# بازبینی گونه *Pyricularia oryzae* و معرفی میزبان‌های جدید این بیمارگر در ایران*

عادل پردل[۱]، محمد جوان نیکخواه[۱]** و سیداکبر خداپرست[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱)

## چکیده

**گونه *Pyricularia oryzae* عامل بلاست برنج یکی از خسارتزاترین و مهمترین بیماری‌های برنج در دنیا می‌باشد. به منظور شناسایی میزبان‌های *P. oryzae* و جدا کردن این گونه از گونه *P. grisea*، در بهار، تابستان و پاییز سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ از گیاهان دارای نشانه‌های بلاست و لکه برگی در مزارع برنج، گندم، جو، ذرت، سورگوم و باغات مرکبات، چای و جنگل‌های نواحی جنوبی دریای خزر- از آستارا در استان گیلان تا گنبد کاووس در استان گلستان- نمونه‌برداری به عمل آمد. از ۸۰ جدایه شناسایی شده، ۵۰ جدایه متعلق به گونه *P. oryzae* و ۳۰ جدایه متعلق به گونه *P. grisea* می‌باشند که با مطالعه ویژگی‌های مورفولوژیکی شناسایی گردید. روابط فیلوژنتیکی دو گونه *P. oryzae* و *P. grisea* براساس توالی نوکلئوتیدی نواحی ژنومی rDNA-ITS و *MCM7* مورد بررسی قرار گرفت و سه گروه اصلی در کلادوگرام حاصل شناسایی شدند. گروه اول شامل گونه‌های *P. oryzae* و *P. grisea* می‌باشند این دو گونه قارچی به لحاظ مورفولوژی و میزبان نیز متمایز می‌گردند. دو گروه دیگر گونه‌های مرتبط با *Magnaporthe sensu lato* را تشکیل می‌دهند. آزمون بیماری‌زایی گونه *P. oryzae* روی بوته‌های ذرت، سوروف، چسبک،گندیل، پاسپالوم و برنج انجام گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که گونه *P. oryzae* روی میزبان‌هایی ذرت، سوروف، چسبک به شدت بیماری‌زا می‌باشد. همچنین در مطالعه حاضر گیاهان ذرت، موز، مرغ، پاسپالوم و گندیل به عنوان میزبان‌های جدیدی برای عامل بیماری بلاست برنج در ایران معرفی می‌گردند.**

**کلیدواژه:** بلاست برنج، بیمارگر، مورفولوژی، فیلوژنی، بیماریزایی

---

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد.

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

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

۲. دانشیارگروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان، رشت.

# Revision of *Pyricularia oryzae* and occurrence of new hosts for the pathogen in Iran*

**A. Pordel[1], M. Javan-Nikkhah[1*], and S. A. Khodaparast[2]**

(Received: 14.4.2015; Accepted: 22.12.2015)

## Abstract

*Pyricularia oryzae* is the causal agent of rice blast disease, the most destructive, and an important disease of rice worldwide. To identify of host plants for *P. oryzae* in the north of Iran, and separation of this species from *P. grisea*, the infected tissues were sampled from rice, corn, sorghum, barley and wheat cultivation regions, tea, citrus orchards, and forest in southern of Caspian Sea from Astara in Guilan province to Gonbad-e Qabus in Golestan province during spring, summers and fall of 2012 and 2013. Out of 80 isolated pathogen, 50 and 30 isolates were identified as *P. oryzae* and *P. grisea* on the basis of morphological characteristics respectively. In order to investigation of phylogenetic relationships of studied isolates, ITS region of ribosomal DNA and *MCM7* were amplified. Three major clades in cladogram of ITS and *MCM7* were identified. Species of the *P. oryzae* and *P. grisea* put in clade one. Species that stand into this group have phylogenetic, morphology and host differences. Two other group associated with *Magnaporthe sensu lato*. Pathogenicity test of *P. oryzae* species were applied on corn (susceptible line B73), barnyard grass, foxtail, rice, eleusine and paspalum in greenhouse. The results showed that this species cause blast and leaf spot symptoms on corn, barnyard-grass, and foxtail. In this study, corn, banana, bermuda grass, paspalum and eleusine are reported as new hosts for the fungus in Iran.

**Keywords:** blast, pathogen, morphology, phylogeny, pathogenicity

---

* A Part of MSc Thesis of the First Author.

** Corresponding author's E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir

1. Ph.D. Student and Prof. of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Assist. Prof. of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran.

## مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.) پس از گندم، مهم‌ترین محصول کشاورزی است و نقش بسیار بارز و چشم‌گیری در تغذیه مردم جهان و ایران دارد. این محصول، بیشترین سطح زیر کشت را در جهان بعد از گندم به خود اختصاص داده است. محل پیدایش برنج را جنوب شرقی قاره آسیا و هندوستان می‌دانند (Webster & Gunnell 1992). 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 محصول این گیاه می‌گردند. بلاست بیشترین اهمیت اقتصادی را در میان بیماری‌های برنج دارد. از نظر میزان خسارت و گستردگی، بلاست، نخستین بیماری برنج در جهان به شمار می‌رود که ضرر و زیان سالانه آن روی برنج حدود ۱۰ تا ۳۰ ٪ برآورد می‌شود. این رقم در زمان‌هایی که شیوع بیماری عادی است، اتفاق می‌افتد، در حالی که در سال‌هایی که اپیدمی رخ دهد، میزان خسارت بسیار بیشتر است (Dean *et al.* 2012).

بیماری بلاست برنج دارای تاریخچه نسبتاً طولانی است که به زمان‌های دور یعنی نیمه اول قرن هفدهم میلادی برمی‌گردد. به نقل از او (Ou 1985) متکالف (Metcalf) در آمریکا، بیماری را از کارولینای جنوبی گزارش کرد و از آن به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های برنج نام برد. در ایران از سال‌ها قبل در استان‌های گیلان و مازندران این بیماری وجود داشت و در اصطلاح محلی به آن «پرسوز» یا «گل خشک» گفته می‌شد. براساس گزارش‌های موجود، نشانه‌ها و نمونه‌های بیماری سال‌ها پیش برای نخستین بار در اطراف لاهیجان مشاهده گردید. هم اکنون این بیماری در داخل کشور، گسترش زیادی دارد و علاوه بر گیلان و مازندران در سایر نقاطی که کشت و کار برنج در آن رواج دارد نیز شیوع پیدا کرده است در ایران خسارت بیماری به طور دقیق معلوم نیست (Behdad 1979, Sharifnabi 2010).

کاوارا (Cavara 1892) *P. oryzae* را از روی برنج شرح داد که تاکسونی با شباهت مورفولوژیکی بالا به *P. grisea* است. علی‌رغم فقدان تفاوت مورفولوژیکی آشکار، این دو تاکسون در دوگونه مجزا نگه داشته شدند (Bussaban *et al.* 2005).

رزمن و همکاران (Rosman *et al.* 1990) قارچ‌های بیمارگر از جنس *Pyricularia* روی برنج و تعدادی زیادی علف‌هرز گرامینه‌ای و میزبان‌های غیرگرامینه‌ای را که از لحاظ مورفولوژیکی تفاوتی نداشتند را یکی دانسته و تحت یک گونه *P. grisea* قرار دادند. به اعتقاد آنها، تفاوت کافی برای تفکیک دو گونه از هم وجود ندارد زیرا اولاً تلاقی جدایه‌های جدا شده از برنج و میزبان‌های غیر برنج منتهی به تولید فرم جنسی می‌گردد که حاکی از وجود ارتباط ژنتیکی بین دو دسته از جدایه‌هاست و ثانیاً مطالعه نمونه‌های تیپ در هرباریوم، شباهت مرفولوژیک جدایه‌های دو گروه را تأیید می‌کند. بر همین اساس *P. grisea* (Cooke) Sacc. را به علت تقدم نام به عنوان اسم صحیح مرحله غیر جنسی ایجاد شده توسط هر دو گروه از جدایه‌ها (جدایه‌های برنج و جدایه‌های غیر برنج) معرفی نمودند. این اسم از طرف محققین پذیرفته شده و به طور گسترده در نوشته‌های علمی به کار می‌رفت.

در سال‌های اخیر اختلاف نظر در مورد نام گونه‌ای که عامل بلاست برنج است، به وجود آمده است. تعدادی از محققین گونه *Magnaporthe oryzae* با آنامورف *P.*

*oryzae* را عامل بلاست برنج می دانند و گونه *M. grisea* با آنامورف *P. grisea* از روی علف هرز علف‌انگشتی (*Digitaria* spp.) شناسایی شده است. برای این منظور اخیرا مطالعات قابل توجهی مبتنی بر آنالیز DNA در مورد جنس *Pyricularia* و گونه عامل بلاست برنج انجام شده است (Yamagashira *et al.*2008، Park & Shin 2009، Borromeo *et al.* 1993، Hirata *et al.* 2007، Couch & Kohn 2002).

کوچ و کوهن (Couch & Kohn 2002) با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن‌های کالمودولین، بتاتوبولین و اکتین مشخص کردند که قارچ بیمارگر روی علف هرز علف انگشتی یک گروه مجزا از جدایه‌های برنج و چندین میزبان دیگر را تشکیل می‌دهد. همچنین تلاقی جنسی بین جدایه‌های به دست آمده از علف انگشتی و برنج در آزمایشگاه ناموفق بوده و به تولید آسک منجر نگردید. در حالی که تلاقی جنسی بین جدایه‌های مختلف به دست آمده از علف‌انگشتی با هم منجر به تولید آسکوکارپ گردید و آسکوسپورها قادر به جوانه‌زنی بوده‌اند. همچنین تلاقی آمیزشی بین جدایه‌های برنج و برخی علف‌های هرز نیز موفقیت‌آمیز بوده است. با توجه به قوانین نامگذاری، نام *M. grisea* (با آنامورف *P. grisea*) را فقط برای جدایه‌های روی علف انگشتی حفظ نمودند و جدایه‌های روی برنج و تعدادی علف‌های هرز مثل گندیل (*Elusine indica*)، چچم (*Lolium perenne*)، اروای (*Agrostis* sp.) و علف هرز چسبک (*Setaria* sp.) را به عنوان گونه *M. oryzae* (با آنامورف *P. oryzae*) نامگذاری و معرفی نمودند. چوی و همکاران (Choi *et al.* 2013) موفق به آلوده سازی برنج توسط گونه *P. grisea* و علف انگشتی توسط *P. oryzae* شدند.

براساس مطالعات مبتنی بر DNA، نام*Magnaporthe* برای گونه تیپ *M. salvinii* و نام*Pyricularia* برای دو گونه *P. oryzae* و *P. grisea* براساس تقدم نسبت به جنس *Magnaporthe* استفاده می‌شود. لازم به ذکر است که با توجه به قدمت نام *Nakataea* نسبت به *Magnaporthe* برای گونه قارچی *M. salvinii* از نام *Nakataea* استفاده می‌شود (Murata *et al.* 2014, Luo & Zhang 2013).

در سال‌های اخیر مطالعات جالب توجهی در زمینه تنوع ژنتیکی، گروه‌های سازگار رویشی و تیپ‌های آمیزشی *Magnaporthe oryzae* در ایران انجام شده است (Javan- Nikkhah *et al.* 2004, Mousanejad *et al.* 2004). سلیمی (Salimi *et al.* 2013) با استفاده از پنج نشانگر مولکولی SSR به بررسی تنوع ژنتیکی و مطالعه ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ عامل بلاست در یک مزرعه در شمال ایران پرداخت. با توجه به نتایج این تحقیق و مطالعات محققین پیشین، عدم ردیابی و شناسایی هر دو الل تیپ آمیزشی قارچ عامل بلاست و عدم مشاهده تولید مثل جنسی در طبیعت به نظر می‌رسد، وجود تنوع زیاد در ارقام مختلف برنج و مساعد بودن شرایط آب و هوایی برای تکثیر غیرجنسی و طبیعتا بروز نوترکیبی غیرجنسی از طریق پدیده شبه‌جنسی در کنار سازگاری رویشی مهمترین عوامل در بروز تغییرات ژنتیکی قارچ عامل بلاست در سطح یک مزرعه برنج در استان گیلان محسوب می‌شوند.

با توجه به موارد ذکر شده، مطالعه مرفولوژیکی و فیلوژنتیکی متمرکزی برای تعیین حدود و ثغور گونه *P. oryzae* و تفکیک آن از گونه *P. grisea* در ایران انجام نشده است و همچنین این گونه قارچی تنها از روی میزبان برنج، چسبک، سوروف و تحت نام *P. grisea* در

ایران گزارش شده است (Ershad 2009). تحقیق حاضر به منظور مطالعه مرفولوژیکی و فیلوژنتیکی گونه *P. oryzae* به دست آمده از میزبان‌های مختلف و همچنین شناخت میزبان‌های این بیمارگر و بررسی بیماری‌زایی *P. oryzae* روی این میزبان‌های گیاهی انجام شده است.

## روش بررسی

### جمع‌آوری نمونه و جداسازی جدایه‌ها

در بهار، تابستان و پاییز سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ از مزارع برنج، گندم، جو، ذرت، سورگوم و باغات مرکبات، چای و جنگل‌های نواحی جنوبی دریای خزر (از آستارا تا گنبد کاووس) نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌برداری از بافت‌های گیاهان دارای نشانه‌های بلاست و لکه‌برگی به صورت تصادفی انجام پذیرفت. اندام‌های گیاهی مشکوک به آلودگی دو الی سه روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بین کاغذ خشک کن قرار گرفتند و سبز خشک شدند. سپس درون پاکت‌های کاغذی جداگانه با ثبت مشخصات (مکان جمع‌آوری و تاریخ جمع‌آوری) درون یخچال با دمای چهار درجه سیلسیوس نگه‌داری گردیدند. برای جداسازی قارچ بیمارگر از اندام‌های گیاهی نمونه‌ها به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه تهران منتقل شدند و هر قسمت به صورت جداگانه کشت شد. ابتدا بخش‌هایی از بافت‌های آلوده با اسکالپل به قطعات کوچکتری بریده شدند و به مدت یک دقیقه در هیپوکلریت سدیم رقیق شده ۱۰ درصد (نیم درصد کلر فعال) ضد عفونی سطحی گردیدند. سپس از آب مقطر استریل به منظور شستشو عبور داده شدند، پس از رطوبت‌گیری نمونه‌ها در کاغذ صافی سترون، قطعات تقریبی به اندازه یک سانتی‌مترمربع از قسمت‌های آلوده به همراه نواحی سالم بافت گیاهی به تشتک‌های پتری حاوی محیط‌های کشت WA دو درصد (۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) و PDA (۳۹ گرم PDA تجاری در یک لیتر آب) و دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل گردیدند. قارچ رشد کرده به روش تک کنیدیوم روی محیط کشت WA دو درصد خالص‌سازی شد.

به علاوه، از روش کشت در محیط کاغذ صافی مرطوب نیز جهت جداسازی قارچ‌های مورد نظر استفاده شد. بدین منظور اندام‌های گیاهی با یا بدون ضدعفونی سطحی به تشتک‌های پتری‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب و سترون، تحت شرایط تاریکی یا نور نزدیک به فرابنفش و دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل گردیدند. پس از باردهی و جداسازی و خالص‌سازی بیمارگر ، جدایه‌ها روی محیط غذایی PDA کشت شدند. ده روز پس از کشت جدایه‌ها، رنگ و شکل پرگنه آنها مورد بررسی قرار گرفت.

### ارزیابی مرفولوژیکی

جهت بررسی خصوصیات میکروسکوپی از قبیل طول و عرض کنیدیفور، طول، عرض، بند عرضی و شکل کنیدیوم، هر جدایه در تشتک‌های حاوی محیط کشت اختصاصی WA ۲٪ به همراه برگ سترون برنج و تشتک حاوی محیط کشت اختصاصی WA ۲٪ به همراه برگ سترون چسبک کشت شد. سپس تشتک‌ها به داخل انکوباتور با دمای ۲۵-۲۰ درجه سیلسیوس و تحت شرایط NUV متناوب (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) و همچنین تحت شرایط نور فلورسنت متناوب (۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی) انتقال یافتند. پس از گذشت ۲۴-۱۵ روز با استفاده از لاکتوفنول، از جدایه‌های مورد نظر اسلاید میکروسکوپی تهیه گردید.

اندام‌های قارچی جهت تهیه اسلاید از پنج نقطه مختلف پرگنه برداشته شد. حداقل ۵۰ عدد از هر اندام قارچی (کنیدیوفور و کنیدیوم) در چند نمونه میکروسکوپی بررسی و اندازه‌گیری شدند. از صفات مذکور با استفاده از میکروسکوپ نوری الیمپوس مدل BH2 عکس تهیه گردید. برای شناسایی گونه قارچی، از منابع شناسایی معتبر از قبیل مقالات و کلیدها استفاده گردید (Ellis 1971 & 1976, Mckenzie *et al.* 2010).

## تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

در این تحقیق براساس خصوصیات مورفولوژیکی، ۵ جدایه از میزبان‌های ذرت (*Zea mays*)، برنج (*Oryza sativa*)، سوروف (*Echinochloa crus-galli*)، چسبک (*Setaria viridis*) و پاسپالوم (*Paspalum distichum*) از گونه *Pyricularia oryzae* و یک جدایه از میزبان علف‌انگشتی (*Digitaria sanguinalis*) از گونه *P. grisea* برای ناحیه ژنومی ITS و از هر گونه یک جدایه برای ناحیه ژنی *MCM7* انتخاب شدند. پس از استخراج دی ان ای ژنومی (Zhong *et al.* 2001)، برای تکثیر ناحیه آی تی اس هسته‌ای و ژن *MCM7* (DNA replication licensing factor) به ترتیب از ترکیب آغازگرهای ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') و MCM7-709 (5'- ACIMGIGTITCVGAYGTHAARCC -3') و MCM7-1348 (5'-GAYTTDGCIACICCIGGRTCWCCCAT -3') به عنوان آغازگرهای مستقیم (forward) و معکوس (reverse) استفاده شد (White *et al.* 1990, Zhang *et al.* 2011). واکنش PCR در مخلوط 20 µl (2/25X PCR buffer، 5 mM MgCL2، 0.2 mM dNTP، 0.5 pM of each Primer، 2.5 U Taq-polymerase) انجام گردید و تکثیر در دستگاه ترموسایکلر با برنامه حرارتی شامل واسرشتگی مقدماتی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۲ دقیقه؛ ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سلسیوس، ۶۰ ثانیه؛ چسبیدن آغازگرها به ناحیه هدف در ۵۷ درجه سلسیوس، ۶۰ ثانیه؛ گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس، ۶۰ ثانیه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس، ۱۰ دقیقه انجام شد (Zhang *et al.* 2011). محصول PCR از ژل آگاروز ۱/۵ درصد با بافر TBE 1X در یک میدان الکتریکی با ولتاژ ۹۰ ولت در دستگاه الکتروفورز عبور داده شد.

خالص‌سازی و توالی‌یابی توسط شرکت BIONEER کره انجام گردید. 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 شدند. روابط فیلوژنی میان جدایه‌های جمع‌آوری شده همراه با توالی تعدادی دیگری از جدایه‌های گرفته شده از بانک ژن به روش NJ (Neighbor-Joining) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و درخت فیلوژنتیکی رسم شد. اعتبار شاخه با انجام اعتبارسنجی (Bootstrap) در ۱۰۰۰ تکرار مورد سنجش قرار گرفت و ارزش بیشتر از ۵۰ روی درخت فیلوژنی نشان داده شد. تجزیه و تحلیل و رسم درخت فیلوژنتیکی و با نرم‌افزار MEGA4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, v 4.0) انجام گردید (Tamura *et al.* 2007).

**آزمون بیماریزایی**

به منظور انجام آزمون بیماری‌زایی، در تیرماه سال ۱۳۹۱ بذور ذرت (لاین حساس B73) از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، بخش تحقیقات ذرت و گیاهان علوفه‌ای تهیه گردید. بذور علف هرز سوروف، چسبک، گندیل و پاسپالوم از حاشیه مزارع و باغات تهیه گردید. نشا برنج از خزانه‌های شالی دانشکده کشاورزی ساری تهیه گردید. بذور مذکور به وسیله قارچکش مانکوزب ۰/۲ ٪ ضدعفونی شدند. به ازای هر جدایه چهار گلدان حاوی خاک لوم-رسی (سه تکرار و یک شاهد) در نظر گرفته شد. برای تولید اسپور فراوان گونه*P. oryzae* جهت مایه‌زنی، قطعاتی از کاغذ صافی جدایه‌های نگهداری شده روی محیط کشت PDA قرار گرفتند و زمانی که پرگنه‌ها به حد کافی رشد کردند، زیرکشت‌هایی از هر جدایه متعلق به میزبان‌های ذکر شده به محیط کشت آب-آگار + برگ سترون برنج انتقال یافت. برای هر جدایه ۵ تشتک پتری حاوی این محیط کشت در نظر گرفته شد و به هر تشتک یک زیرکشت در ابعاد یک در یک سانتیمتر منتقل شد. تشتک‌ها به انکوباتور با دمای ۲۵-۲۰ درجه سلسیوس مجهز به نور NUV با تناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی به مدت ۲۴-۱۵ روز انتقال یافتند. همچنین، چند جدایه تحت نور فلورسنت با تناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی به مدت ۲۴-۱۵ و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند.

برای تهیه سوسپانسیون اسپور، ابتدا مقداری آب مقطر سترون داخل تشتک پتری روی پرگنه واجد اسپور ریخته شد و اسپور و میسلیوم با خراش دادن سطح پرگنه توسط اسکالپل جمع آوری گردید و به درون استوانه مدرج ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی لیتر آب مقطر سترون ریخته شد. در ادامه، دهانه ظرف با پارافیلم مسدود و به خوبی تکان داده شد تا سوسپانسیون یکنواخت بدست آید. پارافیلم را برداشته و سوسپانسیون از توری دو لایه که روی یک ظرف ارلن تمیز قرار گرفته بود عبور داده شد. یک تکه پارافیلم روی دهانه این ظرف قرار داده و بخوبی تکان داده شد تا سوسپانسیون نهایی آماده گردد (Pratt *et al.* 2006).

غلظت سوسپانسیون با کمک لام هموسیتومتر تعیین شد. غلظت سوسپانسیون اسپور $5\times10^5$ اسپور در میلی‌لیتر آب تهیه شد (You *et al.* 2012). اسپورپاشی در مرحله چهار الی شش برگی گیاهچه‌ها انجام گردید. عمل مایه‌زنی سه بار تکرار شد. ۵۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون به ازای سه تکرار هر جدایه در نظر گرفته شد که داخل ظرف ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شدند. داخل هر ظرف، ۱۰ میکرولیتر توئین ۲۰ اضافه شد و ظرف به آرامی تکان داده شد (Valjavec-Gratian *et al.* 1997, Nanayakkara & Uddin 2007). توئین سبب پخش بهتر سوسپانسیون اسپورها می‌شود (Lamari & Bernier 1989). عمل مایه‌زنی به صورت اسپری و با کمک آب فشان روی گیاهچه‌ها صورت گرفت.

## نتایج

### ویژگی‌های مورفولوژیکی جدایه‌ها

در این تحقیق ۸۰ جدایه از گونه *P. oryzae* از میزبان‌های مختلف و ۳۰ جدایه از گونه *P. grisea* از میزبان علف‌انگشتی (*Digitaria* sp.) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

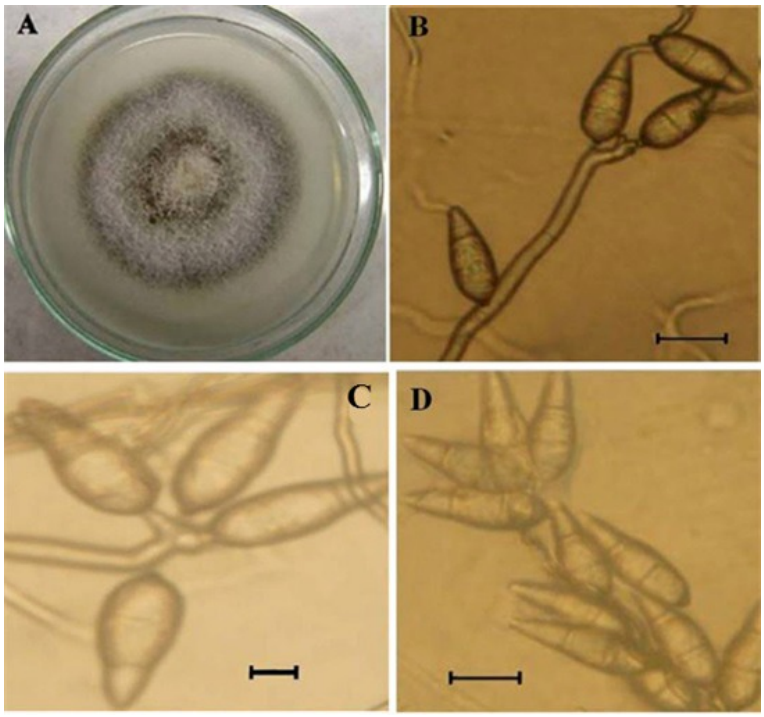
با بررسی خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌های به

**جدول ۱. مشخصات جدایه‌های گونه *Pyricularia oryzae* به دست آمده از برنج و میزبان‌های دیگر و گونه *P. grisea* به دست آمده از *Digitaria sanguinalis* از مناطق مختلف ایران در سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲**

**Table 1. Hosts and geographic origin of *Pyricularia oryzae* species collected from rice and other hosts and *P. grisea* species collected from *Digitaria* sp. during 2012–2013 in Iran**

| Species | No. isolates | Host | Geographical origin |
|---|---|---|---|
| *Pyricularia oryzae* | 80 | Rice, maize, muse, *Echinochloa cruss-galli, Eleusine indica, Setaria viridis, Cynodon dactylon, Paspalum scrobiculatum* | Amol, Rasht, Astara, Gorgan, Kordkuy, Gharakheil, Lahijan, Sari, Galugah, Tuskestan, Siahkal |
| *P. grisea* | 30 | *Digitaria* sp. | Amol, Rasht, Astara, Gorgan, Chalus, Kordkuy |

دست آمده از میزبان‌های ذرت (*Zea mays*)، برنج (*Oryza sativa*)، گندیل (*Eleusine indica*)، سوروف (*Echinochloa crus-galli*)، چسبک (*Setaria viridis*)، مرغ (*Cynodon dactylon*)، پاسپالوم (*Paspalum distichum*) و موز (*Musa acuminata*)،گونه *P. oryzae* شناسایی شدند. پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ خاکستری می‌باشد. کنیدیوفورها منفرد به رنگ قهوه‌ای روشن و طول آنها تقریبا ۲۵۰ – ۱۰۰میکرومتر می‌باشد (شکل ۱B). سلول کنیدی‌زا زانویی و زائده‌دار می‌باشد. کنیدیوم‌ها گلابی شکل وارونه، به رنگ قهوه‌ای روشن، دارای دو دیواره عرضی و ابعاد ۱۰–۷ × ۲۵–۱۶ میکرومتر می‌باشند (شکل ۱C).




**شکل ۱– *Pyricularia oryzae* (جدایه ZG1): A) پرگنه، B) کنیدیوفور، C-D)کنیدیوم (مقیاس= ۱۰ میکرومتر).**

**Fig. 1. *Pyricularia oryzae* (the isolate ZG1): A) colony, B) conodiophore, C-D) conidia (Bar= 10 µm).**

جدول ۲. منبع و رس شماره‌های جدایه‌های *Pyricularia oryzae* و *P. grisea* مورد استفاده در آنالیز فیلوژنتیکی.

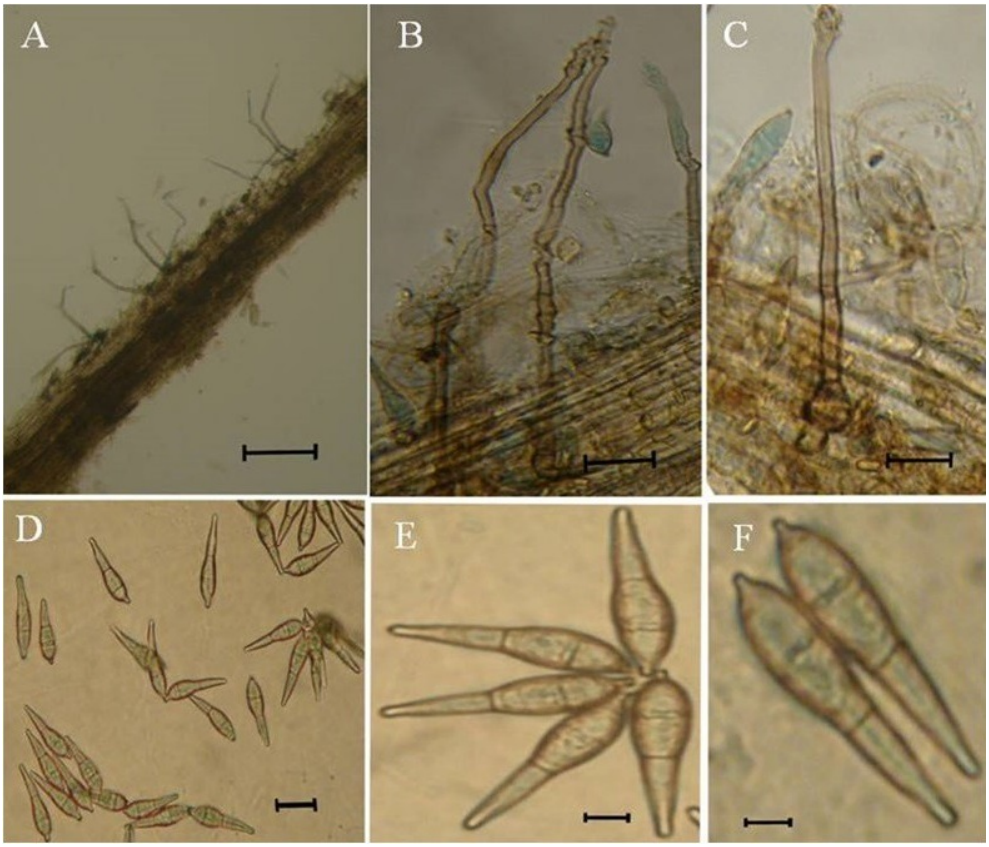
**Table 2. Source and accession numbers of *Pyricularia oryzae* and *P. grisea* isolates included in phylogenetic analysis.**

| Species | Isolate/Strain | Source | GenBank ITS | GenBank *MCM7* |
|---|---|---|---|---|
| *Pyricularia oryzae* | Rr2 | This study | KP144441 | - |
| *P. oryzae* | Zg1 | This study | KP144442 | KP728839 |
| *P. oryzae* | Pam1 | This study | KP144440 | - |
| *P. oryzae* | Echino | This study | KP144439 | - |
| *P. oryzae* | Seth | This study | KP144443 | - |
| *P. oryzae* | PH0014 | IRRI[a] | KM484911 | - |
| *P. oryzae* | GN0001 | J.-L. Notteghem[a] | KM484903 | - |
| *P. oryzae* | PH0079 | J. M. Bonman[b] | KM484819 | - |
| *P. oryzae* | BF0028 | J.-L. Notteghema | KM484886 | - |
| *P. oryzae* | JP0028 | H. Yaegashia | KM484906 | - |
| *P. oryzae* | PH0035 | IRRI[a] | KM484912 | - |
| *P. oryzae* | CD0067 | J.-L. Notteghem [a] | KM484896 | - |
| *P. oryzae* | M61 | Zhang [c] | - | JF710399 |
| *P. oryzae* | M61 | Zhang [c] | - | JN993354 |
| *P. oryzae* | M60 | Zhang [c] | - | JF710398 |
| *P. oryzae* | M25 | Zhang [c] | - | JF710397 |
| *P. grisea* | BR0029 | B J.-L. Notteghem [a] | KM484880 | - |
| *P. grisea* | US0043 | B. Valent[a] | KM484885 | - |
| *P. grisea* | CBS 128304 | H.K. Sim[a] | KM484881 | - |
| *P. grisea* | CR0024 | C.K. Kim[a] | KM4848882 | - |
| *P. grisea* | JP0034 | Klaubauf[a] | KM484883 | - |
| *P. grisea* | PH0055 | IRRI[a] | KM484884 | -- |
| *P. grisea* | Dch1 | This study | KP144438 | KP728838 |
| *P. grisea* | M82 | Zhang [c] | - | JX134710 |
| *P. grisea* | M83 | Zhang [c] | - | JX134711 |
| *Nakataea oryzae* | Ms | This study | KP144444 | KP728840 |
| *Nakataea oryzae* | N sig | This study | KP144445 | - |
| *Nakataea oryzae* | CBS 202.47 | Klaubauf[a] | KM484860 | - |
| *Nakataea oryzae* | ATCC 44754 | Zhang [c] | JF414838 | - |
| *Nakataea oryzae* | M21 | Zhang [c] | - | JF710382 |
| *Nakataea oryzae* | M69 | Zhang [c] | - | JX134712 |
| *Nakataea oryzae* | M71 | Zhang [c] | - | JX134713 |
| *Magnaporthiopsis rhizophila* | M23 | Zhang [c] | JF414834 | JF710383 |
| *M. poae* | M47 | Zhang [c] | JF414836 | JF710390 |
| *Gaeumannomyces graminis var. tritici* | M55 | Zhang [c] | - | JF710395 |
| *Gaeumannomyces graminis* | GGG317 | Saleh[d] | AY428782 | - |

[a] Evolutionary Phytopathology, CBS-KNAW, Fungal Biodiversity Centre, Uppsalalaan 8, Utrecht, UT 3584 CT, the Netherlands.
[b] Department of Biotechnology, University of Kashmir, Hazratbal, Srinagar, Sringar, Jammu and Kashmir 190006, India.
[c] Department of Plant Biology and Pathology,Foran Hall 201, Rutgers University, 59 Dudly road, New Brunswick, NJ 08901, USA
[d] Plant Pathology, Kansas State University, 4024 Throckmorton Hall, Manhattan, KS 66506, USA

ازگونه *P. oryzae* جدایه‌های ZG1 (جدا شده از مازندران)، SetH (جدا شده از گلستان)، RR2 (جدا شده از گیلان )، PAM1 و EA ( جدا شده از مازندران) به عنوان نماینده این گونه برای مطالعات فیلوژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲).

با بررسی مورفولوژیکی جدایه به دست آمده از



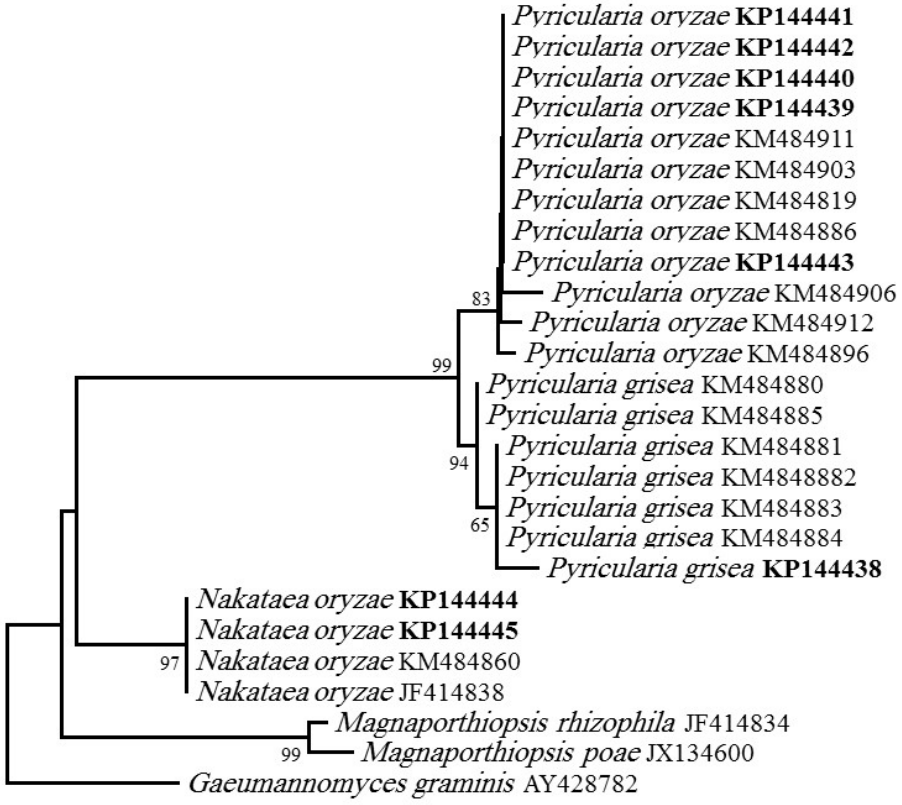

**شکل ۲- *Pyricularia grisea* (جدایه Dch1): A-C) کنیدیوفور، D-F) کنیدیوم (مقیاس= ۱۰ میکرومتر).**

**Fig. 2. *Pyricularia grisea* (the isolate Dch1): A-C) conodiophore, D-F) conidia (Bar= 10 µm).**

علف‌انگشتی (*Digitaria* sp.) گونه *P. grisea* شناسایی گردید. پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA به رنگ خاکستری می‌باشد. کنیدیوفورها منفرد به رنگ قهوه‌ای روشن و طول آنها تقریبا ۱۷۵-۷۰ میکرومتر می‌باشد (شکل ۲A-C). سلول کنیدیوم‌زا زانویی و زائده‌دار می‌باشد. کنیدیوم‌ها گلابی شکل وارونه، به رنگ قهوه‌ای روشن، دارای دو دیواره عرضی و ابعاد ۸-۶× ۳۱- ۲۶ میکرومتر می‌باشند (شکل ۲ D-F). از جدایه Dch1 به عنوان نماینده این گونه در مطالعات فیلوژنتیکی استفاده گردید (جدول ۲).

## تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک

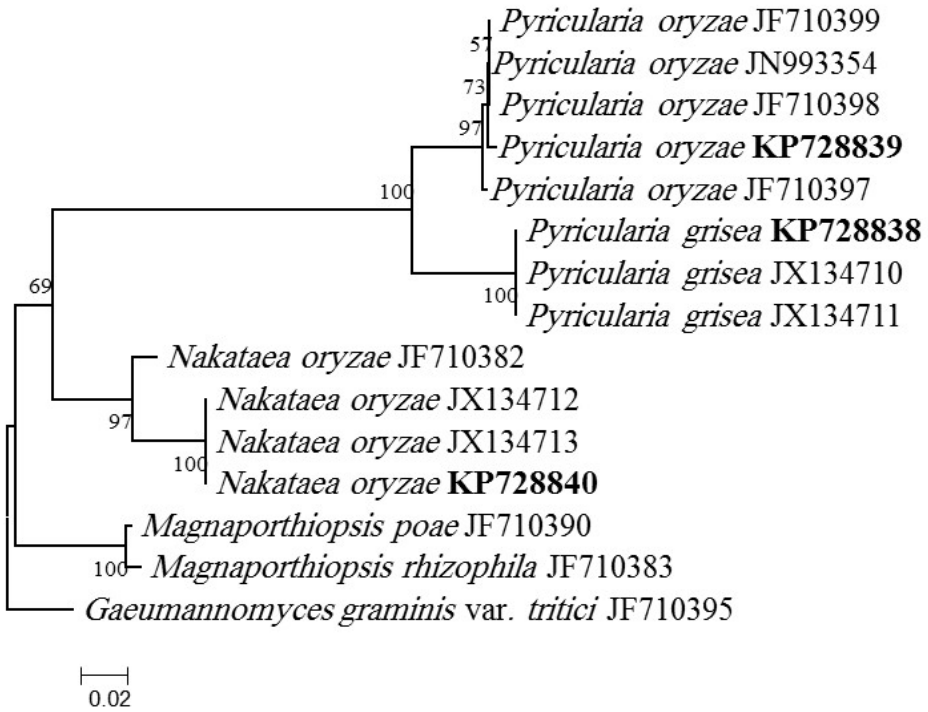
تجزیه و تحلیل کل داده‌ها (نوکلئوتیدها + فاصله‌ها) انجام شد و اطلاعاتی حذف نگردید. طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه (ITS) ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای و ژن *MCM7* توالی‌یابی شده در جدایه‌های مختلف به ترتیب بین ۵۳۱-۵۶۴ و ۶۰۰-۶۵۰ جفت باز متغیر بود. در درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده با روش Neighbor-Joining براساس توالی ناحیه rDNA, ITS و *MCM7* سه گروه اصلی شناسایی گردید. جدایه‌های توالی‌یابی شده ناحیه ITS از گونه‌های *P. oryzae* و *P. grisea* (با اعتبارسنجی ۹۹ درصد در روش Neighbor-Joining)، در کلادوگرام حاصل از ناحیه ITS، و همچنین جدایه‌های توالی‌یابی شده ناحیه ژنی *MCM7* از گونه‌های *P. oryzae* و *P. grisea* (با اعتبارسنجی ۱۰۰ در روش Neighbor-Joining)، در کلادوگرام حاصل از




**شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه ITS با روش NJ ( neighbor-joining) برای ۲۶ تاکسون. اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی (bootstrap) از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. طول شاخه با تعداد تغییرات باز که به صورت مقیاس بار نشان داده شده است. متناسب می‌باشد. گونه *Gaeumannomyces graminis* AY428782 به عنوان outgroup انتخاب شده است.**

**Fig. 3. A neighbor-joining tree inferred from the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA sequences for 26 species. 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. *Gaeumannomyces graminis* AY428782.**

ناحیه ژنی *MCM7*، یک گروه مونوفیلتیک را تشکیل می‌دهند. این گروه مونوفیلتیک در این دو ناحیه ژنی به دو زیر گروه تقسیم می‌شود. جدایه‌های *P. oryzae* (با اعتبارسنجی ۸۳ درصد در روش Neighbor-Joining و ۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی با جدایه‌های استاندارد براساس ناحیه ITS و با اعتبارسنجی ۹۷ درصد در روش Neighbor-Joining و ۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی با جدایه‌های استاندارد براساس ناحیه ژنی *MCM7*) زیر گروه اول را تشکیل می‌دهند. جدایه‌های *P. grisea* (با اعتبارسنجی ۹۴ در روش Neighbor-Joining و ۱۰۰درصد تشابه نوکلئوتیدی با جدایه‌های استاندارد براساس ناحیه ITS؛ و با اعتبارسنجی ۱۰۰ در روش Neighbor-Joining و ۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی با جدایه‌های استاندارد براساس ناحیه ژنی *MCM7*) زیر گروه دوم را تشکیل می‌دهد (شکل‌های ۳ و ۴). دو گروه دیگر مشخص شده در درخت فیلوژنتیکی را گونه‌های مرتبط با *Magnaporthe sensu lato* تشکیل می‌دهند که با اعتبار سنجی ۹۷ و ۹۹ درصد (گروه دوم را گونه *Nakataea oryzae* و گروه سوم را *Magnaporthiopsis rhizophila* به همراه *M. poae*) در درخت فیلوژنتیکی




**شکل ٤- درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه ژنی *MCM7* با روش NJ ( neighbor-joining) برای ۱۵ تاکسون. اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی (bootstrap) از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. طول شاخه با تعداد تغییرات باز که به صورت مقیاس بار نشان داده شده است. متناسب می‌باشد. گونه *Gaeumannomyces graminis* JF710395 به عنوان outgroup انتخاب شده است.**

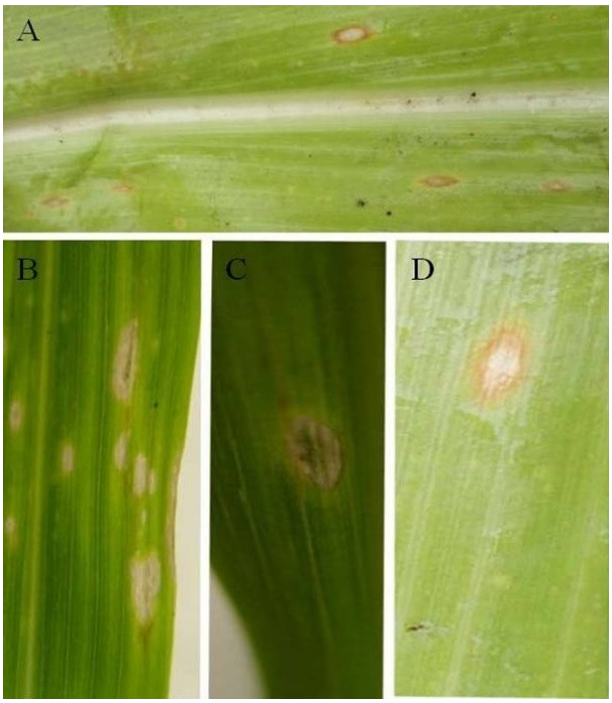
**Fig. 4. A neighbor-joining tree inferred from the *MCM7* sequences for 15 species. The numbers above the branches show the bootstrap values in 1000 replicates. The length of branches is proportional to the number of base changes, indicated by the scale bar. *Gaeumannomyces graminis* JF710395.**

مشخص شده‌اند.

## آزمون بیماری‌زایی

از میان جدایه‌های گونه *P. oryzae* بدست آمده از میزبان‌های گیاهی ذرت، سوروف و چسبک که جهت انجام آزمون بیماری‌زایی روی بوته‌های برنج استفاده شدند، بیماری‌زایی هیچ یک روی برنج اثبات نگردید.

بیماری‌زایی گونه *P. oryzae* بدست آمده از میزبان ذرت روی بوته‌های ذرت در شرایط گلخانه انجام شد. اولین علائم بیماری سه روز پس از مایه‌زنی بصورت لکه‌های کوچک و خاکستری در سطح برگ ظاهر شدند. پس از گذشت سه الی چهار روز، لکه‌های کشیده و دوکی شکل به آسانی قابل رویت بودند (شکل ۵B-D). با گذشت دو هفته بعد از مایه‌زنی، تغییر خاصی از نظر ابعاد و تعداد لکه‌های ایجاد شده رخ نداد. برخی برگ‌ها در اثر شدت آلودگی کاملا پژمرده و خشک شدند. همچنین بیماری‌زایی گونه *P. oryzae* جدا شده از روی چسبک روی بوته‌های چسبک در شرایط گلخانه انجام شد. علائم ایجاد شده توسط گونه *P. oryzae* چهار روز پس از مایه‌زنی به صورت لکه‌های دوکی شکل، کشیده و سفید رنگ با حاشیه تیره در سطح برگ بوته‌های تحت تیمار ظاهر شدند (شکل ۶B-D). با گذشت دو هفته بعد از مایه‌زنی لکه‌ها کشیده‌تر می‌شوند. همچنین بیماری‌زایی گونه *P. oryzae* جدا شده از میزبان سوروف، روی

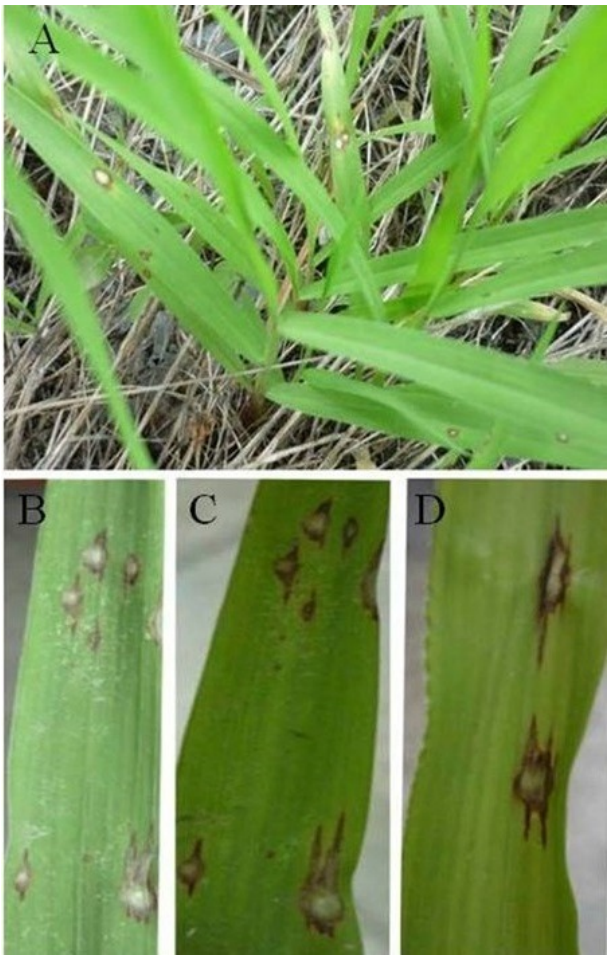



**شکل ۵- علائم لکه‌برگی ناشی از گونه *Pyricularia oryzae* روی بوته‌های ذرت: A) نمونه‌های لکه‌برگی جمع‌آوری شده در مزارع ذرت، B-D) لکه‌های حاصل از آزمون بیماری‌زایی در شرایط گلخانه.**

**Fig. 5. Symptoms of leaf spot caused by *Pyricularia oryzae* on *Zea mays*: A) leaf spot symptoms on naturally infected maize in field. B-D) leaf spot symptoms on maize under greenhouse conditions.**

بوته‌های سوروف در شرایط گلخانه انجام شد، علائم ایجاد شده توسط گونه *P. oryzae* چهار روز پس از مایه‌زنی به صورت لکه‌های دوکی شکل، کشیده و سفید رنگ با حاشیه تیره در سطح برگ بوته‌های تحت تیمار ظاهر شدند (شکل ۷B). با گذشت دو هفته بعد از مایه‌زنی، لکه‌هاکشیده‌تر گردیدند. علائم ایجاد شده روی ساقه به صورت لکه‌های کشیده، خاکستری در مرکز و حاشیه به رنگ قهوه‌ای کم رنگ می‌باشد. علائم روی ساقه بسیار شدید می‌باشد (شکل ۷A).

از میان ۶ جدایه *P. oryzae* جدا شده از میزبان‌های گیاهی گندیل و پاسپالوم که جهت انجام آزمون




**شکل ٦- علائم لکه‌برگی ناشی از گونه *Pyricularia oryzae* روی برگ های گیاه چسبک: A) نمونه‌های لکه‌برگی جمع‌آوری شده از اطراف مزارع و باغات، B-D) علائم لکه برگی تحت شرایط گلخانه.**

**Fig. 6. Symptoms of leaf spot caused by *Pyricularia oryzae* on *Setria* sp. : A) leaf spot symptoms on naturally infected in field and orchards. B-D) leaf spot symptoms on *Setaria* sp. under greenhouse conditions.**

بیماری‌زایی استفاده شدند، بیماری‌زایی هیچ یک روی این دو گونه گیاهی و برنج مشاهده نگردید.

## بحث

براساس بررسی‌های مرفولوژیکی مشخص شد که *P. grisea* نزدیک‌ترین گونه به *P. oryzae*، می‌باشد. گونه

**شکل ۷- علائم لکه‌برگی ناشی از گونه *Pyricularia oryzae* روی بوته‌های سوروف: A) علائم روی ساقه سوروف، B) علائم حاصل از آزمون آزمون بیماریزایی در شرایط گلخانه.**

**Fig. 7. Symptoms of leaf spot by *Pyricularia oryzae* on *Echinochloa crusgall*: A) leaf spot symptoms on naturally infected on stem B) leaf spot symptoms on *Echinochloa crusgall* under greenhouse conditions.**

*P. oryzae* بر اساس ابعاد کنیدیوم ۱۰-۷ × ۲۵-۱۶ میکرومتر از گونه *P. grisea* با ابعاد کنیدیوفور و کنیدیوم ۸-۶× ۳۱- ۲۶ میکرومتر قابل تفکیک است. گونه *P. grisea* گونه‌ای معمول روی گیاه علف انگشتی (*Digitaria sanguinalis*) است و از روی بسیاری از گیاهان از جمله گندیل، مرغ و غیره جداسازی شده است (Ellis 1971). اگرچه در ابتدا به دلیل شباهت ریخت‌شناسی به عنوان عامل بلاست برنج در نظر گرفته شده است. ویژگی‌های ریخت‌شناسی این گونه و مطالعات براساس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک نشان داد که قارچ روی علف هرز علف انگشتی یک گروه مجزا از جدایه‌های برنج و چندین میزبان دیگر است. بنابراین، این دو گونه به لحاظ ریخت‌شناسی، فیلوژنی و میزبان از یکدیگر قابل تفکیک هستند (Couch & Kohn 2002).

کوچ و کوهن با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ژن‌های کالمودولین، بتاتوبولین و اکتین مشخص کردند، که قارچ بیمارگر روی علف هرز گل‌انگشتی یک گروه مجزا از جدایه‌های برنج و چندین میزبان دیگر را تشکیل می‌دهد. همچنین تلاقی به دست آمده از گل‌انگشتی و برنج ناموفق بوده و به تولید آسک منجر نگردید. در حالی که تلاقی بین جدایه‌های مختلف به دست آمده از گل‌انگشتی منجر به تولید آسکوکارپ گردید و آسکوسپورها قادر به جوانه‌زنی بودند. همچنین تلاقی آمیزشی بین جدایه‌های برنج و برخی از علف‌های هرز نیز موفقیت‌آمیز بوده است. آنها با توجه به قوانین نامگذاری، نام *M. grisea* (با آنامورف *P. grisea*) فقط برای جدایه‌های روی علف انگشتی حفظ نمودند و جدایه‌های روی برنج و بسیاری از علف‌های هرز مثل گندیل (*Elusine indica*)، چچم (*Lolium perenne*)، ارزوای (*Agrostis* sp.) و چسبک (*Setaria viridis*) را به عنوان گونه *M. oryzea* (با آنامورف *P. oryzae*) نامگذاری و معرفی نمودند (Couch & Kohn 2002). این دو گونه علاوه بر تفاوت فیلوژنتیکی با توجه به دو ناحیه ژنی استفاده شده، به لحاظ خصوصیات مورفولوژی از قبیل اندازه کنیدیوم و کنیدیوفور و میزبان جدا شده متفاوت می‌باشند. گونه *P. grisea* از روی میزبان گیاهی علف انگشتی جدا شد در صورتی که گونه *P. oryzae* از روی برنج و سایر میزبان‌ها (گیاه برنج و گیاهان هرز به غیر علف انگشتی) جداسازی گردید (شکل‌های ۳ و ۴).

آزمون بیماری‌زایی نشان داد که گونه *P. oryzae* روی میزبان‌های جدا شده به خوبی بیماری‌زا می‌باشد. با توجه

به آزمون انجام شده روی بوته‌های ذرت، قارچ *P. oryzae* برای بقا و تولید بیماری کاملا وابسته به میزبان حساس و شرایط محیطی مناسب (رطوبت و دمای بالا) می‌باشد. توسعه این قارچ روی ذرت به دلیل فراهم نبودن شرایط مناسب محیطی برای این قارچ در سال‌های اخیر بسیار محدود بوده است و در اغلب مناطق کشت ذرت در کشور معمولا این بیمارگر یافت نمی‌شود. همچنین با توجه به آزمون بیماریزایی روی بوته‌های برنج، ذرت، سوروف و چسبک، امکان وجود فرم‌های اختصاصی احتمالی برای میزبان‌های مختلف می‌باشد و باید آزمون بیماری‌زایی گونه *P. oryzae* روی ارقام بیشتر برنج و گیاهان هرز مختلف برای معرفی فرم اختصاصی احتمالی انجام پذیرد.

تحقیق حاضر با مطالعه مورفولوژی و فیلوژنی براساس نواحی ژنومی ITS و *MCM7* نام *Pyricularia oryzae* را برای جدایه‌های روی میزبان ذرت (*Zea mays*)، برنج (*Oryza sativa*)، گندیل (*Eleusine indica*)، سوروف (*Echinochloa crus-galli*)، چسبک (*Setaria viridis*)، مرغ (*Cynodon dactylon*)، پاسپالوم (*Paspalum distichum*) و موز (*Musa acuminata*) و نام *P. grisea* را فقط برای جدایه‌های روی علف انگشتی تایید می‌کند. اکنون نام*Magnaporthe* را برای گونه تیپ *M. salvinii* استفاده می‌شود و نام *Pyricularia* برای دو گونه *P. oryzae* و *P. grisea* براساس تقدم نسبت به جنس *Magnaporthe* استفاده می‌شود. لازم به ذکر است که با توجه به قدمت نام *Nakataea* نسبت به *Magnaporthe* برای گونه قارچی *M. salvinii* از نام *Nakataea* استفاده می‌شود (Murata *et al.* 2014, Luo & Zhang 2013). در این تحقیق میزبان‌های ذرت (*Zea mays*)، گندیل (*Eleusine indica*)، مرغ (*Cynodon dactylon*)، پاسپالوم (*Paspalum scrobiculatum*) و موز (*Musa acuminata*) برای اولین بار از ایران گزارش می‌گردند.

## سپاسگزاری

هزینه انجام این تحقیق از محل اعتبار طرح شماره ۷۱۱۰۰۲۲/۶/۲۹ تامین شده است. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران به خاطر فراهم آوردن اعتبارات مالی این تحقیق کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

## منابع

Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Miller W. and Lipman D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research 25: 3389–3402.

Behdad E. 1979. Diseases of crops. Neshad Publication, Isfahan, 424 p.

Borromeo E. S., Nelson R. J., Bonman J. M. and Leun H. 1993. Genetic differentiation among isolates of *Pyricularia* infecting rice and weed hosts. Phytophatology 83:393-399.

Bussaban B., Lumyong S., Lumyong p., Seelenan T., Park D. C., Mckenzie E. H. C. and Hyde K. D. 2005. Molecular and Morphological characterization of *Pyricularia* and allied genera. Mycologia 97:1002-1011.

Cavara F. 1892. Contributzione alla micologia lombarda. Atti Ist Bot Univer Lab Crittogam Pavia Ser 2. 2:207–292.

Choi J., Park S. Y., Kim B. R., Roh H. J., Oh I. S., Han S. S., Lee Y. H. 2013. Comparative analysis of pathogenicity and phylogenetic relationship in *Magnaporthe grisea* species complex. PloS One 8: e57196.

Couch B. C. and Khohn L. M. 2002. A multilocus gene genealogy concordant with host preference indicate segregtation of a new species, *Magnaporthe oryzae* from *Magnaporthe grisea*. Mycologia 94:683-693.

Dean R., Van Kan J. A. L., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Dipietro A., Spanu P. D., Rudd J. J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. and Foster G.D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molcular Plant Pathology 13: 414–430.

Ellis M. B. 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, 608 p, Kew, England.

Ellis M. B. 1976. More dematiaceous hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, 507 p, Kew, England.

Ershad D. 2009. Fungi of Iran. 3nd ed., Agricultural Res., Education & Extention Org. Pub., Tehran, 531 p.

Hirata K., Kusaba M., Chuma I., Osue J., Nakayashiii H., Mayama S. and Tosa Y. 2007. Speciation in *Pyricularia* inferred from multilocus phylogenetic analysis. Mycological Research 111:799–808.

Javan-Nikkhah M., Banke S., Hejaroude Gh. A. and McDonald B. A. 2004. Genetic structure of Iranian *Pyricularia grisea* populations based on rep-PCR fingerprinting. European Journal of Plant Pathology 110: 909-919.

Lamari L. and Bernier B. B. 1989. Evaluation of wheat lines and cultivars to tan spot based on lesion type. Canadian Journal of Plant Pathology 11: 49-56.

Luo J. and Zhang N. 2013. *Magnaporthiopsis*, a new genus in Magnaporthaceae (Ascomycota). Mycologia 105: 1019–1029.

Mckenzie E. H. C., Park D., Bellgard S. E. and Johnston. P. R. 2010. A new species of *Pyricularia* (hyphomycetes) on *cortoderia* (Poaceae) in Newzealand. Mcosphere 1: 223-228.

Mousanejad S., Javan-Nikkhah M. and Mohammadi Goltape E. 2005. Characterization of Vegetative Compatibility Groups in *Magnaporthe grisea* Population in Guilan Province, Iran. Iranian, Journal of Agriculture Science 36: 305-317.

Murata N., Aoki T., Kusaba M., Tosa Y. and Chuma, I. 2014. Various species of *Pyricularia* constitute a robust clade distinct from *Magnaporthe salvinii* and its relatives in Magnaporthaceae. Journal of General Plant Pathology 80:66–72.

Nanayakkara U. N. and Uddin W. 2007. Effects of soil type, source of silicon, and rate of silicon source on development of gray leaf spot of perennial ryegrass turf. Plant Disease 92: 871-877.

Ou S.H. 1985. Rice diseases. 2ed, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, UK. 380 p.

Park M. J. and Shin H. D. 2009. A new species of *Pyricularia* on *Commelina communis*. Mycotaxon 108:449-456.

Pratt R. G. 2006. Enhancement of sporulation in species of *Bipolaris, Curvularia*, *Drechslera* and *Exserohilum* by growth on cellulose-containing substrates. Mycopathologia 162: 133-140.

Rosman A. Y., Howard R. J. and Valent B.1990. *Pyricularia grisea*, the correct name for the rice blast disease fangus. Mycologia 82: 509-512.

Salimi F., Javan-Nikkhah M., Padasht Dehkayi F. 2013. Study on genetic structure of *Magnaporthe oryzae* population at the rice leaf, tiller, and field levels. MSc Thesis. Tehran University, Karaj, Iran.

Sharifnabi B. 2010. Diseases of Crops. Isfahan University of Technology Publication center. 434 p.

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.

Valjavec-Gratian M. and Sttffenson B. J. 1997. Genetics of virulence in *Cochliobolus sativus* and Resistance in Barley, host genetics and resistance. Phythopathology 87: 1140-1143.

Webester R. K. and Gunnell P. S. 1992. Compendium of rice diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 62 p.

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.

Yamagashira A., Iwai C., Misaka M., Hirata K., Fujita Y., Tosa Y. and Kusaba M. 2008. Taxonomic characterization of *Pyricularia* isolates from green foxtail and giant foxtail, wild foxtails in Japan. Journal of General Plant Pathology, 74:230-241.

You M. P., Lanoiselet V., Wang C. P., Shivas R. G., Li Y. P. and Barbetti M. J. 2012. First report of rice blast (*Magnaporthe oryzae*) on rice (*Oryza sativa*) in Western Australia. Plant Disease 96: 1228.

Zhang N., Zhao S. and Shen Q. 2011. A six-gene phylogeny reveals the evolution of mode of infection in the

rice blast fungus and allied species. Mycologia 103:1267–1276.
Zhong S. and Steffenson B. J. 2001.Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. Phytopathology 91: 469–476.