

بیماری لکه قهوه‌ای برنج در گیلان و بررسی واکنش تعدادی از ارقام برنج نسبت به آن

محمد رضا صفری مطلق^۱، فریدون پاداشت دهکایی^۲ و قربانعلی حجارود^۳

چکیده

بیماری لکه قهوه‌ای (Brown spot) برنج، یکی از بیماری‌های بذرزاد برنج است که در کلیه مراحل رشد گیاه از خزانه تا مزرعه، روی گیاه دیده می‌شود و خساراتی را از نظر کیفی و کمی روی محصول، به وجود می‌آورد. از این رو بررسی‌هایی در زمینه‌های مختلف بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف عامل این بیماری و واکنش برخی ارقام در مقابل آن صورت گرفت. برای این منظور ۱۲۰ جدایه از نمونه‌های گیاهی آلوده برنج جمع‌آوری شده از ۹۱ مزرعه در سطح استان گیلان در محیط غذایی PDA جداسازی شدند. از مجموع جدایه‌های به دست آمده، ۱۵٪ *Bipolaris oryzae*، ۷۵٪ *Bipolaris victoriae* و ۱۰٪ *Bipolaris sp.* بودند. بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های سه گونه از قارچ *Bipolaris*، یعنی *B. oryzae*، *B. victoriae* و *B. sp.* روی برنج رقم خزر، در محیط دسیکاتور انجام گرفت که علائم ایجاد شده توسط این سه گونه متفاوت بوده، از لکه‌های نکروتیک تا خشک شدن برگ را شامل می‌شوند. برای بررسی واکنش ارقام برنج نسبت به قارچ عامل بیماری، ۸ رقم برنج به اسامی «بجار، خزر، سپیدرود، دم‌سفید، حسن‌سرای، بینام، ندا، نعمت» به ترتیب در دو مرحله برگ و بذر (خوشه) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج به دست آمده نشان داد که در مرحله برگ، تفاوت معنی‌داری از نظر میزان آلودگی بین ارقام مذکور وجود نداشت، در حالی‌که در مرحله بذر (خوشه)، براساس آزمون دانکن (۵٪)، در سه گروه قرار گرفتند که ارقام «ندا، سپیدرود، خزر، بینام» با کمترین میزان آلودگی نسبت به سایر ارقام مورد آزمایش در گروه اول، ارقام «بجار، دم‌سفید، حسن‌سرای» در گروه دوم و رقم «نعمت» در گروه سوم، قرار گرفتند، هر چند که براساس جدول تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری نشان ندادند.

واژه‌های کلیدی: برنج، لکه قهوه‌ای، *Bipolaris*، بیماری‌زایی، واکنش ارقام

۱. مربی گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رشت

۲. استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، رشت

۳. استاد گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران

مقدمه

بیماری لکه قهوه‌ای برنج، یکی از بیماری‌های بذرزاد برنج است که در کلیه مراحل رشد گیاه از خزانه تا مزرعه روی برنج دیده می‌شود (۱۶). بیماری دارای انتشار جهانی است و از همه کشورهای تولیدکننده برنج در آسیا، آمریکا و آفریقا، گزارش شده است و این بیماری را عامل قحطی بنگال در سال ۱۹۴۲ می‌دانند (۲۸). بیماری باعث سوختگی نشاهایی می‌گردد که از بذرهای شدیداً آلوده به دست آمده‌اند (۲۷). وقتی دانه‌ها آلوده می‌شوند، کیفیت و وزن آنها پایین می‌آید و کاهش وزن دانه‌ها تا بیش از ۴۰٪ تخمین زده شده است (۱۴ و ۲۶ و ۳۲). در ژاپن، قارچ عامل بیماری به عنوان یکی از اجزای اصلی ایجاد کننده علائم سوختگی خوشه و به عنوان عامل سوختگی نشا در جعبه‌های نشا، در نظر گرفته می‌شود (۲۸). کاهش در بازده دانه به جهت بیماری، بیشتر درجایی شایع است که برنج در خاک ضعیف (فقیر) از نظر مواد غذایی، رشد کرده باشد. در پرتو برخی مطالعات (۱۳) در ارتباط با بیماری فیزیولوژیکی "akiochi" و این حقیقت که قارچ به ندرت می‌تواند روی گیاهان برنج رشد کرده در خاک‌های طبیعی یافت شود، به نظر می‌رسد که بیماری لکه قهوه‌ای در خاک‌هایی که از نظر عناصر غذایی فقیر و غیر متوازن هستند، یافت می‌شوند. در واقع علائم کمبود برخی از عناصر به ویژه پتاسیم تا حدودی شبیه لکه قهوه‌ای هستند، به طوری که تشخیص این کمبودها از بیماری، در برخی مواقع، خیلی مشکل می‌شود (۲۸).

علائم بیماری به وسیله میترا (Mitra) و ساندارارامان (Sundararaman) در هند، توصیف شده‌اند (۲۸). در حالت ابتدایی، لکه‌های کوچک قهوه‌ای روی برگ‌ها و خوشه‌ها ظاهر می‌شوند. لکه‌ها به تعداد کم هستند و حضورشان روی گیاهان چندان قابل توجه نیست، از طرف دیگر وقتی بیماری حالت اپیدمی پیدا می‌کند، لکه‌ها زیاد هستند و با یکدیگر مجتمع می‌شوند، گیاهان از رشد باز می‌مانند و گاهی تمامی برگ‌ها پژمرده می‌شوند (۲۹). عامل این بیماری نخستین بار توسط «بردا دهان» (Breda de Haan) توضیح داده شده و او

آن را *Helminthosporium oryzae* نامید (۲۸). اندازه لکه‌های قهوه‌ای روی برگ در تاریکی به حداکثر می‌رسد و در شرایط سایه‌دار، طول لکه‌ها زیادتر می‌شود، بدین لحاظ برای تشدید آلودگی در شرایط مصنوعی، بهتر است گیاه را قبل از زمان آلودگی، تا مدتی بعد از آلودگی، در سایه نگه داری کرد (۲۱). انتخاب کولتیوارها برای مقاومت به بیماری لکه قهوه‌ای از سال‌ها پیش شروع شده است. ارقامی همچون داکار ناگار ۳۲-۲۷۳ پانتایی ۳۳-۵۴۹، کالما ۲۱۹، ناگار ۱۴-۴۱، در بنگال مقاوم بودند (۱۸). ۲۰ کولتیوار مقاوم در ژاپن معرفی شدند (۳۳). معرفی ارقام مقاوم، کماکان در کشورهای مختلف ادامه دارد. مایه‌زنی‌های مصنوعی مانند آزمایش‌های مزرعه‌ای و نیز ترکیبی از دو روش مذکور، برای اندازه‌گیری واکنش‌های متنوع، به کار رفته است. بررسی‌ها نشان داده است که مایه‌زنی مصنوعی به زمان و فضای کمتری نیاز دارد و کنترل شرایط محیطی، بهتر امکان‌پذیر است (۱۹). آلودگی در دامنه حرارتی 30°C - 20°C (اپتیمم 25°C - 20°C)، اتفاق می‌افتد. ۱۰ ساعت رطوبت بالا، برای آلودگی در 22°C ، مورد نیاز است. آماده کردن پیشین گیاه در رطوبت بالا، قبل از مایه‌زنی، آلودگی را افزایش نمی‌دهد، ولی حضور آب آزاد روی سطح برگ، آلودگی را افزایش می‌دهد. در مزرعه، مایه‌زنی در غروب، مطلوب‌تر از مایه‌زنی در صبح یا ظهر بود (۳۰). حساسیت گیاه برنج به بیماری، با بالا رفتن سن، زیاد می‌شود. مشخص گردید که دانه برنج (Kernel) در مراحل گلدهی و شیری بیشتر از مراحل خمیری یا بالغ حساسیت دارد (۲۰). گزارش شده است که تعداد و اندازه لکه‌های توسعه یافته، هم بستگی مثبت با غلظت اسپورها در سوسپانسیون به کار رفته برای مایه‌زنی دارد (۱۱). بنابراین برای یک‌نواخت کردن نتایج در آزمایش‌های، یک غلظت استاندارد از اسپورها، مورد نیاز می‌باشد.

در ایران، این بیماری ابتدا در سال ۱۳۳۵ از مزارع برنج سواحل دریای خزر جمع‌آوری شده است. بیماری علاوه بر این در مناطق برنج‌کاری لنجان اصفهان و شهر کرد نیز، کم و بیش دیده می‌شود (۱). تراپی، به منظور جداسازی قارچ

الف) کشت قطعات برگ روی محیط سیب‌زمینی-دکستروز، آگار در این روش قطعات آلوده برگ به اندازه ۱-۰/۵ سانتی‌متر برش داده شدند و پس از ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۱ تا ۲ دقیقه و شستشو با آب مقطر سترون، روی محیط کشت PDA در تشتک پتری سترون قرار داده شدند و برای جلوگیری از آلودگی باکتریایی به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط، ۲ میلی‌گرم سولفات استرپتومایسین اضافه گردید. ۲ تا ۳ روز بعد از نگهداری در انکوباتور در دمای ۲۶°C قطعاتی از کلنی مورد نظر به محیط آب آگار انتقال یافته و پس از حدود ۳ هفته نگهداری در دمای ۲۶°C با تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، تک‌اسپور گردیدند.

ب) کشت بذور آلوده روی محیط سیب‌زمینی-دکستروز، آگار این روش مانند روش قبلی است با این تفاوت که بذرها با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۴-۵ دقیقه ضد عفونی سطحی شدند.

استفاده از کاغذ صافی مرطوب و سرمای زیر صفر درجه سانتی‌گراد (Modified Blotter method) از این روش برای جداسازی اسپورهای قارچ عامل بیماری از بذر استفاده گردید (۴).

نگهداری قارچ جدا شده

برای این کار، قارچ‌های خالص شده را پس از کشت در محیط کشت PDA و تشکیل کلنی، روی کاغذ صافی سترون کشت داده و سپس قطعات کاغذ صافی در شیشه‌های پنی‌سیلین قرار گرفته و به فریزر در دمای ۱۵°C- انتقال داده شدند.

مطالعات بیماری زایی

برای مطالعات بیماری‌زایی از سه گونه از قارچ *Bipolaris* یعنی *B. oryzae*، *B. victoriae* و *B. sp.* استفاده شد (۹ و ۳۱).

Drechslera oryzae از بذرهای آلوده برنج، چند روش آزمایشگاهی را با هم مقایسه کرد (۴). مطالعاتی نیز توسط خسروی (۵) و ذاکری (۶ و ۷) به هنگام بررسی قارچ‌های بذرزاد برنج، انجام گرفت و قارچ‌های *Bipolaris oryzae*، *Bipolaris sorgichola* و *Bipolaris sp.* به عنوان عوامل بیماری‌زا معرفی شدند. رضوی، عامل این بیماری را در استان‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد، *B. oryzae*، *B. tetramera* و *Exserohilum rostratum* ذکر کرد (۸). فروتن و بامدادیان، تأثیر قارچ *Drechslera oryzae* در جوانه‌زنی بذرها و ریشه گیاهچه برنج را بررسی کردند (۱۰). بررسی‌هایی در مورد ارتباط بیماری لکه قهوه‌ای برنج با عناصر موجود در گیاه و خاک در گیلان انجام گرفت و مشخص شد که ظهور علائم بیماری با کمبود بسیاری از عناصر از جمله پتاسیم در ارتباط است (۳). هم چنین خسارت آن روی برخی ارقام برنج و علائم آنها بررسی شد (۲).

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌های آلوده برگ و خوشه از ۹۱ مزرعه از شهرستان‌های استان گیلان جمع‌آوری و در کیسه‌های پلاستیکی معجزا قرار داده شدند و پس از انتقال به آزمایشگاه در یخچال در دمای ۴ تا ۵°C نگه‌داری گردیدند و سپس به تدریج جداسازی جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری انجام گرفت.

محیط‌های کشت مورد استفاده

در این بررسی از محیط‌های کشت سیب‌زمینی-دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar (P.D.A.))، آب-آگار (Water Agar) (W.A.) و نیز محیط کشت آب‌شیر-آگار + ساقه گندم (Tapwater Agar) T.W.A.+wheat straw)) استفاده شد.

جداسازی قارچ‌ها

برای جداسازی قارچ‌ها، از چندین روش استفاده شد که اندام‌های گیاهی به کار رفته، برگ و خوشه (بذر) بود.

برنج (۲۲) استفاده شد. علاوه بر آن از سیستم هورسفال- بارت (Horsfall Barratt) براساس تعداد لکه‌های موجود در هر برگ، برای ارزیابی دقیق‌تر استفاده شد که فرمول به کار رفته به قرار زیر بود:

= درجه بیماری (Disease rating)

$$\frac{[(N_1 \times 1) + (N_2 \times 2) + \dots + (N_t \times t)]}{(N_1 + N_2 + \dots + N_t)}$$

که N در این جا، برگ در هر درجه می‌باشد (۱۵).

بررسی واکنش تعدادی از ارقام برنج در مقابل قارچ عامل بیماری

بدین منظور از ۸ رقم برنج به نام‌های دم‌سفید، خزر، سپیدرود، نعمت، ندا، حسن‌سرای، بجا و بینام استفاده گردید. این آزمایش در دو مرحله برگ و خوشه انجام گرفت.

ارزیابی در مرحله برگ

در این روش بذرهای ۸ رقم برنج فوق به مدت ۳۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲٪، ضدعفونی و سپس با آب مقطر سترون شستشو داده شد، پس از آن در گلدان‌های پلاستیکی با دهانه ۱۱ سانتی‌متر که حاوی ماسه بودند، کاشته شدند (در هر گلدان ۱۰ عدد بذر). در این آزمایش از طرح کاملاً تصادفی شامل ۸ تیمار (ارقام برنج) و ۳ تکرار (گلدان‌ها)، استفاده گردید.

گلدان‌ها آبیاری و در گلخانه قرار داده شدند. حرارت گلخانه در زمان رشد و نمو گیاهچه‌ها بین $25-30^{\circ}\text{C}$ در روز و $17-20^{\circ}\text{C}$ در شب و رطوبت نسبی بین ۸۰-۱۰۰٪ در نوسان بود. گیاهچه‌ها از زمان کاشت تا مرحله ۵-۳ برگی در این شرایط و در معرض نور خورشید، نگهداری شدند. در این مدت آبیاری به صورت معمول انجام می‌گرفت، به طوری که گلدان‌ها، به طور دائم حالت غرقابی داشتند. برای تهیه مایه تلقیح از جدایه قارچی *Bipolaris victoriarum* استفاده شد، که دلیل آن فراوانی گونه مورد نظر بود. اسپورپاشی پس از ۶ هفته، انجام گرفت.

از آنجایی که در محیط گلخانه، امکان کنترل شرایط محیطی به نحو مطلوب وجود نداشت، بنابراین اثبات بیماری‌زایی در محیط دسیکاتور انجام گرفت.

برای این منظور نخست مقداری ماسه در داخل شیشه‌های ارلن‌مایر ۳ بار اتوکلاو گردید و سپس مقداری از آن به یک تشتک پتری سترون انتقال داده شد (به طوری که سطح زیرین پتری را در بر گرفت). سپس مقداری بذر رقم خزر به مدت ۱۰ دقیقه در آب گرم $52-57^{\circ}\text{C}$ در حمام ماری ضدعفونی شد (۳). تعداد ۱۰ عدد بذر در داخل هر تشتک پتری در میان ماسه سترون قرار گرفت. این عمل در دو دسیکاتور، یکی به عنوان آلوده و دیگری به عنوان شاهد انجام شد که در هر دسیکاتور از دو تشتک پتری، استفاده گردید. به هر تشتک پتری، مقداری آب مقطر سترون اضافه شد، به طوری که در تمام مدت تقریباً در حالت غرقاب نگهداری شدند. پس از ۱۷-۱۶ روز که نشاهای داخل تشتک پتری به مرحله ۲ برگی رسیدند، عمل اسپورپاشی روی آنها انجام گرفت. لازم به ذکر است که در تمام آزمایش‌های مذکور، دسیکاتورها در انکوباتور با دمای 26°C ، رطوبت نسبی بیش از ۹۰٪ و تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی، ۱۲ ساعت تاریکی، قرار داده شدند. روش مایه‌زنی بدین ترتیب بود که روی همه نشاها در دو دسیکاتور شاهد و آلوده، ابتدا به وسیله افشانه‌های کوچک دستی، آب مقطر پاشیده شدند (در زیر هود سترون) سپس سوسپانسیون لازم برای مایه‌زنی فراهم گردید. لازم به ذکر است که با توجه به این که در این بیماری میسلیم نیز به عنوان مایه تلقیح عمل می‌کند (۳۰)، برای تهیه سوسپانسیون، از مجموع اسپور و میسلیم به عنوان مایه تلقیح استفاده شد. در تمامی آزمایش‌ها از سوسپانسیون شامل 4×10^4 (اسپور + میسلیم) در میلی‌لیتر آب مقطر سترون استفاده گردید که برای شمارش آنها از لام گلبول شمار استفاده شد. هم‌چنین برای افزایش جذب سطحی توئین-۲۰ (Tween-20) به نسبت ۱٪، به کار رفت. ارزیابی علائم ایجاد شده، ۷ روز پس از اسپورپاشی، انجام گرفت. برای این منظور از سیستم ارزیابی استاندارد برای

آزمایش در هر گلدان از ۸ عدد بذر استفاده گردید. وقتی که نشاها به مرحله ۴-۶ برگگی رسیدند، به هر یک از گلدان‌ها، ۲ گرم کود اوره داده شد.

برای مایه‌زنی از جدایه قارچی *Bipolaris victoriae* در سوسپانسیون شامل 4×10^4 (اسپور+ میسلیم) در میلی‌لیتر آب مقطر سترون که توئین-۲۰ به نسبت ۱٪ به آن اضافه شده بود، استفاده گردید که به وسیله افشانه دستی در مرحله خوشه‌دهی بر روی خوشه‌های ارقام برنج مورد آزمایش، پاشیده شدند. قبل از اسپورپاشی کلیه خوشه‌ها در همه گلدان‌ها، به وسیله آب مقطر اسپری گردیدند. سایر شرایط گلخانه، همچون رطوبت، رطوبت نسبی، درجه حرارت در شبانه‌روز و روش‌های تأمین رطوبت زیاد، مانند مرحله برگ بود. ارزیابی ۱۰ روز پس از مایه‌زنی انجام گرفت. برای این منظور در هر تکرار، ۴ خوشه به طور تصادفی انتخاب گردید و کلیه بذرها آنها بررسی شد. بدین معنی که لکه‌های موجود در روی هر بذر بررسی گردید و با استفاده از سیستم هورسفال بارت میزان آن تعیین و سپس درصد آن مشخص شد. آن گاه از فرمول ذکر شده در مرحله قبل استفاده گردید، که در این فرمول N_1 و N_2 و ... و N_t ، تعداد قسمت‌های گیاهی (Plant parts) (در این جا بذر)، در هر طبقه (Category) بیماری می‌باشد (۱۵). پس از آن با به دست آمدن درجه بیماری در هر تکرار، تجزیه و تحلیل آماری به کمک نرم افزار ایری‌استات انجام گرفت.

نتایج و بحث

پراکنندگی بیماری

نتایجی که از نمونه‌برداری‌های انجام شده به دست آمد، نشان داد که ۷۸ مزرعه از ۹۱ مزرعه نمونه‌برداری شده، حداقل به یکی از گونه‌های جنس *Bipolaris* آلوده بوده‌اند، به طوری که ۱۲۰ جدایه از این قارچ به دست آمد. از بقیه نمونه‌ها، قارچ‌های *Nigrospora* sp.، *Pyricularia grisea*، *Curvularia* sp. و *Alternaria* sp. جدا گردید.

برای این کار از سوسپانسیون شامل 4×10^4 (اسپور+ میسلیم) در میلی‌لیتر آب مقطر سترون که توئین-۲۰ به نسبت ۱٪ به آن اضافه شده بود، استفاده گردید. این سوسپانسیون به وسیله افشانه دستی بر روی برگ‌های ارقام فوق، پاشیده شد. لازم به ذکر است که قبل از اسپورپاشی، روی کلیه گلدان‌ها آب مقطر، پاشیده شد. قبل از اسپورپاشی، زمانی که گیاهچه‌ها به مرحله ۴-۶ برگگی رسیدند، با تنک‌کردن، تعداد نشاها در هر گلدان به ۵ عدد، کاهش داده شد. قبل از شروع اسپورپاشی، گیاهچه‌های هر قسمت با پلاستیک شفاف از بقیه گلدان‌ها، مجزا شدند. بعد از اسپورپاشی نیز با استفاده از چارچوب‌هایی که رویشان پلاستیک کشیده شده بود و نیز گونی‌های کتفی که به طور مداوم به وسیله شیلنگ متصل به شیر آب خیس می‌شدند، رطوبت نسبی در بالاتر از ۹۵٪ نگه‌داری شد. بعد از مایه‌زنی، رطوبت نسبی در حدود ۹۵-۱۰۰٪ و می‌وزان حرارت در روز $30-28^\circ C$ و در شب $22-20^\circ C$ نوسان داشت. ارزیابی ۷ روز پس از اسپورپاشی انجام گرفت. برای ارزیابی، از سیستم ارزیابی استاندارد برای برنج (۲۲) استفاده شد که در آن، درصد آلودگی مشخص گردید. آن گاه تجزیه و تحلیل آماری به کمک نرم‌افزار ایری‌استات (IRRISTAT version 92) صورت گرفت.

ارزیابی در مرحله خوشه

از آنجایی که بیماری لکه قهوه‌ای برنج در گیلان، بیشتر در مرحله خوشه قابل مشاهده بوده و خسارت‌زاست، بنابراین ارزیابی در این مرحله نیز انجام شد. برای این منظور بذرها ۸ رقم برنجی که در مرحله برگ به کار رفته بودند، در گلدان‌های بزرگ‌تری کاشته شدند. در این گلدان‌ها از خاک مزرعه استفاده شد تا شرایط آزمایش به شرایط مزرعه‌ای نزدیک‌تر شود. در این آزمایش نیز از طرح کاملاً تصادفی شامل ۸ تیمار (ارقام برنج) و ۳ تکرار (گلدان‌ها)، استفاده گردید. ضدعفونی بذرها با هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت ۳۰ دقیقه و سپس شستشوی آنها با آب مقطر سترون انجام گرفت. در این

مطالعات بیماری‌زایی

در تمامی مطالعات بیماری‌زایی، از یک رقم برنج، یعنی رقم خزر، استفاده شد و مایه‌زنی روی آن انجام گرفت. علائم ایجاد شده روی رقم مذکور در گونه‌های مختلف تا حدی متفاوت بوده، در حالی که علائم یک گونه متشابه بودند. نخستین علائم در مورد دو گونه *B. oryzae* و *B. victoriae*، ۳ تا ۴ روز پس از مایه‌زنی ظاهر گردید، در حالی که در مورد گونه *Bipolaris sp.* ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی، اولین علائم آشکار شدند. ارزیابی کلی در مورد هر سه گونه مزبور، ۷ روز پس از اسپورپاشی، انجام گرفت. در مورد جدایه‌های مربوط به گونه *B. oryzae*، نخستین علائم پس از ۴ روز، به صورت نقاط سرسنجاقی، آشکار شدند. در روزهای بعدی، این نقاط به تدریج توسعه یافته و به صورت لکه‌های نکروتیک، بیضی‌شکل، گاهی به هم پیوسته، به رنگ قهوه‌ای تیره با هاله زرد، درآمدند. توسعه لکه‌ها بیشتر به طرف نوک برگ بود. در مواردی سوختگی و از بین رفتن کامل یک برگ دیده شد (شکل ۱). در جدایه‌های گروه دوم یعنی *B. victoriae* اولین علائم که پس از ۴ روز (در مورد برخی جدایه‌ها، ۳ روز)، پس از مایه‌زنی، ظاهر شدند، نخست به صورت نقاط سرسنجاقی پدیدار شدند. در روزهای بعدی، توسعه یافته، به صورت لکه‌های نکروتیک، کشیده تا بیضی‌شکل، گاهی به صورت مجتمع، قهوه‌ای تیره و گاهی با هاله زرد درآمدند.

لکه‌ها به طرف غلاف برگ نیز توسعه یافتند و باعث ایجاد لکه‌های بیضی تا مستطیلی شکل به رنگ قهوه‌ای تیره مایل به سیاه، روی غلاف و در برخی حالات نیز باعث از بین رفتن و سوختگی یک برگ شدند (شکل ۲). در مواردی میسیلیوم قارچ بر روی غلاف برگ دیده شد که پس از تهیه اسلاید میکروسکوپی و مشاهده در زیر میکروسکوپ به صورت قطعات زنجیری تسبیحی دیده شدند. در مورد گروه سوم جدایه‌ها یعنی *Bipolaris sp.* نخستین علائم ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی، به صورت نقاط سرسنجاقی ظاهر شدند. به تدریج لکه‌ها توسعه یافته و به صورت نواری به طرف پایین برگ

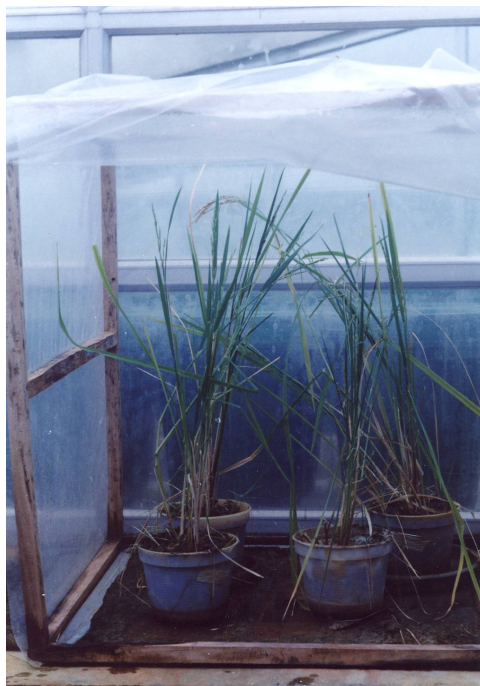
پیشروی نموده ولکه‌های خطی، باریک، کشیده، به ندرت بیضی شکل، به رنگ قهوه‌ای تیره را به وجود آوردند. اکفمیا (Ocfemia) در ۱۹۲۴ نخستین علائم قابل رؤیت را در حدود ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ *B. oryzae*، مشاهده نمود (۲۸). در سال ۱۹۶۴ مشاهده گردید که رنگ سلول‌های آلوده در ۱۷ تا ۲۰ ساعت پس از مایه‌زنی تغییر پیدا می‌کند (۲۷). در تمامی آزمایش‌های فوق، در راستای انجام اصول کخ، قارچ مایه‌زنی شده، مجدداً از نشاهای بیمار، جدا گردید و مورد شناسایی قرار گرفت و نتیجه اولیه تأیید شد. از آنجایی که این سه گونه قارچ علائم بسیار متغیری را نشان دادند که ارزیابی دقیق آنها با سیستم ارزیابی استاندارد برای برنج (۲۲) امکان‌پذیر نبود، بنابراین از سیستم دیگری استفاده گردید. در این سیستم براساس تعداد لکه‌های موجود در هر برگ به آن درجه داده شد و سپس درجه بیماری، با استفاده از سیستم هورسفال-بارت، به دست آمد (۱۵) و براساس آن جدول ۱ حاصل شد.

به طوری که ملاحظه می‌شود، شدت (درجه) بیماری ایجاد شده به وسیله *B. oryzae* تا حدی از دو گونه بعدی بیشتر می‌باشد و در مراحل بعدی، *Bipolaris sp.* و سپس *Bipolaris victoriae* قرار می‌گیرد. با این حال به نظر می‌رسد که تفاوت‌های اساسی از نظر شدت بیماری‌زایی بین این سه گونه، وجود ندارد. بررسی‌های انجام گرفته در سال ۱۹۷۴ نیز نشان داد که تغییر پذیری بیماری‌زایی با تنوع استرین و مورفولوژی کنیدی، هم بستگی ندارد (۱۷). هم چنین در بررسی‌های انجام گرفته توسط رضوی، درجه بیماری‌زایی گونه *B. oryzae* از دو گونه دیگر یعنی *B. tetramera* و *E. rostratum* بیشتر بوده است (۸).

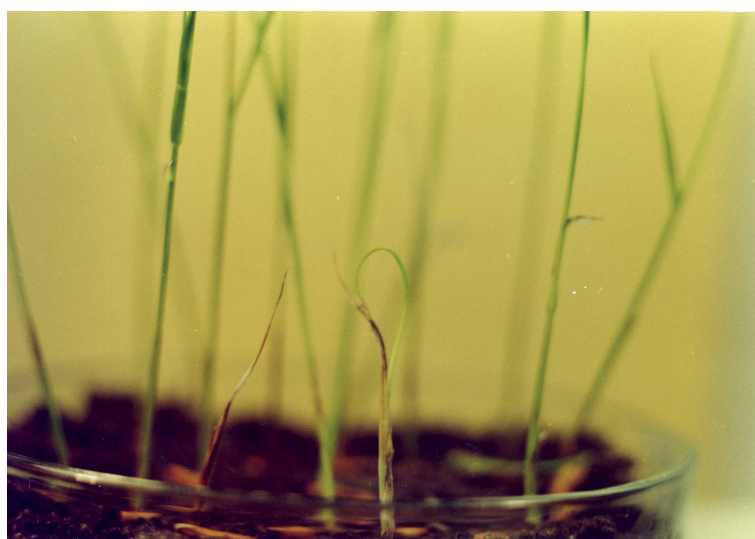
واکنش ارقام برنج در مقابل قارچ عامل بیماری

الف) ارزیابی در مرحله برگ

از ماسه به عنوان بستر کاشت بذر، در گلدان‌ها استفاده گردید که در این حالت، علائم آلودگی دیده شد و این در حالی بود که در تیمار شاهد، در هر رقم در شرایط مشابه با شرایط مایه‌زنی که در ماسه کشت شده و پس از مدت زمان لازم، مورد



شکل ۱. ارزیابی در مرحله خوشه در گلخانه، زیر پوشش پلاستیک



شکل ۲. قهوه‌ای و خشک شدن برگ در رقم خزر پس از تلقیح با قارچ *B. oryzae*

جدول ۱. میزان (درجه) بیماری ایجاد شده به وسیله سه گونه از قارچ *Bipolaris*

گونه قارچ	Disease rating
<i>B. oryzae</i>	۲/۶۱۱
<i>B. victoriae</i>	۲/۰۹
<i>B. sp.</i>	۲/۲۵

معنی داری از نظر مقاومت در مقایسه با یکدیگر، نسبت به قارچ عامل بیماری ندارند تأیید می‌کند، چرا که مرز میان مقاومت بالا و مقاومت متوسط، وضوح چندانی نداشته و تفکیک آن مشکل می‌باشد. هم چنین مشخص شد که ارقام بومی استان همچون دم‌سفید، حسن‌سرای و بینام، مقاومت بالاتری در مقابل بیماری در مرحله برگی از خود نشان می‌دهند.

در بررسی انجام شده توسط رضوی مشخص شد که ارقام بومی برنج در استان فارس حساسیت متفاوتی نسبت به قارچ عامل بیماری نشان داده، به طوری که رقم دم‌سیاه دارای بیشترین حساسیت بوده و در درجات بعدی ارقامی همچون هراز، زرده، عنبربو، رحمت‌آبادی، ریشک قرمز و آمل قرار می‌گرفتند (۸).

ب) ارزیابی در مرحله خوشه‌دهی (بذر)

در این آزمایش برای مایه زنی روی خوشه‌های ۸ رقم برنج مورد بررسی، از گونه *Bipolaris victoriorae* استفاده شد که دلیل آن منشأ جدا سازی قارچ مزبور یعنی خوشه (بذر) برنج بود. ارزیابی نهایی در مورد ارقام مورد آزمایش، ۱۰ روز پس از اسپور پاشی، انجام گرفت.

نخستین علائم، ۴ روز پس از مایه زنی به صورت نقاط سر سوزنی روی بذرهای در مرحله خوشه، ظاهر گردید. در روزهای بعدی، این نقاط، بتدریج توسعه یافته، به صورت لکه‌های نکروتیک، غیر نکروتیک، قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره، سیاه رنگ، به اشکال بسیار متنوع از بیضوی، کروی گرفته تا خطی و کشیده، گاهی با هاله‌های روشن درآمدند. این لکه‌ها، در برخی بذرها، به هم پیوسته و تمامی بذر را در بر گرفته، به طوری که کل بذر را سیاه کرده و در برخی اوقات، بذرها سیاه و پوک شده و در نهایت به رنگ سفید درآمدند. این تنوع علائم آلودگی روی بذرها ارقام مختلف، مشاهده گردید، به طوری که از نظر نوع علائم ایجاد شده، تفاوت آشکاری بین آنها وجود نداشت. (شکل ۳). علائم آلودگی روی غلاف خوشه نیز دیده شد که به صورت تیره شدن بخشی (Partially) از غلاف

بررسی قرار گرفتند، هیچ گونه علائم آلودگی بر روی آنها دیده نشد. در این آزمایش برای اسپورپاشی روی ۸ رقم برنج، از گونه *Bipolaris victoriorae* استفاده شد که دلیل آن فراوانی این گونه از قارچ بود. ارزیابی نهایی در مورد ارقام مورد بررسی، ۷ روز پس از اسپورپاشی انجام گرفت. اولین علائم ۴۸ ساعت پس از تلقیح به صورت نقاط سرسجاقی بر روی برگ‌ها، ظاهر گردیدند. در روزهای بعد به طور بسیار تدریجی، توسعه یافته و به طرف پایین برگ، پیشروی نموده و لکه‌هایی نکروتیک گاهی غیر نکروتیک، بیضی تا کشیده به رنگ قهوه‌ای تیره گاهی با هاله روشن را به وجود آوردند، به طوری که تفاوت چندانی از نظر نوع علائم ایجاد شده روی برگ ارقام مختلف برنج، مشاهده نگردید. بر اساس تجزیه واریانس مشخص گردید که ۸ رقم برنج مورد آزمایش که تیمارهای ما را تشکیل می‌دهند، تفاوت معنی داری با یکدیگر ندارند.

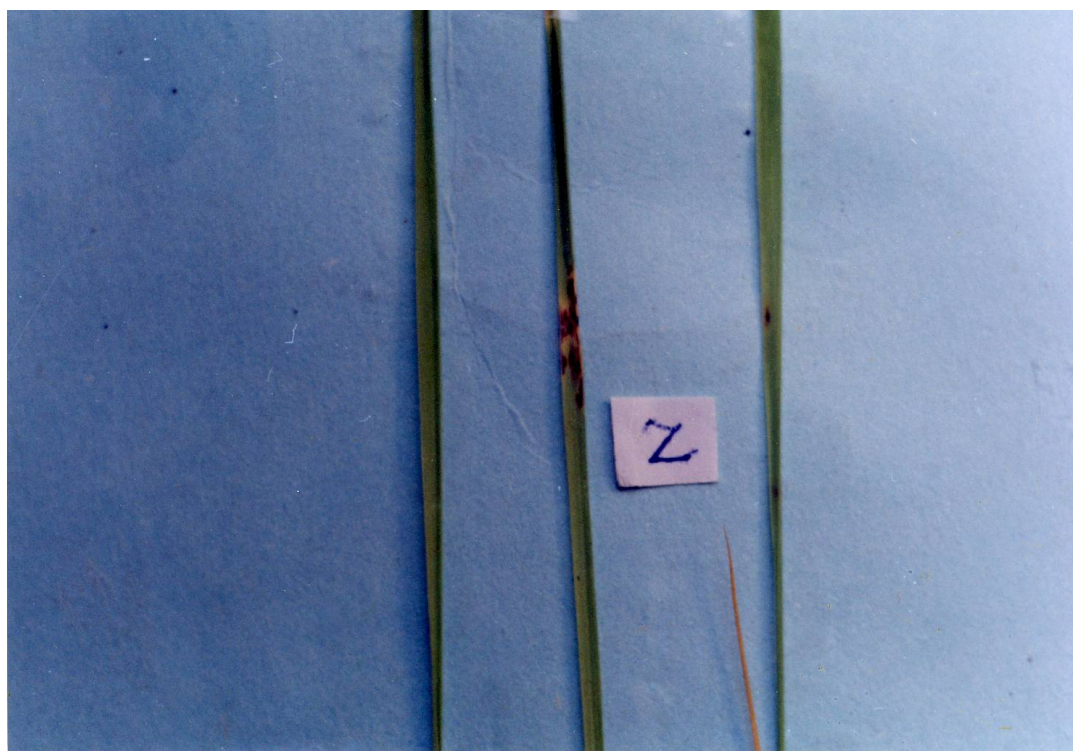
بر اساس آزمون دانکن نیز، میانگین هر ۸ رقم برنج مورد آزمایش، میانگینشان برای لکه‌برگی، در یک گروه قرار گرفتند و این نشان داد که در مرحله برگ، ارقام مذکور، تفاوت معنی داری نسبت به هم در مقابل قارچ عامل بیماری ندارند و این مسأله، نتایج قبلی را که در استان گیلان، قارچ عامل بیماری در مرحله برگ، خسارت چندانی به بار نمی‌آورد، تأیید می‌کند. (جدول ۲) استفاده از مقیاس ۶ واحدی آلوکو (Aluko) (۱۲) در این جا (که مقاومت‌ها را بر اساس تعداد، رنگ، شکل و اندازه لکه‌ها به HR (مقاومت بالا)، R (مقاوم)، MR (مقاومت متوسط)، MS (حساسیت متوسط)، S (حساس)، VS (خیلی حساس) تقسیم می‌کرد)، ارقام برنج فوق‌الذکر را در گروه یک (HR = مقاومت بالا) و گروه سه (MR = مقاومت متوسط) قرار داد. بدین معنی که از سه تکرار رقم بجا، دو تکرار HR و یک تکرار MR بوده، از سه تکرار رقم دم‌سفید، هر سه HR، از سه تکرار رقم نعمت، دو تا MR و یکی HR، از سه تکرار، رقم حسن‌سرای، هر سه HR، از سه تکرار رقم ندا، دو تا HR، یکی MR، از سه تکرار رقم بی‌نام، هر سه HR بودند. این مطلب نتایج بررسی‌های قبلی را مبنی بر این که ارقام مذکور تفاوت

جدول ۲. جدول میانگین تیمارها برای لکه‌برگی (%).

TR (تیمار)	RANKS (ترتیب)	میانگین
S۱	۲	۳/۰۰ ^a
S۲	۴	۵/۶۷ ^a
S۳	۳	۴/۰۰ ^a
S۴	۲	۳/۰۰ ^a
S۵	۶	۶/۶۷ ^a
S۶	۱	۱/۶۷ ^a
S۷	۵	۶/۰۰ ^a
S۸	۲	۳/۰۰ ^a
میانگین		۴/۱۳

اعدادی که با حروف مشترک ذکر گردیده‌اند، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ به وسیله DMRT (آزمون دانکن)، نشان نمی‌دهند.

S۱ = تیمار اول = رقم بچار S۲ = تیمار دوم = رقم دم سفید S۳ = تیمار سوم = رقم نعمت
 S۴ = تیمار چهارم = رقم حسن سرایی S۵ = تیمار پنجم = رقم ندا S۶ = تیمار ششم = رقم سپیدرود
 S۷ = تیمار هفتم = رقم خزر S۸ = تیمار هشتم = رقم بی‌نام



شکل ۳. علائم لکه برگی بر روی برگ رقم خزر پس از تلقیح با قارچ *Bipolaris victoriae*

جدول ۳. جدول میانگین تیمار برای آلودگی بذر (درجه)

TR (تیمار)	RANKS (ترتیب)	میانگین
S1= رقم بچار=	۷	۲/۱۲۷ ^{ab}
S2= رقم دم سفید=	۵	۱/۹۰۳ ^{ab}
S3= رقم نعمت=	۸	۲/۶۸۸ ^b
S4= رقم حسن سرایی=	۶	۱/۹۳۲ ^{ab}
S5= رقم ندا=	۳	۱/۵۹۴ ^a
S6= رقم سپیدرود=	۲	۱/۵۲۸ ^a
S7= رقم خزر=	۱	۱/۴۶۹ ^a
S8= رقم بینام=	۴	۱/۷۳۰ ^a
میانگین		۱/۸۷۱

اعدادی که با حروف مشترک آمده‌اند، تفاوت معنی‌داری در سطح ۵٪ به وسیله DMRT (آزمون دانکن) نشان نمی‌دهند.

صدمات وارده به وسیله قارچ عامل بیماری به گیاه برنج در مرحله خوشه توسط محققین دیگری نیز مورد بررسی قرار گرفته ولی در زمینه مبحث مقاومت در این مرحله، در منابع در دسترس مطلب اساسی یافت نشد. هم‌چنین مشاهده شد که در مورد دسته‌بندی ارقام برنج از نظر مقاومت در مقابل قارچ عامل بیماری در دو مرحله برگ و خوشه، تفاوت‌هایی دیده می‌شود، به طوری که برخی از ارقام بومی، همچون دم‌سفید و حسن سرایی در مرحله برگ از مقاومت بیشتری برخوردار بودند، در مرحله خوشه، حساسیت بیشتری از خود نشان می‌دهند و این با کار انجام گرفته توسط مارچتی (Marchetti) در ۱۹۸۰ که نشان داد که بین اختلال در عملکرد دانه و شدت علائم برگی هم بستگی وجود ندارد (۲۳) سازگاری دارد و این در حالی است که موندال (Mondal) و همکاران در سال ۱۹۹۸ نشان دادند که یک هم بستگی مثبت بین شدت لکه‌برگی و لکه‌دانه‌ای وجود دارد (۲۵). در مورد ژن عامل مقاومت، نتایج متغیر است، به طوری که بر اساس بررسی‌های انجام گرفته در سال ۱۹۳۰ مشخص گردید که مقاومت یک صفت غالب است، در حالی که در سال ۱۹۴۱ مشخص شد که مقاومت، مغلوب است (۲۸) و این مطلب ضرورت بررسی بیشتر روی پدیده مقاومت یا حساسیت در مقابل قارچ مذکور را بیشتر نشان

پدیدار شد. برای ارزیابی، نخست درجه بیماری هر رقم، در ۳ تکرار، با استفاده از سیستم هورسفال - بارت محاسبه و سپس تجزیه و تحلیل آماری آن به کمک نرم‌افزار ایری استات، انجام گرفت. بر این اساس مشخص شد که ارقام مذکور، از لحاظ تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری از نظر درجه، نسبت به یکدیگر نشان نمی‌دهند (جدول ۳).

بر اساس آزمون دانکن، ۸ رقم برنج مذکور که تیمارهای آزمایش را تشکیل می‌دهند، از لحاظ میزان آلودگی، در ۳ دسته قرار می‌گیرند:

دسته اول شامل ارقام ندا، سپیدرود، خزر، بینام، دسته دوم شامل ارقام بچار، دم سفید، حسن سرایی و دسته سوم شامل رقم نعمت بودند. دسته اول در مقایسه با دسته دوم و دسته سوم، از تحمل بیشتری نسبت به آلودگی با قارچ عامل بیماری، برخوردار می‌باشند. این مطلب در مورد دسته دوم در مقایسه با دسته سوم، نیز صدق می‌کند، به طوری که کمترین میزان تحمل در میان ارقام مورد آزمایش، در رقم نعمت، دیده شد.

این بررسی‌ها، مشاهدات ظاهری و گزارش‌های مربوط به این مطلب را که بیماری لکه قهوه‌ای برنج در مرحله خوشه در مقایسه با مرحله برگ، درگیلان، از اهمیت بیشتری برخوردار بود، تأیید می‌کند.

مطلب در زمینه ارزیابی مقاومت در مرحله خوشه‌دهی گیاه مزبور صدق نمی‌کند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از همکاری معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت به دلیل حمایت‌های مالی و نیز زحمات مسئولین محترم مؤسسه تحقیقات برنج کشور که در انجام این پژوهش کمک بسیاری نموده‌اند کمال تشکر را دارم.

می‌دهد. ماسولا و بدن‌دو (Massola & Bedendo) نشان دادند که با بررسی زخم‌های ایجاد شده در اثر مایه‌زنی خوشه با قارچ *B. oryzae*، امکان ارزیابی مقاومت واریته‌های برنج در گلخانه با به کارگیری جدایه‌هایی با قدرت بیماری‌زایی بالا و منطقه زخم به عنوان یک پارامتر برای برآورد، وجود دارد (۲۴). با این وجود یکی از مشکلات در کار تحقیق در زمینه مقاومت در مورد این بیماری، احتمالاً به جهت سیستم‌های محاسبه استاندارد می‌باشد که اگر چه برای ارزیابی مقاومت در مرحله «برگی» گیاه برنج، این سیستم‌ها وجود دارند ولی این

منابع مورد استفاده

۱. بهداد، الف. ۱۳۶۲. بیماری‌های گیاهان زراعی ایران. انتشارات نشاط، اصفهان.
۲. پاداشت، ف. و م. ایزدیار. ۱۳۷۷. بررسی بیماری لکه قهوه‌ای برنج در گیلان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، کرج.
۳. پاداشت، ف.، ب. فردوس و ف. دریغ‌گفتار. ۱۳۷۷. بررسی رابطه بیماری لکه قهوه‌ای برنج با عناصر موجود در گیاه و خاک. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، کرج.
۴. ترابی، م. ۱۳۶۳. مقایسه چند روش آزمایشگاهی به منظور جداسازی قارچ *Drechslera oryzae* از بذرهاى آلوده برنج. بیماری‌های گیاهی ۲ (۴-۱) : ۷-۱.
۵. خسروی، و. ۱۳۷۸. بررسی مهم‌ترین بیماری‌های قارچی بذرزاد برنج در ارقام غالب منطقه مازندران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
۶. ذاکری، ز. ۱۳۵۹. بررسی میکوفلور سه رقم بذر برنج در ایران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌های گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
۷. ذاکری، ز. و ج. زاد. ۱۳۶۶. بررسی علل غیر طبیعی بودن و تغییر شکل (آنومالی) گیاهچه‌های برنج در اثر قارچ‌های بذرزاد. بیماری‌های گیاهی ۲۳ (۴،۱) : ۱۹-۲۷.
۸. رضوی، س. ا. ۱۳۷۲. مطالعه پراکنندگی، خواص فنوتیپی، تاکسونومی و بیماری‌زایی جداشده‌های مختلف شبه‌جنس *Helminthosporium* و شبه‌جنس‌های وابسته به آن از گیاه برنج در استان‌های فارس، کهگیلویه و بویراحمد. پایان‌نامه کارشناس ارشد بیماری‌های گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.
۹. صفری مطلق، م. ر. ۱۳۷۹. اتیولوژی بیماری لکه قهوه‌ای برنج در گیلان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌های گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
۱۰. فروتن، ع. و ط. بامدادیان. ۱۳۷۲. خلاصه مقالات اولین کنگره زراعت و اصلاح نباتات ایران. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
11. Akai, S., J. Shishiyama and R. Nishimura. 1965. Effect of spore density on the pathogenicity of *Helminthosporium oryzae* to rice leaves. Ann. Phytopathol. Soc. Jap. 30 : 166-168.
12. Aluko, M. O. 1975. Crop losses caused by brown leaf spot disease of rice in Nigeria. Plant Dis. Rep. 59:609-613.

13. Baba, I. 1958. Nutritional studies on the occurrence of *Helminthosporium* leaf spot and "akiochi" of the rice plant. Bull of the National Institute of Agric Sci. D7:1-157.
14. Bedi, K. S. and H. S. Gill. 1960. Losses caused by the brown leaf spot disease in the Punjab. Indian Phytopathol. 13: 161-164.
15. Bertrand, P. F. and T. R. Gottwald. 1997. Evaluating fungicides for pecan disease control. In: K. D. Hickey (Ed.), Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens. Oxford and IBH Pub., Calcutta.
16. Bhattachary, D. and N.K. Mukhopudhyay. 1986. Surface adherence and penetrability of mycobacillin as affected by adjuvants. Indian phytopathol. 39(3): 390-394.
17. Gangopadhyay, S. and S.Y. Padmanabhan. 1987. Breeding for Disease Resistance in Rice. Oxford & IBH Publishing Co. Calcutta.
18. Ganguly, D. and S.Y. Padmanabhan. 1959. *Helminthosporium* disease of rice III. Breeding resistant varieties selection of resistant varieties from genetic stock. Indian phytopathol. 11: 161-165.
19. Hemmi, T. and H. Suzuki. 1931. On the relation of soil moisture to the development of *Helminthosporium* disease of rice seedlings. Indian phytopathol. 1: 90-98.
20. Iman m Fazli, S. F. and H. W. Schroeder. 1966. Kernel infection of Blueboment 50 rice by *Helminthosporium oryzae*. Phytopathol. 56:507-509.
21. Imura, J. 1938. On the influence of sunlight upon the lesion enlargement of the *Helminthosporium* disease of rice seedling. Annals of the Phytopathol. Soc. of Jap. 8: 203-211.
22. IRI 1996. Standard Evaluation System for Rice. The Philippines. 52pp.
23. Marchetti, M. A. 1980. Studies of brown spot, stink bugs and pecky rice and their relation ships. (Abstr.) proc. Rice Technol. Davis, CA. 18:57-58.
24. Massola Junior, N. S. and I. P. Bedendo. 1998. leaf lesion area as a parameter for evaluation of rice resistance against *Bipolaris oryzae*, causal agent of brown spot. Summa Phytopathol. 24(1): 30-33.
25. Mondal, A. H. , M. A.T. Mia and A. Ali. 1998. Relationship between brown leaf spot and grain spot and planting value of spotted rice. Seed Res. 26(1): 73-77.
26. Muller, A. S. 1953. Plant disease problems in central America. FAO plant protection Bulletin. 1:136-138.
27. Ocfemia, G.O. 1924. The *Helminthosporium* disease of rice occurring in the southern unitecl States and in the Philippines. Am. J. Bot. 12:385-408.
28. Ou, S.H. 1985. Rice Diseases. 2nd ed., Commonwealth Mycological Institue, England.
29. Padmanabhan, S. Y., K. R. Roy choudhry and D. D. Ganguly. 1948. *Helminthosporium* disease of rice. I. Nature and extent of damage caused by disease. Indian phytopathol. 1:34-47.
30. Sherf, A. F., R. M. page, E. C. Tullis and T. L. Morgan. 1947. Studies on factors affecting the infection of *Helminthosporium oryzae*. Phytopathol. 37:281- 290.
31. Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their Telemorphs. CAB. International Pub., England.
32. Vidhyasekaran, P. 1974. Possible role of sugars in restriction of lesion development in finger millet leaves infected with *Helminthosporium tetramera* Physiol. Plant Pathol 4(4): 457-467.
33. Yoshii, H. and M. Matsumoto. 1951. Studies on the resistance to *Helminthosporiose* of the rice varieties introduced to Japan. I. Scientific Rep. of the Matsuyamn Agric. College 6: 23-60.