



شناسایی عوامل بیمارگر تغییر رنگ خوشه در ارقام برنج لنجان در استان اصفهان

حسین سماواتیان^{۱*} - احمد رضانی^۲ - وحید خسروی^۳

۱ استادیار پژوهش، بیماری شناسی گیاهی، بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران.

۲ استادیار پژوهش، فیزیولوژی گیاهان زراعی، بخش تحقیقات علوم زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اصفهان، ایران.

۳ استادیار پژوهش، بیماری شناسی گیاهی، بخش تحقیقات گیاه پزشکی، موسسه تحقیقات برنج کشور، معاونت مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، آمل، ایران.

ایمیل نویسنده مسئول: hsamavatian@yahoo.com*

چکیده

بیماری تغییر رنگ خوشه برنج یک بیماری مرکب است که عوامل قارچی و باکتریایی در ایجاد آن دخیل هستند. به منظور شناسایی عوامل موثر در ایجاد بیماری تغییر رنگ خوشه در ژنوتیپ های برنج لنجان، تعداد ۳۶ نمونه مرکب از شالیزارهای استان اصفهان جمع آوری گردیدند. بذرهای آلوده پس از شستشو با آب معمولی با الکل ۱۰ درصد ضد عفونی شدند و سپس برای شناسایی عوامل قارچی روی محیط های کشت PDA, WA و کاغذ صافی مرطوب و برای شناسایی عوامل باکتریایی روی محیط های کشت YNAS, NAS, NA قرار گرفتند و در انکوباتور با دمای $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ نگهداری شدند. پس از رشد عوامل قارچی و باکتریایی جداسازی و خالص سازی آنها انجام شد. نتایج به دست آمده بیانگر همراهی قارچ های *Alternaria alternata*, *Fusarium sambucinum*, *Penicillium ssp*, *Aspergillus ssp* با بیماری تغییر رنگ خوشه در مزارع برنج اصفهان بود. بیماری زایی قارچ های *F. Sambucinum*, *A. alternate* در گلخانه با رعایت اصول کنخ اثبات گردید. نقش قارچ *A. alternata* در بروز عارضه مذکور بسیار جدی تر از قارچ *F. sambucinum* بود و بیماری زایی هیچ کدام از ایزوله های باکتریایی به اثبات نرسید. با توجه به نتایج بدست آمده، بیماری تغییر رنگ خوشه بر اثر بیمارگرهای قارچی، بخصوص قارچ *A. alternate* ایجاد می شود.

واژه های کلیدی: سوختگی خوشه برنج، *Fusarium sambucinum*, *Alternaria alternate*

مقدمه

بیماری تغییر رنگ خوشه برنج در جهان به نام های سوختگی خوشه، تغییر رنگ خوشه یا تغییر رنگ گلوم ها و بلاست دروغی معروف می باشد و از کشورهای مختلف از جمله آمریکا، هند، کره، تایلند، تایوان و ژاپن گزارش گردیده است (Webster and Gunnell 1992; Phat, et al. 2005). محققین متعددی بیماری فوق را مورد بررسی قرار داده و آن را به عنوان یک بیماری



پیچیده و مرکب که تعداد زیادی بیمارگر قارچی و باکتریایی در ایجاد آن دخیل هستند معرفی نموده‌اند (et al. Chau 1992; Mew and Misra 1994; Webster and Gunnell 1992). علائم و شدت بیماری بسته به عوامل بیمارگر دخیل در آن، شرایط محیطی، سن گیاه، حساسیت میزبان و شرایط تغذیه‌ای متفاوت است. بیماری مذکور باعث تغییر رنگ خوشه‌های برنج از زرد طلایی به رنگ قهوه‌ای تیره می‌شود. علائم بیماری، تمام یا بخشی از خوشه را در بر گرفته و می‌تواند قسمت‌های مختلف خوشه مثل گردن، شاخه‌های فرعی، میان گره‌ها، گره‌ها و گلچه‌ها را شامل شود. همچنین بیماری باعث افزایش پوکی و عقیمی بذر شده و مورفولوژی دانه (اندازه و شکل) تاثیر گذاشته و دانه‌های حاصل از خوشه آلوده، اغلب ضعیف، لاغر، نیمه پر و بعضاً عقیم بوده و کیفیت محصول را کاهش می‌دهد و باعث کاهش عملکرد نیز می‌گردد (Ashfaq, M., and et al 2017; Mew and Misra 1994; Webster and Gunnell 1992; Ou 1985). در منابع علمی به تعدادی از قارچ‌ها مثل *Alternaria alternata* A. *padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Sarocladium oryzae*, *Pyricularia oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium* spp. *Cladosporium* spp. اشاره شده است که بیماری تغییر رنگ خوشه برنج را همراهی می‌نمایند (نعیمی و همکاران ۱۳۹۰؛ پاداشت دهکایی ۱۳۹۴، Webster, and Gunnell 1992). تعدادی از این قارچ‌ها مثل: *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae*, *Sarocladium oryzae*, *Pyricularia oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium* spp. *Cladosporium* spp., نیز باعث ایجاد بیماری‌های مهم در اندام‌های هوایی برنج می‌گردند (Jeyanandarajah and Seneviratne 1991; Misra et al. 1990; Webster and Gunnell 1992; Mia et al. 2002). در استان‌های شمالی کشور تغییر رنگ خوشه برنج همواره از بیماری‌های مرتبط با تولید برنج بخصوص ارقام اصلاح شده می‌باشد. این بیماری بخصوص در مرحله رسیدگی و همزمان با باران‌های آخر فصل موجب پوسیدگی گردن و محور خوشه، قهوه‌ای شدن و گاهی باعث ایجاد توده سیاه رنگ روی دانه‌ها و خوشه‌ها می‌شود. در این مناطق قارچ *Bipolaris oryzae* به عنوان یکی از عوامل اصلی گزارش شده است (پاداشت دهکایی، ۱۳۹۴). در بررسی که در رابطه با اتیولوژی بیماری پوسیدگی غلاف در استان‌های گیلان و مازندران انجام گرفت قارچ‌های *B. oryzae* و *Fusarium* sp. با جمعیت بالا و قارچ‌های *S. oryzae* و *A. Padwickii* با جمعیت پائین معرفی شده‌اند. در تحقیق مذکور علائم بیماری روی غلاف برگ پرچم بیشتر مشاهده شده و نهایتاً منجر به تغییر رنگ و سوختگی خوشه در تمام و یا قسمتی از آن شده و بذور حاصله نیز نیمه پر و پوک بوده‌اند (نعیمی و همکاران ۱۳۹۰). در تحقیقی که به منظور دستیابی به منابع مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه برنج روی ارقام محلی، اصلاح شده ایرانی و چند رقم خارجی در شرایط مزرعه انجام شد، قارچ‌های *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Bipolaris* sp., *Ulocladium* sp. و *Nigrospora* sp., *Curvularia* sp., (پاداشت دهکایی ۱۳۹۴). با توجه به شیوع بیماری تغییر رنگ خوشه برنج در استان اصفهان و تاثیر منفی این بیماری بر خواص کمی و کیفی محصول، این پژوهش به منظور شناسایی عوامل بیمارگر تغییر رنگ خوشه ارقام برنج لنجان به اجرا گذاشته شد.

مواد و روش‌ها

در سال‌های ۹۰-۱۳۸۹ مناطق عمده برنجکاری استان اصفهان شامل شهرستان‌های لنجان، فلاورجان، مبارکه، اصفهان، خمینی شهر و نجف‌آباد، برای بررسی پراکنش، جداسازی و شناسایی عوامل ایجاد کننده بیماری تغییر رنگ خوشه ارقام برنج لنجان در مرحله ظهور خوشه مورد بازدید و نمونه برداری قرار گرفت.



۱- جداسازی و خالص‌سازی عوامل قارچی

برای جداسازی عوامل قارچی به دو روش اقدام شد. در روش اول، ابتدا بذره‌های تغییر رنگ یافته به مدت ۳۰ دقیقه در زیر آب شهر شستشو داده شد و پس از خشک شدن بذور روی کاغذ صافی سترون، تعدادی از بذور تغییر رنگ یافته به پتری‌دیش حاوی کاغذ صافی مرطوب انتقال یافته و در دمای اتاق نگهداری شدند و تعدادی از آنها نیز روی محیط کشت آب - آگار ۲ درصد قرار گرفته و به انکوباتور با دمای $25 \pm 1^\circ\text{C}$ انتقال داده شد. در روش دوم، ابتدا بذور تغییر رنگ یافته با هیپوکلریت سدیم تجاری ۲۰٪ به مدت ۷ دقیقه ضدعفونی سطحی شد و آنگاه چند بار با آب مقطر سترون شستشو داده شد و روی کاغذ صافی سترون خشک گردید و سپس به محیط کشت‌های آب - آگار، PDA، و کاغذ صافی مرطوب سترون انتقال یافته و در انکوباتور با دمای 10°C $25 \pm$ نگهداری شد (Ou 1985). در هر دو روش پتری‌دیش‌ها تا ۷ روز، به طور روزانه مورد بازدید قرار گرفت و قارچ‌های رشد یافته اطراف نمونه‌ها جداسازی و به روش نوک هیف و تک اسپور خالص‌سازی گردیدند، جدایه‌ها برای ادامه بررسی در یخچال با دمای 4°C در روی محیط کشت PDA نگهداری شدند.

۲- آزمون بیماری‌زایی

تهیه نشاء - تهیه نشاء برنج طبق روال معمول با خیساندن بذور برنج لاین امید بخش شماره ۲ (انتخابی از توده محلی سرخه لنجان) به مدت ۴۸ ساعت در آب خیسانده و سپس ضد عفونی بذور با هیپوکلریت سدیم و بنومیل انجام شد. بذور به مدت ۲-۳ روز جهت جوانه‌زدن داخل پارچه مرطوب نگهداری گردید. پس از آن، بذور جوانه‌زده داخل گلخانه با دمای $25 \pm 5^\circ\text{C}$ و در نمونه خاک مزرعه (ضد عفونی شده با بخار آب) کشت شد. نشاء‌ها پس از یک ماه به سطل‌های ۵ کیلویی که حاوی خاک پاستوریزه مزارع برنج منطقه بودند، انتقال داده شد و عملیات داشت طبق روال معمول در شرایط کشت غرقابی انجام گردید.

۳- تهیه زادمایه جدایه‌های قارچی

برای تهیه زادمایه جدایه‌های قارچی جهت انجام آزمون بیماری‌زایی، از بین جدایه‌های بدست آمده یک جدایه از قارچ *Alternaria* و یک جدایه از قارچ *Fusarium* انتخاب و به طور جداگانه روی محیط کشت PDA تکثیر گردید. سوسپانسیون تنظیم شده با غلظت 2×10^7 جهت اسپورپاشی روی خوشه‌ها برای قارچ *Alternaria* و $2/4 \times 10^6$ برای قارچ *Fusarium* تهیه گردید. بطور همزمان روی گلدان‌های شاهد آب مقطر سترون پاشیده شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه‌ای با رطوبت نسبی ۷۰-۸۵ درصد و در دمای $25-34^\circ\text{C}$ نگهداری شدند. بعد از گذشت یک ماه نتایج ثبت و قارچ عامل بیماری مجدداً از خوشه‌ها جداسازی گردید.

نتایج و بحث

علایم بیماری تغییر رنگ خوشه ارقام برنج لنجان

بیماری تغییر رنگ خوشه برنج، رنگ زرد طلایی خوشه را به رنگ قهوه‌ای و یا قهوه‌ای تیره تبدیل نموده و باعث کاهش کیفیت بذر، نیمه پر شدن دانه‌های برنج و حتی پوکی آن شد. در خوشه‌های مورد بررسی تمامی دانه‌های شلتوک و یا تعدادی از آن‌ها تغییر رنگ داده و سطح دانه‌ها نیز کامل و یا قسمتی از آن تغییر رنگ داده بود (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه خوشه آلوده و سالم

پراکندگی و شدت بیماری

آلودگی به عارضه مذکور در تمام مزارع شهرستان‌های مورد بررسی با شدت و ضعف متفاوت مشاهده گردید. درصد آلودگی ۳۶ نمونه مرکب از خوشه‌های تغییر رنگ یافته مزارع برنج شهرستان‌های مورد مطالعه، بین ۰/۹ تا ۵۷/۷ درصد برآورد گردید. در بین مناطق نمونه برداری شده منطقه قلعه قاسم شهرستان لنجان با ۵۷/۷ درصد بیشترین آلودگی و منطقه راشنان شهرستان اصفهان با ۰/۹ درصد آلودگی کمترین آلودگی را داشته است. در مزارع حاشیه رودخانه زاینده رود آلودگی شدیدتر از سایر نقاط بود. این موضوع بیانگر نقش شرایط محیطی از جمله رطوبت نسبی در شیوع، شدت و درصد آلودگی می‌باشد. در بعضی از مزارع مجاور رودخانه زاینده رود شدت بیماری به حدی بود که پوششی از قارچ روی خوشه را پوشانده بود و باعث تغییر رنگ کامل خوشه گردیده بود.

کشت، جداسازی و شناسایی قارچ‌های عامل بیماری

در هر دو روش کشت، نمونه‌های آلوده روی آب-آگار، و کاغذ صافی مرطوب و PDA قارچ‌های *Alternaria*، *Penicillium*، *Aspergillus*، *Fusarium* بدست آمد. بنابراین قارچ‌های مذکور به عنوان قارچ‌هایی که بیماری تغییر رنگ خوشه برنج در اصفهان را همراهی می‌نمایند معرفی می‌گردند. از تمامی نمونه‌های آلوده قارچ *Alternaria* جدا گردید و در مواردی سایر قارچ‌ها به همراه *Alternaria* جداسازی گردید.

آزمون بیماری‌زایی و شناسایی گونه قارچ‌های بیماری‌زا

نتایج به دست آمده از آزمون بیماری‌زایی که با رعایت اصول کنخ روی ارقام برنج لنجان انجام گرفت نشان داد که قارچ‌های *Alternaria* و *Fusarium* علایمی شبیه بیماری روی خوشه‌های برنج ایجاد نمودند و باعث تغییر رنگ دانه‌های برنج از زرد طلایی به رنگ قهوه‌ای و قهوه‌ای تیره شدند. پس از اثبات بیماری‌زایی، شناسایی گونه قارچ‌های بیماری‌زا انجام و گونه‌های آن تحت عنوان *Alternaria alternata* و *Fusarium sam bucinum* شناسایی گردید.

قارچ *Alternaria alternata* دامنه میزبانی وسیعی داشته و به عنوان یک قارچ بذرزاد یا همراه با بذر در بسیاری از بیماری‌ها گزارش گردیده است (شرفی و صدروی ۱۳۹۳). در تحقیقی که بر روی تعدادی از ارقام داخلی و خارجی انجام گرفت رقم برنج لنجانی به عنوان یک رقم بسیار حساس معرفی گردیده است (پاداشت‌دهکایی ۱۳۹۴). این اولین گزارش از دخالت گونه‌های



مذکور در عارضه تغییر رنگ خوشه برنج در ایران است.

در جهان و ایران بیمارگرهای متعدد قارچی و باکتریایی، متناسب با نوع اقلیم، ارقام و پتانسیل میکروبی مناطق زیر کشت معرفی گردیده‌اند. نتایج بدست آمده از پژوهش حاضر نشان می‌دهد که بیماری تغییر رنگ خوشه برنج در سال‌های انجام پژوهش، روی ارقام برنج لنجان در مزارع اصفهان بر اثر بیمارگرهای قارچی و بخصوص قارچ *A.alternata* ایجاد می‌گردد. هر چند که از نقش قارچ *Fusarium sambucinum* که برای اولین بار گزارش می‌گردد نبایستی غافل شد. به نظر می‌رسد، تفاوت در پتانسیل میکروبی مناطق برنج کاری استان با سایر مناطق کشور، که ناشی از تفاوت اقلیم و بخصوص میزان رطوبت می‌باشد، یکی از عوامل اصلی این تفاوت است بطوری که در بین مناطق برنج کاری استان نیز این تفاوت به چشم می‌خورد. تفاوت دیگر که در عوامل ایجاد کننده بیماری و شدت آن موثر است احتمالاً مربوط به تفاوت ژنتیکی ارقام مورد کشت می‌باشد. نهایتاً در طی این تحقیق مشخص شد که، شرایط متفاوت آب و هوایی و اقلیمی منطقه و رقم مورد کشت از تاثیر گذارترین عوامل در شیوع عوامل ایجاد کننده بیماری و شدت آن می‌باشند.

منابع

- پاداشت‌دهکایی، ف. ۱۳۹۴. مقاومت به بیماری تغییر رنگ دانه در ارقام برنج محلی و اصلاح شده ایرانی و چند رقم خارجی در شرایط مزرعه. پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی. ۴(۲). ۲۶-۱۴.
- شرفی، ز.، و صدروی، م. ۱۳۹۳. معرفی ده قارچ بیمارگر بذرزاد. دو فصلنامه علمی ترویجی بیماری‌شناسی گیاهی. ۴(۱). ۴۴-۳۴.
- نعیمی، ش.، خسروی، و.، و تسوکیوشی، ت. ۱۳۹۰. وقوع آلودگی گیاه برنج به *Bipolaris sorokiniana* در ایران. بیماری‌های گیاهی. ۴(۴). ۳۶۰-۳۵۳.
- Ashfaq, M., Mubashar, U., Haider, S. M., Ali, M., Ali, A and Sajjad, M. 2017. Grain discoloration: An emerging threat to rice crop in Pakistan. The Journal of Animal & Plant Sciences, 27(3): 696-707.
- Chau, T.p., Nguyen, T.D., and Le, T.D. 2005. Influence of grain discoloration to seed quality. Omonrice 13: 139-144.
- Jeyanandarajah, P.R.E.M.A.L.A. and Seneviratne, S.D.S., 1991. Fungi seed-borne in rice (*Oryza sativa*) in Sri Lanka. Seed science and technology. 19(3).pp.561-569.
- Mew, T.W. and Misra, J.K., 1994. A manual of rice seed health testing. Int. Rice Res. Inst.
- Mia MAT, Rahman M, Pearce D and Holderness M, 2002. Effect of seed borne *Biplaris oryzae* on seed germination and disease development in the field. Bangladesh Journal of Plant pathology 17 (1-2): 59-62.
- Misra, J.K., Jergon, E.B. and Mew, T.W., 1990. Organisms causing rice seed discoloration and their possible effect on germinability. Rice Seed Health Newsletter (Philippines). First Edition. Tehran University Press. 333 pages.
- Ou, S. H. 1985. Rice disease. Second edition. Common wealth Mycological Institute Kew, Surrey, Uk.380pp.
- Phat, C.T., Duong, N.T. and Du, L.T., 2005. Influence of grain discoloration to seed quality. Omonrice, 13, 139-144
- Webster, R.K. and Gunnell, P.S., 1992. Compendium of rice diseases.



Identification of pathogens causing Lenjan rice varieties panicle discoloration in Isfahan province

H. Samavatian^{*1}, A. Ramazani², V. Khosravi³

- ¹- Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Isfahan, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran.
- ²- Assistant Professor, Horticulture Crops Research Department, Isfahan, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Isfahan, Iran.
- ³- Assistant Professor, Plant Protection Research Department of Rice Research Institute, Mazandaran Branch, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Amol, Iran.

*Corresponding Author, Email: hsamavatian@yahoo.com

Abstract

Rice grain discoloration is a complex disease that caused by fungi and bacteria agents in the world. For identification pathogens infecting Lenjan genotypes of rice panicle discoloration, 36 composite samples were collected from paddy field of Isfahan Province. The infected seeds sample were washed with tap water, sterilized, and cultured on WA, PDA and filter paper for fungi agents and NA, NAS and YNAS for bacterial agents then incubated at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$. After fungi and bacteria agents' growth, they were isolated and purified. The results showed that, *Alternaria alternata*, *Fusarium sambucinum*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.* associated with rice panicle discoloration disease in paddy fields. Pathogenicity of *A. alternata*, *F. sambucinum* was proved according to Koch principles at rice flowering stage in greenhouse. The role of *A. alternata* was more effective than *F. sambucinum*. Pathogenicity of none of the isolates bacteria was not proved. According to the results, rice panicle discoloration disease is caused by fungal pathogens especially *A. alternata*.

Key words: *Alternaria alternata*, *Fusarium sambucinum*, Rice ear blight