گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۵ شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱

شناسایی نژادهای فیزیولوژیک شبه قارچ عامل بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان در ارومیه

فرناز شاپوران*[۱]، یوبرت قوستا[۲]، رقیه همتی[۳]، سیامک رحمانپور[۴] و رضا درویش‌زاده[۵]

۱*- **نویسنده مسؤول:** دانشجوی سابق کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی،گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، (fshapooran@yahoo.com)

۲و۵- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

۳- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

۴- استادیار بخش تحقیقات دانه های روغنی، موسسهٔ تحقیقات اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۲۲

چکیده

سفیدک داخلی یکی از بیماری‌های مهم آفتابگردان در استان آذربایجان غربی، به‌ویژه ارومیه به شمار می‌آید که در شرایط مساعد آب و هوایی، اپیدمی‌های خسارت‌زایی را ایجاد می‌نماید. با توجه به تکمیل سالانه‌ی چرخهٔ جنسی و وجود چرخه‌های متعدد غیر جنسی در فصل زراعی، احتمال بروز تغییر در قدرت بیماریزایی و ظهور نژادهای جدید، در جمعیت‌های این بیمارگر بالاست. لذا شناسایی نژادهای موجود در منطقه، در راستای تولید و کاربرد ارقام مقاوم به بیماری مفید خواهد بود. بدین منظور، در طول فصل زراعی ۱۳۸۸، بوته‌های آفتابگردان دارای آلودگی سیستمیک به قارچ عامل سفیدک داخلی از مناطق مختلف ارومیه جمع‌آوری شدند. سپس جدایه‌ها روی رقم حساس رکورد با استفاده از روش غوطه‌ور کردن گیاهچه در سوسپانسیون زئوسپورانژیوم بطور جداگانه مایه‌زنی، تکثیر و نگهداری گردیدند. به این ترتیب تعداد ۱۵ جدایه در گلخانه روی گیاهان رکورد تکثیر یافته و در آزمون‌های تعیین نژاد استفاده شدند. سپس جدایه‌ها، روی سری نه تایی ارقام افتراقی با روش مذکور مایه‌زنی شدند. گیاهچه‌های مایه‌زنی شده، در خاک پاستوریزه حاوی مخلوط ماسه و پرلیت با نسبت حجمی (۳:۲) کاشته شده و ارزیابی واکنش بوته‌های رشدکرده (مرحله‌ی دو برگی) به آلودگی، با فراهم کردن شرایط بهینه برای اسپورزایی میسر گردید. براساس نتایج به دست آمده، ارقام افتراقی واکنش یکسانی نسبت به جدایه ها نشان دادند و یک نژاد به عنوان نژاد غالب از منطقه معرفی شد که با استفاده از سیستم نامگذاری بین المللی نژادهای این بیمارگر، نژاد شماره ۱۰۰ برای اولین بار در ایران نام گرفت.

کلید واژه‌ها: آفتابگردان، سفیدک داخلی، نژاد، ارومیه

مقدمه

آفتابگردان با نام علمی هلیانتوس آنوس[1] در میان نه گیاه روغنی متداول در دنیا، یکی از منابع مهم دانه‌های روغنی است. باتوجه به افزایش جمعیت کشور و افزایش سریع‌تر نیاز کشور به مواد غذایی و نیز تغییر عادات مصرفی از یک طرف و محدودیت اراضی کشاورزی و قابل کشت از طرف دیگر، اهمیت جلوگیری از کاهش عملکرد ناشی از عوامل نامساعد محیطی و خصوصیات نامساعد ژنتیکی به آسانی روشن می‌شود و به این دلیل که توسعه سطح زیرکشت گیاه میسر نبوده، لذا باید توجه بیشتری به عملکرد در واحد سطح مبذول داشت. بدیهی

1- *Helianthus annus* L.

Archive of SID

www.SID.ir

است تحقق این امر مستلزم تولید و معرفی ارقام پرمحصول برای مناطق مختلف می باشد، لیکن به تجربه ثابت شده است که بدون توجه به مشکلاتی مانند بیماری های گیاهی این امر میسر نخواهد بود(رحمان پور، ۱۳۷۵). این گیاه مورد حمله تعدادی از عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرد. از جمله بیماری های مهمی که این محصول را تهدید می کند، سفیدک داخلی آفتابگردان[1] است که در بیشتر مناطق تحت کشت آفتابگردان در دنیا و در سطح کشور وجود دارد. پژوهشگران معتقدند این بیماری اولین بار در ایالت ماساچوست آمریکا دیده شده، سپس از طریق بذر گیاه میزبان به کشورهای اروپایی منتقل و سرانجام از همه کشورهایی که آفتابگردان در آن‌ها کشت می‌شود گزارش شده است (کولت[2]، ۱۹۸۵؛ ساکستون[3]، ۱۹۸۱). بنابر عقیده‌ی آسیموویچ[4] (۱۹۸۴)، بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان از هر قاره‌ای که آفتابگردان کشت می شود، گزارش شده و در حال حاضر به صورت اپیدمی در آمده است. اولین گزارش مربوط به وجود این بیماری در ایران توسط لپیک[5] در سال ۱۹۶۲ می‌باشد، ولی نمونه بیماری را میناسیان از خوی در سال ۱۳۴۶ و بعداً شریف از ارومیه در سال ۱۳۴۸ جمع‌آوری نموده‌اند (۱۳۵۰). علی رغم وجود تنوع در علائم بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان سال ها عقیده بر این بود که شبه قارچ عامل بیماری از فاکتور بیماری زایی[6] یکسانی در سرتاسر دنیا برخوردار است. در سال ۱۹۷۴ میلادی مشخص شد که جدایه‌های عامل بیماری در دره رودخانه سرخ از ایالت داکوتای شمالی آمریکا و مناطق مجاور آن در کانادا، با جدایه های اروپایی از نظر فاکتور بیماری زایی تفاوت دارند (توروویل دی لبروه و همکاران[7]، ۲۰۰۰). بنا بر گزارش پژوهشگران تا قبل از سال ۱۹۸۰ دو نژاد اروپایی و آمریکای شمالی شناسایی شده بودند، که بعدها نژاد اروپایی، نژاد شماره ۱ و نژاد آمریکایی نژاد شماره ۲ نام گرفت. بنابراین تا سال ۱۹۸۰، موقعیت و وضعیت نژادهای بیمارگر خیلی ساده بود، از آن زمان به بعد تعداد نژادهای شناسایی شده افزایش یافته است (گولیا و همکاران[8]، ۱۹۹۷)، به طوری‌که در ۲۰ سال اخیر ۷ نژاد جدید از بیمارگر در آمریکای شمالی و چندین کشور اروپایی شناسایی شده‌اند. این نژاد های جدید بیماری زا تر از ۲ نژاد اولیه (اروپایی و آمریکای شمالی) هستند (مولیزو- رویز و همکاران[9]، ۱۹۹۸). پژوهشگران در سال‌های قبل از ۱۹۹۸، برای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ عامل بیماری از ارقام افتراقی قدیمی آفتابگردان[10] که ژن های مقاومت[11] شناخته شده دارند، استفاده کرده و براین اساس ظهور نژادی جدید را باتوجه به عکس العمل حساسیت و یا مقاومت گیاه میزبان در مقابل قارچ اعلام کردند. در این سیستم، نامگذاری نژاد با شماره های یک یا دو رقمی مشخص شده بود که شماره‌گذاری و نامگذاری نژاد با توجه به ژن های مقاومتی که حمل می کردند انجام می شد(جدول۱). مطالعات ساکستون و همکاران (۱۹۹۱) نشان داد که وقتی رقم یا هیبریدی به یک یا چند نژاد بیماری‌زا مقاومت نشان می‌دهد، این مقاومت توسط بعضی از ژن های مقاومت که در واقع مجموعه‌ای از ژن ها هستند به وقوع می‌پیوندد. بنابراین آنها متوجه شدند که نمی‌توان صرفاً نام یک ژن مقاومت را به یک نژاد داد. با توجه به این مسئله، و به دلیل اینکه در تعداد نژادهای شناسایی شده توسط دانشمندان نیز اختلاف نظر وجود داشت و همچنین به دلیل عدم وجود یک سیستم جامع نامگذاری بین المللی و نیز دشواری تجزیه و تحلیل اطلاعات

1- Berl & de Toni *Plasmopara halstedii*
2-Kolte
3- Sackston
4- Acimovic
5- Leppik
6- virulence factor
7- Tourvielle de Labrouhe *et al.*
8- Gulya *et al.*
9- Molinero-Ruiz *et al.*
10- RHA ، RHA – 274 ، RHA – 266 ، HA – 300)
(DM-2 ،DM –3 ، RHA – 340 ،–325
11- pl

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۱-کلید قدیمی شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ *P.halstedii* بر اساس واکنش لاین‌های افتراقی قدیمی آفتابگردان (گولیا و همکاران، ۱۹۹۱؛ رشید ، ۱۹۹۳)

لاین افتراقی	ژن‌های مقاومت مشخص شده	واکنش به نژادها								
		۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹
HA – 300	–	+	+	+	+	+	+	+	?	?
RHA – 266	PL1	–	+	+	+	+	+	+	?	?
RHA-274	$PL_{2,9,10}$	–	–	+	+	+	–	–	?	–
DM-2	$PL_{2,5}$+?	–	–	–	+	+	+	+	+	+
DM-3	PL2,5	–	–	+	+	Seg*	Seg		?	?
RHA-325	$PL_{2,10}$	–	–	–	+	+	+	–	+	–
RHA-340	PL_{8}+?	–	–	–	–	–	–	–	?	?

مقاومت:- حساسیت:+ تفرق ژنی :Seg*

مربوط به نژادهای شناسایی شده، گولیا و همکارانش (۱۹۹۸) از ۶ کشور مختلف جهان، یک سیستم بین المللی نامگذاری نژاد را که در آن از ۹ رقم افتراقی ثابت استفاده می‌شود پیشنهاد نمودند که این ارقام شامل ۳ سری استاندارد و قابل دسترس برای همگان است (جدول۲)[1] (گولیا و همکاران، ۱۹۹۸). با گسترش بیماری، تا سال ۲۰۰۵، تعداد نژادهای شناسایی شده به پانزده نژاد در جمعیت بیمارگررسیده است (دلموت و همکاران[2]، ۲۰۰۸). رحمان‌پور نیز از ایران و منطقه مازندران و دشت گرگان، بر اساس سیستم قدیم نامگذاری، یک نژاد جدید بیماری زا از شبه قارچ عامل بیماری گزارش کرد، که متفاوت از نژادهای شناخته شده در دنیا بود (رحمان پور، ۱۳۷۵؛ علیزاده و رحمان پور[3]، ۲۰۰۵). بنابراین به دلیل وجود نژادهای فیزیولوژیک از عامل بیماری در منطقه و از این جهت که عامل بیماری در طی زمان دچار تغییرات فیزیولوژیک در جمعیت خود می گردد، شناسایی نژادهای موجود در جمعیت بیمارگر در منطقه و ارزیابی مقاومت یا حساسیت ارقام نسبت به بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان، می‌تواند نقش مهمی در مدیریت بیماری داشته باشد. لذا هدف از این تحقیق، جداسازی، شناسایی و معرفی نژادهای فیزیولوژیک قارچ عامل سفیدک داخلی آفتابگردان با استفاده از ارقام استاندارد، در ارومیه می‌باشد.

لازم به ذکر است که نژادهای ۷و۹ قدیمی نسبت به میزبان‌های افتراقی جدید واکنش یکسانی نشان میدهند، بنابراین فقط یک نژاد تلقی شده و براساس این سامانه جدید نامگذاری تا سال ۲۰۰۰ فقط ده نژاد از عامل سفیدک دروغی آفتابگردان در دنیا شناخته و گزارش شده است.

1- HA-304 ،Rha-265، Rha-274 ،PM13،

2- Delmotte *et al.*

3- Alizadeh & Rahmanpour

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۲- نامگذاری نژادهای فیزیولوژیک شبه قارچ عامل سفیدک داخلی آفتابگردان بر اساس واکنش لاین‌های افتراقی جدید آفتابگردان بر اساس کد سه جزئی (تورویل دی لابروه و همکاران، ۲۰۰۰)

Sunflower line	Old Race Denomination / American name 1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SET ONE											
D-1 (HA-304)	S*	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D-2 (RHA-265)	R**	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
D-3 (RHA-274)	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	S
SET TWO											
D-4 (PM13)	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S
D-5 (PM17)	R	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R
D-6 (803-1)	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
SET THREE											
D-7 (HAR-4)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
D-8 (QHP1)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
D-9 (HA335)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Triplet coding system	100	300	700	730	770	310	330	710	330	703	711

**R:مقاومت * S:حساسیت

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، تکثیر و نگهداری نمونه‌های عامل بیماری

در طول فصل زراعی ۱۳۸۸، تعداد ۴۱ بوته آلوده به سفیدک داخلی آفتابگردان (با علائم آلودگی سیستمیک) که اغلب آن‌ها در مرحله قبل از گل‌دهی بودند، از ۹ منطقه مختلف ارومیه، به طور تصادفی جمع‌آوری شدند. در هنگام نمونه برداری بعضی از بوته‌ها که بار بهاره (زئوسپورانژیوم) روی برگشان نداشتند، به همراه ریشه و مقداری از خاک زیر بوته جمع‌آوری گردیده و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای تهیه مایه تلقیح از نمونه های آلوده دارای زئوسپورانژیوم، با استفاده از قلم موی سترون، بار بهاره‌ی آن‌ها داخل آب مقطر سترون شستشو داده شد و بذرهای جوانه زده و سه روزه‌ی رقم حساس رکورد که طول ریشه‌چه آن‌ها به دو الی سه سانتی متر رسیده بود، مطابق روش گولیا و همکاران (۱۹۹۱) به طور غوطه‌ور کامل[1] داخل سوسپانسیون‌زئوسپرانژیوم، با غلظت تقریبی ۳×۱۰^{۴} زئوسپورانژ در هر میلی لیتر قرار گرفته و به مدت سه ساعت داخل انکوباتور با دمای $۱۵\pm۱^{°C}$ و تاریکی مطلق گذاشته شدند، تا مایه زنی صورت گیرد. سپس کاشت گیاهچه‌های مایه زنی شده درون گلدان‌های پلاستیکی حاوی خاک سترون صورت گرفت. دسته‌دوم نمونه‌ها که علائم آلودگی به سفیدک داخلی مانند رنگ پریدگی روی برگ‌ها، کوتولگی و بد شکلی را نشان داده اما بدون بار بهاره (زئوسپورانژیوم) بودند، به منظور

1- WSI (Whole Seedling Immersion)

Archive of SID
www.SID.ir

تولید زئوسپورانژیوم به صورت پشت رو درون تشک پتری مرطوب قرار داده شدند، سپس ظروف کشت درون انکوباتور با دمای $^{\circ}C$۱±۱۵ و تاریکی به مدت ۴۸ ساعت برای تحریک برگ‌ها به اسپورزایی گذاشته شدند، نمونه‌هایی که با این روش اسپورزایی کردند، زئوسپورانژشان با قلموی سترون درون آب مقطر شسته شده و گیاهچه‌های دو الی سه روزه‌ی رقم رکورد درون سوسپانسیون زئوسپورانژ انداخته شده و به مدت سه ساعت داخل انکوباتور با دمای $^{\circ}C$۱±۱۵ غوطه‌ور گردیده و سپس کاشت گیاهچه‌های مایه زنی شده داخل گلدان‌های پلاستیکی صورت گرفت، به این ترتیب مایه زنی و تکثیر نمونه ها انجام شد. در برخی از نمونه های آلوده، عامل بیماریزا تحریک به اسپورزایی با روش مذکور نگردید برای نگهداری و احیای جدایه بیمارگر از این نمونه‌ها، بوته‌های آلوده در خاکی که از زیر همان بوته از مزرعه برداشته شده بود، خرد شده و به طور کامل مخلوط گردیدند و به مدت حدود دو ماه داخل کیسه‌های پلاستیکی ریخته شده و به حالت مرطوب، در جایی خنک نگه داشته شدند، سپس با کاشت عمیق بذور ضد عفونی شده رقم رکورد، به طور متراکم در این خاک‌ها و فراهم کردن رطوبت زیاد و ایجاد هوای خنک، جدایه‌هایی با این روش به دست آمدند که دارای نشانه‌های آلودگی سیستمیک بودند. تعدادی ازجدایه‌های جمع آوری شده نیز پس از اعمال تحریک به اسپورزایی، تولید اسپور نکردند، همچنین تعدادی جدایه نیز از هر مزرعه با رعایت فاصله و به دلیل تکراری بودن از مجموع کل نمونه‌ها حذف شدند.

شناسایی نژادهای فیزیولوژیک

برای شناسایی نژاد از روش گولیا و همکاران (۱۹۹۱) استفاده گردید. ابتدا بذور ارقام افتراقی[1]، با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم ۲۰ درصد به مدت حدود ۱۵-۱۰ دقیقه ضد عفونی سطحی شده و جهت تحریک به جوانه‌زنی به طور جداگانه داخل تشک‌های پتری ۱۰ سانتی‌متری و بین دو لایه کاغذ صافی که با آب مقطر سترون مرطوب شده بودند گذاشته شده و به مدت سه الی چهار روز در انکوباتور با دمای $^{\circ}C$۲±۲۳ و تاریکی مطلق قرار داده شدند تا جوانه زده و طول ریشه چه آن‌ها به دو تا سه سانتی متر برسد، از طرفی ۴۸ ساعت قبل از انجام عملیات مایه زنی، برگ‌های بوته‌های آلوده رکورد که دارای نشانه‌های آلودگی سیستمیک بودند، به صورت پشت و رو داخل تشک پتری ۱۰ سانتی‌متری در شرایط رطوبت اشباع و تاریکی و دمای $^{\circ}C$۱±۱۵ (داخل انکوباتور) به مدت ۴۸ ساعت گذاشته شدند تا تحریک به اسپورزایی شده و زئوسپورانژیوم کافی تولید کنند. غلظت سوسپانسیون‌زئوسپورانژیوم تهیه شده، به وسیله لام گلبول شمار به ^{4}۱۰×۲ زئوسپورانژ در هر میلی لیتر رسانده شد. سپس بشرهای حاوی گیاهچه های سه الی چهار روزه ارقام افتراقی براساس روش غوطه ور کردن کامل گیاهچه در انکوباتور با شرایط مطلوب (رطوبت اشباع و تاریکی و دمای $^{\circ}C$۱±۱۵) به مدت چهار ساعت گذاشته شدند تا مایه‌زنی صورت گیرد، بعد از آن گیاهچه‌های مایه زنی شده داخل گلدان‌هایی با خاک سترون حاوی مخلوط ماسه و پرلیت به نسبت حجمی ۳ : ۲، داخل اتاقک موجود در گلخانه با شرایط خاص (دمای۴±۲۲، فضای با رطوبت نسبی ۵۰٪ و روشنایی کافی) کاشته شدند، لازم به ذکر است، نور فضای داخل گلخانه با استفاده از لامپ‌های کم مصرف نور زرد و سفید و لامپ‌های مهتابی و لامپ‌های قلمی ۱۰۰۰ واتی(۱۴ساعت روشنایی) تامین گردید. به جهت فقیر بودن مخلوط پرلیت و ماسه از مواد غذایی مورد نیاز برای رشد بوته‌های آفتابگردان، هر هفته یک بار کودکامل ان- پی- کا به غلظت ۲۰-۲۰-۲۰ پی پی ام به‌صورت محلول در آب، پای هربوته به میزان دو میلی لیتر اضافه گردید. هفته‌ای یکبار نیز از محلول نیترات سدیم به غلظت ۸/۵ میلی گرم در یک لیتر آب (به منظور کاهش آلودگی محدود به کوتیلدون با قارچ عامل بیماری)

1- HA-304 و RHA-265 و RHA-274 و PM-17 و HA-335 و QHP-1 و HA-R4 و 1-803 و PM-13

Archive of SID
www.SID.ir

استفاده شد که پای هر بوته حدود سه میلی لیتر ریخته شد، به این ترتیب بوته‌ها تا مرحله دو برگی نگه داشته شدند. در هر آزمایش نیز، ازسری نه تایی ارقام افتراقی به عنوان شاهد تحت تیمار آب مقطرسترون، جهت نشان دادن تاثیر مثبت تیمار قارچ عامل بیماری استفاده شد. به این ترتیب که بذور ارقام افتراقی پس از ضدعفونی سطحی، جهت تحریک به جوانه‌زنی به طور جداگانه داخل تشک‌های پتری ۱۰ سانتی‌متری و بین دو لایه کاغذ صافی مرطوب گذاشته شده و به مدت سه الی چهار روز در انکوباتور با دمای $^{\circ}C$۲±۲۳ و تاریکی مطلق قرار داده شدند تا جوانه بزنند، سپس درآب مقطر سترون غوطه ور شده و در انکوباتور با شرایط مطلوب (رطوبت اشباع و تاریکی و دمای $^{\circ}C$۱±۱۵) به مدت چهار ساعت گذاشته شدند.

پس از طی شانزده روز، ارزیابی واکنش بوته‌های رشدکرده نسبت به آلودگی براساس حساسیت یا مقاومت آن‌ها، با فراهم کردن شرایط دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۱۰۰-۹۰ درصد و تاریکی، به مدت ۴۸ ساعت میسر گردید. حساسیت در این ارقام بر اساس کوتولگی، رنگ پریدگی و اسپورزایی روی کوتیلدون و برگ‌ها بود و عدم وجود چنین علائمی مقاومت تلقی شد. کلیه آزمایش‌ها با سه بار تکرار انجام گرفتند. درطول انجام آزمایش‌ها در تعداد معدودی از بوته‌های رقم اچ‌آ-۳۳۵ نیز حساسیت و اسپوردهی روی کوتیلدون و برگ‌ها مشاهده شد برای اطمینان از نتیجه کار و تشابه و خلوص جدایه‌ها، زئوسپورانژیوم حاصل از روی کوتیلدون این رقم جمع‌آوری شده و دوباره روی رقم حساس رکورد تکثیر شد و به این ترتیب این جدایه دوباره خالص سازی گردید . سپس جدایه خالص سازی شده روی سری کامل ارقام افتراقی دوباره مایه‌زنی شد و عکس‌العمل آن‌ها یادداشت گردید(گولیا و همکاران، ۱۹۹۱).

نتایج و بحث

جمع‌آوری و تکثیر نمونه‌های عامل بیماری

برای انجام این تحقیق ۱۵ جدایه بیمارگر از ۹ روستای ارومیه در سال ۱۳۸۸ جمع‌آوری گردیده و بر روی رقم رکورد رشد داده شده و احیا گردیدند، که شامل دو جدایه از هرکدام از روستاهای وقاصلوی‌سفلی، طلاتپه، ترپاخ قلعه، ساعت‌لوی بیگلر، حیدرلوی بیگلر، آغ بلاغ و یک جدایه از هرکدام از روستاهای جبل قشلاق، سیروان شاهلو، اصالو بود، به طوری که تکثیر این جدایه‌ها هر ۲۰ روز یکبار در گلخانه ادامه داشت، تا بدین ترتیب جدایه‌ها نگهداری شدند و برای آزمایش‌های بررسی نژادهای فیزیولوژیک مورد استفاده قرار گرفتند (شکل۱)

شناسایی نژادهای فیزیولوژیک

واکنش ارقام افتراقی آفتابگردان نسبت به ۱۵ جدایه جمع‌آوری شده بیمارگر مورد ارزیابی قرار گرفت. نتیجه آزمایش مشخص کرد که از میان ارقام افتراقی مایه‌زنی شده با جدایه‌های بیمارگر، رقم اچ آ-۳۰۴[1] با اسپوردهی روی جفت اول برگی و کوتیلدون، در همه آزمایش‌ها حساسیت کامل نسبت به تمامی جدایه‌ها از خود نشان داد و بقیه‌ی ارقام با عدم اسپوردهی قارچ، در برابر تمامی جدایه‌ها مقاومت داشتند(جدول۳). مقایسه بیماری‌زایی جدایه‌های آزمایش شده بر روی ارقام افتراقی نشان داد که تمام جدایه‌های مذکور از نظر بیماری‌زایی روی ارقام افتراقی یکسان عمل کرده، مشابه یکدیگر بوده و معرف یک نژاد غالب از شبه قارچ عامل بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان از ارومیه می باشند. با توجه به جدیدترین سیستم بین المللی نامگذاری نژادهای این بیمارگر، که در ایران برای اولین بار به کار میرود، و با توجه به بروز واکنش حساسیت لاین اول[2] از گروه اول جدول مربوط به نامگذاری نژادها، نژاد مورد شناسایی در منطقه به عنوان نژاد شماره ۱۰۰ نام گرفت (رجوع شود به جدول۲). همچنین در بررسی جدایه‌های جمع‌آوری شده از روی ارقام افتراقی، مشخص شد که جدایه منطقه

1- HA-304
2- HA-304

Archive of SID
www.SID.ir

گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۵ شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱

شکل ۱- علائم آلودگی به بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان روی گیاهچه‌های آفتابگردان مایه زنی شده با شبه قارچ *Plasmopara halstedii*

الف- کوتیلدون و برگ‌های آلوده پیش از تحریک به اسپورزایی؛ ب- برگ‌های آلوده پس از تحریک به اسپورزایی؛ پ- کاهش حجم و رشد ریشه در بوته های آلوده؛ ت- کوتولگی بوته‌های آلوده در اثر بیماری در مقایسه با بوته‌های سالم؛ ج- رنگ پریدگی یا موزاییک برگ‌های آلوده به بیماری سفیدک داخلی؛ د- اسپوردهی خفیف در قسمت طوقه گیاه آلوده

ترپاخ قلعه روی کوتیلدون بوته‌های رقم اچ آ-۳۳۵ اسپورزایی می کند، جداسازی دوباره اسپورانژ شبه قارچ از روی بوته های آلوده، تکثیر آن و در نهایت مایه‌زنی دوباره آن روی سری کامل ارقام افتراقی، نشان داد که واکنش ارقام افتراقی در مقابل جدایه مذکور مشابه واکنش شان در مقابل دیگر جدایه‌ها بود. بنابراین به

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۳- واکنش ارقام افتراقی آفتابگردان نسبت به جدایه‌های شبه قارچ عامل بیماری

HA-304 (D-1)	Rha-265 (D-2)	Rha-274 (D-3)	PM13 (D-4)	PM17 (D-5)	803-1 (D-6)	HAR-4 (D-7)	QHP1 (D-8)	HA335 (D-9)	رقم / جدایه
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH2
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH3
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH7
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH22
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH24
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH40
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH41
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH38
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH39
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH9
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH10
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH12
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH13
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH5
S	R	R	R	R	R	R	R	R	PH6

احتمال زیاد اختلاط ژنتیکی در اثر اختلاط گرده در مزرعه وجود داشته که عدم آلودگی آن ها در نوبت دوم مایه‌زنی با جدایه‌های خالص شده را به همراه داشته است.

با توجه به اینکه عامل بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان دارای تولید مثل جنسی بوده و در پایان هر فصل رویش، چرخه جنسی زندگی خود را با تولید اسپور کامل می‌کند (دسپرز- لوستا و همکاران[1]، ۲۰۰۷؛ نواک[2]، ۲۰۰۷). بنابراین احتمال ظهور نژادهای جدید در اثر وقوع نوترکیبی های جنسی بالاست. از طرف دیگر چرخه‌های متعدد غیر جنسی این بیمارگر در هر فصل زراعی ایجاد می شوند که این امر نیز احتمال بروز تغییر در قدرت بیماریزایی شبه قارچ و بروز نژادهای جدید بیماری‌زا، در اثر موتاسیون را افزایش می دهد. کشت وسیع ارقام و یا هیبریدهای مقاوم نیز موجب اعمال فشار انتخابی بر جمعیت های بیمارگر گردیده و ظهور نژادهای بیماری زای جدید را تسریع مینماید که نتیجه آن شکسته شدن مقاومت ارقام و واریته‌های مقاوم و حساس شدن آن‌ها در برابر بیماری می‌باشد. تا قبل از سال ۱۹۸۰ دو نژاد (۲و۱) از بیمارگر در جهان شناسایی شده بودند، ولی پس از آن تعداد نژادها افزایش یافته است. بنا به گزارش های متعدد محققان تا سال ۲۰۰۰ هفت نژاد جدید از بیمارگر در آمریکای شمالی و چندین کشور اروپایی شناسایی شده اند. به طور کلی با گسترش بیماری تعداد نژادهای شناسایی شده تا سال ۲۰۰۵ به پانزده نژاد رسیده است (دلموت و همکاران، ۲۰۰۸؛ تورویل دی لابروه و همکاران، ۲۰۰۳). این تغییرات و گسترش بیماری و تولید نژادهای جدید و متفاوت ممکن است به جهت تغییر و پیچیدگی شرایط آب و هوایی (درجه حرارت و رطوبت) در مناطق مختلف نیز باشد، و پاتوژن برای اینکه خود را با شرایط موجود سازگار کند در خود تغییراتی ایجاد می‌کند و سبب ظهور نژادهایی با قدرت تهاجمی بالاتر می‌شود (بالدینی و همکاران[3]، ۲۰۰۸).

استفاده محققین مختلف از لاین‌های افتراقی متفاوت و یا اختلاف در نحوه ارزیابی نژاد در مایه‌زنی‌های

1- Desprez- Loustau *et al.*
2- Novak
3- Baldini *et al.*

Archive of SID
www.SID.ir

مصنوعی[1]، اختلاف در میزان مایه تلقیح و مدت زمان انکوباسیون می‌تواند علت این تغییرات بوده و نتایج مختلفی در شناسایی نژادهای موجود، حاصل نماید (علیزاده و رحمان پور، ۲۰۰۵). محققین دیگر نیز تغییرات در روش مایه‌زنی، تفاوت در غلظت مایه آلوده‌کننده (۲۰۰۰ تا ۲۰۰۰۰ زئوسپرانژیوم در میلی لیتر)، مدت زمان مایه‌زنی (از یک ساعت تا ۲۴ ساعت) را حداقل بخشی از فاکتورهای موثر در معرفی برخی نژادها می‌دانند (گولیا و همکاران، ۱۹۹۱؛ موزیار و همکاران[2]، ۱۹۹۳). لذا با توجه به این مشکلات و به دلیل اینکه در تعداد نژادهای شناسایی شده توسط دانشمندان نیز اختلاف نظر وجود داشت، در سال ۱۹۹۸ با کوشش جمعی از محققین برجسته و دست اندرکار این بیماری، یک سیستم جدید نامگذاری برای نژادهای فیزیولوژیک این بیماری، با کدهای سه رقمی تصویب و معرفی گردید (گولیا همکاران، ۱۹۹۸). به منظور شناسایی نژادهای فیزیولوژیک عامل بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان تحقیقات متعددی در مناطق مختلف جهان صورت گرفته است. نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که تعداد نژادهای شناسایی شده در مناطق جغرافیایی مختلف، بسیار متفاوت است. باتوجه به نبود گزارشات رسمی در طی سال‌های اخیر از وجود بیمارگر در ارومیه و به دلیل احتمال وجود نژادهای فیزیولوژیک از شبه قارچ در منطقه و همچنین به دلیل اینکه کنترل موثر بیماری‌های گیاهی نیازمند استفاده از راهکارهای مختلف بوده و در این میان کاربرد ارقام مقاوم یکی از روش‌های موثر و سالم در کنترل این بیماری است، لذا در این تحقیق با استفاده از روش قابل قبول بین المللی (گولیا و همکاران، ۱۹۹۱) نژاد غالب موجود در منطقه ارومیه شناسایی شد. نتایج حاصل نشان داد، تنوع در نژادهای بیمارگر در منطقه بالا نیست، سابقه طولانی کشت توده بومی آجیلی به صورت گسترده در منطقه از طرفی و حساسیت بالای آن به قارچ عامل بیماری سفیدک داخلی از طرف دیگر می‌توانند به عنوان دلایلی برای تشابه و عدم وجود تفرق ژنتیکی جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ارومیه باشد، در نتیجه می توان تمام جدایه‌های جمع‌آوری شده را به عنوان یک نژاد در نظر گرفت و اظهار داشت که از تمام جدایه‌های آزمایش شده به عنوان یک نژاد فیزیولوژیک از عامل بیماری شناسایی گردید که با توجه به سیستم بین المللی شناسایی نژادهای این بیمارگر نژاد شماره ۱۰۰ نام گرفت.

علیزاده و رحمان‌پور (۲۰۰۵) نیز در بررسی‌های خود که در سال ۱۳۸۲-۱۳۸۰ از اکثر مناطق ایران به منظور آگاهی از نژاد یا نژادهای جدیدتر قارچ عامل بیماری انجام دادند، یک نژادغالب و جدید[3] را که متفاوت از نژادهای شناخته شده تا آن زمان در دنیا بود معرفی نمودند، از طرفی با مقایسه‌ی واکنش‌های حاصل از نژاد شماره یک (نژاد ۱۰۰) و نژاد مزبور، نسبت به ارقام مورد استفاده، اختلاف در حساسیت یا مقاومت رقم دی ام-۳[4] دیده می‌شد به طوری که این رقم نسبت به نژاد معرفی شده توسط علیزاده و رحمان‌پور حساس ولی نسبت به نژاد یک(۱۰۰) مقاوم بود، همچنین در تحقیقات علیزاده و رحمانپور رقم ار اچ آ۲۶۶[5] بسیار شبیه رقم ار اچ آ ۲۶۵ [6] در تحقیق اخیر بوده و در هر دو این ارقام مقاومت دیده شده است. همین مطلب روی رقم ار اچ آ-۲۷۴[7] نیز نیز که در هر دو تحقیق استفاده شده است صادق است، پس هر دو نژاد در دو مورد واکنش یکسانی روی ارقام افتراقی داشته‌اند. اولین لاین های هر دو سری گذشته و جدید[8] نیز حساسیت نشان داده اند. پس در جدول جدید عدد یک از گروه اول برای هر دو محرز است. لذا نزدیک بودن فیزیولوژیک ایزوله های علیزاده و رحمانپور و نتایج اخیر روشن و واضح است. بنابراین

1- Cotyledon Limited Infection
2- Mouzeyar *et al.*

3- Ir1
4- DM-3
5- RHA266
6- RHA265
7- Rha274
8- HA304 و HA300

Archive of SID
www.SID.ir

احتمال وجود داشته که نژاد قدیمی عددی از شمارهٔ صد باشد (به عنوان مثال ۱۰۱ یا عددی دیگر)، پس اظهار نظر قطعی در این امر نیاز بـه تحقیقـات بیشـتری دارد. بـا ایـن وجود استفادهٔ جهانی و گسترده از سری جدیـد لایـن هـا بروز احتمالات فراوان گذشته را به حداقل رسانده اسـت. ایـن نـژاد (نـژاد۱۰۰) در اکثـر منـاطق مـورد کشـت آفتابگردان دیده شده است، به طوری که شیندروا در طی سه سال تحقیق خود در فاصله سال‌های ۲۰۰۳-۲۰۰۰ این نـژاد را از کشـور بلغارسـتان، گـزارش کـرده اسـت. بـه گفتـه‌ی او فقـط در سـال اول تحقیـق خـود بـا نـژاد ۱۰۰ مواجه شده، که بعدا نژادهـای جدیـد ۳۰۰ و ۷۰۰ را نیـز شناسایی کرده است. نامبرده این مسئله را ناشـی از بـروز مقاومت انبوه در ارقام و هیبریدهای آفتابگردان در مقابل نژاد ۱۰۰ می‌داند (شیند روا[1]، ۲۰۰۵).

سپاسگزاری

بدین وسیله از اعضای گـروه گیاهپزشـکی دانشـکده کشاورزی دانشگاه ارومیه و زنجان به جهت همکاری در طول اجرای پژوهش، تشکر و قدردانی به عمل مـی‌آیـد. همچنین از خانم مهندس معصومه حاتم‌زاده، که در طول انجام پژوهش، بسـیار یـاری رسـاندند صـمیمانه قـدردانی می‌شود.

منابع

۱. رحمان‌پور، س. ۱۳۷۵. بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان در استان مازندران و دشت گرگان. پایان نامه فـوق لیسـانس در رشته بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه‌تهران. ۷۴ ص.

۲. شریف، ق. ۱۳۵۰. سفیدک دروغی آفتابگردان. مجله آفات و بیماری‌های گیاهی. ۳۱: ۱۹ -۳۱.

3. Acimovic, M. 1984. Sunflower diseases in Europe, the United States and Australia, 1981–1983. Helia, 7:45–54.

4. Alizadeh, A., and Rahmanpour, S., 2005. Report of a new race of *Plasmopara halstedii*, the causal agent of sunflower downy mildew from Iran. Iranian. Journal of Plant Pathology, 41(1):19-37.

5. Baldini, M., Danuse, F., Turi, M., Sandra, M., and Raranciuc, S. 2008. Main factors influencing Downy mildew *(Plasmopara halstedii*) infection in high-oleic sunflower hybrids in Northern Italy. Crop Protection, 27: 590–599.

6. Desprez- Loustau, M. L., Robin, C., Buee, M., Courtecuisse, R., Garbaye, J., Suffert, F., Sache, I., Rizzo, d. m., 2007. The fungal dimension of biological invasion. Trends in Ecology and Evolution, 22: 472-480.

7. Delmotte F, Giresse X, Richard-Cervera S, M'Baya J, Vear F, Tourvieille J, Walser P, Moinard J, Tourvieille de Labrouhe D. 2008. Single nucleotide polymorphisms reveal multiple introductions into France of *Plasmopara halstedii,* the plant pathogen responsible for sunflower downy mildew. Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infection Diseases, 8: 534-540.

8. Gulya, T. j., Sackstone, W.E., Viranyi, F., Masirevic, S., and Rashid, K. H. 1991. New races of the sunflower downy mildew pathogen *(Plasmopara halstedii)* in Europe and North America. Journal of Physiopathology, 132: 303-311.

1- Shindrova

Archive of SID
www.SID.ir

9. Gulya, T.J., Rashid, K.H., Maširević, S., 1997. Sunflower diseases. In: Sunflower technology and production. American Society of Agronomy, Madison, Wisconsin, USA, pp: 263-381.

10. Gulya, T.J., Tourvieille, L.D., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, K. and Viranyi, F. 1998. Proposal for standardized nomenclature and identification of races of *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew). pp: 130-136, In: ISA Symposium III Sunflower Downy mildew. T. Gulya and F. Vear, eds. Fargo ND.

11. Kolte, S.J., 1985. Disease of Annual Edible Oilseed Crops. (Vol. 3) Sunflower, Safflower and Nigerseed Disease. CRC Press, pp: 17-24.

12. Molinero-Ruiz, M.L., Melero-Vara, J.M., and Gulya, T.J. 1998. Pathogenic characterization of *Plasmopara halstedii* isolates from Spain. Pages 26-29 in: ISA Symposium III Sunflower Downy Mildew. T. Gulya and F. Vear, eds. Fargo, ND.

13. Montes, F., and Sackstone, W.E., 1974. Growth of *plasmopara* within susceptible and resistant sunflower plants. Proc. 6th. Int. Sunflower Conf. Bucharest. Romania, 623-629.

14. Mouzeyar, S., Tourvielle, D., and Vear, F., 1993. Histopathological studies of resistance of sunflower (*Helianthus annus* L.) to downy mildew (*Plasmopara halstedii* Farl. Berlese et de Toni). Journal of Phytopathology, 139: 289-297.

15. Novak, S.J., 2007. The role of evolution in the invasion process. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 104: 3671–3672.

16. Rashid, K.Y. 1993. Incidence and virulence of *Plasmopara halstedii* on sunflower in western Canada during 1988-1991. Canadian Journal of Plant Pathology, 15: 206-210.

17. Sackston, W.E., 1981. Downy mildew of sunflower. pp: 545-575. In: D. M. Spencer, (ed.). The Downy mildews, Academic Press, New York.

18. Sackston, W.E., Gulya, T.J., Miller, F. 1991. A Proposed international system for designating races of *plasmopara halstedii*. Plant disease, 74(9): 721-723.

19. Shindrova, P. 2005. New nomenclature of downy mildew races in sunflower (*Plasmopara halstedii* Farl. Berlese et de Toni) in Bulgaria (Race composition during 2000-2003) Helia, 28, Nr. 42, pp: 57-64.

20. Tourvielle de Labrouhe, D., Gulya, T.J., Masirevic, S., Penaud, A., Rashid, Y.K., and Viranyi, F., 2000. New nomenculature of races of *Plasmopara halstedii* (Sunflower Downy Mildew). In: Proc. of the 15th International Sunflower Conference, Vol. II, Toulouse, France, 12-15 June, pp: 161- 166.

21. Tourvieille de Labrouhe, D., Batailon, C., Moinarad, J., Philippon, J., Walser, P., Tourvieille, J., and Vear, F., 2003. Evolution of downy mildew races in France. In preparation.

Archive of SID

www.SID.ir