Archive of SID

شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ عامل بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان در استان مازندران ودشت گرگان

Plasmopara halstedii(Farlow) Berl and de Toni

سیامک رحمانپور، جواد زاد و قربانعلی حجارود

دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادان گروه گیاهپزشکی

دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران

تاریخ پذیرش مقاله ۷۸/۸/۱۹

خلاصه

در طول بازدید از مزارع آفتابگردان استان مازندران ودشت گرگان طی سالهای ۱۳۷۴و۱۳۷۵.پنجاه وشش (۵۶)نمونهٔ بیماری سفیدک داخلی از ۳۱ منطقه جمع آوری گردید.قارچ عامل بیماری[1] این بوته ها با استفاده از روش آلوده سازی وغوطه ور کردن کامل گیاهچه در سوسپانسیون اسپور بطور جداگانه روی رقم حساس رکورد تکثیر و نگهداری شد. جدایه‌های نگهداری شده روی ارقام افتراقی[2] دریافت شده از کشور کانادا طبق روش بین المللی[3] مایه زنی شدند . ارقام افتراقی واکنش یکسانی نسبت به تمامی جدایه ها از خود نشان دادند .از مقایسهٔ واکنش ارقام افتراقی دنیا چنین بنظر میرسد که این ایزوله ها با نژادهای موجود تفاوت دارند.

واژه های کلیدی : آفتابگردان . سفیدک داخلی، قارچ عامل بیماری. نژادهای فیزیولوژیک

مقدمه

بیماریهای سفیدک داخلی وزنگ آفتابگردان در ایران بسته به شرایط آب و هوائی تولید این محصول را دچار نقصان می‌نمایند(۱،۳،۴،۵،۶و۷).باتوجه به استقرار و پیشرفت پایدار سفیدک داخلی در نواحی مهم کشت آفتابگردان بویژه استان مازندران و دشت گرگان اهمیت این بیماری مشخص می گردد.

اولین‌اثردربارهٔوجودبیماری سفیدک داخلی آفتابگردان درایران از لیپیک می باشد(۱۲).تاکنون دراستان های مازندران و گرگان و آذربایجان شرقی و غربی،کرمانشاهان ،همدان ،کردستان وگیلان آلودگی به بیماری مشاهده شده است(۲و۳).از آنجائی که قارچ عامل بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان چرخهٔ زندگی خود را همه ساله کامل میکند،لذا ممکن است نژادهای بیماریزای جدیدی دراثر موتاسیون و نوترکیبی ژنهای بیماریزا(همانند سایر عوامل بیماریزای گیاهی) بوجود آیند (۸،۱۳و۱۵). وجود این نژادها و پراکندگی منطقه‌ای آنها درامر تحقیقات اصلاح و تهیهٔ ارقام مقاوم به بیماری ،از اهمیت ویژه ای برخوردار است . چراکه توسعهٔ کشت این ارقام در مقیاس گسترده بدون در نظرگرفتن حضور و نحوهٔ پراکنش نژادها ویا حتی بروز اشتباه دراین زمینه با شکست روبرو خواهد شد (۱۶).تاکنون نه نژاد بیماریزای قارچ عامل بیماری دراسریکا ،اروپا،آسیاوافریقا شناسایی شده اند (۱۸،۱۹و۲۰).دراین میان استرالیا تنها کشوری است که با وجود تولید آفتابگردان در سطحی وسیع،بعلت اعمال قرنطینهٔ شدید،آلودگی به قارچ عامل بیماری سفیدک داخلی درآن مشاهده نشده است (۷و۱۹).

1 - *Plasmopara halstedii* 2- Differential 3- Gulya et al, 1999

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روشها

۱ - جمع آوری ونگهداری نمونه های قارچ عامل بیماری:

براساس روش بین المللی پیشنهادی گولیا و همکاران (۱۰ و ۱۱)برای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک ،در سالهای ۱۳۷۴و۱۳۷۵نمونه برداری از میان بوته های آفتابگردان با علایم آلودگی سیستمیک به سفیدک داخلی از مزارع بطور تصادفی انجام شد. مشخصات هر نمونه شامل محل نمونه برداری ،تاریخ جمع آوری ونوع رقم میزبان یادداشت شده و ضمیمهٔ آنها گردید. درمجموع ۳۱ منطقه مورد بازدید قرار گرفت که عبارت بودند از :

دشت ناز، جامخانه، نودهک، نکاء، رستم کلا، گرجی محله، آسیاب سر، تروجن، بهشهر، سراج محله، تیرتاش، خورشیدکلا، گرگان، ، قرق ، خان بین، دلند، نارکلاته، قره قاچ، آزادشهر، نظام آباد، تاتاربایجق، گنبدکاووس، مینودشت، بلوچ آباد، کلاله، قره جه، ، قره سعید، قره بش، قپان بالا، گلیداغ، عرب‌لاله گون، (جدول ۱).

برای انتقال جدایه ها روی بوته های حساس رکورد بمنظور نگهداری و احیای آنها ابتدا بذور با استفاده از محلول ۲۰ درصد آب ژاول بمدت ۱۵ - ۱۰دقیقه ضد عفونی سطحی شدند. پس از ضد عفونی سطحی درون ظروف پتری و مابین دو لایه کاغذ صافی سترون کشت گردیدند.ظرف های پتری مزبور جهت جوانه زنی و رشد گیاهچه ها بمدت ۳ روز درون ژرمینا تور با حرارت ۲±۲۲درجهٔ سانتیگراد نگهداری شدند.زئوسپورانژهای[1] بوته های آلوده (سطح پشتی برگها)بطور جداگانه با استفاده از قلم مودرون آب مقطر سترون شستشوداده شده و بدین ترتیب سوسپانسیون اسپور تهیه گردید.گیاهچه‌های سه روزهٔ رقم رکورد بلا فاصله براساس روش آلوده سازی غوطه ور کردن ،درون این سوسپانسیونها غوطه ور شدند.مجموعه های گیاهچه ها و سوسپانسیون داخل ژرمیناتور با

جدول ۱ - مشخصات جدایه های قارچ *P.halstedii* استان مازندران ودشت گرگان ۷۵-۱۳۷۴

محل جمع آوری	تعداد جدایه	رقم‌میزبان	محل جمع آوری	تعداد جدایه	رقم میزبان
دشت نازساری	۲	CMS19 ♀	نارکلاته	۱	رکورد
جامخانه	۱	رکورد	قره قاچ	۱	"
نودهک	۱	"	آزادشهر	۱	"
نکاء	۳	"	نظام آباد	۱	"
رستم کلا	۴	"	تاتاربایجق	۲	"
گرجی محله -بهشهر	۱	"	گنبدکاووس	۱	"
آسیاب سر	۳	"	مینودشت	۲	"
تروجن	۱	"	بلوچ آباد	۱	"
بهشهر	۸	"	کلاله	۴	"
سراج محله	۱	R-28	قره جه	۱	"
تیرتاش	۱	رکورد	قره سعید	۱	"
خورشیدکلا	۳	"	قره بش	۱	"
گرگان	۲	"	قپان بالا	۱	"
قرق	۱	"	عرب لاله گون	۲	"
خان‌بین	۱	"	گلیداغ	۲	"
دلند	۱	"			

1 - Zoosporang

2- Haemocytometer

www.SID.ir

Archive of SID

حرارت ۱±۱۵درجهٔ سانتیگراد بمدت سه ساعت جهت مایه زنی[1] قرارداده شدند پس از این مدت گیاهچه هادر گلخانه بعنوان جدایه های قارچ عامل بیماری کشت و نگهداری شدند (۱۰،۱۸و۲۱).درنهایت تعداد ۵۶ جدایه از ۳۱ منطقه تکثیر و نگهداری شده ودر آزمایشهای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند.لازم به ذکر است که جهت تهیهٔ جدایه بایستی از روش تک زئوسپورانژ استفاده می شد یعنی در یک میلی لیتر سوسپانسیون،۲-۱ زئوسپورانژ وجود داشته باشد. ولی در چنین غلظتی آلودگی خیلی بندرت اتفاق می افتد وبناچار روشهای آلوده سازی متداول در دنیا مورد استفاده قرار گرفتند(۱۰).

۲-شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ عامل بیماری :

بذورارقام افتراقی ابتدا در محلول ۲۰ درصد آب ژاول بمدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی سطحی شدند. ۲۴ ساعت قبل از اجرای عملیات مایه زنی ،برگهای بوته های آلودهٔ سیستمیک (رقم رکورد)روی کاغذ صافی مرطوب درون ظروف پتری قرار داده شدند. نمونه های برگی طی این مدت برای تحریک به اسپرزایی درون ژرمیناتور با حرارت ۱±۱۵درجهٔ سانتیگرادوتاریکی نگهداری شدند . سوسپانسیونهای اسپرتهیه و با استفاده از لام‌گلبول شمار[2] به غلظت ۲۰ هزار اسپردر هر میلی لیتر رسانده شدند . سپس گیاهچه های سه روزهٔ ارقام افتراقی در حالت غوطه ور بمدت سه ساعت درون ژرمیناتور با همان شرایط ذکر شده در بالا قرار داده شدند بدین ترتیب گیاهچه‌های‌مایه زنی شده به گلخانه جهت کشت و نگهداری منتقل گردیدند.مخلوط پرلیت[3]- ماسه با نسبت حجمی ۳ به ۲ بعنوان بستر کشت ارقام افتراقی مورد استفاده قرار گرفت (۹،۱۱و۱۸).گیاهچه ها بمدت ۱۵ روز در شرایط گلخانه (۲۲ درجهٔ سانتیگرادحرارت،۱۴-۱۰هزار لوکس[4] شدت نور در ۱۶ ساعت روشنایی و دو مرتبه کود مایع N-P-K بغلظت ppm۲۰-۲۰-۲۰ نگهداری شدند . پس از طی این مدت گیاهچه های رشد کرده برای ارزیابی واکنش آنها از نظر مقاومت یا حساسیت بمدت ۲۴ ساعت در شرایط رطوبت اشباع و تاریکی قرار داده شدند. حساسیت دراین ارقام براساس کوتولگی[5] رنگ پریدگی[6] واسپرزایی روی کوتیلدون[7] وبرگها ارزیابی شد (۸،۹،۱۱B،۱۴و۱۹).اسامی ارقام افتراقی مورداستفاده عبارت بودنداز:

جدول ۲ -مقایسهٔ جدایهٔ مازندران ودشت گرگان با نژادهای شناخته شدهٔ قارچ *P. halstedii*

نژاد	واکنش نسبت به جدایه یا نژاد						
	HA-300	RHA-266	RHA-274	DM-2	DM-3	RHA-325	RHA-340
جدایهٔ مازندران و دشت گرگان	+	-	-	-	+	-	-
۱	+	-	-	-	-	-	-
۲	+	+	-	-	-	-	-
۳	+	+	+	-	-	+	-
۴	+	+	+	+	+	+	-
۵	+	+	+	+	+	+	-
۶	+	+	-	+	Seg	+	-
۷	+	+	-	+	Seg	-	-
۸	?	?	+	+	?	+	?
۹	?	?	-	+	?	-	?

+ حساسیت - مقاومت Seg تفرق ژنی

1 - Inoculation 2- Haemocytometer 3- Perlit 4- Lux 5- Stunting 6- Chlorosis 7- Cotyledon

www.SID.ir

Archive of SID

RHA-340 ,RHA-325 ,DM-3 ,DM-2 ,RHA-274 ,HA-300 ,RHA-266

نتایج

از میان ارقام‌افتراقی‌مایه زنی شده با جدایه های جمع آوری شده ،دورقم HA-300وDM-3درهمهٔ آزمایشها حساسیت کامل نسبت به تمامی جدایه ها از خود نشان دادند و بقیهٔ ارقام مقاومت در مقابل آنها داشتند.ازمقایسهٔ خصوصیات بیماریزایی جدایه های آزمایش شده با همدیگر روی ارقام افتراقی چنین نتیجه گرفته می شود که اولا کلیهٔ ایزوله های مازندران و دشت گرگان از نظر بیماریزایی مشابه یکدیگر بوده و در نهایت همگی بعنوان یک جدایه معرفی می‌شوند.

ثانیا" این جدایهٔ نمایندهٔ مازندران و دشت گرگان با نژادهای شناخته شدهٔ دنیا تفاوت بیماریزایی دارد(جدول ۲).

بحث

نتایج حاصل از واکنش ارقام افتراقی نسبت به جدایه های استان حاکی از تشابه جدایه ها می باشد . پس اختلاف فیزیولوژیک بین این جدایه ها در طی دو سال نمونه برداری مشاهده نشده است . سابقهٔ طولانی کشت رقم رکوردبصورت گسترده در منطقه از طرفی وحساسیت کامل آن به قارچ عامل بیماری سفیدک داخلی از طرف دیگر می توانند بعنوان دلایلی برای تشابه و عدم وجود تفرق فیزیولوژیک جدایه های نقاط مختلف استان باشند. بنابراین تمامی جدایه های استان را می توان بعنوان جدایهٔ واحدی در نظرگرفت. واکنشی که این جدایه روی ارقام افتراقی ایجاد کرده با واکنش این ارقام در مقابل نژادهای فیزیولوژیک شناخته شده در دنیا متفاوت است . دراین صورت بنظر می رسد که جدایهٔ استان مازندران ودشت گرگان بعلت داشتن تفاوت در واکنش حداقل یک رقم از ارقام افتراقی با بقیهٔ نژادها نژادی مستقل باشد. در مقایسه نژاد شمارهٔ یک (نژاد اروپایی) (۸، ۱۱، ۱۳، ۱۵ و ۲۱) با جدایهٔ مزبور،اختلاف در حساسیت یا مقاومت رقم DM-3دیده می شود بطوری که این رقم نسبت به نژاد یک مقاوم ولی نسبت به ایزولهٔ مازندران و دشت گرگان حساس است .بنابراین تاحدودی مشابه همدیگر می باشند.پس این احتمال نیز وجود دارد که نژاد اروپایی درمنطقهٔ شمال کشور دچار تغییرات فیزیولوژیک شده است .

نتایج حاصل از مطالعات ملکولی جدایه‌های ارسالی‌به فرانسه نشان می دهد که قارچ *P.halstedii* موجود دراستان مازندران و دشت گرگان در تقسیم بندی‌براساس روش RAPD [1] در گروه اصلی‌نژاد جدیدآمریکایی [2] قرارگرفته وباگروه نژاد اروپایی [3] نیز خویشاوندی دارد که نظریهٔاخیر را قوت می بخشد(۱۷).اگر مسیر ورود اولیهٔ آفتابگردان از اروپا به ایران در نظر گرفته شود میتوان چنین اذعان کردکه عامل بیماری سفیدک داخلی بواسطهٔ واردات بذر(خصوصا"رکورد)ازکشورهای اروپایی وارد ایران شده وبه مرور زمان و شرایط آب و هوایی تغییر فیزیولوژیک داشته است (۷).به طوریکه احتمالا" به عنوان نژاد ۱۰ قابل معرفی میباشد.استفاده از ارقام افتراقی بیشتر ومتنوع تر با ژنهای مقاومت شناخته شده ، درآینده،اظهار نظر قطعی را میسر میسازد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از آقای دکتر عزیزاله علیزاده بخاطر راهنمایی های ارزنده و نیز سرکار خانم محبوبه رنجی وآقایان سید موسی علایی و محمد اسماعیلی به جهت همکاری در طول اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی بعمل می آید. همچنین از دیگر عزیزان شاغل درمؤسسهٔتحقیقات اصلاح وتهیهٔ نهال و بذر که دراین زمینه یاری رساندند تشکر میشود.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱ - امور زراعی شرکت توسعه کشت دانه های روغنی .۱۳۷۵،گزارش وضعیت عمومی زراعت دانه های روغنی کشور تاپایان مرداد ماه ۱۳۷۵.

۲ - بهداد،ا.۱۳۶۹.بیماریهای گیاهان زراعی ایران .چاپ نشاط - اصفهان ،ص ۲۷۵ - ۲۷۹.

1 - Random Amplified Polymorphic DNA 2- New Red River race 3- European race

www.SID.ir

Archive of SID

۳- رحمانی، ی. و ش. مجیدیهٔ قاسمی. ۱۳۵۴.بررسی مقاومت نسبی ارقام و دورگ های مختلف آفتابگردان به بیماری سفیدک دروغی آفتابگردان *Plasmopara helianthi* در آزمایش گلخانه‌ای وصحرایی .مجلهٔبیماریهای گیاهی ایران. جلد ۱۱، شمارهٔ ۳ و ۴.ص ۹۶-۱۰۴.

۴- زاد، ج. ۱۳۵۷. چگونگی انتقال بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان از طریق بذر. بیماریهای گیاهی ،شماره ۱ تا ۴ ،جلد ۱۴ ص ۷-۱.

۵- زرگرزاده ،ف. ۱۳۷۱.بررسی بیماریهای قارچی آفتابگردان که از طریق بذر منتقل می شوند . پایان نامهٔ فوق لیسانس در رشتهٔ بیماری شناسی گیاهی،گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران . ۱۶۱ص.

۶- شریف ،ق .ا. ۱۳۵۰. سفیدک دروغی آفتابگردان .آفات و بیماریهای گیاهی ،شماره ۳۱.ص ۱۹-۱.

۷- کارتر،ج .اف . ۱۹۷۸.(ترجمه یوسف عرشی). ۱۳۷۳. علوم و تکنولوژی آفتابگردان اداره کل پنبه و دانه های روغنی ایران . ۷۱۹ ص .

8. Carson, M.L. 1981. New Race of *Plasmopara halstedii* Virulent on Resistant sunflowers in south Dakota. Plant Disease 65: 842-843.

9. Fick, G.N., and G.E. Auwarter. 1981. A new race of downy mildew affecting sunflower. Proc. Sunflower Forum and Research Workshop. Jan. 27-28.

10. Gulya, T.J. J.F. Miller, F.Viranyi, and W.E. Sackston, 1991. Proposed international standardized methods for race identification of *Plasmopara halstedii*. Helia, 14, Nr. 15, 11-20.

11. Gulya, T.J., W.E. Sackston, F. Viranyi, S. Masirevic, and K.Y. Rashid. 1991. New races of the sunflower downy mildew pathogen (*Plasmopara halstedii*) in Europe and North and South America. J. Phytopathology 132: 303-311.

12. Leppik,E.E.1962.Distribution of downy mildew and some other seed-borne pathogens on sunflower.F.A.O Bull-10:126-129.

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

14. Rashid, K. Y., 1993. Incidence and virulence of *Plasmopara halstedii* on sunflower in western Canada during 1988-1991. Can. J. Plant Pathol. 15: 206-210.

15. Sackston, W.E., 1974. Downy mildew(*Plasmopara*) of sunflowers: a policy for seed importation and plant breeding. Proc. of 6th. Int. Sunflower Conf. Bucharest, Romania, 623-629.

16. Singh, R.S. 1990. Plant Diseases. 6th. ed. Oxford and IBH Publishing, Co. PVT. LTD. pp. 343.

17. Tourvieille,J.,P.Roeckel-Drevet,P.Nicolas and D.TourvieilleL. 1997.Analysis of molecular variability in *Plasmopara halstedii*,causal agent of sunflower Downy mildew, I, N.R.A. 9pp.

18. Viranyi, F. and T. J. Gulya. 1995. Inter-isolate variation for virulence in *Plasmopara halstedii* (sunflower downy mildew) from Hungary. Plant pathology 44: 619-624.

19. Viranyi, F. T.J. Gulya and S. Masirevic. 1992. Races of *Plasmopara halstedii* in central Europe and their metalaxyl sensitivity. Proc. of 13th. Sunflower Conf. Pise, Italy, 865-868.

20. Viranyi, F. and S. Masirevic. 1991. Pathogenic races of sunflower downy mildew in Europe: Present state, Problems and prospects. Helia, 14, Nr. 15:7-10.

21. Zimmer, D.E., 1974. Physiological specialization between races of *Plasmopara halstedii* in America and Europe. Phytopathology 64:1465-1467.

www.SID.ir

Archive of SID

Identification of Physiological Races of *Plasmopara halstedii*,Sunflower Downy Mildew Pathogen in Mazandaran Province and Gorgan Plain

C. RAHMANPOUR, J. ZAD and GH. HEJAROUD

Former Graduate Student and Professors, Faculty of Agriculture

University of Tehran Karaj, Iran.

Accepted Nov. 10 1999

SUMMARY

During the survey of sunflower fields in Mazandaran province and Gorgan plain between 1995 and 1996, fifty six downy mildew samples from 31 areas were collected. The disease causal agent in these samples , *Plasmopara halstedii*,was mass-produced and maintained separately using the whole seedling immersion(WSI)method on susceptible record cultivar. The maintained isolates were inoculated on differential lines recieved from Canada,according to the proposed-internationally standardized method. The differential lines showed similar reaction, to all isolates tested. Comparison of the reactions of isolates with differential line reactions, in relation to the designated known physiological races,showed that these isolates were different from the existing known races.

Key words: Sunflower, Downy mildew, Pathogenic fungus and Physiological races.

www.SID.ir