

شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ عامل بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان در استان مازندران و دشت 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 و دشت گرگان طی سالهای ۱۳۷۴ و ۱۳۷۵. پنجاه و شش (۵۶) نمونه بیماری سفیدک داخلی از ۳۱ منطقه جمع آوری گردید. قارچ عامل بیماری^۱ این بوته ها با استفاده از روش آلوده سازی و غوطه ور کردن کامل گیاهچه در سوسپانسیون اسپور بطور جداگانه روی رقم حساس رکورد تکثیر و نگهداری شد. جدایه های نگهداری شده روی ارقام افتراقی^۲ دریافت شده از کشور کانادا طبق روش بین المللی^۳ مایه زنی شدند. ارقام افتراقی واکنش یکسانی نسبت به تمامی جدایه ها از خود نشان دادند. از مقایسه 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

همه ساله کامل میکند، لذا ممکن است نژادهای بیماریزای جدیدی در اثر موتاسیون و نوترکیبی ژنهای بیماریزا (همانند سایر عوامل بیماریزای گیاهی) بوجود آیند (۸، ۱۳ و ۱۵). وجود این نژادها و پراکندگی منطقه ای آنها در امر تحقیقات اصلاح و تهیه ارقام مقاوم به بیماری، از اهمیت ویژه ای برخوردار است. چرا که توسعه کشت این ارقام در مقیاس گسترده بدون در نظر گرفتن حضور و نحوه پراکنش نژادها و یا حتی بروز اشتباه در این زمینه با شکست روبرو خواهد شد (۱۶). تاکنون نه نژاد بیماریزای قارچ عامل بیماری در آمریکا، اروپا، آسیا و آفریقا شناسایی شده اند (۱۸، ۱۹ و ۲۰). در این میان استرالیا تنها کشوری است که با وجود تولید آفتابگردان در سطحی وسیع، بعلاوه اعمال قرنطینه شدید، آلودگی به قارچ عامل بیماری سفیدک داخلی در آن مشاهده نشده است (۷ و ۱۹).

بیماریهای سفیدک داخلی و زنگ آفتابگردان در ایران بسته به شرایط آب و هوایی تولید این محصول را دچار نقصان می نمایند (۱، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۷). با توجه به استقرار و پیشرفت پایدار سفیدک داخلی در نواحی مهم کشت آفتابگردان بویژه استان مازندران و دشت گرگان اهمیت این بیماری مشخص می گردد.

اولین اثر درباره وجود بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان در ایران از لیبیک می باشد (۱۲). تاکنون در استان های مازندران و گرگان و آذربایجان شرقی و غربی، کرمانشاهان، همدان، کردستان و گیلان آلودگی به بیماری مشاهده شده است (۲ و ۳). از آنجائی که قارچ عامل بیماری سفیدک داخلی آفتابگردان چرخه زندگی خود را

مواد و روشها

۱- جمع آوری و نگهداری نمونه های قارچ عامل بیماری:

براساس روش بین المللی پیشنهادی گولیا و همکاران (۱۰ و ۱۱) برای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک، در سالهای ۱۳۷۴ و ۱۳۷۵ نمونه 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 و نوع رقم میزبان یادداشت شده و ضمیمه آنها گردید. در مجموع 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، تاتاریاجق، گنبدکاوس، مینودشت، بلوچ آباد، کلاله، قره جه، قره

سعید، قره بش، قپان بالا، گلیداغ، عرب لاله گون، (جدول ۱).

برای انتقال جدایه ها روی بوته های حساس رکورد بمنظور نگهداری و احیای آنها ابتدا بذور با استفاده از متحول ۲۰ درصد آب ژاول بمدت ۱۵-۱۰ دقیقه 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 ژرمیناتور با حرارت 22 ± 2 درجه سانتیگراد نگهداری شدند. زئوسپورانژهای ۱ 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. گیاهچه های سه روزه 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 و دشت گرگان ۷۵-۱۳۷۴

محل جمع آوری	تعداد جدایه	رقم میزبان	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	"	تاتاریاجق	۲	"
گرجی محله- بهشهر	۱	"	گنبدکاوس	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	"
خان بین	۱	"	گلیداغ	۲	"
دلند	۱	"			

نگهداری شدند. سوسپانسیونهای اسپر تهیه و با استفاده از لام گلبول شمار^۲ به غلظت ۲۰ هزار اسپر در هر میلی لیتر رسانده شدند. سپس گیاهچه های سه روزه ارقام افتراقی در حالت غوطه ور بمدت سه ساعت درون ژرمیناتور با همان شرایط ذکر شده در بالا قرار داده شدند بدین ترتیب گیاهچه های مایه زنی شده به گلخانه جهت کشت و نگهداری منتقل گردیدند. مخلوط پرلیت^۳ - ماسه با نسبت حجمی ۳ به ۲ بعنوان بستر کشت ارقام افتراقی مورد استفاده قرار گرفت (۱۸ و ۱۱، ۹). گیاهچه ها بمدت ۱۵ روز در شرایط گلخانه (۲۲ درجه سانتیگراد حرارت، ۱۴-۱۰ هزار لوکس^۴ شدت نور در ۱۶ ساعت روشنایی و دو مرتبه کود مایع N-P-K با غلظت ۲۰ ppm - 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 در این ارقام بر اساس کوتولگی^۵ رنگ پریدگی^۶ و اسپریزایی روی کوتیلدون^۷ و برگها ارزیابی شد (۸، ۹، ۱۱B، ۱۴ و ۱۹). اسامی ارقام افتراقی مورد استفاده عبارت بودند از:

حرارت ۱۵±۱ درجه سانتیگراد بمدت سه ساعت جهت مایه زنی^۱ قرار داده شدند پس از این مدت گیاهچه هادر گلخانه بعنوان جدایه های قارچ عامل بیماری کشت و نگهداری شدند (۱۰، ۱۸ و ۲۱). در نهایت تعداد ۵۶ جدایه از ۳۱ منطقه تکثیر و نگهداری شده و در آزمایشهای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که جهت تهیه جدایه بایستی از روش تک زئوسپورانژ استفاده می شد یعنی در یک میلی لیتر سوسپانسیون ۲۰-۱ زئوسپورانژ وجود داشته باشد. ولی در چنین غلظتی آلودگی خیلی بندرت اتفاق می افتد و بناچار روشهای آلوده سازی متداول در دنیا مورد استفاده قرار گرفتند (۱۰).

۲- شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ عامل بیماری:

بدور ارقام 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 آلوده سیستمیک (رقم زکورد) روی کاغذ صافی مرطوب درون ظروف پتری قرار داده شدند. نمونه های برگگی طی این مدت برای تحریک به اسپریزایی درون ژرمیناتور با حرارت ۱۵±۱ درجه سانتیگراد و تاریکی

جدول ۲- مقایسه جدایه مازندران و دشت گرگان با نژادهای شناخته شده قارچ *P. halstedii*

واکنش نسبت به جدایه یا نژاد							نژاد
RHA-340	RHA-325	DM-3	DM-2	RHA-274	RHA-266	HA-300	
							جدایه مازندران و دشت گرگان
-	-	+	-	-	-	+	۱
-	-	-	-	-	-	+	۲
-	+	-	-	+	+	+	۳
-	+	+	+	+	+	+	۴
-	+	+	+	+	+	+	۵
-	+	Seg	+	-	+	+	۶
-	-	Seg	+	-	+	+	۷
?	+	?	+	+	?	?	۸
?	-	?	+	-	?	?	۹
Seg تفرق ژنی			- مقاومت			+ حساسیت	
1 - Inoculation	2- Haemocytometer	3- Perlit	4- Lux	5- Stunting	6- Chlorosis	7- Cotyledon	

افتراقی با بقیه نژادها نژادی مستقل باشد. در مقایسه نژاد شماره یک (نژاد اروپایی) (۸، ۱۱، ۱۳، ۱۵ و ۲۱) با جدایه مزبور، اختلاف در حساسیت یا مقاومت رقم DM-3 دیده می شود بطوری که این رقم نسبت به نژاد یک مقاوم ولی نسبت به ایزوله مازندران و دشت گرگان حساس است. بنابراین تاحدودی مشابه همدیگر می باشند. پس این احتمال نیز وجود دارد که نژاد اروپایی در منطقه شمال کشور دچار تغییرات فیزیولوژیک شده است.

نتایج حاصل از مطالعات ملکولی جدایه های ارسالی به فرانسه نشان می دهد که قارچ *P.halstedii* موجود در استان مازندران و دشت گرگان در تقسیم بندی براساس روش RAPD^۱ در گروه اصلی نژاد جدید آمریکایی^۲ قرار گرفته و با گروه نژاد اروپایی^۳ نیز خویشاوندی دارد که نظریه اخیر را قوت می بخشد (۱۷). اگر مسیر ورود اولیه آفتابگردان از اروپا به ایران در نظر گرفته شود چنین ادعان کرد که عامل بیماری سفیدک داخلی بواسطه واردات بذر (خصوصاً رکورد) از کشورهای اروپایی وارد ایران شده و به مرور زمان و شرایط آب و هوایی تغییر فیزیولوژیک داشته است (۷). به طوریکه احتمالاً به عنوان نژاد ۱۰ قابل معرفی میباشد. استفاده از ارقام افتراقی بیشتر و متنوع تر با ژنهای مقاومت شناخته شده، در آینده، اظهار نظر قطعی را میسر میسازد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از آقای دکتر عزیزاله عزیزاده بخاطر راهنمایی های ارزنده و نیز سرکار خانم محبوبه رنجی و آقایان 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 در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر که در این زمینه یاری رساندند تشکر میشود.

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

نتایج

از میان ارقام افتراقی مایه زنی شده با جدایه های جمع آوری شده، دورقم DM-3 و HA-300 در همه آزمایشها حساسیت کامل نسبت به تمامی جدایه ها از خود نشان دادند و بقیه ارقام مقاومت در مقابل آنها داشتند. از مقایسه خصوصیات بیماریزایی جدایه های آزمایش شده با همدیگر روی ارقام افتراقی چنین نتیجه گرفته می شود که اولاً کلیه ایزوله های مازندران و دشت گرگان از نظر بیماریزایی مشابه یکدیگر بوده و در نهایت همگی بعنوان یک جدایه معرفی می شوند. ثانیاً این جدایه نیاکننده مازندران و دشت گرگان با نژادهای شناخته شده 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. سابقه طولانی کشت رقم رکورد بصورت گسترده در منطقه از طرفی و حساسیت کامل آن به قارچ عامل بیماری سفیدک داخلی از طرف دیگر می تواند بعنوان دلایلی برای تشابه و عدم وجود تفرق فیزیولوژیک جدایه های نقاط مختلف استان باشند. بنابراین تمامی جدایه های استان را می توان بعنوان جدایه واحدی در نظر گرفت. واکنشی که این جدایه روی ارقام افتراقی ایجاد کرده با واکنش این ارقام در مقابل نژادهای فیزیولوژیک شناخته شده در دنیا متفاوت است. در این صورت بنظر می رسد که جدایه استان مازندران و دشت گرگان بعلاوه داشتن تفاوت در واکنش حداقل یک رقم از ارقام

مراجع مورد استفاده

- ۱- امور زراعی شرکت توسعه کشت دانه های روغنی. ۱۳۷۵، گزارش وضعیت عمومی زراعت دانه های روغنی کشور تا پایان مرداد ماه ۱۳۷۵.
- ۲- بهداد، ا. ۱۳۶۹. بیماریهای گیاهان زراعی ایران. چاپ نشاط - اصفهان، ص ۲۷۵-۲۷۹.

- ۳- رحمانی، ی. و ش. مجیدی قاسمی. ۱۳۵۴. بررسی مقاومت نسبی ارقام و دورگ های مختلف آفتابگردان به بیماری سفیدک دروغی آفتابگردان *Plasmopara helianthi* در آزمایش گلخانه ای و صحرایی. مجله بیماریهای گیاهی ایران. جلد ۱۱، شماره 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 نامه فوق لیسانس در رشته بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران. ۱۶۱ ص.
- 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. Tourvieille L. 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.

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 received 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.