روش انتخاب اکوتیپ‌های یونجه مقاوم به بیماری سفیدک کرکی

وحید رهجو[۱]✉، معصومه حاتم زاده [۲]، علی ماهرخ[۳] و سیدمحمدعلی مفیدیان[۳]

۱- استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه گیلان

۳- پژوهشگر موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۹/۱۶ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۲/۱۲/۲۷

رهجو و.، حاتم‌زاده م.، ماهرخ ع. و مفیدیان س. م. ع. ۱۳۹۲. روش انتخاب اکوتیپ‌های یونجه مقاوم به بیماری سفیدک کرکی. *دانش بیماری‌شناسی گیاهی* ۳(۱):۶۱-۵۴.

چکیده

یکی از عوامل کاهش عملکرد یونجه بیماری سفیدک کرکی ناشی از شبه‌قارچ *Peronospora trifoliorum* است. این بیماری در شرایط مساعد در فصل بهار و چین اول یونجه شیوع می‌یابد و باعث زرد و خشک شدن برگ‌ها می‌شود. برای انتخاب اکوتیپ‌های مقاوم به بیماری از روش استاندارد آزمون گلخانه‌ای و غربال طبیعی ارقام در شرایط مزرعه استفاده می‌شود. در آزمون گلخانه‌ای گیاهچه‌های ۷ روزه یونجه با سوسپانسیون هاگ شبه‌قارچ تلقیح می‌شوند و پس از ظهور نشانه‌های بیماری، درصد گیاهچه‌های فاقد نشانه در مقایسه با شاهد تعیین می‌گردد. آزمون مزرعه‌ای نیز در قالب یک طرح آماری با حداقل ۳ تکرار برای اکوتیپ‌های مختلف در مناطقی که بیماری در شرایط طبیعی آن منطقه شایع می‌شود، انجام می‌پذیرد. واکنش ارقام براساس شاخص شدت بیماری تعیین می‌گردد. با این آزمایش‌ها، ارقام KS224 و Saranac به عنوان مقاوم و اکوتیپ‌هایی نظیر کیسوردای، نیک‌شهری، ملک‌کندی و قارقلوق به عنوان متحمل به بیماری شناخته شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: اکوتیپ، سفیدک کرکی، متحمل، مقاوم، یونجه

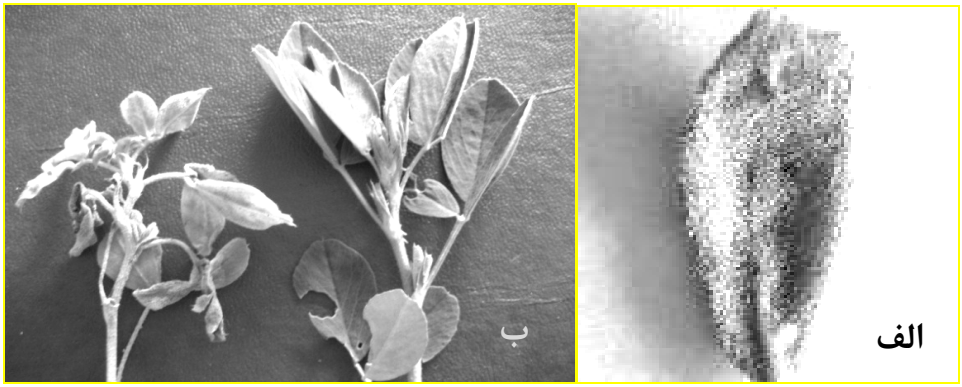
✉ مسئول مکاتبه، پست الکترونیک: vrahjoo@yahoo.com

مقدمه

یونجه *Medicago sativa* L. که به ملکه گیاهان علوفه‌ای معروف است، از مهمترین محصولات علوفه‌ای در جهان و ایران به شمار می‌رود. یکی از عواملی که در نقاط مختلف جهان و به ویژه در مناطق مرطوب و یا در سال‌هایی که بهار پرباران داشته باشند، موجب خسارت و کاهش محصول می‌گردد، بیماری سفیدک کرکی است (Stutevile 1988) . این بیماری در ایران نیز شایع است و در استان‌های شمالی و شمال‌غربی کشور نظیر گلستان و مازندران، آذربایجان شرقی و غربی و به ویژه همدان تقریباً همه ساله مشاهده می‌گردد و در شرایط آب و هوایی سرد و مرطوب شایع می‌شود و موجب خسارت شدید به محصول و کیفیت علوفه می‌گردد (ارجمندیان و حجارود ۱۳۷۷). با توجه به تغذیهٔ دام‌ها از برگ‌های یونجه و مصرف گوشت و شیر دام‌ها توسط انسان، باید از مصرف سموم قارچ‌کش روی این محصول پرهیز کرد، لذا انتخاب و کشت ارقام مقاوم یا متحمل یونجه به بیماری سفیدک کرکی و سازگار با شرایط اقلیمی هر منطقه بهترین روش مبارزه با آن است(Stuteville & Erwin 1990).

۱- نشانه‌های بیماری

نشانه‌ها شامل لکه‌های زرد یا سفید رنگ در سطح برگ‌ها و در پشت برگ‌ها در محل لکه‌های سطحی، پوشش کرکی سفید متمایل به خاکستری رنگ هستند. برگ‌ها سرانجام رنگ پریده، زرد و خشک می‌شوند (شکل ۱) . با توسعه بیماری فواصل بین گره‌های ساقه کم شده و ساقه کوتاه باقی می‌ماند (مهریان و بامدادیان ۱۳۶۹).



شکل ۱- الف- پوشش کرکی خاکستری رنگ در پشت برگ یونجه، **ب**- مقایسه‌ی برگ‌های یونجه رقم حساس شدیدا آلوده (چپ) و مقاوم بدون آلودگی (راست) به بیماری سفیدک کرکی (اصلی).

۲- عامل بیماری

عامل بیماری سفیدک کرکی یونجه شبه‌قارچ *Peronospora trifoliorum* de Bary است، که تولید اسپورانژیوسپورهای (کنیدیوم‌های) فراوان در پشت برگ و روی ساقه یونجه می‌کند . این هاگ‌ها بیضی شکل، به رنگ بنفش تا قهوه‌ای روشن بوده وروی اسپورانژیوم‌برهای منشعب در انتها ۲ شاخه زاده می‌شوند. اُاُسپور نیز کروی با جداری صاف و قهوه‌ای رنگ است. آن به صورت اُاُسپور در بافت‌های مرده و یا به شکل میسلیوم روی جوانه‌های طوقه زمستان‌گذرانی می‌کند . گاهی ممکن است آلودگی از راه بذر نیز منتقل گردد. بیماری با پخش کنیدیوم‌های بیمارگر با جریان هوا در طول فصل رشد یونجه شایع می‌شود (Freid & Stuteville 1977).

۳- مدیریت بیماری

بیماری سفیدک کرکی یونجه را می‌توان با تلفیقی مناسب از روش‌های زیر مدیریت نمود:

۳-۱- روش‌های زراعی

شامل استفاده از بذر عاری از آلودگی، برداشت زود هنگام چین اول جهت حذف عامل بیماری و نیز حذف برگ‌های تازه و حساس بوته‌ها ، روش آبیاری مناسب و عدم استفاده از آبیاری بارانی به منظور جلوگیری از افزایش رطوبت وعدم استفاده بی رویه از کودهای ازته ، جهت کاهش حساسیت بوته‌ها، است (مهریان و بامدادیان ۱۳٦۹).

۳-۲- مبارزه شیمیایی

برای مبارزه شیمیایی با این بیماری می‌توان از قارچ‌کش‌های حفاظتی نظیر ترکیبات مس، مانکوزب و زینب، کاپتان و فتالونیتریل‌ها استفاده کرد، اما استفاده از قارچ‌کش‌های جذبی نظیر متالاکسیل بدلیل کنترل مؤثر بیماری و کمتر بودن آثار سوء زیستی ارجحیت دارد (مهریان و بامدادیان ۱۳٦۹).

۳-۳- شناسایی و کشت ارقام مقاوم یا متحمل

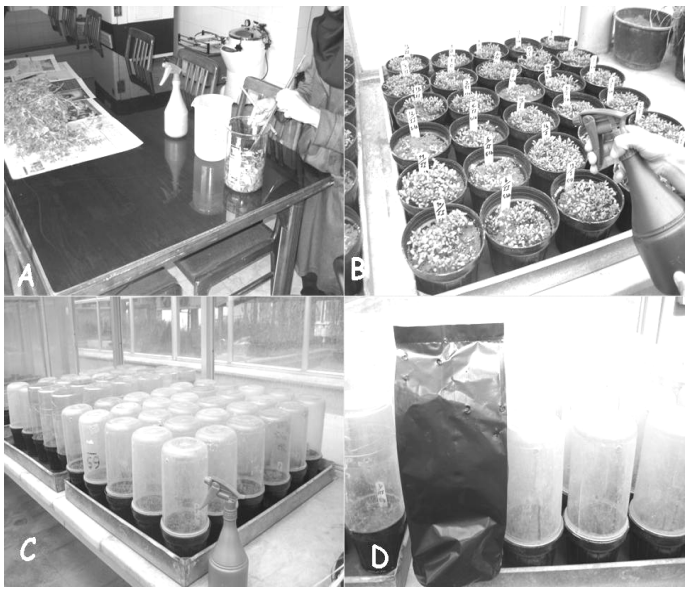
برای شناسایی اکوتیپ‌های مقاوم یا متحمل یونجه به این بیماری سفیدک داخلی می‌توان از روش‌های استاندارد آزمون گلخانه‌ای و نیز غربال طبیعی ارقام در شرایط مزرعه بهره جست. این آزمایش‌ها را به این روش‌ها باید انجام داد:

۳-۳-۱- آزمون گلخانه‌ای

این آزمون گلخانه‌ای در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی با حداقل ٤ تکرار برای ارقام یونجه انجام می‌پذیرد به طوری‌که در هر تکرار حداقل ۱۰ بوته برای هر رقم در نظر گرفته شود. پس از کاشت بذر یونجه در عمق ۰/۸ سانتی‌متری خاک در داخل گلدان‌های پلاستیکی (خاک گلدان‌ها باید مناسب رشد بذر یونجه باشد و قبل از کاشت بذر پاستوریزه شود)، آن‌ها را در گلخانه‌ی با دمای ۲۰درجهٔ سانتی‌گراد و ۸۵-۷۰٪ رطوبت نسبی در معرض نور فلورسنت با شدت ۱۰۰۰۰-۵۰۰۰ لوکس قرار داده و دوره‌ی نوری را روی ١٦- ۱۲ساعت تنظیم گردد. گلدان‌ها باید روزی ۱ الی ۲ مرتبه آبیاری شوند. برای تهیه سوسپانسیون هاگ بیمارگر از برگ‌های بیمار دارای هاگ فراوان که تازه از مزرعه به آزمایشگاه منتقل شده‌اند، باید استفاده گردد. برگ‌ها را باید در ظرف محتوی آب مقطر سترون و آنتی‌بیوتیک تتراسیکلین (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار داد و ظرف به شدت تکان داده شود تا هاگ‌ها جدا شوند (شکل۲-A). سوسپانسیون هاگ پس از تنظیم غلظت به میزان 10^5 کنیدیوم در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون به کمک لام هموسیتومتر، روی برگ گیاهچه‌های ۷روزه یونجه افشانه شود (هاگ‌پاشی گیاهچه‌ها باید به گونه‌ای باشد که یک قطره سوسپانسیون در بین کوتیلودون‌ها تجمع یابد). برای نفوذ کنیدیوم‌ها به بافت، گیاهچه‌ها با پلاستیک پوشانده و ١٦ ساعت در تاریکی قرار می‌گیرند (شکل۲- B، C، D)، سپس پلاستیک‌ها را برداشته و جهت تحریک هاگ‌زایی قارچ، گلدان‌ها تحت دوره‌ی نوری ۸ ساعت در تاریکی و دمای ١٦ درجهٔ سانتی گراد و روشنائی با دمای ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار می‌گیرند . پس از گذشت ۵ روز روی گلدان‌ها را مجدداً با پلاستیک پوشانده و چراغ‌ها به مدت ١٦ ساعت خاموش شوند. پس از ظهور نشانه‌های بیماری درصد گیاهچه‌های فاقد نشانه، در مقایسه با تیمار شاهد، با تقسیم تعداد آن‌ها برتعداد کل گیاهچه‌ها و ضرب در ۱۰۰، محاسبه می‌شود (Stuteville 1991).

۳-۳-۲- آزمون مزرعه‌ای

این آزمون معمولاً در قالب طرح آماری بلوک‌های کامل تصادفی با حداقل ۳ تکرار برای اکوتیپ‌های مختلف یونجه در مناطقی که بیماری در شرایط طبیعی در آن منطقه شایع می‌شود (مانند همدان و زنجان) انجام می‌پذیرد. به این منظور در اواخر تابستان اقدام به کشت اکوتیپ‌های مختلف یونجه در مناطق یاد شده می‌گردد. تیمارها که شامل



شکل ۲- آزمون گلخانه‌ای جهت انتخاب ارقام مقاوم یونجه به بیماری سفیدک کرکی، **A**- تهیه سوسپانسیون هاگ، **B**- هاگ‌پاشی روی گیاهچه‌های ۷ روزه یونجه، **C-** حفظ رطوبت برای جوانه‌زنی و نفوذ بیمارگر به بافت گیاهچه‌ها با گذاشتن درپوش‌های پلاستیکی روی گلدان‌ها ، **D-** تحریک هاگ‌زایی با ایجاد تاریکی موقتی از طریق پوشاندن درپوش گلدان ها (اصلی).

اکوتیپ‌های مورد آزمون به همراه رقم شاهد حساس (مثل همدانی) و رقم شاهد مقاوم (مثل کیسوردای) در کرت‌های با حداقل ۳ ردیف و به طول حداقل ۲ متر کشت می‌شوند. میزان آلودگی ارقام براساس شاخص شدت بیماری مطابق با روش تایر و همکاران (Thyre *et al*. 1978) بر مبنای مقیاس صفر تا ٤ که در آن صفر به معنای عدم آلودگی برگ‌ها، ۱ به معنای آلودگی در صفر تا ۲۵ درصد برگ‌ها، ۲ معرف وجود آلودگی بین ۲۵ تا ۵۰ درصد برگ‌ها، ۳ معرف وجود آلودگی بین ۵۰ تا ۷۵ درصد برگها و ٤ معرف وجود آلودگی بین ۷۵ تا ۱۰۰ درصد برگ‌ها، است و یا روش استوتوایل (Stuteville 1991) بر مبنای درصد آلودگی برگ‌ها ، از ۵ کلاس مختلف ۱ تا ۵ (۱ بدون هرگونه نشانه بیماری، ۲ وجود لکه‌های کوچک و بدون هاگ‌زایی روی ۱ تا ۲ برگ هر بوته، ۳ وجود لکه‌های با هاگ‌زایی روی ۱۰ تا ۲۵ درصد برگ‌ها، ٤ وجود آلودگی در کل بوته و ۵ آلودگی شدید که منجر به نکروز و مرگ بافت برگ‌ها می‌شود) تعیین می‌گردد.. بر این اساس ارقامی که میانگین نمره ۱ و ۲ را کسب نمایند مقاوم و ارقامی که نمره‌های ۳، ٤ و ۵ را کسب نمایند حساس به بیماری شناخته می‌شوند.

نتیجه

تا کنون پژوهش‌های زیادی با کاربرد این روش‌ها برای شناسایی اکوتیپ‌های مقاوم یونجه به بیماری سفیدک کرکی انجام شده و توده‌های مقاوم متعددی شناخته شده‌اند. به عنوان مثال، رقم‌های KS224 و Saranac مقاوم به بیماری گزارش شده‌اند (Stuteville & Sorensen 1981, Stuteville 1984, Skinner & Stutevile 1992). در ایران نیز طی پژوهشی که در سال‌های ۱۳۷٤ و ۱۳۷۵ در همدان صورت گرفته، واکنش ۱۵ رقم یونجهٔ ایرانی و خارجی براساس روش‌های استاندارد فوق مورد مقایسه قرار گرفته، که نتایج حاصل از بررسی‌های مزرعه‌ای و آزمایشگاهی حاکی از آن بوده که ارقام 2122 و Kisverdai دارای بیشترین مقاومت و ارقام همدانی و یزدی دارای بیشترین حساسیت به بیماری هستند و سایر ارقام بین این ۲ گروه قرار دارند (ارجمندیان و همکاران ۱۳۷۷). نتایج پژوهشی که در همدان و گرگان (آزمایش‌های مزرعه‌ای) و کرج (آزمایش‌های گلخانه‌ای) در سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸۲ روی ۱۰ رقم خارجی و داخلی انجام گرفته، نشان داده که در بین تیمارها، ارقام نیک‌شهری و کیسوردای (Kiseverdai) بیشترین مقاومت نسبی و ارقام همدانی و یزدی دارای بیشترین حساسیت نسبی به بیماری دارند (رهجو و همکاران ۱۳۸۳). همچنین در پژوهشی دیگر واکنش تعداد ۱۵ اکوتیپ سردسیری یونجه در ۳ منطقه گرگان، همدان و زنجان در شرایط طبیعی مورد بررسی قرار گرفته، که نتایج نشان داده، اکوتیپ‌های یزدی، همدانی و سیاه بومی لرستان به ترتیب با میانگین شدت بیماری ٦٧/٤٪ ، ٥٥/٣٪ و ٤٣/٩٪ بیشترین حساسیت و اکوتیپ‌های نیک‌شهری، ملک‌کندی و قارقلوق به ترتیب با ١٨/٤٪ ، ٢٦/٨٪ و ٢٦/٣٪ بیشترین تحمل را نسبت به بیماری دارا می باشند. در این پژوهش نتایج آزمون مزرعه‌ای با نتایج آزمون گلخانه‌ای نسبتا مشابهت داشته و همبستگی نسبتا خوبی (r = + 0.78) نشان دادند (رهجو و همکاران ۱۳۹۱). بنابراین پیشنهاد می‌شود با کاشت اکوتیپ‌های مقاوم یا متحمل به بیماری که بدان‌ها اشاره شد در مناطق مختلف کشور، به ویژه در مناطق سردسیر که بیماری بیشتر مشاهده می‌گردد و با رعایت دیگر روش‌های مدیریتی نظیر چین‌برداری به موقع، از شیوع و خسارت این بیماری کاسته شود.

منابع **References**

ارجمندیان ا. و حجارود ق.۱۳۷۷ . بررسی بیماری سفیدک داخلی یونجه و شرایط اقلیمی مؤثر در بروز اپیدمی آن در استان همدان . خلاصهٔ مقدمات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج، ص ۹۵.

ارجمندیان ا.، شریفی تهرانی ع. و اخوت م.۱۳۷۷. بررسی حساسیت ۱۵ رقم یونجه به بیماری سفیدک داخلی در شرایط آزمایشگاه و مزرعه . خلاصه مقالات سیزدهمین کنگرهٔ گیاهپزشکی ایران. کرج، ص ۹۶.

رهجو و.، مقدم ع.، مساوات ا.، مظاهری لقب ح. و ارجمندیان ا. ۱۳۸۳. بررسی مقاومت نسبی ارقام مختلف یونجه نسبت به بیماری سفیدک کرکی. خلاصه مقاله شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. تبریز، ص۱۲۶.

رهجو و.، فیض بخش م. ت.، زمانی م. و قطبی و. ۱۳۹۱. واکنش اکوتیپ‌های سردسیری یونجه به *Peronospora trifoliorum* de Bary ، قارچ عامل بیماری سفیدک کرکی. *به نژادی نهال و بذر* ۲۸(۱): ٤٤٤-٤٢٩.

مهریان ف. و بامدادیان ع. ۱۳٦۹. بیماری‌های مهم قارچی نباتات علوفه‌ای در ایران. موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، ٤۸ ص.

Fried P. M. & Stuteville D. L. 1977. *Peronospora trifoliorum* sporangium development and effects of humidity and light on discharge and germination. *Phytopathology* 67:890-894.

Skinner D. Z. & Stuteville D. L. 1992. Geographical variation in alfalfa accessions for resistance to two isolates of *Peronospora trifolioirum*. *Crop Science* 32:1467-1470.

Stuteville D. L. 1984. Evaluating downy mildew resistance. Pp.23-24. *In:* J. H. Jr. Elgin(ed.). Standard Tests to Characterize Pest Resistance in Alfalfa Varieties. U.S. Dep. Agric. Misc. Publ., U.S.A.

Stuteville D. L. 1988. Differential resistance of alfalfa cultivars to three isolates of *Peronospora trifoliorum*. Pp.13. *In:* M. D. Beltsville(ed.). Report of North American Alfalfa Improvement Conference, 21st, June 1988, U.S.A.

Stuteville D. L & Erwin D. C.1990. Compendium of Alfalfa Diseases. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, U.S.A.,84 p.

Stuteville D. L. & Sorensen E. L. 1981. Effect on downy mildew reaction of selecting for saponin content in alfalfa. Pp.36. *In:* Report of 27th Alfalfa Improvement Conference, Madison, WI. 8-10 July 1980. USDA ARM-NC-19.USDA, Peoria, IL.

Thyre B. D., Hartman B. J., Hunt O. J. & McCormick J. A. 1978. Response of alfalfa cultivars to *Peronospora trifoliorum* in Western Nevada. *Plant Disease Reporter* 62:338–339.

A Method for Selection of Alfalfa Ecotypes Resistant to Downy Mildew Disease

VAHID RAHJOO [1]✉, MASOUMEH HATAMZADEH [2], ALI MAHROKH[3] & SAYYED MOHAMMAD ALI MOFIDIAN[3]

1- Assistant Professor, Seed & Plant Improvement Institute, Karaj, Iran

(✉Corresponding author: vrahjoo@yahoo.com).

2- Former MSc. Student of Plant Pathology, Guilan University, Guilan, Iran.

3- Researcher, Seed & Plant Improvement Institute, Karaj, Iran.

Rahjoo V., Hatamzadeh M. , Mahrokh A. & Mofidian S. M. A. 2014. A method for selection of alfalfa ecotypes resistant to downy mildew disease. *Plant Pathology Science* 3(1):54-61.

Abstract

Alfalfa downy mildew, caused by *Peronospora trifoliorum*, is one of the limiting factors in alfalfa production. Under favorite conditions in spring, the disease is prevalent after first moving and the plant leaves turn to yellow followed by drying. The standard greenhouse experiments and field screening methods are applicable to select the resistant ecotypes of alfalfa to this disease. In greenhouse tests, seven days old seedlings of alfalfa are inoculated with spore suspension. After completion of incubation period and the first symptoms were observed, the percentage of the symptomless seedlings are comparing with resistant control. Field experiments must be carried out for different alfalfa ecotypes in locations with suitable conditions for natural occurrence of disease, using an appropriate statistical design with minimum three replications. The response of cultivars evaluate based on disease severity. In Iran, the cultivars KS224 and Saranac showed resistance to downy mildew and some ecotypes like Kiseverdai, Nikshahri, Gharghlooogh, Malek-Kandi and Gharghloogh known as tolerant to disease.

Key words: Ecotype, Downy mildew, Tolerant, Resistant, Alfalfa