



واکنش ژنوتیپ‌های آفتابگردان به نژادهای زنگ *Puccinia helianthi* در ایران

سیامک رحمانپور^{۱*} - علیرضا نبی بور^۲ - ابوالقاسم خدابنده^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۴/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳

چکیده

بیماری زنگ آفتابگردان یکی از مهم‌ترین عوامل تهدید کننده این گیاه در نواحی مهم کشت در ایران بوده و منابع مقاومت به آن در ژرم پلاسما میزبان دست یافتنی می‌باشد. طی سال ۱۳۸۹ نمونه‌های برگ آفتابگردان آلوده به بیماری زنگ از استان‌های گلستان و آذربایجان غربی جمع‌آوری شده و در مجموع هشت جدایه از این مناطق برای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک روی رقم حساس رکورد مایه‌زنی گردیدند. سپس با روش تک پوستول کردن، عمل خالص‌سازی صورت گرفت. جدایه‌های قارچ پس از تولید انبوه در اتاقک‌های مجزای گلخانه بر روی سری نه تایی ارقام افتراقی آفتابگردان مایه‌زنی گردیدند. نتایج به دست آمده حاکی از تفاوت فیزیولوژیک جدایه‌های این دو منطقه و وجود دو نژاد مستقل می‌باشند. با توجه به تشابهات بیماری زایی روی لاین‌های افتراقی مشترک، نژادهای شماره ۳۰۲ و ۳۰۰ به ترتیب برای مناطق گلیداغ (گلستان) و خوی در استان آذربایجان غربی معرفی می‌شوند. بررسی‌های مقاومت ژرم پلاسما آفتابگردان به بیماری زنگ نیز در شرایط کنترل شده گلخانه صورت پذیرفت. این آزمایش‌ها با کاربرد روش مایه‌زنی گردپاشی با پودر تالک و استفاده از نژادهای شناسایی شده به اجرا در آمدند. نتایج حاصل نشان داد که هیبرید قاسم و لاین نگهدارنده باروری آن به نژاد ۳۰۲ و هیبرید برزرگ و لاین مربوطه آن به هر دو نژاد زنگ مقاوم هستند. از میان شش عدد تک بوته‌های مقاوم رقم گابور تنها ژنوتیپ G-445 در مقابل هر دو نژاد بیمارگر مقاومت داشت.

واژه‌های کلیدی: جدایه، ژنوتیپ، لاین‌های افتراقی، مقاومت، نژادهای فیزیولوژیک

مقدمه

آفتابگردان روی هیبریدهای تجاری تا اوایل دهه ۹۰ در کانادا افزایش پیدا کرده بود به طوری که شدت آن در مزارع آلوده در طول سال‌های ۸۹-۱۹۸۸ تا ۶۰ درصد گزارش شده و مزارع بسیار آلوده فقط در برخی موارد و انتهای فصل زراعی بوده است (۲۰). بنابر عقیده گولیا و ماسیرویچ (۴)، زنگ سیاه ناشی از *Puccinia helianthi* گسترش جهانی روی آفتابگردان زراعی و همه گونه‌های *Helianthus* دارد (۶ و ۷).

عباسی و علیزاده (۱) در بررسی‌های خود مناطق بهشهر، کلاله، گلیداغ، دشت کالپوش و گنبد کاووس را از استان‌های مازندران و گلستان آلوده گزارش کردند. در حال حاضر زنگ آفتابگردان یکی از شایع‌ترین بیماری‌های قارچی میزبان در بیشتر مناطق عمده کشت آن در ایران است و در برخی شرایط موجب خسارت سنگینی به این محصول می‌شود. بیماری هر چند سال یک بار به صورت اپیدمی در می‌آید. یکی از شدیدترین این اپیدمی‌ها در سال ۱۳۷۳ در گلستان رخ داد که ۱۰ درصد کل محصول و ۹/۸ درصد روغن استحصالی، ارزیابی شده است (۲).

نخستین منابع مقاومت به زنگ آفتابگردان به طور تصادفی در سال‌های ۱۹۴۹ و ۱۹۵۱ در کانادا یافت شده‌اند (۲۱). مطالعات ژنتیکی نشان داد که مقاومت در این منابع توسط دو ژن غالب R1 و

زنگ یکی از مهم‌ترین بیماری‌های آفتابگردان در سرتاسر دنیا بوده و تغییرات سریع در خصوصیات بیماری‌زایی جمعیت‌های آن در مناطق تهدید مداومی برای ارقام و هیبریدهای مقاوم به بیماری شده است (۶، ۹، ۱۶ و ۲۴). بنابراین راهبرد توسعه لاین‌های دارای مقاومت پایدار به آن لازم و ضروری می‌باشد (۹). این بیماری ناشی از قارچ *Puccinia helianthi* اولین بار به سال ۱۸۲۲ میلادی از روی نمونه‌های جمع‌آوری شده از جنوب شرقی ایالات متحده آمریکا، شناسایی و توصیف گردید (۲۱). عامل بیماری یک زنگ تک پایه، هتروتال و بلند چرخه است (۲۳ و ۹). درصد و شدت بیماری زنگ

۱- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(*- نویسنده مسئول: Email: sirahmanpour@spii.ir)

۲- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، معاونت مازندران، آمل، ایران

۳- مربی پژوهش، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

برای واکنش به زنگ تحت شرایط آلودگی طبیعی به ترتیب در سال های ۱۹۸۸، ۱۹۸۹ و ۱۹۹۰ ارزیابی کرد. عده‌ای از پژوهشگران برای ارزیابی واکنش ژرم پلاسما آفتابگردان اقدام به گروه‌بندی واکنش آن‌ها بر اساس میزان و اندازه جوش‌های زنگ در سطح برگ‌ها نمودند. مقیاس عددی این واکنش‌ها از صفر (معادل واکنش فوق حساسیت یا مصونیت) تا حداکثر ۴ (یوردینیوسپوره‌های بزرگ با قطر بیش از ۰/۶ میلی‌متر) تغییر می‌کرد (۱۱، ۱۴ و ۲۰).

گولیا و همکاران (۵) با کاربرد دیاگرام‌های دامنه پوشش جوش های زنگ رده‌بندی را انجام دادند. در این رده‌بندی صفر (بدون جوش یا مصون) و ۰/۱ درصد پوشش جوش‌ها (خیلی مقاوم) برای گیاهان مقاوم و پوشش جوش بالای ۰/۵ درصد را به عنوان حساس در نظر گرفتند. ایشان در ارزیابی مقاومت ارقام و لاین‌های مورد آزمایش از مخلوط‌های حجمی نژادهای آمریکای شمالی و نژادهای رایج استرالیایی به طور جداگانه استفاده کردند. اولین طبقه‌بندی پنج گانه واکنش آفتابگردان به زنگ به سال ۱۹۶۲ ارائه شده و در سال ۱۹۸۶ اصلاح گردید که در آن گروه‌های مصون، خیلی مقاوم، مقاوم، حساس، و خیلی حساس بر اساس میزان تولید جوش و نیز قطر آن‌ها همراه با پتانسیل اسپورزایی از هم تفکیک شدند (۱۰). گولیا با ارزیابی چندین هزار لاین و رقم اصلاح شده آفتابگردان دریافته است که مقاومت اغلب به وسیله تعداد کاهش یافته‌ای از جوش‌ها بیان می‌شود که ممکن است هر اندازه‌ای داشته باشند. با کاربرد دیاگرام‌های رایانه ای، گولیا و ماسیرویچ (۱۰) گیاهان را بر اساس درصد تقریبی پوشانده شده سطوح برگ با جوش‌ها طبقه‌بندی کردند. ایشان با فرض آلودگی مناسب (۱۰-۵ درصد سطوح برگ پوشیده شود) روی شاهدهای حساس، تنها سه دسته را ترجیح دادند: مصون: بدون جوش زنگ، خیلی مقاوم: با نزدیک به ۰/۵ درصد پوشش جوش، و حساس: با پوشش یک درصدی یا بالاتر توسط جوش.

در ایران نیز مجیدی قاسمی و همکاران (۱۲) در ارزیابی‌های صحرائی واکنش ۲۰ رقم و لاین آفتابگردان مقابل زنگ، رقم گابور^۱ و لاین R-43 را متحمل معرفی کرده‌اند. علیزاده و عباسی (۲) با استفاده از ارزیابی قطر جوش‌های زنگ و تراکم آن‌ها در واحد سطح اقدام به بررسی واکنش ۵۴ ماده ژنتیکی آفتابگردان در شرایط گلخانه نمودند. ایشان با استفاده از این مقیاس ژرم پلاسما آفتابگردان را در پنج گروه مصون، بسیار مقاوم، مقاوم، حساس و بسیار حساس گروه بندی کردند. بر این اساس هیبریدهای هایسان^{۳۴۱۲}، هایسان^{۳۴۶}، هایسان^{۴۴۵}، هایسان^{۵۳۶} و لاین‌های R-2، R-55 واکنش مصونیت

R2 کنترل می‌شود (۲۳). با شناسایی این دو ژن امکان شناسایی چهار نژاد فیزیولوژیک فراهم گردید (۱۳ و ۲۰). این شناسایی بر اساس سه لاین افتراقی کانادایی یعنی CM-90RR با ژن مقاومت R1، کراس ۳-۲۹ دارنده ژن مقاومت R2 و رقم حساس S37-388 صورت گرفته بود. بنابراین نژادهای یک تا چهار در مانیتوبای کانادا تا پیش از سال ۱۹۶۰ شناسایی شدند. شناسایی چهار نژاد آمریکایی در ابتدا با کاربرد سه لاین افتراقی ذکر شده میسر گردید و به دنبال آن فهرست لاین‌های افتراقی به حداقل ۲۵ مورد رسید که بیشتر آنها واکنش‌های یکسانی در مقابل زنگ داشتند (۴).

در حال حاضر چندین ژن عامل مقاومت در مقابل زنگ در آفتابگردان شامل R1, R2, R3, R4, R5, Pu6 و Radv شناسایی شده‌اند. همچنین ارزیابی‌های مقاومت صورت گرفته در قاره آمریکا به شناسایی تعداد زیادی منابع مقاوم در مقابل نژادهای مختلف بیماری از جمله ۳۳۶ و ۷۷۷ منتهی شده است (۷، ۸ و ۱۶).

کونگ (۱۰) نیز تعداد ۲۲ لاین افتراقی را برای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک زنگ معرفی نموده است. نیاز به گروه مختصر و متمایز استاندارد به عنوان ارقام افتراقی، گولیا و ماسیرویچ (۴) را بر آن داشت تا نه لاین افتراقی را پیشنهاد کنند. این لاین‌ها الگوهای متفاوت واکنش به زنگ را داشته و همگی از نتایج مختلف به طور افتراقی حاصل شده‌اند. لامبرید و میلر (۱۱) برای بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های زنگ از ۱۳ ژنوتیپ افتراقی آفتابگردان استفاده کردند. با استفاده از این نه لاین افتراقی تعداد ۲۹ نژاد فیزیولوژیک قابل شناسایی هستند. در برخی موارد پژوهشگران اقدام به افزودن لاین های افتراقی تکمیلی حاصل از برنامه‌های به‌نژادی خودشان در کنار لاین‌های اصلی نموده‌اند (۱۶).

اگرچه ورود هیبریدهای آفتابگردان دارای مقاومت به زنگ شدت بیماری را کاهش داد ولی حضور این منابع مقاوم به تعدد نژادهای بیماری‌زا روی ژنوتیپ‌های مقاوم منجر شد. به طوری که در استرالیا نژاد سه روی هیبریدهای حاصل ژن R1 گسترش پیدا کرد. همچنین بازیدهای انجام شده توسط رشید (۲۰) در ایالت مانیتوبای کانادا افزایش سریعی را در میزان و شدت زنگ آفتابگردان نشان داده و تغییر در بیماری‌زایی جمعیت زنگ را مشخص نمود. جمعیت *P. helianthi* در آرژانتین شامل چهار نژاد آمریکای شمالی به علاوه نژادهای دیگر با الگوهای متفاوت بیماری‌زایی می‌باشد (۱ و ۲۰). رشید (۲۰) در بررسی‌های نژادهای زنگ، از لاین‌های کانادایی CM-90RR، 29-3، S37-388 و آمریکایی HA-R1، HA-R2، HA-R3، HA-R4، HA-R5 استفاده کرد. رحمانپور (۱۹) در آخرین مطالعات انجام گرفته و با استفاده از این مجموعه لاین‌های افتراقی نژاد شماره ۳۰۲ را در منطقه گلیداغ و نژاد شماره دو آمریکایی (۳۰۰) را برای منطقه خوی و آذربایجان معرفی نمود.

رشید (۲۰) در مجموع ۶۰، ۵۷، و ۶۸ هیبرید تجاری آفتابگردان را

1- Gabor
2- Hysun 341
3- Hysun 46
4- Hysun 45
5- Hysun 36

(پرهیز از احتمال آلودگی زنگ به قارچ‌های ساپروفیت^۳) از اختلاط احتمالی جدایه‌ها ممانعت به عمل آورد. ۱۰-۱۵ روز پس از مایه‌زنی که جوش‌های حاوی اسپور زنگ ظاهر شدند، هر جدایه به روش تک جوش خالص گردید. برای این کار گیاهچه‌های حساس رکورد در مرحله ۲ برگی با اسپورهای حاصل از یک جوش منفرد مایه‌زنی شدند (۶). در نهایت جدایه‌های خالص شده به منظور ازدیاد اسپور طی چند مرحله پیاپی (دوره‌های حداقل یک ماهه) بر روی رقم رکورد (حساس) مایه‌زنی شدند (جدول ۱).

در نهایت با توجه به محدودیت در نگهداری جدایه‌ها در اتاقک‌های مستقل، از مناطق گلیداغ (استان گلستان) ۲ جدایه و خوی (واقع در شمال غرب کشور) ۳ جدایه انتخاب شده و جهت شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ عامل بیماری (بر روی رقم حساس رکورد) تکثیر شدند (۶). یوردینیوسپورهای تولیدی روی رقم رکورد، دو هفته پس از مایه‌زنی، با کاربرد جاروبرقی مجهز به قطعه مخصوص جمع آوری شده و به مدت ۲۴ ساعت در دیسیکاتور دارای سیلیکاژل به منظور جذب رطوبت و خشک کردن نگهداشته شدند. اسپورها جهت نگهداری طولانی مدت درون شیشه‌های درب‌دار مخصوص در فریزر قرار داده شدند و یا بلافاصله در آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

شناسایی نژادهای فیزیولوژیک بیمارگر

به منظور شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ عامل بیماری (*Puccinia helianthi*) از سری نه تایی لاین‌های افتراقی کانادایی (P-386; 803-1; QHP1) و آمریکایی (HA-R1; HA-R2; HA-335; HAR-4; RHA-265) استفاده گردید (۴). این لاین‌ها واکنش‌های متفاوتی در مقابل بیماری زنگ دارند. اسامی لاین‌های افتراقی مورد استفاده عبارت بودند از پرودوویک^۴، HA-R1, 803-1, HA-R2, P-386, RHA-265, QHP1, HAR-4, HA-335.

بذرهای ارقام افتراقی (در هر گلدان پنج عدد) پس از ضد عفونی سطحی (پنج دقیقه) با محلول پنج درصد هیپوکلریت سدیم (آب ژاول خانگی) در گلدان‌های حاوی خاک پاستوریزه کشت شدند. مایه‌زنی گیاهچه‌ها در مرحله رشدی V2 یعنی زمانی که نخستین برگ‌های حقیقی به رشد کامل خود رسیده بودند، انجام شد. ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی، گلدان‌ها از شرایط تاریکی خارج شده و در شرایط کنترل شده گلخانه نگهداری شدند. شرایط نگهداری بوته‌های مایه‌زنی شده همانند مرحله تولید انبوه جدایه‌های عامل بیماری بود. ۱۲ تا ۱۴ روز پس از مایه‌زنی، واکنش لاین‌های افتراقی بر اساس درصد پوشش جوش‌های زنگ در سطح برگ‌ها (۴ و ۹) یادداشت‌برداری شد.

نشان دادند. شش هیبرید خارجی و ۱۷ لاین برگشت دهنده باروری و رقم گابور در گروه بسیار مقاوم قرار گرفتند. همچنین یادآور شدند که هیبریدهای داخلی گلشید، گل‌دیس و آذرگل واکنش متغیری نسبت به بیماری نشان دادند و توصیه نمودند که مطالعات بیشتری در این خصوص صورت پذیرد. آخرین اطلاعات حاصل از پژوهش روی مقاومت ژنوتیپ‌های آفتابگردان توسط رحمانپور (۱۹) حاکی از آن است که دو و ۳۶ ژنوتیپ به ترتیب به عنوان مصون و خیلی مقاوم در شرایط کنترل شده شناسایی شدند.

شناسایی ژرم پلاسما مقاوم به نژاد یا نژادهای جدید زنگ آفتابگردان برای مؤسسات مجری تحقیق روی لاین‌های مادری سازگار در مناطقی که احتمال شیوع بیماری وجود دارد از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۲۳). اساس و پایه مقاومت حاصل از منابع جدید مقاومت به اقدام متخصصان اصلاح نباتات و ژنتیک در انتخاب ژرم پلاسما اختصاصی گیاه نیاز دارد که در برنامه‌های اصلاحی آنان قرار گیرد. این دانش همچنین متخصص اصلاح‌گر را در طراحی روش‌های مناسب برای وارد کردن مؤثر مقاومت درون لاین‌های آفتابگردان یاری خواهد کرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و تکثیر اسپور بیمارگر

نمونه‌های برگ آفتابگردان آلوده به زنگ در طول فصل زراعی از مناطق کشت آفتابگردان در مناطق گلیداغ و خوی به ترتیب از استان‌های گلستان و آذربایجان غربی جمع‌آوری گردیدند. بدین ترتیب که برگ‌های دارای جوش‌های بیماری درون پاکت‌های کاغذی خشک قرار داده شده و در شرایط خنک به آزمایشگاه بیماری‌شناسی بخش تحقیقات دانه‌های روغنی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر واقع در کرج منتقل شدند. نمونه‌های زنگ پس از انتقال به گلخانه بر روی رقم حساس رکورد با منشاء کشور رومانی مایه‌زنی شدند. برای مایه‌زنی ابتدا سطح رویی برگ‌ها در مرحله دو برگی یا حداکثر چهار برگی با استفاده از مه پاش حاوی آب مقطر و یک قطره توپین ۱۲۰ یا توپین ۱۰۰^۲ به حدی خیسانده شدند که قطرات روی آن‌ها به هم چسبیده و جاری نشوند. سپس با استفاده از گوش پاک کن خیس اسپورهای روی برگ‌ها به صورت مالشی جدا شده و به همان طریق روی سطح برگ‌ها مالش داده شدند. شرایط تاریکی، رطوبت اشباع و دمای حداکثر ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت فراهم شدند تا عمل جوانه‌زنی و نفوذ قارچ در بافت میزبان صورت گیرد. پس از این مدت پلاستیک‌های مشکی برداشته شده و سرپوش‌های شفاف به حالت مایل در روی گلدان‌ها قرار داده شدند تا ضمن کاهش رطوبت

3- Saprophyte

4- Prodivic

1- Tween 20

2- Tween 100

بود (جدول ۱). با توجه به این که سری کامل لاین‌های افتراقی در دسترس نبود، لاین‌های موجود افتراقی با هدف دستیابی به نتایج مشابه جایگزین شدند. به عبارت بهتر لاین‌های HA-R1, P-386 و HAR-4, و HA-R2 با لاین‌های اصلی مشترک بوده و دیگر لاین‌ها به عنوان مشابه مورد استفاده قرار گرفتند. از آنجایی که ژنوتیپ‌های استاندارد حساس آفتابگردان به تمامی نژادهای فیزیولوژیک قارچ عامل بیماری آلوده می‌شوند و در واقع برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های زنگ کاربرد دارند، رقم موجود و استاندارد پرودویک به علت نداشتن ژن مقاومت به عنوان لاین حساس جایگزین لاین حساس S-37-388 (نا موجود) گردید (جدول ۱).

برای نام‌گذاری نژادهای فیزیولوژیک از روش پیشنهادی گولیا و ماسیرویچ (۴) که شامل یک سیستم کدگذاری سه رقمی با استفاده از واکنش نه لاین افتراقی بود، استفاده گردید. در این سیستم، نه لاین افتراقی در سه زیر گروه طبقه‌بندی می‌شوند. اگر اولین لاین در هر زیر گروه حساس باشد عدد یک به آن تعلق می‌گیرد و اگر لاین‌های دوم حساس باشند، دارنده امتیاز عددی دو هستند. اگر سومین لاین در یک زیر گروه حساس باشد، عدد چهار را شامل می‌شود و عدد سه زمانی حاصل می‌شود که اولین و دومین لاین‌ها حساس باشد. بنابراین اگر تمامی سه لاین در یک زیر گروه حساس باشند، بیماری‌زایی آن جدایه زنگ برای آن زیر گروه هفت می‌شود. حال اگر بقیه لاین‌های افتراقی واکنش مقاومت نشان دهند نژاد شناسایی شده ۷۰۰ خواهد

جدول ۱- لاین‌های افتراقی استفاده شده برای شناسایی نژادهای فیزیولوژیک قارچ عامل بیماری زنگ آفتابگردان و واکنش آن‌ها
Table 1- Differential lines for identifying sunflower rust physiological races and their reaction pattern

Line	واکنش به نژادهای اصلی							
	Reaction to main races							
	1	2	3	4	A	B	C	D
Prodovic	+	+	+	+	+	+	+	+
HA-335	+	+	+	+	+	+	+	+
803-1	?	?	?	?	?	?	?	?
RHA-265	-	?	?	?	?	?	?	?
QHP1	?	?	?	?	?	?	?	?
P-386	-	-	-	-	+	-	-	-
HA-R1	-	-	-	-	+	-	+	-
HA-R2	-	-	-	-	-	-	+	+
HA-R4	-	-	-	-	-	-	-	+
کد سه رقمی Triple code	?	?	?	?	?	?	?	?

A-D: اسامی نژادهای نامگذاری شده در اروپا، ۱-۴: اسامی نژادهای نامگذاری شده در آمریکای شمالی، +: حساسیت - مقاومت

زنی با اسپور زنگ، سطح برگ‌ها به خوبی با آب مقطر همراه با یک قطره آمولسیون کننده Tween 20 مه‌پاشی شد به طوری که قطرات بسیار ریز آب مقطر به طور یکنواخت در سطح برگ‌ها وجود داشتند. پس از آن با استفاده از قلم موی نرمی مخلوط پودر تالک و اسپور به نسبت وزنی یک‌هزارم (در این حالت پودر تالک در اختلاط با اسپور زنگ تقریباً کرم رنگ دیده می‌شود) به صورت یکنواخت روی سطح برگ‌ها پاشیده شد به نحوی که کاملاً با پودر پوشانده شوند. روی هر گلدان سرپوش پلاستیکی شفاف به منظور تأمین رطوبت لازم برای جوانه‌زنی اسپورها قرار داده شد. رطوبت فضای داخلی این سرپوش‌ها با استفاده از یک مه پاش دستی به حالت اشباع درآمد. همزمان زیر گلدان‌های مورد استفاده از آب پر شدند تا با افزایش تعریق و تفرق بوته‌های مایه‌زنی شده این فضاها رطوبت بالایی داشته باشند. دمای گلخانه روی ۱۸-۲۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم و روی تمام سرپوش‌ها با کیسه پلاستیکی مشکی به مدت ۴۸ ساعت به جهت تأمین شرایط تاریکی پوشانده شد. پس از این مدت سطح برگ‌ها به کمک یک مه

ارزیابی مقاومت ژرم پلاسما آفتابگردان به زنگ در شرایط کنترل شده (گلخانه)

در این پژوهش، مجموعاً مقاومت ۲۳ هیبرید و لاین آزمایشی آفتابگردان شامل هیبریدهای جدید ایرانی، لاین‌های گرده دهنده (رستورر)، و تک بوته‌های انتخابی رقم گلبور از بخش دانه‌های روغنی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر و نهال دریافت و مورد ارزیابی قرار گرفتند (جدول‌های ۴ تا ۶). خاطر نشان می‌شود که این مواد ژنتیکی پس از تشخیص مقاومت‌شان در برابر بیماری سفیدک کرکی در مقابل نژادهای شناسایی شده زنگ ارزیابی شدند. با توجه به وجود دو نژاد فیزیولوژیک زنگ در دو منطقه شمال غرب و شمال شرق کشور، هر دو نژاد شناسایی شده در ارزیابی‌های مقاومت مورد استفاده قرار گرفتند.

برای اجرای آزمایش‌ها از بوته‌های ۱۵-۱۸ روزه استفاده گردید. در این مرحله رویشی، بوته‌ها دو تا چهار برگه هستند. پیش از مایه

گلیداغ تفاوت نشان می‌داد. با مقایسه واکنش لاین‌های افتراقی مشابه بررسی نژادهای فیزیولوژیک زنگ توسط رحمانپور (۱۷ و ۱۹) چنین بر می‌آید که نژاد شناسایی شده در جدایه‌های خوی مشابه نژاد ۳۰۰ آمریکایی و نژاد غالب موجود در منطقه گلیداغ نیز به شماره ۳۰۲ نزدیک تر است.

نتایج به دست آمده نشان می‌دهند که در حال حاضر دو نژاد متفاوت در دو منطقه شمال غرب و شمال شرق کشور وجود دارند. با مقایسه واکنش لاین‌های افتراقی تفاوت این دو نژاد در ایجاد واکنش بر روی دو لاین RHA-265 و QHP1 محرز گردید (جدول ۲ و ۳).

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های آفتابگردان به زنگ در شرایط گلخانه

۲۳ ماده ژنتیکی آفتابگردان در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مقابل نژادهای شناسایی شده زنگ مورد ارزیابی قرار گرفتند. ارقام هیبرید ایرانی برزگر و قاسم در مقابل نژاد موجود گلیداغ (معادل ۳۰۲ عددی) مقاومت بالایی داشتند. حال آنکه نژاد غالب منطقه خوی (معادل ۳۰۰ عددی) بر روی هیبرید قاسم ایجاد حساسیت کرده بود (جدول ۴). از طرفی در میان لاین‌های رستورر یا برگشت دهنده باروری (گرده دهنده) لاین‌های پدری R-14، R-43 و R-1031 در مقابل نژاد منطقه گلیداغ خیلی مقاوم بودند. در این میان دو لاین R-43 و R-1031 به هر دو نژاد کاملاً مقاوم بودند (جدول ۵). بیشتر تک بوته های رقم گابور در مقابل هر دو نژاد حساسیت نشان دادند. این در حالی است که تنها تک بوته شماره Ga-445 مقاومت کامل در مقابل هر دو نژاد شناسایی شده زنگ داشت.

بحث

بیماری زنگ آفتابگردان یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زای این گیاه در نواحی مهم کشت در ایران به شمار می‌رود. در حال حاضر مزارع آفتابگردان در نواحی گلیداغ از استان گلستان، کالپوش از استان سمنان، و خوی و مرند از استان‌های آذربایجان به صورت گسترده‌ای به این بیماری آلودگی نشان می‌دهند. ارقام متداول آفتابگردان آجیلی در مناطق آذربایجان منبع مقاومتی به زنگ ندارند. لذا قارچ عامل بیماری زنگ در این مناطق شدت بالایی دارد. در مناطق گلیداغ و کالپوش (استان سمنان) نیز کشت آفتابگردان از سابقه‌ای طولانی برخوردار است. زنگ آفتابگردان نیز به مدت طولانی در این مناطق وجود داشته و ایجاد خسارت می‌کند. بر اساس آخرین اطلاعات موجود نژاد غالب زنگ در استان آذربایجان غربی و با کاربرد مجموعه لاین‌های افتراقی استاندارد، شماره ۳۰۰ و یا همان آمریکایی شناسایی شده است. رحمانپور (۱۹) در بررسی‌های خود نژادهای ۳۰۰ و ۳۰۲ را به ترتیب برای استان‌های آذربایجان غربی و گلستان گزارش کرده بود.

پاش دستی با آب مقطر شستشو گردید تا پودر تالک موجود در سطح برگ‌ها حذف شود. سپس سرپوش‌های پلاستیکی شفاف به صورت کمی مایل روی گلدان‌ها دوباره تعبیه شده و کیسه‌های مشکی دور گذاشته شدند. ۱۶ ساعت روشنایی در شبانه روز و دمای ۱۸-۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۲-۱۴ روز پس از مایه‌زنی، تیمار مورد استفاده برای تمامی آزمایش‌های بررسی مقاومت بود. در کلیه آزمایش‌ها برای هر ماده ژنتیکی سه تکرار مایه‌زنی با اسپور زنگ و پودر تالک و یک گلدان نیز مایه‌زنی با پودر تالک بدون اسپور زنگ (به عنوان شاهد هر ژنوتیپ) در نظر گرفته شد (۲ و ۳). همچنین رقم حساس رکورد با همین شرایط و تکرار به عنوان شاهد مثبت جهت نشان دادن بیماری‌زایی طبیعی یوردینوسپوره‌های زنگ و تأثیر مناسب مایه، در هر آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

۱۲-۱۴ روز پس از عمل مایه‌زنی، ارزیابی واکنش مواد ژنتیکی آفتابگردان بر اساس درصد پوشش جوش‌های زنگ در سطح برگ‌ها و روش پیشنهادی گولیا و ماسیرویچ (۴) صورت گرفت. درصد پوشش جوش‌ها با استفاده از الگوی رایانه‌ای درصدهای آلودگی سطح برگ تعیین شد. این درصدها عبارت بودند از ۰/۱٪، ۰/۵٪، ۱٪، ۲٪، ۵٪ و ۱۰٪ (۴). بر این اساس مواد ژنتیکی بررسی شده با استفاده از مقیاس‌های عددی میزان تراکم جوش‌های زنگ (PCP) بر روی برگ‌های آفتابگردان، در سه گروه مصون (PCP=0%)، خیلی مقاوم (0.5% > PCP > 0%)، و حساس (PCP > 1%) طبقه‌بندی شدند.

نتایج

شناسایی نژادهای فیزیولوژیک زنگ آفتابگردان

همه جدایه‌های زنگ جمع‌آوری شده از مناطق خوی در استان آذربایجان غربی و گلیداغ در استان گلستان روی رقم پرودوویک که فاقد ژن مقاومت است، ایجاد بیماری‌زایی و جوش‌های متراکم زنگ کردند. این واکنش حاکی از قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها بود. علاوه بر آن تمامی جدایه‌ها روی لاین‌های HA-335 و 803-1 ایجاد بیماری کردند. جدایه‌های منطقه گلیداغ (G1، G2) قادر به ایجاد بیماری‌زایی روی لاین‌های RHA-265 و QHP1 نبودند و این در حالی بود که دو لاین اخیر در مقابل جدایه‌های منطقه خوی حساسیت نشان دادند. لاین‌های P-386، HA-R1، HA-R2، HA-R4 در مقابل همگی جدایه‌ها مقاومت از خود به نمایش گذاشتند (جدول ۲). بنابراین جدایه‌های دو منطقه در ایجاد یا عدم ایجاد بیماری روی دو لاین RHA-265 و QHP1 با یکدیگر تفاوت بیماری‌زایی داشتند. در مجموع واکنش لاین‌های افتراقی در مقابل جدایه‌های منطقه خوی از الگوی یکسانی برخوردار بود و با الگوی واکنش به جدایه‌های منطقه

آمریکایی را در ترکیه شناسایی کرده است که در سیستم جدید نامگذاری به ترتیب نژادهای ۱۰۰ و ۳۰۰ بوده (۹) و در واقع نژاد ۳۰۰ مشابه نژاد شناسایی شده بیماری در ناحیه همسایه آن یعنی آذربایجان غربی (خوی) می باشد.

بنابراین در طول سال های ۱۳۸۳ تا ۱۳۸۹ تغییرات بیماریزایی مشاهده نگردیده است. عباسی و عزیزاده (۱) با استفاده از نامگذاری قدیمی نژاد غالب زنگ در استان های مازندران و گلستان را شماره سه معرفی کرده بودند. تان (۲۴) نیز در بررسی های خود دو نژاد یک و سه

جدول ۲- واکنش لاین های افتراقی آفتابگردان به جدایه های زنگ (خوی: Kh و کلیداغ: G)

Table 2- Reaction of sunflower differential lines to rust isolates (Kh: Khoy and G: Golidagh)

Differential line لاین افتراقی	Isolates جدایه ها				
	G1	G2	Kh1	Kh2	Kh3
Prodovic	S	S	S	S	S
HA-335	S	S	S	S	S
803-1	S	S	S	S	S
RHA-265	R	R	S	S	S
QHP1	R	R	S	S	S
P-386	R	R	R	R	R
HA-R1	R	R	R	R	R
HA-R2	R	R	R	R	R
HA-R4	R	R	R	R	R

R: Resistance; S: Susceptibility

جدول ۳- بیماریزایی جدایه ها (جدایه های موجود G1, Kh1)، (جدایه های پیشین KH و GO) و نژادهای شناسایی شده زنگ روی لاین های افتراقی استاندارد (ستون چپ) و موجود (ستون سمت راست) آفتابگردان (۲۲ و ۴)

Table 3- Pathogenicity of sunflower rust isolates (present Kh1, G1), isolates 300 and 302 and identified races on standard differential lines

Differential line* لاین افتراقی	Race/Representative isolate نژاد یا جدایه نماینده												Differential line** لاین افتراقی	
	1	2	3	4	A	B	C	D	KH	GO	Kh1	G1		
S37-388	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	Prodovic
CM90RR	0	2	0	2	0	2	2	2	2	2	?	?		
HA-335	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	HA-335
MC29	0	0	4	4	0	0	0	4	0	0	?	?		
803-1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	+	+		803-1
P-386	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	?	?		
P-386	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	-	-		P-386
HA-R1	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	?	?		
HAR-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		HAR-1
HA-R2	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	?	?		
HA-R2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		HA-R2
HA-R3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	?	?		
QHP1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	+	-		QHP1
HA-R4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	?	?		
HA-R4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		HA-R4
HA-R5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	?	?		
RHA-265	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	+	-		RHA-265
Race triple code	100	300	500	700	130	305	364	747	300	302	#300	#302	Race triple code	

*سری لاین های افتراقی استاندارد (لاین ها و واکنش آن ها در مقابل نژادهای زنگ با حروف و اعداد پر رنگ مشخص شده اند)، ** سری لاین های افتراقی موجود استفاده شده (واکنش لاین ها با حروف و نشانه های کم رنگ تفکیک شده اند)

0: Resistance; 1, 2, and 4: Susceptibility

جدول ۴- هیبریدهای ایرانی آفتابگردان و واکنش آن‌ها به نژادهای بیماری زنگ در شرایط کنترل شده

Table 4- Reaction of Iranian sunflower hybrids to rust physiological races under controlled conditions

ژنوتیپ Genotype	واکنش Reaction			
	PCP	Race 302	PCP	Race 300
Barzegar (CMS19*R-1031)	0.5	HR	0.5	HR
Ghasem (CMS1221/1*R-14)	0.5	HR	2	S

PCP: Pustul Coverage Percentage; HR: Highly Resistant; S: Susceptible

جدول ۵- واکنش لاین‌های رستورر آفتابگردان در مقابل نژادهای بیماری زنگ در گلخانه

Table 5- Reaction of sunflower restorer lines against rust disease physiological races under greenhouse conditions

ژنوتیپ Genotype	واکنش Reaction			
	PCP	Race 302	PCP	Race 300
R-14	0.5	HR	2	S
R-43	0.5	HR	0.5	HR
R-217	2	S	2	S
R-232	2	S	2	S
R-864	2	S	2	S
R-1031	0.5	HR	0.5	HR
R-N1-72	2	S	0.5	HR

PCP: Pustul Coverage Percentage; HR: Highly Resistant; S: Susceptible

جدول ۶- تک بوته‌های انتخابی رقم گابور و واکنش آن‌ها به نژادهای زنگ در شرایط کنترل شده

Table 6- Single plants of sunflower Gabor cultivar and their reaction to rust races under controlled conditions

ژنوتیپ Genotype	واکنش Reaction			
	PCP	Race 302	PCP	Race 300
Ga-424	0	IM	2	S
Ga-425	2	S	0.5	HR
Ga-426	2	S	2	S
Ga-429	2	S	2	S
Ga-430	2	S	2	S
Ga-431	0.5	HR	2	S
Ga-432	2	S	2	S
Ga-436	2	S	2	S
Ga-437	2	S	2	S
Ga-440	0.5	HR	2	S
Ga-443	2	S	2	S
Ga-444	2	S	2	S
Ga-445	0.5	HR	0.5	HR
Ga-446	0.5	HR	2	S

PCP: Pustul Coverage Percentage; HR: Highly Resistant; S: Susceptible; IM: Immune

قاره به صورت معنی‌داری از استرالیا متفاوت باشد (۶). با توجه به عدم دسترسی به سری کامل این لاین‌ها در پژوهش اخیر و در اختیار داشتن چند لاین مشترک، امکان قضاوت کامل در زمینه شماره نژاد با استفاده از سیستم کدگذاری وجود نداشته است. در مورد نژاد غالب موجود در منطقه گلستان نیز چنین وضعیتی حاکم است. ولی باید یادآور شد که هر دو نژاد موجود شناسایی شده از گروه ۳۰۰ به شمار می‌آیند. مسئله مهمی که در این مورد نمایان است، تفاوت محرز فیزیولوژیک بین جدایه‌های دو منطقه می‌باشد. به عبارت بهتر دو نژاد فیزیولوژیک در دو ناحیه قابل شناسایی هستند. این اختلاف

در حال حاضر نژاد گروه ۳۰۰ در نواحی مغولستان مرکزی کشور چین نیز نژاد غالب معرفی شده است (۹). همچنین نژادهای گروه ۷۰۰ شامل ۷۰۰، ۷۰۴، ۷۲۰، ۷۴۰، ۷۴۴، ۷۶۰ و ۷۷۷ در قاره‌های آمریکای شمالی (ایالات متحده) و جنوبی (آرژانتین) شناسایی و معرفی شده‌اند که به محصول آفتابگردان خسارت وارد می‌کنند (۹). در ایالات متحده و کاربرد نه لاین افتراقی استاندارد ۳۹ نژاد غالب و یا نادر شناسایی شده‌اند. از آنجایی که منشأ گسترش آفتابگردان از آمریکای شمالی بوده و به دنبال آن خاستگاه عامل بیماری نیز به شمار می‌آید این انتظار وجود دارد که گسترش عامل بیماری در این

مقاومت است. اینبرد لاین‌ها و لاین‌های بین گونه‌ای زیادی معرفی شده‌اند که به بیماری زنگ مقاومت دارند (۳). برای ارزیابی مقاومت هم گولیا و ماسبرویج (۴) اذعان داشته‌اند که بهترین روش ارزیابی محاسبه همزمان اندازه جوش، میزان پوشش سطح برگ و اندازه انتشار زنگ در گیاه کامل می‌تواند باشد. وجود دو نژاد متفاوت در این دو منطقه این ضرورت را نیز به دنبال دارد که در مقوله مقاومت بایست ژنوتیپ‌های آفتابگردان در فرآیند اصلاح برای مقاومت نسبت به هر دوی آن‌ها آزمایش شوند. خوشبختانه دو رقم هیبرید جدید آفتابگردان هر کدام حداقل به یک نژاد مقاومت نشان داده‌اند. به عبارت بهتر هیبرید قاسم (CMS1221/1*R-14) در مقابل نژاد غالب موجود در منطقه خوی و هیبرید برزگر (CMS19*R-1031) در مقابل هر دو نژاد غالب موجود در گلیداغ از استان گلستان و خوی از استان آذربایجان غربی مقاومت قابل قبولی نشان دادند. وجود لاین‌های گرده دهنده مقاوم در برابر این نژادها نیز نقطه قوت دیگری است که پژوهشگران اصلاح نباتات می‌توانند در برنامه‌های به نژادی آفتابگردان جهت نیل به ارقام هیبرید مقاوم به زنگ از آن‌ها استفاده کنند. شناسایی تک‌بوتۀ Ga-445 در تودۀ ژنتیکی رقم آزاد گرده افشان گابور مقاوم به هر دو نژاد موجود نشانگر آن است که منبع مقاومت به نژادهای زنگ در میان توده‌های ژنتیکی آفتابگردان وجود دارد. در حال حاضر هسته مرکزی تودۀ ژنتیکی رقم گابور در راستای دستیابی به مقاومت به زنگ پروسۀ اصلاحی را طی می‌کند. از آنجایی که گزارشات متعددی در سرتاسر دنیا مبنی بر بروز حساسیت ارقام آزاد گرده افشان و هیبرید آفتابگردان در مقابل نژادهای ۳۰۰ عامل بیماری زنگ ارائه می‌گردند و این گروه در شرایط ایران غالب می‌باشد، لازم و ضروری است که نسبت به شناسایی متناوب نژادهای جدید و نیز منابع جدید مقاومت اقدام کرد. همچنین نشانگرهای ملکولی برای شناسایی ژن‌های مقاومت گزارش شده‌اند که در برنامه‌های به نژادی لاین‌ها و ژرم پلاسما آفتابگردان استفاده می‌شوند (۲۲). وجود منابع مقاوم به زنگ دسترسی به معرفی رقم آزاد گرده افشان مناسب برای مناطق مستعد بیماری را سرعت خواهد بخشید.

سپاسگزاری

از آقایان مهندس دوجی، قدیمی و خانم مهندس خیرگو در مراکز تحقیقات کشاورزی و منبع طبیعی گلستان و آذربایجان غربی به خاطر جمع‌آوری و ارسال نمونه‌های زنگ قدرانی می‌شود. پژوهش اخیر بخشی از پروژه تحقیقاتی به شماره ۸۸۰۷۶-۸۸۰۳-۰۳-۲ در مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر می‌باشد.

بیماری‌زایی و فیزیولوژیک در واکنش لاین‌های RHA-265 و QHP1 به جدایه‌های خوی و گلیداغ با نشان دادن به ترتیب حساسیت و مقاومت مشخص بود. از آنجایی که مناطق آذربایجان و گلستان جزو مناطق مهم کشت آفتابگردان به شمار می‌آیند، لذا شناسایی نژادهای غالب بیماری زنگ در آن‌ها لازم و ضروری می‌نماید.

در برنامه‌های ارزیابی کلکسیون نژادهای زنگ موجود در ایالات متحده آمریکا بین سال‌های ۲۰۰۷ و ۲۰۰۸ تعداد ۳۹ نژاد فیزیولوژیک شناسایی شدند. از میان آن‌ها نژادهای ۳۳۴ و ۳۳۶ منشأ گرفته از نژاد ۳۰۰ (نژاد سه قدیمی) در دو سال پیپی غالب بودند. نژاد ۳۳۶ قادر به آلوده کردن شش لاین افتراقی بود. به علاوه نژاد ۷۷۷ منشأ گرفته از نژاد ۷۰۰ یا شماره چهار قدیمی از فراوانی کمتری برخوردار بوده ولی بیشترین قدرت بیماری‌زایی را دارا است. تمامی نه لاین افتراقی آفتابگردان به این نژاد حساس هستند (۱۶) تنها لاین HA-R6 اخیرا معرفی شده است که به نژادهای ۳۳۶ و ۷۷۷ مقاومت نشان داده است (۳). شناسایی نژادهای فیزیولوژیک در دنیا به ۵۰ سال گذشته بر می‌گردد که با یافتن ژن‌های مقاومت به زنگ در ارقام و لاین‌های کانادایی عملی شد. تهیه ارقام افتراقی نیز بر اساس منابع موجود مقاومت و به صورت مجزا از هم در مناطق مختلف صورت پذیرفت. و به دنبال آن سیستم نامگذاری در قاره اروپا و آمریکا دچار دوگانگی گردید. لزوم استفاده از یک سیستم واحد برای شناسایی نژاد به سیستم کدگذاری عددی منتهی شد. در این راستا بیشترین تعداد نژادهای زنگ از ایالات متحده آمریکا، کانادا، فرانسه، مجارستان، استرالیا، هندوستان و ترکیه گزارش شده‌اند. وجود ارقام و هیبریدهای مقاوم آفتابگردان در نواحی آلوده خود می‌تواند به عنوان عامل فشار ژنتیکی واکنش‌های مقاومت فیزیولوژیک را در جمعیت قارچ عامل بیماری زنگ به بار آورد.

چندین ژن عامل مقاومت به زنگ در آفتابگردان شناسایی شده‌اند. ژن R1 مقاومت به نژادهای یک و دو آمریکایی را باعث می‌شود. ژن R2 مقاومت به نژادهای یک و سه، ژن R4 و R5 مقاومت به نژاد چهار، ژن Pu6 مقاومت به نژادهای یک تا چهار، و بالاخره ژن‌های Ph1, Ph2, Ph2a در ترکیب با Ph3 مقاومت به جدایه شماره ۳۴۰ آرژانتین را به وجود می‌آورند. علاوه بر این‌ها چهار ژن دیگر نیز شناسایی شدند که عامل مقاومت به نژادهای یک تا چهار بودند (۱۱). در حال حاضر ژن‌های مقاومت R₁₂, R₁₁, R_{adv}, Pu6, R₅, R₄, R₃, R₂, R₁ که هر کدام به تعداد معدودی از نژادهای فیزیولوژیک مقاوم هستند شناسایی و معرفی شده‌اند (۳).

یکی از بهترین و دست‌یافتنی‌ترین روش‌های کنترل خسارت بیماری زنگ در دنیا استفاده از ارقام و هیبریدهای آفتابگردان با منابع

- 1- Abbasi S., and Alizadeh A. 2000. Histological study of sunflower rust and identification of its race 3 in Mazandaran and Golestan provinces. Iranian Journal of Plant Pathology. 36 (3-4): 207-219. (In Persian with English abstract)
- 2- Alizadeh A., and Abbasi S. 2001. Evaluation of some genetic materials for resistance to the prevalent race of *Puccinia helianthi* in Mazandaran and Golestan provinces. Iranian Journal of Plant Pathology. 37 (1-2): 15-27. (In Persian with English abstract)
- 3- Bulos M., Ramos M.L., Altieri E., and Sala C.A. 2013. Molecular mapping of a sunflower rust resistance gene from HAR6. Breeding Science 63: 141-146.
- 4- Gulya T.J., and Masirevic S. 1995. Proposed methodologies for inoculation of sunflower with *Puccinia helianthi* and for disease assessment. The FAO European Research Network on Sunflower 31:31-47.
- 5- Gulya T.J., Kong G., and Brothers M. 2000. Rust resistance in wild *Helianthus annuus* and variation by geographic origin, P. 138-42, Proceedings of the 15th International Sunflower Conference, Toulouse, France.
- 6- Friskop A.J., Gulya T.J., Jordahl J., Ramsett M., Humann R., Acevedo M., Harveson R., and Markell S. 2012. Determination of *Puccinia helianthi* races in the United States Northern Great Plains. Proceedings of 18th International Sunflower Conference. 27 February-1 March. Mar del Plata, Argentina. Vol.2: 1-4.
- 7- Friskop A.J., Gulya T.J., Halley S.A., Schatz B.G., Schaefer J.P., Jordahl J.G., Meyer S.M., Misek K.W., Hendrickson P., and Markell S.G. 2015a. Effect of fungicide and timing of application on management of sunflower rust. Plant Disease. 99: 1210-1215.
- 8- Friskop A.J., Gulya T.J., Harveson R.M., Humann R.M., Acevedo M., and Markell S.G. 2015b. Phenotypic diversity of *Puccinia helianthi* (sunflower rust) in the United States from 2011 and 2012. Plant Disease. 99:1604-1609.
- 9- Jing L., Xu X., Jing J., Li L., and Navi S.S. 2015. Determination of physiological races and evaluation of sunflower for resistance to *Puccinia helianthi* Schw. Journal of Phytopathology 163: 507-512.
- 10- Kong G. 1999. Briefing notes for sunflower rust characterization. Information on techniques used for study of rust, P.5, Farming Systems Institute, Toowoomba, Queensland.
- 11- Lambrides C.J., and Miller J.F. 1994. Inheritance of rust resistance in a source of MC29 sunflower germplasm. Crop Science 34:1225-1230.
- 12- Madjidieh-Ghassemi Sh., Malihipour A., and Khiyawi M. 1995. Evaluation of tolerance in some sunflower cultivars to *Puccinia helianthi* Schw. in field condition. Proceedings of the 12th Iranian Plant Protection Congress. 2-7 September, Karaj, Iran. 116.
- 13- Miller J.F., Rodriguez R.H., and Gulya T.J. 1992. Evaluation of genetic materials for inheritance of resistance to race 4 rust in sunflower, P. 361-365, Proceedings of the 13th International Sunflower Conference, Pise, Italy.
- 14- Patil P.V., Kachapur M.R., and Anahosur K.H. 1998. Identification of physiological races of *Puccinia helianthi* in India. Indian Phytopathology 51(4):376-378.
- 15- Qi L.L., Gulya T., Seiler G.J., Hulke B.S., and Vick B.A. 2011a. Identification of resistance to new virulent races of rust in sunflowers and validation of DNA markers in the gene pool, Phytopathology 101:241- 249.
- 16- Qi L.L., Hulke B.S., Vick B.A., and Gulya T.J. 2011b. Molecular mapping of the rust resistance gene R4 to a large NBS-LRR cluster on linkage group 13 of sunflower, Theoretical Applied Genetics 123:351-358.
- 17- Rahmanpour S. 2010. Identification of physiological races of sunflower rust and reaction of the genotypes to the disease in Iran, P: 176-180, Proceedings of International Symposium of Sunflower Breeding on Resistance to Diseases, Krasnodar, Russia.
- 18- Rahmanpour S. 2004a. Study on the resistance to rust, *Puccinia helianthi*, in sunflower germplasm under controlled conditions. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress. Tabriz, Iran. Vol. 2:294. (In Persian with English abstract)
- 19- Rahmanpour S. 2004b. An investigation on physiological variation in races of sunflower rust, *Puccinia helianthi*, and downy mildew, *Plasmopara halstedii*. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress. Tabriz, Iran. Vol. 2:300. (In Persian with English abstract)
- 20- Rashid K.Y. 1992. New virulent pathotypes of sunflower rust in Canada, P. 772-778, Proceedings of the 13th International Sunflower Conference, Pise, Italy.
- 21- Sackston W.E. 1992. Managing the major sunflower diseases: From cultural practices to breeding for resistance, P. 667-669, Proceedings of the 13th International Sunflower Conference, Pise, Italy.
- 22- Sendall B.C., Kong G.A., Goulter K.C., Aitken E.A.B., Thompson S.M., Mitchell H.M., Kochman J.K., Lawson W., Shatte T., and Gulya T.J. 2006. Diversity in the sunflower: *Puccinia helianthi* pathosystem in Australia. Australasian Plant Pathology. 35:657-670.
- 23- Skoric D. 1988. Breeding for resistance to diseases and pests, Journal of Edible Oil Industry 25:25-40.
- 24- Tan A.S. 2010. Identification of rust (*Puccinia helianthi* Schw.) races in sunflower (*Helianthus annuus* L.) in Turkey. Helia 33: 181-190.
- 25- Vicente P.M., and Zizzerini A. 1997. Identification of sunflower rust (*Puccinia helianthi*) physiological races in Mozambique. Helia 20(27):25-30.

