دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی
جلد بیستم، شماره چهارم، ۱۳۹۲
http://jopp.gau.ac.ir

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی نسبت به بیماری لکه موجی ناشی از بیمارگر قارچی *Alternaria tenuissima* و *Alternaria allternata* در شرایط درون شیشه‌ای و گل‌خانه‌ای

حمیدرضا میرکریمی[*][1]، احمد عباسی‌مقدم[2] و جواد مظفری[3]
[1] دانشجوی دکتری گروه اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران
[2] استادیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، بانک ژن گیاهی ملی ایران، مؤسسه نهال بذر، کرج،
[3] دانشیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، بانک ژن گیاهی ملی ایران، مؤسسه نهال بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۹۲/۲/۱۸ ؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۳/۲۸

چکیده

به‌منظور تعیین سطوح مقاومت و مناسب‌ترین ژنوتیپ سیب‌زمینی به بیماری لکه موجی، آزمایشی در قالب طرح به‌طور کامل تصادفی به‌صورت فاکتوریل با ۳ تکرار در بانک ژن گیاهی ملی ایران در سال‌های ۱۳۸۷–۸۸ به اجرا گذاشته شد. تیمارها شامل بیمارگر قارچی *A. alternata* و *A. tenuissima* و ٦ ژنوتیپ سیب‌زمینی شامل پیکاسو، مارفونا، دیتا، آگریا، کاسموس و آرمیدا بودند. نتایج تجزیه واریانس در ارزیابی درون‌شیشه‌ای و گل‌خانه‌ای نشان داد که اثر بیمارگرها، ژنوتیپ‌ها و اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار بود. در ارزیابی درون‌شیشه‌ای، علایم هر دو بیمارگر در روز دوم شروع و تا روز ششم ادامه داشت. براساس سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری برای بیمارگر *A. alternata* ژنوتیپ کاسموس در سطح پایین‌تری از آگریا (شاهد حساس) قرار داشت، حال آن‌که پیکاسو و مارفونا با دیتا (شاهد مقاوم) در گروه مقاوم قرار گرفتند. با استفاده از بیمارگر *A. tenuissima* نیز کاسموس حساس و تنها پیکاسو در گروه مقاوم قرار گرفت. در روش گل‌خانه‌ای علایم در روز سوم شروع و تا روز بیستم ادامه یافت. در این ارزیابی با استفاده از هر دو ایزوله قارچی، کاسموس در سطح حساس و پیکاسو در سطح مقاوم قرار گرفتند. در ارزیابی درون‌شیشه‌ای و گل‌خانه‌ای، آرمیدا هیچ‌گونه علایم بیماری از خود نشان نداد که

---

[*] مسئول مکاتبه: rezamirkarimi21@gmail.com

می‌توان آن را بعد از آزمایش‌های مزرعه‌ای به‌عنوان ژنوتیپ مصون از بیماری معرفی کرد. از آن‌جایی‌که نتایج ارزیابی مقاومت در هر دو شرایط درون‌شیشه‌ای و گل‌خانه‌ای کاملاً مشابه بود، می‌توان نتیجه گرفت که دسته‌بندی ژنوتیپ‌ها به مقاوم و حساس در این مطالعه دارای اعتبار می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری، لکه موجی، بیماری‌زایی، مقاومت

مقدمه

گیاه سیب‌زمینی با نام علمی سولانوم توبرزوم[1] گیاهی است یک ساله با برگ‌های متناوب، مرکب و تکثیر آن از طریق کاشتن غده‌ها و یا قسمت‌هایی از غده که دارای جوانه است صورت می‌گیرد. براساس آمار سازمان خواروبار جهانی (FAO) تولید سیب‌زمینی دنیا در سال ۲۰۰۷ به‌میزان ۳۲۱۷۳٦ هزار تن و در ایران ٥۲٤۰ هزار تن بوده است. بیماری لکه موجی سیب‌زمینی[2] یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های قارچی خانواده بادنجانیان[3] محسوب می‌شود و موجب ایجاد لکه‌ها، زخم‌ها، پوسیدگی در میوه، ساقه، یقه و در نهایت کاهش عملکرد می‌گردد. بیماری لکه موجی سیب‌زمینی با توجه به تنوع قارچی و میزان خسارت بالا در دنیا و بالاخص ایران به‌علت تنوع در شرایط اقلیم آب و هوا، نقش مهمی در کاهش عملکرد این محصول زراعی دارد. میزبان‌های مهم برای آلترناریا شامل گوجه‌فرنگی، سیب‌زمینی و بادنجان می‌باشد (پسچیدت، ۱۹۸٥). سایر میزبان‌های این بیماری شامل گزنه، فلفل قرمز و گیاهان غیر از خانواده بادنجانیان مانند خیار و گل آهار می‌باشد (قوستا، ۲۰۰٤؛ نیرگارد، ۱۹٤٥). تاکنون بیش‌تر پژوهش‌های در دنیا با استفاده از دو گونه قارچی آلترناریای *Alternaria solani* و *A. alternata* معطوف بوده است. کشور ایران از نظر شرایط اقلیمی به‌گونه‌ای است که گونه‌های قارچی نام برده دارای تنوع بود و در مطالعات اخیر در ایران ٦ گونه قارچی آلترناریا شناسایی شده است (طاهری‌اردستانی و همکاران، ۲۰۰۷). در مطالعات اخیر گونه قارچی *A. tenuissima* در گیاه سیب‌زمینی ایران گزارش شد و پراکنش جمعیتی تقریباً مساوی با گونه *A. alternata* مشاهده شده است (طاهری‌اردستانی و همکاران، ۲۰۰۸). از آن‌جایی‌که مقاومت سیب‌زمینی به بیماری لکه موجی در بیش‌تر موارد یک صفت کمی محسوب می‌گردد، حصول ارقام

---

[1] *Solanum Tuberosum*
[2] Early Blight of Potato
[3] Solanacea

مقاوم و موفق تجاری به سادگی صورت نمی‌گیرد (کریست و هاینس، ۲۰۰۱؛ فرانک و همکاران، ۱۹۷۹؛ هریت و همکاران، ۱۹۹۰). استفاده از روش‌های مبارزه و پیش‌گیری از این بیماری به‌ویژه استفاده از ارقام مقاوم همراه با روش‌های زراعی، فیزیکی و زیستی عدم تخریب محیط‌زیست و صرفه‌جویی در هزینه‌های جانبی مقابله با این بیماری توصیه شده است. ارزیابی واکنش گیاهچه‌های سیب‌زمینی به‌این بیمارگرها معمولاً براساس دو روش درون‌شیشه‌ای و گل‌خانه‌ای انجام می‌گیرند (دیتا رودریگوز و همکاران، ۲۰۰٦). روش ارزیابی درون‌شیشه‌ای با پخش عصاره بر روی گیاه اولین بار معرفی شد و برای شناسایی مقاومت به بیماری لکه موجی مورد استفاده قرار گرفت (لوکه، ۱۹٤۸). بررسی گیاهچه‌های به‌دست آمده از کشت بافت با استفاده از عصاره‌های فیلتر شده قارچ، بر روی سطح گیاه صورت می‌گیرد و ارزیابی بر مبنای بروز علایم شامل میزان نکروز، کلروز و مرگ گیاهچه‌ها انجام می‌شود (دیتا رودریگوز و همکاران، ۲۰۰٦). استیوارت و برادشو (۱۹۹۳) نشان دادند، تطابق مناسب بین انتخاب گل‌خانه‌ای و مزرعه‌ای اجازه می‌دهد که بتوان بیش‌تر نمونه‌های ژنتیکی مقاوم و حساس با سطوح متفاوت از مقاومت را تشخیص داد. هدف از انجام این پژوهش بررسی میزان حساسیت و یا مقاومت ٦ ژنوتیپ سیب‌زمینی به دو بیمارگر *A. alternata* و *A. tenuissima* در دو شرایط مختلف درون‌شیشه‌ای و گل‌خانه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی: ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی مورد بررسی در این پژوهش شامل: پیکاسو، مارفونا، دیتا، کاسموس، آرمیدا و آگریا از بخش ژنتیک و بانک ژن گیاهی ملی ایران دریافت شد. این نمونه‌های ژنتیکی به‌صورت ریزنمونه عاری از ویروس[1] در اتاق رشد با دمای ثابت در ۲۵±۱ درجه سانتی‌گراد در مجموعه ژنتیکی درون‌شیشه‌ای بانک ژن گیاهی ملی ایران نگهداری می‌شوند. در طی ارزیابی گل‌خانه‌ای از هر دو بیمارگر قارچی، با غلظت $۱۰^{٦}$–$۱۰^{٤}$ اسپور و با روش اسپورپاشی استفاده گردید. نمونه‌ها در زیر پوشش پلاستیکی قرار داده شدند. بر روی برگ‌های نمونه‌های ژنتیکی مورد آزمایش استفاده شد. ارزیابی بر مبنای بروز علایم شامل میزان نکروز، کلروز و مرگ گیاهچه‌ها انجام گرفت. در این پژوهش از ۲ ژنوتیپ به‌عنوان شاهد استفاده گردید. ژنوتیپ آگریا در منابع نسبت به جدایه *A. alternata* حساس گزارش شده است و در نتیجه به‌عنوان شاهد حساس در نظر گرفته شد (نصر اصفهانی، ۲۰۰٤). نمونه

---

[1] Viruse Free Plant

ژنتیکی دیتا به‌عنوان منبع مقاومت به بیماری لکه موجی سیب‌زمینی در ارزیابی نمونه‌های ژنتیکی سیب‌زمینی در برزیل محسوب شده که به‌عنوان شاهد مقاوم محسوب گرفت (بویتکس، ۱۹۹۵). مطالعه شامل دو آزمایش در شرایط درون‌شیشه‌ای و گل‌خانه‌ای بود. آزمایش‌ها به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه به‌طور کامل تصادفی به ۳ تکرار صورت گرفت. تیمارها شامل ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی (٦ سطح) و بیمارگرهای قارچی (۲ سطح) در بانک ژن گیاهی ملی ایران در سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۸ انجام شد.

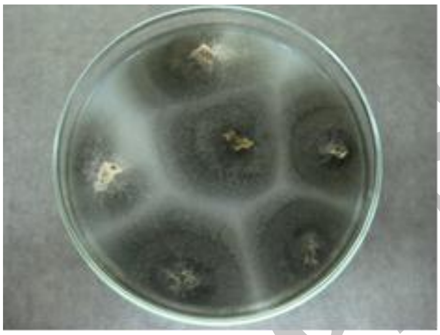
کشت بافت گیاهی: به‌منظور ازدیاد گیاهچه‌ها برای آزمایش‌ها از روش کشت بافت[1] استفاده شد. کشت بافت برای سیب‌زمینی با استفاده از محیط کشت MS[2] پایه و بدون اضافه کردن هیچ‌گونه مواد از جمله ویتامین‌ها و هورمون‌ها استفاده شد. محیط جامد MS پایه را در لوله‌های آزمایش ۲×۱۸ و ۲×۲۰ ریخته شد و سپس با استفاده از اتوکلاو سترون گردید. برای اطمینان از آلوده نبودن لوله‌ها به‌مدت ٤٨–٢٤ ساعت در اتاقک کشت قرار داده شد و در صورت اطمینان حاصل کردن از سترون بودن محیط، گیاهچه‌ها برای کشت آماده گردید. از کشت جوانه‌های جانبی و انتهایی برای کشت استفاده شد و در هر برش سعی گردید دارای حداقل یک برگ به اضافه یک جوانه باشد، تلاش گردید جوانه‌ها در زمان برش آسیب نبینند. از کشت جوانه‌های خشک پرهیز شد، تا حد امکان برگ‌های بزرگ تا حدودی که به جوانه‌ها آسیبی وارد نگردد حذف گردید. بعد از کشت ریزنمونه‌ها، که هر گیاهچه به چندین برش تقسیم و در لوله‌های شامل محیط کشت قرار گرفت، لوله‌های آزمایش به اتاقک رشد با همان شرایط دمایی (شرایط نگهداری گیاهچه‌ها) منتقل گردید. گیاهچه‌ها مدت ۲۵–۲۰ روز در این وضعیت نگهداری شد تا به مرحله ۵–٤ برگی (وضعیت مناسب برای انتقال[3] و ارزیابی گل‌خانه‌ای[4]) برسند.

کشت قارچ‌های بیمارگر: جدایه‌های بیماری‌زایی ۲ گونه *A. tenuissima* و *A. alternata* جمع‌آوری شده از مزارع سیب‌زمینی کاری کشور از بانک ژن گیاهی ملی ایران مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شد، روی محیط PCA[5] رشد نمود و بعد به‌صورت قطعاتی به اندازه ۵ میلی‌متر با استفاده از تیغ

---

[1] 1- Tissue Culture
[2] 2- Murashige and Skoog Medium
[3] 3- Transformation
[4] 4- Greenhouse Evaluation
[5] 5- Potato Carrot Agar

اسکالپل استریل برداشته شد و به تشتک‌های پتری‌دیش ۹ سانتی‌متر شامل محیط کشت PCA انتقال داده شد (اندرسون و همکاران، ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲؛ روبرتس، ۲۰۰۱؛ سیمونز، ۲۰۰۰). این تشتک‌ها در انکوباتور تحت شرایط دمایی ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد با ۸ ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی و تحت نور سفید فلورسنت به‌مدت زمان ۱۲-۱۰ روز نگهداری شد. به‌منظور تولید میزان اسپور لازم برای ارزیابی تعداد کافی از تشتک‌های پتری دیش کشت شد (شکل ۱).



شکل ۱- ایزوله کشت شده قارچی Alternaria (A. tenuissima) در محیط کشت PCA.

تهیه عصاره فیلتر شده کشت قارچ: حلقه‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه در حال رشد پرگنه‌های مربوط به هر جدایه مورد مطالعه برداشته شد و به تشتک‌های پتری شامل محیط غذایی PCA یا PDA[1] منتقل گردید. این تشتک‌ها در انکوباتور تحت شرایط دمایی ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد و تحت نور سفید فلورسنت با چرخه نوری/ تاریکی ۱۶/۸ ساعت، به‌مدت زمان ۱۲-۱۰ روز نگهداری شدند. به‌منظور تهیه سوسپانسیون قارچی از کشت ۱۲-۱۰ روزه جدایه‌های قارچی در محیط کشت جامد PCA یا PDA استفاده شد. مقداری آب مقطر ۲ بار استریل را روی سطح پرگنه قارچی در تشتک‌های پتری پخش می‌کنیم و سپس با استفاده از سوزن روی سطح محیط کشت چند بار کشیده و هاگ‌های تولید شده برداشته شد و در یک بشر استریل قرار داده شد. میزان اسپور لازم در نمونه برداشته شده با استفاده از لام هموسایتومتر محاسبه گردید و میزان غلظت $۱۰^{٤}$–$۱۰^{٦}$ اسپور در میلی‌لیتر تنظیم گردید. بعد از تنظیم غلظت اسپور سوسپانسیون، ۱ مایکرولیتر از سوسپانسیون را در شیشه محتوی ۱۰۰

---

[1] Potato Dextrose Agar

سی‌سی محیط کشت مایع PDB[1] ریخته و در انکوباتور و تحت شرایط نوری/ تاریکی ١٦/٨ ساعت و دمای ۲۵-۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰-۸ روز نگهداری شد. شیشه‌ها هر روز به‌مدت ٦-٤ ساعت روی دستگاه شیکر قرار داده شدند. بعد از مدت مشخص کشت، محیط مایع کشت عبور داده شده از پارچه ململ ٤ لایه، در داخل یک بشر استریل نگهداری شد. عصاره قارچی عبور داده شده به‌مدت ۲۰-۱۵ دقیقه با استفاده از سانتریفیوژ رومیزی با سرعت ۲۵۰۰-۲۰۰۰ گرم قرار داده شد. فاز رویی برای حذف اسپورهای عبور کرده از پارچه توری جدا گردید. برای جلوگیری از وجود و رشد باکتری‌ها در عصاره قارچی به‌دست آمده در مراحل بالا، از روش فیلتر- سرنگ با استفاده از فیلترهای ۰/۲ میکرومتر استفاده شد. با استفاده از سرنگ عصاره قارچی را برداشته و از فیلترهای نام برده عبور داده شد تا عصاره فیلتر شده کشت قارچ تهیه گردید.

ارزیابی درون‌شیشه‌ای: ارزیابی درون‌شیشه‌ای گیاهچه‌های به‌دست آمده از کشت بافت با استفاده از عصاره‌های فیلتر شده کشت قارچ، به روش پخش عصاره فیلتر شده قارچی بر روی سطح گیاه تهیه شد و بر مبنای بروز علایم شامل میزان نکروز، کلروز و مرگ گیاهچه‌ها انجام گردید. در این روش عصاره فیلتر شده کشت قارچ به‌دست آمده از محیط کشت مایع به‌صورت قطره‌ای بر روی برگ گیاهچه‌های داخل لوله آزمایش پاشیده شد. گیاهچه‌ها بعد از تلقیح در انکوباتور تحت شرایط دمایی ۲±۲۳ سانتی‌گراد و دوره روشنایی/ تاریکی ١٦/٨ ساعت نگهداری شد. ارزیابی از روز اول تا روز ششم و بر مبنای مشاهده برگ‌های میانی انجام گرفت. علایم بیماری بر مبنای مقیاس پریور و میچالیدز (۲۰۰۲) رتبه‌بندی شد.

جدول ۱- مقیاس برای ارزیابی میزان خسارت تولیدی به‌وسیله گونه‌های آلترناریا در شرایط درون‌شیشه‌ای و گل‌خانه‌ای روی سیب‌زمینی (پریور و میچالیدز، ۲۰۰۲).

داده‌های بیماری‌زایی	علایم بیماری
۱	بدون علایم توسعه لکه
۲	لکه‌های بزرگ‌تر از ۱ میلی‌متر
۳	لکه‌های بین ۵-۱ میلی‌متر
٤	لکه‌های بزرگ‌تر از ۵ میلی‌متر

---

[1] 1- Potato Dextrose Broth

تهیه سوسپانسیون قارچی: از کشت ۱۲–۱۰ روزه جدایه‌های قارچی در محیط کشت جامد PCA یا PDA استفاده شد. مقداری آب مقطر ۲ بار استریل را روی سطح پرگنه قارچی در تشتک‌های پتری پخش می‌کنیم و سپس با استفاده از سوزن روی سطح محیط کشت چند بار کشیده و هاگ‌های تولید شده برداشته شد و در یک بشر استریل قرار داده شد، سپس با استفاده از لام هموسایتومتر غلظت سوسپانسیون اسپور به‌میزان ۱۰^{۶}–۱۰^{٤} اسپور تنظیم گردید. سوسپانسیون قارچ در موارد موردنیاز به‌صورت تازه تهیه شده طی مدت ۳۰ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت.

ارزیابی گل‌خانه‌ای: به‌منظور ارزیابی گل‌خانه‌ای نمونه‌های ژنتیکی از شرایط درون‌شیشه‌ای به شرایط گل‌خانه‌ای منتقل شدند. انتقال گیاهچه‌ها از محیط درون شیشه تحت شرایط طبیعی به محیط گل‌خانه بسیار دشوار می‌باشد، در نتیجه شرایط رطوبتی و دمایی مناسب نیاز دارد. پوشش پلاستیکی با ایجاد شرایط ایده‌ال (رطوبت ۸۰–٦۵ درصد و درجه حرارت ۳۱–۲۳ درجه سانتی‌گراد) میزان کارایی انتقال به‌میزان ۹۵ درصد افزایش یافت. خاک مورد استفاده برای انتقال گیاهچه‌ها محتوی پیت‌ماس: پرلیت: خاک برگ به نسبت ۲ :۱ :۱ بود. گیاهچه‌ها زیر پوشش پلاستیکی مدت ۳۰–۲۵ روز قرار داده شدند. مراحل اسپور پاشی با استفاده از آبفشان صورت گرفت و برای هر جدایه قارچی به‌صورت مجزا انجام گرفت. سوسپانسیون مایه تلقیح بر روی برگ‌ها به‌صورت یکنواخت پخش گردید. مراحل اسپور پاشی در شرایط کاملاً ایزوله بدون امکان اختلاط گونه‌های قارچی تحت بررسی انجام شد و گیاهچه‌های تلقیح شده زیر پوشش‌های پلاستیکی جداگانه قرار داده شد. گیاهان شاهد در شرایط مشابه با گیاهان مایه‌کوبی شده با جدایه‌های قارچی متفاوت قرار گرفتند.

آزمایش بیماری‌زایی: در پایان هر یک از آزمایش‌های بالا به‌منظور اطمینان از صحت آزمایش بیماری‌زایی و نبود عوامل بیماری‌زای خارجی دیگر، برگ‌های آلوده گیاهان در هر دو شرایط درون شیشه و گلخانه به‌صورت مجزا جمع‌آوری گردید. به‌این منظور برگ‌ها را ابتدا در آب مقطر ۲ بار استرل به‌مدت ۳۰ ثانیه قرار داده و سپس در محلول ۳۰ درصد وایتکس تجاری به‌مدت ٦۰–٤۵ ثانیه قرار گرفت، بعد از آن برگ‌ها را دوباره در آب مقطر ۲ بار استریل قرار داده، به تکه‌هایی تقسیم گردید و بر روی کاغذ صافی استریل برای خشک شدن قرار داده شد. تکه‌های برگ خشک شده در تشتک‌های پتری‌دیش که محتوی محیط کشت PCA بود قرار گرفت و کشت‌ها به انکوباتور و تحت شرایط نوری با ۸ ساعت روشنایی و ۱٦ ساعت تاریکی و دمای ۲۵–۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۸–٦

روز منتقل گردید. سپس صفات مورد مطالعه شامل اندازه هاگ‌ها، رنگ، آرایش‌بندها، وجود یا نبود نوک و طول آن، تزیینات سطح هاگ‌ها و ابعاد هاگ‌بر، با استفاده از کلید شناسایی سیمونز مورد آزمون قرار گرفت و گونه‌های قارچی شناسایی گردیدند.

نحوه محاسبه AUDPC و تجزیه آماری داده‌ها: با توجه به منحنی پیشرفت بیماری، سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری را که معیاری مناسب از میزان شدت بیماری می‌باشد با استفاده از فرمول $AUDPC= \sum [(۰/۵)\ (Y_{i+1} + Y_i)\ (T_{i+1} - T_i\ )]$ [1] محاسبه گردید و برای سنجش سطح مقاومت استفاده شد.

که در آن، Y= میزان بیماری‌زایی، i= نوبت یادداشت‌برداری و T= مدت زمان ارزیابی از زمان تلقیح.

ارزیابی درون‌شیشه‌ای از روز اول تا ششم به شکل روزانه و در ارزیابی گل‌خانه‌ای از روز دوم تا بیستم هر ۲ روز یک‌بار انجام شد و ۲ برگ میانی مورد سنجش گسترش بیماری قرار گرفتند. به‌ازای هر گونه قارچی، از عصاره فیلتر شده محیط مایع بدون رشد قارچ در ارزیابی درون‌شیشه‌ای و آب مقطر ۲ بار استریل در ارزیابی گل‌خانه‌ای برای هر ژنوتیپ به‌عنوان شاهد استفاده شد. محاسبه‌های آماری شامل تجزیه واریانس، مقایسه میانگین و تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار MSTAT و SPSS صورت گرفته است.

نتایج و بحث

ارزیابی درون‌شیشه‌ای با استفاده از روش پخش عصاره فیلتر شده قارچ روی گیاه: علایم بیماری در نمونه‌های ژنتیکی حساس در روز اول و در سطوح دیگر مقاومت در روزهای دوم و سوم ظاهر گردیدند. با توجه به جدول تجزیه واریانس در این روش بین گونه‌های قارچی، ژنوتیپ‌ها و اثرات متقابل بین آن‌ها در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ۲).

در ارزیابی با جدایه *A. alternata* علایم بیماری ناشی از این گونه قارچی در نمونه‌های ژنتیکی حساس از روز دوم و در سطوح دیگر مقاومت در روزهای سوم و چهارم بعد از تلقیح نمایان گشت. پس از محاسبه سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری با استفاده از آزمون دانکن، نمونه‌های ژنتیکی دسته‌بندی شدند (جدول ۳). سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بیانگر میزان حساسیت یک ژنوتیپ می‌باشد، به‌طوری‌که هرچه این سطح بیش‌تر باشد میزان حساسیت به بیماری نیز بالاتر خواهد بود. با

---

[1] 1- Area Under the Disease Progress Curve

توجه به این‌که رقم آگریا به‌عنوان شاهد حساس در نظر گرفته شد، نمونه ژنتیکی کاسموس دارای سطح زیرمنحنی پیشرفت بیماری بیش‌تر از آگریا بودند و در سطوح بسیار حساس قرار گرفت. ژنوتیپ‌های پیکاسو و مارفونا با دیتا در سطح یکسانی بودند و به‌عنوان مقاوم شناخته شدند. ژنوتیپ آرمیدا هیچ‌گونه علایم بیماری نشان نداد، بنابراین این ژنوتیپ به‌عنوان نمونه دارای مصونیت نسبت به این ایزوله قارچی در نظر گرفته شد و در مقایسه میانگین سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری با کم‌ترین میزان در گروه مجزا و مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها نسبت به‌این جدایه قرار گرفت. به‌طورکلی ارقام آرمیدا، مارفونا، دیتا، پیکاسو، آگریا و کاسموس را می‌توان به‌ترتیب میزان مقاومت به‌این بیمارگر معرفی نمود.

در ارزیابی با جدایه ***A. tenuissima*** علایم بیماری ناشی از این‌گونه قارچی در نمونه‌های ژنتیکی حساس از روز دوم و در سطوح دیگر مقاومت در روزهای سوم و چهارم بعد از تلقیح نمایان گشت. با توجه به این‌که رقم آگریا به‌عنوان شاهد حساس در نظر گرفته شد، ژنوتیپ کاسموس دارای سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری بیش‌تری از آگریا بودند و در سطوح بسیار حساس قرار گرفت. ژنوتیپ پیکاسو با دیتا به‌عنوان شاهد مقاوم در سطح یکسانی از نظر سطح زیر منحنی بود و به‌عنوان ژنوتیپ مقاوم شناخته شد (جدول ۳). ژنوتیپ آرمیدا هیچ‌گونه علایم بیماری نشان ندادند، بنابراین این ژنوتیپ به‌عنوان نمونه دارای مصونیت نسبت به‌این ایزوله قارچی در نظر گرفته شد و در مقایسه میانگین سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری با کم‌ترین میزان در گروه مجزا و مقاوم‌ترین نمونه‌های ژنتیکی نسبت به این جدایه قرار گرفت (جدول ۳). نتایج نشان داد که ژنوتیپ‌های آرمیدا، دیتا، پیکاسو، مارفونا، آگریا و کاسموس را می‌توان برحسب درجه مقاومت به بیمارگر ***A. tenuissima*** معرفی شد.

جدول ۲- تجزیه واریانس ارزیابی درون‌شیشه‌ای ایزوله‌های قارچی و ژنوتیپ‌های مختلف سیب‌زمینی با استفاده از سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
بیمارگر قارچی	۱	۳/۵۱۶**
ژنوتیپ سیب‌زمینی	۵	۲۶/۶۶**
بیمارگر × ژنوتیپ	۵	۰/۹۳۴**
اشتباه آزمایشی	۲۴	۰/۰۷۶
کل	۳۵	
ضریب تغییرات (درصد)	۳/۸۲	

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ٣- مقایسه میانگین ارزیابی درون‌شیشه‌ای ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی براساس سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری.

	بیمارگر *A. tenuissima*		بیمارگر *A. alternata*	
پیکاسو	٦/٣٣	d	٦/١٦	b
مارفونا	٧/٥٠	c	٥/٦٦	b
دیتا	٥/٧٥	d	٥/٩١	b
کاسموس	١٠/٧٥	a	٩/٥٠	a
آرمیدا	٥/٠٠	e	٥/٠٠	c
آگریا	٩/٩١	b	٩/٢٥	a

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از نظر آماری در سطح احتمال ١ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند (دانکن ١ درصد).

ارزیابی گل‌خانه‌ای با استفاده از روش پخش سوسپانسیون قارچی بر روی گیاه: بسته به ژنوتیپ علایم بیماری دو ایزوله (*A. alternata* و *A. tenuissima*) از روز سوم تا هشتم آشکار شد. با توجه به جدول تجزیه واریانس در این روش بین بیمارگرهای قارچی، ژنوتیپ‌های گیاهی و اثرات متقابل بین آن‌ها در سطح ١ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (جدول ٤).

در ارزیابی گلخانه‌ای در برابر گونه *Alternaria alternata* علایم بیماری در ارزیابی گل‌خانه‌ای در برابر این گونه در نمونه‌های ژنتیکی حساس از روز ششم تا هشتم و در سطوح دیگر مقاومت از روز دهم بعد از تلقیح نمایان گشت. نتایج نشان می‌دهد که کاسموس در سطوح حساسیت یکسانی با آگریا و در گروه حساس قرار گرفت (جدول ٥). ژنوتیپ پیکاسو در سطح پایین‌تری در مقایسه با نمونه دیتا بوده و به‌عنوان نمونه ژنتیکی مقاوم شناخته شد. نمونه ژنتیکی آرمیدا هیچ‌گونه علایمی از بیماری را نشان نداد و به‌عنوان نمونه عاری از بیماری در نظر گرفته شد. ژنوتیپ‌ها را براساس میزان مقاومت به *Alternaria alternata* به‌صورت آرمیدا، مارفونا، دیتا، پیکاسو، کاسموس و آگریا مرتب نمود.

در ارزیابی گل‌خانه‌ای در برابر گونه *Alternaria tenuissima* علایم بیماری در این گونه قارچی در ژنوتیپ‌های حساس از روز ششم تا هشتم و در سطوح دیگر مقاومت از روز دهم بعد از تلقیح نمایان گشت. براساس سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری، نمونه کاسموس در سطوح حساسیت بالاتری از آگریا در گروه حساس قرار گرفت (جدول ٥). نمونه ژنتیکی پیکاسو در سطح یکسانی با

نمونه دیتا بوده و به‌عنوان نمونه ژنتیکی مقاوم شناخته شده است. نمونه ژنتیکی آرمیدا هیچ‌گونه علایمی از بیماری را نشان نداد و به‌عنوان نمونه عاری از بیماری در نظر گرفته شد. ترتیب مقاومت ژنوتیپ‌ها به بیمارگر *Alternaria tenuissima* به‌صورت آرمیدا، پیکاسو، دیتا، مارفونا، آگریا و کاسموس بود.

جدول ٤- تجزیه واریانس ارزیابی گل‌خانه‌ای ایزوله‌های قارچی و ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی مختلف با استفاده از سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
بیمارگر قارچی	۱	۱٦/۱٦۲**
ژنوتیپ سیب‌زمینی	۵	۱٦۵۰/٦۱**
بیمارگر × ژنوتیپ	۵	٦۰/٦۵٦**
اشتباه آزمایشی	۲٤	۰/٦۸۸
کل	۳۵	
ضریب تغییرات (درصد)		۳/۸۲

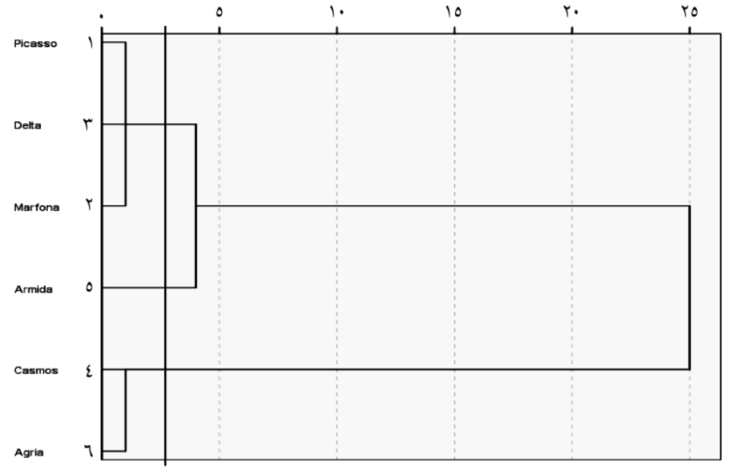
**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۵- مقایسه میانگین ارزیابی گل‌خانه‌ای ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی براساس سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری.

ژنوتیپ	بیمارگر *A. tenuissima*		بیمارگر *A. alternata*	
پیکاسو	۲۹/۸۳	d	۳۲/۸۳	b
مارفونا	۳۲/۸۳	c	۲۵/۸۳	d
دیتا	۳۰/۱٦	d	۲۹	c
کاسموس	۵۱/۵۰	a	۵٤/۵۰	a
آرمیدا	۱۸/۰۰	e	۱۸/۰۰	e
آگریا	٤٦/٦٦	b	۵۵/۵۰	a

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون از نظر آماری در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند (دانکن ۱ درصد).

تجزیه خوشه‌ای: تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های مورد آزمایش براساس داده‌های به‌دست آمده از ارزیابی درون‌شیشه‌ای و گل‌خانه‌ای با هر دو ایزوله قارچی در ۳ گروه دسته‌بندی نمود (نمودار ۱). ژنوتیپ‌های دیتا، پیکاسو و مارفونا در گروه مقاوم، ژنوتیپ آرمیدا در گروه بسیار مقاوم یا مصون از بیماری و ژنوتیپ‌های آگریا و کاسموس در گروه حساس قرار گرفتند. قرار گرفتن ژنوتیپ آرمیدا به‌صورت یک خوشه جداگانه در کنار خوشه ژنوتیپ‌های مقاوم علاوه‌بر بیان مصونیت این ژنوتیپ نشان می‌دهد که مقاومت این نمونه نسبت به هر دو قارچ متفاوت از سایر ژنوتیپ‌ها مقاوم است. بنابراین مبرهن است آرمیدا را رقم مصون، دیتا، پیکاسو و مارفونا را مقاوم و آگریا و کاسموس را حساس به هر دو قارچ نامید. نتایج به‌دست آمده با نتایج به‌دست آمده در هر ایزوله قارچی به‌صورت جداگانه صادق می‌باشد.



شکل ۲- تجزیه خوشه‌ای ژنوتیپ‌های سیب‌زمینی براساس ارزیابی درون‌شیشه‌ای و گل‌خانه‌ای تحت تیمار دو ایزوله قارچی بیماری لکه موجی (*Alternaria tenuissima* و *Alternaria allternata*).

این آزمایش‌ها بر مبنای محاسبه سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری انجام گرفت، بررسی‌های دیتا رودریگوز و همکاران (۲۰۰٦) نیز استفاده از سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری را در سنجش مقاومت ٤ رقم سیب‌زمینی نسبت به‌این بیماری مفید اعلام نموده است. از آن‌جایی‌که طبق نظر بسیاری از پژوهش‌گران مقاومت به بیماری لکه موجی بیش‌تر به‌صورت کمی است محاسبه سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری در دست‌یابی به منابع مقاومت کمی بسیار سودمند است و توسط بسیاری از متخصصان توصیه شده است (پالویکس و همکاران، ۱۹۹۰). دیتا رودریگوز و همکاران (۲۰۰٦) در ارزیابی

درون‌شیشه‌ای برای مقاومت به بیماری لکه موجی با عامل قارچی *A. solani* ظهور علایم را در روزهای دوم و سوم مشاهده کردند. در طی این آزمایش علایم بیماری لکه موجی در ارزیابی درون‌شیشه‌ای با روش پخش عصاره قارچ بر روی گیاه در برابر دو گونه *A. tenuissima* و *A. alternata* در نمونه‌های ژنتیکی حساس در روز دوم بعد از تلقیح و در نمونه‌های ژنتیکی با سطوح دیگر مقاومت در روزهای سوم و چهارم بعد از تلقیح مشاهده شد. مشاهده علایم در ارقام حساس و مقاوم مقداری متفاوت است. در ارقام حساس از روز دوم و در ارقام مقاوم از روز چهارم شروع می‌گردد. در آزمایش‌های درون‌شیشه‌ای و گل‌خانه‌ای با توجه به مقایسه میانگین داده‌های سطح زیر منحنی پیشرفت نتایج یکسانی به‌دست آمد و این نتایج بیانگر قابل اطمینان بودن روش‌های درون‌شیشه‌ای می‌باشد، که می‌تواند موجب کاهش قابل‌توجهی در وقت و هزینه ایجاد نماید. در این ارزیابی در مقابل گونه‌های *A. alternata* و *A. tenuissima* نمونه ژنتیکی دیتا در شاخه مقاوم قرار گرفت که با گزارش‌های منتشر شده مبتنی‌بر این مورد که این نمونه ژنتیکی به‌عنوان نمونه شامل منبع مقاومت به بیماری لکه موجی سیب‌زمینی در ارزیابی نمونه‌های ژنتیکی سیب‌زمینی در برزیل مشخص گردیدند مطابقات دارد (بویتکس و همکاران، ۱۹۹۵). ژنوتیپ آگریا در منابع نسبت به جدایه *A. alternata* حساس گزارش شده است (نصر اصفهانی، ۲۰۰٤). نتایج به‌دست آمده در این آزمایش‌ها بیانگر حساسیت این ژنوتیپ است. تاکنون هیچ‌گونه نمونه ژنتیکی مصون به بیماری لکه موجی در برابر گونه‌های قارچی مورد بررسی مشاهده نشده بود. در برابر گونه‌های *A. tenuissima* و *A. alternata* نمونه ژنتیکی آرمیدا هیچ‌گونه علایمی از بیماری لکه موجی نشان نداد، که بعد از آزمایش‌های مزرعه‌ای می‌توان به‌عنوان نمونه ژنتیکی مصون از بیماری بروی آن‌ها مطالعات بیش‌تری انجام داد. با توجه به این مطلب که نبود یا کمبود منابع مقاومت به آلترناریا در بین لاین‌های سیب‌زمینی و هم‌چنین سیب‌زمینی‌های تجاری اعلام شده بود (روتم و فلدمن، ۱۹٦۵)، پیدا کردن ژنوتیپ‌های مقاوم یا مصون از بیماری در کنترل این بیماری بسیار مؤثر می‌باشد. هر چند که سطوح متفاوت مقاومت در سیب‌زمینی‌های دیپلویید وحشی مشاهده شده است (مندوزا، ۱۹۸۹؛ تامسون و مندوزا، ۱۹۸٤). بنابراین وجود ژنوتیپ‌های احتمالی مصون با سطح بالای مقاومت به این بیماری می‌تواند در مقاومت به بیماری لکه موجی بسیار تأثیرگذار بوده و تولید ارقام زراعی مقاوم مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

1.Anderson, B., Kroger, E. and Roberts, R.G. 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. Mycological Res. 105: 291-299.

2.Andersen, B., Kroger, E. and Roberts, R.G. 2002. Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescense*, *A. infectoria* and *A. tenuissima* species groups. Mycological Res. 106: 170-182.

3.Boiteux, L.S., Reifschneider, F.J.B., Fonseca, M.E. and Buso, J.A. 1995. Search for sources of early blight *(Alternaria solani)* field-resistance not associated with vegetative late maturity in tetraploid potatogermplasm. Euphytica. 83: 63-70.

4.Christ, B.J. and Haynes, K.G.V. 2001. Inheritance to early blight disease in a diploid potato population. Plant Breed. 120: 169-172.

5.Dita Rodriguez, M.A., Brommonschenkel, S.H., Matsuoka, K. and Mizubuti, E.S.G. 2006. Components of resistance to early blight in four potato cultivars: effect of leaf position. J. Phytopathol. 154: 230-235.

6.Frank, J.A., Webb, R.E. and Douglas, D.R. 1979. Evaluation of several USDA potato clones for resistance to early blight. Plant Dissease. Rep. 63: 392-394.

7.Ghosta, Y. 2004. The studying Alternaria isolate in Iran. Tabiat Modares University. Press.

8.Herriott, A.B., Haynes, F.L. and Shoemaker, P.B. 1990. Inheritance of resistance to early blight disease in tetraploid × diploid crosses of potatoes. *Hort Sci*. 25: 224-226.

9.Locke, S.B. 1948. A method for measuring resistance to defoliation diseases in tomato and other *Lycopersicon* species. Phytopathoogyl. 38: 937-942.

10.Mendoza, H.A. 1989. Population breeding as a tool for germplasm enhancement. Amer. Potato J. 66: 639-653.

11.Nasr esfehani, M. 2004. evaluation of early blight of potato dissese in Friden. Annual report Isfehan plant pathology. Pp: 256-276. (In Persian)

12.Neergaard, P. 1945. Danish species of Alternaria and Stemphylium. Taxonomy, parasitism, economic significance. Einar Munksgaard, Copenhagen.

13.Palloix, A., Pochad, E., Phaly, T. and Daubeze, A.M. 1990. Reccurent selection for resistance to *verticillium ahlia* in pepper. Euphyticcca. 47: 79-89.

14.Pryor, B.M. and Michailides, T.J. 2002. Morphological, Pathogenic,and Molecular Characterization of Alternaria Isolates Associated *with Alternaria Late Blight* of pistachio. Phytopathol. Pp: 406-416.

15.Pscheidt, J.W. 1985. Epidemiology and control of potato early blight, caused by Alternaria solani. in: Van der Waals *et al.*: Review of early blight of potato 101. University of Wisconsin-Madison.

16.Roberts, R.G. 2001. *Alternaria alternata* ubiquitous or commonly misidentified. Phytopathol. 92: 76.

17.Simmons, E.G. 2000. *Alternaria* themes and variations 244-286. Species on Solanaceae Mycotaxon, 75: 1-115.

18.Stewardt, H. and Bradshaw, J.E. 1993. A. glasshouse test for assessing resistance to early blight (*Alternaria solani*). Potato Res. 36: 35-42.

19.Taheri Ardestani, S., Sharifnabi, B., Zare, R. and Abbasi Moghaddam, A. 2007. *Alternaria* species associated with potato early blight in Iran. *Asian Mycology Congress* and International Marine and Fresh Water *Mycology Symposium*. 2-6 dec. Pp: 266-16.

20.Taheri Ardestani, S., Sharifnabi, B., Zare, R. and Abbasi Moghaddam, A. 2008. Introduce two new isolate of *Alternaria* species in Iran. 18th *Congress* of Plant pathology, Hamedan. Iran. 674p. (In Persian)

21.Thompson, P.G. and Mendoza, H.A. 1984. Genetic variance estimates in a heterogenous potato population propagated from true seed. Amer. Potato J. 61: 697-702.

Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources
J. of Plant Production, Vol. 20 (4), 2014
http://jopp.gau.ac.ir

Evaluation of resistance of potato genotypes to early blight disease caused by the pathogenic fungus *Alternaria tenuissima* and *Alternaria allternata*under in vitro and greenhouse conditions

***H.R. Mirkarimi[1], A. Abbasi Moghadam[2] and J. Mozafari[3]**
[1]Ph.D. Student, Dept. of Plant Breeding, Islamic Azad University, Tehran Science and Research Branch, [2]Assistant Prof., Dept. of Plant Pathology, National Plant Gene Bank, Institute of Plant Seed Branch, [3]Associate Prof., Dept. of Plant Pathology, National Plant Gene Bank, Institute of Plant Seed Branch
Received: 05/08/2013 ; Accepted: 06/18/2013

Abstract

In order to determine the resistance levels and the most suitable potato genotypes to the early blight, an experiment was conducted in a completely randomized factorial design with three replications, in National Plant Gene Bank of Iran during 2007-2008. Factors included pathogenic fungus, *A. tenuissima* and *A. alternata* and six potato genotypes, Picasso, Marfona, Delta, Agria, Cosmos and Armida. Analysis of variance, in vitro and greenhouse evaluation showed that there were significant between pathogen, genotype and their interactions. In vitro evaluation, symptoms appeared after the second day and continued until the sixth day. Based on area under the disease progress curve for pathogenic *A. alternata*, Cosmos genotype had a lower level of Agria (susceptible control), while Picasso and Marfona with Delta (resistant control) were resistant patients.With the pathogenic *A. tenuissima*, Cosmos was sensitive, and only Picasso was resistant patient.The method greenhouse, symptoms began on the third day and it lasted until the twentieth day. In this evaluation, using both fungal isolates, Cosmos was sensitive level and Picasso was resistant level. In vitro and greenhouse assessment, Armida not show any signs of disease, it may be referred to as a genotype-immune disease, after field testing. Since, the results of the assessment of resistance was generally similar in both in vitro and greenhouse conditions, it can be argued that this study is validated by classifying genotypes to resistant and susceptible.

Keywords: Area under disease progress curves, Wave spots, Pathogenesis, Resistance

---

* Corresponding author; Email: rezamirkarimi21@gmail.com