Archive of SID

بررسی گروه‌های سازگاری رویشی و بیماری‌زایی جدایه‌های *Colletotrichum coccodes* عامل خال سیاه سیب‌زمینی در ایران*

INVESTIGATION ON VEGETATIVE COMPATIBILITY GROUPS AND PATHOGENESITY OF *Colletotrichum coccodes*, THE CAUSAL AGENT OF POTATO BLACK DOT IN IRAN

مظاهر بینائیان [۱**]، کسری شریفی [۲] و حمیدرضا زمانی‌زاده [۱]

(تاریخ دریافت: ۸۹/۸/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۷)

چکیده

بیماری خال سیاه سیب‌زمینی توسط *Colletotrichum coccodes* ایجاد می‌شود و در اکثر مناطق کشت سیب‌زمینی ایران پراکنده است. عامل بیماری یکی از عوامل مهم کاهش عملکرد در مزرعه است و باعث پوسیدگی غده‌ها و افت وزن محصول در انبار می‌شود. وضعیت تنوع ژنتیکی و توان بیماری‌زایی این قارچ در ایران مشخص نبود. برای این منظور از مناطق عمده سیب‌زمینی کاری استان‌های اردبیل، اصفهان و همدان اقدام به نمونه‌برداری از گیاهان با علایم بیماری شد. از ۱۰۸ جدایه به دست آمده ۴۸ جدایه با توجه به مناطق نمونه برداری انتخاب شدند. بر پایه واکنش‌های سازگاری رویشی در مجموع چهار گروه چند عضوی IRN-VCG1، IRN-VCG2، IRN-VCG3 و IRN-VCG4 به ترتیب با فراوانی ۴۲/۸۶، ۱۴/۲۹، ۴/۱۶ و ۴/۱۶ درصد و شش گروه تک عضوی تعیین شدند. جدایه‌های اردبیل در گروه‌های IRN-VCG1 و IRN-VCG2 با فراوانی ۵۰ و ۱۲/۵ درصد قرار گرفتند و بقیه جدایه‌ها گروه‌های تک عضوی را تشکیل دادند. سه گروه IRN-VCG1، IRN-VCG2 و IRN-VCG3 به ترتیب با فراوانی ۵۵، ۱۳ و ۱۳ درصد جدایه‌های همدان را در بر گرفتند و باقی جدایه‌ها در گروه‌های تک عضوی جای داده شدند. جدایه‌های استان اصفهان به سه گروه IRN-VCG1، IRN-VCG2 و IRN-VCG4با فراوانی ۲۵، ۱۹ و۱۲ درصد تعلق داشتند و بقیه جزو گروه‌های تک عضوی بودند. با استفاده از دو روش تلقیح اینوکلوم قارچ به غده‌های سیب‌زمینی و آلوده‌سازی ریشه، بیماری‌زایی جدایه‌ها بررسی شد. به جز پنج جدایه بقیه جدایه‌ها قادر به پوسانیدن غده‌های سیب‌زمینی بودند و همه جدایه‌ها توانستند در ریشه و ساقه زیرزمینی ایجاد بیماری کنند. مقایسه داده‌های مربوط به شدت بیماری‌زایی نشان داد شدت پوساندگی غده‌ها و گسترش میکرواسکلروت‌های جدایه‌ها در اندام‌های زیرزمینی مستقل از هم هستند. هم‌چنین بین گروه‌های سازگاری رویشی و قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها هم‌بستگی وجود نداشت ولی بین این گروه‌ها و مناطق جغرافیایی جدایه‌ها هم‌بستگی اندکی دیده شد. پژوهش حاضر نشانگر تنوع قابل توجه گروه‌های سازگاری رویشی در این گونه است.

واژه‌های کلیدی: تنوع ژنتیکی، مرگ زودرس سیب‌زمینی، جهش یافته **nit** ، شدت بیماری، ***Colletotrichum coccodes***

---

*: بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mazaherbn@gmail.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

۲. مربی پژوهشی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری خال سیاه سیب‌زمینی توسط *Colletotrichum coccodes* (Wallr) Hughes (syn. *C. atramentarium* (Berk. & Taub) ایجاد و به وسیله سختینه‌ها یا میکرواسکلروت‌های (Microsclerotia) سیاه کوچک زائده‌دار روی ریشه‌ها، ساقه‌ها، استولن‌ها (Stolens) و غده‌های دختری در گیاهان آلوده در آخر فصل قابل تشخیص است (Nitzan *et al.* 2002, Lees & Hilton 2003). *C. coccodes* روی اندام‌های زیرزمینی گیاهان و بقایای گیاهی به شکل میکرواسکلروت یا هیف وجود دارد و زمستان را به صورت میکرواسکلروت سپری می‌کند. در بهار همزمان با کشت سیب‌زمینی قارچ به صورت آسروول گسترش می‌یابد. آسروول‌ها در اندام‌های زیرزمینی در داخل یا سطح بافت اپیدرم مستقر می‌شوند (Bailey & Jeger 1992).

این بیماری در اکثر مناطق کشت سیب‌زمینی در جهان شناسایی و۲۰ تا ۳۰ درصد عملکرد را کاهش می‌دهد (Tsror (Lahkim) *et al.* 1999, Lees & Hilton 2003). خال سیاه سیب‌زمینی اولین بار توسط شریف (تحت نام مترادف عامل آن *C. atramentarium*) در سال ۱۳۳۴ از باسمنج تبریز گزارش شد. سپس از مناطق مختلف ایران از جمله فارس، آذربایجان شرقی، اردبیل، سمنان، همدان و اصفهان که از مناطق اصلی کشت این گیاه هستند گزارش و بر اهمیت آن تأکید شده است (Behdad 1996, Omati & Karimi 2002, Binaiyan *et al.* 2008, Fazli *et al.* 2008). تحقیقات اخیر نشان می‌دهد این بیماری در سطح وسیعی از مناطق کشت سیب‌زمینی پراکنده است، به‌طوری‌که ۱۰۰-۶۰% مزارع استان اردبیل، ۸۵-۷۵% مزارع استان اصفهان و ۶۵-۵۰% مزارع استان همدان آلوده به عامل بیماری هستند (Binaiyan *et al.* 2008).

شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی (VCG) یک روش مناسب برای تعیین ساختار ژنتیکی جمعیت‌های قارچ‌های ناقص بیماری‌زای گیاهی بوده و جدایه‌های متعلق به یک گروه سازگاری رویشی تمایل به اشتراک‌گذاری و تبادل مواد ژنتیکی دارند. معمولاً ایجاد گروه‌های سازگاری رویشی به وسیله تشکیل جهش یافته‌های نیت (nit) حاصل از کلر است که در مصرف انواع نیترات نقص دارند. (Glass & Kulda 1992).

اکثر قارچ‌ها می‌توانند از نیترات به عنوان منبع نیتروژن استفاده کنند که این کار از طریق احیای نیترات به آمونیوم به وسیله آنزیم‌های نیترات ریداکتاز (Nitrate reductase) و نیتریت ریداکتاز (Nitrite reductase) صورت می‌گیرد. احیای کلرات به عنوان آنالوگ نیترات، به کلریت به وسیله نیترات ریداکتاز باعث سمیت محیط می‌شود. جدایه‌های حساس به کلرات می‌توانند نیترات را به نیتریت احیا کنند ولی جدایه‌های مقاوم به کلرات توانایی این تبدیل را ندارند. سکتورهای سریع‌الرشد در واقع هیف‌هایی جهش یافته با رشد ظریف و نازک یا اگزوتروف (Exotroph) هستند که به دلیل تغییرات ژنی که در آنها صورت گرفته توانایی سنتز آنزیم نیترات ریداکتاز را نداشته و یا این که نمی‌توانند این آنزیم را القا کنند (Corell *et al.* 1987).

اساس روش تعیین VCG ایجاد هتروکاریونی پایدار و ظهور رشد تیپ وحشی یا پروتوتروف (Prototroph) در محل برخورد پرگنه‌های دو جهش یافته nit هاپلوئید که دارای رشد اگزوتروف هستند روی محیط‌های غذایی معین می‌باشد. این روش برای اول بار توسط کوو (Cove 1976) برای قارچ *Aspergillus nidulans* به کار گرفته شد. او دریافت که گروه‌های سازگار رویشی در

www.SID.ir

Archive of SID

جمعیت قارچ با فرم‌های اختصاصی این گونه هماهنگی دارند و پیشنهاد نمود که ممکن است هر گروه سازگاری رویشی از نظر ژنتیکی با بقیه گروه‌ها متفاوت باشد و جمعیت معین را تشکیل دهد (Puhall 1985, Leslie 1993). جدایه‌هایی که با دیگر جدایه‌ها، سازگاری رویشی دارند در یک گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند. درک بیشتر تنوع بین گروه‌های مختلف ممکن است به تکمیل اطلاعات در خصوص اپیدمی بیماری و کنترل آن کمک نماید (Glass & Koldau 1992) .

از آنجایی که برای *C. coccodes* مرحله جنسی مشخصی شناسایی نشده است، احتمالاً تبادل ژنتیکی بین جدایه‌های آن از طریق آناستوموزهای هیفی بین هیف‌های افرادی که دارای سازگاری رویشی هستند، صورت می‌گیرد (Nitzan *et al.* 2006). *بروکر و همکاران* (Brooker *et al.* 1991) اولین بار با تعداد هفت جدایه از پنج گونه مختلف *Colletotrichum* ، قابلیت تولید جهش یافتگان مقاوم به کلرات حاصل از محیط کشت‌های PDC (Potato dextrose chlorate) و MMC (Minimal medium chlorate) را جهت تعیین گروه‌های سازگاری رویشی آزمایش نمودند. هیچ یک از جهش یافتگان با جهش یافتگان جدایه‌های دیگر خودسازگاری نداشتند لذا هفت گروه مجزا معرفی نمودند. *نیتزان و همکاران* (Nitzan *et al.* 2002) با استفاده از جهش‌زایی نیت با ۱۱۰ جدایه *C. coccodes* از اسرائیل، هلند و فرانسه چهار گروه سازگار رویشی با درصدهای ۷/۳، ۳۵/۵، ۲۰ و ۱۰ به ترتیب در EU/I-VCG1 تا EU/I-VCG4 معرفی نمودند. ۳۰ جدایه (۲۷/۳%) در هیچ گروهی جای نگرفتند و فقط با خودشان سازگار بودند. قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی ارقام حساس سیب‌زمینی (Desiree و Monidal) آزمایش شد که جدایه‌های گروه EU/I-VCG3 بیشترین بیماری‌زایی را داشتند. *نیتزان و همکاران* (Nitzan *et al.* 2006) سازگاری رویشی ۱۲۳ جدایه *C. coccodes* از آمریکای شمالی (ایالات متحده و کانادا) جدا شده از سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، فلفل و نعناع را در هفت گروه سازگاری رویشی (NA-VCGs) تقسیم‌بندی نمودند که به ترتیب ۱/۶ ، ۱/۶ ، ۴ ، ۸/۱ ، ۱۳/۸ ، ۱۹/۵ ، ۳۶/۶ درصد را شامل شدند. ۱۴/۶درصد از جدایه‌ها در هیچ یک از هفت گروه جای نگرفتند.

پژوهش حاضر با توجه به اهمیت این بیماری در ایران با هدف بررسی وضعیت بیماری و تعیین گروه‌های سازگاری رویشی این قارچ در سه استان مهم تولید سیب‌زمینی کشور، اردبیل، اصفهان و همدان، انجام شد.

روش بررسی

۱- نمونه برداری

در تابستان و پاییز سال ۱۳۸۶ از سه استان عمده سیب‌زمینی کاری شامل اردبیل، اصفهان و همدان با توجه به علائم ظاهری از گیاهان آلوده نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌گیری به طور تصادفی بر اساس نقشه‌های پراکنش کشت سیب‌زمینی و آمارنامه کشاورزی سال ۱۳۸۵ با انتخاب سه منطقه مهم کاشت سیب‌زمینی از هر استان و از هر منطقه تعداد ۵ مزرعه و از هر مزرعه ۱۰ گیاه انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در کیسه‌های نایلونی در مکانی سرد قرار داده شد تا در مدت کوتاهی به آزمایشگاه انتقال داده شوند.

۲–جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری جدایه

ریشه و طوقه گیاهان در آزمایشگاه با آب شسته شدند. سپس قطعات ۵ سانتی‌متری از قسمت طوقه و ساقه

www.SID.ir

Archive of SID

زیرزمینی بریده و با محلول هیپوکلریدسدیم یک درصد (۲۰ سی سی هیپوکلریت سدیم تجاری با ۵/۲۵ درصد ماده فعال در ۱۰۰ سی سی آب مقطر رقیق شد) به مدت ۳ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر شسته شدند. قطعات را روی کاغذهای صافی در زیر هود میکروبیولوژی قرار داده تا خشک شوند. از زیر پوست ساقه‌ها اسکلروت‌های قارچ برداشته شد و روی محیط غذایی PDA (طبق توصیه شرکت سازنده (Merk آلمان)، ۳۹ گرم در یک لیتر آب مقطر) حاوی استرپتومایسین (به غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در یک لیتر) قرار داده شدند. ظروف پتری در انکوباتور و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز در شرایط تاریکی نگهداری شدند. مشخصات جدایه‌های قارچ *C. coccodes* با کلید شناسایی *بیلی و* ججر (Bailey & Jeger 1992) مطابقت داده شدند. سپس جدایه‌ها را در محیط کشت آب آگار (با توجه به توصیه شرکت سازنده (Merk آلمان)، ۱۸ گرم در ۱ لیتر آب مقطر) تک اسپورکرده و هیف‌های به دست آمده از هر جدایه به محیط کشت زاپک انتقال داده شدند. از پرگنه جدایه‌های تک اسپور شده یک قطعه کوچک به محیط خاک و زاپک جهت نگهداری در طولانی مدت انتقال داده شدند.

محیط کشت زاپک یا CDA (Czapeck Dox Agar)

محیط کشت CDA طبق توصیه شرکت سازنده (شرکت Difco ایتالیا به میزان ۴۹ گرم در یک لیتر آب مقطر) تهیه گردید و سپس در فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس توسط دستگاه اتوکلاو سترون شد.

محیط کشت خاک

مخلوط خاک و پرلیت (۴:۱) در لوله‌های ۱۵ میلی لیتری ریخته و حدود ۲ میلی لیتر محلول زاپک (Czapeck-Dox Broth Difco) به غلظت ۳۵ گرم در لیتر اضافه شد. لوله های حاوی محیط کشت در اتوکلاو با دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه، دو بار سترون شدند.

۳- آزمون‌های تعیین گروه‌های سازگاری رویشی

۳-۱- محیط کشت‌های مورد استفاده

محیط کشت پایه (BM)

این محیط کشت برای ساخت سایر محیط کشت‌های مورد نیاز در آزمایش‌های گروه‌های سازگاری رویشی و نگهداری جهش یافتگان nit استفاده گردید (Correll *et al.* 1987). به منظور تهیه محیط کشت ۳۰ گرم ساکارز، ۱ گرم KH_2PO_4 ، ۰/۵ گرم $MgSO_4.\ 7H_2O$ ، ۰/۵ گرم KCL ، ۱۰ میلی‌گرم $FeSO_4.\ 7H_2O$ ، ۲۰ گرم آگار و محلول عناصر کم مصرف (۰/۲ میلی‌لیتر) با هم مخلوط و حجم محلول به ۱ لیتر رسانیده شد. برای تهیه ۱۰۰ سی‌سی محلول عناصر کم مصرف، اسید سیتریک (۵ گرم)، $ZnSO_4.\ 7H_2O$ (۵ گرم)، $Fe(NH4)_2\ (SO4)_2.\ 6H_2O$ (۱ گرم)، $uSO_4.\ 5H_2O$ (۰/۲۵ گرم)، $MnSO_4.\ H_2O$ (۵۰ میلی‌گرم)، H_3BO_4 (۵۰ میلی‌گرم)، $NaMoO_4.\ 2H_2O$ (۵۰ میلی‌گرم) در ۹۵ میلی لیتر آب مقطر حل شدند. محلول‌های تهیه شده در فشار ۱ اتمسفر و دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند (Correll *et al.* 1987).

محیط کشت حداقل (MM)

این محیط کشت با افزودن ۲ گرم نیترات سدیم (NaNo3) به یک لیتر محیط کشت پایه (BM)، پس از سترون کردن سوسپانسیون تهیه گردید (Correll *et al.* 1987).

www.SID.ir

Archive of SID

محیط کشت MMC

به محیط کشت MM درصدهای مختلفی از کلرات پتاسیم ابتدا به مقدار ۱۵ گرم در لیتر (۱/۵%) اضافه نموده که در صورت عدم ایجاد هیف سریع الرشد از درصدهای ۵% و ۷% کلرات پتاسیم استفاده شد. این محیط نیز در شرایط ذکر شده بالا سترون شد (Brooker *et al.* 1991).

محیط کشت MMC1

برای ایجاد محیط کشت MMC1 از ترکیبات ال- آسپاراژین (۱/۶ گرم)، نیترات سدیم (۲ گرم)، کلرات پتاسیم (۳۰ - ۵۶ گرم) و یک لیتر محیط کشت پایه (BM) استفاده شد که پس از اختلاط سترون شد. جدایه‌هایی که ایجاد جهش یافته nit با محیط KClO3 محتوی کلرات پتاسیم ۳%، ۵% و ۷% نکردند، به این محیط کشت برده شدند (Howthorne & Ress-George 1996).

محیط کشت MMC2

این محیط با اضافه کردن ال- ترئونین (۲/۳ گرم)، نیترات سدیم (۲ گرم)، کلرات پتاسیم (۵۶-۳۰ گرم) به یک لیتر محیط کشت پایه (BM) جهت ایجاد موتانت در جدایه‌هایی که با محیط کشت‌های فوق جهش ندادند، استفاده گردید، با این تفاوت که احتمال وقوع موتانت از نوع NitM در این محیط کشت بیشتر است. این محیط کشت نیز طبق روش بالا سترون شد (Howthorne & Ress-George 1996).

محیط کشت WAC

این محیط کشت از ترکیب ۲ درصد آگار،۳ درصد کلرات پتاسیم و ۰/۰۲ درصد گلوکز جهت ایجاد جهش در جدایه‌ها تهیه و سترون شد (Nitzan *et al.* 2002).

۳-۲- ایجاد جهش یافتگان نیت از جدایه‌ها

جهش در جدایه‌های *C. coccodes* به روش *نیتزان و همکاران* (۲۰۰۲) و *پوهالا* (Puhalla 1985) مطابقت داده شده با روش *بروکر و همکاران* (۱۹۹۱) ایجاد شد. برای ایجاد جهش بلوک‌های هیف (حدود ۲ میلی‌متر مکعبی) از جدایه‌های رشد یافته روی محیط حداقل (MM)، در مرکز ظروف پتری حاوی محیط کشت‌های کلرات پتاسیم (MMC، MMC1، MMC2، WAC) قرار داده شدند. ابتدا از درصدهای کلرات ۳، ۵ و ۷ درصد در محیط WAC و MMC استفاده شد و چنانچه جهش یافته nit حاصل نشد، جدایه‌ها مجدداً به محیط‌های MMC1 و MMC2 انتقال داده شدند. رشد پرگنه‌ها روزانه بازدید شد و به محض دیدن جهش یافته سریع‌الرشد، از نوک هیف آن قطاع کوچکی برداشته و به تشتک حاوی محیط حداقل برده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شد. اگر رشد قارچ در این محیط تا ۵ روز به صورت هیف‌های نازک بود به عنوان جهش یافته نیت انتخاب گردید. جهش یافتگان بازیابی شده به لوله‌های ۱۵ میلی‌لیتری حاوی محیط کشت پایه جهت نگهداری انتقال داده شد (Brooker *et al.* 1991).

۳-۳- تعیین کلاس‌های فنوتیپی جهش یافتگان نیت

برای تشخیص نوع جهش یافته قطعه ۲ میلی‌متر مکعبی از آنها روی محیط کشت‌های پایه حاوی یکی از منابع ازت شامل نیترات (۲ گرم در لیتر)، نیتریت (۰/۵ گرم در لیتر) و هیپوزانتین (۰/۲ گرم در لیتر) کشت داده شدند. ظروف پتری در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت پنج روز نگهداری شدند. سپس جهش یافته‌ها با توجه به شکل رشد پرگنه (بسته به شکل رشد وحشی یا ظریف طبق جدول ۱) طبقه‌بندی شدند (Correll *et al.* 1987).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. تعیین نوع جهش یافتگان بر اساس نحوه رشد آنها روی محیط‌های غذایی با منابع نیتروژن متفاوت

Table 10. Identification of nit mutants by growing on different nitrogen sources

فنوتیپ موتانت Mutant designation	رشد روی منبع نیتروژن (Grows on nitrogen sources)		
	نیترات (MM)	نیتریت (NM)	هیپوزانتین (HM)
تیپ وحشی	+	+	+
nit1	-	+	+
nit3	-	-	+
NitM	-	+	-

(+)= رشد تیپ وحشی ، (-)= رشد تیپ گسترده و بدون میسلیوم هوایی

(+): Typical wild-type growth, (-): Thin growth with no aerial mycelium

۳-۴- آزمون مکمل سازی فیزیولوژیکی جهت تعیین گروه‌های سازگاری رویشی

به منظور تعیین گروه‌های سازگاری رویشی ابتدا خود سازگاری رویشی جدایه‌ها انجام شد، برای این منظور یک بلوک ۲ میلی‌متر مکعبی از جهش‌یافته NitM هر جدایه در مرکز ظروف پتری حاوی محیط کشت حداقل (MM) گذاشته شد و در اطراف آن قطعاتی از nit1 و nit3 همان جدایه به فاصله ۲-۱ سانتی‌متر از NitM قرار داده شد. ظروف پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷ تا ۱۴ روز قرار داده شدند. رشد ضخیم و وحشی در محل برخورد دو کلونی موتانت دال بر تشکیل هتروکاریون و خودسازگاری است و این نوع فنوتیپ‌ها برای ادامه مطالعه تعیین گروه‌های سازگاری رویشی در لوله‌های حاوی محیط کشت حداقل نگهداری شدند. در صورت عدم تشکیل هیف‌های ضخیم و وحشی در محل تلاقی نشان دهنده خودناسازگاری بوده و چنین جهش یافتگان برای جلوگیری از اختلال در روند آزمون حذف شدند.

جهت بررسی سازگاری رویشی بین جدایه‌های مختلف، تقابل‌های مختلفی بین فنوتیپ‌های جهش‌یافتگان NitM از یک جدایه با جهش‌یافتگان nit1 و nit3 (از جدایه دیگر) و گاهی بین nit1 و nit3 به روش بالا انجام شد که در صورت تشکیل هتروکاریون پایدار و رشد وحشی در محل برخود دو پرگنه در یک گروه سازگاری رویشی قرار داده شدند.

۴- آزمون‌های بیماری‌زایی

برای بررسی بیماری‌زایی و شدت آن از دو روش بیماری‌زایی به شرح زیر استفاده شد.

۴-۱- آزمون میزان پوساندگی غده

ابتدا بیماری‌زایی جدایه‌ها به روش تزریق اینوکلوم قارچ به غده‌های سیب‌زمینی آزمایش شد. جدایه‌ها در محیط PDA کشت و به مدت پنج روز در انکوباتور ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. غده‌های سیب‌زمینی رقم اگریا با اندازه‌های تقریباً یکسان و بدون آلودگی تهیه شد و بعد از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد و الکل صنعتی، با آب مقطر شستشو شدند. حلقه‌هایی به قطر ۱/۵ و عمق دو سانتی‌متر در غده‌ها با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن ایجاد شد. سپس پرگنه‌های هر جدایه به قطر ۱ و عمق ۱ سانتی‌متر تهیه و در حفره‌های مورد نظر قرار داده شد و حلقه‌های سیب‌زمینی

www.SID.ir

Archive of SID

برداشته شده مجدداً بر جای خود قرار داده و با نوار پارافیلم در جای خود ثابت شدند. همه غده‌های تلقیح شده و شاهد (محیط کشت بدون پرگنه) داخل پاکت‌های کاغذی و در انکوباتور ۱۵ درجه سلسیوس به مدت یک ماه نگهداری شدند. سپس غده‌ها از مرکز محل تلقیح بریده شدند و با استفاده از شاخص *وایرسما* (Wiersma 1979) تکمیل شده توسط *ترون و هولز* (Theron & Hols 1987)، ارزیابی شدت بیماری‌زایی با نمره‌دهی از صفر تا ۵ انجام شد. در این شاخص نمره صفر مربوط به عدم ایجاد پوسیدگی غده توسط قارچ درون حفره ایجاد شده در غده سیب‌زمینی بود. نمره ۱ مربوط به ایجاد پوسیدگی اندک در حفره درون غده سیب‌زمینی به طوری که آلودگی قارچ تا حدود ۱۰ درصد غده را فرا گرفت، نمره ۲ حدود ۱۰ تا ۳۰ درصد غده را پوسیدگی فرا کرفت، نمره ۳ مربوط به پیشرفت ۳۰ تا ۵۰ درصدی پوسیدگی، نمره ۴ برای پیشرفت پوسیدگی ۵۰ تا ۸۰ درصدی و در نهایت نمره ۵ برای ایجاد پوسیدگی کامل غده در نظر گرفته شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی (با سه تکرار) انجام و داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه واریانس و مقایسه میانگین شدند.

۴-۲- تعیین شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها به روش آلوده کردن خاک

آزمایش در شرایط گلخانه در گلدان‌های ۱۰ لیتری در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای این منظور غده‌های بذری رقم اگریا عاری از بیماری تهیه و در خاک تلقیح شده با جدایه‌های مورد نظر کشت شد. برای تهیه مایه تلقیح ابتدا جدایه‌ها در ظروف پتری حاوی محیط کشت PDA کشت و به مدت هفت روز در دمای ۲۷ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. بلوک‌های یک سانتی‌متر مکعبی از هر پرگنه جدایه‌ها به ظروف ارلن یک لیتری حاوی جو دو بار استریل انتقال داده و به مدت سه هفته در دمای ۲۵°c و شرایط تاریکی نگهداری شدند. غده‌های بذری با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد (۲۰ سی‌سی از هیپوکلریت سدیم ۵ درصد در ۱۰۰ سی-سی آب) به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی و با آب مقطر شستشو داده شدند. بعد از خشک شدن غده‌ها، جوانه‌های آنها توسط قاشقک خارج و به مدت ۷۲ ساعت در رطوبت ۱۰۰ درصد در اتاقک رشد نگهداری شدند تا سطوح بریده شده چوب پنبه‌ای شوند. به ازای هر گلدان ۱۵ گرم از مایه تلقیح حاصل اضافه شد و سپس یک قطعه جوانه سیب‌زمینی آماده شده در وسط هر گلدان کشت گردید. آبیاری گلدان‌ها پس از سه ماه به‌تدریج متوقف شد تا گیاهان پیر و همه برگ‌ها نکروز شده و قسمت‌های هوایی خشک شوند. شدت بیماری از طریق اندازه‌گیری میزان پیشرفت اسکلروت در طول ساقه ارزیابی و داده‌های حاصل تجزیه آماری و مقایسه میانگین شدند (Helimann *et al.* 2006).

نتایج

۱- جداسازی و شناسایی جدایه‌ها

نمونه‌های مشکوک به بیماری خال سیاه دارای علائم زردی و پژمردگی شبیه ورتیسلیوز و فوزاریوز در قسمت‌های هوایی بودند و در قسمت‌های زیرزمینی از جمله ساقه زیرزمینی و ریشه به صورت پوسیدگی و جداشدن پوست ریشه از استوانه مرکزی دیده شد. در بافت‌های آلوده در زیر بینوکلر سته‌های میکرواسکلروت‌ها به وضوح قابل مشاهده بوده که از اعضای مهم شناسایی در گونه *C. coccodes* است. پرگنه‌ها یک روز بعد از کشت روی محیط‌کشت PDA نمایان شدند که در ابتدا کرم رنگ بوده

www.SID.ir

Archive of SID

و به تدریج برنگ نارنجی روشن در آمدند ولی به سرعت به دنبال تشکیل میکرواسکلرت‌ها که اغلب کل محیط کشت را فرا می‌گیرند، سیاه شدند. میسلیوم‌های هوائی در صورت وجود سفید رنگ، تنک و گاهی اوقات فاقد میسلیوم هوایی بودند. کنیدی این قارچ سیلندری با انتهای پخ، شفاف، بدون دیواره عرضی، ۲۴-۱۶ میکرون اندازه دارد که در انتهای کنیدیفورهای تک سلولی سیلندری فیالیدیک ایجاد شد. اپرسوریوم زرد مایل به سبز، تخم مرغی، به طور نامنظم با اندازه ۱۴-۵ در ۱۱-۴ میکرومتر تولید شد. آسروول‌ها به رنگ نارنجی کم رنگ قابل مشاهده با چشم غیر مسلح در محیط کشت PDA در مراحل اولیه رشد پرگنه قابل مشاهده بود ولی بعد تبدیل به میکرواسکلروت‌های سیاه رنگ شدند. این مشخصات با مشخصات *C. coccodes* همخوانی داشت. در مجموع ۱۰۸ جدایه از سه استان مورد نظر جدا شد. از جدایه‌های به دست آمده تعداد ۴۸ جدایه با توجه به پراکنش مزارع کشت سیب‌زمینی در آن استان‌ها برای مراحل بعدی این تحقیق انتخاب گردید.

۲- نتایج آزمون‌های تعیین گروه‌های سازگاری رویشی

۲-۱- تولید جهش یافتگان نیت

از ۴۸ جدایه مورد آزمایش تعداد ۳۱۳ جهش یافته نیت به دست آمد. زمان ایجاد هیف‌های سریع‌الرشد به وسیله محیط کشت‌های کلرات‌دار ۱۴ تا ۳۰ روز و در برخی موارد در محیط ال- تروئونین‌دار تا ۶۰ روز به طول انجامید. با این وجود برخی از جدایه‌ها جهش ایجاد نکردند. همین طور بسیاری از هیف‌های سریع‌الرشد به دست آمده در محیط MM رشد تیپ وحشی را داشتند و علی‌رغم تکرار آزمایش، پنج جدایه از ۴۸ جدایه مورد آزمون قادر به تولید جهش یافته نیت نبودند.

۲-۲- تعیین فنوتیپ جهش یافتگان نیت

با مطابقت نحوه رشد پرگنه (شکل رشد وحشی یا ظریف) روی محیط کشت‌های پایه حاوی یکی از منابع ازت شامل نیترات، نیتریت و هیپوزانتین، سه نوع فنوتیپ nit1، nit3 و NitM می‌بایست مشاهده می‌شد ولی تفاوت رشد در بین جهش یافتگان این قارچ به خصوص بین nit1 و nit3 مشهود نبود و از آنجا که بین برخی فنوتیپ جهش یافته‌های nit1 یا nit3 هتروکاریون تشکیل شد، ولی فنوتیپ مذکور به عنوان nit1/3 در نظر گرفته شد. از میان جهش یافتگان نیت به دست آمده تعداد ۶۰ جهش‌یافته از نوع NitM با فراوانی ۱۹/۴% و ۲۵۳ جهش‌یافته از نوع nit1/3 با فراوانی ۸۰/۶% بودند. از محیط‌های کشت کلرات‌دار حاوی آسپاراژین و ال ترئونین جهش یافتگان NitM بیشتری به دست آمد.

۲-۳- تعیین گروه‌های سازگاری رویشی

جهش‌یافتگان پنج جدایه از ۴۸ جدایه مورد آزمایش خودسازگاری رویشی نشان ندادند. با قرار دادن NitM و nit1/3 جدایه‌ها در مقابل همدیگر تعداد هفت جهش‌یافته NitM که بیشترین سازگاری رویشی را داشتند به عنوان آزمایشگر (تستر) انتخاب شدند. شش جدایه با آزمایشگرهای تعیین شده هتروکاریون تشکیل ندادند و کلیه مقابله‌های ممکن روی محیط کشت حداقل انجام شد و چون هیچ هتروکاریونی تشکیل ندادند، در نتیجه هر یک از آنها در یک گروه مجزا تک عضوی قرار گرفتند. در نهایت چهار گروه اصلی چند عضوی با فراوانی ۴۳/۷۵%، ۱۴/۵۸%، ۴/۱۶% و ۴/۱۶% به ترتیب در گروه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

سازگاری رویشی IRN-VCG1 (Iranian-VCG)، IRN-VCG2، IRN-VCG3 و IRN-VCG4 شناسایی شدند (جدول ۲).

جدایه‌های استان اردبیل تنها در گروه‌های IRN-VCG1 و IRN-VCG2 قرار گرفتند که به ترتیب ۵۰ و ۱۲/۵ درصد از جدایه‌های این استان را در بر داشتند. ۱۸/۷۵ درصد جدایه‌های اردبیل گروه‌های تک عضوی را تشکیل دادند. ۱۸/۷۵ درصد نیز خودناسازگار بودند و یا این که جهش‌یافتگان نیت پایدار ایجاد نکردند (جدول ۲).

برای جدایه‌های استان همدان سه گروه اصلی IRN-VCG1، IRN-VCG2 و IRN-VCG3 به ترتیب با فراوانی ۵۵، ۱۳ و ۱۳ درصد شناسایی شد. IRN-VCG3 فقط از منطقه کوریجان همدان با دو عضو بود و شش درصد از جدایه‌های همدان گروه‌های تک عضو تشکیل دادند. جهش یافتگان مربوط به جدایه‌های استان همدان هیچ یک خودناسازگار نبودند ولی از ۱۲/۵ درصد از آنها جهش یافتگان نیت به‌دست نیامد (جدول ۲).

جدایه‌های استان اصفهان در سه گروه اصلی IRN-VCG1، IRN-VCG2 و IRN-VCG4 به ترتیب با درصدهای ۲۵، ۱۹ و ۱۲ جای گرفتند و ۱۹ درصد گروه‌های تک عضوی تشکیل دادند. ضمن این که بقیه جدایه‌های اصفهان (۱۲/۴%) جایگاه مشخصی با روش سازگاری رویشی پیدا نکردند (جدول ۲).

از طرفی بین جهش‌یافتگان برخی جدایه‌های متعلق به گروه IRN-VCG2 با آزمایشگرهای IRN-VCG1 هتروکاریون ضعیف در ابتدا تشکیل، ولی بعد از چند روز رشد کافی پیدا نکردند و رشد پروتروفیک واضح در محل تلاقی دو ریسه سازگار حاصل نشد.

۳- آزمایش‌های بیماری‌زایی جدایه‌ها

۳-۱- تلقیح غده

بررسی توانایی جدایه‌ها در پوسانیدن غده‌های سیب‌زمینی نشان داد همه جدایه‌ها به جز جدایه‌های PC5،PC17، PC18، PC24 و PC25 به ترتیب جمع‌آوری شده از کلخوران اردبیل، دو جدایه بعدی از هارون‌آباد بهار و دو جدایه آخری از کوریجان کبودرآهنگ بیماری‌زا بودند. علائم پوسیدگی به صورت قهوه‌ای شدن محل‌های آلوده و در مرکز پوسیدگی خشک، در حاشیه (مرز بین سالم و آلوده) به صورت نرم و کرم رنگ تظاهر کرد (شکل۲). تجزیه داده های مربوط به آزمون پوسانندگی غده نشان داد بین جدایه‌ها از نظر شدت پوسانندگی در سطح ۱% اختلاف معنی‌دار وجود دارد و جدایه PC10 جمع‌آوری شده از منطقه مرکزی اردبیل بیشترین شدت و جدایه‌های PC4، PC21 و PC41 به ترتیب جمع‌آوری شده از مناطق نمین اردبیل، کبودرآهنگ همدان و دولت‌آباد فریدن اصفهان کمترین شدت بیماری‌زایی را داشتند (جدول ۲).

۳-۲- شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها به روش آلوده کردن خاک

نتایج بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها از طریق آلوده کردن خاک اطراف ریشه نشان داد که علایم بیماری حدود ۲/۵ ماه پس از کشت در اندام‌های هوایی گیاه ظاهر می‌شوند. ماشوره‌ای شدن ساقه‌های هوایی، تغییر رنگ در قسمت طوقه و پژمردگی از علایم بارز بیماری در این بررسی بود و در این مرحله قارچ عامل بیماری به راحتی از ساقه‌های هوایی (حدود ۵ سانتی‌متر بالاتر از طوقه) جدا شد. هم‌چنین ریشه‌ها پوسیده و یا پوست ریشه از استوانه مرکزی به سهولت جدا می‌شد و در زیر پوست

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. منشأ جغرافیایی، گروه‌های سازگاری رویشی شناسایی شده و میانگین شدت بیماری‌زایی جدایه‌های *C. coccodes* سیب‌زمینی

Table 2. Geographical origin, determined vegetative compatibility groups (VCGs) and Averages comparison of disease severity of *C. coccodes* isolates collected from Potato.

Isolate	Geographic origin[a]		Sampling time	VCG	Tuber rot severity	Sclerotia development by Root inoculation
	Province, Town	Area, stead				
PC1	Ardabil, Namin	Vilkij, 1	86.6.26	IRN-VCG1	1.62bcdefg	2.71abcd
PC2	Ardabil, Namin	Vilkij, 1	86.6.26	IRN-VCG1	1.73abcdef	2.21bcd
PC3	Ardabil, Namin	Vilkij, 4	86.6.26	IRN-VCG1	1.73abcdef	2.70abcd
PC4	Ardabil, Namin	Vilkij, 5	86.6.26	IRN-VCG1	1.27ghi	2.57abcd
PC5	Ardabil, Namin	Kalkhoran, 1	86.6.26	IRN-VCG1	1.00i	2.42abcd
PC6	Ardabil, Markazy	Kalkhoran, 2	86.6.26	IRN-VCG1	1.41fgh	2.08d
PC7	Ardabil, Markazy	Kalkhoran, 3	86.6.26	HSI[b]	1.51defgh	2.71abcd
PC8	Ardabil, Markazy	Kalkhoran, 2	86.6.26	NT[c]	1.80abcde	2.61abcd
PC9	Ardabil, Markazy	Dowlatabad, 3	86.6.26	HSI[b]	1.73abcdef	2.63abcd
PC10	Ardabil, Markazy	Dowlatabad, 3	86.6.26	IRN-VCG1	2.08a	2.66abcd
PC11	Ardabil, Markazy	Dowlatabad, 4	86.6.26	IRN-VCG1	1.51defgh	2.70abcd
PC12	Ardabil, Markazy	Dowlatabad, 5	86.6.26	self compatible[d]	1.51defgh	2.57abcd
PC13	Ardabil, Hir	Bodalo , 1	86.6.26	IRN-VCG2	1.51defgh	2.82abcd
PC14	Ardabil, Hir	Bodalo, 2	86.6.26	IRN-VCG2	1.73abcdef	2.34abcd
PC15	Ardabil, Hir	Bodalo, 3	86.6.26	self compatible[d]	1.13hi	2.66abcd
PC16	Ardabil, Hir	Bodalo, 5	86.6.26	self compatible[d]	1.38fgh	2.45abcd
PC17	Hamadan, Bahar	Haroon Abad, 4	86.7.7	NT[c]	1.00i	2.51abcd
PC18	Hamadan, Bahar	Haroon Abad, 4	86.7.7	IRN-VCG2	1.00i	2.87ab
PC19	Hamadan, Bahar	Haroon Abad, 4	86.7.7	IRN-VCG2	1.62bcdefg	2.88ab
PC20	Hamadan, Bahar	Haroon Abad, 4	86.7.7	IRN-VCG1	1.13hi	2.85abc
PC21	Hamadan, Laljin	Laljin, 1	86.7.7	IRN-VCG1	1.27ghi	2.10dc
PC22	Hamadan, Laljin	Laljin, 2	86.7.7	IRN-VCG1	1.13hi	2.58abcd
PC23	Hamadan, Kabudar Ahang	Korijan, 1	86.7.7	IRN-VCG3	1.90abcd	2.55abcd
PC24	Hamadan, Kabudar Ahang	Korijan, 2	86.7.7	IRN-VCG3	1.00i	2.76abcd
PC25	Hamadan, Kabudar Ahang	Dastjerd, 1	86.7.7	self compatible[d]	1.00i	3.00a
PC26	Hamadan, Kabudar Ahang	Dastjerd, 2	86.7.7	IRN-VCG1	1.47efgh	2.76abcd
PC27	Hamadan, Kabudar Ahang	Tasaran, 1	86.7.7	IRN-VCG1	1.62bcdefg	2.81abcd
PC28	Hamadan, Kabudar Ahang	Tasaran, 2	86.7.7	IRN-VCG1	1.82abcde	2.58abcd

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۲. ادامه

Isolate	Geographic origin[a]		Sampling time	VCG	Tuber rot severity	Sclerotia development by Root inoculation
	Province, Town	Area, stead				
PC29	Hamadan, Razan	Razan, 1	86.7.7	IRN-VCG1	1.73abcdef	2.57abcd
PC30	Hamadan, Razan	Razan, 2	86.7.7	IRN-VCG1	1.91abc	2.58abcd
PC31	Hamadan, Razan	Razan, 3	86.7.7	IRN-VCG1	1.71abcdef	2.81abcd
PC32	Hamadan, Razan	Razan, 3	86.7.7	NT[c]	1.73abcdef	2.77abcd
PC33	Esfahan, Faridan	Koordsofla, 1	86.7.15	IRN-VCG1	1.91abc	2.31abcd
PC34	Esfahan, Faridan	Koordsofla, 2	86.7.15	NT[c]	1.51defgh	2.69abcd
PC35	Esfahan, Faridan	Koordsofla, 2	86.7.15	NT[c]	1.73abcdef	2.70abcd
PC36	Esfahan, Faridan	Koordsofla, 3	86.7.15	self compatible[d]	1.60cdefg	2.81abcd
PC37	Esfahan, Faridan	Dowlatabad, 1	86.7.15	HSI[b]	1.71abcdef	2.82abcd
PC38	Esfahan, Faridan	Dowlatabad, 2	86.7.15	IRN-VCG4	1.41fgh	2.82abcd
PC39	Esfahan, Faridan	Dowlatabad, 2	86.7.15	HSI[b]	1.41fgh	2.54abcd
PC40	Esfahan, Faridan	Dowlatabad, 3	86.7.15	HSI[b]	1.73abcdef	3.00a
PC41	Esfahan, Faridan	Kordalia, 2	86.7.15	self compatible[d]	1.27ghi	2.88ab
PC42	Esfahan, Faridan	Kordalia, 3	86.7.15	IRN-VCG4	1.13hi	2.76abcd
PC43	Esfahan, Faridan	Kordalia, 3	86.7.15	IRN-VCG1	1.27ghi	2.56abcd
PC44	Esfahan, Faridan	Kordalia, 4	86.7.15	IRN-VCG2	1.62bcdefg	2.63abcd
PC45	Esfahan, Faridan	Damaneh, 1	86.7.15	IRN-VCG1	2.00ab	3.00a
PC46	Esfahan, Faridan	Damaneh, 2	86.7.15	IRN-VCG2	1.99abc	2.76abc
PC47	Esfahan, Faridan	Damaneh, 3	86.7.15	IRN-VCG1	2.00ab	2.44abcd
PC48	Esfahan, Faridan	Damaneh, 3	86.7.15	IRN-VCG2	1.41fgh	2.81abcd

a- اطلاعات جغرافیایی مناطق جمع‌آوری جدایه‌ها. b- جدایه‌های خود ناسازگار رویشی. c- از این جدایه‌ها جهش یافتگان نیت ایجاد نشد. d- جدایه‌های دارای خود سازگار رویشی ولی با هیچ جدایه دیگری هتروکاریون ندادند.

a- source data showed for Iranian isolates. b- This isolates were identified as heterokaryon self-incompatible. c- This isolates was not create nit mutants. d- This isolates was self compatibility but couldn't anastomose with another isolate mutant.

آسروول‌های قارچ با بینوکولر قابل مشاهده بود. شدت بیماری از طریق اندازه‌گیری میزان پیشرفت اسکلرت در طول ساقه ارزیابی شد. همه جدایه‌ها در این روش آلوده‌سازی خاک بیماری‌زا بودند. تجزیه داده‌ها نشان داد جدایه‌ها در سطح ۱% اختلاف معنی‌داری داشته و جدایه‌های PC40، PC45 و PC25 بیشترین و جدایه PC6 جمع‌آوری شده از منطقه مرکزی اردبیل کمترین شدت بیماری‌زایی را در این روش داشتند (جدول۲).

۳-۳- هم‌بستگی بین نتایج بیماری‌زایی

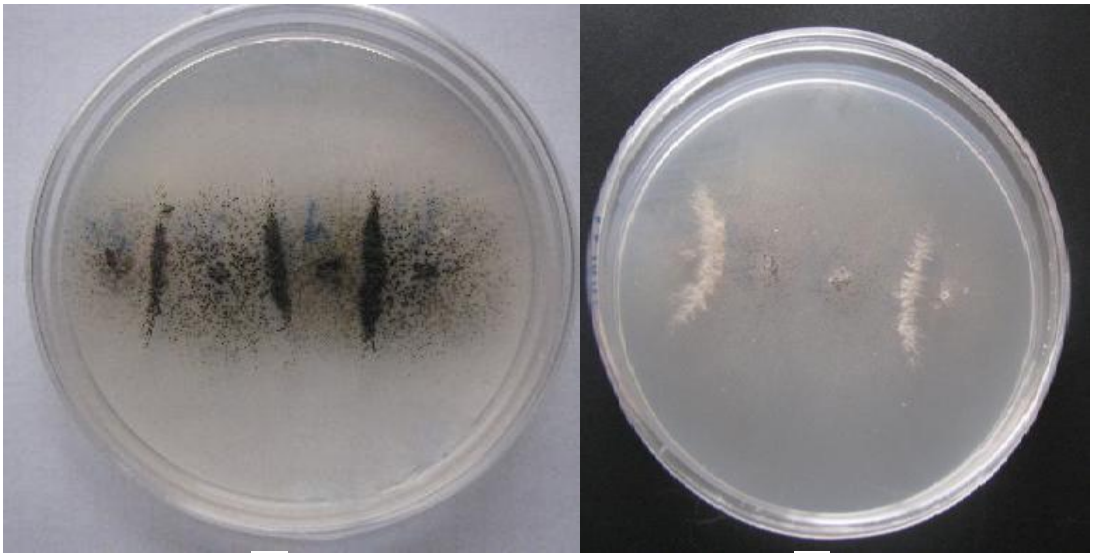
نتایج تجزیه داده‌ای مربوط به روش‌های ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها نشان داد هم‌بستگی بین دو روش بیماری‌زایی وجود ندارد و بیماری‌زایی جدایه‌ها در غده‌های سیب زمینی مستقل از بیماری‌زایی آنها در ریشه و طوقه گیاه عمل می‌کند (جدول ۳).

۳-۴- هم‌بستگی نتایج بیماری‌زایی و گروه‌های سازگاری رویشی

با توجه به نتایج، بین بیماری‌زایی و گروه‌های سازگاری رویشی جدایه‌ها هم‌بستگی دیده نشد. به طوری که بعضی از جدایه‌های غیر بیماری‌زا و بیماری‌زاترین جدایه‌ها متعلق به یک گروه سازگاری رویشی (به عنوان مثال IRN-VCG1) هستند. جدایه PC10 از IRN-VCG1 بیشترین پوسانندگی غده را ایجاد نمود. بیشترین ارتفاع

www.SID.ir

Archive of SID



A B

شکل ۱. تقابل بین جهش‌یافتگان nit جدایه‌های *Colletotrichum coccodes* : A= جدایه خود سازگار. B= جفت شدگی سازگار جهش یافتگان NitM (قطعه‌های مرکزی) و جهش یافتگان nit1/3 (قطعه‌های کناری). سازگاری با حضور یا عدم حضور هیف‌های هوایی در محل تماس جهش یافتگان nit1/3 و nitM مشخص می‌شود.

Fig. 1. Pairings on minimal medium of nitrate nonutilizing (nit) mutants of isolates of *Colletotrichum coccodes*. A. self compatible isolate. B. Complementary pairings of NitM (center blocks) and nit1/3 mutants (surrounding blocks). Compatibility is scoral by the presence or absence of aerial mycelia at zones of contact between nit1/3 and NitM mutants.

A B C

شکل ۲. علائم پوسیدگی غده‌های اگریا در مطابقت با مقیاس وایرسما برای ارزیابی شدت پوسیدگی غده‌های سیب‌زمینی توسط *Colletotrichum coccodes*، تکمیل شده توسط ترون و هولز. نمای بیرونی غده‌های مایه‌زنی شده و پوسیده (A)، شدت پوسیدگی غده با نمره ۲ از ۵ (B) و شدت پوسیدگی غده با نمره ۳ از ۵ (C).

Fig. 2. Wiersma index scale for assessment of potato tuber rot severity by *Colletotrichum coccodes*, complemented by Theron & Holz. Out view of tuber inoculation and rot (A), Tuber rot severity that indicated number 2 of 5 (B) and Tuber rot severity that indicated number 3 of 5 (C).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. مقایسه ضرایب هم‌بستگی بین متغیرهای ارزیابی شدت بیماری در روش‌های مختلف آزمون بیماری‌زایی

Table 3. Comparison of correlation coefficient among assessment variances of disease severity in different method of pathogenicity tests.

variant	N	b	a
a	147	0.053^{ns}	1
b	147	1	

N: تعداد مشاهده، a: شدت پوسانندگی غده، b: میزان گسترش اسکلروت در طول ساقه در آلوده‌سازی خاک اطراف ریشه. ns: غیر معنی‌دار.

N: Number of observation. a: Tuber rot severity, b: Height of sclerotial mass in stems were obtianed from root inoculation method, ns: Not significant.

تشکیل اسکلروت روی ساقه در آزمایش تلقیح خاک اطراف ریشه مربوط به اعضای گروه IRN-VCG1، گروه تک‌عضوی و یک جدایه از جدایه‌های گروه سازگاری رویشی نامشخص بود.

بحث

نوع محیط کشت و غلظت کلرات، آسپاراژین و ال تروئونین در تولید جهش یافتگان نیت بسیار حائز اهمیت است به طوری که در این تحقیق با وجود تکرار فراوان از محیط WAC جهش یافتگان نیت به دست نیامد. هرچند گاهی با انتقال نوک ریسه قطاع با رشد سریع به محیط حداقل جهت شناسایی جهش‌یافتگان نیت پایدار، پرگنه‌هایی با رشد ضخیم و فاصله‌دار رشد می‌کردند. کوو (۱۹۷۶) ثابت نمود که منبع ازت مورد استفاده در محیط کلرات‌دار فراوانی نسبی جهش یافتگان نیت را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این تحقیق برای برخی جدایه‌ها در محیط کشت MMC جهش یافتگان نیت به دست نیامد یا برای بسیاری از جدایه‌ها جهش یافتگان NitM بازیابی نشد بنابراین از اسیدآمینه‌هایی همچون آسپاراژین و ال- ترئونین استفاده شد. *کلیتیچ و لیزلی* (Klittich & Leslie 1988) اظهار داشتند استفاده از ترئونین در محیط کشت کلرات‌دار باعث بازیابی جهش یافتگان NitM بیشتری می‌شود.

تفاوت فنوتیپی بین جهش‌یافتگان nit1 و nit3 مشخص نبود ولی در آزمایش تقابل روبه‌روی هم برخی با یکدیگر تشکیل هتروکاریون دادند. تحقیقات چن و همکاران (Chen *et al.*1994) روی جدایه‌های ***Verticillium dahliae*** و *نیتزان و همکاران* (۲۰۰۲ و ۲۰۰۶) در خصوص جدایه‌های ***C. coccodes*** نیز عدم وجود تفاوت ظاهری بین nit1 و nit3 را تأیید می‌نماید. هم‌چنین تشخیص nit1 از nit3 در آزمایش تعیین فنوتیپ جهش یافتگان مربوط به ***C. malvarum*** توسط *بروکر و همکاران* (۱۹۹۱) امکان پذیر نبود. به نظر می‌رسد جهش در جایگاه ژنی ساختمانی آنزیم احیاکننده نیترات که منجر به تولید nit1 می‌شود و همین‌طور جهش در جایگاه ژنی تنظیم اختصاصی مسیر مصرف نیترات که منجر به تولید nit3 می‌شود، در این قارچ مشخص نیست. تشکیل هتروکاریون بین دو فنوتیپ متفاوت جهت تکمیل نقص بیوشیمیایی در بین هتروکاریون‌ها صورت می‌گیرد تا بتوانند از منابع نیتروژن (نیترات یا نیتریت) موجود در محیط کشت استفاده نمایند (Nitzan *et al.* 2006).

بعضی از جدایه‌ها که در محیط کلرات دار قادر به تولید جهش نبودند علی‌رغم این که در محیط کشت‌های کلرات‌دار و آسپاراژین یا ال- ترئونین‌دار تولید قطاع با رشد سریع تولید کردند ولی به علت قابلیت استفاده از منابع نیترات جزو جهش یافتگان نیت محسوب نشده و از

www.SID.ir

Archive of SID

روند آزمایش‌ها حذف شدند. به این نوع، جهش‌یافتگان crn (Chlorate-resistant nitrate-utilizing mutants) می‌گویند که با وجود مقاومت به کلرات قادر به استفاده از منبع ازت به صورت نیترات هستند. این جهش‌یافتگان به طور معمول از آزمایش‌های تعیین گروه‌های سازگاری رویشی حذف می‌شوند (Leslie & Summerell 2006).

در این تحقیق چهار گروه سازگاری رویشی در بین ۴۸ جدایه *C. coccodes* جمع‌آوری شده از استان‌های اردبیل، همدان و اصفهان با درصدهای ۴۳/۷۵، ۱۴/۵۸، ۱۴/۱۶ و ۱۴/۱۶ شناسایی شدند و به ترتیب اسامی IRN-VCG1، IRN-VCG2، IRN-VCG3 و IRN-VCG4 نام‌گذاری شدند. وجود گروه‌های سازگاری رویشی مشترک در بین جدایه‌ها در مناطق مختلف ایران شاید به دلیل کشت تک‌محصولی در مناطق کشت سیب‌زمینی و جابه‌جایی غده‌های بذری آلوده به عامل بیماری از منطقه‌ای به منطقه دیگر باشد.

نیتزان و همکاران (۲۰۰۲) چهار گروه چندعضوی با درصدهای ۷/۳، ۳۵/۵، ۲۰ و ۱۰ جمع‌آوری شده از بوته‌های سیب‌زمینی کشورهای اسرائیل، فرانسه و هلند معرفی نمودند. ضمن این که ۲۷/۳ درصد از جدایه‌ها با وجود خودسازگاری رویشی در هیچ گروه چند عضوی جای نگرفته و تک عضوی بودند. مجدداً *نیتزان و همکاران* (۲۰۰۶) سازگاری رویشی ۲۱۱ جدایه قارچ *C. coccodes* که شامل ۱۰۸ جدایه از تحقیق سال ۲۰۰۲ و ۱۲۳ جدایه از آمریکای شمالی بود را در ۷ گروه سازگاری رویشی (NA-VCGs) تقسیم‌بندی نمودند که به ترتیب ۱/۶، ۱/۶، ۴، ۸/۱، ۱۳/۸، ۱۹/۵ و ۳۶/۶ درصد از جدایه‌ها در این گروه‌ها تقسیم‌بندی شدند که ۱۴/۶ درصد جدایه‌ها در هیچ یک از هفت گروه تعیین شده جای نگرفته و تک عضوی بودند.

بین برخی از جهش یافتگان نیت جدایه‌های متعلق به گروه‌های IRN-VCG1 و IRN-VCG2 هتروکاریون ضعیف ایجاد شد که نشان‌دهنده وجود شباهت در جایگاه‌های VIC بین این دو گروه می‌باشد و ممکن است حاکی از حذف برخی از ژن‌ها به علت شرایط طبیعی در طول تکامل قارچ باشد. بنا به ادعای *پوهالا* (۱۹۸۵) جمعیت گروه‌های سازگاری رویشی در قارچ *F. oxysporum* دارای تنوع زیادی بوده است ولی در طول زمان بعضی از آنها بر اثر عوامل طبیعی و شرایط میزبان حذف شدند. سازگاری رویشی شاخصی عالی از شباهت ژنتیکی است ولی شاخص خوبی برای تفاوت‌ها نیست. تشکیل هتروکاریون ضعیف بین دو جهش‌یافته نوعی هتروکاریون موقتی است که در آن مرگ سیتوپلاسمی در محل آناستوموزی از سرعت کمی برخوردار است به گونه‌ای که مانع تولید آنزیم‌های احیاکننده نیترات نشده و در آنجا هتروکاریون موقت تا زمانی که برخی از این آنزیم‌ها سنتز شوند باقی می‌ماند ولی به دلیل این که آنزیم‌های سنتز شده کافی نیست، این هتروکاریون ضخیم و متراکم نمی‌شود (Mohamadi & Banihashemi 2007).

وجود هتروکاریون ضعیف بین گروه‌های IRN-VCG2 و IRN-VCG1 و فراوانی زیاد دو گروه و وجود گروه‌های تک عضو، شاید حاکی از خطر توسعه و ایجاد گروه‌های سازگاری رویشی جدید در مناطق کشت سیب‌زمینی ایران باشد. *آن و همکاران* (Ahn *et al.* 1998) پیدایش بیش از یک گروه سازگاری رویشی در یک منطقه را نشان از گسترش جمعیت‌های قارچ توسط بذر، گیاهچه و بقایای گیاهی نسبت می‌دهند.

پنج جدایه از جدایه‌های مورد آزمون علی‌رغم تولید جهش قادر به تولید هتروکاریون در مقابله با جهش یافتگان

www.SID.ir

Archive of SID

نیت خود نبودند لذا به عنوان خود ناسازگار رویشی یا (Heterokaryon Self-Incompatibility = HSI) در نظر گرفته شدند. بر اساس تعریف *لیزلی* (Leslie 1993) نژادهایی که به جهت دارا بودن نقص‌ها و جهش‌های ژنتیکی قادر به تشکیل هتروکاریون حتی با خودشان نیستند، اصطلاحاً خود ناسازگار رویشی یا خود ناسازگار هتروکاریونی نامیده می‌شوند. این نژادها از جمعیت‌های قارچی گونه‌های *F. oxysporum*، *F. subglutinans* و *F. moniliforme* شناسایی شده‌اند. این گونه جدایه‌های خودناسازگار رویشی را در همان ابتدای آزمایش‌های تعیین گروه‌های سازگاری رویشی جهت جلوگیری از اشتباه کنار می‌گذارند. بررسی هتروکاریون خودسازگار در گونه‌های *Colletotrichum spp.* مهم است و *بروکر* (Brooker *et al. 1991*) در آزمایشات تعیین میزان جهش‌زایی روی گونه‌های این قارچ از گونه‌های *C. destructivum* و *C. fragariae* *جدایه‌های* خودناسازگار رویشی گزارش نمود.

بررسی‌های *هلیمن و همکاران* (۲۰۰۶) نشان داد گروه بندی جمعیت‌های *C. coccodes* آمریکای شمالی (NA-VCGs) متکی بر سازگاری رویشی مشابهت زیادی با گروه بندی این جمعیت به روش مولکولی AFLP دارد.

نتایج بررسی توانایی جدایه ها در پوسانیدن غده‌های سیب‌زمینی نشان داد علایم مشخص بیماری خال سیاه در غده لکه‌های قهوه‌ای با حاشیه‌های نامشخص، فرورفتگی اندک و ایجاد فضاهای خالی است. این علائم در غده‌های دیر برداشت شده بیشتر نمایان می‌شود و در مقابل آلودگی‌های نهان در غده‌های زود برداشت شده بیشتر است. بیش از ۸۵٪ جدایه‌های *C. coccodes* قادر به پوسانیدن غده‌های سیب‌زمینی بودند. با توجه به شرایط انبارهای نگهداری سیب‌زمینی در ایران این قارچ را می‌توان یکی از عوامل مهم پوسیدگی غده‌ها در انبار و در غده‌های بذری عامل کاهش تراکم بوته در واحد سطح در مزرعه دانست. *گلیس- ولت و همکاران* (Glais-Valet *et al.* 2004) اثبات نمودند که شدت پوسانیدن غده‌ها توسط *C. coccodes* در دمای بالاتر سریع تر است. آنها نشان دادند که آلودگی در دماهای پایین ۵، ۱۰و ۱۵ درجه سلسیوس نیز رخ می‌دهد اگر چه در دماهای پایین تر گسترش پوسیدگی به طور آهسته تر است.

خال سیاه موجب کاهش وزن غده‌ها در انبار می‌شود و باعث کاهش بازارپسندی محصول می‌شود (Lees & Hilton 2003). لذا باتوجه به خسارت بیماری خال سیاه در انبار می‌توان این بیماری را در زمره دیگر بیماری‌های انباری چون، پوسیدگی خشک فوزاریومی، قانقاریا و شوره نقره‌ای قرار داده و در ارزیابی حساسیت ارقام به بیماری‌های انباری میزان حساسیت غده‌ها به این عامل را نیز مدنظر قرار داد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد بین نتایج شدت بیماری‌زایی و گروه‌های سازگاری رویشی هم‌بستگی معنی‌دار وجود ندارد. بنابراین نمی‌توان گروه‌های سازگاری رویشی را ملاک شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها دانست. با آن‌که *نیتزان و همکاران* (۲۰۰۲) بیماری‌زایی جدایه‌های EU/I-VCG را با تلقیح قارچ به ریشه سیب‌زمینی و اندازه‌گیری شدت تشکیل سطوح اسکلروت یک گروه سازگاری رویشی را بیماری‌زاتر معرفی نمود ولی با بررسی‌های تکمیلی روی جدایه‌های متعلق به NA-VCGs که از چندین فاکتور ارزیابی بیماری‌زایی استفاده نمودند، هیچ هم‌بستگی بین گروه‌های سازگاری و بیماری‌زایی مشخص نشد (Nitzan *et al.* 2006).

www.SID.ir

Archive of SID

آکیل و همکاران (Aqeel *et al.* 2008) با استفاده از دو روش آزمون بیماری‌زایی (تلقیح جدایه‌ها روی اندام‌های هوایی و ریشه‌ها) در شرایط یکسان شدت بیماری‌زایی جمعیت NA-VCGs را مقایسه و ارتباط احتمالی بین شدت بیماری‌زایی و گروه‌های سازگاری رویشی مربوط را بررسی نمودند. نتایج نشان داد جدایه‌های مربوط به گروه سازگاری رویشی ۲ و ۶ از نظر کاهش وزن غده بیماری‌زاترین جدایه‌ها بودند ولی جدایه‌های مربوط به گروه‌های سازگاری رویشی ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ بیشترین تراکم میکرواسکلروت در اندام‌های هوایی ایجاد کردند. این تحقیقات نشان‌دهنده عدم هم‌بستگی بین دو روش مورد آزمون و گروه‌های سازگاری رویشی بود.

با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان گفت تنوع نسبتاً زیادی بین جمعیت ***C. coccodes*** در مناطق مورد بررسی وجود دارد. هر چند این تنوع به صورت تک عضوی در بعضی جدایه‌ها نمود داشته ولی آن را می‌توان به مراحل اولیه بروز تنوع در جمعیت این قارچ نسبت داد. ضمن این که اختلاف در شدت و نحوه بیماری‌زایی جدایه‌ها و نبود هم‌بستگی بین این روش‌ها، هم‌چنین نبود ارتباط بین گروه‌های سازگاری رویشی معرفی شده و شدت بیماری‌زایی، همه حاکی از پیچیدگی ارتباطات و احتمال بروز تغییرات ژنتیکی در درون جمعیت این قارچ است. لذا به نظر می‌رسد انجام پژوهش و بررسی‌های تکمیلی به خصوص بر اساس روش‌های نوین مولکولی برای دستیابی به نتایج منسجم تر و دقیق تر ضروری است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (9-7) متن انگلیسی مراجعه شود.

www.SID.ir