مجله علوم و فنون باغبانی ایران جلد ۱۹ شماره ۳ صفحه‌های ۳۴۱ تا ۳۵۲ (۱۳۹۷)

اثر استفاده از قارچ عامل بیماری خال سیاه سیب‌زمینی روی باززایی پایه‌های مقاوم در شرایط درون‌شیشه‌ای[1]

Effect of using Potato Black Dot Pathogen on Regeneration Resistant Stocks under *in vitro* Conditions

خسرو پرویزی* و عزیز باقری[2]

چکیده

به‌منظور غربال‌گری و انگیزش مقاومت پایه‌های سیب‌زمینی به قارچ عامل بیماری خال سیاه (*Colletotrichum coccodes*)، ابتدا ژوخه‌های (غده) بذری سالم از دو رقم مارفونا و آگریا برای تشکیل جوانه‌های نوری و گرهی ساقه در شرایط مناسب قرار گرفتند. سپس از آن‌ها قطعه‌های جوانه نوری و تک گرهی ساقه به طول ۵ تا ۷ میلی‌متر تهیه شد. قطعه‌های تهیه شده درشرایط سترون به ارلن‌های حاوی محیط کشت‌های موراشیگی و اسکوک (MS) و نیچ و نیچ در آمیخته با عصاره قارچ خالص‌سازی شده از *C. coccodes* منتقل شدند. ظرف‌های کاشت در اتاقک کشت در شرایط دما و دوره نوری مناسب تا زمان باززایی شاخساره قرار گرفتند. برای انجام پژوهش از آزمایش فاکتوریل با طرح پایه به‌طور کامل تصادفی شامل نوع رقم در دو سطح (مارفونا و آگریا)، غلظت عصاره قارچ در سه سطح، غلظت کم (شش سی سی عصاره خالص قارچ همراه هم حجم آن آب مقطر سترون) غلظت میانگین (شش سی‌سی عصاره خالص قارچ همراه یک سوم حجم آن آب مقطر سترون) و غلظت زیاد (شش سی‌سی عصاره خالص قارچ) و آب مقطر سترون (تیمار شاهد) و نوع محیط کشت در دو سطح (MS و نیچ ونیچ) استفاده شد. پس از باززایی و تولید گیاهچه‌های جدید، آلودگی و سلامت آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتیجه آزمایش نشان داد که در قطعه‌های جوانه نوری در هر دو نوع محیط کشت و در هر دو رقم و با هر سه غلظت از عصاره قارچ، باززایی صورت نگرفت و تنها در تیمار شاهد قطعه‌های گرهی جوانه قادر به باززایی شدند. اما در قطعه‌های گرهی ساقه در هر دو رقم و با غلظت کم و میانگین عصاره قارچ، باززایی صورت گرفت. ضمن این‌که تفاوت معنی‌داری از نظر تولید گیاهچه در تیمار شاهد (آب مقطر سترون) و تیماری که عصاره قارچ با غلظت کم استفاده شده بود، وجود نداشت.

واژه‌های کلیدی: تک گره، جوانه نوری، عصاره قارچ، کشت بافت.

مقدمه

یکی از بیماری‌های مهم و اقتصادی سیب‌زمینی بیماری خال سیاه می‌باشد. این بیماری توسط قارچ *Colletotrichum* ایجاد می‌شود. جنس *Colletotrichum* یکی از مهم‌ترین جنس‌های قارچ‌های بیماریزای گیاهی در سراسر دنیا می‌باشد. مهم‌ترین بیماری ایجاد شده توسط جنس *Colletotrichum* بیماری خال‌سیاه

۱- تاریخ دریافت: ۹۶/۸/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۲۳

۲- به‌ترتیب استادیار بخش تحقیقات علوم زراعی- باغی و مربی پژوهش بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، همدان، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (khosroster@gmail.com).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]

سیب‌زمینی است که توسط گونه *C. coccodes* ایجاد می‌شود و در سال‌های اخیر بیماری خال‌سیاه به یک بیماری مهم از نظر اقتصادی در سیب‌زمینی تبدیل شده است. این قارچ می‌تواند تمام بخش‌های زیرزمینی (ژوخه‌های دختری، دستک‌ها و ریشه‌ها)، ساقه اصلی و شاخساره سیب‌زمینی را آلوده کند. آلودگی ژوخه‌ها به صورت ایجاد زخم‌های نقره‌ای رنگ روی ژوخه است که ریز سختینه‌های[1]سیاه‌رنگی تولید می‌کنند. این زخم‌های نقره‌ای ممکن است قهوه‌ای رنگ شده و حاشیه نامشخصی داشته باشند (۲).

در گزارش Effmert و Pett (۷) مشخص شد که غربال کردن رقم‌های مقاوم سیب‌زمینی برای کنترل بیماری با کشت مریستم و از بین بردن آلودگی پنهان و روزنه‌های نفوذ قارچ به ژوخه‌ها تأثیرگذار و کارآمد می‌باشد. نقش قارچ‌های *Alternaria alternata*، *Colletotrichum coccodes* و *Geotrichum candidum* در پوسیدگی‌های ژوخه سیب‌زمینی درسال‌های ۱۹۸۶ تا ۱۹۸۹ در کشورهای هلند و بنین[2] بررسی شد. با نتیجه‌های به‌دست آمده، خسارت *Alternaria* ۵۲٪، *Colletotrichum* ۸٪ و *Geotrichum* ۳۵٪ برآورد شد.

توانایی قارچ *C. coccodes* در ایجاد نشانه‌ها و مرگ زود هنگام رگبرگ و کاهش محصول در شرایط گلخانه و مزرعه روی اندام‌های هوایی سیب‌زمینی بررسی شده است. محلول‌پاشی مایه با سوسپانسیون کنیدی‌ها (10^6 C.F.U./ml) *C. coccodes* سبب زخم‌های فرورفته و سیاه شدن روی ساقه‌ها، برگ‌ها و رگبرگ و دمبرگ‌ها و بافت‌مردگی برگ و مرگ دوباره و بلوغ زودرس رگبرگ در شرایط اتاق کشت و گلخانه می‌شود. مایه‌زنی مزرعه‌ای در سال ۱۹۸۷ در دو منطقه باعث کاهش محصول در رقم دیررس رازت باربنک[3] در حد ۶/۳ تا ۶/۵ تن در هکتار شد. اما در رقم زودرس رازت نورگولد[4] تاثیری در عملکرد نداشت. در بررسی‌های گلخانه‌ای و مایه زنی‌های خاک با *C. coccodes* نتیجه‌های مشابهی حاصل شده است (۱۰).

حساسیت برخی از رقم‌های رایج در کشور نسبت به بیماری خال سیاه مورد بررسی قرار گرفته و نتیجه‌گیری شده است که همه رقم‌های مورد آزمون کم و بیش به بیماری گفته‌شده حساس هستند. هم‌چنین در مقایسه تاریخ‌های مختلف کاشت روی میزان خسارت سیب‌زمینی بذری به بیماری خال سیاه مشخص شده است که انتشار بیماری در کشت‌های دیرهنگام نسبت به کشت‌های زودهنگام کمتر می‌باشد. در مناطق مختلف کشور گزارش‌هایی از میزان خسارت این بیماری در سال‌های مختلف ارائه شده است به طوری‌که در سال ۱۳۶۴ در کشتزارهای سیب‌زمینی آلوده اصفهان خسارت بیماری خال سیاه تا حدود ۵۰٪ و در کشتزارهای اردبیل ۵۰ تا ۵۵٪ برآورد شده است. در استان همدان نیز خسارت بیماری مذکور در سال ۱۳۷۲ تا حد ۴۰٪ گزارش شده است (۱).

استفاده از روش کشت بافت در ایجاد مقاومت و گزینش رگه‌های مقاوم از گیاهان، بیشتر به چهار صورت امکان‌پذیر می‌باشد (۱۴، ۱۶): ۱- به کارگیری مریستم، ۲- جهش‌زایی در توده بافت پینه‌ای، کشت‌های تعلیق یاخته‌ای و یا کشت رویان و سپس غربالگری در محیط کشت بافت و آمیخته با عصاره فیلتر شده از قارچ عامل بیماری، ۳- انتقال ژن مقاومت به بیماری به گیاه میزبان و افزایش و پرآوری بعدی آن در محیط کشت بافت و انجام گزینش و غربالگری و اثبات بیان و ظهور ژن مقاومت در نسل رویشی حاصل از آن، ۴- کشت مخلوط پینه، سوسپانسیون یاخته‌ای، رویان‌های سوماتیکی، جوانه‌های رویشی و یا گره‌های ساقه در محیط کشت بافت و در مخلوط با عصاره قارچ عامل بیماری. قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا بیشتر با تولید متابولیت‌های سمی[5] و ایجاد سمیت در یاخته‌های گیاهان میزبان منجر به بیماری گیاه میزبان شده و با بروز نشانه‌هایی مانند کم‌سبزینگی،

۱- Micro sclerotinians ۲- Benin ۳- Russet Burbank ۴- Russet Norgold

۵- Phytotoxic Secondary Metabolites

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]

بافت‌مردگی و یا سوختگی، پژمردگی و گاهی آبگزیدگی[1]همراه می‌باشد. در مقابل گیاهان میزبان بسته به میزان مقاومت اقدام به تولید متابولیت‌های ثانویه سمی به عنوان بازدارنده و پادزهر نموده و از خطر بیماری می‌توانند نجات یابد (۱۶). از مهمترین ماده‌های سمی تولید شده توسط قارچ‌های بیماری‌زا می‌توان به فوزاریک اسید[2] و دئوکسینی‌والنول[3] (DON) اشاره کرد. اما متابولیت‌های ثانویه سمی تولید شده از گیاهان شامل ترکیبی از پپتیدهای کوچک مولکول، ترکیبات لیگنینی، فنل‌ها، ترپنوئیدها، گلیکواستروئیدها، آلکالوئیدها و اسیدهای آلی ساده می‌باشند (۱۴).

به‌طورمعمول، در محیط کشت بافت امکان تولید متابولیت‌های ثانویه توسط گیاهان میزبان در شرایط آلودگی به قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی فراهم شده است و تولید این متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان یکی از سازوکارهای انگیزش مقاومت می‌باشد، که به‌عنوان گزینش در محیط کشت بافت با حضور عصاره قارچ[4] مطرح می‌باشد (۱۶). در این راستا گزارش‌هایی در تولید رگه‌های مقاوم با استفاده از فن کشت یاخته و یا اندام گیاهی در مخلوط با عصاره قارچ‌های مهم بیماری‌زا از جمله *Phytophthora infestans*، *Alternaria alternata*، *Helminthosporium solani* و *Fusarium oxysporum* در محصولاتی مانند انگور (۹)، جو (۴) و گل میخک (۱۸) ارائه شده است. پایداری و تثبیت مقاومت به قارچ ورتیسیلیوم در گوناگونی بدن همگروهی[5] حاصل از کشت بافت توت فرنگی با پژوهش Markiewicz و MIchalczuk (۱۱) به اثبات رسیده است. در شمعدانی عطری از طریق کشت پینه و غربال‌گری بعدی آن و نیز تلقیح دوباره گیاهان حاصله با قارچ *Alternaria alternaria* در محیط باززایی برگ، به ارزیابی مقاومت با غلظت‌های صفر، ۴، ۸ و ۱۲٪ از عصاره قارچ پرداخته شد. نتیجه نشان داد که امکان تولید همگروه‌های مقاوم شمعدانی با غلظت‌های ۸ و ۱۲٪ و تثبیت مقاومت آن در محیط باززایی از برگ با قارچ یاد شده وجود دارد (۱۷). در آزمایشی، Sacristan و همکاران (۱۵) با استفاده از ماده جهش‌زای اتیل متان سولفانات[6] اقدام به ایجاد جهش در سوسپانسیون یاخته‌ای از یاخته‌های تک‌گان و رویان‌های بدنی[7] کلم نمودند. در مرحله بعد جهش یافته‌های تولید شده در محیط کشت بافت مخلوط با عصاره قارچ *Plasmodiophora brassicae* (عامل بیماری ساق سیاه و گره ریشه کلم) مورد باززایی قرار گرفتند. نتیجه‌های حاصل نشان داد که ۲۲٪ از گیاهان جهش یافته باززایی داشته و ۴٪ از آنان به بیماری مقاومت نشان دادند.

تولید رگه‌های مقاوم به بیماری قارچی فایتوفترا در کشت پینه از توتون با آزمایش Helgeson و همکاران (۸) به اثبات رسیده است. در این آزمایش هم‌چنین شدت کلونیزاسیون رگه‌های مقاوم با تغییر ترکیب هورمونی محیط کشت و دمای دوره نهفتگی یا کمون[7] تغییر پیدا کرده و با افزایش دمای دوره نهفتگی از ۱۵ به ۳۲ درجه سلسیوس، شدت کلونیزاسیون رگه مقاوم افزایش یافته است. در بررسی‌های انجام شده توسط Cristinzio و همکاران (۵) ژوخه و برگ ده رقم از سیب‌زمینی در محیط کشت بافت در ارتباط با میزان نشت الکترولیتی عصاره قارچ *Phytophthora infestans* مورد آزمون قرار گرفتند. نتیجه‌ها نشان داد که در محیط کشت بافت میزان انتشار الکترولیتی عامل بیماری در ژوخه و برگ متناسب نبوده و در برگ رقم‌های مقاوم بیشتر از دیسک‌های ژوخه بوده است. این پژوهشگران این روش را به‌عنوان شیوه‌ای کارآمد در غربالگری و گزینش رقم‌های مقاوم مورد تأئید قرار دادند. با بررسی منابع مختلف مشخص شد که تا زمان انجام این پژوهش گزارشی از غربال‌گری رقم‌ها به بیماری قارچی خال سیاه در کشت بافت سیب‌زمینی ارائه نشده است و تنها در قهوه امکان حذف قارچ *Colletotrichum* و غربال‌گری پایه‌های مقاوم در کشت بافت گزارش گردیده است (۱۲).

۱- Water soaking
۲- Fusaric acid
۳- Deoxynivalenol (DON)
۴- Culture Filtrate fungus Based Selection on Tissue Culture
۵- Somaclonal variation
۶- Ethyl methane sulfonate
۷- Somatic embryos

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]

بنابراین در این پژوهش به بررسی امکان باززایی و غربال‌نمودن سیب زمینی به بیماری خال سیاه در محیط کشت بافت و آمیخته با عصاره فعال قارچ پرداخته شد. ضمن این‌که واکنش به باززایی و امکان انگیزش مقاومت در دو نوع ریزنمونه قطعه‌های جوانه نوری و تک‌گره و هم‌چنین تفاوت در نوع محیط کشت نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه بخش تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی و گلخانه بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان همدان در سه مرحله در سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ به اجرا درآمد.

مرحله اول: ژوخه‌های بذری سالم از دو رقم مارفونا و آگریا که آزمون مقدماتی سلامت روی آن‌ها انجام گرفته بود و عدم آلودگی آن‌ها با آزمون‌های مربوطه به اثبات رسیده بود انتخاب شده و پس از این‌که با محلول ۱۰ میلی‌گرم در لیتر جیبرلیک‌اسید به‌مدت ۱۵ دقیقه تیمار شدند، به‌منظور تحریک رشد جوانه‌ها در شرایط تاریکی مطلق و در دمای ۲۰ تا ۱۸ درجه سلسیوس به‌مدت دو هفته در دستگاه جوانه‌زنی تمام خودکار نگهداری شدند. پس از این‌که جوانه‌های به‌طول ۵ تا ۷ سانتیمتر روی ژوخه‌ها تشکیل شد، برای تهیه ریزنمونه و مراحل سترون‌سازی به جایگاه انتقال در آزمایشگاه کشت بافت منتقل شدند. هم‌چنین گیاهچه‌های حاصل از کشت مریستم ارسالی از مؤسسه تحقیقات بیوتکنولوژی نیز به عنوان ماده اولیه برای تهیه قطعه‌های گرهی مورد استفاده قرارگرفتند. بدین منظور گیاهچه‌های حاصل از کشت مریستم در شرایط سترون به هود آزمایشگاه در جایگاه انتقال برای تهیه قطعه‌های گرهی به مرحله دوم منتقل شدند.

تهیه اینوکلوم قارچ: برای جداسازی و خالص سازی *C. coccodes* از آلودگی‌های قسمت‌های پاهنگ و ریشه گیاهچه‌های سیب‌زمینی روی محیط‌های کشت WA و PDA قارچ یادشده جداسازی و خالص‌سازی شد. برای تکثیر و تهیه عصاره قارچ از کشت مایع موراشیگی و اسکوگ[۱] (MS) (محیط مغذی که برای تکثیر گیاهچه‌های سیب‌زمینی حاصل از کشت بافت استفاده می‌شود) استفاده گردید.

یک لوپ از اندام‌های قارچ که روی محیط PDA در پتری رشد یافته بود، به داخل ارلن حاوی ۵۰ سی سی محیط مایع MS منتقل شد. سپس ارلن حاوی قارچ و محیط مایع MS به‌مدت ۲۰ روز روی شیکر در دمای ۲۰ تا ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. کلنی قارچ به‌صورت توده‌ای توپی شکل (کروی) و سفید رشد کرد (شکل ۱). ارلن حاوی کلنی توپی شکل قارچ با مگنت روکش‌دار به مدت ۳ ساعت روی شیکر مغناطیس قرار گرفته و پس از خرد شدن اندام‌های قارچ، در شرایط سترون با استفاده از یک پمپ خلأ، عصاره گیری قارچ با فیلترهای ۱۰ میلی پور به مدت ۵ ساعت انجام شد. سپس عصاره قارچ حاصل روی محیط کشت PDA کشت داده شد. غلظت عصاره قارچ به سه صورت غلظت کم (شش سی سی عصاره خالص قارچ به اضافه هم حجم آن آب مقطر سترون) غلظت میانگین (شش سی سی عصاره خالص قارچ به اضافه یک سوم حجم آن آب مقطر سترون) و غلظت زیاد (شش سی سی عصاره خالص قارچ) تهیه شد.

مرحله دوم: در شرایط سترون و در زیر هود آزمایشگاه جوانه‌ها از ژوخه‌ها جدا و پس از دو نوبت شستشو با آب مقطر با محلول کلراکس (سفید کننده تجاری حاوی ۵٪ هیپو کلرید سدیم) با نسبت حجمی ۲۰٪ با آب مقطر به مدت ۱۰ دقیقه ضد عفونی شدند. سپس دو بار با آب مقطر سترون آبکشی شدند. همچنین گیاهچه‌های حاصل از کشت مریستم به مدت پنج دقیقه در محلول کلراکس با نسبت حجمی ۱۰٪ با آب مقطر فروبرده شده و سپس سه بار با آب مقطر سترون آبکشی شدند. جوانه‌ها به قطعه‌هایی به طول پنج تا هفت میلی‌متر تقسیم شدند.

۱- Murashige and Skoog

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]

گیاهچه‌های حاصل از کشت بافت به قطعه‌هایی که هرکدام واجد یک جوانه بود تقسیم شدند (طول تقریبی ۵ تا ۱۵ میلی‌متر). قطعه‌های حاصل از جوانه‌ها و گیاهچه‌ها در داخل آب مقطر دوبار تقطیر شده استریل[۱](D.D.W) تا زمان انتقال به محیط کشت نگهداری شدند (به مدت پنج دقیقه). از هورمون‌های برون‌زاد تنها هورمون بنزیل آدنین (BA) به میزان ۲۵ میلی‌گرم در لیتر به هر دو نوع محیط کشت افزوده شد. قبل از انجام مراحل تهیه ریزنمونه محیط کشت‌های موراشیگی و اسکوگ (MS) و نیچ و نیچ[۲] مطابق فرمول‌های استاندارد از محلول‌های ذخیره[۳] تهیه شدند. میزان ۱۵ تا ۲۰ میلی‌لیتر از محیط‌های کشت به هر کدام از ظرف‌های کاشت افزوده شد و با اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع (PSI) به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند. ظرف‌ها نیز پس از سترون‌سازی به زیر هود آزمایشگاه منتقل و بی‌درنگ به داخل هر شیشه کاشت ۵ ریزنمونه منتقل شد. ریزنمونه‌ها قبل از انتقال به محیط کشت به مدت دو ثانیه در محلول الکل اتیلیک ۷۵٪ قرار گرفتند. همزمان با انتقال ریزنمونه‌ها به شیشه‌های کشت، عصاره قارچ که پیشتر با سه غلظت مورد نظر تهیه شده بود به محیط‌های کشت افزوده شد. ظرف‌های کشت بی‌درنگ با پارافیلم مسدود شده و به داخل ژرمیناتوری که دمای موردنظر در شب ۱۸ و در روز ۲۲ تا ۲۵ درجه سلسیوس قابل کنترل بوده و با دوره نوری ۱۴ ساعته با نور کافی از لامپ‌های فلورسنت مجهز بود، منتقل شدند. هر ظرف کشت به عنوان یک واحد آزمایشی در نظر گرفته شد. این پژوهش به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کامل تصادفی انجام شد که شامل رقم در دو سطح (مارفونا و آگریا)، غلظت عصاره قارچ در سه سطح (کم، میانگین، زیاد) و شاهد (آب مقطر خالص) و نوع محیط کشت در دو سطح موراشیگی و اسکوگ و نیچ و نیچ بود.

مرحله سوم: پس از گذشت دوره زمانی چهار تا ۶ هفته‌ای گیاهچه‌های تولیدی از مرحله دوم که چند برگه شده و به طول ۵ تا ۴ سانتیمتر رسیدند شمارش شده و از نظر آلودگی به قارچ مورد بررسی قرار گرفتند. برای انجام آزمون آلودگی قارچی، بخش‌هایی از ریشه و ساقه گیاهچه‌ها جدا شده و با آب به خوبی شستشه شده و پس از خشک شدن با اسکالپل استریل به قطعه‌های کوچک ۱ تا ۵ میلی‌متری برش داده شدند. قطعه‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت یک دقیقه گندزدایی شده و سپس با استفاده از پنس سترون به پتری‌های حاوی آب مقطر سترون منتقل شده و دو بار و هر بار به‌مدت ۲ تا ۳ دقیقه شستشو داده شدند. سپس نمونه‌ها روی کاغذ صافی سترون قرار داده شده و پس از این‌که به طور کامل خشک شدند، به تعداد ۳ تا ۵ عدد در هر پتری حاوی محیط کشت PDA کشت شدند. پتری‌ها در انکوباتور و دمای ۲۵ تا ۲۸ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. پس از گذشت ۲ تا ۳ روز و در صورت آلودگی قارچی در نمونه‌ها، میسلیوم‌هایی به رنگ شیری قابل مشاهده بود (۳). در پایان تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصل از آزمایش با نرم افزار SAS (9.2) انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن[۴] در سطح احتمال خطای ۵٪ استفاده شد.

نتایج

میانگین تولید تعداد گیاهچه در قطعه‌های جوانه

در بررسی این ویژگی داده‌های حاصل از تجزیه واریانس حاکی از این است که اثر رقم و برهمکنش رقم× غلظت عصاره قارچ در سطح ۵٪ معنی‌دار شده است. تولید تعداد گیاهچه در قطعه‌های جوانه زیر تأثیر نوع محیط کشت قرار نگرفت و واکنش قطعه‌های جوانه در دو محیط کشت روال مشابهی را داشته است. برهمکنش محیط کشت × رقم معنی‌دار نشد و این بدان معنی است که دو رقم آگریا و مارفونا در جهت باززایی قطعه‌های جوانه در هر دو محیط کشت یکسان عمل کرده‌اند. برهمکنش محیط کشت در عصاره قارچ و برهمکنش سه جانبه رقم ×

۱- Double Distilled Water
۲- Nitsch and Nitsch
۳- Stock solution
۴- Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]
[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]

محیط کشت × عصاره قارچ معنی‌دار نشد. به این ترتیب مشخص می‌شود که واکنش رقم‌ها به باززایی گیاهچه از قطعه‌های جوانه در هر دو محیط کشت و با هر چهار غلظت عصاره قارچ وضعیت مشابهی را داشته است. اثر غلظت عصاره قارچ بر تولید گیاهچه از قطعه‌های جوانه در سطح ۱٪ معنی‌دار شد.

مقایسه میانگین داده‌های حاصل از اندازه‌گیری تعداد گیاهچه از قطعه‌های جوانه سیب‌زمینی بیانگر این است که غلظت عصاره قارچ حتی در پایین‌ترین غلظت نیز سبب مرگ ریزنمونه‌ها شده و از ادامه رشد و باززایی آن‌ها جلوگیری کرده است. در قطعه‌های جوانه (جدول ۱) تنها در تیمارهای شاهد باززایی صورت گرفت. رقم مارفونا تعداد گیاهچه بیشتری تولید کرد که با میانگین تولید ۲/۶۲ عدد گیاهچه در هر ریز نمونه در مقایسه با رقم آگریا با میانگین تولید ۱/۸۷ عدد گیاهچه در سطح ۵٪ با آزمون دانکن اختلاف معنی‌دار نشان داد. در هر دو رقم و با سه غلظت عصاره قارچ امکان باززایی در هیچ‌کدام از ریزنمونه‌ها وجود نداشت (جدول ۱ و شکل ۱).

میانگین تولید گیاهچه در کشت قطعه‌های گرهی ساقه سیب‌زمینی

در تولید میزان گیاهچه از قطعه‌های گرهی ساقه سیب‌زمینی تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که تنها اثر غلظت عصاره قارچ در سطح ۱٪ معنی‌دار شده است و با دیگر پارامترهای مورد بررسی (رقم و محیط کشت) اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ نشان نداد. بنابراین واکنش دو رقم آگریا و مارفونا برای تولید گیاهچه از قطعه‌های گرهی ساقه یکسان بوده است. هیچکدام از اثرهای برهمکنش رقم × محیط کشت، رقم × عصاره قارچ، محیط کشت × عصاره قارچ و نیز برهمکنش ۳ جانبه رقم × محیط کشت × عصاره قارچ اختلاف معنی‌دار نشان ندادند. با این نتیجه‌ها مشخص می‌شود که هر دو رقم آگریا و مارفونا در دو محیط کشت موراشیگی و اسکوگ و نیز نیچ و نیچ و با هر چهار غلظت عصاره قارچ از نظر میزان تولید گیاهچه از قطعه‌های گرهی ساقه وضعیت مشابهی داشته‌اند.

با مقایسه میانگین داده‌های حاصل از تولید گیاهچه از قطعه‌های گرهی ساقه مشخص شد که تفاوت معنی‌داری از نظر تولید گیاهچه در تیمار شاهد (فاقد عصاره قارچ) و تیماری که عصاره قارچ با غلظت کم استفاده شده بود، وجود نداشت (میانگین تولید ۲/۷ گیاهچه در هر دو تیمار).

مقایسه میانگین داده‌های حاصل از تعداد گیاهچه تولیدی از قطعه‌های گرهی (جدول ۲ و شکل ۳) نشان‌دهنده این امر مهم می‌باشد که در هر دو رقم مارفونا و آگریا در تیمارهایی که عصاره قارچ افزوده شده است، توانایی تولید گیاهچه در ریزنمونه‌ها وجود دارد و تنها در تیمارهایی که عصاره قارچ در غلظت پایین استفاده شده است میزان باززایی اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد (بدون عصاره قارچ) در سطح ۵٪ آزمون دانکن نشان نداده است. در هر دو رقم میانگین تعداد گیاهچه در تیمارهایی که غلظت میانگین و زیاد عصاره قارچ به‌کار گرفته شده بود، بسیار پایین بود و در غلظت زیاد هیچ گیاهچه‌ای تولید نشد و ریزنمونه‌های تک گره پیش از باززایی از بین رفتند. روند تغییرهای دو رقم در پاسخ به باززایی گیاهچه از قطعه‌های گرهی ساقه در دو محیط کشت و با غلظت‌های مختلف از عصاره قارچ به تقریب یکنواخت بود و اختلاف‌ها در سطح ۵٪ آزمون دانکن معنی‌دار نشد (جدول ۲).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]

Fig. 1. Globular dark colonies of *Colletotrichum coccodes* grown in liquid MS medium.

شکل ۱-همگروه‌های توپی شکل تیره رنگ قارچ *Colletotrichum coccodes* در محیط مایع MS.

Fig. 2. Cultivation of potato sprout pieces from Agria cultivar onto MS medium containing *Colletotrichum coccodes* extract.

شکل ۲ -کشت قطعه‌های جوانه سیب‌زمینی از رقم آگریا روی محیط MS حاوی عصاره قارچ *Colletotrichum coccodes*.

Fig. 3. Production of adventitious plantlets derived from potato single node segment in tissue culture media and in combination with low concentrations of extract of *Colletotrichum coccodes*.

شکل ۳- تولید گیاهچه نابجا از کشت قطعه‌های تک گره سیب‌زمینی در محیط کشت بافت و در اختلاط با غلظت کم از عصاره *Colletotrichum coccodes*.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]

جدول ۱- مقایسه میانگین تعداد گیاهچه حاصل از کشت قطعه‌های جوانه سیب‌زمینی در تیمارهای مختلف از مایه‌زنی با عصاره قارچ *Colletotrichum coccodes* در کشت بافت سیب‌زمینی.

Table 1. Comparison of the average number of plantlets from sprout segments of potato in different treatments with inoculation of *Colletotrichum coccodes* in potato tissue culture.

	محیط کشت موراشیگی و اسکوگ Morashige and Skoog medium				محیط کشت نیچ و نیچ Nitch and Nitch medium			
رقم Cultivar	شاهد (عدم مایه‌زنی) Control	غلظت کم عصاره قارچ Low concentration of fungus extract	غلظت میانگین عصاره قارچ Moderate concentration of fungus extract	غلظت بالای عصاره قارچ High concentration of fungus extract	شاهد (عدم مایه‌زنی) Control	غلظت کم عصاره قارچ Low concentration of fungus extract	غلظت میانگین عصاره قارچ Moderate concentration of fungus extract	غلظت بالای عصاره قارچ High concentration of fungus extract
آگریا Agria	2.0 b	0.0 c	0.0 c	0.0 c	1.75 b	0.0 c	0.0 c	0.0 c
مارفونا Marfona	2.5 ab	0.0 c	0.0 c	0.0 c	2.75 a	0.0 c	0.0 c	0.0 c

Means followed by the same letters are not significantly different at 5% using DMRT.

میانگین های با حروف مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون دانکن نشان ندادند

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]

جدول ۲- مقایسه میانگین تعداد گیاهچه حاصل از کشت قطعه‌های تک گره سیب‌زمینی در تیمارهای مختلف از تلقیح با عصاره قارچ *Colletotrichum coccodes* در کشت بافت سیب زمینی.

Table 2. Comparison of the average number of plantlets from single node segments of potato in different treatments with inoculation of *Colletotrichum coccodes* in potato tissue culture.

	محیط کشت موراشیک و اسکوک Morashige and Skoog culture medium				محیط کشت نیچ و نیچ Nitch & Nitch culture medium			
رقم Cultivar	شاهد (عدم مایه‌زنی) Control	غلظت کم عصاره قارچ Low concentration of fungus extract	غلظت میانگین عصاره قارچ Moderate concentration of fungus extract	غلظت بالای عصاره قارچ High concentration of fungus extract	شاهد (عدم مایه‌زنی) Control	غلظت کم عصاره قارچ Low concentration of fungus extract	غلظت میانگین عصاره قارچ Moderate concentration of fungus extract	غلظت بالای عصاره قارچ High concentration of fungus extract
آگریا Agria	2.5 b	2.5 b	1.25 c	0.0 d	2.75 ab	2.75 ab	0.75 c	0.0 d
مارفونا Marfona	3.0 a	2.75 ab	1.5 c	0.0 d	2.75 ab	3.0 a	1.0 c	0.0 d

Means followed by the same letters are not significantly different at 5% using DMRT.

میانگین های با حروف مشابه اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون دانکن نشان ندادند.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]

بحث

در قطعه‌های جوانه با افزودن زادمایه[1]فعال قارچ به محیط کشت بافت حتی در غلظت پایین، بافت‌مردگی جوانه‌ها پس از ۳ روز آغاز شد و بدون این‌که شاخساره‌ای تولید شود، از بین رفتند. اما در قطعه‌های گرهی ساقه و در هر دو رقم مارفونا و آگریا در غلظت‌های پایین عصاره قارچ ریزنمونه‌ها به رشد ادامه داده و باززایی گیاهچه‌ها تکمیل شد. اغلب، انگیزش مقاومت یا تولید گیاهچه مقاوم در محیط کشت بافت با سازوکار تولید متابولیت ثانویه از طریق گیاه میزبان و با خنثی‌نمودن و یا کاهش اثر ماده‌های سمی تولید شده از قارچ عامل بیماری ناشی می‌شود (۱۴، ۱۶). به نظر می‌رسد که قطعه‌های جوانه در مقایسه با قطعه‌های گرهی ساقه حساسیت بسیار بالاتری به عصاره قارچ داشته و توان انطباق با شرایط متابولیکی جدید و سازگار کردن را ندارند. استنباط دیگر از این نتیجه‌ها می‌تواند به این صورت بیان شود که در قطعه‌های جوانه امکان تولید متابولیت‌های ثانویه یا فایتوتوکسین‌های سمی در حدی که بتوانند اثرهای سمی قارچ عامل بیماری را خنثی و یا محدود کنند، فراهم نشده است.

در قطعه‌های گرهی و با اضافه کردن عصاره قارچ با غلظت میانگین به محیط کشت بافت، اگرچه از توان باززایی ریزنمونه‌ها کاسته شد، اما در نهایت باززایی صورت گرفت (میانگین تولید ۰/۴۳ گیاهچه در هر ریزنمونه). از این رو، مشخص می‌شود در زمانی که قطعه‌های تک گره ساقه مورد استفاده قرار می‌گیرند با تلقیح عصاره قارچ در غلظت کم و میانگین به هر دو نوع محیط کشت بافت سیب زمینی، امکان انگیزش مقاومت در گیاهچه‌های باززایی شده به بیماری خال سیاه وجود دارد. این قابلیت اکتسابی می‌تواند نتیجه تغییرهای فیزیولوژیکی متأثر از شرایط محیط کشت بافت و برهمکنش آن با این نوع ریزنمونه باشد. آزمون‌های بعدی نشان داد که گیاهچه‌های تولیدی به بیماری خال سیاه آلودگی نداشتند، (آزمون آلوده نبودن گیاهچه‌ها به بیماری قارچی با کشت قطعه‌های ریشه و ساقه گیاهچه‌ها روی محیط کشت PDA انجا شد). بنابراین، امکان پایداری و تثبیت مقاومت به قارچ عامل بیماری خال سیاه نیز فراهم می‌باشد. به نظر می‌رسد که در زمان باززایی گیاهچه‌های جدید از قطعه‌های گرهی ساقه به ویژه در غلظت کمتر از عصاره قارچ (شش سی سی عصاره خالص قارچ به اضافه هم حجم آن آب مقطر سترون)، ظرفیت تولید ماده‌های سمی گیاهی یا فایتوتوکسین که بازدارنده تثبیت و انتشار قارچ عامل بیماری می‌باشد، در محیط کشت بافت فراهم شده است. بنابراین بخشی از گیاهچه‌های حاصل به طریقی بر عامل بیماری‌زا غلبه کرده و با کسب قدرت باززایی قادر به ادامه رشد شدند. رقم مارفونا در واکنش به میزان باززایی گیاهچه از قطعه‌های گرهی بهتر از آگریا بوده و گیاهچه بیشتری تولید نموده است که این به‌دلیل واکنش متفاوت رقم‌های سیب‌زمینی به باززایی در کشت بافت می‌باشد. در غلظت بالا از عصاره قارچ (شش سی سی عصاره خالص قارچ) در هیچ یک از ریزنمونه‌های قطعه‌های جوانه و تک گره تشکیل جوانه نابجا اتفاق نیفتاد و ریزنمونه‌ها قبل از تشکیل جوانه نابجا بفات‌مرده شده و از بین رفتند. به نظر می‌رسد در غلظت‌های بالا از عصاره قارچ، ریزنمونه‌ها توانایی انجام فعالیت متابولیکی معمول را از دست داده و با جمعیت بیشتر از زادمایه فعال قارچ عامل بیماری، قابلیت انگیختگی و اختصاصی شدن یاخته‌های جدید از ریزنمونه‌ها گرفته شده و قبل از استقرار در محیط کشت بافت منجر به نابودی آن‌ها شود. با این نتیجه‌ها مشخص شد زمانی که عصاره قارچ با غلظت بالاتر به محیط کشت بافت افزوده شده است، در عمل با بالارفتن جمعیت فعال قارچ فرصت و توان کافی در غلبه بر عامل بیماری از ریزنمونه‌ها سلب شده و قبل از تکمیل ظرفیت باززایی از بین رفتند.

۱- Inoculum

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]

قابلیت تولید گیاهچه‌های مقاوم در محیط کشت بافت و در مخلوط با عصاره قارچ عامل بیماری خال سیاه اگرچه پیشتر در سیب زمینی گزارش نشده است اما با نتیجه‌های پژوهش‌های Nyange و همکاران (۱۲، ۱۳) در قهوه همخوانی دارد. هم‌چنین، نتیجه‌های این پژوهش، تولید رگه‌ها و پایه‌های مقاوم به دیگر بیماری‌های قارچی در محیط کشت بافت و در مخلوط با عصاره قارچ‌های بیماری‌زای مهم مانند *Helminthosporium sativum* در جو و گندم (۴)، *Phytophthora parasitica* در توتون (۸)، *Fusarium oxysporum* در میخک (۱۸) و *Elsinoe ampelina* در انگور (۹) را مورد تأیید قرار می‌دهد.

در این آزمایش نوع محیط کشت بر میزان باززایی و تولید گیاهچه مقاوم در دو رقم سیب‌زمینی تفاوت معنی‌دار نشان نداد. به نظر می‌رسد که امکان باززایی و مقاومت اکتسابی حاصل به قارچ عامل بیماری خال سیاه در کشت بافت سیب‌زمینی، زیر تاثیر سطح‌های متفاوت عنصرهای معدنی غذایی در دو محیط کشت نیچ و نیچ و موراشیگی و اسکوگ قرار نمی‌گیرد و بیشتر تغییر غلظت عصاره قارچ و نوع ریزنمونه در واکنش به انگیزش مقاومت تاثیرگذار می‌باشد. ممکن است که سطح هورمون‌های برونز و به‌ویژه نسبت سایتوکینین به اکسین نقش تعیین کننده‌ای در میزان واکنش به باززایی و انگیزش مقاومت به بیماری داشته باشد که در هر دو محیط کشت به‌طورمعمول یکسان می‌باشد. بنابراین در آزمایش‌های تکمیلی می‌تواند این مسئله مورد توجه و آزمون قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در مجموع با نتیجه‌های این پژوهش مشخص شد که در سیب‌زمینی امکان تولید پایه‌های مقاوم به بیماری خال سیاه از اندام‌های شاخساره در محیط کشت بافت و در آمیخته با غلظت‌های میانگین و کم از عصاره فعال قارچ فراهم می‌باشد. بنابراین در غربال‌گری از این بیماری مهم در رقم‌های پر محصول و با کیفیت سیب‌زمینی می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

منابع References

۱. سلطانی، ه. و ع. کریمی. ۱۳۷۴. بررسی اثر تاریخ کاشت روی میزان آلودگی سیب‌زمینی بذری واریته‌های کوزیما، آئولا، دراگا و مورن به قارچ *Colletotrichum coccodes*. سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، گزارش نهایی طرح تحقیقاتی. ۱۲۵ ص.

2. Andrivon, D., J.M. Lucas, C. Guerin and B. Jouan. 1998. Colonization of roots, stolons tubers and stems of various potato (*Solanum tuberosum*) cultivars by the black–dot fungus *Colletotrichum coccodes*. Plant Pathol. 47:440- 445.
3. Carnegie, S.F., J.W. Choiseul. and A.M.I. Roberts. 2003. Detection of *Colletotrichum coccodes* and *Helminthosporium solani* in soils by bioassay. Plant Patho. 52: 13-21.
4. Chawla, H.S. and G. Wenzel, 1987. *In-vitro* selection of barley and wheat for resistance against *Helminthosporium sativum*. Theor. Appl. Genet. 74: 841-845.
5. Cristinzio, G. and A. Testa. 1999. *In vitro* evaluation of resistance of potato cultivars to Phytophthora infestans. Potato Res. 42(1):101-105.
6. Dillard, H.R. 1992. "*Colletrotrichum coccodes*: The pathogen and its Host", In: Bailey, A.J. and Jeger, M.J. "*Colletrotrichum:* Biology, Pathology and control" CAB International. P: 225-236.
7. Effmert, M. and B. Pett. 1992. Latent penetration of the potatoes by *Colletrotrichum coccodes* (wallr.) Hughes its elimination by shoot tip culture and its recontamination in the field. Arch. Phytopat. Plant Protect. 28: 23- 27.
8. Helgeson, J. P., J. D. Kemp, G. T. Haberlach. and D. P. Maxwell. 1972. A tissue culture

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]

system for studding disease resistant Black Shank in Tobacoo callus culture. Phytopatology, 62: 1439-1443.

9. Jayasankar, S., R.E. Litz. and D.J. Gray. 2000. *In vitro* selection of *Vitis vinifera* `Chardonnay` with *Elsinoe ampelina* culture filtrates is accompanied by fungal resistance and enhanced secretion of chitinase. Planta, 211: 200-208.
10. Mohan, S.K., J.R. Davis, L.H. Sorensen and A.T. Schneider. 1992. Infection of aerial parts of potato plants by *Colletotrichum coccodes* and its effects on premature vine death and Yield. Am. Potato J. 69:547-559.
11. Markiewicz, S.M. and L. MIchalczuk. 2015. Stability of *Verticillium dahliae* resistance in tissue culture-derived strawberry somaclones. Hort. Sci. 42 (3): 141- 148.
12. Nyange, N., B. Williamson, R. Mcnicol and C. Hackett. 1995. *In vitro* screen of coffee genotypes for resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*). Ann. Appl. Biol. 127:251-261.
13. Nyange, N., B. Williamson, R. Mcnicol, G. Lyon and C. Hackett. 1995. *In vitro* selection of *Coffea arabica* callus for resistance to partially purified phytotoxic culture filtrates from *Colletotrichum kahawae.* Ann. Appl. Biol. 127:425-439.
14. Ramesh, C., A. Madhu, B. Muthukumar, M. and K. Shahina. 2010. *In vitro* selection: A candidate approach for disease resistance breeding in fruit crops. Asian. J. Plant. Sci. 9 (8):437-446.
15. Sacristan, M-D. 1985. Selection for disease resistance in Brassica cultures. Hereditas Suppl. 3:57-63.
16. Slavov, S. 2005. Phytotoxins and *in vitro* screening for improved disease resistant plants. Biotech. Biotechnologic. Equip. 19:48-55
17. Saxena, G., P.G. Verma, l. Rahman, R.S. Sukla and K. Sushil. 2008. Selection of leaf blight-resistant *Pelargonium graveolens* plants regenerated from callus resistant to a culture filtrate of *Alternaria alternate.* Crop Prot. 27:558-565.
18. Thakur, M., D. Sharma. and S. Sharma. 2002. *In vitro* selection and regeneration of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) plants resistant to culture filtrate of *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. Plant Cell. Rep. 20: 825-828.

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]

Iranian Journal of Horticultural Science and Technology 19 (3): 341-352 (2018)

Effects of using Potato Black Dot Pathogen on Regeneration Resistant Stocks under *in vitro* Conditions

K. Parvizi* and A. Bagheri [1]

In order to screen and induce the resistance of the potato stocks to the *Colletotrichum coccodes*, firstly, healthy seed tubers from two potato cultivars (Marfona and Agria) were placed in suitable conditions to produce sprout and single node. Then, segments of sprouts and single node of 5 to 7 mm were prepared. These segments were transferred to sterilized culture media containing MS and Nitsch & Nitsch mixed with three-dosage mixture of the fungus extract. Flasks of sprouts and nodal segment cuttings transferred into the chamber growth under appropriate temperature and light period until shoots were regenerated. This test arranged by factorial experiment based on randomized complete design with four replications. The factors were selected by cultivar in two level (Agria, Marfona), three concentration of fungus extract; low concentration (Six cc pure fungus extracts plus one volume of sterilized distilled water), Medium concentration (Six cc pure fungus extract plus one third volume of distilled sterilized water) and high concentration (Six cc pure fungus extract), distilled water as control treatment and culture medium in two levels (MS and Nitch & Nitch). After regeneration and production of new plantlets, their contamination and their health were evaluated. The result of the experiment showed that regeneration was not observed in sprout segments in both culture media and in both cultivars with all three concentrations of fungal extract, and only in the control treatment, the sprout segments were able to regenerate. However, regeneration was performed in the single nodes in both cultivars with a low concentration and average fungus extract.

Keywords: Fungus extract, Single node, Sprout, Tissue culture.

1. Assistant Professor, Horticulture Crops Research Department and Research Assistant, Plant Protection Research Department, Hamedan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Hamedan, Iran.

* Corresponding author, Email: (khosroster@gmail.com).

[Downloaded from journal-irshs.ir on 2025-12-08]

[DOR: 20.1001.1.16807154.1397.19.3.2.6]