

واکنش ژنوتیپ‌های گردو به بیماری آنتراکنوز *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & de Note. در گلخانه

Response of Walnut Genotypes to *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & de Note. in Greenhouse

رعنا دستجردی^۱ و داراب حسنی^۱

۱- به ترتیب مربی و استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۰/۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۲/۱۷

چکیده

دستجردی، ر.، و حسنی، د. ۱۳۸۸. واکنش ژنوتیپ‌های گردو به بیماری آنتراکنوز *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & de Note. در گلخانه. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۵: ۴۴۹-۴۳۳.

Gnomonia leptostyla فرم جنسی قارچ *Marssonina juglandis* عامل بیماری لکه سیاه یا آنتراکنوز گردو، از جمله مهم‌ترین بیماری‌های این محصول در مناطق مختلف گردوکاری دنیا است. در این تحقیق مقاومت نسبی یازده ژنوتیپ گردو (موجود در کلکسیون گردو کمال شهر کرج) به صورت آزمایش فاکتوریل در پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور، جدایه قارچی در سه سطح و ژنوتیپ‌های گردو در یازده سطح، ارزیابی شد. پس از پیوند ژنوتیپ‌های مورد نظر بر روی پایه بذری، مایه‌زنی نهال‌ها با سوسپانسیون اسپور قارچ با غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر انجام شد. نتایج نشان داد که بیشترین جوانه‌زنی کنیدی‌ها در سطح بالائی برگ‌ها رخ داده است. اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی روی ژنوتیپ‌های Z60 و Hartley مشاهده شد. اندام‌های تولید مثل غیر جنسی، ۲۷ روز پس از مایه‌زنی، نخست بر روی ژنوتیپ K72 ظاهر شدند. دو ماه پس از مایه‌زنی، تعداد لکه‌ها و قطر آن‌ها روی برگ‌ها یادداشت‌برداری و پس از تعیین مساحت برگ، درصد سطح آلوده برگ در هر گیاه محاسبه شد. نتایج نشان داد که بین ارقام و ژنوتیپ‌های گردو از نظر میزان آلودگی (تعداد لکه‌ها و اندازه لکه‌ها) اختلاف معنی‌دار وجود دارد. بیشترین درصد سطح آلوده برگ در ژنوتیپ‌های Z60، K72 و رقم Hartley مشاهده شد. ارقام *Ronde de montignac* و *Vina* کمترین درصد سطح آلوده برگ را نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: گردو، ارقام و ژنوتیپ‌ها، آنتراکنوز، *Gnomonia leptostyla*، مقاومت نسبی.

مقدمه

۷۰ درصد نیز گزارش شده، اما در حال حاضر برآورد آماری دقیقی از میزان خسارت اقتصادی بیماری در ایران وجود ندارد (Saremi et al., 2003).

گرچه کنترل شیمیایی بیماری لکه سیاه گردو تا حدودی امکان پذیر است، اما امروزه در بسیاری از کشورهای جهان برنامه های مدونی برای انتخاب و گزینش ارقام مقاوم یا متحمل گردو در حال اجرا است (Shawn, 1995). محدودیت کاربرد سموم شیمیایی در بخش های بالائی تاج درختان گردو، اثر زیست محیطی این ترکیبات، تاثیر اندک سایر روش های کنترل و همچنین حساسیت گردوی ایرانی به بیماری آنتراکنوز (Black and Neely, 1978a)، سبب شده است تا بیماری شناسان و به‌نژادگران درختان میوه، مهم ترین استراتژی منطقی برای مبارزه با بیماری لکه سیاه گردو را دستیابی به ارقام مقاوم یا متحمل معرفی کنند. آنچه بر اهمیت شناسائی و استفاده از ارقام مقاوم می افزاید تغییر مقدار و شدت بیماری لکه سیاه از منطقه ای به منطقه دیگر و یا از یک سال به سال دیگر است (Shawn, 1995). باید اشاره کرد که بر اساس مطالعات انجام شده، وراثت پذیری صفت مقاومت به بیماری آنتراکنوز در گردوی سیاه بسیار بالا برآورد شده است (Beineke and Masters, 1973). این موضوع نشان می دهد که امکان اصلاح ژنتیکی ارقام گردو از نظر مقاومت به این بیماری مخرب وجود دارد (Reid, 1990). ارزیابی مقاومت از

بیماری لکه سیاه یا آنتراکنوز گردو، *Gnomonia leptostyla*، که فرم غیر جنسی آن *Marssonina juglandis* (Lib.) Magn. است از مهم ترین بیماری های قارچی گردو (*Juglans* spp.) در اکثر مناطق گردوکاری دنیا و از جمله ایران به شمار می رود. عامل بیماری روی گردوی سیاه (*Juglans nigra*) سبب بروز خسارت اقتصادی می شود (Matteoni and Neely, 1979). بیماری آنتراکنوز روی گردوی ایرانی (*J. regia*)، اولین بار در سال ۱۸۱۵ از اروپا گزارش شد (Teviotdale et al., 2002). قارچ عامل بیماری در شرایط مرطوب به سرعت گسترش یافته و سبب ریزش زودرس برگ ها می شود. این امر موجب کاهش رشد درختان شده و در صورت ادامه بیماری برای چند سال متوالی خطر خشکیدگی و مرگ، درختان را تهدید می کند (Berry, 1960). بیماری آنتراکنوز از مناطق مختلف ایران نیز گزارش شده است. اولین بار در سال ۱۳۳۱ خیبری، در سال ۱۳۴۲ اسکندری و در سال ۱۳۴۴ شریف و ارشاد بیماری را از مناطق مختلف ایران گزارش کردند (Ershad, 1995). ربیعی فر (Rabieifar, 1997) در مطالعات خود این بیماری را در بیش از هشتاد منطقه گردوکاری کشور ردیابی کرده است. اگر چه خسارت بیماری در برخی از باغات شمال غرب ایران تا

بالا به بیماری گزارش شده است (Revin, 1981).

در سال‌های ۱۹۹۰-۱۹۸۶ عکس‌العمل ۳۷ ژنوتیپ گردو در برابر قارچ *G. leptostyla* در شرایط طبیعی مورد مقایسه قرار گرفت. در این تحقیق اگر چه ژنوتیپ کاملاً مقاومی در برابر بیماری یافت نشد، اما برخی ژنوتیپ‌ها از نظر دیر برگ‌دهی نسبت به سایر ارقام از مقاومت بالایی برخوردار بوده و نسبتاً مقاوم به بیماری گزارش شدند. در این میان ژنوتیپ‌های Paradox و Franquette کمتر از ۱۰٪ آلودگی برگ را نشان دادند (Balaz et al., 1993).

پاسـتوره و همکاران (Pastore et al., 1997) ۳۲ رقم گردو را از نظر میزان حساسیت به قارچ عامل آنتراکنوز در شرایط طبیعی و در یک کلکسیون گردوی عاری از ویروس مورد مطالعه قرار دادند. در این بررسی ارقام مورد آزمایش از نظر حساسیت به *G. leptostyla* در پنج گروه مختلف جای گرفتند. قارچ عامل بیماری آلودگی بسیار کمی را در ارقام Hartley (از امریکا) و Mayette (از فرانسه) ایجاد کرد، اما ارقام Jefe و VZ5 حساسیت فوق‌العاده‌ای را در برابر بیماری نشان دادند.

تحقیقات اولیه پیرامون یافتن منابع مقاومت به آنتراکنوز در جنس *Juglans* و در دو منطقه مختلف آب و هوایی ایتالیا، حساسیت فوق‌العاده زیاد *J. nigra* و *J. hindsii* را در برابر قارچ

طرق مختلف انجام می‌شود، اما آنچه مهم است داشتن اطلاعات کافی در خصوص عامل بیماری و چرخه زندگی آن است. جمعیت‌های گیاهی انتخاب شده می‌توانند در گلخانه، نهالستان، مزرعه و حتی در محیط‌های آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گیرند. در بسیاری از موارد، آزمایش‌های گلخانه‌ای جایگزین ارزیابی‌های مزرعه‌ای شده‌اند. در این گونه آزمایش‌های معمولاً نتایج تحقیق قابل اطمینان بوده و از تکرار پذیری مطلوبی برخوردار است (Shawn, 1995).

بری (Berry, 1960) در تحقیقات خود پیرامون یافتن ارقام و ژنوتیپ‌های مقاوم به بیماری آنتراکنوز، دامنه وسیعی از حساسیت را در ارقام مختلف شناسایی کرد. مطالعات او نشان داد که اگر چه ارقام گردوی سیاه Thomas و Ohio به بیماری لکه سیاه مقاوم معرفی شده‌اند، اما در شرایط بسیار مناسب برای گسترش بیماری، این ارقام نیز درصدی از آلودگی را نشان می‌دهند.

گونه *J. ailantifolia* و برخی از ارقام *J. regia* در مقایسه با گونه‌های *J. nigra* و *J. major* از مقاومت بالاتری در برابر آنتراکنوز برخوردار هستند، ولی تحقیقات نشان داده است که بین درصد آلودگی برگ‌ها و ریزش آن‌ها رابطه مستقیمی وجود ندارد (Black and Neely, 1978b). در بین ۱۱۲ رقم محلی غربال شده در شرایط و موقعیت‌های طبیعی اکراین، نوزده رقم با مقاومت فوق‌العاده

ارومیه اشاره کرد. در آن بررسی ژنوتیپ B21 حساس‌ترین و ژنوتیپ‌های OR4 و T19 از مقاومت بالایی برخوردار بودند (Rabieifar, 1997). صارمی و همکاران (Saremi et al, 2003) نیز در یک بررسی مقدماتی در سال‌های ۱۳۷۶ تا ۱۳۸۰، مقاومت نسبی توده‌های محلی گردو به لکه سیاه را در منطقه قزوین ارزیابی کردند. در این تحقیق توده موتی به عنوان توده مقاوم گزارش شده است. هدف از این پژوهش، مطالعه عکس‌العمل یازده رقم و ژنوتیپ گردو موجود در کلکسیون باغ تحقیقاتی کمال‌شهر کرج در شرایط گلخانه‌ای و در برابر قارچ عامل بیماری لکه سیاه بود.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی

در بهمن ماه ۱۳۸۴ و ۱۳۸۵ نهال‌های گردوی بذری دو ساله از نهالستان خارج و برای پیوند به گلخانه بخش تحقیقات باغبانی منتقل شدند. همزمان، پیوندک یازده ژنوتیپ مختلف گردو (Z60, Z63, Z67, K72, Serr, Vina, Franquette, Ronde de montignac, Pedro, Lara و Hartley) از کلکسیون گردو در باغ تحقیقاتی کمال‌شهر کرج تهیه و با استفاده از روش پیوند شاخه روی پایه بذری پیوند شدند. از هر ژنوتیپ تعداد ۵۰-۴۰ نهال پیوندی آماده شد. نهال‌های پیوند شده ابتدا در جعبه‌هایی با بستر پرلیت و در اتاقکی با دمای

عامل بیماری نشان داد. در این مطالعات *J. sieboldiana* و *J. cinerea* کاملاً مقاوم گزارش شدند. گردوی ایرانی (*J. regia*) نیز عکس‌العمل متوسطی را در مقابل بیماری بروز داد (Belisario et al., 2008).

گزارش‌های مختلف حاکی از آن است که ارقام گردوی سیاه (*J. nigra*) از نظر حساسیت به بیماری لکه سیاه اختلاف دارند (Berry, 1960). گروهی از محققین در ارزیابی‌های مزرعه‌ای، *J. regia* را یک گونه نسبتاً حساس و *J. nigra* را مقاوم به آنتراکنوز گزارش کرده‌اند. هیبریدهای بین گونه‌ای (*J. nigra* N23 × *J. regia*) NG23 و (*J. magor* × *J. regia*) MJ209 نیز مقاومت حدواسطی را از خود نشان داده‌اند. وجود همبستگی معنی‌دار بین قدرت رشد درخت و وقوع بیماری آنتراکنوز در گونه گردوی ایرانی و هیبرید NJ23 تأییدکننده کاهش رشد درخت در برابر حمله شدید قارچ عامل بیماری است (Annunziati et al., 2007).

مطالعات و تحقیقات گلخانه‌ای انجام شده در راستای بررسی میزان مقاومت ارقام و ژنوتیپ‌های گردو به بیماری آنتراکنوز در ایران بسیار اندک است. برخی مطالعات پراکنده در نقاط مختلف کشور منجر به معرفی ژنوتیپ‌ها و یا توده‌های مقاوم به آنتراکنوز در شرایط طبیعی و مزرعه‌ای شده‌اند. از آن جمله می‌توان به ارزیابی مقاومت نسبی ژنوتیپ‌های گردو به بیماری لکه سیاه در کلکسیون گردوی کهریز

(Matteoni and Neely, 1979).

مایه‌زنی نهال‌های پیوندی و ارزیابی مقاومت

ژنوتیپ‌ها

آزمایش ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های گردو در قالب آزمایش فاکتوریل در پایه کاملاً تصادفی انجام شد. در این آزمایش، دو فاکتور جدایه قارچی (در سه سطح) و ژنوتیپ‌های گردو (در یازده سطح) مورد آزمون قرار گرفتند. برای هر ژنوتیپ دو گلدان (تکرار) در نظر گرفته شد. در اطراف نهال‌های آزمایشی، دو ردیف نهال به عنوان حاشیه (Guard) مورد استفاده قرار گرفتند.

نهال‌های گردوی پیوندی از یازده ژنوتیپ مختلف، ۲-۱ ساعت قبل از مایه‌زنی به طور کامل آبیاری شده و سه برگ بالایی هر گلدان برای مایه‌زنی علامت گذاری شد. پس از تهیه سوسپانسیون اسپور از هر کدام از جدایه‌های قارچی، مایه قارچ آماده و مایه‌زنی در اواخر عصر انجام شد. سوسپانسیون کینیدی قارچ بر روی برگ‌ها به نحوی مه‌پاشی شد که از تماس مستقیم اسپور با برگ‌ها جلوگیری شده و فقط مه غلیظی از اسپور در فضای بالای گلدان‌ها ایجاد شد. گلدان‌های شاهد با آب مقطر استریل مایه‌زنی و در کنار سایر گلدان‌ها در گلخانه جای گرفتند. پس از مایه‌زنی، بلافاصله گلدان‌ها با پوشش‌های پلاستیکی شفاف پوشیده شدند. برای حفظ رطوبت گلخانه، از دستگاه رطوبت‌ساز استفاده شد. پوشش‌های پلاستیکی ۴۰ ساعت پس از مایه‌زنی برداشته شده و

۲۸-۲۶°C و رطوبت بالای ۸۰ درصد به مدت یک ماه قرار گرفتند. پس از تشکیل کالوس و گیرایی پیوند، نهال‌ها از جعبه خارج و در گلدان‌های پلاستیکی پنج لیتری حاوی مخلوطی از خاک، ماسه، پرلیت و کود دامی پوسیده به نسبت ۱/۴:۱:۱:۲ کاشته شدند. گلدان‌ها به گلخانه منتقل شده و مراقبت‌های لازم از آن‌ها به عمل آمد.

جمع‌آوری، جداسازی و تهیه مایه قارچ

سه جدایه قارچی مورد استفاده در این تحقیق (جدایه‌های No1، Kh4 و V2 به ترتیب جمع‌آوری شده از مناطق کلیبر، مرکزی و ورزقان میانه در استان آذربایجان شرقی) در تابستان و پائیز ۱۳۸۴ و ۱۳۸۵ جداسازی و مطابق روش هو و کو (Ho and Ko, 1997) خالص‌سازی شدند. شناسایی این جدایه‌ها بر اساس خصوصیات ماکروسکوپی و ویژگی‌های میکروسکوپی انجام شد (Alexopoulos et al., 1996). آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های مذکور روی دانهال‌های بذری و یک ساله گردو انجام و پس از تأیید بیماری‌زایی آن‌ها، این جدایه‌ها برای آزمایش‌های ارزیابی مقاومت برگزیده شدند.

مایه قارچ، سوسپانسیون اسپور با غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر استریل بود که از کشت‌های خالص و ۲۵ روزه قارچ، رشد یافته در روی محیط کشت Oat Meal یا Corn Meal Agar (CM) Agar (OMA) به دست آمده بودند

شده در هر گیاه، طول و عرض هر برگچه، تعداد لکه در برگچه‌های آلوده، قطر لکه و وجود یا عدم وجود آسروول روی برگ‌ها انجام شد. با محاسبه مساحت برگ و شاخص آلودگی $[3/14 \times (2/2 \text{ قطر لکه}) \times \text{تعداد لکه}]$ ، درصد سطح آلوده برگ در هر نهال تعیین شد. داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه آماری شدند. مقایسه میانگین‌ها نیز به کمک آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. به این ترتیب میانگین درصد سطح آلوده برگ، به عنوان معیاری برای ارزیابی مقاومت یا تحمل نسبی هر رقم یا ژنوتیپ مورد استفاده قرار گرفت.

نتایج و بحث

مشاهدات اولیه از استقرار عامل بیماری در بافت

های گیاهی

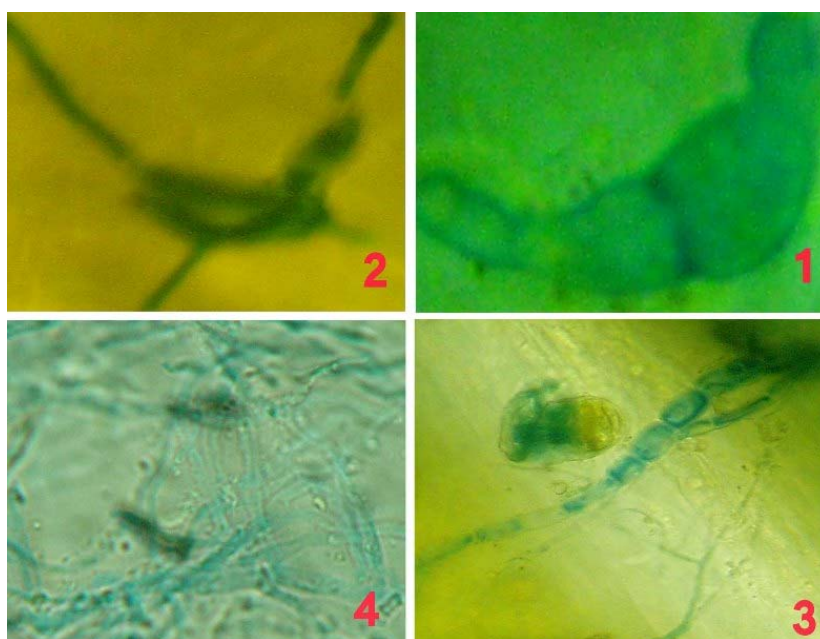
چهل و هشت ساعت پس از مایه‌زنی، اولین نشانه‌های تورم و جوانه‌زنی کنیدی‌های قارچ در نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده بافت برگ مشاهده شد. بررسی‌های انجام شده در این تحقیق نشان داد که بیشترین جوانه‌زنی کنیدی‌ها در سطح بالایی برگ‌ها رخ داده و درصد کمی از اسپوره‌های قرار گرفته در بخش زیرین برگ در ایجاد آلودگی موثر بودند (شکل ۱). این یافته‌ها با نتایج محققین دیگر تطابق کامل داشت (Cline and Neely, 1983). آن‌ها در گزارش خود بیان کردند که ۱۶۸ ساعت (هفت روز) پس از مایه‌زنی نهال‌های گردوی سیاه

گلدان‌ها برای بررسی ظهور علائم و نحوه پیشرفت آن‌ها، روزانه مورد بازدید قرار گرفتند (Cline and Neely, 1983). متوسط دما و رطوبت گلخانه تا زمان حذف پوشش‌های پلاستیکی گلدان‌ها به ترتیب 22°C و ۸۹٪ بود ولی میزان رطوبت در زیر پوشش‌های پلاستیکی در حد اشباع بود. پس از استقرار عامل بیماری و ظهور علائم، جداسازی مجدد قارچ از نهال‌های آلوده انجام شد.

به منظور ردیابی کنیدی‌های جوانه‌زده در بافت برگ، ۲-۳ روز پس از مایه‌زنی، برگ تعدادی از نهال‌های حاشیه یا گارد به طور تصادفی جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. عملیات رنگ‌زدائی در محلول اتانول-اسیداستیک (به نسبت حجمی ۱:۱) انجام شد (Cline and Neely, 1983). نحوه جوانه‌زنی اسپور، نفوذ قارچ به داخل سلول‌ها، استقرار و گسترش قارچ عامل بیماری در بافت‌های رنگ‌آمیزی شده برگ، به وسیله میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت.

متوسط دما و رطوبت گلخانه در طی آزمایش و پس از حذف پوشش‌های پلاستیکی تا ظهور علائم به ترتیب $21/9^{\circ}\text{C}$ و ۷۸٪ اندازه‌گیری و ثبت شد.

برای ارزیابی بیماری، به ترتیب ۱، ۲ و ۳/۵ ماه پس از مایه‌زنی، وضعیت آلودگی ژنوتیپ‌ها با بررسی میزان پیشروی قارچ در بافت برگ تعیین شد. برای این کار یادداشت‌برداری از تعداد کل برگچه‌های سه برگ علامت‌گذاری



شکل ۱- تورم (۱) و جوانه‌زنی اسپور قارچ (۲) چهل و هشت ساعت پس از مایه‌زنی، انشعابات هیفی (۳) و کلونیزه شدن بافت‌های برگ گردو (۴)؛ ۹۶-۱۲۰ ساعت پس از مایه‌زنی با قارچ *G. leptostyla* (۴۰X)

Fig. 1. Swelling (1) and spore germination (2) 48 hours after inoculation; hyphal branches (3) and colonization of walnut leaf 96-120 hours after inoculation with *G. leptostyla* (40X)

چهار روز پس از مایه‌زنی به صورت نقاط ریز به رنگ قهوه‌ای کم رنگ با حاشیه سفید-خاکستری و در سطح برگ‌ها نمایان شد (شکل ۲). در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، اولین علائم روی ژنوتیپ Z60 و رقم Hartley مشاهده شد. لکه‌ها به تدریج گسترش یافته، گاهی به همدیگر متصل و به تدریج به رنگ قهوه‌ای تیره درآمدند. حدود ۲۷ روز پس از مایه‌زنی، اندام‌های تولید مثل غیر جنسی قارچ در سطح بالائی برگ‌ها (اولین بار روی برگ‌های ژنوتیپ K72) ظاهر شدند. جداسازی مجدد عامل بیماری و وجود کنیدی‌های باسیلی

(*J. nigra*)، میسیلیوم قارچ وارد مزوفیل برگ شده و پس از سپری شدن این زمان، زخم‌های نکره‌وز سلول میزبان از نظر میکروسکوپی قابل رویت بودند اما زخم‌های ماکروسکوپی ده روز بعد از مایه‌زنی مشاهده شدند. این محققین معتقدند که اطلاعات مرتبط با نحوه استقرار و توسعه قارچ در برگ‌های گردو می‌تواند راهنمای خوبی برای بیماری شناسان در برنامه‌های مقاومت به بیماری باشد و آن‌ها را در تفسیر موفقیت و یا عدم موفقیت روش‌های کنترل یاری کند. در این پژوهش اولین علائم ماکروسکوپی



شکل ۲- بروز اولین علائم آلودگی در سطح زیرین (۱) و روئی (۲) برگ‌ها چهار روز پس از مایه‌زنی، گسترش لکه‌ها دو ماه پس از مایه‌زنی (۳) و ظهور آسروول‌ها (۴) در ژنوتیپ حساس Z60 گردو

Fig. 2. First symptoms of infection in lower (1) and upper (2) leaf surfaces four days after inoculation, development of spots two months after inoculation (3) and appearance of acervuli (4) on leaves of susceptible genotype of walnut (Z60)

است بین جدایه‌های قارچی از نظر تعداد لکه ایجاد شده روی برگ اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در میان سه جدایه مورد آزمایش، جدایه V2 سبب تشکیل بیشترین تعداد لکه بر روی برگ‌ها شد، اما جدایه‌های Kh4 و No1 از نظر تعداد لکه ایجاد شده اختلاف چندانی با یکدیگر نداشتند (جدول ۲). اندازه لکه‌های ایجاد شده توسط هر سه جدایه نسبتاً یکسان بود، اما بیشترین بیماری‌زائی و درصد سطح آلوده برگ مربوط به جدایه V2 بود (جدول ۲).

نتایج حاصل از اندازه‌گیری تعداد لکه‌های تشکیل شده روی ژنوتیپ گردو نشان داد که از این نظر بین ژنوتیپ‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با استفاده

شکل، دو سلولی و شفاف، حضور قارچ را در بافت‌های آلوده تأیید کرد. در گلدان‌های شاهد هیچ‌گونه علائمی از بیماری مشاهده نشد.

ارزیابی واکنش ارقام و ژنوتیپ‌های گردو در

برابر بیماری آنتراکنوز

نتایج حاصل از تجزیه واریانس تعداد لکه، قطر لکه و درصد سطح آلوده برگ دو ماه پس از مایه‌زنی در جدول ۱ نشان داده شده است. این نتایج بیانگر آن است که اثر جدایه‌های مختلف قارچی بر صفات مورد اندازه‌گیری معنی‌دار بود، بین ارقام و ژنوتیپ‌های گردو نیز از نظر میزان آلودگی (تعداد لکه‌ها و اندازه لکه‌ها) اختلاف معنی‌دار وجود داشت.

همان‌گونه که در جدول ۱ مشخص شده

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر جدایه‌های مختلف قارچ *G. leptostyla*، ژنوتیپ‌های گردو و اثر متقابل آن‌ها بر صفات اندازه‌گیری شده دو ماه پس از مایه‌زنی
 Table 1. Variance analysis for effects of different isolates of *G. leptostyla*, walnut genotypes and their interactions on measured traits two months after inoculation

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	میانگین مربعات MS			
			تعداد لکه Number of spot	قطر لکه Diameter of spot	شاخص آلودگی Index of infection	درصد سطح آلوده برگ Infected area of leaf (%)
Isolate (I)	جدایه قارچ	2	4.63**	0.09 ^{ns}	2.81**	0.55**
Genotype (G)	ژنوتیپ	10	2.32**	0.16**	1.58**	0.23**
G×I	جدایه × ژنوتیپ	20	1.46**	0.10**	1.25**	0.24**
Error	خطا	22	0.45	0.03	0.24	0.01
Total	کل	54				
%CV	ضریب تغییرات		38.5	27.6	63	32.8

ns and **: Not significant and significant at 1% probability level, respectively.

.ns و **: به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطح احتمال ۱٪.

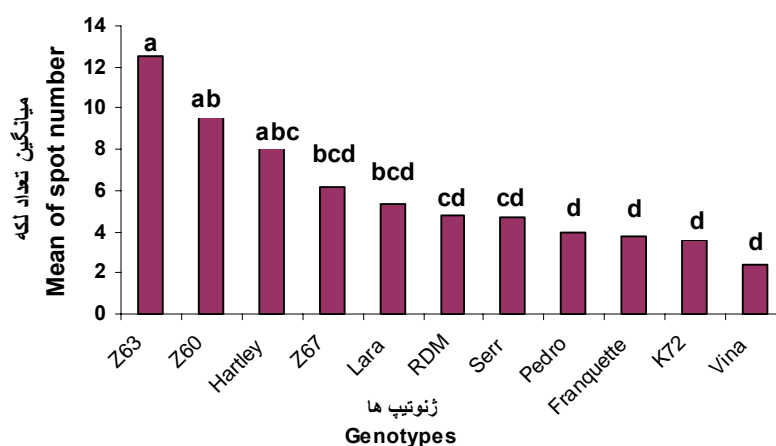
جدول ۲- اثر جدایه های مختلف قارچ بر میانگین صفات اندازه گیری شده

Table 2. Effect of different fungal isolates on means of measured traits

جدایه قارچ	تعداد لکه	قطر لکه	درصد سطح آلوده برگ
Isolate	Number of spot	Diameter of spot (mm)	Infected area of leaf (%)
Kh	3.63b	0.71a	0.18b
No1	5.55b	0.77a	0.35b
V2	9.18a	0.88a	1.36a

میانگین‌ها با حروف مشترک در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد هستند (آزمون چند دامنه دانکن)

Means followed by similar letters in each column are not significantly different at 1% levels of probability (Duncan's multiple range test).



شکل ۳- مقایسه میانگین تعداد لکه ایجاد شده توسط جدایه‌های *G. leptostyla* روی ژنوتیپ‌های گردو

Fig. 3. Mean number of spots produced by *G. leptostyla* on leaves of different walnut genotypes

ستون‌ها با حروف مشترک در سطح احتمال ۱٪ فاقد اختلاف معنی‌دار هستند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

Bars with similar letters are not significantly different at 1% level of probability (Duncan's multiple range test).

متقابل جدایه قارچی و ژنوتیپ نیز معنی‌دار بود، به این صورت که جدایه V2 نسبت به دو جدایه دیگر تعداد لکه بیشتری را روی اکثر ارقام یا ژنوتیپ‌ها به وجود آورده بود (جدول‌های ۱ و ۳).

از آزمون دانکن انجام و نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده ژنوتیپ Z63 بیشترین تعداد لکه و ارقام Pedro, Franquette, Vina و ژنوتیپ K72 کمترین تعداد لکه را داشتند (شکل ۴). اثر

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات مختلف مربوط به بیماری آنتراکنوز اندازه گیری شده برای جدایه‌های مختلف قارچ *G. leptostyla* در ژنوتیپ‌های گردو

Table 3. Mean comparison of traits related to disease assessed for different isolates of *G. leptostyla* in different walnut genotypes

ژنوتیپ	جدایه	تعداد لکه	قطر لکه	درصد سطح آلوده برگ
Genotype	Isolate	Number of spot	Diameter of spot(mm)	Infected area of leaf (%)
Z60	Kh	1.20fghi	0.77cdefgh	0.05b
Z60	No	8.20defghi	0.90bcdefgh	0.53b
Z60	V2	20.20a	1.85a	8.42a
Z63	Kh	10.30bcd	1.00abcdefg	0.62b
Z63	No	17.40ab	0.47efgh	0.13b
Z63	V2	9.80cde	0.77cdefgh	0.32b
Hartley	Kh	2.20efghi	0.76cdefgh	0.10b
Hartley	No	9.25cdef	1.05abcdefg	1.00b
Hartley	V2	16.00abc	1.34abcd	1.89b
Lara	Kh	1.00hi	0.64cdefgh	0.16b
Lara	No	4.50defghi	1.30abc	0.98b
Lara	V2	10.10bcde	0.48efgh	0.16b
Serr	Kh	0.30i	0.25gh	0.003b
Serr	No	3.20defghi	0.59cdefgh	0.16b
Serr	V2	8.30defgh	1.30abcde	0.58b
RDM	Kh	0.30i	0.30gh	0.07b
RDM	No	4.80defghi	0.41fgh	0.10b
RDM	V2	9.130cdef	0.37fgh	0.17b
Franquette	Kh	4.20defghi	0.75cdefgh	0.20b
Franquette	No	2.30efghi	0.41fgh	0.04b
Franquette	V2	4.80defghi	1.18abcdef	0.50b
Pedro	Kh	2.20efghi	0.54defgh	0.08b
Pedro	No	6.50defghi	0.84cdefgh	0.52b
Pedro	V2	3.20defghi	0.42fgh	0.17b
K72	Kh	4.80defghi	0.80cdefgh	0.09b
K72	No	3.00efghi	1.81a	1.00b
K72	V2	3.00efghi	1.60ab	0.87b
Vina	Kh	6.00defghi	0.76cdefgh	0.13b
Vina	No	0.40hi	0.59cdefgh	0.18b
Vina	V2	0.80hi	0.18h	0.01b
Z67	Kh	8.10cdefg	1.32abcd	0.54b
Z67	No	3.40defghi	0.71cdefgh	0.14b
Z67	V2	6.90defghi	1.00abcdefg	0.38b

ستون‌ها با حروف مشترک در سطح احتمال ۱٪ فاقد اختلاف معنی دار هستند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

Bars with similar letters are not significantly different at 1% level of probability (Duncan's multiple range test).

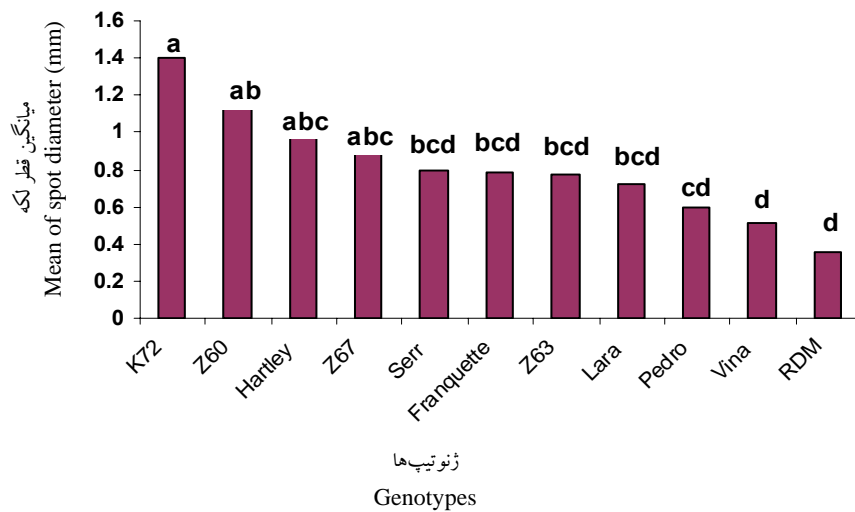


شکل ۴- مقایسه تعداد لکه روی برگ‌های ژنوتیپ Z63 و رقم Franquette، دو ماه پس از مایه‌زنی
Fig. 4. Comparison of number of spots on leaves of Z63 and Franquette, two months after inoculation

به نفوذ در بافت برگ بوده و لکه‌های نکروز اولیه به تعداد کمتری در این ژنوتیپ ایجاد شده است. آن دسته از کینیدی‌هایی که موفق به عبور از سد دفاعی گیاه شده‌اند، به راحتی در داخل بافت گیاه گسترش یافته و لکه‌های بزرگ‌تری را به وجود آورده‌اند. بزرگ بودن اندازه لکه‌ها در این ژنوتیپ می‌تواند به دلیل عدم وجود حصارهای دفاعی ساختمانی و بیوشیمیایی فعال در داخل بافت گیاه باشد. کلاین و نیلی (Cline and Neely, 1983) تشکیل پاپیل را در اطراف میخ‌رخنه (Infection peg)، یکی از دلایل مقاومت نسبی برخی از ارقام گردوی سیاه در برابر قارچ عامل بیماری آنتراکنوز عنوان کرده‌اند. تشکیل آسروول‌ها برای اولین بار در روی برگ‌های این ژنوتیپ (K72) نیز موید رشد و فعالیت مطلوب قارچ در بافت برگ بود. کوچک‌ترین لکه‌ها در ارقام Vina، Pedro و RDM (Ronde de montignac) تشکیل شد (شکل‌های ۶ و ۵). در بررسی‌های آماری این

لازم به ذکر است گلدان‌های شاهد که با آب مقطر استریل مایه‌زنی شده بودند، هیچ‌گونه علائمی از آلودگی را نشان ندادند.

نتایج حاصل از اندازه‌گیری قطر لکه‌ها دو ماه پس از مایه‌زنی بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین ژنوتیپ‌های مختلف بود (جدول ۱). مقایسه میانگین‌های به دست آمده با استفاده از آزمون دانکن نشان داد که علیرغم تولید حداقل تعداد لکه روی ژنوتیپ K72، بزرگ‌ترین لکه‌های نکروز روی این ژنوتیپ به وجود آمدند. باید اشاره شود که گیاهان ممکن است در برابر حمله بیمارگرها از چندین مکانیسم دفاعی مختلف به صورت توأم استفاده کرده و نفوذ بیمارگر را محدود می‌سازند. به نظر می‌رسد در ژنوتیپ K72 وجود ساختارهای دفاعی پیش ساخته و یا ممانعت‌کننده‌های بیوشیمیایی پیش ساخته، نفوذ بیمارگر را به داخل بافت گیاه با مشکل مواجه کرده است، از این رو در این ژنوتیپ تعداد کمتری از اسپورهای قارچ قادر



شکل ۵- مقایسه میانگین قطر لکه‌های ایجاد شده توسط جدایه‌های قارچ *G. leptostyla* روی برگ ژنوتیپ‌های گردو

Fig. 5. Mean diameter of spots produced by *G. leptostyla* on leaves of different walnut genotypes

ستون‌ها با حروف مشترک در سطح احتمال ۱٪ فاقد اختلاف معنی‌دار هستند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

Bars with similar letters are not significantly different at 1% level of probability (Duncan's multiple range test).



شکل ۶- مقایسه اندازه لکه‌ها روی برگ‌های ژنوتیپ K72 و رقم Round de montignac، دو ماه بعد از مایه‌زنی

Fig. 6. Comparison of spots size on leaves of K72 and Round de montignac (RDM), two months after inoculation

بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در بین جدایه‌ها بود. بین ژنوتیپ‌های مختلف نیز از نظر درصد سطح آلوده برگ تفاوت معنی‌داری وجود

صفت، اثر متقابل جدایه و ژنوتیپ نیز معنی‌دار شد (جدول‌های ۱ و ۳).

نتایج مربوط به درصد سطح آلوده برگ،

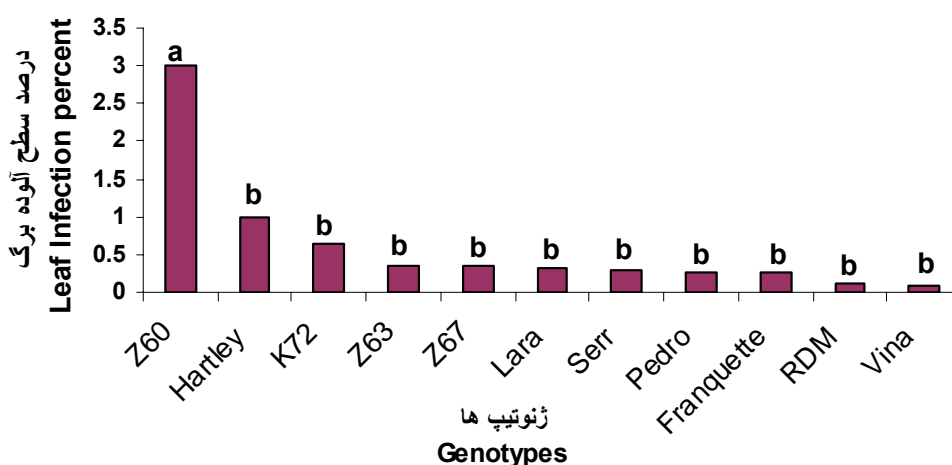
بالاترین درصد سطح آلوده برگ را نیز در بین ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به خود اختصاص داده بود. اندازه لکه ناشی از این جدایه قارچی بر روی ژنوتیپ مذکور نیز قابل توجه بود.

هر سه جدایه قارچی مورد استفاده در آزمایش‌های ارزیابی مقاومت، همان‌گونه که در آزمون‌های اثبات بیماریزائی تولید آسروول کرده بودند، حداکثر پس از دو ماه و نیم توانستند بر روی گیاهان پیوندی گردو نیز اندام‌های تولید مثل غیر جنسی را ایجاد کنند. کلاین و نیلی (Cline and Neely, 1983) در گزارش خود بیان کردند که تولید آسروول سن برگ در ارتباط است. این محققین نشان دادند که در برگ‌های جوان زخم‌های نکروز کوچک‌تری به وجود آمده و تشکیل آسروول در آنها به ندرت انجام می‌شود. مشاهدات مشابهی نیز از تولید آسروول در میوه نابالغ گزارش شده است (Cline and Neely, 1983). بری (Berry, 1960) استفاده از کود نیتروژن در اوائل فصل را برای کنترل بیماری لکه سیاه گردو توصیه کرد. به نظر می‌رسد کاربرد کود نیتروژن در اوائل بهار بلوغ برگ‌ها را به تاخیر انداخته و لذا مطابق نظر کلاین و نیلی (Cline and Neely, 1983) تشکیل زخم‌های نکروز و به دنبال آن تولید آسروول به کندی انجام خواهد شد. این موضوع مدیریت بیماری را در باغ تسهیل می‌کند. در هر صورت بروز این نوع از مقاومت در ابتدای فصل، سرعت

داشت. اثر متقابل جدایه قارچی و رقم یا ژنوتیپ گردو در مورد این صفت و در سطح آماری ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۱). بر این اساس بیشترین درصد سطح آلوده برگ در ژنوتیپ Z60 دیده شد. پس از آن ژنوتیپ K72 و رقم Hartley بالاترین میزان بیماری را داشتند. کمترین درصد سطح آلوده برگ هم در ارقام Vina و Ronde de montignac (RDM) مشاهده شد (شکل ۷).

هر چند رقم Hartley در شرایط طبیعی مقاومت نسبی خوبی را از خود نشان داده است (Pastore et al., 1997)، اما به نظر می‌رسد این رقم در موقعیت‌های مناسب برای گسترش بیماری می‌تواند به راحتی مورد حمله قارچ قرار گرفته و آلوده شود. این نتیجه با نتایج به دست آمده در مطالعات بری (Berry, 1960) تطابق دارد. تحقیقات او نشان داد که ارقام گردوی سیاه با نام Thomas و Ohio علی‌رغم مقاومت به بیماری آنتراکنوز در شرایط طبیعی، در شرایط مناسب برای توسعه بیماری درصدی بالایی از آلودگی را نشان داده‌اند.

بررسی اثرهای متقابل نشان داد که درصد سطح آلوده برگ ناشی از جدایه V2 در اغلب ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، از سایر جدایه‌ها بیشتر اما مقدار آن برای ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بود. همان‌گونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود ژنوتیپ Z60 که با جدایه V2 (جمع‌آوری شده از منطقه ورزقان میانه) مایه‌زنی شد بود، با دارا بودن بیشترین تعداد لکه،



شکل ۷- مقایسه میانگین درصد سطح آلوده برگ توسط جدایه‌های قارچ *G. leptostyla* در ژنوتیپ‌های گردو

Fig. 7. Mean comparison of leaf infection percent of walnut genotypes

ستون‌ها با حروف مشترک در سطح احتمال ۱٪ فاقد اختلاف معنی دار هستند (آزمون چند دامنه‌ای دانکن).

Bars with similar letters are not significantly different at 1% level of probability (Duncan's multiple range test).

اشاره شود که بین سن فیزیولوژیکی یا دوره نونهالی درختان گردو و تولید آسروول در آنها هیچ گونه ارتباط معنی‌داری یافت نشده است (Cline and Neely, 1983). با توجه به این امر امکان آلودگی درختان گردو در هر سن وجود دارد. به عبارت دیگر در صورت عدم وجود درختان مقاوم یا متحمل در یک باغ، با مساعد شدن شرایط اقلیمی و بروز بیماری در باغ یا نهالستان، درختان گردو در هر سنی که باشند مورد تهاجم قارچ عامل بیماری قرار گرفته و تشکیل آسروول در آنها به سهولت انجام خواهد شد. در چنین شرایطی مدیریت صحیح یک باغ گردو می‌تواند از بروز همه‌گیری‌های

گسترش بیماری را به شدت تحت تاثیر قرار می‌دهد. به تدریج با زیاد شدن سن برگ، تشکیل آسروول در برگ‌ها روند صعودی می‌یابد. به طور کلی در بیماری‌های چند چرخه‌ای، با افزایش تولید مثل غیر جنسی قارچ، میزان زادمایه ثانویه در محیط بیشتر شده و این امر سبب افزایش سرعت گسترش بیماری در جمعیت گیاهی و بروز اپیدمی می‌شود (Cline and Neely, 1983). در بیماری لکه سیاه گردو نیز، تشدید بیماری و بروز همه‌گیری آن در یک منطقه، نتیجه عمل کنیدی‌های قارچ در طول چرخه‌های متعدد آلودگی است (Cline and Neely, 1983). در این میان باید

گسترش بیماری وجود دارد، کاشت درختان در دامنه‌های جنوبی و شرقی، تشکیل مه را به حداقل رسانده و سبب حذف سریع رطوبت و به دنبال آن کاهش شدت بیماری می‌شود (Black and Neely, 1978b).

سپاسگزاری

از خانم آفاق فرهادنژاد تکنیسین بخش تحقیقات باغبانی به خاطر همکاری در مراحل مختلف اجرای این تحقیق صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

گسترده در یک منطقه جلوگیری نماید. روش عملی برای کنترل بیماری، محدود کردن مایه تلقیح زمستان‌گذران و نیز کاهش چرخه‌های آلودگی در طول فصل است. بدیهی است که کاربرد ارقام مقاوم یا متحمل به همراه رعایت سایر عوامل مدیریتی و بهداشتی از جمله جمع‌آوری و انهدام بقایای آلوده گیاهی و همچنین هرس مناسب (که سبب جریان مطلوب هوا در درخت تاج می‌شود) می‌تواند در کاهش بروز آلودگی بسیار موثر واقع شود (Cline and Neely, 1983). در مناطقی که به دلیل شرایط اقلیمی (دما و رطوبت) خطر

References

- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., and Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology. John Wiley and Sons. USA. 880pp.
- Annunzati, M., Gras, M., Pollegioni, P., Mughini, G., Molvoti, M. E., and Anselmi, N. 2007. Resistance behavior to anthracnose disease by *Gnomonia leptostyla* in *Juglans* spp. Proceedings of the 51st Italian Society of Agricultural Genetics, Annual Congress. Riva del Garda, Italy.
- Balaz, J., Korac, M., and Cerovic, S. 1993. Susceptibility of walnut genotypes to *Gnomonia leptostyla*. Horticultural Abstract 63(6): 498.
- Beineke, W. F., and Masters, C. J. 1973. Black walnut progeny and clonal tests at Purdue University. Proceedings of the 12th South Forest Tree Improvement Conference., Baton Rouge LA. pp. 233-242.
- Belisario, A., Scotton, M., Santori, A., and Onofri, S. 2008. Variability in the Italian population of *Gnomonia leptostyla*, heterotallism and resistance of juglans species to anthracnose. Forest Pathology 38:129- 145.
- Berry, F. H. 1960. Etiology and control of walnut anthracnose. Maryland Agricultural Experimental Station Research Bulletin. A- 113. 22pp.

- Black, W. M., and Neely, D. 1978a.** Effects of temperature, free moisture and relative humidity on the occurrence of walnut anthracnose. *Phytopathology* 68: 1054-1056.
- Black, W. M., and Neely, D. 1978b.** Relative resistance of *Juglans* species and hybrids to walnut anthracnose. *Plant Diseases Reporter* 62: 497- 499.
- Cline, S., and Neely, D. 1983.** Penetration and infection of leaves of black walnut by *Marssonnia juglandis* and resulting lesion development. *Phytopathology* 73: 494-497.
- Ershad, J. 1995.** Fungi of Iran. Agricultural Research, Education and Extension Organization. Tehran, Iran. 874pp. (in Farsi).
- HO, W. C., and Ko, W. H. 1997.** A simple method for obtaining single-spore isolates of fungi. *Botanical Bulletin of Academic Science* 38: 41-44.
- Matteoni, J.A., and Neely, D. 1979.** *Gnomonia leptostyla*: Growth, sporulation and heterotalism. *Mycologia* 71: 1032- 1034.
- Pastore, M., Consoli, D., and Cristinzio, G. 1997.** Susceptibility of 32 walnut varieties to *Gnomonia leptostyla* and *Xanthomonas compestris* pv. *Juglandis*. *Acta Horticulturae* 442: 379-385.
- Rabieifar, A. 1997.** Study on distribution of walnut anthracnose disease in Iran. Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress. Karaj, Iran. Page 223 (in Farsi).
- Reid, W. 1990.** Eastern black walnut: Potential for commercial nut producing cultivars. pp: 327- 331. In: Janick, J., and Simon, J. E.(eds.) *Advances in New Crops*. Timber Press Portland, Oregon, USA.
- Revin, A. A. 1981.** Selecting forms of walnut resistant to *Gnomonia leptostyla* in the Crimean foothills.: 4-I sezd genetikov i seleksionerov Ukrainy, Odessa. Tez. dokl. 4: 104- 108. Kiev, Ukrainian SSR.
- Saremi, H., Razaz Hashemi, S. R., and Jafari, H. 2003.** Study on walnut anthracnose disease at the northwest of Iran. *Journal of Agricultural Science and Natural Resource* 9(4): 141- 153 (in Farsi).
- Shawn, A. M. 1995.** Classical and molecular approaches to breeding fruit and nut crops for disease resistance. *HortScience* 30: 466- 477.
- Teviotdale, B. L., Michailides, T. J., and Pscheidt, J. W. 2002.** *Compendium of Nut Crop Diseases in Temperate Zones*. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 368pp.