مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۳۱، شماره ۴، سال ۱۳۹۴

تکرارپذیری مایه‌زنی آزمایشگاهی در سنجش مقاومت میوه نارس گردو به بلایت باکتریائی و ارتباط مقاومت با فنل کل

Repeatability of Laboratory Inoculation on Assessing Susceptibility of Walnut Unripe Fruits to Bacterial Blight and Relationship Between Resistance and Total Phenols

فریبا موسوی[۱]، منصوره کشاورزی[۲]، روح‌اله حق‌جویان[۳] و عادله سبحانی[۴]

۱ و ۴- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دامغان
۲ و ۳- به ترتیب استادیار و محقق، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۶/۱۹

چکیده

موسوی، ف.، کشاورزی، م.، حق‌جویان، ر. و سبحانی، ع. ۱۳۹۴. تکرارپذیری مایه‌زنی آزمایشگاهی در سنجش مقاومت میوه نارس گردو به بلایت باکتریائی و ارتباط مقاومت با فنل کل. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۱:** ۵۹۴- ۵۸۱. **10.22092/spij.2017.111277**

خسارت اصلی بیماری بلایت باکتریایی گردو با عامل *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* در اثر ریزش میوه نارس و افت کیفیت میوه رسیده است. در این تحقیق، حساسیت نسبی میوه نارس ۷۲ رقم و ژنوتیپ بومی گردو به بلایت باکتریایی در دو سال تکرار (۱۳۹۱ و ۱۳۹۲) در شرایط آزمایشگاهی، کارآیی روش ارزیابی و ارتباط غلظت فنل کل و اندازه میوه نارس با سطوح نسبی مقاومت مطالعه شد. بر اساس نتایج تجزیه مرکب داده‌ها، ۱۰/۷ درصدارقام/ژنوتیپ‌ها حساس، ۳۲/۱ درصد نیمه‌حساس و ۵۷/۱ درصد نیمه مقاوم بودند. مقایسه میانگین نتایج دو ساله نشان داد که روش ارزیابی مورد استفاده از تکرارپذیری قابل قبولی برخوردار بود. با وجودی که بیش‌ترین غلظت فنل کل در رقم مقاوم Pedro و کم‌ترین در ژنوتیپ حساس ۱-۲ مشاهده شد، همبستگی بین غلظت فنل کل با مقاومت معنی‌دار نبود. بین مقاومت و اندازه میوه نارس ارتباطی مشاهده نشد که مبین حساسیت یکسان کلیه مراحل میوه نارس به این بیماری است. بر اساس این نتایج، تنوع بالایی در سطوح مقاومت میوه نارس ارقام مختلف گردو به بلایت باکتریایی وجود دارد که این تنوع با مایه‌زنی در شرایط آزمایشگاهی قابل سنجش است اما اندازه‌گیری غلظت فنل کل روش مناسبی برای پیش آگاهی سطوح مقاومت نیست.

واژه‌های کلیدی: گردو، *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*، مقاومت، فنل کل.

نویسنده مسئول: mkeshavarze@spii.ir تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۲۵۴۱

مقدمه

بلایت باکتریایی گردو با عامل *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* از خسارت‌زاترین بیماری‌های باکتریایی گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) در سراسر جهان است (Frutos, 2010). این باکتری می‌تواند کلیه بافت‌های سبز لیگنینی نشده درخت اعم از گل‌های نر و ماده، برگ، جوانه، میوه و شاخه را آلوده کند (Lang and Evans, 2010) اما عمده خسارت اقتصادی به دلیل ریزش میوه نارس آلوده و افت کیفیت میوه رسیده است (Lang *et al*., 2006).

روش اصلی مدیریت بلایت باکتریایی گردو محلول‌پاشی سموم مسی است ولی این سموم نه تنها کاملاً موثر نیستند بلکه به دلیل تکرار محلول‌پاشی‌ها، باکتری عامل نیز مقاوم شده است (Garden *et al*., 1993؛ Lang and Evans, 2010). از این رو بی‌خطرترین و اقتصادی‌ترین راه کنترل این بیماری می تواند کاشت ارقام مقاوم باشد. با توجه به وجود تنوع سطوح مقاومت ارقام مختلف گردو به این بیماری، در بسیاری کشورها به ویژه کشورهای اروپایی تلاش‌های گسترده‌ای برای شناسایی منابع مقاومت انجام شده و ژنوتیپ‌ها و ارقام فرانسه، ایتالیا، امریکا، ژاپن، اروگوئه، چین، اسپانیا و ایران در گروه‌های مختلف مقاومتی رده‌بندی شده‌اند (Tamponi and Donati, 1990؛ Woeste and McGranaham, 1992؛ Belisario *et al*., 1997؛ Aleta *et al*., 2001؛ Pastore *et al*., 1997؛ Silsepur *et al*., 2012) و در برخی گزارش‌ها تنوع واکنش میوه نارس ارقام مختلف به این بیماری بررسی شده و ارقام نسبتاً مقاوم شناسایی شده‌اند (Vagelas *et al*., 2012؛ Belisario *et al*., 1999؛ Woeste and McGranaham, 1992؛ Tsiantos *et al*., 2007) متابولیت‌های ثانویه همچون پلی‌فنل‌ها نقش مهمی در مقاومت ژنتیک گیاهان از جمله گردو به تنش‌های محیطی زنده دارند (Benett and Wallsgrove, 1994؛ Radix *et al*., 1998). فعالیت دفاعی فنل‌ها در گیاه به دو صورت القا شونده و ساختاری است. فنل‌های القا شونده، فنل‌های سبک وزنی هستند که بعد از تهاجم میکروبی ساخته می‌شوند اما فنل‌های ساختاری، از قبل از تهاجم میکروبی ساخته شده و به صورت آزاد یا کانژوکه در گیاه وجود دارند (Strack, 1997). فنل‌ها در دفاع گیاهان باغی از جمله واکنش دفاعی سیب به *Venturia inaequlis* عامل بیماری لکه سیاه (Mikulic Petkovsek *et al*., 2009؛ Mayr *et al*., 1997) و گردوی سیاه (*J. nigra* L.) به *Gnomonia leptostyla* عامل بیماری آنتراکنوز (Cline and Neely, 1984) نقش دارند. برخی مطالعات نیز موید ارتباط برخی اسیدهای فنلی با مقاومت به بلایت در گردوی ایرانی است (Mikulic-Petkovsek *et al*., 2011؛

(Matias *et al.*, 2009؛ Solar *et al.*, 2012). هدف از این تحقیق، ارزیابی مقاومت میوه نارس ۷۲ ژنوتیپ بومی/رقم تجاری گردو به بلایت باکتریایی، بررسی تکرارپذیری روش آلوده‌سازی آزمایشگاهی در ارزیابی مقاومت و تاثیر غلظت فنل کل بر سطوح نسبی مقاومت بود. همچنین ارتباط مقاومت با اندازه میوه نارس نیز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در مجموع ۷۲ ژنوتیپ بومی و رقم تجاری گردو شامل ژنوتیپ‌های آذرشهر از استان آذربایجان شرقی، ژنوتیپ B21 کرج، رقم ایرانی جمال (Z63) با منشا قزوین و سه رقم تجاری چندلر، پدرو و سر (Chandler، Pedro و Serr) با منشا ایالات متحده مورد بررسی قرار گرفتند. مواد گیاهی در کلکسیون درختان میوه موسسه تحقیقات اصلاح نهال و بذر واقع در کمال‌شهر کرج در فواصل ۷ در ۸ متر کشت شده و حدود ۲۰ سال سن دارند. میوه‌های نارس در ۴۵ روز پس از گلدهی برداشت و به آزمایشگاه منتقل شدند.

به منظور تهیه مایه تلقیح، از دو جدایه بومی باکتری *X. a.* pv. *juglandis* تحت نام های X4 و Xq1 که از درختان گردوی کرج و قزوین جدا شده بودند، استفاده شد (Silsepur *et al.*, 2012). جدایه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط غذایی مایع (Nutrient broth) در شیکر انکوباتور با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه و دمای $25\ ^{o}C$ کشت شدند. سپس کدورت سوسپانسیون سلولی هر یک در طول موج ۶۰۰ نانومتر روی ۰/۱ تنظیم و حجم مساوی از آن ها مخلوط و برای مایه‌زنی به کار برده شد.

آلوده‌سازی میوه‌های نارس در شرایط آزمایشگاه و بر اساس روش آلتا و همکاران (Aleta *et al.*, 2001)انجام شد. بدین منظور، با استفاده از سرنگ انسولین، در ناحیه استوایی هر میوه دو تزریق ۱۰۰ میکرولیتری به زیر پوست سبز انجام شد. در تیمار شاهد، به جای مایه تلقیح آب مقطر استریل به کار برده شد. سپس میوه‌ها روی سبدی درون ظرف شفاف درداری که کف آن تا ۰/۵ سانتی‌متر آب ریخته شده بود، چیده شدند. برای تامین رطوبت بیش‌تر، میوه ها روزانه دو نوبت به طور ملایم مه‌پاشی شدند. پانزده روز بعد از آلوده‌سازی، قطر لکه‌ها به وسیله کولیس اندازه‌گیری و شدت بلایت معادل میانگین قطر لکه‌ها در نظر گرفته شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ده تکرار (میوه) در دو سال ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ انجام شد. به منظور انجام آزمون کخ، سطح لکه‌ها ضدعفونی سطحی شده و با استفاده از اسکالپل ضدعفونی شده، قطعاتی از حاشیه بین بافت سالم و آلوده جدا سازی و در هاون حاوی آب مقطر استریل له شد. سپس یک لوپ از عصاره حاصله به روش مخطط بر روی محیط کشت حاوی آگار غذایی کشت داده شد. نمونه‌های کشت شده به مدت ۲ تا ۳ روز در انکوباتور در $25\ ^{o}C$ نگهداری شدند و سپس آزمون‌های

فنوتیپی کلیدی رنگ کلنی در محیط آگار غذایی، تولید مواد فلوروسنت، شکل باکتری، واکنش گرم، هیدرولیز نشاسته و چربی، احیای نیترات و اکسیداز روی آن‌ها انجام شد.

در سال دوم ارزیابی، ارتباط مقاومت با غلظت پلی‌فنل‌های میوه نارس بررسی شد. این آزمایش روی مقاوم‌ترین (۲۲-۱ و ۷-۵) و حساس‌ترین (۱-۲، سر، ۲۱-۴) ژنوتیپ‌ها در کنار ارقام تجاری پدرو و چندلر انجام شد. پلی فنل‌ها در متانل استخراج و غلظت آن‌ها توسط روش فولین بر اساس معادل اسیدگالیک در موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Singleton and Rossi, 1965) برای هر رقم سه تکرار در نظر گرفته شد. طول و عرض میوه با استفاده از کولیس اندازه‌گیری و بر اساس آن ابعاد میوه (طول در عرض) محاسبه شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن و همبستگی بین صفات با روش پیرسون با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد.

نتایج و بحث

علائم بلایت در محل‌های تزریق به صورت لکه‌های سیاه فرورفته طی یک هفته پس از مایه‌زنی ظاهر و به تدیج گسترده شد. چنین لکه‌هایی در شاهد مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل مشاهده نشد. برش میوه‌ها نشان داد که در نمونه‌های حساس، سیاهی و نکروز تا مغز میوه پیش رفته بود.

نتایج جداسازی و شناسایی باکتری از میوه های آلوده (آزمون کخ) نشان دهنده دخالت نوعی باکتری زردرنگ در محیط آگار غذایی، میله ای، غیرفلوروسنت، گرم منفی، قادر به هیدرولیز چربی و نشاسته با واکنش منفی احیای نیترات و تولید اکسیداز ضعیف بود که مطابق خصوصیات باکتری *X. a.* pv. *juglandis* است و بدین ترتیب انتساب زخم‌های ایجاد شده به بیماری بلایت باکتریایی تائید شد.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که شدت بلایت در میوه نارس ژنوتیپ‌های مختلف در دو سال ارزیابی متفاوت بود (جدول ۱). تفاوت در سطوح مقاومت میوه نارس ارقام مختلف گردو به بلایت باکتریایی در گزارش‌های متعددی از جمله آلتا و همکاران (۲۰۰۱)، سیلسپور و همکاران (Silsepur *et al.*, 2010)، اوزاکتان (Ozaktan, 2008) و واگلاس و همکاران (Vagelas *et al.*, 2012) نیز آمده است. میکلیک پتکوسک و همکاران (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2011) نشان داد که در شرایط طبیعی نیز درصد آلودگی میوه نارس به بلایت در ارقام مختلف متفاوت است. در کشورهای اروپایی و آمریکا، به طور سنتی ارزیابی مقاومت به بلایت با محلول پاشی برگ انجام می شود زیرا جوانه برگ محل زمستان گذرانی باکتری و هر چه برگ حساس‌تر باشد، میزان مایه تلقیح اولیه برای آلوده کردن اندام‌های سبز گیاه بیش‌تر و در نتیجه بلایت شدیدتر است. اما ریزش میوه نارس

جدول ۱- تجزیه واریانس شدت بلایت و ابعاد میوه نارس گردو در سال های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲

Table 1. Analysis of variance of blight severity and fruit size in unripe walnut fruits in years 2013 and 2014

		درجه آزادی df.		میانگین مربعات Mean square			
				ابعاد میوه Fruit size		شدت بلایت Blight severity	
		سال اول	سال دوم	سال اول	سال دوم	سال اول	سال دوم
S.O.V.	منابع تغییرات	Year 1	Year 2	Year 1	Year 2	Year 1	Year 2
Genotype	ژنوتیپ	57	49	287246.0**	276405.0**	4.082**	0.198**
Error	خطا	642	392	11009.0	11860.9	0.480	0.049
CV. (%)	درصد ضریب تغییرات			13.8	13.1	34.20	11.250

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

**: Significant at 1% level of probability

.

نیز بسیار خسارت‌زا است به گونه‌ای که در شرایط مساعد، حداقل ۵۰ درصد ریزش میوه‌های نارس در اثر بلایت است (Miller and Bollen, 1946؛ Lang *et al*., 2006) و از این رو، مقاومت هر دو اندام برگ و میوه نارس از اهمیت اقتصادی برخوردار است.

بررسی میانگین شدت بلایت در سال اول نشان داد که ژنوتیپ ۲۴-۳ با قطر نکروز ۱۰/۷۷ میلی‌متر حساس‌ترین و ژنوتیپ‌های ۵-۵، ۹-۴ و ۱۹-۴ با قطر نکروز به ترتیب ۱/۸۳، ۱/۸۸ و ۱/۸۹میلی‌متر مقاوم‌ترین بودند (جدول ۲). در سال دوم، ژنوتیپ ۱-۲ حساس‌ترین (قطر نکروز ۵/۸۶ میلی‌متر) و ژنوتیپ ۷-۵ مقاوم‌ترین (قطر نکروز ۲/۸۲ میلی‌متر) بودند (جدول ۳). بر اساس نتایج تجزیه مرکب داده‌های ۲۸ رقم مشترک در دو سال، اثر سال × قطر نکروز و رقم و رقم × قطر نکروز معنی‌دار بود (جدول ۴). میانگین دو ساله قطر نکروز در ژنوتیپ ۲۴ـ۳ بیش‌ترین و در ژنوتیپ ۱۹ـ۴ کم‌ترین بود. میانگین قطر نکروز در مقاوم‌ترین ژنوتیپ ۳/۱۳ برابر حساس‌ترین بود. بررسی میانگین داده‌های دو ساله روی ۲۸ رقم مشترک نشان داد که مشابه سال اول، حساس‌ترین و مقاوم‌ترین ژنوتیپ‌ها به ترتیب ۲۴-۳ و ۱۹-۴ اما در سال ۱۳۹۲، به ترتیب ژنوتیپ‌های ۱ـ۲ و ۲۲ـ۱ بودند (جدول ۵). این می‌تواند مبین تفاوت نتایج سال ۱۳۹۱ با نتایج ۱۳۹۲ و در نتیجه، تکرار ناپذیری روش ارزیابی باشد اما دقت بیشتر در جدول ۵ نشان می‌دهد که میانگین قطر نکروز در ژنوتیپ‌های ۱ـ۲ و ۲۲ـ۱ اختلاف معنی‌داری با ژنوتیپ‌های ۲۴ـ۳ و ۱۹ـ۴ ندارد بدین معنی که اثر متقابل سال در رقم برای صفت قطر نکروز اصطلاحاً از نوع اثر متقابل در مقدار بوده و از نوع اثر متقابل در جهت نیست. بر این اساس، نتیجه‌گیری می‌شود که روش به کار برده شده در این تحقیق برای ارزیابی مقاومت میوه نارس از

جدول ۲- مقایسه میانگین شدت بلایت (قطر نکروز)، حساسیت نسبی و ابعاد میوه نارس ژنوتیپ‌های گردو در سال ۱۳۹۱

Table 2. Mean comparison of blight secverity (necrosis diameter), relative susceptibility and size of unripe fruits of walnut genotypes in year 2012

رقم/ژنوتیپ Cultivar/ Genotype	قطر نکروز Necrosis diameter (mm)	حساسیت سبی Relative susceptibility	ابعاد میوه Fruit size (mm^2)	رقم/ژنوتیپ Cultivar/ Genotype	قطر نکروز Necrosis diameter (mm)	حساسیت نسبی relative susceptibility	ابعاد میوه Fruit size (mm^2)
3-24	10.77a	S	768.4h-m	4-14	4.40j-s	MR	557.9s-w
2-24	10.05ab	"	849.4e-j	5-2	4.40j-s	"	398.3x
1-25	8.77a-c	MS	1096.96a	2-10	4.40j-s	"	717.1k-q
3-9	8.03a-d	"	924.4c-f	4-23	4.37j-t	"	570.9r-v
2-1	7.93b-e	"	769.9h-l	3-27	4.37j-t	"	800.3g-k
3-22	7.91b-e	"	635.8o-t	3-18	4.34j-t	"	478.6v-x
2-19	7.77c-f	"	718.6k-q	1-14	4.24k-u	"	608.3q-u
1-9	7.22c-g	"	670.6l-r	1-22	4.16l-u	"	590.6r-u
1-23	7.05c-h	"	945.9c-e	5-12	3.95m-u	"	456.2wx
1-17	6.95c-i	"	751.3j-o	1-10	3.79m-u	"	512.9u-w
3-12	6.88c-i	"	954.1c-e	Serr	3.46n-u	"	952.8c-e
B21	6.76c-j	"	744.7j-p	4-25	3.42n-u	"	844.6e-j
2-5	6.66c-k	"	668.0l-r	5-1	3.41m-u	"	741.9j-p
1-1	6.61c-k	"	728.7k-p	3-5	3.34o-u	"	767.5h-m
4-27	6.41c-k	"	588.2r-u	3-8	3.32o-u	"	881.4d-g
Z30	6.41d-l	"	962.8cd	4-22	3.31o-u	"	671.0l-r
1-16	6.11e-m	"	630.5p-t	3-11	3.24o-u	"	652.5m-s
2-27	5.99e-m	"	1012.8a-c	Z63	3.22o-u	"	826.4f-k
1-26	5.88e-m	"	979.6b-d	Pedro	3.16p-u	"	811.1g-k
2-26	5.82e-n	"	759.2i-n	5-15	3.03p-u	"	882.3d-g
1-2	5.61e-o	"	1031.5a-c	3-15	2.96p-u	"	665.1l-r
1-24	5.41f-p	"	1072.0ab	3-25	2.88q-u	"	809.2g-k
4-16	5.10g-p	MR	869.8d-i	4-4	2.51r-u	"	516.5u-w
1-4	4.80g-q	"	875.5d-h	4-12	2.09s-u	"	543.9t-w
2-25	4.50g-q	"	898.7d-g	4-5	1.99tu	"	643.9n-t
4-10	4.40h-r	"	867.8d-i	2-14	1.98tu	"	654.8l-r
2-11	4.00h-r	"	548.5t-w	4-9	1.89u	"	731.3k-p
2-9	4.58-r	"	715.9k-q	4-19	1.88u	"	711.5k-p
2-23	4.44j-s	"	720.2k-q	5-5	1.83u	"	674.8l-r

در هر ستون، میانگین‌هائی که با حروف متفاوت دنبال شده اند از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P\leq0.01$).

In each column, means followed by different letters are significantly different ($P\leq0.01$).
S: Susceptible; MS: Moderately Susceptible; MR: Moderately Resistant

تکرارپذیری کافی برخوردار بوده است. ارزیابی مقاومت میوه نارس با آلوده‌سازی مصنوعی قبلاً نیز در برخی منابع آمده است (Belisario *et al.*, 1999؛ Woeste and McGranaham, 1992؛ Vagelas *et al.*, 2012) اما گزارشی دال بر میزان تکرارپذیری آن ارائه نشده که باتوجه به انطباق نتایج دو ساله در این تحقیق، به نظر می‌رسد روشی نسبتاً تکرارپذیر باشد. با این وجود ذکر این نکته لازم است که

جدول ۳- مقایسه میانگین شدت بلایت (قطر نکروز)، حساسیت نسبی و ابعاد میوه نارس ژنوتیپ‌های گردو در سال ۱۳۹۲

Table 3. Mean comparison of blight secverity (necrosis diameter) relative susceptibility and size of unripe fruits of walnut genotypes in year 2013

رقم/ژنوتیپ Cultivar/ Genotype	قطر نکروز Necrosis diameter (mm)	حساسیت سبی Relative susceptibility	ابعاد میوه Fruit size (mm^2)	رقم/ژنوتیپ Cultivar/ Genotype	قطر نکروز Necrosis diameter (mm)	حساسیت نسبی Relative susceptibility	ابعاد میوه Fruit size (mm^2)
2-1	5.86a	S	919.54e-i	4-1	3.83f-m	MR	856.9g-l
4-21	5.67ab	“	661.8o-r	2-26	3.79g-m	“	473.5tu
Serr	5.50a-c	“	886.90f-k	2-4	3.79g-m	“	908.6e-j
4-23	5.33a-d	“	1028.23b-e	5-1	3.75g-m	“	508.8tu
3-26	5.17a-e	“	584.56q-u	2-23	3.72g-m	“	523.4s-u
4-4	5.15a-e	“	909.56e-j	1-17	3.72g-m	“	777.7j-p
1-26	5.00a-f	“	681.90n-q	1-21	3.71g-m	“	871.2g-l
3-1	4.83a-g	“	910.55e-j	2-17	3.68g-m	“	987.2c-g
6-3	4.78a-h	“	811.04i-n	Chandler	3.67g-m	“	1124.2b
4-3	4.70b-i	“	649.80p-s	4-26	3.67g-m	“	1056.9b-d
5-4	4.54b-j	MS	680.40n-q	3-25	3.64g-m	“	755.0k-p
3-18	4.50c-k	“	1101.40bc	3-4	3.64g-m	“	481.5tu
2-16	4.44c-k	“	782.15i-p	3-15	3.60h-m	“	751.6l-p
3-24	4.36c-l	“	988.58c-g	Pedro	3.58h-m	“	602.6q-t
2-2	4.36c-l	“	1033.25b-e	5-3	3.53i-m	“	895.2e-k
4-22	4.35c-l	“	957.16d-h	2-27	3.50i-m	“	534.4r-u
4-27	4.33c-l	“	712.42m-p	2-25	3.46j-m	“	462.7u
3-17	4.30c-l	“	762.15l-p	4-19	3.35j-m	“	759.1k-o
4-18	4.22d-l	“	995.67c-g	4-16	3.33j-m	“	799.2i-o
2-24	4.19d-l	“	793.15i-o	5-2	3.31k-m	“	697.9m-q
2-3	4.14e-l	“	830.83h-m	1-15	3.30k-m	“	669.3o-q
1-16	4.06e-l	“	763.68k-p	3-27	3.30klm	“	765.8k-p
4-25	3.95f-m	“	881.2g-l	1-1	3.30k-m	“	598.7q-t
4-15	3.88f-m	MR	834.94h-m	1-22	3.19lm	“	1015.2b-f
1-2	3.86f-m	“	959.98d-h	5-7	2.82m	R	1315.7a

در هر ستون، میانگین‌هائی که با حروف متفاوت دنبال شده اند از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P\leq0.01$).

In each column, means followed by different letters are significantly different ($P\leq0.01$).

S: Susceptible; MS: Moderately Susceptible; MR: Moderately Resistant

از ارتباط مقاومت میوه نارس در شرایط آزمایشگاه با شرایط باغ گزارشی موجود نیست زیرا شدت الودگی در باغ نه تنها تابع رقم و بافت گیاه، که تابع شرایط آب و هوایی، تاریخ برگدهی و تاریخچه بیماری در باغ نیز هست و ممکن است یافته های حاضر کاملاً در شرایط طبیعی صادق نباشد (Mikulic-Petkovsek *et al*., 2011؛ Vagelas *et al*., 2012).

نتایج گروه‌بندی ارقام/ژنوتیپ‌ها نشان داد که در سال اول، ۳/۵٪ ژنوتیپ‌ها در گروه حساس، ۳۴/۵٪ نسبتاً حساس و ۶۲٪ نسبتا مقاوم بودند و هیچ رقمی کاملا مقاوم نبود (شکل ۱). در سال دوم، ۲۰٪ در گروه حساس، ۲۶٪ نسبتاً حساس، ۵۲٪ نسبتاً مقاوم و ۲٪ مقاوم بودند (شکل ۲). رده‌بندی داده‌های دو ساله در ۲۸ رقم

جدول ۴- تجزیه واریانس مرکب داده‌های دو ساله شدن بلایت (قطر نکروز) و ابعاد میوه ژنوتیپ‌های گردو

Table 4. Combined analysis of variance of blight severity (necrosis diameter) and fruit size of walnut genotypes

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	قطر نکروز Necrosis dimension	ابعاد میوه Fruit size
Year (Y)	سال	1	0.95**	123942.8^{ns}
Rep. (Y)	تکرار (سال)	48	0.25	11138.2
Genotype (G)	ژنوتیپ	27	1.65*	366894.5*
G × Y	ژنوتیپ × سال	27	1.52**	186743.7**
Error	خطا	448	35.00	161360.0
CV. (%)	درصد ضریب تغییرات		29.42	12.7

ns، * و **: به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد.

ns,* and **: Not significant, significant at 5% and 1% levels of probability, repectively.

جدول ۵- مقایسه میانگین داده‌های دو ساله شدت بلایت (قطر نکروز) و حساسیت نسبی برخی ژنوتیپ‌های گردو

Table 5. Mean comparison of two years data of blight severity (necrosis diameter) and relative susceptibility of some walnut genotypes

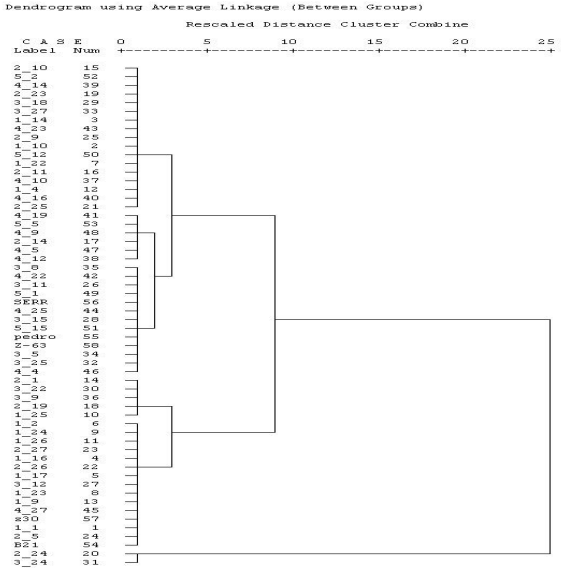
رقم/ژنوتیپ Cultivar/ genotype	قطر نکروز Necrosis diameter (mm)	حساسیت نسبی Relative susceptibility	رقم/ژنوتیپ Cultivar/ genotype	قطر نکروز Necrosis diameter (mm)	حساسیت نسبی Relative susceptibility
3-24	7.95a	S	2-23	4.18b-d	MR
2-1	7.23ab	"	4-16	4.09b-d	"
2-24	6.70a-c	"	3-27	3.92b-d	"
1-17	5.79a-d	MS	4-4	3.90b-d	"
1-26	5.74a-d	"	4-22	3.90b-d	"
4-27	5.52a-d	"	Serr	3.87b-d	"
1-16	5.15a-d	"	1-22	3.84b-d	"
1-1	5.03a-d	"	5-2	3.65b-d	"
2-26	4.85a-d	"	4-25	3.64b-d	"
1-2	4.84a-d	"	5-1	3.57b-d	"
4-23	4.71a-d	"	Pedro	3.44cd	"
2-27	4.62a-d	MR	3-15	3.32cd	"
3-18	4.39a-d	"	3-25	3.17cd	"
2-25	4.18b-d	"	4-19	2.55d	"

در هر ستون، میانگین‌هائی که با حروف متفاوت دنبال شده اند از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P\leq0.01$)

In each column, means followed by different letters are significantly different ($P\leq0.01$).

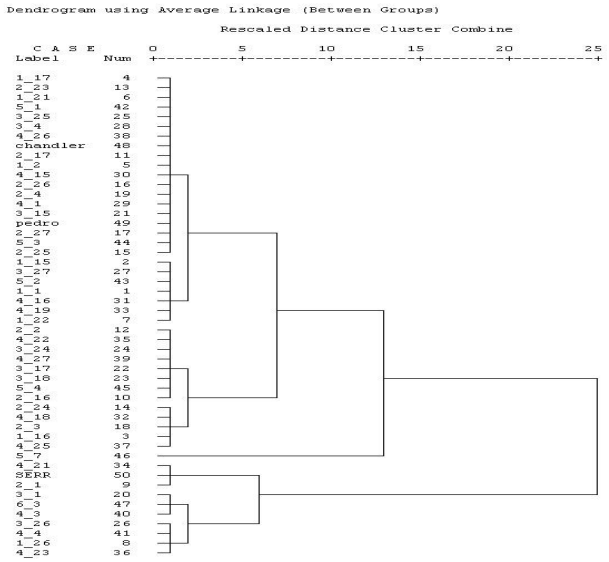
S: Susceptible; MS: Moderately Susceptible; MR: Moderately Resistant

مشترک نشان داد که ۱۰/۷٪ حساس، ۳۲/۱٪ نسبتاً و ۵۷/۱٪ نسبتاً مقاوم بودند و هیچ ژنوتیپی کاملاً مقاوم نبود (شکل ۳). بر اساس این نتایج به نظر می‌رسد میوه نارس بیش از ۵۰٪ ژنوتیپ‌ها دارای درجاتی از مقاومت نسبی به بلایت است. گزارش‌های موجود روی برخی دیگر از ژنوتیپ‌های بومی نیز نشان‌دهنده مقاومت نسبی میوه نارس برخی ژنوتیپ‌های



شکل ۱- تجزیه کلاستر شدت بلایت (قطر نکروز) در ژنوتیپ‌های گردو در سال ۱۳۹۱ با استفاده از روش UPGMA

Fig. 1. Cluster analysis of blight severity (necrosis diameter) in walnut genotypes in year 2012 using UPGMA method

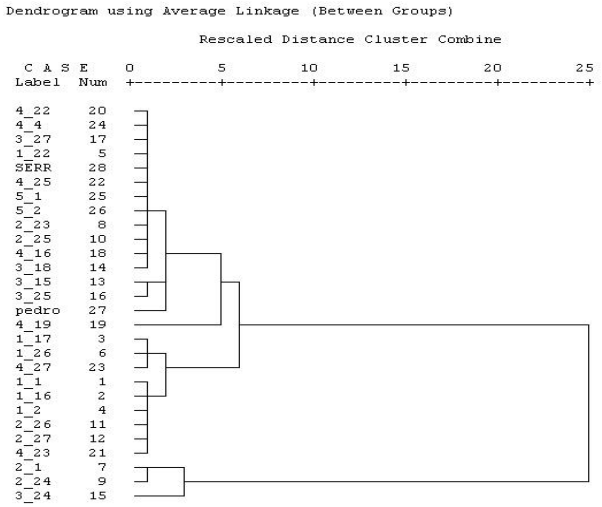


شکل ۲- تجزیه کلاستر شدت بلایت (قطر نکروز) در ژنوتیپ‌های گردو در سال ۱۳۹۲ با استفاده از روش UPGMA

Fig. 2. Cluster analysis of blight severity (necrosis diameter) in walnut genotypes in year 2013 using UPGMA method

بومی دارد (Silsepur *et al.*, 2010). ارقام شاهد سر و پدرو در گروه نسبتاً مقاوم رده‌بندی شدند که مشابه نتایج سیانتس و همکاران (Tsiantos *et al.*, 2007)، سیلسپور و همکاران (۲۰۱۰) و ازاکتان (۲۰۰۹) بود.

غلظت مواد پلی‌فنلی در میوه نارس ژنوتیپ‌های بررسی شده متفاوت بود (جدول ۶ و شکل ۴).



شکل ۳- تجزیه کلاستر شدت بلایت (قطر نکروز) در ژنوتیپ‌های گردو در سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ با استفاده از روش UPGMA

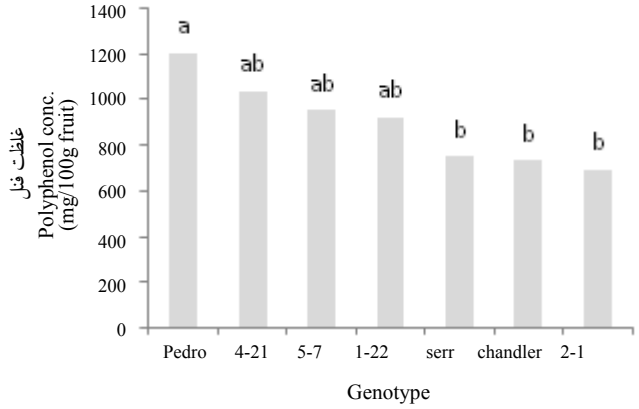
Fig. 3. Cluster analysis of blight severity (necrosis diameter) in walnut genotypes in years 2012 and 2013 using UPGMA method

جدول ۶- ضرایب همبستگی بین صفات مختلف در ژنوتیپ‌های گردو

Table 6. Correlation coefficients between different traits in walnut genotypes

Trait	صفت	شدت بلایت Blight severity	ابعاد میوه Fruiy size
Fruit size	ابعاد میوه	391.0^{ns}	
Polyphenol concentration	غلظت پلی فنل	-325.0^{ns}	-156.0^{ns}

ns: Not significant. ns: غیرمعنی‌دار.



شکل ۴- میانگین غلظت فنل کل در میوه نارس ژنوتیپ‌های گردو

Fig 4. Mean of total phenols in unripe fruits of walnut genotypes

تفاوت غلظت مواد پلی‌فنلی در ارقام مختلف گردو در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (Solar *et al.*, 2006؛ Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2011؛ Botu *et al.*, 2001). کمترین غلظت پلی‌فنل در حساس‌ترین ژنوتیپ (۱-۲) و بیشترین در رقم مقاوم پدرو ردیابی شد که مبین ارتباط نسبی مقاومت با غلظت پلی‌فنل‌ها (R = -0.325) بود اما بررسی دقیق‌تر داده‌ها نشان داد که این ارتباط از نظر آماری معنی‌دار نبود (جدول ۶) و لذا نمی‌توان غلظت پلی‌فنل‌ها را به عنوان شاخصی برای پیش آگاهی مقاومت به بلایت به کار برد. در چند گزارش محدود نیز ارتباط غلظت فنل کل میوه/شاخه گردو با مقاومت به بلایت ضعیف ذکر و نتیجه‌گیری شده که نوسانات فصلی برخی فنل‌ها مانند جوگلان (Juglone) و اسید گالیک (Gallic acid) در مقاومت موثرتر است تا غلظت فنل کل (Matias *et al.*, 2009؛ Solar *et al.*, 2012؛ Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2011). اما در برخی گونه‌های درختی مقاومت به بیمارگرها با غلظت فنل کل مرتبط بوده است. به عنوان مثال در سیب، غلظت پلی‌فنل‌های ساختاری ارقام مقاوم به لکه سیاه بیش از ارقام حساس بوده و ژن‌های مقاومت به لکه سیاه تنظیم گر سنتز پلی‌فنل‌ها هستند (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2009؛ Michalek *et al.*, 1999). در گردوی سیاه (*Juglans nigra* L.) غلظت بالای مواد پلی‌فنلی در مقاومت به آنتراکنوز موثر گزارش شده است (Cline and Neely, 1984).

بر اساس نتایج این تحقیق، ابعاد میوه نارس در ژنوتیپ‌های مختلف متفاوت بود (جدول‌های ۱، ۲ و ۳) که طبیعتاً ناشی از تفاوت در زمان‌های گلدهی است. در سال اول، بزرگ‌ترین میوه متعلق به ژنوتیپ ۲۵-۱ (۱۰۹۶/۹ میلی‌مترمربع) و کوچک‌ترین به ژنوتیپ ۲-۵ (ابعاد ۳۹۸/۳ میلی‌مترمربع) بود. در سال دوم، بزرگ‌ترین میوه در ژنوتیپ ۲-۱ (۱۳۱۵/۵۷ میلی‌متر مربع) و کوچک‌ترین در ژنوتیپ ۲۷-۴ (ابعاد ۴۶۲/۷۹ میلی‌مترمربع) دیده شد. با وجودی که اندازه میوه صفتی ژنتیک است و انتظار می‌رود اندازه‌ها در هر دو سال از الگوی یکسانی تبعیت کنند، اما عواملی مانند بارآوری سالیانه نیز موثر بوده و موجب نوسانات میانگین اندازه میوه در سال‌های مختلف می‌شود. بین شدت بلایت و ابعاد میوه نارس ارتباط معنی‌داری مشاهده نشد (جدول ۶). ظاهراً مکانیسم‌های دفاعی میوه گردو به ابعاد آن بستگی ندارد بلکه بیشتر به مراحل فیزیولوژیک رسیدن میوه مرتبط است. آلودگی ها عموماً در مرحله میوه نارس آغاز می‌شود و میوه رسیده بالغ به نوعی به بلایت مقاوم است.

در مجموع، مشاهدات این تحقیق نشان داد که سطوح مقاومت میوه نارس ژنوتیپ‌های مختلف گردو به بلایت باکتریایی متفاوت است و با توجه به همخوانی نتایج دو ساله، به نظر می‌رسد روش ارزیابی حاضر، روشی قابل قبول

و تکرارپذیر باشد. این روش می‌تواند سنین مختلف میوه نارس را آلوده کند و ابعاد میوه نارس تاثیر چندانی بر نتایج آن ندارد. غلظت فنل کل ارقام مختلف متفاوت است اما رابطه قوی با مقاومت ندارد و توصیه می‌شود برای پیش اگاهی مقاومت، بر روی اسیدهای فنلی مختلف مطالعه شود.

References

Aleta, N., Ninot, A., Moragrega, C., Liorente, I., and Montesinos, E. 2001. Blight sensitivity of Spanish selections of *Juglans regia*. Acta Horticulturae 544: 353-362.

Belisario, A., Are, M., Palangio, C. S., and Zonia, A. 1997. Walnut blight in the genus Juglans. Acta Horticulturae 442: 357-359.

Belisario, A., Zoina, A., Pezza, L., and Luongo, L. 1999. Susceptibility of species of Juglans to pathovars of *Xanthomonas campestris*. European Journal of Plant Pathology 29: 75-80.

Benett, R. C., and Wallsgrove, R. M. 1994. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. New Phytologist 127: 617-633.

Botu, M., Botu, I., Achim, G., and Godeanu, I. 2001. Genetic variability of the *Juglans regia* L. natural populations from Oltenia, Romania. Acta Horticulturae 544: 149-154.

Cline, S., and Neely, D. 1984. Relationship between juvenile-leaf resistance to anthracnose and the presence of juglone and hydrojuglone glucoside in black walnut. Phytopathology 74: 185-188.

Frutos, D. 2010. Bacterial diseases of walnut and hazelnut and genetic resources. Journal of Plant Pathology 92: 79-85.

Gardan, L., Brault, T., and Germain, E. 1993. Copper resistance of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* in French walnut orchards and its association with conjugative plasmids. Acta Horticulturae 311: 259-265.

Lang, M. D., and Evans, K. J. 2010. Epidemiology and status of walnut blight in Australia. Journal of Plant Pathology 92 (S1): 49-55.

Lang, M. D., Hills, J. L., and Evans, K. E. 2006. Preliminary studies toward managing walnut blight in Tasmania. Acta Horticulturae 705: 451-456.

Matias, J., Aletà, N., Rovira, C., and Moragrega, C. 2009. Phenolic composition in *Juglans regia* commercial cultivars. Relationship with blight susceptibility. COST

873 Annual meeting of working groups 1, 2, 3 and 4. Cetara (SA), Italy. Available from: http://www.cost873.ch /_uploads/_files/JMatias_ Walnut Phenolics_Italy_1.pd

Mayr, U., Michalek, S., Treutter, D., and Feucht, W. 1997. Phenolic compounds of apple and their relationship to scab resistance. Journal of Phytopathology 145: 69-75.

Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Veberic, R., Stampar, F., and Solar, A. 2011. Phenolic response in green walnut husk after infection with bacteria *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. Physiological and Molecular Plant Pathology 76: 159-165.

Mikulic Petkovsek, M., Stampar, F., and Veberic, R. 2009. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. Physiological and Molecular Plant Pathology 74: 60-67.

Miller, P. W., and Bollen, W. B. 1946. Walnut bacteriosis and its control. Technical Bulletin, Oregon Agricultural Experiment Station, Oregon, USA. 9. 107 pp.

Ozaktan, H. 2009. Evaluation of susceptibility of some walnut cultivars to *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* by immature nut test. COST 873, WG3 Meeting, Sibiu, Romania.http://www. cost873.ch/_uploads /_files/ASolar_Phenols.pdf

Pastore, M., Consoli, D., and Cristinzio, G. 1997. Susceptibility of 32 walnut varieties to *Gnomonia leptostyla* and *Xanthomonas campestris* pv. *juglandi*s. Acta Horticulturae 442: 379-382.

Radix, P., Bastien, C., Jay-Allemand, C., Charlot, G., and Siegle-Murandi, F. 1998. The influence of soil nature on polyphenols in walnut tissues. A possible explanation of differences in the expression of walnut blight. Agronomie 18: 627-637.

Silsepur, L., Keshavarzi, M., Hassani, D., and Hashemi, M. 2010. Necessity of different walnut organs evaluation for selection of blight resistant cultivars. Iranian Journal of Plant Protection 46: 325-329.

Silsepur, L., Keshavarzi, M., Hassani, D., and Hashemi, M. 2012. Reaction of some walnut cultivars and genotypes to bacterial blight disease caused by *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. Seed and Plant Improvement Journal 28-1: 395-405 (in Persian).

Singleton, V. L., and Rossi, J. A. Jr. 1965. Colorimetry of total phenolics with phsphomolibdic-phosphotungestic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture 16: 144-158.

Solar, A., Colaric, M., Hudina, M., and Stampar, F. 2006. Phenolic content of walnut fruit as affected by cultivar and developmental stage. Acta Horticulturae 705: 231-240.

Solar, A., Jakopic, J. R., Veberic, F., and Stampar, F. 2012. Correlations between *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* severity and endogenous Juglane and phenolic acids in walnut. Journal of Plant Pathology 94: 229-235.

Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. pp. 384-446. In: Dey, P. M., and Harborne, J. B. (eds), Plant Biochemistry, Academic Press, London, UK.

Tamponi, G., and Donati, G. 1990. Walnut cultivars susceptibility to *Xanthomonas juglandis*. Acta Horticulturae 284: 301-302.

Tsiantos, J., Vagelas, I.K., Rumbos, C., Chatzaki, A., Rouskas, D., and Gravanis, F. T. 2007. Evaluation of ressitance of cultivated walnut varieties and selections to *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. COST 873, WG3/WG4 Joint Meeting, Murcia.

Vagelas, I. K., Rumbos, C. I., and Tsiantos, J. 2012. Variation in disease developemt among Persian walnut cultivars, selections and crosses when inoculoated with *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. Plant Pathology 94: 57-61.

Woeste, K. E., and McGranaham, G. H. 1992. Variation among Persian walnuts in response to inoculation with *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*. Journal of American Society for Horticultural Sciences 117: 527-531.