

## لزوم ارزیابی مقاومت اندام‌های مختلف گردو به منظور انتخاب ارقام مقاوم به بلایت باکتریایی\*

### NECESSITY OF DIFFERENT WALNUT ORGANS EVALUATION FOR SELECTION OF BLIGHT RESISTANT CULTIVARS

لیدا سیلسپور<sup>۱</sup>، منصوره کشاورزی<sup>۲\*</sup>، داراب حسنی<sup>۲</sup>، مجید هاشمی<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱۲/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۹/۱۷)

#### چکیده

کاشت ارقام مقاوم یکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل بیماری بلایت باکتریایی گردو با عامل *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* است. با توجه به حساسیت کلیه بافت‌های سبز درخت گردو به بیماری بلایت، هدف از این تحقیق بررسی میزان مقاومت نسبی اندام‌های برگ، میوه نارس و میوه رسیده ارقام جدید داخلی جمال و دماوند، ژنوتیپ برتر داخلی Z67 و ارقام تجاری Pedro, Serr, Chandler, Franquette, Hartley به منظور تعیین روش مناسب در ارزیابی مقاومت به این بیماری بود. جدایه‌های باکتری عامل از میوه‌های آلوده باغات قزوین، کرج، زنجان و ارومیه جداسازی شده و پس از شناسایی، مخلوط چهار جدایه به عنوان مایه تلقیح به کار برده شد. نهال‌های پیوندی ارقام در سن یک سالگی مورد ارزیابی مقاومت برگ در شرایط گلخانه قرار گرفتند. مقاومت میوه‌های نارس در شرایط آزمایشگاه و میوه‌های رسیده در شرایط باغ ارزیابی شد. بر اساس نتایج، میزان مقاومت اندام‌های مختلف در ارقام مختلف متفاوت بود ( $P \leq 0.01$ ). با توجه به عدم هم‌بستگی بین میزان مقاومت برگ و میوه، تعیین میزان حساسیت هر دو اندام در ارزیابی مقاومت ارقام گردو به بیماری بلایت ضروری است.

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

\* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌های گیاهی نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

\*\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mansoureh\_1343@yahoo.com

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌های گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان

۲. استادیاران پژوهشی مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج

## مقدمه

بلایت باکتریایی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گردو در جهان است. با توجه به تفاوت میزان مقاومت ارقام مختلف گردو به این بیماری، کاشت ارقام مقاوم یکی از مهم‌ترین روش‌های کنترل است و در سراسر جهان غرب‌الگری‌های متعددی برای شناسایی منابع مقاومت به این بیماری صورت گرفته است (Aleta et al. 2001; Woeste et al. 1992; Belisario et al. 1997). تا کنون در کشور مطالعه‌ای روی مقاومت ارقام گردو به بلایت به جزء بررسی مقاومت برگ ۱۷ ژنوتیپ بذری همدان که نتایج آن موید تنوع مقاومت برگ ژنوتیپ‌ها بود (Soltanee et al. 2002) انجام نشده است. از سویی، اگرچه محلول پاشی برگ رایج‌ترین شیوه ارزیابی مقاومت گردو به بلایت است، با توجه به اینکه کلیه بافت‌های سبز گیاه به این باکتری حساس بوده و هر یک سهمی در چرخه بیماری دارند، لازم است واکنش مقاومتی هر بافت و هم‌بستگی بین این واکنش‌ها بررسی شود. هدف از این تحقیق تعیین سطح نسبی مقاومت برگ، میوه نارس و میوه رسیده به بیماری بلایت و درصد هم‌بستگی بین این مقادیر بود. بدین منظور از ۵ رقم مهم خارجی و ۳ ژنوتیپ داخلی Z67, Z63, Z30 استفاده شد. این ژنوتیپ‌های داخلی از بین ۲۵۰ ژنوتیپ برتر بومی گردو که از سال ۱۳۶۲ در مؤسسه تحقیقات اصلاح نهال و بذر جمع‌آوری شده بودند انتخاب شد (Hassani et al. 2007) و ژنوتیپ‌های Z30 (گرده دهنده) و Z63 در سال ۱۳۸۹ به عنوان اولین ارقام بومی باغی ایران تحت اسامی دماوند و جمال آزاد (Release) شده‌اند. وزن میوه رقم جمال بیش از ۱۲ گرم بوده و دارای ۵۰٪ مغز و عملکردی بالا می‌باشد. وزن میوه رقم دماوند نیز بالای ۱۲/۵ گرم با ۵۰٪ مغز است. ژنوتیپ Z67 عملکرد کمتری نسبت به رقم جمال دارد و

اندازه میوه آن کوچک‌تر از ۲ رقم قبلی اما درصد مغز آن ۵۴٪-۵۳/۵- است.

## روش بررسی

میوه‌های آلوده از درختان گردوی شهرهای کرج، قزوین، زنجان و ارومیه جمع‌آوری و تعداد ۱۶ سویه باکتری زردرنگ روی محیط آگار غذایی (Nutrient agar) جدا و خالص‌سازی و توسط تعدادی آزمون کلیدی فنوتیپی شناسایی شدند. آزمون بیماری‌زایی توسط پاشیدن سویه‌ها روی نهال‌های بذری یک ساله در شرایط گلخانه (دمای  $30^{\circ}\text{C}$  -  $25^{\circ}\text{C}$  و رطوبت نزدیک به اشباع) و مایه‌زنی سویه‌ها به شاخه‌های ترد و سبز گیاه انجام شد. به منظور تهیه مایه تلقیح، از هر شهر یک سویه انتخاب و بمدت ۲۴ ساعت در آبگوشت غذایی در شیکر انکوباتور با سرعت  $150^{\circ}$  دور در دقیقه و دمای  $25^{\circ}\text{C}$  کشت داده شدند. سپس غلظت آنها با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول  $600$  نانومتر به روی  $10^8$  CFU در میلی‌لیتر تنظیم و حجم‌های یکسان مخلوط و به کار برده شد.

مواد گیاهی مورد استفاده شامل ارقام داخلی دماوند و جمال و ژنوتیپ برتر داخلی Z67 و ارقام تجاری فرانسوی فرانکت (Franquette) و آمریکایی چندلر، پدرو، هارتلی، سر (Chandler, Hartely, Pedro, Serr) بودند. کلیه ارقام روی پایه‌های بذری پیوند شدند و در سن یک سالگی در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد ارزیابی برگ در شرایط گلخانه (۹-۶ تکرار)، میوه نارس در شرایط آزمایشگاه (۱۶ تکرار) و میوه رسیده در شرایط باغ کلکسیون گردوی مؤسسه تحقیقات اصلاح نهال و بذر واقع در کمالشهر کرج (۲ تکرار و ۳ درخت و ۱۰۰ میوه از هر درخت: ۳۰۰ میوه در هر واحد آزمایشی) قرار گرفتند. آلوده‌سازی برگ با محلول پاشی مایه تلقیح روی کل نهال

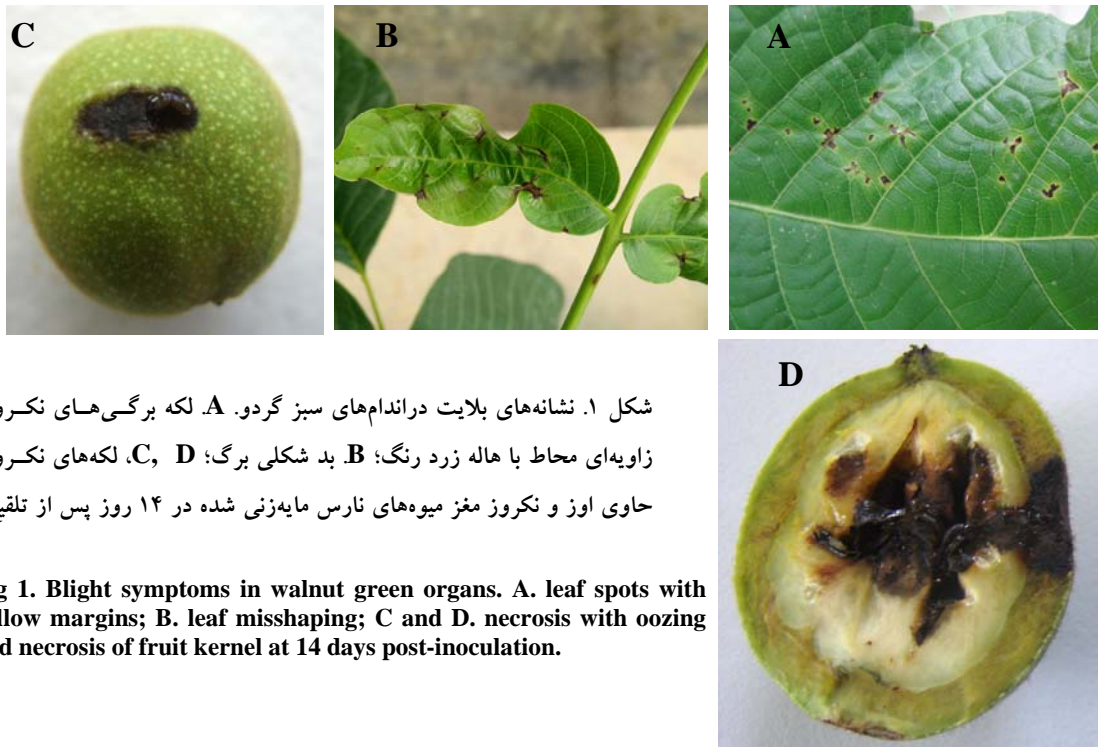
بودن، هیدرولیز کازئین، اسکولین، نشاسته، تویتن و ژلاتین، عدم احیای نیترات، تولید مواد احیا کننده از سوکروز، تولید گاز سولفید هیدروژن از پپتون و سیستئین، واکنش (ضعیف اکسیداز)، تولید لسیتیناز، کاتالاز و اندول و عدم تولید اوره از، *X.a. pv. juglandis* تشخیص داده شدند. مخلوط ۴ جدایه از ۴ شهر در مایه تلقیح به کار برده شد تا احتمال واکنش‌های سویه- اختصاصی (Race-specific) بر میزان مقاومت ارقام برطرف شود (Woeste et al. 1982).

ارزیابی مقاومت برگ نشان داد که در طی ۱۰-۷ روز پس از پاشیدن مایه تلقیح روی نهال، لکه‌های زاویه‌ای محاط با هاله زرد رنگ و بدشکلی در برگ‌ها ظاهر شد و تعداد و ابعاد آنها به مرور زمان افزایش یافت (شکل ۱). در ۲۱ روز پس از مایه‌زنی، میزان تعداد لکه‌های برگ در ارقام مختلف به طور معنی‌داری ( $P \leq 0/01$ ) متفاوت بود (جدول ۱). تفاوت مقاومت برگ ارقام مختلف گردو به بیماری بلایت قبلاً نیز گزارش شده است (Woeste et al. 1982, Aleta et al. 2001). برگ رقم Serr حساس و برگ ارقام فرانکت، چندلر، هارتلی و پدرو به طور نسبی مقاوم بودند که هماهنگ با گزارش‌های موجود است (Aleta et al. 2001; Teviotdale et al. 1990; Tamponi and Donati, 1985). علائم بلایت در میوه نارس به صورت لکه‌های سیاه نکروزه و گاه‌آب‌سوخته در طی سه روز پس از مایه‌زنی ظاهر و به تدریج گسترده شد (شکل ۱). مقایسه میانگین طول زخم‌ها در ۱۴ روز پس از تزریق نشان داد که مقاومت میوه نارس ارقام مختلف متفاوت است ( $P \leq 0/01$ ) (جدول ۱) و ارقام بومی نسبتاً مقاوم و ارقام چندلر و فرانکت نسبتاً حساس بودند. حساسیت بالای میوه نارس ارقام چندلر و فرانکت قبلاً نیز گزارش شده است (Aleta et al. 2001). فراوانی بلایت در میوه‌های رسیده ارقام مختلف نیز متفاوت بود

(Woeste et al. 1992) انجام و بیست و یک روز بعد، شدت بلایت در برگچه‌ها بر اساس مقیاس پنج گانه شامل، صفر: سالم، ۱: کمتر از ۵۰۰ لکه، ۲: ۵۰۰-۱۰۰۰ لکه، ۳: ۱۰۰۰-۱۵۰۰ لکه، ۴: بیش از ۱۵۰۰ لکه و ۵: نکروز کامل و ریزش برگچه، اندازه‌گیری و نمره‌دهی شد. به منظور مایه‌زنی میوه نارس (Aleta et al. 2001)، سه مایه‌زنی هر کدام با ۲۵ میکرولیتر در هر میوه انجام و میوه‌ها به مدت ۱۰ روز درون جعبه‌های شفاف روی توری که زیر آن تا یک سانتی‌متر آب سترون ریخته شده، نگهداری و روزانه ۳ نوبت به طور ملایم مه پاشی شدند و ۱۵ روز پس از مایه‌زنی، قطر لکه‌ها اندازه‌گیری شد. در میوه‌های رسیده، فراوانی آلودگی طبیعی میوه‌ها در شرایط باغ به صورت در صد میوه‌های آلوده اندازه‌گیری شد. تجزیه داده‌ها و تعیین هم‌بستگی صفات توسط نرم‌افزار SAS انجام و میانگین داده‌ها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شد. در کلیه ازمون‌های از آب مقطر به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

## نتایج و بحث

در مجموع تعداد ۱۶ جدایه از میوه‌های آلوده قزوین، ارومیه، زنجان و کرج جدا و خالص‌سازی شدند. کلیه جدایه‌ها در محیط آگار غذایی کلنی‌های نرم، برآمده با حاشیه کامل، زرد رنگ و درخشان و در محیط YDC کلنی‌های نرم برآمده زرد رنگ ایجاد کردند. بر اساس نتایج آزمون‌های اثبات بیماری‌زایی، لکه‌های نکروزه زاویه‌ای محاط با هاله زردرنگ در برگ و زخم‌های نکروزه سیاه در شاخه در طی دو هفته پس از مایه‌زنی ظاهر شدند. جدایه‌های جمع‌آوری شده بر پایه خصوصیات فنوتیپی شامل: عدم تولید رنگ فلوروسنت، واکنش مثبت فوق حساسیت، واکنش منفی گرم، تولید لوان، هوازی اجباری



شکل ۱. نشانه‌های بلایت در اندام‌های سبز گردو. A. لکه برگی‌های نکروزه زاویه‌ای محاط با هاله زرد رنگ؛ B. بد شکلی برگ؛ C, D. لکه‌های نکروزه حاوی اوز و نکروز مغز میوه‌های نارس مایه‌زنی شده در ۱۴ روز پس از تلقیح.

**Fig 1. Blight symptoms in walnut green organs. A. leaf spots with yellow margins; B. leaf misshaping; C and D. necrosis with oozing and necrosis of fruit kernel at 14 days post-inoculation.**

جدول ۱. میانگین مقاومت نسبی به بلایت در اندام‌های برگ، میوه نارس و میوه رسیده ارقام مختلف گردو

**Table 1. Mean values of relative resistance to blight in leaves, unripe and ripen fruits of different walnut cultivars.**

| فرآوانی بلایت در میوه رسیده (%)      | طول نکروز در میوه نارس                   | مقیاس شدت بلایت در برگ        | رقم        |
|--------------------------------------|--|-------------------------------|------------|
| Blight frequency in ripen fruits (%) | length of necrosis in unripe fruits (mm) | blight severity scale in leaf | cultivar   |
| 2.48A                                | 9.85B                                    | 5A                            | Serr       |
| 2.16AB                               | 5.0C                                     | 4AB                           | Z67        |
| 1.91BC                               | 8.68BC                                   | 3.75AB                        | Z30        |
| 1.82BC                               | 4.95C                                    | 3.5AB                         | Z63        |
| 1.56C                                | 14.84A                                   | 2.71B                         | Hartley    |
| 1.54C                                | 10.36AB                                  | 2.5B                          | Franquette |
| 1.47C                                | 11.93AB                                  | 2.5B                          | Chandler   |
| 1.46C                                | 12.04AB                                  | 2.17B                         | Pedro      |

Means followed by the same letters are not significantly different .

اعداد با یک حرف از نظر آماری متفاوت نیستند.

گزارش شده است (Aleta et al. 2001).  
بررسی هم‌بستگی بین صفات مختلف (حساسیت برگ،  
میوه نارس و میوه رسیده) نشان داد که بین حساسیت میوه

( $P \leq 0/01$ ) و ارقام بومی و Serr از حساسیت بالاتری  
نسبت به سایر ارقام برخوردار بودند (جدول ۱). مقاومت  
بالای میوه رسیده در ارقام فرانکت و چندلر قبلاً نیز

تلقیح، بلکه به سطوح حساسیت بافت‌های مختلف نیز ارتباط دارد. با این وجود از میزان دخالت حساسیت اندام‌های مختلف در سطوح خسارت اقتصادی این بیماری و اینکه مقاومت کدام بافت از نظر اقتصادی مهم‌تر است، اطلاعی در دست نیست. در کشورهای مستعد این بیماری، تولید کنندگان حداقل ۱۰٪ خسارت میوه در سال در اثر بلایت را پذیرفته‌اند که این میزان بدون احتساب خسارت ناشی از ریزش اولیه میوه نارس، که غیر قابل اندازه‌گیری و محاسبه است، می‌باشد.

#### منابع

جهت ملاحظه به صفحات (125-126) متن انگلیسی مراجعه شود.

نارس و میوه رسیده هم‌بستگی منفی ( $P \leq 0/05$ ) با ضریب هم‌بستگی ۰/۶۹۸ وجود دارد. وجود این هم‌بستگی منفی می‌تواند ناشی از ریزش میوه‌های نارس حساس باشد که منجر به کاهش فراوانی بلایت در میوه‌های رسیده می‌گردد در حالی که میوه‌های نارس مقاوم دچار ریزش کمتری شده و بسیاری تا زمان رسیدن بر روی درخت باقی می‌مانند که این موجب افزایش فراوانی بلایت در میوه‌های رسیده‌ای که از رشد میوه‌های نارس آلوده حاصل شده‌اند، می‌گردد. نتایج مشابهی مبنی بر حساسیت بالای میوه نارس در ارقام مقاوم به بلایت (که فراوانی بلایت در میوه رسیده آنها پائین است) توسط آلتا و همکاران (۲۰۰۱) گزارش شده است.

بر اساس این نتایج به نظر می‌رسد که در برنامه‌های ارزیابی مقاومت به بیماری بلایت، کل چرخه بیماری باید مد نظر قرار گیرد زیرا شدت بلایت نه تنها به جمعیت مایه