DOI: 10.22092/spj.2025.367684.1388

"نهال و بذر"
جلد ۴۰، شماره ۱، سال ۱۴۰۳

مقاله پژوهشی

واکنش هیبریدهای امیدبخش گردو به بیماری لکه سیاه (*Ophiognomonia leptostyla*)

Reaction of Promising Walnut Hybrids to Black Spot Disease (*Ophiognomonia leptostyla*)

رعنا دستجردی[۱*]، اصغر سلیمانی[۲]، سولماز نادی[۳] و داراب حسنی[۴]

۱- دانشیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۲- استادیار، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۳- کارشناس، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.
۴- استاد، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۲۰

چکیده

دستجردی، ر.، سلیمانی، ا.، نادی، س. و حسنی، د. ۱۴۰۳. واکنش هیبریدهای امیدبخش گردو به بیماری لکه سیاه (*Ophiognomonia leptostyla*). **نهال و بذر** ۴۰: ۱۵۰-۱۲۷

بیماری لکه سیاه گردو (*Ophiognomonia leptostyla*)، یکی از مهمترین بیماری‌های برگی این محصول در اغلب مناطق گردوکاری است. در این پژوهش، واکنش نهال‌های پیوندی چهار هیبرید امیدبخش و پرمحصول گردو (H 1-7, H 2-1, H 1-1, H 2-12) به همراه رقم هارتلی (Hartley) و ژنوتیپ K72 به‌ترتیب به عنوان شاهد مقاوم و حساس، در برابر قارچ عامل بیماری مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار و دو عامل جدایه قارچی (در دو سطح) و ارقام و ژنوتیپ‌های گردو (در ۶ سطح) انجام شد. در بهار ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ نهال‌های گردو با استفاده از سوسپانسیون کنیدی قارچ با غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر مایه‌زنی شدند. تعداد و قطر لکه‌های نکروز، در سه نوبت به فواصل ۱۵ روز یادداشت‌برداری شد. نتایج نشان داد که ۴۵ روز پس از مایه‌زنی، بیشترین تعداد لکه به هیبرید H 2-12 تعلق داشت. همچنین بزرگترین لکه‌های بیماری روی هیبریدهای H 1-1 و H 1-7 مشاهده شد. اولین آسروول‌ها، ۴۴-۴۳ روز پس از مایه‌زنی، بر روی ژنوتیپ‌های H 1-1 و H 2-12 ظاهر شدند. کلیه‌ی ژنوتیپ‌ها در برابر بیماری حساس بودند، اما شدت بیماری در آنها متفاوت بود. میانگین سطح آلوده برگچه‌ها (NLA) در دامنه‌ای از ۲۰ (در هارتلی) تا ۹۰ درصد (در H 1-7) متغیر بود. براساس درصد سطح نکروز برگچه‌ها، هیبریدهای H 1-7، H 1-1 و H 2-12 به همراه K72 در گروه فوق حساس، و هیبرید H 2-1 با میانگین ۵۲ درصد آلودگی در گروه نیمه‌حساس طبقه‌بندی شدند. هارتلی نیز میزان اندکی از آلودگی را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: گردو، مایه زنی، نکروز، سطح نکروز برگچه‌ها، مقاومت.

* نگارنده مسئول: r.dastjerdi@areeo.ac.ir تلفن: ۰۲۶۳۶۷۰۵۰۶۲

2024© Seed and Plant. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

مقدمه

ایران با دارا بودن ۱۶۳ هزار هکتار سطح زیرکشت و تولید بیش از ۲۹۲ هزار تن گردو یکی از مهمترین تولیدکنندگان این محصول در جهان است (Anonymous, 2023). ولی متاسفانه با وجود پتانسیل‌های مطلوب، اغلب باغ‌های گردو با استفاده از نهال‌های بذری ایجاد می‌شوند. وجود دوره نونهالی طولانی، باغ‌های غیریکنواخت که محصول تولیدی آنها از نظر کمی و کیفیت با عملکرد ارقام اصلاح‌شده در دنیا فاصله زیادی دارد، و همچنین مشکلاتی برای ورود محصول به بازارهای جهانی، از جمله پیامدهای این موضوع می‌باشند (Hassani *et al.*, 2020).

یکی از مهمترین دلایل وضعیت موجود در باغ‌های گردو در ایران، عدم وجود و دسترسی باغداران به ارقام مناسب، سازگار و مقاوم به بیماری‌های مهم گردو است. برای ایجاد باغ‌های یکنواخت که از عملکرد و کیفیت محصول مطلوبی برخوردار باشند، معرفی ارقام جدید و پرمحصول ضرورت دارد (Hassani *et al.*, 2020). پرواضح است که برای معرفی رسمی ارقام جدید به باغداری کشور، می‌بایست مقاومت آنها در برابر بیماری‌های مهم نیز مورد آزمون قرار گیرد تا بتوان با اطمینان، رقم مناسب و سازگار برای کاشت در هر منطقه را انتخاب و توصیه کرد (Hassani *et al.*, 2020; Dastjerdi and Nadi, 2019).

بیماری لکه سیاه (*Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov) یکی از مهمترین بیماری‌های برگی گردو است که هرساله در اکثر مناطق گردوکاری دنیا خسارت فراوانی بر کمیت و کیفیت محصول وارد می‌کند. بیماری عمدتاً برگ، دمبرگ، شاخه‌های جوان و میوه را مورد حمله قرار داده و سبب کندی رشد درختان، ریزش برگ و میوه قبل از بلوغ، و کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌شود (Cline and Neely, 1983; Teviotdale *et al.*, 2002; Juhasova *et al.*, 2006). مطالعات انجام شده نشان می‌دهد که این بیماری در مناطق مختلف گردوکاری ایران نیز وجود دارد (Ershad, 2009).

اگرچه آمار دقیق و مدونی از میزان خسارت بیماری در ایران دردست نیست، اما با توجه به استقرار بیمارگر بر روی برگ، دمبرگ و میوه، کاهش عملکرد محصول به‌ویژه در سال‌هائی که شیوع گسترده بیماری رخ می‌دهد، قابل ملاحظه است. در برخی از سال‌ها به‌خصوص در فصول سرد و بارانی در شمال‌غرب ایران، خسارت به عملکرد و کیفیت محصول حدود ۸۰-۶۰ درصد گزارش شده است (Saremi and Amiri, 2010). هر چند کنترل شیمیایی بیماری امکان‌پذیر است، اما با توجه به محدودیت‌های کاربردی سموم شیمیائی در تاج درختان گردو، نگرانی‌های ناشی از کاربرد سموم، اثربخشی اندک سایر روش‌های کنترل، و نیز در راستای مدیریت تلفیقی عوامل بیماریزا، دستیابی به ارقام مقاوم می‌تواند به عنوان یک راهبرد منطقی جهت کاهش خسارت درنظر گرفته شود.

گونه‌های مختلف جنس *Juglans* سطوح متفاوتی از حساسیت به بیماری لکه سیاه را

نشـان می‌دهند. نتایج تحقیق بلیسـاریو و همکاران (Belisario *et al*., 2001) در ایتالیا نشـان می‌دهد که خسـارت قارچ عامل بیماری در نهالسـتان‌های گردو ناچیز اسـت و فقط باغ‌های گردوی ایرانی (*J. regia*) و گردوی سـیاه (*J. nigra*) متحمل خسارت شـدند. گروهی دیگر از پژوهشـگران در ارزیابی‌های مزرعه‌ای، *J. regia* را یک گونه نسبتاً حسـاس و *J. nigra* را مقاوم به بیماری گزارش نموده‌اند. اگرچه ارقام گردوی سیاه با نام‌های اوهیو (Ohio)، توماس (Thomas) و اسپارو (Sparrow) مقاوم به بیماری لکه سـیاه می‌باشـند، اما در موقعیت‌های بسیار مساعد برای گسترش بیماری، این ارقام نیز درصدی از آلودگی را نشان می‌دهند (Beri, 1960; Reid *et al*., 2004).

مطالعات انجام‌شـده در شـرایط گلخانه، میزان حسـاسـیت گونه‌های *J. hindsii* و *J. major* را بیشـتر از گردوی سـیاه، و حساسیت گردوی ژاپنی (*J. Ailantifolia*)، گردوی ریز (*J. microcarpa*)، و گردوی کره‌ای (*J. cinerea*) را کمتر از گردوی سیاه نشان داده است (Black and Neely, 1978). بررسـی‌های انجام‌شـده برای یافتن منابع مقاومت به بیماری لکه سـیاه در جنس *Juglans* و در دو منطقه مختلف آب و هوائی ایتالیا، حسـاسـیت فوق‌العاده زیاد *J. nigra* و *J. hindsii* را در برابر قارچ عامل بیماری نشـان داد. در این مطالعات، *J. cinerea* و *J. sieboldiana* کاملاً مقاوم گزارش شـدند. گردوی ایرانی نیز پاسـخ متوسـطی را در مقابل بیماری نشـان داد (Belisario *et al*., 2008).

ارزیابی مقاومت با استفاده از روش‌های مختلف انجام می‌شود، اما آنچه مهم است داشتن اطلاعات کافی درخصـوص عامل بیماری و چرخه زندگی آن است. جمعیت‌های گیاهی می‌توانند در گلخانه، نهالستان، مزرعه و حتی در محیط‌های آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گیرند. در بسـیاری از موارد، آزمایش‌های گلخانه‌ای جایگزین ارزیابی‌های مزرعه‌ای شـده‌اند. در این گونه آزمایش‌ها معمولاً نتایج پژوهش قابل اطمینان بوده و از تکرارپذیری مطلوبی برخوردار می‌باشـند (Mehlenbacher, 1995). ارقام مختلف گردو از نظر مقاومت به بیماری لکه سـیاه از وراثت‌پذیری بسـیار بالایی برخوردارند (Beineke and Masters, 1973). در گونه‌ی گردوی سیاه نیز مقاومت به صورت ژنتیکی قابل انتقال اسـت. این موضـوع نشـان می‌دهد کـه امکـان بهبود ژنتیکی ارقام گردو از نظر مقاومت به این بیماری خسـارت‌زا وجود دارد (Reid *et al*., 2004).

در بررسـی عکس‌العمل ۳۷ ژنوتیپ گردو در برابر قارچ *O. leptostyla* در شـرایط طبیعی، اگرچه ژنوتیپ کاملاً مقاومی در برابر بیماری یافت نشـد، اما برخی ژنوتیپ‌ها به لحاظ دیربرگ‌دهی نسبت به سایر ارقام از مقاومت بالاتری برخوردار بودند و نسبتاً مقاوم به بیماری گزارش شـدند. پایهٔ دورگ‌هـای فـرانـکـت (Franquette)، کـورن (Corne) و رقم پارادوکس (Paradox) کمتر از ۱۰درصد آلودگی برگ را نشان دادند (Balaz *et*

(*al*., 1993). همچنین مطالعه **۳۲** رقم گردو در یک کلکسیون عاری از ویروس، نشان داد که قارچ عامل بیماری قادر به ایجاد آلودگی در ارقام هارتلی (Hartley) و مایت (Mayette) نبود، اما گونه *J. jefe* و VZ5 حساسیت فوق‌العاده‌ای به بیماری نشان دادند (Pastore *et al*., 1997).

مطالعات انجام‌شده در سال‌های ۱۰-۲۰۰۶ میلادی برای ارزیابی مقاومت **۱۳** رقم گردوی ۸-۵ ساله در شرایط طبیعی باغ در بلغارستان، بیانگر رابطه نوع باردهی درختان گردو با شدت بیماری بود. پژوهشگران با بیان اینکه هیچ کدام از ارقام/ژنوتیپ‌های مورد مطالعه، کاملاً مقاوم نبودند، اظهار داشتند ارقامی با باردهی انتهائی (نظیر Serr, Slivenski, Izvor 10) در مقایسه با ارقامی که باردهی جانبی دارند، از حساسیت بیشتری در برابر بیماری برخوردار بودند (Arnaudov and Gandev, 2009; Arnaudov *et al*., 2014).

نتایج پژوهش‌های انجام شده در بلغارستان نشان داد که ارقام زودبرگ‌ده با باردهی انتهائی، نسبت به ارقام دیربرگ‌ده با همان وضعیت باردهی، حساس‌تر می‌باشند. همچنین ارقام زودبرگ‌ده با باردهی جانبی (مثل Hartley, Lara, Tizacsecsi, Millotai) نیز حساس‌تر از ارقام دیربرگ‌ده با باردهی مشابه (از قبیل Chandler, Fernor, Fernette) بودند (Arnaudov and Gandev, 2009; Arnaudov *et al*., 2014). در سال ۲۰۱۸ میلادی نیز حساسیت دو رقم گردوی ترک (Chebin, Bilecik)، سه رقم گردوی بلغاری، ارقام چندلر (Chandler) و پدرو (Pedro) در باغ‌های ارگانیک بلغارستان گزارش شد؛ در حالی که رقم فرنور (Fernor) به طور کامل از آلودگی به بیماری مصون باقی ماند (Jelev and Marinov, 2018).

پژوهش‌های انجام‌شده در ایران در زمینه مقاومت ارقام و ژنوتیپ‌های گردو به بیماری لکه سیاه نسبتاً اندک است. ارزیابی مقاومت به بیماری در کلکسیون گردوی کهریز ارومیه نشان داد که ژنوتیپ B21 (به عنوان یک ژنوتیپ خوشه‌ای و زودبرگ‌ده) حساس‌ترین، و ژنوتیپ‌های OR4 و T19 از مقاومت بالایی برخوردارند. یک بررسی مقدماتی دیگر در سال‌های ۱۳۸۰-۱۳۷۶ در گردوکاری‌های قزوین، توده محلی الموتی (Alamoty) را به عنوان توده مقاوم گزارش نمود (Saremi *et al*., 2003). مطالعه‌ای دیگر بر روی کلون‌های ایرانی گردو در شمال‌غرب ایران در شرایط گلخانه، ضمن تائید مقاومت مطلوب کلون الموتی، مقاومت رقم ضیاآبادی (Ziyaabadi) در برابر آلودگی را متوسط ارزیابی کرد (Saremi and Amiri, 2010).

برنامه‌های به‌نژادی و توسعه گردو در ایران از سال **۱۳۶۲** با هدف دست‌یابی به ارقام و پایه‌های جدید، در بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر آغاز شد. در این برنامه‌ها ضمن تأکید بر صفات مطلوب باغبانی و افزایش عملکرد کمی و کیفیت محصول، به مقاومت/تحمل ارقام جدید در برابر بیماری‌های مهم نیز توجه شده است. حاصل این برنامه‌ها، معرفی رسمی اولین ارقام جدید گردو با

نام‌های جمال و دماوند در سال ۱۳۸۸ (Hassani *et al*., 2012a; Hassani *et al*., 2012b) و ارقام کاسپین، الوند، چالدران و پرشیا در سال ۱۳۹۸ بود (Hassani *et al*., 2020). در بررسی‌های گلخانه‌ای برای تعیین واکنش این ارقام در برابر بیماری لکه سیاه ، رقم جمال (زود تا میان برگ‌ده) دارای حساسیت کم، رقم زودبرگ‌ده دماوند نسبتا مقاوم، رقم دیربرگ‌ده پرشیا نسبتا مقاوم، و رقم کاسپین از حساسیت اندکی در برابر بیماری برخوردار بودند (Dastjerdi and Hassani, 2009; Dastjerdi *et al*., 2023). ارزیابی‌های باغی برای بررسی میزان مقاومت این ارقام در شرایط آلودگی‌های طبیعی همچنان ادامه دارد.

در این پژوهش، واکنش چهار هیبرید امیدبخش گردو که حاصل برنامه‌های به‌نژادی طولانی‌مدت این محصول در ایران می‌باشند، به قارچ عامل بیماری لکه سیاه مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی مواد گیاهی برای انجام آزمون‌های مقاومت

پایه‌های بذری یک‌ساله *J. regia* (با گرده‌افشانی آزاد) که از دی ۱۳۹۸ در زمین کشت شده بودند، در بهمن ماه ۱۳۹۹ از زمین خارج و پس از انتقال به کیسه‌های پلاستیکی ۱۰ لیتری (به ابعاد cm ۳۰ × ۲۵)، حاوی مخلوطی از خاک سترون، شن، پرلیت، پیت‌ماس (1:1:1:2 V/V) به همراه ۵۰۰ گرم تریپل سوپرفسفات، ۱۰۰ گرم KNO_3، ۵۰ گرم $FeSO_4$، ۵۰ گرم $CuSO_4$، ۳۰ گرم $MgSO_4$، ۲۰ گرم $ZnSO_4$، و ۱۰ گرم $MnSO_4$ در متر مکعب، جهت طی فرآیند رشد، به گلخانه‌ی پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری- موسسه تحقیقات علوم باغبانی در کرج با دمای ۱°C ± ۲۷ منتقل شدند.

پیوندک‌های مورد استفاده، در بهمن ۱۳۹۹ از شاخه‌های یک‌ساله درختان نه ساله در کلکسیون گردوی ایستگاه تحقیقات باغبانی مشکین‌آباد- کرج تهیه و پس از ضدعفونی و بسته‌بندی، تا زمان پیوند در سردخانه با دمای ۱°C ± ۴ نگهداری شدند. با شروع رشد رویشی پایه‌ها، پیوند ارقام/ژنوتیپ‌های مورد مطالعه (شامل چهار هیبرید امیدبخش H 2-1, H 1-1, H 1-7, H 2-12، رقم تجاری هارتلی (Hartley) و ژنوتیپ K72) در اوائل فروردین ۱۴۰۰ به روش چیپ (Chip budding) بر روی پایه‌های بذری گردو انجام، و نهال‌ها در گلخانه با رطوبت نسبی ۹۰-۸۰ درصد و دمای ۱°C ± ۲۷ نگهداری شدند. از هر ژنوتیپ ۵۰-۴۰ اصله نهال پیوندی تهیه شد. نهال‌های پیوندی موفق تا زمان مایه‌زنی و انجام آزمون‌های مقاومت، در گلخانه با دمای ۲۷°C-۲۵ و رطوبت بالای ۶۵ درصد قرار گرفتند و مراقبت‌های لازم از آنها به عمل آمد.

تهیه زادمایه‌ی قارچ عامل بیماری

کشت خالص دو جدایه‌ی قارچ عامل بیماری لکه سیاه با کدهای Q57 و LA به ترتیب جمع‌آوری‌شده از برگ درختان گردو در باغ‌های مناطق قزوین و لواسان، در آزمایشات ارزیابی

مقاومت مورد استفاده قرار گرفت. این جدایه‌ها در کلکسیون قارچی آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی، پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری- موسسه تحقیقات علوم باغبانی در کرج نگه‌داری می‌شوند. بیماریزایی این جدایه‌ها قبلاً بررسی و نتایج آن منتشر شده است (Dastjerdi and Hassani, 2009; Dastjerdi and Nadi, 2019).

برای تهیه زادمایه‌ی قارچ، از کشت‌های حدوداً ۳۰-۲۵ روزه، رشدیافته روی محیط Oat Meal Agar (OMA) (شامل: عصاره ۳۰ گرم آرد یولاف، پنج گرم دکستروز و ۱۸ گرم آگار در یک لیتر آب) که اندام‌های باردهی غیرجنسی (آسروول‌ها) به مقدار کافی روی آن تشکیل شده بود، استفاده شد. پس از تهیه سوسپانسیون اسپور، با کمک لام اسپورشمار (Hemocytometer) غلظت 10^5 اسپور در میلی‌لیتر از آن تهیه و زادمایه آماده مایه‌زنی شد (Matteoni and Neely, 1979).

ارزیابی مقاومت هیبریدهای امیدبخش گردو به بیماری لکه سیاه در گلخانه

چهار هیبرید امیدبخش و پرمحصول گردو (H 1-7, H 2-1, H 1-1, H 2-12) به همراه رقم هارتلی (Hartley) و ژنوتیپ K72 به‌ترتیب به عنوان شاهد مقاوم و حساس، در آزمایشات منظور شدند. این هیبریدها، نتاج رقم الوند و ژنوتیپ B21 هستند که در برنامه‌های طولانی‌مدت به‌نژادی گردو، به عنوان هیبریدهای امیدبخش شناسائی شده‌اند. ارزیابی مقاومت هیبریدهای امیدبخش گردو به بیماری لکه سیاه به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار (دو نهال در هر تکرار) در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ در گلخانه پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری- موسسه تحقیقات علوم باغبانی درکرج انجام شد.

در این آزمایش، دو عامل جدایه قارچی (در دو سطح) و شش رقم و هیبریدگردو مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای مایه‌زنی هر هیبرید/ژنوتیپ با هر جدایه‌ی قارچ، شش گلدان (سه تکرار و دو نهال در هر تکرار) در نظر گرفته شد. برای هر هیبرید/ژنوتیپ، دو درخت نیز به عنوان شاهد با آب مقطر سترون مایه‌زنی شدند. نهال‌های پیوندی گردو (که برگ‌های مرکب آن‌ها به خوبی رشد کرده بودند) در ۲۰ اردیبهشت ۱۴۰۰ و ۲۵ اردیبهشت ۱۴۰۱ مطابق روش بلک و نیلی (Black and Neely, 1978) مایه‌زنی شدند. به این منظور، پس از تهیه سوسپانسیون اسپور از هرکدام از جدایه‌های قارچی، زادمایه به گلخانه منتقل و مایه‌زنی در ساعات خنک (صبح زود) انجام گرفت. سوسپانسیون اسپور قارچ روی برگ‌ها به نحوی پاشیده شد که از تماس مستقیم اسپور با برگ‌ها جلوگیری شده و فقط مه غلیظی از اسپور در فضای گلدان‌ها ایجاد شد. گلدان‌های شاهد با آب مقطر سترون مایه‌زنی شدند.

بلافاصله پس از مایه‌زنی، گلدان‌ها با کیسه‌های پلاستیکی شفاف پوشانده شدند. برای تأمین رطوبت لازم در فضای گلخانه، از دستگاه رطوبت‌ساز استفاده شد. چهل ساعت پس ازمایه‌زنی، پوشش‌های پلاستیکی حذف و

گلدان‌ها به طور طبیعی آبیاری و روزانه مورد بازدید قرار گرفتند. چهار تا هفت روز پس از مایه‌زنی، برگ تعدادی از گلدان‌ها به طورتصادفی جمع‌آوری و جهت اطمینان از استقرار قارچ و شروع رشد و گسترش آن در بافت گیاهی، به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه، برگ‌ها به مدت ۲۰-۱۶ ساعت در محلول اتانول- اسیداستیک (به نسبت حجمی ۱:۱) قرار گرفتند و سپس در لاکتوفنل کاملاً شفاف شدند (Cline and Neely, 1983). دیسک‌های بافتی از برگ تهیه و پس از رنگ‌آمیزی با محلول آبی پنبه (Cotton blue)، جوانه‌زنی اسپور و نفوذ قارچ در بافت برگ، توسط میکروسکوپ نوری ردیابی شد. میانگین دمای گلخانه تا زمان حذف پوشش پلاستیکی گلدان‌ها و پس از آن، به ترتیب ۲۱ و ۲۴ درجه سانتی‌گراد، و میانگین رطوبت نسبی به ترتیب ۹۴ و ۶۹ درصد اندازه‌گیری و ثبت شد.

جمع‌آوری و تجزیه تحلیل داده‌ها

با ظهور و پیشرفت علائم بیماری بر روی برگ‌ها، ثبت و یادداشت برداری علائم در سه نوبت به فواصل ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز پس از مایه‌زنی انجام شد. در هر نوبت، به منظور اندازه‌گیری میزان رشد بیمارگر در بافت گیاه، تعداد لکه و همچنین قطر لکه‌ها در هر یک از پنج برگچه‌ی سه برگ بالائی هر نهال به تفکیک یادداشت‌برداری شدند. سپس با اندازه‌گیری طول و عرض هر برگچه، و محاسبه مساحت برگچه و مساحت آلودگی، درصد سطح نکروز برگچه‌ها (Necrotic Leaflet Area = NLA)، ایجادشده توسط هر جدایه‌ی قارچی در هر هیبرید/ژنوتیپ، تعیین شد. داده‌های مربوط به روز چهل و پنجم پس از مایه‌زنی، برای تعیین کلاس‌های حساسیت، براساس درصد سطح بافت نکروزشده (NLA)، مورد استفاده قرار گرفت (Dastjerdi *et al*., 2023):

کلاس 0: مقاوم-سطح نکروز برگچه‌ها ۱٪ -۰
کلاس I: نیمه‌مقاوم-سطح نکروز برگچه‌ها ۱۰٪-۱
کلاس II: کمی حساس- سطح نکروز برگچه‌ها ۳۰٪-۱۰
کلاس III: حساس-سطح نکروز برگچه‌ها ۵۰٪-۳۰
کلاس IV: نیمه‌حساس-سطح نکروز برگچه‌ها ۷۰٪-۵۰
کلاس V: خیلی حساس-سطح نکروز برگچه‌ها ۱۰۰٪-۷۰

Class 0: Resistant- NLA of 0-1%
Class I: Moderately resistant- NLA of 1-10%
Class II: Slightly susceptible- NLA of 10-30%
Class III: Susceptible- NLA of 30-50%
Class IV: Moderately susceptible- NLA of 50-70%
Class V: Highly susceptible- NLA of 70-100%

داده‌های حاصل در نرم‌افزار اکسل (Microsoft Excel, ver. 2013) ثبت شد. میانگین‌ها با معیار اشتباه (Standard error) به صورت نمودار رسم شدند. ضرائب همبستگی ساده (پیرسون) بین صفات توسط نرم‌افزار SPSS (ver. 22) محاسبه شد.

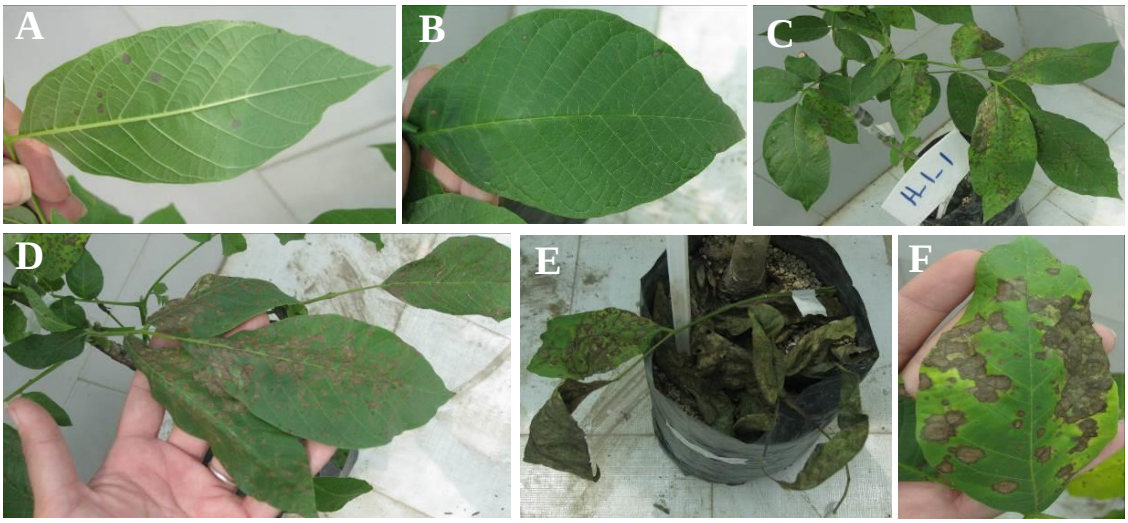
نتایج و بحث

مشاهدات اولیه از استقرار و توسعه بیمارگر در بافت گیاهان جوان پیوندی

تعداد و توسعه لکه‌های نکروز و همچنین تشکیل اندام‌های غیرجنسی قارچ (آسروول) در برگ‌های بالغ گردو که به طور کامل گسترش

یافته‌اند، بیشتر از برگ‌های جوان و نابالغ بود. براساس منابع موجود، بالاتر بودن محتوی جوگلان و هیدروجوگلان‌گلوکوزید در برگ‌های نابالغ گردو اعم از گردوی سیاه و گردوی ایرانی، در مقایسه با برگ‌های بالغ، سبب مقاومت ابتدایی آنها در برابر نفوذ قارچ عامل بیماری لکه سیاه و توسعه علائم می‌شود (Cline and Neely, 1984; Belisario *et al.*, 2001). ازاین‌رو، مایه‌زنی و ارزیابی میزان حساسیت مواد گیاهی مورد مطالعه در این پژوهش، در زمان گسترش کامل برگ‌های مرکب نهال‌های پیوندی انجام شد.

در هر دو سال آزمایش، اولین علائم ماکروسکوپی ۱۰-۸ روز پس از مایه‌زنی به صورت لکه‌های گرد قهوه‌ای کوچک با حاشیه سفید-خاکستری ابتدا در سطح زیرین و سپس در سطح فوقانی برگ‌های هیبرید H 2-12 که با جدایه LA مایه‌زنی شده بود، ظاهر شد. شکل ۱، ظهور و پیشرفت علائم بیماری را در ژنوتیپ حساس H 1-1 نشان می‌دهد. علائم بیماری در ژنوتیپ K72 دیرتر از سایر ژنوتیپ‌ها ظاهر شد. لکه‌ها به تدریج توسعه یافت، گاهی به یکدیگر متصل شدند و لکه‌های نکروز بزرگتری را تشکیل دادند. گیاهان شاهد که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند، علائمی از آلودگی را تا زمان ظهور و پراکنش اسپورهای غیرجنسی ثانویه (کنیدی‌ها)، نشان ندادند.



شکل ۱- اولین علائم آلودگی در سطح زیری (A) و بالائی (B) برگ‌های هیبرید امیدبخش و حساس گردو (H 1-1)، نه روز پس از مایه‌زنی با قارچ *Ophiognomonia leptostyla*، گسترش لکه‌ها ۱۵ (C)، ۳۰ (D)، و ۴۵ (E) روز پس از مایه‌زنی، ظهور آسروول‌ها ۴۴ روز بعد از مایه‌زنی (F)

Fig. 1. First symptoms of infection on lower (A) and upper (B) surface of the leaves of promising and susceptible walnut hybrid (H 1-1), nine days after inoculation with *Ophiognomonia leptostyla*, development of spots 15 (C), 30 (D) and 45 (E) days after inoculation, appearance of acervuli 44 days after inoculation (F)

کلاین و نیلی (Cline and Neely, 1983) گزارش کردند که تولید اندام‌های تولیدمثل غیرجنسی (آسروول‌ها) با سن برگ در ارتباط می‌باشد. این پژوهشگران نشان دادند که در برگ‌های جوان، لکه‌های نکروز کوچک‌تری به وجود آمد و تشکیل آسروول در آن‌ها به ندرت اتفاق افتاد. در پژوهش حاضر، اولین ظهور آسروول‌ها در سال ۱۴۰۰، ۴۴ روز پس از مایه‌زنی بر روی برگ‌های هیبرید H 1-1 و در سال ۱۴۰۱، چهل و سه روز پس از آلودگی بر روی H 2-12، مشاهده شد. ریزش برگ‌ها قبل از تشکیل آسروول در هیبریدهای امیدبخش H 1-1 و H 2-12، نشان‌دهنده آلودگی شدید آنها به بیماری بود.

به دلیل سطح آلودگی بالا و ریزش برگ‌ها در برخی از هیبریدها/ژنوتیپ‌ها و همچنین آغاز آلودگی‌های ثانویه‌ی ناشی از تشکیل آسروول در گلخانه، یادداشت‌برداری در روز چهل و پنجم پس از مایه‌زنی متوقف شد و داده‌های جمع‌آوری شده در این تاریخ، برای گروه بندی ارقام از نظر میزان حساسیت در برابر بیماری مورد استفاده قرار گرفت. جداسازی مجدد عامل بیماری از برگچه‌های دارای علائم و مشاهده کنیدی‌های باسیلی شکل دو سلولی، حضور بیمارگر را در بافت‌های آلوده تائید کرد. استقرار و سپس استمرار حضور و ردیابی موفق بیمارگر در بافت‌های گیاهی، نشان داد که روش مورد استفاده در این پژوهش برای مایه‌زنی و ارزیابی میزان حساسیت ارقام گردو، مناسب بود و می‌تواند در مطالعات آینده برای ارزیابی پاسخ ارقام گردو به بیماری لکه سیاه مورد استفاده قرار گیرد. قارچ عامل بیماری در برگ نهال‌های شاهد، ردیابی نشد.

ارزیابی مقاومت

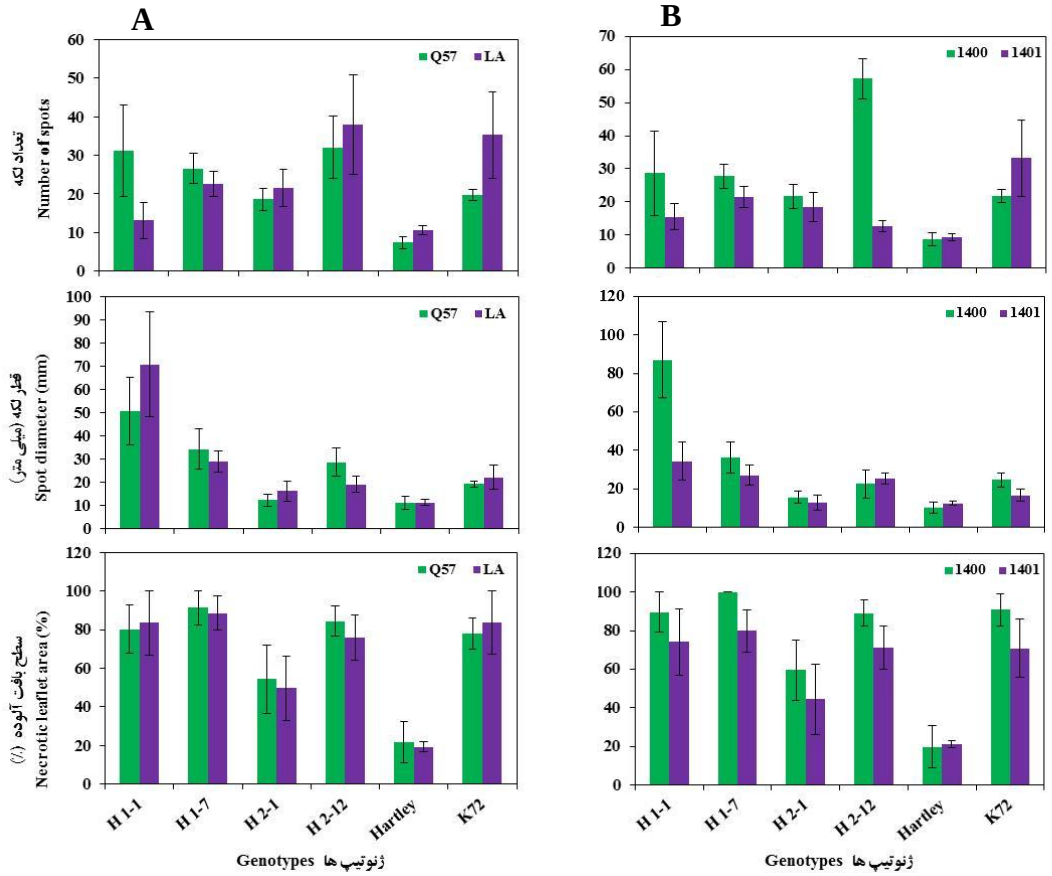
برخی از مهمترین آماره‌های توصیفی برای صفات ارزیابی‌شده در بررسی و ارزیابی حساسیت هیبریدها/ژنوتیپ‌های گردو به بیماری لکه سیاه در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که ۴۵ روز پس از آلودگی، میانگین قطر لکه‌های نکروز ناشی از بیماری در بین شش رقم/ژنوتیپ مورد مطالعه ۲۷ میلی‌متر بود (جدول ۱). سطح برگچه‌های آلوده در دامنه‌ای از ۰/۰۵ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود و میانگین آلودگی ۶۷/۵ درصد محاسبه شد. وقوع بیماری (Disease incidence) بر روی ۸۲/۳ درصد از برگچه‌های مایه‌زنی‌شده، ردیابی شد (به تفکیک سال: ۸۸/۷ درصد در سال ۱۴۰۰ و ۷۵/۹ درصد در سال ۱۴۰۱) (جدول ۱). بیشترین درصد وقوع بیماری در ژنوتیپ H 1-1 (۸۹/۳ درصد) اندازه‌گیری شد، درحالی که در رقم هارتلی و ژنوتیپ K72، به ترتیب ۶۹/۲ و ۸۲/۵ درصد برگچه‌های مایه‌زنی‌شده، علائم آلودگی را نشان دادند (جدول ۱).

شکل ۲ میانگین تعداد و قطر لکه‌های نکروز و همچنین سطح آلودگی برگچه‌ها توسط هر یک از دو جدایه‌ی قارچی مورد استفاده را در سال‌های انجام آزمایش (۱۴۰۱-۱۴۰۰)، ۴۵ روز پس از مایه‌زنی، نشان می‌دهد.

جدول ۱- آماره‌های توصیفی برای صفات ارزیابی‌شده برای تعیین حساسیت هیبریدهای امیدبخش گردو به بیماری لکه سیاه

Table 1. Descriptive statistics for evaluated traits for determination of susceptibility of promising walnut hybrids to black spot disease

Trait	صفت	کمینه Minimum	بیشینه Maximum	میانگین Mean
Number of spot leaflet^{-1}	تعداد لکه در هر برگچه	1.00	82.93	23.0 ± 7.50
Spot diameter leaflet^{-1} (mm)	قطر لکه در هر برگچه (میلی‌متر)	0.62	148.53	27.1 ± 10.74
Leaflet area (mm^2)	مساحت برگچه (میلی‌متر مربع)	2776.61	22379.80	5921.8 ± 1051
Necrotic leaflet area (%)	درصد سطح نکروز برگچه	0.05	100.00	67.5± 15.13
Disease incidence (%)	درصد وقوع بیماری	69.18	89.25	82.3 ± 2.97



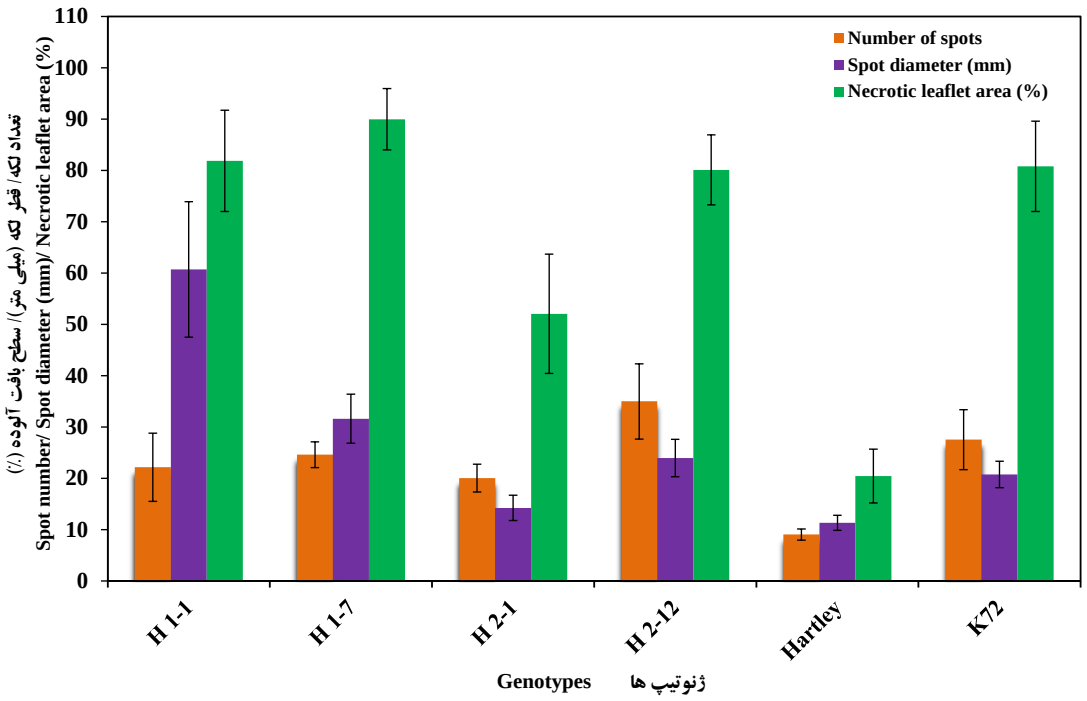
شکل ۲- میانگین تعداد لکه، قطر لکه و درصد سطح نکروز برگچه‌ها در ژنوتیپ‌های گردو، ۴۵ روز پس از مایه‌زنی با دو جدایه مختلف از قارچ *Ophiognomonia leptostyla* (A)، و در سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ (B). میله‌های عمودی بالای ستون ها نمایانگر ± اشتباه معیار هستند

Fig. 2. Mean of spot number, spot diameter and necrotic leaflet area in walnut genotypes, 45 days after inoculation with two different fungal isolates of *Ophiognomonia leptostyla* (A), and in two years of 2021 and 2022 (B). Vertical error bars above columns indicate ± standard error

با هر دو جدایه‌ی قارچی Q57 و LA، بزرگ‌ترین لکه‌های نکروز بیماری بر روی ژنوتیپ H 1-1 یادداشت‌برداری شد (شکل ۲-A). میانگین تعداد و قطر لکه‌های ایجادشده توسط جدایه LA (۲۳/۵ لکه با اندازه ۲۸/۱ میلی‌متر) بیشتر از جدایه Q57 (۲۲/۶ لکه به اندازه ۲۶/۱ میلی‌متر) بود. میانگین درصد سطح آلوده برگچه‌ها (NLA) برای دو جدایه‌ی مورد آزمایش تقریبا مساوی بود (۶۸/۴ درصد برای جدایه Q57 و ۶۶/۷ درصد برای جدایه LA). هر دو جدایه‌ی قارچی توانستند بر روی هیبریدهای مورد مطالعه، آسروول ایجاد کنند. مطالعات قبلی نیز بیماریزائی یکسان دو جدایه‌ی Q57 و LA را بر روی نهال‌های گردو نشان داده

بود (Dastjerdi *et al.*, 2023). نتایج این بخش از مطالعه ضمن تایید نتایج قبلی، نشان داد که عکس‌العمل نهال‌های گردوی پیوندی در برابر این دو جدایه قارچی تفاوت نداشته و در آزمایشات ارزیابی برای مقاومت به بیماری ها، امکان اختلاط جدایه‌هایی با قدرت بیماریزائی یکسان وجود دارد.

کوچک‌ترین لکه‌های نکروز با قطر ۱۱ میلی‌متر و کمترین درصد آلودگی (۲۱ درصد) در هر دو سال آزمایش به رقم تجاری هارتلی اختصاص یافت (شکل ۲-B). میانگین میزان آلودگی در سال ۱۴۰۰ (۷۴/۸ درصد) بیشتر از سال ۱۴۰۱ (۶۰/۲ درصد) بود. میانگین بیشترین تعداد لکه ناشی از بیماری، ۴۵ روز پس از مایه‌زنی، متعلق به هیبرید H 2-12 بود، اگرچه بزرگترین لکه‌های نکروز در ژنوتیپ H 1-1 (۶۰/۷ میلی‌متر) مشاهده و یادداشت‌برداری شد. بیشترین درصد NLA نیز به ژنوتیپ H 1-7 (۹۰ درصد) اختصاص داشت؛ سطح آلودگی برگچه‌ها در ژنوتیپ‌های H 1-1 و H 2-12 با ژنوتیپ محلی و حساس K72 مشابه بود (شکل ۳).



شکل ۳- میانگین تعداد لکه، قطر لکه و درصد سطح نکروز برگچه‌ها در ژنوتیپ‌های گردو، ۴۵ روز پس از مایه‌زنی با *Ophiognomonia leptostyla*. میله‌های عمودی بالای ستون ها نمایانگر ± اشتباه معیار هستند

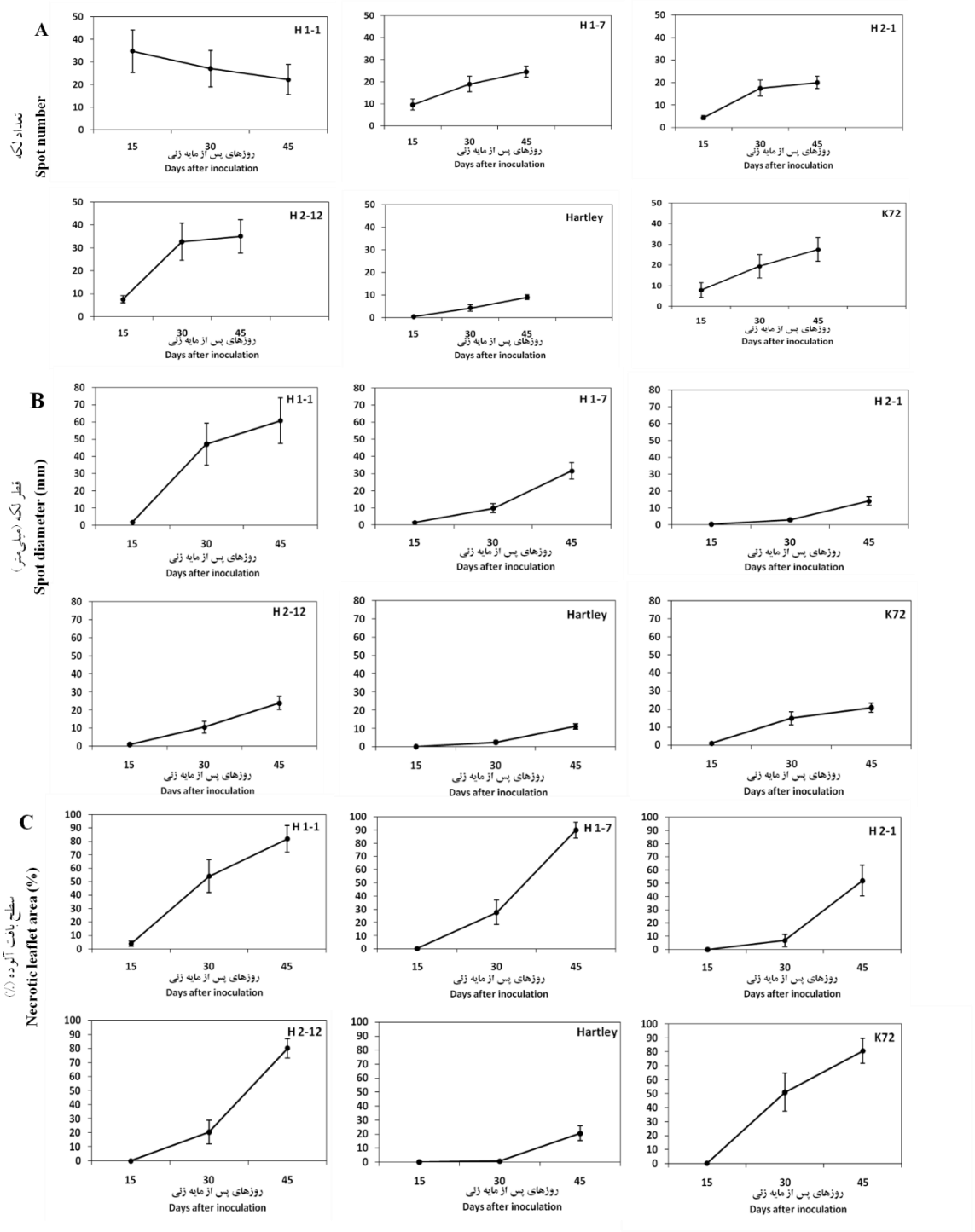
Fig. 3. Mean of spot number, spot diameter and necrotic leaflet area in walnut genotypes, 45 days after inoculation with *Ophiognomonia leptostyla*. Vertical error bars above columns indicate ± standard error

روند تغییرات میانگین تعداد و قطر لکه‌های نکروز و همچنین سطح آلودگی برگچه‌ها در فواصل زمانی ۱۵روزه پس از مایه‌زنی در شکل ۴ ارائه شده است. همان‌طور که در این شکل مشخص است با پیدایش علائم بیماری بر روی برگ‌ها، میانگین تعداد لکه‌ها در فاصله‌ی اولین و دومین یادداشت‌برداری به‌تدریج افزایش یافت، اما پس از آن با توسعه لکه‌ها و پیوستن آنها به یکدیگر، تعداد لکه ها با شیب ملایمی کاهش یافت (شکل ۴-A).

در اولین یادداشت‌برداری، بیشترین تعداد لکه و بزرگترین لکه‌ها به هیبرید امیدبخش H 1-1 اختصاص یافت. دلیل کاهش تعداد لکه‌ها در این ژنوتیپ به‌ویژه در فاصله روزهای پانزدهم و سی‌ام، بهم‌پیوستن لکه‌ها به یکدیگر و بزرگ‌شدن سریع زخم‌ها می‌باشد (شکل ۴-B). متوسط سطح آلودگی برگچه‌ها در همه ژنوتیپ‌ها و طی روزهای پس از مایه‌زنی، همواره روند افزایشی را نشان داد، اما افزایش چشمگیر نرخ رشد بیماری پس از روز سی‌ام مشاهده شد (شکل ۴-C).

براساس محاسبه سطح برگچه‌های آلوده (NLA)، هیبریدهای مورد مطالعه در دو گروه حساسیت طبقه‌بندی شدند (جدول ۳). میزان آلودگی در سه هیبرید امیدبخش H 1-1, H 1-7 و H 2-12 بالا بود، از این‌رو، این ژنوتیپ‌ها به همراه ژنوتیپ محلی K72، در گروه فوق حساس قرار گرفتند. هیبرید امیدبخش H 2-1 با میانگین ۵۲ درصد آلودگی برگچه‌ها، در گروه نیمه‌حساس قرار گرفت. ظهور آسروول‌ها در این هیبرید در دو سال انجام آزمایش، به ترتیب ۴۸ و ۵۰ روز پس از مایه‌زنی، و در مجموع ۷-۴ روز دیرتر از سایر ژنوتیپ‌ها رخ داد. این زمان تقریبا مقارن با ظهور آسروول در رقم هارتلی بود. ظهور دیرهنگام آسروول‌ها در هیبرید H 2-1 در مقایسه با سایر هیبریدها، موضوعی است که در برنامه مدیریت بیماری لکه سیاه برای جلوگیری از شیوع بیماری از طریق کاهش تعداد چرخه‌های ثانویه آلودگی، باید در باغ های گردو مورد توجه قرار گیرد. این امر نیازمند انجام بررسی‌های دقیق در شرایط طبیعی باغ‌های گردو است.

تعیین میزان مقاومت ارقام، ضمن آن که تولیدکنندگان و بهره‌برداران را در انتخاب رقم مناسب جهت کاشت در مناطق مختلف با هدف مدیریت موفق بیماری یاری خواهد کرد، می‌تواند در برنامه‌های به‌نژادی گردو نیز برای به‌نژادگران این محصول مفید واقع شود. مطالعات نشان داده است که صرف‌نظر از سن درختان گردو، ظهور لکه‌های نکروز و تشکیل آسروول‌ها در ارقام دیر-میان‌برگ‌ده که بلوغ برگ در آنها با تاخیر انجام می‌شود، کندتر است. در آلودگی طبیعی باغ‌های گردو، ارقام زودبرگ‌ده با باردهی انتهائی، حساس‌تر از ارقام دیربرگ‌ده با همان وضعیت باردهی گزارش شده‌اند (Arnaudov and Gandev, 2009; Arnaudov *et al.*, 2014). بروز این شکل از مقاومت در ابتدای فصل، می‌تواند سرعت گسترش بیماری را تحت تاثیر قرار دهد.



شـکل ۴- روند تغییرات میانگین تعداد لکه (A)، قطر لکه (B) و درصـد سـطح نکروز برگچه‌ها (C) در ژنوتیپ‌های گردو، ۱۵، ۳۰ و ۴۵ روز پس از مایه‌زنی با *Ophiognomonia leptostyla*. میله‌های عمودی روی نمودار ها نمایانگر ± اشتباه معیار هستند

Fig. 4. The trend of variation in number of spot (A), spot diameter (B), and necrotic leaflet area (C) in walnut cultivars, 15, 30 and 45 days after inoculation with *Ophiognomonia leptostyla*. Vertical error bars on lines indicate ± standard error

جدول ۳- برخی از خصوصیات فنوتیپی مهم ژنوتیپ‌های گردو و حساسیت آنها در برابر بیماری لکه سیاه براساس شاخص سطح بافت نکروز برگچه‌ها

Table 3. Some of the important phenotypic characteristics of studied walnut genotypes and their susceptibility to black spot disease based on necrotic leaflet area

ژنوتیپ Genotype	تاریخ برگدهی [1] Leafing date [1]	عادت باردهی [2] Bearing habit [2]	میانگین مساحت برگچه (سانتی‌متر مربع) Mean leaflet area (cm^2)	حساسیت به لکه سیاه Black spot susceptibility
H 1-1	۲ فروردین 22 March	جانبی Lateral	60.1	بسیار حساس Highly susceptible
H 1-7	۲ فروردین 22 March	میانی Intermediate	74.9	بسیار حساس Highly susceptible
H 2-1	۴ فروردین 24 March	جانبی Lateral	50.6	نیمه‌حساس Moderately susceptible
H 2-12	۳ فروردین 23 March	جانبی Lateral	62.4	بسیار حساس Highly susceptible
Hartley	۲۷ فروردین 15 April	جانبی-انتهایی Terminal-Intermedeate	50.5	حساسیت کم Slightly susceptible
K72	۱۱ اسفند 14 March	انتهایی Terminal	58.2	بسیار حساس Highly susceptible

[1 and 2:] Hassani *et al*., unpublished data.

[۱ و ۲:] حسنی و همکاران، داده‌های منتشرنشده.

هیبریدهای امیدبخش مورد ارزیابی در این پژوهش، نتاج رقم جدید گردو با نام الوند و B21 می‌باشند. الوند رقمی زودبرگ‌ده با تیپ باردهی جانبی است (Hassani *et al*., 2020). با توجه به زودبرگ‌دهی و حساسیت این رقم در برابر بیماری (Dastjerdi *et al*., 2023)، احتمال انتقال صفت حساسیت از والدین به نتاج در برنامه‌های به‌نژادی این رقم وجود دارد. مطابق با این انتظار، هیبریدهای مورد مطالعه دارای باردهی جانبی بوده و از نظر تاریخ برگ‌دهی همانند رقم الوند، جزو ارقام زود تا میان برگ‌ده محسوب می‌شوند (جدول ۳).

کاشت ارقام زودبرگ‌ده در مناطقی که شرایط اقلیمی (سرما و رطوبت نسبی بالا) برای گسترش بیماری فراهم است، سبب می‌شود تا درختان گردو در هر سنی که هستند مورد تهاجم قارچ عامل بیماری لکه سیاه قرار گرفته و با ایجاد مستمر چرخه‌های بیماری، همه‌گیری‌های گسترده در منطقه آغاز شود. از این رو، بالا بودن حساسیت هیبریدهای مورد مطالعه در برابر بیماری لکه سیاه، کاشت آنها را در مناطقی که شرایط مطلوب برای ظهور و گسترش عامل بیماری وجود دارد، با تردید روبرو می‌سازد. اما این احتمال نیز وجود دارد که در موقعیت‌های طبیعی آلودگی، مقاومت هیبریدهای مذکور به دلیل میان‌برگ‌ده بودن اندکی بهبود یافته و با فرار بخش هایی از بافت‌های میزبان از حمله‌ی اولیه‌ی قارچ عامل بیماری، خسارت تا حدودی کاهش یابد. هرچند این موضوع نیاز به بررسی‌های تکمیلی در

شـــرایط طبیعی باغ‌های جدیدالاحداث گردو دارد.

بر اســـاس یافته‌های قبلی (Dastjerdi and Hassani, 2009; Dastjerdi *et al*., 2023)، در این پژوهش حاضـر نیز رقم هارتلی حسـاسـیت اندکی در برابر بیماری نشـان داد. اگرچه برخی از پژوهشـگران مقاومت نسـبی خوبی را برای هـارتلی در شـرایط طبیعی گزارش کرده انـد (Pastore *et al*., 1997; Maria *et al*., 1997)، اما گزارشـات دیگر بیانگر آن اسـت که این رقم در شـرایط مسـاعد برای گسـترش بیماری مورد حمله قارچ بیمارگر قرار گرفته و آلوده مـی شـود (Arnaudov *et al*., 2014). بـری (Berry, 1960) این تغییر میزان مقاومت را در برخی از ارقام گردوی سـیاه با نام‌های اوهیو (Ohio) و توماس (Thomas) نیز گزارش کرده است.

تعداد ساختارهای تکثیری بیمارگر، شمارش لکه‌های ناشی از عامل بیماری و نرخ رشد آن در بافت‌های گیاهی، ابزارهای مهم برای ارزیابی واکنش مقاومتی گیاه در برابر عامل بیماری می‌باشـند (Cline and Neely, 1984). در این مطالعه نیز بررسـی ضـرایب همبسـتگی بین شـاخص‌های آلودگی، همبسـتگی مثبت و معنی‌داری را بین تعداد لکه و درصـد سـطح نکروز برگچه‌ها ($r = 0.823^{*}$)، نشـان داد. بالا بودن ضـریب همبسـتگی بین قطر لکه و درصـد NLA ($r = 0.589$)، نیز اگرچه از نظر معنی‌دار نمی‌باشـد، اما بیانگر آن اسـت که این صـفت نیز می‌تواند در میزان آلودگی نقش مهمی داشـته باشد (جدول ۴).

یافته‌های پژوهش حاضـر نشـان دادکه تعداد لکه و توانایی بیمارگر برای رشـد و توسعه در بـافـت‌هـای گیـاهی، شـاخص‌هـای مهم برای ارزیابی مقاومت میزبان می‌باشـند. اگرچه تعداد لکه‌های نکروز ایجادشـده در برگچه‌های آلوده، بیانگر تعداد آلودگی‌های موفق بود، اما نمی‌تواند به طور دقیق پتانسـیل اسـتقرار و تکثیر بیمارگر را نشـان دهد. این یافته ها با نتایج قبلی هـمـخـوانـی دارد (Dastjerdi *et al*., 2023). برای مثال، هرچند تعداد لکه‌های نکروز ناشی از بیمـاری در هیبریـد امیـدبخش H 2-12 بیشـتر از H 1-1 بود، اما رشد بیشتر قارچ در بافت برگ H 1-1 چهل و پنج روز پس از مایه‌زنی، سـبب شـد تا میزان موفقیت بیمارگر برای اسـتقرار و ایجـاد آلودگی در این ژنوتیـپ مسـاوی بـا میزان آلودگی بیماری در برگ ژنوتیپ H 2-12 باشـد. به نظر می‌رسـد در چنین ارقامی، آن‌دسته از کنیـدی‌هـایی کـه موفق بـه عبور از سـد دفاعی گیاه شـده‌اند، به‌راحتی در داخل بافت گیاهی گسترش یافته و لکه‌های بزرگ‌تری را به وجود آوردند.

گیـاهـان در برابر حمله بیمـارگرهـا گـاه از چندین سـازکار دفاعی مختلف به صـورت توأم اسـتفـاده کرده و نفوذ بیمـارگر را محـدود می‌سـازند. بزرگ‌بودن اندازه لکه‌ها در برخی از ارقام می‌تواند به دلیل عدم وجود حصـارهای دفاعی سـاختمانی و بیوشـیمیائی فعال در داخل

جدول ۴- ضرائب همبستگی بین صفات اندازه‌گیری‌شده در ژنوتیپ‌های گردو (درجه آزادی= ۴)

Table 4. Correlation coefficients between measured traits in walnut genotypes (df = 4)

Trait	صفت	تعداد لکه در هر برگچه Spot number/ leaflet	قطر لکه در هر برگچه Spot diameter/leaflet	طول برگچه Leaflet length	عرض برگچه Leaflet width	مساحت برگچه Leaflet area	سطح نکروز برگچه Necrotic leaflet area
Spot number/ leaflet	تعداد لکه در هر برگچه	1					
Spot diameter/leaflet	قطر لکه در هر برگچه	0.221	1				
Leaflet length	طول برگچه	0.321	0.244	1			
Leaflet width	عرض برگچه	0.752	0.453	0.614	1		
Leaflet area	مساحت برگچه	0.530	0.375	0.948**	0.828*	1	
Necrotic leaflet area	سطح نکروز برگچه	0.823*	0.589	0.607	0.789	0.767	1

* and **: Significant at the 5% and 1% probability levels, respectively.

* و **: به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد.

بافت گیاه باشد. کلاین و نیلی (Cline and Neely, 1983) تشکیل پاپیل را در اطراف میخ رخنه (Infection peg) یکی از دلایل مقاومت نسبی برخی از ارقام گردوی سیاه در برابر قارچ عامل بیماری لکه سیاه عنوان کرده‌اند. مطالعات دیگری نیز نقش عناصر غذایی را به عنوان ترکیبات ساختمانی و یا تنظیم‌کننده‌های متابولیکی در مقاومت گیاهان در برابر بیمارگر، مهم توصیف نموده‌اند (Dordas, 2008; Huber *et al*., 2012).

براساس نتایج پژوهش حاضر، هیبرید امیدبخش H 2-1 در مقایسه با سایر هیبریدها، حساسیت کمتری در برابر بیماری لکه سیاه داشت. کاشت این ژنوتیپ میان‌برگ‌ده در مناطق کمتر مساعد برای شیوع بیماری، با رعایت کامل اصول مدیریت تلفیقی بیماری‌ها امکان‌پذیر است. روش عملی برای کنترل بیماری لکه سیاه گردو، محدود کردن مایه تلقیح زمستان‌گذران و نیز کاهش چرخه‌های آلودگی در طول فصل رویشی است. ارقام گردوی دارای حساسیت کم یا متوسط در برابر بیماری لکه سیاه، نقش مهمی را در مدیریت تلفیقی بیماری ایفا می کنند (Hassan and Ahmad, 2017). بدیهی است که کاربرد این ارقام 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 داخل تاج درختان می‌شود) می‌تواند در کاهش آلودگی بسیار مفید واقع شود.

در مناطقی که به دلیل شرایط اقلیمی (افت دما و رطوبت مناسب) خطر وقوع وگسترش 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 گسترش و شدت بیماری خواهد شد (Black and Neely, 1978). به این ترتیب تا زمان دست‌یابی به ارقامی با سطح مقاومت بالاتر، همچنان تنها راه‌کار مدیریت و کنترل بیماری لکه سیاه در باغ‌های گردو، استفاده از روش‌های به باغی وقارچ کش های شیمیائی مناسب در کنار استفاده از ارقام گردو با مقاومت قابل قبول می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله از داده‌های پروژه تحقیقاتی به شماره ۷-۷۲-۳۳-۰۲۵-۹۸۰۲۶۰ مصوب سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی تهیه و نگارش شده است. نویسندگان بدین وسیله از موسسه تحقیقات علوم باغبانی و پژوهشکده میوه‌های معتدله و سردسیری که امکانات لازم برای اجرای این پژوهش را فراهم کردند، سپاسگزاری می کنند.

عدم تعارض منافع

نگارندگان اعلام می‌کنند که با یکدیگر و دیگران هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

References

Anonymous. 2023. Agricultural Statistics, Vol 3: Horticultural Products. Ministry of Jahad Agriculture, Vice President of Planning and Economics, Center for Statistics, Information and Communication Technology. 400 pp. (in Persian).

Arnaudov, V. and Gandev, S. 2009. Susceptibility of some walnut cultivars to *Gnomonia leptostyla*. *Acta Horticulturae, 825***,** pp**.**407-412. DOI: 10.17660/ActaHortic.2009.825.64

Arnaudov, V., Gandev, S. and Dimova, M. 2014. Susceptibility of some walnut cultivars to *Gnomonia leptostyla* and *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* in Bulgaria. *Agro-Knowledge Journal, 15,* pp.41-54. DOI: 10.7251/AGREN1401041A

Balaz, J., Korac, M. and Cerovic, S. 1993. Susceptibility of walnut genotypes to *Gnomonia Leptostyla. Horticultural Abstract, 63*(6), pp.498.

Beineke, W.F. and Masters, C. J. 1973. Black walnut progeny and clonal tests at Purdue University. Pp. 233-242. In: Proceedings of the 12th Tree Improvement and Genetics-Southen Forest Tree Improvement Conferennce, Baton Rouge, United States.

Belisario, A., Forti, E., Cichello, A. M., Zoina, A., Barbieri, E. and valier, A. 2001. Epidemiological surveys of *Gnomonia leptostyla* in *Juglans regia* hedgerow trained orchard. *Acta Horticulturae, 544,* pp.405-409. DOI: 10.17660/ActaHortic.2001.544.54

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*(2), pp.129-145. DOI: 10.1111/j.1439-0329.2007.00540.x

Berry, F. H. 1960. Etiology and control of walnut anthracnose. Ph. D. Thesis. University of Maryland. United States. 59 pp.

Black, W. M. and Neely, D. 1978. Relative resistance of *Juglans* species and hybrids to walnut anthracnose. *Plant Diseases Reporter, 62,* pp.497-499.

Cline, S. and Neely, D. 1983. Penetration and infection of leaves of black walnut by *Marssonia juglandis* and resulting lesion development. *Phytopathology, 73*(3), pp.494-497. DOI: 10.1094/Phyto-73-494

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,* pp.185-188. DOI: 10.1094/Phyto-74-185

Dastjerdi, R. and Hassani, D. 2009. Response of walnut genotypes to *Gnomonia*

leptostyla (Fr.) Ces. & denote. In greenhouse. *Seed and Plant, 25*(3), pp.433-449 (in Persian). DOI: 10.22092/spij.2017.110992

Dastjerdi, R. and Nadi, S. 2019. Evaluation of some morphological features and diversity of pathogenicity of *Ophiognomonia leptostyla* isolates causal agent of walnut anthracnose after prolonged storage. *Iranian Journal of Plant Pathology, 55*(3), pp.237-242 (in Persian). DOI: 10.22034/ijpp.2019.38324

Dastjerdi, R., Hassani, D., Nadi, S. and Soleimani, A. 2023. Response of some walnut genotypes *(Juglans regia* L.) to anthracnose attack (*Ophiognomonia leptostyla*). *Journal of Agricultural Science and Technology, 25*(5), pp.1207-1221. DOI: 10.22034/jast.25.5.1193

Dordas, C. 2008. Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture: a review. *Agronomy for Sustainable Development, 28*, pp.33-46. DOI: 10.1051/agro:2007051

Ershad, J. 2009. Fungi of Iran. Iranian Research Institute of Plant Protection. Tehran, Iran. 558pp. (in Persian).

Hassan, M. and Ahmad, K. 2017. Anthracnose disease of walnut- A review. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology, 2*(5), pp.2319-2327. DOI: 10.22161/ijeab/2.5.6

Hassani, D., Atefi, J., Haghjooyan, R., Dastjerdi, R., Keshavarzi, M. and Mozaffari, M. R. 2012a. Damavand, a new Persian walnut cultivar as a pollinizer for Iranian walnut cultivars and genotypes. *Seed and Plant, 28*(3), pp.529-531 (in Persian). DOI: 10.22092/spij.2017.111125

Hassani, D., Atefi, J., Haghjooyan, R., Dastjerdi, R., Keshavarzi, M. and Mozaffari, M. R. 2012b. Jamal, a new Persian walnut cultivar for moderate-cold areas of Iran. *Seed and Plant, 28*(3), pp.525-527 (in Persian). DOI: 10.22092/spij.2017.111124

Hassani, D., Mozaffari, M.R., Soleimani, A., Dastjerdi, R., Rezaee, R., Keshavarzi, M., Vahdati, K., Fahadan, A. and Atefi, J. 2020. Four new Persian walnut cultivars of Iran: Persia, Caspian, Chaldoran and Alvand. *HortScience 55*, pp.1162-1163. DOI: 21273/HORTSCI15044-20

Huber, D., Romheld, V. and Weinmann, M. 2012. Relationship between nutrition, plant diseases and pests. Pp. 283-298. In: Marschner, P. (eds.) *Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants*. Elsevier Academic Press, San Diego. DOI: 10.1016/B978-0-12-384905-2.00010-8

Jelev, Z. and Marinov, M. 2018. Reactions of organically grown walnut cultivars to walnut blight (*Xanthomonas compestris* p.v. *Juglandis*) and anthracnose (*Gnomonia leptostyla*). Pp. 188-190. In: Proceedings of the 18th International Conference on Organic Fruit-Growing, Hohenheim, Germany.

Juhasova, G., Ivanova, H. and Spisak, J. 2006. Biology of fungus *Gnomonia leptostyla* in agro-ecological environments of Slovakia. *Mikologiya Fitopatologiya, 40,* pp.538-547.

Matteoni, J. A. and Neely. D. 1979. *Gnomonia leptostyla*: Growth, sporulation and heterothallism. *Mycologia, 71*(5), pp.1034-1042. DOI: 10.1080/00275514.1979.12021107

Mehlenbacher, S. A. 1995. Classical and molecular approaches to breeding fruit and nut crops for disease resistance. *HortScience, 30*(3), pp.466-477.

Pastore, M., Consoli, D. and Cristinzio, G. 1997. Susceptibility of 32 walnut varieties to *Gnomonia leptostyla* and *Xanthomonas compestris* pv. *Juglandis*. *Acta Horticulturae, 442*, pp.379-384. DOI: 10.17660/ActaHortic.1997.442.60

Reid, W., Coggeshall, M. V. and Hunt, K. L. 2004. Cultivar evaluation and development for black walnut orchards. Pp. 18-24. In: Proceedings of the 6th Walnut Council Research Symposium. Saint Paul, USA.

Saremi, H. and Amiri, M. E. 2010. Evaluation of resistance to anthracnose (*Marssonina juglandis*) among diverse Iranian clones of walnut (*Juglns regia* L.). *Journal of Food, Agriculture and Environment*, *8*(2), pp.375-378. DOI: 10.1234/4.2010.1689

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), pp.141- 153 (in Persian).

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. 100 pp.

RESEARCH ARTICLE

Reaction of Promising Walnut Hybrids to Black Spot Disease (*Ophiognomonia leptostyla*)

R. Dastjerdi[1*], A. Soliemani[2], S. Nadi[3] and D. Hassani[4]

1. Associate Professor, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

2. Assistant Professor, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

3. Expert, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

4. Professor, Temperate Fruits Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Karaj, Iran.

ABSTRACT

Dastjerdi, R., Soliemani, A., Nadi, S. and Hassani, D. 2024. Reaction of promising walnut hybrids to black spot disease (*Ophiognomonia leptostyla*). *Seed and Plant, 40*, pp.127-150 (in Persian).

Black spot disease (*Ophiognomonia leptostyla*) is an important disease in walnut growing areas all over the world. Four promising walnut hybrids; H 1-1, H 1-7, H 2-12 and H 2-1 were evaluated for susceptibility to using factorial arrangement in completely randomized design. Hartley and K72 were included as resistant and susceptible controls, respectively. The experiment was conducted in spring 2021 and 2022. Fully expanded walnut leaflets were inoculated by fungal conidia (10^5 spore ml^{-1}). Number and size of necrotic spots were recorded at 15-day intervals until 45 days after inoculation. According to the data of 45 days after inoculation, the maximum number of necrotic spots belonged to H 2-12 while the largest spots were developed on H 1-1 and H 1-7. First acervuli appearance was occurred 43-44 days after inoculation on H 1-1 and H 2-12. All evaluated hybrids were susceptible, but symptoms development and disease severity varied. The average of NLA ranged from 20% in Hartley to 90% in H 1-7. H 1-7, H 1-1 and H 2-12 as well as K72 exhibited high level of infection and was considered as highly susceptible. Hybrid H 2-1 with the average NLA of 52% was classified in moderately susceptible group.

Keywords: Walnut, inoculation, necrosis, necrotic leaflet area, resistance.

Introduction

Black spot disease caused by the fungus *Ophiognomonia leptostyla* (Fr.) Sogonov is one of the most important foliar diseases of walnut tree that affect its fruit production and nut quality worldwide. The fungus mostly attacks leaves, petioles, young shoots and fruits after prolonged periods of wetness. Irregular circle brown and black spots occur on plant tissues led to premature defoliation and fruit drop. Primary spots provide conidia that spread by wind and water splashing and cause secondary infections in walnut orchards. Trees may become weak by reduction of fruit yield and nut quality. Using resistant cultivars could be integrated with other control measures such as orchard management practices and chemical fungicides to manage and control the black spot disease. Several studies have shown variation in walnut cultivars for susceptibility to black spot disease (Arnaudov *et al.*, 2014; Dastjerdi and Hassani, 2009; Jelev and Marinov, 2018). Studies in Iran have shown that cv. Jamal, cv. Damavand and cv. Persia are slightly susceptible, very low susceptible, and moderately resistant to black spot disease, respectively (Dastjerdi and Hassani, 2009; Dastjerdi *et al*., 2023).

The promising walnut hybrids used in this research have been developed in the national walnut breeding program with the aim of obtaining new cultivars that are suitable for planting in different walnut-growing areas of Iran. The objective of this study was to determine their reaction of four paromising walnut hybrids to *O. leptostyla*.

Material and Methods

Reaction of four promising walnut hybrids; H 1-7, H 2-1, H 1-1, H 2-1) to *O. leptostyla* was assessed in greenhouse conditions during spring 2021 and 2022. Hartley and K72 were considered as resistant and susceptible control, respectively. The purified culture of two fungal isolates; Q57 and LA were used for inocultion. The experiment was conducted as factorial arrangements in completely randomized design with six replications. Experimental treatments were combination of two factors including; cultivars (6 levels) and fungal isolates (2 levels). Fully expanded leaflets of grafted plants were inoculated by fungal conidia (10^5 spore ml^{-1}). The number and size of necrotic spots were recorded in 15-day intervals, continued until 45 days after inoculation. Due to the appearance of mature fruit bodies (acervuli) and starting of secondary disease cycles, data on the 45 days after inoculation was used for determination of susceptible genotypes. Computation of leaflet area and infection area led to the determination of NLA for each isolate/cultivar combination. Data were inserted in Excel ver. 2013 and the graphs were using Excel software.

Results and Discussion

The first macroscopic symptoms appeared 8-10 days after inoculation as small brown spots with gray halos first on the lower surface of the leaves of H 2-12, in both years. The spots gradualy developed and formed larger necrotic spots. Control plants, inoculated with distilled water, did not show any symptoms. The appearance of acervuli on H 1-1 in 2021 and H 2-12 in 2022, occurred 44 and 43 days after inoculation, respectively.

Descriptive statistics of evaluated traits for susceptibility of promising walnut hybrids to black spot disease demonstrated that the percentage of NLA ranged from 0.05-100 with the average of 67.5%. Disease incidence was recorded on 82.3% of inoculated leaflets. It showed the successful establishment and spread of black spot disease, and penterationin the fungus in walnut tissues. Considering the data of 45 days after inoculation, the maximum number of spots belonged to H 2-12 hybrid while the largest spots developed on H 1-1 and H 1-7 hybrids. The highest NLA was recorded on H 1-7 hybrid.

The evaluated promising hybrids were classified in two susceptibility groups. All evaluated walnut hybrids were susceptible, but symptoms development and disease severity varied among them. The average of NLA ranged from 20% (in cv. Hartley) to 90% (in H 1-7 hybrid). H 1-7, H 1-1 and H 2-12 hybrids demonstrated high level of infection, and therefore were grouped with K72 as highly susceptible group. The H 2-1 hybrid with the average NLA of 52% was classified in moderately susceptible grouped. Dastjerdi *et al*. (2023) reported the Hartley exhibited very low level of susceptibility. Susceptible cultivars/hybrids are not recomended for the hot spot area where the black spot disease is a serious problem for walnut growing and production.

References

Arnaudov, V., Gandev, S. and Dimova, M. 2014. Susceptibility of some walnut cultivars to *Gnomonia leptostyla* and *Xanthomonas arboricola* pv. *Juglandis* in Bulgaria. *Agro-Knowledge Journal, 15,* pp.41-54. DOI: 10.7251/AGREN1401041A

Dastjerdi, R. and Hassani, D. 2009. Response of walnut genotypes to *Gnomonia leptostyla* (Fr.) Ces. & denote. In greenhouse. *Seed and Plant, 25*(3), pp.433-449 (in Persian). DOI: 10.22092/spij.2017.110992

Dastjerdi, R., Hassani, D., Nadi, S. and Soleimani, A. 2023. Response of some walnut genotypes *(Juglans regia* L.) to anthracnose attack (*Ophiognomonia leptostyla*). *Journal of Agricultural Science and Technology, 25*(5), pp.1207-1221. DOI: 10.22034/jast.25.5.1193

Jelev, Z. and Marinov, M. 2018. Reactions of organically grown walnut cultivars to walnut blight (*Xanthomonas compestris* p.v. *Juglandis*) and anthracnose (*Gnomonia leptostyla*). Pp. 188-190. In: Proceedings of the 18th International Conference on Organic Fruit-Growing, Hohenheim, Germany.

***Corresponding author**: r.dastjerdi@areeo.ac.ir Tel.: +982636705062

Received: 07 March 2024
Accepted: 09 May 2024

2024© Seed and Plant. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.