

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های سیب در برابر بیماری شانکر اروپایی *Neonectria ditissima*

مرجان قاسم‌خانی^۱

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۲۱)

چکیده

بیماری شانکر اروپایی درختان میوه با عامل *Neonectria ditissima* یکی از مهمترین بیماری‌های درختان سیب در شمال کشور بوده که آسیب‌های زیانباری به این محصول وارد نموده است. با توجه به اهمیت اقتصادی این محصول استراتژیک در کشور، شناسایی روشی قابل اعتماد که بتواند در بازه زمانی کوتاه ارقام مقاوم و حساس را تفکیک نماید، مورد نیاز است. در این راستا، در این تحقیق به شناسایی چنین روشی پرداخته شد و به دنبال آن تنوع فنوتیپی ۲۶ رقم مختلف سیب از نظر مقاومت به بیماری شانکر اروپایی مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش شاخه‌های بریده شده یکساله از درختان بالغ سیب جمع‌آوری شدند. تلقیح مصنوعی با استفاده از سوسپانسیون قارچ انجام و گسترش و توسعه بیماری در فواصل زمانی معین اندازه‌گیری شد. درصد آلودگی و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) محاسبه گردید. نتایج تقریباً مشابه با استفاده از درصد آلودگی و AUDPC برای شناسایی ارقام مقاوم و حساس در شاخه‌های بریده به دست آمد که نشان داد این روش‌های آماری برای رتبه‌بندی مقاومت به این پاتوژن در ارقام سیب کارآمد می‌باشد. همچنین روش استفاده از شاخه‌های بریده می‌تواند برای غربالگری اولیه ارقام با کمترین تأثیرپذیری از شرایط محیطی برای مطالعات بیشتر مورد استفاده قرار گیرد. رقم "برابورن" بیشترین مقاومت و رقم "ایدارد" بیشترین حساسیت به بیماری شانکر را از خود نشان دادند. همچنین رقم "گلدن دلشز" نیز در رده ارقام نسبتاً مقاوم قرار گرفت. این رقم‌های بالقوه مقاوم به بیماری شانکر می‌توانند در برنامه‌های آتی به‌نژادی مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: اسپور، سطح زیرمنحنی پیشرفت بیماری، شانکر، گلخانه

۱- استادیار گروه تنوع زیستی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

* پست الکترونیک: m.ghasemkhani@kgut.ac.ir

مقدمه

بیماری گیاهی شانکر اروپایی درختان میوه از جمله سیب، هلو و گلابی توسط قارچ *Neonectria ditissima* ایجاد می‌شود. همچنین در گیاهان چوبی، زینتی و درختان جنگلی نیز منجر به آلودگی می‌شود. این بیماری رشد درختان را کاهش می‌دهد، بر کیفیت چوب تأثیر می‌گذارد و باعث کاهش عملکرد قابل توجهی در میوه می‌شود. علاوه بر این در تمام طول سال منجر به آلودگی می‌شود و زخم‌های حاصل از هرس، ریزش برگ‌ها، شکستن شاخه‌ها و آسیب‌های ناشی از سرمازدگی راه‌های مهمی برای ایجاد عفونت هستند. درختان سیب در تمام مراحل رشد به وسیله اسپورهای قارچ، آلوده می‌شوند. راه اصلی عفونت در درختان سیب محل ریزش برگ‌هاست (امپانسه^۱ و همکاران، ۲۰۱۵؛ پاپ-روپار^۲ و همکاران، ۲۰۲۲؛ متزلر^۳ و همکاران، ۲۰۰۲؛ مک‌کراکن^۴ و همکاران، ۲۰۰۳؛ یودر^۵ و همکاران، ۱۹۹۹). پس از ایجاد عفونت در درخت، پوست شاخه در ناحیه آلوده به رنگ قهوه‌ای تیره شده و زخم کوچکی بوجود می‌آید که بتدریج گسترش یافته و با تغییر شکل بافت آلوده بصورت شانکرهای مشخص نمایان می‌گردد. این شانکرها باعث ایجاد نواحی مرده متورم و فرورفته از پوست در محل اطراف جوانه‌ها و محل ریزش برگ‌ها می‌شوند و لایه‌های متعدد بافت پنبه‌ای جهت جلوگیری از انتشار بیماری توسط درخت به طور پیوسته تشکیل می‌گردد. در مرحله پیشرفته بیماری که آلودگی دور تا دور ساقه را فرا گرفته است، تمام شاخه‌های بالای این ناحیه آلوده از بین می‌روند (مونتیکیو^۶ و همکاران، ۲۰۱۱).

اپیدمی فراگیر می‌تواند باعث حذف کل باغ‌های درختان جوان شود. عفونت توسط این قارچ می‌تواند در دو مرحله تولید اسپور ایجاد شود: اسپورهای غیرجنسی (کنیدی) و اسپورهای جنسی (آسکوسپور). شیوع شدید بیماری معمولاً پس از هوای خنک و بارانی در طول پاییز رخ می‌دهد. دما، مدت زمان رطوبت و بارندگی از عوامل مهم تعیین‌کننده در گسترش و افزایش آلودگی هستند (برسفورد و کیم^۷، ۲۰۱۱؛ کیم^۸، ۲۰۱۲) و بنابراین آب و هوا نقش مهمی در

توزیع جغرافیایی این بیماری دارد (ویر^۹، ۲۰۱۴). کنیدی‌ها و آسکوسپورهای قارچ *N.ditissima* از طریق جریان هوا و قطرات باران در همان درخت و درختان مجاور پخش می‌شوند. درختان جوان در نهالستان می‌توانند آلوده شوند (جانسونیوس^{۱۰} و همکاران، ۲۰۰۴) و پس از یک دوره نهفته ۳ الی ۵ ساله عفونت سیستمیک، بیماری به طور ناگهانی روی درختان ظاهر می‌شود. هنگامی که آلودگی به طور گسترده در درختان ایجاد می‌شود، قارچ وارد سیستم بافت پارانشیم شده و در درخت پخش می‌گردد. کلونیزه شدن سیستمیک آوند چوبی نیز می‌تواند در اثر آلودگی به *N.ditissima* ایجاد شود (ویر، ۲۰۱۴؛ ژلان^{۱۱} و همکاران، ۲۰۲۲).

بنابراین هرس دقیق یک اقدام برای کنترل شانکر می‌تواند باشد، به‌طوری که شانکرهای شاخه‌های کوچک و شاخه‌های جانبی را می‌توان با هرس از بین برد. با این حال، این اقدامات زمان‌بر هستند، هزینه‌های بالای نیروی کار را شامل می‌شوند و اغلب به اندازه کافی موفق نیستند (هارتولد^{۱۲} و همکاران، ۲۰۲۳). قارچ‌کش‌ها را می‌توان در باغ‌های کوچک و غیرتجاری برای کاهش شیوع شانکر استفاده کرد، اما هیچ‌یک از قارچ‌کش‌هایی که امروزه استفاده می‌شوند قادر به ریشه‌کن کردن بیماری یا درمان درختان مبتلا نیستند. علاوه بر این، افزایش نگرانی در مورد سلامت انسان و محیط زیست از جمله افزایش علاقه به تولید ارگانیک، استفاده از قارچ‌کش‌ها را در بسیاری از مناطق پرورش سیب کاهش داده است (گارکاوا-گوستاوسون^{۱۳} و همکاران، ۲۰۱۳). از این رو، شانکر مشکلات بزرگی را در تولید ارگانیک ایجاد کرده است، جایی که فقط قارچ‌کش‌های مبتنی بر مس و محصولات آهکی مجاز هستند. روش‌های غیرشیمیایی کنترل عمدتاً شامل تلاش برای جلوگیری از عفونت با پوشاندن زخم‌ها با خمیر بوردو، هرس و سوزاندن تمام درختان و میوه‌های آلوده به منظور کاهش منابع آلودگی در باغ‌ها است. این روش‌ها پرهزینه و پرزحمت بوده و کارآمد نیستند. از آنجایی که اسپورهای قارچ و همچنین محل‌های ورود عفونت در طول سال در دسترس هستند کنترل شانکر

8. Kim
9. Weber
10. Jansonius
11. Gelain
12. Harteveld
13. Garkava-Gustavsson

1. Amponsah
2. Papp-Rupar
3. Metzler
4. McCracken
5. Yoder
6. Montecchio
7. Beresford and Kim

هوایی به ویژه بارندگی (کیم و برسفورد^۷، ۲۰۱۲)، درجه حرارت محیط، سن زخم‌ها، میزان و منبع تلقیح قارچ در باغ‌ها، مدیریت باغ‌ها شامل هرس و کود و مدت زمان مورد نیاز برای ارزیابی عفونت بوده است. برای غلبه بر این مشکلات، تلاش‌های متعددی با استفاده از تلقیح مصنوعی با روش‌های مختلف مانند زخم‌های مصنوعی ایجاد شده شبیه محل ریزش برگ‌ها و زخم‌های هرس انجام شده است (گارکاوا-گوستاوسون و همکاران، ۲۰۱۳). در یکی از مطالعات گذشته از روش شاخه‌های بریده سیب برای غربالگری ارقام استفاده شد که به‌عنوان یک روش ساده نتایج قابل قبولی را حاصل نمود (ون دوگ، ۱۹۸۹). بنابراین در مطالعه حاضر، با ترکیب کردن چندین روش استفاده شده در مطالعات پیشین، روشی قابل اعتماد جهت بررسی تنوع فنوتیپی ارقام سیب در مقاومت به *N.ditissima* و ارزیابی سطح مقاومت ۲۶ ژنوتیپ سیب با استفاده از تلقیح مصنوعی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

شاخه‌های در وضعیت زمستان‌گذران با طول تقریبی ۶۰ سانتی‌متر از درختان بالغ در باغ‌های سیب واقع در بالسگارد^۸ (بخش)، کیخانستاد^۹ (شهر)، سوید (۵۶°۹' شمالی، ۱۴°۹' شرقی) در بهمن‌ماه جمع‌آوری شدند و در کیسه‌های پلاستیکی در سردخانه با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد بدون استفاده از قارچ‌کش نگهداری شدند. چهار روز قبل از آزمایش (اواخر بهمن‌ماه)، شاخه‌ها به گلخانه‌های استاندارد جهت سازگاری با دمای تنظیم شده گلخانه منتقل شدند.

در مجموع ۲۶ ژنوتیپ سیب: "گلدن‌دلشز"، "برابورن"، "گرانی‌اسمیت"، "آستراکان‌قرمز"، "اسپرقرمز"، "اسپنسر"، "دلباراستیوال"، "لیبرتی"، "اپل‌سین"، "کریتریون"، "گالا"، "اسپرطلائی"، "موتسو"، "جوناکلد"، "همپوس"، "سلطنت"، "کورتلند"، "فوجی"، "جنواری"، "اسنوویت"، "دلکورف"، "هتا"، "استارگینک‌قرمز"، "ساندرا"، "ایدارد" و

سیب به سادگی امکان‌پذیر نمی‌باشد (وبر و بارو^۱، ۲۰۲۱). ارقام مختلف سیب تفاوت‌های قابل ملاحظه‌ای در حساسیت به شانکر نشان می‌دهند. برای ارقام بسیار حساس، این بیماری می‌تواند عامل محدودکننده‌ای برای تولید باشد. اصلاح ارقام جدید با سطح بالایی از مقاومت در برابر عفونت *N.ditissima* کمک بزرگی به تولید پایدار سیب خواهد کرد. در مطالعات گذشته تنوع در مقاومت بین ارقام سیب مشاهده شده است (ساسناکاست^۲ و همکاران، ۲۰۰۶؛ ژلوناوسکین^۳ و همکاران، ۲۰۰۷؛ ون دوگ^۴، ۱۹۸۹). اما در این میان تاکنون هیچ ژنی شناسایی نشده است و به نظر می‌رسد که مقاومت عمدتاً با عملکرد ژن افزایشی کنترل می‌شود (ژلوناوسکین و همکاران، ۲۰۰۷). مکانیسم‌های مولکولی بین درخت و عامل بیماری‌زا، همچنین دفاع میزبان هنوز نامشخص هستند، اما در حال شناسایی می‌باشند (باس^۵ و همکاران، ۲۰۱۹). تشکیل لایه‌های متعدد بافت پنبه‌ای به عنوان نشانه قابل مشاهده مقاومت در نظر گرفته می‌شود (کنل^۶، ۱۹۶۳)، در حالیکه تشکیل شانکرهای بزرگ با توده زیادی از اسپورهای قارچ و یا رشد قارچ به بافت‌های چوبی فراتر از مرز شانکرها به عنوان نشانه‌هایی از حساسیت بالای یک رقم در نظر گرفته می‌شود (گومز-کورتچرو^۷ و همکاران، ۲۰۱۶). اگرچه هنوز هیچ رقمی با مقاومت کامل به *N.ditissima* شناسایی نشده است اما اصلاح نژاد برای مقاومت (حتی جزئی) هنوز یک کار امیدوارکننده است زیرا بسیاری از ارقام موجود در حال حاضر حساس هستند و به نظر می‌رسد ساختار جمعیت *N.ditissima* در مناطق مختلف جهان و میزبان‌های مختلف نسبتاً یکسان است (گومز-کورتچرو و همکاران، ۲۰۱۶). بنابراین رقمی که دارای مقاومت است، حداقل از دیدگاه یک آسیب‌شناس گیاهی، پتانسیل تجاری جهانی دارد. همچنین روش‌های قابل اعتمادی برای ارزیابی مقاومت ارقام مختلف سیب به بیماری شانکر مورد نیاز است تا امکان اصلاح‌نژاد برای مقاومت به این بیماری را فراهم نماید. تلاش‌هایی براساس آلودگی طبیعی در مزرعه انجام شده است (کازلوسکایا^۸ و همکاران، ۲۰۱۳؛ یودر و همکاران، ۱۹۹۹). اما نتایج تحت تأثیر مواردی نظیر: شرایط آب و

7. Gómez-Cortecero
8. Kazlouskaya
9. Kim and Beresford
10. Balsgård
11. Kristianstad

1. Weber and Børve
2. Sasnauskaset
3. Gelvonauskiene
4. Van de Weg
5. Bus
6. Kennel

شیشه‌ای در گلخانه با محیط کنترل‌شده نگهداری شدند. رطوبت ۷۰ درصد و دمای ثابت ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت (روز) و ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت (شب) و آب و هوا با یک دستگاه گردش هوا تنظیم شد.

ارزیابی بیماری و تجزیه و تحلیل‌های آماری

سطح آلودگی با استفاده از کولیس دیجیتالی در پنج نقطه زمانی با فاصله هفت روزه ثبت شد. زخم‌های آلوده نشده به عنوان مقادیر گم‌شده در نظر گرفته شدند. طول آلودگی ایجاد شده در هر شاخه به طور میانگین محاسبه شد و تمام مقادیر میانگین در همه شاخه‌ها برای محاسبه منحنی پیشرفت بیماری استفاده شد. طبق روش شانر و فینی^۳ (۱۹۷۷) از داده‌های شدت بیماری برای سطح زیرمنحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) استفاده شد (شانر و فینی، ۱۹۹۷). همچنین درصد آلودگی نیز محاسبه گردید. مقدار AUDPC به صورت زیر در برنامه اکسل ۲۰۱۰ محاسبه شد:

$$AUDPC = \sum_{i=1}^n [(Y_{i+1} + Y_i)/2] [X_{i+1} - X_i]$$

بررسی تنوع فنوتیپی ارقام سیب براساس داده‌های محاسبه شده AUDPC و درصد آلودگی بیماری صورت پذیرفت و رسم نمودار در برنامه اکسل انجام شد. تجزیه واریانس با استفاده از مقادیر سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری و رقم انجام شد. از آزمون همبستگی پیرسون برای بررسی AUDPC و درصد آلودگی استفاده گردید. تجزیه و تحلیل‌های ذکر شده در برنامه SAS نسخه ۹.۳ و اکسل انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها به روش توکی نیز در نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ محاسبه گردید.

نتایج و بحث

براساس نتایج به دست آمده، علائم اولیه بیماری در شاخه‌های بریده یکساله شامل یک ناحیه کم رنگ پوست در نواحی اطراف محل تلقیح و به دنبال آن ناحیه فرورفته و متورم پوست بود. سپس علائم در طول شاخه در مقایسه با عرض شاخه سریعتر پیشرفت کردند و ناحیه نکروز از نقطه تلقیح شروع و تشکیل گردید. در این روش تلقیح، علائم بیماری ۱۰ تا ۱۴ روز پس از تلقیح مشاهده شدند و سپس طی چهار تا پنج هفته ارزیابی به سرعت پیشرفت

"لیندا" استفاده و تلقیح داده شدند و گلخانه‌ای با دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۷۰ درصد غربالگری انجام شد.

تهیه سوسپانسیون قارچ

جهت آماده‌سازی سوسپانسیون، شانکرهای طبیعی حاوی اسپورودوخیوم روی شاخه‌های درختان سیب با علائم بیماری از باغ‌های سیب در بالسگارد، کیخانستاد، سوید در پاییز جمع‌آوری شدند و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کنیدی‌ها توسط سوزن استریل برداشته و در آب مقطر پخش شدند، بدین ترتیب سوسپانسیون قارچ به دست آمد. سپس غلظت با استفاده از هموسیتومتر به غلظت 1×10^5 کنیدی در میلی‌لیتر تنظیم شد (قاسم‌خانی^۱ و همکاران، ۲۰۱۵).

تلقیح و شرایط آزمایش

برای هر رقم، هشت شاخه انتخاب و بین دو بلوک تقسیم شدند (۴ شاخه $\times$ ۲ بلوک $\times$ ۵ نقطه زمانی). آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی انجام شد. سه جوانه از هر شاخه انتخاب شد. به طور کلی جوانه‌های شماره ۶، ۸ و ۱۰ از راس شاخه جهت تلقیح استفاده شدند، اما در شاخه‌های کوتاه‌تر از ۶۰ سانتی‌متر، جوانه‌های شماره ۴، ۶ و ۸ انتخاب شدند. جوانه‌ها با اسکالپر بریده شدند. یک شاخه از هر رقم به عنوان شاهد با آب استریل تلقیح داده شد. زخم‌های ایجاد شده با 10×10^5 میکرولیتر سوسپانسیون قارچ به غلظت 1×10^5 اسپور در میلی‌لیتر ظرف ۴ دقیقه پس از ایجاد زخم تلقیح داده شدند. سپس زخم‌ها با وازلین پوشانده شدند تا رطوبت محل زخم حفظ شود. وازلین پس از چهار روز با استفاده از دستمال کاغذی برداشته شد. در این مطالعه، دو روش مورد استفاده توسط ون‌دوگ (۱۹۸۹)، استفاده از روش شاخه‌های بریده و پوشاندن زخم‌ها با وازلین ترکیب شد (ون‌دوگ، ۱۹۸۹). وازلین حساسیت آزمون را نسبت به حضور آب آزاد در محل تلقیح در مدت زمان طولانی‌تری کاهش داد. بطری‌های شیشه‌ای یک لیتری با 300 میلی‌لیتر آب و کود مایع (کریستال سفید، بونسای^۲) به نسبت ۱:۲۰ پر شدند و شاخه‌های تلقیح داده شده در آنها قرار گرفتند. کود مایع جهت افزایش طول عمر شاخه‌های بریده استفاده شد. محلول آب/کود هر هفته تعویض می‌شد و چند میلی‌متر از پایه شاخه به صورت اریب قطع می‌گردید تا توانایی جذب آب بهبود یابد. بطری‌های



شکل ۱- علائم بیماری شانکر اروپایی روی شاخه‌های بریده یکساله سیب پس از گذشت ۲۵ روز از زمان تلقیح در رقم "لیندا"

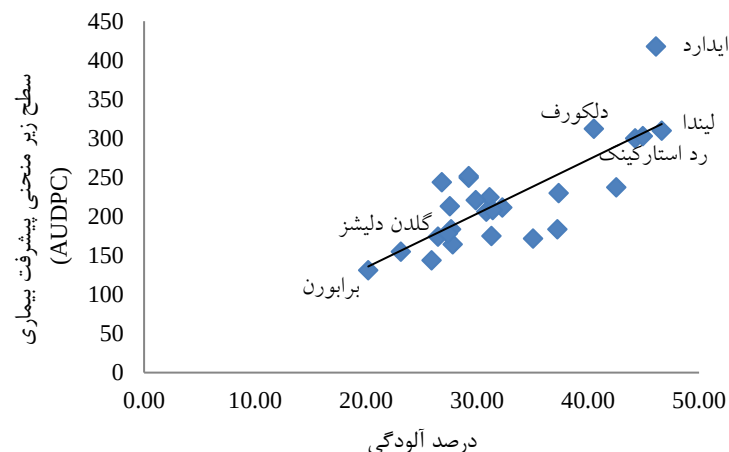
کردند (شکل ۱).

در این آزمایش، تنوع قابل ملاحظه‌ای بین ارقام در مقاومت به بیماری مشاهده شد و هیچ علائمی روی شاخه‌های شاهد یافت نشد که نشان می‌دهد عفونت‌های نهفته با نتایج به دست آمده تداخلی نداشته‌اند. برای ارزیابی مقاومت به بیماری از مقادیر AUDPC و درصد آلودگی به عنوان بازتابی از شدت و توسعه بیماری استفاده شد. تفاوت معنی‌داری در سطح آلودگی براساس درصد آلودگی و AUDPC به ترتیب در بین ۲۶ رقم مشاهده شد ($P < 0.001$, $F = 2/98$, $df = 25$) و همچنین همبستگی معنی‌داری بین میانگین داده‌های AUDPC و میانگین درصد آلودگی به دست آمد (شکل ۲، جدول ۲). رقم "برابورن" کمترین حساسیت و رقم "ایدارد" بیشترین حساسیت را براساس نتایج درصد آلودگی و AUDPC نشان دادند. علاوه بر این "گرانی اسمیت" و "گلدن دلشیز" به *N.ditissima* مقاوم بودند در حالیکه "لیندا"، "ساندرا" و "دلکورف" حساس به این بیماری شناسایی شدند (جدول ۱). چندین رقم دیگر نیز مانند "اپل سین"، "فوجی" و "استراکان قرمز" مقاومت نسبتاً بالایی براساس دو داده فنوتیپی درصد آلودگی و AUDPC از خود نشان دادند که می‌توانند در برنامه‌های آبی در جهت اصلاح و پرورش ارزشمند باشند (نمودار ۱ و ۲). در حالیکه "ساندرا" و "استراکینگ قرمز" در درجه حساس طبقه‌بندی شدند. مابقی ارقام در بین این رقم‌ها قرار گرفتند (نمودار ۱ و ۲). نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌ها نیز نشان داد که با این دو روش آنالیز می‌توان عمده‌ترین و مقاوم‌ترین ژنوتیپ را شناسایی نمود و گروه‌بندی یکسانی در

ژنوتیپ‌های نیمه‌حساس و نیمه‌مقاوم مشاهده نگردید (جدول ۱). به عنوان مثال براساس AUDPC رقم‌های "فوجی"، "همپوس" و "جنوا ارلی" در رده نیمه‌مقاوم طبقه‌بندی شدند در حالیکه طبق داده‌های درصد آلودگی در طبقه نیمه‌حساس قرار گرفتند (جدول ۱). توسعه و پیشرفت آلودگی در شاخه‌های بریده در فواصل هفت روزه اندازه‌گیری شد و ارزیابی داده‌های به دست آمده برای منحنی پیشرفت بیماری، تنوع معنی‌داری را در بین ۲۶ رقم حاصل نمود. همچنین همبستگی معنی‌داری بین تکرارها براساس AUDPC و درصد آلودگی به دست آمد (جدول ۲).

به منظور انجام مطالعات بیشتر در زمینه مقاومت ژنتیکی به شانکر درختان میوه، داده‌های فنوتیپی قابل اعتماد از ژنوتیپ‌های مختلف سیب مورد نیاز بود. مطالعات پیشین در زمینه تعیین روشی نسبتاً دقیق جهت ارزیابی مقاومت ارقام سیب به این بیماری، شاخه‌های بریده یکساله زمستان گذران و تلقیح مصنوعی محل جوانه‌ها را استفاده نمودند که نتایج قابل قبولی حاصل شد (گارکاوا-گوستاوسون و همکاران، ۲۰۱۳؛ قاسم‌خانی و همکاران، ۲۰۱۵). در نتیجه در این آزمایش از ترکیب این دو روش استفاده شد که نتایج در مدت زمان کوتاه به دست آمد و شرایط آزمایش همچون عدم ایجاد آلودگی ثانویه، عدم تداخل آلودگی‌های نهفته در پیشرفت بیماری در تطابق با نتایج آزمایشات پیشین بوده است (گارکاوا-گوستاوسون و همکاران، ۲۰۱۳؛ قاسم‌خانی و همکاران، ۲۰۱۵).

در تحقیقات گذشته برای ارزیابی سطح مقاومت از روش‌های مختلف استفاده شده است که شامل سه روش



شکل ۲- نمودار همبستگی بین میانگین سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) با میانگین درصد آلودگی در ۲۶ رقم سیب آلوده شده با قارچ *N. ditissima*

رقمی مقاوم به سوختگی سطحی ناشی از انبارداری در سردخانه گزارش شده است که علت آن کاهش تولید ماده آلفا-فارنسن^۲ بوده است (پچوس^۳ و همکاران، ۲۰۰۵). طبق گزارشات میوه‌ها در معرض متیل‌سیکلوپروپین و دیازودی سیکلوپنتادین قرار گرفته بودند و تولید اتیلن مسدود شده بود. این دو ترکیب به‌عنوان عوامل مهارکننده اتیلن برای حفظ کیفیت و کاهش ضایعات میوه‌ها در مدت زمان نگهداری استفاده می‌شود (پچوس و همکاران، ۲۰۰۵).

نتیجه به دست آمده برای "گلدن دلشیز" با نتایج گزارش شده برای شاخه‌های بریده شده (ون دوگ، ۱۹۸۹)، درختان تلقیح شده (زو^۴ و همکاران، ۲۰۲۲) و درختان دساله (شپر^۵ و همکاران، ۲۰۱۸) مطابقت دارد. تفاوت در روش‌های ارزیابی (بارو^۶ و همکاران، ۲۰۱۹؛ شپر و همکاران، ۲۰۱۸؛ گومز-کورتچرو و همکاران، ۲۰۱۶) می‌تواند منجر به رتبه‌بندی متفاوت ارقام در پاسخ به *N. ditissima* شود. بنابراین نتایج حاضر نشان می‌دهد که عوامل ژنتیکی مسئول کاهش رشد شانکر در "گلدن دلشیز" در محیط‌های مختلف پایدار و مؤثر هستند و بهره‌برداری از این عوامل مقاومت در اصلاح نژاد می‌تواند مفید باشد.

همبستگی معنی‌دار بین تکرارها نشان داد که ممکن است برای انجام این آزمایش‌ها به شرایط محیطی کنترل شده با دمای متعادل نیاز باشد. زیرا در مطالعات گذشته همبستگی

بود: درصد آلودگی (تقسیم تعداد جوانه‌های آلوده در آخرین زمان اندازه‌گیری بر تعداد کل جوانه‌های آلوده)، دوره کمون (از زمان تلقیح تا زمانی که اولین علائم آلودگی اندازه‌گیری شد) و طول گسترش آلودگی ایجاد شده در هر شاخه (محاسبه سطح زیرمنحنی پیشرفت بیماری، AUDPC) (ژلونوسکین و همکاران، ۲۰۰۷؛ گارکاوا-گوستاوسون و همکاران، ۲۰۱۳). همچنین در مطالعات قبل، براساس مقادیر AUDPC همبستگی معنی‌داری بین دو سال متوالی مشاهده شد در حالیکه بر اساس دوره کمون همبستگی معنی‌داری مشاهده نشد. علاوه بر این، داده‌های دوره کمون تفاوت معنی‌دار کمتری در بین ارقام نشان دادند و در مقایسه با سایر پارامترها، تنوع بیشتری را در بین شرایط محیطی محل آزمایش ایجاد کردند (قاسم‌خانی و همکاران، ۲۰۱۵). در نتیجه در این آزمایش برای ارزیابی مقاومت نسبی از دو روش AUDPC و درصد آلودگی استفاده گردید و نتایج قابل قبولی حاصل گردید. به طوریکه ارقام با مقاومت بالا و حساسیت بالا را شناسایی نمودند که نتایج بدست آمده در تطابق با نتایج آزمایشات پیشین بوده است (گارکاوا-گوستاوسون و همکاران، ۲۰۱۳؛ قاسم‌خانی و همکاران، ۲۰۱۵).

نتایج پالم^۱ و همکارانش (۲۰۱۱) نشان دادند که "برابورن" رقمی مقاوم به این بیماری می‌باشد. علاوه بر این "ایدارد"

4. Xu
5. Scheper
6. Børve

1. Palm
2. α -farnesene
3. Pechous

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد آلودگی و سطح زیرمنحنی پیشرفت بیماری (AUDPC) در ۲۶ رقم سیب تلقیح شده با قارچ *N.ditissima*

AUDPC	تکرار	ژنوتیپ	درصد آلودگی	تکرار	ژنوتیپ
۱۳۰/۸۳ ^A	۸	برابورن	۲۰/۱۹ ^A	۸	برابورن
۱۴۳/۴۴ ^{AB}	۸	گرانی اسمیت	۲۳/۱۳ ^{AB}	۸	گلدن دلیشز
۱۵۴/۸۵ ^{AB}	۸	گلدن دلیشز	۲۵/۹۰ ^{BC}	۸	گرانی اسمیت
۱۶۴/۱۹ ^{AB}	۸	اپل سین	۲۶/۴۶ ^{BC}	۸	آستراکان قرمز
۱۷۱/۴۲ ^{AB}	۸	فوجی	۲۶/۸۲ ^{BC}	۸	اسپر قرمز
۱۷۳/۷۷ ^{AB}	۸	آستراکان قرمز	۲۷/۳۵ ^{BC}	۸	اسپنسر
۱۷۴/۸۱ ^{AB}	۸	همپوس	۲۷/۵۲ ^{BC}	۸	جوناکلد
۱۷۷/۸۹ ^{AB}	۸	اسپنسر	۲۷/۶۵ ^{BC}	۸	لیبرتی
۱۸۳/۵۳ ^{AB}	۸	جنوا ارلی	۲۷/۷۹ ^{BC}	۸	اپل سین
۱۸۳/۵۳ ^{AB}	۸	لیبرتی	۲۹/۲۳ ^{CD}	۸	کریترون
۲۰۵/۸۵ ^{BC}	۸	موتسو	۲۹/۲۵ ^{CD}	۸	گالا
۲۰۷/۸۹ ^{BC}	۸	سلطنت	۲۹/۸۶ ^{CD}	۸	اسپر طلایی
۲۱۱/۰۷ ^{BC}	۸	کورتلند	۳۰/۸۲ ^{CD}	۸	موتسو
۲۱۲/۷۲ ^{BC}	۸	جوناکلد	۳۱/۱۰ ^{CD}	۸	دلبار استوال
۲۲۰/۷ ^{BC}	۸	گلدن اسپور	۳۱/۲۸ ^{CD}	۸	همپوس
۲۲۴/۲۲ ^{BC}	۸	دلبار استیوال	۳۱/۴۰ ^{CD}	۸	سلطنت
۲۲۹/۸۷ ^{BC}	۸	اسنوویت	۳۲/۲۷ ^{CD}	۸	کورتلند
۲۳۶/۹۴ ^{BC}	۸	هتا	۳۵/۰۲ ^D	۸	فوجی
۲۴۳/۸۲ ^{BC}	۸	اسپر قرمز	۳۷/۲۳ ^{DE}	۸	جنوا ارلی
۲۴۹/۲۸ ^{BC}	۸	کریترون	۳۷/۳۴ ^{DE}	۸	اسنوویت
۲۵۱/۲۲ ^{BC}	۸	گالا	۴۰/۵۲ ^{EF}	۸	دلکورف
۲۹۹/۶۸ ^{CD}	۸	استارکینگ قرمز	۴۲/۵۵ ^{EF}	۸	هتا
۳۰۲/۷۳ ^{CD}	۸	ساندرا	۴۴/۲۵ ^{EF}	۸	استارکینگ قرمز
۳۰۹/۴۸ ^{CD}	۸	لیندا	۴۴/۹۴ ^{FG}	۸	ساندرا
۳۱۲/۲۵ ^{CD}	۸	دلکورف	۴۶/۱۱ ^{FG}	۸	ایدارد
۴۱۷/۵ ^D	۸	ایدارد	۴۶/۶۴ ^{FG}	۸	لیندا

مقایسه میانگین به روش توکی انجام شد و حروف مختلف در ستون گروه‌بندی نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری با در سطح معنی‌داری ۵ درصد است.

جدول ۲. همبستگی پیرسون بین درصد آلودگی و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری (AUDPC).

درصد آلودگی	سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری
۰/۶۹**	۰/۷۵**
	۰/۷۹**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

همکاران، ۲۰۱۵). همچنین مطالعات گذشته نشان داد که تفاوت در شرایط آب و هوایی می‌تواند از نظر تأثیر بر عمق خواب زمستانی یا وضعیت تغذیه بر روی شاخه‌ها تأثیرگذار

پایینی بین تکرارها به دست آمد که دلیل آن استفاده از گلخانه‌ای بود که شرایط محیطی در آن قابل کنترل نبود (گارکاوا-گوستاوسون و همکاران، ۲۰۱۳؛ قاسم‌خانی و

باشد و تفاوت در مواد گیاهی مورد استفاده در آزمایش مانند درخت، شاخه‌های بریده و محیط در طول گسترش بیماری احتمالاً دخیل است (ساویل و اولیویری^۱، ۲۰۱۹؛ ونکر^۲ و همکاران، ۲۰۱۷). در تحقیقات پیشین دمای بالای ۲۲ درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌ها روی شاخه‌های بریده شده‌ای که مستقیماً از سردخانه آمده بودند، نامطلوب بود (گارکاوا-گوستاوسون و همکاران، ۲۰۱۳)، در نتیجه در این آزمایش دمای مورد استفاده ۲۰ درجه سانتی‌گراد لحاظ شد.

از آنجایی که آزمایش در شرایط کنترل شده، انجام پذیرفت و رطوبت محیط با دستگاه گردش هوا کنترل و پایین نگه داشته شد آلودگی ثانویه در محل تلقیح جوانه‌ها مشاهده نگردید. در حالیکه در مطالعات گذشته عدم کنترل مناسب محیط گلخانه منجر به عفونت ثانویه توسط سایر قارچ‌ها شد (گارکاوا-گوستاوسون و همکاران، ۲۰۱۳؛ قاسم‌خانی و همکاران، ۲۰۱۵). در مطالعه حاضر پیشرفت بیماری روند متعادلی را طی نمود و منجر به نتایج بهتری گردید. این می‌تواند به این دلیل باشد که یک دوره سازگاری کوتاه مدت با انتقال شاخه‌های بریده چهار روز پیش از شروع آزمایش به گلخانه اعمال شد و برای مدت کوتاه‌تری در سردخانه نگهداری شدند. در مطالعات قبل چنین دوره‌ای اعمال نگردید در نتیجه روند پیشرفت بیماری بسیار آهسته بود که به ناچار شرایط محیطی گلخانه تغییر داده شد (گارکاوا-گوستاوسون و همکاران، ۲۰۱۳). دوره کوتاه نگهداری در سردخانه در بالا بودن رطوبت موجود در شاخه‌ها موثر بوده و پیشرفت بیماری را مساعدتر نمود. لازم به ذکر است دماهای پایین‌تر از صفر درجه سانتی‌گراد بر طیف گسترده‌ای از متابولیسم سلولی تأثیر می‌گذارد که به مدت و شدت دمای سرد بستگی دارد که این می‌تواند بر روند پیشرفت بیماری تأثیرگذار باشد (کنل، ۱۹۶۳). ارقام مختلف سیب از نظر حساسیت به *N.ditissima* متفاوت گزارش شده‌اند و بین مطالعات مختلف نتایج چندان مشابه نمی‌باشد (بارو و همکاران، ۲۰۱۹؛ شیر و همکاران، ۲۰۱۸). چندین احتمال برای این اختلافات وجود دارد. برخی از مطالعات براساس تلقیح مصنوعی، بعضی براساس عفونت طبیعی ارزیابی گردیده‌اند (پالم و همکاران، ۲۰۱۱؛ دلگادو^۳

و همکاران، ۲۰۲۲). همچنین مایه تلقیح در مطالعات متفاوت بوده است مانند سوسپانسیون اسپور و میسلیم (گارکاوا-گوستاوسون و همکاران، ۲۰۱۳؛ ون دوگ، ۱۹۸۹). تفاوت در ته‌اجمی بودن سوسپانسیون‌های مختلف اسپور نیز می‌تواند دلیلی برای ایجاد تفاوت در ارزیابی ارقام سیب مورد توجه قرار گیرد (وشه و وبر^۴، ۲۰۲۳). علاوه بر این، اختلاف بین مطالعات ممکن است ناشی از محل‌های مختلف ورود قارچ باشد مانند زخم‌های مصنوعی ایجاد شده شبیه ریش برگ‌ها در پاییز در محل دمبرگ یا زخم‌های هرس (پالم و همکاران، ۲۰۱۱؛ گارکاوا-گوستاوسون و همکاران، ۲۰۱۳؛ والتر^۵ و همکاران، ۲۰۱۹). انواع مختلف زخم در درختان از نظر آناتومی و فیزیولوژی متفاوت می‌باشد و به نظر می‌رسد زخم‌های هرس نسبت به دمبرگ بیشتر مستعد ابتلا به *N.ditissima* هستند (لیکتفوس^۶، ۲۰۰۹). علت این می‌تواند باشد که پاسخ دفاعی سریع میزبان به عفونت از طریق زخم دمبرگ احتمالاً از طریق انتخاب طبیعی تکامل یافته است، زیرا تعداد زیادی زخم دمبرگ به طور طبیعی هرساله در پاییز تشکیل می‌شوند. در مقابل، پاسخ به عفونت از طریق زخم‌های هرس کندتر است، احتمالاً به این دلیل که هرس به طور طبیعی رخ نمی‌دهد و یک مکانیسم دفاعی کارآمد تکامل نیافته است (پاپ-روپار و همکاران، ۲۰۲۲).

در این آزمایش سعی شد تا جای ممکن کلیه شرایط آزمایش قابل کنترل باشد. به عنوان مثال در روش ارزیابی درختان عواملی مانند عفونت نهفته در نهالستان‌ها می‌تواند عاملی باشد که سیستم مقاومتی درخت را پیش از تلقیح مصنوعی فعال نموده و در ارزیابی فنوتیپی این درختان اختلالی خارج از کنترل ایجاد نماید. همچنین خاک استفاده شده و میکروارگانیسم‌های رشد یافته در این خاک می‌تواند تفاوت بین ارقام ایجاد کند (بارو و همکاران، ۲۰۱۹؛ یودر و همکاران، ۱۹۹۹). در حالیکه در این مطالعه استفاده از شاخه‌های بریده این عوامل غیرقابل کنترل را حذف نمود.

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که روش استفاده از شاخه‌های بریده راهی سریع و نسبتاً ارزان برای بررسی تنوع فنوتیپی

4. Wesche and weber
5. Walter
6. Lichtfouse

1. Saville and Olivieri
2. Wenneker
3. Delgado

بهینه‌سازی بیشتری دارد. همچنین پیشنهاد می‌شود روش‌هایی با توان و وضوح بالا برای تحقیقات ژنتیکی و ژنومی توسعه یابد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب طرح پژوهشی شماره ۵۲۹/۰۱/ص/۷ با استفاده از اعتبارات پژوهشی پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران انجام شده است.

ارقام سیب در برابر بیماری شانکر اروپایی می‌باشد. نتایج مشابه در داده‌ها با استفاده از دو روش ارزیابی درصد آلودگی و AUDPC برای ارقام مقاوم و حساس نشان می‌دهد که این روش آماری برای رتبه‌بندی ارقام مفید است و می‌تواند مدل مناسبی در مرحله اولیه تحقیقات مرتبط با شانکر و شناسایی منابع مقاومت و حساس در درختان سیب باشد. همچنین روش ارزیابی شاخه‌های بریده یکساله می‌تواند برای غربالگری اولیه ژنوتیپ‌های سیب و همچنین کسب دانش در مورد توسعه عفونت مورد استفاده قرار گیرد. در پایان این رویکرد برای دستیابی به قدرت وضوح بهتر نیاز به

منابع

- Amponsah, N.T., Walter, M., Beresford, R.M. and Scheper, R.W.A. 2015. Seasonal wound presence and susceptibility to *Neonectria ditissima* infection in New Zealand apple trees. *New Zealand Plant Protection*, 68: 250-256.
- Beresford, R.M. and Kim, K.S. 2011. Identification of regional climatic conditions favorable for development of European canker of apple. *Phytopathology*, 101(1): 135-146.
- Børve, J., Dalen, M. and Stensvand, A. 2019. Development of *Neonectria ditissima* infections initiated at grafting of apple trees. *European Journal of Plant Pathology*, 155: 1225-1239.
- Bus, V.G., Scheper, R.W., Walter, M., Campbell, R.E., Kitson, B., Turner, L., Fisher, B.M., Johnston, S.L., Wu, C., Deng, C.H. and Singla, G. 2019. Genetic mapping of the European canker (*Neonectria ditissima*) resistance locus Rnd1 from *Malus* 'Robusta 5'. *Tree Genetics and Genomes*, 15: 1-13.
- Delgado, Á., García-Fernández, B., Gómez-Cortecero, A. and Dapena, E. 2022. Susceptibility of cider apple accessions to European canker-Comparison between evaluations in field planted trees and rapid screening tests. *Plants*, 11(9): 1145.
- Garkava-Gustavsson, L., Zborowska, A., Sehic, J., Rur, M., Nybom, H., Englund, J.E., Lateur, M., Van de Weg, E. and Holefors, A. 2013. Screening of apple cultivars for resistance to European canker, *Neonectria ditissima*. *Acta Horticulturae*, 976: 529-536.
- Gelain, J., Hamada, N.A. and Mio, L.L.M.D. 2022. Survival of pathogens after dormancy in apple tree twigs indicates potential risk as source of inoculum. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 44: e53816.
- Gelvonauskienė, D., Sasnauskas, A. and Gelvonauskis, B. 2007. The breeding of apple tree resistant to European canker (*Nectria galligena* Bres.). *Sodininkystė ir daržininkystė*, 26: 174-178.
- Ghasemkhani, M., Liljeroth, E., Sehic, J., Zborowska, A. and Nybom, H. 2015. Cut-off shoots method for estimation of partial resistance in apple cultivars to fruit tree canker caused by *Neonectria ditissima*. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B—Soil and Plant Science*, 65(5): 412-421.
- Gómez-Cortecero, A., Saville, R.J., Scheper, R.W., Bowen, J.K., Agripino De Medeiros, H., Kingsnorth, J., Xu, X. and Harrison, R.J. 2016. Variation in host and pathogen in the *Neonectria/Malus* interaction; toward an understanding of the genetic basis of resistance to European canker. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1365.
- Harteveld, D.O.C., Goedhart, P.W., Houwers, I., Köhl, J., de Jong, P.F. and Wenneker, M. 2023. Detecting the asymptomatic colonization of apple branches by *Neonectria ditissima*, causing European canker of apple. *European Journal of Plant Pathology*, 166(3): 291-301.
- Jansonius, P., de Jong, P.F. and Anbergen, R. 2004. Vruchtboomkanker in de biologische vruchtboomteelt. Publicatie LF79. Louis Bolk Instituut: Driebergen, Netherlands.
- Kazlouskaya, Z.A. and Marchuk, Y.G. 2011. Evaluation of susceptibility to *Nectria* canker as initial material for apple breeding. In XIII Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics 976: 549-554.
- Kennel, W. 1963. Zur Pathogenese des Obstbaumkrebses (*Nectria galligena* Bres.) am Apfel. *Gartenbauwissenschaft*, 29-64.

- Kim, K.S. and Beresford, R.M. 2012. Use of a climatic rule and fuzzy sets to model geographic distribution of climatic risk for European canker (*Neonectria galligena*) of apple. *Phytopathology*, 102(2): 147-157.
- Lichtfouse, E. 2009. Climate change, intercropping, pest control and beneficial microorganisms (Vol. 2, pp. 229-232). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
- McCracken, A.R., Berrie, A., Barbara, D.J., Locke, T., Cooke, L.R., Phelps, K., Swinburne, T.R., Brown, A.E., Ellerker, B. and Langrell, S.R.H. 2003. Relative significance of nursery infections and orchard inoculum in the development and spread of apple canker (*Nectria galligena*) in young orchards. *Plant Pathology*, 52(5): 553-566.
- Metzler, B., Meierjohann, E., Kublin, E. and Von Wühlisch, G. 2002. Spatial dispersal of *Nectria ditissima* canker of beech in an international provenance trial. *Forest Pathology*, 32(3): 137-144.
- Montecchio, L., Scattolin, L. and De Battisti, R. 2011. Dormouse injuries predispose beech to infection by *Neonectria ditissima*. *Forest Pathology*, 41(2): 114-119.
- Palm, G., Harms, F. and Vollmer, I. 2011. Mehrjährige Befallsentwicklung des Obstbaukrebses an verschiedenen Apfelsorten an drei Standorten. *Mitteilungen des Obstbauversuchsrings des Alten Landes*, 66: 360-363.
- Papp-Rupar, M., Karlstrom, A., Passey, T., Deakin, G. and Xu, X. 2022. The influence of host genotypes on the endophytes in the leaf scar tissues of apple trees and correlation of the endophytes with apple canker (*Neonectria ditissima*) development. *Phytobiomes Journal*, 6(2): 127-138.
- Pechous, S.W., Watkins, C.B. and Whitaker, B.D. 2005. Expression of α -farnesene synthase gene *AFS1* in relation to levels of α -farnesene and conjugated trienols in peel tissue of scald-susceptible 'Law Rome' and scald-resistant 'Idared' apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 35(2): 125-132.
- Sasnauskas, A., Gelvonauskienė, D., Gelvonauskis, B., Bendokas, V. and Baniulis, D. 2006. Resistance to fungal diseases of apple cultivars and hybrids in Lithuania. *Agronomy Research*, 4: 349-352.
- Saville, R. and Olivieri, L. 2019. Fungal diseases of fruit: apple cankers in Europe. In *Integrated management of diseases and insect pests of tree fruit* (pp. 59-84). Burleigh Dodds Science Publishing.
- Scheper, R.W., Fisher, B.M., Taylor, T. and Hedderley, D.I. 2018. Detached shoot treatments cannot replace whole-tree assays when phenotyping for apple resistance to *Neonectria ditissima*. *New Zealand Plant Protection*, 71: 151-157.
- Shaner, G. and Finney, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in Knox wheat. *Phytopathology*, 67(8): 1051-1056.
- Van de Weg, W.E. 1989. Screening for resistance to *Nectria galligena* Bres. in cut shoots of apple. *Euphytica*, 42: 233-240.
- Walter, M., Manktelow, D.W., Le Berre, F., Campbell, R.E., Turner, L., Vorster, L., Patrick, E., Butler, R.C. and Northcott, G.L. 2019. How much captan is required for wound protection of *Neonectria ditissima* conidial infection in apple? *New Zealand Plant Protection*, 72: 95-102.
- Weber, R.W. and Børve, J. 2021. Infection biology as the basis of integrated control of apple canker (*Neonectria ditissima*) in Northern Europe. *CABI Agriculture and Bioscience*, 2: 1-16.
- Weber, R.W.S. 2014. Biology and control of the apple canker fungus *Neonectria ditissima* (syn. *N. galligena*) from a Northwestern European perspective. *Erwerbs-Obstbau*, 56(3): 95-107.
- Wenneker, M., de Jong, P.F., Joosten, N.N., Goedhart, P.W. and Thomma, B.P. 2017. Development of a method for detection of latent European fruit tree canker (*Neonectria ditissima*) infections in apple and pear nurseries. *European Journal of Plant Pathology*, 148: 631-635.
- Wesche, J. and Weber, R.W. 2023. Are microconidia infectious principles in *Neonectria ditissima*? *Journal of Plant Diseases and Protection*, 130(1): 157-162.
- Xu, X., Passey, T., Robinson-Boyer, L., Mclean, H., Saville, R. and Papp-Rupar, M. 2022. Development of European apple canker on different cultivars in relation to planting time at three sites in the UK. *Frontiers in Horticulture*, 1: 995776.
- Yoder, K.S., Miller, S.S. and Byers, R.E. 1999. Suppression of fireblight in apple shoots by prohexadione-calcium following experimental and natural inoculation. *HortScience*, 34(7): 1202-1204.