شناسایی باکتری عامل بیماری شانکر پوستی گردو آن در دماوند
Occurrence of Shallow Bark Canker of Walnut Trees in Damavand

سمیرا اسداللهی[۱]، ابوالقاسم قاسمی[۲*] و سید محمد اشکان[۳]

دریافت: ۱۳۹۵/۱۰/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۶/۲/۱۶

چکیده

در سال‌های اخیر بیماری شانکر پوستی گردو با عامل*Brenneria nigrifluens* از مناطق مختلفی از ایران گزارش شـده است. به منظـور شنـاسـایی عامل بیماری و پراکنش این بیماری در منطقه دماوند از اوایل تابستان ۱۳۹۲ نمونه‌برداری از تنه درختان دارای علائم شانکر پوستی به همراه ترشح شیرابه سیاه انجام شد. نمونه‌های مورد نظر در محیط EMBAgar (Agar Eosin methylene blue) کشت و کلنی های با توانایی تولید رنگ سبز متالیک انتخاب شدند. در مجموع ۴۶ جدایه باکتری گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری از بافت‌های آلوده که قادر به ایجاد علائم مشابه در نهـال‌های گردو بودند، جدا گردید. باکتری‌های جداشده دارای خصوصیات فنوتیپی مشابهی بودند. براساس ویژگی‌های مرفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیک جدایه‌ها و نیز تعیین توالی قطعه *rpoB* (RNA polymerase beta subunit) جدایه‌های منتخب گونه *Brenneria nigrifluens* به عنوان عامل بیماری شانکر پوستی درختان گردو تعیین گردید. این اولین گزارش از این بیماری در دماوند روی درختان گردو می‌باشد.

واژگان کلیدی: گردو، دماوند، rpoB و *Brenneria nigrifluens*

۱ و ۳- دانشیار و دانشجویسابق کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، ورامین، ایران

۲- استادیار بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: ghasemi@gmail.com

مقدمه

بیماری شانکر باکتریایی گردوبا عامل *Brenneria nigrifluen*s اولین بار درسال ۱۹۵۷ میلادی در منطقه کالیفرنیای آمریکا مشاهده شد و پس از آن در برخی نواحی دیگر از قبیلSutter، Colusuو Yolo گزارش گردید (Wilson *et al*., 1957). سپس این بیماری در سال ۱۹۹۴در کشور اسپانیا (Lopez *et al*., 1994)، کشور ایتالیا (Saccardi *et al*., 1998; Morone *et al*., 1998; Scortichini, 1999; Carella *et al*., 2003; Loreti *et al*., 2005) و فرانسه مشاهده شد (Menard *et al*., 2004). در ایران بیماری بلایت باکتریایی گردو اولین بار در سال ۱۳۲۶ توسط اسفندیاری (بهداد، ۱۳۶۶) و ۱۹۷۷ میلادی توسط امانی گزارش شده است (Amani, 1977). بیماری شانکر پوستی گردو اولین بار در سال ۱۳۶۵ در نقاط محدودی از استان مازندران (زاغمرز و نکا) با عامل *Erwinia nigrifluens* شناسایی وگزارش گردید. در آن سال اطلاعی در مورد وجود این بیماری در سایر مناطق استان مازندران و مناطق همجوار وجود نداشت (Rahimian, 1989)، سپس این بیماری در شیراز و کهگیلویه و بویراحمد (YousefiKopaei *et al*., 2004)، کرمان (Baradaran and Ghasemi, 2004)، کردستان (Harighi, 2006)، گیلان و گلستان (Jamalzade *et al*., 2009) مشاهده شد.

علائم بیماری شامل نواحی نکروزه به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره در لایه‌های بیرونی پوست تنه و انشعابات اصلی درخت بوده که در مراحل اولیه به صورت نقاط تاول مانند کروی به قطر حدود یک میلی‌متر و بلندی تقریبی یک سانتی‌متر در ناحیه کورتکس و در زیر خارجی‌ترین لایه پوست تشکیل می‌شود. در فصل تابستان این جوش‌ها به یک روزنه یا شکاف پاره شده با شیرابه قهوه‌ای رنگ تبدیل می‌شود. با توسعه آلودگی و ازدیاد تعداد جوش‌ها سطح وسیعی از پوست تحت تاثیر قرار گرفته و ترشح شیرابه قهوه‌ای به صورت گسترده‌ای نمایان می‌شود. علائم بیماری روی سایر اندام‌ها (برگ، جوانه‌ها و میوه) گزارش نشده و حتی با تزریق نیز علائم روی برگ ایجاد نشده است (Wilson *et al*., 1957).

یوسفی کوپایی، تقوی و بنی‌هاشمی (۱۳۸۳) در تحقیق خود با عنوان «پراکنش و سبب‌شناسی بیماری شانکر پوستی گردو در استان‌های فارس، کهکیلویه و بویراحمد» با نمونه‌برداری از درختان آلوده، ۶۱ جدایه باکتری را از نظر خصوصیات فنوتیپی، حساسیت به آنتی بیوتیک‌ها، الکتروفورز پروتئین سلولی و سرولوژی مورد بررسی و مقایسه قرار دادند. در نهایت با انجام آزمون‌های فوق (از جمله آزمون‌های بیماری‌زایی)، عامل بیماری را *Brenneria nigrifluens* شناسایی نمودند. نامبردگان تنوع بسیار کم خصوصیات فنوتیپی بین جدایه‌ها و شباهت زیاد نقوش الکتروفورزی در باکتری‌ها را بیانگر تنوع‌پذیری محدود این گونه دانسته و ضمن بیان گستردگی وسیع بیماری شانکر پوستی گردو در دو استان مورد بررسی خود، اولین گزارش از وجود بیماری مذکور را در فارس و کهکیلویه و بویر احمد ارائه کردند. منارد و همکاران (Menard *et al*., 2004) از روی ارقام مختلف گردو از گونه *Juglans regia* L. در فرانسه، بیماری شانکر پوستی را با خسارت شدید مشاهده نمودند. نامبردگان با بررسی ۱۳ باغ بزرگ و نهالستان گردو در جنوب غربی، جنوب شرقی و غرب فرانسه، شانکرهای عمودی با ترشح شیرابه بر روی تنه و شاخه‌های درخت را مشاهده کردند. سپس با انتقال نمونه‌های بیماری به آزمایشگاه و براساس خصوصیات بیماری‌زایی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی استرین‌های باکتری، برای اولین بار از فرانسه باکتری *Brenneria (Erwinia) nigrifluens* را گزارش نمودند.

برای شناسایی و تعیین فیلوژنی باکتری‌ها در حال حاضر از روش تعیین توالی قسمت‌هایی از ژنوم باکتری‌ها استفاده می‌شود که از محافظت‌شدگی بالایی برخوردار باشد. این قطعات تحت نام ژن‌های خانه‌داری (House Keeping Genes) شناخته می‌شوند و ژن خانه‌دار آران‌ای پلیمراز RNA polymerase beta sub unit یکی از ژن‌های مناسب در خانواده انتروباکتریاسه (*Entrobacteriaceae*) می‌باشد (Waleron *et al*., 2002).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری:

در تابستان ۱۳۹۲ تعداد ۱۲۸نمونه تنه درختان گردو که ترشح شیره سیاه از شکاف‌های پوستی داشته و پوست داخلی آن‌ها قهوه‌ای رنگ شده‌بود از مناطق مختلف دماوند جمع‌آوری گردید. نمونه‌های جمع‌آوری شده در زیر شیر آب به منظور حذف گرد و غبار و عوامل ساپروفیت به طورکامل شستشو و دو بار نیز در آب مقطر سترون شستشو و سپس در تشتک پتری حاوی چند میلی‌لیتر آب مقطر سترون خرد گردیده و بعد از ده دقیقه، سوسپانسیون حاصل در محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار (Eosin methylene blue Agar) مخطط و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت چهار روز کلنی‌های ریز با طیف رنگی سبز متالیک انتخاب و به محیط آگار مغذی منتقل شدند (Harighi and Rahimian, 1997).

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها

استرین‌ها به مدت ۴۸ ساعت در محیط آگار غذایی حاوی عصاره مخمر (YNA) کشت شدند و سپس سوسپانسیونی به رقت تقریبی 10^7 سلول باکتری در میلی‌لیتر در آب مقطر تهیه و با استفاده از سرنگ‌های پنج میلی‌لیتری به زیر پوست ساقه نهال‌های دو ساله گردو تزریق گردید. بروز علائم بیماری همراه با ترشح شیرابه تا سه ماه مورد بررسی قرار گرفت (Schaad *et al*., 1973; Harighi and Rahimian, 1997).

آزمون‌های فنوتیپی

جدایه‌ها از نظر واکنش گرم با حلالیت در KOH سه درصد، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی (O/F)، فوق حساسیت در توتون، آزمون‌های کاتالاز، هیدرولیز نشاسته، اسکولین، فسفاتاز، تولید مواد احیا کننده از سوکروز، هیدرولیز ژلاتین، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی و رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، آزمون اکسیداز، آرجنین دهیدرولاز، دی‌اکسی ریبونوکلئاز، تولید اندول، متیل‌رد و استوئین، لستیناز و هیدرولیز کازئین و نیز برای بررسی تولید اسید از کربوهیدرات‌های مختلف و استفاده از اسیدهای آمینه و آلی از محیط پایه آیر با غلظت نهایی ۰/۲ درصد استفاده شد. حساسیت استرین‌های مورد بررسی نسبت به اریترومایسین با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیک در محیط کشت آگار غذایی به روش‌های ذکر شده توسط شاد و همکاران بررسی شد (Schaad *et al*., 2001)

شناسایی فیلوژنتیکی باکتری عامل بیماری

DNA ژنومیک جدایه‌ها، طبق پروتکل Rademaker و همکاران (Rademaker and De Bruijn, 1997) استخراج گردید. بدین منظور، بخشی از کلنی‌های باکتری توسط لوپ سترون به ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون منتقل گردید. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به ۱۰۰ میکرولیتر NaOH 0.05 مولار اضافه شد. تیوب‌های حاوی NaOH به همراه باکتری به مدت ده دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و پس از آن نمونه‌ها در ۱۳۰۰۰ دور به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. و در نهایت ۵۰- ۱۰۰ میکرولیتر از فاز رویی به تیوب‌های جدید منتقل و جهت انجام PCR استفاده شد (Rademaker *et al*., 1997). برای تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد نظر، قطعه ۶۳۷ جفت بازی ژن RNA Polymerase beta sub unit به عنوان یک ژن خانه داری با میزان حفاظت‌شدگی بالا در گونه‌ها با استفاده از آغازگر CM81/ CM32ropB (جدول ۱)تکثیر شد. مخلوط واکنش PCR شامل ۵ میکرولیتر PCR Buffer 10X، MgCl2 دو میلی‌مولار، dNTP ۱۰ میلی‌مولار به میزان ۰/۵ میکرولیتر، از هر یک از پرایمرهای ۱۰ پیکومول به میزان ۱ میکرولیتر، آنزیم taq دی‌ان‌ای پلیمراز ۱/۵ واحد و یک میکرولیتر از DNA ژنومی هر یک از جدایه‌ها اضافه و حجم کل با آب مقطر به ۵۰ میکرولیتر رسانده شد (Waleron *et al*., 2002).

محصول PCR با دستگاه الکتروفورز افقی مینی‌ژل مدل سیگما روی ژل آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز بررسی شد. بافر مورد استفـاده در ژل و در محفظـه الکتروفـورز، بافـر TAE بـود. ابتـدا ژل آگارز در بافـر TAE تهیـه و برای رنگ‌آمیزی DNA، به آن محلول اتیدیوم بروماید با غلظت ۱ mg/L اضافه گردید. ماده رنگی پیشرو ۶x (حاوی گلیسرول ۶۰ درصد، ۶۰EDTA میلی‌مولار، برموفنول بلو ۰/۰۹ درصد و زایلن سیانول ۰/۰۹FF درصد) به نسبت یک به شش با محصول PCR مخلوط و روی ژل آگارز با ولتاژ ثابت ۷۰ ولت به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید. برای ارزیابی اندازه قطعات محصول PCR، از مارکر استاندارد 100bp استفاده شد. پس از پایان الکتروفورز، ژل در دستگاه UVdoc مشاهده شد (Rademarker *et al*., 1997).

قطعات تکثیر شده توسط شرکت (Macrogen, Korea) با استفاده از دستگاه اتوماتیک ABI 3730 XL تعیین توالی گردید. توالی‌ها با برنامه BLAST (NCBI)، با توالی‌های دیگر موجود در بانک ژن به روش آلتشـول و همکاران (Altschul *et al*., 1990) مقایسه شدند. دندروگرام مربوطه با نتایج موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار Mega6 به‌روش Bootstrap-Neighbour Joining به روش تامورا و همکاران (Tamura *et al*., 2013) ترسیم گردید.

تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن rpoB برای تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه‌ها

تعیین توالی نوکلئوتیدی بر اساس ژن rpoB انجام گرفت که توالی پرایمر در جدول زیر آمده است:

جدول ۱- توالی آغازگر ژن خانه‌دار آران‌ای پلیمراز (CM81/ CM32)

Table 1. primer sequencing of housekeeping genes primer of RNA polymerase beta sub unit

نام آغازگر	توالی	اندازه قطعه
Primer	Sequence	Size
rpoB CM81F	(5`CAG TTC CGC GTT GGC CTG3`)	
rpoB CM32R	(5`CGGACCGGC CTG ACG TTG CAT3`)	637bp

نتایج

جداسازی عامل بیماری: در این تحقیق تعداد ۴۶جدایه از تنه‌های درختان گردو با علائم شانکر و ترشح شیرابه سیاه‌رنگ از ۱۲۸نمونه درخت نمونه‌برداری شده به‌دست آمد که مشخصات مکانی هریک از نمونه‌ها از شهرستان دماوند در جدول یک آمده است.

خصوصیات فنوتیپی استرین‌های باکتری جدا شده از گردو

از میان جدایه‌های متعددی که در محیط کشت EMB Agar متالیک بودند، بیماری‌زایی پنج استرین نماینده در آزمون بیماری‌زایی مورد بررسی قرار گرفت که قادر به ایجاد نکروز و ترشح شیرابه در ساقه نهال‌های گردو بوده و همگی بیماری‌زا تشخیص داده شدند. استرین‌ها در آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری بوده و در تولید اندول و واکنش فوق حساسیت در توتون و احیائ نیترات، اکسیداز، تجزیه پکتات و تولید رنگ صورتی در محیط YDC منفی بودند. همچنین در تولید استویین و فسفاتاز مثبت و قادر به مصرف قندهای اینوزیتول، سوربیتول، زایلوز، ریبوز، مانوز، را منوز، رافینوز، ملیبیوز، گلیسرول و مانیتول بودند. سایر خصوصیات در جدول (۲) آمده است. براساس نتایج فوق باکتری عامل بیماری *Brenneria nigrifluens* شناسایی شد.

فیلوژنی جدایه‌های مورد بررسی

با توجه به این‌که در آزمون‌های فنوتیپی جدایه‌های با نتیجه بیش از ۸۵٪ به عنوان مثبت یا منفی در نظر گرفته شدند، برای اثبات دقیق همسـانی جـدایـه‌های دمـاوند با داده‌های ژنتیـکی ذخـیره شده در پایـگاه NCBI (National Center for Biotechnology Information) قطعـه ژنی RNA Polymerase beta sub unit (*rpoB*)

تعدادی از نمونه‌های منتخب جدا شده از شانکر پوستی گردو، مورد مطالعه قرار گرفت. سه جدایه مورد بررسی در این تحقیق، یک قطعه با اندازه تقریبی ۶۳۷ جفت بازی را در ژل آگارز نشان دادند (جدایه‌های B1 و B12، B5) که تعیین توالی قطعه مورد نظر نشان داد، جدایه‌های مذکور به میزان، نزدیک به۱۰۰ درصد با توالی نمونه‌های *Brenneria nigrifluens* موجود در بایگانی NCBI بر اساس توالی ژن *rpoB* شباهت داشته و به این گونه تعلق دارند و از سایر گونه‌های این جنس متمایز و با فاصله زیاد ژنتیکی قرار گرفته‌اند. در این تحقیق هیچ‌یک از جدایه‌ها به عنوان شانکر عمقی با گونه *Brenneria rubrifaciens* شناسایی نشدند (شکل ۲).

جدول۱- مشخصات جدایه‌های مورد مطالعه براساس محل نمونه‌برداری از باغ‌های گردو و شماره هر یک در شهرستان دماوند

Table 1. Characteristics of studied isolates based on sampling of walnut gardens and number of each in Damavand city

شماره جدایه Isolate number	محل جمع‌آوری Collecting location	شماره جدایه Isolate number	محل جمع‌آوری Collecting location	شماره جدایه Isolate number	محل جمع‌آوری Collecting location
Bn33	سیاهرود– چنار غرب Siahrood- Chenar-e Gharb	Bn17	تاررود – خرمده Tarrood-khorramdarreh	Bn1	سیاهرود – وسکاره Siahrood-Vaskareh
Bn34	تاررود – چنار شرق Tarrood- Chenar-e Shargh	Bn18	تاررود – خرمده Tarrood-khorramdarreh	Bn2	سیاهرود – وسکاره Siahrood-Vaskareh
Bn35	تاررود– چنار شرق Tarrood- Chenar-e Shargh	Bn19	تاررود – خرمده Tarrood-khorramdarreh	Bn3	تاررود – اوره Tarrood-Ure
Bn36	تاررود – چنار شرق Tarrood- Chenar-e Shargh	Bn20	تاررود – خرمده Tarrood-khorramdarreh	Bn4	تاررود – اوره Tarrood-Ure
Bn37	تاررود – چنار شرق Tarrood- Chenar-e Shargh	Bn21	تاررود – خرمده Tarrood-khorramdarreh	Bn5	تاررود – اوره Tarrood-Ure
Bn38	تاررود – چنار شرق Tarrood- Chenar-e Shargh	Bn22	تاررود – خرمده Tarrood-khorramdarreh	Bn6	تاررود – دشت مزار Tarrood- Dasht-e Mazar
Bn39	ابرشیوه – جابان Abarshiveh-Jaban	Bn23	ابر شیوه – سربندان Abarshiveh-Sarbandan	Bn7	تاررود – دشت مزار Tarrood- Dasht-e Mazar
Bn40	ابرشیوه – جابان Abarshiveh-Jaban	Bn24	ابر شیوه – سربندان Abarshiveh-Sarbandan	Bn8	تاررود – دشت مزار Tarrood- Dasht-e Mazar
Bn41	ابرشیوه – جابان Abarshiveh-Jaban	Bn25	ابر شیوه – سربندان Abarshiveh-Sarbandan	Bn9	تاررود – دشت مزار Tarrood- Dasht-e Mazar
Bn42	جمع آبرود – وادان JamAbrood-Vadan	Bn26	ابر شیوه – آرو Abarshiveh-Aro	Bn10	تاررود – جیلارد Tarrood- Jilard
Bn43	جمع آبرود – وادان JamAbrood-Vadan	Bn27	ابر شیوه – آرو Abarshiveh-Aro	Bn11	تاررود – جیلارد Tarrood- Jilard
Bn44	جمع آبرود – وادان JamAbrood-Vadan	Bn28	ابر شیوه – آرو Abarshiveh-Aro	Bn12	تاررود – جیلارد Tarrood- Jilard
Bn45	جمع آبرود – وادان JamAbrood-Vadan	Bn29	ابرشیوه – آیینه ورزان Abarshiveh- Ayeneh Varzan	Bn13	تاررود – مرا Tarrood- Mera
Bn46	جمع آبرود – وادان JamAbrood-Vadan	Bn30	ابرشیوه – آیینه ورزان Abarshiveh- Ayeneh Varzan	Bn14	تاررود – مرا Tarrood- Mera
		Bn31	ابرشیوه – آیینه ورزان Abarshiveh- Ayeneh Varzan	Bn15	تاررود – مرا Tarrood- Mera
		Bn32	سیاهرود – چنار غرب Siahrood - Chenar-e Gharb	Bn16	تاررود – خرمده Tarrood- Khoramdareh

جدول ۲- خصوصیات فنوتیپی استرین‌های *E. nigrifluens* جدا شده از گردو

Table 2. Phenotypic characteristics of *E. nigrifluens* strains isolated from walnuts

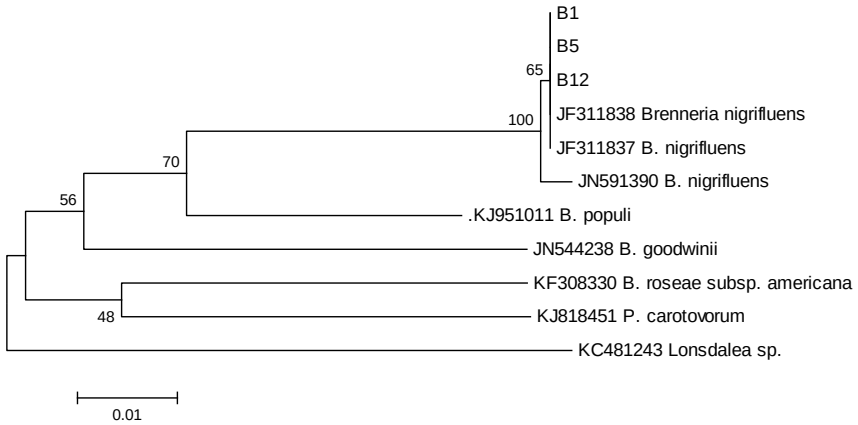
نتیجه Result	Test	آزمون	نتیجه Result	Test	آزمون
+	Consumption of format	مصرف فرمات	+*	Anaerobic growth	رشد بی هوازی
+	Consumption of tartarat	مصرف تارتارات	-**	Warm reaction	واکنش گرم
-	Oxidation of gluconate	اکسیداسیون گلوکونات	-	Oxidase	اکسیداز
	Acid production from	تولید اسید از:	+	Catalase	کاتالاز
+	Sorbitol	سوربیتول	-	Extra sensitivity in tobacco and geranium	فوق حساسیت در توتون و شمعدانی
+	Zaylose	زایلوز	-	Pink color production on YDC	تولید رنگ صورتی رویYDC
+	Zaylose	زایلوز	+	Growth in 36°C	رشد در C ۳۶
+	Ribose	ریبوز	-	in 5% Salt tolerance	تحمل نمک۵٪
+	Manose	مانوز	+	Acetoin	استوئین
+	Ramenoz	رامنوز	d	Phosphatase	فسفاتاز
+	Raffinose	رافینوز	+	H_2S production	تولید H_2S
+	Melibiose	ملیبیوز	-	Endol production	تولید اندول
+	Glycerol	گلیسرول	-	Nitrate recovery	احیا نیترات
+	Manitol	مانیتول	-	Production of sucrose reducing agents	تولید مواد احیا کننده از سوکروز
-	Cytrat	سیترات	+	Metallic paint on EMB	رنگ متالیک روی EMB
+	Inositol	اینوزیتول	-	Melt gelatin	ذوب ژلاتین
			-	Starch hydrolysis	هیدرولیز نشاسته

*بیش از ۸۵٪ جدایه‌ها مثبت بودند، به عنوان مثبت در نظر گرفته شدند.

**کم‌تر از ۱۵٪ جدایه‌ها مثبت بودند، به عنوان منفی در نظر گرفته شد.

*More than 85% of the isolates were positive, considered as positive.

**Less than 15% of the isolates were positive, considered as negative.



شکل ۲- دندروگرام فیلوژنتیکی جدایه‌های جدا شده از گردو (B1، B2، B5) در مقایسه با تعدادی از گونه‌های شناخته شده در خانواده انتروباکتریاسه بر اساس توالی ژن *RNA Polymerase beta subunit* با استفاده از نرم افزار مگا-۶ با ۱۰۰۰ بوتسترپ

Fig.2. Phylogenetic dendrogram of isolated isolates from walnut (B1, B2, B5) in comparison with a number of known species in Enterobacteriaceae family based on the *RNA Polymerase beta subunit* gene using MEGA-6 software with 1000 bootstrap

بحث

خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و مرفولوژیکی جدایه‌های بدست آمده از درختان گردو دارای علائم شانکر پوستی شامل واکنش گرم و اکسیداز، مثبت بودن کاتالاز و مثبت بودن واکنش اوره آز با خصوصیات گونه *Brenneria nigrifluen*s مطابقت داشتند (Schaad *et al*., 2001). همچنین خصوصیات جدایه‌ها از جمله تولید مواد احیا کننده از ساکارز (Fahy and Hyvard, 1983)، بی‌هوازی اختیاری بودن (Hugh and Leifson, 1953)، عدم هیدرولیز ژلاتین، نشاسته، رشد در دمای ۳۶ درجه‌سانتی گراد، عدم رشد در دمای ۳۹ درجه‌سانتی‌گراد با دیگر از ویژگی‌های گونه *Brenneria nigrifluen*s مطابقت داشتند (Schaad *et al*., 2001).

تاکنون بیماری شانکر پوستی درختان گردو در مناطق تنکابن، نوشهر، چالوس، سیاوش کلا، بابلسر، ساری، جویبار، زاغمرز، نوکنده، عباس آباد و نشاترود استان مازندران توسط حریقی و رحیمیان گزارش شده بود(Harighi and Rahimian, 1997). در تحقیقی دیگر این بیماری از مناطق قائم‌شهر، رامسر، بهشهر و بابل نیز مشاهده گردید به علاوه این بیماری در استان‌های گلستان و گیلان نیز محرز شده است (Jamalzade *et al*., 2009). همچنین نتایج تحقیق‌های انجام شده در استان‌های دیگر نشان داده‌است که این بیماری در استان‌های کرمان (Baradaran and Gasemi, 2004)، کردستان (Harighi, 2006) و فارس و کهگیلویه و بویر احمد (YousefiKopaei, 2007) نیز گسترش دارد. در هیچ کدام از تحقیقات انجام شده در کشور تا کنون گونه *Brenneria rubrifaciens* جداسازی و گزارش نشده است. لذا در این تحقیق بیماری شانکر پوستی گردو برای اولین بار از دماوند نیز گزارش می‌شود. نتایج نشان‌دهنده روند رو به رشد وقوع بیماری در مناطق مختلف تولید گردو در ایران می‌باشد، از این رو بررسی جامع به منظور تعیین مناطق انتشار بیماری در کشور، یافتن روش‌های محدود کردن گسترش آن و همچنین بررسی وجود منابع مقاومت در میان توده‌های بومی ضروری می‌باشد.

منابع References

بهداد، ا. ۱۳۶۶. آفات و بیماری‌های درختان و درختچه‌های جنگلی و گیاهان زینتی ایران. نشاط اصفهان. ۸۰۷ صفحه.

یوسفی کوپائی، ف.، تقوی، س.، و بنی‌هاشمی، ض. ۱۳۸۳. پراکنش و سبب‌شناسی بیماری شانکر پوستی گردو در استان‌های فارس و بویر احمد. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی. ۷ الی ۱۱ شهریور. دانشگاه تبریز. صفحه ۳۸۷.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology 215: 403-410.

Amani, B. 1977. Bacterial blight of walnut in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 13: 15-23.

Baradaran, G. H. and Ghasemi, A. 2004. Etiology of walnut canker disease in Kerman province. Proc. 16th Plant Protection Congress. Iran. University of Tabriz. P. 358.

Brady, C. L., Cleenwerck, I., Venter, S. N., Vancacceyt, M., Swings, J. and Coutinho, T. A. 2008. Phylogeny and identification of pantoea species associated with plants, humans and the natural environment based on multilocus sequence analysis (MLSA). Systematic and Applied Microbiology 31: 447-460.

Carella, D., Spigno P. and Devita N. 2003. Occurrence of trunk canker of walnut in Campania region (Italy). Informatore Fitopatologico 53: 32-33.

Dye, D. W. 1968.A taxonomic study of the genus *Erwinia* L. The "Amylovora" group. New Zealand Journal of Science 11: 590-607.

Fahy, P. C. and Hayward, A. C. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. Pp. 337-374. In: Fahy, P.C. and Persley G. H. J. (eds.) Plant Bacterial Disease Guide, Academic Press. New York, USA.

Harighi, B. 2006. Bacterial canker of walnut trees in Kourdestan province. Proceeding of the 17th National Plant Protection Congress.

Harighi, B. and Rahimian, H. 1997. Widespread occurrence of the bark canker of walnut trees in Mazandaran Province. Iranian Journal of Plant Pathology 33 (3-4): 48-50.

Hauben, L., Moore, R. B. E., Vauterin, L., Steenackers, M., Mergaert, J., Verdonck, L. and Swings, J. 1998. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. System Applied Microbiology 21: 384-397.

Hugh, R. and Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. Journal of Bacteriology 66: 24-26.

Jamalzade, A., Shams-Bakhsh, M. and Rahimian, H. 2009. Occurrence and distribution of shallow bark canker of walnut trees in Northern provinces of Iran. Iranian Journal of Plant Production. 16(2): 195-204.

Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London). 178: 703.

Lopez, M. M., Marti, R., Morente, C., Orellana, N., Ninot, T. and Aleta, N. 1994. Phytopathogenic bacteria identified in walnut in Spain. Investigacion Agraria. Production y ProteccionVegetales 2: 307–314.

Loreti, S., Galleli, A., Piccirillo, P. and Belisario, A. 2005. Bacterial bark canker on English walnut. Acta Horticulture 705: 433-435.

Menard, M., Delort, F., Baudery, A. and Saux, M. L. E. 2004. First report of bacterial canker of walnut caused by *Brenneria nigrifluens*in France. Plant Disease 88: 220.

Moore, L. W., Kado, C. I. and Bouzar, H. 1988. Gram negative bacteria. Pp. 16-36. In: Schaad, N. W. (ed.) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.APS Press, St. Paul, Minnesota, USA.

Morone, C., Janse, J. D. and Scortichini, M. 1998. Bark canker of Persian walnut (*Juglans regia*) tree incited by *Erwinia nigrifluens* in Italy. Journal of phytopathology 146: 637-639.

Rademaker, J. L. W. and De Bruijn, F. J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis Chapter 10. Pp. 151 171. In: Caetano-Anollés, G. and Gresshoff P. M. (ed.) DNA markers: Protocols, Applications and Overviews. J. Wiley & Sons, Inc., USA**.**

Rahimian, H. 1989. Bacterial canker of walnut trees in Sari. Proceeding 9th Plant Protection Congress Iran. University of Ferdowsi, Mashhad, P. 150.

Saccardi, A., Bonnetti, V., Melegatti, A. and Cristini, M. 1998. Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on English walnut (*Juglans regia*) in the Veneto region (Northern Italy). Journal of Plant Pathology 80: 63-65.

Schaad, N. W., Heskett, M. G., Gardner, J. M. and Kam, C. I. 1973. Influence of inoculum dosage, time after wounding, and season of infection of Persian walnut trees by *Erwinia rubrifaciens*. Phytopathology 63: 327-329.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Patogenic Bacteria. APS Press. St. Paul, MN, USA. 373pp.

Scortichini, M. 1999. Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on walnut for timber production in Latium region. Informatore Fitopatologico 49: 52-54.

Suslow, T. V., Schroth, M. N. and Isaka, M. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72: 917-918.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6. 0. Molecular Biology and Evolution 30: 2725-2729.

Thornely, M. J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. Journal of Applied Bacteriology 23: 37-52.

Waleron, M., Waleron, K., Podhajska, A. J. and Lojkowska, E. 2002. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a recA gene fragment. Microbiology 148: 583–595.

Wilson, E. E., Starr, M. P. and Berger, J. A. 1957. Bark canker, a bacterial disease of Persian walnut tree. Phytopathology 47: 669-673.

YousefiKopaei, F., Taghavi, M. and Banihashemi, Z. 2004. Distribution and etiology of shallow bark canker of walnut in Fars and Kohgiluyehand- Boyerahmad provinces. Book of abstracts. 16th Plant Protection Congress, Tabriz, Iran, 387.

YousefiKopaei, F., Taghavi, M. and Banihashemi, Z. 2007. Occurrence of shallow bark canker of walnut (*Juglansregia*) in southern provinces of Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences 10: 1507-1512.