



جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری شانکر پوستی گردو و بررسی بیماری‌زایی باکتری روی نهال و میوه نارس گردو در استان لرستان

وحید امیرسرداری^۱، مصطفی درویش‌نیا^{۲*}، حسین میرزایی^۳

^۱ کارشناس ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، آستادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، ^۲ دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

چکیده

سابقه و هدف: بیماری شانکر پوستی گردو توسط باکتری *برنریا نیگری فلوننس* ایجاد می‌گردد. این بیماری در سال‌های اخیر افزایش داشته است و در شرایط مناسب تهدید جدی برای درختان گردو محسوب می‌شود. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری شانکر پوستی گردو در استان لرستان و بررسی بیماری‌زایی باکتری روی میوه نارس گردو انجام شد. **مواد و روش‌ها:** این پژوهش به صورت مقطعی-توصیفی بر روی تنه و شاخه‌های ۱۰۵ درخت گردو دارای علائم شانکر پوستی در استان لرستان انجام شد. پس از خالص‌سازی و جداسازی، خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. سپس نتایج این خصوصیات توسط نرم‌افزار *Ntsys-pc version 2.02* آنالیز شد. به منظور شناسایی دقیق‌تر سویه باکتریایی، از روش واکنش زنجیره ای پلی‌مرز استفاده گردید. همچنین ۵ جدایه باکتری به عنوان نماینده انتخاب و بیماری‌زایی آن‌ها بر روی میوه نارس و نهال گردو بررسی شد.

یافته‌ها: بر اساس خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها به عنوان *برنریا نیگری فلوننس* تشخیص داده شدند. همچنین آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی در سطح تشابه ۹۴ درصد، جدایه‌ها را به چهار گروه تقسیم نمود. در واکنش PCR، قطعه ۲۵۵ جفت بازی در تمامی جدایه‌ها تکثیر گردید. در آزمون بیماری‌زایی، علائم به صورت نقاط سیاه رنگ همراه با ترشح شیرابه روی میوه ظاهر شدند. **نتیجه‌گیری:** آزمون‌های فنوتیپی افتراقی، آزمون بیماری‌زایی بر روی میوه نارس گردو و استفاده از آغازگرهای اختصاصی، سریع‌ترین و مطمئن‌ترین روش برای تشخیص عامل بیماری است. مطالعه حاضر اولین گزارش وقوع این بیماری در استان لرستان و از اثبات بیماری‌زایی باکتری *برنریا نیگری فلوننس* روی میوه گردو در ایران می‌باشد. **واژگان کلیدی:** شانکر باکتریایی، گردو، *برنریا نیگری فلوننس*.

پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۳

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۳

مقدمه

این محصول، می‌توان به بیماری شانکر پوستی باکتریایی با عامل *برنریا نیگری فلوننس* (*Brenneria nigrifluens*) اشاره نمود. در مناطق مرطوب و پرباران به شدت شیوع دارد و خسارت هنگفتی به باغات گردو وارد می‌سازد. همچنین این بیماری در باغ‌های تولید الوار و میوه با تضعیف درختان گردو سبب ایجاد خسارت می‌شود (۲). علائم شانکر پوستی گردو ابتدا به صورت لکه‌هایی بدون شکل هندسی، به رنگ قهوه‌ای

درخت گردو در ایران و دیگر کشورهای اروپایی، آسیایی، آمریکای شمالی و جنوبی کشت می‌شود. گردو از محصولات مهم خشکباری دنیا به شمار می‌آید و در بعضی کشورهای صنعتی به عنوان یک درخت روغنی بسیار مهم محسوب می‌گردد (۱). از مهم‌ترین عوامل کاهش تولید، کمیت و کیفیت

(* آدرس برای مکاتبه: لرستان، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی. تلفن: ۰۹۱۶۶۱۱۶۳۰ پست الکترونیک: mdarvishnia44@yahoo.com

هم‌چنین در سال‌های اخیر این بیماری در استان‌های کردستان، فارس، کهگیلویه و بویراحمد و گیلان و گلستان (۱۱) گزارش شده است. شناسایی برنریا نیگری فلوئنس بر اساس جداسازی مستقیم از بافت آلوده، آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و آزمون بیماری‌زایی استوار می‌باشد. به دلیل اهمیت ردیابی سریع بیمارگر برای رعایت بهداشت زراعی و پایش شیوع بیماری، استفاده از روش‌های سریع و مطمئن به منظور افزایش صحت و دقت تشخیص بیمارگر حائز اهمیت است (۱۲). ژن *hrcC* مسئول انتقال پروتئین‌های تاثیر گذار به درون سلول میزبان گیاهی است و برای رشد باکتری یاد شده به درون گیاه و ایجاد علائم بیماری ضروری است. ژن‌های دستگاه ترش‌حی نوع سوم و پروتئین‌های موثر مربوط به آن مجموعه ژنتیکی *hrp* را تشکیل می‌دهند. با انتقال پروتئین‌های اثر گذار باکتریایی به درون سلول میزبان، انتقال سیگنال درون سلول و سایر فرآیندهای سلولی دچار اختلال می‌گردد. از این رو باعث افزایش پر آزاری باکتری روی میزبان حساس می‌شود. جدایه‌های فاقد این ژن ممکن است متعلق به گونه‌های دیگر جنس برنریا باشند که در ارتباط نزدیکی با گیاهان زندگی می‌کنند. اما علائم بیماری آشکاری بر روی میزبان ایجاد نمی‌کنند (۱۳).

هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری شانکر پوستی گردو بر اساس حضور ژن *hrcC* در استان لرستان و بررسی بیماری‌زایی باکتری روی میوه نارس گردو بود.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری: در این مطالعه ۱۰۵ نمونه گیاهی مشکوک و دارای علائم زخم از تنه و شاخه‌های درختان گردو از مناطق عمده گردوکاری استان لرستان در فصول بهار و تابستان سال ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها به صورت جداگانه درون کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل و با استفاده از الکل اتیلیک ۷۰ درصد، ضد عفونی و توسط آب مقطر سترون شسته شدند.

متماایل به تیره در قسمت‌های خارجی پوست تنه و شاخه‌های اصلی بروز می‌کند و پس از مدتی این علائم در سطح اپیدرم پدیدار می‌شوند.

با تراشیدن اپیدرم تنه‌ها و شاخه‌های عفونی، قهوه‌ای شدن بافت‌های خارجی پوست کاملاً آشکار می‌گردد. در تابستان با پیشروی بیماری، پوست از محل لکه‌ها شکاف برداشته و از آنجا شیرابه‌ای قهوه‌ای تا سیاه‌رنگ خارج می‌گردد و سرانجام حالت شانکر پیدا می‌کند (۳). عامل بیماری برای اولین بار توسط ویلسون (Wilson) و همکاران گونه‌ای از جنس *اروینیا (Erwinia)* به نام *اروینیا نیگری فلوئنس (Erwinia nigri-fluens)* شناسایی و نام‌گذاری گردید (۴). سپس عامل شانکر پوستی توسط هابن (Hauben) و همکاران به جنس برنریا نیگری فلوئنس تغییر نام یافت (۵).

مورون (Morone) و همکاران در سال ۱۹۹۸ اولین گزارش از وجود و پراکندگی بیماری شانکر پوستی گردو را با عامل *اروینیا نیگری فلوئنس* در ایتالیا ارائه نمودند (۶). در کشور مجارستان تراوش‌هایی به صورت پراکنده بر روی تنه و شاخه‌های درختان آلوده در شهر زالن، در نزدیکی دریاچه بالتون و در دیگر نقاط مجارستان مانند بوداپست، گیور و تاتابانیا مشاهده شد. بر اساس خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی سویه‌ها، برای اولین بار از کشور مجارستان باکتری برنریا (اروینیا) نیگری فلوئنس را گزارش نمودند (۷). نخستین بار وجود شانکر پوستی تنه گردو در ایران در شهرهای ساری و نکا گزارش گردید (۸). حریقی (Harighi) و رحیمیان (Rahimian) وجود گسترده و فراوان باکتری عامل شانکر پوستی گردو (برنریا نیگری فلوئنس) در استان مازندران ارائه دادند (۹). در تحقیقی که بر روی اتیولوژی شانکر گردو انجام شد، محققین علاوه بر توصیف علائم بیماری و جداسازی باکتری عامل از تنه و شاخه‌های درختان گردو، با انجام آزمون‌های بیماری‌زایی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، عامل بیماری شانکر تنه درختان گردو را برنریا نیگری فلوئنس شناسایی کردند و به عنوان اولین مورد از باکتری یاد شده در استان کرمان گزارش نمودند (۱۰).

(شرکت پیشگام ایران) استفاده شد (۱۵). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس رد (شرکت پیشگام ایران)، ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل، ۳ میکرولیتر DNA ژنومی، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر (غلظت ۱۰ پیکومول) انجام شد. از آب مقطر استریل به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

در ادامه واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (بایورد، آمریکا) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۶ درجه سلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۴ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. برای انجام الکتروفورس، ژل آگارز ۱/۵ درصد واجد اتیدیوم بروماید تهیه گردید. در نهایت قطعه DNA به کمک دستگاه UV ترانس لومیناتور (یو وی داک، انگلستان) عکسبرداری شد. تکثیر قطعه ۲۵۵ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن واکنش می باشد.

د) *آزمون بیماری‌زایی*: در این مطالعه اثبات بیماری‌زایی باکتری برنریا نیگری فلوننس برای اولین بار در ایران بر روی میوه نارس گردو انجام گرفت. برای این منظور میوه‌های نارس گردو قبل از سخت شدن پوسته گردو از درختان ۲۰ تا ۳۰ ساله در اواخر بهار و تابستان سال ۹۳ جمع‌آوری گردید. پنج جدایه از باکتری شناسایی شده با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی به عنوان *برنریا نیگری فلوننس*، برای انجام آزمون بیماری‌زایی روی میوه نارس گردو انتخاب شدند. از کشت ۴۸ ساعته جدایه باکتری سوسپانسیون با غلظت‌های 10^8 cfu/ml (چگالی نوری ۱/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر-اسپکتروفتومتر مدل Unico, Usa) تا 10^2 cfu/ml (چگالی نوری ۰/۳ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) در آب مقطر استریل تهیه و با استفاده از سوزن استریل سطح میوه خراش داده شد (سه سوراخ در میوه). درون هر سوراخ مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تزریق گردید. برای هر غلظت از

سپس از بافت آلوده سوسپانسیون تهیه و روی محیط کشت های YDC (Yeast و EMB (Eosin Methylen Blue) Extract Dextrose Calcium-Carbonat (مرک، آلمان) کشت و درون گرمخانه با دمای ۲۸ درجه سلیسیوس قرار داده شد. پس از سه روز پرگنه های سبز متالیک بر روی محیط کشت EMB و پرگنه‌ای سفید و کروی بر روی محیط کشت YDC برای بررسی های بیشتر انتخاب و خالص سازی گردیدند.

به منظور نگهداری جدایه‌ها، سوسپانسیون از آنها در آب مقطر سترون تهیه و در دمای ۴ درجه سلیسیوس قرار داده شدند. برای نگهداری طولانی مدت باکتری‌ها از کشت جوان هر جدایه خالص‌شده، سوسپانسیون غلیظی در گلیسرول ۱۵٪ تهیه و در دمای ۷۰- درجه سلیسیوس نگهداری گردید.

ب) *بررسی ویژگی های فنوتیپی و بیوشیمیایی*: تعداد ۲۱ جدایه جمع‌آوری شده از درختان گردو مناطق مختلف استان لرستان که دارای پرگنه‌های سبز متالیک روی محیط کشت EMB و پرگنه‌ای سفید و کروی روی محیط کشت YDC که قادر به ایجاد واکنش حساسیت زیاد روی شمعدانی بودند، به عنوان نماینده انتخاب و آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای بر اساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی گیاهی روی آنها انجام شد (۱۴).

ج) *شناسایی مولکولی باکتری برنریا نیگری فلوننس*: به منظور استخراج DNA یک لوپ از پرگنه های باکتری رشد یافته بر روی محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) برداشته شد و در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل گردید. نمونه ها در یک ظرف حاوی آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و بلافاصله به مدت چند دقیقه بر روی یخ قرار داده شدند. در ادامه نمونه ها در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رومانند برای انجام آزمون PCR استفاده گردید. به‌منظور تکثیر ژن *hrcC* که در سیستم ترشحی نوع سوم باکتری یاد شده دخالت دارد از پرایمرهای اختصاصی این ژن با توالی (5'CCTGCGCCATGTTGCCAGATCGCTAT-3') F1 و (3'-ACCTGAGTAGCAGTTTTCGACTATTT-5') C3

بیوشیمیایی جدایه‌ها رسم گردید. برای بررسی واقعی میان گروه‌ها از روش داده‌های غیر وزنی (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic average) و ضریب تشابه تطابق ساده (Simple matching) استفاده گردید (۱۸). ویژگی‌های فنوتیپی به صورت کدهای یک (برای ویژگی‌های مثبت) و صفر (برای ویژگی‌های منفی) برای این نرم‌افزار تعریف گردید. بر پایه ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی تعریف شده، دندروگرام مربوط به ۲۱ جدایه مورد بررسی توسط نرم‌افزار رسم گردید. درصد تشابه بین جدایه‌های موجود در گروه‌ها بر اساس تمامی ویژگی‌های موجود در این پژوهش محاسبه گردید.

یافته‌ها

در این پژوهش در مجموع ۲۱ جدایه از اندام‌های مختلف درخت گردو از مناطق مختلف استان لرستان بر اساس مجموعه ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی به عنوان باکتری برنریا نیگری فلوننس تشخیص داده شدند (جدول ۱). در آزمون PCR با کمک جفت آغازگر اختصاصی F1 و C3 قطعه قابل انتظار ۲۵۵ جفت بازی تکثیر گردید (شکل ۱).

تمامی جدایه‌ها میله‌ای شکل، گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، قادر به رشد در شرایط بی‌هوازی، دارای پرگنه‌های سفید و کروی و فاقد پرگنه و رنگدانه‌های قرمز روی محیط کشت YDC بودند. تمامی جدایه‌ها قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت بر روی گیاه شمعدانی و تولید گاز H₂S از پپتون بودند. هیچکدام از جدایه‌ها توانایی تولید اندوسپور و هیدرولیز ژلاتین را نداشتند. نتایج آزمون‌ها به صورت خلاصه در جدول ۲ آورده شده است.

میزان شباهت ۲۱ جدایه باکتری از میزبان‌های مناطق مختلف بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تعیین و جدایه‌ها به چهار گروه عمده تقسیم بندی شدند. گروه اول شامل جدایه‌های مربوط به شهر خرم‌آباد، بروجرد و یک جدایه مربوط به شهرستان الشتر بود که در زیر گروه‌های متفاوت قرار گرفتند. گروه دوم به استثنای جدایه 24C1 شهر بروجرد، شامل

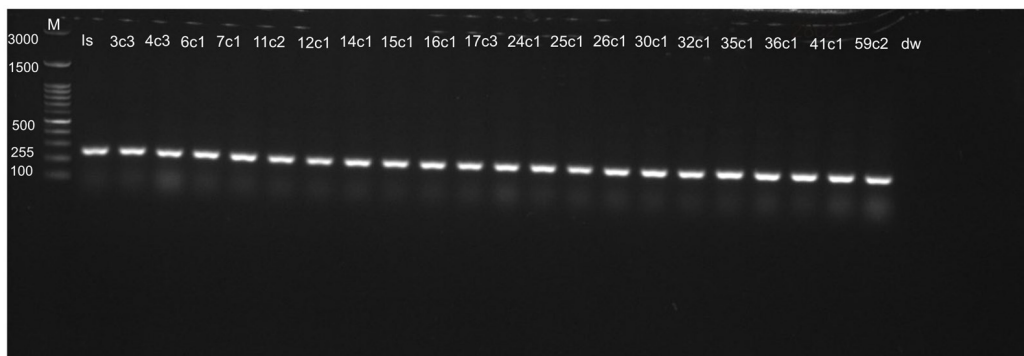
سوسپانسیون باکتری، یک شاهد تلقیح شده با آب مقطر استریل در نظر گرفته شد. سپس میوه‌ها درون ژرمیناتور با دمای ۲۰ درجه سلیسیوس، رطوبت نسبی ۹۰ درصد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی به مدت ۸ روز نگهداری شدند (۱۶).

آزمون بیماری‌زایی روی نهال‌های دو ساله گردو انجام گرفت. برای این منظور سوسپانسیونی با غلظت ۱۰^۸ cfu/ml (چگالی نوری ۱/۵ در طول موج ۶۰۰ نانومتر) از کشت ۴۸ ساعته باکتری‌ها روی محیط آگار غذایی در آب مقطر استریل تهیه شد. با استفاده از سرنگ سترون ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در سرشاخه‌های جوان تزریق گردید. علاوه بر آن مقداری از پرگنه باکتری نیز به وسیله خلال‌دندان برداشته و در بافت همان سرشاخه به صورت مستقیم مایه‌زنی گردید و محل زخم‌های حاصل از خلال‌دندان به وسیله نوار پارافیلیم پوشانده شد (۱۷). پنج جدایه باکتری برای مایه‌زنی به کار رفت و هر جدایه به دو نهال مایه‌زنی گردید. در نهال‌های شاهد از آب مقطر استریل به عنوان مایه استفاده شد. نهال‌های مایه زنی شده به صورت روزانه تا حدود دو ماه مورد بازرسی قرار گرفتند.

ه) آنالیز داده‌ها: با استفاده از نرم‌افزار Ntsys-pc version 2.02e (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) فاصله یا شباهت فنوتیپی و

جدول ۱: جدایه‌های باکتری برنریا نیگری فلوننس عامل شانکر پوستی گردو در استان لرستان.

کد جدایه	محل جمع‌آوری	کد جدایه	محل بافت گیاهی
3C3	خرم‌آباد	25C1	تنه بروجرد
4C3	خرم‌آباد	26C1	تنه بروجرد
6C1	خرم‌آباد	28C2	تنه بروجرد
7C1	خرم‌آباد	30C1	شاخه خرم‌آباد
11C2	الشتر	32C1	شاخه خرم‌آباد
12C1	الشتر	35C1	شاخه خرم‌آباد
14C1	الشتر	36C1	شاخه خرم‌آباد
15C1	الشتر	41C1	تنه دورود
16C1	الشتر	52C2	تنه دورود
17C3	الشتر	59C2	شاخه دورود
24C1	بروجرد		تنه



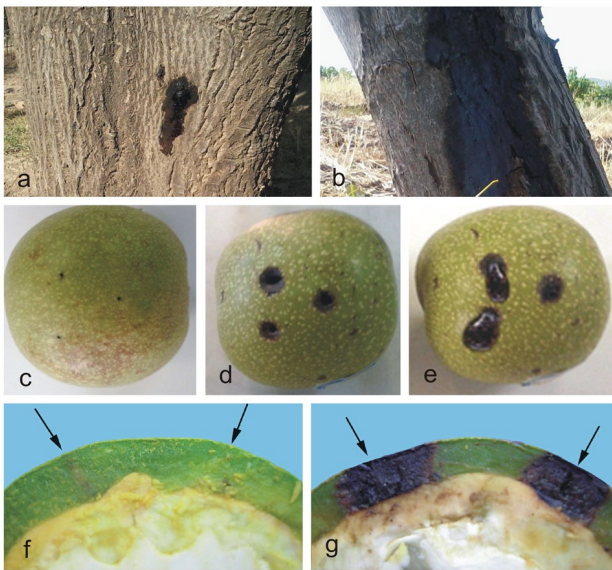
شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل از تکثیر ژن *hrcC* (M مارکر ۱۰۰ جفت بازی، بقیه ستون‌ها نمونه‌های مثبت از نظر حضور ژن *hrcC* (تکثیر قطعه ۲۵۵ جفت بازی)).

جدایه‌هایی مربوط به منطقه کهمان شهرستان الشتر بودند که در ۹۰ درصد گروهی مجزا نسبت به بین خود نیز تفاوت‌هایی داشتند. گروه سوم به استثنای جدایه 7C1 خرم‌آباد، شامل جدایه‌های مربوط به منطقه هونام شهرستان الشتر بودند. گروه چهارم شامل جدایه‌های شهرستان دورود

جدول ۲: ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای سویه‌های برنریا نیگری فلوننس جدا شده از درختان گردو.

واکنش	آزمون	واکنش	آزمون
-	تولید گاز از گلوکز	-	گرم
-	تولید انداسپور	-	اکسیداز
-	تولید اسید از:	+	کاتالاز
+	رایبوز، زایلوز، سوکروز	++	لوان
-*	لاکتوز و آدونیتول	+	فوق حساسیت روی شمعدانی
++	آرابینوز و رامنوز	-	هیدرولیز ژلاتین
++	رافینوز و سلوبیوز	++	هیدرولیز اسکولین
-	استفاده از:	+	حرکت swarming باکتری
-	فورمات	-	تولید اندول
-	بنزوات	-	هیدرولیز توئین ۲۰
-	پروپانول	-	هیدرولیز نشاسته
+	سوکسینات و لاکتات	++	واکنش متیل رد
-**	اتانول	+	تولید گاز H ₂ S از پپتون
-	اگزالات	+	رشد در ۳۶ درجه سلیسیوس
-**	دی-تارتارات	-	رشد در ۳۹ درجه سلیسیوس
-	ال-لوسین	+	تحمل نمک ۵ درصد
+	مانیتول	++	اوره آز
-	دولستول	-	تولید رنگدانه روی محیط کشت YDC
++	گلیسرول	+	تولید رنگدانه سبز متالیک روی EMB
-	سیترات	-	لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی
-	ال-سرین	-	مواد احیاکننده از سوکروز
-	دی-ال آلانین و دی ال تارتارات	+	O/F
-	مالونات	-	احیای نیترات

+ نشان‌دهنده مثبت بودن واکنش، - نشان‌دهنده منفی بودن واکنش، **: بیش از ۷۰ درصد، *: بیش از ۵۰ درصد



شکل ۳: علائم باکتری برنریا نیگری فلوننس. (a و b) علائم روی تنه، (c) میوه نارس گردو تلقیح شده با آب مقطر استریل (شاهد)، (d) میوه نارس گردو تلقیح شده با سوسپانسیون باکتری چهار روز پس از آلودگی در غلظت 10^8 cfu/ml، (e) میوه نارس گردو تلقیح شده با سوسپانسیون باکتری هشت روز پس از آلودگی در غلظت 10^8 cfu/ml، (f) میزان آلودگی میان‌بر میوه نارس گردو در تلقیح با سوسپانسیون باکتری در غلظت 10^2 cfu/ml، (g) میزان آلودگی میان‌بر میوه نارس گردو در تلقیح با سوسپانسیون باکتری در غلظت 10^8 cfu/ml.

برنریا نیگری فلوننس بررسی شد. به منظور شناسایی باکتری یاد شده از جفت آغازگرهای اختصاصی (F1 و C1) استفاده شد. تعداد ۲۱ جدایه که بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی برنریا نیگری فلوننس تشخیص داده شدند، در واکنش زنجیره پلی مرز قطع ۲۵۵ جفت بازی را تکثیر نمودند. این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه لورتی (Loreti) و همکاران در سال ۲۰۰۸ مطابقت دارد (۱۵).

در آزمون اثبات بیماری‌زایی از طریق مایه‌زنی روی نهال و میوه نارس گردو، تمامی میوه‌های مایه‌زنی شده علائم بروز شیرابه از پوست گردو و زخم روی نهال را نشان دادند. با توجه به نتایج حاصل از این آزمون تمامی جدایه‌های مایه‌زنی شده از لحاظ بیماری‌زایی کاملاً مشابه بودند و هیچ گونه تنوعی از لحاظ بیماری‌زایی نشان ندادند.

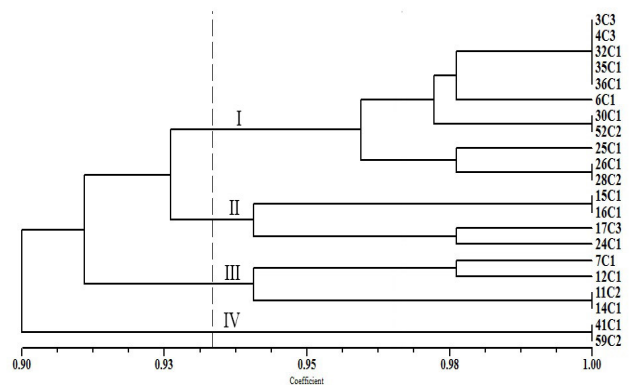
چاد (Schadd) و همکاران در سال ۲۰۰۱ ویژگی‌های

در این پژوهش باکتری برنریا نیگری فلوننس علاوه بر ایجاد زخم بر روی تنه، روی میوه‌های نارس گردو نیز علائم به صورت مناطق سیاه‌رنگ و نکروزه ایجاد نمود. گاهی در بعضی از نمونه‌ها از مناطق نکروز شده شیرابه قهوه‌ای‌رنگی مایل به سیاه مشاهده گردید (شکل ۳). در آزمون بیماری‌زایی روی نهال گردو هشت هفته پس از تزریق سوسپانسیون جدایه‌ها به سرشاخه‌های جوان لکه‌های آب سوخته و زخم‌هایی در سرشاخه‌های مایه‌زنی دیده شد. همچنین هیچ علامتی در سرشاخه‌های مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل دیده نشد.

بحث

در بازدیدهای به‌عمل آمده از باغات گردو مناطق مختلف استان لرستان در بهار و تابستان سال ۱۳۹۳ علائم شانکر پوستی از مناطق گردوکاری استان لرستان مشاهده گردید. این علائم به‌صورت ترشح شیرابه روی تنه و شاخه‌های درختان گردو ظاهر شد. در این تحقیق ویژگی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های برنریا نیگری فلوننس جدا شده از درختان گردو بررسی شد. از بافت‌های آلوده جدایه‌ای از باکتری‌های گرم منفی، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت جداسازی گردید که بر اساس نتایج حاصل از انجام آزمون‌های استاندارد باکتری‌شناسی به عنوان برنریا نیگری فلوننس تشخیص داده شد.

در این پژوهش وجود قطعه اختصاصیون *hrcC* در باکتری



شکل ۲: گروه‌بندی جدایه‌های برنریا نیگری فلوننس عامل شانکر یاکتریایی پوستی گردو بر اساس مثبت یا منفی بودن واکنش بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بر اساس الگوریتم UPGMA.

بودند. در حالی که بقیه جدایه‌ها فاقد این توانایی بودند. متغیر بودن تولید اوره‌آز در بین جدایه‌ها با نتایج مورتی (Moretti) و همکاران در سال ۲۰۰۷ مشابهت دارد (۲۲). ۱۹ درصد از جدایه‌ها در ویژگی‌هایی مانند تولید لوان، واکنش متیل رد و استفاده از اتانول و تقریباً ۱۰ درصد از جدایه‌ها در هیدرولیز اسکولین، تولید اسید از آرابینوز و رامنوز و استفاده از دی تارتارات و گلیسرول متفاوت بودند.

در بازدید به عمل آمده از باغات گردو استان لرستان، علایم شانکر پوستی به صورت تیره شدن سطح خارجی پوست و در تابستان به صورت خروج شیرابه از تنه درختان گردو مشاهده گردید که با یافته‌های روشنگر (Roshangar) و حریق (Harighi) در سال ۲۰۰۹ در مورد شناسایی علایم بیماری مطابقت دارد (۲۳).

با توجه به آنالیز عددی ویژگی‌های فنوتیپی، پراکنندگی جدایه‌ها بر اساس تنوع در تعدادی از ویژگی‌های فنوتیپی بود. در بررسی‌های فنوتیپی حداقل میزان شباهت بین افراد یک گونه ۸۰ درصد در نظر گرفته می‌شود (۲۴). بنابراین نتیجه به دست آمده در این پژوهش نشان می‌دهد که سویه‌های مورد مطالعه در یک گونه قرار دارند که اکثر جدایه‌های به دست آمده از یک منطقه، در یک گروه و یا گروه‌های نزدیک به هم قرار دارند.

در مطالعه حاضر آزمون اثبات بیماری‌زایی بر روی میوه و نهال گردو انجام گرفت. با مقایسه نتایج هر دو آزمون بیماری‌زایی مشخص می‌شود که استفاده از روش بیماری‌زایی بر روی میوه گردو نسبت به روش بیماری‌زایی روی نهال دارای مزایایی مانند کوتاه شدن زمان بروز علایم بیماری و نیز وسعت کمتر محدوده آزمایش می‌باشد. مورتی (Moretti) در سال ۲۰۱۰، در مورد آزمون بیماری‌زایی روی میوه گردو تاکید بر اختصاصیت و تکرار پذیری بالای این روش داشت و با مایه زنی باکتری *برنریا نیگری فلوننس* و چندین باکتری دیگر ثابت کرد که علایم بروز شیرابه روی میوه گردو به طور اختصاصی توسط این باکتری به وجود می‌آید (۲۵).

از آنجایی که درختان بیمار را نمی‌توان معالجه نمود، قطع شاخه‌ها، پاجوش‌ها و قسمت‌های خشکیده درختان بیمار کمی

بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه‌های *برنریا نیگری فلوننس* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج برخی ویژگی‌ها شامل واکنش منفی گرم و اکسیداز، مثبت بودن کاتالاز و بی‌هوازی اختیاری (OF مثبت)، توانایی در تولید گاز سولفید هیدروژن از پپتون و عدم توانایی در تولید اندوسپور و تولید گاز سولفید هیدروژن از گلوکز و مثبت بودن آزمون تحرک بود. همچنین نشان دادند که باکتری یاد شده، توانایی لازم برای هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز توئین ۲۰ و تولید اندول را ندارد. اما قادر به رشد در دمای ۳۶ درجه سیلیسیوس و رشد در نمک طعام ۵ درصد است (۱۹). این یافته‌ها با نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر کاملاً مطابقت دارد.

ویلسون (Wilson) و همکاران در سال ۱۹۶۷ شانکرهایی معمولاً عمیق‌تر و شدیدتر از شانکرهای ایجاد شده توسط *برنریا نیگری فلوننس* بر روی تنه درختان گردو را گزارش کردند و آن را تحت نام شانکر عمیق پوستی گردو و عامل آن را *برنریا رابری فاسینس (Brenneria rubrifaciens)* توصیف کردند. جدایه‌های این باکتری بر روی محیط کشت YDC تولید رنگدانه‌های صورتی تا قرمز رنگ می‌کنند و این احتمال وجود دارد که این رنگدانه‌ها در بیماری‌زایی پاتوژن نقش داشته باشند (۲۰).

با توجه به اینکه در این تحقیق هیچ‌کدام از جدایه‌های *برنریا نیگری فلوننس* بر روی محیط کشت YDC تولید رنگدانه صورتی نکردند، از این ویژگی می‌توان برای متمایز کردن این گونه با گونه *برنریا رابری فاسینس* استفاده نمود.

برادران (Baradarn) و قاسمی (Ghasemi) در سال ۲۰۰۴ و جمال‌زاده (Jamalzadeh) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که باکتری *برنریا نیگری فلوننس* قادر به لهیده کردن ورقه‌های سیب‌زمینی نمی‌باشد. این یافته‌ها با نتایج این تحقیق به طور کامل منطبق است. اما یوسفی کوپایی (Yosefi Kopaei) و همکاران در سال ۲۰۰۷ اعلام کردند که ۱۴/۲ درصد از جدایه‌ها قادر به ایجاد لهیدگی ضعیف بوده‌اند (۲۱).

۸۵ درصد باکتری یاد شده در تحقیق حاضر اوره‌آز مثبت

دورتر از محل‌های عفونی، تراشیدن شانکرهای تنه و شاخه‌های اصلی بعد از ریزش برگ‌ها در پاییز و بلافاصله سم‌پاشی درختان با مخلوط بر روی ۱/۲ درصد و پانسمان محل زخم‌ها با چسب باغبانی در جلوگیری از توسعه و تشدید بیماری و به تعویق انداختن مرگ درختان بیمار مؤثرند.

نیگیری فلوئنس می باشد و کارایی لازم برای تشخیص به موقع را دارد. برای پیشگیری از بیماری شانکر پوستی گردو یافتن منابع مقاومت در میان توده‌های بومی ضروری است. همچنین پیشنهاد می‌گردد که از نهال‌های سالم و بدون آلودگی جهت احداث باغ استفاده شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر مسعود شمس به دلیل در اختیار گذاشتن جدایه استاندارد کمال امتنان را دارند.

نتیجه گیری

به نظر می‌رسد آزمون‌های فنوتیپی افتراقی و آزمون بیماری‌زایی بر روی میوه نارس گردو به همراه واکنش زنجیره پلی مرز کوتاه‌ترین راه ممکن برای شناخت باکتری برنریا

References

1. Fruto D. Bacterial diseases of walnut and hazelnut and genetic resources. J Plant Patholo. 2010; 92 (1): 79-85.
2. Saccardi A, Bonetti V, Melegatti A, Cristanini M. Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on English walnut (*Juglans regia*) in the Veneto region (Northern Italy). J Plant Patholo. 1998; 80 (1): 63-65.
3. Saccardi A, Bonetti V, Melegatti, Cristanini M. Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on english walnut (*juglans regia*) in the veneto region (northern italy). J Plant Pathology. 1998; 80 (1): 63-65.
4. Wilson E, Starr MP, Berger JA. Bark canker, a bacterial disease of the Persian walnut tree. Phytopathol. 1957; 47: 669-673.
5. Hauben L, Moore ERB, Vauterin L, Steenaekers M, Mergaert J, Verdonek L, Swings J. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. Systematic Appl Microbiol. 1998; 21: 384-397.
6. Morone C, Janse JD, Scortichini M. Bark canker of Persian walnut (*Juglans regia*) trees incited by *Erwinia nigrifluens* in Italy. Phytopathol. 1998; 146: 637-639.
7. Anita V. First Report of Bacterial Canker of Walnut Caused by *Brenneria nigrifluens* in Hungary. Plant Disease. 2014; 98(7): 988.
8. Falahi charkhabi N, Shamsbakhsh M, Rahimian H, Khodayegan P. Identification of *Brenneria nigrifluens* isolates. Iran J Plant Pathol. 2011; 7(3): 263-277. [In Persian].
9. Harighi B, Rahimian H. Widespread occurrence of the bark canker of walnut trees in Mazandaran Province. Iran J Plant Pathol. 1997; 33(3-4): 48-50
10. Baradaran GH, Ghasemi A. 2004. Etiology of walnut canker disease in Kerman province. Proceeding of the 16th Plant Protecting Congress. Tabriz, University, Tabriz, Iran. 358.

11. Jamalzade A, Shamsbakhsh M, Rahimian H. Genetic diversity of *Brenneria nigrifluens* strains in north of Iran (margin of Caspian Sea). J Creterb agronom. 2012; 150 (2): 57-68.
12. Biosca, EG, López M. Detection and identification methods and new tests as developed and used in the framework of COST873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts - *Brenneria nigrifluens* and *Brenneria rubrifaciens*. J Plant Pathol. 2012; 94 (1): 105-113.
13. Alfano RJ, Collmer A. Type III secretion system effector proteins double agent in bacterial disease and plant defense. Annu Rev Phytopathol. 2004; 42: 385- 414.
14. Cowan ST. manual for the identification of medical bacteria. 3rd ed. Cambridge. Cambridge University Press; 1995.
15. Loreti S, Simone D, Gallelli A. Detection and Identification of *Brenneria nigrifluens*, the Causal Agent of the Shallow Bark Canker of Walnut by, PCR Amplification. Phytopathol. 2008; 156: 464-469.
16. Moretti C, Buonauro R. Immature walnut fruit inoculation for evaluation of *Brenneria nigrifluens* pathogenicity. Phytopathol Mediterranea. 2010; 49: 80-83.
17. Saccardi A, Bonetti V, Melegatti, Cristanini M. Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on English walnut (*Juglans regia*) in the Veneto region (northern Italy). J Plant Pathol. 1998; 80 (1): 63-65.
18. Rohlf F J. NTSYSpc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exete software. Appl Biostatistics INC., NY, USA; 2000; 493-505
19. Schaad NW, Jones JB, Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathology Soc. St. Paul, MN, USA. 2001.
20. McClean A, Daniel A. Genetic Loci Involved in Rubrifacine Production in the Walnut Pathogen *Brenneria rubrifaciens*. J Bacteriol. 2009; 99 (2): 145-151.
21. Yousefi Kopaei F, Taghavi M, Banihashemi Z. Occurrence of shallow bark canker of walnut (*Juglans regia*) in southern provinces of Iran. Pakistan J Biol Sciences. 2007; 10: 1507-1512.
22. Moretti C, Silvestri FM, Rossini E, Natalini G, Buonauro R. A protocol for rapid identification of *Brenneria nigrifluens* among bacteria isolated from bark cankers in Persian walnut plants. Eur J Plant Pathol. 2007; 89(2): 211-218
23. Roshangar R, Harighi B. Investigation of the phenotypic and genetic properties of *Brenneria nigrifluens* strains, the causal agent of walnut bark canker in Kurdistan province, Iran. J Forest Pathol. 2009; 39 (5): 335-342.
24. Tvasoli E, Marefat AR, Hasanzadeh N. Phenotype and genotype diversity of soft rot pectobacteria isolated from different plant hosts in several regions of Iran. J Biol. 2009; 4 (4): 69-78. [In Persian]
25. Popovic T, Ivanovic Z, Zivkovic S, Trkulja N, Ignjatov M. First report of *Brenneria nigrifluens* as the causal agent of shallow-bark canker on walnut trees (*Juglans regia*) in Serbia. J Plant Disease. 2013; 97(11): 1504.



Isolation and molecular identification of bacterial bark canker in walnut and evaluation of bacteria pathogenicity on the seedling and immature walnuts fruits in Lorestan province

Vahid Amirsardari¹, Mostafa Darvishniya², Hossein Mirzaei³

¹M.Sc. Student, Department of Plant Protection, Faculty Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran.

²Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran.

³Ph.D. Student, Department of Plant Protection, Faculty Agriculture, Ferdosi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Bacterial canker in walnut is caused by *Brenneria nigrifluens*. The prevalence of this disease has been increasing in recent years and it is a serious threat to walnut tree in the appropriate conditions. The aim of this study was to isolate and identify the prevalence bacterial walnut canker in Lorestan and to determine their pathogenesis in the raw walnut.

Materials & Methods: This cross-sectional study was carried out on 105 branches and trunk bark walnut trees suffering of the symptoms of shallow bark canker. After purification and isolation of the disease agents, the bacteria were identified based on phenotypic characteristics. Next, the results were analyze by Ntsys-pc version 2.02 software. The PCR reactions were performed for more accurate identification of the isolates. Overall, five bacterial isolates were selected to study their pathogenesis on the walnut fruits and trunks.

Results: According to the results of phenotypic characteristics of isolates, these strains were classified as *B. nigrifluens*. Furthermore, based on numerical analysis of the strains with 94% similarity, these isolates were classified into four groups. All isolates produced an expected 255 bp band in the PCR reaction. These strains caused necrotic area on fruit with reddish brown ooze.

Conclusion: The differential phenotypic tests, the pathogenicity test on the raw fruits and specific primers are reliable methods for diagnosis of the etiology of this disease. In our knowledge, the present study is the first report regarding the occurrence of this disease in Lorestan province and also first report of the pathogenicity of *B. nigrifluens* on fruit in Iran.

Keywords: Bacterial canker, Walnut, *Brenneria nigrifluens*.

Correspondence to: Mostafa Darvishniya

Tel: +989166616300

E-mail: mdarvishniya44@yahoo.com

Journal of Microbial World 2015, 8(2): 120-129.