مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره دوم (پیاپی ۲۳) تابستان ۱۳۹۴
صفحات ۱۲۹-۱۲۰

Original Article

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، [۲]استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، [۳]دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

چکیده

سابقه و هدف: بیماری شانکر پوستی گردو توسط باکتری *برنریا نیگری فلوئنس* ایجاد می گردد. 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 روش ها: این پژوهش به‌صورت مقطعی-توصیفی بر روی تنه و شاخه های ۱۰۵ درخت گردو دارای علایم شانکر پوستی در استان لرستان انجام شد. پس از خالص سازی 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 دقیق تر سویه باکتریایی، از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز 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 جدایه ها به عنوان *برنریا نیگری فلوئنس* تشخیص داده شدند. همچنین آنالیز عددی خصوصیات فنوتیپی در سطح تشابه ۹٤ درصد، جدایه‌ها را به چهار گروه تقسیم نمود. در واکنش PCR، قطعه ۲۵۵ جفت بازی در تمامی جدایه ها تکثیر گردید. در آزمون بیماری‌زایی، علایم به صورت نقاط سیاه رنگ همراه با ترشح شیرابه روی میوه ظاهر شدند.

نتیجه گیری: 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 فلوئنس* روی میوه گردو در ایران می‌باشد.

واژگان کلیدی: شانکر باکتریایی، گردو، *برنریا نیگری فلوئنس*.

دریافت مقاله: فروردین ماه ۹۳ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۳

مقدمه

درخت گردو در ایران و دیگر کشورهای اروپایی، آسیایی، آمریکای شمالی و جنوبی کشت می شود. گردو از محصولات مهم خشکباری دنیا به شمار می آید و در بعضی کشورهای صنعتی به‌عنوان یک درخت روغنی بسیار مهم محسوب می گردد (۱). از مهم‌ترین عوامل کاهش تولید، کمیت و کیفیت این محصول، می توان به بیماری شانکر پوستی باکتریایی با عامل *برنریا نیگری فلوئنس* (*Brenneria nigrifluens*) اشاره نمود. در مناطق مرطوب و پرباران به‌شدت 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). علایم شانکر پوستی گردو ابتدا به‌صورت لکه‌هایی بدون شکل هندسی، به رنگ قهوه‌ای

*) آدرس برای مکاتبه: لرستان، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی.
تلفن: ۰۹۱۶۶۶۱۶۳۰۰ پست الکترونیک: mdarvishnia44@yahoo.com

متمایل به تیره در قسمت‌های خارجی پوست تنه و شاخه‌های اصلی بروز می‌کند و پس از مدتی این علایم 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 nigrifluens*) شناسایی و نام‌گذاری گردید (٤). 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 (٦). در کشور مجارستان تراوش‌هایی به‌صورت 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 سویه ها، 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 علایم 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).

هم‌چنین در سال‌های اخیر این بیماری در استان‌های کردستان، فارس، کهگیلویه و بویراحمد و گیلان و گلستان (۱۱) گزارش‌شده است. شناسایی *برنریا نیگری فلوئنس* بر اساس جداسازی مستقیم از بافت آلوده، آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و آزمون بیماری‌زایی استوار می باشد. 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 علایم 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 می گردد. 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 علایم 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 علایم زخم از تنه و شاخه‌های درختان گردو از مناطق عمده گردوکاری استان لرستان در فصول بهار و تابستان سال ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردید. نمونه ها به‌صورت جداگانه درون کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل و با استفاده از الکل اتیلیک ۷۰ درصد، ضد عفونی و توسط آب مقطر سترون شسته شدند.

سپس از بافت آلوده سوسپانسیون تهیه و روی محیط کشت های EMB (Eosin Methylen Blue) و YDC (Yeast Extract Dextrose Calcium-Carbonat) (مرک، آلمان) کشت و درون گرمخانه با دمای ۲۸ درجه سیلیسیوس 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، سوسپانسیونی از آنها در آب مقطر سترون تهیه و در دمای ٤ درجه سیلیسیوس قرار داده شدند. برای نگهداری طولانی‌مدت باکتری‌ها از کشت جوان هر جدایه خالص‌شده، سوسپانسیون غلیظی در گلیسرول ۱۵٪ تهیه و در دمای ۷۰- درجه سیلیسیوس 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 (١٤).

ج) شناسایی مولکولی باکتری برنریا نیگری فلوئنس : 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. روماند 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 F1 (5'CCTGCGCCATGTTGCCAGATCGCTAT-3') و C3 (٥'-ACCTGAGTAGCAGTTTCGACTATTT-3') (شرکت پیشگام ایران) استفاده شد (۱۵). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز 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 ۹٦ درجه سیلیسیوس و در ادامه ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سیلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ٥٦ درجه سیلیسیوس به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ٤٥ ثانیه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلیسیوس به مدت ٥ دقیقه انجام گردید. برای انجام الکتروفورز، ژل آگارز ۱/٥ درصد واجد اتیدیوم بروماید تهیه گردید. در نهایت قطعه DNA به کمک دستگاه UV ترانس لومیناتور (یو وی داک، انگلستان) عکسبرداری شد. تکثیر قطعه ۲٥٥ جفت بازی نشان دهنده مثبت بودن واکنش می باشد.

د) آزمون بیماری‌زایی: در این مطالعه اثبات بیماری‌زایی باکتری *برنریا نیگری فلوئنس* 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 فلوئنس*، برای انجام آزمون بیماریزایی روی میوه نارس گردو انتخاب شدند. از کشت ٤٨ ساعته جدایه باکتری سوسپانسیونی با غلظت‌های 10^{8} cfu/ml (چگالی نوری ۱/٥ در طول موج ٦۰۰ نانومتر–اسپکتروفتومتر مدل Unico, Usa) تا 10^{2} cfu/ml (چگالی نوری ۰/۳ در طول موج ٦۰۰ 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 ٥۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تزریق گردید. برای هر غلظت از

سوسپانسیون باکتری، یک شاهد تلقیح شده با آب مقطر استریل در نظر گرفته شد. سپس میوه ها درون ژرمیناتور با دمای ۲۰ درجه سیلیسیوس، رطوبت نسبی ۹۰ درصد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی به مدت ۸ روز نگهداری شدند (۱٦).

آزمون بیماریزایی روی نهال‌های دو ساله گردو انجام گرفت. برای این منظور سوسپانسیونی با غلظت 10^8 cfu/ml (چگالی نوری ۱/۵ در طول موج ٦۰۰ نانومتر) از کشت ٤۸ 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 به‌وسیله خلال‌دندان برداشته و در بافت همان سرشاخه به‌صورت مستقیم مایه‌زنی گردید و محل زخم‌های حاصل از خلال‌دندان به‌وسیله نوار پارافیلم 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 به‌صورت روزانه تا حدود دو ماه مورد بازبینی 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 بیوشیمیایی جدایه‌ها رسم گردید. برای بررسی واقعی میان گروه‌ها از روش داده‌های غیر وزنی (Unweighted Pair-Group Method using Arithemtic average) و ضریب تشابه تطابق ساده (Simple matching) استفاده گردید (۱۸). ویژگی های فنوتیپی به‌صورت کدهای یک (برای ویژگی های مثبت) و صفر (برای ویژگی های منفی) برای این نرم‌افزار تعریف گردید. بر پایه ویژگی های 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 ویژگی های موجود در این پژوهش محاسبه گردید.

جدول ۱: جدایه های باکتری *برنریا نیگری فلوئنس* عامل شانکر پوستی گردو در استان لرستان.

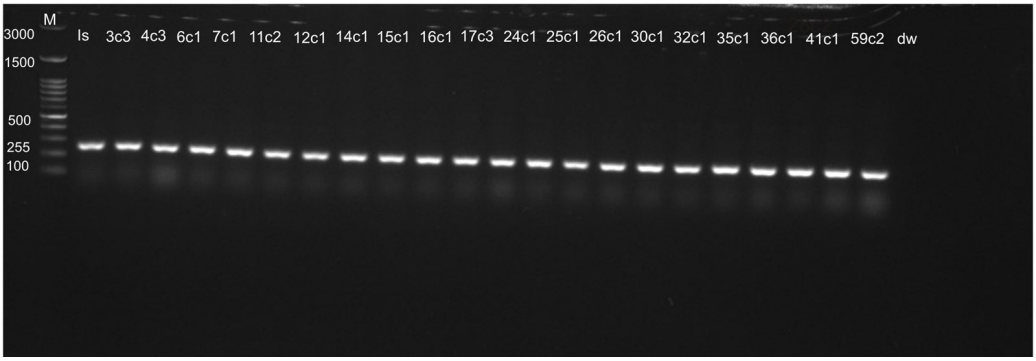
کد جدایه	محل جمع‌آوری	بافت گیاهی	کد جدایه	محل جمع‌آوری	بافت گیاهی
3C3	خرم‌آباد	تنه	25C1	بروجرد	تنه
4C3	خرم‌آباد	تنه	26C1	بروجرد	تنه
6C1	خرم‌آباد	تنه	28C2	بروجرد	تنه
7C1	خرم‌آباد	تنه	30C1	خرم‌آباد	شاخه
11C2	الشتر	تنه	32C1	خرم‌آباد	شاخه
12C1	الشتر	شاخه	35C1	خرم‌آباد	شاخه
14C1	الشتر	شاخه	36C1	خرم‌آباد	شاخه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

یافته ها

در این پژوهش در مجموع ۲۱ جدایه از اندام های مختلف درخت گردو از مناطق مختلف استان لرستان بر اساس مجموعه ویژگی های فنوتیپی و بیوشیمیایی به عنوان باکتری *برنریا نیگری فلوئنس* 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 جدایه ها میله ای شکل، گرم منفی، بی هوازی اختیاری، اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، قادر به رشد در شرایط بی‌هوازی، دارای پرگنه های سفید و کروی و فاقد پرگنه و رنگدانه های قرمز روی محیط کشت YDC بودند. تمامی جدایه ها قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت بر روی گیاه شمعدانی و تولید گاز H_2S از پپتون بودند. هیچکدام از جدایه ها توانایی تولید اندوسپور و هیدرولیز ژلاتین را نداشتند. نتایج آزمون ها به صورت خلاصه در جدول ۲ آورده شده است.

میزان شباهت ۲۱ جدایه باکتری از میزبان‌های مناطق مختلف بر اساس ویژگی های 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



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

جدایه‌هایی مربوط به منطقه کهمان شهرستان الشتر بودند که در بین خود نیز تفاوت‌هایی داشتند. گروه سوم به‌استثنای جدایه 7C1 خرم‌آباد، شامل جدایه‌های مربوط به منطقه هونام شهرستان الشتر بودند. گروه چهارم شامل جدایه‌های شهرستان دورود بودند که در سطح تشابه ۹۰ درصد گروهی مجزا نسبت به گروه‌های دیگر ایجاد کردند. این گروه به دلیل تفاوت در برخی از ویژگی های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی از سه گروه دیگر متمایز بودند (شکل ۲).

جدول ۲: ویژگی های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای سویه های *برنریا نیگری فلوئنس* جدا شده از درختان گردو.

آزمون	واکنش	آزمون	واکنش
گرم	–	تولید گاز از گلوکز	–
اکسیداز	–	تولید انداسپور	–
کاتالاز	+	تولید اسید از:	
لوان	+**	رایبوز، زایلوز، سوکروز	+
فوق حساسیت روی شمعدانی	+	لاکتوز و آدونیتول	–*
هیدرولیز ژلاتین	–	آرابینوز و رامنوز	+**
هیدرولیز اسکولین	+**	رافینوز و سلوبیوز	+**
حرکت swarming باکتری	+	استفاده از:	
تولید اندول	–	فورمات	–
هیدرولیز توئین ۲۰	–	بنزوات	–
هیدرولیز نشاسته	–	پروپانول	–
واکنش متیل رد	+**	سوکسینات و لاکتات	+
تولیدگاز H_2S از پپتون	+	اتانول	–**
رشد در ۳۶ درجه سلسیوس	+	اگزالات	–
رشد در ۳۹ درجه سلسیوس	–	دی–تارتارات	–**
تحمل نمک ۵ درصد	+	ال–لوسین	–
اوره آز	+**	مانیتول	+
تولید رنگدانه روی محیط کشت YDC	–	دولیستول	–
تولید رنگدانه سبز متالیک روی EMB	+	گلیسرول	+**
لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی	–	سیترات	–
مواد احیاکننده از سوکروز	–	ال–سرین	–
O/F	+	دی–ال آلانین و دی ال تارتارات	–
احیای نیترات	–	مالونات	–

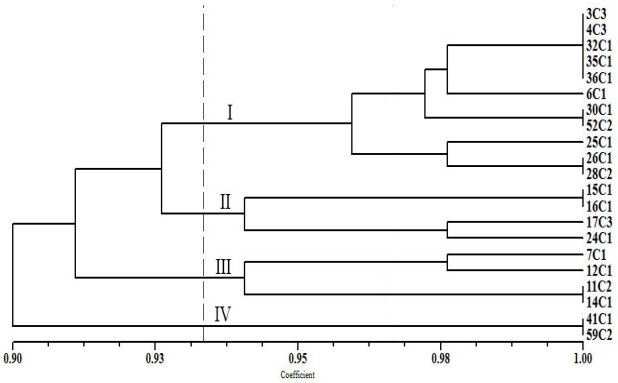
+: نشان‌دهنده مثبت بودن واکنش، –: نشان‌دهنده منفی بودن واکنش، **: بیش از ۷۰ درصد، *: بیش از ۵۰ درصد

در این پژوهش باکتری *برنریا نیگری فلوئنس* علاوه بر ایجاد زخم بر روی تنه، روی میوه‌های نارس گردو نیز علایم 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 بیماری زایی روی نهال گردو هشت هفته پس از تزریق سوسپانسیون جدایه‌ها به سرشاخه‌های جوان لکه های آب سوخته و زخم‌هایی در سرشاخه‌های مایه‌زنی دیده شد. همچنین هیچ علامتی در سرشاخه‌های مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل دیده نشد.

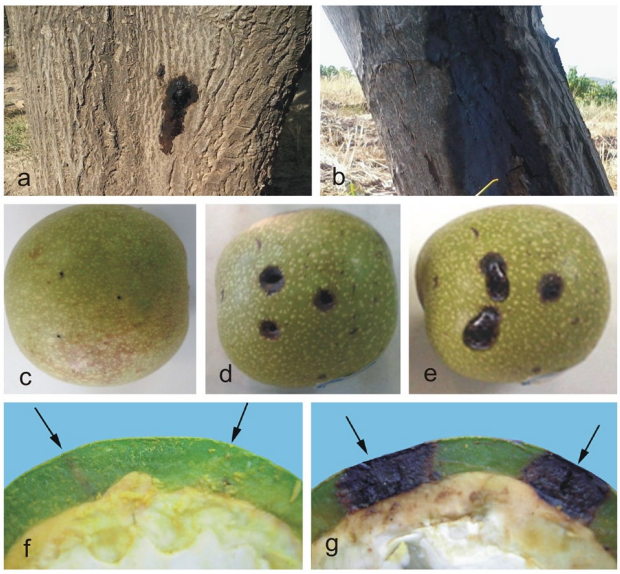
بحث

در بازدیدهای به‌عمل آمده از باغات گردو مناطق مختلف استان لرستان در بهار و تابستان سال ۱۳۹۳ علایم شانکر پوستی از مناطق گردوکاری استان لرستان مشاهده گردید. این علایم به‌صورت ترشح شیرابه روی تنه و شاخه‌های درختان گردو ظاهر شد. در این تحقیق ویژگی های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های *برنریا نیگری فلوئنس* 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 فلوئنس* تشخیص داده شد.

در این پژوهش وجود قطعه اختصاصیژن *hrcC* در باکتری



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



شکل ۳: علایم باکتری *برنریا نیگری فلوئنس*. a و b) علایم 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 فلوئنس بررسی شد. به منظور شناسایی باکتری یاد شده از جفت آغازگرهای اختصاصی (F1 و C1) استفاده شد. تعداد ۲۱ جدایه که بر اساس ویژگی های فنوتیپی *برنریا نیگری فلوئنس* تشخیص داده شدند، در واکنش زنجیره پلی مراز قطعه 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 بیماری زایی از طریق مایه‌زنی روی نهال و میوه نارس گردو، تمامی میوه‌های مایه زنی شده علایم 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 ویژگی های

بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی جدایه های *برنریا نیگری فلوئنس* را مورد بررسی قرار دادند. نتایج برخی ویژگی ها 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 ۳٦ درجه سیلیسیوس و رشد در نمک طعام ۵ درصد است (۱۹). این یافته‌ها با نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر کاملاً مطابقت دارد.

ویلسون (Wilson) و همکاران در سال ۱۹٦۷ شانکرهایی معمولاً عمیق‌تر و شدیدتر از شانکرهای ایجاد شده توسط *برنریا نیگری فلوئنس* 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 قرمزرنگ 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 فلوئنس* بر روی محیط کشت YDC تولید رنگدانه صورتی نکردند، از این ویژگی می‌توان برای متمایز کردن این‌گونه با گونه *برنریا رابری فاسینس* استفاده نمود.

برادران (Baradarn) و قاسمی (Ghasemi) در سال ۲۰۰٤ و جمال‌زاده (Jamalzadeh) و همکاران در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که باکتری *برنریا نیگری فلوئنس* قادر به لهیده کردن ورقه‌های سیب‌زمینی نمی باشد. این یافته‌ها با نتایج این تحقیق به طور کامل منطبق است. اما یوسفی کوپایی (Yosefi Kopaei) و همکاران در سال ۲۰۰۷ اعلام کردند که ۱٤/۲ درصد از جدایه‌ها قادر به ایجاد لهیدگی ضعیف بوده اند (۲۱).

۸۵ درصد باکتری یاد شده در تحقیق حاضر اوره‌آز مثبت بودند. در حالی‌که 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 ویژگی هایی 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 به‌صورت تیره شدن سطح خارجی پوست و در تابستان به‌صورت خروج شیرابه از تنه درختان گردو مشاهده گردید که با یافته‌های روشنگر (Roshangar) و حریقی (Harighi) در سال ۲۰۰۹ در مورد شناسایی علایم بیماری مطابقت دارد (۲۳).

با توجه به آنالیز عددی ویژگی‌های فنوتیپی، پراکندگی جدایه‌ها بر اساس تنوع در تعدادی از ویژگی های فنوتیپی بود. در بررسی‌های فنوتیپی حداقل میزان شباهت بین افراد یک گونه ۸۰ درصد در نظر گرفته می‌شود (۲٤). بنابراین نتیجه به‌دست آمده در این پژوهش نشان می‌دهد که سویه‌های مورد مطالعه در یک گونه قرار دارند که اکثر جدایه‌های به‌دست آمده از یک منطقه، در یک گروه و یا گروه‌های نزدیک به‌هم قرار دارند.

در مطالعه حاضر آزمون اثبات بیماری زایی بر روی میوه و نهال گردو انجام گرفت. با مقایسه نتایج هر دو آزمون بیماری‌زایی مشخص می‌شود که استفاده از روش بیماری زایی 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 فلوئنس* 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

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.

نتیجه گیری

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

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 Crecterb 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 Phytopthol. 2004; 42: 385- 414.

14. Cowan ST. manual for the identification of medical bacteria. 3nd ed. Cambaridge. Cambaridge 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, Buonaurio 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, Buonaurio 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.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 2, June 2015

Original Article

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 Amirsardari[1], Mostafa Darvishniya[2], Hossein Mirzaei[3]

[1]M.Sc. Student, Department of Plant Protection, Faculty Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran.
[2]Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran.
[3]Ph.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.