مجله دنیای میکروب‌ها
سال دهم شماره سوم (پیاپی ۳۲) پاییز ۱۳۹۶
صفحات ۲۵۵-۲۴۳

Original Article

بررسی ویژگی های ریخت شناسی و ردیابی ژن‌های موثر در تولید رنگدانه *رابری‌فاشینس* در باکتری *برنریا رابری‌فاشینس* عامل شانکر عمیق گردو

وحید امیرسرداری*[1]، میترا امیدی نسب[2]، کرم سپه‌وند[3]، حامد نظری[4]

[1]کارشناس ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، [2]کارشناس ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی همدان، [3]دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان، [4]کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان.

چکیده

سابقه و هدف: بیماری شانکر عمیق پوستی که توسط باکتری *برنریا رابری‌فاشینس* ایجاد می‌گردد، از بیماری‌هایی است که باعث کاهش کمیت و کیفیت گردو می‌شود. این مطالعه با هدف شناسایی باکتری شانکر عمیق پوستی بر اساس ویژگی های ریخت شناسی، بیماری‌زایی و استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن‌های مداخله کننده در تولید رنگدانه *رابری‌فاشینس* انجام گردید.

مواد و روش ها: این پژوهش به‌صورت مقطعی- توصیفی بر روی درختان گردو دارای علایم شانکر در استان لرستان انجام شد. پس از خالص‌سازی، شناسایی باکتری ها بر مبنای ویژگی های فنوتیپی جدایه‌ها انجام شد. به‌منظور بررسی دقیق‌تر و ردیابی مستقیم عامل شانکر از آغازگرهای 2BrIF/2BrIR و GSP2F/GSP2R استفاده گردید. همچنین ویژگی های بیماری‌زایی باکتری بر روی نهال و میوه گردو مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بر اساس ویژگی های فنوتیپی ۱٤ جدایه به‌عنوان باکتری *برنریا رابری‌فاشینس* شناسایی شد. این جدایه‌ها در آزمون PCR قطعه مورد نظر ٦٧١ و ۲۸۰ جفت بازی را تکثیر کردند. در آزمون بیماری‌زایی علایم به‌صورت لهیدگی و سیاه شدن بافت در محل تلقیح مشاهده شد. دو جدایه در آنالیز فیلوژنی سطح تشابه ۹۷ و ۹۸ درصدی با دیگر جدایه‌های شناسایی شده در بانک ژنی داشتند.

نتیجه‌گیری: آزمون PCR و استفاده از آغازگرهای اختصاصی یک روش سریع، کاربردی و بسیار حساس در شناسایی باکتری *برنریا رابری‌فاشینس* نسبت به سایر روش‌های تشخیصی می‌باشد. با توجه به بررسی توان بیماری‌زایی جدایه‌ها در این پژوهش و بروز علایم روی نهال، بیمارگر در شرایط مساعد بیماری خسارت شدیدی به درختان وارد می‌کند.

واژگان کلیدی: *برنریا رابری‌فاشینس*، شانکر عمیق، عوامل بیماری زایی.

دریافت مقاله: اسفند ماه ۹۵ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ماه ۹٦

مقدمه

کشور ایران سرزمینی است حاصلخیز با اکوسیستمی متنوع و وسیع که قسمتی از رویشگاه‌های وسیع گردو را در دنیا شامل می‌شود. این تنوع اقلیم و اکوسیستم را در سایر نقاط جهان کمتر می‌توان یافت (۱). عوامل مختلفی مانند بیماری‌های قارچی، فیزیولوژیک و باکتریایی سلامت گردو را تهدید می‌کنند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به بیماری شانکر عمیق پوستی اشاره نمود (۲). این بیماری در دما و رطوبت بالا باعث کاهش کمیت، کیفیت و تولید گردو می‌شود و در شرایط مطلوب رشد بیماری و حضور میزبان حساس خسارت گسترده‌ای به باغات گردو وارد می‌سازد. باکتری بیمارگر روی ٥٤ رقم از گونه‌های گردوی فارسی و گردوی سیاه ایجاد خسارت می‌کند (۳). خسارت در ابتدا به صورت شکاف‌های عمودی بر روی تنه و شاخه گردو قابل مشاهده است که با گرم شدن هوا از محل شکاف‌ها شیرابهٔ قهوه‌ای تا سیاه رنگی

*) آدرس برای مکاتبه: لرستان، دانشگاه لرستان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی.
تلفن: ۰۹۱٦۰۸۱٤۷٦۸ پست الکترونیک: v.amirsardari@yahoo.com

همراه با باکتری تراوش می‌کند (٤). درختان آلوده دارای ضعف عمومی، پژمردگی و خشکیدگی سرشاخه‌ها هستند (٥).

طبق بررسی‌های کادو وگاردن (Kado and Garden)، حساسیت میزبان نسبت به عامل بیماری به زمان آلودگی، وجود زخم و میزان تلقیح اولیه بستگی دارد (٦). عامل بیماری یکی از مهمترین بیمارگرهای گیاهی گرم منفی متعلق به خانواده *انتروباکتریاسه* است و اولین بار توسط ویلسون (Willson) و همکاران شناسایی و تحت نام *اروینیا رابری‌فاشینس* (*Erwinia rubrifaciens*) گزارش شد (٧). سپس در سال ۱۹۹۸ در جنس *برنریا* (*Brenneria*) و نام *برنریا رابری‌فاشینس* (*Brenneria rubrifaciens*) برای آن انتخاب شد (٨).

در پژوهشی محققین با استفاده از ویژگی های بیوشیمیایی، بیماری‌زایی و آزمون الایزا باکتری یاد شده را برای اولین بار در اسپانیا و اروپا گزارش و با انجام آزمون‌های بیماری‌زایی نشان دادند که باکتری عامل بیماری در مدت زمان چهار سال پس از آلودگی زخم‌هایی به عمق ۲۰ تا ۸۰ سانتی متر در تنه درخت گردو ایجاد می‌کند (٩). این بیماری در سال ۲۰۱۱ در کشور اسپانیا به صورت اپیدمی ظاهر شد و باعث نابودی ٩٦ هزار هکتار از جنگل‌های گردو در این کشور شد (١٠).

همچنین در بررسی عوامل بیماری‌زا و موثر بر روی چوب درختان گردو، باکتری *برنریا رابری‌فاشینس* برای اولین بار در ایتالیا گزارش شد (١١). باکتری *برنریا رابری‌فاشینس* در بافت گیاه تولید رنگدانه‌های قرمزی به نام رابری‌فاشینس می‌کند که این رنگدانه‌ها در بیماری زایی پاتوژن نقش دارند (١٢).

در پژوهشی محققین برای اولین بار با جداسازی این رنگدانه از *برنریا رابری‌فاشینس* از درختان گردو، نحوهٔ استخراج، مشخصات و مکانیسم عمل (جلوگیری از انتقال الکترون در میتوکندری ها) رنگدانه را بررسی و توصیف نمودند (١٣).

همچنین عده‌ای از پژوهشگران عقیده دارند که رنگدانه‌های باکتری بیمارگر در پدیده رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها بر سر مواد غذایی و همچنین استقرار در بافت میزبان حساس نقش دارند (١٤). با توجه به اینکه مکانیسم تولید رنگدانه رابری‌فاشینس به طور اختصاصی متعلق به باکتری *برنریا رابری‌فاشینس* می‌باشند، ژن‌های موثر در تولید این رنگدانه می‌تواند به عنوان یک ویژگی یا نشانگر ژنتیکی مناسب برای تشخیص اختصاصی *برنریا رابری‌فاشینس* از بافت‌های آلوده مفید واقع شود (١٥).

کنترل بیماری های ناشی از باکتری‌های بیمارگر گیاهی معمولاً نیازمند تشخیص دقیق و به دنبال آن شناسایی صحیح ارگانیسم عامل بیماری است که روش های مبتنی بر نوکلئیک اسید حساسیت کافی در این زمینه را دارند (١٦). در حال حاضر دامنه وسیعی از باکتری های بیمارگر گیاهی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مراز در میزبان‌های متعدد شناسایی شده‌اند (١٧).

با توجه به مشاهدات و گزارش‌های مختلفی از بروز علایم شانکر عمیق پوستی گردو در استان لرستان تا کنون مطالعه‌ای در رابطه با بررسی ویژگی های عامل بیماری انجام نشده است.

هدف از این مطالعه جداسازی و تشخیص عامل بیماری شانکر عمیق پوستی گردو بر اساس آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، بیماری‌زایی و مولکولی با استفاده از طراحی آغازگرهای اختصاصی بر اساس ژن‌های تولید کننده رنگدانه رابری‌فاشینس و آنالیز فیلوژنیکی عامل بیماری بر اساس ترادف ناحیه *16S rDNA* بود.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌برداری، جداسازی و نگهداری عامل بیماری: در فصول بهار و تابستان سال ١٣٩٤ و ١٣٩٥ از مناطق عمده کشت درختان گردو در استان لرستان بازدید شد و از درختان دارای علایم شانکر پوستی، نمونه‌هایی از تنه، شاخه و سرشاخه جمع‌آوری و در پاکت‌های مجزا به آزمایشگاه منتقل شد. به‌منظور جداسازی باکتری، قطعاتی در مرز بین بافت سالم و آلوده هر نمونه تهیه و توسط هیپوکلریت سدیم ٥٪ ضدعفونی و با آب مقطر استریل شسته شدند. سپس قطعات درون پتری حاوی آب مقطر استریل انداخته شد و به‌وسیله تیغ اسکالپل استریل خرد گردید و به مدت ٢٤ ساعت شیکر شدند.

سوسپانسیون باکتری بر روی محیط کشت نوترینت آگار (مرک، آلمان) کشت داده شد و در انکوباتور در دمای ٢٨ درجه

سلیسیوس به مدت ۴۸-۲۴ ساعت قرار گرفت. پس از این مدت، پرگنه‌های سفید رنگ انتخاب و بر روی محیط های ائوزین متیلن بلو (EMB)، YDCA (Yeast Extract Dextrose Calcium-Carbonat Agar) (مرک، آلمان) کشت و در گرمخانه به مدت ۷۲ ساعت با دمای ۲۸ درجه سلیسیوس قرار داده شدند. سپس پرگنه‌هایی سبز دارای جلای فلزی(متالیک) بر روی محیط کشت EMB که قادر به تولید رنگدانه قرمز بر روی محیط کشت YDC بودند، برای بررسی بیشتر انتخاب و خالص سازی گردیدند. به منظور نگهداری جدایه‌ها، سوسپانسیونی از آنها در آب مقطر سترون تهیه و در دمای ٤ درجه سلیسیوس قرار داده شد. برای نگهداری طولانی مدت، از کشت جوان هر جدایه خالص شده سوسپانسیون غلیظی در گلیسرول ۱۵ درصد تهیه و در دمای ۷۰- درجه سلیسیوس نگه داری گردید (۱۸).

ب) بررسی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه ها: جدایه‌های جمع‌آوری شده از درختان گردو مناطق مختلف استان لرستان که دارای پرگنه‌های سبز متالیک بر روی محیط کشت EMB و پرگنه‌ای سفید و کروی بر روی محیط کشت YDC و قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت روی شمعدانی و توتون بودند، به عنوان نماینده انتخاب و آزمون‌های تکمیلی و آزمون‌های استفاده از اسیدهای آمینه و آلی و تولید اسید از قندهای مختلف از محیط پایه Ayer (یک گرم آمونیوم دی‌هیدروژن فسفات، ۰/۲ کلورپتاسیم، ۰/۲ گرم سولفات منیزیم، ۰/۰۰۸ گرم برم تیمول بلو و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون)ً با روش‌های متداول در باکتری‌شناسی گیاهی انجام شد (۱۹).

ج) آزمون بیماری‌زایی روی نهال و میوه گردو: آزمون بیماری‌زایی بر روی نهال‌های دو ساله انجام گرفت. برای این منظور سوسپانسیونی با غلظت 10^{8} cfu/ml (چگالی نوری ۱/۵ در طول موج ٦۰۰ نانومتر-اسپکتروفتومتر مدل Unico, Usa) از کشت ٤۸ ساعت باکتری‌ها بر روی محیط آگار غذایی در آب مقطر استریل تهیه شد. با استفاده از سرنگ سترون ٤۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در سرشاخه‌های جوان تزریق گردید. علاوه بر آن مقداری از پرگنه باکتری نیز به‌وسیله خلال دندان برداشته و در بافت همان سرشاخه به‌صورت مستقیم مایه‌زنی گردید و محل زخم‌ها حاصل از خلال دندان به‌وسیله نوار پارافیلم پوشانده شد (۲۰). چهار جدایه باکتری برای مایه‌زنی به‌کار رفت و هر جدایه به دو نهال مایه‌زنی گردید. در نهال‌های شاهد از آب مقطر سترون به عنوان مایه استفاده گردید. نهال‌های مایه‌زنی به مدت سه ماه مورد بازبینی قرار گرفتند. برای انجام آزمون بیماریزایی سه جدایه *برنریا رابری‌فاشینس* روی میوه نارس گردو انتخاب شدند. از کشت ٤۸ ساعته جدایه باکتری سوسپانسیونی با غلظت‌های 10^{8}cfu/ml تا 10^{2} cfu/ml (چگالی نوری ۰/۳ در طول موج ٦۰۰ نانومتر-اسپکتروفتومتر مدل Unico, Usa) در آب مقطر سترون تهیه و با استفاده از سوزن استریل سطح میوه را خراش داده (سه سوراخ در میوه)، درون هر سوراخ مقدار ۵۰ 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 سلیسیوس، رطوبت نسبی ۹۰ درصد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی به مدت دوازده روز نگهداری شدند (۲۱).

د) شناسایی مولکولی جدایه‌های عامل شانکر پوستی عمیق گردو: استخراج DNA با استفاده از روش لیز قلیایی صورت گرفت. بدین منظور سوسپانسیون کدری از کشت ٢٤ ساعته هر جدایه در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر تهیه گردید. جهت تجزیه سلول‌ها به هر سوسپانسیون به میزان ۰/۱ حجم پتاس ۱۰ درصد اضافه و نمونه‌ها به مدت ۱۲ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. شفاف شدن سوسپانسیون نشانه تجزیه شدن سلول‌های باکتری تلقی گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۷ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گشته و محلول رویی حاوی DNA به‌طور مستقیم در واکنش زنجیره ای پلی‌مراز استفاده شد (۲۲). به‌منظور تکثیر ژن اتواندوسر سنتاز و پپتید سنتاز از پرایمرهای اختصاصی آنها استفاده شد (جدول ۱) (۲۳). این دو ژن در تولید رنگدانه رابری فاشینس نقش دارد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر از

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه.

پرایمر	توالی پرایمر	طول قطعه (جفت باز)
2BrIF	5'-CGGGATCCATGTTAGAAATATTCGATGTC-3'	٦٧١
2BrIR	5'-TCAGCTGTCAAGCCTCTTCCTTTTTG-3'	
GSP2F	5'-CATTACTGTTTCTCCTCGCTAATC-3'	٢٨٠
GSP2R	5'-GATGTAAATTAGCCATACACGGAATG-3'	
16F27	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCA-3'	١٥٠٠
16R1525	5'-TTCTGCAGTCTAGAAGGAGGTGWTCCA-3'	

بافر PCR 10X (500 mM KCL, Tris-HCL (اسیدیته ٨/٤))، ١٥ پیکومول از هر آغازگر، ٠/٢ میلی مولارdNTPs، ٢ میلی مولار $MgCl_2$، ٢ میکرولیتر DNA الگو و ١/٢٥ واحد Taq Polymerase (سیناژن، ایران) در دستگاه ترموسایکلر مدل Bio Red (USA) انجام گردید. واسرشت سازی اولیه در دمای ٩٥ درجه سلیسیوس به مدت ٤ دقیقه صورت گرفت. سپس ٣٠ چرخه شامل واسرشت سازی DNA ژنومی در دمای ٩٣ درجه سلیسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ٦٢ و ٦٠ درجه سلیسیوس به مدت ٤٥ ثانیه به ترتیب برای آغازگرهای 2BrIF/2BrIR و GSP2F/GSP2R، گسترش رشته جدید در دمای ٧٢ درجه سلیسیوس به مدت ٤٥ ثانیه و در پایان گسترش نهایی در دمای ٧٢ درجه سلیسیوس به مدت ٢ دقیقه انجام شد (٢٤).

ه) تعیین ترادف ناحیه 16S rDNA و آنالیز فیلوژنتیکی: قطعه 16S rDNA برای جدایه‌های BRU4 و BRU17 با استفاده از آغازگرهای 16F27 و 16R1525 تکثیر گردید (جدول ١). شرایط واکنش زنجیره پلی‌مراز توسط پوزا (Poza) و همکاران توصیف شده است (٢٥). قطعه ١٥٠٠ جفت بازی تکثیر شده با استفاده از کیت استخراج DNA (سیناژن، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده از ژل آگاروز استخراج و برای تعیین ترادف به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال گردید. ترادف‌های همولوگ مربوط به گونه‌های خانواده انتروباکتریاسه از سایت NCBI (National Information Center for Biotechnology) دریافت و با ترادف 16s rDNA جدایه‌های BRU4 و BRU17 با استفاده از نرم‌افزار GenDoc هم ردیف شد. درخت فیلوژنتیکی نیز با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 با الگوریتم اتصال مجاور (Neighbor-Joining) و آزمون صحت شاخه‌ها (Bootstrapping) با ١٠٠٠ تکرار بررسی گردید.

یافته ها

الف) جداسازی عامل بیماری: طبق نتایج به دست آمده و بر اساس آزمون‌های استاندارد باکتری‌شناسی، در مجموع ١٤ جدایه به عنوان باکتری *برنریا رابری‌فاشینس* از اندام‌های مختلف درخت گردو شناسایی شد. مناطق انتشار سویه‌های جدا شده در این بررسی در جدول ٢ آمده است.

ب) ارزیابی ویژگی های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای: جدایه‌های شناسایی شده عامل شانکر پوستی در این پژوهش دارای رشد در شرایط هوازی و بی‌هوازی، رشد در دمای ٣٣ درجه سلیسیوس و قادر به تولید رنگدانه سبز متالیک در محیط کشت EMB، رنگدانه قرمز تا صورتی رنگ در محیط YDC و رنگدانه صورتی در محیط King B بودند. جدایه‌ها توانایی تحمل تمک طعام ٥ درصد را داشتند. اما نتوانستند روی محیط نمک طعام ٦ درصد رشد کنند. نتایج برخی ویژگی های مهم دیگر شامل واکنش گرم، اکسیداز، لوان و احیای نیترات، واکنش متیل رد، کاتالاز، لهیدگی ورقه‌های سیب‌زمینی، توانایی تولید گاز H_2S از پپتون و توانایی استفاده از سیترات و مانیتول بود. هیچ کدام از جدایه‌ها توانایی هیدرولیزآرژنین، ژلاتین و نشاسته را نداشتند (جدول ٣).

جدول ٢: جدایه های باکتری عامل شانکر پوستی گردو در استان لرستان.

جدایه	محل جمع‌آوری	بافت گیاهی	جدایه	محل جمع‌آوری	بافت گیاهی
BRU2	خرم‌آباد	تنه	**BRU17**	دورود	تنه
BRU4	خرم‌آباد	تنه	**BRU22**	دورود	تنه
BRU5	خرم‌آباد	تنه	**BRU26**	دورود	تنه
BRU10	خرم‌آباد	شاخه	**BRU29**	دورود	شاخه
BRU12	خرم‌آباد	تنه	**BRU30**	الشتر	شاخه
BRU13	خرم‌آباد	شاخه	**BRU35**	خرم‌آباد	شاخه
BRU14	خرم‌آباد	شاخه	**BRU39**	خرم‌آباد	شاخه

جدول ۳: ویژگی های ریخت شناسی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای سویه های *برنریا رابری‌فاشینس* جدا شده از درختان گردو در ایران.

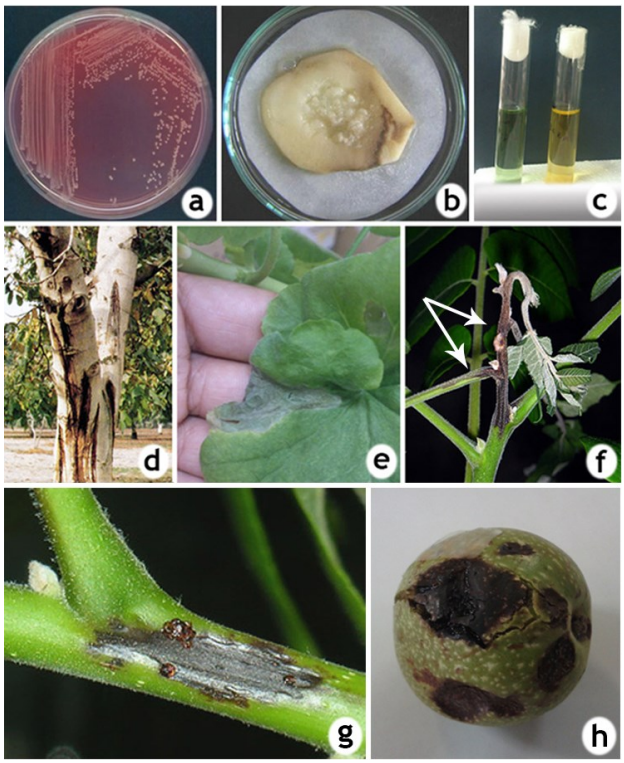
آزمون	واکنش	آزمون	واکنش
گرم	-	تولید گاز از گلوکز	-
اکسیداز	-	تولید انداسپور	-
کاتالاز	+	تولید اسید از:	
لوان	-	سوکروز و آرابینوز	+
فوق حساسیت روی شمعدانی و توتون	+	لاکتوز، آدونیتول	-
هیدرولیز آرژنین	-	سوربیتول و زایلوز	-
هیدرولیز ژلاتین	-	رایبوز و سلوبیوز	-
هیدرولیز اسکولین	+	رافینوز و رامنوز	-
حرکت swarming	+	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 ۳۳ درجه سلیسیوس	+	اگزالات	-
رشد در ۳۶ درجه سلیسیوس	-	دی-تارتارات	-(۷۱/۴۲ درصد)
اوره‌آز	-	ال-لوسین	-
تولید رنگدانه صورتی روی محیط KB	+	مانیتول	+
تولید رنگدانه قرمز روی محیط YDC	+	دولیستول	-(۷۸/۵۷ درصد)
تولید رنگدانه سبز متالیک روی EMB	+	ال-والین	+
لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی	+	سیترات	+
تحمل نمک طعام ۵ درصد	+	ال-سرین	-
O/F	+	دی- ال آلانین و دی ال تارتارات	-
احیای نیترات	-	مالونات	-

ج) علایم بیماری روی نهال و میوه‌های مایه‌زنی شده: در آزمون بیماری‌زایی روی نهال گردو سه ماه پس از مایه زنی علایمی به‌صورت نقاط نکروزه، لکه‌های آبسوخته و مناطق سیاه رنگ که در بعضی موارد همراه با ترشح شیرابه بود مشاهده گردید. همچنین هیچ علامتی در سرشاخه‌های مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل دیده نشد. در خصوص آزمون بیماری‌زایی روی میوه نارس گردو، در میوه‌هایی که با غلظت 10^8 cfu/ml مایه‌زنی شدند علائم بیماری به‌صورت لهیدگی کامل میوه، همراه با مناطق سیاه رنگ و نکروزه که مانند نهال‌های مایه زنی شده در بعضی موارد با ترشح شیرابه سیاه رنگی همراه بود مشاهده شد (شکل ۱).

د) شناسایی مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی: به منظور تایید نتایج حاصل از آزمون‌های فنوتیپی از واکنش زنجیره ای پلی‌مراز استفاده گردید. در این واکنش قطعه ژنتیکی مربوط به ژن اتواینداوسر سنتاز به طول ۶۷۱ جفت باز و قطعه ژنتیکی مربوط به ژن پپتید سنتاز به طول ۲۸۰ جفت باز در ۱۴ جدایه تکثیر شد (شکل ۲).

همچنین اندازه قطعات به دست آمده در مورد تمام نمونه‌ها یکسان بوده و تفاوتی از این نظر بین آنها مشاهده نشد. در کنترل منفی چنین باندی مشاهده نگردید که نشان دهنده اختصاصی بودن واکنش و درست عمل نمودن آغازگرها از نظر عدم وقوع واکنش غیراختصاصی بود.

ه) آنالیز 16S rDNA: به منظور شناسایی دقیق‌تر و اطمینان بیشتر، توالی ناحیه 16S rDNA دو جدایه BRU4 و BRU17، تکثیر و مشخص شد. به منظور مشخص شدن موقعیت فیلوژنیکی این دو جدایه در خانواده انتروباکتریاسه، با توالی

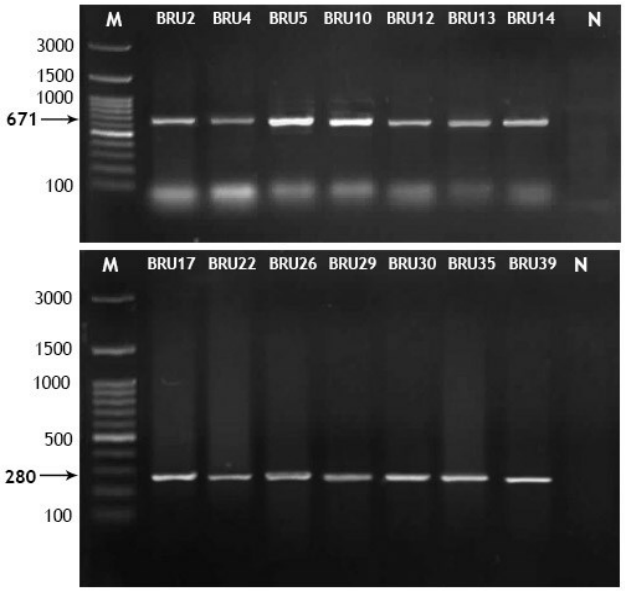


شکل ۱: نشانه‌های بیماری، ویژگی هایبیوشیمیایی و بیماریزایی باکتری *برنریا رابری‌فاشینس*. a: تولید رنگدانه قرمز رنگ بر روی محیط King B، b: لهیدگی ورقه سیب‌زمینی و تولید آنزیم پکتیناز، c: نمونه سبز شاهد و نمونه زرد واکنش مثبت استفاده از اسیدهای آمینه و قندها، d: ایجاد علایم شانکر و بروز شیرابه روی تنه گردو، e: ایجاد واکنش فوق حساسیت روی گیاه شمعدانی، f: سیاه شدن بافت و ایجاد پژمردگی در محل آلودگی شاخه نهال گردوی مایه زنی شده با سوسپانسیون باکتری *برنریا رابری‌فاشینس* در غلظت 10^8 cfu/ml. g: سیاه شدن بافت و خروج شیرابه باکتری در محل نهال گردوی مایه زنی شده با سوسپانسیون باکتری *برنریا رابری‌فاشینس* در غلظت 10^8 cfu/ml. h: لهیدگی میوه، همراه با مناطق سیاه رنگ و نکروزه.

گونه‌های نزدیک موجود در NCBI مقایسه شد (شکل ۳). نتایج نشان داد که جدایه BRU4 که از خرم‌آباد، از تنه درخت گردو جدا شده بود با جدایه NR119372.1 گونه *برنریارابری‌فاشینس*، ۹۷ درصد شباهت داشت و جدایه BRU17 که از دورود از شاخه درخت گردو جدا شده بود با جدایه GU942729.1 ۹۹ درصد شباهت داشت.

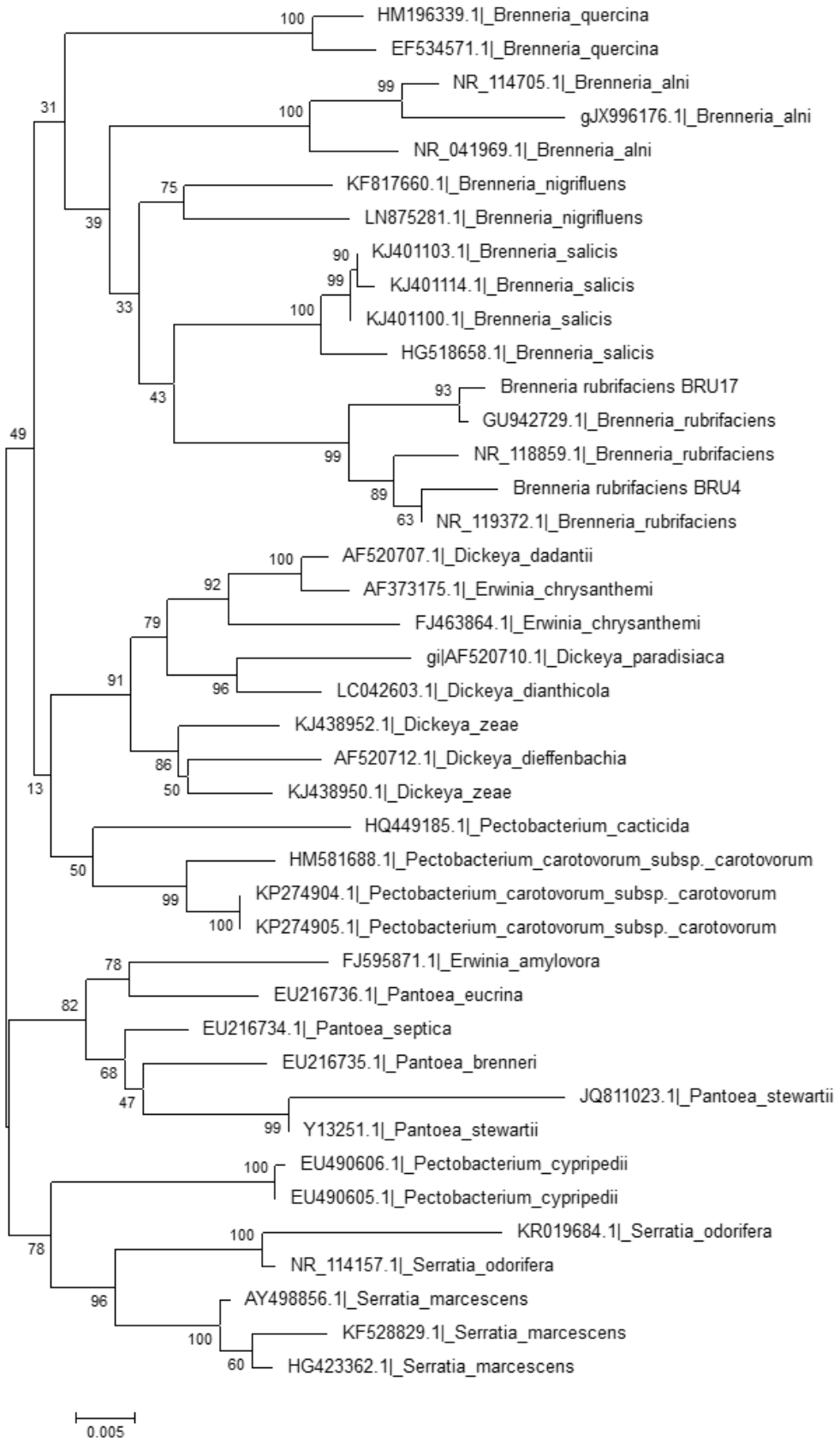
بحث

در بازدیدهای به عمل‌آمده از باغات گردو استان لرستان



شکل ۲: الگوی باندهای تکثیر شده جدایه‌های *برنریا رابری‌فاشینس* با استفاده از آغازگرهای 2BrIF/2BrIR و GSP2F/GSP2R. M) مارکر ۱۰۰ جفت بازی، N) کنترل منفی.

نمونه‌های مشکوک به علایم شانکر عمیق پوستی جمع‌آوری گردید. علایم این شانکر به‌صورت تیره شدن سطح خارجی پوست و در تابستان به‌صورت خروج شیرابه از تنه درختان گردو مشاهده گردید که یافته‌های سایر محققین در مورد علائم شناسی بیماری را تأیید می‌کند (۲۶ و ۲۷). از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌هایی به‌عنوان *برنریا رابریفاشینس* شناسایی شدند که با توصیف‌های کوان (Cowan)، شاد (Schaad) و همکاران در شناسایی گونه مطابقت داشت (۱۹ و ۲۸). کابلو (Cabello) و همکاران در سال ۲۰۱۶ با بررسی و مقایسه گونه‌های ایجاد کننده شانکر جنس *برنریا* نشان دادند که باکتری *برنریا رابری‌فاشینس* توانایی تولید اسید از سوکروز و آرابینوز را دارد. اما توانایی تولید اسید از سوربیتول، زایلوز، رافینوز و رامنوز را ندارد. این یافته‌ها با نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر مشابهت دارد. همچنین آنها مشخص کردند که تمامی جدایه‌ها اکسیداز مثبت و فاقد آنزیم پکتیناز هستند (۲۹). اما جدایه‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر اکسیداز منفی و دارای آنزیم پکتیناز بودند و توانستند در آزمون پکتیناز با تجزیه پکتین موجود در دیواره



شکل ۳: دندروگرام قرابت ترادف ناحیه 16S rDNA، دو جدایه BRU4 و BRU17 با برخی از جدایه‌های خانواده انتروباکتریاسه موجود در بانک اطلاعات NCBI.

سلولی موجب لهیدگی ورقه‌های سیب‌زمینی شوند.

بیوسکا (Biosca) و لوپز (Lopez) با بررسی ویژگی های فنوتیپی و بیوشیمیایی باکتری *برنریا رابریفاشینس* مشخص کردند که جدایه‌ها نسبت به آزمون اندول و تولید اسید از لاکتوز و آدونیتول واکنش منفی نشان دادند که با نتایج به‌دست آمده در این پژوهش مطابقت دارد. اما بر خلاف نتایج پژوهش حاضر جدایه‌ها قابلیت تولید گاز H_2S از پپتون و استفاده از سیترات را نداشتند (۲۳).

۲۷/۵۰ و ۱۱/۴۳ درصد از جدایه‌ها به ترتیب توانایی استفاده از دی تارتارات و دولیستول را داشتند. اما بقیه جدایه‌ها فاقد این توانایی بودند. دلیل این تغییرات را می‌توان واکنش متفاوت جدایه‌های دورود نسبت به آزمون دی‌تارتارات و جدایه‌های الشتر نسبت به آزمون دولیستول دانست. شانکر پوستی گردو توسط باکتری *برنریا نیگری‌فلوئنس* (*Brenneria nigrifluens*) عامل شانکر سطحی پوست و باکتری *برنریا رابریفاشینس* عامل شانکر عمیق پوست ایجاد می‌شود (۳۰).

امیرسرداری (Amirsardari) و همکاران در سال ۲۰۱۵ و جمال‌زاده (Jamalzadeh) و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی ویژگی های فنوتیپی باکتری *برنریا نیگری‌فلوئنس* (شانکر سطحی) جدا شده از درختان گردو نشان دادند که هیچ کدام از جدایه‌های باکتری بر روی محیط کشت YDC و King B تولید رنگدانه نکردند (۳۱ و ۳۲).

در پژوهشی دیگر محققین با بررسی ژن‌های دخیل در تولید رنگدانه رابری فاشینس، سعی در انتقال این ژن به سویه های *برنریا نیگری‌فلوئنس* و *برنریا سالیسیس* (*Brenneria salicis*) داشتند که نهایتاً ژن تولید کننده این رنگدانه در باکتری‌های مورد آزمون بروز پیدا نکرد و هیچکدام از باکتری‌ها قادر به ایجاد رنگدانه نشدند (۳۳).

اما تمام جدایه‌های باکتری *برنریا رابریفاشینس* در پژوهش حاضر روی محیط کشت YDC و King B تولید رنگدانه قرمز تا صورتی رنگ (رابری‌فاشینس) کردند. تولید رنگدانه و بیماری‌زایی باکتری در کنترل خودالقاگرها یا سیگنال‌های مولکولی و سیستم حساسیت جمعیتی(کروم سنسینگ) است.

این سیستم فرآیند هماهنگی و ارتباط بین سلولی که شامل تولید سیگنال‌های مولکولی خارج سلولی و قابل انتشار و در پی آن تنظیم بیان ژن ها، از جمله ژن های بیماری زایی است (۳٤). در باکتری های گرم منفی‌ها آسیل هموسرین لاکتون ها (AHL) عمده ترین خودالقاگرها با وزن مولکولی پائین هستند و می توانند ارتباط‌های داخل گونه ای را برقرار نمایند (۳۵). زمانی که غلظت سیگنال‌ها به حد آستانه برسد، این امکان فراهم می شود که باکتری های *برنریا رابری فاشینس* تراکم توده سلولی موجود را درک و در پاسخ، ژن‌های موثر در تولید رنگدانه را بیان نمایند (۳٦).

ارتباط سیگنالینگ و بیان ژن‌های تولید رنگدانه، عامل ایجاد پاسخ فوق حساسیت و بیماری‌زایی در باکتری حامل آن می‌باشد و به عبارتی دیگر دامنه میزبانی بیمارگر را تعیین می‌کند. اختلال و موتاسیون در این ژن‌ها باعث از بین رفتن بیماری‌زایی و پاسخ فوق حساسیت روی میزبان می‌شود (۳۷ و ۳۸).

در بررسی به عمل آمده از ویژگی حاضر برای جداسازی اولیه این‌گونه با سایر گونه‌های جنس *برنریا* استفاده شد. به منظور اطمینان از تشخیص صحیح تمامی جدایه‌ها که بر اساس ویژگی های فنوتیپی *برنریا رابری‌فاشینس* شناخته شده بودند از واکنش زنجیره ای پلی‌مراز و آغازگرهای اختصاصی 2BrIF/2BrIR و GSP2F/GSP2R طراحی شده بر اساس ژن‌های دخیل در تولید رنگدانه رابری‌فاشینس استفاد شد. تعداد ١٤ جدایه شناسایی شده در خصوصیات فنوتیپی، قطعات ژنتیکی به طول ٦٧١ و ۲۸۰ جفت بازی را تکثیر کردند که با اندازه قطعه تکثیر شده در نتایج تاپا (Thapa) و همکاران و مک‌کلین (McClean) و همکاران مطابقت دارد (۳۹ و ٢٤).

با توجه به مشخصات اقلیمی نقاطی که بیماری شانکر پوستی گردو، برای اولین بار در دنیا از آنجا گزارش شده (ایالت کالیفرنیا)، نشان دهندهٔ این مطلب است که درجه حرارت، نقش به سزایی درگسترش و محدودیت جغرافیایی این باکتری دارد. در منطقهٔ ساکرامنتو از ایالت کالیفرنیا، بیماری بیشتر در نواحی مرکزی این منطقه وجود داشته و گزارش شده که نسبت به بقیهٔ

مناطق گرمتر هستند. ضمناً درصد شیوع این بیماری و اندازه لکه‌ها در مناطق سردتر، با مقدار و شدت کمتری گزارش شده است (٤٠). طبق بررسی‌های انجام گرفته در اسپانیا که این بیماری از آن نقاط گزارش شده، نقش افزایش دما برای ظهور و گسترش بیماری، تأیید شده است (٤١).

درختانی که به هر طریق در معرض استرس‌های محیطی نامناسب، مانند تنش آبیاری و یا تغذیهٔ ناکافی قرار می گیرند، زودتر و بیشتر به این بیماری دچار می‌شوند. همچنین در چندین مورد درختانی که در تنه و شاخهٔ خود، در اثر حملهٔ پرندگان، حشرات، انسان یا عوامل مکانیکی دیگر دچار زخم و ترک خوردگی شده‌اند، دچار بیماری شانکر عمیق پوستی و شانکر قارچی گردیده‌اند.

به نظر می‌رسد که ایجاد زخم در بافت‌های پوست تنه و شاخه، یکی از راه‌های لازم و ضروری برای نفوذ باکتری و سایر عوامل بیماری‌زا باشد. در همین رابطه محققین با بررسی ویژگی های زیست‌شناسی باکتری عامل بیماری نشان دادند که بیمارگر می‌تواند در ارقام مختلف گردو ایجاد آلودگی پنهان کند. همچنین مشخص کردند که باکتری *برنریا رابری‌فاشینس* از طریق زخم و روزنه‌ها وارد بافت آوندی به ویژه آوند آبکش می‌شود و در آنجا استقرار می‌یابد (٤٢).

وقتی که میزبان تحت تاثیر تنش (آبی و خشکی) و تغییرات آب و هوایی قرار می‌گیرد، باکتری ها فعال و داخل آوندها تکثیر پیدا می کنند و با تولید پکتینازها و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی باعث تخریب دیواره سلولی و انسداد آوندها شده و در انتقال آب و مواد غذایی اثر می‌گذارد (٤٣). برای پیشگیری بیماری باید از انتقال نهال‌های آلوده به مناطق غیر آلوده جلوگیری کرد و بایستی از نهال‌های سالم دارای گواهی بهداشت به منظور احداث باغ استفاده نمود.

همچنین یافتن ژنوتیپ‌های مقاوم و یا متحمل در میان توده‌های بومی ضروری است. در صورت بروز آلودگی هرس شاخه‌ها ۳۰ سانتی‌متر پایین‌تر از محل‌های عفونی انجام گیرد. تراشیدن شانکرهای تنه در محل آلودگی و بلافاصله سم‌پاشی درختان با غلظت مناسب از سموم مسی (اکس کلرورمس یا محلول بوردو)، و پانسمان محل زخم‌ها با چسب باغبانی در دو تا سه نوبت به فاصله ۲۰ روز در جلوگیری از توسعه و تشدید بیماری و به تعویق انداختن مرگ درختان بیمار مؤثرند. همچنین درختان شدیدا آلوده باید حذف شوند.

حفظ این درختان باعث می‌شود که بیماری برای همیشه در باغات وجود داشته باشد. شایان یادآوری است که قسمت‌های تراشیده و هرس شده نیز باید پس از انجام عملیات هرس سوزانده شوند. با توجه به وقوع این بیماری در ایران و پیشرفت آن در استان لرستان و از آنجا که مهم‌ترین شرط برای کنترل بیماری، شناسایی و پی بردن به تنوع ژنتیکی است، ضرورت پایش بیشتر و انگشت نگاری ژنتیکی سویه های این باکتری در مناطق مختلف کشور، به منظور شناسایی کانون‌های آلودگی و جلوگیری از گسترش بیماری وجود دارد.

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که باکتری *برنریا رابری فاشینس* علایم مخرب و شدیدتری روی درختان گردو در مقایسه با *برنریا نیگری‌فلوئنس* باکتری عامل شانکر سطحی پوستی گردو ایجاد می‌کند. همچنین تلقیح جدایه‌های باکتری روی میوه نارس گردو و ایجاد علایم مشخص کرد که این تکنیک می‌توان جایگزین تکنیک تلقیح روی نهال که زمان بر است بشود و محقق در زمان بسیار کوتاهتری به نتیجه مورد نظر برسد. در ضمن شناسایی مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس ژن‌های مداخله کننده در تولید رنگدانه روشی سریع و مطمئن برای تفکیک باکتری یاد شده از سایر گونه‌های جنس *برنریا* می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آقای رضا امیرسرداری کارشناس آزمایشگاه و همکاران واحد حمایت و حفاظت مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان لرستان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنـان را دارند.

References

1. 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. [In Persian]
2. Fruto D. Bacterial diseases of walnut and hazelnut and genetic resources. J Plant Pathol. 2010; 92(1): 79-85.
3. Amirsardari V, Sepahvand S, Madani M. Identification of deep bark canker agent of walnut and study of its phenotypic, pathogenic, holotypic and genetic diversity in Iran. J Plant Interactions. 2017; 12(1): 340-347.
4. Mcclean AE, Sudarshana P, Kluepfel DA. Enhanced detection and isolation of the walnut pathogen *Brenneria rubrifaciens*, causal agent of deep bark canker. Eur J Plant Pathol. 2008; 122: 413-424.
5. Mazzaglia A, Fabi A, Belisario A, Librandi I, Cefalo G, Varvaro L, Anselmi N. Bark cankers of English walnut: an emerging disease. Acta Hortic. 2006; 70(5): 437-441.
6. Kado CI, Gardner JM. Transmission of deep bark cankers of walnuts by the mechanical harvester. Plant Dis . 1977; 61(4): 321-325.
7. Li Y, Fang W, Xue H, Liang W, Wang LF, Tian GZ, Wang XZ, Lin Cl, Li X. *Brenneria populi* sp. nov., isolated from symptomatic bark of *Populusxeur americana* canker. Int J Syst Evol Microbiol. 2015; 65(2): 432-437.
8. Hauben L, Moore ERB, Vauterin L, Steenaekers M, Mergaert J, Verdonek L, Swings J. Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. Syst Appl Microbiol. 1998; 21: 384-397.
9. Gonzalez R, Lopez M, Biosca EG, Lopez F, Santiago R, Lopez MM. First report of bacterial deep bark canker of walnut caused by *Brenneria* (*Erwinia*) *rubrifaciens* in Europe. Plant Dis. 2002; 86(6): 696- 701.
10. Lopez B. Plagas Reglamentadas bajo el Sistema Na-cional de Vigilancia Epidemiológica Fitosanitaria. Agri Soc Desa. 2013; 10(3): 283-303.
11. Pardatscher R, Schweigkofler W. Microbial biodi-versity associated with walnut *Juglans regia* L. in south Tyrol (Italy). Mitt Klosterneuburg. 2009; 59: 17-23.
12. Pacheco AR, Sperandio V. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host. Curr Opin Microbiol. 2009; 12(1): 192- 198.
13. Feistner G, Korth H, Budzikicz H, Pulverer G. Rubrifacine from *Erwinia rubrifaciens*. Curr Clin Microbiol Rep. 1982; 10(3): 169-172.
14. 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 Dis. 2014; 97(11): 1504.
15. Vegh A, Toth A, Zambo A, Borsos G, Palkovics L. First report of bacterial bark canker of walnut caused by *Brenneria nigrifluens* in Hungary. J Plant Dis. 2015; 98(7): 988.

16. Palacio-Bielsa A, Cambra MA, Lopez MM. PCR detection and identification of plant-pathogenic bacteria: updated review of protocols (1989-2007). J Plant Pathol. 2009; 91: 249-297.

17. Abbasi V, Rahimian H, Tajick-Ghanbari A. Genetic variability of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker disease of stone fruits. Eur J Plant Pathol. 2013; 135: 225-235.

18. Dehghan- niri M, Rahimian H. Assessment of genetic diversity of yeast isolates causing canker in stone fruit trees in some central provinces of Iran. Iran J Plant Pathol. 52(2); 199- 215. [In Persian]

19. Schaad NW, Jones JB, Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. American Phytopathology Soc. St. Paul, MN, USA. 2001.

20. Falahi Charkhabi N, Shamsbakhsh M, Rahimian H, Khodayegan P. Identification of *Brenneria nigrifluens* isolates. Iran J Plant Pathol. 2011; 47(3): 263-277. [In Persian]

21. Moretti C, Buonaurio R. Immature walnut fruit inoculation for evaluation of *Brenneria nigrifluens* pathogenicity. Phytopathol Mediterr. 2010; 49: 80-83.

22. Taghipour M, Rahimian H, Babaei zad V. Genetic diversity of strains of *Acidovorax oryzae* causal agent of brown stripe of rice in Mazandaran province. Iran J Plant Pathol. 2016; 51(1): 11-25. [In Persian]

23. Biosca EG, Lopez 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.

24. McClean AE, Sudarshana P, Kluepfel DA. Development of PCR-based method for the detection of *Brenneria rubrifaciens* the causal agent of deep bark canker of walnut. J Walnut Res Rep. 2006; 25(1): 327-331.

25. Poza-Carrion C, Aguilar I, Gallego F, Nunez-Moreno Y, Biosca E, Gonzalez R, Lopez M, Rodrguez-palenzuela, P. *Brenneria quercina* and *Serratia spp*. isolated from Spanish oak trees: molecular characterization and development of PCR primers. J Plant Pathol. 2008; 57(2): 308-319.

26. Teviotdale BL, Sibbett GS, Fitch L, Harper DH. Budwood transmission of *Erwinia rubrifaciens*, causal agent of deep bark canker disease of English walnut. J Plant Dis. 1991; 75: 360-363.

27. Loreti S, Galleli A, Piccirillo P, Belisario A. Bac-terial bark canker on English walnut. Acta Hortic . 2006; 70(5): 433-435.

28. Cowan ST. Manual for the identification of medical bacteria. 3rd ed. Cambridge. Cambridge University Press; 1995.

29. Cabbelo JA, Valdes RA, Chaves EC, Bache MB. Review of diagnosis techniques for *Brenneria* spp in walnut (*Juglans regia*). Re Mex FITOPATHOL. 2016; 34(2): 158-172.

30. Yousefi Kopaei F, Taghavi M, Banihashemi Z. Occurrence of shallow bark canker of walnut

(*Juglans regia*) in southern provinces of Iran. J Biol Sci . 2007; 10: 1507-1512.

31. Amirsardari V, Darvishniya M, Mirzaei H. 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. J Microb World. 2015; 8(2): 120-129. [In Persian]

32. Jamalzade A, Shamsbakhsh M, Rahimian H. Genetic diversity of *Brenneria nigrifluens* strains in north of iran (margin of caspian sea). J Cre Agr. 2012; 150(2): 57-68.

33. McClean AE, Kluepfel DA. Genetic loci involved in rubrifacine production in the walnut pathogen *Brenneria rubrifaciens*. *Bacteriol.* 2009; 99(2): 145-151.

34. Kusari P, Kusari S, Spiteller M, Kayser. Implications of endophyte-plant crosstalk in light of quorum responses for plant biotechnology. Appl Microbiol Biotechnol. 2015; 99: 5383-5390.

35. Schikora A, Schenk ST, Hartmann A. Beneficial effects of bacteria-plant communication based on quorum sensing molecules of the*N*-acyl homoserine lactone group. Plant Mol Biol. 2016; 90(6): 605-612.

36. Hense BA, Schuster M. Core principles of bacterial autoinducer systems. Microbiol Mol Biol Rev. 2015; 79: 153-169.

37. Hartmann A, Rothballer M, Hense BA, Schroder P. Bacterial quorum sensing compounds are important modulators of microbe–plant interactions. Front Plant Sci. 2014; 5: 131-134.

38. McClean AE, Breck A, Duerkop E, Greenberg P, Kluepfel D A. AHL Signals Induce Rubrifacine Productionin a *bru*I Mutant of *Brenneria rubrifaciens.* J Phythopathol. 2012; 102 (2): 195- 203.

39. Thapa SP, Lim CK, Kim SK, Cho JM, Hur JH, Park DH. Direct detection of *Brenneria rubrifaciens* by PCR-based assay using rubrifacine synthetic gene. Afr J Microbiol Res. 2010; 4: 1754-1757.

40. Shaad NW, Heskett MG, Gardner JM, Kado CI. Influence of inoculum dosage, time after wounding, and season on Infection of persian Walnut trees by *Erwinia rubifaciens*. J PhytoPathol. 1973; 63(3): 327-329.

41. Belisario A, Maccaroni M, Corazza L, Balmas V, Valier A. Occurrence and etiology of brown apical necrosis on Persian (English) walnut fruit. J Plant Dis. 2002; 86(2): 599-602.

42. Audrain B, Farag MA, Ryu CM, Ghigo JM. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. FEMS Microbiol Rev. 2015; 39: 222-233.

43. Mcclean AE, Kluepfel DA. Biology of *Brenneria rubrifaciens*: screening for genes involved in pathogenesis. Available at: http://cekings.ucanr.edu/files/19273.pdf (September, 2010).

Journal of Microbial World
Volume 10, No. 3, September 2017

Original Article

Study of the morphological characteristics and tracing of the genes involved in rubrifacien pigment production in *Brenneria rubrifaciens* as the agent of deep bark canker in Walnut

Vahid Amirsardari[1], **Mitra Omidi nasab**[2], **Karam Sepahvand**[3], **Hamed Nazari**[4]

[1]M.Sc. Department of Plant Protection, Faculty Agriculture, Lorestan University, Lorestan, Iran.
[2]M.Sc. Department of Plant Protection, Faculty Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
[3] Ph.D. student, The Agriculture and Natural Research Center and Education of Lorestan, Iran.
[4] M.Sc., The Agriculture and Natural Research Center and Education of Lorestan, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Deep bark canker is a disease which is caused by *Brenneria rubrifaciens*, and reduces the quality and quantity of Walnut fruits. This study was performed to identify the bacterial agent of deep bark canker based on morphological characteristics, pathogenicity and using specific primers for the genes involved in rubrifacien pigment production.
Materials & Methods: This cross-sectional- descriptive study was performed on walnut trees with canker symptoms in Lorestan Province. Following purification, bacterial identification was performed using the phenotypic characteristics of the bacterial isolates. Further evaluation of the canker agent was carried out using 2BrIF/2BrIFR and GSP2F/GSP2R primers. Also, the virulence properties of the bacteria were tested on walnut seedling and fruits.
Results: Based on the phenotypic characteristics, 14 isolates were identified as *B. rubrifaciens*. 671 and 280 bp fragments were amplified in the isolates the during PCR test. In pathogenicity test, symptoms of a rotted and blackened tissue were observed at the site of inoculation. In the phylogenetic analysis, two isolates showed 97% and 98% homology with the bacterial isolates identified in the Genbank.
Conclusion: Comparing other methods, PCR using specific primers is a fast, functional and highly sensitive method to detect *B. rubrifaciens*. Based on our results on the pathogenicity potential of the strains and the occurrence of the symptoms on walnut seedlings, the pathogen under favorable conditions suffers severe damage to the trees.
Keywords: *Brenneria rubrifaciens*, Deep bark canker, Virulence factors.

Correspondence to: Vahid Amirsardari
Tel: +98 9160814768
E-mail: v.amirsardari@yahoo.com
Journal of Microbial World 2017, 10(3): 243-255.