

مطالعه بیماری شانکر سطحی پوست گردو در استان کرمان

الهه صادقی^۱، پژمان خدایگان^{۲*}، احمد حسینی^۳ و روح الله صابری ریشه^۲

۱، ۲ و ۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۱ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۸)

چکیده

بیماری شانکر پوستی گردوی ایرانی (*Juglans regia* L.) با عامل *Brenneria nigrifluens* یکی از بیماری‌های مهم درختان گردو است. تشخیص به موقع عامل بیماری، نقش مهمی در جلوگیری از خسارت‌های جبران‌ناپذیر آن دارد. در پژوهش حاضر، ۵۷ جدایه از درختان دارای علائم بیماری، از مناطق مختلف استان کرمان جمع‌آوری شدند. جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی به دو گروه تقسیم شدند. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و تکثیر قطعه‌ای از DNA به طول ۲۵۵ جفت باز، جدایه‌های متعلق به گونه *B. nigrifluens* از عوامل همراه با عامل بیماری، تفکیک شدند. بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی میوه‌های نارس گردو ارزیابی شد. جهت شناسایی مولکولی برخی جدایه‌ها، بخشی از اپران ریوزومی نیز در آن‌ها تکثیر و توالی‌یابی شد. نتایج نشان دادند که باکتری *B. nigrifluens* با تنوع ژنتیکی قابل‌ملاحظه، در مناطق مختلف گردو کاری استان کرمان گسترش داشته و افزون بر آن، عوامل دیگری از جنس *Gibbsiella* نیز می‌توانند در ایجاد یا تشدید علائم بیماری دخالت داشته باشند که نیازمند پژوهش‌های دیگری است.

واژه‌های کلیدی: برنریا، شانکر سطحی گردو، کرمان.

Study on shallow bark canker disease of walnut in Kerman province

Elale Sadeghi¹, Pejman Khodaygan^{2*}, Ahmad Hosseini³ and Roohallah Saberi-Riseh²

1. M. Sc. Student, Associate Professor and Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Kerman, Iran
(Received: Jan. 30, 2017 - Accepted: Mar. 19, 2019)

ABSTRACT

Walnut is one of the important nuts with a high economic value. Shallow bark canker, caused by *Brenneria nigrifluens*, is one of the most dangerous diseases of the walnut trees. Early detection of the causal agent has an important role in preventing economic and irreparable losses caused by this disease. In this study, 57 bacterial strains were isolated from walnut trees with the typical lesions of the shallow bark cankers from different regions of Kerman province. These isolates were divided into two groups, based on phenotypic and biochemical characteristics and then, amplification product of the expected size (255 bp) was obtained with genomic DNA using specific pair primers in *B. nigrifluens* isolates. Pathogenicities of the isolates were assessed on immature walnut fruits. To identify the causal and the associated bacteria molecularly, a part of *16s rDNA* gene sequence was analyzed. Results showed that *B. nigrifluens* with a significant genetic diversity spread over different regions of Kerman province. In addition, the genus *Gibbsiella* can probably contribute to the increase of the disease severity, which requires further studies.

Keywords: *Brenneria*, Kerman province, Shallow bark canker of walnut.

* Corresponding author E-mail: Pkhodaygan@vru.ac.ir

مقدمه

گردو (*Juglans spp.*) یکی از قدیمی‌ترین گونه‌های گیاهی در کره زمین است که از دوران سوم زمین‌شناسی وجود داشته و از نظر چوب و میوه استفاده شده است. کشور ایران دارای رویشگاه‌های وسیع گردو است. دامنه‌های رشته‌کوه البرز، زاگرس و شهرهای تویسرکان، تفرش، خوانسار و مناطق وسیعی از استان کرمان از مراکز عمده گردو کاری کشور هستند. استان کرمان مقام اول سطح زیر کشت گردو را در کشور دارد. درختان گردو، مورد حمله عوامل بیماری‌زای متعددی قرار می‌گیرند. یکی از دلایل مهم کاهش تولید، کمیت و کیفیت این محصول، بیماری شانکر پوستی باکتریایی است. شیوع این بیماری در مناطق مرطوب و پرباران بیش‌تر بوده و خسارت زیادی را به باغ‌های گردو وارد ساخته و با تضعیف درختان گردو سبب ایجاد خسارت می‌شود (Saccardi *et al.*, 1998). علائم این بیماری به‌صورت شانکرهای نامنظم و کم‌عمق در پوست تنه و شاخه‌ها دیده می‌شود و گاهی با پیشروی بیماری در فصل تابستان، پوست از محل لکه‌ها، شکاف برداشته و شیرابه قهوه‌ای تیره‌رنگ از محل شکاف‌های کوچک زیر پوست خارج می‌شود (Moretti *et al.*, 2007). مراحل اولیه بیماری به علت به وجود آمدن نواحی متورم در سطح پوست که اغلب هم‌رنگ بافت سطحی هستند، مشهود نبوده ولی به‌مرور، نقاط متورم که به حالت مجتمع بوده، پاره شده و شیرابه قهوه‌ای تیره‌رنگی به بیرون تراوش می‌کند. علائم بیماری در اکثر موارد محدود به ناحیه پوست است (Scortichini, 1999). عامل بیماری برای اولین بار از کالیفرنای آمریکا (Wilson *et al.*, 1957) و پس‌از آن به ترتیب از ایران (Rahimian, 1989)، اسپانیا (Lopez *et al.*, 1994)، ایتالیا (Morone *et al.*, 1998; Saccardi *et al.*, 1998; Scortichini, 1999) و فرانسه (Menard *et al.*, 2004) گزارش شده است. در ایران، اولین بار از ساری و نکا (Rahimian, 1989) و پس‌از آن از سایر مناطق استان مازندران (Harighi & Baradaran & Ghasemi, 1997)، کرمان (Rahimian, 1997) و کردستان (Harighi, 2006)، فارس و کهگیلویه و بویراحمد (Yousefikopaei *et al.*, 2007) گیلان و

گلستان (Jamalizadeh *et al.*, 2009) و لرستان (Amirsardari *et al.*, 2015) گزارش شد. در ایران این بیماری محدود به مناطق مرطوب و پرباران نبوده و در مناطقی که بارندگی متوسطی دارند نیز شیوع دارد. از آنجاکه این بیماری به‌عنوان یک تهدید جدی برای گیاهان موجود در نهالستان‌ها و درختان بالغ محسوب می‌گردد، روش‌های سریع شناسایی دارای اهمیت است (Moretti *et al.*, 2007). با توجه به اینکه تنها یک گزارش از وجود این بیماری در استان پهن‌اور کرمان که بیشترین باغ‌های گردوی ایران را دارد، وجود داشته و اطلاعات دقیق و کامل دیگری در خصوص وضعیت بیماری، شیوع و پیشروی آن در مناطق عمده گردو کاری این استان، وجود ندارد، بررسی و شناسایی دقیق بیمارگر به‌عنوان نخستین قدم در جمع‌آوری اطلاعات بیماری‌شناسی، ضروری بود. تاکنون گزارش بیماری از استان کرمان مربوط به شهرستان بافت بوده و در خصوص سایر مناطق اطلاعاتی در دست نیست. مشاهده علائم بیماری در دیگر مناطق استان، ضرورت انجام گسترده‌تر پژوهش را ایجاد نمود. هدف این پژوهش، بررسی وضعیت بیماری و عامل آن در مناطق مختلف گردو کاری استان کرمان بوده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌ها

در بهار و تابستان ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ از تمام مناطق عمده گردو کاری استان کرمان (باغ‌های اطراف شهرهای بافت، بردسیر، زرد، جیرفت، شهربابک، رفسنجان و کرمان) نمونه‌های مشکوک به بیماری، جمع‌آوری و جهت بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند. بافت‌های آلوده پس از ضدعفونی سطحی، بر سطح محیط کشت آگار غذایی مخطط گردیده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Schaad *et al.*, 2001). پس از واکشت جدایه‌های خالص‌سازی شده روی محیط کشت ائوزین متیلن بلو آگار (EMB-Agar)، تولید جلای فلزی سبز توسط آن‌ها بررسی شد.

خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها

برای به‌دست‌آوردن باکتری خالص، کلنی‌هایی با رنگ

باکتری‌ها بر روی محیط کشت EMBA انجام شد (Moretti & Buonauro, 2010).

بررسی ویژگی‌های ژنوتیپی جدایه‌ها

اسید نوکلئیک جدایه‌ها به روش معمول فنل-کلروفرم، با اندکی تغییر استخراج شد (Habibi & Khodaygan, 2015). برای تشخیص گونه *B. nigrifluens* واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی F₁ و C₃ (جدول ۱) انجام شد.

مقایسه الگوی اثرانگشتی DNA ژنومی جدایه‌ها با استفاده از نشانگرهای rep-PCR

به منظور بررسی شباهت جدایه‌ها، الگوی اثرانگشت ژنومی آن‌ها با استفاده از آغازگرهای ERIC-PCR و BOX-PCR، با توالی موجود در جدول ۱، بر اساس روش Versalovic *et al.* (1991) تهیه و مقایسه شد. ترسیم دندروگرام‌ها با استفاده از نرم‌افزار NTSYS انجام شد.

تعیین ترادف ژن 16s rDNA

به منظور تأیید شناسایی جدایه‌ها و به عنوان یک روش استاندارد، بخشی از ناحیه 16s rDNA در سه جدایه عامل و دو جدایه همراه با بیماری، با استفاده از آغازگرهای 63f و 1387r ذکر شده در جدول ۱ تکثیر و تعیین توالی شدند. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز یک درصد در اختلاف پتانسیل ثابت ۷۰ ولت همراه با نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی محصول شرکت Thermo fisher انجام شد. ژل به وسیله رنگ آشکارساز red Safe رنگ آمیزی و به وسیله دستگاه ژل داکيومنت تصويربرداری شد.

و شکل متفاوت، مجدداً روی محیط کشت NAS مخطط گردیدند. به منظور نگهداری جدایه‌ها، سوسپانسیون غلیظ از کشت جوان هر جدایه در دمای ۴ درجه سلسیوس و همچنین برای نگهداری طولانی مدت، باکتری‌ها در محیط آبگوشت غذایی حاوی ۵۰ درصد گلیسرول، در دمای ۸۰- درجه سلسیوس قرار گرفت. تمامی جدایه‌ها از لحاظ ویژگی‌های فیزیولوژیکی، مرفولوژیکی و بیوشیمیایی و بر اساس روش‌های مرسوم باکتری‌شناسی بررسی شدند (Schaad *et al.*, 2001).

آزمون بیماری‌زایی

میوه‌های نابالغ گردو با قرار گرفتن در محلول کل ۷۰ درصد، به مدت پنج دقیقه ضدعفونی و روی کاغذ صافی استریل خشک شدند. سوسپانسیون غلیظ از کشت تازه باکتری، به غلظت ۱۰^۸cfu/ml در بافر فسفات (Phosphate Buffered Saline) تهیه گردید. سوسپانسیون باکتری به دو روش به مزوکارپ میوه گردو تزریق شد. در روش اول سوسپانسیون باکتری توسط سرنگ به میوه تزریق شد و در روش دوم، شکاف مثلثی شکل با عمق حدود یک سانتی‌متر در میوه ایجاد شده و سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری توسط سرنگ در این شکاف‌ها وارد شد. از بافر فسفات استریل به عنوان شاهد استفاده گردید. جهت حفظ رطوبت، میوه‌های مایه‌زنی شده درون دسیکاتور حاوی آب مقطر استریل و در انکوباتور با دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. ظهور علائم روی میوه به مدت ۱۰ روز به صورت روزانه بررسی شد. پس از مشاهده علائم، جداسازی مجدد

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش

Table 1. Primers used in this study

Primer name	Sequence	The length of expected band	Reference
F ₁	5'-CCTGCGCCATGTTGCCAGATCGTAT-3'	255bp	(Loreti <i>et al.</i> , 2008)
C ₃	5'-ACCTGAGTAGCAGTTTCGACTATTT-3'		
ERIC1R	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'	-	(Versalovic <i>et al.</i> , 1991)
ERIC2	5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'	-	
BOX	5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	-	(Versalovic <i>et al.</i> , 1991)
63f	5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3'	1500bp	(Marchesi <i>et al.</i> , 1998)
1387r	5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGC-3'		

بررسی نقش احتمالی جدایه‌های همراه با بیماری

توان جدایه‌های همراه با بیماری در ایجاد علائم بر روی بافت گردوی تازه به روش ذکرشده در بند قبل بررسی شد. پس‌از آن، به منظور بررسی احتمال اثر آنتاگونیستی جدایه‌های همراه با عامل بیماری، از روش متفاوتی استفاده شد. جدایه‌های همراه با بیماری و تعدادی جدایه اپی‌فیت که قبلاً از سرشاخه‌های درختان میوه و از مناطق مختلف استان البرز جداسازی شده و هیچ‌گونه فعالیت بیماری‌زایی روی گردو نداشتند، بررسی شدند. در روش متداول غربالگری، بررسی بازدارندگی از رشد در محیط کشت جامد به صورت کشت دوطرفه انجام شد. ظهور هاله‌ی بازدارنده تا یک هفته پس از مایه‌زنی باکتری‌ها بررسی شد. در روش دوم، جدایه‌های در ۲ میلی‌لیتر محیط کشت مایع LB (Luria-Bertani) به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور گرداننده با دور rpm ۱۲۰، کشت داده شدند. به منظور جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست از محیط کشت و دست‌یابی به متابولیت‌های تولیدشده توسط هر جدایه، سوسپانسیون‌ها دو بار درون سانتریفیوژ با دور rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. جهت اطمینان از عدم حضور سلول‌های باکتریایی، چند میکرولیتر از فاز روشن‌شده بر سطح محیط کشت آگار غذایی مخطط گردید. سوسپانسیون باکتری بیمارگر *B. nigrifluens* در محیط کشت LB، با غلظت 10^3 cfu/ml تهیه شد. برای سنجش، از پلیت ۹۶ خانه‌ای الیزا استفاده شد. تیمارها شامل مخلوطی از سوسپانسیون بیمارگر و متابولیت آنتاگونیست‌ها، بیمارگر، محیط کشت LB خالص و متابولیت هر آنتاگونیست بود. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. پلیت‌های الیزا به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور گرداننده با دور rpm ۱۰۰ قرار داده شدند و سپس میزان کدورت هر چاهک که بازتابی از رشد باکتری بود، توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در سه طول موج ۴۵۰، ۵۵۰ و ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

در این پژوهش ۵۷ جدایه از مناطق مختلف استان و از درختان گردوی دارای علائم بیماری، جمع‌آوری شدند. جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی (استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی) به دو گروه عامل بیماری و جدایه‌های همراه با عامل بیماری

تقسیم‌بندی شدند. کاربرد آغازگرهای اختصاصی سبب تکثیر قطعه ۲۵۵ جفت بازی در ۳۰ جدایه گردید. این جدایه‌ها، گرم و اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت بودند. همه این جدایه‌ها، بی‌هوازی اختیاری بوده و توان تولید کلنی با جلای سبز فلزی در محیط کشت EMB و القای واکنش فوق حساسیت در شمعدانی را داشتند. هیچ‌کدام تولید آنزیم پروتئاز، لستیناز و آمیلاز نکرده و در تولید رنگ فلورسنت روی محیط King's B و رنگ‌دانه صورتی روی محیط YDC ناتوان بودند. نتایج سایر آزمون‌های انجام‌شده بر روی این جدایه‌ها در جدول ۲ ذکر شده‌اند. این ۳۰ جدایه توان ایجاد علائم بیماری روی میوه گردوی نابالغ را داشتند و بر اساس دستورالعمل شناسایی این بیمارگر (Moretti et al., 2007) که مورد تأیید سازمان قرنطینه اروپا است، می‌توان آن‌ها را متعلق به گونه *B. nigrifluens* دانست.

۲۷ جدایه که در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه *B. nigrifluens* هیچ‌گونه بانندی نداشتند به‌عنوان گروه دوم یعنی جدایه‌های همراه با عامل بیماری در نظر گرفته شدند. در خصوص جدایه‌هایی که افزون بر بیمارگر از بافت جداسازی گردیدند، یکی از فرضیه‌های زیر محتمل و لازم بود تا برای به دست آوردن نتیجه قطعی بیشتر بررسی شود. جدایه‌های همراه می‌توانند ساپروفیت یا اپی‌فیت‌هایی باشند که هیچ‌گونه تأثیری بر بیماری یا کاهش و گسترش علائم آن ندارند. این فرضیه با بررسی توان ایجاد علائم در میوه‌های نارس گردو بررسی شد. ۲۱ جدایه توان ایجاد هیچ‌گونه علائمی بر میوه‌های نابالغ گردو را نداشته و بیشتر بررسی نشدند. هشت جدایه توان ایجاد شبه علائمی بر روی میوه‌های نارس گردو را داشتند. ویژگی‌های فنوتیپی هشت جدایه بررسی شدند که نتایج در جدول ۳ آمده‌اند.

ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌هایی که به‌واسطه آغازگر اختصاصی ردیابی شده و به‌عنوان گونه *B. nigrifluens* تأیید گردیده بودند، با نتایج اعلام‌شده در بررسی جدایه‌های *B. nigrifluens* در دیگر نقاط ایران توسط Baradaran & Harighi & Rahimian (1997)، Ghasemi (2004)، Yousefikopaei et al. (2007)، Jamalizadeh et al. (2009) و Amirsardari et al. (2015) هم‌خوانی داشت.

جدول ۲. ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های *B. nigrifluens* (اعداد جدول درصد جدایه‌ها، دارای واکنش مثبت است)

Table 2. Phenotypic characters of *B. nigrifluens* isolates (Numbers in the table indicate percentages of isolates with positive reaction)

Test	Tolerance to 4% NaCl	H ₂ S Production from Cysteine	Hydrolysis of Esculin	Hydrolysis of Tween 80	Urease	Utilization of Lactose	Utilization of cellobiose	Utilization of tartarate
	75%	87%	37%	12%	38%	34%	67%	13%

ایتالیا و آمریکا، تنوع زیادی در جدایه‌های عامل بیماری شانکر سطحی پوست گردو ملاحظه نشده است. بررسی‌های دقیق روی جدایه‌های ایرانی نشان داده است که تنوع ژنتیکی قابل‌ملاحظه‌ای در این جدایه‌ها وجود دارد. نتایج پژوهش‌های Jamalizadeh *et al.* (2009)، نخستین گزارش از تنوع ژنتیکی این بیمارگر در ایران است. پس از نامبردگان، Fallahi-Charkhabi *et al.* (2010) نیز به وجود تنوع ژنتیکی این بیمارگر در ایران، اشاره نمودند. در این گزارش‌ها دلیل مشخصی برای وجود تنوع ژنتیکی عامل بیماری ذکر نشده است؛ اما به نظر می‌رسد با توجه به اینکه درخت گردو بومی ایران بوده و از ایران به سایر مناطق دنیا گسترش یافته است، عامل بیماری نیز، استرین‌های بومی در ایران دارد که به موازات گردو و هم‌زمان با آن تکامل یافته‌اند و به همین دلیل تنوع قابل‌ملاحظه‌ای در آن‌ها وجود دارد (رحیمیان، منتشر نشده). اثبات این مدعی نیاز به پژوهش‌های گسترده‌تری دارد. مقایسه الگوی اثرانگشتی، تنوع نسبتاً زیادی را میان استرین‌های *B. nigrifluens* جداسازی شده از مناطق مختلف استان کرمان نشان داد. بیش‌ترین تنوع مشاهده‌شده در استرین‌هایی بود که از منطقه بافت جداسازی گردیده بودند. بیش‌ترین سطح زیر کشت گردو و همچنین بیش‌ترین انواع کولتیوارهای گردو در این بخش از استان کرمان وجود دارند. نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش نشان می‌دهند که اکثر جدایه‌های به‌دست‌آمده از یک منطقه در گروه‌های نزدیک به هم قرار می‌گیرند. وجود این تفاوت بین جدایه‌های مناطق مختلف استان توسط هر دو نشانگر ERIC و BOX به‌خوبی قابل‌مشاهده بود (شکل‌های ۱ تا ۵). جدایه‌های همراه بیماری نیز تنوع قابل‌ملاحظه‌ای داشتند. شناسایی این جدایه‌ها و بررسی نقش آن‌ها در بیماری دارای اهمیت فراوان است. برخی از این جدایه‌های همراه، متعلق به

در پژوهش‌های مذکور وجود تنوع در ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها ذکر گردیده بود. این تنوع در ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های استان کرمان نیز مشاهده شد و از این منظر نتایج این پژوهش با دیگر پژوهش‌های انجام‌شده در ایران هم‌خوانی دارد. تشخیص این باکتری بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی دشوار است (Moretti *et al.*, 2007). وجود ویژگی‌های متغیر به همراه تنوع ژنتیکی بالا، تهیه دستورالعمل مناسب برای تشخیص سریع عامل بیماری را پیچیده می‌نماید. همان‌گونه که انتظار می‌رفت کاربرد جفت آغازگرهای اختصاصی F₁ و C₃ سبب گردید تا امکان ردیابی سریع تعدادی از جدایه‌ها فراهم گردد. در همگی ۳۰ جدایه‌ای که بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی، گونه *B. nigrifluens* تشخیص داده شده بودند، قطعه ۲۵۵ جفت بازی توسط آغازگرهای اختصاصی تکثیر شد. از این روی به نظر می‌رسد سریع‌ترین روش در تفکیک و تمایز این گونه بیمارگر، استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز است. نتایج با تکثیر و توالی‌یابی بخشی از اپران ریبوزومی سه جدایه (رس‌شمارهای MH685516-18) نیز تأیید گردید. نتایج هم‌ترازی توالی‌ها نشان دادند که این جدایه‌ها تشابه ۱۰۰ درصدی با جدایه‌های *B. nigrifluens* ثبت‌شده در بانک ژن دارند. روش شناسایی تلفیقی به‌عنوان یک دستورالعمل استاندارد برای تشخیص این گونه پیشنهاد شده و در اتحادیه اروپا استفاده می‌شود (Loreti *et al.*, 2008). مقایسه نتایج نشان می‌دهد که تلفیق سه روش بررسی بیماری‌زایی، فنوتیپی و ردیابی اختصاصی در تشخیص عامل بیماری کارایی خوبی دارد. استفاده از آزمون بیماری‌زایی روی میوه گردو به دلیل کوتاه بودن زمان بروز علائم و همچنین استفاده از آغازگرهای اختصاصی، کوتاه‌ترین و سریع‌ترین روش در تشخیص سریع و به‌موقع عامل بیماری است. طی پژوهش‌های انجام‌شده در سایر مناطق دنیا به‌خصوص

می‌تواند ناشی از عملکرد جدایه‌های همراه با بیماری نیز باشد. گرچه بیان دقیق این موضوع نیز نیاز به پژوهش جامع و گسترده‌تری دارد. در بررسی رابطه احتمالی این جدایه‌ها و بیماری گردو، اثر آنتاگونیستی مشاهده نگردید. بررسی فعالیت احتمالی آنتاگونیستی این جدایه‌ها نشان داد که هیچ‌یک از جدایه‌ها در روش بررسی روی محیط جامد، توان مهار رشد باکتری *B. nigrifluens* را ندارند. استرین‌های به‌دست‌آمده از استان کرمان که به‌عنوان همراه بیماری جداسازی شده بودند، در بررسی ممانعت‌کنندگی در محیط مایع نیز قابلیت از خود نشان ندادند. حال آن‌که متابولیت‌های ۱۳ استرین که از فیلوسفر درختان میوه نواحی غیربومی جداسازی شده بودند، به‌خوبی قادر به کنترل جمعیت بیمارگر در محیط کشت مایع بوده و از رشد آن ممانعت به عمل آوردند. توانمندترین این جدایه‌های آنتاگونیست، از برگ گردو در استان البرز جداسازی گردیده بود. لذا هیچ‌یک از جدایه‌های همراه با بیماری، تعامل آنتاگونیستی با باکتری عامل بیماری ندارند اما برخی از آن‌ها می‌توانند سبب ایجاد علائمی شبیه به علائم بیمارگر در میوه گردو شوند. از میان هشت جدایه، دو جدایه از این گروه قادر به تولید شبه علائم نسبتاً شدید روی میوه بودند. این علائم مشابه با علائم ایجادشده توسط برخی از جدایه‌های *B. nigrifluens* بود. گردوی مایه‌زنی شده در محل تزریق، قهوه‌ای‌رنگ شده و به‌آرامی دچار پوسیدگی گردید. از محل مایه‌زنی پس از سپری شدن هفت روز جمعیت بسیار بالایی از باکتری جداسازی گردید. جدایه‌هایی که توان ایجاد این علائم را نشان دادند بر اساس ویژگی ژنوتیپی (Accession number MK447935) بیشترین شباهت را به جنس *Gibbsiella* sp. داشتند. شش جدایه دیگر تنها توانستند علائم ضعیفی از زخم در محل تزریق را ایجاد نموده که گسترش بسیار آرامی داشت. این شش جدایه شناسایی نشدند. بررسی دقیق دخالت این عوامل در بیماری‌زایی یا شدت آن ضروری به نظر رسیده و مطالعه اثر سینرژیستی آن‌ها با عامل بیماری در دست انجام است. سایر جدایه‌های همراه، قادر به تولید هیچ‌گونه علائمی نبوده و محل تزریق کاملاً مشابه با محل تزریق بافر فسفات نمکی، کاملاً سالم و

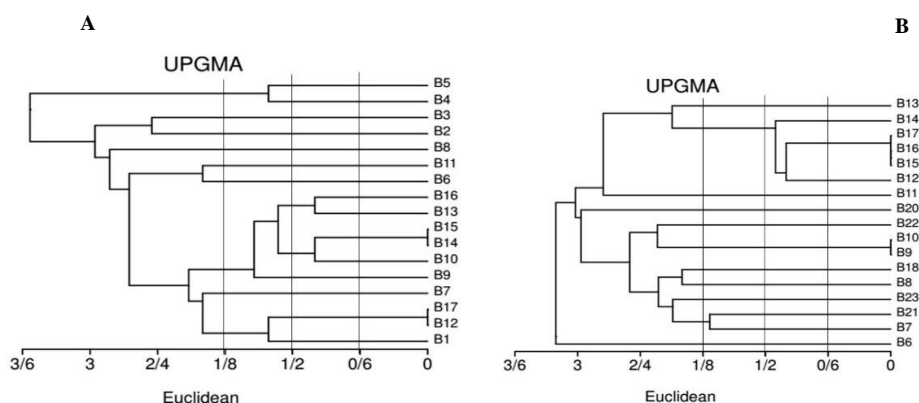
خانواده *Enterobacteriaceae* هستند. این احتمال وجود دارد که بدون شناسایی و تفکیک آن‌ها از عامل اصلی بیماری، اشکالاتی در شناسایی پاتوژن اصلی و به دنبال آن در مدیریت بیماری ایجاد گردد. علاوه بر آن بررسی دقیق نقش احتمالی آن‌ها در کاهش یا افزایش شدت بیماری نیز، دارای اهمیت فراوان است. استفاده از دستورالعمل کلی شناسایی بیمارگر در صورتی قابل‌اتکا است که باکتری یا باکتری‌های دیگری در ایجاد علائم یا تشدید آن‌ها دخالت نداشته باشند، در غیر این صورت روش‌های ذکرشده در دستورالعمل، از حساسیت و دقت کافی برخوردار نبوده و به حصول نتیجه مطلوب منجر نخواهد گردید (Loreti *et al.*, 2008). گزارش تنوع قابل‌ملاحظه عامل بیماری و وجود عوامل همراه با این بیماری در مناطق مختلف ایران و تفاوت آن با سایر مناطق دنیا که بیمارگر در آن‌ها از تنوع زیادی برخوردار نبوده و عوامل همراه متعددی گزارش نشده‌اند، سبب می‌گردد تا در استفاده از دستورالعمل استاندارد شناسایی سریع عامل بیماری، احتیاط بیش‌تر لازم بوده و یا ضروری است تا این دستورالعمل بر اساس اطلاعات جدایه‌های ایرانی بازنویسی و بومی‌سازی گردد. نتایج بررسی بیماری‌زایی نشان دادند که گروه اول جدایه‌ها توان ایجاد علائم به‌صورت سیاه‌شدگی و نکروز و در بعضی موارد ترشح شیرابه تیره‌رنگ به خارج از محل مایه‌زنی را دارند. این جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی به‌عنوان گونه *B. nigrifluens* تشخیص داده شده بودند. در روش دوم مایه‌زنی که با ایجاد شکاف بر روی پوست میوه انجام شده بود، ظهور علائم بیماری سریع‌تر اتفاق افتاد. این مسئله می‌تواند ناشی از فعالیت بهتر باکتری روی قسمت‌های سطحی میوه باشد. در برش‌های عرضی میوه‌های تزریق‌شده با باکتری نیز رگه‌های سیاه کاملاً قابل‌مشاهده بود. نتایج آزمون بیماری‌زایی با گزارش مورتی مطابقت داشت (Moretti & Buonauro, 2010). این نتایج نشان دادند که جدایه‌های *B. nigrifluens* شدت بیماری‌زایی متفاوتی دارند. بررسی دلیل این مسئله و ارتباط آن با ویژگی‌های ژنتیکی جدایه‌ها، نیازمند پژوهش مستقلی است. به نظر می‌رسد تفاوت در شدت بیماری‌زایی

پیش از آن به نظر می‌رسد، شناسایی دقیق عامل یا عوامل احتمالی ایجاد یا تشدید بیماری در اولویت نخست باشد. گرچه در شناسایی عامل بیماری در ایران پیشرفت قابل‌ملاحظه‌ای مشاهده می‌گردد اما هنوز ابعاد مختلف بیماری آشکار نبوده و همین تیرگی، امکان مقابله با آن را محدود می‌نماید.

بدون تغییر رنگ بود (شکل ۶). جهت پیش‌گیری از این بیماری که به‌صورت گسترده در استان کرمان شیوع داشته و در سایر نقاط ایران نیز در حال پیشروی است، استفاده از نهال‌های سالم، بررسی امکان کنترل زیستی یا شیمیایی و همچنین بررسی وجود منابع مقاومت در میان توده‌های بومی، ضرورت دارد؛ اما

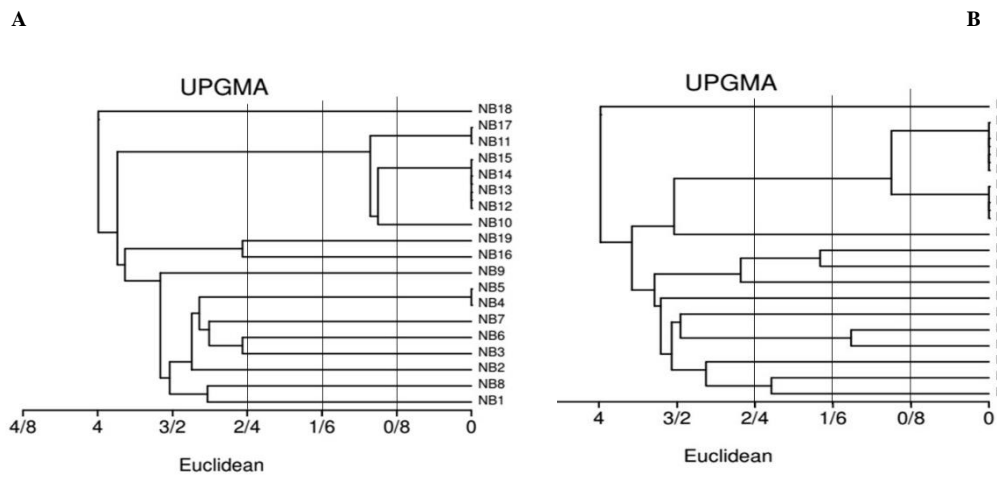
جدول ۳. ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌های همراه با عامل بیماری
Table 3. Phenotypic and biochemical characteristics of the associated isolates

Test	Isolates							
	NB6	NB8	NB16	NB19	NB20	NB21	NB22	NB26
Gram reaction	+	-	-	-	-	-	-	-
Pigment in KB	-	-	-	-	-	-	-	-
Pigment in EMB	-	+	+	+	+	+	+	+
Pigment in YDC	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	+	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in aerobic conditions	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in anaerobic condition	+	+	+	+	+	+	+	+
Levan	-	-	-	-	-	-	+	+
4% NaCl tolerance	-	+	+	+	+	+	-	-
Hypersensitive Reaction	-	-	+	+	+	+	+	+
H ₂ S production from Cysteine	-	+	+	+	+	+	+	-
Arginine dihydrolase	+	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of Esculin	-	-	-	-	+	-	-	+
Hydrolysis of Tween 80	-	+	+	+	-	+	-	-
Hydrolysis of Starch	-	-	-	-	-	-	-	-
Hydrolysis of Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	+	+	+	+	-	-
Acid production from								
Mannitol	-	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	-	+	+	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	-
Cellobiose	+	+	-	-	+	-	+	-
Tartrate	+	-	+	+	-	+	-	-



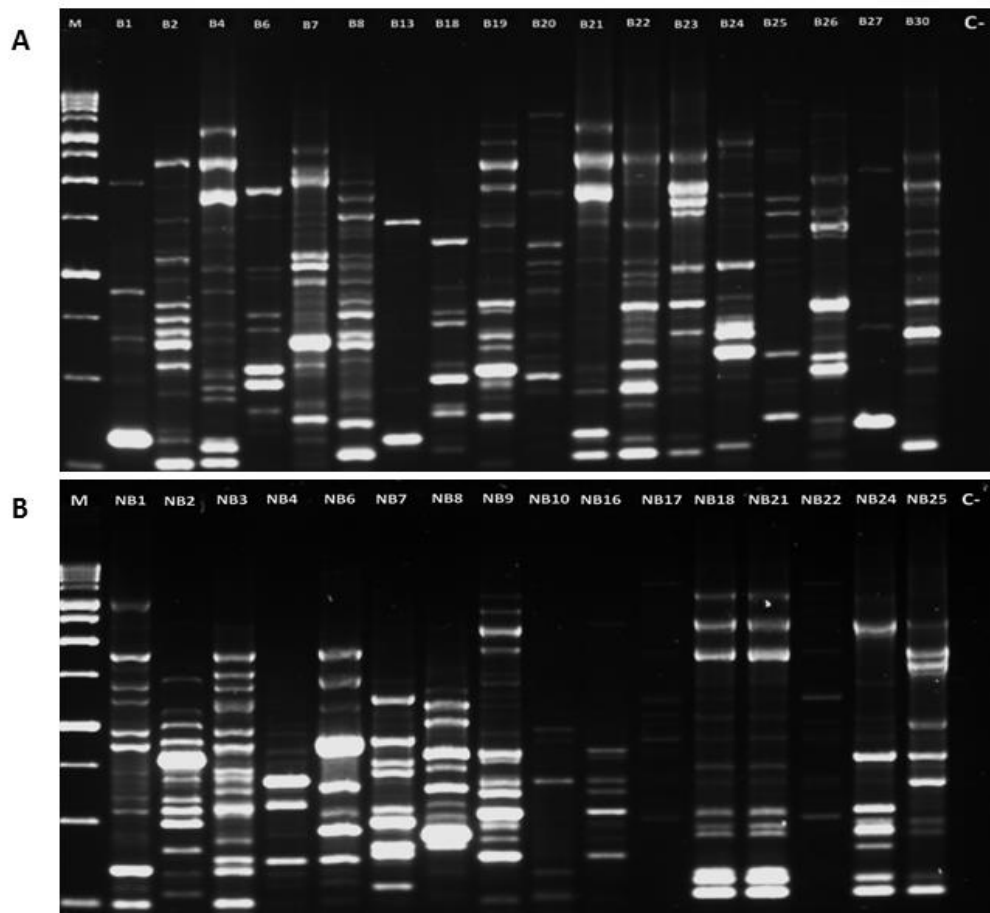
شکل ۱. دندروگرام ترسیم‌شده بر اساس شباهت گونه‌های *B. nigrifluens* با استفاده از داده‌های ERIC-PCR (A) و BOX-PCR (B)، ترسیم‌شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

Figure 1. Dendrogram generated based on the genetic similarity of *B. nigrifluens* isolates using datasets from ERIC-PCR and BOX-PCR, UPGMA analysis, and Jaccard's coefficient.



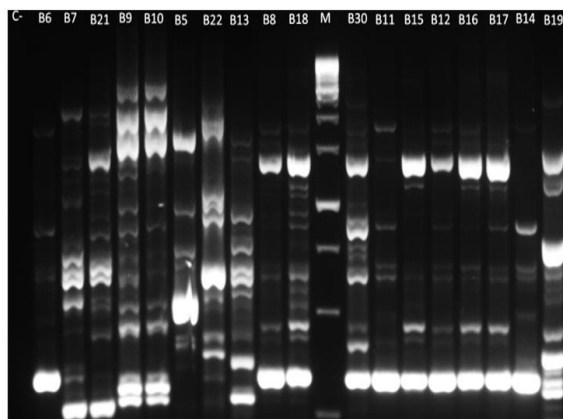
شکل ۲. دندروگرام ترسیم‌شده بر اساس شباهت جدایه‌های همراه با استفاده از داده‌های ERIC-PCR (A) و BOX-PCR (B)، ترسیم‌شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

Figure 2. Dendrogram generated based on the genetic similarity of the associated isolates using datasets from ERIC-PCR and BOX-PCR, UPGMA analysis, and Jaccard's coefficient



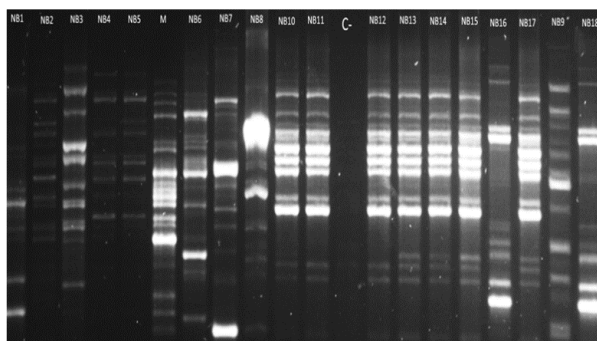
شکل ۳. الگوی اثرانگشتی گونه‌های *B. nigrifluens* (A) و جدایه‌های همراه با عامل بیماری (B) با آغازگرهای ERIC-PCR. C: کنترل منفی، M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی

Figure 3. PCR fingerprinting patterns of representative *B. nigrifluens* and associated isolates obtained using BOX primer (A) and Eric primers (B). Lane M: marker (1kb ladder), lane C: negative control



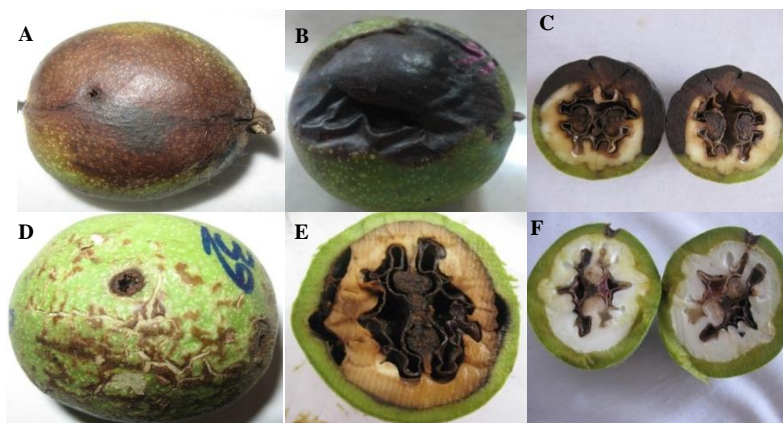
شکل ۴. الگوی اثرانگشتی جدایه‌های *B. nigrifluens* با آغازگرهای BOX-PCR. C: کنترل منفی، M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی

Figure 4. PCR fingerprinting patterns of representative *B. nigrifluens* isolates obtained using BOX-PCR primer. Lane M: marker (1kb ladder), lane C: negative control



شکل ۵. الگوی اثرانگشتی جدایه‌های همراه با بیماری با آغازگرهای BOX-PCR. C: کنترل منفی، M: نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰۰ جفت بازی

Figure 5. PCR fingerprinting patterns of associated isolates obtained using BOX-PCR primer. Lane M: marker (1kb ladder), lane C: negative control



شکل ۶. (A) علائم بیماری روی میوه نارس گردو پس از مایه‌زنی با *B. nigrifluens* به روش سرنج، (B) علائم بیماری روی میوه نارس گردو پس از مایه‌زنی عامل بیماری به روش شکاف در پوست میوه، (C) برش عرضی میوه مایه‌زنی شده، (D) و (E) علائم ایجادشده روی میوه نارس گردو به‌وسیله یکی از باکتری‌های همراه با عامل بیماری پس از مایه‌زنی به روش تزریقی (D) و (F) میوه مایه‌زنی شده با بافر نمکی یا سایر باکتری‌های همراه.

Figure 6. (A) Symptoms on immature walnut fruits inoculated with *B. nigrifluens* using the syringe technique, (B) symptoms on immature walnut fruits inoculated with *B. nigrifluens* using cracks in the skin of the fruit technique, (C) cross-cut of inoculated fruit, (D) and (E) symptoms on immature walnut fruits inoculated with one of associated bacteria using syringe inoculation technique, (F) fruits infiltrated with PBS buffer or other associated bacterium.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش به دلیل نبود اطلاعات و گزارش‌های کافی از باکتری عامل بیماری شانکر سطحی گردو در استان کرمان، به بررسی دقیق‌تر عامل بیماری، پرداخته شد. جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و ژنوتیپی تقسیم‌بندی شدند و پس از شناسایی دقیق عامل بیماری به اهمیت و نقش جدایه‌های همراه پرداخته شد. به نظر می‌رسد این جدایه‌ها تا حدودی در افزایش شدت علائم بیماری اثرگذار باشند. دو جدایه که علائم متفاوت بر روی میوه ایجاد کرده بودند، بعد از تعیین توالی بخشی از

اپران ریبوزومی به جنس *Gibbsiella* تعلق داشتند. بررسی الگوی اثرانگشتی ژنوم جدایه‌ها با استفاده از دو آغازگر ERIC-PCR و BOX-PCR، تفاوت نسبتاً زیادی را بین جدایه‌های *B. nigrifluens* به دست آمده از مناطق مختلف استان و نیز بین جدایه‌های همراه با بیماری نشان داد. این تنوع بین جدایه‌ها ممکن است علت اصلی در ناتوانی کنترل بیماری باشد. با توجه به اهمیت اقتصادی و ارزش غذایی میوه درختان گردو در کشور و وجود بیشترین سطح زیر کشت گردو در استان کرمان، اقدامات مؤثر در جهت شناسایی دقیق عوامل بیماری ضرورت دارد.

REFERENCES

1. Amirsardari, V., Darvishniya, M. & Mirzaei, H. (2015). 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. *Journal of Microbial World*, 8(2), 120-129.
2. Baradaran, G. & Ghasemi, A. (2004). Etiology of walnut canker disease in Kerman province. In: Paper read at Proceeding of 16th Plant Protection Congress Iran. University of Tabriz, P.388.
3. Fallahi-Charkhabi, N., Shams-bakhsh, M. & Rahimian, H. (2010). Genetic diversity among *Brenneria nigrifluens* strains in Iran. *European journal of Plant Pathology*, 128(3), 303-310.
4. Habibi, H. & Khodaygan, P. (2015). The first report of *Stenotrophomonas* sp. associated with canker and leaf spot disease of stone fruits in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 51(1), 103-106. (in Farsi)
5. Harighi, B. (2006). Bacterial canker of walnut trees in Kourdestan province. In: Paper read at Proceeding of 17th Plant Protection Congress Iran. University of Tehran, P.319.
6. Harighi, B. & Rahimian, H. (1997). Widespread occurrence of the bark canker of walnut in Mazandaran province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 33(3), 48-50. (In Farsi)
7. Jamalizadeh, A., Shamsbakhs, M. & Rahimian, H. (2009). Occurrence and distribution of shallow bark canker of walnut trees in Northern provinces of Iran. *Journal of Plant Production*, 16(2), 195-204.
8. Lopez, M., Marti, R., Morente, C., Orellana, N., Ninot, T. & Aleta, N. (1994). Phytopathogenic bacteria identified in walnut in Spain. *Investigacion Agraria. Produccion Proteccion Vegetales*, 2, 307-314.
9. Loreti, S., De Simone, D. & Gallelli, A. (2008). Detection and identification of *Brenneria nigrifluens*, the causal agent of the shallow bark canker of walnut by PCR amplification. *Journal of Phytopathology*, 156(7-8), 464-469.
10. Menard, M., Delort, F., Baudry, A. & Le Saux, M. (2004). First report of bacterial canker of walnut caused by *Brenneria nigrifluens* in France. *Plant Disease*, 88(2), 220-220.
11. Moretti, C. & Buonauro, R. (2010). Immature walnut fruit inoculation for evaluation of *Brenneria nigrifluens* pathogenicity. *Phytopathologia Mediterranea*, 49(1), 80-83.
12. Moretti, C., Silvestri, F., Rossini, E., Natalini, G. & Buonauro, R. (2007). A protocol for rapid identification of *Brenneria nigrifluens* among bacteria isolated from bark cankers in Persian walnut plants. *Journal of Plant Pathology*, 211-218.
13. Morone, C., Janse, J. & Scortichini, M. (1998). Bark canker of Persian walnut (*Juglans regia*) trees incited by *Erwinia nigrifluens* in Italy. *Journal of Phytopathology*, 146(11-12), 637-639.
14. Rahimian, H. (1989). Bacterial canker of walnut trees in Sari. Paper read at Proceeding of 9th Plant protection congress Iran. University of Ferdowsi, Mashhad, P. 150.
15. Saccardi, A., Bonetti, V., Melegatti, A. & Cristanini, M. (1998). Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on English walnut (*Juglans regia*) in the Veneto region (northern Italy). *Journal of Plant Pathology*, 80, 63-65.
16. Schaad, N., Braun-Kiewnick, A., Sands, D., Jones, J. & Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Minnesota: APS Press, U.S.A. 3, 398.
17. Scortichini, M. (1999). Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on walnut for timber production in Latium region [*Juglans regia* L.]. *Informatore Fitopatologico*, 49(9), 52-54.

18. Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in *Eubacteria* and application to finerprinting of bacterial enomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823-6831.
19. Waleron, M., Waleron, K., Podhajska, A. J. & Łojkowska, E. (2002). Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment. *Microbiology*, 148(2), 583-595.
20. Wilson, E., Stake, M. & Berger, J. A. (1957). Bark canker, a bacterial disease of the Persian Walnut tree. *Phytopathology*, 47(11), 669-673.
21. Yousefikopaei, F., Tagliavi, S. & Banihashemi, Z. (2007). Occurrence of Shallow Bark Canker of Walnut (*Jugions regia*) in Southern Provinces of Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(9), 1507-1512.