گزارش علمی کوتاه

شانکر ساقه درختان میوه هسته دار ناشی از *Staphylococcus warneri*

مجتبی دهقان‌نیری و حشمت‌اله رحیمیان[1*]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۱۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۲/۱۸)

شانکر باکتریایی درختان میوه هسته دار ناشی از *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* پراکنش وسیعی در ایران پیدا کرده است (Abbasi *et al* 2013). به منظور ارزیابی تنوع جدایه‌ها و گونه‌های احتمالی دیگر در پاره‌ای از مناطق مرکزی کشور بازدیدهایی از باغ‌های میوه برخی از استان‌های مرکزی از جمله اصفهان، چهارمحال و بختیاری، قم و یزد در سال‌های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ به عمل آمد. نمونه‌هایی از شاخه‌های زردآلو (*Prunus armeniaca*)، آلو (*P. domestica*)، هلو (*P. persica*) و گیلاس (*P. avium*) دارای علایم شاخص شانکر که غالباً همراه با ترشح صمغ بود، جدا و به آزمایشگاه منتقل گردید (شکل ۱). پس از شستشوی فراوان بخشی از پوست شاخه که دارای لکه بود جدا و همراه با چند قطره آب مقطر در یک تشتک پتری خرد گردید. قطره‌هایی از سوسپانسیون حاصل، پس از ۲۰-۱۰ دقیقه نگهداری نمونه‌ها در دمای اتاق در سطح محیط آگار غذایی حاوی سوکروز (NAS) مخطط گردید. تشتک‌های کشت‌شده در دمای ۲۷±۱°C نگهداری شدند. تک کلونی‌هایی از باکتری غالب، پس از ۴-۳ روز از زمان کشت جدا و دوباره روی محیط NAS مخطط‌شده و پانزده کلنی تک به عنوان جدایه خالص‌شده تکثیر و در آزمون‌ها به کار برده شدند. ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها براساس روش‌های توصیه‌شده توسط شاد و همکاران (Schaad *et al* 2001) تعیین گردید. تزریق سوسپانسیون حاوی 10^{8}-10^{7} سلول زنده در میلی لیتر (کدری ۰/۲-۰/۱ واحد در ۶۰۰ نانومتر و انطباق با شمارش کلنی روی NAS) جدایه‌ها منجر به ایجاد واکنش فوق حساسیت در برگ‌های شمعدانی (*Pelargonium* × *hortorum*) گردید. تزریق سوسپانسیون حاوی 10^{6} سلول در میلی لیتر چهار نماینده به زیر پوست ساقه سرشاخه‌های نهال‌های یک ساله هلو (رقم آلبرتا و رقم محلی از هر یک دو نهال برای هر جدایه) منجر به بروز شانکرهای قهوه‌ای رنگ ۵-۴ روز بعد از زمان آلوده سازی گردید. جدایه‌های مایه‌زنی‌شده ۱۵-۱۱ روز پس از مایه‌زنی دوباره از شانکرهای در حال توسعه روی محیط NAS جداسازی و تشابه آنها با جدایه‌های مایه‌زنی‌شده، براساس چند ویژگی کلیدی، از قبیل واکنش گرم، تولید کاتالاز، اوره از، پروتئاز و تحمل بیش از ٪۸ نمک طعام و نیز نقوش قطعات تکثیرشده در ERIC-PCR تأیید گردید. DNA کروموزمی از دو جدایه نماینده با جوشاندن سوسپانسیون سلول‌ها و نیز به روش آزوبل و همکاران (Ausubel etal ۱۹۹۱) آزادشده و برای تکثیر قطعه‌هایی از ژن‌های

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Rahimian.h@gmail.com

۱ - گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

شکل ۱. علائم شانکر روی شاخه جوان درخت هلوی آلوده از منطقه شهرکرد استان چهارمحال و بختیاری، که از آن *Staphylococcus warneri* جدا گردید.

Fig 1. Symptoms of stem canker on a twig of peach from Shahr-e-Kord, Char-Mahal and Bakhtiary province from which *Staphylococcus warneri* was isolated.

ریبوزومی ۱۶S و *tuf* در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) به کار برده شد. مقایسه ترادف بخش تکثیرشده ژن‌های دو جدایه SP1 و SAP1 نشان داد که این جدایه‌ها بالاترین شباهت نوکلئوتیدی (٪۹۸) قطعه ۱۱۲۰ جفت بازی ژن ۱۶S (رس شمارهای به ترتیب KP ۶۶۲۷۱۷ و KM ۲۸۲۱۰۴ در GenBank) و نیز بیشترین تشابه (٪۹۸) قطعه ۶۱۰ جفت بازی ژن *tuf* (رس شمارهای به ترتیب KR ۱۴۹۲۸۷ و KR ۱۳۶۲۷۷ در GenBank) را با جدایه‌های گونه *Staphylococcus warneri* دارند. بیماریزایی گونه *S. aureus* روی گیاه آزمون آرابیدوپسیس (*Arabidopsis thaliana*) قبلاً در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شده است (Pritiviraj *et al* 2005)؛ بر پایه دانسته‌ها به نظر می‌رسد این اولین گزارش از وقوع نوعی شانکر باکتریایی ناشی از *S. warneri* و اثبات بیماریزایی این باکتری در شرایط گلخانه و مزرعه باشد.

A stem canker of stone fruit trees caused by *Staphylococcus warneri*

M. Dehghan-Niri and H. Rahimian[1*]

(Received: 5.12.2015; Accepted: 8.3.2016)

Bacterial canker of stone fruit trees caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* has become widespread throughout most fruit growing areas of Iran (Abbasi *et al* 2013). To evaluate the diversity of the strains and possible species inciting the disease in the central areas of the country, surveys were made in 2014 and 2015 in some central provinces including Charmahal-and-Bakhtiary, Isfahan, Qum and Yazd. The twigs and shoots of apricot (*Prunus armeniaca*), peach (*P. persica*), plum (*P. domestica*) and sweet cherry (*P. avium*) with typical cankers which almost invariably were associated with exudation of gum were collected and brought to the laboratory. The affected shoots were thoroughly washed under tap water. The bark tissues of a segment encompassing a canker were excised and chopped with a sterile razor blade in a few drops of sterile distilled water. Loopfuls of the resulting suspension, following standing for 10-20 min in the laminar flow, were streaked onto plates of sucrose nutrient agar (SNA), and the plates were incubated at 27±1°C. Pure cultures of the isolates were prepared by restreaking on SNA of single colonies of the predominant colony types, after, 3-4 days of incubation at the above-mentioned conditions. Fifteen isolates of the bacterium were characterized phenotypically, following the protocols of Schaad *et al* (2001). All strains induced a hypersensitive reaction (HR) on geranium (*Pelargonium* × *hortorum*) following injection of a suspension containing 10^7-10^8 CFU. ml^{-1} (OD 600 nm of 0.1-0.2, and adjustments through colony counting). Suspension of four representative isolates at ca 10^5-10^6 CFU/ml were injected into the bark tissues of the current season growth of 12-24-month old peach (two budlings each of cv. Alberta and a local early-ripening cultivar, per isolate). Brown depressed lesions started to develop 4-5 days after inoculation, enlarging and deepening in color with time. The inoculated strains were reisolated from the resulting brownish-black cankers 11-15 days following inoculation and their identity verified by checking their key phenotypic features including positive Gram-reaction, production of catalase, protease and urease and tolerance to over 8% NaCl and their ERIC-PCR profiles. DNA was isolated from two representative strains by boiling and by the method of Ausuble *et al* (1991) and used in PCR for amplifications of fragments of the 16S rDNA and *tuf* genes. Blast analysis demonstrated that strains SP1 and SAP1 have the highest nucleotide sequence identity (98%) in their partial 16SrDNA gene sequence (1120bp, GenBank accession # KP662717 and KM282104, respectively) and a ca. 610bp fragment of *tuf* gene (98% identity) (GenBank accession # KP149287 and KR136277, respectively) with strains of *Staphylococcus warneri*. *S. aureus* has previously been demonstrated to be capable of infecting the model plant species, *Arabidopsis thaliana* experimentally (Pritiviraj *et al* 2005). To our knowledge, this is the first report on the occurrence of a bacterial canker disease of stone fruit trees caused by *S. warneri* and on proof of the pathogenicity of this bacterium in the field and in the greenhouse.

* Corresponding author's E-mail: Rahimian.h@gmail.com

1. Dept. Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari Iran.

منابع

Abbasi, V., Rahimian, H. and Tajick Ghanbari, M. A. 2013. Genetic variability of Iranian strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker disease of stone fruits. European Journal of Plant Pathology 135: 225-235.

Ausuble, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moor, D. D., Seideman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. 1991. Current Protocol in Molecular Biology, Vol. 1, Greene Publishing Assoc. and Wiley - Interscience, John Wiley & Sons, New York. P. 2.0.1-2.12.5.

Prithiviraj, B., Bais, H.P., Jha, A.K., Vivanco, J.M. 2005. *Staphylococcus aureus* pathogenicity on *Arabidopsis thaliana* is mediated either by a direct effect of salicylic acid on the pathogen or by SA-dependent, NPR1-independent host responses. The Plant Journal 42: 417-432.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd Ed. , APS Press, St. Paul, MN., USA. 373p.