

## شناسایی مخمر *Cryptococcus magnus* به عنوان عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار در برخی از استان‌های مرکزی ایران\*

مجتبی دهقان نیری<sup>۱</sup>✉، حشمت‌اله رحیمیان<sup>۲</sup> و ولی‌اله بابایی‌زاد<sup>۳</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد؛ ۲- استاد؛ ۳- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری  
(تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۴؛ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۵)

### چکیده

شانکر تنه و شاخه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار است که بارزترین علائم آن ایجاد زخم‌های فرورفته روی شاخه‌ها همراه با تراوش صمغ می‌باشد. دو باکتری *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* و *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به عنوان عوامل اصلی این بیماری قبلاً از مناطقی از ایران گزارش شده‌اند. به منظور شناسایی و تعیین پراکنش عوامل مولد شانکر از نواحی مرکزی ایران، نمونه‌های دارای علائم شانکر از باغ‌های این مناطق جمع‌آوری گردید. پس از کشت نمونه‌ها روی محیط آگار غذایی حاوی سوکرز (NAS) کلنی‌های برجسته، کرم متمایل به صورتی و خمیری مانند جدا شد. بیماری‌زایی نماینده‌هایی از جدایه‌ها روی نهال‌های هلو (*Prunus persica*) به اثبات رسید. بررسی‌های میکروسکوپی، فنوتیپی و مولکولی برای شناسایی جدایه‌ها انجام شد. با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 این قطعه در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) در جدایه‌های نماینده تکثیر و توالی‌یابی شد. توالی‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار بلاست در ژن بانک (NCBI) با توالی‌های موجود در این پایگاه مقایسه و میزان شباهت تعیین گردید. بخشی از توالی ژن‌های RPB1، RPB2 و RPB2 نیز برای تأیید شناسایی استفاده شد. در بررسی میکروسکوپی جدایه‌ها سلول‌هایی کروی شکل که برخی از آن‌ها در حال جوانه زدن بودند مشاهده شد. در مقایسه توالی قطعه ITS در ژن بانک، جدایه‌ها بیشترین شباهت را به گونه *Cryptococcus magnus* نشان دادند. توالی ژن‌های RPB1، RPB2 و RPB2 نیز این شباهت را تایید کردند.

واژه‌های کلیدی: شباهت، شانکر، توالی، ITS.

### *Cryptococcus magnus* as the causative agent of stem and branch canker of stone fruit trees in some central provinces of Iran

M. DEGHAN-NIRI<sup>1</sup>✉, H. RAHIMIYAN<sup>2</sup> and V. BABAEIZAD<sup>3</sup>

1- M.Sc., 2-Professor; 3-Associate Professor, Department of Plant Protection, Sari University of Agricultural Sciences and Natural Resources

#### Abstract

Canker is one of the most damaging diseases of stone fruit trees which incite depressed brown to black lesions, often accompanied by exudation of gum, on twigs, branches and trunk of affected trees. The most common causal agents of bacterial canker in the world as well as in Iran are *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. To determine the predominant causative microorganism in some major fruit growing areas of the central provinces of Iran, samples were taken from the canker-affected stone fruit trees in these regions and macerates of the affected bark tissues were cultured on sucrose nutrient agar (NAS). The predominant colonies appearing on NAS were whitish and yeast-like in appearance. Pathogenicity of representative isolates on peach (*Prunus persica*) seedlings was confirmed. Microscopic, phenotypic and genotypic characteristics of pure cultures of the isolates were determined. DNAs of representative isolates were extracted and the rDNA ITS regions were amplified and sequenced. The sequences were compared with those deposited in GenBank. Partial sequences of the 26S rRNA, RPB1 and RPB2 genes were determined and compared with those existing in GenBank. Budding globose cells were predominant in cell suspensions studied under the microscope. The isolates showed the highest identity with *Cryptococcus magnus* based on the sequences of the ITS regions. The identity of the isolates as *C. magnus* was further verified by comparison of the nucleotide sequences of their 26S, RPB1 and RPB2 genes with the homologous regions in *Cryptococcus* species. It is concluded that canker of stone fruit trees in the central provinces of Iran is predominantly caused by the yeast species *C. magnus*.

**Key words:** Canker, homologous, ITS, sequence.

\* این مقاله بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد.

## مقدمه

شانکر درختان میوه هسته‌دار یکی از مشکلات جدی و محدود کننده تولید محصول باغ‌های میوه هسته‌دار محسوب می‌شود. این بیماری باعث خسارت به درختان و کاهش محصول و یا مرگ درختان می‌شود. علائم بیماری شامل ایجاد شانکر همراه با تراوش شیرابه از سر شاخه‌ها، شاخه‌ها و تنه درخت است. گسترش شانکرها به طرف پایین و بالا بوده و غالباً منجر به سرخشکیدگی در شاخه‌های جوان نیز می‌شود (Agrios, 2005).

در ایران بهار و همکاران برای نخستین بار شانکر باکتریایی درختان زردآلو را با نام *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در استان اصفهان گزارش کردند (Bahar et al., 1982). پس از آن این بیماری در استان مازندران گزارش و عامل آن نیز *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) معرفی شد (Shams-Bakhsh and Rahimian, 1989). از استان تهران نیز جدایه‌هایی از *P.s.* pv. *syringae* از درختان گیلاس مبتلا به شانکر جدا گردید (Banapour et al., 1990). در سال‌های اخیر باکتری *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* نیز به عنوان عامل لکه برگی و شانکر از درختان میوه هسته‌دار در استان‌های گیلان و مازندران گزارش گردید (Rahimian et al., 2004; Jami et al., 2005). وقوع شانکر درختان میوه هسته‌دار ناشی از برخی از گونه‌های *Cryptococcus* هم اخیراً از استان‌های خراسان و یزد گزارش شده است (Borhani and Rahimian, 2013; Borhani and Rahimian, 2015; Dehghan-Niri et al., 2015).

مخمرها نسبت به قارچ‌های رشته‌ای به ندرت سبب خسارت روی گیاهان می‌شوند اما بیماری‌گری آن‌ها می‌تواند در برخی مواقع مهم بوده و نیاز به مبارزه داشته باشند. گونه‌های *Taphrina* و *Protomyces* (Taphrinomycotina) از شبه مخمرهای مهم بیماری‌زای گیاهی محسوب می‌شوند (Schisler et al., 2011). گونه‌های جنس *Cryptococcus* دارای سلول‌های گرد، بیضوی یا کشیده هستند. در اکثر گونه‌ها

کپسول پلی ساکاریدی وجود دارد. تولید مثل آن‌ها به وسیله جوانه‌زنی است و در برخی از گونه‌ها هیف‌های کاذب یا حقیقی ممکن است تولید شود. برخی از گونه‌ها رنگ‌دانه‌های قرمز، نارنجی، زرد یا قهوه‌ای تیره تولید می‌کنند (Fonseca et al., 2011). تولید مثل جنسی در آن‌ها دیده نشده اما برخی از گونه‌ها حالت آنامورفی متعلق یا شبیه به جنس‌های تلومورفی *Cystofilobasidiales*, *Filobasidiales* و *Tremellales* دارند (Fonseca et al., 2011). مخمرهای بازیدیومیستی متعلق به گروه‌های *Urediniomycetes* و *Hymenomycetes* بر اساس توالی‌های نواحی ITS و زیر واحد بزرگ ژن rDNA (D1/D2) قابل شناسایی بوده و آنالیز ترکیبی توالی‌های این نواحی برای شناسایی و طبقه بندی گونه‌ها توصیه شده است (Scorzetti et al., 2002).

گونه‌های متعددی از مخمرها براساس توالی‌های ITS شناسایی شده و مشخص گردیده است که این نواحی به ویژه توالی‌های ITS2 می‌توانند معیار قابل اعتمادی برای تفکیک گونه‌ها باشند (Ning Leaw et al., 2006).

در بررسی توالی بخش‌هایی از زیر واحد بزرگ RNA ریبوزومی (D1/D2)، ۲۳۰ گونه از مخمرهای بازیدیومیستی که در ۱۸ جنس آنامورفی و ۲۴ جنس تلومورفی بودند مشخص شده است که جنس‌هایی مانند *Cryptococcus*, *Bensingtonia*, *Rhodotorula* و *Sporobolomyces* پلی فیلتیک بوده و در ۲ یا چند شاخه قرار می‌گیرند. در مقابل جنس‌هایی نظیر *Cystofilobasidium*, *Bullera*, *Filobasidiella*, *Filobasidium*, *Leucosporidium*, *Kurtzmanomyces*, *Kondoa*, *Fellomyces*, *Rhodosporeidium* و *Udeniomyces* مونوفیلتیک هستند. برای تشخیص دقیق گونه‌ها اغلب بررسی توالی ناحیه ITS نیز ضروری است (Fell et al., 2000).

خصوصیات ژنوتیپی برخی از گونه‌های بیمارگر *Cryptococcus* و رابطه آن‌ها با گونه‌های غیر بیمارگر در راسته *Tremellales* بررسی شده است. از توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های RPB1, RPB2, EF1a, RPB2 زیر واحد کوچک rRNA

عوامل بیماری متقل شدند.

ساقه‌های آلوده با آب شسته شدند. پوست قسمت‌های دارای علائم از شاخه جدا و در تشتک پتری استریل قرار داده شد. قطعات سه بار متوالی با آب سترون شسته شده و همراه با چند قطره آب مقطر سترون داخل تشتک پتری سترون با تیغ سترون به قطعات ۳-۱ میلی‌متری خرد شدند. پس از ۳۰-۲۰ دقیقه نگهداری نمونه در دمای اتاق، چند لوپ پر از سوسپانسیون به دست آمده روی محیط آگار غذایی حاوی دو درصد سوکروز (NAS<sup>۳</sup>) منقح شد. پتری‌های کشت شده در دمای ۲۸-۲۶°C نگهداری شدند و تک کلونی‌های رشد یافته از روی محیط پس از دو یا سه روز جدا و دوباره روی محیط NAS کشت و پس از دو روز رشد برای نگهداری کوتاه مدت، در دمای ۴-۶°C قرار داده شدند. جدایه‌ها در محیط‌های YEPGA<sup>۴</sup>، PDA<sup>۵</sup>، SDA<sup>۶</sup>، CMA<sup>۷</sup> و NAS کشت گردیده و شکل و رنگ کلونی‌ها بررسی شد. جهت نگهداری بلند مدت جدایه‌ها روی محیط کشت PDA به صورت لکه‌ای کشت داده شدند. سوسپانسیون کدری از رشد ۴۸ ساعته جدایه‌ها در آب مقطر استریل تهیه و در یخچال (۴-۶°C) نگهداری شد. جدایه مرجع *Cryptococcus magnus* (CBS 8394) نیز برای مقایسه در آزمون‌ها به کار برده شد.

**آزمون اثبات بیماری‌زایی:** سوسپانسیونی با غلظت

حدود  $10^6 \times 4$  سلول هر میلی‌لیتر از کشت ۴۸ ساعته جدایه‌های منتخب از هر میزبان در آب مقطر تهیه و به وسیله سرنگ انسولین به زیر پوست ساقه‌های انتهایی نهال‌های جوان هلو (*Prunus persica*) و شلیل (*Prunus persica* var. *nucipersica*) تزریق شد.

**بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها:** آزمون‌های

بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی روی جدایه‌های به دست آمده و

میتوکندریایی<sup>۱</sup> (mitSSU)، زیر واحد بزرگ rRNA هسته‌ای<sup>۲</sup> (nucLSU, rRNA) و نواحی ITS برای متمایز کردن گونه‌ها استفاده گردیده است. ضمناً مشخص شده که مقایسه مجموع توالی‌های یاد شده به خوبی قادر به متمایز کردن گونه‌ها است (Findley et al., 2009).

گونه *Cryptococcus magnus* (Lodder & Kreger-van Rij)

(Baptist & Kurtzman 1976) از گونه *C. laurentii* بر پایه ویژگی‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، الگوهای آنزیمی و مولکولی قابل تفکیک می‌باشد. چهار جدایه از *Cryptococcus magnus* به دست آمده از سطح برگ‌ها (phylloplane)، دارای فعالیت‌های آنزیمی متعددی به ویژه آنزیم‌های هیدرولیز ژلاتین، کازئین، توپین ۸۰، کربوکسی متیل سلولز و پلی گالاتورونات با شدت‌های متفاوتی بوده‌اند. توانایی تولید زایلاناز و کوتیناز را نیز بسیاری از آن‌ها نشان دادند (Fonseca et al., 2011). جمعیت‌هایی از مخمرهای بازیدیومیستی و آسکومیستی به صورت اپی‌فیت در سطوح گل‌ها و اندام‌های رویشی گیاهان مشاهده شده است که از جنس *Cryptococcus* گونه‌های *C. magnus* و *C. albidus* بیشترین فراوانی را داشته‌اند (Glushakova and Chernov, 2010).

از کشت ترشحات مجرای گوش یک گربه مبتلا به گوش درد که عامل آن *Aspergillus fumigatus* تشخیص داده شده بود مدتی پس از درمان جدایه‌هایی به دست آمد که بر اساس مشخصات مورفولوژیکی و توالی ژن 28S *Cryptococcus magnus* تشخیص داده شد (Kano et al., 2004).

## روش بررسی

**جدایه‌ها:** نمونه برداری از درختان میوه هسته‌دار آلوده به

شانکر در بهار سال ۱۳۹۱ از استان‌های اصفهان، چهار محال و بختیاری، قم و یزد انجام گردید (جدول ۱). نمونه‌ها با قرار دادن در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه جهت جداسازی

۳-Nutrient agar sucrose

۴-Yeast extract peptone glucose agar

۵-Potato dextrose agar

۶-Sabouraud dextrose agar

۷-Corn meal agar

۱-Mitochondrial small subunit

۲-Nuclear large subunit

حجم ۲۳ میکرولیتر محلول پایه شامل ۱/۵ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۱/۲۵ U آنزیم پلی مراز تک (*Taq Polymerase*) (سیناژن، ایران) و ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR 10X به همراه ۲ میکرولیتر از نمونه DNA هر جدایه انجام شد.

ناحیه ITS ژنوم دو جدایه P2 و P27 با استفاده از آغازگرهای ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') و همچنین برای تایید شناسایی، از تکثیر و تسوالی یابی ناحیه rDNA 26S با آغازگرهای D1 و D2 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') و Fell *et al.*, 2000) (5'-GGTCCGTTTCAAGACGG-3') بخشی از ژن‌های RPB1 با آغازگرهای RPB1-Df و RPB1-Fr (5'-TACAATGCGAYTTYGAYGG-3') و RPB2 (5'-CCYTCNCKWCCWCCCATDGCRTG-3') با آغازگر fRPB2-5f (5'-GAYGAYMGWGATCAYTTYGG-3') و آغازگر fRPB2-7R (5'-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT-3') (Matheny, 2005)، استفاده شد. برنامه دمایی شامل یک مرحله واسرشت سازی اولیه در دمای  $95^{\circ}C$  به مدت ۶ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی DNA در دمای  $95^{\circ}C$  به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه (در دمای  $60^{\circ}C$  برای آغازگر ITS،  $52^{\circ}C$  برای آغازگر 26S و  $56^{\circ}C$  برای آغازگرهای RPB1 و RPB2) و گسترش طول در دمای  $72^{\circ}C$  به مدت یک دقیقه بود. یک مرحله بسط نهایی رشته‌ها به مدت ۷ دقیقه در دمای  $72^{\circ}C$  نیز به کار برده شد.

**الکتروفورز محصولات PCR:** محصول PCR جدایه‌ها با رنگ بارگذاری (حاوی ۲۵ درصد برم فنل بلو، ۲۵ درصد زایلن سیانول و ۳۰ درصد گلیسرول) مخلوط و در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد ریخته شد. در یک چاهک نشانگرهای جرم مولکولی DNA (SM0311 شرکت فرمتاس) ریخته شد. نمونه‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در ولتاژ ثابت ۸۰ ولت الکتروفورز شدند. سپس در اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی

جدایه مرجع انجام شد (Schaad *et al.*, 2001, Kurtzman *et al.*, 2011). آزمون استفاده از کربوهیدرات‌ها به عنوان تنها منبع کربن بر اساس روش Schaad و با استفاده از محیط کشت پایه آیر و همکاران (Ayer *et al.*, 1919) انجام شد.

**استخراج DNA ژنومی:** یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های منتخب (P2 و P27) در داخل لوله‌های اپندرف حاوی مقداری پودر شیشه و ۱ میلی لیتر بافر استخراج DNA (تریس هیدروکلرید ۰/۰۱ مولار، EDTA ۰/۰۰۱ مولار،  $pH=8$ ) و دو درصد تریتون X100 ریخته و کاملاً ورتکس شدند. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر SDS ده درصد به آن‌ها اضافه شد. لوله‌ها در ازت مایع منجمد شده و در آب با دمای نزدیک به جوش محتوی ذوب شد. مرحله انجماد و ذوب سه بار تکرار شد. به میزان هم حجم کلروفرم به لوله‌ها اضافه و به آرامی ورتکس شد. لوله‌ها در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی به لوله جدیدی منتقل و افزودن کلروفرم، بهم زدن و سانتریفیوژ کردن، مشابه بالا یکبار دیگر تکرار شد. لایه رویی به لوله جدیدی منتقل و به هر لوله یک دهم حجم استات سدیم ۳ مولار با  $pH$  برابر ۵ اضافه شد. سپس ۲/۵ برابر حجم اتانول ۹۶ درجه با دمای  $20^{\circ}C$  اضافه و لوله‌ها سه بار سر و ته شدند. پس از قرار دادن لوله‌ها در دمای  $20^{\circ}C$  به مدت دو ساعت، لوله‌ها در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی خالی شده و لوله‌ها تا خشک شدن تقریبی رسوب به صورت مورب در دمای اتاق نگهداری شدند. حدود یک دهم حجم سوسپانسیون اولیه، آب مقطر یا TE رقیق (۰/۰۰۱ مولارتریس، ۰/۰۰۰۱ مولار EDTA،  $pH=8$ ) به لوله‌ها اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۴ ساعت در یخچال نگهداری و چند بار برای حل رسوب تکان داده شده و سپس به  $20^{\circ}C$  منتقل و تا زمان استفاده در این دما نگهداری شدند (Millar *et al.*, 2000; Ausuble *et al.*, 1992; Mirhendi *et al.*, 2001).

**تکثیر نواحی ITS، rDNA 26S، RPB1 و RPB2 با واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR):** واکنش‌های PCR در

دست آمده در جدول ۱ خلاصه شده است.

### بیماری‌زایی جدایه‌ها: در ساقه‌های جوان هلو و شلیل

۷-۱۰ روز پس از مایه‌زنی علایم شانکر مانند ظاهر شد (شکل ۳). علایم شانکر مانند از محل تزریق شروع و به صورت زخم‌هایی که به دنبال آن پوست ساقه با گذشت زمان ترک خورد ظاهر گردید و روی ساقه به تدریج پیشرفت کرد. در بعضی از ساقه‌ها بخش انتهایی ساقه در بالای قسمت مایه‌زنی شده به تدریج پژمرده شدند. از کشت مجدد سوسپانسیون تهیه شده از پوست ساقه‌های آلوده شده جدایه‌هایی با کلونی‌های مشابه جدایه‌های مایه زنی شده به دست آمد (جدول ۲). در گیاه شاهد که با آب مقطر استریل مایه‌زنی شده بود علایمی مشاهده نشد.

### خصوصیات فنوتیپی (تغذیه‌ای، بیوشیمیایی و

فیزیولوژیکی) جدایه‌ها: تمام جدایه‌ها در آزمون‌های اوره‌آز، احیای نیترات، کاتالاز، هیدرولیز نشاسته، اسکولین، آربوتین و تولید نشاسته دارای واکنش مثبت و در آزمون‌های اکسیداز، هیدرولیز ژلاتین، کازین، تولید استوئین، تولید گاز از گلوکز، متیل رد، آرژنین دی هیدرولاز، لسیتیناز و پروتئاز منفی بودند. در آزمون تولید  $H_2S$  از سیستئین، پیتون و تیوسولفات سدیم تعدادی از جدایه‌های مثبت ضعیف بودند.

جدایه‌ها توانایی هیدرولیز توئین ۲۰ را نداشتند ولی توئین ۴۰، ۶۰، ۸۰ را به خوبی هیدرولیز کردند. جدایه‌ها از گلوکز، سلوبیوز، مانوز، دی زایلوز، ال آرابینوز، فروکتوز، سالیسین، آلفا متیل دی گلوکوزید، ترهالوز و سوکروز به عنوان منبع کربن استفاده و از آن‌ها اسید نیز تولید کردند اما قادر به استفاده از مزواریتیتول، اینولین، ملی بیوز و فوکوز نبودند. همچنین جدایه‌ها از سرین و سترات استفاده کردند اما قادر به مصرف دی تارتارت، ال اورنیتین، دی گلاکتورونات، دی-ال متیونین، ال متیونین، والین و گلیسین نبودند. نتایج آزمون‌های انجام شده در جدول ۳ خلاصه شده است.

و با استفاده از دستگاه ژل داکيومنت از آن عکس برداری شد (Ausuble et al., 1992).

### توالی‌یابی و رسم درخت فیلوژنی: بعد از تکثیر قطعه‌ها،

توالی آن‌ها توسط شرکت بایونیر<sup>۱</sup> کره جنوبی تعیین گردید و با استفاده از نرم‌افزار BioEdit ver. 7.0.9.0 توالی‌ها اصلاح شده و با استفاده از نرم‌افزار بلاست<sup>۲</sup> (Blast) موجود در ژن بانک NCBI همسانی توالی‌ها با توالی‌های موجود در ژن بانک مقایسه شدند. توالی‌ها در ژن بانک ثبت گردیدند. همچنین با استفاده از توالی‌های به دست آمده و توالی‌های موجود در ژن بانک NCBI به وسیله نرم افزار MEGA 5.05 درخت فیلوژنی ترسیم گردید.

### نتیجه و بحث

در این بررسی ۴۲ جدایه با کلونی و شکل میکروسکوپی مخمر مانند از شاخه‌های آلوده به شانکر درختان میوه شامل ۹ جدایه از بادام (*Prunus amygdalus*)، ۱۴ جدایه از هلو (*P. persica*) و شلیل (*P. persica* var. *nectarine*)، ۵ جدایه از زردآلو (*P. armeniaca*)، ۸ جدایه از گیلاس (*P. avium*) و ۶ جدایه از آلو (*P. domestica*)، آلوچه (*P. cerasifera*) و آلبالو (*P. cerasus*) از مناطق مختلف استان‌های مرکزی ایران روی محیط آگار غذایی حاوی سوکروز (NAS) جداسازی شد. در مشاهده میکروسکوپی، سلول‌های ۳-۸ میکرومتری مشاهده شد که برخی در حال جوانه زدن بودند (شکل ۱). جدایه‌ها در محیط‌های کشت PDA، YEPDA، SDA، CMA کشت داده شدند. کلونی جدایه‌ها در محیط NAS محدب و به رنگ کرم تا صورتی کم رنگ بود (شکل ۲). در محیط کشت SDA جدایه‌ها صورتی کدر و دارای رشد زیاد و متراکم بودند. در محیط کشت PDA جدایه‌ها پس از چند روز نگه‌داری در دمای اتاق لعاب تولید کردند. در سایر محیط‌ها نیز کلونی جدایه‌ها کرم تا صورتی رنگ بودند. مشخصات جدایه‌های به

۱-Bioneer

۲-Basic local alignment search tool

جدول ۱- میزبان، موقعیت جغرافیایی و نام جدایه‌های به دست آمده از درختان میوه هسته‌دار آلوده به شانکر از استان‌های مرکزی ایران

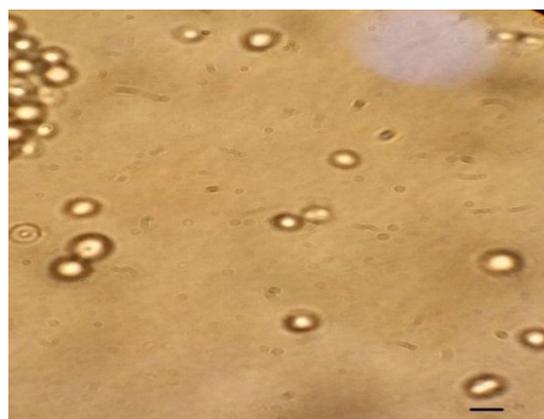
**Table 1.** Name of the isolates recovered from stem cankers of stone fruit trees, host species and the geographical distribution in some central provinces of Iran

نام جدایه‌ها Name of isolates	موقعیت جغرافیایی Location	میزبان Host
M1, M2, M3(P27)	استان اصفهان Isfahan	آلو، آلوچه و آلبالو Plum, prune and sour cherry
M4, M5, M6	استان قم Qom	
M7, M8, M9, M10, M11	استان اصفهان Isfahan	بادام Almond
M12, M13	استان چهارمحال و بختیاری Chaharmahal & Bakhtiari	
M14, M15	استان یزد Yazd	
M16, M17, M18, M19, M20	استان قم Qom	زردآلو Apricot
M21, M22, M23, M24, M25, M26	استان اصفهان Isfahan	گیلاس Cherry
M27, M28	استان قم Qom	
M29, M30, M31, M32, M33	استان اصفهان Isfahan	هلو و شلیل Peach and Nectarine
M34, M35, M36, M37	استان چهارمحال و بختیاری Chaharmahal & Bakhtiari	
M38, M39(P2) , M40, M41, M42	استان قم Qom	



شکل ۲- *Cryptococcus magnus* ICMP 20085. کلونی‌های رشد کرده روی محیط آگار غذایی حاوی سوکروز (NAS) بعد از ۳ روز

**Fig. 2.** *Cryptococcus magnus* ICMP 20085. The colonies grown on nutrient agar sucrose (NAS) after 3 days



شکل ۱- *Cryptococcus magnus* ICMP 20085. سلول‌های مخمری

در مشاهده میکروسکوپی از کلونی‌های رشد کرده روی NAS با اندازه شاخص 6 μm

**Fig. 1.** *Cryptococcus magnus* ICMP 20085, yeast cells, were observed on microscopic examination of the colonies grown on NAS. Bar=6 μm.

### تکثیر و توالی یابی نواحی ITS, 26S, RPB2, RPB1:

ناحیه ITS جدایه‌های P2 هلوی قم (ICMP 20085) و P27 از آلوی اصفهان تکثیر، توالی یابی و به کمک نرم‌افزار بلاست با توالی‌های موجود در ژن بانک مقایسه شد. طول قطعه تکثیری در حدود ۶۰۰ جفت باز (در مقایسه با نشانگر جرم مولکولی در ژل آگارز) تخمین زده شد. توالی جدایه‌های P2 (GenBank Accession Nos. KF667113) و P27 (GenBank Accession Nos. KF667114) شباهت ۱۰۰-۹۹ درصدی را با گونه *Cryptococcus magnus* نشان دادند.

مقایسه توالی ژن‌های 26S و RPB2 جدایه P2 (به ترتیب با کدهای ژن بانک KF891470 و KT803608) با دیگر توالی‌های موجود در ژن بانک، نشانگر بیشترین شباهت آن‌ها با توالی‌های مربوط به گونه *C. magnus* بود. در توالی یابی و بررسی ژن RPB1 از جدایه P2، با توجه به عدم وجود توالی قطعه مورد نظر ژن RPB1 بعضی از گونه‌های *Cryptococcus* در ژن بانک، قطعه RPB1 جدایه مرجع *C. magnus* نیز به همراه جدایه P2 توالی یابی شد. شباهت‌های توالی جدایه P2 و جدایه مرجع *C. magnus* ۹۹٪ بود. درخت فیلوژنی ترسیم شده بر پایه توالی‌های یاد شده، نتایج آزمون‌های فنوتیپی و بلاست توالی‌ها را تایید کرده و جدایه‌ها به عنوان *C. magnus* شناسایی شدند (شکل ۴ و ۵).

شانکر درختان میوه هسته‌دار باعث خشک شدن نهال‌ها و درختان جوان، کاهش محصول در درختان مسن، خشکیدن جوانه‌ها و گل‌ها و گاهی تمامی تاج درختان بیمار می‌شود. به این بیماری بلاست جوانه، بلاست شکوفه و سوختگی سیخک هم گفته می‌شود. از نشانه‌های بارز این بیماری تشکیل شانکر همراه با ترشح صمغ روی تنه و شاخه می‌باشد. محل ایجاد شانکر در آغاز کمی فرو رفته، قهوه‌ای رنگ و تیره‌تر از بافت‌های سالم اطراف است (Ashkan, 2011).

وجود شانکر باکتریایی ناشی از *Pseudomonas syringae* در بسیاری از مناطق ایران گزارش شده و در برخی مناطق کشور هم علاوه بر *Pss*، بیماری ناشی از



شکل ۳- علائم شانکرمانند ظاهر شده در ساقه جوان هلوی تزریق

شده با سوسپانسیون جدایه P2، ۱۰ روز پس از مایه زنی

Fig. 3. Canker symptoms observed 10 days after inoculation of a suspension of isolate P2 on peach shoot

جدول ۲- نتایج آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های به دست آمده از درختان میوه هسته‌دار آلوده به شانکر در تعدادی از استان‌های مرکزی ایران

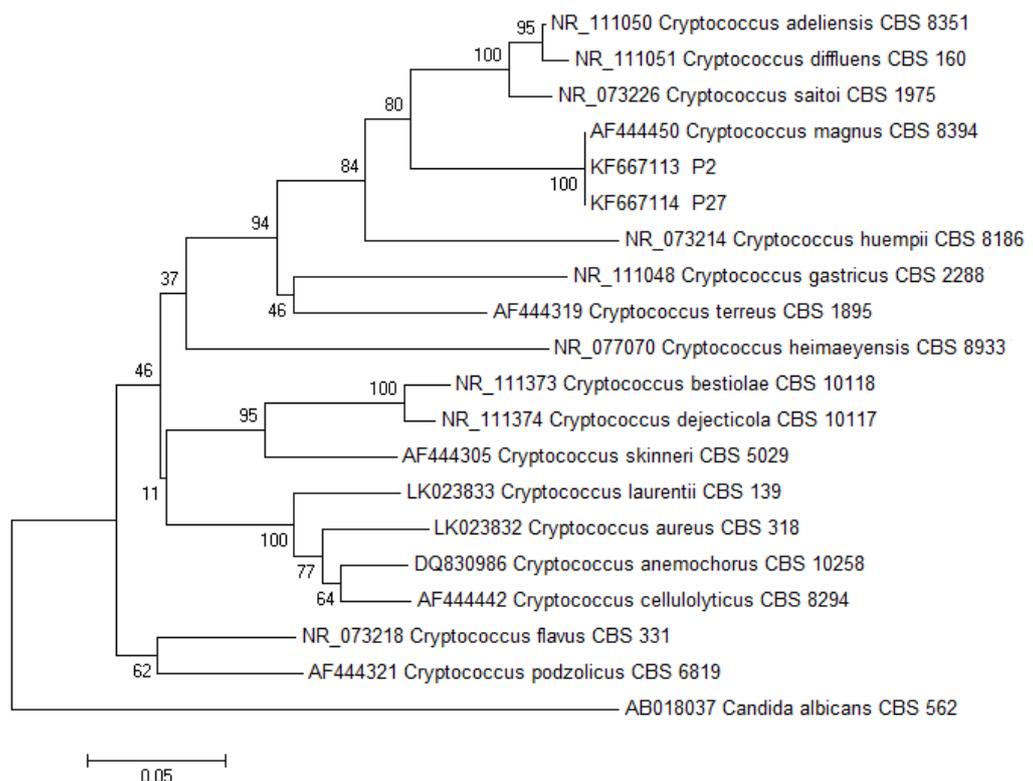
Table 2. Results of pathogenicity tests of isolates obtained from cankers on stone fruit trees in some central provinces of Iran

جدایه‌ها isolates	میزبان اولیه	شدت علائم ایجاد شده Severity of symptoms
M3(P27)	آلو plum	شلیل S
M9, M10	بادام Almond	هلو S
M32, M33, M39(P2)	هلو و شلیل Peach and Nectarine	شلیل S
M17, M18	زردآلو Apricot	هلو M
M22	گیلاس Cherry	هلو M

S: علائم شانکر مانند بعد از حدود ۱۰ روز به سرعت به اندازه ۲ برابر میزان تلقیح رسیده و در حال پیشرفت بود.  
M: علائم شانکر مانند بعد از حدود ۱۰ روز به آرامی به اندازه میزان تلقیح رسیده و در حال پیشرفت بود.

Scorzetti *et al.*, 2002). نتایج به دست آمده از توالی‌یابی دو ناحیه ITS و 26S هم دیگر را تأیید کردند. با توجه به اهمیت ژن‌های RPB1 و RPB2 در شناسایی و طبقه‌بندی قارچ‌ها (Findley *et al.*, 2009 و Hibbett *et al.*, 2007) قطعه‌هایی از این ژن‌ها هم در جدایه P2 تکثیر و توالی‌یابی شد. در مقایسه توالی ژن RPB2 جدایه مورد بررسی در پایگاه NCBI، شباهت بالای جدایه را با گونه *C. magnus* منعکس نمود. مقایسه ژن RPB1 جدایه P2 با توالی جدایه مرجع *C. magnus* شباهت بالای آنها را آشکار ساخته و نتایج حاصل از مقایسه دو ناحیه ITS و 26S را تأیید کرد.

*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* مشاهده شده است (Bahar *et al.*, 1982; Jami *et al.*, 2005, Shams-Bakhsh and Rahimian, 1997). در سال‌های اخیر نیز در ایران شانکر درختان میوه هسته‌دار ناشی از گونه‌های *Cryptococcus adeliensis* و *C. magnus* از استان خراسان رضوی و شمالی و ناشی از *C. uzbekistanensis* از مناطق مرکزی کشور گزارش شده است (Borhani and Rahimian, 2013; Borhani and Rahimian 2015; ) (Dehghan-Niri *et al.*, 2015). در این بررسی با مقایسه توالی ناحیه ITS ژنوم جدایه‌های P2 و P27 در پایگاه NCBI شباهت جدایه‌ها با گونه *C. magnus* آشکار شد. به منظور شناسایی دقیق‌تر، ناحیه ژنومی 26S جدایه P2 نیز تکثیر و توالی‌یابی شد



شکل ۴- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ناحیه ITS جدایه‌های P2 و P27 عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار به دست آمده از برخی استان‌های مرکزی ایران و سایر جدایه‌های ثبت شده در ژن بانک با روش اتصال همسایه‌ها و مدل Maximum Composite Likelihood و با برنامه MEGA5، اعداد ثبت شده در محل انشعاب‌ها نشانگر درصد تایید خوشه بندی با ۱۰۰۰ تکرار نمونه‌برداری (bootstrap) است. خط نشانه برابر ۰/۰۵ تغییر نوکلئوتید در هر محل است.

**Fig. 4.** Phylogenetic tree based on the sequences of ITS region. The tree was constructed by the neighbor-joining method and Maximum Composite Likelihood model. The numerals represent the confidence level (bootstrap) from 1000 resamplings. The bar indicates number of nucleotide changes per sites. *Candida albicans* was used as an outgroup.

جدول ۳- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های به دست آمده از درختان میوه هسته‌دار آلوده به شانکر در تعدادی از استان‌های مرکزی ایران

Table 3. Phenotypic characteristics of yeast-like isolates obtained from cankers on stone fruit trees in some central provinces of Iran

واکنش جدایه	آزمون	واکنش جدایه‌ها	آزمون
Reaction of strains	Test	Reaction of strains	Test
-	تولید استوئین Production of acetoin	-	اکسیداز Oxidase
-	واکنش متیل رد (MR) Methyl red reaction	+	رشد هوازی/ بی‌هوازی Oxidative/fermentative
-	لیسیپیناز Lecithinase	+	واکنش فوق حساسیت HR reaction
-	پروتئاز protease	+	تولید لوان Levan formation
+ <sup>w</sup> / -	تولید H <sub>2</sub> S از تیوسولفات سدیم H <sub>2</sub> S from thiosulfate	۴	تحمل نمک طعام (درصد) NaCl tolerance
+ <sup>w</sup> / -	تولید H <sub>2</sub> S از سیستئین H <sub>2</sub> S from cysteine	-	تولید رنگدانه فلورسنت Flourescent pigment
+ <sup>w</sup> / -	تولید H <sub>2</sub> S از پپتون H <sub>2</sub> S from peptone	-	تولید گاز از گلوکز Gas from glucose
	تولید اسید از: Acid from:	+	کاتالاز Catalase
+	دی گلوکز D(+)-Glucose	+	هیدرولیز اسکولین Esculin hydrolysis
+	سلوبیوز Cellobiose	+	هیدرولیز نشاسته Starch hydrolysis
+	دی مانوز D(+)-Mannose	+	تولید نشاسته Starch formation
+	رافینوز Raffinose	-	هیدرولیز ژلاتین Gelatin hydrolysis
+	ال آرابینوز L(-)-Arabinose	-	هیدرولیز کازئین Casein hydrolysis
+	دی زایلوز (D)-Xylose	+	لهانیدن سیب‌زمینی Potato rot
-	اینولین Inulin	+	هیدرولیز توئین ۸۰ Tween 80 hydrolysis
+	فروکتوز Fructose	+	هیدرولیز توئین ۶۰ Tween 60 hydrolysis
+	سوکروز Sucrose	+	هیدرولیز توئین ۴۰ Tween 40 hydrolysis
+	رامنوز Rhamnose	+ <sup>w</sup>	هیدرولیز توئین ۲۰ Tween 20 hydrolysis
-	مزواریتروتیول Meso-erythritol	+	احیاء نترات Nitrate reduction
+ <sup>g</sup>	میواینوزیتول Myo-inositol	+	اوره‌آز Urease
+/-	آدونیتول Adonitol	-	تایروزیناز Tyrosinase
+	سوربیتول Sorbitol	-	آرژنین دهیدرولاز Arginine dihydrolase
+	ال آلانین L-Alanine	+	سالیسین Salicin
-	ال اورنیتین L-Ornithine	+ <sup>g</sup>	اتانول Ethanol
-	دی گالاکتورونات D-Galacturonate	+	دولسیتول Dulcitol
-	دی ال متیونین DL-Metionin	-	ملی بیوز Melibiose

ادامه‌ی جدول ۳- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های به دست آمده از درختان میوه هسته‌دار آلوده به شانکر در تعدادی از استان‌های مرکزی ایران

**Table 3 Continued.** Phenotypic characteristics of yeast-like isolates obtained from cankers on stone fruit trees in some central provinces of Iran

واکنش جدایه	آزمون	واکنش جدایه‌ها	آزمون
Reaction of strains	Test	Reaction of strains	Test
-	L-metionin ال متیونین	+	$\alpha$ -methyl-D-glucoside آلفامتیل دی گلوکوزید
-	Valin والین	+	Trehalose ترهالوز
-	Glycin گلایسین	-	L-Fucose ال فوکوز
+	Malonate مالونات	-/+	Lactose لاکتوز
+	DL-Malate مالات	-	Xylitol زایلیتول
-	Fumarate فومارات	-	Palatinose پالاتینوز
+	Citrate سیترات		Utilization of : استفاده از :
-	D-Tartrate دی تارتارات	+	Succinate سوکسینات
		+	L-serine ال سرین

g: Growth only, no acid or alkali produced; w: Weak reaction or slow growth

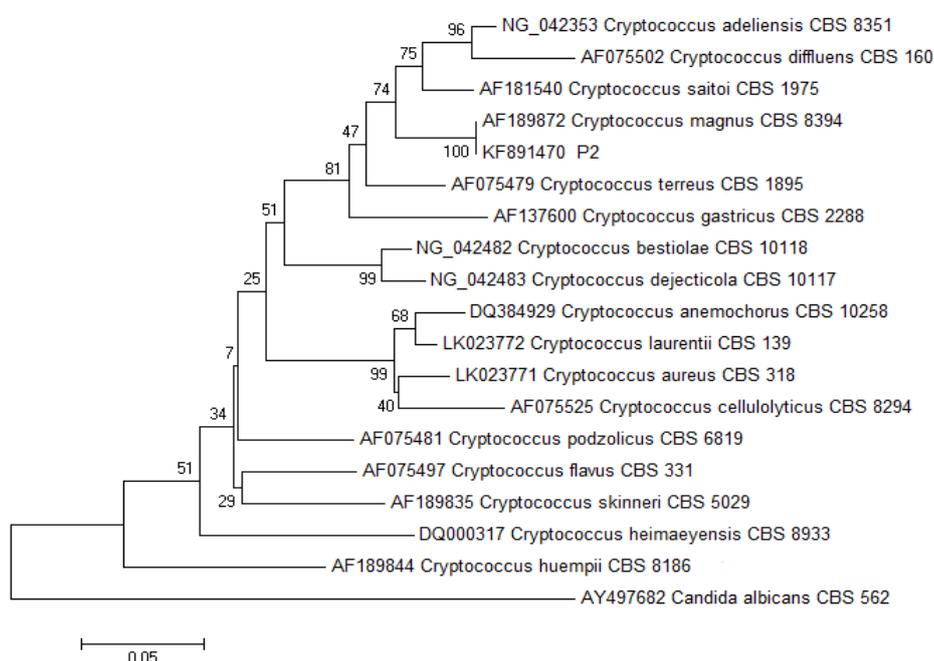
g: فقط رشد، بدون تولید اسید یا قلیا، w: ضعیف

+: All isolates ( $\geq 90\%$ ) positive or utilize

+: همه (بیش از ۹۰ درصد) جدایه‌ها مثبت

-: All isolate ( $\geq 90\%$ ) negative or no growth

-: همه (بیش از ۹۰ درصد) جدایه‌ها منفی



**شکل ۵-** درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ناحیه 26S جدایه P2 عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار به دست آمده از برخی استان‌های مرکزی

ایران و سایر جدایه‌های ثبت شده در ژن بانک با روش اتصال همسایه‌ها و مدل Maximum Composite Likelihood و با برنامه MEGA5، اعداد ثبت شده در محل انشعاب‌ها نشانگر درصد تایید خوشه بندی با ۱۰۰۰ تکرار نمونه‌برداری (bootstrap) است. خط نشانه برابر ۰/۰۵ تغییر نوکلئوتید در هر محل است.

**Fig. 5.** Phylogenetic tree based on the partial sequences of 26S rDNA. The tree was constructed by the neighbor-joining method and Maximum Composite Likelihood model. The numerals represent the confidence level (bootstrap) from 1000 replicate samplings. The bar indicates number of nucleotide changes per sits. *Candida albicans* was used as an outgroup.

(Fonseca *et al.*, 2011).

در مجموع می‌توان عنوان کرد که گونه *C. magnus* در ایجاد شانکر ساقه روی اکثر گونه‌های درختان میوه هسته‌دار علاوه بر شهرهای استان‌های خراسان رضوی و شمالی در مناطق دیگری از کشور از جمله استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، قم و یزد دخالت دارد (Borhani and Rahimian, 2013). در این راستا بررسی میکروارگانیسم‌های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار در سایر مناطق کشور در جهت شناسایی و تصمیم صحیح در مدیریت این بیماری ضروری به نظر می‌رسد.

## References

- AGRIOS, G. N. 2005. Plant Pathology (5th ed.). Academic Press, San Diego, CA. 992 p.
- ASHKAN, S. M. 2011. Fruit Crops Diseases in Iran. Aeeizh press, Tehran, Iran. 427p.
- AUSUBLE, F., F. M. BRENT, R. E. KINGSTONE, MOOR, D. D., J. A. SMITH, J. G. SEIDEMAN and K. STRUHL, 1992. Current Protocol in Molecular Biology. Greene, Publishing Associates, Wiley Interscience, New York, USA. 4757 p.
- AYERS, S. H., P. RUPP and W. T. JOHNSON, 1919. A Study of the alkali forming bacteria in milk. U.S. Department of Agriculture. 782p.
- BAHAR, M., H. MOJTAHEDI and A. AKHIANI, 1982. Bacterial canker of apricot in Isfahan. Iranian Journal of Plant Pathology, No. 18: 58–68.
- BANAPOUR, A., Z. ZAKIEE and G. AMANI, 1990. Isolation of *Pseudomonas syringae* from sweet cherry in Tehran Province. Iranian Journal of Plant Pathology, No. 26:67–72.
- BORHANI, B. and H. RAHIMIAN, 2013. Yeast species as the causal agents or associated with stem canker of stone fruit trees. Iranian Journal of Plant Pathology, No. 49: 461-462.
- BORHANI, B. and H. RAHIMIAN, 2015. *Cryptococcus adeliensis* inciting branch canker on stone fruit trees. European Journal of Plant Pathology
- DEGHAN-NIRI, M., H. RAHIMIAN and V. BABAEIZAD, 2015. *Cryptococcus uzbekistanensis* causing canker on stone fruit trees. New Disease Reports, NO. 31: 13.
- FELL, J. W., T. BOEKHOUT, A. FONSECA, G. SCORZETTI and A. STATZELL-TALLMAN, 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by Large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, No. 50: 1351-1371.
- FINDLEY, K., M. RODRIGUEZ-CARRES, B. METIN, J. KROISS, A. FONSECA, R. VILGALYS and J. HEITMANL, 2009. Phylogeny and Phenotypic Characterization of Pathogenic *Cryptococcus* Species and Closely Related Saprobic Taxa in the Tremellales. Eukaryotic Cell, No. 8: 353–361.
- FONSECA, A., T. BOEKHOUT and J. W. FELL, 2011. *Cryptococcus* Vuillemin(1901), pp. 1661-1737. In Kurtzman, C. P., Fell, J. W. and Boekhout, T. (eds.), The Yeasts, a Taxonomic Study (5th ed.). Elsevier, London.
- GLUSHAKOVA, A. and I. Y. CHERNOV, 2010. Seasonal dynamics of the structure of epiphytic yeast communities. Microbiology, No. 79: 830-839.

تمام جدایه‌ها اوره آز مثبت بودند، این ویژگی با نظر فونسکا و همکاران (Fonseca *et al.*, 2011) که این آزمون را از مشخصه‌های جنس *Cryptococcus* مطرح کرده‌اند هم خوانی دارد. اکثر جدایه‌ها از گلوکز، سلوبیوز، دی زایلوز، ال آرابینوز، سالیسین، ترهالوز و سوکروز به عنوان تنها منبع کربن استفاده کردند، این یافته نیز در توافق با نتایج Fonseca *et al.* (2011) است. بر خلاف یافته‌های این محققین جدایه‌ها توانایی مصرف میواینوزیتول و اتانول را نداشتند و تنها رشد محدودی در محیط حاوی این دو منبع داشتند. این محققین جدایه‌های *C. magnus* را از محیط‌های مختلفی مانند سطوح گیاهی، خاک و نیز نمونه‌های آزمایشگاهی جدا کرده‌اند

- HIBBETT, D. S., M. BINDER, ..., 2007. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, No. 509–547.
- JAMI, F., M. N. KAZEMPOUR, S. A. ELAHINIA and G. KHODAKARAMIAN, 2005. First Report of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on Stone Fruit Trees from Iran. *Journal of Phytopathology*, No. 153: 371–372.
- KANO, R., S. HOSAKA and A. HASEGAWA, 2004. First isolation of *Cryptococcus magnus* from a cat. *Mycopathologia*, No. 157: 263-264.
- KURTZMAN, C. P., J. W. FELL and T. Boekhout, 2011. Gene sequence analyses and other DNA-based methods for yeast species recognition. pp 137-144. In: Kurtzman, C. P, Fell, J. W. and Boekhout, T. (eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study* (5th ed.). Elsevier, London.
- LEAW, S. N., H. C. CHANG, H. F. SUN, R. BARTON, J. P. BOUCHARA and T. C. CHANG, 2006. Identification of Medically Important Yeast Species by Sequence Analysis of the Internal Transcribed Spacer Regions. *Journal of Clinical Microbiology*, No. 44: 693–699.
- MATHENY, P. B. 2005. Improving phylogenetic inference of mushrooms with RPB1 and RPB2 nucleotide sequences (Inocybe; Agaricales). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, No. 35: 1-20.
- MILLAR, B. C., X. JIRU, J. E. MOORE and J. A. EARLE, 2000. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *Journal of Microbiological Methods*, No. 42: 139-147.
- MIRHENDI, S. H., P. KORDBACHEH, B. KAZEMI, S. SAMIEI, M. PEZESHKI and M. R. KHORRAMIZADEH, 2001. A PCR-RFLP method to identification of the important opportunistic Fungi: *Candida* Species, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium solani*. *Journal of Public Health*, No. 30: 103-106.
- RAHIMIAN, H., Z. NICKRAVESH, F. ARABI and V. REZAEIAN, 2004. The interference of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* in blossom blast of peach in Mazandaran. *Proceeding of the 16th Plant Protection Congress of Iran*, Tabriz. 424p.
- SCHAAD, N. W., J. B. JONES and W. CHUN, 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. (3rd ed.). APS Press, USA.
- SCHISLER, D. A., W. J. JANISIEWICZ, T. BOEKHOUT, and C. P. KURTZMAN, 2011. Agriculturally important yeasts: Biological control of field and postharvest diseases using yeast antagonists, and yeasts as pathogens of plants. pp. 45-52. In: Kurtzman, C. P., Fell J. W. and Boekhout T. (eds.), *The Yeasts, a Taxonomic Study* (5th ed.). Elsevier, London.
- SCORZETTI, G., J. FELL, A. FONSECA and A. STATZELL-TALLMAN, 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: A comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. *FEMS Yeast Research*, No. 2: 495-517.
- SHAMS-BAKHSH, M. and H. RAHIMIAN, 1989. Identification of bacterial canker agent of stone fruits in Mazandaran. *Proceeding of the 9th Plant Protection Congress of Iran*, Mashhad. 134p.
- SHAMS-BAKHSH, M. and H. RAHIMIAN, 1997. Comparative study on agents of citrus blast and bacterial canker of stone fruits in Mazandaran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, No. 33: 132-143.
- WHITE, T. J., T. BRUNS, S. LEE and J. W. TAYLOR, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315-322. In: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White T. J. (eds). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, San Diego, CA, USA.