



Extensional Article

Bacterial Bark Canker Disease of Walnut Tree

MEYSAM AZADI MOGHADAM¹, ZABIHOLLAH AZAMI SARDOOEI^{1✉},
MEHDI AZADVAR²

1- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. 2- Department of Plant Protection, South Kerman Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Jiroft, Iran

Received: 25.10.2018

Accepted: 14.04.2019

AzadiMoghadam M, AzamiSardooei Z and Azadvar M (2019) Bacterial bark canker disease of walnut tree. Plant Pathology Science 8(2):38-44. DOI: 10.2982/PPS.8.2.38

Abstract

Bacterial canker disease is one of the most destructive diseases of walnut trees that causes die back and plant decline and also great damages to quality and quantity of fruits. The disease can be observed in two forms, at depth and the surface of the bark which cause by two bacteria, *Brenneria nigrifluens* and *B. rubrifaciens*, respectively. The most important way of the pathogen penetration is the wounds in the trunk and branches which are occurred due to human activities or mechanical harvesting equipment. The disease becomes severe with the deep irrigation and when the nutrition is insufficient and temperature and humidity are high. Current paper explains history, importance, symptoms, biology, host range, sampling and isolation method also differential characteristics of bacteria and methods of disease management.

Key words: Bacterium, *Brenneria*, Canker, Walnut

✉ Corresponding author: zabih.azami@gmail.com

مقاله ترویجی

بیماری شانکر باکتریایی پوستی درخت گردو

میثم آزادی مقدم^۱، ذبیح اله اعظمی ساردوئی^۱ و مهدی آزادوار^۲

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، ۲- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، جیرفت.

پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۵

دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۰۳

آزادی مقدم م، اعظمی ساردوئی ذ و آزادوار م. ۱۳۹۸. بیماری شانکر باکتریایی پوستی درخت گردو. دانش

بیماری‌شناسی گیاهی ۸(۲): ۳۸-۴۴. DOI: 10.2982/PPS.8.2.38

چکیده

بیماری شانکر باکتریایی یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های گردو است که باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول، خشکیدگی شاخه‌ها و زوال درختان گردو می‌شود. این بیماری به دو شکل عمقی و سطحی به ترتیب توسط دو باکتری *Brenneria nigrifluens* و *B. rubrifaciens* ایجاد می‌شود. مهم‌ترین راه ورود بیمارگرها در تنه و شاخه‌ها، زخم‌های ناشی از فعالیت‌های انسانی یا وسایل برداشت مکانیکی می‌باشد. این بیماری با افزایش درجه حرارت، رطوبت بالای ناشی از آبیاری کرتی یا غرقابی و تغذیه ناکافی شدت می‌یابد. در مقاله حاضر تاریخچه، اهمیت، نشانه‌ها، زیست‌شناسی و دامنه میزبانی باکتری‌ها، نحوه نمونه‌برداری، جداسازی و خصوصیات افتراقی باکتری‌ها و روش‌های مدیریت بیماری بیان شده است.

واژگان کلیدی: باکتری، شانکر، گردو، *Brenneria*

مقدمه

گردو از محصولات مهم خشکباری دنیا است که در بعضی از کشورهای صنعتی به‌عنوان یک درخت روغنی بسیار مهم محسوب می‌شود (Fruto 2010). ایران با ۱۲۰۲۷۹ هکتار سطح زیر کشت بارور و تولید ۲۶۱۳۴۰۹ تن رتبه سوم تولید گردو دنیا را به خود اختصاص داده است. استان‌های مهم تولیدکننده گردو شامل کرمان، همدان، لرستان، کرمانشاه، مازندران، اصفهان، گیلان و اردبیل می‌باشند (آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی ۱۳۹۶). یکی از بیماری‌های مهم گردو در دنیا، بیماری شانکر پوستی گردو ناشی از باکتری *Brenneria nigrifluens* Wils. است که اولین بار از ایالات متحده (Wilson et al. 1957) و پس‌از آن از اسپانیا (Lopez et al. 1994)، ایران (Rahimian 1989, Harighi and Rahimian 1997)، ایتالیا (Morone et al. 1998, Saccardi et al. 1998, Scortichini 1999, Carella et al. 2003)، فرانسه (Menard et al. 2004)، صربستان (Popovic et al. 2013, Anguiano-Castellano et al. 2016) و مجارستان (Vegh et al. 2014) گزارش شده است. در ایران این بیماری اولین بار در سال ۱۳۶۸ در استان مازندران (منطقه زاغمرز و نکا) (Rahimian 1989) و در سال‌های اخیر از استان‌های کردستان، فارس، کهگیلویه و بویراحمد، گیلان، گلستان، کرمان و لرستان گزارش شده است (Bakhtiari and Qasemi 2007, Jamalzadeh et al. 2009, Amirsardari et al. 2015). ویلسون و همکاران (۱۹۶۷) شانکرهای عمیق‌تر و شدیدتر از شانکرهای ایجادشده توسط *B. nigrifluens* را روی تنه درختان گردو گزارش کردند و آن را تحت نام شانکر عمقی پوست گردو نامیده و عامل آن را *B. rubrifaciens* توصیف نمودند. بیماری شانکر عمقی

✉ مسؤل مکاتبه: zabih.azami@gmail.com

پوست گردو ناشی از گونه باکتری *B. rubrifaciens* Wils. در سال ۱۳۹۶ از ایران اولین بار توسط امیرسرداری و همکاران شناسایی و گزارش گردید (Amirsardari et al. 2017).

۱- نشانه‌های بیماری

نشانه‌های اولیه بیماری شانکر سطحی پوستی گردو با شکاف‌های طولی کوچک روی تنه و شاخه‌ها که در طول بهار و تابستان شیره قهوه‌ای تا سیاه از آن‌ها خارج می‌شود، بروز می‌کند. با حذف قسمت سطحی پوست، ناحیه نکروتیک قهوه‌ای تا سیاه آشکار می‌شود. در این بیماری نکروز معمولاً سطحی است اما گاهی اوقات به طرف کامبیوم و آوند چوبی خارجی نیز پیشروی می‌کند. در شانکر باکتریایی عمقی، شکاف‌ها عمیق‌تر بوده و قسمت‌ها چوبی نکروز می‌شود (Wilson et al. 1957, Loreti et al. 2006). اکثر رقم‌ها گردو به شانکر باکتریایی حساس هستند و نشانه‌های بیماری ممکن است زمانی که درخت گردو تحت تنش‌های محیطی قرار گیرد توسعه یابند (Teviotdale and Panopoulos 1994). ردیابی باکتری عامل بیماری به علت مشهود نبودن نشانه‌ها خارجی و چرخه زندگی درون‌رستی آن مشکل می‌باشد. دستیابی به روش‌های سریع، ارزان و قابل‌اعتماد برای امکان ردیابی آلودگی از درختان بدون نشانه‌ها بیماری جهت توسعه مؤثر راهبردهای مدیریتی این بیمارگر لازم است (McClellan and Kluepfel 2009).

۲- روش نمونه‌برداری و جداسازی بیمارگر

برای جداسازی باکتری عامل بیماری ابتدا پوست قسمت آلوده دارای نشانه‌ها شانکر، زیر جریان آب به‌خوبی شسته و سپس قطعه‌هایی از بافت آلوده با محلول هیپوکلرید سدیم و آب مقطر سترون به نسبت ۹:۱ برای مدت ۱ دقیقه ضدعفونی می‌شوند. پس از شستشوی مجدد با آب مقطر سترون قطعاتی از بافت آلوده را توسط تیغ سترون جدا کرده و در ۲-۳ میلی‌لیتر آب مقطر سترون خرد نموده و پس از ۲۰ دقیقه، یک قطره از سوسپانسیون به‌دست‌آمده روی محیط کشت انوزین متیلن بلو (EMB) به‌صورت پنج‌ضلعی (مخطط) کشت داده می‌شود. تشنگ‌های پتری کشت‌شده به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری می‌شوند. تک پرگنه‌های باکتری غالب از هر تشنگ پتری انتخاب و در محیط کشت نوترینت آگار سوکروز (NAS) کشت داده می‌شوند. درنهایت تک پرگنه‌های حاصل خالص‌سازی می‌شوند (Taghipour et al. 2015).

۳- خصوصیات باکتری‌های عامل بیماری

گونه‌های *Brenneria* گرم منفی، میله‌ای شکل، فاقد اندوسپور یا کیپسول، منفرد و به‌ندرت جفتی، متحرک با تازک‌های محیطی هستند. در اعضای این جنس آزمون‌های اکسیداز، لوآن، لسیتیناز، هیدرولیز ژلاتین، کازین، نشاسته و فوق حساسیت در توتون منفی می‌باشد. این باکتری‌ها در محیط کشت EMB پرگنه‌های سبز براق تولید می‌کنند (Yousefi Kopaei et al. 2007). شایان‌ذکر است که این باکتری‌ها قبلاً در جنس *Erwinia* قرار می‌گرفتند اما پس از تقسیم جنس *Erwinia* بر اساس توالی 16S rDNA به جنس‌های *Brenneria*، *Erwinia* و *Pectobacterium* در سال ۱۹۹۸، به جنس *Brenneria* منتقل شدند (Hauben et al. 1998). خصوصیات افتراقی فنوتیپی و تغذیه‌ای گونه‌های باکتری عامل این بیماری در جدول ۱ آورده شده است.

۴- چرخه بیماری

بیماری شانکر باکتریایی در درختان گردو توسط دو گونه باکتری *B. rubrifaciens* (عامل شانکر عمقی پوست) و *B. nigrifluens* (عامل شانکر سطحی پوست) ایجاد می‌شود. شانکر عمقی خطرناک‌تر از شانکر سطحی است ولی هیچ‌کدام به‌تنهایی کشنده نیستند (Keshavarzi 2011). هر دو گونه باکتری در حاشیه شانکرها و یا تراوش‌های آن‌ها زمستان‌گذرانی می‌کنند و در بهار با جاری شدن تراوشات، به بیرون راه می‌یابند.

جدول ۱. خصوصیات فنوتیپی و تغذیه‌ای افتراقی *B. rubrifaciens* و *Brenneria. nigrifluens* (Yousefi Kopaei et al. 2007).

Table 1. Differential phenotypic and nutritional characteristics of *B. nigrifluens* and *B. rubrifaciens* (Yousefi Kopaei et al. 2007).

Characteristic	<i>B. nigrifluens</i>	<i>B. rubrifaciens</i>
Tolerance of NaCl 5%	+	-
Urease production	+	-
Acetoin production	+	-
Growth at 40°C	+	-
Pink pigment on YDC	-	+
Acid production from:		
meso erithritol	-	+
myo inositol	+	-
Trehalose	+	-
D (+) cellobiose	+	-
D- sorbitol	+	-
D- fructose	+	-
D (+) mannose	+	-
Utilization of:		
Asparagine	+	-
Salicine	+	-

سپس به کمک باد و باران و از راه زخم‌های موجود در پوست به درخت نفوذ می‌کنند. زمانی که درخت در معرض تنش‌های محیطی قرار گیرد، شدت بیماری افزایش می‌یابد (Teviotdale and Panopoulos 1994). باکتری *B. nigrifluens* در طول ماه‌های گرم فعال‌تر و در ماه‌های سرد غیرفعال است، بنابراین، جداسازی باکتری در طول ماه‌های گرم موفقیت‌آمیزتر است (Wilson et al. 1957). تکثیر شدید باکتری *B. nigrifluens* در هوای مرطوب و دمای ۲۰ تا ۲۹ درجه سلسیوس اتفاق می‌افتد (Falahi Charkhabi et al. 2011). این باکتری در شرایط آزمایشگاه به گردو و آفتابگردان حمله می‌کند (Hassan Zadeh 1996) ولی تاکنون درخت گردو تنها میزبان شناخته‌شده آن در شرایط طبیعی شناخته شده است (Keshavarzi 2011). باکتری *B. rubrifaciens* به وسیله دستگاه‌های برداشت کننده مکانیکی و یا چوب زدن در هنگام برداشت محصول و با ایجاد زخم‌های عمیق روی پوست درخت انتشار می‌یابد. همچنین بیمارگر ممکن است به وسیله پیوند چوبی منتقل شود (Teviotdale and Panopoulos 1994). باکتری *B. rubrifaciens* به دلیل داشتن زندگی درون‌رستی (Thapa et al. 2010) دارای دوره کمون می‌باشد به طوری که در درختان ضعیف نشانه‌ها زودتر نمایان می‌شود ولی در درختان قوی‌تر بعد از چندین سال نشانه‌ها بیماری پدیدار می‌گردد. شدت این بیماری در فصول بهار و تابستان بیشتر است (Keshavarzi 2011).

۵- مدیریت بیماری

۵-۱- رقم‌های مقاوم

استفاده از رقم‌های مقاوم، نهال سالم و عاری از آلودگی جهت احداث باغ ضروری است زیرا وجود چند درخت آلوده در درازمدت باعث آلودگی تمام باغ می‌شود (Bakhtiari and Qasemi 2007). باکتری *B. rubrifaciens* اغلب روی گردو رقم هارتلی (Hartley) شایع است، اگرچه، اکثر رقم‌های گردو به این

باکتری حساس هستند (Teviotdale and Panopoulos 1994). همچنین تمام رقم‌های گردوی تجاری ایرانی به باکتری *B. nigrifluens* حساس هستند ولی پایه تجاری پارادوکس به این باکتری مقاوم بوده و دچار بیماری شانکر پوستی نمی‌شود (Keshavarzi 2011).

۲-۵- عملیات به باغی

زخم‌ها و شکاف‌های ایجادشده در تنه و شاخه درختان ناشی از فعالیت‌های انسانی مانند چوب زدن در هنگام برداشت و یا استفاده از دستگاه مکانیکی تکان‌دهنده و همچنین حمله پرنده‌گان و حشرات، راه نفوذ باکتری عامل شانکر پوستی را به درختان گردو مستعد می‌سازد. براین اساس لازم است تا حد امکان مانع صدمه به درختان گردو شد (Bakhtiari and Qasemi 2007). حذف قسمت‌های آلوده درخت و سوزاندن آن‌ها در جلوگیری از توسعه بیماری مؤثر است (Amirsardari et al. 2015). با بالا رفتن درجه حرارت، بارندگی و آبیاری و تغذیه ناکافی در باغات گردو، شیوع بیماری شانکر پوستی باکتریایی شدت می‌یابد. آبیاری باغ‌ها به صورت متعادل و در صورت امکان به صورت قطره‌ای انجام شود (Bakhtiari and Qasemi 2007). برای تقویت درخت استفاده از کودهای فسفات و پتاسه (۱-۰/۵ کیلوگرم به ازای هر درخت، بسته به سن درخت) در اسفندماه و کود ازته (۱-۰/۵ کیلوگرم به ازای هر درخت، در دو نوبت نیمی در فروردین و نیم دیگر یک ماه بعد) توصیه می‌شود. همچنین در زمستان از کود دامی (۳۰-۴۰ تن در هکتار، هر ۲-۳ سال یک بار) به صورت برگرداندن به عمق ۳۰ سانتی متری خاک استفاده شود (Keshavarzi 2011).

۳-۵- مبارزه شیمیایی

در مراحل اولیه نفوذ باکتری عامل شانکر پوستی، با چاقوی باغبانی ضدعفونی شده قسمت‌های آلوده را حذف نموده، سپس در دو الی سه نوبت محل تراشیده شده را با اکسی کلرور مس ۳-۵ در هزار و یا مخلوط بردو چهار درصد پانسمان کرده تا از نفوذ عمقی بیمارگر ممانعت شود (Bakhtiari and Qasemi 2007). شانکر باکتریایی پوستی درختان گردو با سموم شیمیایی رایج یا تزریق آنتی‌بیوتیک قابل کنترل نیست. فقط در مراحل اولیه ظهور نشانه‌های بیماری، تراشیدن شانکر و ضدعفونی محل آن با سموم مسی یا هیپوکلریت سدیم می‌تواند مؤثر باشد؛ اما این کار در شانکرهای پیشرفته نه تنها باعث ریشه‌کشی باکتری نمی‌شود بلکه به تضعیف درخت و تشدید بیماری می‌انجامد (Keshavarzi 2011).

نتیجه‌گیری

بروز و شیوع بیماری شانکر پوستی باعث کاهش کمیت و کیفیت در تولید گردو می‌شود. اجرای برنامه مدیریت کارآمد بیماری، نیازمند آگاهی کامل از بیمارگر، از جمله شناسایی دقیق، بقاء، بررسی تنوع ژنتیکی، چرخه زندگی و دامنه میزبانی آن می‌باشد. مدیریت بیماری از طریق رعایت بهداشت باغ، روش‌های به باغی، استفاده از نهال سالم و عاری از بیماری، استفاده از رقم‌های مقاوم و ضدعفونی زخم‌ها با سموم مسی صورت می‌گیرد.

References

1. Amirsardari V, Darvishniya M and 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 8:120-129. (In Persian with English Abstract).
2. Amirsardari V, Sepahvand Sh and Madani M (2017) Identification of deep bark canker agent of walnut and study of its phenotypic, pathogenic, holotypic and genetic diversity in Iran. Journal of Plant Interactions 12:340-347.
3. Anguiano-Castellano J., Arredondo-Valdés R., Cerna-Chávez E., Beltran-Beache M., Delgado-Ortiz JC and Ochoa-Fuentes YM (2016) Review of diagnosis techniques for

منابع

- Brenneria* spp in walnut (*Juglans regia*). Revista Mexicana de Fitopatología 34:158-172.
4. Bakhtiari MH and Qasemi A (2005) Shallow bark bacterial canker of walnut trees in Hamadan province. 4th Congress of Horticultural Sciences, Tehran, Iran, 23p. (In Persian).
 5. Carella D, Spigno P and de Vita N (2003) Occurrence of trunk canker of walnut in Campania region (Italy). Informatore Fitopatologico 53:32-33.
 6. Falahi Charkhabi N, Shams-Bakhsh M, Rahimian H and Khodayegan P (2011) Identification of *Brenneria nigrifluens* isolates. Iranian Journal of Plant Pathology 7:263-277. (In Persian with English Abstract).
 7. Fruto D (2010) Bacterial diseases of walnut and hazelnut and genetic resources. Journal of Plant Pathology 92:79-85.
 8. Harighi B and Rahimian H (1997) Widespread occurrence of shallow bark canker of walnut trees in Mazandaran province. Iranian Journal of Plant Pathology 33:48-50. (In Persian with English Abstract).
 9. Hassan Zadeh N (1996) The study of a few bacterial diseases in Iran. Applied Entomology and Phytopathology 63:14-15.
 10. Hauben L, Moore ER, Vauterin L, Steenackers M, Mergaert J, Verdonck L and Swings J (1998) Phylogenetic position of phytopathogens within the Enterobacteriaceae. Systematic and Applied Microbiology 21:384-397.
 11. Jamalzadeh A, Shams-Bakhsh M and Rahimian H (2009) Occurrence and distribution of shallow bark canker of walnut trees in Northern provinces of Iran. Journal of Plant Production 2:16.
 12. Keshavarzi M (2011) Walnut diseases in Iran, diagnosis and management. Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Karaj, Iran, 135 p. (In Persian).
 13. Lopez MM, Marti R, Morente C, Orelana N, Ninot T and Aleta N (1994) Phytopathogenic bacteria identified in walnut in Spain. Investigacion Agraria, Produccion y Proteccion Vegetale Fuera de Serie 2:307-314.
 14. Loreti S, Gallelli A, Piccirilloand P and Belisario A (2006) Bacterial Bark canker on English walnut. 5th International Walnut Symposium, Sorrento, Italy, pp. 433- 436.
 15. McClean AE and Kluepfel DA (2009) Genetic loci involved in rubrifacine production in the walnut pathogen *Brenneria rubrifaciens*. Phytopathology 99:145-151.
 16. Menard M, Delort F, Baudry A and Le Saux M (2004) First report of bacterial canker of walnut caused by *Brenneria nigrifluens* in France. Plant Disease 88:220.
 17. Morone C, Janse JD and Scortichini M (1998) Bark canker of Persian walnut (*Juglans regia*) tree incited by *Erwinia nigrifluens* in Italy. Journal of Phytopathology 146:637-639.

18. Popovic T, Ivanovic Z, Zivkovic S, Trkulja N and Ignjatov M (2013) First report of *Brenneria nigrifluens* as the causal agent of shallow-bark canker on walnut trees (*Juglans regia*) in Serbia. *Plant Disease* 97:1504
19. Rahimian H (1989) Bactrial canker of walnut trees in Sari. *Proceedings of 9th Congress of Plant Protection, Mashhad, Iran*, p.150. (In Persian with English Abstract)
20. Rahimian H. 1368. Bacterial bark canker disease of walnut in Sari. *9th Iranian Plant Protection Congress, Ferdowsi University of Mashhad*, p.150.
21. Saccardi A, Bonetti V, Melegatti A and Cristanini M (1998) Occurrence of *Erwinia nigrifluens* on English walnut (*Juglans regia*) tree in the Veneto region (Northern Italy). *Journal of Plant Pathology* 80:63-65.
22. Scortichini M (1999) Rinvenimento di *Erwinia nigrifluens* su noce da legno nel Lazio. *Informatore Fitopatologico* 49:52-54.
23. Taghipour M, Rahimian H and Babaizad V (2015) Genetic diversity of strains of *Acidovorax oryzae* causal agent of brown stripe of rice in Mazandaran province. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51:11-25. (In Persian with English Abstract).
24. Teviotdale BL and Panopoulos N (1994) Development of a polymerase chain reaction (PCR) protocol to detect the deep bark canker pathogen, *Erwinia rubrifaciens*, in walnut tissue. *Walnut Research Reports* P: 279.
25. Thapa SP, Lim CK, Kim SK, Cho JM, Hur JH and Park DH (2010) Direct detection of *Brenneria rubrifaciens* by polymerase chain reaction (PCR-based assay) using rubrifacine synthetic gene. *African Journal of Microbiology Research* 4:1754-1757.
26. Vegh A, Toth A, Zambo A, Borsos G and Palkovics L (2014) First Report of Bacterial Bark Canker of Walnut Caused by *Brenneria nigrifluens* in Hungary. *Plant Disease* 98:988.
27. Wilson EE, Starr MP and Berger JA (1957) Bark canker, a bacterial disease of the Persian walnut tree. *Phytopathology* 47:669-673.
28. Yousefi Kopaei F, Taghavi M and Banihashemi Z (2007) Occurrence of shallow bark canker of walnut (*Juglans regia*) in southern provinces of Iran. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10:1507-1512.