

مقاله پژوهشی

برهمکنش *Paecilomyces formosus* و سویه‌های *Bacillus pumilus* در وقوع و شدت سرخشکیدگی درختان پستهالهام توسلی^۱، نادر حسن‌زاده^{۲*}، محمد مرادی^۳، پژمان خدایگان^۴، کلودیا پروبست^۵

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛ ۳- دانشیار بخش بیماری‌شناسی گیاهی پژوهشکده پسته، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رفسنجان، ایران؛ ۴- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج)، رفسنجان، ایران؛ ۵- استاد بخش تکنولوژی و مدیریت کشاورزی، دانشکده مهندسی، دانشگاه علوم کاربردی اتریش علیا، ولز، اتریش
(تاریخ دریافت: آذر ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۹)

چکیده

سرخشکیدگی درختان پسته یکی از مهمترین و شایع‌ترین بیماری‌های درختان پسته می‌باشد که به لحاظ اقتصادی خسارت زیادی به صنعت پسته کشور وارد آورده است. با توجه به نقش باکتری‌ها در بروز و توسعه این بیماری، برهمکنش بین جدایه‌های *Bacillus* spp. و قارچ *Paecilomyces formosus* در ایجاد و توسعه بیماری بررسی شد. به این منظور ابتدا توان بیماری‌زایی جدایه‌ها روی سرشاخه در شرایط آزمایشگاه ارزیابی، و جدایه‌های منتخب در شرایط باغ زیر بافت پوست سرشاخه‌های پسته رقم اوحدی مایه‌زنی شد. براساس نتایج به‌دست آمده، جدایه‌های *Bacillus pumilus* و *P. formosus* به تنهایی قادر به ایجاد بیماری روی سرشاخه‌های درختان پسته در شرایط باغ بودند که میزان پیشروی طولی علائم در بافت آوندی در مایه‌زنی تنها با جدایه‌های باکتریایی از ۴،۵ تا ۱۴ و در ترکیب با جدایه قارچی از ۱۰ تا ۳۲ سانتی‌متر متغیر بود. در سرشاخه‌های مایه‌زنی شده، جداسازی جدایه‌های باکتریایی از مرز علائم و ۱۰ سانتی‌متر پایین‌تر از آن در بافت سالم سرشاخه نیز صورت گرفت. براساس ویژگی‌های مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی، جداسازی جدایه‌های باکتریایی *B. pumilus* برای اولین بار به‌عنوان یکی از عوامل سرخشکیدگی درختان پسته گزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: برهمکنش، پسته، سرخشکیدگی، *Bacillus* spp.، *Paecilomyces formosus*

Interactions between *Paecilomyces formosus* and *Bacillus pumilus* strains in occurrence and development of pistachio tree die back

E. TAVASOLI¹, N. HASANZADEH^{2*}, M. MORADI³, P. KHODAYGAN⁴, C. PROBST⁵

1 and 2. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; 3. Pistachio Research Center, Horticultural Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran; 4. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University, Rafsanjan, Iran; 5. Agriculture Technology and management Department, University of Applied Sciences Upper Austria, School of Engineering, 4600 Wels, Austria

Abstract

Pistachio die-back is one of the most important and prevalent diseases of pistachio orchards, causing severe reduction of pistachio yield. Due to the important role of bacteria in the occurrence and development of pistachio die-back, the interaction of *Bacillus* spp. and *Paecilomyces formosus* was investigated in this research. The isolates of both groups were injected beneath of the inner bark of branches (Ohadi cultivar) using sterile syringes alone or in mixture. According to the results, *Bacillus pumilus* and *P. formosus* isolates were able to cause disease on the branches, with longitudinal developments in vascular tissue. Bacterial isolates alone caused lesions ranged 4.5-14 cm in inoculation sites. Mix inoculations, significantly, increased disease development in xylem varied 10-32 cm. Based on morphological, biochemical and molecular properties, isolation of *B. pumilus* strains is reported for the first time as one of the causal agents of pistachio die-back in Iran.

Keywords: interaction, pistachio, dieback, *Bacillus* spp., *Paecilomyces formosus*

مقدمه

سرخشکیدگی سرشاخه‌ها و شاخه‌ها یکی از مهمترین بیماری‌های درختان پسته در کشور می‌باشد که به‌عنوان یک معضل جدی در باغ‌های پسته استان کرمان مطرح است. پراکندگی بیماری در استان کرمان زیاد بوده به‌طوری که تاکنون از مناطق مختلف پسته‌کاری شامل سیرجان، زرنند، کرمان و رفسنجان گزارش شده است و حداقل ۸۵ درصد باغ‌های پسته، آلودگی 1-100 درصد را نشان می‌دهند (Heidarian et al., 2018). علائم این بیماری، ابتدا به‌صورت لکه‌های کوچک قهوه‌ای تا سیاه‌رنگ در سطح پوست شاخه‌ها ظاهر می‌شود و با پیشرفت بیماری، لکه‌ها گسترش یافته و باعث سبزخشک شدن سرشاخه‌ها می‌گردند. بافت‌های آلوده به‌سبب اختلاف رنگ از قسمت‌های سالم شاخه به آسانی قابل تشخیص می‌باشند. خشکیدگی شاخه‌ها معمولاً از بالا به پایین پیشروی می‌کند و گاهی تا پایین‌ترین قسمت شاخه‌ها و تنه اصلی و برخی اوقات طوقه ادامه می‌یابد (Aminae and Ashkan et al., 1997 and Alaei, 1997; Ershad, 1987; Heidarian et al., 2017 and Heidarian et al., 2018). در این بیماری، رشد رویشی و میزان تولید محصول در درختان آلوده به‌شدت کاهش می‌یابد. عدم رشد رویشی بهینه باعث کاهش پوشش برگی شده و این امر، شاخه‌ها و سرشاخه‌ها را در معرض آفتاب شدید تابستان و استرس‌های محیطی قرار می‌دهد. سرخشکیدگی درختان پسته یک بیماری مرکب بوده و تحت تأثیر فاکتورهای مختلف زنده و غیرزنده قرار دارد. از جمله عوامل غیرزنده محیطی که باعث ضعیف شدن درختان و افزایش شدت بیماری می‌شود می‌توان به زخم‌های ایجاد شده ناشی از برداشت و همچنین هرس، خشکی، آفتاب‌سوختگی، بادهای شدید و عدم تعادل عناصر غذایی در خاک اشاره کرد. سرخشکیدگی باکتریایی درختان پسته برای اولین بار در سال ۱۹۹۲ در استرالیا گزارش گردید و عامل آن استرین‌های جنس *Xanthomonas* معرفی شدند (Edwards and Taylor, 1998). پس از آن، علائمی نظیر زوال، سرخشکیدگی، تغییر رنگ آوندها و

نهایتاً مرگ درختان پسته در استرالیا مشاهده و براساس بررسی‌های تکمیلی، گونه *Xanthomonas translucens* به‌عنوان عامل بیماری معرفی شد (Marefat et al., 2004; Facelli et al., 2005). از ایران باکتری *Bacillus licheniformis* به‌عنوان یکی از عوامل مولد سرخشکیدگی درختان پسته استان کرمان معرفی شده بود (Baradaran and Ghasemi, 2010). و پیش از آن از قارچ *Paecilomyces variotii* به‌عنوان عامل این بیماری نامبرده شده بود (Aminae and Ershad, 1987; Aminae, 1993).

براساس تحقیقات انجام شده، گونه‌های گیاهی ممکن است هم‌زمان مورد حمله چندین عامل بیماری‌زای مختلف قرار گیرند و توسط بیشتر از یک گونه بیماری‌زا آلوده شوند (Fitt et al., 2006). در خیلی از موارد، آلودگی توسط یک میکروارگانیسم، علائم شدید یک بیماری را نشان نمی‌دهد و آلودگی‌های هم‌زمان میکروارگانیسم‌ها، به جهت برهمکنش‌های هم‌افزایی، توسعه و شدت بیشتر بیماری را موجب می‌شوند. گزارش‌های کمی در مورد بیماری‌های مرکب ایجاد شده توسط پاتوژن‌های قارچی و باکتریایی وجود دارد. به‌عنوان مثال، نکروز انتهایی میوه گردو که بیمارگرهای قارچی متعدد شامل *Phomopsis*, *Colletotrichum*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Alternaria* و باکتری *Xanthomonas arboricola* در آن درگیر هستند (Belisario et al., 2002). مثال دیگر پوسیدگی ریشه گیاه *Panax notoginseng* است که توسط تعداد زیادی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی *Alternaria tenuis*, *Alternaria panax*, *Cylindrocarpon didymum*, *Cylindrocarpon destructans*, *Rhizoctonia*, *Phytophthora cactorum*، *F. oxysporum*، *F. solani* و *Phoma herbarum solani* و دو باکتری *Pseudomonas* sp. و *Ralstonia* sp. ایجاد می‌شود (Miao et al., 2006; Ma et al., 2013). در این ارتباط برخی از سویه‌های گونه‌های جنس باسیلوس به‌عنوان عامل همراه یا عامل اصلی در بیماری سرخشکیدگی درختان میوه معرفی شده‌اند. به‌طور مثال *B. pumilus* به‌عنوان عامل همراه با *Pseudomonas syringae* در بروز سرخشکیدگی گلابی آسیایی (Li et al., 2009) و



شکل ۱- مناطق نمونه‌برداری شده در استان کرمان.

Fig. 1. Locations of sampling areas in Kerman province.



شکل ۲- علائم بیماری سرخشکیدگی درختان پسته در باغ‌های مورد بازدید استان کرمان. (a-c) کم رشدی، خشک شدن برگ‌ها و سرشاخه‌های پسته. (d) تغییر رنگ پوست سرشاخه. (e و f) ترک‌های سطح پوست. (g) علائم آلودگی باکتریایی و قارچی آوندهای چوبی در نمای برش عرضی سرشاخه. (h-k) علائم تیبیک آلودگی باکتریایی آوندهای چوبی در نمای برش عرضی سرشاخه.

Fig. 2. Symptoms of pistachio dieback in Kerman orchards.

a-c) Visible dieback and discoloration of branches and leaves. d) Development of pistachio dieback and its symptoms on surface of bark. e and f) Transverse and longitudinal cracks of bark. g) Symptoms of bacterial and fungal infections (brown to black wood discoloration on part or all of the wood tissue) in xylem vessels at the cross-section. h-k) Typical symptoms of bacterial infections (brown to black spots) in xylem vessels at the cross-section.

به‌عنوان عامل اولیه در سرخشکیدگی پسته معرفی شده است (Baradaran and Ghasemi, 2010). در حال حاضر، مکانیسم‌های برهمکنش عوامل یادشده در این بیماری‌های مرکب که منجر به اثر هم‌افزایی آن‌ها می‌شود ناشناخته است. در بیشتر مطالعات آزمایشگاهی، بررسی‌های تک‌عاملی در زمینه شناسایی یک گونه بیماری‌زا و یا گونه‌های مختلف یک جنس بیماری‌زا به‌عنوان عامل یک بیماری خاص انجام می‌شود. این شیوه بررسی سبب می‌گردد تا دانش ما از همراهی احتمالی بیمارگرها که منجر به افزایش شدت بیماری می‌شود، ناقص باشد. بررسی نحوه برهمکنش بیمارگرها برای درک بهتر بیماری‌زایی آن‌ها، همچنین نقش آن در توسعه بیماری و در نتیجه، ارائه راهکارهای مدیریتی بیماری می‌تواند موثر باشد. تاکنون در مورد نقش هم‌زمان بیمارگرهای قارچی و باکتریایی و همچنین نحوه برهمکنش آن‌ها در این بیماری تحقیقی صورت نگرفته است لذا به‌منظور بررسی نقش باکتری‌ها در بروز و توسعه این بیماری، در این پژوهش سعی شد پس از تایید توان بیماری‌زایی جدایه‌های باکتریایی و قارچی در شرایط آزمایشگاه، تأثیر برهمکنش دو بیمارگر (سویه‌های *Paecilomyces formosus* و *Bacillus pumilus*) در شرایط آزمایشگاه و باغ، مورد بررسی قرار گیرد.

روش بررسی

نمونه‌برداری و جداسازی

طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ از باغ‌های پسته استان کرمان شامل شهرستان‌های رفسنجان، کرمان، زرنند، انار، شهربابک و سیرجان نمونه‌برداری انجام شد (شکل ۱). نمونه‌برداری از شاخه‌ها و سرشاخه‌های درختان آلوده صورت گرفت (شکل ۲). نمونه‌ها پس از ثبت مشخصات، در صندوق یخ قرار داده شده و به آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی پژوهشکده پسته کشور منتقل گردیدند. در آزمایشگاه، از مرز بافت سالم و آلوده، بخش‌هایی به ابعاد 4×4 میلی‌متر از بافت چوب، بریده و با آب شستشو شد. قطعات به مدت ۶۰ ثانیه در

نیز سلولی با رنگ‌آمیزی گرم ارزیابی شدند. همچنین به منظور شناسایی دقیق جدایه‌ها، آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی لازم انجام شد (Schaad *et al.*, 2001). بررسی ویژگی‌های جدایه‌های قارچی نیز بر اساس کلید قارچ‌شناسی انجام گرفت و شناسایی دقیق جدایه‌ها با توجه به ویژگی‌های موفولوژیکی و فیزیولوژیکی تعیین شد. ویژگی‌هایی شامل حضور شکل جنسی، رنگ پرگنه، طول یاخته کنیدی‌زا، نحوه انشعاب‌ها و اندازه کنیدیفور، اندازه فیالید، اندازه و شکل کنیدیوم‌ها، تولید اسید، رشد در محیط‌های کشت و دماهای مختلف ارزیابی شد (Samson, 1974; Samson *et al.*, 2009; Hoog *et al.*, 2000 and Heidarian *et al.*, 2018).

۲- شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتریایی

برای استخراج DNA ژنومی از کیت (SINACLON DNPTM Kit) استفاده شد و ناحیه ژنی 16S rDNA با استفاده از آغازگرهای عمومی fd1 و rD1 تکثیر شد. همچنین تکثیر ژن *gyrA* نیز برای جدایه‌های منتخب انجام شد (جدول ۱). جهت انجام الکتروفورز افقی از ژل آگارز ۱ درصد و بافر TBE 1X استفاده شد. پس از توالی‌یابی محصولات PCR برای بررسی میزان مشابهت نوکلئوتیدی با توالی‌های موجود در NCBI (National Center of Biotechnology Information)، توالی‌ها هم‌تراز گردیدند.

الکل ۷۰ درصد غوطه‌ور و سپس سه مرتبه با آب مقطر سترون شسته شد.

جهت جداسازی باکتری‌ها، قطعات به مدت ۱۵ دقیقه در آب مقطر سترون و در دمای اتاق نگه‌داری و از سوسپانسیون حاصل از هر نمونه به میزان یک لوپ روی محیط کشت NA (Nutrient Agar) مخطط گردید (Schaad *et al.*, 2001). ظروف پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. تک کلنی‌های حاصله مجدد روی محیط کشت NA کشت و خالص و تا زمان استفاده در یخچال در دمای ۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. به منظور جداسازی جدایه‌های *Paecilomyces*، قطعات با دستمال کاغذی سترون خشک و روی ظروف پتری حاوی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) قرار داده شد. ظروف پتری به مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی نگه‌داری شد. پرگنه‌های متعلق به جنس *Paecilomyces* جهت خالص‌سازی روی ظروف پتری حاوی محیط کشت WA (Water Agar) کشت و از روش نوک ریشه برای خالص‌سازی آن‌ها استفاده شد.

شناسایی جدایه‌ها

۱- بررسی ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌های قارچی و باکتریایی کلنی‌های خالص باکتری‌ها از نظر ویژگی‌های ماکروسکوپی مانند رنگ، اندازه، شکل، حاشیه، برجستگی و

جدول ۱- مشخصات آغازگرها و برنامه PCR استفاده شده در این تحقیق.

Table 1. The primer characteristics and PCR program used in this study.

Primer	Target	Amplicon Size (bp)	Sequence	PCR Program	Source
fd1	16SrDNA	1500	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'	94, 9 min 94, 30 s	Weisburg <i>et al.</i> , 1991
rD1			5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'	56, 30 s × 30 72, 90 s	
gyrA-42f	gyrA	928	5'-CAG TCAGGA AAT GCG TAC GTC CTT-3'	72, 10 min 94, 4 min 94, 30 s	Chun and Bae, 2000
gyrA-1066r			5'-CAA GGT AAT GCT CCA GGC ATT GCT-3'	60, 30 s × 35 72, 1 min 72, 10 min	

ج- بررسی توان بیماری‌زایی جدایه‌ها روی سرشاخه‌های درختان پسته در شرایط باغ

در تمامی آزمایش‌های بیماری‌زایی، از درختان پسته رقم اوحدی با سن ۳۰ سال واقع در باغ آزمایشی پژوهشکده پسته استفاده شد. مایه‌زنی‌ها از اواخر اسفند تا اوایل فروردین ماه انجام شد. جهت بررسی‌های تکمیلی، تعداد ۱۰ جدایه که توان بیماری‌زایی بالایی را در شرایط آزمایشگاه داشتند انتخاب و در آزمون باغی به کار گرفته شدند. بدین منظور، سوسپانسیون با غلظت 10^7 CFU/ml از کشت تازه باکتری‌های منتخب در آب مقطر سترون تهیه (Peng et al., 2013) و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون، زیر پوست سرشاخه‌های سالم دوساله تزریق شد. محل تزریق نیز با پارافیلیم پوشانده شد.

جهت مایه‌زنی *Paecilomyces formosus*، یک جدایه با بیشترین توان بیماری‌زایی در شرایط آزمایشگاه، انتخاب و به مدت هفت روز در لوله‌های حاوی PDA کشت داده شد. پس از هفت روز، ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون به لوله اضافه شد و به مدت ۱۰ ثانیه تا دو دقیقه روی شیکر لوله تکان داده شد. سوسپانسیون حاصل از پارچه ململ دولایه عبور داده شد و غلظت نهایی سوسپانسیون با هموسیتمتر اندازه‌گیری شد و در غلظت 10^7 اسپور در میلی لیتر تنظیم و به کار گرفته شد. نحوه مایه‌زنی جدایه قارچی روی سرشاخه پسته در باغ، مشابه روش یاد شده برای جدایه‌های باکتریایی به زیر پوست سرشاخه‌های سالم دوساله انجام شد.

د- بررسی برهمکنش جدایه‌های قارچی و باکتریایی در شرایط باغ جهت بررسی برهمکنش جدایه‌ها، مخلوط زاد مایه به نسبت یک به یک و با غلظت‌های یادشده تهیه و روش مایه‌زنی روی سرشاخه‌های پسته در شرایط باغ مشابه روش مایه‌زنی جداگانه قارچ و باکتری انجام شد (Scotton et al., 2015). همچنین برای هر جدایه هم در مایه‌زنی‌های جداگانه و هم مخلوط، سه تکرار در نظر گرفته شد و از تزریق آب مقطر سترون به سرشاخه به‌عنوان شاهد استفاده شد.

آزمون‌های بیماری‌زایی

الف- بررسی توان جدایه‌های باکتریایی در القا واکنش فوق حساسیت (Hypersensitivity Reaction Test)

جدایه‌های باکتریایی با خصوصیات ماکروسکوپی باسیلوس‌ها و همچنین واکنش مثبت در رنگ‌آمیزی گرم، انتخاب و استفاده شد. سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته این جدایه‌ها تهیه و به پشت برگ‌های شمعدانی (cv. Burley) تزریق شد. بروز واکنش فوق حساسیت، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی ارزیابی شد (Schaad et al., 2001).

ب- غربالگری جدایه‌های باکتریایی و قارچی دارای توان بیماری‌زایی در شرایط آزمایشگاه

برای بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها از سرشاخه‌های بریده ۲ ساله سالم درختان پسته رقم اوحدی که به‌این بیماری حساس است استفاده گردید (Alizadeh et al., 2000). تعداد ۱۲۱ جدایه باسیلوس جداسازی شده از سرشاخه‌های درختان پسته در این آزمون غربالگری بیماری‌زایی شد. پس از شستشو و ضدعفونی سطحی سرشاخه‌های سالم دوساله به طول ۲۰-۱۸ و قطر ۱،۵-۱ سانتی‌متر در آزمایشگاه، سوسپانسیونی با غلظت تقریبی 10^7 CFU/ml از کشت تازه باکتری‌ها در آب مقطر سترون تهیه و زیر پوست سرشاخه تزریق و محل تزریق با پارافیلیم پوشانده شد. جهت مایه‌زنی جدایه‌های *Paecilomyces formosus* ۳۹ جدایه ارزیابی شد. سرشاخه‌های درختان پسته با یک بلوک میسلومی از حاشیه پرگنه‌های سه روزه *P. formosus*، روی محیط کشت PDA مایه‌زنی شدند. بلوکی از حاشیه در حال رشد قارچ (به قطر ۴ میلی‌متر) تهیه و زیر پوست سرشاخه در سوراخی به‌همین قطر قرار داده شد و روی آن با پارافیلیم پوشانده شد. سرشاخه‌ها درون لوله‌های آزمایش سترون حاوی پنبه مرطوب سترون (کف لوله آزمایش) قرار گرفتند و در دیسکاتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۲۰ روز، جدایه‌ها بر اساس میزان پیشروی علائم روی سرشاخه‌ها گروه‌بندی شدند و جداسازی مجدد عامل مایه‌زنی شده از مرز بافت سالم و آلوده انجام شد.

ارزیابی توانایی استقرار جدایه‌ها و توسعه بیماری روی سرشاخه‌ها در شرایط باغ نیز پس از دو ماه انجام شد. بدین منظور، ۳۰ سانتی‌متر پایین‌تر از محل مایه‌زنی، سرشاخه از درخت جدا و در آزمایشگاه، میزان پیشروی علائم بیماری از محل مایه‌زنی درون چوب سرشاخه اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری

داده‌های به دست آمده با استفاده از طرح آماری کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شد. همچنین برای بررسی تأثیر برهمکنش بین جدایه‌های باکتریایی با گونه قارچی بر میزان پیشروی علائم بیماری، تجزیه و تحلیل داده‌های به دست آمده با استفاده از آزمون t مستقل دو طرفه انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد و تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری IBM SPSS Statistics انجام شد.

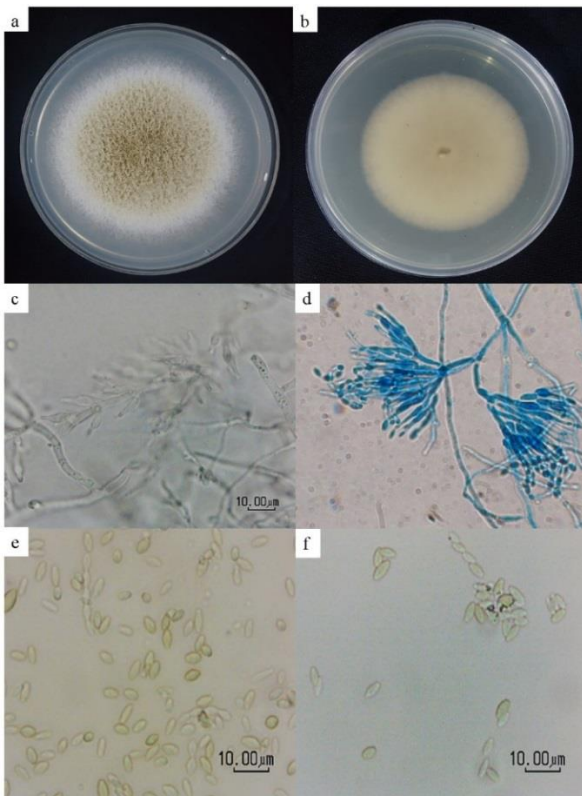
نتیجه و بحث

یکی از معضلات باغ‌های پسته کشور عارضه سرخشکیدگی می باشد که باعث کاهش شدید رشد و تولید محصول می‌گردد. در باغ‌های مورد بازدید، علائم ظاهری بیماری روی قسمت‌های مختلف شامل سرشاخه، شاخه و در برخی موارد روی تنه قابل مشاهده بود که به صورت تغییر رنگ ظاهری پوست، ترک‌های ریز و گاهی کاهش رشد درخت دیده می‌شد. در مقطع عرضی شاخه نیز تغییر رنگ بافت آلوده به صورت نقاط و یا مناطق قهوه‌ای روشن تا تیره در بافت آوندهای چوبی متغیر بود (شکل ۲). این موضوع می‌تواند در بررسی‌های اولیه، باعث عدم تشخیص صحیح علائم سرخشکیدگی درختان پسته با علائم پژمردگی ورتیسلیومی در مقطع عرضی شاخه‌ها و سرشاخه‌ها گردد که عدم توصیه صحیح مدیریت بیماری را در پی دارد. در جداسازی‌های انجام شده از مناطق مختلف پسته‌کاری استان کرمان، از بین تعداد ۲۸۱ جدایه باکتری، ۷۷ جدایه متعلق به جنس باسیلوس تشخیص داده شدند و در آزمون فوق حساسیت تعداد ۴۰ جدایه واکنش مثبت نشان دادند.

جدایه‌های قارچی توانایی رشد در دمای ۲۵، ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس روی محیط‌های کشت مالت آگار و زاپک مخمر آگار را داشتند. همچنین قادر به تولید اسید در محیط کشت کراتین آگار و رشد میسلیمی سریع‌تر در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نسبت به ۳۷ درجه سلسیوس بودند. رنگ پرگنه قارچ زرد روشن و کرمی تا کرم زیتونی و پشت کلنی از رنگ کرم تا زیتونی متغیر بود. میسلیم‌ها بدون رنگ و قطر آن‌ها از ۱،۸ تا ۶ میکرومتر متغیر بود. کنیدیوفورها به صورت فراهم و یا غیرمنظم منشعب شده بودند. فیالیدها فلاسکی شکل با ابعاد ۱۹-۳،۵×۹-۲ میکرومتر، در پایه به صورت بیضوی تا استوانه‌ای و به سمت نوک باریک شده بودند. کنیدیومها بیضوی تا لیمویی شکل، تک سلولی با ابعاد ۸-۱،۵×۳،۵-۳ میکرومتر، به صورت زنجیره طویل روی فیالیدها تشکیل می‌شدند. کلامیدوسپورها به رنگ قهوه‌ای، در کشت‌های مسن به صورت انتهایی به قطر ۱۱-۳ میکرومتر، دارای دیواره ضخیم و کروی تا تخم‌مرغی شکل بودند. براساس نتایج به دست آمده، جدایه‌ها متعلق به گونه *P. formosus* تشخیص داده شدند (شکل ۳).

براساس نتایج به دست آمده از آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های باکتریایی در آزمایشگاه از میان ۴۰ جدایه باسیلوس مورد بررسی (B1-B40)، میزان پیشروی علائم بیماری روی سرشاخه‌ها از ۰ تا ۹،۵ سانتی‌متر متغیر بود که با تغییر رنگ ایجاد شده از محل تزریق سوسپانسیون باکتری و گسترش طولی در سرشاخه‌ها قابل مشاهده بود. بیشترین و کمترین علائم روی سرشاخه‌ها به ترتیب مربوط به جدایه‌های B3 باسیلوس با ۹،۵ سانتی‌متر پیشروی و B16، B28، B37 باسیلوس بود که سه جدایه یادشده قادر به استقرار و پیشرفت علائم روی سرشاخه نبودند (جدول ۲). نتایج بیماری‌زایی جدایه‌های پسیلومایسز در آزمایشگاه نشان داد تمامی ۳۳ جدایه قارچی قادر به ایجاد و پیشرفت علائم روی سرشاخه با درجات متفاوت هستند و بیشترین و کمترین میزان پیشروی علائم مربوط به جدایه‌های 19Bb1 و 30P با ۴ و ۰،۵ سانتی‌متر

جدایه *P. formosus* تنها از محل‌های مایه‌زنی شده و ناحیه اطراف آن حداکثر تا ۵ سانتی‌متر جداسازی شد در حالی‌که جدایه‌های باکتریایی در طول سرشاخه گسترش یافته بودند و از محل بافت سالم و آلوده جداسازی شدند. هم‌زمان با جداسازی مجدد عوامل یاد شده از سرشاخه‌های مایه‌زنی شده، تا ۲۰ سانتی‌متر پایین‌تر از ناحیه اتمام علائم، بررسی وجود یا عدم وجود بیمارگرها نیز صورت گرفت و نتایج حاکی از وجود باسیلوس‌ها حداکثر تا ۱۰ سانتی‌متر پایین‌تر از ناحیه اتمام علائم در سرشاخه‌ها بود. این امر می‌تواند دلیل عدم موفقیت عملیات هرس را در کنترل سرخشکیدگی پسته در باغات نشان دهد.



شکل ۳- تصاویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی از قارچ *Paecilomyces*

(a,b) *formosus* پرگنه قارچ در محیط کشت PDA. (c,d) نمای از میسلیم‌ها، کنیدیوفورها و فیالیدهای قارچ. (e,f) کنیدیوم‌ها.

Fig. 3. Macroscopic and microscopic features of *Paecilomyces formosus*. a,b) Fungal colony on PDA medium. c,d) Mycelium, conidiophores and phialides. e,f) Conidia.

بود. براساس نتایج بیماری‌زایی جدایه‌های باسیلوس، ۱۰ جدایه (B1, B2, B3, B11, B18, B24, B25, B32, B38, B40) و از میان جدایه‌های پسیلومایسز نیز جدایه 19Bb1 با بیشترین توان بیماری‌زایی برای آزمایش‌های باغی استفاده شدند. نتایج بیماری‌زایی در شرایط باغ نیز نشان داد جدایه‌های منتخب باسیلوس به‌تنهایی قادر به ایجاد علائم بیماری و پیشروی طولی در سرشاخه‌های درختان پسته بودند. علائم بیماری پس از یک هفته روی سرشاخه درختان پسته با تغییر رنگ ایجاد شده از محل مایه‌زنی و پیشرفت در آوندهای چوبی به‌وضوح قابل مشاهده بود و میزان پیشروی جدایه‌های باسیلوس درون چوب سرشاخه دو ماه پس از مایه‌زنی از ۴,۵ تا ۱۴ سانتی‌متر متغیر بود. بررسی نتایج مایه‌زنی جدایه 19Bb1 قارچ نیز نشان از توان جدایه یاد شده در بروز علائم بیماری دارد. میانگین پیشروی جدایه 19Bb1 قارچ، ۳,۵ سانتی‌متر بود و از علائم بیماری مجدداً قارچ مزبور جداسازی شد.

نتایج مایه‌زنی سرشاخه‌ها با مخلوط زادمایه باکتری و قارچ حاکی از تأثیر معنی‌دار تیمار هم‌زمان آن‌ها بر افزایش میزان پیشروی طولی علائم بود به‌طوری‌که در مایه‌زنی‌های ترکیبی، پیشرفت طولی علائم بیماری به‌طور میانگین ۴ تا ۷ برابر بیشتر از قارچ به‌تنهایی و ۲ تا ۲,۵ برابر در مایه‌زنی جدایه‌های باکتریایی بود (جدول ۳). این نتایج نشان دهنده اثر تشدیدکنندگی حضور توأمان عوامل قارچی و باکتریایی در شدت علائم بیماری می‌باشد (شکل ۴).

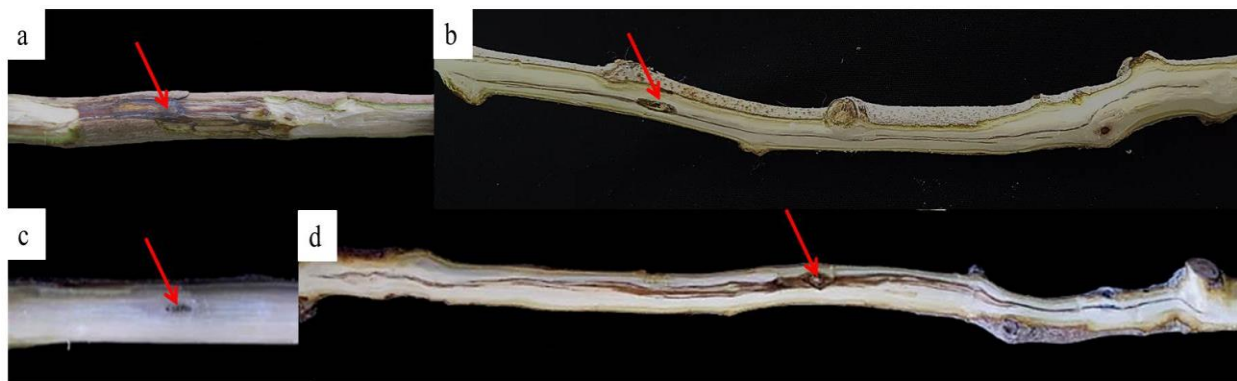
در تمامی مایه‌زنی‌ها، پس از تعیین میزان پیشروی جدایه‌های باسیلوس به‌تنهایی و یا مخلوط با *P. formosus*، روی سرشاخه‌های درختان پسته تحت شرایط آزمایشگاهی و باغی، جداسازی مجدد جدایه‌های باسیلوس از محل‌های آلوده مایه‌زنی شده و همچنین حاشیه سالم و آلوده انجام شد که این امر حاکی از توانایی ایجاد بیماری در جدایه‌ها می‌باشد. در سرشاخه‌های شاهد نیز علائمی مشاهده نشد. براساس نتایج به‌دست آمده از جداسازی در سرشاخه‌های مایه‌زنی شده در آزمایشگاه و باغ،

جدول ۲- مقایسه میزان پیشروی طولی جدایه‌های مختلف *Bacillus pumilus*، بیست روز پس از مایه‌زنی سرشاخه‌های درختان پسته در شرایط آزمایشگاه. داده‌هایی که دارای حروف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار نمی‌باشند.

Table 2. Comparison of longitudinal progression of disease symptom of *Bacillus pumilus*, twenty days after inoculation of pistachio branches under laboratory conditions.

Data with the same letter are not significantly different by Duncan test at $p < 0.01$.

<i>Bacillus pumilus</i> isolates	Vascular discoloration (cm)		<i>Bacillus pumilus</i> isolates	Vascular discoloration (cm)	
B1	5.25 ± 0.53	c-f	B21	1.75 ± 0.18	i-o
B2	4.75 ± 0.53	d-g	B22	1.00 ± 0.07	k-o
B3	9.00 ± 0.35	a	B23	3.50 ± 0.14	f-i
B4	3.50 ± 0.35	f-i	B24	4.75 ± 0.53	d-g
B5	0.75 ± 0.18	l-o	B25	8.00 ± 0.35	ab
B6	2.25 ± 0.53	h-m	B26	2.75 ± 0.18	h-k
B7	3.00 ± 0.35	g-j	B27	0.75 ± 0.18	l-o
B8	3.50 ± 0.35	f-i	B28	0.00 ± 0.00	o
B9	1.00 ± 0.07	k-o	B29	2.25 ± 0.18	h-m
B10	2.75 ± 0.53	h-k	B30	3.75 ± 0.53	e-h
B11	3.75 ± 0.18	e-h	B31	3.50 ± 0.35	f-i
B12	0.50 ± 0.07	m-o	B32	5.75 ± 0.53	cd
B13	0.75 ± 0.18	l-o	B33	2.75 ± 0.18	h-k
B14	1.75 ± 0.18	i-o	B34	0.25 ± 0.04	no
B15	2.50 ± 0.35	h-l	B35	2.00 ± 0.07	h-n
B16	0.00 ± 0.00	o	B36	1.50 ± 0.07	j-o
B17	2.75 ± 0.18	h-k	B37	0.00 ± 0.00	o
B18	5.50 ± 0.71	c-e	B38	7.75 ± 0.53	ab
B19	2.00 ± 0.35	h-n	B39	3.75 ± 0.53	e-h
B20	2.50 ± 0.07	h-l	B40	7.00 ± 1.00	bc



شکل ۴- علائم تغییر رنگ بافت آوندی پس از مایه‌زنی سرشاخه‌های درختان پسته در شرایط باغ. (a) مایه‌زنی *Paecilomyces formosus* 19Bb1 در باغ (b) مایه‌زنی *Bacillus pumilus* B3 به تنهایی. (c) شاهد (آب مقطر استریل). (d) مایه‌زنی مخلوط اینوکولوم *Bacillus pumilus* B3 و *Paecilomyces formosus* 19Bb1. نوک پیکان‌ها محل مایه‌زنی را نشان می‌دهد.

Fig. 4. The symptoms of pistachio twigs after inoculation under field conditions. a) Inoculation of *Paecilomyces formosus* 19 Bb1. b) Inoculation of *Bacillus pumilus* B3 alone. c) No-inoculations control. d) Mix inoculations of *B. pumilus* B3 and *P. formosus* 19 Bb1.

The tip of the arrow shows inoculation point.

جدول ۳- مقایسه میزان پیشروی طولی جدایه‌های باکتریایی *Bacillus pumilus* در مایه‌زنی به‌تنهایی و در ترکیب با *Paecilomyces formosus* در سرشاخه‌های درختان پسته تحت شرایط باغی.

داده‌هایی که دارای حروف مشترک هستند از نظر آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار نمی‌باشند.

Table 3. Comparison of longitudinal progression in disease symptom of *Bacillus pumilus*, and combination with *Paecilomyces formosus* under field conditions.

Data with the same letter are not significantly different by Duncan test at $p < 0.01$

<i>Bacillus pumilus</i> isolates	Vascular discoloration (cm)		<i>Bacillus pumilus</i> and <i>Paecilomyces formosus</i> isolates	Vascular discoloration (cm)	
B1	9.25 ± 1.59	f-h	B1+PF	23.50 ± 1.77	bc
B2	7.00 ± 1.06	gh	B2+PF	12.75 ± 0.53	ef
B3	13.50 ± 0.35	ef	B3+PF	32.00 ± 2.12	a
B11	5.75 ± 0.88	h	B11+PF	10.00 ± 0.71	f-h
B18	5.75 ± 0.53	h	B18+PF	11.75 ± 0.53	e-g
B24	9.00 ± 1.06	f-h	B24+PF	15.25 ± 0.88	de
B25	11.00 ± 0.71	e-g	B25+PF	21.50 ± 1.41	bc
B32	5.50 ± 0.35	h	B32+PF	11.25 ± 0.88	e-g
B38	13.75 ± 0.18	ef	B38+PF	25.25 ± 0.88	b
B40	9.25 ± 0.53	f-h	B40+PF	19.50 ± 1.77	cd

جدول ۴- تجزیه واریانس طول زخم حاصل از مایه‌زنی جدایه‌های مختلف *Bacillus pumilus* در سرشاخه‌های درختان پسته تحت شرایط آزمایشگاهی و باغی.

Table 4. Inoculation analysis of isolates of *Bacillus pumilus* in pistachio branches under laboratory and field conditions.

Source	Type III Sum of squares	df	Mean square	F	P value
Laboratory inoculation					
Isolates	400.987	39	10.282	16.040	.000
Error	25.640	40	641		
Total	1152.640	80			
Orchard inoculation					
VAR00002	1986.125	19	104.533	22.663	.000
Error	92.250	20	4.613		
Total	9504.000	40			
t-Test analysis					
F	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
15.399	5.204	26.06	000	-9.30000	1.78700

نتایج حاصل از آزمون t ($t=5.2095$) حاکی از تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد در میزان پیشروی طولی علائم در مایه‌زنی‌های جدایه‌های مختلف باسیلوس به‌تنهایی، نسبت به مایه‌زنی‌های مخلوط با *P. formosus* بود (جدول ۴).

حضور جدایه‌های مختلف باسیلوس و *P. formosus* در ایجاد علائم بافت آوندی درختان پسته با کشت مجدد آن‌ها در پایان آزمایش‌ها ثابت شد.

براساس تحقیقات انجام شده، باکتری‌های گرم مثبت و منفی بیماری‌زای گیاهی قادر به حرکت و انتشار در فضای بین سلولی و کلونیزاسیون آوندهای چوبی می‌باشند (Bacon and Hinton, 2006) که این امر همچنین تحت تأثیر غلظت ترکیبات مختلف گیاهی و میزان آزادسازی آن‌ها نیز قرار می‌گیرد (Shah, 2009). این موضوع سبب انسداد آوندی و تداخل در انتقال آب و مواد معدنی و در نتیجه باعث ضعف و زوال در سرشاخه‌های درختان پسته و ایجاد سرخشکیدگی می‌شود.

را افزایش می‌دهد و حضور یک بیمارگر قوی، نقش بیمارگر ضعیف را در ایجاد بیماری پررنگ‌تر می‌کند. لذا بررسی نحوه اثر و روابط بیمارگرها، به‌منظور مدیریت بهتر بیماری و همچنین کاهش خسارات وارده، ضروری است. با توجه به نتایج حاصله از مطالعات قبلی، در آلودگی‌های قارچی ناشی از *P. formosus* و آلودگی‌های باکتریایی ناشی از *Bacillus* به‌طور جداگانه در هر دو مورد، علائم بیماری دیده می‌شود (Aminae, 1993; Baradaran and Aminae and Ershad, 1987; Ghasemi, 2010 and Heidarian et al., 2018) ولی نقش آلودگی‌های هم‌زمان بیمارگرهای قارچی و باکتریایی بررسی نشده بود. به‌طور کلی مطالعات در زمینه برهمکنش‌های سینرژیستی عوامل بیماری‌زا هنوز در مراحل اولیه خود قرار دارد و مکانیسم‌های برهمکنش‌های یادشده ناشناخته‌اند. بدین منظور در این تحقیق در درجه اول به بررسی توان بیماری‌زایی دو عامل اصلی ایجادکننده بیماری سرخشکیدگی درختان پسته در شرایط آزمایشگاه و باغ و دوم ارزیابی شدت بیماری در آلودگی‌های هم‌زمان دو بیمارگر در شرایط باغ پرداخته شد.

بدین‌منظور نمونه‌برداری در فصول مختلف سال از باغ‌های استان کرمان انجام گرفت و در سه فصل پاییز، زمستان و بهار هم جدایه‌های باکتریایی و هم قارچی از سرشاخه‌های آلوده جداسازی شد. اما در فصل تابستان تنها قارچ جدا گردید و امکان جداسازی باکتری‌ها وجود نداشت. تحقیقات Mocali و همکاران در سال ۲۰۰۳ نیز نشان داده است که میان امکان جداسازی باکتری‌ها از گیاه و فصل جداسازی رابطه وجود دارد به‌طوری‌که برخی باکتری‌ها تنها در فصول سرد قابل جداسازی از بافت‌های گیاه می‌باشند که این امر نشان دهنده توانایی سازگاری جمعیت‌های اندوفیتی به‌شرایط متغیر بافت‌های داخلی گیاه است.

طبق نتایج حاصل از این تحقیق، گونه *B. pumilus* از سرشاخه‌های آلوده در باغ‌های استان کرمان جدا شد که این گونه برای اولین بار در دنیا به‌عنوان یکی از عوامل

آزمون‌های فنوتیپی انجام شده و نتایج آن‌ها جهت تشخیص جنس و گونه جدایه‌های باکتریایی در جدول ۵ آمده است. نتایج الکتروفورز محصولات PCR در ژن‌های 16S rDNA و *gyrA* به‌ترتیب تکثیر قطعه ۱۵۰۰ و ۹۲۸ جفت بازی را نشان داد. براساس توالی‌یابی و بلاست ژن 16S rDNA و *gyrA* در جدایه‌های B3، B25، B38 باسیلوس، شباهت بالای ۹۸ درصد جدایه‌های مورد بررسی با جدایه‌های باسیلوس موجود در NCBI دیده شد. با توجه به درصد تشابه یکسان ناحیه ژنی 16S rDNA، جدایه‌های مورد مطالعه بیشترین شباهت را به‌گونه *Bacillus pumilus* نشان دادند. جدایه B3 با شماره دسترسی MN861985، جدایه B25 با شماره MT022519 و جدایه B38 با شماره دسترسی MT022520 در بانک جهانی ژن (NCBI) ثبت شدند. جدایه‌ها در آنالیز فیلوژنتیکی بر مبنای توالی‌های نوکلئوتیدی در ژن 16S rDNA در دو گروه اصلی قرار گرفتند. جدایه B25 در زیرگروه اول از گروه اول در کنار جدایه‌های *Bacillus pumilus* از کشور چین (MN704531.1 و MF077157.1) قرار گرفت. در زیرگروه دوم از گروه اول دو جدایه (KC771038.1 و KC771049.1) از کشور چین جای گرفتند. جدایه‌های B3 و B38 در زیرگروه اول از گروه دوم قرار گرفتند و بیشترین شباهت را به جدایه‌هایی از کشور چین و ترکیه (KT003256.1 و KT307977.1) نشان دادند. جدایه MF077158.1 از کشور چین نیز در زیرگروه دوم از گروه دوم قرار گرفت (شکل ۵).

همان‌گونه که گزارش شده است بیماری‌زایی پدیده پیچیده‌ای است و ترکیبی از عوامل نظیر بیمارگر، ژنوتیپ میزبان، تنش‌های محیطی و غیرزنده، همچنین برهمکنش‌های میکروبی، نتیجه واکنش یک گیاه به پاتوژن را تعیین می‌کند. تشخیص درست عامل یا عوامل بیماری، مرحله اول مدیریت بیماری است (Adams et al., 2013). بیماری‌های مرکب چالش‌هایی را برای بیماری‌شناسان ایجاد می‌کنند زیرا تشخیص، کمیت و کنترل آن‌ها مشکل می‌باشد (Wallace, 1978). حضور هم‌زمان دو یا چند بیمارگر در گیاه خسارات ناشی از بیماری

بیماری را با درجات متفاوت روی سرشاخه‌های پسته ایجاد کردند در حالی که تمامی جدایه‌های *P. formosus* قادر به ایجاد و بروز علائم بیماری بودند با این حال، میانگین میزان پیشروی جدایه‌های باکتریایی روی سرشاخه‌های پسته بیشتر از جدایه‌های قارچی بود.

بر اساس نتایج به دست آمده در شرایط باغ، جدایه‌های منتخب *B. pumilus* و *P. formosus* قادر به استقرار و پیشروی روی سرشاخه‌های درختان پسته بودند. همچنین ایجاد و توسعه بیماری روی سرشاخه‌ها تحت تأثیر مخلوط زادمایه قرار گرفت به طوری که در مایه‌زنی‌های مخلوط باکتری و قارچ، میزان پیشرفت علائم پس از دو ماه بیشتر از مایه زنی‌های جداگانه قارچ و باکتری به‌تنهایی بود که این امر تأثیر سینرژیستی عوامل یادشده را نشان می‌دهد. همچنین این نکته قابل ذکر است که علائم بیماری در مایه‌زنی‌های انجام شده روی سرشاخه‌های پسته از محل تزریق به صورت خطی و یا طولی در امتداد مسیر آوندی تزریق شده در هر دو جهت با غالبیت بیشتر به سمت تنه درختان پیشروی داشتند. از علائم ایجاد شده، مجدداً جداسازی به عمل آمد و کلنی‌هایی مشابه جدایه مایه‌زنی شده به دست آمد. در سرشاخه‌های شاهد نیز علائمی مشاهده نشد. در جداسازی‌های مجدد از مایه‌زنی‌های مخلوط از مرز بین بافت سالم و آلوده روی سرشاخه‌ها سه ناحیه مورد ارزیابی قرار گرفت. در ناحیه مایه‌زنی شده و کمی پایین‌تر از آن ناحیه، هم باکتری و هم قارچ جدا شد در صورتی که در ناحیه انتهایی و جایی که اتمام علائم بیماری دیده می‌شد تنها باکتری جداسازی شد و جدایه قارچی جدا نشد که این نشان از توان و سرعت بیشتر جدایه‌های باکتریایی در پیشرفت در آوندهای چوبی گیاه دارد.

در ارتباط با برهمکنش عوامل بیماری‌زای گیاهی در بین خود عوامل باکتریایی، هم‌افزایی یک پدیده شناخته شده است. به‌طور مثال، در بیماری نکروز پیت گوجه‌فرنگی (Pit necrosis)، ۸ باکتری بیمارگر شناسایی شده‌اند که به‌طور

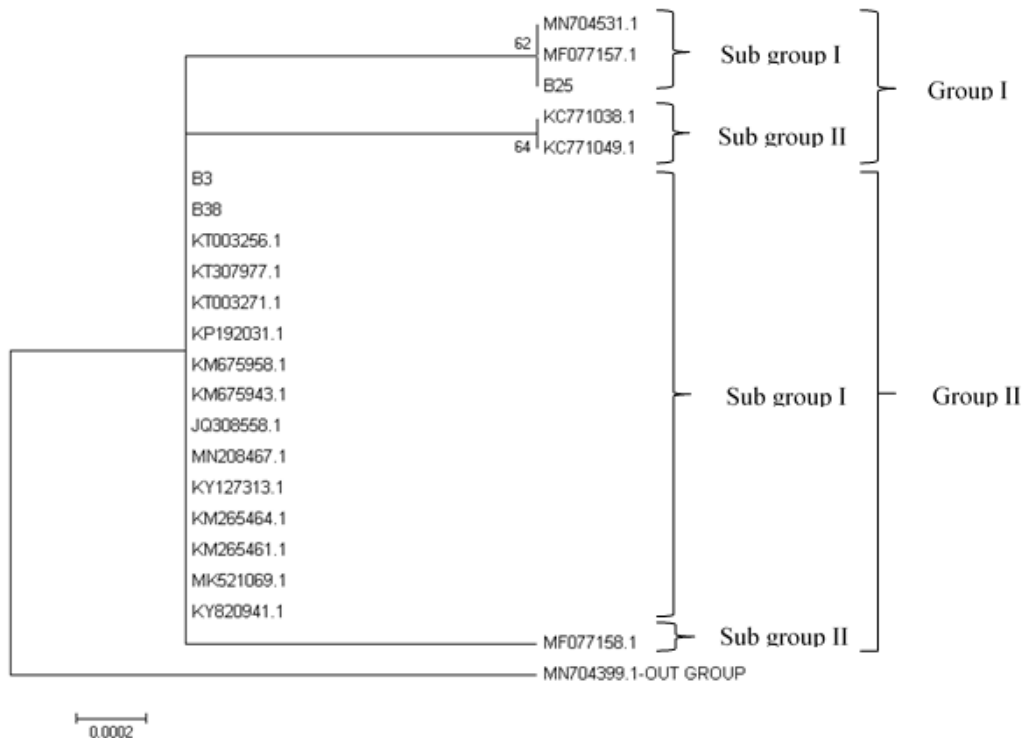
سرخشکیدگی درختان پسته گزارش می‌شود. پیش از این، تنها گونه *Bacillus licheniformis* توسط برادران و همکاران در سال ۲۰۱۰ معرفی شده بود. همچنین در میان جدایه‌های متعلق به جنس پسیلومایسز، ۸۵ درصد آن‌ها *P. formosus* شناسایی شدند که می‌توان گفت این گونه، گونه غالب در استان کرمان می‌باشد. باکتری *B. pumilus* گونه‌ای است که در مقابل شرایط نامساعد محیطی نظیر کمبود یا عدم دسترسی به مواد مغذی، خشکی، اشعه و ضدعفونی‌کننده‌های شیمیایی مقاومت بالایی دارد (Fritze, 2004; Menezes et al., 2010; Sella et al., 2014). تحقیقات انجام شده نشان داده است برخی استرین‌های *B. pumilus* قادر به ایجاد بیماری روی محصولات مختلف نظیر گلابی (Li et al., 2009)، هلو (Saleh et al., 1997)، مانگو (Galal et al., 2006)، زنجبیل (Peng et al., 2013)، *Ficus lacor* (Kovaleva et al., 2015) و کاج (Hakim et al., 2015) می‌باشند. نتایج آزمون‌های بیماری‌زایی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی نشان داد در جدایه‌های *B. pumilus* ۷۵ درصد جدایه‌ها علائم

جدول ۵- خصوصیات فنوتیپی استرین‌های *Bacillus pumilus* جدا شده از باغات پسته استان کرمان.

Table 5. Phenotypic characteristics of *Bacillus pumilus* strains isolated from Pistachio orchards in Kerman province.

Characteristic	Reaction	Characteristic	Reaction
Shape of cell	Rod	Growth at pH 5	-
Motility	+	Voges-Proskauer test	+
Gram reaction	+	Utilization of :	
Anaerobic growth	+	citrate	+
Catalase production	+	N-Acetylglucosaminey	-
Urease	-	D-Mannitol	+
Gelatin hydrolysis	+	D-Arabinose	-
Casein hydrolysis	+	D-Cellobiose	-
Starch hydrolysis	-	Dulcitol	-
Arginine dihydrolase activity	-	Glycerol	-
Fluorescence on KB medium	-	Inulin	-
Nitrate reduction Tobacco	-	D-Rhamnose	-
hypersensitive reaction	+	D-Sorbitol	-
Ice nucleation	-	L-Sorbose	-
Lecithinase (egg yolk)	-	D-Xylose	+
Growth at 45°C	-	L-arabinose	+
Growth in 5% NaCl	+	D-glucose	+

+ : واکنش مثبت؛ - : واکنش منفی



شکل ۵- درخت فیلوژنتیکی حاصل از آنالیز توالی‌های نوکلئوتیدی ناحیه ژنی 16S rDNA در جدایه‌های B3، B25 و B38 باسیلوس با استفاده از الگوریتم Neighbor-joining و مدل p-distance و bootstrap با ۱۰۰۰ تکرار انجام شد. از توالی نوکلئوتیدی *Bacillus safensis* (MN704399.1) به‌عنوان گروه خارجی در فیلوگرام استفاده گردید.

Fig. 5. Phylogenetic tree on the basis of 16S rDNA sequence B3, B25 and B38 *B. pumilus* isolates using neighbor-joining algorithm, p-distance method and bootstrap consisting of 1,000 pseudoreplicates. Nucleotide sequences of *Bacillus safensis* (MN704399.1) was used as an out group to root the tree.

یکدیگر در توسعه و شدت بیماری روی میزبان را نشان می‌دهد و در برهمکنش‌ها، تولید متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات دخیل در بیماری‌زایی و توسعه بیماری تحت تأثیر قرار می‌گیرد (Moradi, 2008). براساس نتایج این تحقیق، در مایه‌زنی مخلوط بیشترین کلونیزاسیون مشاهده گردید. دلایل قطعی آن به‌دستی روشن نیست ولی می‌توان اثرات تجمعی دو عامل بیماری در ایجاد و توسعه محل‌های متفاوت کلونیزاسیون در آوندها، همچنین انتقال جدایه‌های باکتریایی در آوندها و انسداد آوندی توسط آن‌ها را نام برد.

تاکنون چندین استرین از *B. pumilus* به‌عنوان پاتوژن گیاهی و انسانی شناخته شده است. اطلاعات ژنومی استرین‌های بیماری‌زای گونه یادشده برای درک بهتر

مجزا یا مختلط در ایجاد این بیماری نقش دارند (Lamichhane and Venturi, 2015) و یا در بیماری پوسیدگی گیاه بروکلی، چهار عامل باکتریایی بنام‌های *Pectobacterium carotovorum*، *P. marginalis*، *P. fluorescens* و *P. viridiflava* در پیدایش این بیماری مؤثر هستند (Canaday et al., 1991). اگرچه دلایل و مستندات متقن در این ارتباط وجود ندارد اما برخی از گزارش‌ها بر نقش پدیده حدنصاب حسگری بین گونه‌ای باکتری‌ها و نیز تبادل پیغام بین میکروفلور بیرونی بامیکروبیتهای داخل گیاه در امر هماهنگی رفتار بیماری‌زایی آن‌ها تأکید دارد (Lamichhane and Venturi, 2015). مطالعات انجام شده در خصوص برهمکنش بین عوامل مختلف بیماری‌زای گیاهی، اثرات مستقیم و غیرمستقیم آن‌ها با

بررسی وضعیت فیزیولوژیکی و افزایش بهینه سازی شرایط جذب عناصر مختلف و ریشه‌زایی با یک برنامه توصیه کودی مناسب با و یا بدون تیمارهای اصلاحی، هرس شاخه‌های آلوده در فصل زمستان و فرم‌دهی مناسب درختان جهت جلوگیری از آفتاب‌سوختگی، بررسی آلودگی به‌عوامل بیماری‌زای دیگر، استفاده از کودهای حاوی فسفر و پتاس و بررسی غلظت آن‌ها با آنالیز برگ، القاء مقاومت در درختان با کودهای حاوی فسفونیک اسید و سیلیکات پتاسیم، اصلاح و بهینه سازی روش‌های آبیاری و استفاده از خاکپوش‌ها برای حفظ بهتر رطوبت خاک و کاهش تنش خشکی و شوری به‌عنوان روش‌های مدیریت بیماری توصیه می‌گردد.

به‌طور کلی با توجه به‌نتایج به‌دست آمده حاصل از جداسازی و وجود باکتری‌ها تا ده سانتی‌متر پایین‌تر از علائم بیماری، نیاز است تا دقت بیشتری در امر مدیریت بیماری سرخشکیدگی درختان پسته به‌ویژه در زمینه هرس صورت پذیرد و با در نظر گرفتن این موضوع و حذف این بیمارگرها، جلوی پیشرفت بیماری تا قسمت‌های پایین تنه گرفته شود.

بیماری‌زایی و شناسایی استراتژی‌های مدیریت بیماری اهمیت دارد. Gao و Yuan در سال ۲۰۱۵ تحقیقاتی در این زمینه انجام دادند بدین ترتیب که ژنوم استرین *B. pumilus* GR8 که باعث پوسیدگی شدید ریزوم زنجبیل می‌شد را توالی‌یابی کردند. این گونه حاوی ژن‌های مختلفی بود که آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی گیاه (مانند CAZymes، GroEL و LepA) را رمزگذاری کرده و چندین پروتئین مرتبط با تهاجم و سازگار با محیط را در فضای خارج سلولی بافت پاراننشیم ریزوم زنجبیل به‌وجود می‌آورد. GroEL در ورود پاتوژن یا ورود واکوئل‌های حامل باکتری به‌سلول میزبان نقش دارد (Newton *et al.*, 2010; Shin and Roy, 2008) و پروتئین LepA نیز به‌خروج باکتری‌ها از سلول میزبان کمک می‌کند تا آلودگی به‌سلول‌های مجاور نیز سرایت کند (Shin and Roy, 2008). این یافته‌ها نشان می‌دهد که آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی گیاه می‌توانند نقش مهمی در بیماری‌زایی این گونه ایفا کنند. با توجه به‌این‌که بررسی برهمکنش بیمارگرهای سرخشکیدگی درختان پسته برای اولین بار انجام شده است، نیاز به‌بررسی‌های بیشتر به‌منظور دستیابی به‌روش‌های مناسب مدیریت بیماری و در نتیجه افزایش تولید و عملکرد باغ‌های پسته ضروری می‌باشد. آزمایش‌های خاک، آب و برگ برای

References

- ADAMS, I. P., D. W. MIANO, Z. M. KINYUA, A. WANGAI, E. KIMANI, N. PHIRI, R. REEDER, V. HARJU, R. GLOVER, U. HANY and R. SOUZA-RICHARDS, 2013. Use of next-generation sequencing for the identification and characterization of Maize chlorotic mottle virus and Sugarcane mosaic virus causing maize lethal necrosis in Kenya. *Plant Pathology*, 62(4): 741-749.
- ALIZADEH, A., H. ALAEI and J. ERSHAD, 2000. Etiological study on dieback disease of pistachio trees in Rafsanjan. *Journal of Modares Agricultural Sciences*, 1(2): 53-63 (in persian).
- AMINAEE, M. M. and J. ERSHAD, 1987. Dieback of young shoots of pistachio trees in Kerman province. *Proceeding of 11th Plant protection. Congress, Iran*, 28:216.
- AMINAEE, M. M. 1993. Major fungal disease of pistachio trees in Iran. In *Proceedings of 6th International Congress on Plant Pathology*, July, pp. 281.
- ASHKAN, S. M., D. ABUSAIDI and J. ERSHAD, 1997. Etiological study of dieback and canker of pistachio nut tree in Rafsangan. Iran. *Journal of Plant Pathology*, 33:15-26 (in Persian with English summary).
- BACON, C. W. and D. M. HINTON, 2006. Bacterial endophytes: The endophytic niche, its occupants, and its utility. In: Gnanamanickam SS, editor. *Plant-associated bacteria*. Dordrecht: Springer. 155-194.

- BARADARAN, G. R. and A. GHASEMI, 2010. Introducing *Bacillus licheniformis* as the causal agent of pistachio dieback in Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 43(6): 597-601.
- BELISARIO, A., M. MACCARONI, L. CORAZZA, V. BALMAS and A. VALIER, 2002. Occurrence and etiology of brown apical necrosis on Persian (English) walnut fruit. Plant Disease, 86: 599-602.
- CANADAY, C. H., WYATT, J. E., and MULLINS, J. A. 1991. Resistance to broccoli to bacterial soft rot caused by *Pseudomonas marginalis* and fluorescent *Pseudomonas* species. Plant Disease, 75: 715-720.
- CHUN, J. and K. S. BAE, 2000. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial gyrA gene sequences. Antonie van Leeuwenhoek, 78(2): 123-127.
- DWARDS, M. and C. TAYLOR, 1998. Pistachio canker: The story so far. In: Wilkinson J, ed. Proceedings of the Eighth Australian Nut Industry Council Conference. Victoria, Australia: Australian Nut Industry Council, 31-2.
- FITT, B. D. L., Y. J. HUANG, F. V. D. BOSCH and J. S. WEST, 2006. Coexistence of related pathogen species on arable crops in space and time. Annual Review of Phytopathology, 44: 163-182.
- FRITZE, D. 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: The aerobic endospore-forming bacteria. Phytopathology, 94(11): 1245-1248.
- GALAL, A., A. EL-BANA and J. JANSE, 2006. *Bacillus pumilus*, a new pathogen on mango plants. Egyptian Journal of Phytopathology, 34: 17-29.
- HAKIM, S., F. LIAQUAT, S. GUL, H. J. CHAUDHARY and M. F. H. MUNIS, 2015. Presence of *Bacillus pumilus* causing fruit rot of *Ficus lacor* in Pakistan. Journal of Plant Pathology, 97(3): 543.
- HEIDARIAN, R., K. B. FOTOUHIFAR, A. HOSSEIN MOHAMMADI and M. JAVAN NIKKHAH, 2017. Identification of sexually transmitted idiomorphs in *Paecilomyces formosus*, causative agent of pistachio branch die-back and some other hosts in vitro condition. Iranian Journal of Plant Protection Science, 48(2): 295-305 in Persian (in Persian).
- HEIDARIAN, R., K. B. FOTOUHIFAR, A. J. DEBETS and D. K. AANEN, 2018. Phylogeny of *Paecilomyces*, the causal agent of pistachio and some other trees dieback disease in Iran. PloS one, 13(7), p.e0200794.
- HOOG, G. S., J. GUARRO, J. GENE and M. J. FIGUERAS, 2000. Atlas of Clinical Fungi. (2th ed.) Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS).
- KIMOULI, M., G. VRIONI, M. PAPAPOPOULOU, V. KOUMAKI, D. PETROPOULOU, A. GOUNARIS, A. W. FRIEDRICH and A. TSAKRIS, 2012. Two cases of severe sepsis caused by *Bacillus pumilus* in neonatal infants. Journal of Medical Microbiology, 61(4): 596-599.
- KOVALEVA, V. A., Y. I. SHALOVYLO, Y. N. GOROVIK, A. L. LAGONENKO, A. N. EVTUSHENKOV, and R. T. GOUT, 2015. *Bacillus pumilus*—a new phytopathogen of Scots pine. Journal of Forest Science, 61(3): 131-137.
- LAMICHHANE, J. R. and V. VENTURI, 2015. Synergisms between microbial pathogens in plant disease complexes: a growing trend. Frontiers Plant Science, 6(385):1-12.
- LI, B., W. QIU, Q. M. TAN, T. SU, Y. FANG and G. L. XIE, 2009. Association of a *Bacillus* species with leaf and twig dieback of Asian pear (*Pyrus pyrifolia*) in China. Journal of Plant Pathology, 91(3): 705-708.
- LOGAN, N. A. 2012. *Bacillus* and relatives in foodborne illness. Journal of Applied Microbiology, 112(3): 417-429.
- MA, L., Y. H. CAO, M. H. CHENG, Y. HUANG, M. H. MO, Y. WANG, J. Z. YANG and F. X. YANG, 2013. Phylogenetic diversity of bacterial endophytes of *Panax notoginseng* with antagonistic characteristics towards pathogens of root-rot disease complex. Antonie Van Leeuwenhoek, 103(2): 299-312.
- MIAO, Z., S. LI, X. LIU, Y. CHEN, Y. LI, Y. WANG, R. GUO, Z. XIA and K. ZHANG, 2006. The causal microorganisms of *Panax notoginseng* root rot disease. Scientia Agricultura Sinica, 39(7): 1371-1378.

- MENEZES, C. B., R. C. BONUGLI-SANTOS, P. B. MIQUELETTTO, M. R. PASSARINI, C. H. SILVA, M. R. JUSTO, R. R. LEAL, F. FANTINATTI-GARBOGGINI, V. M. OLIVEIRA, R. G. BERLINCK and L. D. SETTE, 2010. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research*, 165(6): 466-482.
- MOCALI, S., E. BERTELLI, F. DI CELLO, A. MENGONI, A. SFALANGA, F. VILIANI, A. CACIOTTI, S. TEGLI, G. SURICO and R. FANI, 2003. Fluctuation of bacteria isolated from elm tissues during different seasons and from different plant organs. *Research in Microbiology*, 154: 105-114.
- MORADI, M. 2008. Microbiological and molecular assessment of interactions among the major Fusarium head blight pathogens on wheat ears. Ph.D. Thesis, University of Bonn.
- NEWTON, H. J., D. K. ANG, I. R. VAN DRIEL and E. L. HARTLAND, 2010. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2): 274-298.
- PENG, Q., Y. YUAN and M. GAO, 2013. *Bacillus pumilus*, a novel ginger rhizome rot pathogen in China. *Plant Disease*, 97: 1308-1315.
- SALEH, O. I., P. Y. HUANG and J. S. HUANG, 1997. *Bacillus pumilus*, the cause of bacterial blotch of immature balady peach in Egyptian Journal of Phytopathology, 145(10): 447-453.
- SAMSON, R. A. 1974. *Paecilomyces* and some allied Hyphomycetes, *Studies in Mycology*, 6: 1-119.
- SAMSON, R. A., J. HOUBRAKEN, J. VARGA and J. C. FRISVAD, 2009. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssoschlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia*, 22: 14-27.
- SCHAAD, N.W., J. B. JONES and W. CHUN, 2001. Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, 373 pp.
- SCOTTON, M., E. BORTOLIN, A. FIORIN and A. BELISARIO, 2015. Environmental and pathogenic factors inducing brown apical necrosis on fruit of English (Persian) walnut. *Phytopathology*, 105: 1427-1436.
- SELLA, S. R., L. P. VANDENBERGHE and C. R. SOCCOL, 2014. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. *Microbiological Research*, 169(12): 931-939.
- SHAH, J. 2009. Plants under attack: systemic signals in defense. *Current opinion in plant biology*, 12(4): 459-64.
- SHIN, S. and C. R. ROY, 2008. Host cell processes that influence the intra- cellular survival of *Legionella pneumophila*. *Cellular Microbiology*, 10(6): 1209-1220.
- WALLACE, H. R. 1978. The diagnosis of plant diseases of complex etiology. *Annual Review of Phytopathology*, 16: 379-402.
- WEISBURG, W. G., S. M. BARNS, D. A. PELLETIER and J. R. LUPSKI, 1991. 16S ribosomal DNA amplication for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173: 697-703.
- YUAN, Y. and M. GAO, 2015. Genomic analysis of a ginger pathogen *Bacillus pumilus* providing the understanding to the pathogenesis and the novel control strategy. *Scientific Reports*, 5: 10259.