Archive of SID

ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌های مخمری عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار در برخی از استان‌های مرکزی ایران*

مجتبی دهقان‌نیری** و حشمت‌اله رحیمیان[1]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۲۳)

چکیده

شانکر یکی از خسارت‌زاترین بیماری‌های درختان میوه هسته‌دار است که سبب ایجاد زخم‌های فرورفته تیره رنگ همراه با تراوش صمغ بر روی سرشاخه‌ها، شاخه‌ها و تنه درختان آلوده می شود. بیماری از مناطق مختلفی از ایران گزارش شده و نشان داده شده است کـه عمـدتا توسط *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* و در موارد کمتری به وسیله *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* ایجاد می شود. برای ارزیابی پراکندگی عوامل بیماری، نمونه‌هایی از درختان آلوده باغ‌های استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیـاری، قـم و یـزد جمـع‌آوری گردید. بخش‌های دارای علائم شاخه‌ها پس از ضد عفونی سطحی، در آب مقطر استریل خرد شده و سوسپانسیون به دست آمده روی محیط آگار غذایی حاوی سوکروز کشت گردید. کلونی‌های غالب روی محیط یاد شده برجسته، سفید مایل به خاکستری و خمیری شکل بودنـد. بیماریزایی نماینده‌هایی از جدایه‌ها روی نهال‌های هلو (*Prunus persica*) به اثبات رسید. DNA ژنومی از نماینده‌ها استخراج و قطعـه‌ای از ژن RNA ریبوزومی 26S آن‌ها با PCR تکثیر و توالی‌یابی گردید. مقایسه توالی این ناحیه با توالی‌های مشابه در ژن بانـک نشـانگر تشـابه بالای آن‌ها با گونه‌های *Cryptococcus* بود. تنوع ژنتیکی بیست و هفت جدایه به دست آمده با یکدیگر و با دو جدایه مرجع *Cryptococcus adeliensis* و *C. magnus* با به کارگیری آغازگرهای ERIC، BOX و REP بررسی شد. در دندروگرام رسم شده بر پایه تجمیع نتایج حاصل از سه نشانگر، جدایه‌ها در سطح تشابه ۳۰٪ در ۱۲ گروه قرار گرفتند. نتایج نشانگر وجود تنوع قابل توجه در بین جدایه‌های عامـل شـانکر درختان میوه هسته‌دار در مناطق مرکزی ایران است..

کلیدواژه: آر- ان- آ ریبوزومی، 26S، rep-PCR، شانکر، *Cryptococcus*

---

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد نگارندهٔ اول.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mojtaba.dehghan68@yahoo.com

۱. به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استاد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

www.SID.ir

Archive of SID

Assessment of genetic diversity of yeast isolates causing canker in stone fruit trees in some central provinces of iran

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

(Received: 29.10.2015; Accepted: 12.6.2016)

Abstract

Canker is one of the most damaging diseases of stone fruit trees which incites depressed brown to black lesions, often accompanied by exudation of gum, on twigs, branches and trunk of affected trees. The disease has been reported from different areas of Iran and shown to becaused by *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* a few case by *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*. To assess the distribution of the causal organisms samples were taken from fruit orchards in these regions. The stem tissues with canker symptoms were surface-disinfected in sodium hypochlorite, washed with sterile distilled water minced in drops of SDW. The suspension was plated on sucrose nutrient agar. The predominant colonies appearing on SNA were grayish-white, round and pasty. Representative isolates were tested for pathogenicity on peach seedling. Genomic DNA was extracted and a fragment of the 26S rRNA of the representative isolates was amplified by PCR and sequenced. The nucleotide sequence of 26S rRNA gene of the representative isolates showed high homology with sequences of *Cryptococcus* species. Comparison of their sequences with those deposited in GenBank. Also 27 isolates along with reference strains of *Cryptococcus adeliensis* and *C. magnus* were genetically characterized by using ERIC, REP, and BOXAIR primers in PCR. Cluster analysis was performed using NTSYS program. The isolates were separated into 11 genotypic groups by the concatenated data of rep-PCR at 33 % similarity level. The results demonstrated the existence of a considerable genetic diversity among isolates causing canker of stone fruit trees in the central provinces of Iran.

Keywords: rRNA, Canker, 26S, *Cryptococcus*, rep-PCR

* Corresponding author's E-mail: mojtaba.dehghan68@yahoo.com
1. Dept. Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari Iran.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

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، خشکیدگی باکتریایی سر شاخه 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). در ایران برای نخستین بار شانکر باکتریایی درختان میوه از اصفهان (Bahar *et al.* 1982) گزارش شد. پس از آن بیماری از استان‌های مازندران (Shams-Bakhsh & Rahimian 1989, Shams-Bakhsh & Rahimian 1997)، تهران (Banapour *et al.* 1990) و گیلان (Jami *et al.* 2005)، گزارش گردید. بر اساس نتایج آزمون‌های مختلف و با استفاده از آغازگرهای D21 و D22 دو باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* و *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* به عنوان عوامل مولد شانکر درختان میوه هسته‌دار در استان گلستان معرفی شدند (Mahmoudi *et al.* 2012). مخمرها نسبت به قارچ های رشته‌ای به ندرت سبب خسارت روی گیاهان می شوند اما بیماری‌های ناشی از آن‌ها می‌توانند در برخی مواقع مهم بوده و نیاز به مبارزه داشته باشد. گونه‌های Taphrina و Protomyces (Taphrinomycotina) از شبه مخمرهای مهم بیماری‌زای گیاهی به حساب می آیند (Schisler *et al.* 2011). اخیرا در ایران شانکر درختان میوه هسته دار ناشی از برخی گونه‌های *Cryptococcus* از استان‌های خراسان رضوی و شمالی گزارش شده است (Borhani & Rahimian 2013). 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 توسعه یافته باشند. رنگ کلونی‌ها روی محیط‌های کشت جامد ممکن است سفید، کرم یا مایل به قهوه‌ای باشد و 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 نشان می‌دهند (Fonseca *et al.* 2011). مخمرهای بازیدیومیستی متعلق به گروه‌های Urediniomycetes و Hymenomycetes بر اساس توالی-های نواحی ITS و زیر واحد بزرگ ژن rRNA (D1/D2) مورد مقایسه قرار گرفته و آنالیز ترکیبی توالی‌های آن‌ها برای شناسایی گونه‌ها توصیه شده است (Scorzetti *et al.* 2002).

در بررسی عوامل مولد شانکر شاخه درختان میوه در برخی از مناطق مرکزی ایران نیز به گونه‌هایی از جنس *Cryptococcus* برخورد شد، که از نظر مرفولوژیکی متنوع به نظر می رسیدند. در بررسی حاضر میزان تنوع جدایه‌ها با نشانگر مولکولی (rep-PCR) ارزیابی گردید. در زمینه تعیین تنوع ژنتیکی مخمرها با rep-PCR تاکنون بررسی‌های زیادی صورت نگرفته است. این در حالی است که از این روش برای بررسی تنوع ژنتیکی بسیاری از میکروارگانسیم‌ها استفاده شده است (Louws *et al.* 1999). مقایسه اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی تعدادی از مخمرها با ERIC-PCR و REP-PCR روشی ساده و مطمئن برای شناسایی مخمرها معرفی شده است (Hierro *et al.* 2004).

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

آماده سازی جدایه‌ها

نمونه‌برداری از درختان میوه هسته‌دار آلوده به شانکر در سال ۱۳۹۱ از استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، قم و یزد انجام گردید. بخشی از پوست شاخه‌های دارای علائم جدا شده و پس از ضد عفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت دو دقیقه و شستشو با آب مقطر استریل در چند قطره آب مقطر به کمک تیغ استریل خرد گردیدند. سوسپانسیون به دست آمده در سطح محیط آگار غذایی حاوی دو درصد سوکروز (NAS)[1] مخلط شدند. پس از خالص سازی، جدایه‌ها از نظر میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. جهت نگه‌داری کوتاه مدت جدایه‌ها به مدت ۴۸ ساعت روی محیط NAS رشد داده شده و کشت‌ها در یخچال (°C ۶-۴) نگه‌داری شدند. برای نگه-داری بلند مدت سوسپانسیون کدری از رشد ۴۸ ساعته جدایه‌ها روی محیط NAS در لوله‌های اپندرف[2] حاوی آب مقطر استریل تهیه و در °C ۶-۴ نگه‌داری شدند.

آزمون بیماری‌زایی

سوسپانسیونی با غلظت حدود ۴×۱۰^{۶} سلول در میلی لیتر از کشت ۴۸ ساعته جدایه‌های منتخب روی NAS در آب مقطر تهیه و به وسیله سرنگ انسولین به زیر پوست ساقه‌های جوان نهال‌های هلو و شلیل تزریق شد.

الکتروفورز پروتئین‌های سلولی

به منظور ارزیابی مقدماتی تنوع جدایه‌ها، تعیین گروه-های احتمالی و انتخاب جدایه‌ها برای بررسی‌های بعدی، نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های آن‌ها بررسی گردید. یک لوپ پر از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها روی محیط NAS در هاون چینی استریل سرد با افزودن پودر شیشه به مقدار یک سوم حجم توده جدایه، کوبیده شد. سپس به توده کوبیده شده یک میلی لیتر بافر (تریس هیدروکلرید ۰/۷ مولار، حاوی ۱٪ DDT[3]، PH= ۸) اضافه و سوسپانسیون حاصل به لوله‌های اپندرف انتقال یافت. لوله‌ها به خوبی ورتکس شده و سپس در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به لوله جدید منتقل و یک پنجم حجم بافر تریس (۰/۷۶ گرم تریس هیدروکلرید PH= ۶/۸، ۱۱میلی لیتر گلیسرول،۱ گرم SDS[4]، ۰/۱گرم DDT و در حجم نهایی ۱۰۰میلی لیتر آب مقطر) به آن‌ها اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۴-۲ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند و سپس در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. محلول رویی به لوله‌های جدید منتقل و تا زمان استفاده برای الکتروفورز در °C ۲۰- نگه‌داری شدند (Ausuble *et al.* 1992). الکتروفورز پروتئین در ژل پلی اکریل آمید با استفاده از سیستم ناپیوسته لملی (Laemmli 1970) و ژل در محلول کرمازی بلو رنگ آمیزی و سپس در حلال بدون رنگ، رنگبری و در اسید استیک ۷٪ نگه‌داری شد (Rahimian 1995).

استخراج DNA ژنومی

استخراج DNA بر اساس روش آزوبل و همکاران (Ausuble *et al.* 1992) با تغییراتی از جمله انجام سه چرخه یخ زدن و ذوب کردن و با جایگزین کردن فنل با کلروفرم (Mirhendi *et al.* 2001, Millar *et al.* 2000)

[1] Nutrient Agar Sucrose
[2] Eppendorf tube
[3] 1,4-dithioerythritol
[4] Sodium dodecyl sulphate

www.SID.ir

Archive of SID

انجام شد. یک لوپ از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها 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= ۸ و دو درصد تریتون X100)ریخته و کاملاً ورتکس شدند. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر SDS ده درصد به آن‌ها اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در ازت مایع قرار داده شدند و سپس به آب با دمای نزدیک به جوش منتقل شدند. مرحله انجماد و ذوب ۳ بار تکرار شد. به لوله‌ها به میزان هم حجم کلروفرم اضافه و به آرامی ورتکس شدند. 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 آنچه ذکر گردید، یکبار دیگر تکرار شد. لایه رویی به لوله جدید 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 ۲۰ °C- اضافه و لوله-ها سه بار سر و ته شدند. پس از قرار دادن لوله‌ها در دمای ۲۰ °C- به مدت دو ساعت، لوله‌ها در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از تخلیه محلول رویی، لوله‌ها تا خشک شدن تقریبی رسوب در دمای اتاق نگه‌داری شدند. سپس یک دهم حجم سوسپانسیون اولیه، آب مقطر یا TE رقیق (۰/۰۰۱ مولارتریس، ۰/۰۰۰۱ مولار EDTA، PH= ۸) به لوله‌ها اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۴ ساعت در یخچال نگه‌داری و چند بار برای حل رسوب تکان داده شده و سپس به ۲۰°C- منتقل شدند.

تکثیر و توالی یابی ژن 26S rDNA

جهت شناسایی جدایه‌ها، بخشی از ناحیه 26S rDNA دو جدایه نماینده با استفاده از جفت آغازگر D1 (5′-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3′) و D2 (5′-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3′) تکثیر شد (Scorzetti *et al.* 2002). واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر از هر آغازگر (معادل ۱۰ پیکومولار)، یک میکرولیتر dNTPs ۱۰ میلی مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰× PCR، یک میکرولیتر منیزیم کلراید ۵۰ میلی مولار، ۰/۳ میکرولیتر (با غلظت ۲/۵ واحد در میکرولیتر) آنزیم پلی مراز تک به همراه ۲ میکرولیتر از نمونه DNA هر جدایه و آب مقطر تا رسیدن حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شد.

برنامه دمایی شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۶ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با برنامه ۱ دقیقه در دمای ۹۵ °C ، ۱ دقیقه در دمای ۵۲°C و ۱ دقیقه در ۷۲ °C و یک مرحله بسط رشته‌ها به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ °C به کار برده شد (Kurtzman and Robnett 1998). توالی قطعه تکثیر شده توسط شرکت تکاپوزیست (Bioneer کره جنوبی) تعیین شده و شباهت توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در ژن بانک (NCBI) با استفاده از برنامه BLASTn تعیین گردید. همچنین با استفاده از توالی‌های به دست آمده و توالی‌های موجود در ژن بانک NCBI به وسیله نرم‌افزار MEGA 5.05 درخت فیلوژنی به روش اتصال همسایگی با درجه اعتبار سنجی ۱۰۰۰ رسم شد.

ارزیابی تنوع ژنتیکی با روش rep-PCR

تنوع ژنتیکی ۲۷ جدایه که با استفاده از مقایسه نقوش پروتئین‌های سلولی آن‌ها انتخاب شدند به همراه دو جدایه مرجع *Cryptococcus adeliensis* CBS[1] 8351[T] و *C.*

[1] Centraal Bureau Voor Schimmelculture. Utrecht, Holland

www.SID.ir

Archive of SID

magnus CBS 8394 در واکنش PCR با به کارگیری آغازگرهای BOX، ERIC و REP بررسی گردید. برنامه دمایی برای تکثیر شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ °C به مدت ۶ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با برنامه ۱ دقیقه در دمای ۹۵ °C ، ۱ دقیقه برای آغازگرهای BOX، ERIC و REP به ترتیب با دمای ۵۰، ۴۸ و ۴۵ درجه سلسیوس و ۳ دقیقه در دمای ۷۲ °C و یک مرحله بسط انتهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ °C بود. این برنامه اساسا طبق آنچه توسط محققین (Louws *et al.* 1999, versalovic *et al.* 1991) توصیه شده و با تغییرات مختصری شامل کاهش دماهای اتصال و نیز تغییر شرایط بسط به ۳ دقیقه در ۷۲ °C اجرا گردید.

الکتروفورز محصولات PCR

محصول rep-PCR جدایه‌ها با رنگ بارگذاری مخلوط و در چاهک‌های ژل آگارز ۱/۵ درصد ریخته شد. در یک چاهک نشانگرهای جرم مولکولی DNA (SM0311 شرکت Fermentas) ریخته شد. نمونه‌ها به مدت ۱/۵ ساعت در ۸۰ ولت الکتروفورز شدند. ژل در محلول اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر) رنگ آمیزی و با استفاده از دستگاه ژل داکیومنت از آن عکس برداری شد (Ausuble *et al.* 1992).

آنالیز داده‌ها و رسم درخت‌ها

نقوش انگشت‌نگاری ژنومی REP-PCR، ERIC-PCR و BOX-PCR بر اساس وجود و یا عدم وجود باند، به صورت کدهای صفر و یک نمره دهی شده و داده‌ها به صورت ماتریسی در نرم‌افزار Excel وارد شد. درخت تشابه با استفاده از نرم‌افزار ان تی سیس(NTSYS)، نسخه ۲/۰۲ ترسیم گردید. برای تعیین تشابه جدایه‌ها از ضریب تشابه جاکارد (Jaccard) و از روش داده‌های جفت‌های بی وزن (Unweighted pair group method with arithmetic averages, UPGMA)، جهت ترسیم دندروگرام استفاده شد. آنالیز خوشه‌ای نتایج به دست آمده از سه مارکر به کار رفته به صورت تجمیعی (با همراه و جمع کردن داده‌های هر سه نشانگر مولکولی) نیز انجام شد. برای به دست آوردن یک خوشه بندی بهتر، کارایی روش‌های مختلف تجزیه کلاستر به کمک ضریب همبستگی کوفنتیک (Farris 1969) مورد ارزیابی قرار گرفت. در این ارزیابی ضریب کوفنتیک میزان ضریب تشابه به دست آمده از طریق ضرایب جاکارد، دایس و سیمپل مچینگ با استفاده از نرم افزار ذکر شده در بالا محاسبه و با یکدیگر مقایسه شدند. ضریب کوفنتیک بالاتر نشانگر مناسب‌تر بودن روش خوشه بندی تلقی گردید (Sokal & Rohlf 1962, Sneath & Sokal 1973).

نتایج

در این بررسی ۸۹ جدایه با کلونی و شکل میکروسکوپی مخمر مانند از شاخه‌های آلوده به شانکر درختان میوه شامل ۳۰ جدایه از بادام (*Prunus amygdalus*)، ۲۱ جدایه از هلو (*P. persica*) و شلیل (*P. persica* var. *nectarina*)، ۱۴ جدایه از زردآلو (*P. armeniaca*)، ۱۵ جدایه از گیلاس (*P. avium*) و ۹ 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، سلول‌هایی به قطر ۸-۳ میکرومتری که برخی در حال جوانه زدن بودند،

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱. توالی آغازگرهای به کار برده شده برای ارزیابی تنوع جدایه‌های ***Cryptococcus*** به دست آمده از شانکر شاخه‌های درختان میوه در واکنش‌های **rep-PCR**

Table 1. sequences of primers used for assessment of genetic diversity of *Cryptococcus* isolates recovered from cankers on stone fruit trees, in rep-PCR.

آغازگر Primers	منبع Reference	توالی Sequence
ERIC1R	Versalovic *et al.* 1991	5′ ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC3′
ERIC2	Versalovic *et al.* 1991	5′ AAGTAAACTGGGGTGAGCG 3′
REP1-I	Versalovic *et al.* 1991	5′ IIIICGICICATCIGGC3′
REP2-I	Versalovic *et al.* 1991	5′ ICGICTTATCIGGCCTAC3′
BoxA1R	Louws *et al.* 1999	5′ CTACGGCAAGGCGACGCTGACG3′

شکل ۱. علایم شانکر مانند ظاهر شده در شاخه جوان هلوی تزریق شده با سوسپانسیون جدایه A1، ۹ روز پس از مایه زنی

Fig.1. Canker symptoms observed 9 days after inoculation of a suspension of isolate A1 on peach shoot.

دیده شد.

بیماری‌زایی جدایه‌ها

هفت تا ده روز پس از مایه زنی جدایه‌ها به شاخه‌های هلو، علایم شانکر مانند ظاهر شد (شکل ۱). شانکرها به تدریج از سطح مایه زنی شده گسترده شدند. از کشت مجدد سوسپانسیون تهیه شده از پوست ساقه‌های دارای علایم جدایه‌هایی با کلونی‌های مشابه جدایه‌های مایه زنی شده به دست آمد.

نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌ها

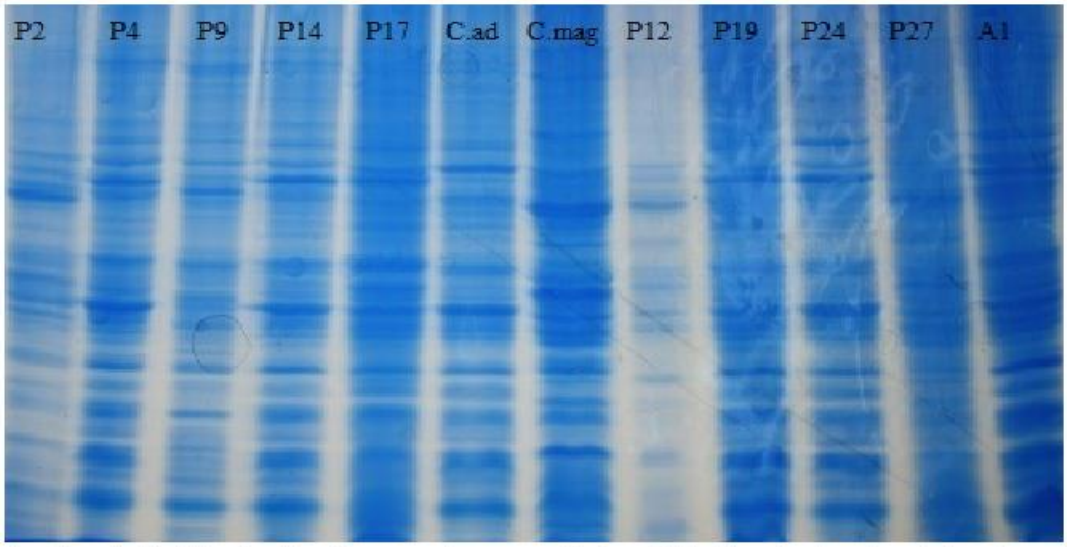
نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌های به دست آمده از هر یک از گونه‌های درختان آلوده به همراه دو جدایه مرجع تعیین گردید. اختلاف زیادی در نقوش پروتئینی بین جدایه‌ها وجود نداشت. نقوش الکتروفورزی بعضی از جدایه‌ها به جدایه مرجع *C. adeliensis* و برخی به *C. magnus* شبیه بود. چند گروه کلی بر این اساس شناسایی گردید. از هر گروه الکتروفورزی نماینده‌هایی بر اساس فراوانی تعداد جدایه گروه انتخاب شده و در **rep-PCR** به کار برده شدند (شکل ۲).

توالی‌یابی ناحیه 26S rDNA

طول قطعه تکثیر شده جدایه‌های A1 بادام اصفهان (ICMP 20084) و P2 شلیل قم (ICMP 20085) حدود ۶۰۰ جفت باز بود. توالی جدایه A1 (GenBank Accession No KF891469) شباهت ۹۹ درصدی با گونه *Cryptococcus adeliensis* و توالی جدایه P2 (GenBank Accession No KF891470) شباهت

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲. نقوش پروتئینی تعدادی از جدایه‌های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار به دست آمده از برخی از استان‌های مرکزی ایران در ژل پلی اکریل آمید ۱۰ درصد. C.ad و C.mag به ترتیب جدایه‌های مرجع *Cryptococcus adeliensis* و *Cryptococcus magnus* می‌باشند. مشخصات جدایه‌ها در جدول شماره ۱ آمده است.

Fig. 2. Electrophoretic pattern of cell proteins of the representative isolates recovered from cankers on shoots of fruit trees in some central provinces of Iran. On 10% polyacryl amide gel. C.ad, *Cryptococcus adeliensis*; C.mag, *Cryptococcus magnus* reference isolates.characteristics of isolates are shown in table 1.

۹۹ درصدی را با گونه *C. magnus* نشان داد. درخت فیلوژنی توالی جدایه‌ها و برخی از توالی‌های موجود در ژن بانک به روش اتصال همسایه‌ها با درجه اعتبار سنجی ۱۰۰۰ ترسیم شد (شکل ۳).

تنوع ژنتیکی جدایه‌ها

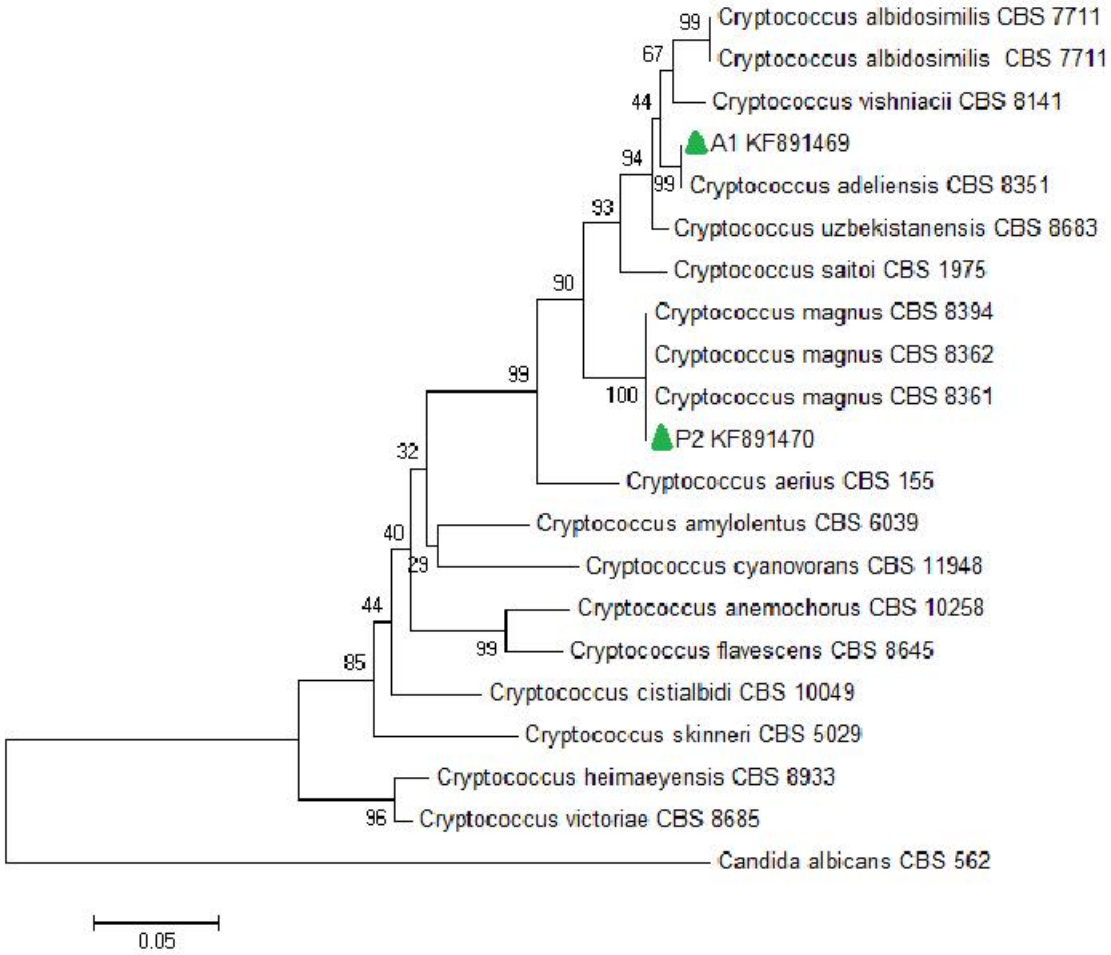
آنالیز خوشه‌ای داده‌ها به روش UPGMA انجام شد. ضریب همبستگی کوفنتیک میزان تشابه به دست آمده از طریق ضرایب جاکارد، دایس و سیمپل مچینگ برای آغازگر REP به ترتیب ۰/۸۲، ۰/۷۶، ۰/۸۰، برای آغازگر ERIC به ترتیب ۰/۸۸، ۰/۸۳، ۰/۷۹ و برای آغازگر BOX به ترتیب ۰/۸۲، ۰/۷۵ و ۰/۶۷ بود. با توجه به بالاتر بودن ضریب جاکارد نسبت به دو ضریب دیگر از ضریب همبستگی کوفنتیک، برای خوشه بندی بهتر و تعیین میزان تشابه جدایه‌ها از این روش استفاده شد.

در آنالیز خوشه‌ای نقوش قطعات به دست آمده با آغازگرهای REP1 و REP2 (شکل۴)، جدایه‌ها در سطح تشابه ۳۰ درصد به ۴ گروه تقسیم شدند و جدایه‌های CH1، CH4، CH7 و P24 هر کدام گروه جداگانه‌ای را تشکیل دادند. در سطح تشابه ۶۷ درصد جدایه A3 با جدایه مرجع *C. adeliensis* در یک گروه و جدایه‌های P2، P14 و P19 با جدایه مرجع *C. magnus* در گروه مستقل دیگری جای گرفتند. چند جدایه با فاصله بیشتری با این دو گونه هم گروه شدند ولی در سطح تشابه بالاتر از ۶۷ درصد، اکثر جدایه‌های مورد بررسی در شاخه‌ای مستقل و مجزا از سایر جدایه‌ها از جمله جدایه‌های مرجع *C. adeliensis* و *C. magnus* قرار گرفتند (شکل ۵).

بر اساس نقوش قطعات تکثیر شده در PCR با آغازگرهای ERIC1R و ERIC2 (شکل ۶)، جدایه‌ها در سطح تشابه ۳۰ درصد به ۱۳ گروه تقسیم شدند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳. درخت فیلوژنی ترسیم شده براساس توالی بخشی از ژن 26S rDNA جدایه‌های *Cryptococcus* (A1 و P2) به دست آمده از درختان میوه هسته‌دار مبتلا به شانکر از استان‌های مرکزی کشور. دندروگرام براساس روش اتصال همسایه‌ها (neighbor joining) ترسیم شده است. اعداد در محل‌های انشعاب منعکس کننده ضریب اطمینان صحت شاخه‌بندی برحسب درصد و حاصل از ۱۰۰۰ تکرار نمونه-گیری (bootstrap) است. درخت ترسیم شده با روش بیشینه احتمال (maximum likelihood) نیز به طرز مشابهی گروه‌ها (شاخه‌ها) را تفکیک کرد. خط نشانه برابر ۰/۰۵ تغییر نوکلئوتید در هر محل است.

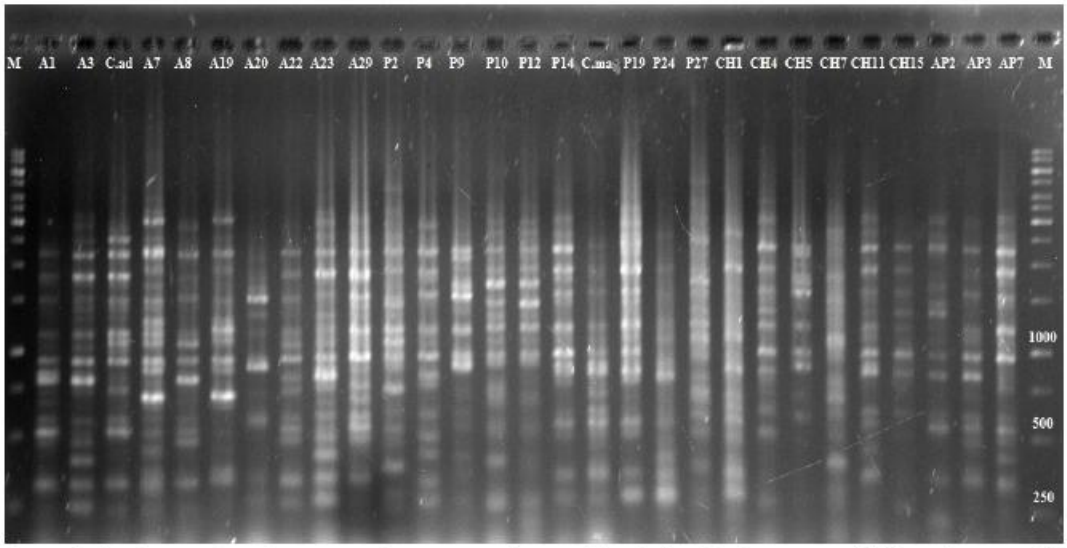
Fig. 3. phylogenetic tree depicting the relationship of *Cryptococcus* isolates A1 and P2 recovered from canker affected fruit trees in the central provinces of Iran. The dendrogram was constructed by the neighborur joining algorithm. Nambers at the branch points reflect the robustness of branching (in percentage) obtained by 1000 resamplings (bootstrap). A similar tree was obtained when drawn by the maximum likelihood algorithm. The bar indicates number of nucleotide changes per sits. *Candida albicans* was used as on outgroup.

جدایه‌های A1، A3، A7 و A8 با جدایه مرجع *C. adeliensis* در یک گروه و جدایه P14 با جدایه مرجع *C. magnus* در گروه دیگری قرار گرفتند. در سطوح تشابه بالاتر اکثر جدایه‌ها به صورت منفرد گروه بندی شدند (شکل ۷).

در آنالیز خوشه‌ای نقوش به دست آمده از تکثیر قطعات در PCR با آغازگر BOXA1R (شکل ۸)، جدایه‌ها در سطح تشابه ۳۰ درصد به ۱۵ گروه تقسیم کرد. جدایه A22 با جدایه مرجع *C. adeliensis* در یک گروه و جدایه P14 با جدایه مرجع *C. magnus* در گروه دیگری جای

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ٤. اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار به دست آمده از برخی استان‌های مرکزی ایران با روش REP-PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد. C.ad جدایه مرجع *Cryptococcus adeliensis* و C.ma جدایه مرجع *Cryptococcus magnus* می‌باشد. مشخصات جدایه‌ها در جدول شماره ۲ آمده است.

Fig. 4. Banding patterns obtained from amplified DNA fragments by REP-PCR for the yeast species causing stone fruit canker in some central provinces of Iran, in a 1.5% agarose gel. C.ad is type strain of *Cryptococcus adeliensis* and C.ma is type strain of *Cryptococcus magnus*. Characteristics of isolates are shown in Table 2.

گرفتند (شکل ۹).

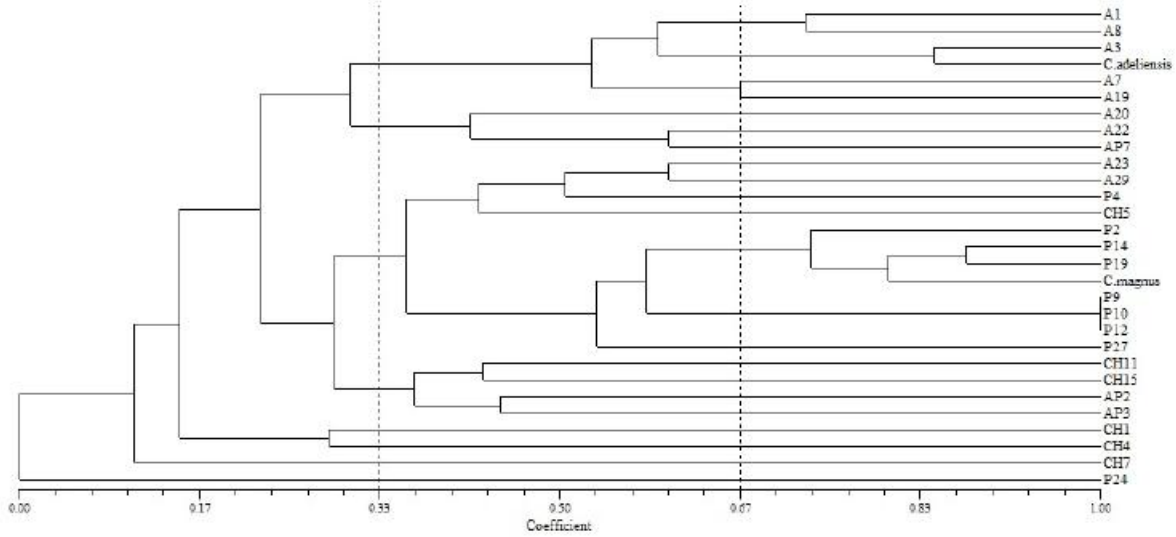
در تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های حاصل از آغازگرهای REP، ERIC و BOX به صورت تجمیعی جدایه‌ها در سطح تشابه ۳۰ درصد به ۱۲ گروه تقسیم شدند. جدایه‌های A1، A3، A7، A8، A19 با جدایه مرجع *C. adeliensis* و جدایه‌های P2، P9، P10، P12، P14 و P19 با جدایه مرجع *C. magnus* در گروه مستقل دیگری جای گرفتند (شکل ۱۰).

بحث

شانکر درختان میوه هسته‌دار از مهم ترین بیماری‌های این گروه از درختان میوه محسوب شده (Agrios 2005) و بیماری و عامل باکتریایی آن، *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) از اکثر استان‌های کشور گزارش شده است (Bahar *et al.* 1982, Banapour *et al.* 1990, Elahi nia & Rahimian 1993, Shams-Bakhsh & Rahimian 1997, Mohammadi *et al.* 2001). در سال‌های اخیر شانکر ناشی از زانتوموناس (*Xanthomonas arboricola* pv. *pruni*, *Xap*) نیز از مناطقی از استان‌های گیلان و مازندران گزارش شده است (Rahimian *et al.* 2004, Jami *et al.* 2005). در یک بررسی انجام شده در خصوص پراکندگی و فراوانی بیماری در خراسان رضوی و شمالی، جدایه‌های به دست آمده از درختان دارای علایم شانکر باکتریایی نبوده و گونه‌های مخمری *Cryptococcus adeliensis* و *C. magnus* و *Meyerozyma guilliermondii* جداسازی و شناسایی گردیدند (Borhani *et al.* 2013, Borhani & Rahimian 2013, Borhani & Rahimian 2015). از آنجا که اولین گزارش از وقوع شانکر باکتریایی درختان میوه هسته‌دار و عامل باکتریایی (*Pss*) از درختان زردآلو در اصفهان بوده (Bahar *et al.* 1982) و متعاقب آن *Pss* از باغ‌های حاشیه

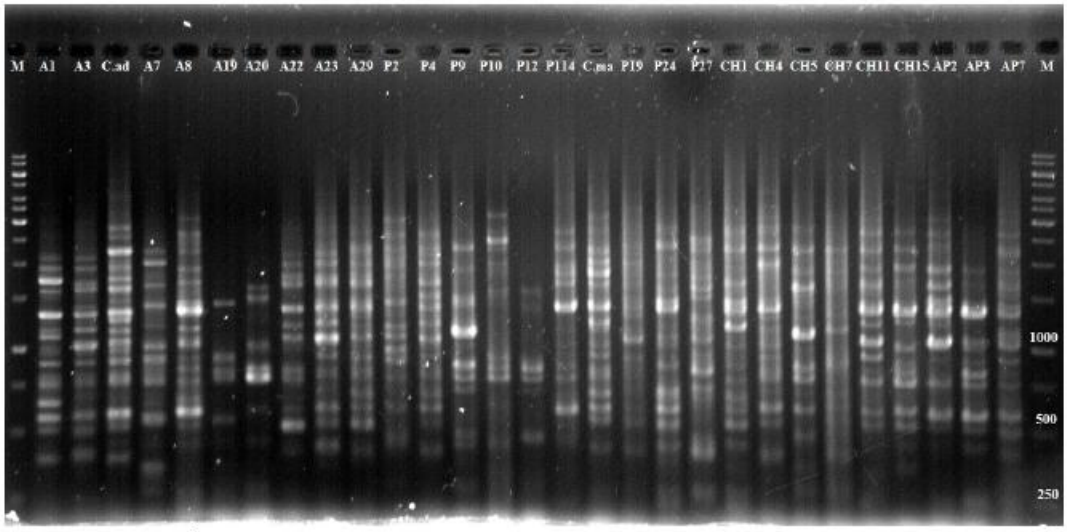
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۵. دندروگرام ارتباط ژنتیکی مبان جدایه‌های مخمری عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار به دست آمده از برخی استان‌های مرکزی ایران و دو جدایه مرجع (*Cryptococcus adeliensis* و *C. magnus*) بر اساس نقوش قطعات حاصل از REP-PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد؛ تشابه جدایه‌ها بر اساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است.

Fig. 5. Dendrogram of genetic relatedness of the REP-PCR fingerprint patterns of the yeast species causing stone fruit canker in some central provinces of Iran and type strains of *Cryptococcus adeliensis* and *C. magnus*. Cluster analysis was performed by the Jaccard similarity coefficient and the UPGMA algorithm.

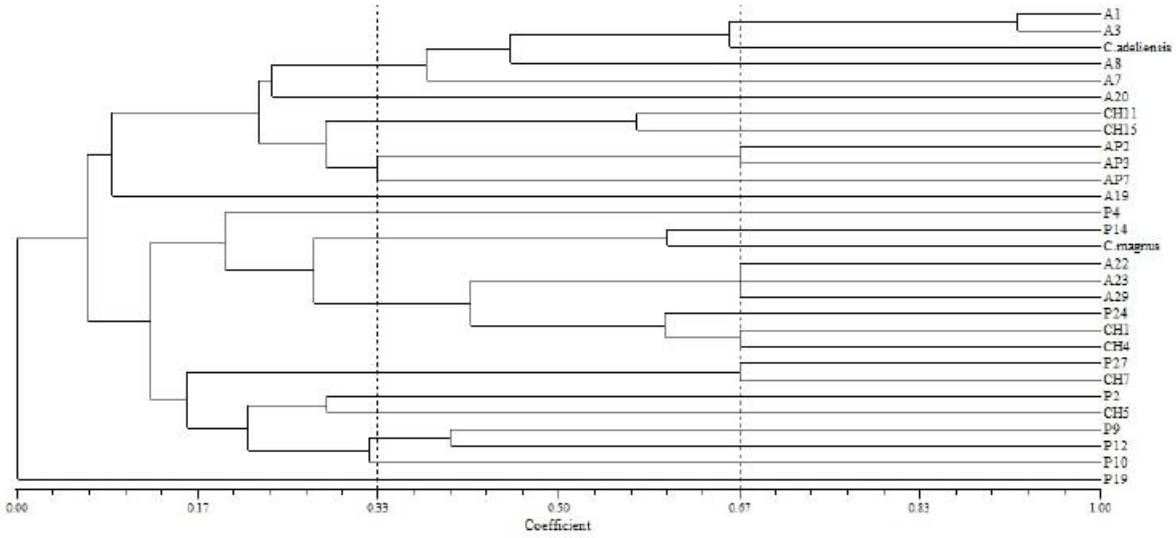


شکل ٦. اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌های مخمری عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار به دست آمده از برخی استان‌های مرکزی ایران با روش ERIC-PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد. C.ad جدایه مرجع *Cryptococcus adeliensis* و C.ma جدایه مرجع *Cryptococcus magnus* می‌باشد. مشخصات جدایه‌ها در جدول شماره ۲ آمده است.

Fig. 6. Banding patterns obtained from amplification DNA fragments by ERIC-PCR for the yeast species causing stone fruit canker in some central provinces of Iran, in 1.5% agarose gel. C.ad is type strain of *Cryptococcus adeliensis* and C.ma is type strain of *Cryptococcus magnus*. Characteristics of isolates are shown in Table 2.

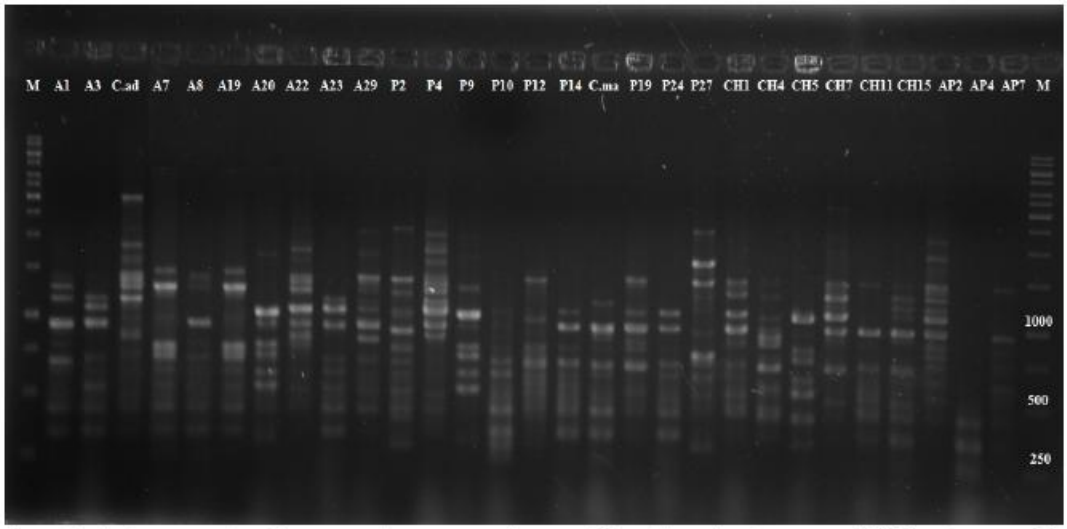
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷. دندروگرام ارتباط ژنتیکی میان جدایه‌های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار به دست آمده از برخی استان‌های مرکزی ایران و جدایه‌های مرجع (*Cryptococcus adeliensis* و *C. magnus*) بر اساس نقوش قطعات حاصل از ERIC -PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد؛ تشابه جدایه‌ها بر اساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است.

Fig. 7. Dendrogram of genetic relatedness of the ERIC-PCR fingerprint patterns of the yeast species causing stone fruit canker in some central provinces of Iran and type strains of *Cryptococcus adeliensis* and *Cryptococcus magnus*. Cluster analysis was performed by the Jaccard similarity coefficient and the UPGMA algorithm.



شکل ۸. اثر انگشت ژنتیکی DNA ژنومی جدایه‌های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار به دست آمده از برخی استان‌های مرکزی ایران با روش BOX-PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد. C.ad جدایه مرجع *Cryptococcus adeliensis* و C.ma جدایه مرجع *Cryptococcus magnus* می‌باشد. مشخصات جدایه‌ها در جدول شماره ۲ آمده است.

Fig. 8. Banding patterns of amplified DNA fragments of yeast isolate by BOX-PCR for the yeast species causing stone fruit canker in some central provinces of Iran, in a 1.5% agarose gel. C.ad is type strain of *Cryptococcus adeliensis* and C.ma is type strain of *Cryptococcus magnus*. Characteristics of isolates are shown in Table 2.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. میزبان، موقعیت جغرافیایی و نام جدایه‌های مخمری به دست آمده از درختان میوه هسته‌دار آلوده به شانکر از برخی استان‌های مرکزی ایران

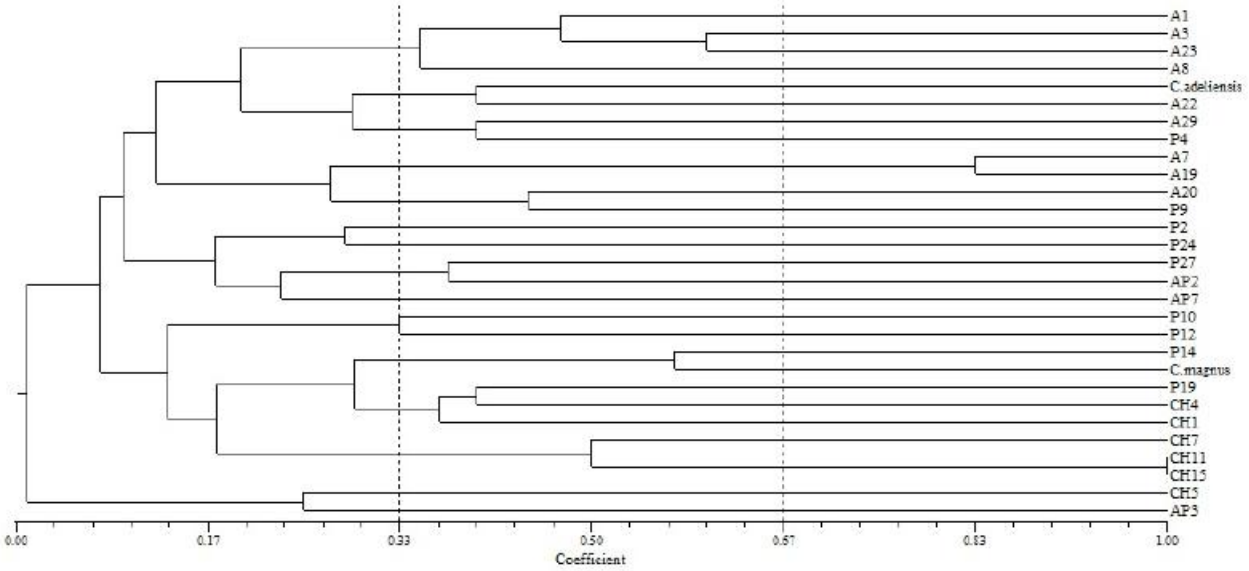
Table 2. List of yeast isolates recovered from stone fruit trees in some central provinces of Iran.

میزبان Host	موقعیت جغرافیایی Location	نام جدایه Isolate name
آلبالو (sour cherry)	اصفهان- مبارکه (Isfahan-Mobarakeh)	P28, P29
آلوچه (Prune)	اصفهان- مبارکه (Isfahan-Mobarakeh)	P25, P30
آلو (Plum)	اصفهان- مبارکه (Isfahan-Mobarakeh)	P26, P27
	قم- کهک (Qom-Kahak)	P22, P23,P24
بادام (Almond)	اصفهان-تیران (Isfahan-Tiran)	A1, A5, A9, A11, A13, A16
	اصفهان-فلاورجان (Isfahan-Falavarjan)	A10, A14, A15, A23, A25
	اصفهان-شهرضا (Isfahan-Shahreza)	A17, A18, A24, A27
	چهار محال و بختیاری-سامان (Chaharmahal & Bakhtiari-Saman)	A2, A3, A4, A19, A20, A26
	قم- کهک (Qom-Kahak)	A6, A7, A8
	یزد-نیر (Yazd-Nir)	A12, A21, A22, A28, A29, A30
زردآلو (Apricot)	اصفهان-باغ بهادران (Isfahan-Bagh-e Bahadoran)	AP1,AP7,AP12,AP14
	قم- کهک (Qom-Kahak)	AP2,AP3, AP8,AP9,AP11,AP4, AP5, AP6, ,AP10,AP13
گیلاس (Cherry)	اصفهان-باغ بهادران (Isfahan-Bagh-e Bahadoran)	CH1, CH2, CH3, CH5, CH8
	اصفهان-فلاورجان (Isfahan-Falavarjan)	CH6, CH9, CH10, CH11
	قم- کهک (Qom-Kahak)	CH4, CH7, CH12, CH13, CH14, CH15
هلو (Peach)	اصفهان-فلاورجان (Isfahan-Falavarjan)	P1, P3, P4, P5, P18
	چهار محال و بختیاری-سامان (Chaharmahal & Bakhtiari-Saman)	P6, P7 ,P9,P16
	قم- کهک (Qom-Kahak)	P2, P8,P10, P11, P12
شلیل (Nectarine)	اصفهان-فلاورجان (Isfahan-Falavarjan)	P19, P20, P21
	قم- کهک (Qom-Kahak)	P13, P14, P15, P17

زاینده رود در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری جداسازی و شناسایی شده بود، منطقی به نظر رسید که ماهیت عامل بیماری در این مناطق و نیز در استان‌های همجوار قم و یزد که اطلاع دقیقی از وقوع بیماری و عامل آن در دست نبود، مورد بررسی قرار گیرد. از نواحی یاد شده در مجموع ۸۹ جدایه با مرفولوژی کلونی و سلولی

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۹. دندروگرام ارتباط ژنتیکی مبان جدایه های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار به دست آمده از برخی استان‌های مرکزی ایران و جدایه های مرجع (*Cryptococcus adeliensis* و *C. magnus*) بر اساس نقوش قطعات حاصل از BOX-PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد؛ تشابه جدایه‌ها بر اساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است.

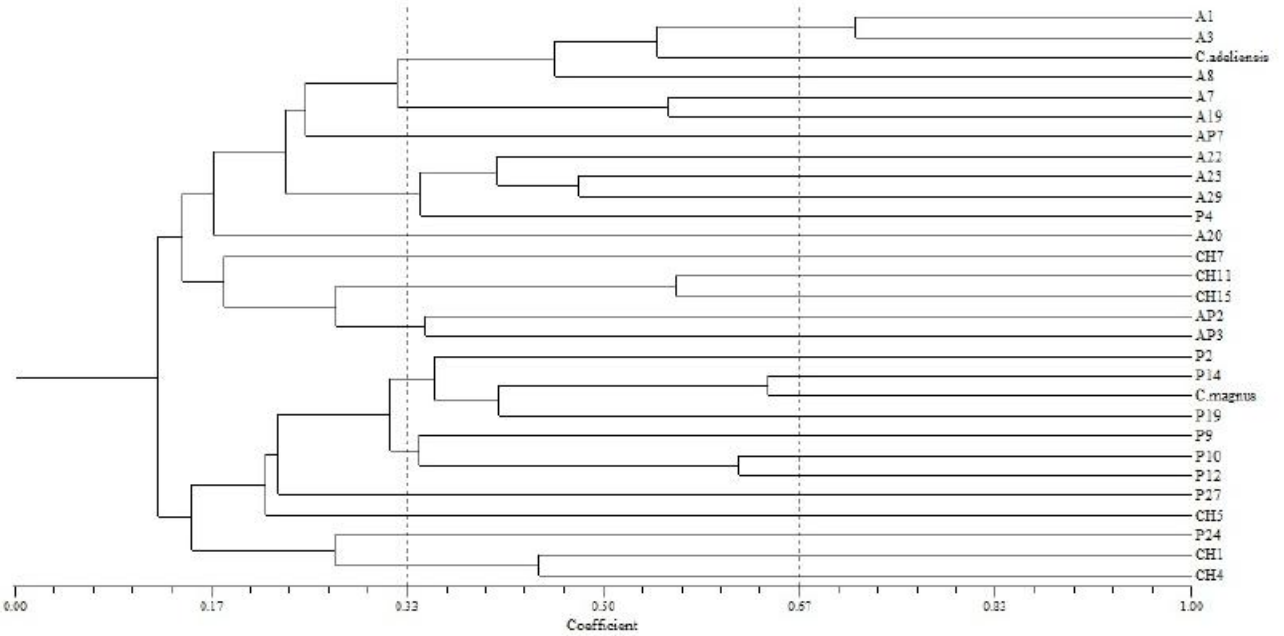
Fig. 9. Dendrogram of genetic relatedness of yeast isolates causing canker in stone fruit trees in some central provinces of Iran, based on their BOX-PCR fingerprint patterns and the type strains of *Cryptococcus adeliensis* and *Cryptococcus magnus*. Cluster analysis was performed by the Jaccard similarity coefficient and the UPGMA algorithm

مخمرمانند از شانکرهای درختان هلو، بادام، گیلاس، زردآلو، آلو، گوجه سبز و آلبالو جدا گردید. نماینده‌هایی از جدایه‌های به دست آمده از هر یک از درختان در هر منطقه و بر اساس نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی آن‌ها انتخاب شده و تنوع آن‌ها با rep-PCR ارزیابی گردید.

بیست و هفت جدایه مقایسه شده در rep-PCR دارای تنوع قابل توجهی بودند. از آنجا که بیشترین تعداد جدایه در rep-PCR در دو گروه (به ترتیب ۹ و ۸ جدایه در گروه‌های یک و دو) قرار داشته و با *Cryptococcus adeliensis* و *C. magnus* هم گروه شده بودند قطعه‌ای از ژن 26S rDNA نماینده‌ای از این دو گروه تکثیر و توالی یابی گردید. تشابه بالای توالی نوکلئوتیدی به دست آمده تعلق اعضای گروه به دو گونه یاد شده را تایید کرد. بدین ترتیب مشخص گردید که دو گونه *Cryptococcus adeliensis* و *C. magnus* گونه‌های غالب مولد شانکر درختان میوه هسته‌دار در استان‌های اصفهان، یزد، چهارمحال و بختیاری و قم هستند. تنوع مشاهده شده در این دو گروه و نیز در گروه‌های کوچک‌تر، به ویژه در نتایج حاصل از PCR با آغازگرهای ERIC و BOX زیاد بود. به علت کم (ناکافی) بودن تعداد جدایه‌های تشکیل دهنده گروه‌های دیگر (به عنوان مثال تک عضو شدن شاخه‌ها در سطح تشابه ۶۷ درصد و بالاتر بجز شاخه‌های مربوط به *C. adeliensis* و *C. magnus*)، بررسی دقیق موقعیت تاکسونومیکی آن‌ها بهتر است به زمانی موکول گردد که تعداد کافی از گروه‌های مختلف شایع در دسترس باشد. در مجموع وجود چنین سطوحی از تنوع که در حال حاضر بین یا درون گونه‌ای بودن آن‌ها را نمی‌توان

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱۰. دندروگرام ترکیبی منعکس کننده ارتباط ژنتیکی مبان جدایه‌های عامل شانکر درختان میوه هسته‌دار به دست آمده از برخی استان‌های مرکزی ایران و جدایه‌های مرجع (*Cryptococcus adeliensis* و *C. magnus*) بر اساس نفوش قطعات حاصل از آغازگرهای REP، ERIC و BOX در ژل آگارز ۱/۵ درصد؛ تشابه جدایه‌ها بر اساس ضریب جاکارد محاسبه و دندروگرام به روش UPGMA ترسیم شده است.

Fig. 10. Dendrogram of genetic relatedness of the yeast species as the causing stone fruit canker in some central provinces of Iran and type strains of *Cryptococcus adeliensis* and *Cryptococcus magnus* based on the combined data set of BOX, ERIC and REP–PCR using UPGMA analysis and Jaccard's coefficient.

به درستی اعلام نمود، شگفت انگیز به نظر می رسد، هر چند در غیاب بررسی‌های پیوسته یا دوره‌ای در زمینه ماهیت عامل یا عوامل مولد شانکر در کشور، تخمین قدمت وقوع شانکرهای ناشی از عواملی غیر از عوامل باکتریایی *Pss* و *Xap* شناسایی شده در یک تا سه دهه قبل، امکان پذیر نمی‌باشد.

C. adeliensis ابتدا از جلبک‌های پوسیده در قطب جنوب جدا و شناسایی شده (Scorzetti *et al.* 2000) و سپس از آب نخاعی بدن یک بیمار مبتلا به منتژیت در آلمان جدا گردید (Rimek *et al.* 2004). متعاقبا این گونه از نمونه‌های کلینیکی و مدفوع کبوتر و گوسفندان در اروپا نیز جدا و به عنوان یک بیمارگر فرصت طلب معرفی شده است (Velazquez *et al.* 2006).

C. magnus یک گونه ساپروفیت است که در محیط-های مختلف از جمله در سطوح گیاهان و در هوا وجود دارد ولی تاکنون بیماریزا بودن آن در انسان، حیوانات و یا گیاهان مطرح نگردیده است (Cadez *et al.* 2010, Fonseca *et al.* 2011). در یک مورد این گونه از گوش گربه در ژاپن جدا شده ولی عامل بیماری خاصی نبوده است (Kano *et al.* 2004). وقوع شانکر شاخه درختان میوه هسته‌دار ناشی از این دو گونه مخمر در استان‌های خراسان رضوی و شمالی (Borhani & Rahimian 2013, Borhani & Rahimian 2015) و برخی از استان‌های مرکزی مانند اصفهان، چهارمحال و بختیاری، قم و یزد می تواند نشانگر این باشد که گونه‌هایی از جنس *Cryptococcus* که یا ساپروفیت بوده و یا فقط در یک

www.SID.ir

Archive of SID

مورد به عنوان منتژیت در انسان معرفی شده‌اند، قابلیت ایجاد بیماری در طیفی از گیاهان، دست کم در درختان میوه هسته‌دار را کسب کرده و جدایه‌های بیماریزای گیاهی آن‌ها در حال گسترش هستند. تنوع قابل توجه دیده شده در جمعیت‌های *Cryptococcus* در استان‌های خراسان و استان‌های مرکزی ایران می‌تواند حاکی از قدمت احتمالی آن‌ها و نیز وجود گونه‌ها، زیرگونه‌ها و یا بیوتیپ‌های متعددی از این جنس در یک منطقه یا مناطق مختلف باشد. لازم است بررسی‌هایی در این زمینه و نیز در خصوص چگونگی (مکانیسم) بیماریزایی جدایه‌های بیمارگر این جنس در آینده صورت پذیرد. تغییرات شدید آب و هوایی رخ داده در دهه‌های اخیر ممکن است نقش تعیین یا تسریع کننده‌ای در جایگزینی عوامل مولد باکتریایی مولد شانکر با عوامل مخمری مولد آن بیماری داشته باشد.

منابع

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., Brent F. M., Kingestone R. E., Moor D. D., Smith J. A., Seideman J. G. and Struhl K. 1992. Current Protocol in Molecular Biology. Greene, Publishing Associates, Wiley Interscience, New York, USA. 4757 p

Bahar M., Mojtahedi H. and Akhiani A. 1982. Bacterial canker of apricot in Isfahan. Iranian Journal of Plant Pathology 18: 58–68

Banapour A., Zakiee Z. and Amani G. 1990. Isolation of *Pseudomonas syringae* from sweet cherry in Tehran Province. Iranian Journal of Plant Pathology 26:67–72

Borhani B. and Rahimian H. 2013. Yeast species as the causal agents or associated with stem canker of stone fruit trees. Iranian Journal of Plant Pathology 49: 461-462

Borhani B. and Rahimian H. 2015. *Cryptococcus adeliensis* inciting branch canker on stone fruit trees. European Journal of Plant Pathology

Borhani B., Rahimian H., Babaeizad V. and Zohour, E. 2013. *Cryptococcus adeliensis* a yeast species inciting stem canker on stone fruit trees. Journal of Plant Pathology 95: 666

Cadez N., Zupan J. and Raspor P. 2010. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. FEMS Yeast Research 10: 619–630

Chraghali V., Sarpeleh A. and Razavi M. 2012. Study of the genetic diversity of *Monosporascuse cannonballus* isolates causal agent of root rot and vine decline of muskmon in Iran using rep-PCR marker. Iranian journal of Plant Pathology 48: 1-11

Elahi nia A. and Rahimian H. 1993. Identification of Bacterial Canker Agent of Stone Fruit in West Mazandaran. Proceeding of the 11th Iranian Plant Protection Congress, Iran p: 213

Fariis J.S. 1969. On the cophenetic correlation coefficient. Systematic Zoology 18: 279-285

Fonseca A., Boekhout T. and Fell J. W. 2011. *Cryptococcus* Vuillemin(1901), pp. 1661-1737. In C. P. Kurtzman, J. W. Fell and T. Boekhout. (eds.), The Yeasts, a Taxonomic Study (5th ed.). Elsevier, London

Hierro N., Gonzalez A., Mas A. and Guillamon J. 2004. New PCR-based methods for yeast identification. Journal of Applied Microbiology 97: 792-801

Jami F., Kazempour M. N., Elahinia S. A. and Khodakaramian G. 2005. First Report of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* on Stone Fruit Trees from Iran. Journal of Phytopathology 153: 371–372

Kurtzman C. P., and Robnett C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek 73: 331–371

Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (Lond.) 227 p

Louws F. J., Rademaker J. L. W. and de Bruijn F. J. 1999. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. Annual Review Phytopathology 37:81-125

Mahmoudi H., Rahnama K., Rahimian H., Nasrolahnejad S. and Taghinasab M. 2012. Investigation on casual and

www.SID.ir

Archive of SID

associated agents with bacterial canker stone fruit trees in Golestan Province. Journal of Plant Production 18: 1-14

Millar B. C., Jiru X., Moore J. E. and Earle J. A. 2000. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. Journal of Microbiological Methods 42: 139-147

Mirhendi S. H., Kordbacheh P., Kazemi B., Samiei S., Pezeshki M. and Khorramizadeh M. R. 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 30: 103-106

Mohammadi M., Ghasemi A. and Rahimian H. 2001. Phenotypic Characterization of Iranian Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* van Hall, the Causal Agent of Bacterial Canker Disease of Stone Fruit Trees. Journal of Agricultural Science and Technology 3: 51-65

Pour Saeed R., Javan Nikkhah M., Berdi Fotouhifar kh. and Khosravi, V. 2011. Study on sexual fertility and genetic diversity of *Magnaporthe salvinii*, causal agent of rice stem rot in northern Iran. Iranian journal of Plant Pathology 47: 107-119

Rahimian H. 1995. The occurrence of bacterial red streak of sugarcane caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Iran. Journal of Phytopathology 143: 321-324

Rahimian H., Nikravesh Z., Arabi F., and Rezaeean V. 2004. Association of *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* with blossom blight of peach in Mazandaran. Proceeding of the 16th Iranian Plant Protection Congress, Iran p: 424

Rimek D., Haase G., Lück A., Casper J. and Podbielski A. 2004. First report of a case of meningitis caused by *Cryptococcus adeliensis* in a patient with acute myeloid leukemia. Journal of Clinical Microbiology 42: 481-483

Schisler D. A., Janisiewicz W. J., Boekhout T. and Kurtzman, C. P. 2011. Agriculturally important yeasts: Biological control of field and postharvest diseases using yeast antagonists, and yeasts as pathogens of plants, pp. 45-52. In: C. P. Kurtzman, J. W. Fell and T. Boekhout.(eds.), The Yeasts, a Taxonomic Study (5th ed.). Elsevier, London.

Scorzetti G., Fell J., Fonseca A. and Statzell-Tallman A. 2002. Systematics of basidiomycetous yeasts: A comparison of large subunit D1/D2 and internal transcribed spacer rDNA regions. FEMS Yeast Research 2: 495-517

Scorzetti G., Petrescu I., Yarrow D. and Fell J. W. 2000. *Cryptococcus adeliensis* sp. nov., a xylanase producing basidiomycetous yeast from Antarctica. Antonie van Leeuwenhoek 77: 153-157

Shams-Bakhsh M. and Rahimian H. 1989. Identification of bacterial canker agent of stone fruits in Mazandaran. Proc. 9th Iranian Plant Protection Congress, Mashhad, Iran: 134

Shams-Bakhsh M. and Rahimian H. 1997. Comparative study on agents of citrus blast and bacterial canker of stone fruits in Mazandaran. Iranian Journal of Plant Pathology 33:132-143

Sneath P.H. and Sokal R. R. 1973. The principles and practice of numerical classification. Numerical Taxonomy. San Francisco: W.H. Freeman & Co. 278p

Sokal R. and Rohlf F. J. 1962. The comparisons of dendrograms by objective mathods. Taxon 11: 33-40

Velazquez E., villar M., Grondona I., Monte E. and Gonzalez-villa T. 2006. Ultrastructural and chemotaxonomic analysis of a xylanolytic strain of *Cryptococcus adeliensis* isolated from sheep droppings in Spain. Archives Microbiology 186:195–202

Versalovic J., Koeuth T. and Lupski R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerpriting of bacterial enomes. Nucleic acids research 19: 6823-6831.

www.SID.ir