" نهال و بذر"
جلد ٢٤ ، شماره ٣، سال ١٣٨٧

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌هایی از درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) نسبت به بیماری آتشک. I. جداسازی، ارزیابی و گزینش جدایه‌های باکتری عامل بیماری (*Erwinia amylovora*)

Evaluation of Fire Blight Resistance in some Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotypes. I. Isolation, Evaluation and Selection of Causal Bacterial (*Erwinia amylovora*) Isolates

حمید عبداللهی[1] و هانیه اکبری مهر[2]

۱- استادیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
۲- کارشناس، دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۸٦/٥/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۷/۲/۱۲

چکیده

عبداللهی، ح.، و اکبری مهر، ه. ۱۳۸۷. ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌هایی از درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) نسبت به بیماری آتشک. I. جداسازی، ارزیابی و گزینش جدایه های باکتری عامل بیماری (*Erwinia amylovora*). **نهال و بذر ٢٤**: ٥٢٨-٥١٥.

بیماری آتشک (Fire blight) با عامل باکتریایی *Erwinia amylovora* (Burr.) Winslow *et al.* بیشترین اهمیت را در بین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار در بسیاری از کشورها دارد. در بین روش‌های مبارزه با بیماری، استفاده از ارقام متحمل یا مقاوم اقتصادی‌ترین و موثرترین روش محسوب می‌شود. در این تحقیق به منظور به کارگیری جدایه‌های باکتری در ارزیابی تحمل ژنوتیپ‌های درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) نسبت به بیماری آتشک، اقدام به جمع‌آوری، شناسایی و ارزیابی توان بیماری‌زایی و خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های باکتری عامل بیماری شد. از مجموع ۲۵ جدایه باکتری به دست آمده از بافت‌های میزبان‌های مختلف آلوده به آتشک، تنها پنج جدایه به طور کامل به ۲۳ آزمون بیوشیمیایی و آزمون بیماری زایی پاسخ مطلوب دادند. از بین پنج جدایه انتخابی، دو جدایه به دست آمده از استان زنجان (Z1 و Z2) و یک جدایه از استان تهران (K2) بیماری زایی قابل توجهی نشان دادند که امکان کاربرد بعدی آن‌ها را در ارزیابی مقاومت ارقام فراهم می‌آورد. بررسی الگوی استفاده از منابع کربنی مختلف توسط جدایه‌ها بیانگر یکنواختی قابل توجه جدایه‌ها بود و جدایه‌ها سرعت استفاده بیشتری از ساکاروز، گلوکز و فروکتوز داشتند. با توجه به این که ساکاروز از جمله منابع کربن غالب در خانواده گلسرخیان است، به نظر می‌رسد حداقل بخشی از محدوده میزبانی باکتری با فراوانی این منبع کربن در این خانواده وابسته است. همچنین ارزیابی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها بیانگر وجود مقاومت زیاد (High-Resistance) در جدایه K1 به استرپتومایسین بود که اولین گزارش از جداسازی جدایه مقاوم به این آنتی‌بیوتیک در کشور است.

واژه‌های کلیدی: درخت به، *Erwinia amylovora*، آتشک (Fire Blight)، جدایه، خصوصیات بیوشیمیایی، بیماری‌زایی.

نویسنده مسئول: habdollahi@yahoo.it

مقدمه

بیماری آتشک با عامل باکتریایی *Erwinia amylovora* مهم‌ترین بیماری درختان میوه دانه دار در کشور است. این بیماری در سال ۱۳۶۸ برای اولین بار در کشور در برغان کرج مشاهده و گزارش شد (Zakeri and Sharif Nabi, 1991). اولین آلودگی‌های بیماری در سال ۱۳۷۳ در قزوین و سلماس به وقوع پیوست (Mazarei *et al*., 1994) و سپس بین سال‌های ۱۳۷۶ الی ۱۳۷۸ موجب نابودی بسیاری از باغات ارقام حساس گلابی و به در استان‌های تهران و قزوین شد. علی‌رغم تمهیدات قرنطینه‌ای انجام شده جهت جلوگیری از گسترش بیماری در کشور، آتشک در سال ۱۳۸۳ از استان‌های خراسان (Zohur and Rahmani Moghadam, 2004)، گیلان (Ali and Kazempour, 2004) و فارس (Sahandpour and Ghasemi, 2004) گزارش شد.

بیماری آتشک فاقد یک روش مبارزه قطعی بوده و هر روش مبارزه‌ای بایستی بر اساس کاهش جمعیت باکتری مولد بیماری در باغ پایه‌ریزی شود. در بین روش‌های مبارزه با بیماری آتشک، استفاده از ارقام متحمل اقتصادی‌ترین و موثرترین روش مبارزه به حساب می‌آید. ارزیابی مقاومت ارقام سیب کشور در شرایط گلخانه‌ای (Davoudi, 1998؛ Maroofi and Mostafavi, 1996) و شرایط باغ تحقیقاتی (Abdollahi and Majidi, 2005) بیانگر وجود ارقامی با آستانه تحمل مطلوب به بیماری در بین ارقام سیب داخلی و وارداتی بود، در حالی که هیچ یک از ارقام گلابی موجود در کشور حتی در گروه نیمه متحمل نسبت به بیماری قرار نگرفتند (Davoudi, 1998). با توجه به سابقه طولانی بیماری آتشک در آمریکا و اروپا، ارزیابی‌های متعددی در زمینه بررسی مقاومت ارقام و ژنوتیپ‌های سیب و گلابی (Bagnara *et al.,* 1996؛ Van der Zwet *et al.,* 1984؛ Noreli *et al.,* 2002؛ Zeler, 1978) و در امتداد آن اصلاح ارقام مقاوم یا متحمل (Fischer and Richter, 1999؛ Thibault, 1981) انجام شده است که منجر به معرفی ارقام متحمل گلابی و ارقام مقاوم سیب نسبت به بیماری شده است.

به منظور انجام یک برنامه ارزیابی مقاومت به بیماری آتشک از طریق آلوده‌سازی مصنوعی، اولین گام خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌های بیماری زای باکتری *E. amylovora* می‌باشد. جدایه‌های مختلف این باکتری دارای یکنواختی (Homology) بالایی در بسیاری از خصوصیات بیوشیمیایی و سرولوژیک هستند (Momol and Aldwinckle, 2000) لیکن از نظر توان بیماری‌زایی، تفاوت‌های قابل‌توجهی در بین جدایه‌های باکتری مشاهده می‌شود که برای اولین بار توسط پیرستورف (Pierstorff, 1931) گزارش شد. مطالعه بیلینگ (Billing, 1984) بیانگر پائین بودن توان

بیماری‌زایی جدایه‌های فاقد کپسول این باکتری بود. بنلی اغلو و اوزاکمن (Benlioglu and Ozakman, 1999) بیش از ۵۰ جدایه باکتری از نواحی مختلف ترکیه را بررسی و تفاوت قابل‌توجهی در الگوی استفاده از هیدارت‌های کربن در آن‌ها مشاهده کردند، ولی هیچ یک از جدایه‌ها مقاوم به استرپتومایسین نبودند. مطالعات نورلی و همکاران (Norelli *et al*., 1984, 1986) بیانگر تفاوت توان بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *E. amylovora* روی برخی ارقام سیب بود. داودی (Davoudi, 1998) نیز تفاوت قابل‌توجهی را در توان بیماری‌زایی جدایه‌های باکتری عامل آتشک گزارش کرد. افیونیان و رحیمیان (Afunian and Rahimian, 1996) به بررسی خصوصیات جدایه‌های مختلف *E. amylovora* پرداختند و گزارش کردند که به دلیل شباهت‌های بیوشیمیایی زیاد جدایه‌ها، گروه‌بندی آن‌ها امکان‌پذیر نیست.

این تحقیق به منظور دستیابی به جدایه‌های خالص و بیماری‌زای باکتری *E. amylovora* جهت استفاده در برنامه ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌های جمع‌آوری شده درخت به (*Cydonia oblonga* Mill.) نسبت به بیماری آتشک انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی باکتری

شاخه‌های سال جاری واجد علائم بیماری آتشک از درختان سیب، گلابی، به و زالزالک از مناطق مختلف استان‌های تهران، قزوین، ارومیه و زنجان جمع‌آوری شد و برش‌های عرضی شاخه‌ها پس از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت عمومی لوریا-برتانی آگار (LB-Agar) جامد کشت داده شدند. کلونی‌های سفید رنگ و گنبدی پس از ۲۴ ساعت رشد جداسازی و روی همان محیط زیر کشت شدند. به منظور نگهداری جدایه‌ها تا زمان انجام آزمایش‌های بیوشیمیایی، رشدهای شبگذران باکتری در محیط LB مایع به صورت ۶۰٪ سوسپانسیون باکتری و ۴۰٪ گلیسرول در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد حفظ و نگهداری شدند.

آزمایش‌های بیوشیمیایی

آزمایش‌های بیوشیمیایی شامل دو گروه آزمون‌های شناسایی باکتری و آزمون‌های تمایز جدایه‌ها بودند. در گروه اول ۲۳ آزمون شامل آزمون‌های گرم (روش پتاس ۳٪ و رنگ‌آمیزی با محلول لوگول)، اکسیداسیون یا تخمیر هیدرات های کربن (Hugh and Lifson, 1983)، رشد هوازی و بی‌هوازی، ذوب ژلاتین، هیدرولیز اسکولین، تولید اندول و تولید اکسیداز (Moore *et al*., 1988)، تولید اسید از ساکاروز (Fahy and Hayward, 1983)، تولید کاتالاز، آزمون متیل رد، واکنش روی شیر لیتموس، استفاده از سیترات، تولید گاز سولفید هیدروژن

از سیستئین و تولید اوره آز (Aneja, 2004)، تحمل مقادیر ۵ و ۶ درصد نمک طعام در محیط، رشد در دماهای ۳۵ و ۳۶ درجه سانتی‌گراد، تولید رنگ صورتی روی محیط YDC، احیاء نیترات و تولید رنگ فلورسنت روی محیط کینگ- بی (Aneja, 2004)، تولید لوان و هیدرولیز نشاسته (Dye, 1978)، رشد روی محیط افتراقی CCT (Ishimaru and Klos, 1984) انجام شد. به منظور تمایز جدایه‌ها از آزمون‌های مصرف قندهای آرابینوز، ریبوز، سوربیتول، ساکاروز، فروکتوز، گالکتوز، گلوکز و ملیبیوز (Aneja, 2004)، همراه با مقاومت به سه آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین، استرپتومایسین و ترامایسین (اکسی‌تتراسایکلین) استفاده شد.

آزمایش اثبات بیماری‌زایی

ارزیابی توان بیماری‌زایی جدایه‌های به دست آمده روی میوه‌های نابالغ (۲ ماه پس از تمام گل) دو رقم گلابی اسپادونا (نیمه متحمل) و شاه میوه (نیمه حساس) انجام شد. به منظور تهیه مایه باکتری، پس از حذف محیط مایع از کشت‌های شبگذران باکتری از طریق انجام سانتریفیوژ، اقدام به جایگزینی محیط با تامپون فسفات خنثی (pH=7) و تنظیم غلظت مایه باکتری از طریق اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر شد. به صورتی که غلظت نهایی کلیه مایه‌های به کار رفته براساس آزمایش‌های قبلی به کدورت (OD) برابر ۲ رسید (Abdollahi *et al*., 2004). کلیه آزمایش‌ها حداقل در چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد.

نتایج و بحث

از کشت نمونه‌های آلوده درختان، ۲۵ کلونی باکتریایی با شباهت ظاهری به کلونی‌های *E. amylovora* جداسازی شد که پس از انجام آزمون‌های بیماری زایی و بیوشیمیایی پنج جدایه با خصوصیات گونه *E. amylovora* تطابق کامل نشان داد (جدول ۱). کلیه جدایه‌های انتخابی میله ای شکل و دارای تاژک‌های متعدد محیطی بودند.

ارزیابی خصوصیات بیوشیمیایی

آزمایش‌های بیوشیمیایی انجام شده جهت شناسایی باکتری بیانگر یکنواختی بالای جدایه‌های به دست آمده این گونه از مناطق و میزبان‌های مختلف بود به صورتی که در کلیه آزمایش‌های انجام شده رفتار یکنواختی از کلیه جدایه‌ها مشاهده شد (جدول ۲). تنها مورد تفاوت در آزمایش‌ها میزان تولید اسید از ساکاروز بود که دو جدایه به دست آمده از استان زنجان دارای توان تولید اسید بیشتری نسبت به سایر جدایه‌ها بودند (جدول ۲). علاوه بر آن کلیه جدایه‌ها دارای توان رشد بی‌هوازی ضعیف، فاقد توان هیدرولیز نشاسته، احیاء نیترات و تولید اکسیداز، اندول، اوره آز، گاز سولفید هیدروژن، رنگیزه‌های فلورسنت و رنگ صورتی روی محیط YDC بودند (جدول ۲). آستانه تحمل دمایی ۳۵ درجه سانتی‌گراد و

جدول ۱- مشخصات گونه‌های میزبان و موقعیت جغرافیایی پنج جدایه انتخاب شده *E. amylovora*

Table 1. Host and geographical origin offive selected isolates of *E. amylovora*

جدایه Isolate	خصوصیات میزبان Host characteristics		محل نمونه برداری Sampling location	
	گونه Species	رقم Cultivar	استان Province	ناحیه Area
K1	*Malus pumila* Borkh.	Ardabil No. 1	Tehran	Karaj-Kamal Abad
K2	*Pyrus communis* L.	Williams	Tehran	Karaj-Kamal Abad
S1	*Malus pumila* Borkh.	Shafi Abadi	Tehran	Shahriar
Z1	*Malus pumila* Borkh.	Golden Delicious	Zanjan	Khoram Dareh
Z2	*Pyrus communis* L.	Williams	Zanjan	Khoram Dareh

جدول ۲- آزمون های بیوشیمیایی انجام شده برای شناسایی جدایه‌های مختلف باکتری *E. amylovora*

Table 2. Biochemical tests used for identification of *E. amylovora* isolates

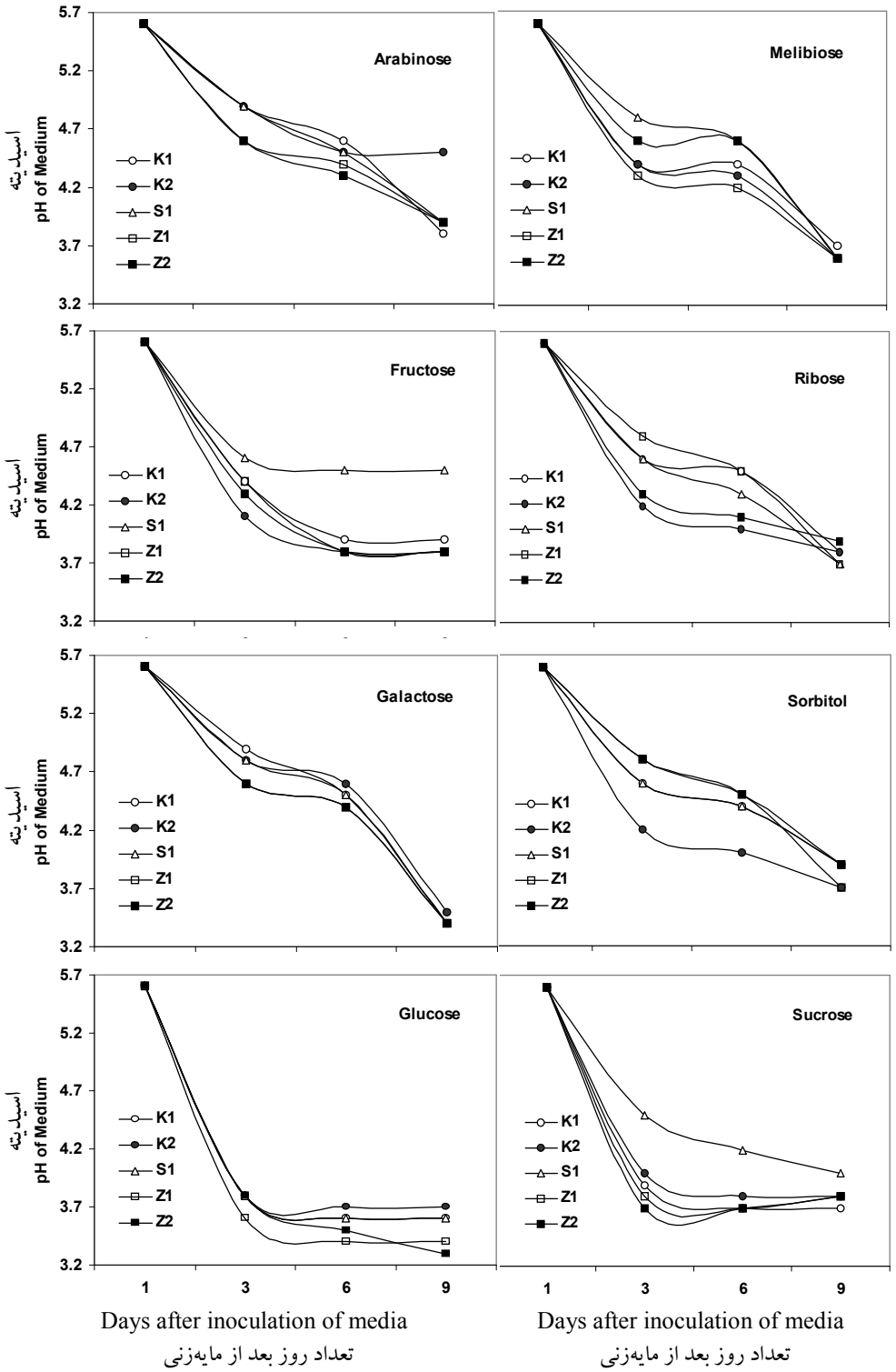
آزمون Test	جدایه‌ها Isolates					آزمون Test	جدایه‌ها Isolates				
	K1	K2	S1	Z1	Z2		K1	K2	S1	Z1	Z2
Gram Reaction	-	-	-	-	-	Fermentation of Sucrose	±	±	±	±	±
Anaerobic Growth	±	±	±	±	±	H_2S Production from Cysteine	-	-	-	-	-
Aerobic Growth	+	+	+	+	+	Acid Production from Citrate	+	+	+	+	+
Starch Hydrolysis	-	-	-	-	-	Acid Production from Sucrose	±	±	±	+	+
Gelatin Hydrolysis	±	±	±	±	±	Morphology of Colony on CCT	+	+	+	+	+
Nitrate Reduction	-	-	-	-	-	Fluorescent Pigments on King's B Medium	-	-	-	-	-
Catalase Production	+	+	+	+	+	Yellow Color Production on YDC	-	-	-	-	-
Oxidase Production	-	-	-	-	-	Effect on Lithmus Milk	Acidic	Acidic	Acidic	Acidic	Acidic
Endol Production	-	-	-	-	-	5% NaCl Growth	±	±	±	±	±
Urease Production	-	-	-	-	-	6% NaCl Growth	-	-	-	-	-
Methyl Red	-	-	-	-	-	Growth at 35ºC	±	±	±	±	±
Levan Production	+	+	+	+	+	Growth at 36ºC	-	-	-	-	-
Esculin Hydrolysis	-	-	-	-	-	Virulence on Pear Shoots	+	+	+	+	+

-، ± و + به ترتیب بیانگر پاسخ یا رشد منفی، مثبت ضعیف و مثبت قوی باکتری هستند

-, ± and +, indicate negative, weak positive and strong positive reaction or growth of bacteria, respectively.

آستانه تحمل ۵٪ نمک طعام نیز برای جدایه‌های گزینش شده تقریباً یکنواخت بود لیکن میزان رشد باکتری در نزدیکی آستانه‌های دمایی و غلظت نمک بسیار بطئی و کند بود.

مقایسه توان استفاده از کربوهیدرات‌های مختلف بیانگر تفاوت جدایه‌ها در سرعت و میزان استفاده از آن‌ها بود. شکل ۱ بیانگر این است که منحنی استفاده از منابع کربن به دو نوع سیگموئید منفرد (ساکاروز، فروکتوز و گلوکز) و سیگموئید دوگانه (آرابینوز، ریبوز، سوربیتول، گالاکتوز و ملیبیوز) مشاهده می‌شد، به عبارتی کلیه جدایه‌های مورد مطالعه سرعت زیادی در استفاده از سه قند فروکتوز، گلوکز و ساکاروز دارند به نحوی که در طی ۴ الی ۵ روز اولیه اسیدیته محیط رشد باکتری حاوی این سه کربوهیدرات در اغلب جدایه‌ها به pH نزدیک ۳/۵ اُفت کرد، لیکن سرعت استفاده از فروکتوز اندکی در مقایسه با گلوکز و ساکاروز کمتر بود. مطالعات نشان داده که ساکاروز از جمله مهم‌ترین کربوهیدرات‌های خانواده رزاسه است، فراوانی این قند بسته به زمان و شرایط محیطی متغیر بوده لیکن بالاترین غلظت آن در نوشجای (Nectarthod)، یعنی مهم‌ترین محل ورود باکتری به میزبان وجود دارد (Bieleski and Redgwell, 1980). باکتری *E. amylovora* ساکاروز را به دو گونه درون و بیرون سلولی در متابولیسم خود مورد استفاده قرار می‌دهد. در نوع اول ساکاروز را در بیرون سلول به لوان تبدیل و سپس آن‌را به صورت گلوکز مورد استفاده قرار می‌دهد (Geier and Geider, 1993). مطالعه بوگز و گیدر (Bogs and Geider, 2000) بیانگر درگیری یک مجموعه ژنی در متابولیسم ساکاروز و فروکتوز است و علاوه بر این هرگونه موتاسیون در این مجموعه سبب از دست رفتن قدرت استفاده از کربوهیدارت‌های فوق شده و توان بیماری‌زایی باکتری به طور کامل از بین خواهد رفت. برعکس ایجاد موتاسیون در ژن‌های وابسته به متابولیسم سوربیتول فاقد تاثیر در بیماری‌زایی باکتری روی میوه‌های نابالغ گلابی شده و توان بیماری زایی آن را روی سرشاخه‌های سیب در حد محدودی کاهش می‌دهد (Aldridge *et al*., 1997). داده‌های به دست آمده از مقایسه سرعت استفاده از قندهای مختلف و مطالعات فوق‌الذکر بیانگر این است که سه قند گلوکز، فروکتوز و خصوصاً ساکاروز نه تنها دارای اهمیت در بیماری‌زایی باکتری هستند بلکه منابع کربنی سهل‌الوصولی هستند که به سرعت در متابولیسم باکتری مورداستفاده قرار می‌گیرند. با توجه به این که باکتری *E. amylovora* پس از استقرار روی بافت‌های میزبان در صورتی که طی چند روز اقدام به بیمار کردن بافت‌ها ننمایند در اثر تشعشعات خورشیدی از بین خواهند رفت (Thomson, 2000)، سرعت استفاده زیاد باکتری از ساکاروز ضامن بیماری‌زایی باکتری خواهد بود. علاوه بر آن جدایه‌های گزینش شده همگی در استفاده از دو قند گالاکتوز و ملیبیوز که جدایه‌های مختلف این باکتری اغلب در میزان استفاده از آن‌ها متفاوت هستند در این آزمایش‌ها یکنواختی نشان دادند.



شکل ۱- تغییرات اسیدیته محیط رشد باکتری *E. amylovora* در محیط های حاوی منابع کربن مختلف. خطاهای استاندارد به لحاظ معنی دار بودن تفاوت ها و قابل رویت بودن روند تغییرات اسیدیته نمایش داده نشده است

Fig. 1. Variation in pH of *E. amylovora* media containing different carbon sources. The standard errors have not been demonstrated due to significance of differences and visibility of pH variation

K1, K2, S1, Z1 and Z2: Isolates of *E. amylovora* (see Table 1).

ارزیابی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها

ارزیابی مقاومت جدایه‌های *E. amylovora* به آنتی‌بیوتیک‌ها بیانگر وجود مقاومت به استرپتومایسین در کلیه سطوح تیماری بین ۲۵ الی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر در یک جدایه به دست آمده از درخت سیب ناحیه کمال‌آباد در کرج بود (جدول ۳). دو آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین و ترامایسین از موثرترین باکتری کش‌ها در مبارزه شیمیایی علیه باکتری عامل بیماری آتشک هستند در حالی که اغلب جدایه‌های این باکتری به پنی‌سیلین مقاومت نشان می‌دهند (Paulin, 2000). استرپتومایسین از دهه ۶۰ میلادی در ایالات متحده بر علیه آتشک استفاده شده و اولین جدایه‌های مقاوم به استرپتومایسین باکتری در سال ۱۹۷۱ در کالیفرنیا یافت شد (Miller and Schroth, 1972). مقاومت به استرپتومایسین در اثر موتاسیون در ژن‌های ریبوزومی باکتری که محل تاثیر این نوع آنتی‌بیوتیک است به وجود می‌آید. وقوع این موتاسیون در مواد ژنتیکی کروموزومی باکتری سبب ایجاد مقاومت زیاد (High Resistance:HR) به استرپتومایسین می‌شود (Schroth *et al*., 1979). احتمال تبادل ژن‌های مقاومت روی پلاسمید در طبیعت نیز وجود دارد که منجر به ایجاد مقاومت متوسط (Medium Resistance:MR) به استرپتومایسین می‌شود (Chiou and Jones, 1991). با توجه به دامنه غلظت استرپتومایسین به کار رفته در این آزمایش به نظر می‌رسد که مقاومت موجود در جدایه K1 از نوع مقاومت زیاد (HR) باشد.

بررسی جدایه‌های مختلف باکتری *E. amylovora* در ترکیه تاکنون وجود مقاومت به استرپتومایسین را در این جدایه‌ها نشان نداده است (Benlioglu and Ozakman, 1999)، در حالی که وجود جدایه‌های مقاوم به استرپتومایسین در فلسطین اشغالی به طور مکرر گزارش شده است (Manulis *et al*., 1998, 2003). با توجه به سطح مقاومت زیاد موجود در جدایه K1 و عدم وجود سابقه استفاده از استرپتومایسین در کشور ایران جهت مبارزه با بیماری آتشک که منجر به فشار گزینشی و ایجاد موتاسیون‌های کروموزومی شده باشد، چنین به نظر می‌رسد که مقاومت به استرپتومایسین از جدایه‌های کشورهای همسایه به کشور وارد شده و مقاومت به استرپتومایسین را با جدایه‌های بومی مبادله کرده‌اند.

اثبات بیماری‌زایی

مقایسه توان بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف بیانگر عدم وجود تفاوت قابل ملاحظه در سرعت پیشرفت نکروز حاصل از جدایه‌ها روی میوه‌های نابالغ دو رقم گلابی نیمه متحمل (اسپادونا) و نیمه حساس (شاه میوه) بود، بنابراین به نظر نمی‌رسد ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌ها بر روی میوه‌های نابالغ گلابی امکان‌پذیر باشد

جدول ۳- رشد جدایه های باکتری *E. amylovora* روی محیط LB-agar غنی شده با غلظت های مختلف آنتی بیوتیک

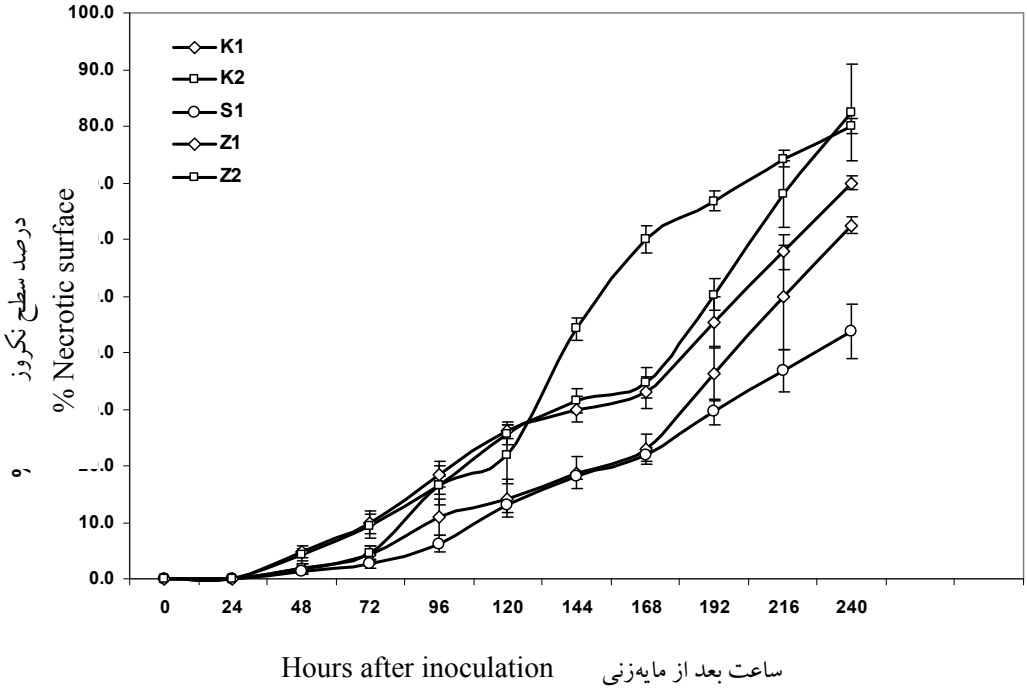
Table 3. Growth of *E. amylovora* isolates on solid LB-agar medium containing different antibiotic concentrations

جدایه‌ها Isolates	Antibiotics آنتی بیوتیک‌ها														
	Penicillin (mgl^{-1})					Streptomycin (mgl^{-1})					Terramycin (mgl^{-1})				
	0	25	50	75	100	0	25	50	75	100	0	25	50	75	100
K1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
K2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Z1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Z2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-

- and + respectively show no growth and growth of bacteria. - و + به ترتیب بیانگر عدم رشد و رشد باکتری است.

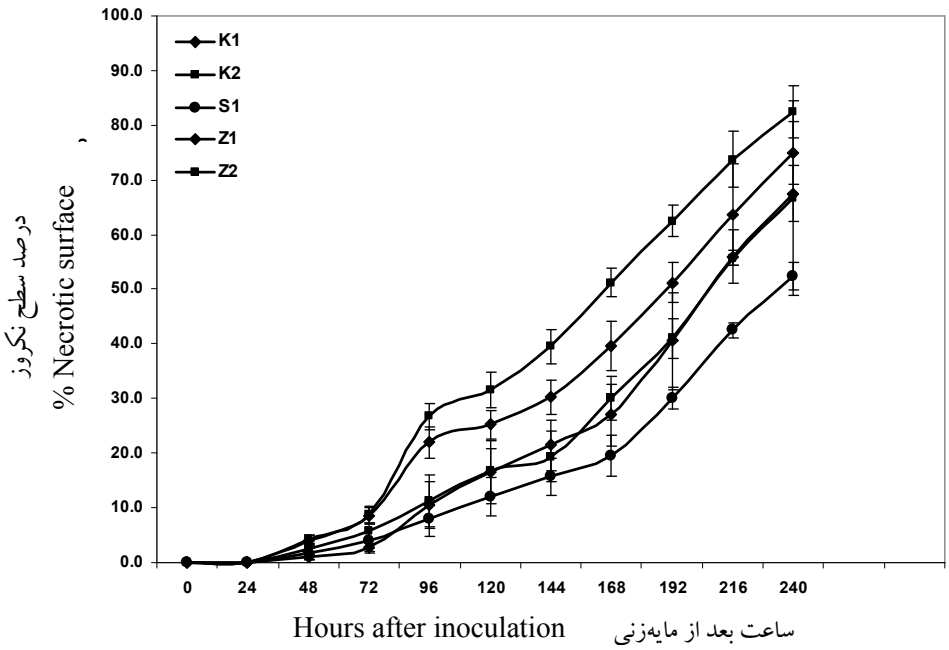
(شکل ۲و۳). برعکس گزارش‌های متعدد بیانگر امکان‌پذیر بودن استفاده از مواد گیاهی درون شیشه نظیر ساقه‌چه‌های کشت بافتی (Abdollahi *et al*., 2004) و پروتوپلاست‌ها (Brisset *et al*., 1990) در کنار روش متداول استفاده از نهال برای ارزیابی مقاومت ارقام به بیماری آتشک بوده است.

آزمون جدایه‌های باکتری بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار در توان بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف روی میوه‌های نابالغ گلابی بود، به این صورت که در مورد رقم شاه میوه جدایه K2 به عنوان بیماری‌زاترین جدایه مشاهده شد و پس از آن دو جدایه زنجان (Z1 و Z2) قرار گرفتند (شکل ۲). در مورد رقم اسپادونا جدایه‌های زنجان بیشترین بیماری‌زایی را داشتند (شکل ۳). از مقایسه شکل‌های ۲ و ۳ با سرعت رشد باکتری در محیط LB مایع (شکل ۴) چنین به نظر می‌رسد که گرچه سرعت رشد باکتری در محیط مایع به تنهایی و به طور قطعی نمی‌تواند بیانگر میزان بیماری‌زایی آن جدایه باشد لیکن جدایه S1 هم در محیط مایع و هم در بافت‌های میوه کمترین سرعت رشد را از خود بروز داده بود. مقایسه توان بیماری زایی دو جدایه زنجان با نتایج ارائه شده در جدول ۱ بخش تولید اسید از ساکاروز و منحنی‌های مصرف هیدرات‌های کربن مختلف نشانگر این است که دو جدایه زنجان به طور عموم دارای توانایی جذب و استفاده بیشتری از اغلب قندها در مقایسه با دیگر جدایه‌ها هستند، بنابراین چنانچه قبلاً نیز اشاره شده به نظر می‌رسد که حداقل بخشی از توان بیماری‌زایی باکتری عامل بیماری آتشک به سرعت استفاده آن از منابع کربن محیطی و کاربرد آن در سوخت و ساز باکتری وابسته است. با توجه به توان بیماری‌زایی و سرعت رشد سه جدایه K2، Z1 و Z2 به نظر می‌رسد این سه جدایه مناسب‌تر برای استفاده در برنامه گزینش مقاومت به بیماری ژنوتیپ‌ها باشند.



شکل ۲- مقایسه سرعت پیشرفت نکروز روی میوه‌های نابالغ گلابی رقم شاه میوه (نیمه حساس) مایه‌زنی شده با جدایه‌هایی از باکتری *E. amylovora*

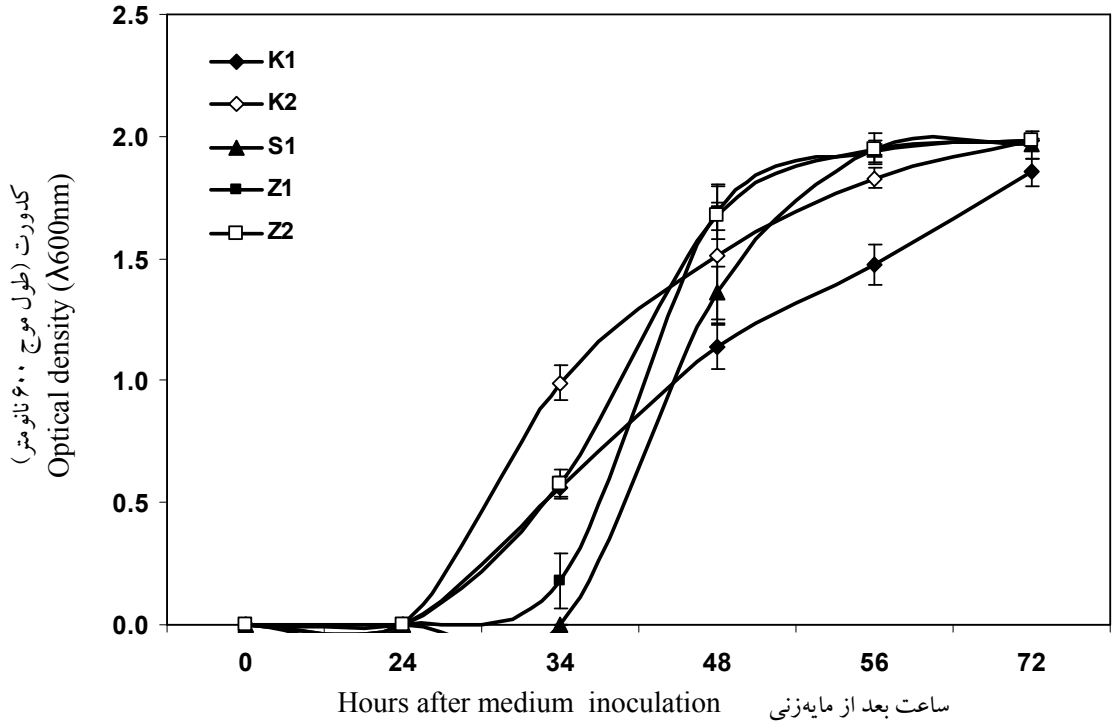
Fig. 2. Comparison of necrosis progress rates caused by some isolates of *E. amylovora* on semi- pear cv.



شکل ۳- مقایسه سرعت پیشرفت نکروز روی میوه‌های نابالغ گلابی رقم اسپادونا (نیمه متحمل) مایه‌زنی شده با جدایه‌هایی از باکتری *E. amylovora*

Fig. 3. Comparison of necrosis progress rates caused by some isolates of E. amylovora on semi-tolerant pear cv. Spadona

K1, K2, S1, Z1 and Z2: Isolates of *E. amylovora* (see Table 1).



شکل ۴- مقایسه سرعت رشد جدایه‌هایی از باکتری *E. amylovora* در محیط LB مایع

Fig. 4. Comparison of growth rates of some *E. amylovora* isolates in liquid LB medium

K1, K2, S1, Z1 and Z2: Isolates of *E. amylovora* (see Table 1).

سپاسگزاری

بدین وسیله از همکاری کلیه همکاران آزمایشگاه کشت بافت و بیماری‌شناسی بخش تحقیقات باغبانی به خصوص آقای مهندس مهیار طاووسی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

Abdollahi, H., and Majidi, E. 2005. Relation between fire blight resistance and different characteristics of apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. Fruit Growing 17: 90-95.

Abdollahi, H., Ruzzi, M., Rugini, E., and Muleo, R. 2004. An *in vitro* system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. Plant Cell Tissue and Organ Culture 79: 203-212.

Afunian, M. R., and Rahimian, H. 1996. Investigation on the characteristics of Iranian isolates of *Erwinia amylovora*Acta Horticulturae 411: 187-188.

Aldridge, P., Metzger, M., and Geider, K. 1997. Genetics of sorbitol metabolism by

Erwinia amylovora and its influence on bacterial virulence. Molecular General Genetics 256: 611–619.

Ali, B., and Kazempour, M. N. 2004. Presentation of *Erwinia amylovora*, causal agent of apple and pear fire blight, from Guilan province. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress University of Tabriz, Iran. Page 423.

Aneja, K. R. 2004. Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology. New Age International Publishers. New Delhi. 607pp.

Bagnara, G. L., Rivalta, L., Laghi, M., and Quarta, R. 1996. Evaluation of fire blight resistance in pear: combining ability and breeding strategy. Acta Horticulturae 411: 383-392.

Benlioglu, K., and Ozakman, M. 1999. Characterization of Turkish isolates of *Erwinia amylovora* (burr.) Winslow *et al*. Acta Horticulturae 489: 127-132.

Bieleski, R. L., and Redgwell., R. J. 1980. Sorbitol metabolism in nectaries from flowers of Rosaceae. Australian Journal of Plant Physiology 7: 15–25.

Billing, E. 1984. Studies on avirulent strains of *Erwinia amylovora*. Acta Horticulturae 151: 249-254.

Bogs, J., and Geider, K. 2000. Molecular analysis of sucrose metabolism of *Erwinia amylovora* and influence on bacterial virulence. Journal of Bacteriology 182: 5351–5358.

Brisset, M. N., Ochatt, S. J., and Paulin, J. P. 1990. Evidence for quantitative responses during co-culture of *Pyrus communis* protoplasts and *Erwinia amylovora*. Plant Cell Reports 9: 272-275.

Chiou, C. S., and Jones, A. L. 1991. The analysis of plasmid-mediated streptomycin resistance in *Erwinia amylovora* Phytopathology 81: 710–714.

Davoudi, A. 1998. Evaluation of fire blight resistance in some apple and pear cultivars. M.Sc. Thesis, College of Agriculture, University of Tabriz, Iran. 200pp.

Dye, D. W. 1978. A taxonomic study of genus Erwinia. I. The amylovora group. Journal of Microbiology 12: 81-97.

Fahy, P. C., and Hayward, A. C. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests. pp. 337-374. In: Fahy, P. C., and Persley, G. H. J. (eds.) Plant Bacterial Disease Guide. Academic Press. Sidney, Australia.

Fischer, C., and Richter, K. 1999. Results on fire blight resistance in the Pillnitz apple

breeding program. Acta Horticulturae 489: 279-286.

Geier, G., and Geider, K. 1993. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. Physiology and Molecular Plant Pathology 42: 387–404.

Hugh, R., and Lifson, M. 1983. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. Journal of Bacteriology 66: 24-26.

Ishimaru, C., and Klos, E. J. 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological studies. Phytopathology 74: 1342–1345.

Manulis, S., Kleitman, F., Shtienberg, D., and Shwartz, H. 2003. Changes in the sensitivity of *Erwinia amylovora* populations to streptomycin and oxolinic acid in Israel. Plant Disease 87: 650-654.

Manulis, S., Zutra, D., Kleitman, F., Dror, O., David, I., Zilberstaine, M., and Shabi, E. 1998. Distribution of streptomycin-resistant strains of *Erwinia amylovora* in Israel and occurrence of blossom blight in the autumn. Phytoparasitica 26: 223-230.

Maroofi, A., and Mostafavi, M. 1996. Evaluation of the resistance of apple, pear and quince varieties to fire blight. Acta Horticulturae 411: 395-400.

Mazarei, M., Zakeri, Z., and Hassanzadeh, N. 1994. Fire blight situation on fruit trees in West Azerbaijan and Ghazvin provinces. Iranian Journal of Plant Pathology 30: 25-32 (in Farsi).

Miller, T. D., and Schroth, M. N. 1972. Monitoring the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on pear with a selective medium. Phytopathology 62: 1175–1182.

Momol, M. T., and Aldwinckle, H. S. 2000. Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. pp. 55-72. In: Vanneste, J.L. (ed.) Fire Blight, the Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing. Wallingford, UK.

Moore, L. W., Kado, C. I., and Bouzar, H. 1988. Gram-negative bacteria. pp.16-36. In: Scgaad, N.W. (ed.) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, USA.

Norelli, J. L., Aldwinckle, H. S., and Beer, S. V. 1984. Differential host×pathogen interactions among cultivars of apple and strains of *Erwinia amylovora*.

Phytopathology 74: 136–139.

Norelli, J. L., Aldwinckle, H. S., and Beer, S. V. 1986. Differential susceptibility of *Malus* spp. Robusta 5, Novole, and Ottawa 523 to infection by *Erwinia amylovora*. Plant Disease 70: 1017–1019.

Norelli, J. L., Aldwinckle, H. S., Holleran, H. T., Robinson, T. L., and Johnson, W. C. 2002. Resistance of 'Geneva' apple rootstocks to *Erwinia amylovora* when grown as potted plants and orchard trees. Acta Horticulturae 590: 359-362.

Paulin, J. P. 2000. *Erwinia amylovora*: general characteristics, biochemistry and serology. pp. 87-115. In: Vanneste, J.L. (ed.) Fire Blight, the Disease and Its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing. Wallingford, UK.

Pierstorff, A. L. 1931. Studies on the fire blight organism, *Bacillus amylovorus*. New York Agricultural Experimental Station Memoir 136, Ithaca. 53pp.

Sahandpour, A., and Ghasemi, A. 2004. Outbreak of fire blight of pome fruits in Fars province. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress. University of TabrizIran . Page 423.

Schroth, M. N., Thomson, S. V., and Moller, W. J. 1979. Streptomycin resistance in *Erwinia amylovora*Phytopathology 69: 565–568.

Thibault, B. 1981. Pear breeding for fire blight resistance program and first studies in France. Acta Horticulturae 117: 63-70.

Thomson, S. V. 2000. Epidemiology of fire blight. pp. 9-36. In: Vanneste, J. L. (ed.) Fire Blight, the Disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing. Wallingford, UK.

Van der Zwet, T., Bell, R. L., and Blake, R. C. 1984. Comparative evaluation of the degree of fire blight resistance in various pear cultivars and selections. Acta Horticulturae 151: 267-276.

Zakeri, Z., and Sharif Nabi, B. 1991. Fire blight disease of pear in Karaj. Proceedings of the 10th Iranian Plant Protection Congress. Kerman, Iran. Page 157.

Zeller, W. 1978. Field trials on the resistance of pear and apple varieties to fire blight (natural and artificial infection). Acta Horticulturae 86: 15-24.

Zohur, A., and Rahmani Moghadam, N. 2004. Outbreak of fire blight in Khorasan province. Proceedings of the 16th Iranian Plant Protection Congress. University of TabrizIran . Page 423.