

بررسی فاکتورهای بیماری‌زایی جدایه‌های *Erwinia amylovora* بدست آمده از استان سمنان و ارزیابی مقاومت بافت شکوفه و میوه نارس ارقام مختلف گلایی به بیماری آتشک

مهدی اخلاقی^{۱*}، وحیده رفیعی^۲، علیرضا برجسته^۲، محمدرضا عالی منش^۳ و احمد دزیانیان^۲

- ۱- *نویسنده مسوول: دانش‌آموخته بیماری‌شناسی گیاهی، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران (Mahdi.akhlaghi66@gmail.com)
- ۲- استادیار، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران
- ۳- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲۰

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۹/۲۲

چکیده

هم اکنون بیماری آتشک یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار در کشور محسوب می‌شود. در این پژوهش، ۶۸ جدایه از سه میزبان گلایی، به و سبب از مناطق مختلف استان سمنان جمع‌آوری گردید. آزمون‌های فنوتیپی، تغذیه‌ای و مولکولی با استفاده از پلاسمید pEA29 باکتری انجام پذیرفت. فاکتورهای بیماری‌زایی شامل آمیلووران، سیدروفور و بیوفیلیم در تمام جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. همچنین حساسیت و مقاومت بافت شکوفه و میوه نارس هشت رقم گلایی (شامل چهار رقم خارجی و چهار رقم بومی) سنجیده شد. نتایج نشان داد جدایه‌ها گرم و اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت و از نوع بی‌هوازی اختیاری بودند. جدایه‌ها قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون و تولید لوآن بودند ولی هیچ یک از جدایه‌ها قادر به تولید رنگدانه فلورسنت بر روی محیط کشت کینگ ب و رشد در ۳۹ درجه سانتی‌گراد نبودند. نتایج نشان داد از میان ۶۸ استرین جمع‌آوری شده ۵۲ جدایه متعلق به باکتری *Erwinia amylovora* بود. نتایج بیانگر آن بود جدایه D 43 که از میزبان به و از منطقه دیباج (دامغان) جداسازی شده بود، دارای بیشترین توان بیماری‌زایی بود. تمامی ۵۲ جدایه مورد بررسی قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی پلاسمید pEA29 را تکثیر نمودند. نتایج بررسی‌های فاکتورهای بیماری‌زایی بر روی جدایه‌ها نشان داد که صرف نظر از میزبان و مکان جغرافیایی، بین دو فاکتور آمیلووران و سیدروفور ارتباط معنی‌داری وجود داشت. نتایج بررسی حساسیت روی بافت شکوفه و میوه نارس با یکدیگر متفاوت بود، بطوری که بیشترین مقاومت به بیماری آتشک در شکوفه ارقام گلایی درگزی و اسپادونا و در مورد میوه نارس برای ارقام گلایی دوکومیس و چینی حصار ثبت گردید.

کلیدواژه‌ها: آمیلووران، درختان میوه دانه‌دار، سیدروفور

مقدمه

محصولات درختان میوه دانه‌دار از تولیدات مهم باغی ایران محسوب شده و از لحاظ تغذیه‌ای، صنایع تبدیلی، صادرات و کسب درآمدهای ارزی جایگاه مهمی از اقتصاد کشور را به خود اختصاص داده‌اند (Moarrefzadeh et al., 2009). بیماری آتشک با عامل باکتریایی *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) خسارت اقتصادی فراوانی به درختان میوه دانه‌دار وارد می‌کند (Gusberti et al., 2015). علائم اصلی بیماری شامل سوختگی (بلایت) شکوفه، نکرور و سرعصابی شدن سرشاخه‌ها و خشک شدن برگ‌ها بر روی شاخه می‌باشند. همچنین در مورد سایر علائم بیماری آتشک حالت چروکیده، سیاه و مومیایی شدن میوه و باقی ماندن آن بر روی درخت مشاهده شده است (Afunian et al., 2000). در مورد بقا باکتری در شرایط محیطی، تحقیقات گذشته نشان داد که علاوه بر حضور اندوفیتی و اپی‌فیتی در گیاه، عامل بیماری می‌تواند به صورت سیستمیک درون گیاه گسترش یابد (Moslemkhani et al., 2015). آلودگی شکوفه در فصل بهار موجب گسترش آلودگی‌های ثانویه در میزبان می‌شود (Parcey et al., 2020). دامنه دمایی بهینه برای فعالیت باکتری بین ۲۳ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد است و در دماهای پایین‌تر (۵-۲ درجه سانتی‌گراد) فاقد رشد است (Gusberti et al., 2015). کنترل این بیماری مشکل بوده و به سرعت مناطق زیادی را آلوده و به صورت همه‌گیری در یک منطقه عمل می‌کند. در ایران بیماری آتشک اولین بار در ناحیه برغان کرج در سال ۱۳۶۸ شمسی گزارش شد (Zakeri and Sharif, 1991). استفاده از ارقام حساس درختان میوه دانه‌دار و مقاومت باکتری به سموم مسی خطر آلودگی به این بیماری را افزایش داده است. طی یک مطالعه در باغات میوه دانه‌دار استان سمنان مشخص گردید در بین درختان میوه دانه‌دار بیشترین درصد آلودگی به ترتیب مربوط به درختان به (۸۸٪)، گلابی (۵۵٪) و سیب (۲۴٪)

بود (Ommati and Zaker, 2014). در واقع مدیریت و کنترل بیماری آتشک به میزان جلوگیری از آلوده شدن شکوفه وابسته است (Parcey et al., 2020). اما با توجه به محدودیت‌هایی که در مورد بررسی شکوفه وجود دارد اطلاعات ما در این زمینه محدود است. هدف از این مطالعه، شناسایی و تعیین خصوصیات بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده از استان سمنان بود تا همراه با بررسی دقیق‌تر فاکتورهای اصلی بیماری‌زایی، شناخت بهتری در مورد نحوه بیماری‌زایی *E. amylovora* حاصل شود. همچنین در پژوهش‌های گذشته در مورد تعیین حساسیت و مقاومت ارقام مختلف، بیشتر آزمون‌های بیماری‌زایی روی نهال دو ساله ارقام انجام شده بود، لذا در این پژوهش سعی گردید که بافت‌های مختلف گیاه کامل ارقام، شامل شکوفه و میوه نارس به عنوان دو هدف مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی باکتری

در فاصله اردیبهشت تا تیر سال ۱۳۹۸ از باغات درختان میوه دانه‌دار مشکوک به علائم بیماری آتشک در مناطق مختلف استان سمنان، نمونه برداری انجام شد. قطعاتی از مرز ناحیه آلوده و سالم با استفاده از قیچی باغبانی جداسازی شد و بوسیله تیغ سترون به قطعات چهار تا پنج میلی‌متری تقسیم گردید. قطعات خرد شده درون لوله آزمایش حاوی پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون و یک درصد پیتون قرار داده شد و لوله‌های آزمایش به مدت ۶۰ دقیقه در دستگاه چرخاننده با ۹۰ دور در دقیقه قرار گرفتند (Tavakolbakhoda and Taghavi., 2010). از سوسپانسیون تشکیل شده یک لوپ به روش چند ضلعی بر روی محیط کشت آگار غذایی^۱ (لیوفلیکم، ترامو، ایتالیا، ۲۵ گرم در لیتر) کشت داده شد. بعد از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت از تک پرگنه‌هایی که به رنگ سفید تا شیری و به شکل گرد و محدب،

1- Nutrient agar

واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت پنج دقیقه آغاز و سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۳ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک سیکل گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر انجام شد. به منظور بررسی قطعات تکثیر شده، ژل آگارز ۱/۵ درصد تهیه و محصولات PCR به همراه مارکر یک کیلو بازی (شرکت فرمتاز) در چاهک های ژل بارگذاری و به مدت یک ساعت با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد. توالی یابی محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز توسط شرکت بایونیر صورت گرفت.

آزمون بیماری زایی

جدایه های باکتری در محیط کشت لوریا-برتانی مایع^۴ به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شدند. پس از سانتریفیوژ، باکتری ته نشین شده با بافر PBS^۵ مخلوط گردید و به غلظت 10^8 CFU/mL رسید. از رقم اسپادونا (*Pyrus communis* L. cv Spadona) جهت آزمون بیماری زایی استفاده شد. بعد از سترون سازی سطح میوه با اتانول ۷۰ درصد، با سرسمپلر حفره کوچکی در سطح میوه ایجاد گردید و مقدار چهار میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده در داخل حفره ها قرار داده شد. سپس میوه ها در ظروف پلاستیکی درب بسته حاوی آب مقطر سترون (به منظور تامین رطوبت ۷۰ تا ۸۰ درصدی) قرار گرفته و به مدت سه تا پنج روز در انکوباتور (دمای ۲۸ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند (Zhao et al., 2009). بر اساس نوع و شدت علائم بیماری، پنج وضعیت برای درجه بندی بیماری در نظر گرفته شد. تقسیم بندی براساس میزان پیشرفت بیماری در یک ناحیه ۱/۵ سانتی متر مربعی در سطح میوه نارس بود

درون محیط آگار غذایی به صورت چمنی کشت شدند (Schaad et al., 2001). مشخصات جدایه ها در جدول یک نشان داده شده است.

بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه ها

آزمون های فیزیولوژیکی، تغذیه ای و بیوشیمیایی بر اساس روش های استاندارد باکتری شناسی انجام شد. از میان ۶۸ جدایه بدست آمده از میزبان های مختلف، ۵۲ جدایه که دارای پرگنه های گرد، شیری تا کرم رنگ، محدب و براق بر روی محیط NA بودند، انتخاب شدند و آزمون های مختلف شامل گرم، رشد در محیط های YDC^۱ و EMB^۲، تولید رنگدانه در محیط KB، رشد در ۳۹ درجه سانتی گراد، لپانیدن ورقه های سیب زمینی، لوان (Schaad et al., 2001)، واکنش فوق حساسیت^۳ (Klement et al. 1964)، کاتالاز (Dye 1968)، اکسیداز (Kovacs 1956)، رشد بی هوازی (Hugh and Leifson, 1953)، احیای نترات (Lelliot and Stead, 1987) روی آنها انجام پذیرفت.

شناسایی مولکولی جدایه ها

استخراج DNA با استفاده از روش جوشاندن انجام شد (Yaish, 2006). واکنش زنجیره ای پلی مرز با استفاده از آغازگرهای طراحی شده بر اساس پلاسمید pEA29 صورت گرفت. توالی آغازگر رفت (Primer A) شامل 5'-CGGTTTTTAACGCTGGG-3' و توالی برگشت (Primer B) شامل 5'-GGGCAAATACTCGGATT-3' بود (Bereswill et al. 1992). واکنش در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۱۰۰ نانوگرم از هر یک از آغازگرها، یک میلی مولار dNTPs، ۰/۵ واحد آنزیم Taq DNA پلی مرز (Bioneer، سنول، کره جنوبی) و ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X به اضافه یک میکرولیتر از DNA ژنومی (100 ng/ μ L) و آب مقطر سترون انجام شد. چرخه حرارتی برای آغازگرها با

4- LB Broth
5- Phosphate Buffered Saline

1- Yeast extract dextrose CaCO₃
2- Eosin methylene blue
3- Hypersensitive response

جدول ۱- نام، میزبان و محل جغرافیایی نمونه برداری جدایه‌های *Erwinia amylovora* مورد بررسی در این پژوهش

Table 1. Isolates code, host plant and area of sampling for isolates of *E. amylovora* used in this research

| No. | Isolate | Number of bacterial isolate | Host | Area |
|-----|---------|-----------------------------|--------|---------------|
| 1 | S1-S6 | 6 | Apple | Bastam |
| 2 | S7-S16 | 10 | Pear | Bastam |
| 3 | S17-S19 | 3 | Pear | Gorgi |
| 4 | S20-S24 | 5 | Pear | Shahrood |
| 5 | S25-S29 | 5 | Pear | Mojen |
| 6 | S30-S31 | 2 | Quince | Royan |
| 7 | D32-D38 | 7 | Pear | Damghan |
| 8 | D39-D48 | 10 | Quince | Dibaj |
| 9 | D49-D52 | 4 | Quince | Kalate-rodbar |

گردید و ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. در نهایت غلظت مایع رویی حاوی CPC در ۶۰۰ نانومتر سنجیده شد و با تقسیم نتیجه بر غلظت مرحله رشد ۴۸ ساعته، میزان تولید آمیلووران بدست آمد (Zhao et al., 2009).

بررسی میزان تولید سیدروفور

از محیط کشت CAS-agar جهت انجام آزمون سیدروفور استفاده شد. پس از کشت باکتری در محیط کشت LB غلظت ۱۰^۸ تا ۱۰^۹ واحد تشکیل دهنده کلنی بر میلی‌لیتر از باکتری تهیه شد و مقدار ۱۵ میکرولیتر بر روی سطح محیط کشت CAS-agar قرار داده شد. پس از خشک شدن سوسپانسیون، پتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در انتها قطر هاله نارنجی رنگ (میزان جذب سیدروفور) در سطح محیط اندازه‌گیری شد (Mohammadi, 2010).

سنجش بیوفیلم

ابتدا جدایه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت LB مایع رشد داده شدند. سپس یکسان سازی جمعیت باکتری‌ها در غلظت ۱۰^۶ واحد تشکیل دهنده کلنی بر میلی‌لیتر صورت گرفت. در شرایط سترون درون چاهک‌های میکروپلیت ۱۲۰ میکرولیتر از محیط کشت LB مایع ریخته شد و به آن ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه اضافه گردید. در انتها پس از اتمام کار میکروپلیت به مدت پنج دقیقه بر روی شیکر-انکوباتور قرار گرفت (۱۲۰ دور در دقیقه). میکروپلیت در دمای ۲۸ درجه

که نوع A: ۱۰۰٪ ناحیه مورد بررسی دارای علائم، B: ۷۰٪ ناحیه مورد بررسی دارای علائم، C: ۵۰٪ ناحیه مورد بررسی دارای علائم، D: کمتر از ۲۰٪ ناحیه مورد بررسی دارای علائم و E: فاقد علائم مشخص بود (Akhlaghi et al., 2018; Iakimova et al., 2013).

سنجش پلی ساکارید خارج سلولی آمیلووران

مقدار ۲۵ میکرولیتر از کشت تازه جدایه‌ها به دو میلی‌لیتر محیط کشت LB مایع اضافه شد. جهت رشد، جدایه‌ها به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد (درون شیکر انکوباتور) قرار گرفتند. پس از انجام سانتریفیوژ مقدار دو میلی‌لیتر بافر فسفات سالین (PBS) به سلول‌های ته‌نشین شده اضافه گردید و در ادامه پس از سه بار شستشوی سلول‌ها توسط بافر PBS، مجدد ۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS به آن اضافه شد و عمل اختلاط^۱ انجام شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط حاضر به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MBMA با غلظت سوربیتول یک درصد اضافه گردید. لوله آزمایش حاوی محیط MBMA به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد بر روی شیکر-انکوباتور قرار گرفت و پس از آن غلظت توسط اسپکتروفتومتر سنجیده و برای هر جدایه ثبت شد. جداسازی مایع رویی فالکن حاوی محیط کشت توسط سانتریفیوژ انجام شد و به یک میلی‌لیتر از آن، ۲ CPC با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه

1- Vortex

2- Cetyl Pyrimidinium Chloride

قارچ کُش مانکوزب (یک در هزار) استفاده گردید. در فواصل زمانی یک، چهار و هفت روز شکوفه‌ها به منظور بررسی علائم مورد ارزیابی قرار گرفتند. محاسبه پیشرفت علائم ترکیبات فوق با توجه به جدول دو انجام پذیرفت.

بررسی میزان حساسیت و مقاومت میوه نارس در ارقام مختلف گلابی

آزمون بیماری‌زایی بر اساس روش Zhao و همکاران (۲۰۰۹) مطابق با توضیحات بخش چهار انجام پذیرفت. هشت رقم مورد استفاده شامل ارقام نامبرده در بخش هشت بودند.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه واریانس داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها به وسیله نرم افزار SPSS version 22، آنالیز واریانس انجام گردید و میانگین داده‌های هر صفت با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شد. رسم نمودارها با نرم افزار Excel version 2016 صورت گرفت.

نتایج

جداسازی باکتری و بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

نتایج آزمون‌های مختلف اثبات نمود که از بین ۶۸ استرین جمع‌آوری شده، ۵۲ جدایه متعلق به گونه *E. amylovora* بودند. جدایه‌های مذکور همگی گرم و اُکسیداز منفی بودند. نتایج آزمون‌های لوان و کاتالاز مثبت ارزیابی گردید و جدایه‌ها بی‌هوازی اختیاری بودند. واکنش فوق حساسیت (HR) برای تمام جدایه‌ها مثبت ارزیابی شد. تولید پرگنه‌های آبی مایل به سبز با درخشندگی فلزی در محیط کشت EMB برای جدایه‌های مورد آزمایش مشاهده گردید. سایر نتایج آزمون‌های فنوتیپی در جدول سه نشان داده شده است.

سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شد. سپس میکروپلیت تخلیه و چاهک‌ها با استفاده از رنگ کریستال ویوله یک درصد به مدت یک ساعت آمیزی شدند. پس از تخلیه رنگ و شستشوی چاهک‌ها با آب مقطر سترون، مقدار بیوفیلم تولید شده توسط هر جدایه پس از حل نمودن بیوفیلم تشکیل شده، توسط اتانول و قرائت مقدار جذب در ۵۹۰ نانومتر به عنوان توانایی آن جدایه در تولید بیوفیلم برآورد گردید (Koczan et al., 2011).

بررسی میزان حساسیت و مقاومت شکوفه در ارقام مختلف گلابی

از درختان گلابی باغات کلکسیون میوه‌های دانه‌دار مرکز تحقیقات کشاورزی استان سمنان (شاهرود) در اردیبهشت ماه سال ۹۹ شکوفه‌های سالم و در مرحله‌ی باز شدن انتخاب و به آزمایشگاه منتقل گردید. یک سری سه تا پنج عددی شکوفه همراه با دُمگل درون ظروف شیشه‌ای از محلول ساکارز ۱۰ درصد قرار داده شد. هشت رقم مورد استفاده شامل ارقام بومی شاه میوه، درگزی، قوسی و چینی حصار بودند. همچنین ارقام خارجی مورد استفاده شامل ارقام اسپادونا، دوکومیس، دوشس و کوشیا بودند. در ادامه جدایه باکتری عامل آتشک (بیماری‌زاترین جدایه) روی محیط NA کشت داده شد و سپس باکتری از سطح محیط به درون بافر سترون ۰/۰۵ مولار Na/KPi حاوی ۰/۰۳ درصد توین ۲۰ (pH=۷) انتقال داده شد و غلظت 10^8 واحد تشکیل دهنده کلنی بر میلی‌لیتر باکتری تهیه گردید (Fischer et al., 2012). به منظور تلقیح شکوفه پنج میکرولیتر از مخلوط آماده شده روی نوش‌جای^۱ توزیع گردید. آب و بافر به عنوان شاهد منفی استفاده شدند. در ادامه شکوفه‌ها در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۸۰ درصد به مدت هفت روز انکوبه گردیدند. به منظور حفظ رطوبت و جلوگیری از آلودگی قارچی ظروف حاوی تیمارهای شکوفه، هر ۲۴ ساعت از اسپری آب مقطر سترون (در شرایط هود میکروبی) حاوی

جدول ۲- درجه بندی شدت علائم در شکوفه‌های ارقام مختلف گلابی تحت تیمار با جدایه *Erwinia amylovora*Table 2. Grading of symptom severity in blooms of different pear cultivars treated with *Erwinia amylovora* isolate

| No. | Degree | Intensity of symptoms in bloom |
|-----|--------------|--|
| 1 | No symptoms | The flower has petals without changing shape and color |
| 2 | Weak | Browning is part of the hypanthium and some of the petals fall off |
| 3 | Moderate | The browning of all the hypanthium and the fall of all the petals |
| 4 | Intense | Change the color of the whole flower, change the color of the flags and receptacles along with deformed the shape of the whole bloom |
| 5 | High intense | Blackening of the flower, progression of symptoms to the peduncle, deformation of the whole bloom and its drying |

جدول ۳- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Erwinia amylovora* مورد بررسیTable 3. Phenotypic characteristics of *Erwinia amylovora* strains tested

| No. | Test | Positive strains (%) |
|-----|--|----------------------|
| 1 | Gram negative | 100 |
| 2 | Fluorescent pigment on KB | 0 |
| 3 | Production of white colonies in YDC medium | 100 |
| 4 | Greenish metallic sheen on EMB | 100 |
| 5 | Oxidase | 0 |
| 6 | Catalase | 100 |
| 7 | HR on tobacco | 100 |
| 8 | Oxidative | 100 |
| 9 | Fermentative | 100 |
| 10 | Levan formation | 100 |
| 11 | Nitrate reduction | 0 |
| 12 | Potato soft rot | 0 |
| 13 | Growth at 39 °C | 0 |

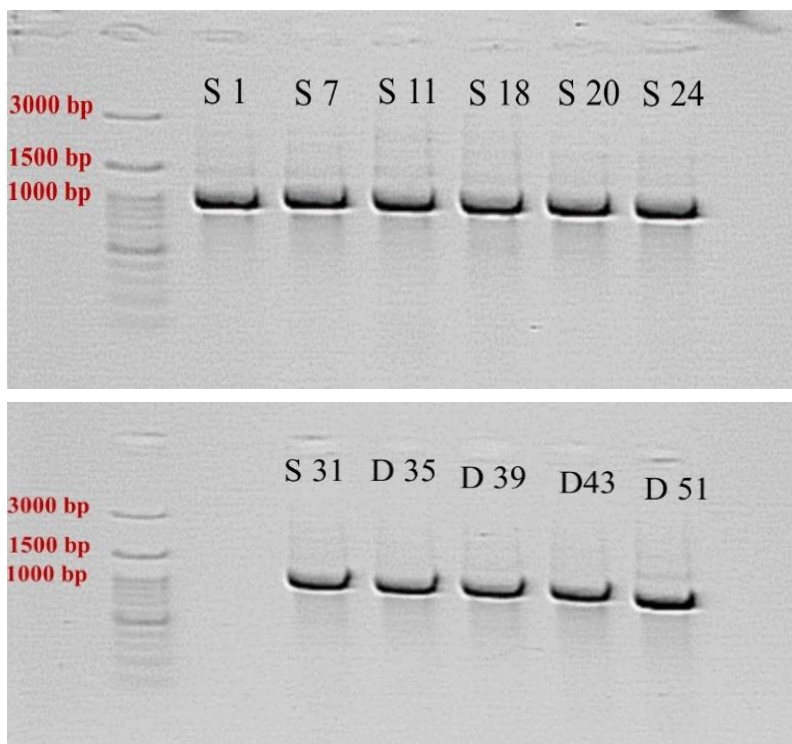
شناسایی مولکولی جدایه‌ها

تعداد ۵۲ جدایه که بر اساس مجموعه ویژگی‌های افتراقی به عنوان باکتری *E. amylovora* شناسایی شده بودند در آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای A و B پلاسمید pEA29 قطعه مورد انتظار (حدود ۱۰۰۰ جفت باز) را تکثیر نمودند (شکل ۱). نتایج توالی‌یابی در مورد بیماری‌زاترین جدایه مورد آزمایش و انجام فرآیند BLASTN در پایگاه داده NCBI^۱ تأیید نمود که جدایه مورد بررسی دارای تشابه بیش از ۹۹ درصدی با گونه‌های باکتری *E. amylovora* بود.

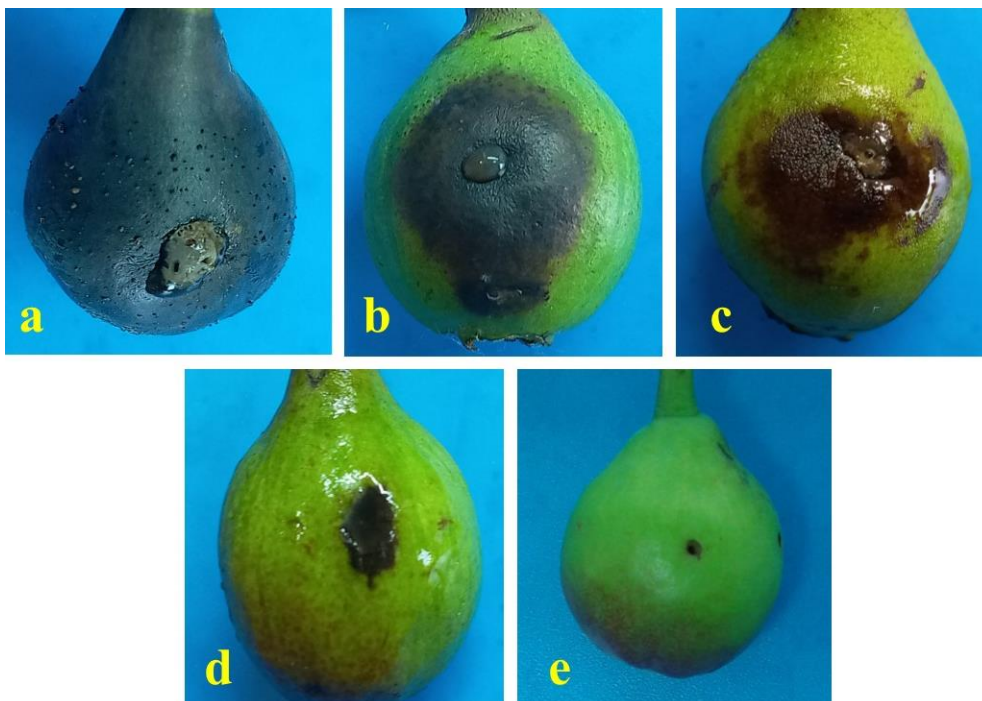
آزمون بیماری‌زایی

آزمون اثبات بیماری‌زایی نشان داد که علائم نکروز و لهیدگی پس از گذشت حدود چهار روز روی

میوه‌های گلابی نارس رقم اسپادونا ظاهر گردید. جدایه (D 43) بدست آمده از درخت به (*Cydonia oblonga*) منطقه دیباج به دلیل ایجاد شدیدترین علائم شامل نکروز، سیاه شدگی بافت، خروج اوز^۲ و لهیدگی پیرامون قسمت تزریق شده به عنوان بیماری‌زاترین جدایه انتخاب گردید (تیپ A). سایر جدایه‌ها نسبت به جدایه D 43، مقادیر کمتری از علائم بیماری را نشان دادند. هفت جدایه دیگر به ترتیب شدت بیماری‌زایی شامل جدایه‌های D 39 و D 40 (از میزبان به) بودند. سایر جدایه‌ها علائم متوسط تا ضعیف را نشان دادند (شکل ۲). تعداد ۱۳ جدایه دارای شدت بیماری‌زایی متوسط روی میوه نارس



شکل ۱- تشکیل باند حدود ۱۰۰۰ جفت بازی برای تعدادی از جدایه‌های منتخب، L: لدر ۱۰۰ تا ۳۰۰۰ جفت بازی
 Figure 1. The molecular weight of bands was about 1000 bp in some selected isolates, L: Ladder 100 to 3000 bp



شکل ۲- مقایسه شدت بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف: جدایه با قدرت بیماری‌زایی بسیار شدید (a)، جدایه با قدرت بیماری‌زایی شدید (b)، جدایه با قدرت بیماری‌زایی متوسط (c)، جدایه با علائم ضعیف (d)، جدایه بدون علائم مشخص (e)
 Figure 2. Separation of isolates based on pathogenicity: Isolate with very severe virulence (a), Isolate with severe virulence (b), Isolate with moderate virulence (c), Isolate with low virulence (d), Isolate without distinct symptoms (e)

جدایه‌ها برخوردار بودند. سایر جدایه‌های مورد بررسی مقدار کمتری تولید آمیلووران داشتند و با اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد در گروه‌های جداگانه‌ای قرار گرفتند (جدول ۵). همچنین کمترین میزان آمیلووران تولیدی با میانگین چگالی نوری ۰/۱۸۷ مربوط به جدایه S 19 بود.

تولید سیدروفور

اندازه هاله نارنجی رنگ تشکیل شده در سطح محیط کشت CAS-agar نشان دهنده میزان توانایی هر یک از جدایه‌ها در تولید سیدروفور بود. نتایج این آزمون بیانگر این نکته بود که جدایه‌ها از لحاظ میزان تولید سیدروفور با یکدیگر دارای اختلاف معنی‌دار بودند، اما این تفاوت در مقایسه با آمیلووران از پراکندگی کمتری برخوردار بود. نتایج نشان داد بیشترین تولید سیدروفور مربوط به جدایه D 38 با میانگین قطر هاله ۲۳ میلی‌متر بود و جدایه‌های D 39 و D 40 به ترتیب با میانگین قطر هاله ۲۲ و ۲۲/۱۷ در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند. سه جدایه S 7، S 36 و S 31 به ترتیب با قطر هاله ۱۱، ۱۱ و ۱۱/۶۷ میلی‌متر کمترین میزان تولید سیدروفور را از خود نشان دادند. نتایج آزمون تولید سیدروفور در سطح خطای پنج درصد در جدول شماره شش نشان داده شده است.

گلایی رقم اسپادونا بودند (تیپ C). بیشترین تعداد جدایه مربوط به تیپ بیماری‌زایی ضعیف (D) بود که شامل ۲۳ جدایه بود. همچنین هشت جدایه فاقد علائم بیماری‌زایی در میوه نارس تشخیص داده شدند (شکل ۲). از جدایه‌ای D 43 که شدیدترین علائم را بروز داد، برای ادامه آزمایش‌ها استفاده شد. سایر اطلاعات و نتایج در جدول شماره چهار نشان داده شده است. البته برخی ارقام دیگر هم برای تعیین بیماری‌زاترین جدایه استفاده گردید و جدایه D 43 در آنها هم بیماری‌زاترین بود (نتایج نشان داده نشده است).

نتایج میزان تولید آمیلووران

با توجه به این که میزان چگالی نوری (OD) بیشتر در اثر واکنش با ترکیب CPC به عنوان تولید بیشتر آمیلووران در نظر گرفته می‌شود، از این رو می‌توان با مقایسه جدایه‌ها از میزان این پلی‌ساکارید مهم جدایه‌های *E. amylovora* مطلع شد. نتایج این آزمون نشان داد که جدایه‌های مورد آزمایش از لحاظ تولید آمیلووران با یکدیگر متفاوت بودند. بیشترین مقدار جذب در طول موج ۶۰۰ نانومتر برای جدایه D 40 با میانگین چگالی نوری ۰/۳۲۵ بدست آمد. همچنین آنالیز آماری نشان داد جدایه‌های D 43، S 20 و S 21 از توانایی تولید آمیلووران بیشتری در مقایسه با سایر

جدول ۴- آزمون بیماری‌زایی در جدایه‌های *Erwinia amylovora* مورد استفاده در این پژوهش

Table 4. Pathogenicity test for isolates of *E. amylovora* used in this research

| Types of virulence | No. of isolate | Isolate |
|--------------------|----------------|--|
| A | 1 | D 43 |
| B | 7 | S 13, S 15, S 20, S30, D 38, D 39, D 40 |
| C | 13 | S 11, S12, S 14, S16, S21, S 22, S 23, S 24, D 41, D 42, D 45, D48, D51 |
| D | 23 | S 2, S 4, S 5, S 6, S 8, S 9, S 10, S 18, S 19, S 25, S 26, S 27, S 28, S 29, S 31, D 32, D 33, D 34, D 35, D 36, D37, D 44, D 46, |
| E | 8 | S 1, S3, S7, S17, D 47, D 49, D 50, D 52 |

جدول ۵- مقایسه میانگین توانایی جدایه‌های مورد بررسی در تولید آمیلووران بر حسب چگالی نوری (O.D.)

Table 5. Compare Means of the ability of the isolates studied in amylovoran production

| Isolate | O.D. | Group | Isolate | O.D. | Group | Isolate | O.D. | Group | Isolate | O.D. | Group |
|---------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
| S 1 | 0.214 | j-n | S 14 | 0.285 | c-e | S 27 | 0.213 | j-n | D 40 | 0.325 | a |
| S 2 | 0.191 | n | S 15 | 0.295 | b-e | S 28 | 0.208 | k-n | D 41 | 0.216 | i-n |
| S 3 | 0.207 | k-n | S 16 | 0.266 | e-g | S 29 | 0.203 | k-n | D 42 | 0.231 | h-l |
| S 4 | 0.212 | j-n | S 17 | 0.201 | l-n | S 30 | 0.321 | f-h | D 43 | 0.316 | ab |
| S 5 | 0.202 | l-n | S 18 | 0.213 | j-n | S 31 | 0.214 | j-n | D 44 | 0.201 | h-l |
| S 6 | 0.218 | i-n | S 19 | 0.187 | n | D 32 | 0.255 | f-h | D 45 | 0.245 | f-i |
| S 7 | 0.211 | j-n | S 20 | 0.311 | a-c | D 33 | 0.202 | l-n | D 46 | 0.213 | j-n |
| S 8 | 0.204 | k-n | S 21 | 0.305 | a-c | D 34 | 0.211 | j-n | D 47 | 0.217 | i-n |
| S 9 | 0.197 | mn | S 22 | 0.245 | f-i | D 35 | 0.217 | i-n | D 48 | 0.266 | e-g |
| S 10 | 0.208 | k-n | S 23 | 0.239 | g-j | D 36 | 0.214 | j-n | D 49 | 0.207 | k-n |
| S 11 | 0.291 | b-e | S 24 | 0.271 | e-g | D 37 | 0.195 | mn | D 50 | 0.193 | i-m |
| S 12 | 0.274 | d-f | S 25 | 0.209 | j-n | D 38 | 0.203 | k-n | D 51 | 0.225 | e-g |
| S 13 | 0.302 | a-d | S 26 | 0.224 | i-m | D 39 | 0.311 | a-c | D 52 | 0.211 | i-m |

اعداد با حروف مشابه در جدول با یکدیگر اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

The numbers with the same letters in table are not significantly difference ($P > 0.05$).

جدول ۶- نتایج آزمون تولید سیدروفور برای جدایه‌های *Erwinia amylovora* مورد بررسی بر حسب میلی‌متر

Table 6. Results of the siderophore production test for the isolates examined (mm)

| Isolate | Halo zone | Group | Isolate | Halo zone | Group | Isolate | Halo zone | Group | Isolate | Halo zone | Group |
|---------|-----------|-------|---------|-----------|-------|---------|-----------|-------|---------|-----------|-------|
| S 1 | 12 | de | S 14 | 17 | a-e | S 27 | 15 | a-e | D 40 | 22 | ab |
| S 2 | 12 | c-e | S 15 | 21 | a-c | S 28 | 13 | c-e | D 41 | 16 | a-e |
| S 3 | 14 | b-e | S 16 | 14 | b-e | S 29 | 12 | de | D 42 | 19.5 | a-e |
| S 4 | 17 | a-e | S 17 | 16 | a-e | S 30 | 20 | a-e | D 43 | 21 | a-d |
| S 5 | 18 | a-e | S 18 | 12 | de | S 31 | 12 | e | D 44 | 14 | b-e |
| S 6 | 13 | c-e | S 19 | 14 | b-e | D 32 | 15.5 | a-e | D 45 | 12 | de |
| S 7 | 11 | e | S 20 | 15 | a-e | D 33 | 14 | b-e | D 46 | 15 | a-e |
| S 8 | 13 | c-e | S 21 | 17.5 | a-e | D 34 | 14 | b-e | D 47 | 13 | c-e |
| S 9 | 14 | b-e | S 22 | 19 | a-e | D 35 | 13 | c-e | D 48 | 14 | b-e |
| S 10 | 16 | a-e | S 23 | 15 | a-e | D 36 | 11 | e | D 49 | 13 | c-e |
| S 11 | 16 | a-e | S 24 | 15 | a-e | D 37 | 13 | c-e | D 50 | 12 | de |
| S 12 | 16 | a-e | S 25 | 17 | a-e | D 38 | 23 | a | D 51 | 12 | b-e |
| S 13 | 19 | a-e | S 26 | 13 | b-e | D 39 | 22 | ab | D 52 | 13 | de |

اعداد با حروف مشابه در جدول با یکدیگر اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

The numbers with the same letters in table are not significantly difference ($P > 0.05$).

گرفته شد. بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم معادل چگالی نوری ۰/۲۸۷ و ۰/۲۸۹ به ترتیب برای جدایه‌های S 18 و S 31 بدست آمد. دو جدایه S 1 و S 35 نیز توانایی بالایی در تشکیل بیوفیلم از خود نشان دادند. کمترین میزان تشکیل بیوفیلم با چگالی نوری ۰/۱۸۳ مربوط به جدایه S 14 بود. سایر نتایج در جدول شماره هفت نشان داده شده است.

تولید بیوفیلم

توانایی تشکیل بیوفیلم یکی از ویژگی‌های شناخته شده در کمک به بیماری‌زایی موثر جدایه‌های باکتریایی *E. amylovora* می‌باشد. میزان جذب رنگ کریستال ویوله به عنوان شاخص تشکیل بیوفیلم محسوب می‌گردد، از این رو جذب بیشتر در طول موج ۵۹۰ نانومتر به عنوان تشکیل بیوفیلم بیشتر و بالعکس در نظر

جدول ۷- نتایج آزمون بیوفیلم برای جدایه‌های *Erwinia amylovora* مورد بررسی بر اساس جذب در طول موج ۵۹۰ نانومتر

Table 7. Results of the Biofilm assay for the *Erwinia amylovora* isolates examined in 590 nm

| Isolate | O.D. | Group | Isolate | O.D. | Group | Isolate | O.D. | Group | Isolate | O.D. | Group |
|---------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|---------|-------|-------|
| S 1 | 0.283 | ab | S 14 | 0.183 | z | S 27 | 0.204 | vw | D 40 | 0.192 | x-z |
| S 2 | 0.269 | c-e | S 15 | 0.237 | l-o | S 28 | 0.226 | p-r | D 41 | 0.221 | p-r |
| S 3 | 0.254 | f-i | S 16 | 0.186 | x-z | S 29 | 0.196 | wx | D 42 | 0.254 | g-j |
| S 4 | 0.261 | ef | S 17 | 0.263 | d-f | S 30 | 0.209 | uv | D 43 | 0.253 | g-i |
| S 5 | 0.239 | k-n | S 18 | 0.288 | a | S 31 | 0.288 | a | D 44 | 0.262 | ef |
| S 6 | 0.192 | x-z | S 19 | 0.248 | h-k | D 32 | 0.211 | t-v | D 45 | 0.216 | s-u |
| S 7 | 0.275 | bc | S 20 | 0.205 | vw | D 33 | 0.208 | Uv | D 46 | 0.228 | o-q |
| S 8 | 0.233 | m-q | S 21 | 0.212 | t-v | D 34 | 0.257 | f-h | D 47 | 0.241 | j-m |
| S 9 | 0.225 | q-s | S 22 | 0.186 | yz | D 35 | 0.276 | Bc | D 48 | 0.202 | vw |
| S 10 | 0.259 | e-g | S 23 | 0.189 | x-z | D 36 | 0.235 | l-p | D 49 | 0.189 | x-z |
| S 11 | 0.215 | tu | S 24 | 0.268 | c-e | D 37 | 0.239 | k-n | D 50 | 0.217 | s-u |
| S 12 | 0.244 | i-l | S 25 | 0.232 | n-q | D 38 | 0.241 | k-n | D 51 | 0.248 | h-k |
| S 13 | 0.218 | r-t | S 26 | 0.195 | w-y | D 39 | 0.268 | Cd | D 52 | 0.259 | f-h |

اعداد با حروف مشابه در جدول با یکدیگر اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

The numbers with the same letters in table are not significantly difference ($P > 0.05$).

گردید. به ترتیب ارقام گلابی دو کومیس، چینی حصار و درگزی بیشترین مقاومت را به بیماری آتشک داشتند و اختلاف معنی دار بین این سه رقم و سایر ارقام در جدول شماره ۹ نشان داده شده است. رقم دو کومیس در مدت هشت روز با قطر نکروز و تغییر رنگ بافت ۱۳ میلی متری مقاوم‌ترین رقم برآورد شد. رقم چینی حصار با قطر ۱۶/۲ میلی متری علائم سیاه شدگی و بافت مُردگی در جایگاه دوم قرار گرفت. رقم درگزی نیز با میزان علائم ۲۱ میلی متر در جایگاه‌های بعدی قرار گرفت و از لحاظ مقاومت به بیماری آتشک نیمه مقاوم ارزیابی شد. در مورد رقم دوشس گسترش علائم در پنج روز اول کم و در حدود ۹/۵ میلی متر بود اما پس از هشت روز، سطح کل میوه دچار سیاه شدگی و تغییر بافت شد (جدول ۹). در مورد ارقام شاه‌میوه، کوشیا، اسپادونا و قوسی پیشرفت بیماری (در مدت زمان هشت روز) که با علائم نکروز و لهیدگی بافت همراه بود، کل میوه را فرا گرفت و ارقام نامبرده شده از لحاظ بیماری‌زایی در میوه نارس حساس تشخیص داده شدند. البته در مورد رقم شاه‌میوه ظهور و گسترش این علائم زودتر و بیشتر از سایر ارقام مشاهده شد.

نتایج آزمون بیماری‌زایی در شکوفه هشت رقم گلابی

آزمون بیماری‌زایی روی شکوفه هشت رقم گلابی در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که درجات مختلفی از علائم پیشرفت بیماری شامل نکروز در قسمت نوش‌جای، لهیدگی دُمگل و سیاه شدن گلبرگ‌ها یک هفته پس از تلقیح روی شکوفه ارقام مختلف ظاهر گردید. رقم درگزی دارای بیشترین میزان مقاومت به بیماری آتشک بود، بطوری که حداقل علائم بیماری در مدت زمان آزمایش مشاهده گردید. در مورد رقم اسپادونا نیز ظهور کلی علائم بر روی شکوفه ضعیف بود. بیشترین میزان تغییر شکل و رنگ بافت در مورد رقم شاه‌میوه وجود داشت و از این نظر بافت شکوفه بسیار حساس تشخیص داده شد (شکل ۳). سایر نتایج در جدول شماره هشت نشان داده شده است.

نتایج آزمون بیماری‌زایی در میوه نارس ارقام گلابی برای بیماریزاترین جدایه

آزمون بیماری‌زایی روی میوه‌های نارس هشت رقم گلابی نشان داد که بعد از گذشت پنج روز، علائم نکروز و لهیدگی روی تمام ارقام مورد بررسی مشاهده



شکل ۳- آزمون بیماری زایی در بافت شکوفه بر روی هشت رقم مختلف گلایی

Figure 3. Pathogenicity assay in blossom tissue on eight pear cultivars

جدول ۸- نتایج درجه بندی شدت علائم در شکوفه های ارقام مختلف گلایی تحت تیمار با جدایه D

Erwinia amylovora 43

Table 8. Results grading of symptom severity in blooms of different pear cultivars treated with *Erwinia amylovora* D 43 isolate

| No. | Degree | Pear cultivars tested |
|-----|---------------------|------------------------------|
| 1 | Minimum of symptoms | Dargazi |
| 2 | Weak | Spadona |
| 3 | Moderate | Gossi, do Comis |
| 4 | Intense | Koshia, Duchess, Chini Hesar |
| 5 | High intense | Shah miveh |

جدول ۹- میزان حساسیت و مقاومت هشت رقم میوه نارس گلابی به بیماری آتشک (بر حسب میلی‌متر) در مدت زمان هشت روز

Table 9. Susceptibility and resistance of eight unripe pear cultivars to fire blight (in millimeters) for eight days

| No. | Cultivar | Susceptibility and resistant of the cultivar | Diameter of disease spread area (5 day) | Diameter of disease spread area (8 day) |
|-----|-------------|--|---|---|
| 1 | Do Comis | Resistant | 4/5 ^g | 13 ^d |
| 2 | Chini Hesar | Resistant | 8/5 ^f | 16/2 ^c |
| 3 | Dargazi | Semi-resistant | 11 ^e | 21 ^b |
| 4 | Duchesse | Semi-Susceptible | 9/5 ^e | The whole surface of the fruit ^a |
| 5 | Koshia | Susceptible | 14 ^c | The whole surface of the fruit ^a |
| 6 | Spadona | Susceptible | 21 ^b | The whole surface of the fruit ^a |
| 7 | Gossi | Susceptible | 22 ^b | The whole surface of the fruit ^a |
| 8 | Shah miveh | Susceptible | 25 ^a | The whole surface of the fruit ^a |

اعداد با حروف متفاوت، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد را نشان می‌دهند.

The numbers with the different letters are significantly difference ($P < 0.05$).

باکتری *E. amylovora* شناسایی شده که پلاسمید منحصر به فرد pEA29 در اکثر جدایه‌های باکتری عامل آتشک وجود دارد (Gross et al. 2015). پلاسمید pEA29 نقش مهمی در بیماری‌زایی و گسترش علائم نکروز در گیاهان میزبان دارد به طوری که با حذف پلاسمید فوق، بیماری‌زایی (تولید آوز) و گسترش سریع علائم در میزبان با کُنندی مواجه شد (Geier and Geider, 1993). بررسی شدت بیماری‌زایی در میوه نارس گلابی نشان داد با استفاده از این آزمون می‌توان به خوبی بیماری‌زاترین جدایه‌ها را تشخیص داد. این روش نسبت به آزمون بیماری‌زایی در سرشاخه (نهال یکساله درختان میوه دانه‌دار)، نیاز به تجهیزات گلخانه‌ای نداشته و برخلاف آزمون بیماری‌زایی روی شکوفه در مدت زمان بیشتری از فصل قابلیت انجام داشت. برخلاف ویژگی‌های فنوتیپی در بین جدایه‌ها تفاوت آشکاری پیرامون بیماری‌زایی مشاهده شد که در مطالعات سایر محققین در این زمینه به آن اشاره شده است (Lee et al., 2010). بجز تعداد محدودی جدایه، بیشتر جدایه‌های مورد بررسی صرف نظر از اینکه از چه میزبانی جدا شده بودند، روی میوه نارس گلابی رقم اسپادونا بیماری‌زایی داشتند. با توجه به این که تنوع در شدت بیماری‌زایی در جدایه‌ها

بحث

در مناطق نمونه برداری علائم بیماری با درجات مختلف مشاهده شد و این علائم بیشتر شامل سرخشکیدگی شاخه، سرعصایی شدن، سیاه شدن بافت دمیرگ و رگبرگ‌ها و وجود میوه کوچک و خشک شده (سیاه رنگ) در شاخه‌ها بود. شدیدترین علائم بیماری آتشک در درختان به منطقه دیباج واقع در شمال شهرستان دامغان مشاهده شد که درختان به بصورت کشت مخلوط با سایر درختان کشت شده بودند. در تمامی آزمون‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای صورت گرفته، هیچ گونه تنوعی در میان جدایه‌ها مشاهده نگردید و نتایج این امر حاکی از یکسان بودن خصوصیات جدایه‌های مورد بررسی بود که با نتایج بدست آمده در پژوهش‌های گذشته مطابقت داشت (Tavakolbakhoda and Taghavi, 2010). یکی از سریع‌ترین روش‌ها برای شناسایی جدایه‌های *E. amylovora* استفاده از آغازگرهای اختصاصی پلاسمید pEA29 است که در تحقیقات دیگر (Falkenstein et al., 1988) نیز به آن اشاره شده است و در این پژوهش نیز جهت شناسایی جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفت. در مجموع تاکنون تعداد ۱۱ پلاسمید در جدایه‌های مختلف

بیماری‌زایی باکتری موثر خواهد بود که با مشاهدات تحقیق اخیر نیز همخوانی داشت. در این پژوهش تقریباً در یک رابطه مستقیم جدایه‌هایی که از لحاظ بیماری‌زایی بیشترین علائم را نشان می‌دادند (جدایه‌های بیماری‌زای گروه A و B)، سیدروفور و آمیلووران زیادی نیز تولید می‌کردند (موارد استثناء محدود یا اختلاف ناچیز بود). همچنین برخی پژوهشگران در شرایط آزمایشگاهی با بررسی جهش یافته‌هایی از باکتری، که فاقد ژن اختصاصی تولید سیدروفور بودند و نشانه‌های بیماری را بروز نمی‌دادند، این قضیه را اثبات نمودند (Expert et al., 2000; Vanneste and Expert, 1990). از این رو با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان به طور کلی بر ارتباط مستقیم بین آمیلووران، سیدروفور و شدت علائم بیماری در بافت‌های میزبان تایید بیشتری نمود. بیوفیلم در باکتری *E. amylovora* برای بیماری‌زایی و حرکت سیستمیک درون گیاه لازم است ولی در مقابل برای زنده ماندن و رشد باکتری ضروری نمی‌باشد (Vrancken et al., 2013). در این پژوهش نتایج تولید بیوفیلم از روند ثابتی برخوردار نبود به طوری که بیشترین میزان تولید بیوفیلم در جدایه‌ای با قدرت بیماری‌زایی ضعیف (تیپ D) مشاهده شد و سایر جدایه‌ها مقادیر کمتری از تولید بیوفیلم را نشان دادند. به نظر می‌رسد تولید بیوفیلم در شرایط میزبان در ارتباط با دیگر فاکتورهای بیماری‌زایی رخ می‌دهد و به فرآیند کلونیزه کردن کمک می‌کند. در مورد *E. amylovora* می‌توان نتیجه گرفت حداقل در شرایط آزمایشگاهی بیوفیلم از نقش کمتری نسبت به سایر فاکتورهای بیماری‌زایی (در رابطه مستقیم با شدت علائم بیماری) برخوردار است. جدایه‌های *E. amylovora* جداسازی شده از مناطق مختلف به طور قابل ملاحظه‌ای هموژن بودند و نسبت به دیگر عوامل بیمارگر باکتریایی، دچار تغییرات تکاملی کمتری شده‌اند، از این رو با توجه به یکنواختی خصوصیات عمده جدایه‌های عامل آتشک در بحث مدیریت و کنترل بیماری می‌توان از یک روش یکسان (ارقام مقاوم، متحمل و پیش آگاهی) در کنترل

مشاهده شد لذا فاکتورهای مختلفی که معمولاً در بیماری‌زایی باکتری *E. amylovora* از اهمیت بالایی برخوردار بودند مورد بررسی قرار گرفتند. میزان تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی مهم‌ترین فاکتور بیماری‌زایی باکتری عامل آتشک می‌باشد. در صورت در دسترس بودن قندهایی مانند ساکاروز، باکتری‌های *E. amylovora* لوان، گلوکان و آمیلووران (یک موکوپلی ساکارید غنی از گالاکتوز) تولید می‌کنند. آمیلووران اصلی‌ترین هتروپلی‌ساکارید ترشحات گیاه آلوده (اُوز) است که هنگام رشد باکتری در میزبان تولید می‌گردد و نشان می‌دهد تولید آن به واسطه تعامل متقابل با میزبان تنظیم می‌گردد (Maes et al., 2001). در پژوهشی ایجاد جهش در ژن‌های *rCSB* و *rCSD* در تولید آمیلووران نقصان ایجاد شد و باکتری نتوانست در میزبان بیماری‌زایی کند (Khan et al., 2012). تحقیقات سایر محققین نشان داده بود که به دلیل هم بستگی مستقیم مشاهده شده بین تولید آمیلووران و پُرآزاری، آمیلووران برای پُرآزاری *E. amylovora* ضروری می‌باشد ولی پلی‌ساکاریدهای دیگری مانند لوان به تشدید علائم کمک می‌کنند (Geier and Geider, 1993) که با نتایج بدست آمده مطابقت داشت. آهن به عنوان یک فاکتور اصلی تغذیه‌ای برای میکروارگانیسم‌ها و به عنوان یک کوفاکتور برای بسیاری از پروتئین‌ها نقش بازی می‌کند. به دلیل کمبود آهن قابل جذب (محلول) میکروارگانیسم‌هایی که در محیط طبیعی زندگی می‌کنند، کارایی بالایی در سیستم‌های جذب کننده آهن خود پدید آورده‌اند. باکتری عامل آتشک هم از این قاعده مستثنی نیست، آنها با تولید سیدوفور (موکول‌هایی با وزن کمتر ۱۰۰۰ کیلو دالتون) آهن محلول در محیط را جذب می‌نمایند و از این طریق در مراحل اولیه بیماری‌زایی یعنی رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها و همچنین به عنوان یک مکانیزم دفاعی برای محافظت در برابر واکنش‌های آکسیداتیو میزبان، نقش خود را ایفا می‌کنند (Smits and Duffy, 2011)، در نتیجه تولید بیشتر سیدروفور در

که مقاومت ارقام در زمان‌های مختلف رشدی دچار تغییراتی می‌شود و بحث مقاومت و حساسیت به بیماری آتشک را نمی‌توان محدود به نهال‌های دوساله دانست. احتمالاً اختلاف آشکاری که بین ارقام از لحاظ گسترش بیماری آتشک مشهود بود، نشان از تنوع مقاومت بافت و متابولیت‌های مرتبط با شکوفه دارد که در پژوهش‌های گذشته در مورد نهال و تلقیح سرشاخه درختان میوه دانه‌دار اثبات شده است (Ebadi et al., 2014). در مجموع از مقایسه این پژوهش که روی بافت‌های زایشی انجام گردید با سایر تحقیقات صورت گرفته روی بافت‌های رویشی، تفاوت چشمگیری مشاهده گردید که تاکنون در پژوهش‌های مرتبط با بیماری آتشک به آن پرداخته نشده بود. نتایج این پژوهش به وضوح ثابت نمود در مورد بافت‌هایی مانند میوه نارس و شکوفه حساسیت بافت در مقایسه با حساسیت کل گیاه نسبت به بیماری آتشک متفاوت است و در ارقام متحمل و نیمه مقاوم در برخی موارد حساسیت میوه نارس به بیماری آتشک بیشتر است که این موضوع در بحث مبارزه شیمیایی در زمان تشکیل گل و میوه و همچنین برنامه‌های اصلاح ارقام گلایی در آینده بسیار راه‌گشا خواهند بود. در واقع در طول رشد شکوفه و میوه این بافت‌ها دچار تغییرات آنزیمی شده که این حالت احتمالاً روی میزان حساسیت به بیماری موثر است. اما برای مشخص نمودن زوایای بیشتر موارد توضیح داده شده نیاز به آزمایش‌های بیشتر خصوصاً مطالعات فیزیولوژیکی در زمان تشکیل و رشد دو بافت شکوفه و میوه نارس آلوده به آتشک در ارقام مورد مطالعه می‌باشد.

سپاس‌گزاری

از کلیه کارکنان مرکز تحقیقات کشاورزی استان سمنان (شاهرود) که امکانات مالی و اجرایی این پژوهش را فراهم ساختند، قدردانی می‌نمایم.

بیماری استفاده کرد. فاکتورهای اصلی بیماری‌زایی باکتری در شرایط آزمایشگاه از یک ارتباط مستقیم بهره می‌برند و به صورت یک مجموعه در فرآیند بیماری‌زایی باکتری در شرایط محیطی عمل می‌کنند اما در مورد تولید بیوفیلم نیاز به تحقیقات گسترده‌تر است. نتیجه‌ای که از این پژوهش بدست می‌آید این نکته را آشکار می‌کند که بیماری‌زاترین جدایه‌ها از منطقه‌ای بدست آمدند که باغات به و گلایی آلوده به دلیل عدم مبارزه موثر و وجود میزبان‌های مختلف دانه‌دار، فرصت به وجود آمدن جدایه‌های بسیار خطرناک از لحاظ بیماری‌زایی را فراهم کرده بودند، که در بحث کنترل و ریشه‌کن کردن باکتری *E. amylovora* باید به آن توجه نمود. در این پژوهش در دو آزمایش جداگانه بر روی شکوفه و میوه نارس، حساسیت ارقام مختلف به این بیماری سنجیده شد که با نتایج بدست آمده در مورد نهال متفاوت بود. این موضوع نشان می‌دهد که بافت‌های گوناگون ارقام مختلف گلایی در مقایسه با تنه و شاخه درخت از خود مقاومت و حساسیت متفاوتی را بروز می‌دهند. به عنوان مثال میزان مقاومت موجود در میوه نارس گلایی رقم دو کومیس از رقم درگزی بیشتر برآورد شد در حالی که در پژوهش‌های گذشته رقم درگزی به عنوان یک رقم مقاوم (متحمل) و رقم دو کومیس به عنوان یک رقم نیمه حساس معرفی شده بود (Ebadi et al., 2014). مورد دیگر میوه نارس رقم اسپادونا بود که در مقایسه با رقم کوشیا حساس‌تر برآورد شد در حالی که در پژوهش‌های گذشته در شاخه‌های نهال دوساله، کوشیا حساس‌تر از اسپادونا بود (Ebadi et al., 2014). در مورد بافت شکوفه نیز تفاوت‌هایی در مقایسه با کل گیاه (گیاه دو ساله) مشاهده شد اما نسبت به میوه نارس در مقایسه با شاخص حساسیت کل گیاه، این تفاوت کمتر بود به عنوان مثال در رقم درگزی (در نهال دو ساله متحمل تعیین شده) شکوفه نسبت به سایر ارقام، موارد کمتری از تغییر رنگ و بافت را نشان داد و مقاوم‌ترین تشخیص داده شد. به نظر می‌رسد

REFERENCES

- Afunian, M.R., Mohammadi, M., and Rahimian, H. 2000. Phenotypic characterization of Iranian strain of *Erwinia amylovora* the causal agent of fire blight disease pome tree. Iranian Journal Agricultural Sciences, 31(3): 463-476 (In Farsi with English summary).
- Akhlaghi, M., Tarighi, S., and Taheri, P. 2018. Evaluating antibacterial effect of plant extracts against *Erwinia amylovora* and their role in resistance induction in pear. Biological control of pests and plant diseases, 7(2): 31-47 (In Farsi with English summary).
- Bereswill, S., Pahl, A., Bellemann, P., Zeller, W., and Geider, K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by PCR-analysis. Applied and Environmental Microbiology, 58: 3522-6.
- Dye, D.W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*, The amylovora group. Journal of Agricultural Science, 11: 590-607.
- Ebadi, A., Erfani, J., Abdollahi, H., and Fattahi Moghaddam, J. 2014. Investigation of changes in antioxidant enzyme and total phenol level in some pear cultivars inoculated with fire blight disease. Iranian Journal of Horticultural Science, 45(2): 127-136 (In Farsi with English summary).
- Expert, D., Dellagi, A., and Kachadourian, R. 2000. Iron and fire blight: role in pathogenicity of desferrioxamine E, the main siderophore of *Erwinia amylovora*. In Vanneste, J., (Eds.), Fire blight: the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, New York, N.Y. pp. 179-195.
- Fischer, T.C., Gosch, C., Mirbeth, B., Gselmann, M., Thallmair, V., and Stich, K. 2012. Potent and specific bactericidal effect of juglone (5-hydroxy-1, 4-naphthoquinone) on the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. Journal of agricultural and food chemistry, 60(49): 12074-12081.
- Falkenstein, H., Bellemann, P., Walter, S., Zeller, W., and Geider, K. 1988. Identification of *Erwinia amylovora*, the fire blight pathogen, by colony hybridization with DNA from plasmid pEA29. Applied and Environmental Microbiology, 54: 2798-2802.
- Geier, G., and Geider, K. 1993. Characterization and influence on virulence of the levansucrase gene from the fire blight pathogen. Physiological and Molecular Plant Pathology, 42(6): 387-404.
- Gross D.C., Lichens-Park, A., and Kole, C. 2015. Genomics of plant-associated bacteria. Springer press. 238 pp.
- Gusberti, M., Klemm, U., Meier, M.S., Maurhofer, M., and Hunger-Glaser, I. 2015. Fire Blight Control: The Struggle Goes On. A Comparison of Different Fire Blight Control Methods in Switzerland with Respect to Biosafety, Efficacy and Durability. International Journal of Environmental Research and Public Health, 12: 11422-11447.

Hugh, R., and Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 66: 24-26.

Iakimova, E.T., Sobiczewski, P., Michalczuk, L., Wegrzynowicz-Lesiak, E., Mikici-nski, A., and Woltering, E.J. 2013. Morphological and biochemical characterization of *Erwinia amylovora* induced hypersensitive cell death in apple leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 63: 292-305.

Khan, M.A., Zhao, Y., and Korban, S.S. 2012. Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Resistance to the Bacterial Pathogen *Erwinia amylovora*, Causal Agent of Fire Blight Disease in Rosaceae. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30: 247-260.

Klement, Z., Farkas, G.L., and Lovrekovich, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by Phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, 54: 474-477.

Koczan, J.M., Lenneman, B.R., McGrath, M.J., and Sundin, G.W. 2011. Cell surface attachment structures contribute to biofilm formation and xylem colonization by *Erwinia amylovora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 77: 7031-7039.

Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature, Lond*, 178.

Lee, S.A., Ngugi, H.K., Halbrecht, N.O., Keefe, G., Lehman, B., Travis, J.W., Sinn, J.P., and McNellis, T.W. 2010. Virulence characteristics accounting for fire blight disease severity in apple trees and seedlings. *Phytopathology*, 100: 539-550.

Lelliot, R.A., and Stead, D.E. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Disease of Plant*. Blackwell Scientific, Pub., London.

Maes, M., Orye, K., Bobev, S., Devreese, B., Van Beeumen, J., De Bruyn, A., Busson, R., Herdewijn, P., Morreel, K., and Messens, E. 2001. Influence of amylovoran production on virulence of *Erwinia amylovora* and a different amylovoran structure in *E. amylovora* isolates from Rubus. *European Journal of Plant Pathology*, 107: 839-844.

Moarrefzadeh, N. Mohamadi, M., Sharifitehrani, A., and Zakeri, Z. 2009. Evaluation of the effectiveness of some serological and PCR-based methods for detecting bacteria in the fire blight agent of pome fruit trees. *Iranian Journal of Plant Protection Sciences*, 40(1): 55-64 (In Farsi with English summary).

Mohammadi, M. 2010. Enhanced colonization and pathogenicity of *Erwinia amylovora* strains transformed with the near-ubiquitous pEA29 plasmid on pear and apple. *Plant Pathology*, 59: 252-261.

Moslemkhani, K., Hemati, M., Hajnajari, H., and Aminkhaki, S. 2015. Investigating the Inheritance of *Erwinia amylovora* in Apple trees without symptoms of disease. *Journal of Plant Protection*, 29(2): 206-210 (In Farsi with English summary).

Ommati, F., and Zaker, M. 2015. Role of Infected Plant Parts in Development and Survival of Fire Blight of Pome Fruits. Applied research in plant protection, 3(2): 57-98 (In Farsi with English summary).

Parceya, M., Gaydera, S., Morley-Senklerc, V., Bakkerenc, G., Úrbez-Torresc, J.R., Ali, S., Castlee, A.J., and Svircevb, M.A. 2020. Comparative genomic analysis of *Erwinia amylovora* reveals novel insights in phylogenetic arrangement, plasmid diversity, and streptomycin resistance. Genomics, 112: 3762-3772.

Tavakolbakhoda, S., and Taghavi, S.M. 2010. Genotypic and phenotypic characteristics of *Erwinia amylovora* isolates from different hosts in Shiraz. Iranian Journal of Plant Protection Sciences, 41(1): 29-40 (In Farsi with English summary).

Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria 3rd ed., The American Phytopathology Society Press, St. Paul, MN, USA. 373 pp.

Smits, T.H., and Duffy, B. 2011. Genomics of iron acquisition in the plant pathogen *Erwinia amylovora*: insights in the biosynthetic pathway of the siderophore desferrioxamine E. Archives of Microbiology, 193: 693-9.

Vanneste, J.L. and Expert, D. 1990. Detection of an iron uptake system in *E. amylovora*. Acta Horticulturae, 273: 249-253.

Vrancken, K., Holtappels, M., Schoofs, H., Deckers, T., and Valcke, R. Pathogenicity and infection strategies of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* in Rosaceae: State of the art. Microbiology, 159: 823-832.

Yaish, M.W.F. 2006. Genetic mapping of quantitative resistance to race 5 of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in common bean. Euphytica, 152, 397-404.

Zakeri, Z., and Sharif Nabi, B. 1991. Pear fire blight disease in Karaj. Abstracts of the 10th Iranian Plant Protection Congress, Kerman, 157.

Zhao, Y., Wang, D., Nakka, S., Sundin, G.W., and S. S. Korban. 2009. Systems level analysis of two-component signal transduction systems in *Erwinia amylovora*: Role in virulence, regulation of amylovoran biosynthesis and swarming motility. BMC Genomics, 245: 1-16.



© 2021 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Study of Virulence factor of *Erwinia amylovora* isolates obtained from Semnan province and resistance evaluation of different pear tissues, blossom and immature fruit, in different pear cultivars to Fire blight disease

M. Akhlaghi^{1*}, V. Rafiei², A. R. Barjesteh², M. R. Alymanesh³ and A. Dezianian²

1. ***Corresponding Author:** Ph.D. Graduate of Plant Pathology, Plant Protection Research Department, Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran (Mahdi.akhlaghi66@gmail.com)
2. Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran
3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

DOI: 10.22055/PPR.2021.16578

Received: 12 December 2020

Accepted: 8 February 2021

Abstract

Background and Objectives

Fire blight, caused by *Erwinia amylovora*, is one of the important bacterial diseases of pome fruit trees. It causes the blight of different organs of the tree (blossoms, shoots, leaves, fruits, and limbs) and exudates' production. The main symptoms of fire blight infection are the burnt-like appearance of infected tissues, bacterial ooze released from the infected tissues, shepherd's crook, wilting, and water-soaked appearance. Recently, it has been included in the top 10 plant pathogenic bacteria. This study aimed to collect, identify and characterize *E. amylovora* isolates from provinces of Semnan in Iran and determine their pathogenicity factor and the current situation of fire blight disease in this province.

Material and Methods

In the present study, 68 strains isolated from pear, quince, and apple hosts were identified in Semnan Provinces. Phenotypic, nutritional, and biochemical tests were performed on strains. The molecular identification of isolates was conducted using specific primers A and B of the plasmid pEA29. A pathogenicity test of the bacterial isolates on the immature pear fruit of the Spadona pear cultivar was performed, and the most pathogenic bacterium isolate was selected for further evaluation. Pathogenicity test was carried out on immature fruits and blooms of eight pear cultivars. Pathogenicity characteristics such as amylovoran, biofilm, and siderophore were studied in most virulence isolates.

Results and Discussion

The isolates were gram and oxidase negative, catalase-positive, and anaerobic. The isolates were able to produce a hypersensitive response in tobacco and levan production, but none of them could produce fluorescent pigment on King B medium and growth at 39 °C. The results suggested that of 68 strains collected, 52 isolates belong to *Erwinia amylovora* bacteria. The virulent isolate (D 43) was collected from Dibaj city. All 52 isolates under study proliferated 1000 base pairs. These tests, along with sequencing of

PCR products, proved they were *Erwinia amylovora* species. Studying pathogenicity factors showed an almost direct relationship between all pathogenicity factors (other than biofilm production) and the severity of disease symptoms on tissues. The most resistant blooms tissues to D 43 isolate were shown to be related to Dargazi and Spadona pear cultivars; Duchess and Chini Hesar pear cultivars had the most resistant immature fruits tissues to D 43. It is therefore concluded that the susceptibility tissues to isolates of *Erwinia amylovora* were different in various cultivars. This point could help control fire blight disease and programs of breeding cultivars in the future.

Keywords: *Amylovoran, Pome fruit tree, Siderophore*