وقوع بیماری آتشک گلابی در اثر *Erwinia amylovora* در استان گیلان

مصطفی نیک نژاد کاظم پور[۱]، اسماعیل کامران[۲] و بیتا علی[۱]

چکیده

بیماری آتشک گلابی با عامل *Erwinia amylovora* یکی از بیماری‌های خطرناک درختان میوه دانه دار در بسیاری از مناطق دنیا می‌باشد که موجب نکروز شدن بافت‌های میزبان می‌گردد. این باکتری یک نکروژن تدریجی است که می‌تواند به تدریج با گسترش خود موجب تخریب تمام بافت‌های گیاه میزبان شود. در این بررسی طی بازدیدهای مکرر از مناطق کشت گلابی آستانه اشرفیه، لاهیجان و کیاشهر در استان گیلان از درختان آلوده به آتشک گلابی نمونه برداری به عمل آمد. علایم بیماری روی درختان گلابی آلوده به‌صورت نکروز سرشاخه‌ها همراه با ترشحات صمغ در بافت‌های آلوده بود. جهت جداسازی عوامل بیماری زای باکتریایی تعدادی از بافت‌های آلوده، شاخه، تنه و جوانه‌ها پس از شستشو و ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۵٪ و شستشوی مجدد با آب مقطر سترون در آب پپتونه له شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره روی محیط‌های کشت روی محیط آگار مغذی سوکروز دار حاوی آنتی بیوتیک سیکلوهگزامید (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) با یک میله شیشه‌ای خمیده پخش گردید بعد از سه تا پنج روز کلنی‌های سفید مایل به کرم کمرنگ انتخاب و روی محیط‌های کشت مذکور خالص شدند. جدایه‌های باکتری به‌دست آمده به‌صورت میله‌ای شکل، گرم منفی و بی هوازی اختیاری بودند. جدایه‌ها روی محیط کشت‌های غنی از سوکروز تولید لوان نموده، ولی قادر به تولید رنگدانه فلورسنت در محیط KB نبودند. تمام جدایه‌های مورد بررسی در توتون و شمعدانی فوق حساسیت ایجاد کردند. باکتری‌های جداشده اکسیداز، نیترات، اوره آز و ایندول منفی بوده و قادر به لهانیدن برش‌های سیب زمینی، تولید گاز H_2S و هم‌چنین رشد در دمای $36\ ^oC$ نبودند. به علاوه جدایه‌ها قادر به استفاده از سیترات، استوئین، سوربیتول و تری‌هالوز بوده و آزمون ژلاتین آنها نیز مثبت بود. بر اساس مجموع خصوصیات مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و تکثیر یک قطعه ۹۳۷ جفت بازی از DNA با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مرآز (PCR) به کمک آغازگرهای اختصاصی Ea1 و Ea2 جدایه‌های مذکور به عنوان *Erwinia amylovora* شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی: گلابی، *Erwinia amylovora*، آتشک، PCR، گیلان

مقدمه

بیماری آتشک (fire blight) در اثر آلودگی به باکتری *Erwinia amylovora* (Burrill) یکی از شدیدترین و مخرب‌ترین بیماری‌های مهم درختان میوه دانه دار به‌خصوص سیب *(Malus domestica)* و گلابی *(Pyrus communis)* محسوب می‌شود. کنترل و مهار این بیماری برای کشاورزان و

۱. به ترتیب استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۲. کارشناس ارشد موسسه تحقیقات پرورش کرم ابریشم، رشت

Archive of SID

www.SID.ir

باغداران امری بسیار دشوار است (۲۵). معمولاً اولین علائم بیماری در فصل بهار به‌صورت سوختگی شکوفه ظاهر می‌گردد. شکوفه‌ها ابتدا حالت آبسوخته پیدا کرده، کمی بعد چروکیده و پژمرده گشته و به رنگ قهوه‌ای تا سیاه در می‌آیند. عامل بیماری از طریق دمگل پیشرفت کرده و برگ‌های مجاور خود را آلوده می‌کند. برگ‌ها نکروزه و خشک می‌شوند. با پیشرفت بیماری شاخه‌های انتهایی درخت سوخته و انتهای این نوع شاخه‌ها به شکل سر عصایی در می‌آیند. با آلوده شدن تعداد زیادی از شاخه‌ها به همراه برگ‌های خشکیده درخت ظاهری آتش گرفته به خود می‌گیرد (۲۱). در مجموع علایم نکروز و ترشح شیرابه باکتریایی روی شاخه و میوه آلوده از مهم‌ترین علایم پیشرفت بیماری می‌باشد (۱۰). یکی از دلایل کمبود موفقیت در شناخت بیماری عدم اطلاعات کافی در مورد دامنه میزبانی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های *E . amylovora* می‌باشد (۱۷). جدایه‌های *E . amylovora* معمولاً دارای میزبان اختصاصی نیستند. به عنوان مثال بیشتر جدایه‌های بیماری‌زای از سیب روی گلابی و دیگر گونه‌های زیر خانواده *Maloideae* و هلو (*Prunus*) هم ایجاد بیماری می‌نماید. در حالی‌که جدایه‌های به‌دست آمده از تمشک روی گلابی یا سیب بیماری‌زای نیستند (۸). *E . amylovora* به عنوان عامل بیماری‌زای خانواده Rosaceae شناخته شده است. در این خانواده *E. amylovora* دارای دامنه میزبانی وسیعی می‌باشد. به‌طوری‌که علایم بیماری آتشک روی تقریباً ۲۰۰ گونه از ۴۰ جنس رزاسه گزارش شده است (۲۲). با وجود این‌که ساختار مولکولی، دامنه میزبانی، اپیدمی شناسی و تأثیر متقابل عامل بیماری و میزبان به طور کامل شناخته نشده است اما نتایج به‌دست آمده از روش‌های مولکولی در سال‌های اخیر دادند اطلاعات در مورد تنوع ژنتیکی این جدایه‌ها را به طور گسترده‌ای افزایش داده است. شناسایی دامنه میزبانی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های *E . amylovora* ، تعیین میزان مقاومت بیماری در دوره رشد گیاه، برنامه‌های مهندسی ژنتیک، تعیین پراکندگی بیماری‌های دراز دوره و کوتاه دوره، شناسایی منابع آلودگی، تشخیص گروه‌های جدایه‌ها و مطالعه روابط بین جدایه‌ها برای قرنطینه گیاهان حائز اهمیت است (۱۸). باکتری *E . amylovora* دارای دامنه میزبانی وسیعی می‌باشد و در برخی نواحی سراسر زمستان را در گیاهانی سپری می‌کند که از نظر اقتصادی، میزبان‌های مهمی نیستند و به عنوان میزبان‌های منبع نامیده می‌شوند. تاکنون بیووارهای (biovars) *E . amylovora* نه تنها براساس خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی توصیف نشده است بلکه بر اساس قدرت بیماریزایی باکتری روی میزبان‌های اختصاصی، جهت تعیین پاتووار (Pathovar) نیز ملاک مشخصی ارائه نگردیده است (۲۱).

در ایران ذاکری و شریف نبی (۵) وقوع بیماری آتشک را روی درختان گلابی در برغان کرج گزارش کردند. حسن زاده و همکاران (۳) وضعیت بیماری آتشک را روی درختان میوه دانه دار در استان‌های آذربایجان غربی و قزوین مورد بررسی قرار دادند و روش سرولوژیکی را جهت شناسایی باکتری *E . amylovora* عامل بیماری آتشک سیب و گلابی به‌کار بردند. افیونیان و همکاران (۲) جدایه‌های ایرانی *E . amylovora* به‌دست آمده از درختان میوه دانه دار مبتلا به آتشک را از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و الکتروفورز پروتئین با هم مقایسه کردند. مزارعی و همکاران (۷) جدایه‌هایی از باکتری‌های *E . amylovora* و *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* را از روی درختان سیب، گلابی و به از باغ‌های کرج، قزوین و آذربایجان غربی شناسایی و گزارش کردند. داودی و همکاران (۴) عکس العمل برخی ارقام مختلف سیب و گلابی نسبت به بیماری آتشک با استفاده از روش‌های شاخص حساسیت واریته‌ای ارقام و در آلوده سازی مصنوعی و شدت بیماری ارقام در شرایط آلودگی طبیعی بررسی نمود و بر اساس این سیستم ۸۱/۴٪ از ارقام گلابی در گروه خیلی حساس و ۱۸/۶٪ در گروه نیمه حساس قرار گرفتند. علی و نیک نژاد (۶) وقوع بیماری آتشک را در برخی باغ‌های گلابی استان گیلان گزارش کردند.

وجود علایم بیماری آتشک در باغات گلابی استان گیلان، لزوم بررسی و شناسایی عامل بیماری باکتریایی روی درختان

Archive of SID

www.SID.ir

گلابی را ضروری می‌سازد در این منطقه مورد توجه قرار گیرد. از آنجایی که در بررسی‌های مقدماتی عامل بیماری آتشک گلابی در گیلان باکتریایی تشخیص داده شد (۶)، ضروری به‌نظر رسید که باکتری عامل بیماری به‌صورت دقیق تری شناسایی شود تا در آینده با انجام پژوهش‌های تکمیلی روش‌های پیشگیری و مبارزه با بیماری حاصل شود.

مواد و روش‌ها

بازدید از باغات

طی سال‌های۱۳۸۳-۱۳۸۲ از باغ‌های گلابی مختلف استان گیلان در لاهیجان، آستانه اشرفیه بازدید به عمل آمد. در هنگام بازدیدها، انواع سوختگی و شانکر روی این درختان مورد بررسی قرار گرفت و از درختان گلابی که دارای سوختگی برگ و شانکر در سرشاخه‌ها بودند، نمونه برداری شد. نمونه‌ها پس از قرار دادن داخل کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی عوامل بیماری‌زا

نمونه‌های آلوده به آتشک گلابی ابتدا در جریان ملایم آب شسته شده و قطعاتی حدود یک سانتی متر مربع شامل قسمت سالم و بافت آلوده مورد نظر بریده شده و به‌طور جداگانه توسط هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و سپس سه بار (هر بار ده دقیقه) با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. بافت‌های آلوده در آب پپتونه کاملاً له شدند و ۳۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار گرفتند. عصاره‌های به‌دست آمده توسط آب مقطر سترون تا یک میلیونیوم رقیق شدند. سپس از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط آگار مغذی سوکروز دار (NAS) , King's B (KB) و LB (مخمر ۱۰ گرم، باکتو پپتون ۵ گرم، NaCl ۱۰ گرم، آگار ۱۷ گرم) حاوی آنتی بیوتیک سیکلوهگزامید (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) با یک میله شیشه‌ای خمیده پخش گردید. تشتک‌های پتری در دمای ۲۷ $^{\circ}C$ به مدت ۳ روز نگه‌داری شدند. کلنی‌های رشد یافته براساس شکل ظاهری و رنگ، بررسی و کلنی‌های غالب انتخاب و خالص سازی شدند.

آزمون اثبات بیماری‌زایی

برگ‌های گلابی رقم خوج جهت مایه زنی استفاده شدند. برای مایه زنی برگ‌ها و میوه‌ها، از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها در آب مقطر سترون استفاده شد. بدین منظور، یک توده از کشت جدایه‌ها در آب مقطر سترون به‌صورت سوسپانسیون با غلظت ۱×۱۰^{۸} واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر با استفاده از روش سری رقت (Serial dilution) تهیه شد. جهت مایه زنی از روش یاسد و همکاران (۲۴) استفاده شد. بدین ترتیب، در ناحیه رگبرگ اصلی برگ، توسط چاقوی جراحی یک برش به‌شکل T زده شد و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در محل زخم قرار گرفت. برای مایه زنی میوه‌ها سوسپانسیون باکتری به بافت میوه تلقیح گردید. در تمام موارد آزمایش برای شاهد از آب مقطر استفاده گردید. برگ‌های جوان و میوه‌ها مایه زنی شده به منظور حفظ رطوبت بترتیب در تشتک‌های ۳۰۰ میلی متری و بشر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی کاغذ صافی مرطوب به مدت ۱۰ الی ۱۵ روز قرار گرفتند. در صورت بروز علایم بیماری، جداسازی عامل بیماری از برگ‌های جوان و میوه‌های مایه زنی شده به روش قبلی تکرار شد.

آزمون‌های بررسی ویژگی‌های فنوتیپی

الف) ویژگی‌های مورفولوژیک

از کلنی‌های ۲۴ ساعته رشد یافته هر جدایه باکتری روی محیط LB برای رنگ آمیزی گرم به روش شاد و همکاران (۱۹)، واکنش در مقابل KOH به روش سالسو و همکاران (۲۰) استفاده شد. برای تعیین وجود یا عدم وجود رنگدانه فلورسنت از محیط KB، و برای مشاهده تولید لوان محیط آگار غذایی به اضافه پنج درصد ساکارز به‌کار گرفته شد (۱۸).

ب) ویژگی‌های فیزیولوژیک

برای آزمون تحریک فوق حساسیت در توتون و شمعدانی، یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت $۱۰^{۸}$ cfu /ml در

Archive of SID

www.SID.ir

پارانشیم تحتانی برگ‌های توتون و شمعدانی تزریق شد(۱۵). فعالیت پکتولیتیک جدایه‌های باکتریایی، حداکثر دمای رشد، درصد تحمل نمک طعام (۱۸)، طبق روش‌های توصیه شده تعیین گردید.

ج) ویژگی‌های بیوشیمیایی

آزمون‌های رشد هوازی و بی هوازی به روش هیو و لایفسن (۱۳)، اکسیداز به روش کواکس (۱۸) و کاتالاز به روش دای (۱۱) انجام شد. جهت انجام آزمون‌های تجزیه نشاسته و ژلاتین جدایه‌های باکتری از محیط کشت آگار مغذی محتوی ۲٪ نشاسته و ۴٪ ژلاتین استفاده شد. آزمون اوره آز به وسیله محیط پایه اوره آگار که به آن دو درصد اوره افزوده شد، انجام گردید. آزمون‌های تولید گاز هیدرژن سولفوره (H_2S)، ایندول و مواد احیا کننده از ساکارز با استفاده از محیط‌های کشت آماده TSI و SIM و استفاده از معرف‌های کواکس و بندیکت انجام شد (۱۴). برای آزمون متیل رد و تولید استوئین، محیط کشت آماده MR-VP به مقدار دو درصد در آب مقطر تهیه شد و سه روز پس از مایه زنی جدایه‌ها در محیط کشت، با افزودن معرف‌های مربوطه واکنش‌ها بررسی گردید (۱۰ و ۱۱). تولید نیترات، هیدرولیز اسکولین، هیدرولیز DNase، و آزمون لستیناز بر پایه روش‌های توصیه شده لیلیوت و استید (۱۶) انجام گرفت. تولید اسید از قندها با کاربرد محیط پایه آیر و همکاران بررسی شد (۱۸).

تشخیص جدایه‌ها به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)

برای تشخیص سلول‌های *E.amylovora* با روش PCR از آغازگرهای اختصاصی زیر:

Ea1 (5’ GG TTT TTA ACG CTG GG 3’) و (5’ GGG Ea2 (CAA ATA CTC GGA TT 3’ استفاده شد.

جهت استخراج DNA از سلول‌های *E.amylovora* یک کلنی از باکتری برداشته شد و در لوله‌های آزمایش محتوی ۴/۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون قرار گرفت. سپس باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن ماری در دمای $100^{\circ}C$ قرار داده شد و بلافاصله لوله‌ها در ظرف محتوی یخ قرار گرفتند. از ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری جهت تکثیر استفاده گردید. برای تکثیر DNA از واکنش ۱۰۰ میکرولیتری محتوی دو میکرولیتر از آغازگرهای اختصاصی، چهار میکرولیتر مخلوط dNTP، شش میکرولیتر کلرور منیزیم ۲۵ مولار، ۱۰ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر غلظت، ۰/۲ میکرولیتر *Taq* polymerase، ۶۵/۸ میکرولیتر آب مقطر سترون دو بار تقطیر شده استفاده گردید. سپس جهت اجتناب از تبخیر در طول انجام مراحل PCR به لوله ۲ قطره روغن معدنی اضافه گردید. لوله‌ها در دستگاه PCR (Mastercycler gradient, Germany) قرار داده شده و برنامه آن شامل ۶۰ ثانیه در $94^{\circ}C$ جهت جدا شدن رشته‌های DNA و سپس به تعداد ۳۷ سیکل به‌ترتیب ۶۰ ثانیه در $52^{\circ}C$ و سپس ۶۰ ثانیه در $72^{\circ}C$ قرار گرفتند. جهت بسط نهایی لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای $72^{\circ}C$ قرار گرفتند. در پایان لوله‌ها در $4^{\circ}C$ نگه‌داری شدند. بعد از پایان یافتن تکثیر عملیات PCR مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر لوله برداشته و روی ژل آگارز ۲ درصد در داخل بافر TBE (Tris/base ۸ گرم، اسید بوریک ۵/۵ گرم، EDTA نیم مولار با pH ۸ نیم مولار، و آب مقط سترون ۱۰۰۰ میلی لیتر) بار گذاری شدند و سپس ژل آگارز را با جریان ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد. بعد از اتمام الکتروفورز ژل اگارز را در اتیدیوم بروماید (۱۰ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت و سپس داده و سپس زیر زیر نور ماورای بنفش DNA، ژل مرئی شد. از جدایه استاندارد *E.amylovora* CFBP 1430 ارسالی از مرکز تحقیقات باکتریولوژی آنژه – فرانسه، به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. تمام باندها که در سطح شاهد مثبت قرار گرفتند، به‌عنوان تیمار مثبت در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

جدا سازی عامل بیماری

سه روز پس از کشت برگ‌های آلوده روی محیط SNA، کلنی‌های سفید مایل به کرم کمرنگ ظاهر شدند که اکثریت

Archive of SID

www.SID.ir

غالب کلنی‌های باکتریایی را شامل می‌شدند. از نمونه‌های جمع آوری ۲۶ جدایه که توانایی ایجاد فوق حساسیت روی توتون و شمعدانی را داشتند، انتخاب و آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک روی آنها انجام شد.

اثبات بیماری‌زایی

کلیه ۲۶ جدایه‌هایی که باعث ایجاد فوق حساسیت روی توتون و شمعدانی شدند در آزمون بیماری‌زایی روی برگ و میوه گلابی رقم خوج، پس از ۱۵ روز تولید علایم بیماری نمودند. علایم بیماری روی برگ به‌صورت سوختگی و نکروز برگ و علایم بیماری روی میوه به‌صورت نکروز و ترشح شیرابه باکتریایی مشاهده گردید که این شبیه علایم مشاهده شده در شرایط باغ روی درختان گلابی بود. علایم بیماری در همه جدایه‌ها روی برگ‌های جوان و میوه‌ها یکسان مشاهده گردید. برگ‌های جوان و میوه‌ها که توسط آب مقطر سترون مایه زنی شده بودند، هیچ‌گونه علایمی نشان ندادند.

علایم بیماری آتشک در باغ‌های گلابی استان گیلان به‌صورت سوختگی شکوفه، جوانه وشانکر مشاهده گردید. به‌نظر می‌رسد وجود شرایط محیطی مناسب در طی ماه‌های اسفند تا اواسط خرداد علایم بیماری در باغات گلابی استان گسترش می‌یابد. البته اظهار نظر دقیق در این زمینه نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. در شرایط بارندگی و شبنم در طول گل‌دهی، سوختگی ناشی از باکتری‌های اپی فیت رخ می‌دهد که انتشار ثانویه آن توسط حشرات و سایر عوامل جوی باعث گسترش بیماری می‌گردد. آلودگی جوانه ناشی از حرکت سیستمیک باکتری از شانکرهای زمستان‌گذران می‌باشد (۲۳).

خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌های *E.amylovora*

مشخصات فیریولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای ایزوله‌های جدا شده از درختان گلابی مبتلا به آتشک در استان گیلان در جدول ۱ ذکر شده است. به‌طورکلی جدایه‌ها از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی, فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای تنوعی نداشتند.

تشخیص جدایه‌های *E.amylovora* به وسیله PCR

جدایه‌های *E. amylovora* توسط آغازگرهای اختصاصی Ea1 و Ea2 تشخیص داده شدند. روی ژل الکتروفورز ۲ درصد باندهای ۹۳۷ جفت باز توسط آغازگرهای اختصاصی تشکیل شدند. باندهای ایجاد شده روی ژل با باندهای شاهد مثبت (جدایه استاندارد*E.amylovora* CFBP 1430) کاملاً مطابقت داشت (شکل ۱).

به جز چند استثنا همه جدایه‌های *E.amylovora* پلاسمید مشابه ۲۹ کیلو باز (kb) که pEA29 نامیده می‌شود را دارا می‌باشند. به دلیل این که آغازگرهای Ea1 و Ea2 از توالی این پلاسمید طراحی شده‌اند، لذا تکثیر قطعه kb ۰/۹ در این تحقیق مشخص نمود که جدایه‌های منطقه گیلان نیز واجد این پلاسمید هستند که در اکثر جدایه‌های *E. amylovora* وجود دارد. حساسیت شناسایی این جدایه‌ها با استفاده از روش nested-PCR و به وسیله آنزیم‌های برشی *pst*I روی قطعه kb ۰/۹ از قطعه ژن pEA29 بیشتر می شود (۲۲). در این تحقیق نتایج آزمون‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌های *E. amylovora* به‌دست آمده از درختان گلابی در استان گیلان با استفاده از روش PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی مورد تائید قرار گرفت. نتایج به‌دست آمده در روش PCR با کارهای برسویل و همکاران (۹) کاملاً مطابقت داشت.

بر اساس نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیماری‌زایی و نتایج به‌دست آمده از تکثیر DNA جدایه‌های حاصل از درختان گلابی مبتلا به آتشک در استان گیلان مشخص گردید که عامل بیماری آتشک گلابی در این منطقه *E. amylovora* می‌باشد.

میزان آلودگی باغ‌های گلابی استان گیلان شامل آستانه اشرفیه، لاهیجان و کیاشهر به آتشک بسیار شدید بود به‌طوری‌که علایم سوختگی برگ و سرشاخه روی رقم گلابی محلی (خوج) بیشتر مشاهده گردید. علائم بیماری در آزمایشگاه شباهت زیادی با علائم بیماری در باغ داشت.

کنترل بیماری آتشک نیازمند استفاده از تمام دانش موجود

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱ . خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌های *Erwinia amylovora* به‌دست آمده از درختان گلابی در استان گیلان

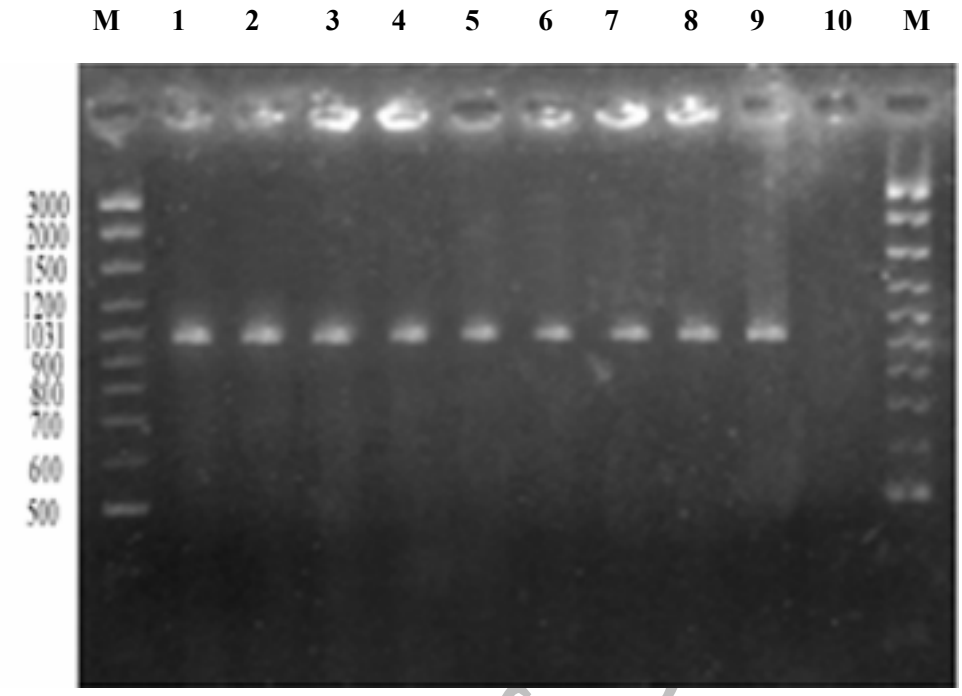
ویژگی	استرین‌های *E. amylovora*	ویژگی	استرین‌های *E. amylovora*
رنگ‌آمیزی گرم	-	تولید اسید از	
رشد بی‌هوازی	+	رافینوز	–
فوق حساسیت روی		دی مانوز	–
توتون	+	دی رافینوز	–
شمعدانی	+	دی گلوکز	+
لکه برگی روی گلابی	+	اسکولین	–
رشد در ۳۶ Ċ	–	سلوبیوز	–
احیاء نیترات	–	اینولین	–
کاتالاز	–	ال آرابینوز	+
لوان	+	میو اینوسیتول	–
اکسیداز	–	مانیتول	–
اوره آز	–	مالتوز	-
هیدرولیز نشاسته	–	دی – گالاکتوز	+
هیدرولیز ژلاتین	+	سوربیتول	+
DNase	–	ساکارز	+
ایندول	–	رایبوز	+
H_2S تولید	–	فروکتوز	+
لیسیتیناز	–	لاکتوز	–
متیل رد	–	تری هالوز	+
هیدرولیز کازئین	–	زایلوز	–
تحمل نمک طعام ۳/۵٪	+	دی ادنیتول	–
استفاده از تارتارات	–	گلیسرول	–
سیترات	+		
لاکتات	–		

+ : واکنش مثبت، وجود فعالیت و استفاده از ترکیبات

– : واکنش منفی، عدم وجود فعالیت یا عدم استفاده از ترکیبات

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱ . تکثیر قطعه ۹۳۷ جفت باز *Erwinia amylovora* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Ea1 و Ea2 , چاهک‌های ۱ و ۱۲ شناساگر با وزن مولکولی ۱۰۰ تا بازی را نشان می‌دهند، چاهک ۲، شاهد مثبت (جدایه استاندارد *E.amylovora* CFBP 1430)، چاهک‌های ۳ الی ۱۰ جدایه‌های *E.amylovora* به‌دست آمده از درختان گلابی در استان گیلان و ۱۱، شاهد منفی (آب مقطر سترون) را شامل می‌شود.

اپیدمیولوژی بیماری می‌باشد (۲۲). بیماری آتشک را باید با استفاده از روش‌های کنترل تلفیقی و ردیابی و پایش باغ بیماری را کنترل نمود. بدین منظور می‌توان از روش‌های مدیریت زراعی (هرس و رعایت اصول بهداشتی)، کنترل بیولوژیک (باکتری‌های آنتاگونیست) و شیمیایی (در زمان مناسب با توجه به پیش آگاهی)، بر طرف نمودن منابع آلودگی، قرنطینه و به‌کارگیری ارقام متحمل بیماری آتشک را کنترل نمود (۱).

میزان آلودگی باغات گلابی استان گیلان شامل آستانه اشرفیه، لاهیجان و کیاشهر به آتشک بسیار شدید بود به‌طوری‌که علایم سوختگی برگ و سرشاخه روی رقم گلابی محلی (خوج) بیشتر مشاهده گردید. علائم بیماری در آزمایشگاه شباهت زیادی با علائم بیماری در باغ داشت.

منابع مورد استفاده

۱. آهون منش، ع. ۱۳۷۹. *اصول مبارزه با بیماری‌های گیاهی*. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان.

۲. افیونیان، م.،ح. رحیمیان و م. مزارعی.۱۳۷۴.مقایسه ایزوله‌های ایرانی *Erwinia amylovora* بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و الکتروفورز پروتئین. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج.

۳. حسن زاده، ن.، ز. ذاکری و م. مزارعی.۱۳۷۲. موقعیت فعلی بیماری آتشک در ایران. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، دانشگاه گیلان.

۴. داودی، ع.، الف. مجیدی، ح. رحیمیان و م. ولیزاده. ۱۳۷۹. عکس العمل ارقامی از سیب و گلابی به بیماری آتشک (Fire blight). چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان.

Archive of SID
www.SID.ir

۵. ذاکری. ز. و ب. شریف نبی. ۱۳۶۸. بیماری آتشک گلابی در کرج. خلاصه مقالات دهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرمان.

۶. علی، ب. و م. نیک نژاد کاظم پور.۱۳۸۳. معرفی باکتری *Erwinia amylovora* عامل آتشک سیب و گلابی از استان گیلان. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه تبریز.

۷. مزارعی، م.، ن. حسن زاده و م. ر.حاجی مراد. ۱۳۷۲. شناسایی سرولوژیکی باکتری *Erwinia amylovora* عامل بیماری آتشک. خلاصه مقالات یازدهین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه گیلان.

8. Bell, A. 2001. Fire Blight : A bacterial disease of Rosaceous plants. Department of Horticulture Science, In: http://www.actahort.org/books/411/411_56.htm.
9. Berswill, S., A. Path, P. Bellemann, W. Zeller and K. Geider. 1992. Sensitive and species-specific detection of Erwinia amylovora by PCR analysis. Appl. Environ. Microbiol. 58: 3522-3526.
10. Bogs, J., I. Bruchmuler, C. Erbar and K. Geider. 1998. Colonization of host plant by the fire blight pathogen Erwinia amylovora, labeled with genes for bioluminescence and fluorescence. Phytopathol. 88:416-421.
11. Dye, D.W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*, The amylovora group. Newzealand J. Agric. Sci. 11: 590-607.
12. Hugh, R. and E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative methabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. J. Bacteriol. 66 :24-26.
13. Kirally, Z.Z., F. Klement, F. Solymosy and J.Voros. 1974. Methods in Plant Pathology. Elsevier Scientific Pub. Co., Amesterdam.
14. Klement, Z., G.L. Fakas and L. Loverkovich. 1964. Hypersensitive reaction induced by pathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathol. 54 : 474-477.
15. Lelliot, R.A. and D.E. Stead. 1987. Methods for the Diagonosis of Bacterial Disease of Plant. Blackwell Scientific Pub., London.
16. Momol, M.T., E.T. Momol, W.F. Lmboy, J.L. Norelli, S.V. Beer and H.S. Aldwinckle. 1997. Characterization of Erwinia amylovora strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). J. Appl. Microbiol. 82 : 389-398.
17. Momol T.M. and H.S. Aldwinckle. 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*. Oxford. London.
18. Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Thrid eds. APS. St. Paul. Minnesota, USA. 373pp.
19. Sulsow, T.V., M.N. Schorth and M. Saka. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathol. 72 : 917-918.
20. Thomason, S.V., M.N. Schorth, W.J. Moller and W.O. Reil. 1975. Occurrence of the fire blight of pear in relation to weather and epiphytic population of *Erwinia amylovora*. Phytopathol. 65 : 335-358.
21. Van der Zwet, T. 2002. Present worldwide distribution of fire blight. Acta Hort. 590: 33–34.
22. Van der Zwet, T. and H.I. Keil. 1979. Fire blight – A Bacterial Disease of Rosaceae Plant. Agriculture Handbook 510, US Department of Agriculture, Washington. DC. 200 pp.
23. Vanneste, J.L. 1995. *Erwinia amylovora*. PP. 21-41. *In*: Singh. U.S., R.P. Singh and k. Kohmato (Eds.) Pathogenesis and host specificity in Plant Disease : Histopathological, Biotechnical, Genetic and Molecular Bases. Vol.1. Prokayotes, Progamon Press., Oxford. London
24. Yassad-Carreau, S., C. Manceau and J. Luisetti. 1994. Occurrence of specific reaction induced by Pseudomonas syringae pv. syringae on bean pods, lilac and pear plants. Phytopathol. 43 :528-536.
25. Zhang, Y. and K. Geilder. 1997. Differentiation of Erwinia amylovora strains by pulse-field gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 4421-4426 .

Archive of SID

www.SID.ir