فصلنامه گیاه‌پزشکی
۱۳۸۹-۲ (۲): ۱۶۱-۱۶۶

مقاله کوتاه

بررسی بیماری آتشک درختان دانه داربا استفاده از آزمون بیماریزایی و مقاومت به استرپتومایسین

اسفندیار ظهورپرالک*

بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد، خراسان رضوی، ایران

چکیده

بیماری آتشک درختان دانه دار ناشی از *Erwinia amylovora* (Burill) دو دهه در ایران سابقه داشته و یکی از بیماری های مهم و اقتصادی درختان دانه‌دار به شمار می‌رود که در بعضی مناطق تولید محصول به و گلابی را غیر اقتصادی نموده است. طی سال‌های ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ نود و پنج جدایه از استان‌های خراسان رضوی، شمالی و جنوبی از درختان سیب، گلابی و به جداسازی و شناسائی شد. بیماری‌زایی جدایه‌ها با آزمون‌های فوق حساسیت روی برگ توتون، شمعدانی و نیز مایه‌زنی روی میوه نارس گلابی تایید شد. این جدایه‌ها از لحاظ ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای مقایسه شدند. جدایه‌ها از لحاظ ویژگی‌های فنوتیپی شباهت زیادی نشان دادند. همچنین نتایج نشان داد که جدایه‌های به دست آمده از میزبان‌ها و مناطق مختلف جغرافیایی از نظر بیماری‌زایی مشابه و هیچ‌گونه مقاومتی به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، تتراسیکلین و مس در آن‌ها مشاهده نشد. نتایج بررسی‌ها نشان داد استرین های متعلق به میزبان‌ها و نواحی مختلف یکنواخت است. بنابراین احتمال وجود گونه جدید *Erwinia pyrifoliae* در آنها نیست.

واژه‌های کلیدی: آتشک سیب، گلابی و به، استرپتومایسین

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zohourpp@yahoo.co.in

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۱۷ ، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۸/۸

مقدمه

بیماری آتشک درختان میوه‌دانه‌دار ناشی از *Erwinia amylovora* دارای دامنه میزبانی وسیعی است. این بیماری بومی آمریکایی شمالی بوده و در بسیاری از کشورهای دنیا از میزبان‌های مختلف سیب، گلابی و تمشک گزارش شده است (Lee *et al*., 2010). اولین بار در ایران بیماری آتشک از منطقه برغان کرج و از روی گلابی گزارش شد (Zakeri & Sharifnabi, 1991). پس از آن به تدریج در بسیاری از مناطق پرورش سیب، گلابی و به گسترش یافت. در سال‌های اخیر از استان خراسان همراه با بیماری بلاست گلابی گزارش گردیده است (Zohour *et al*., 2002). در سال ۱۹۹۹ یک گونه جدید به نام *Erwinia pyrifoliae* به عنوان عامل نکروز سرشاخه‌های گلابی آسیایی (*Pyrus pyrifolia*) از کره جنوبی گزارش شد. این گونه تنها روی تعداد معدودی از کولتیوارهای سیب بیماری‌زا بود (Kim *et al*., 1999). جدایه‌های *E. amylovora* از نظرشدت بیماری‌زایی، پایداری و مقاومت به استرپتومایسین متنوع می‌باشد (Manulis *et al*.,1999). گزارش‌هایی وجود دارد که جدایه‌های باکتری عامل بیماری آتشک تخصص میزبانی نداشته، از طرف دیگر برخی بررسی‌ها نشان داده که تخصص میزبانی نسبی وجود دارد. به عنوان مثال جدایه‌های *E. amylovora* جدا شده از تمشک قادر به بیماری‌زایی روی سیب و گلابی نبودند (Star *et al*., 1951). همچنین جدایه‌های بدست آمده از گلابی آسیایی از Hokkaido ژاپن درجاتی از تخصص میزبانی را نشان داده‌اند و اخیراً در بلغارستان از Chokeberry و توت فرنگی نیز گزارش شده است (Atanasova *et al*,. 2005). پژوهش حاضر به منظور تفکیک جدایه‌های *E.amylovora* از لحاظ بیماری‌زایی، مشخصات فنوتیپی و نیز مقاومت به استرپتومایسین انجام شد. علاوه بر این احتمال وجود گونه جدید *E. pyrifoliae* نیز ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

جداسازی، خالص سازی و شناسایی

در فصول بهار، تابستان و زمستان از مناطق مختلف استان‌های خراسان رضوی، شمالی و جنوبی نمونه‌های برگ، گل، میوه و شاخه‌های درختان سیب، گلابی و به دارای علائم بیماری جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی به روش‌های معمول باکتری‌شناسی انجام شد. کلنی‌های کوچک، براق، کرم تا شیری با حاشیه کامل، گرد و محدب انتخاب و خالص گردیدند. سایر آزمون های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیماری‌زایی با استفاده از روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی انجام شد (Schaad *et al*., 2001).

تعیین شدت بیماریزایی جدایه‌ها

از کشت ۷۲-۴۸ ساعته جدایه‌ها روی محیط آگار غذایی، سوسپانسیون باکتریایی تهیه و چگالی نوری آن‌ها معادل نیم واحد در ۶۰۰ نانومتر تهیه شد. سرشاخه‌های سبز به طول حداکثر ۱۵ سانتیمتر از یک رقم (رقم شاه‌میوه) حاوی برگ‌های جوان انتخاب و در شرایط آزمایشگاهی با سوسپانسیون تازه مایه‌زنی گردید. آزمون فوق در دو تکرار انجام و از آب مقطر سترون بدون باکتری به عنوان شاهد استفاده شد. پس از ۴ روز لکه‌های آب‌سوخته و قطر ناحیه آلوده مورد بررسی قرار گرفت (Lee *at al*., 2010).

تعیین حساسیت جدایه‌ها به استرپتومایسین

برای تعیین حساسیت جدایه‌ها نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین، اکسی‌تتراسیکلین و ترکیب مسی اکسی‌کلرورمس از دیسک‌های کاغذی که با محلول ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از استرپتومایسین، اکسی‌تتراسیکلین و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتراکسی کلرورمس (۳۷درصد) آغشته بود استفاده شد (Klement *et al*., 1990).

نتایج و بحث

جدایه‌های مورد بررسی گرم منفی، اکسیداز منفی ، کاتالاز مثبت بی‌هوازی اختیاری و لوان مثبت بودند. آزمونهای احیاء نیترات، تولید ایندول، آرژنین دهیدرولیز، لهانیدن سیب‌زمینی، تولید استوئین، هیدرولیز توئین۸۰، هیدرولیز اسکولین، هیدرولیز ژلاتین برای کلیه جدایه‌های مورد بررسی منفی ارزیابی شد. سایر خصوصیات جدایه‌ها در جدول ۱ آمده است. در آزمون‌های فنوتیپی شباهت بسیار بالایی بین جدایه‌ها مشاهده شد. در تمامی نمونه‌ها پس از ۴ روز هاله-ای به قطر یک سانتی‌متر ایجاد شد و علائم سوختگی و بلایت را نشان دادند. با توجه به واکنش یکسان بین نمونه‌ها و تکرارها اختلاف در شدت بیماری‌زایی مشاهده نشد. از این نظر استرین‌ها در یک گروه قرار می‌گیرند. تمامی استرین‌های جدا شده از میزبان‌ها و مناطق مختلف در برابر استرپتومایسین، اکسی‌تتراسیکلین و اکسی‌کلرور مس قادر به تولید هاله باز دارنده رشد بیش از میلیمتر ۷ بودند، بنابراین نسبت به این ترکیبات حساس بودند. در صورتی که وجود جدایه‌های مقاوم از برخی مناطق گزارش شده است (Manulis *et al*.,1999). بنابراین می‌توان از این ترکیبات در مدیریت بیماری آتشک استفاده نمود. علائم بیماری، خصوصیات باکتریولوژیکی و بیماری‌زایی استرین‌های جدا شده از نمونه های مشکوک تاییدی بر وجود بیماری ناشی از شیوع آتشک در استان‌های خراسان رضوی و شمالی با عامل *E. amylovora* است. عامل بیماری در کلیه مناطق مورد بررسی از اغلب میزبان‌های اصلی سیب، گلابی و به جداسازی شد. جدایه‌های میزبان‌های مختلف تفاوتی در صفات مورد بررسی با یکدیگر نشان ندادند در حالی که مطالعات برخی محققین معلوم نمود بعضی از جدایه‌ها از نظر شدت بیماری‌زایی در واریته‌های خاصی از میزبان با هم اختلاف نشان می‌دهند. مانند جدایه Ea273 (جدا شده از

سیب در امریکا)، E4001a (جداشده از سیب در کانادا) و E2002a (جدا شده از گلابی در کانادا) که بر روی ارقام مختلف سیب که دارای شدت بالای بیماری‌زایی می‌باشند. در حالیکه جدایه Ea581 (جداشده از سیب درفرانسه) شدت بیماری‌زایی متوسط می‌باشند (Lee *et al*., 2010). از نظر آزمون‌های فنوتیپی بین جدایه‌ها اختلاف کمی مشاهده شد و فقط در تحمل نمک طعام ۵٪ و تولید اسید از دی‌سوربیتول و دی‌آرابینوز متفاوت بودند (جدول ۱). در بسیاری از تحقیقات انجام شده نیز در سال‌های اخیر این نتایج حاصل شده است و نشان دهنده یک دست بودن جدایه‌ها است (Omidvar *et al*., 2006). در بررسی‌های سایر محققین نیز تنها جدایه‌های تمشک در یک کلاستر جداگانه قرار گرفتند و سایر استرین‌ها در یک گروه تمرکز داشتند (Lee *et al*., 2010). بدست آمدن جدایه‌ها از میزبان‌های مختلف، دامنه میزبانی آنها (سیب، گلابی و به) نشان می‌دهد. تشابهی میان گونه *E. amylovora* و گونه *E. pyrifoliae* وجود ندارد. گونه *E. pyrifoliae* توانایی آلودگی تمام کولتیوارهای سیب را نداشته و فاقد پلاسمید pEA29 می‌باشد. در حالیکه جدایه‌های ایرانی از نظر دامنه میزبانی گسترده‌تر هستند. از نظر هموlوژی DNA، *E. amylovora* و *E. pyrifoliae* دارای ۸۹٪ تا ۱۰۰٪ تشابه‌اند. در حالیکه در ناحیه ریبوزومی intergenic transcribed spacer region (ITS) ۴۰٪ تا ۵۰٪ شباهت دارند (Kim *et al*., 1999).

جدول ۱- خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Erwinia amylovora* جدا شده از درختان میوه دانه دار مناطق مختلف استان های خراسان

Table 1. Phenotypic characteristics of *Erwinia amylovora* strians isolated from pome fruits trees in different regions of Khorasan provinceses

Row	Test	*E. amylovora*	Row	Test	*E. amylovora*
1	Gram reaction	-	17	Tobacco hypersensitivity	+
2	Oxidase	-	18	Pear inoculation	+
3	Catalse	+	19	5% NaCl tolerans	D
4	O/F	+	20	Acid Porduction from	
5	Soft rot	-	21	Glocose	+
6	Nitrate reduction	-	22	Lactose	-
7	Argirine dihydrolase	-	23	Maltose	-
8	Gelatin hydrolysis	-	24	Galactose	-
9	Starch hydrolysis	-	25	Mannose	-
10	Tween-80 hydrolysis	-	26	Sucrose	+
11	Aesculin hydrolysis	-	27	D-sorbitol	D
12	Porduction H_2S	-	28	Trehalose	+
13	Levan Porduction	-	29	Inositol	+
14	Fluorescent pigment	-	30	Dextrin	-
15	Indole Porduction	-	31	D-Arabinose	D
16	Litmus milk reaction	Acidic			

- : واکنش منفی، عدم وجود فعالیت و عدم استفاده از ترکیبات (Negative reaction or no growth -)

+ : واکنش مثبت، وجود فعالیت و یا استفاده از ترکیبات (Positive reaction or growth +)

D : واکنش متفاوت، بعضی جدایه ها با واکنش مثبت (D : Different reaction, some strains positive)

منابع

Atanasova, I., Kabadjova, P., Bogatzevska, N., & Moncheva, P. 2005. New host plants of *Erwinia amylovora* in Bulgaria. Zeitschrift fur Naturforschung. *Section C Journal of Biosciences*, 60(11-12):893-898.

Klement, Z., Rudolph, K., & Sands, D.C. 1990. Methodes in Phytobacteriology .Academiaie, Kiado. Budapest.

Kim,W. S. L., Gardan, L., Rhim, S. L., & Geider, K. 1999. *Erwinia pyrifoliae* sp. nov., a novel pathogen that affects Asian pear trees (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49: 899–906.

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

Manulis, S., Zutra, D., Kleitman, F., Dror,O., Shabi, E., Zilberstaine, M, & David, L. 1999. Streptomycin resistance of *Erwinia amylovora* in Israel and occurrence of fire blight in pear orchards in the autumn. *ISHS Acta Horticulturae 489: VIII International Workshop on Fire Blight*.

Omidvar, R., Shams-Bakhsh., & Rahimian, H. 2006. Characterization of Iranian *Erwinia amylovora* strains usng biochemical tests and RAPD-PCR method. *Iranian Journal of Plant Patholgy* 42:673-686.

Schaad, N.W., Jones, J.B., & Chun,W. 2001. *Laboratory Guide for ldentification of Plant Pathogenic Bacteria*. American Phytopathology Society, St. Paul, USA.

Starr, M. P. Cardona, C. & Folson D. 1951. Bacterial fire blight of raspberry. *Phytopathology*, 41: 915-919.

Zacerri, Z. & Sharinabi, B. 1991. Fire blight of pear in Karaj. *Proceeding of the 10th Iranian plant protection congress*, Kerman University, Iran, p 215.

Zohour, E., Rahimian, H,. Arab. F,. and Nikravesh., Z. 2002. Pear blast disease in Khorasan. *Proceeding of the 15th Iranian plant protection congress, University of Razi, Kermanshah, Iran, Vol II*. p 247.