مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۸، شماره ۱، سال ۱۳۹۱

واکنش تعدادی از ژنوتیپ‌های به (*Cydonia oblonga* Mill.) مناطق گیلان و خراسان به بیماری آتشک

Response of some Quince (*Cydonia oblonga* Mill.) Genotypes from Guilan and Khorasan Provinces to Fire Blight Disease

سارا مهرابی‌پور[۱]، حمید عبداللهی[۲] و محمود عدلی[۳]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران
۲- دانشیار، موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، کرج
۳- کارشناس، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۷/۲۱

چکیده

مهرابی‌پور، س.، عبداللهی، ح.، و عدلی، م. ۱۳۹۰. واکنش تعدادی از ژنوتیپ‌های به (*Cydonia oblonga* Mill.) مناطق گیلان و خراسان به بیماری آتشک. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۸:** ۸۴ - ۶۷.

در این تحقیق واکنش برخی از ژنوتیپ‌های پیوند شده به روی پایه زالزالک به بیماری آتشک بررسی شد. به این منظور، هفت ژنوتیپ به گزینش شده از غرب استان گیلان و نه ژنوتیپ به گزینش شده استان خراسان رضوی همراه با شاهد به رقم اصفهان، با تزریق سرشاخه‌ای مخلوطی از چهار جدایه باکتری با کدهای K1، Z1، ۲ و ۳۶ مورد ارزیابی قرار گرفتند. به منظور انتخاب جدایه‌های باکتری عامل بیماری از آزمون‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیک، بیماری‌زایی و تکثیر لانه گزینی قطعه پلاسمید pEA29 با استفاده از جفت آغازگرهای بیرونی Aj و درونی PEANT استفاده شد. به طور کلی ژنوتیپ‌های به گیلان و خراسان مقاومت بیشتری به بیماری در مقایسه با به رقم اصفهان نشان دادند ولی میزان مقاومت ژنوتیپ‌های گیلان بیشتر بود. ژنوتیپ‌های M4 با ۴۷/۳ درصد و ASM1 با ۱۳/۱ درصد پیشرفت نهایی نکروز به ترتیب بیشترین و کمترین علائم را نشان دادند. بر این اساس سه ژنوتیپ در گروه نیمه حساس، یازده ژنوتیپ در گروه نیمه مقاوم و دو ژنوتیپ در گروه مقاوم قرار گرفتند و تنها به رقم اصفهان در گروه حساس طبقه‌بندی شد. پیشرفت بیماری طی روزهای ابتدایی استقرار باکتری در میزبان، با میزان پیشرفت نهایی آن ارتباطی نداشت.

واژه‌های کلیدی: درخت به، ژنوتیپ، آتشک، *Erwinia amylovorn*، pEA29.

نویسنده مسئول: hamidabdollahi@spii.ir تلفن: ۰۲۶۱-۶۷۰۲۵۴۱

مقدمه

بیماری آتشک (Fire blight) از معضلات مهم کشت و پرورش درختان میوه دانه‌دار در کشور است. این بیماری در بیش از چهل کشور از پنج قاره دنیا گزارش شده است (van der Zwet and Bonn, 1999). باکتری عامل بیماری آتشک *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow *et al.* به خانواده انتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) تعلق دارد که یک باکتری میله‌ای شکل، دارای کپسول و تاژک‌های محیطی است (Thomson, 1992). دمای بهینه رشد برای این باکتری ۲۱ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد است (van der Zwet and Keil, 1979) و از ویژگی‌های عمده آن همگونی بسیار زیاد جدایه‌های آن است که بر اساس روش‌های معمول سرولوژیک قابل تفکیک نیست (Momol and Aldwinckle, 2000). این بیماری اولین بار در اواخر قرن هجدهم، در دره رود هادسون واقع در ایالت نیویورک مشاهده و در سال ۱۸۸۰ میلادی گزارش شد. بیماری آتشک در اواخر ۱۹۵۰ از انگلستان، در سال ۱۹۶۲ از مصر، ۱۹۶۶ از لهستان و هلند، ۱۹۶۸ از دانمارک، ۱۹۷۱ از آلمان، ۱۹۷۲ از فرانسه و بلژیک، ۱۹۸۵ از ایرلند، سوئد، نروژ و یونان، ۱۹۸۸ از لبنان، ۱۹۸۹ از ایران و ۱۹۹۰ از ارمنستان گزارش شده است. بیماری آتشک در ایران، اولین بار در برغان کرج مشاهده وگزارش شد (Zakeri and Sharifnabi, 1991). بیماری طی سال‌های اخیر از شمال و مرکز به شرق کشور حرکت و استان‌های خراسان و سمنان را آلوده کرده است.

به منظور مهار بیماری آتشک هیچ روش منفردی کفایت نمی‌کند و ترکیبی از اقدامات جهت کاهش بیماری ضروری است. در بین روش‌های مبارزه با این بیماری، انتخاب ارقام متحمل مهم‌ترین روش است، به این دلیل که نه تنها سبب کاهش شدت بیماری خواهد شد، بلکه کارآیی سایر روش‌های مبارزه را می‌افزاید (van der Zwet and Keil, 1979). با توجه به طغیان شدید بیماری در دهه ۷۰ شمسی در مناطق کرج، قزوین و سلماس، اولین برنامه گزینش ارقام متحمل سیب و گلابی توسط معروفی و مصطفوی (Maroofi and Mostafavi, 1996) انجام و شماری از ارقام متحمل به طور مقدماتی معرفی شدند. متعاقب آن طی دو برنامه مستقل ارزیابی مقاومت ارقام سیب و گلابی کشور به بیماری در شرایط گلخانه‌ای توسط داوودی (Davoudi, 1998) و در شرایط باغی توسط عبداللهی و مجیدی هروان (Abdollahi and Majidi Heravan, 2005) مورد بررسی و ارقام متحمل این دو محصول با خصوصیات کیفی برتر میوه معرفی و به منظور احداث باغ‌های جدید خصوصاً در درخت گلابی مورد استفاده قرار گرفت (Abdollahi, 2010). پس از آن ملکی بالاجو و همکاران (Maleki Balajoo *et al.*, 2011) به

ارزیابی مقاومت تعدادی از ارقام و ژنوتیپ‌های سیب کلکسیون جدید ژرم‌پلاسم سیب بومی کشور پرداختند. در این تحقیق ۵٪ ارقام و ژنوتیپ‌های مقاوم، ۱۷٪ نیمه مقاوم، ۱۸٪ نیمه حساس، ۲۸٪ حساس و ۳۲ ٪ بسیار حساس بودند. آن‌ها چنین نتیجه گیری کردند که در بین ژرم‌پلاسم سیب بومی ایران، نسبت ارقام حساس به بیماری آتشک زیاد است. در ارزیابی ارقام مختلف درختان میوه دانه‌دار به آتشک، همبستگی بالایی بین نتایج حاصل از آلودگی طبیعی در باغ و ارزیابی گلخانه‌ای (Paulin and Lelezec, 1987) و همچنین شاخص‌های مختلف ارزیابی به بیماری شامل سه شاخص بلتسویل، فراوانی سرشاخه‌های آلوده و شاخص حساسیت واریته‌ای (Abdollahi and Majidi Heravan, 2005) گزارش شده است. وجود این همبستگی‌ها سبب اطمینان از تعمیم نتایج ارزیابی‌های گلخانه‌ای نسبت به بیماری به شرایط باغی شده است. در ارزیابی‌های باغی انجام شده در کشور، بالاترین فراوانی ارقام کاملاً مقاوم به ترتیب در گروه سیب‌های ارقام تیپ اسپور (۶۶/۷ درصد)، ارقام داخلی (۵۹/۵ درصد) و در نهایت ارقام خارجی (۴۳/۶ درصد) مشاهده شده است. همچنین میزان فراوانی ارقام کاملاً مقاوم در ارقامی که از نواحی شمال شرقی کشور منشأ گرفته بودند تقریباً دو برابر ارقام منشأ گرفته از نواحی شمال غرب بود (Abdollahi and Majidi Heravan, 2005).

در بررسی دیگر روی ارزیابی مقاومت ارقام گلابی، اکثر ارقام در شرایط طبیعی آلوده شدند ولی شدت بیماری به طور معنی‌داری در بین ارقام تفاوت داشت. در این ارزیابی ۸۱/۴ درصد از ارقام گلابی خیلی حساس و ۱۸/۶ درصد نیمه حساس گزارش شدند (Davoudi *et al.*, 2000). به منظور ارزیابی ارتباط صفات رویشی و زایشی روی تحمل به بیماری و استفاده از این صفات به عنوان مارکرهای مورفولوژیک در برنامه‌های اصلاحی این صفات در سیب (Abdollahi and Majidi Heravan, 2005) و گلابی (Abdollahi and Tahzibi, 2009) مورد بررسی قرار گرفتند.

با توجه به اهمیت اقتصادی سیب و گلابی در کشور، ارزیابی مقاومت به بیماری در ابتدا صرفاً روی ارقام این دو محصول متمرکز شده بود. با توجه به خسارت آتشک روی درختان به و اختصاص بخش عمده‌ای از تولید جهانی این میوه به کشور، اطلاعات موجود روی تحمل ارقام به نسبت به آتشک محدود بوده و همچنین با توجه به عدم شباهت ارقام داخلی و خارجی نتایج مطالعات خارج از کشور کاربرد چندانی نداشت، لذا اولین برنامه ارزیابی مقاومت به بیماری آتشک روی ارقام و ژنوتیپ‌های به منطقه مرکزی ایران انجام (Abdollahi *et al.*, 2008) و در این ارزیابی دو ساله، رقم به اصفهان در صورت پیوند روی همان گونه بیش از سایر ژنوتیپ‌ها از خود

تحمل نشان داد. در این تحقیق هیچ یک از ژنوتیپ‌های به مورد ارزیابی تحمل مطلوبی به آتشک نداشتند. همچنین استفاده از پایه زالزالک در مقایسه با پایه به سبب بیش‌تر شدن حساسیت اغلب ارقام از جمله به اصفهان به بیماری شد (Mehrabi Pour *et al*., 2010). به منظور ادامه بررسی مقاومت ارقام و ژنوتیپ‌های به کشور به آتشک برنامه جمع‌آوری و احداث کلکسیون به با جمع‌آوری ژنوتیپ‌های استان‌های شمالی، شمال غرب و شمال شرق کشور ادامه یافت (Abdollahi *et al*., 2008). ارزیابی مقدماتی خصوصیات رویشی و زایشی شماری از این ارقام و ژنوتیپ‌ها بیانگر تفاوت قابل توجه خصوصیات مورفولوژیک آن‌ها با ژنوتیپ‌های منطقه مرکزی است (Mohammad Zadeh, 2010؛ Razavi *et al*., 1999).

با توجه به نبود ژنوتیپ یا رقم دارای مقاومت قابل توجه به بیماری آتشک در مواد گیاهی منطقه مرکزی و تنوع قابل توجه ظاهری مشاهده شده بین ژنوتیپ‌های مناطق مختلف کشور، این تحقیق با هدف ارزیابی دو گروه مهم از ژنوتیپ‌های به کشور شامل ژنوتیپ‌های مناطق شمال و شمال شرق کشور به بیماری طرح‌ریزی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

در بهار سال ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ از باغ‌های آلوده به بیماری آتشک در مناطق مختلف از جمله قزوین، سمنان، لرستان و آذربایجان بازدید و نمونه‌های دارای علائم جمع‌آوری شد. پس از ضد عفونی سطحی نمونه‌ها، از حد فاصل بافت سالم و آلوده قسمتی جدا و سوسپانسیون باکتری توسط آب مقطر استریل تهیه و سپس روی محیط کشت LB جامد به صورت مخطط در ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای رشد باکتری‌های موجود در نمونه کشت شد. پس از دو تا سه روز کلونی‌های کوچک، براق، کرم تا شیری رنگ و محدب با شباهت ظاهری به کلونی‌های باکتری *E. amylovora* انتخاب شدند. علاوه بر جدایه‌های فوق، پنج جدایه شامل K1، K2، S1، Z1 و Z2 که قبلاً در بخش تحقیقات باغبانی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر جداسازی و مورد استفاده قرار گرفته بود همراه با یک جدایه Ea273 از کلکسیون کشت‌های تیپ آمریکا (ATCC) که از طریق کشور ایتالیا تهیه و تامین شد مورد استفاده و مقایسه قرار گرفت.

به منظور شناسایی جدایه‌هایی که در این تحقیق از مناطق مختلف کشور جمع‌آوری شده بودند (کلیه جدایه‌ها به غیر از جدایه‌های K1، K2، S1، Z1 ، Z2 و Ea273)، آزمون‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی شامل آزمون لوان (Lelliott and Stead, 1987)، واکنش گرم با حلالیت در پتاس سه درصد (Suslow *et al*., 1982)، ایندول (Dye, 1968)، آزمون رشد هوازی، بی‌هوازی (Hugh and Leifson, 1953)، واکنش تولید

مـــــــواد احیاکننـــــــده از ســـــــاکاروز (Fahy and Hayward, 1983)، فـسفاتاز (Cowan and Steel, 1965)، متیـل رد و اسـکولین (Dye, 1968)، هیـدرولیز چربـی (Sierra, 1957)، احیای نیترات، تولید کاتـالاز، تولیـد اکـسیداز، تولیـد لـسیتیناز، تولیـد اوره‌آز، هیدرولیز نشاسته، هیـدرولیز ژلاتـین، تولیـد گـاز H_2S از سیستئین، تولید رنگدانه صورتی بر روی محیط کشت YDC، تولید رنگ فلورسنت روی محـیط کـشت King's B، اسـتفاده از گلـوکز، ساکاروز، فروکتوز، گالاکتوز، زایلوز، ترهـالوز، سیترات، سوربیتول، سالیسین، اسـکولین، ریبـوز، آرابینوز، سلوبیوز، اینوزیتول، مالونات، اینـولین، تارتارات، پروپیونات، گلوکانات و آسـکوربات انجام شد (Schaad, 1988).

بـــه منظـــور ارزیـــابی بیمـــاری‌زایـــی باکتری از آزمون‌های واکنش فوق‌حـساسیت در توتـون (Skerman, 1967) و تولیـد تراوشـات باکتریـایی بـر روی میـوه‌هـای نـارس گلابـی (Schaad *et al*., 2001) استفاده شد. برای انجام آزمون فوق‌حساسیت، دمبرگ‌هـای توتـون رقـم سامسون توسط سوسپانسیون باکتری با کـدورت ۲ به صورت تزریق با سرنگ انـسولین مایـه‌زنـی شدند. در آزمون تولیـد تراوشـات باکتریـایی بـر روی میوه‌های نارس گلابی، پس از ضـدعفـونی سطح میوه‌های نارس گلابی با اتانول ۹۶ درصد، سوسپانسیون باکتری بـه داخـل میـوه مایـه‌زنـی و میـوه‌هـا در شـرایط مرطـوب نگهـداری شـدند. همچنـین آزمـون‌هـای تکمیلـی بیمـاریزایی در شرایط گلخانه و درون شیشه روی سرشاخه‌هـای حساس گلابی رقـم ویلیـامز (Williams) انجـام شـد و در نهایـت مخلـوطی از جدایـه‌هـای بیماری‌زاتر که در مدت کوتاه‌تر و با شدت قابل توجه‌تری سبب ایجاد نکروز روی سرشاخه‌هـای حساس گلابی رقم ویلیامز و همچنین میـوه‌هـای نابالغ گلابی شده بودند گزینش شدند.

بـــرای شناســـایی بـــاکتری از روش Nested PCR استفاده شد. بـه منظـور اسـتخراج پلاســمید pEA29 از روش جــوش (Boil) سوسپانـسیون بـاکتری (OD=۱) در ۹۵ درجـه سانتی‌گراد به مدت ده دقیقه استفاده شد. پـس از استخراج پلاسـمید، نـسبت بـه انجـام PCR روی پلاسمید استخراجی با استفاده از جفـت آغـازگر های لانه‌گزینی شده (Nested Primers) شـامل دو جفـت آغـازگر بیرونـی Aj75 و Aj76 (McManus and Jones, 1995) و دو جفـت آغازگر درونـی PEANT1 و PEANT2 اقـدام شـد (Llop *et al*., 2000). بـرای رقیـق کـردن آغازگرها نسبت به تهیه محلـول مـادری هریـک با غلظت ۱۰ پیکومول بـر میکرولیتـر اقـدام شـد. برای انجام واکنش به حجم ۲۵ میکرولیتر، مقدار ۰/۹ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهـای پیـشرو و پـس رو، همچنـین ۰/۴ میکرولیتـر از محلـول ۵۰ میلی‌مـولار $MgCl_2$، ۲ میکرولیتـر از محلـول ۱۰X بـافر PCR، ۰/۵ میکرولیتـر از محلـول ۱۰ میلی‌مولار $dNTP_s$، ۰/۳ میکرولیتر از محلول ۵ واحد بر میکرولیتـر Taq DNA Polymerase و یک میکرولیتر سوسپانـسیون حـاوی پلاسـمید

استفاده شد. پروفیل واکنش PCR شامل مرحله واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه، مرحله واسرشت در ۹۴ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها در ۶۰ و ۵۶ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برای آغازگرهای بیرونی و درونی هر دو به مدت ۲ دقیقه و درنهایت مراحل توسعه و توسعه نهایی هر دو در ۷۴ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به مدت ۲ و ۱۵ دقیقه بر اساس مک مانوس و جونز (McManus and Jones, 1995) و لوپ و همکاران (Llop *et al*., 2000) بود. برای تعیین آلودگی همواره یک تیوب حاوی اجزاء واکنش PCR به غیر از DNA الگو بود استفاده شد. برای مشاهده محصول PCR از ژل آگاروز ۱/۵ درصد استفاده و محصولات واکنش روی دستگاه ترانس ایلومینیتور در طول موج ۳۱۲ نانومتر ارزیابی شدند.

ارزیابی مقاومت ژنوتیپ‌ها به صورت زیر انجام شد:

به منظور تکثیر ژنوتیپ‌های به مورد نیاز، در سال ۱۳۸۴ نسبت به کشت بذر زالزالک بر اساس روش معمول نهالستان‌های کشور اقدام و پس از جوانه‌زنی و رشد بذرها در خزانه، دانهال‌های حاصل در زمستان ۱۳۸۵ به محل اصلی نهالستان منتقل شده و در تابستان سال بعد با ژنوتیپ‌های گزینش شده استان‌های گیلان و خراسان رضوی پیوند شدند. به این منظور، هفت ژنوتیپ گزینش شده درخت به غرب استان گیلان، با کدهای AS، ASM و ASP و نه ژنوتیپ به گزینش شده استان خراسان رضوی، با کد M همراه با شاهد به رقم اصفهان (Razavi *et al*., 1999) که در دیگر برنامه‌های تحقیقاتی با نام به رقم اصفهان و یا کد KVD3 نامگذاری شده است (Abdollahi *et al*., 2008) پیوند و در بهار سال ۱۳۸۷ به منظور رشد پیوندک سربرداری و در زمستان همان سال نسبت به انتقال مواد گیاهی رشد کرده به گلخانه برای تزریق باکتری اقدام شد.

به منظور تهیه مایه باکتری، کشت‌های شب‌گذران در محیط کشت مایع LB با کدورت ۱، در طول موج ۶۰۰ نانومتر در سانتریفیوژ رسوب داده و با حجم معادل بافر فسفات (pH=7) رقیق شد. غلظت بهینه مایه باکتری بر اساس آزمایش‌های مقدماتی تعیین شده بود (Abdollahi, 2003). ارزیابی‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار و دو درخت در هر کرت و سه تزریق به ازاء هر درخت در هفته آخر اردیبهشت ماه انجام و مایه باکتری توسط سرنگ در سرشاخه‌ها تزریق شد. پس از تزریق مایه باکتری، کف گلخانه به مدت یک ماه مرطوب نگه داشته شد به طوری که حداقل رطوبت ۸۰ درصد و دمای گلخانه در گرم‌ترین ساعات روز از ۳۰ درجه سانتی‌گراد تجاوز نکرد. برای به حداقل رساندن احتمال فرار شاخه‌ها از آلودگی در روز بعد تزریق مجدد سرشاخه‌ها انجام شد. در این مرحله تلاش شد تا حد امکان از شاخه‌هایی با رشد حداقل ۳۰ سانتی‌متر و یا

بیش‌تر برای تزریق مایه باکتری استفاده شود، لیکن تفاوت قابل توجهی در میزان رشد رویشی ژنوتیپ‌های مناطق مختلف مشاهده شد. ارزیابی مقاومت بر اساس میزان پیشرفت نکروز در زمان‌های ۱، ۲، ۴، ۵، ۷، ۹، ۱۲، ۱۴ و ۱۷ روز بعد از باکتری و شاخص حساسیت واریته‌ای (I.V.S) در سرشاخه‌ها تعیین شد. شاخص حساسیت واریته‌ای به صورت درصد بخش آتشک زده به طول کل شاخساره یک ساله محاسبه شد و ارقام در کلاس‌های مختلف حساسیت بر اساس للزک و پائولین (Lelezec and Paulin, 1984) طبقه‌بندی شدند.

نتایج و بحث

مشخصات جدایه‌های *E. amylovora* جمع‌آوری شده از مناطق ایران در جدول ۱ و مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی جدایه‌های جمع‌آوری شده در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *E. amylovora* جمع‌آوری شده از مناطق مختلف ایران

Table 1. Characteristics of *E. amylovora* isolates collected from different parts of Iran

کد جدایه Code of isolate	گیاه میزبان Host plant	Origin مبداء		اطلاعات تکمیلی Supplementary information
		Province استان	Zone ناحیه	
Ea273	Apple	---	---	Reference strain from ATCC
K1	Apple	Tehran-Iran	Karaj	Selected and tested isolate in SPII (2004)
K2	Pear	Tehran-Iran	Karaj	Selected and tested isolate in SPII (2004)
S1	Apple	Tehran-Iran	Shahryar	Selected and tested isolate in SPII (2004)
Z1	Apple	Zanjan-Iran	Khoram Dareh	Selected and tested isolate in SPII (2004)
Z2	Pear	Zanjan-Iran	Khoram Dareh	Selected and tested isolate in SPII (2004)
1	Wild Pear	Loristan-Iran	Khoram Abad	Isolated and tested in this experiment
2	Wild Pear	Loristan-Iran	Khoram Abad	Isolated and tested in this experiment
3	Apple	Loristan-Iran	Khoram Abad	Isolated and tested in this experiment
G2-1	Pear	Ghazvin-Iran	Esmail Abad	Isolated and tested in this experiment
6	Quince	Semnan-Iran	Shah Roud	Isolated and tested in this experiment
9	Apple	Loristan-Iran	Khoram Abad	Isolated and tested in this experiment
11	Quince	Loristan-Iran	Khoram Abad	Isolated and tested in this experiment
12-1	Pear	Loristan-Iran	Khoram Abad	Isolated and tested in this experiment
12-2	Pear	Loristan-Iran	Khoram Abad	Isolated and tested in this experiment
16	Pear	Ghazvin-Iran	Esmail Abad	Isolated and tested in this experiment
32	Quince	East Azerbaijan-Iran	Marand	Isolated and tested in this experiment
33-1	Quince	East Azerbaijan-Iran	Marand	Isolated and tested in this experiment
33-2	Quince	Semnan-Iran	Shah Roud	Isolated and tested in this experiment
36	Apple	East Azerbaijan-Iran	Marand	Isolated and tested in this experiment

بر اساس آزمون‌های مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی انجام شده، جدایه‌های شماره ۱، ۲، ۳، ۹، ۱۱، ۱-۱۲ و ۲-۱۲ از استان لرستان، ۱-G۲ و ۱۶ از استان قزوین، ۳۲، ۱-۳۳ و ۳۶ از استان آذربایجان غربی و در نهایت جدایه‌های ۶ و ۲-۳۳ از استان سمنان بر اساس انطباق کامل با خصوصیات گونه *E. amylovora* در کلیه آزمون‌ها مورد

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی جدایه‌های جمع‌آوری شده *E. amylovora* با استفاده از روش تکثیر لانه گزینی شده روی پلاسمیدpEA29

Table 2. Characteristics of primers used for identification of *E. amylovora* isolates by nested amplification on pEA29

موقعیت آغازگر Primer position	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگرها Primer sequences	منبع References
External	AJ75 AJ76	5'-CGTATTCACGGCTTCGCAGAT-3' 5'-ACCCGCCAGGATAGTCGCATA-3'	(McManus and Jones, 1995)
Internal	PEANT1 PEANT2	5'-TATCCCTAAAAACCTCAGTGC-3' 5'-GCAACCTTGTGCCCTTTA-3'	(Llop *et al*., 2000)

گزینش قرار گرفتند (جدول ۱). مقایسه نتایج آزمون‌های مختلف مورفولوژیک، فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جدایه‌های جمع‌آوری شده نشان داد که تمامی جدایه‌ها به صورت یکنواخت به آزمون‌ها واکنش نشان دادند (جدول‌های ۳ و ۴). چنین یکنواختی در اولین گزارش از وقوع آتشک بر روی درخت به، در ترکیه نیز ملاحظه شد (Saygili *et al*., 2006) و به عنوان خصوصیت شاخص این باکتری مورد پذیرش است (Momol and Aldwinckle, 2000). همچنین باکتری عامل بیماری آتشک به واسطه عدم تولید رنگ فلورسنت بر روی محیط کشت King's B از *Pseudomonas syringae* و به واسطه تولید تراوشات باکتریایی روی میوه نارس گلابی از سایر باکتری‌های اعضای خانواده انتروباکتریاسه قابل تشخیص است که نتایج این آزمایش‌های تایید کننده گونه مورد نظر در این تحقیق است. همچنین بر اساس آزمایش‌های مولکولی در مرحله اول PCR، قطعاتی با طول ۷۵۰ تا ۹۰۰ جفت باز (شکل ۱) و در PCR لانه گزینی شده قطعاتی با طول ۳۹۰ تا ۴۵۰ جفت باز که مربوط به پلاسمید pEA29 است تکثیر شدند (شکل ۲). نتایج به دست آمده در این آزمایش‌های نیز با نتایج گزارش شده توسط مک مانوس و جونز (McManus and Jones, 1995) و لوپ و همکاران (Llop *et al*., 2000) در انطباق بوده و موید گونه *E. amylovora* است. از طرفی آزمون pEA29 تنها آزمونی بود که از بین آزمون‌های مختلف انجام شده روی باکتری در این تحقیق تفاوت‌هایی را بین جدایه‌های مختلف باکتری نشان داد که در گزارش‌های فوق نیز وجود تنوع در طول قطعه تکثیری در جدایه‌ها تایید شده است (Schnabel, and Jones, 1998).

در این تحقیق از تزریق سرشاخه‌های رشد کرده در شرایط گلخانه‌ای و سرشاخه‌های درون شیشه گلابی حساس رقم ویلیامز و تولید اوز روی میوه نابالغ گلابی برای گزینش جدایه‌های بیماری‌زاتر باکتری استفاده شد. نتایج نشان داد که بین جدایه‌ها از نظر تعداد روز مورد نیاز تا ظهور اولین علایم تفاوت مشاهده می‌شود. این

جدول ۳- آزمون های بیوشیمیایی انجام شده برای شناسایی جدایه های مختلف باکتری *E. amylovora*

Table 3. Biochemical tests used for identification of *E. amylovora* isolates

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

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

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

تفاوت در بیماری‌زایی جدایه‌ها در دیگر تحقیقات انجام شده به منظور ارزیابی مقاومت به آتشک مشاهده شده است (Viseur *et al.*, 1987). بر اساس نتایج جدایه‌های K1، Z1، ۲ و ۳۶ به تعداد روز کم‌تری برای ظهور علائم نیاز داشته و در آزمایش ظهور اوز روی میوه نابالغ گلابی و مایه‌زنی سرشاخه‌های درون شیشه و گلخانه‌ای گلابی پس از ۳ تا ۴ روز اولین علائم را بروز دادند. ظهور علائم در دیگر جدایه‌های باکتری بیش از ۴ روز و تا ۷ روز ادامه یافت. براین اساس چهار جدایه فوق به عنوان مایه باکتری برای ارزیابی‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفتند.

در آزمایش ارزیابی مقاومت، نتایج اولیه در این تحقیق نشان داد که در کلیه تکرارهای آزمایش میزان فرار از آلودگی بسیار کم و نزدیک به صفر بود. در تحقیق انجام شده توسط تزیانتوس و سالیداس (Tsiantos and Psallidas, 2004) روی ارزیابی حساسیت به آتشک در ارقام ازگیل ژاپنی، سیب و گلابی این محققین از

جدول ۴- آزمون‌های مصرف کربوهیدرات‌های مختلف و بیماری‌زایی انجام شده برای شناسایی جدایه‌های مختلف باکتری *E. amylovora*

Table 4. Carbohydrates and virulence tests used for identification of *E. amylovora* isolates

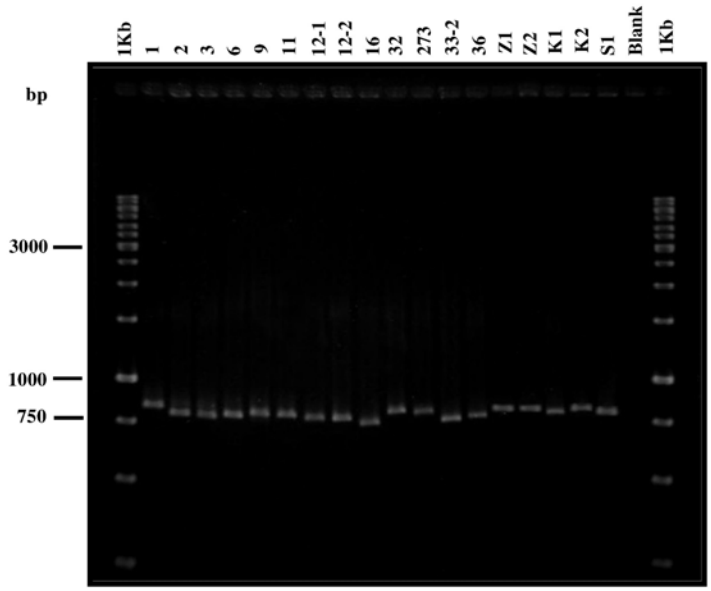
آزمون Test	پاسخ Response
Glucose	+
Sucrose	+
Citrate	+
Fructose	+
Galactose	+
Ribose	+
Xylose	+
Arabinose	+
Esculin	+
Salicin	+
Trehalose	+
Sorbitol	+
Cellobiose	+
Inositol	+
Malonate	-
Inolin	-
Tartrate	-
Propionate	-
Gluconate	-
Ascorbate	-
Hypersensitivity Test on Tobacco Leaves	+
Ooze Production on Immature Fruits	+
Virulence on Pear Shoots in Greenhouse	+
Virulence on Pear Shoots *in Vitro*	+

- و + به ترتیب بیانگر پاسخ یا رشد منفی و مثبت باکتری است.

- and +, indicates negative and positive reaction or growth or effects of bacteria, respectively.

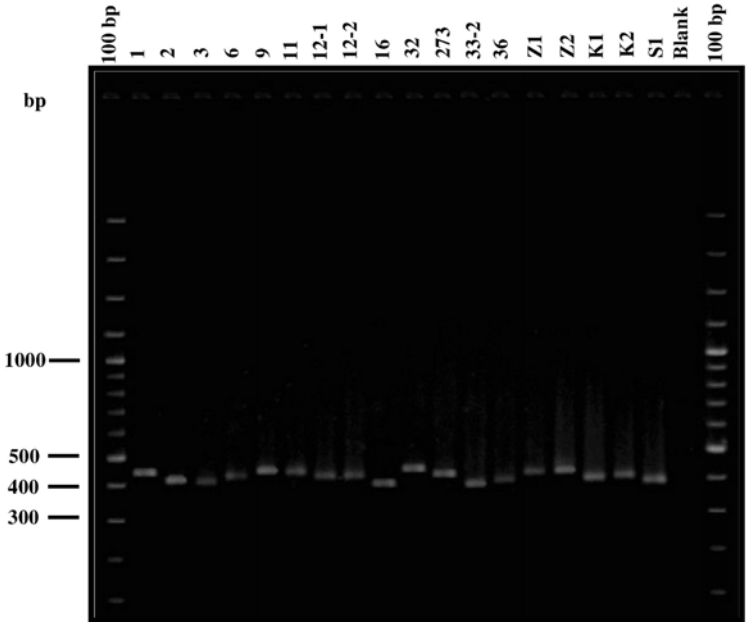
شاخص‌های فراوانی موفقیت آلودگی و شدت نکروز استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که به دلیل حساسیت بالای ارقام ازگیل ژاپنی به آتشک درصد موفقیت مایه‌زنی در این گونه بالا و در ارقام سیب و گلابی که طیفی از مقاومت را نشان داده بودند درصد موفقیت مایه‌زنی بسته به رقم متغیر بود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در ژنوتیپ‌های به بررسی شده مناطق شمال و شمال شرقی کشور، فراوانی موفقیت آلودگی ارقام در تمامی ژنوتیپ‌ها یکنواخت بود و فرار از آلودگی مشاهده نشد، به همین دلیل شاخص فراوانی در این تحقیق فاقد کارآیی بود. به نظر می رسد بالا بودن موفقیت در آلوده سازی سر شاخه‌های به در این‌جا از حساسیت زیادتر این گونه نسبت به سایرگونه‌های میزبان، فراهم کردن شرایط مایه‌زنی موفق و تکرار مایه‌زنی در روزهای بعد ناشی می‌شود.

مقایسه شاخص حساسیت واریته‌ای در



شکل ۱- الگوی باندی حاصل از تکثیر پلاسمید pEA29 باکتری با جفت آغازگر بیرونی Aj75 و Aj76

Fig. 1. Banding pattern of amplified pEA29 fragments by Aj75 and Aj76 external



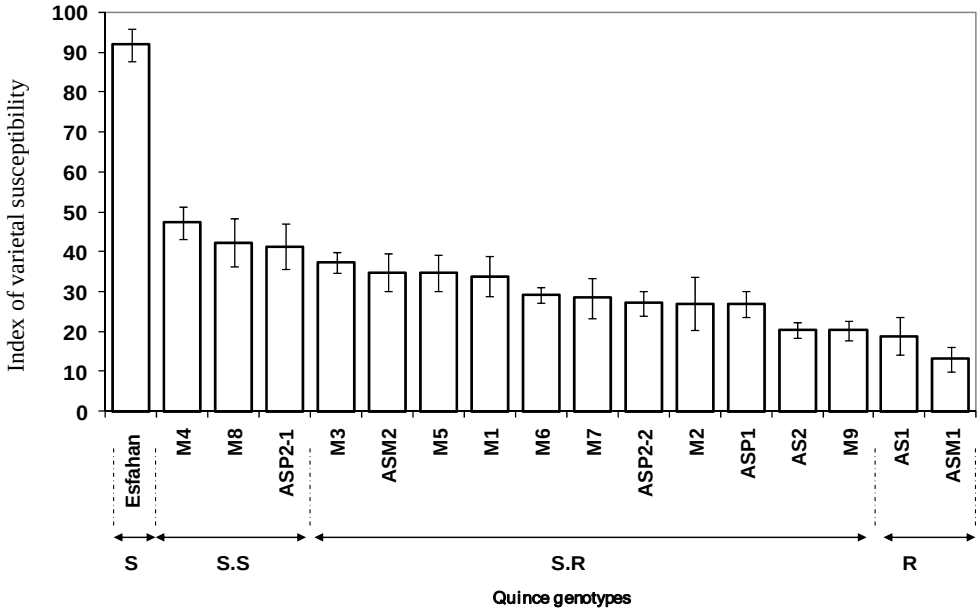
شکل ۲- الگوی باندی حاصل از تکثیر پلاسمید pEA29 باکتری با جفت آغازگر درونی PEANT1 و PEANT2

Fig. 2. Banding pattern of amplified pEA29 fragments by PEANT1 and PEANT2 internal primers

ژنوتیپ‌های رشد یافته بر روی پایه به نشان داد که کلیه ژنوتیپ‌های مورد مطالعه نسبت به رقم شاهد به اصفهان مقاومت بیش‌تری به آتشک داشتند. نتایج پیشرفت نهایی نکروز نشان داد که ژنوتیپ M4 با ۴۷/۳ درصد و ژنوتیپ ASM1 با ۱۳/۱ درصد پیشرفت نهایی نکروز به ترتیب

بالاترین و پائین‌ترین میزان آلودگی را داشتند. بر این اساس ژنوتیپ‌های ASP2-1، M4 و M8 در گروه نیمه حساس، ژنوتیپ‌های AS2، ASM2، ASP1، ASP2-2، M1، M2، M3، M5، M6، M7 و M9 در گروه نیمه مقاوم و ژنوتیپ‌های AS1 و ASM1 در گروه مقاوم قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده در ژنوتیپ‌های مشخص شده این مناطق، ارقام حساس و خیلی حساس مشاهده نشد (شکل ۳). مقایسه میزان رشد ظاهری ژنوتیپ‌های به استان‌های خراسان و گیلان در مقایسه با ارقام به اصفهان بیانگر رشد محدودتر و پاکوتاه کنندگی بیش‌تر ژنوتیپ‌های به این دو استان هم در شرایط گلخانه‌ای (Mehrabi Pour, 2009) و هم در شرایط باغی (Alipour, 2011) است که خود می‌تواند به عنوان عاملی برای تحمل بیش‌تر این ژنوتیپ‌ها به بیماری آتشک باشد. در بررسی باغی انجام شده ژنوتیپ‌های گیلان تحمل بهتری به خشکی، آهک خاک و در نتیجه کلروز برگی ناشی از کمبود آهن نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها نشان دادند. همچنین میزان پاکوتاهی در میان ژنوتیپ‌های استان گیلان فراوان‌تر و اغلب این مواد پس از گذشت سه سال بعد از کاشت در کلکسیون باردهی و میوه‌های کم کیفیتی تولید کردند (Alipour, 2011). مقایسه این نتایج با نتایج ارزیابی نقش پایه روی حساسیت به آتشک ارقام و ژنوتیپ‌های به نشان می‌دهد که در ژنوتیپ‌های منطقه مرکزی استفاده از پایه زالزالک سبب حساسیت بیش‌تر این ارقام به بیماری آتشک شده است (Mehrabi Pour *et al.*, 2010). لذا در صورتی که نقش این پایه در افزایش حساسیت ارقام به یکسان باشد، ژنوتیپ‌های به مورد ارزیابی روی پایه به قادر به بروز تحمل بیش‌تری نیز خواهند بود که نیازمند بررسی است.

در منحنی پیشرفت نکروز، مطابق با شاخص حساسیت واریته‌ای، ژنوتیپ‌های M4 و ASM1 در نهایت به ترتیب بیشترین و کمترین میزان پیشرفت بیماری را نشان دادند. یادداشت‌برداری‌ها در روزهای بعد از آلوده‌سازی نشان داد علی‌رغم این که ژنوتیپ ASM1 نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها سرعت پیشرفت کمی داشت ولی از زمان شروع علائم تا چند روزاولیه استقرار بیماری نسبت به ژنوتیپ‌های AS1، ASM2 و ASP2-1 سرعت پیشرفت بالاتری داشت و پس از سپری شدن این دوره تا پایان زمان توقف علائم بیماری با سرعت کم‌تری نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها سبب ایجاد نکروز در سرشاخه‌ها شد. همچنین ژنوتیپ M4 که نسبت به سایر ژنوتیپ‌ها شاخص حساسیت واریته‌ای بالاتری داشت، در منحنی پیشرفت نکروز، تا روز پنجم یادداشت‌برداری دارای سرعت پیشرفت نکروز بالاتری نسبت به بقیه ژنوتیپ‌ها بود ولی سرعت آن طی روزهای پنجم تا هفتم یادداشت‌برداری اندکی کاهش یافت و پس از آن دوباره به رشد صعودی خود ادامه داد (شکل ۴). با توجه به



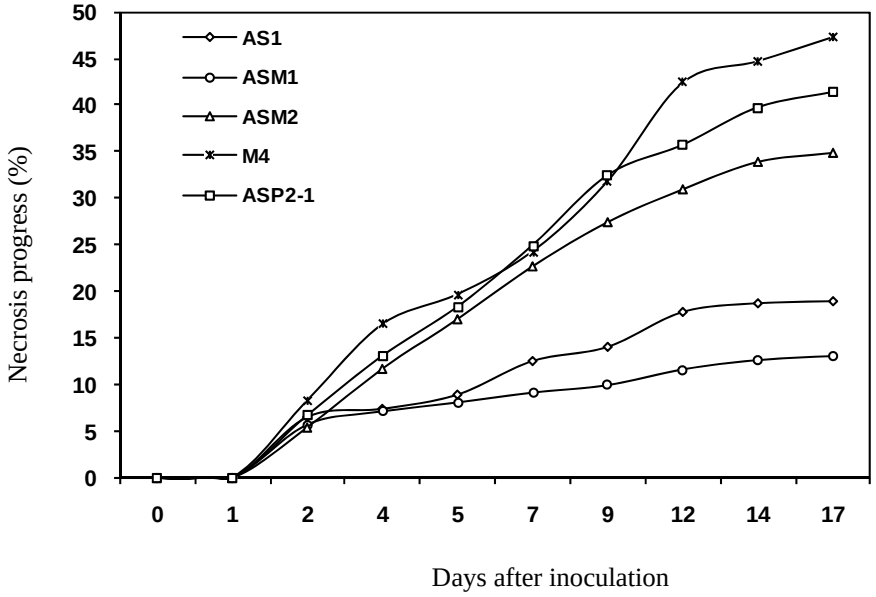
شکل ۳- مقایسه شاخص حساسیت واریته‌ای در سرشاخه‌های آلوده شده ژنوتیپ‌های به و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها در کلاس‌های مختلف حساسیت بر اساس روش للزک و پائولین (Lelezec and Paulin, 1984).

علائم اختصاری شامل S: حساس؛ S.S: نیمه حساس؛ S.R: نیمه مقاوم و R: مقاوم

Fig. 3. Comparison of index of varietal susceptibility in the inoculated shoots of quince genotypes and susceptibility classification of genotypes based on Lelezec and Paulin (1984). Abbreviations are: S: Susceptible; S.S: Moderately -Susceptible; S.R: Moderately-Resistant and R: Resistant

نوسان سرعت پیشرفت نکروز در روزهای اولیه پس از آلوده‌سازی با عامل بیماری، این نتیجه حاصل شد که پیشرفت بیماری طی روزهای ابتدایی استقرار باکتری در گیاه پس از آلوده‌سازی سرشاخه‌ها، با مقاومت نهایی رقم ارتباطی ندارد.

مقایسه مقاومت ژنوتیپ‌ها میان دو منطقه گیلان و خراسان نشان داد که از میان ژنوتیپ‌های بررسی شده منطقه گیلان، دو ژنوتیپ در گروه مقاوم قرار گرفتند در حالی‌که در میان ژنوتیپ‌های بررسی شده منطقه خراسان، نه تنها ژنوتیپی در گروه مقاوم معرفی نشد، بلکه حساس‌ترین ژنوتیپ بررسی شده در این تحقیق به منطقه خراسان تعلق داشت. نتایج بیش از یک قرن تحقیق بر روی روش‌های مختلف مبارزه با آتشک نشان داده است که استفاده از ارقام مقاوم یا متحمل به بیماری نه تنها به طور طبیعی موجب کاهش جمعیت باکتری در باغ می‌شود بلکه هزینه سایر روش‌های کنترل بیماری را نیز کاهش می‌دهد (Paulin and Lelezec, 1987؛ Paulin and Lespinasse, 1987). با توجه به تحمل مشاهده شده در ژنوتیپ‌های به ارزیابی شده و همچنین ارزیابی‌های اولیه انجام شده روی کیفیت میوه این ارقام و ژنوتیپ‌ها، می‌توان



شکل ۴- مقایسه سرعت پیشرفت نکروز در سرشاخه های آلوده شده ژنوتیپ های مختلف به
Fig. 4. Comparison of necrosis progress rate in the inoculated shoots of different quince genotypes

جمع‌بندی کرد که میزان پاکوتاه کنندگی و تحمل به تنش‌های محیطی این مواد بیش از ژنوتیپ‌های به اصفهان که در تحقیق قبلی توسط عبداللهی و همکاران (Abdollahi *et al*., 2008) مورد ارزیابی قرار گرفتند است. نتایج ارزیابی تنوع ژنتیکی این مواد نیز با استفاده از مارکر SSR که توسط خرمدل آزاد و همکاران (Khoram Del Azad and Abdollahi, 2010) انجام شده موید این است که ژنوتیپ‌های به خراسان، اصفهان و گیلان نه تنها بر اساس شواهد مورفولوژیک بلکه بر اساس ارزیابی‌های ژنتیکی روی DNA نیز به کلی از یک دیگر متمایز بوده و در سه گروه مجزا قابل تفکیک هستند.

همچنین کیفیت میوه در اغلب ژنوتیپ‌های گیلان و خراسان پایین، میوه کوچک‌تر و خصوصاً در ژنوتیپ‌های به گیلان پاکوتاهی فراوان و میوه بسیار دیررس و متحمل به کرم سیب و به است که حاکی از فراوانی ژنی‌های تحمل به تنش‌های محیطی در آن‌ها و تایید کننده نقش گزینش طبیعی روی تحمل بالاتر این مواد است. لذا احتمال می‌رود با ارزیابی‌های تکمیلی در آینده روی کیفیت میوه بتوان از میان ژنوتیپ‌های به خراسان ارقامی را با کیفیت میوه متوسط تا خوب برای مناطق با خطر زیاد حمله آتشک معرفی کرد، در حالی که با توجه به کیفیت پایین میوه ژنوتیپ‌های به گیلان، استفاده از این مواد ظاهراً در برنامه‌های دورگ گیری

با هدف انتقال ژن‌های مقاومت امکان پذیر خواهد بود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از کلیه همکاران بخش تحقیقات باغبانی مؤسسه اصلاح و تهیه نهال و بذر و آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی واحد علوم و تحقیقات که در فراهم آوردن شرایط انجام این تحقیق ما را یاری کردند صمیمانه تقدیر و تشکر می‌شود.

References

Abdollahi, H. 2003. Molecular biology of interaction between *Erwinia amylovora* (burr.) Winslow *et al.* and different genotypes of pear (*Pyrus communis* L.). Ph.D. Thesis, University of Florence, Florence, Italy. 210 pp.

Abdollahi, H. 2010. Pear, Botany, Cultivars and Rootstocks. Plant Production. Agricultural Education Publisher, Tehran, Iran. 200pp. (in Persian).

Abdollahi, H., Ghasemi, A., and Mehrabi Pour, S. 2008. Evaluation of fire blight resistance in some quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes, II. Resistance of genotypes to the disease. Seed and Plant 24: 529-541 (in Persian).

Abdollahi, H., Ghasemi, A., and Adli, M. 2008. Collecting and collection establishment of *Cydonia oblonga* Mill. germplasm from different regions of Iran. 10th Iranian Congress of Genetic (Plant Section), 21-23 May 2008, Tehran, Iran.

Abdollahi, H., and Majidi Heravan, E. 2005. Relationship between fire blight resistance and different characteristics of apple (*Malus domestica* Borkh.) cultivars. Seed and Plant 21: 501-513 (in Persian).

Abdollahi, H., and Tahzibi, F. 2009. Correlation analysis between fire blight resistance and morphological traits in some pear (*Pyrus communis* L.) cultivars. Fruit Growing, The Journal of National Academy of Belorussia 19: 90-95.

Alipour, M. 2012. Physiological, morphological and molecular characterization of some Iranian quince (*Cydonia oblonga* Mill.) cultivars and genotypes. MSc. Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran. 110pp. (in Persian).

Cowan, S. T., and Steel, K. L .1965. Manual of the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press, Cambridge. London. 352pp.

Davoudi, A. 1998. Evaluation of fire blight resistance in some apple and pear cultivars. MSc. Thesis, University of Tabriz, Tabriz, Iran. 200pp. (in Persian).

Davoudi, A., Majidi Heravan, E., Rahimian, H., and Valizadeh, M. 2000. Evaluation of resistance to fire blight of some apple and pear cultivars. Proceedings of the 14th Iranian Plant Potection Congress, Volume 2: Plant Diseases and Weeds, Isfahan, Iran, p. 139 (in Persian).

Dye, D. W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia* L. The "Amylovora" group. New Zealand Journal of Horticultural Science 11: 590-607.

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, New York, USA.

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.

Khoram Del Azad, M., and Abdollahi, H. 2010. Genetic diversity of quince (*Cydonia oblonga* L.) genotypes of national quince collection of Iran. 11th Iranian Congress of Genetic (Plant Section), 22-24 May 2010, Tehran, Iran. (in Persian).

Lelezec, M., and Paulin, J. P. 1984. Shoot susceptibility to fire blight of some apple cultivars. Acta Horticulturae 151: 277-287.

Lelliott, R. A., and Stead, D. E. 1987. Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. Methods in Plant Pathology, Vol. 2, Blackwell Scientific Publications, London, UK. 224pp.

Llop, P., Bonaterra, A., Penalver, J., and Lopez, M. M. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Applied and Environmental Microbiology 66: 2071-2078.

Maleki Balajoo, O., Keshavarzi, M., Rezaei Danesh, Y., Damyar, S., and Jaafari, M. 2011. Response of some apple genotypes from local apple collection of Iran to *Erwinia amylovora*. Seed and Plant Improvement Journal 27-1: 23-36 (in Persian).

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

Mehrabi Pour, S. 2009. The role of rootstock and evaluation of resistance to fire blight in quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes in different parts of the country. MSc. Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran. 108pp

(in Persian).

Mehrabi Pour, S., Abdollahi, H., and Ghasemi, A. 2010. Study of rootstock role on susceptibility of some quince genotypes to fire blight disease. Applied Entomology and Phytopathology 78: 25-42 (in Persian).

McManus, P. S., and Jones, A. L. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR-dot-blot and reverse-blot hybridizations. Phytopathology 85: 618-623.

Mohammad Zadeh, B. 2010. Identification and moprphological evaluation of native quince cultivars in Ardabil province. MSc. Thesis, Islamic Azad University, Abhar, Abhar Branch, Iran, 135pp. (in Persian).

Momol, M. T., and Aldwinckle, H. S. 2000. Genetic discovery 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 International Publishing, Wallingford, UK.

Paulin, J. P., and Lelezec, M. 1987. Shoot and blossom susceptibility to fire blight of apple cultivars. Acta Horticulturae 217: 311-315.

Paulin, J. P., and Lespinasse, Y. 1987. Evaluation with different isolates of *Erwinia amylovora* of the susceptibility to fire blight of apple cultivars. Acta Horticulturae 217: 253-267.

Razavi, F., Arzani, K., and Vezvaei, A. 1999. Identification of native quince (*Cydonia oblonga* Mill.) genotypes from various regions of Isfahan province. Seed and Plant 15: 354-374. (in Persian).

Saygili, H., Aysan, Y., Mirik, M., and Sahin, F. 2006. Severe outbreak of fire blight on quince in Turkey. Acta Horticulturae 704: 51-54.

Schaad, N. W. 1988. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul, MN, USA. 164pp.

Schaad, N. W., Jones, J. B., and Chun, W .2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul, MN, USA. 373pp.

Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms. Antoniovan Leeuwenhock 23: 15.

Schnabel, E. L., and Jones, A. L. 1998. Instability of a pEA29 marker in *Erwinia amylovora* previously used for strain classification. Plant Disease 82: 1334-1336.

Skerman, V. B. D. 1967. A Guide for Identification of the Genera of Bacteria. Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, USA. 303pp.

Suslow, T. V., Schroth, M. N., and Isaka, M. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology 72: 917-918.

Thomson, S. V. 1992. Fire blight of apple and pear. pp. 32-65. In: Komar, J., and Chaube, H. S.(eds.) Plant Disease of International Importance, Vol. III. Disease of Fruit Crops. Prentice Hall, APS Press, New York, USA.

Tsiantos, J., and Psallidas, P. 2004. Fire blight resistance in various loquat, apple and pear cultivars and selections in Greece. Journal of Plant Pathology 86: 227-232.

van der Zwet, T., and Bonn, W. G. 1999. Recent spread and current worldwide distribution of fire blight. Acta Horticulturae 489: 167-168.

van der Zwet, T., and Keil, H. L. 1979. Fire Blight: A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. United States Department of Agriculture. Agricultural Handbook No. 510, 650 pp.

Viseur, J., Figueroa M., and Tapia, Y. 1987. *In vitro* co-culture as a tool for the evaluation of fire blight resistance in pear and apple. Acta Horticulturae 217: 273-282.

Zakeri, Z., and Sharifnabi, B. 1991. Fire blight of pear in Karaj. Proceedings of the 10th Iranian Plant Protection Congress, Kerman, Iran. page 157 (in Persian).