

خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی *Erwinia amylovora* جدا شده از درختان میوه دانه‌دار با استفاده از rep-PCR در استان اصفهان

گیلدا نجفی پور^{*}، الهام جمالی^۱ و کاووس ایازپور^۱

۱- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، گروه گیاه‌پزشکی، جهرم.

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم.

*مسئول مکاتبات gilda_najafi@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۳/۹/۱۹

چکیده

از مهر ماه ۱۳۹۰ تا شهریور ۱۳۹۱ از باغ‌های درختان سیب، به و گلابی که سوختگی سر شاخه و برگ نشان می‌دادند در مناطق مختلف استان اصفهان نمونه‌برداری شد. ۴۹ جدایه روی محیط کشت‌های SNA، NA و EMB از باغ‌های آلوده جداسازی و بر اساس آزمون‌های استاندارد باکتری‌شناسی به عنوان *Erwinia amylovora* تشخیص داده شدند. همچنین جدایه‌های حاصله از لحاظ خصوصیات فنوتیپی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی، تغذیه‌ای، دامنه میزبانی، اندازه قطعات DNA تکثیری با استفاده از آغازگرهای اختصاصی A/B و نیز خصوصیات ژنوتیپی در آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگرهای سه‌گانه ERIC، BOX و REP مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش فوق حساسیت روی توتون و شمعدانی در تمام جدایه‌ها مثبت ارزیابی شد. در مایه‌زنی جدایه‌ها روی گلابی نارس لکه‌های قهوه‌ای تا سیاه رنگ در اطراف محل مایه‌زنی دیده شد. در آزمون ردیابی بیمارگر با استفاده از آغازگر اختصاصی A/B، کلیه جدایه‌ها قطعه‌ای DNA با اندازه تقریبی ۱۰۰۰ جفت باز را سنتز کردند. در تجزیه و تحلیل داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی حاصل از rep-PCR گروه‌بندی خاصی مشاهده نشد. علاوه بر این آنالیز نتایج آزمون‌های فنوتیپی و ژنوتیپی با استفاده از rep-PCR یکنواختی زیادی را در میان سویه‌های این باکتری در استان نشان داد و کلیه جدایه‌ها صرف نظر از میزبان از ۷۱٪ همولوژی با یکدیگر برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: آتشک درختان میوه دانه‌دار، آغازگر A/B، *Erwinia amylovora*، rep-PCR.

مقدمه

گونه گیاهی متعلق به ۴۰ جنس از تیره گلسرخیان خسارت وارد می‌کند. برخی از این میزبان‌ها شامل به^۱، گلابی^۲، سیب^۳، ازگیل^۴، زالزالک^۵، پیراکانتا^۶، شیرخشت^۷ و سماق کوهی می‌باشند. به، سیب و گلابی بیشترین

بیماری سوختگی آتشی ناشی از *Erwinia amylovora* یکی از مهم‌ترین، مخرب‌ترین و قدیمی‌ترین بیماری باکتریایی درختان میوه دانه‌دار در مناطق مختلف دنیا به‌شمار می‌رود (واندرزت و همکاران ۱۹۹۰). این بیماری به‌طور پیوسته ولی پراکنده، در باغ‌ها ظهور کرده و خسارات غیر قابل جبرانی به محصولات باغی وارد می‌سازد (حسن زاده و همکاران، الف ۱۳۷۲). این بیمارگر دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و به ۲۰۰

¹ *Cydonia* spp.

² *Pyrus* spp.

³ *Malus* spp.

⁴ *Mespilus* spp.

⁵ *Crataegus* spp.

⁶ *Pyrocantha* spp.

⁷ *Comoteoster* spp.

منفی و تعدادی از باکتریهای گرم مثبت یافت می شود. سه خانواده از این ترادفهای تکراری شامل: REP با ۴۰ bp - ۳۵، ERIC با ۱۲۷bp-۱۲۴ و BOX با ۱۴۵ bp می باشد. rep-PCR علاوه بر مطالعه تنوع در میان باکتری ها به عنوان ابزار ارزشمندی در جهت شناسایی و طبقه بندی باکتری ها نیز به شمار می آید. تاکنون این روش برای مطالعه برخی باکتری های همگن مورد استفاده قرار گرفته است (ورسالوویچ و همکاران ۱۹۹۱، لووس و همکاران ۱۹۹۵، هالووی و همکاران ۱۹۹۷). علاوه بر این نتیجه تحقیقات لووس و همکاران (۱۹۹۵) روی تعدادی از گونه ها و پاتوارهای جنس *Xanthomonas* نشان داد که در صورت استفاده از روش سه گانه rep-PCR و آنالیز خطی آنها با یکدیگر می توان این سویه ها را طبقه بندی نمود به گونه ای که نتیجه حاصله با گروه بندی حاصل از هیبریداسیون DNA کاملاً منطبق است. در سال ۱۹۹۵، با استفاده از rep-PCR، ۱۸۹ جدایه از *E. amylovora* که از میزبان های مختلف در کانادا، آمریکا و نیوزیلند به دست آمده بودند (مک مانوس و جونز ۱۹۹۵) مورد بررسی قرار گرفتند و مشخص شد که جدایه های مشتق شده از مناطق جغرافیایی نزدیک به هم و میزبان های مربوط به یک خانواده، تفاوت هایی در نقوش حاصل از سه آغازگر ERIC، REP و BOX دارند. در ایران نیز مطالعات محدودی با استفاده از روش rep-PCR روی *E. amylovora* انجام شده است. توکل با خدا و تقوی (۱۳۸۹)، ملایی و حریقی (۲۰۱۳)، ملایی و همکاران (۱۳۹۰) و رهیده و عبداللهی (۱۳۹۲) با استفاده از روش مذکور به بررسی مشخصات ژنوتیپی و فنوتیپی *E. amylovora* در نقاط مختلف کشور پرداخته اند. در همین راستا پژوهش حاضر با هدف مقایسه تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی احتمالی *E. amylovora* با استفاده از rep-PCR در جدایه های درختان میوه دانه دار در استان اصفهان صورت گرفت.

حساسیت به بیماری را از خود نشان می دهند (واندرزت و همکاران ۱۹۹۰، مومل و آلونکل ۲۰۰۰). آتشک در ایران برای اولین بار در سال ۱۳۶۸ و در ناحیه برغان کرج (ذاکری و شریف نبی ۱۳۷۰) مشاهده شد. در سال های اولیه خسارت های گسترده ای را در استان های تهران، قزوین، آذربایجان غربی (مزارعی و همکاران، ۱۳۷۳) و آذربایجان شرقی (داوودی، ۱۳۷۹) سبب گردید. به همین دلیل بخش قابل توجهی از باغ های گلایی احداث شده با استفاده از ارقام حساس یا نیمه حساس به بیماری نظیر ارقام شاه میوه، دوشس و پیغمبری (سردرودی) طی این سال ها ریشه کن شده و توسعه باغ های گلایی برای سال های متوالی در این مناطق تقریباً بطور کامل متوقف شد (داوودی، ۱۳۷۹). پس از آن بیماری به تدریج از استان های فارس (سهندپور و قاسمی، ۱۳۸۲)، گیلان (نیک نژاد و همکاران، ۱۳۸۶) و اصفهان و کردستان (ملایی و حریقی، ۲۰۱۳) نیز گزارش شد. در سال های اخیر این بیماری زیان های جبران ناپذیری به باغ های میوه دانه دار برخی مناطق ایران وارد نموده و هم اکنون یکی از مهمترین بیماری های درختان میوه دانه دار در کشور محسوب می شود (امیدوار و همکاران، ۱۳۸۵).

در دو دهه گذشته، تلاش های فراوانی انجام شده تا با استفاده از آنالیزهای مولکولی، تنوع ژنومی موجود میان سویه های مختلف باکتریایی بررسی شود. از بین این روش ها می توان به روش^۱ rep-PCR اشاره نمود که به منظور مقایسه سویه ها مورد استفاده واقع شده است (ورسالوویچ و همکاران ۱۹۹۱، لووس و همکاران ۱۹۹۵، وین گارت و ولکش ۱۹۹۷، رادمیکر و برویجن ۱۹۹۸). آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگرهای خاصی انجام می گیرد که بر اساس ترادفهای تکراری و کاملاً حفاظت شده موجود در ژنوم باکتری ها طراحی شده است. این ترادفها در ژنوم اغلب باکتری های گرم

^۱Repetitive PCR

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، جداسازی و بررسی خصوصیات فنوتیپی

طی سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱، از باغات درختان میوه دانه‌دار در استان اصفهان بازدید و از درختان دانه دار با علائم سوختگی آتشی شامل خشکیدگی شکوفه‌ها، قهوه-ای شدن رگیب‌ها و بافت اطراف آن، آویزان شدن برگ-ها و میوه‌های نارس، بروز شانکر و ترشحات صمغی در تنه درخت، نمونه برداری و با ثبت مشخصات به آزمایشگاه منتقل شد. جهت جداسازی عامل بیماری، ابتدا بافت آلوده با آب روان شسته شده و پس از دوبار شستشو در هاون سترون عصاره‌گیری شد. سپس یک لوپ از عصاره حاصل روی محیط نوترینت آگار به صورت خطی کشت و در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بعد از ۴۸-۲۴ ساعت، پرگنه‌های گرد، محدب و براق به رنگ کرم تا شیری با حاشیه صاف انتخاب و خالص سازی گردید. جدایه‌های حاصل جهت بررسی‌های بعدی به آب مقطر سترون انتقال یافته و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تعداد ۴۹ جدایه جمع آوری شده از مناطق مختلف استان که دارای پرگنه های براق، گرد، محدب، کرم تا شیری رنگ بودند انتخاب شده و آزمون‌های تکمیلی روی آنها انجام گرفت. جدایه های گرم منفی، اکسیداز مثبت، بی هوازی اختیاری، کاتالاز مثبت با واکنش مثبت فوق حساسیت در توتون بطور اولیه انتخاب و آزمون های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی بر اساس روش فهی و پرسلی (۱۹۸۳) و شاد و همکاران (۲۰۰۱) روی آنها انجام گردید.

آزمونهای فنوتیپی مورد استفاده در این قسمت شامل آزمون گرم، لوان، اکسیداز، لهیدگی سیب زمینی، فوق حساسیت روی توتون، آزمون استفاده از قندها، آزمون بیماریزایی تعدادی دیگر از آزمون های استاندارد باکتری شناسی بر اساس روش شاد و همکاران (۲۰۰۱) و فهی و پرسلی (۱۹۸۳) بود.

اثبات بیماریزایی

از کشت ۴۸ ساعته جدایه‌ها روی محیط کشت آگار غذایی، سوسپانسیونی به غلظت 10^8 cfu/ml (با چگالی نوری یک در طول موج ۶۰۰ نانومتر) در آب مقطر سترون تهیه و با استفاده از سرنگ، روی رگیب‌ها اصلی نهال، تزریق شد. برای حفظ رطوبت، محل مایه زنی به مدت یک تا دو روز با پارافیلیم پوشانده شد. در تیمارهای شاهد به جای سوسپانسیون باکتری، از آب مقطر سترون به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (شاد و همکاران ۲۰۰۱). ظهور علائم و نحوه‌ی پیشرفت بیماری حداکثر تا سه ماه مورد بررسی قرار گرفت. بروز هر یک از علائم پژمردگی، کلروز و خشکیدگی بافت با هم و یا به تنهایی به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شد.

در آزمون بیماریزایی روی میوه نارس گلابی، پس از شستشو و ضدعفونی سطحی میوه‌ها با محلول ۱۰٪ هیپوکلریت سدیم پنج درصد، سوسپانسیونی به غلظت 10^8 cfu/ml (با چگالی نوری یک در طول موج ۶۰۰ نانومتر) در آب مقطر سترون تهیه و بعد از مایه زنی بوسیله سرنگ سترون به مدت یک هفته در محل مرطوب نگهداری شد (شاد و همکاران ۲۰۰۱). ظهور رنگ قهوه‌ای در محل مایه زنی و ترشح صمغ به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شد.

بررسی خصوصیات ژنوتیپی جدایه‌ها

از کشت ۴۸ ساعته باکتریوسوسپانسیونی با غلظت 10^8 cfu ($OD_{600}=1$) تهیه و به مدت ده دقیقه جوشانده شد و بلافاصله به مدت یک دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس پنج دقیقه در دور ۱۱۰۰۰ g سانتریفیوژ (EBA 21, France) گشته و از فاز رویی به طور مستقیم در PCR استفاده شد (یائیش ۲۰۰۶). از سوسپانسیون حاصله به عنوان DNA قالب در واکنش PCR با آغازگر اختصاصی A/B (با ترادف 5'-CGG TTT TTA A: و 3'-GGG CAA ATA CTC ACG CTG GG-3' B: و 3'-GGA TT-3') استفاده شد (شاد و همکاران ۲۰۰۱). واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BIO-

(جدول ۱). واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (BIO-RAD, USA) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار $dNTP_s$ ، واحد آنزیم Taq پلی مرز DNA (سیناژن، ایران) و دو میکرولیتر سوسپانسیون جوشانده باکتری آب مقطر سترون صورت پذیرفت. چرخه گرمایی مورد استفاده شامل واسرشتگی اولیه پنج دقیقه در $95^{\circ}C$ و $30^{\circ}C$ چرخه واسرشتگی در $94^{\circ}C$ به مدت یک دقیقه، اتصال $40^{\circ}C$ برای آغازگر REP، $52^{\circ}C$ برای آغازگر ERIC و $53^{\circ}C$ برای آغازگر BOX به مدت یک دقیقه، امتداد هشت دقیقه در $65^{\circ}C$ و امتداد نهایی ۱۶ دقیقه در $65^{\circ}C$ انجام شد (ورسالوویچ و همکاران ۱۹۹۱).

(RAD, USA) با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرومولار از هر آغازگر، ۰/۲ میلی مولار $dNTP_s$ ، واحد آنزیم Taq پلی مرز DNA (سیناژن، ایران) و ۲ میکرولیتر سوسپانسیون جوشانده باکتری صورت پذیرفت. واسرشتگی اولیه شامل: دو دقیقه در $93^{\circ}C$ و $37^{\circ}C$ چرخه شامل: واسرشتگی یک دقیقه در $93^{\circ}C$ ، اتصال ۲ دقیقه در $52^{\circ}C$ ، امتداد دو دقیقه در $72^{\circ}C$ و امتداد نهایی دو دقیقه در $172^{\circ}C$ انجام شد (برسویل و همکاران ۱۹۹۲، لکومت و همکاران ۱۹۹۷).

آزمون rep-PCR

جهت انجام این آزمون از آغازگرهای ERIC BOX A1R و REP 1R/REP 2I.1R/ERIC2 استفاده شد

جدول ۱- ترادف آغازگرهای مورد استفاده در rep-PCR

آغازگر	ترادف	منبع
BOXA1R	CTACggCAAgCgACgCTgACg	Versalovic et al., 1994
ERIC1R	ATgTAAGCTCCTggggATTAC	Versalovic et al., 1991
ERIC2	AAgTAAGTgACTggggTgAgCg	Versalovic et al., 1991
REP1R	IIICgICgICATCIggC	Versalovic et al., 1991

آنالیز داده‌ها

با استفاده از نرم افزار NTsys-pc Version 2.02 فاصله ژنتیکی جدایه‌ها ترسیم گردید. فاصله و یا شباهت ژنتیکی بین افراد براساس مارکرهای مولکولی وجود و یا عدم وجود نوار در ژل تعیین شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش مراتبی^۳ انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان کلاسترها از روش UPGMA^۴ و ضریب تشابه SM° استفاده گردید. ویژگی‌های فنوتیپی به صورت کدهای صفر (برای ویژگی‌های منفی) و یک (برای ویژگی‌های مثبت) و مشخصات ژنوتیپی براساس rep-

الکتروفورز محصول PCR

در آزمون PCR با آغازگر اختصاصی، ژل آگاروز یک در صد و در آزمون rep-PCR، ژل آگاروز یک و نیم درصد تهیه گردید. پس از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید ۱ درصد، ژل بر روی صفحه آشکار کننده^۱ U.V بررسی و با استفاده از دستگاه عکسبرداری از ژل^۲ از آن عکسبرداری شد. سپس با کمک مارکر مولکولی ۲۰۰ جفت بازی DNA که همراه نمونه‌ها در ژل بارگذاری شده بود، وزن ملکولی قطعات تکثیر شده اندازه‌گیری شد.

³Hierachical Technique

⁴Unweighted Pair-group method using Arithemtic Average

⁵Simple Matching

¹U.V transilluminator

²Gel Documentation

آنالیز عددی ویژگی‌های فنوتیپی *E. Amylovora* با

استفاده از نرم افزار NTSYS

بر اساس دندروگرام رسم شده بر مبنای ویژگی‌های فنوتیپی شامل آزمون های گرم، لوان، اکسیدان، لهیدگی سیب زمینی، آرژنین دهیدرولاز، فوق حساسیت روی توتون، آزمون استفاده از قندها، آزمون بیماریزایی و سایر آزمون های ذکر شده در جدول ۲، چهل و نه جدایه *E.amylovora* از مناطق مختلف استان اصفهان، در سطح ۸۷ درصد با هم شباهت نشان دادند. جدایه های بدست آمده از یک میزبان و یک منطقه در یک گروه و یا گروه-های بسیار نزدیک به هم قرار گرفتند (شکل ۲).

ردیابی بیمارگر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

تعداد ۴۹ جدایه که بر اساس آزمون های مختلف فنوتیپی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای *E. amylovora* تشخیص داده شده بودند با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی A/B و آزمون PCR قطعه DNA با اندازه تقریبی ۱۰۰۰ جفت باز را سنتز کردند (شکل ۳).

آزمون rep-PCR

۴۹ جدایه *E.amylovora* در آزمون rep-PCR و با استفاده از آغازگرهای REP، ERIC، و BOX مورد ارزیابی قرار گرفتند (شکل‌های ۴ تا ۶) (Versalovic et al., 1991). با استفاده از هر یک از سه آغازگر مذکور قطعاتی با وزن های مولکولی مختلف سنتز شد. با استفاده از آغازگرهای REP1R و REP2I در آزمون rep-PCR در سطح تشابه ۷۷ درصد دو گروه ایجاد شد (شکل ۷). با استفاده از آغازگرهای ERIC1R و ERIC2 در آزمون rep-PCR، جدایه ها در سطح تشابه ۷۱ درصد (شکل ۸)، با آغازگر BOX در سطح ۷۵ درصد (شکل ۹) و با استفاده از آغازگر REP در سطح تشابه ۷۷٪ به دو گروه تقسیم شدند (شکل ۷).

PCR به صورت کدهای صفر (برای عدم باند) و یک (برای وجود باند) در این نرم‌افزار تعریف گردید. درصد تشابه بین ۴۹ جدایه موجود، بر اساس داده های فنوتیپی و ژنوتیپی بدست آمده در این تحقیق، محاسبه و دندروگرام مربوطه ترسیم شد (رالف ۲۰۰۰).

نتایج

ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه ای جدایه‌ها، از درختان نمونه‌برداری شده ۴۹ جدایه که دارای واکنش منفی گرم، بی هوازی اختیاری، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت بوده، بطور مقدماتی بعنوان *E.amylovora* تلقی شده و آزمون‌های تکمیلی روی آن‌ها انجام گردید. نتایج حاصله در جدول ۲ ثبت شده است.

اثبات بیماری‌زایی روی نهال‌های به، سیب و گلابی

برای انجام این آزمون ۱۸ جدایه نماینده که از نظر ویژگی‌های فنوتیپی و آزمون PCR به عنوان *E. amylovora* شناسایی شدند، انتخاب و مورد بررسی قرار گرفتند. میزبان های مورد استفاده شامل به، سیب و گلابی بود. جدایه های گلابی و به قادر به ایجاد علائم کلروز، خشکیدگی و عصایی شدن دمبرگ در هر سه گیاه مورد آزمایش بودند. این در حالی بود که جدایه های سیب تنها روی سیب علامت ایجاد نموده و در نهال های به و گلابی فاقد علامت بودند. همچنین در آزمون اثبات بیماریزایی روی میوه نارس گلابی جدایه ها پنج روز بعد از تلقیح قادر به ایجاد واکنش در تیمارها بودند. بروز لکه‌های قهوه‌ای تا سیاه رنگ در اطراف محل مایه زنی، با و یا بدون ترشح صمغ، ایجاد آن در شاهد به عنوان واکنش مثبت تلقی گردید (شکل ۱). نتایج این آزمون در جدول ۳ ثبت شده است.

جدول ۲- ویژگی‌های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای جدایه‌های *E.amylovora* از مناطق مختلف استان اصفهان.

درصد جدایه های مثبت	نوع آزمون	درصد جدایه های مثبت	نوع آزمون
۱۰۰	سیترات	۱۰۰	گرم
۱۰۰	فروکتوز	۱۰۰	کاتالاز
۱۰۰	گلوکز	۱۰۰	اکسیداز
۱۰۰	گالاکتوز	۱۰۰	رشد هوازی
۲/۵۳	گلیسرول	۱۰۰	رشد بی هوازی
۱۶/۳۲	گلیسرین	۱۰۰	رشد روی محیط EMB
۱۸/۳۶	لاکتوز	صفر	تولید رنگدانه صورتی YDC
۱۰۰	لاکتات	۱۰۰	واکنش فوق حساسیت روی توتون
صفر	مانوز	۱۰۰	تولید پرگنه آبی روی محیط CCT
صفر	ملی بیوز	صفر	تولید رنگدانه فلورسترو روی محیط KB
۳۲/۶۵	مانیتول	صفر	لهیدگی روی برش سیب زمینی
صفر	مالتوز	صفر	تولید لستیناز
۱۴/۲۸	نشاسته	صفر	تولید اوره آز
صفر	اینوزیتول	۱۰۰	تولید لووان
صفر	تارتارات	۱۰۰	تولید استونین
صفر	تری هالوز	۱۹/۶۶	تولید اندول
۸۵/۷۱	دولسیتول	صفر	احیاء نیترات
۶/۱۲	رافینوز	۱۰۰	ذوب ژلاتین
صفر	رامنوز	صفر	هیدرولیز ژلاتین
۱۰۰	رابیوز	صفر	هیدرولیز توئین ۸۰
۳۶/۷۳	زایلوز	صفر	هیدرولیز نشاسته
۱۰۰	ساکارز	صفر	اتانول
صفر	سرین	۲۲/۴۴	آدونیتول
۱۰۰	سلوبیوز	۶۱/۲۲	آرایینوز

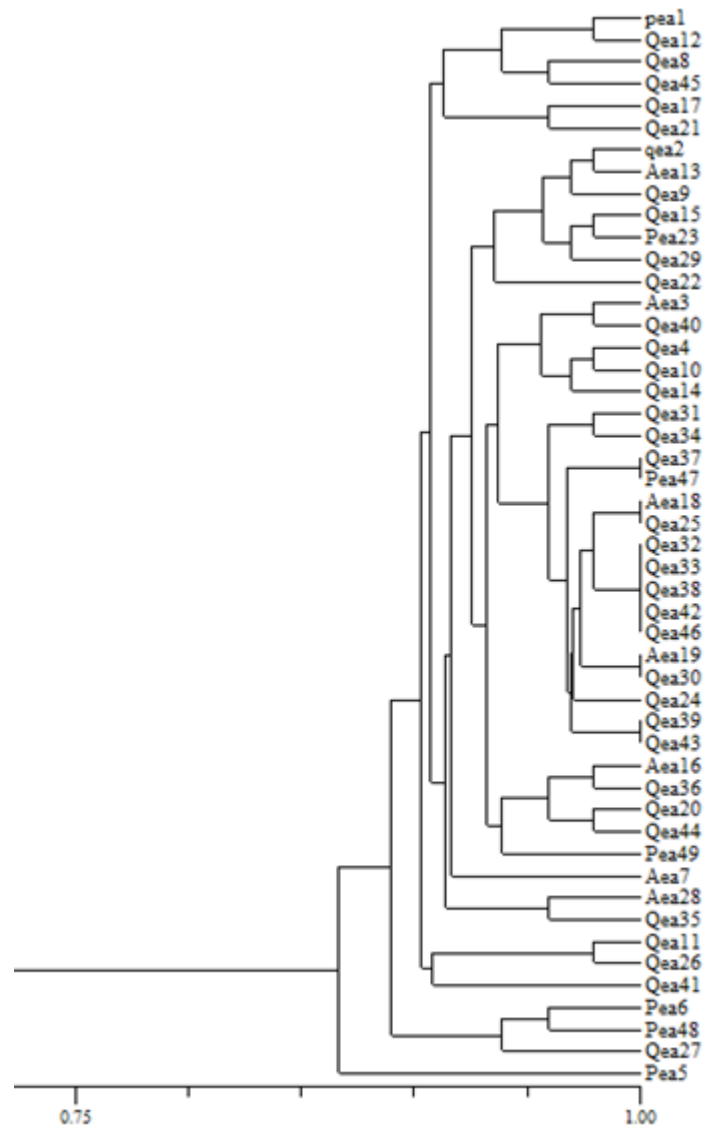


شکل ۱- آزمون اثبات بیماریزایی روی میوه‌های نارس گلابی بوسیله *E. amylovora* سمت راست تیمار، سمت چپ شاهد.

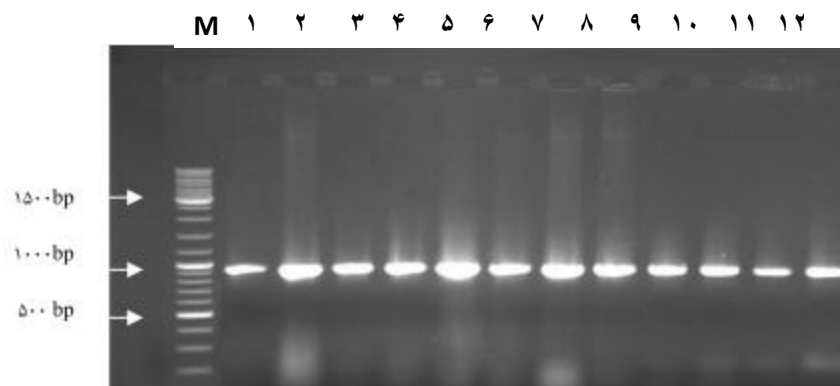
جدول ۳- نتایج آزمون اثبات بیماریزایی تعدادی از سویه‌های *E. amylovora* جدا شده از درختان میوه دانه‌دار در استان اصفهان.

پایه تلقیح شده

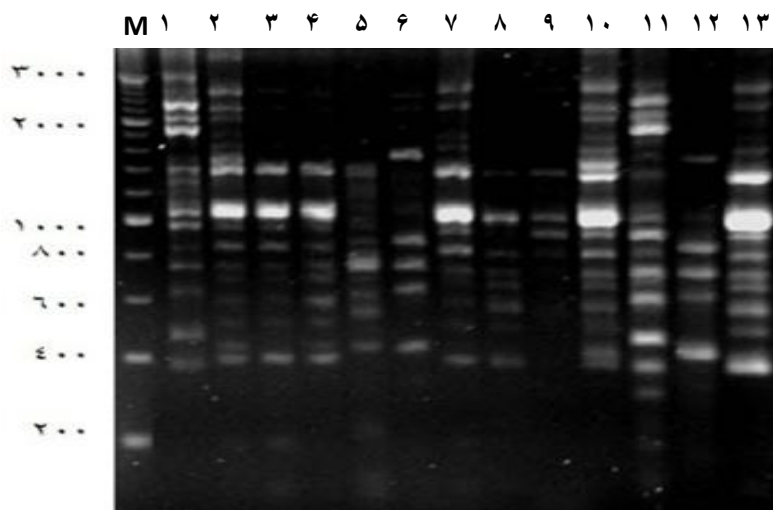
گل‌ابی	به	سیب	میزبان جدا شده	کد جدا به مایه زنی شده
+	+	-	به	Qea2
+	+	-	به	Qea4
+	+	-	گل‌ابی	Pea2
-	-	+	سیب	Aea7
+	+	-	به	Qea9
+	+	-	به	Qea10
+	+	-	به	Qea13
+	+	-	به	Qea11
+	+	-	به	Qea17
+	+	-	به	Qea21
+	+	-	به	Qea23
-	-	+	سیب	Aea28
+	+	-	به	Qea30
+	+	-	به	Qea31
+	+	-	به	Qea38
+	+	-	گل‌ابی	Pea46
+	+	-	گل‌ابی	Pea47
+	+	-	گل‌ابی	Pea49



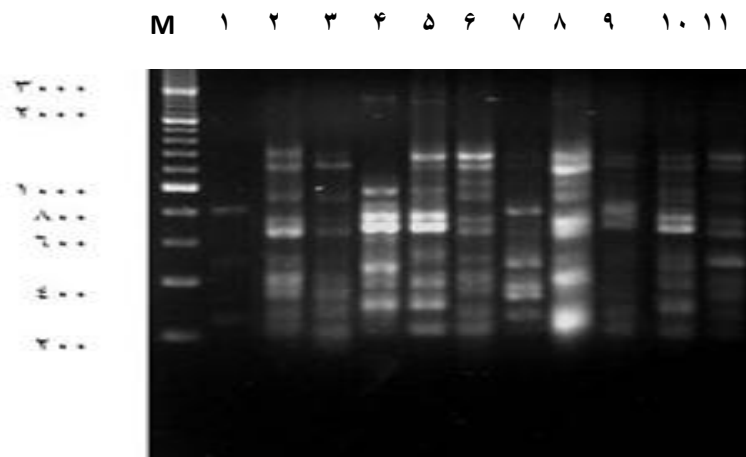
شکل ۲- دندروگرام رسم شده براساس ویژگی‌های فنوتیپی ۴۹ جدایه *E. amylovora* از میزبان‌های مختلف درختان میوه دانه‌دار در استان اصفهان. جدایه‌های سیب، گلابی و به متعلق به مناطق مختلف، به ترتیب با حروف A، P و Q مشخص شده‌اند.



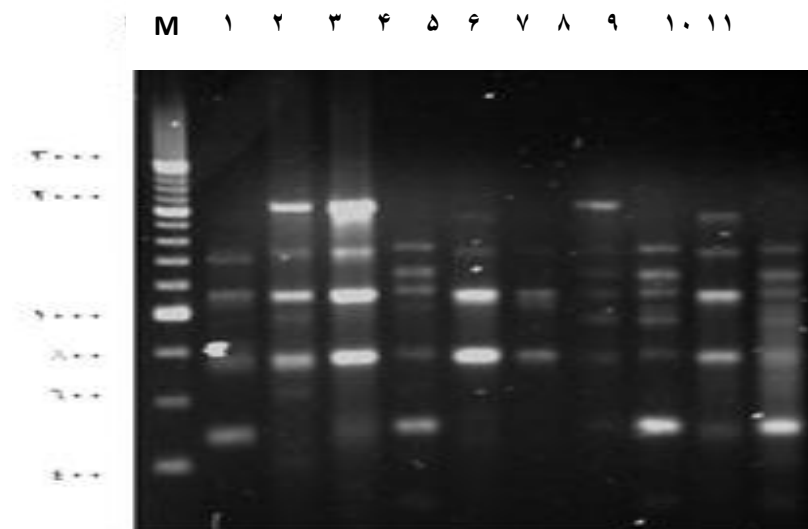
شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های مختلف *E. amylovora* با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی A/B. سمت چپ: نشانگر ۲۰۰ جفت بازی (Standard Molecular Marker 200bp DNA Ladder)، یک تا ۱۲ جدایه‌های متعلق به میزبان‌های مختلف دانه‌دار.



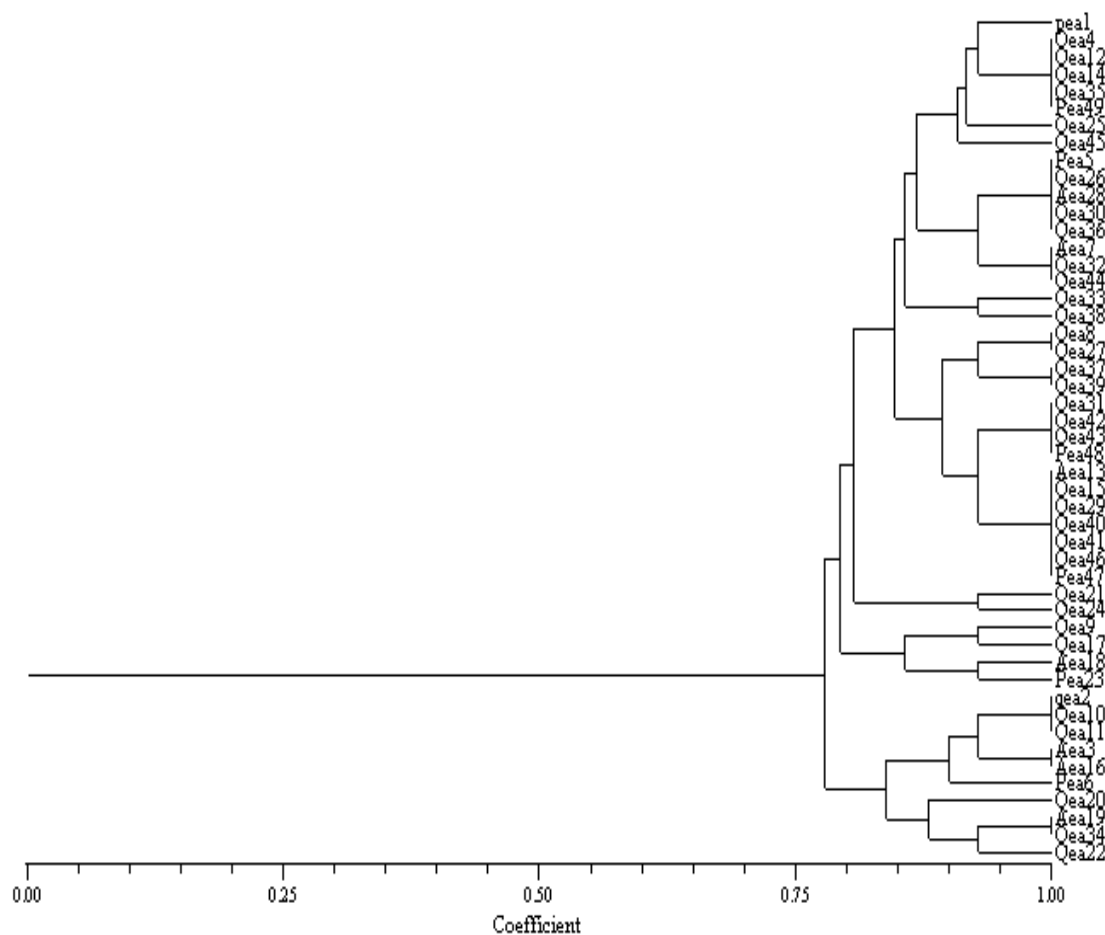
شکل ۴- نقوش الکتروفورزی محصول PCR در جدایه‌های مختلف *E. amylovora* با استفاده از آغازگر REP: M، مارکر ۲۰۰ جفت بازی؛ یک تا ۱۳، جدایه‌های *E. amylovora*.



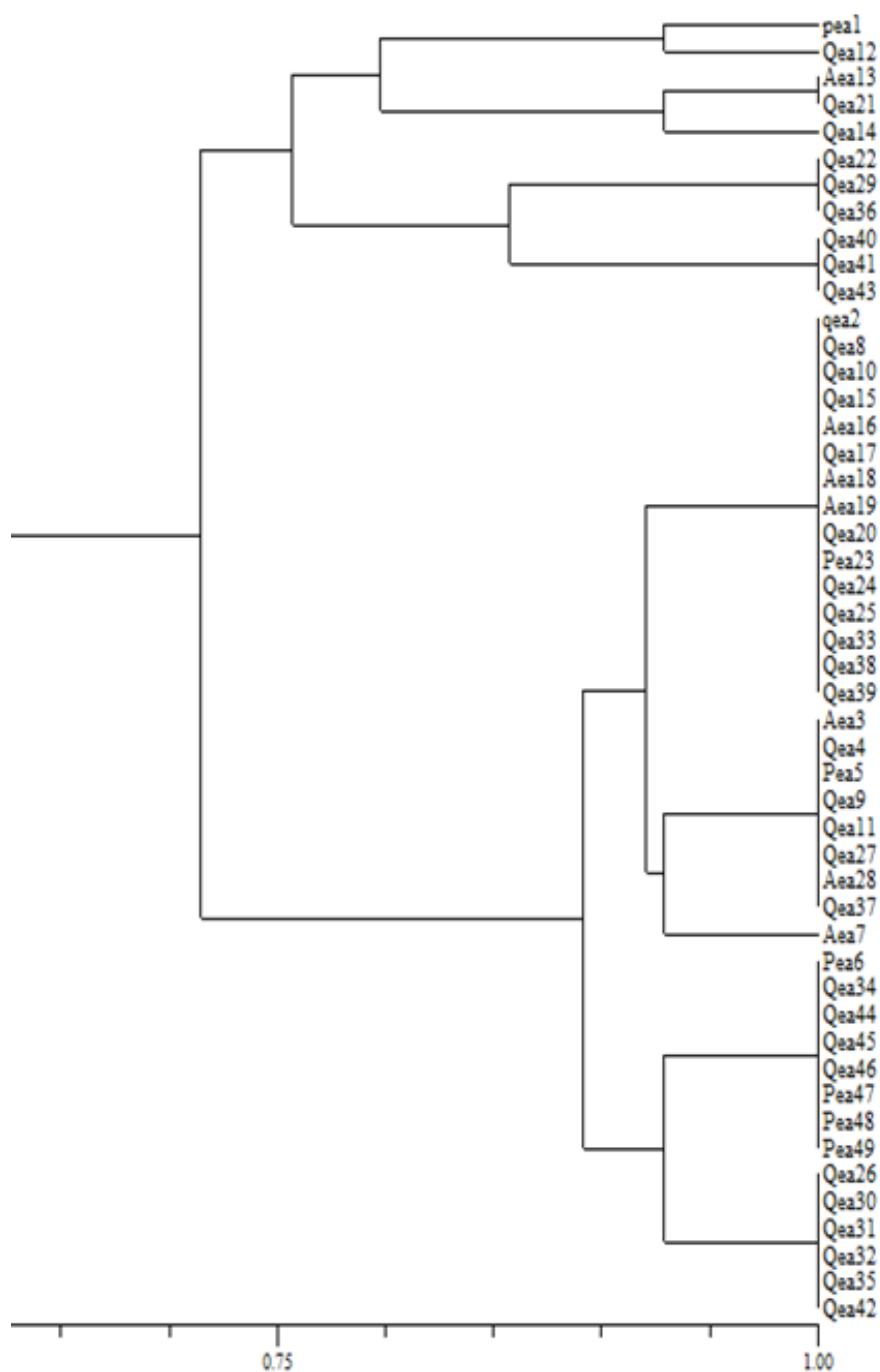
شکل ۵- نقوش الکتروفورزی محصول PCR در جدایه‌های مختلف *E. amylovora* با استفاده از آغازگر ERIC: M، مارکر ۲۰۰ جفت بازی؛ یک تا ۱۱، جدایه‌های *E. amylovora*.



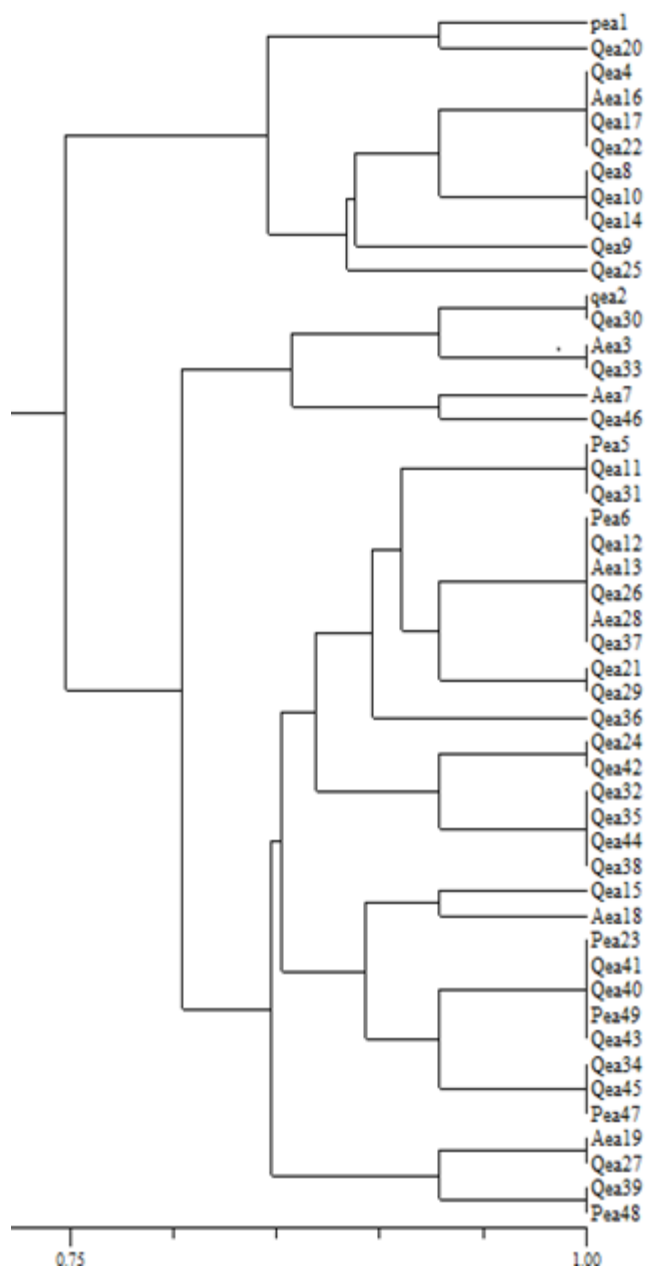
شکل ۶- نقوش الکتروفورزی محصول PCR در جدایه های مختلف *E. amylovora* با استفاده از آغازگر **M:BOX**، مارکر ۲۰۰ جفت بازی؛ یک تا ۱۲، جدایه های *E. amylovora*.



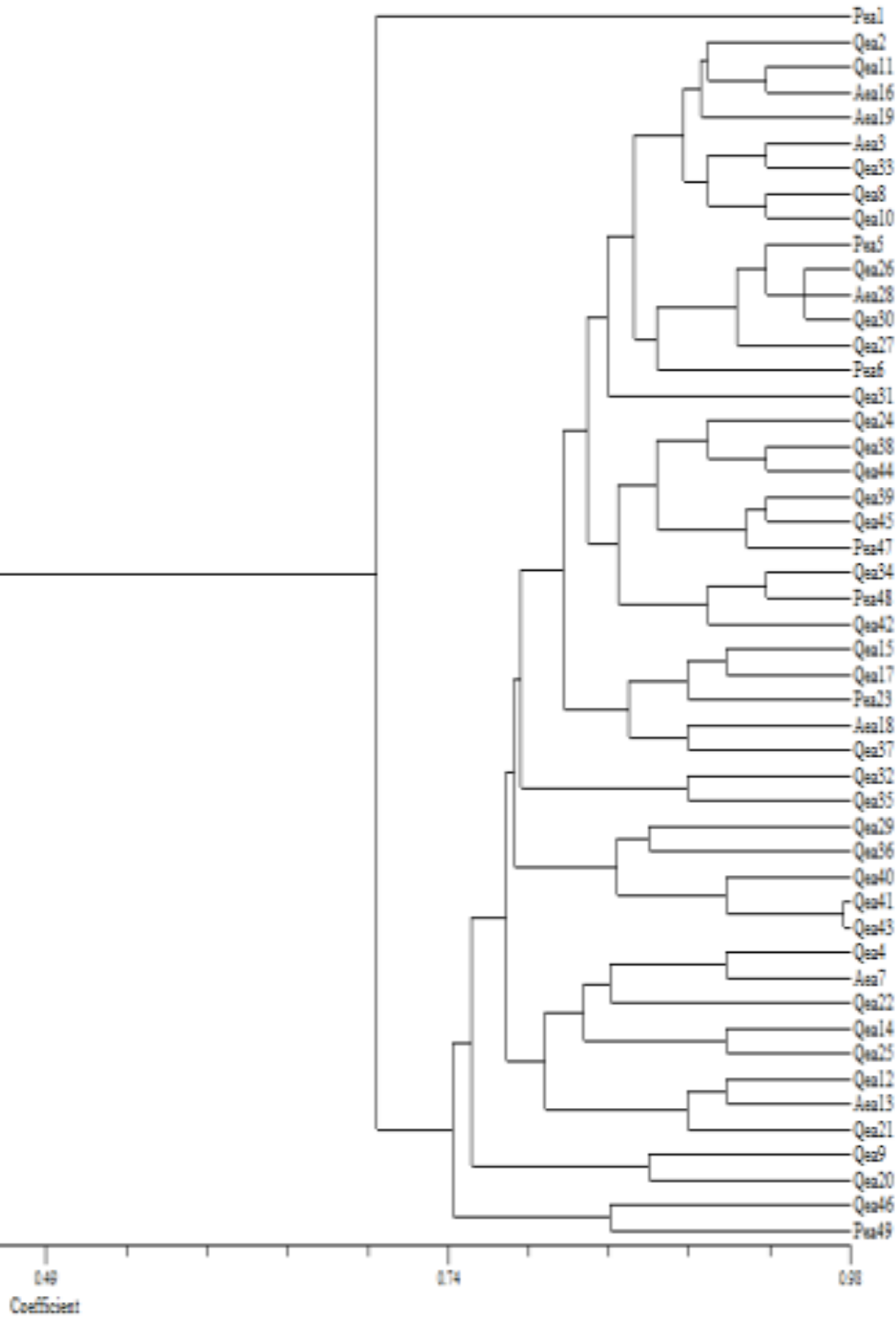
شکل ۷- دندروگرام رسم شده بر اساس نقوش الکتروفورز محصول **rep-PCR** در سویه های *E. amylovora* جدا شده از درختان دانه دار در استان اصفهان با استفاده از آغازگر **REP**. جدایه های سیب، گلابی و به متعلق به مناطق مختلف، به ترتیب با حروف **A**، **P** و **Q** مشخص شده اند.



شکل ۸- دندروگرام رسم شده بر اساس نقوش الکتروفورز محصول PCR سویه‌های *E.amylovorae* جدا شده از درختان دانه‌دار در استان اصفهان با استفاده از آغازگر ERIC. جدایه‌های سیب، گلابی و به متعلق به مناطق مختلف، به ترتیب با حروف A، P و Q مشخص شده- اند.



شکل ۹- دندروگرام رسم شده بر اساس نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR جدایه‌های *E. amylovora* با استفاده از آغازگر BOX. جدایه‌های سیب، گلابی و به متعلق به مناطق مختلف، به ترتیب با حروف A، P و Q مشخص شده‌اند.



شکل ۱۰- دندروگرام رسم شده بر اساس آنالیز ترکیبی جدایه‌های *E. amylovora* با استفاده از آغازگرهای سه گانه در rep-PCR. جدایه‌های سیب، گلابی و به متعلق به مناطق مختلف، به ترتیب با حروف A، P و Q مشخص شده‌اند.

آنالیز ترکیبی حاصل از سه آغازگر فوق‌الذکر در rep-PCR دو گروه در سطح تشابه ۷۱ درصد ایجاد کرد (شکل ۱۰). در یک گروه تنها جدایه *pea5* و در گروه دوم سایر جدایه‌ها قرا گرفتند.

بحث

در تحقیق حاضر از باغهای درختان میوه دانه‌دار در مناطق مختلف استان اصفهان باز دید و علائم سوختگی آتشی در مناطق مختلف استان باشد شدت‌های متفاوتی مشاهده گردید.

بر اساس آنالیز عددی ویژگی‌های فنوتیپی ۴۹ سویه *E.amylovora* جدا شده از به، گلابی و سیب، جدایه‌ها در سطح تشابه ۸۷ درصد با یکدیگر یکنواختی نشان دادند. از آنجا که حداقل تشابه در ویژگی‌های فنوتیپی ۸۰٪ ذکر شده است، بنابراین میتوان استنباط نمود که جدایه‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر در مطابقت با مووینگ و هی وارد (۱۹۹۰) در یک گونه قرار دارند مطابقت با سووینگ و هی وارد علاوه بر این، دندروگرام حاصله نشان داد با استفاده از یافته‌های آزمون‌های فنوتیپی، نمی توان جدایه‌ها را براساس میزبان و یا منطقه جغرافیایی از یکدیگر تفکیک نمود. این نتیجه با یافته‌های سایر پژوهندگان مطابقت دارد. افیونیان و رحیمیان (۱۹۹۶) ویژگی‌های فنوتیپی ۵۰ جدایه سیب، گلابی، ازگیل، به، زالزالک و گلسرخ مربوط به مناطق تهران، کرج، طالقان، ارومیه، تبریز، سلماس و خوی را بررسی نموده و نشان دادند این جدایه از همولوژی بسیار بالایی برخوردار بوده و ویژگی خاصی که بر اساس آن بتوان جدایه‌های دارای منشا جغرافیایی متفاوت را از یکدیگر متمایز ساخت در میان آنها یافتن می‌شود. توکل با خدا و تقوی (۱۳۸۹) با استفاده از آنالیز ویژگی‌های فنوتیپی ۴۷ جدایه بدست آمده از میزبان‌های مختلف در شیراز نشان دادند گروهی با شباهت بیش از ۸۲ درصد ایجاد می‌شود که بر این اساس نمی توان آن‌ها را با توجه به منطقه جغرافیایی و یا میزبان از یکدیگر متمایز نمود.

آتاناسووا و همکاران (۲۰۰۷) نیز در بلغارستان با مقایسه ۵۳ جدایه از درختان دانه‌دار دریافتند که این جدایه‌ها از لحاظ فنوتیپی دارای ۷۰ درصد شباهت هستند. آیسان و همکاران (۲۰۰۳) در ترکیه نیز نشان دادند ۳۷ جدایه گلابی، سیب و گلابی وحشی دارای ۸۸ درصد تشابه از لحاظ ویژگی‌های فنوتیپی هستند. این نتایج نشان می‌دهد سویه‌های مختلف *E. amylovora* با یکدیگر هموزن بوده و علیرغم وجود اختلافات ناچیز در برخی آزمون‌های بیوشیمیایی، بوسیله آزمون‌های فنوتیپی، قابل تفکیک از یکدیگر نیستند.

در آزمون اثبات بیماریزایی روی نهال‌های سیب، به و گلابی دو هفته بعد از تلقیح، تیمارها علائم سرعصایی شدن دمبرگ، خشکیدگی و تغییر رنگ برگها را نشان دادند. جدایه‌های سیب تنها روی نهال سیب بیماریزا بودند، در صورتی که جدایه‌های به و گلابی روی نهال‌های به و گلابی بیماریزا اما روی نهال سیب بیماریزا نبودند. این نتایج با یافته‌های توکل با خدا و تقوی (۱۳۸۹) اندکی متفاوت است. آن‌ها نشان دادند کلیه جدایه‌ها بدون توجه به این که از چه میزبانی جدا شده اند قادر به ایجاد بیماری در به هستند، این در حالی است که نهال‌های سیب و گلابی، تنها از طریق جدایه‌های بدست آمده از همان میزبان آلوده می‌شوند.

در ردیابی بیمارگر با استفاده از واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR) از آغازگر اختصاصی A/B (برسویل و همکاران ۱۹۹۲) که بر مبنای پلاسمید PEA29 طراحی شده بود استفاده شد. کلیه جدایه‌های مورد بررسی، در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز قطعه‌ی با اندازه تقریبی ۱۰۰۰ جفت باز راتکتیر نمودند. بدینسان وجود پلاسمید PEA29 در این جدایه‌ها ثابت می‌شود. پلاسمید مذکور ژن‌های مرتبط با متابولیسم تیامین را حمل کرده و بجز اندکی از سویه‌ها، در اغلب جدایه‌های این باکتری وجود دارد (لارنت و همکاران ۱۹۸۹). مطالعات انجام شده توسط لکومت و همکاران نشان داده، اندازه قطعه تکثیر شده با استفاده از آغازگر A/B، بین ۹۰۰ تا ۱۱۰۰ جفت

باز متغیراست و این امر به دلیل تفاوت در تعداد SSR^۱ های موجود در ژنوم باکتری است (لکومت و همکاران ۱۹۹۷، وق آ ۲۰۱۲).

در آنالیز اثر انگشت ژنتیکی حاصل از آغازگر REP جدایه ها ۷۷ درصد تشابه با یکدیگر نشان دادند اما گروه بندی خاصی مشاهده نشد. به بیان دیگر این نتایج نشان داد بوسیله آغازگر REP در آزمون rep-PCR نمیتوان جدایه های مناطق و میزبان های مختلف را از یکدیگر تفکیک نمود. توکل با خدا و تقوی (۱۳۸۹) با استفاده از آنالیز داده های حاصل از انگشت نگاری ناشی از آغازگر REP در شیراز، دو گروه اصلی با تشابه ۹۲ درصد را مشاهده نمودند. آن ها نیز عنوان نمودند گروه بندی خاصی با استفاده از آغازگر اخیر قابل مشاهده نیست. ملایی و همکاران (۱۳۹۰) نیز با استفاده از این آزمون، ۱۴ جدایه مولد آتشک را در کردستان بررسی نموده و نشان دادند این جدایه ها با یکدیگر هموزن بوده و ۸۱٪ تشابه داشتند اما به گروه بندی خاصی دسترسی پیدا نکردند.

با استفاده از آغازگر ERIC نیز جدایه ها ۷۲ درصد شباهت نشان دادند. در این مورد نیز گروه بندی خاصی مشاهده نشد. نتیجه فوق با نتایج سایر محققین همخوانی دارد. توکل باخدا و تقوی (۱۳۸۹) عنوان نمودند جدایه های استان فارس دارای ۹۴٪ تشابه بوده و با این روش قابل تفکیک نیستند. بررسی هایی که در مراکش انجام شده است نیز نشان داد بوسیله آغازگر مذکور جدایه ها دارای ۹۰ درصد تشابه بوده و با این روش، براساس منطقه جغرافیایی یا میزبان، قابل تفکیک از یکدیگر نبودند (یاخ و همکاران ۲۰۱۱). ملایی و همکاران (۱۳۹۰) با استفاده از آغازگر ERIC دریافتند که جدایه های استان کردستان ۷۰٪ همولوژی با یکدیگر نشان می دهند.

نقوش حاصل از واکنش rep-PCR با استفاده از آغازگر BOX در سطح ۸۰٪، جدایه ها را به سه گروه

تقسیم کرد. نتایج بدست آمده بوسیله ی این آغازگر نیز نشان داد با استفاده از این روش، نمی توان جدایه های مناطق و میزبان های مختلف را از یکدیگر متمایز کرد. این نتیجه نیز با نتایج توکل باخدا و تقوی همخوانی دارد. آنها عنوان نمودند جدایه های استان فارس دارای ۸۶٪ تشابه بوده و با این روش قابل تفکیک نیستند (توکل با خدا و تقوی، ۱۳۸۹).

نقوش حاصل از واکنش rep-PCR با استفاده از سه آغازگر REP، ERIC و BOX در سطح ۷۱٪، جدایه ها را به دو گروه تقسیم کرد. با توجه به نتایج حاصل از آنالیز ژنوتیپی ناشی از rep-PCR در *E. amylovora* در استان اصفهان، مشخص می گردد جدایه های دانه داران در این استان دارای یکنواختی بالایی هستند. توکل با خدا و تقوی در شیراز با استفاده از تلفیق داده های بدست آمده از واکنش rep-PCR با سه آغازگر قید شده دو گروه با سطح تشابه ۹۱٪ مشاهده نمودند (توکل با خدا و تقوی، ۱۳۸۹). مقایسه نتایج حاصل از آنالیز انفرادی و ترکیبی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون rep-PCR که در این پژوهش حاصل شده با یافته های توکل با خدا و تقوی (۱۳۸۹) تفاوت هایی را نشان داد. در اغلب موارد آن ها نشان دادند جدایه ها درصد تشابه بیشتری دارند. به عنوان مثال از آنالیز داده های حاصل از انگشت نگاری ژنتیکی با آغازگر rep در شیراز مشخص شد. جدایه ها درصد تشابه بالاتری داشته و به دو گروه اصلی با تشابه ۹۲ درصد تفکیک می شوند. به نظر می رسد علت وجود اختلاف در درصد تشابه سویه ها در استان های فارس و اصفهان دسترسی به تعداد جدایه های بیشتر از *E. amylovora* (۴۹ جدایه) در تحقیق حاضر و نیز جمع آوری آنها از مناطق مختلف در استان اصفهان باشد. این در حالی است که توکل با خدا و تقوی تنها ۱۱ جدایه که از سطح شهر شیراز جداسازی شده بود را با استفاده از این آزمون مورد بررسی قرار دادند که تنوعی از لحاظ جغرافیایی در میان جدایه ها وجود نداشت؛ به همین دلیل جدایه ها در سطح بالاتری شباهت نشان دادند. علاوه بر

¹Short sequence repeat

این، ممکن است جدایه‌های استان فارس در مجموع دارای همگنی بیشتری نسبت به جدایه‌های اصفهان باشند. این امر دور از انتظار نیست؛ زیرا بیماری در مناطق مختلف استان فارس گسترش نیافته و تنها محدود به شهر شیراز می باشد (توکل با خدا و تقوی، ۱۳۸۹)؛ لذا بیمارگر تحت تاثیر شرایط آب و هوایی متنوعی قرار نگرفته تا مجبور به تغییر ژنتیکی هرچند اندک گردد. تاکنون پایین بودن تنوع جدایه های مختلف باکتری سوختگی آتشی با استفاده از روشهای مختلف نشان داده شده است. از این روشها می توان به روشهای بیوشیمیایی (دای ۱۹۶۹، وردونک و همکاران ۱۹۸۷) دورگ‌گیری DNA (برنر و همکاران ۱۹۷۴)، سرولوژی (وانتومی و همکاران ۱۹۸۲) و آنالیز خوشه های ژنی *dsp* و *hrp* با استفاده از روش RFLP (رهیده و عبداللهی ۱۳۹۲) اشاره نمود. یکنواخت بودن ویژگی های فنوتیپی و ژنوتیپی در بین

جدایه های یک گونه، به عوامل مختلفی از جمله منشأ جغرافیایی، تخصص میزبانی و دامنه میزبانی باکتری بستگی دارد. بررسی ها نشان داده جدایه های *E.amylovora* که از یک اقلیم مشخص جدا شده اند و دامنه میزبانی آنها محدود به خانواده رزاسه است، به طور قابل ملاحظه ای هموژن می باشد. این احتمال وجود دارد که این باکتری‌ها نسبت به گونه هایی که دامنه میزبانی وسیع تر و پراکندگی جغرافیایی بیشتری دارند، فشار تکاملی کمتری را تحمل کرده باشند (پرومبلون و کلمان ۱۹۸۰). با توجه به مطالب ذکر شده، پیشنهاد می گردد از روش های مختلف مانند بررسی SSR در ژنوم این باکتری، مطالعه ژن های بیماریزایی با RFLP و RAPD استفاده گردد تا مشخص شود که آیا این باکتری از جهات مذکور نیز از یکنواختی برخوردار می باشد و یا خیر؟

منابع

- امیدوار ر، شمس بخش م و رحیمیان ح، ۱۳۸۵. تعیین خصوصیات استرین های ایرانی *Erwinia amylovora* با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی و RAPD. بیماری های گیاهی، جلد ۴۲، شماره ۴، صفحه های ۶۷۳ تا ۶۸۶.
- توکل باخدا ش و تقوی س م، ۱۳۸۹. ویژگی های فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه های *Erwinia amylovora* از میزبان های مختلف در شیراز. دانش گیاهپزشکی ایران، دوره ۴۱، شماره ۱، صفحه های ۴۰ تا ۴۱.
- داوودی ع. ۱۳۷۹. ارزیابی مقاومت ارقامی از سیب و گلابی به بیماری آتشک. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تبریز. ۲۰۰ صفحه
- ذاکری ز و شریف نوبی ب، ۱۳۷۰. بیماری آتشک گلابی در کرج. دهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. کرمان. صفحه ۱۵۷.
- رهیده س و عبداللهی ح. ۱۳۹۲. مقایسه تنوع ژنتیکی جدایه های *Erwinia amylovora* در خوشه های ژنی *ams* و *hrp*، *dsp* و پلاسمید pEA29. مجله ژنتیک نوین، صفحه های ۱۷۷ تا ۱۸۸.
- سهندپور ا و قاسمی ا. ۱۳۸۳. وقوع بیماری آتشک درختان میوه دانه دار در استان فارس. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. تبریز. صفحه ۴۲۹.
- حسن زاده ن، ذاکری ز و مزارعی م. ۱۳۷۲ الف. وضعیت بیماری آتشک در ایران. یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه گیلان، صفحه ۲۲۳.

- حسنزاده ن، مزارعی م و حاجی مراد م ر. ۱۳۷۲. شناسایی سرولوژیکی باکتری *Erwinia amylovora* عامل بیماری آتشک. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. دانشگاه گیلان، صفحه ۳۲۵.
- مزارعی م، ذاکری ر و حسنزاده ن. ۱۳۷۳. وضعیت بیماری آتشک روی درختان میوه در استان آذربایجان غربی و قزوین در سال های ۱۳۷۱ و ۱۳۷۲. مجله بیماری های گیاهی. جلد ۳۰، شماره های ۱-۴، صفحه های ۲۵ تا ۳۲
- ملایی س ن، حریقی ب و رفیعی پور م، ۱۳۹۰. بررسی خصوصیات فنوتیپی و مولکولی جدایه های باکتری عامل سوختگی جوانه با استفاده از تکنیک rep-PCR. کنگره ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی. تهران، مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران، http://www.civilica.com/Paper-IBRC01-IBRC01_165.html
- نیک نژاد کاظم پور م، کامران ا و علی ب. ۱۳۸۶. وقوع بیماری آتشک گلابی در اثر *Erwinia amylovora* در استان گیلان. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، صفحه های ۲۵۷ تا ۲۶۴.
- Afunian MR and Rahimian H. 1996. Investigation on the characteristics of Iranian isolates of *Erwinia amylovora*. Acta Horticulturae 411, 187-188.
- Atanasova I, Stefanova K, Kabadjova P, Tishkova S, Dimitrov Z, Bogatzevska N and Moncheva P. 2007. Phenotypic diversity of *Erwinia amylovora* in Bulgaria. Naturforsch 857-868
- Aysan Y, Miric M, Sahin F, Kotan R and Saygili H. 2003. Phenotypic characterization of *Erwinia amylovora* from pome fruits in Turkey. Acta Horticulturae 704:459-464
- 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, 3522-3526.
- Brenner DJ, Fanning GR and Steigerwalt AG. 1974. Deoxyribonucleic acid relatedness among *Erwinia* and other Enterobacteriaceae: the gall, wilt, and dry-necrosis organisms (Genus *Erwinia* Winslow et al.). International Journal of Systematic Bacteriology 24: 197-204.
- Dye DW. 1969. A taxonomic study of the genus *Erwinia* II. The carotovora groups. N. Z. J. Sci. 12: 81-97.
- Fahy PC and Persley CJ, 1983. Plant Bacterial Diseases: A Diagnostic Guide. Academic Press. Sydney, Australia.
- Halloway GJ, Gilling MR and Fahy PC. 1997. Use fatty acid profiles & REP-PCR to assess the genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv pisi isolated from Australia. Australian Journal of Plant Pathology 26: 98-108.
- Lecomte P, Manceau C, Paulin JP and Keck M. 1997. Identification by PCR analysis on plasmid pEA29 of isolates of *Erwinia amylovora* responsible of an outbreak in Central Europe. European Journal of Plant Pathology 103, 91-98.
- Laurent J, Barny MA, Kotoujansky A, Dufriche P and Vannest JL. 1989. Characterization of a ubiquitous plasmid in *Erwinia amylovora*. Molecular Plant-Microbe Interaction 2: 160-164.
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephenes CT and de Bruijn FJ. 1995. Differentiation of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. Phytopathology 85: 528-536.
- McManus PS and Jones AL. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested PCR and PCR dot-blot and reverse-blot hybridizations. Phytopathology 85: 618-623.
- Mollaei N and Harighi B, 2013. First report of fire blight on pear trees caused by *Erwinia amylovora* in Kurdistan Province, Iran. Plant Disease, 97: 1111.
- Momol MT and Aldwinckle HS. 2000. Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. PP.55-52. In: Vanneste JL (ed) Fire Blight. The Disease and Its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CABI Publishing, Wallingford.

- Perombelon MCM and Kelman A. 1980. Ecology of the soft rot erwinias. Annual Review of Phytopathology 18: 361-387.
- Rademaker JLW and De Bruijn FJ. 1998. Characterization & classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting. Pp 1-26 In: ADL Akkermans, JD Van Elsas and FJ de Bruijn, (eds.) Molecular Microbial Manual. Chapter 3.4.3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands
- Rohlf FJ. 2000. NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.1 Exetesoftware. Applied Biostatistics INC., NY, USA.493-505.
- Schaad N W, Jones J B and Chun W. 2001.Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul, MN., USA.
- Swings J and Hayward AC. 1990.Taxonomy.pp. 125–131. In: KlementZ, Rudolph K and Sands DC(eds.) Methods in phytobacteriology . Budapest: Akademiai Kiado.
- Van der Zwet T, Thomson SV, Covey RP and Bonn WG. 1990. Population of *Erwinia amylovora* on external and internal apple fruit tissues. Plant Disease, 74: 711-716.
- Vantomme R, Swings J, Goor M, Kersters K and De Ley J. 1982. Phytopathological, serological, biochemical and protein electrophoretic characterization of *Erwinia amylovora* strains isolated in Belgium. Phytopathologische Zeitschrift 103:349-360.
- Vegh A. 2012. Biological diversity of the Hungarian *Erwinia amylovora* isolates causing fire blight disease.Thesis of PhD Dissertaion, Corvinus University of Budapest, Hungary, 21pp.
- Verdonck L, Mergaert J, Rickaert C, Swings J, Kersters K and De ley J. 1987. The genus *Erwinia*: a numerical analysis of phenotypic features. International Journal of Systematic Bacteriology, 37: 4-18.
- Versalovic J, Koeuth Tand Lupski JR, 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteriaand application to fingerprinting of bacterial genome. Nucleic Acid Research 19: 6823-6831.
- Weingart H and Volkesh B. 1997.Genetic fingerprinting of *Pseudomonas syringae* Pathovars using ERIC-, REP- & IS50-PCR. Journal of Phytopathology 145: 339-345.
- Yaich M, Fatmi MB, Bougsiba M, Valentini F, Scuderi G, D'onghia AM and Cirvilleri G, 2011. Fire blight (*Erwinia amylovora* [Burrill] Winslow) in Morocco: importance, geographical distribution and characterization.Phytopathologia Mediterranea 50: 212–227
- Yaish MWF. 2006. Genetic mapping of quantitative resistance to race 5 of *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola in common bean. Euphytica 152: 397-404.

Phenotypic and Genotypic Characterization of *Erwinia amylovora* in Pome Fruit Orchards in Isfahan Province

G Najafipour^{*1}, E Jamali¹ and K Ayazpour¹

¹Assistant Professor, Department of Plant Protection, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

²Former MSc Student of Plant Protection Department, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.

*Corresponding author: g_najafipour@jia.ac.ir and gilda_najafi@yahoo.com

Received: 18 May 2014

Accepted: 10 Dec 2014

Abstract

During 2011 to 2012, different Pome orchards in Isfahan province were surveyed and the samples with fire blight symptoms such as water soaking of infected tissues, necrosis, wilt and tissue necrosis, scorched and in some cases death of the entire tree, were collected. Forty nine bacterial strains were isolated using NA, SNA and EMB media. Based on standard physiological and biochemical tests, the isolates were identified as *Erwinia amylovora*. In the PCR assay isolates were identified as *E. amylovora*, based on 1000 bp DNA fragments using A/B specific primers. In rep-PCR assay representative strains produced different fingerprints patterns using REP, ERIC, BOX primers. The results of this study demonstrated that fire blight disease is distributed in Isfahan province and collected *E. amylovora* strains from various regions of Isfahan province are genotypically homogenous with more than 71% similarity.

Keywords: *Erwinia amylovora*, Fire blight, Isfahan, rep-PCR.