مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۱، شماره۳، سال ۱۳۷۹ (۴۷۶-۴۶۳)

خصوصیات فنوتیپی استرین‌های ایرانی *Erwinia amylovora* (Burill) Winslow *et al.*, عامل باکتریائی بیماری آتشک درختان میوه سیب، گلابی و به

محمدرضا افیونیان، مجتبی محمدی و حشمت‌ا... رحیمیان
کارشناس ارشد مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریها، استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران و استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران، ساری.

تاریخ پذیرش مقاله ۷۹/۴/۸

خلاصه

در این بررسی تعداد پنجاه استرین جدا شده از میزبانهای سیب، گلابی، به، گل سرخ و ازگیل از مناطق قزوین، تهران، کرج، هشتگرد، طالقان، خوی، سلماس و ارومیه مورد بررسیهای فنوتیپی و الکتروفورز پروتئین و پلاسمید و حساسیت نسبت به آنتی‌بیوتیکها قرار گرفت. استرین‌ها لوان و کاتالاز مثبت، قادر به تحریک واکنش فوق حساسیت در برگهای توتون و شمعدانی و تولید تراوشات باکتریایی بر روی میوه‌های نارس گلابی بودند. واکنش گرم و اکسیداز منفی بوده و قادر به احیای نیترات و یا تولید رنگ فلورسانت نبودند. همه استرین‌ها هوازی اختیاری، اوره‌آز منفی، قادر به تحمل نمک طعام ۵٪ و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بودند. واکنش تولید مواد احیاء کننده از ساکارز در تمامی استرینها مثبت بود. تولید استوئین پس از دو روز مثبت و پس از پنج روز منفی ثبت گردید. ژلاتین به کندی هیدرولیز شده ولی هیچکدام از استرینها قادر به هیدرولیز نشاسته، کازئین، آرژی‌نین، توئین ۸۰ و یا اسکولین نبودند. تولید اندول، گاز از گلوکز، فنیل آلانین دی آمیناز، لستیناز، فسفاتاز و یا تولید رنگ صورتی در محیط YDC در تمامی استرینها منفی بود. تمامی استرینها از گلوکز، ساکارز، گالاکتوز، مانیتول، تری هالوز، ریبوز، سالیسین، آرابینوز، سلوبیوز، اینوزیتول، فروکتوز، گلیسرول، سیترات، سوکسینات و فومارات استفاده کرده و تولید اسید یا قلیا نموده و اکثراً توانایی مصرف فرمات را داشتند ولی قادر به مصرف اینولین، اسید نیکوتینیک، نیکوتین آمید، مالونات، تارتارات، آسکوربات، گلوکانات، گالاکتیورونات، پروپیونات، اگزالات، دی‌گلوتامیک اسید، لاکتات، بنزوات، استات و یا پلی‌پکتات سدیم نبودند. نقوش الکتروفورز پروتئین همه استرینها یکسان بود و در الکتروفورز ژل آگارز نیز تمامی آنها دارای دو نوار پلاسمیدی با وزن‌های مولکولی مشابه بودند. تمامی استرین‌ها در آزمون نشت دوطرفه در آگار در برابر سه آنتی سرم مصرفی یک باند رسوبی قوی ایجاد نمودند. واکنش غیر اختصاصی مشاهده نگردید. آنتی ژن حاصل از باکتری کشته شده با حرارت، واکنش قوی‌تری نسبت به آنتی‌ژن تیمار نشده (سوسپانسیون باکتری زنده) تولید نمود. کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی لیپیدهای استرین‌ها روی صفحه نازک سیلیکاژل شامل سه لکه عمده بوده و تفاوتی بین استرین‌ها مشهود نبود. براساس نتایج حاصله، استرین‌های باکتری عامل آتشک سیب و گلابی جدا شده از مناطق مختلف ایران در خصوصیات بررسی شده همانند (هموژن) و غیر قابل تمایز بودند.

واژه‌های کلیدی : بیماری باکتریائی آتشک، خصوصیات فنوتیپی، درختان میوه دانه‌دار.

مقدمه

بیماری آتشک با عامل باکتریایی *Erwinia amylovora*(*Burr*) (Winslow *et al.*, 1920) در ایران ابتدا از ناحیه برغان کرج و از روی درختان گلابی گزارش گردید (۳). بیماری سپس از مناطق آذربایجان غربی، قزوین و بر روی درختان سیب، گلابی، به و نیز گلسرخ گزارش شد. در حال حاضر بیماری در مناطق تبریز، شمیرانات و دماوند به طور محدود و عمدتاً روی درختان گلابی وجود دارد. علاوه بر میزبانهای یاد شده عامل بیماری در منطقه کرج از درختان و درختچه‌های مبتلای زالزالک، ازگیل و پیراکانتا نیز جدا شده است (۱ و ۲). علائم عمده بیماری شامل بلایت شکوفه‌ها، نکروز، سیاه شدگی و نیز سر عصایی شدن سرشاخه‌هاست. میوه‌های جوان چروکیده، سیاه و مومیایی شده، معمولاً مدتها به درخت متصل باقی می‌مانند. در بخش‌های آلوده ساقه، نکروز بافت‌های چوب و آبکش نیز قابل رؤیت است. در شرایط مرطوب، تراوشات باکتریایی از سطوح آلوده میوه‌های نارس، تنه و شاخه‌ها جریان می‌یابد.

E. amylovora باکتری است گرم منفی با ابعاد ۲-۱×۰/۸ میکرون، سلولها منفرد، دوتایی و یا به صورت زنجیره‌های کوتاه دیده می‌شوند. معمولاً دارای کپسول، متحرک با یک تا هشت تاژک پیرامونی، دامنه دمای رشد بین ۶ تا ۲۰ و دمای بهینه ۲۵ تا ۲۷ درجه سانتی‌گراد می‌باشد و در ۲ تا ۵ درجه فاقد رشد است. کلنی‌ها برجسته و روی محیط نوترینت آگار حاوی ۵ درصد سوکرز برآمده، سفید براق و لعاب دار (لوان مثبت) است. استرین‌های لوان منفی نیز ندرتاً جداسازی شده است. قطر کلنی‌ها پس از ۳ روز به ۳ تا ۴ میلیمتر می‌رسد. بی هوازی اختیاری است و در شرایط بی هوازی رشد ناچیز دارد. تولید اسید از گلوکز در شرایط هوازی به تندی و بدون ایجاد گاز و در شرایط بی هوازی به کندی انجام می‌پذیرد. تولید اسید از آرابینوز، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکز، مانوز، ساکارز، تری هالوز، گلیسرول، مانیتول و سوربیتول سریع بوده در حالیکه از سلوبیوز، سالیسین و اینوزیتول به کندی اسید تولید می‌شود. از سوربوز، لاکتوز، رافینوز، گلیکوژن، اینولین، دکسترین، نشاسته، آلفامتیل گلوکوزید یا دولسی‌تول اسید تولید می‌نماید. تولید اسید از زایلوز، رامنوز و مالتوز متغیر می‌باشد. تولید استوئین ضعیف بوده و بستگی به روش مورد استفاده دارد. تولید ایندول و هیدرولیز نشاسته، کازئین، توئین ۸۰، لسیتین، تری بنزین، پکتین، اوره‌آز و آرژی نین منفی است. کاتالاز مثبت، سیتوکرم اکسیداز منفی بوده و ژلاتین را به کندی هیدرولیز می‌کند. تولید H_2S و مصرف مالونات منفی است. اکسید اسیون گلوکونات و هیدرولیز اسکولین متغیر است. رشد در ۲٪ نمک طعام به تعویق افتاده و در ۶ تا ۷ درصد کاملاً جلوگیری می‌شود. به پنی‌سیلین مقاوم ولی به کلرامفنیکل، استرپتومایسین و تتراسیکلین حساس می‌باشد. به واسطه عدم تولید رنگ فلورسانت بر روی محیط King's B از باکتری *Pseudomonas syringae* و به واسطه تولید تراوشات باکتریایی بر روی میوه نارس گلابی از سایر اروینیاها قابل تمایز است. درصد گوانین باضافه سیتوزین از ۵۲/۳ تا ۵۴/۱ متغیر می‌باشد (۱۰).

یکی از ویژگی‌های شگفت‌آور باکتری *Erwinia amylovora* همگونی بسیار بالای این‌گونه است. هیچگونه اختلاف آنتی ژنیک بین استرین‌های بررسی شده تاکنون گزارش نشده است. همچنین امکان گروه‌بندی این گونه بر اساس واکنش در برابر آنتی سرم (سروتیپ) به منظور استفاده در مطالعات اپیدمیولوژیکی نیز مقدور نبوده است. همگونی سرولوژیکی و آنتی ژنهای منحصر به فرد، استفاده گسترده از سرولوژی را در تعیین و شناسایی این گونه امکان‌پذیر ساخته است. اگر چه آزمون تولید لخته روی اسلاید در تستهای روزمره تشخیص به قدر کفایت سریع و دقیق است، تکنیکهای حساستری مانند رنگ‌آمیزی ایمیونو فلورسنت و دس الایزا با بکارگیری از آنتی بادی مونوکلونال نیز انجام یافته است. چندین آنتی بادی مونوکلونال اختصاصی علیه این باکتری تهیه و در شناسایی آن از نمونه‌های شکوفه سیب و نیز از بافتهای آلوده بکار گرفته شده است (۱۵، ۱۷، ۲۵، ۲۷، ۲۸ و ۲۹).

حساسیت و میزان اختصاصی بودن چهار روش شناسایی بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) مقایسه شده است. از PCR برای تکثیر (amplification) یک قطعه DNA یک کیلو بازی اختصاصی از پلاسمید pEA29 که در گونه E. amylovora منحصر به فرد می‌باشد استفاده شده است. در روش nested PCR تعداد کمتر از یک سلول قابل ردیابی است که در مقایسه با single-round PCR تا هزار برابر حساس تر است. در بلات نقطه‌ای PCR Dot Blot و Reverse Blot Hybridization حداقل تعداد باکتری قابل تشخیص تقریباً ۲۰

سلول بوده است (۱۸). همچنین، آغازگرهای چند نوکلئوتیدی از بخش ams واقع در کروموزوم این باکتری که ۱/۶ کیلو باز است برای تشخیص *E. amylovora* با استفاده از PCR انجام گرفته است (۵).

چندین پلاسمید با وزن ملکولی ۳ تا ۶۰ کیلوباز در *E. amylovora* کشف گردیده است. هیچ ارتباطی بین پلاسمید و منشاء جغرافیایی یا میزبانی استرینهای مورد مطالعه یافت نشده است. تمامی استرینهای این گونه واجد یک پلاسمید ۲۹ یا ۳۰ کیلوبازی به نام pEA28 یا pEA29 می‌باشند (۹ و ۲۵). اختلاف نام به خاطر تفاوت در تخمین اندازه این پلاسمید بوده است. بعضی استرینهای غیر بیماریزا نیز فاقد هر گونه پلاسمید می‌باشند. پلاسمید pEA28 به علت پایداری زیاد با روشهای کلاسیک شیمیایی و فیزیکی قابل حذف نمی‌باشد و برای حذف آن از ناسازگاری پلاسمیدها استفاده شده است. در این روش با جایگزین کردن یک پلاسمید انتخابی ناپایدار و ناسازگار با پلاسمید pEA28 باکتری مربوطه، پلاسمید بومی در اثر رقابت حذف می‌گردد.استرینهای مقاوم به استرپتومایسین ابتدا در سال ۱۹۷۲ در کالیفرنیا و سپس در سایر نواحی ایالات متحده آمریکا و نیوزیلند یافت شده‌اند. تاکنون دو مکانیزم برای مقاومت باکتریهای بیماریزای گیاهی نسبت به استرپتومایسین توصیف شده است. یکی موتاسیون کروموزومی که قدرت اتصال پروتئینهای ریبوزومی به استرپتومایسین را تغییر می‌دهد و دیگری غیر فعال نمودن آنزیمی آنتی بیوتیکها توسط پلاسمید است. مقاومت به استرپتومایسین در باکتری مورد بحث غالب اوقات کروموزومی است، اما اخیراً استرینهائی از این باکتری واجد یک پلاسمید ۳۴ کیلوبازی به نام pEA34 یافت شده که قادر به اعطای مقاومت در باکتری است. ژنهای مقاومت جزئی از یک قطعه ۶/۷ کیلوبازی این پلاسمید بوده که در ترانسپوزانی به نام Tn5393 قرار دارد. این ترانسپوزان فاقد همولوژی با پلاسمید فوق‌الذکر بوده و نیز قادر به القای سنتز تیامین در استرینهایی که عاری از پلاسمید می‌گردند، نمی‌باشد. pEA34 بر خلاف pEA28 که نمی‌تواند از طریق الحاق (Conjugation) منتقل شود توانایی انتقال خود را دارد (۲۵).

هدف از این پژوهش، مقایسه استرین‌های ایرانی *E. amylovora*، عامل باکتریائی بیماری آتشک درختان میوه دانه‌دار، براساس ویژگیهای فنوتیپی و سرولوژیک، نقوش DNA پلاسمیدی، پروتئین سلولی و اسیدهای چرب و حساسیت به آنتی بیوتیکها می‌باشد.

مواد و روشها

نمونه برداری، جداسازی و نگهداری استرینها

در بهار ۱۳۷۲ با سرکشی و بازدید از باغهای آلوده مناطق مختلف تهران، کرج، شهریار، هشتگرد، طالقان و قزوین، نمونه‌های مظنون و دارای علایم بیماری جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌های برگی چند دقیقه در زیر آب شیر شسته و سپس توسط آب مقطر استریل آبکشی گردیدند. نمونه‌های خشبی پس از شستشو زیر آب ، با محلول سوبلمه جیوه یک در هزار به مدت یک دقیقه ضد عفونی و سپس آبکشی گردیدند. نمونه‌های برگی به همراه مقدار کمی آب مقطر استریل در هاون چینی استریل خرد و محلول حاصل روی محیط نوترینت آگار مخطط گردید. نمونه‌های خشبی پس از ضد عفونی سطحی، توسط قیچی تمیز به قطعات کوچکی تقسیم و به لوله‌های حاوی ۵ سی‌سی آب مقطر استریل انتقال داده شدند و پس از مدت نیم ساعت از محلول حاصل کشت به عمل آمد. در برخی موارد نیز پس از تماس مستقیم لوپ با تراوشات باکتریایی نمونه‌های آلوده، نسبت به کشت اقدام گردید. دو تا سه روز پس از کشت، تشتک‌هامورد معاینه قرار گرفته و کلنی‌های کوچک، براق، کرم تا شیری با حاشیه کامل، گرد و محدب انتخاب و مجدداً مخطط گردیدند. باکتریهای جدا شده در صورت واکنش منفی گرم و اکسیداز، تولید لوان و تحریک واکنش فوق حساسیت در برگهای توتون، عدم تولید رنگ فلورسانت در محیط کینگ B، با قدرت رشد بی‌هوازی اختیاری به عنوان گونه *E. amylovora* انتخاب شدند. برای اطمینان در تشخیص، توانایی تولید تراوشات باکتریایی در برشهای نارس گلابی نیز بررسی شد. همچنین از تعداد ۱۰ استرین، اهدایی میترا مزارعی (آزمایشگاه باکتری شناسی، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، اوین) نیز استفاده گردید. مشخصات استرین‌های مورد بررسی در جدول شماره ۱ ذکر گردیده است.

پس از جداسازی، تشخیص و انتخاب استرین‌ها، جهت نگهداری از روشهای سوسپانسیون یخ زده باکتری در آب و در

جدول ۱ - شماره استرین‌ها، محل نمونه‌برداری و نوع میزبان

محل نمونه‌برداری	نوع میزبان و شماره استرین
کرج (محمدآباد)	K_{2ii} گلابی، K_{2bi} سیب، $K_{3}41$ به، K6c به، K6a گلابی
کرج (ملارد)	K391 سیب، K392 گلابی
کرج (ساوجبلاغ)	Ks1 به، Ks2 گلابی
کرج (کمال‌آباد)	K4 به
کرج (بذر و نهال)	K5 گلابی
کرج (کلاک)	K_{3a} سیب، K_{3b} گلابی، K_{3c} به
کرج (مهرشهر)	Zal1 زالزالک
کرج (هشتگرد)	Az1 ازگیل
تهران (مؤسسهٔ تحقیقات آفات و ...)	Teh1 گلابی، Teh2 به
طالقان	Tal1 گلابی
قزوین (فیض آباد)	G51 سیب، G59 گلابی، G53 به
قزوین	*G1e به، *G1g سیب، *G1h گلابی، *G1i گلابی، *G1j گلابی، *G2 به
قزوین (جمال‌آباد)	G3c گلابی، G3e به، G3f سیب
قزوین (شیراصفهان)	G4f به، G4e به، G4j گلابی، G4h سیب
ارومیه	*Um6 گل سرخ
ارومیه (گردآباد)	U4c به، U4b گلابی، U4e گلابی، U4f سیب
ارومیه	U8a به، U8b سیب
خوی	*U6a گلابی، *U6b به، *U6c سیب
تبریز (سردرود)	T_1 گلابی، T_2 گلابی

ایزوله‌های دریافتی از خانم میترا مزارعی (بخش بیماریها، مؤسسهٔ تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، اوین)

دمای ۵ - درجه سانتی گراد، سوسپانسیون در آب ۴ سانتی گراد، کشت بر روی محیط مورب در زیر پارافین در یخچال و لیوفی لایز نمودن نمونه‌های استفاده شد. استرین‌ها حداقل به مدت ۸ ماه در دمای ۴ سانتی گراد و حداقل یکسال در سوسپانسیون یخ زده در آب مقطر سترون دوام آورده و قابل نگهداری بودند.

آزمون اثبات بیماریزایی

بیماریزایی ۱۰ استرین نیز توسط خراش برگها با سوزن آلوده به کلنی باکتری و یا تزریق سوسپانسیون حاوی 5×10^8 باکتری در میلی‌لیتر در محل انشعاب ساقه بررسی گردید. جهت اثبات اصول کخ، باکتری عامل بیماری از محل گسترش آلودگی‌های برگ و ساقه، در چند نمونه تلقیحی مجدداً جدا سازی و شناسائی گردید.

بررسی خصوصیات فنوتیپی استرینها

پنجاه استرین از مجموعه استرین‌های جدا شده، بر اساس میزبان و منطقه جغرافیایی، مورد بررسی‌های فنوتیپی و آزمونهای فیزیولوژیکی و بیوشیمایی قرار گرفت. آزمون گرم به دو روش رنگ‌آمیزی گرم و اسکرمن (۲۱) و حلالیت در پتاس ۳٪ به روش ساسلو و همکاران (۲۳) انجام شد. آزمون رشد هوازی و بی هوازی به روش هیوولایف سن (۱۱) و آزمون تحریک واکنش فوق حساسیت در توتون به روش کلمنت (۲۱) انجام گردید. تولید تراوش باکتریایی به روش بیلینگ (۶) و تولید لوان به روش للیوت و

همکاران (۱۴) انجام شد. آزمون تولید مواد احیاء کننده از ساکارز به روش دای (۷) و با افزودن معرف بندیکت اجرا شد.

آزمون ذوب ژلاتین بر اساس دای (۱۹) و به دو روش درون لوله و محیط جامد در پتری انجام گردید. نتایج آزمون ذوب ژلاتین در لوله پس از ۲۸ روز و در تشتک پس از گذشت حداقل ۷ روز و با استفاده از معرف کلرور جیوه در اسید کلریدریک ارزیابی شد. آزمون تولید گاز از گلوکز به روش شاد (۱۹) و آزمون اکسیداز به روش کواکز (۱۲) انجام شد. احیای نیترات به روش استانیر (۲۲) و با افزودن معرفهای سولفانیلیک اسید و آلفانفتل در اسید استیک و آزمون اوره آز در محیط مایع به روش شاد (۱۹) و نیز در محیط جامد با استفاده از محیط آماده تجارتی انجام پذیرفت. آزمون کاتالاز به روش للیوت و همکاران (۱۴) و تولید اندول به روش فهی و پرسلی (۸) و با افزودن معرف کواکس اندول به محیطهای کشت ۲ و ۵ روزه انجام شد. آزمون دی هیدرولاز آرژی نین به روش تورنلی (۲۴) انجام گردید. آزمون هیدرولیز توئین ۸۰ به روش سیه را (۲۰) و آزمون DNase با استفاده از محیط آماده اکسوئید انجام گردید. آزمون مصرف سیترات با استفاده از محیط تجارتی سیمون سیترات آگارونیز در محیط آیر انجام شد. آزمون اثر روی شیر لیتموس با استفاده از محیط آماده دیفکو (تندالیزه شده) انجام و نتایج تا ۳۰ روز مورد بررسی قرار گرفت (۱۹).

آزمون لهانیدن سیب زمینی به روش دای (۷) و آزمونهای تحمل نمک طعام، فسفاتاز، هیدرولیز نشاسته و کازئین، لسیتیناز، فنیل آلانین دی آمیناز، تولید H_2S و حساسیت به اریترومایسین بر اساس روشهای پیشنهادی فهی و پرسلی (۸) انجام گردید. آزمون رشد در دماهای ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی گراد با تلقیح محیط نوترینت براث واستفاده از بن ماری شیکردار با دقت ۰/۲ ± انجام شد. آزمونهای قدرت استفاده از منابع مختلف کربوهیدرات به عنوان تنها منبع کربن و انرژی و تولید اسید یا قلیا به روش دای (۷) انجام و نتایج تا ۳۰ روز بعد ارزیابی گردید. رشد یا واکنش استرین‌های مشکوک مجدداً در محیط مایع بررسی شد.

منابع کربنی و بنیانهای کربوهیدراتی استفاده شده عبارت بودند از: گلوکز، ساکارز، مانیتول، تری هالوز، ریبوز، سوربیتول، آرابینوز، اینوزیتول، فروکتوز، گلیسرول، سالیسین، دی‌مانوز، ملزیتوز، لاکتوز، دولسی‌تول، ادونیتول، رافینوز، رامنوز، دی‌زایلوز، ال‌زایلوز، ملی‌بیوز، مالتوز، سوربوز، پالاتینوز، آلفامتیل‌گلوکوزید، نشاسته، آمیگدالین، دکسترین، اینولین، نیکوتین‌آمید، سیترات، مالونات، فرمات، سوکسینات، تارتارات، آسکوربات، گلوکونیک‌اسید، فومارات، پروپیونات، اگزالات، گلی‌سین، دی‌گلوتامیک‌اسید، لاکتات، بنزوات، استات و سدیم پلی‌پکتات.

سرولوژی و آزمون نشت دو طرفه در آگار

برای شناسایی و نیز مطالعه استرینها از آنتی‌سرم اهدایی پروفسور J.P. Paulin (مرکز تحقیقات INRA فرانسه)، دو آنتی سرم اهدایی میترا مزارعی (علیه سلول باکتری تثبیت شده با گلوتر آلدئید و علیه سلول کشته شده با حرارت) و آنتی سرم تولیدی در این بررسی استفاده گردید.

سلول های زنده باکتری و نیز سلول های‌های کشته شده در اثر حرارت (ده دقیقه اتوکلاو یا تیمار در آب جوش) به عنوان آنتی ژن مصرف گردید. آزمون نشت دو طرفه در ژل آگارز ۰/۷ درصد در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار، pH۷/۲ حاوی ۰/۰۲ درصد سدیم رازاید و ۰/۸ درصد کلرور سدیم در چاهکهایی به قطر و فاصله سه میلیمتر از چاهک مرکزی انجام گردید. در چاهکهای مرکزی ۲۰ میکرولیتر آنتی سرم و در چاهکهای کناری به همان میزان آنتی ژن قرار داده شد و سپس پتریها در دسیکاتور مرطوب در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲ تا ۴ روز نگهداری و از نظر تشکیل باندهای رسوبی مورد بررسی قرار گرفتند.

الکتروفورز پروتئین

الکتروفورز پروتئین (SDS-PAGE) با استفاده از سیستم ناپیوسته لاملی (۱۳) و به روش آزوبل و همکاران (۴) انجام گردید. بدین منظور ۴۸ ساعت پس از کشت استرینها روی محیط نوترینت آگار حاوی ۱٪ گلوکز، نمونه‌ها در آب مقطر استریل سوسپانسیون و دانسیته نوری (OD) آن در ۶۰۰ نانومتر برابر یک، تنظیم شد.

به سوسپانسیون باکتری معادل ۰/۲ حجم آن بافر نمونه: ۰/۶ میلی‌لیتر بافر ۰/۵ مول تریس - HCl، pH ۶/۸، ۰/۵ میلی‌لیتر گلیسرول ۳۶ درصد؛ ۱ میلی‌لیتر SDS ۱۰ درصد؛ ۱۰ میلی گرم برومونول بلو، ۲/۴ میلی لیتر آب مقطر، ۲۲۵ میکرولیتر مرکاپتواتانول اضافه و نمونه‌ها به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند.

نمونه‌ها به میزان ۴۰ میکرولیتر در چاهکهای مربوطه قرار

داده شدند و الکتروفورز با شدت جریان ثابت ۱۰ میلی آمپر به مدت ۴ ساعت با استفاده از بافر تریس - گلیسین-SDS انجام گردید.

درصد آکریل آمید ژل متراکم کننده (Stacking gel) و ژل جداکننده (Separating gel) به ترتیب ۵ و ۱۰ درصد (وزن به حجم) بود. ژل حاصل در محلول رنگ‌آمیزی (۵۰ میلی لیتر آب مقطر، ۵۰ میلی لیتر متانول، ۱۰ میلی لیتر اسید استیک و ۰/۱ گرم کومازی بریلیانت بلو) به مدت یک شب رنگ‌آمیزی و سپس در محلول مشابه فاقد کومازی بلو رنگ بری گردید.

الکتروفورز پلاسمید

استخراج و الکتروفورز DNA پلاسمیدی براساس SDS-Alkaline Lysis و به روش پیشنهادی آزوبل و همکاران (۴) انجام شد. حدود ۱/۵ میلی‌لیتر از کشت ۲۴ ساعته استرینها در محیط نوترینت براث حاوی ۱٪ گلوکز به لوله‌های ایندورف منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه در ۸ هزار دور سانتریفوژ شد. رسوب حاصل در ۱۰۰ میکرولیتر بافر (۱۰ میلی لیتر آب مقطر، ۳۵ میلی‌گرم EDTA و ۱۰ میلی‌گرم Tris) حل گردید و به مدت ۵ دقیقه در حرارت اتاق نگهداری شد. سپس به هر یک از نمونه‌ها ۲۰۰ میکرولیتر سود ۰/۲ نرمال حاوی ۱٪ SDS اضافه شد و پس از به هم زدن به مدت ۵ دقیقه روی یخ نگهداری گردید. به هر نمونه ۱۵۰ میکرولیتر محلول استات پتاسیم سه مولار اضافه و چند ثانیه به شدت به هم زده شد و مجدداً به مدت ۵ دقیقه روی یخ نگهداری گردید. نمونه‌ها سپس به مدت یک دقیقه در ۸ هزار دور سانتریفوژ شد تا DNA کروموزومی و بقایای سلولی رسوب نمایند. محلول روئی به لوله‌های تمیز انتقال یافت و به آن ۰/۹ میلی‌لیتر اتانول ۱۰۰٪ اضافه و به مدت ۲ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. DNA پلاسمیدی به سانتریفوژ نمودن نمونه‌ها به مدت یک دقیقه رسوب داده شد. رسوب حاصل در اتانول ۷۰٪ شستشو و در دمای اتاق خشک گردید. رسوب در ۲۰ میکرولیتر بافر حل شد. پس از افزودن ۰/۲۵ درصد بروم فنیل بلو و ۵۰ درصد گلیسرول، نمونه‌ها به میزان ۵ تا ۱۰ میکرولیتر در چاهکهای ایجاد شده در ژل آگارز ۰/۷ درصد (وزن به حجم) در بافر Tris-borate-EDTA در ولتاژ ۵ V/cm به مدت سه ساعت الکتروفورز شد. نوارهای پلاسمیدی پس از رنگ‌آمیزی ژل توسط اتیدیوم بروماید ۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر با ترانس الومیناتور ماورای بنفش (UV-Transilluminator) مشاهده و عکس برداری گردید.

۲-۷- کروماتوگرافی لیپیدها

کروماتوگرافی لیپیدها بر اساس روش پیشنهادی ماتسویاما و همکاران (۱۶) انجام شد. پس از انتقال مستقیم کلنی‌های باکتری بر روی صفحات نازک سیلیکاژل ۶۰ (TLC) به ابعاد ۲۰×۲۰ سانتی‌متر و ضخامت ۰/۲۵ میلیمتر (Merck, Art. 5721) چربیهای سلول باکتری ابتدا به مدت ۱۰ دقیقه توسط محلول کلروفرم: متانول (۲ به ۱، حجمی) استخراج و سپس کروماتوگرافی در همان جهت به مدت ۹۰ دقیقه با استفاده از محلول کلروفرم، متانول و آب به نسبت ۶۰، ۲۵ و ۴ ادامه یافت. سپس صفحه مورد نظر با محلول الکل اتیلیک اسیدی شده (با افزودن ۱٪ اسید سولفوریک) حاوی ۲٪ درصد نین هیدرین اسپری و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. متعاقباً صفحه نازک مزبور توسط محلول ۵۰ درصد اسید سولفوریک اسپری گردید و به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در آون با دمای ۱۵۰ درجه سانتی‌گراد تا ظهور لکه‌ها حفظ گردید.

بررسی حساسیت به آنتی بیوتیکها

میزان حساسیت استرین‌ها نسبت به آنتی بیوتیکهای مختلف با استفاده از دیسکهای تجارتی آنتی‌بیوتیک مورد آزمون قرار گرفت. در این بررسیها پس از کشت یکنواخت یکصد میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت تقریبی 5×10^8 سلول در میلی‌لیتر روی محیط نوترینت آگار حاوی ۱٪ گلوکز، دیسکهای مورد نظر توسط پنس استریل در سطح محیط کشت قرار داده شدند. برای هر تیمار آنتی‌بیوتیک - باکتری چهار تکرار در نظر گرفته شد و نتایج پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت ثبت گردید. آنتی بیوتیکهای مصرفی بر اساس میانگین هاله بازدارنده از لبه دیسکها، ارزیابی گردیدند. در این بررسی، از دیسکهای عاری از آنتی‌بیوتیک به عنوان کنترل استفاده شد. آنتی‌بیوتیکهای مورد بررسی در جدول ۴ آورده شده است.

نتایج و بحث

در مجموع ۵۰ استرین *Erwinia amylovora* از درختان سیب، به، گلابی، ازگیل، گل سرخ و زالزالک از مناطق تهران، کرج، طالقان، قزوین، ارومیه، تبریز، سلماس و خوی تعیین خصوصیت شده و مورد مقایسه قرار گرفتند (جدول ۱).

جدول ۲ -خصوصیات فنوتیپی‌استرینهای Erwinia amylovora جداشده از مناطق مختلف ایران*

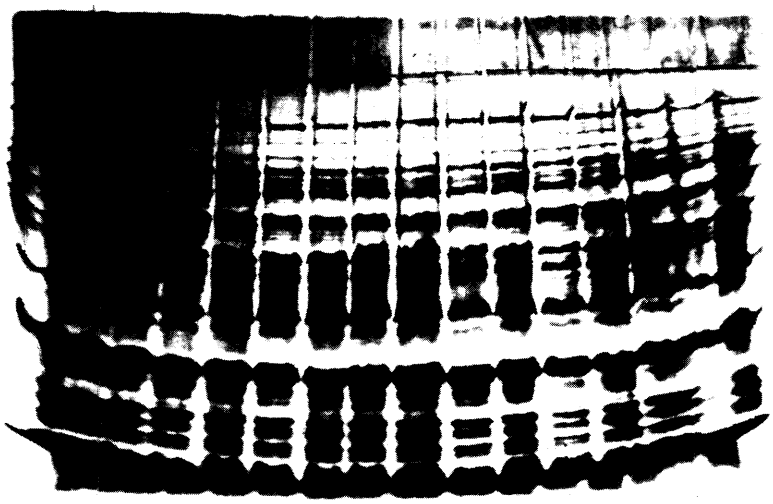
آزمون	نتیجه	آزمون	نتیجه
رنگ‌آمیزی گرم	-	تحمل نمک طعام ۵٪	+
واکنش گرم (پتاس ۳٪)	-	تحمل نمک طعام ۶٪	-
توانایی رشد هوازی و بی‌هوازی	+	رشد در ۳۶ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد	-
تولید لوان	+	تولید گاز از گلوکز	-
فوق حساسیت در برگ توتون و شمعدانی	+	هیدرولیز توئین ۸۰	-
اکسیداز	-	تولید استوئین (۲ روزه)	+ (۹۶٪)
تولید رنگ فلورسانت	-	تولید استوئین (۵ روزه)	-
کاتالاز	+	متیل رد	-
تولید شیرابه روی میوه نارس گلابی	+	تولید H_2S از سیستئین	- (۹۲٪)
مواد احیاء کننده از ساکارز	+	هیدرولیز اسکولین	- (۹۲٪)
هیدرولیز ژلاتین (پتری)	+ (ضعیف)	DNase	-
هیدرولیز ژلاتین (لوله)	+ (ضعیف)	هیدرولیز کازئین	-
اوره‌آز (محیط مایع)	-	فسفاتاز	-
اوره‌آز (محیط جامد)	-	لهانیدن سیب‌زمینی	-
تولید ایندول	-	فعالیت هسته یخ	-
تولید رنگ صورتی روی YDC	-	حساسیت به اریترومایسین (15μg/disc)	+
۲ -کتوگلوکونات	-	رشد روی EMB Agar	+
۳ -کتولاکتوز	-	اثر روی شیر لیتموس :	
احیای نیترات	-	قلیائی شدن	۸۵٪
هیدرولیز آرژی‌نین	-	اسیدی شدن	۱۳٪
فنیل‌آلانین دی‌آمیناز	-	احیای لیتموس	۲٪

تعداد ۵۰ استرین شامل ۲ استرین از تهران، ۱۶ استرین از کرج، یک استرین از طالقان، ۱۶ استرین از قزوین، ۷ استرین از ارومیه، ۳استرین از خوی و ۲ استرین از تبریز.

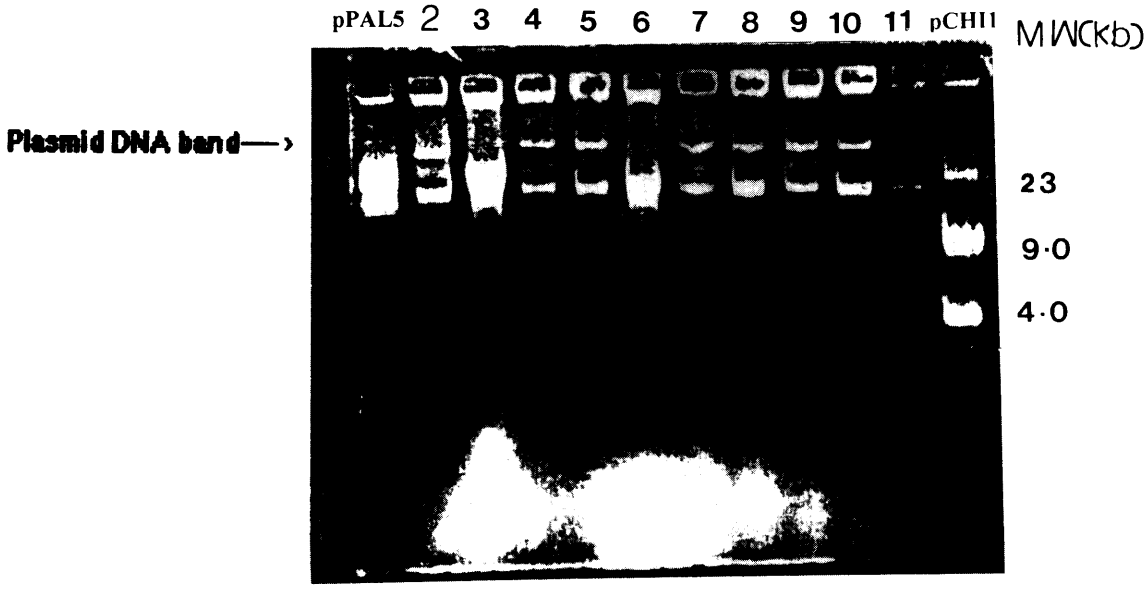
+ : واکنش مثبت - : واکنش منفی

کلنی استرینها روی محیط لوان برجسته و لعابدار و در محیط نوترینت آگار بعد از ۲ روز رشد در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، ۲-۱ میلی‌لیتر قطر داشته، مدور، برجسته و براق با حاشیه کامل به رنگ کاملاً روشن یا ندرتاً آبی روشن بود. کلنی‌های اخیر ناپایدار بوده و رنگ استرین‌های مزبور پس از تجدید کشت به کرم تغییر نمود. هیچگونه تفاوت فنوتیپی دیگری در این مطالعات بین این دو حالت کلنی دیده نشد. تفاوت اخیر توسط بلینگ (٦) نیز گزارش شده و علت آن به میزان کپسول باکتری ارتباط داده شده است.

کلیه استرین‌ها گرم و اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت، بی هوازی اختیاری بوده وقادر به تولید لوان در محیط نوترینت آگار حاوی ۵٪



شکل ۱ - همگونی استرین های *E. amylovora* از لحاظ الگوی پروتئین سلولی در ژل پلی آکریل آمید



شکل ۲ - پلاسمیدهای pPAL5 و pCHIl به عنوان نشانگر با وزن مولکولی به ترتیب ۹/۸ و ۳/۹ در چاهکهای کناری رانده شده اند. وزن های مولکولی با فلش مشخص شده است.

ساکارز، تولید مواد احیاکننده از ساکارز، تحریک واکنش فوق حساسیت در برگهای توتون و شمعدانی و تولید تراوشات باکتریایی بر روی میوه نارس گلابی بودند. قادر به تولید رنگ فلورسانت در محیط کینگ ب، اوره‌آز و احیای نیترات نبودند.

تمامی استرین‌های انتخابی مدت ۸ تا ۲۴ ساعت واکنش فوق حساسیت در توتون ایجاد کردند. استرین‌های مزبور همچنین طی ۲۴ ساعت قادر به تحریک واکنش فوق حساسیت در برگهای شمعدانی شدند. کلیه استرین‌های انتخابی دراین آزمایش به برشهای میوه‌های نارس گلابی که پیشتر توسط الکل اتیلیک ۷۰ درصد ضد عفونی سطحی شده بودند تلقیح گردیدند و همگی قادر بودند در مدت ۴ تا ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تولید تراوش باکتریایی (ooze) بنمایند. مایه کوبی با آب مقطر و نیز یک استرین *Pseudomonas syringae* جدا شده از درختان گلابی به عنوان کنترلهای این آزمایش به کار رفتند. برخلاف *E. amylovora* که قادر به ایجاد تراوش باکتریای روی میوه گلابی نارس بود، *P. syringae* تنها لکه‌های نکروز بدون ایجاد تراوشات در میوه نارس گلابی ایجاد نمود.

قدرت هیدرولیز ژلاتین بسیار ضعیف و نتایج حداقل ۷ روز پس از تلقیح جامد با مصرف معرف مربوطه و یا پس از یک ماه در لوله قابل تعیین بود. استرین‌ها قادر به تحمل ۵ درصد نمک طعام با حرارت ۳۵ درجه سانتی گراد بودند اما رشدشان در ٦ درصد نمک و با دماهای ۳٦ درجه سانتی گراد و بالاتر دچار توقف گردید. استرین‌ها فاقد قدرت هیدرولیز نشاسته، توئین ۸۰ و کازئین بوده و بر روی محیط YDC تولید رنگ صورتی ننمودند. واکنشهای تولید ایندول، ۳ کتولاکتور، ۲ کتوگلوکونات، هیدرولیز آرژی نین، تولید فنیل آلانین دی آمیناز، DNase، فسفاتاز، گاز از گلوکز، واکنش متیل رد، لهانیدن سیب‌زمینی و تشکیل هسته یخ منفی بود. تنها دو استرین قادر به تولید گاز H_2S از سیستئین و هیدرولیز اسکولین بودند (جدول ۲).

تمامی استرینها، قندهای گلوکز، ساکارز، گالاکتوز، مانیتول، تری هالوز، ریبوز، سوربیتول، ارابینوز، سلوبیوز، فروکتوز، اینوزیتول را مصرف و تولید اسید نموده و قادر به استفاده از گلیسرول، سالیسین، سیترات، فومارات، سوکسینات، و بندرت فرمات بودند. هیچ یک از استرینها قادر به مصرف و یا تولید اسید از مانوز، ملزیتوز، لاکتوز، دولسی تول، آدونیتول، رافینوز، رامنوز، زایلوز، مالتوز، سوربوز، پالاتینوز، آلفامتیل گلوکوزید، نشاسته، آمیگدالین، دکسترین، اینولین، گلیسین، و یا مصرف مالونات، تارتارات، بنزوئات، آسکوربات، گلوکونات، گالاکتیورونات، پروپیونات، اگزالات، گلوتامات، لاکتات و استات نبودند. استرینها فاقد قدرت مصرف نیکوتین آمید، نیکوتینیک اسید و پلی پکتات سدیم به عنوان تنها منبع کربن و انرژی بودند (جدول ۳).

کلیه استرین‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین، آموکسی سیلین، آمپی سیلین، سفالکسین، ونکومایسین، اگزاسیلین، لینکومایسین، گلوگزاسیلین و سفالوتین مقاوم بوده و هیچگونه هاله بازدارنده مشاهده نشد. در مقایسه، استرین‌ها در برابر فورازولیدون، اکسی تتراسیکلن، سفتیزوکسیم، نیتروفورانتوئین، دوکسی سیکلین، نالیدیکسیک اسید و کلرامفنیکل حساسیت داشته و هاله بازدارنده بین ۸ تا ۹/۸ میلی‌متر بود. استرینهای مورد مطالعه در مقابل سایر آنتی‌بیوتیکها کمی تا نسبتاً حساس بوده و هاله بازدارنده آنان بین ۱ تا ۷/۸ میلی متر متغیر بود.

تمامی استرین‌ها در الگوی الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی کاملاً مشابه و هموژن بوده و بر این اساس غیر قابل تفکیک هستند (۱). همچنین کلیه استرین‌های مورد بررسی در دو نوار پلاسمیدی با وزن ملکولی متفاوت مشترک بوده و نتایج حاصل از این بررسی با نتایج فالکنشتین و همکاران (۹) مبنی بر وجود یک پلاسمیدی مشابه در تمامی ایزوله‌های این باکتری تناقض دارد (شکل ۲).

کلیه استرین‌های مورد بررسی در آزمون نشت دو سویه در آگارز علیه آنتی سرمهای مصرفی، واکنش یکسان یعنی تنها یک نوار رسوبی قوی (بدون هر گونه واکنش غیر اختصاصی) نشان دادند (شکل ۳). آنتی سرمهای مزبور فاقد قدرت واکنش کنندگی غیر اختصاصی با سایر جنسهای پاتوژن گیاهی و یا گونه‌های دیگر اروینیا بودند و آنتی سرم پلی کلونال تهیه شده علیه این باکتری اختصاصی عمل کرد. آنتی ژن حاصل از تیمار حرارتی باکتری در برابر هر دو آنتی سرم تهیه شده علیه سلول تثبیت شده با گلوتر آلدئید و یا کشته شده با حرارت واکنش قوی‌تری در مقایسه با سلول زنده و کامل باکتری نشان داد. هیچگونه گروه بندی بر اساس حساسیت به فاژها (لایزوتیپ) یا عکس‌العمل به سرم (سروتیپ) مقدور نبوده است

جدول ۳ - توانایی مصرف منابع کربوهیدراتی توسط استرینهای *Erwinia amylovora* جدا شده از مناطق مختلف ایران

منبع مورد بررسی	نتیجه	منبع مورد بررسی	نتیجه
گلوکز	+	آلفا متیل گلوکوزید	-
ساکارز	+	نشاسته	-
گالاکتوز	+	آمیگدالین	-
مانیتول	+	دکسترین	-
ترهالوز	+	اینولین	-
ریبوز	+	نیکوتینات	-
ال‌اربینوز	+	نیکوتین آمید	-
سلوبیوز	+	سیترات	+
فروکتوز	+	سوکسینات	+
سوربیتول	+	فومارات	+
اینوزیتول	+	مالونات	-
گلیسرول	+	فرمات	-
سالیسین	+	ال (-) تارتارات	-
دی مانوز	-	ال (+) تارتارات	-
ملزیتوز	-	آسکوربات	-
لاکتوز	-	گلوکونات	-
دولسی تول	-	گالاکتیورونات	-
آدونیتول	-	پروپیونات	-
رافینوز	-	اگزالات	-
رامنوز	-	لاکتات	-
دی‌زایلوز	-	بنزوات	-
ال‌زایلوز	-	استات	-
ملی‌بیوز	-	گلوتامات	-
مالتوز	-	گلی سین	-
سوربوز	-	پلی پکتات سدیم	-
پالاتینوز	-		

+ : واکنش مثبت - : واکنش منفی

جدول ۴ - حساسیت استرین‌های *E. amylovora* جدا شده از نقاط مختلف ایران به آنتی‌بیوتیکها

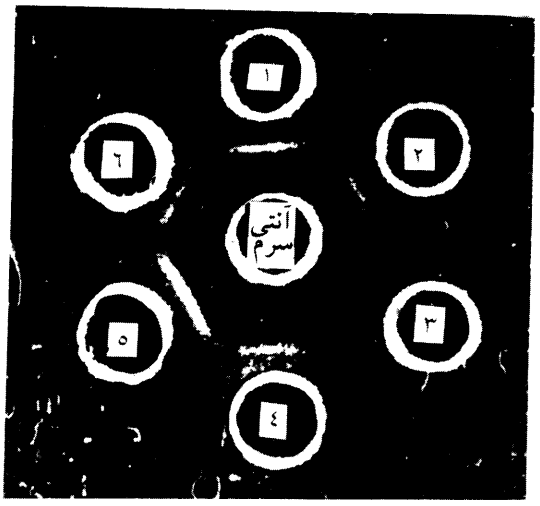
نوع آنتی‌بیوتیک	میزان	متوسط هاله بازدارنده لبه دیسک (میلی‌لیتر)
۱ - پنی سیلین	10 μg/disc	۰
۲ - آموکسی سیلین	25 μg/disc	۰
۳ - آمپی سیلین	10 μg/disc	۰
۴ - سفالکسین	30 μg/disc	۰
۵ - ونکومایسین	30 μg/disc	۰
۶ - اگزاسیلین	1 μg/disc	۰
۷ - لینکومایسین	2 μg/disc	۰
۸ - کلوگزاسیلین	5 μg/disc	۰
۹ - سفالوتین	30 μg/disc	۰
۱۰ - کلینداماپسین	2 μg/disc	۱/۲
۱۱ - نئومایسین	30 μg/disc	۲/۹
۱۲ - توبرامایسین	10 μg/disc	۲/۹
۱۳ - جنتامایسین	10 μg/disc	۳/۶
۱۴ - تری‌متوپرایم‌سولفامتاکسازول	SXT	۳/۹
۱۵ - ریفامپیسین	30 μg/disc	۴/۹
۱۶ - اریترومایسین	15 μg/disc	۵
۱۷ - کولستین	10 μg/disc	۵/۲
۱۸ - سفازولین	3 μg/disc	۵/۲
۱۹ - استرپتومایسین	10 μg/disc	۶/۲
۲۰ - کانامایسین	30 μg/disc	۷/۷
۲۱ - آمیکاسین	30 μg/disc	۷/۷
۲۲ - تتراسیکلین	30 μg/disc	۷/۸
۲۳ - فورازولیدون	15 μg/disc	۸
۲۴ - اکسی تتراسیکلین	30 μg/disc	۸/۵
۲۵ - سفتیزوکسیم	30 μg/disc	۸/۸
۲۶ - نیتروفورانتوئین	300 μg/disc	۹/۲
۲۷ - دوکسی سیکلین	30 μg/disc	۹/۲
۲۸ - نالیدیکسیک اسید	30 μg/disc	۹/۴
۲۹ - کلرامفنیکل	30 μg/disc	۹/۸

هالهٔ بازدارنده: ۰ میلی‌متر: مقاوم ۸/۷-۵: نسبتاً حساس

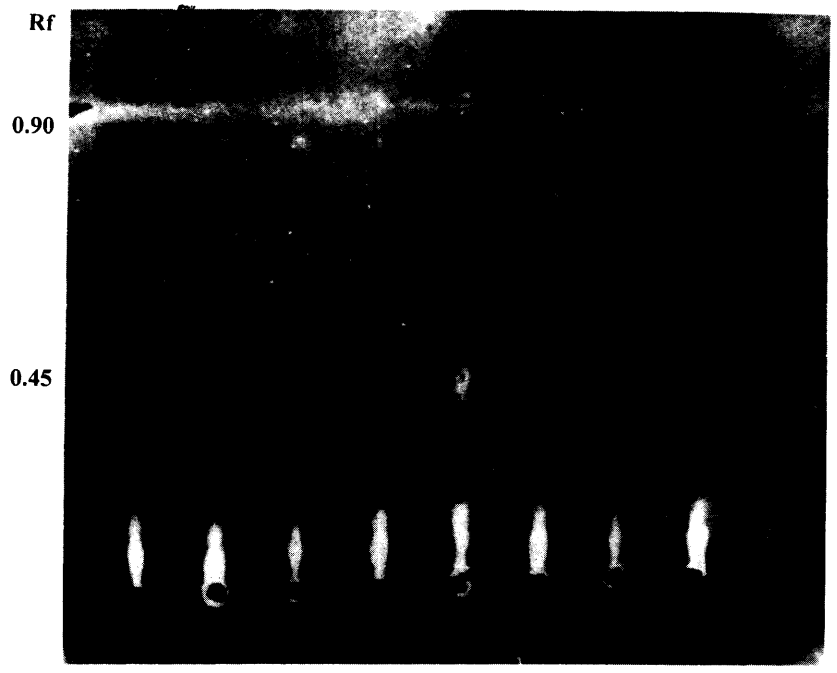
۹/۴-۱ میلی‌متر: کمی حساس ۹/۸-۸: حساس

(۲۵). بر خلاف سایر باکتری‌های مولد نکروز، این گونه بر اساس دامنه میزبانی غیر قابل تفکیک است.

الگوی لیپیدی حاصل از کروماتوگرافی نازک لایهٔ سیلیکاژل، مؤید تشابه کامل استرینها از لحاظ چربیهای سلولی بود که با نتایج و اندر زویت (۲۸) مطابقت دارد. به نظر می‌رسد لکه وسط (R_f=۰/۴۵) و لکه بالایی (R_f=۰/۹۰) به ترتیب مشخصه جنس اروینیا و گونه آمیلوورا باشد. کروماتوگرام حاصل از استرین‌های *E. amylovora* در این بررسی با الگوی مربوط به باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* کاملاً متفاوت و شامل سه لکه عمده بود (شکل ۴). از لحاظ پروفیل اسیدهای چرب نیز این



شکل ۳ - عکس العمل یکسان استرین های *Erwinia amylovora* نسبت به آنتی سرم مربوطه در آزمون نشت دو طرفه در آگار



شکل ۴ - الگوی حاصل از کروماتوگرافی لیپیدهای سلولی باکتری *E. amylovora* روی لایه نازک سیلیکاژل R_f لکه های وسط و بالا به ترتیب ۰/۴۵ و ۰/۹۰ می باشد.

گونه کاملاً متجانس و هموژن ارزیابی شده است (۲۸).

بر اساس مطالعات و بررسی خصوصیات فنوتیپی انجام یافته بر روی ۵۰ استرین *E. amylovora* جدا شده از میزبانهای سیب، گلابی، به، ازگیل، زالزالک و گل سرخ مربوط به مناطق تهران، کرج، قزوین، طالقان، ارومیه، تبریز، سلماس و خوی، کلیه استرین‌ها از همولوژی بسیار بالایی برخوردار بودند. هیچگونه ویژگی که بر اساس آن بتوان استرین‌های دارای منشاء میزبانی جغرافیایی متفاوت و یا جدایه‌های سالهای مختلف را متمایز ساخت یافت نشده است (۲۵).

تفکیک استرین‌ها بر اساس یک یا چند خصوصیت مرفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمایی و یا بر اساس خصوصیات سرولوژی در آزمون نشت دو طرفه در آگار، الگوی پروتئینی سلولی در ژل آکریل آمید، الگوی پلاسمیدی استرینها در ژل آگارز، الگوی چربیهای سلولی در کروماتوگرافی نازک لایه و آزمون بررسی حساسیت به آنتی بیوتیکها غیر ممکن بوده و بر این اساس تمامی استرینهای مورد مطالعه در یک گروه واحد قرار می گیرند.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱. افیونیان، م.ر. و ح. رحیمیان. ۱۳۷۴. ازگیل به عنوان میزبان جدید آتشک در ایران. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، کرج. صفحه ۲۲۰.

۲. افیونیان، م. ر. ح. رحیمیان و م. مزارعی. ۱۳۷۴. مقایسه ایزوله‌های ایرانی *Erwinia amylovora* بر اساس خصوصیات بیوشیمیائی، فیزیولوژیکی و الکتروفورز پروتئین. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، کرج. صفحه ۳۵۹.

۳. ذاکری، ز. و ب. شریف‌نبی. ۱۳۷۰. بیماری آتشک گلابی در کرج. خلاصه مقالات دهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، کرمان. صفحه ۱۵۷.

4. Ausubel, F.M.O., R. Brent & D.D. Moore. 1987. Current protocols in molecular biology. Greene Publ. Asso. Wiley interscience, NY.

5. Bereswill, S., P. Bugert, L. Bruchmuller & K. Geider. 1995. Identification of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora* by PCR assays with chromosomal DNA. Appl. Environ. Microbiol. 61:2636-2643.

6. Billing, E. 1961. Characterization of English isolates of *Erwinia amylovora* J. Appl. Bacteriol. 24:195-211.

7. Dye, S.W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia* L. The "Amylovora" group. New Zealand J. Agric. Sci. 11:590-607.

8. Fahy, P.C. & G.J. Persley. 1983. Plant bacterial diseases, a diagnostic guide. Academic Press, N.Y.

9. Falkenstein, H., W. Zeller & K. Geider. 1989. The 29 Kb Plasmid, common in strains of *Erwinia amylovora*, modulates development of fire blight symptoms. J. Gen. Microbiol. 135:2643-2650.

10. Hayward, A.C. & J.M. Waterston. 1965. *Erwinia amylovora* CMI description of pathogenic fungi and Bacteria. No. 44.

11. Hugh, R. & E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. J. Bacteriol. 66:24-26.

12. Kovacs, N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature (London) 178:703.

13. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

14. Lelliott, R.A., E. Billing & A.C. Hayward. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas*. J. Appl. Bacteriol. 29:470-489.

15. Lin, C.P., T.A. Chen, J.M. Wells & T. Van der Zwet. 1987. Identification and determination of *Erwinia amylovora* with monoclonal antibodies. Phytopathol. 77:376-380.

16. Matsuyama, N., I.H. Main & H. Furuja. 1993. Application of the direct colony TLC method for identification of phytopathogenic bacteria. J. Faculty of Agric. Kyushu Univ. 37:283-287.

17. McLaughlin, R.J., T.A. Chen & J.M. Wells. 1989. Monoclonal antibodies against*Erwinia amylovora*: characterization and evaluation of a mixture for detection by enzyme-linked immunosorbent assay. Phytopathol. 79:610-613.

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

19. Schaad, N.W. 1988. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd ed. APS Press, St. Paul, MN, USA.

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

21. Skerman, N.B.D. 1967. A guide to identification of the genera of bacteria. 2nd ed. Baltimore, Maryland, USA. Williams & Wilkins.

22. Stainer, Y. 1966. The aerobic Pseudomonads. J. Gen. Microbiol. 43:159-271.

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

24. Thornley, M.J. 1960. The differentiation of Pseudomonas from other gram negative bacteria on the basis of arginine metabolism. J. Appl. Bacteriol. 23:37-52.

25. Vanneste, J.L. 1995.*Erwinia amylovora*. In: Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Vol. 1 (editor: Singh, U.S.A.). Pergamon Publ. 21-46 pp.

26. Vanneste. J.L., J. Yu and S.Y. Beer. 1992. Role of antibiotic production by Eh252 in biological control of *Erwinia amylovora*. J. Bacteriol. 2785-2796.

27. Vantomme, R., J. Swings, M. Goor, K. Kersters & J. De Ley. 1982. Phytopathological, serological, biochemical and protein electrophoretic characterization of *Erwinia amylovora* isolated in Belgium. Phytopathol Z. 103:349-360.

28. Van der Zwet, T. 1986. Determination of fatty acid profiles relevant to the characterization of *Erwinia amylovora*. Proceedings of the 6th Int Conf. Plant Path. Bact. 821-829.

29. Van der Zwet, T. & H.L. Keil. 1979. Fire blight USDA Agriculture Handbook 510, 200 pp.

Iranian J. Agric. Sci. Vol. 31, No.3, 2000

Phenotypic Characterization of Iranian Strains of Erwinia Amylovora, the Causal Agent of Fire Blight Disease Pome Trees.

M.R. AFUNIAN, M. MOHAMMADI AND H. RAHIMIAN

Former Graduate Student, Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Tehran, Karaj, Iran and Professor, Faculty of Agriculture University of Mazandaran, Iran.

Accepted June, 28, 2000

SUMMARY

A total fifty strains of *Erwinia amylovora* (Burr). Winslow *et al*, the causal agent of fire blight disease of pome trees, were isolated from apple, pear, quince, rose and medlar trees from various regions of Iran and subjected to physiological and biochemical characterization, electrophoresis of protein and plasmid DNA, fatty acid analysis and serological and antibiogram tests. The results showed that all fifty strains shared similar biochemical as well as physiological properties, soluble protein profile in SDS-PAGE and antibiotic sensitivities. All *E. amylovora* strains possessed two plasmid DNA bands differing in molecular weight in agarose gel electrophoresis. Ouchterolony double diffusion test revealed a single and strong homologous precipitin band against three specific anti-sera tested. Thin-layer chromatography of lipids showed three major and common spots for all strains used. It is concluded that the Iranian strains of E. amylovora originated from different geographical regions are considered homologous and non-distinctive.

Key words: Fire blight disease, *Erwinia amylovora*, Phenotypic Characterization, Pone tress