مجله کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
شماره ۱، ۱۳۹۱ (۴۷-۳۹)

بررسی کنترل بیولوژیک بیماری آتشک گلابی با عامل *Erwinia amylovora* با استفاده از برخی باکتری‌های آنتاگونیست

مهدی میرزائی[1*]، حشمت‌اله امینیان[2] و علی روستایی[2]
۱، کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
۲، دانشیار پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۲۷ تاریخ تصویب: ۹۱/۷/۱۲)

چکیده

بیماری آتشک (Fire blight) یکی از بیماری‌های مهم درختان میوه‌ی دانه‌دار در جهان است. مشکلات کنترل این بیماری، بخصوص در مورد استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و همچنین از آنجایی‌که روش‌های دیگر شیمیایی نیز برای مبارزه با بیماری آتشک سیب و گلابی در دست نیست، روش بیولوژیک می‌تواند به‌عنوان بهترین جایگزین برای کنترل بیماری مورد توجه قرار گیرد. در این تحقیق، اثر پنج جدایه آنتاگونیست از گونه‌های *Pantoea agglomerans* و *Pseudomonas fluorescens*، بر باکتری عامل بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*) در آزمایشگاه و باغ، مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور باکتری‌های آنتاگونیست و عامل بیماری به ترتیب از بافت‌های سالم و آلوده درختان سیب و گلابی از باغ‌های استان‌های تهران و قزوین جداسازی شد و سپس جدایه‌های به‌دست‌آمده، با استفاده از آزمون‌های فیزیولوژیک، بیوشیمیایی و مورفولوژیکی مورد شناسایی قرار گرفتند. برای بررسی اثر این آنتاگونیست‌ها بر رشد عامل بیماری آتشک، در آزمایشگاه، آزمون ایجاد هاله‌ی بازدارنده (آنتی‌بیوز) و بررسی تولید آنتی‌بیوتیک (آزمون کلروفرم)، به‌کار گرفته شد. در این آزمون‌ها، جدایه‌های آنتاگونیست اثر معنی‌داری را در مهار رشد باکتری *E. amylovora* از خود نشان دادند. برای بررسی اثر این آنتاگونیست‌ها در جلوگیری از سوختگی گل‌های گلابی به‌وسیله‌ی عامل بیماری در شرایط باغ، آزمون مزرعه‌ای طراحی و اجرا شد. تحلیل داده‌های این آزمون مشخص کرد که تیمارهای آنتاگونیستی به‌طور معنی‌داری موفق به جلوگیری از سوختگی گل‌ها شدند. به‌طوری که این تیمارها وقوع بیماری را بین ۵۵/۳ تا ۸۶/۴ ٪ کاهش دادند. این یافته‌ها نشان داد که همه‌ی پنج جدایه‌ی مورد بررسی در این تحقیق، هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط باغ در کنترل بیماری موفق بوده‌اند.

واژه‌های کلیدی: آتشک گلابی، بیوکنترل، *Pantoea agglomerans*، *Pseudomonas fluorescens*، *Erwinia amylovora*

مقدمه

امروزه با توجه به مشخص‌شدن بیش از پیش زیان‌های سموم شیمیایی برای انسان و محیط‌زیست، اهمیت کاربرد کنترل زیستی برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی آشکار شده است. علاوه بر ملاحظات زیست‌محیطی، از آنجایی‌که روش‌های مطمئنی برای مبارزه با بیماری آتشک سیب و گلابی، در دست نیست، کنترل بیولوژیک این بیماری، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در بیماری آتشک درختان میوه دانه‌دار، سطح کلاله‌ی گل محل ورود عامل بیماری و نیز محل برخورد

* نویسنده مسئول: مهدی میرزائی تلفن: ۰۹۱۲۶۱۱۰۱۲۰ E-mail:mirzaiem@ut.ac.ir

عوامل آنتاگونیستی با باکتری بیماریزا در کنترل بیولوژیک به‌حساب می‌آید. سراسر سطح کلاله‌ی گل پوشیده از کرک‌های اپیدرمی است که فضاهای بین‌سلولی آن مکان مناسبی برای استقرار باکتری‌هاست. سلول‌های واقع در پایه‌ی این کرک‌ها مایعی سرشار از مواد غذایی ترشح می‌کنند که باکتری‌های ساکن در آنها از آن به‌عنوان غذا برای رشد استفاده می‌کنند (Stochwell *et al*. 1999). به دلیل آنکه در هنگام باز شدن گل‌ها، کلاله‌ها عاری از باکتری هستند، شرایط مناسبی برای رشد و افزایش جمعیت باکتری‌هایی که روی آن تشکیل جمعیت اپی‌فیتی می‌دهند، فراهم می‌شود.

Erwinia amylovora از جمله باکتری‌هایی است که از این فرصت استفاده می‌کنند و پرگنه‌های اپی‌فیتی خود را روی این سطح تشکیل می‌دهد. جمعیت اپی‌فیتی بسیار زیاد این باکتری به دو دلیل در بیماری‌شناسی آتشک، دارای اهمیت است؛ اول از نظر ایجاد عفونت در گل و دلیل دوم، افزایش احتمال انتشار باکتری بر اثر باران و یا حشرات گرده افشان مانند زنبور عسل، از یک گل به گل دیگر است (Johnson *et al*. 1993). برای مؤثر واقع شدن کنترل بیولوژیکی آتشک لازم است باکتری‌های آنتاگونیست قبل از باکتری عامل بیماری روی سطح کلاله مستقر شوند و بتوانند جمعیت خود را افزایش دهند. تکثیر باکتری‌های آنتاگونیست از استقرار و رشد اپی‌فیتی باکتری *E. amylovora* جلوگیری می‌کند و در نتیجه توانایی آلوده‌سازی گل و نیز انتقال (انتشار) باکتری به سایر گل‌ها کاهش می‌یابد (Pusey 1998). باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* و *Pantoea agglomerans* به دلیل توانایی‌های زیادشان برای کنترل بیماری ناشی از *E. amylovora* به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. سویه‌ی A506 از باکتری *P. fluorescens* قادر است با اشغال جایگاه استقرار باکتری عامل بیماری، کلنیزاسیون *E. amylovora* بر روی گل‌های گلابی را کاهش دهد. این سویه از سال ۱۹۹۶ به‌طور تجاری برای سرکوب بیماری آتشک در دسترس بوده است (Kenneth and Stochwell 2000). عامل بیماری آتشک در صورت حضور سویه‌ی A506 از باکتری *P. fluorescens* در مکان آلودگی، عامل بیماری نمی‌تواند در آنجا استقرار یابد (Stockwell *et al*. 1998). همچنین سویه‌ی EhC9-1 باکتری آنتاگونیست *Pantoea agglomerans*، که از سیب در ایالات میشیگان آمریکـــا جدا شده است (Ishimaru *et al*. 1988) ، در کنترل باکتری عامل آتشک در مناطق مورد آزمایش مؤثر بوده است. سویه‌ی نامبرده نیز همانند PfA506 توانایی بسیاری در کلنیزاسیون کلاله در گل‌های سیب وگلابی دارد. با توجه به اهمیت بررسی کنترل بیولوژیک بیماری آتشک در باغات مناطق مختلف کشور، هدف از این تحقیق جداسازی آنتاگونیست‌های مؤثر و بررسی میزان اثرات کنترل کنندگی آنها علیه عامل بیماری آتشک روی درختان گلابی در باغ بوده است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری عامل بیماری و آنتاگونیست‌ها

در این بررسی، از باغ‌های سیب و گلابی در مناطق مختلف آلوده به بیماری آتشک در استان‌های قزوین و تهران (منطقه دماوند)، بازدید و به ترتیب از شاخ و برگ درختان آلوده و سالم، به منظور جداسازی عامل بیماری و باکتری‌های اپی‌فیتی، نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد و پس از شستشو با آب جاری، به قطعات کوچکی تقسیم و در ارلن‌های جداگانه حاوی آب مقطر استریل روی شیکر قرار داده شدند. برای جداسازی باکتری عامل بیماری و باکتری‌های اپی‌فیت، به ترتیب از محیط‌های کشت لوان (NSA) و محیط کشت آگار مغذی (NA) استفاده شد (EPPO Bulletin 2004). سپس جدایه‌های اپی‌فیت برای انتخاب آنتاگونیست، غربال شدند (Petruta *et al*. 2008). باکتری عامل بیماری و آنتاگونیست‌های جداشده از درختان منطقه قزوین و دماوند، با انجام آزمون‌های باکتری‌شناسی و بیوشیمیایی شامل شکل‌شناسی پرگنه، رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های رشد بی‌هوازی، کاتالاز، اکسیداز، هیدرولیز ژلاتین، تولید لوان، تولید اندوسپور، تولید رنگدانه زرد در محیط‌کشت YDC و تولید رنگدانه فلورسنت در محیط‌کشت KB، مصرف قند به‌عنوان منبع کربن، آزمون واکنش فوق‌حساسیت روی برگ‌های توتون

رقم روستیکا و اثبات بیماریزایی روی میوه گلابی نارس، مورد شناسایی قرار گرفتند (Schaad et al. 2001; Hassanzadeh 1995).

بررسی اثر آنتاگونیستی (آنتی‌بیوز) در آزمایشگاه

برای مقایسه اثر آنتاگونیستی هر یک از این جدایه‌ها آزمون بررسی قطر هاله‌ی بازدارنده (آنتی‌بیوز) انجام شد. برای این منظـــور غلظتـی معـــادل 10^9 سلول در میلی‌لیتر از باکتری *Erwinia amylovora* تهیه شد (EPPO Bulletin 2004). سوسپانسیون تهیه شده از باکتری عامل بیماری را روی محیط کشت NA به طور یکنواخت پخش کرده، پس از خشک شدن سطح محیـــط، یک لـوپ از باکتری‌های آنتاگونیست روی سطح محیط قرار داده شد. برای هر آنتاگونیست ۴ تکرار درنظرگرفته شد و در یک پتری هم به عنوان شاهد فقط باکتری عامل بیماری کشت داده شد. پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، قطر هاله‌ها اندازه‌گیری شد (Petruta *et al.* 2008).

بررسی تولید آنتی‌بیوتیک به‌وسیله‌ی جدایه‌های آنتاگونیست (آزمون کلروفرم)

در این آزمون، باکتری‌های آنتاگونیست به صورت خطی در محیط‌کشت NA کشت داده شدند. پس از ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، باکتری‌ها توسط آب مقطر استریل، از سطح پتری شسته شدند. سپس پتری درحالی‌که یک قطعه پنبه آغشته به کلروفرم روی درِ آن قرار داده شد، به‌صورت وارونه قرار گرفت. پس از ۲۰ دقیقه، اجازه داده شد تا بخار کلروفرم کاملا از پتری خارج شود و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری عامل بیماری با غلظت 10^3 سلول در میلی‌لیتر، به طور یکنواخت روی سطح پتری پخش شد. سپس پتری‌ها در گرمخانه در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. پس از این مدت نتایج با شمارش پرگنه‌های باکتری عامل بیماری مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. این آزمون با ۵ تیمار در ۴ تکرار انجام گرفت (Wright *et al.* 2001).

بررسی اثر آنتاگونیستی در شرایط باغ

به منظور بررسی میزان توانایی جدایه‌های آنتاگونیست در جلوگیری از سوختگی گل‌های گلابی، یک آزمون مزرعه‌ای در یک باغ گلابی در منطقه دماوند طراحی شد. در این باغ، ۱۱ اصله درخت انتخاب شد. یک اصله درخت به عنوان شاهد مثبت فقط با باکتری عامل بیماری با غلظت 10^7 سلول در میلی‌لیتر، ۵ اصله درخت به عنوان شاهد منفی با پنج جدایه‌ی آنتاگونیست با غلظت 10^8 سلول در میلی‌لیتر و پنج اصله درخت دیگر نیز با تیمار آنتاگونیست به همراه باکتری عامل بیماری با همان غلظت‌ها، محلول‌پاشی شد. در پنج درخت با تیمارِ مشترکِ آنتاگونیست با باکتری عامل بیماری، محلول‌پاشی باکتری عامل بیماری ۴۸ ساعت پس از محلول‌پاشی آنتاگونیست‌ها صورت گرفت.

محلول‌پاشی روی درختان به وسیله‌ی آب‌پاش‌های دستی نیم‌لیتری و در یک هوای آرام در هنگام غروب آفتاب انجام شد. در این آزمون، روی هر درخت ۹۰ گل (۳۰ گل در سه تکرار) در نظر گرفته شد. برای بررسی نتایج ۱۴ روز پس از محلول‌پاشی باکتری عامل بیماری، تعداد گل‌های سوخته شمارش و درصد آن نسبت به تعداد کل گل‌ها محاسبه شد (Ozaktan and Bora 2004).

تجزیه و تحلیل آماری

در این بررسی، نتایج به‌دست آمده در قالب طرح کاملا تصادفی و به‌وسیله‌ی نرم‌افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

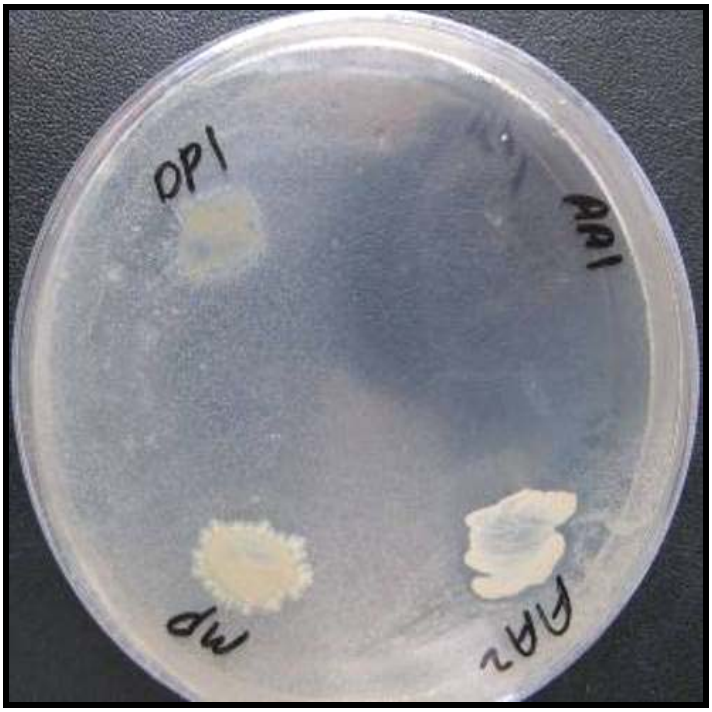
نتایج

جداسازی و شناسایی باکتری عامل بیماری و آنتاگونیست‌ها

باکتری گرم منفی جداشده از اندام‌های بیمار گیاه، ۲۴ ساعت بعد از تزریق به برگ گیاه توتون واکنش شدید فوق‌حساسیت ایجاد کرد. این باکتری روی محیط کشت لوان پس از ۴۸ ساعت، پرگنه‌های سفید مرواریدی، مدور و بسیار لعاب دار، بدون تولید هر گونه رنگدانه تشکیل داد و در محیط کشت KB بعد از ۲۴ ساعت، پرگنه‌های باکتری به صورت مدور و به رنگ سفید شیری مشاهده شد. بررسی این پرگنه‌ها بعد از ۴۸ ساعت نشان داد که رنگدانه فلورسنت در محیط کشت تولید نشده است و بنابر این، مشخص شد این باکتری به سودوموناس‌های فلورسنت تعلق ندارد. در کشت این

باکتری در محیط‌کشت yeast extract dextrose- $CaCO_3$ (YDC) رنگدانه زرد رنگ تولید نشد. نتیجه آزمون بیماریزایی روی میوه نارس گلابی برای این باکتری مثبت بود. در ضمن، نتایج آزمون‌های کاتالاز و رشد بی‌هوازی مثبت و آزمون‌های اکسیداز و تولید اندوسپور، منفی بود. با توجه با این نتایج، این باکتری به عنوان *E. amylovora* شناسایی شد. در فرایند غربال، از میان جدایه‌های باکتری اپی‌فیتی که از فلور شاخ و برگ درختان سیب و گلابی به دست آمد، پنج جدایه توانستند بیشترین قطر هاله‌ی بازدارنده در اطراف پرگنه‌ی باکتری عامل بیماری در پتری ایجاد کنند (شکل شماره‌ی ۱). این جدایه‌ها در آزمون رنگ‌آمیزی گرم، گرم منفی تشخیص داده شدند و نتایج آزمون‌های هیدرولیز ژلاتین، کاتالاز و تولید لوان برای آنها مثبت بود. در آزمون تولید اندوسپور، هیچکدام تولید اندوسپور نکردند. در میان این جدایه‌ها، سه جدایه قادر به رشد بی‌هوازی بودند، در محیط‌کشت YDC رنگدانه‌ی زرد تولید کردند اما در محیط کشت KB قادر به تولید رنگدانه فلورسنت نبودند و نتیجه آزمون اکسیداز برای آنها، منفی بود و از این روی، به گونه‌ی *Pantoea agglomerans* تعلق گرفتند. دو جدایه‌ی دیگر در محیط‌کشت YDC رنگدانه زرد تولید نکردند، ولی در محیط‌کشت KB قادر به تولید رنگدانه فلورسنت بودند. نتیجه‌ی آزمون اکسیداز برای این دو جدایه مثبت بود و قادر به رشد بی‌هوازی نبودند. در آزمون مصرف قند به عنوان منبع کربن، این دو جدایه توانایی استفاده از قند ترهالوز را داشتند.

با توجه به نتیجه‌ی این آزمون‌ها این دو جدایه به عنوان *Pseudomonas fluorescens* شناسایی شدند. هیچکدام از این پنج جدایه باعث بروز واکنش فوق‌حساسیت روی برگ‌های توتون نشدند.

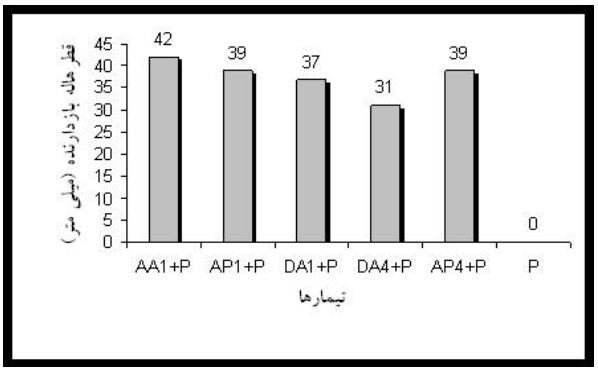


شکل ۱- غربال جدایه‌های اپی‌فیت برای انتخاب باکتری‌های آنتاگونیست

بررسی اثر آنتاگونیستی (آنتی بیوز) در آزمایشگاه

در این آزمون جدایه‌ی باکتری *Pantoea agglomerans* جداشده از سیب در قزوین، با تشکیل هاله‌ی بازدارنده به قطر ۴۲ میلی‌متر، بیشترین و جدایه‌ی باکتری *P. agglomerans* که از روی درختان سیب در منطقه دماوند جدا شده بود، با ۳۱ میلی‌متر،

کمترین اثر بازدارندگی را بر رشد باکتری عامل بیماری از خـود نشـــان دادنـد (شکل شمـاره ۲).



شکل ۲- اندازه‌ی قطر هاله‌ی بازدارنده‌ی ایجاد شده در پتری براثر آنتاگونیست‌ها

AA1 : باکتری *Pantoea agglomerans* جدا شده از درختان سیب در منطقه قزوین

AP1 : باکتری *Pantoea agglomerans* جدا شده از درختان گلابی در منطقه قزوین

AP4 : باکتری *Pseudomonas fluorescens* جدا شده از درختان گلابی در منطقه قزوین

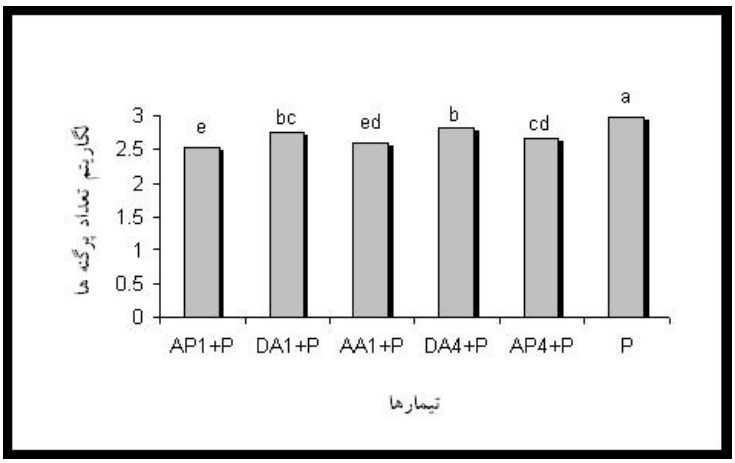
DA1 : باکتری *Pseudomonas fluorescens* جداشده از درختان سیب در منطقه دماوند

DA4 : باکتری *Pantoea agglomerans* جدا شده از درختان سیب در منطقه دماوند

P : باکتری *Erwinia amylovora* جدا شده از درختان گلابی در منطقه قزوین

بررسی تولید آنتی‌بیوتیک به وسیله جدایـه‌هـای آنتاگونیست (آزمون کلروفرم)

در این آزمون در مقایسه بـا شـاهد، جدایـه‌ی *P. agglomerans* که در قزوین از روی درخت گلابـی جـدا شده بـود، بیـشترین و در نقطـه‌ی مقابـل جدایـه‌ی *P. agglomerans* که در دماوند از روی درخت سـیب جـدا شد، کمترین میزان آنتی‌بیوتیک را تولید کردند. تحلیـل داده‌های شمارش پرگنه‌های باکتری عامل بیماری نشان داد بین تیمارهای مورد بررسی به احتمال ۹۹/۹۹ درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد (شکل شماره ۳).

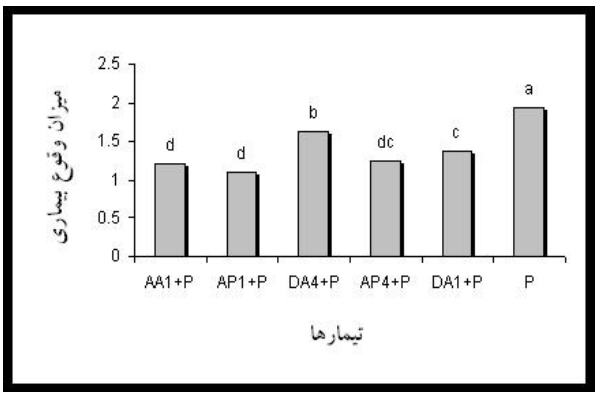


شکل ۳ - اثر بازدارندگی تیمارهای مختلف آنتاگونیستی بر رشد عامل بیماری درآزمون کلروفرم

بررسی اثر آنتاگونیستی روی درختان گلابی در باغ

پس از گذشت ۱۴ روز از محلول‌پاشی باکتری عامل بیماری بر روی گل‌ها در شرایط باغ، جدایه‌ی *P. agglomerans* جدا شده در قزوین از روی شاخ و برگ گلابی، با ۸۶/۴ درصد کنترل‌کنندگی، بهترین و جدایه‌ی *P. agglomerans* که در دماوند از روی سیب جدا شده بود، با ۵۵/۳ درصد ضعیف‌ترین جدایه‌های آنتاگونیستی بوده‌اند. در عین حال تحلیل نرم‌افزاری داده‌ها اختلاف

معنی‌داری در میزان جلوگیری از سوختگی گل‌ها در باغ بین دو جدایه‌های *P. agglomerans* که در منطقه قزوین از روی سیب و گلابی جدا شدند و جدایه‌ی *P. fluorescens* که در همان منطقه از روی درختان گلابی به دست آمده بود، نشان نداد (شکل شماره ۴).



شکل ۴- میزان وقوع بیماری روی گل‌های گلابی در تیمارهای مختلف آنتاگونیستی، ۱۴ روز پس از ایجاد آلودگی مصنوعی در باغ

بحث

نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی و باغ نشان داد که همه‌ی جدایه‌های آنتاگونیست مورد آزمایش نسبت به شاهد، به طور معنی‌داری قادر به کنترل بیماری بودند. در میان این جدایه‌ها، باکتری *P. agglomerans* که از منطقه‌ی قزوین جدا شده بود، نسبت به سایر آنتاگونیست‌ها در آزمون‌های آزمایشگاهی بهترین اثر را داشت؛ به طوری که در آزمون بررسی هاله‌ی بازدارندگی ضمن اینکه همه‌ی تیمارها نسبت به شاهد، تفاوت معنی‌داری را نشان دادند، جدایه‌ی مذکور بیشترین قطر هاله‌ی بازدارندگی را در پتری ایجاد کرد. جدایه‌های *P. fluorescens* از قزوین به همراه یک جدایه دیگر *P. agglomerans* از همان منطقه پس از آن بهترین اثر بازدارندگی از رشد باکتری عامل بیماری در آزمایشگاه را از خود نشان دادند. در ارزیابی اثر جدایه‌های آنتاگونیستی در آزمون باغ نیز دو جدایه‌ی *P. fluorescens* و *P. agglomerans* که از منطقه‌ی قزوین جدا شدند، بیشترین اثر را در کنترل باکتری عامل بیماری داشتند. با تحلیل آماری نتایج آزمون‌های انجام شده در باغ، مشخص شد آنتاگونیست‌های مورد مطالعه در تحقیق حاضر، بسته به جدایه، توانستند بین ۵۵/۳ تا ۸۶/۴٪ از وقوع بیماری روی گل‌های درختان گلابی جلوگیری کنند. بررسی درصد گل‌های آلوده در روز چهاردهم پس از محلول‌پاشی درختان تیمار با باکتری عامل بیماری، نشان از آن داشت که میزان پیشرفت بیماری پس از اسپری عامل بیماری، متوقف شده، دو آنتاگونیست نام برده به خوبی موفق به مهار سوختگی گل‌ها شدند.

در تحقیق دیگری در استان آذربایجان شرقی، کنترل شیمیایی و بیولوژیکی بیماری آتشک در شرایط باغ مورد بررسی قرار گرفته است. در این مطالعه اثر باکتری آنتاگونیست *P. agglomerans* به عنوان عامل بیوکنترل باکتری عامل بیماری آتشک گلابی، مورد ارزیابی قرار گرفته است. نتایج این تحقیق نشان داد که باکتری مورد آزمایش توانست تا ۷۹/۴ درصد از سوختگی گل‌ها روی درختان گلابی جلوگیری کند (Babai-Ahari *et al.* 2008).

در یک تحقیق، تیمار مخلوطی از سویه‌ی A506 باکتری *P. fluorescens* و سویه‌ی C9-1 باکتری *P. agglomerans* میزان سوختگی گل‌های گلابی را به‌طور معنی‌داری کاهش داد، هر چند که اثر این تیمار کمتر از اثر تجویز استرپتومایسین ارزیابی شد (Momol *et al.* 1998). نحوه اثر آنتاگونیستی باکتری‌های *P. agglomerans* و *P. fluorescens* را به ترتیب به تولید آنتی‌بیوتیک و رقابت بر سر مکان نسبت داده‌اند (Vanneste 2000). در توضیح نحوه‌ی اثر بازدارندگی

باکتری *P. agglomerans* بر رشد باکتری عامل بیماری آتشک گلابی، به عوامل دیگری همچون اسیدی شدن محیط ناشی از فعالیت آنتاگونیست، رقابت برای غذا، آزاد کردن مواد بازدارنده با منشا میزبانی، تولید مواد باکتریوستاتیک، تولید هربیکولین و یا القای واکنش فوق‌حساسیت نیز علاوه بر تولید آنتی‌بیوتیک اشاره شده است (Goodman 1965, Erkine and Lopatecki 1975, Ishimaru *et al*. 1988, Vanneste 2000, Goodman 1987, Wodzinski *et al*. 1994)

توانایی کنترل بیماری آتشک گلابی به وسیله‌ی *P. agglomerans* توسط محققین بسیاری گزارش شده است. در یک تحقیق با استفاده از آزمون‌های آزمایشگاهی، گلخانه‌ای و مزرعه‌ای کنترل بیماری آتشک گلابی بررسی شده است (Mercier and Lindow 2001). این تحقیق نشان داد که چهار جدایه آنتاگونیست از میان شش جدایه‌ی مورد بررسی، میزان وقوع سوختگی گل‌ها را در باغ و گلخانه به ترتیب بین ۴۳ تا ۷۳٪ و ۴۱ تا ۵۲٪ کاهش داده است. در مطالعه مذکور بین نتایج آزمایشگاهی و باغ همبستگی کامل وجود داشته است، به‌طوری که تیمارهایی که در آزمایشگاه و در آزمون‌های بررسی آنتی‌بیوز، موفق‌تر ارزیابی شده بود، در باغ و گلخانه نیز موفق‌تر بودند. در تحقیق حاضر، نتایج ما نیز در آزمایشگاه و باغ چنین همبستگی‌ای را نشان داد. در واقع جدایه‌های *P. agglomerans* که در آزمایشگاه موفق بودند، در باغ نیز بهترین اثر را در محافظت از گل‌ها داشتند. در بررسی دیگری، اثر آنتاگونیستی استرین EH24 باکتری *P. agglomerans*، که با پایه‌ی تالک فرموله شده بود، در یک باغ گلابی مورد ارزیابی قرار گرفته است. این باکتری در آن آزمایش بین ۶۳ تا ۷۶٪ از وقوع سوختگی گل‌ها جلوگیری کرد و به طور معنی‌داری از وقوع بیماری نسبت به شاهد کاست. در همین بررسی تیمار اکسی کلرور مس به‌همراه مانب تنها بین ۲۹ تا ۳۹٪ و به طور معنی‌داری کمتر از این آنتاگونیست قادر به کاهش بیماری بود (Ozaktan and Bora 2004). نتایج به‌دست آمده در بررسی حاضر، نشان داد سویه باکتری *P. agglomerans* مورد مطالعه ما در مقایسه با نتایج مطالعه فوق موفق‌تر عمل می کند. تحقیقات مختلف در زمینه کنترل بیولوژیک آتشک گلابی با استفاده از باکتری *P. fluorescens* نشان داده است که درصد گل‌های کلنیزه شده با سویه‌ی fA506 با درصد گل‌های بیمار نسبت عکس دارد؛ بنابر این، در شرایطی که اکثریت گل‌ها به‌وسیله باکتری‌های آنتاگونیست محافظت شده باشند، تنها تعداد کمی از گل‌ها که محافظت نشده باقی مانده‌اند، در معرض آلودگی قرار دارند. استفاده از fA506 در ایالات متحده موجب کاهش سوختگی گل‌های گلابی به میزان ۵۰ تا ۶۰٪ شده است (Wilson *et al.* 1992). در تحقیق مشابهی، سویه‌ی A506 باکتری *P. fluorescens* توانست وقوع بیماری را به طور معنی‌داری بین ۴۱/۶ تا ۴۸/۵ ٪ نسبت به گروه شاهد کاهش دهد (McLaughlin and Roberts 1992). مقایسه‌ی نتایج تحقیقات مشابه در سایر کشورها با نتایج بررسی حاضر، نشان می‌دهد میزان کنترل کنندگی آنتاگونیست‌های مورد مطالعه حاضر از بیشتر نتایج تحقیقات انجام شده در دنیا بیشتر است. به‌طور مثال، این میزان در تحقیق حاضر ۵۵/۳ تا ۸۶/۴ درصد و در تحقیقی دیگر ۴۳ تا ۸۱ درصد بوده است (Laux *et al.* 2003). عواملی مانند شرایط محیطی از لحاظ دما و رطوبت، سویه ی عامل بیماری مورد استفاده در تحقیق و همین طور سویه‌ی باکتری‌های آنتاگونیست، ممکن است در این تفاوت نقش داشته باشند. با توجه به یافته‌های ما در این بررسی، برای کنترل بیولوژیک مؤثر بیماری آتشک در باغ‌های سیب و گلابی منطقه دماوند می‌توان از همه‌ی جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق با موفقیت استفاده کرد و برای دستیابی به بیشترین سطح کنترل از باکتری *Pantoea agglomerans* که در قزوین و از روی درختان سیب و گلابی جدا شد، بهره گرفت.

سپاسگزاری

از مدیریت محترم آموزشکده کشاورزی دماوند به خاطر همکاری در این طرح صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

REFERENCES

Babai-Ahari A, Alipour Y, Rahimian H, Torabi E (2008) Evaluation of biological and chemical control of pear fire blight. Agricultural Science 17(3): 129-141 (In Persian)

Erskine JM, Lopatecki LE (1975) *In vitro* and *in vivo* interactions between *Erwinia amylovora* and related saprophytic bacteria. Canadian Journal of Microbiology 21(1): 35-41.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (2004) Diagnostic protocol for regulated pests: *Erwinia amylovora*. OEPP/EPPO Bulletin 34: 155-171.

Goodman RN (1965) *In vitro* and *in vivo* interactions between components of mixed bacterial cultures isolated from apple buds. Phytopathology 55: 217-221

Goodman RN, Butrov D, Gidley M (1987) Structure and proposed mode of action of amylovorin. Acta Horticulture 217, 157.

Hassanzadeh N (1995) Principles and methods of plant bacteriology. Scientific Publication Center of Islamic Azad University. IRAN. (In Persian)

Hildebrand M, Dickler E, Geider K (2000) Occurrence of *Erwinia amylovora* on insects in a fire blight orchard. Journal. Phytopathology 148: 251–256.

Ishimaru CA, Klos EJ, Brubaker RR (1988) Multiple antibiotic production by *Erwinia herbicola*. Phytopathology. 78(6): 746-750.

Johnson KB, Stockwell VO, McLaughlin RJ, Sugar D, Loper JE, Roberts RG (1993) Effect of antagonistic bacteria on establishment of honey bee dispersed *Erwinia amylovora* in pear blossoms and on fire blight control. Phytopathology 83(9): 995-1002.

Kenneth B, Stochwell VO (2000) Biological control of fire blight. *In*: J.Vanneste (ed.): Fire blight the disease and its causative agent *Erwinia amylovora*. CABI, UK. pp. 319-337

Zeller W (2003) Field experiments on biological control of fire blight by bacterial antagonists. J. Plant Disease Protection 110(4): 401-407.

McLaughlin RJ, Roberts RG (1992) Biological control of fire blight with *Pseudomonas fluorescens* strain A506 and two strains of *Erwinia herbicola.* Phytopathology 82: 1129

Mercier J, Lindow SE (2001) Field performance of antagonistic bacteria identified in a novel laboratory assay for biological control of fire blight of pear. Biological Control 22: 66-71.

Momol MT, Norelli JL, Aldwinckle HS (1998) Evaluation of biological control agents, systemic acquired resistance inducers and bactericides for the control of fire blight on apple blossom. Acta Horticulture 489, 553-557.

Ozaktan H, Bora T (2004) Biological control of fire blight in pear orchards with a formulation of *Pantoea agglomerans* Strain Eh24. Brazilian Journal of Microbiology 35: 224-229.

Petruta CC, Catalina V, Matilda C, Sorina D, Manuela C, Draganoiu M, Valeriu S, Oncea F (2008) In vitro inhibition of *Erwinia amylovora* Romanian isolates by new antagonistic bacterial strains. http://pomona.ro/results.php

Pusey PL (1998) Laboratory and field trials with selected microorganisms as biocontrol agents for fire blight. Acta Horticulture 489: 655–660.

Schaad NW, Lones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria (3th ED) APS Press. USA

Stochwell VO, McLaughlin RJ, Henkels MD, Loper JE, Sugar D, Roberts RG (1999) Epiphytic colonization of pear stigmas and hypanthia by bacteria during primary bloom. Phytopathology 89(12): 1162-1168.

Stockwell VO, Johnson KB, Loper JE (1998) Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation. Phytopathology 88(6): 506-513.

Vanneste JL (2000) Fire blight the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora* CABI, UK.

Wilson M, Epton HAS, Sigee DC (1992) Interactions between *Erwinia herbicola* and *E. amylovora* on the stigma of hawthorn blossoms. Phytopathology 82(9): 914-918.

Wodzinski RS, Umholtz TE, Rundle JR, Beer SV (1994) Mechanisms of inhibition of *Erwinia amylovora* by *E. herbicola in vitro* and *in vivo.* Journal of. Applied Bacteriology 76: 22-29

Wright SAI, Zumoff CH, Schneider L, Beer SV (2001) *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics inhibit *Erwinia amylovora* in vitro. Applied and Environmental Microbiology 67(1): 284-292.

Biological Control of Pests and Plant Diseases,
No. 1, 2012

The Study of Biological Control of Pear Fire Blight Caused by *Erwinia amylovora* by some Antagonistic Bacteria

MIRZAI M.*[1], AMINIAN H.[2], ROUSTAEE A.[2]
1. MSc of Plant Pathology, Aboureyhan Campus, University of Tehran,
2. Aboureyhan Campus, University of Tehran
(Received: May 16, 2011 - Accepted: October 3, 2012)

ABSTRACT

Fire blight is an important worldwide disease of pome fruits that control of which through antibiotics is particularly critical. In this case and in absence of another chemical methods, the biocontrol methods can be considered as the best alternative for control of fire blight. In this study efficacy of 5 isolates of antagonistic bacteria belongs to *Pseudomonas fluorescens* and *Pantoea agglomerans* on fire blight pathogen, *Erwinia amylovora* was investigated in laboratory assays and field experiments. For this purpose antagonist bacteria and the pathogen were isolated from infected and healthy tissues of pear and apple trees in Qazvin and Tehran provinces. These bacteria were identified by morphological, biochemical and physiological properties. To investigate the efficacy of these antagonists on the growth of fire blight pathogen, laboratory assays were performed such as chloroform test and inhibition zone (antibiosis). All antagonists showed significantly effect on *E. amylovora* growth in laboratory assays. A field experiment also performed to study of antagonistic effect on blossoms blight of pear trees. In orchard trial, analysis showed that these antagonists significantly reduce the blight on pear blossoms. These treatments decreased the incidence of disease by 55.3%- 86.4% in field experiments. These findings indicated that these five antagonists are effective in biological control of fire blight in both laboratory and orchard situations.

Keywords: Pear Fire blight, Biological control, *Pantoea agglomerans, Pseudomonas fluorescens, Erwinia amylovora*

* Corresponding author:MIRZAI, M. E-mail: mirzaiem@ut.ac.ir