نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۴، ص. ۲۱۰-۲۰۶

Journal of Plant Protection
Vol. 29, No. 2, Summer 2015, P. 206-210

بررسی وجود آلودگی درونی بیمارگر *Erwinia amylovora* در درختان سیب فاقد علائم بیماری

کبری مسلم خانی[1*]- مرتضی همتی[2]- حسن حاج نجاری[3] - سپیده امین خاکی[4]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۷/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۰۴

چکیده

آلودگی‌های پنهان بیماری آتشک، علاوه بر این‌که به عنوان منابع مهم، برای شروع بیماری در فصل بهار مطرح هستند، در گسترش بیماری از طریق مواد تکثیر شونده رویشی و نهال‌های آلوده نیز نقش به سزایی ایفا می‌نمایند. مطالعهٔ حاضر به بررسی وجود آلودگی درونی بیمارگر *Erwinia amylovora* در درختان مادری و نهالستان‌های سیب شهرستان‌های کرج و دماوند با استفاده از روش‌های تشخیصی بهینه سازی شده و قابل اطمینان کشت روی محیط انتخابی، سرولوژیکی، آزمون‌های مولکولی مبتنی بر تشخیص اسید نوکلئیک پرداخته است. باکتری عامل بیماری آتشک از هیچ یک از نهال‌های ارزیابی شده در دماوند ردیابی نگردید. در باغات سیب مورد ارزیابی در شهرستان کرج نیز این باکتری درون جوانه‌های سه رقم Red rome ، Janathan3 و گلاب کهنز، گسترش یافته در حالی‌که هیچ نوع علائمی از بیماری آتشک در آن‌ها مشاهده نشد. به نظر می‌رسد این نوع آلودگی‌ها در شرایط مساعد آب و هوایی می‌توانند به عنوان اینوکلوم اولیه در شروع بیماری نقش موثری داشته باشند، لذا گواهی سلامت نهالستان‌ها و باغات مادری، در کنترل و جلوگیری از گسترش بیماری موثر است.

واژه‌های کلیدی: ارقام سیب، آلودگی درونی، *Erwinia amylovora*

مقدمه

بیماری آتشک با عامل *E. amylovora* یکی از خطرناک‌ترین بیماری‌ها روی سیب، گلابی و بسیاری از اعضاء خانواده رزاسه است. توسعهٔ بیماری آتشک طی ۲۰ سال اخیر روزافزون است و عامل بیماری از روش‌های متفاوت و موثری از منطقه‌ای به منطقه دیگر پراکنده می‌شود (۱۴ و ۱۵) گزارشات متعددی در خصوص آلودگی درختان از طریق شکاف‌ها و یا زخم‌ها بدون ظهور علائم وجود دارد (۱۱). باکتری *E. amylovora* علاوه بر این‌که به‌صورت اندوفیت و اپی‌فیت در گیاه میزبان بقاء داشته، به‌صورت سیستمیک نیز درون گیاه گسترش می‌یابد. از آن جایی که در صورت رخنه پاتوژن به گیاه، کنترل بیماری بسیار دشوار است. لذا محافظت گیاه از وقوع و گسترش بیماری حائز اهمیت زیادی می‌باشد. حتی جدایه‌های *E. amylovora*، با شدت بیماریزایی بالا می‌توانند در بافت درختان سیب و گلابی بدون ایجاد علائم توسعه یابند و باکتری به مدت بیش از ۶ ماه، قادر به بقاء تحت این شرایط می‌باشد. در نهالستان‌ها، باغ‌های تازه احداث و یا باغاتی که مدیریت مناسب دارند نیز وقوع این نوع آلودگی‌های بدون علائم گزارش شده است (۷). گزارشات محققین نشان داده که این باکتری به سرعت از طریق آوند آبکش در گیاه آلوده توسعه می‌یابد و این توسعه نه تنها در شاخه‌های آلوده بلکه تا پایه‌ها نیز ردیابی شده است (۱۱). در صورتی که شرایط محیطی برای ظهور بیماری مهیا نباشد، انتقال مواد تکثیر شونده رویشی با آلودگی‌های پنهان و نیز نهال‌های آلوده به ظاهر سالم به نقاط مختلف کشور و یا حتی کشورهای دیگر، می تواند باعث گسترش بیماری گردد (۹) .

لذا ارزیابی آلودگی نهفته در درختان فاقد علائم و داشتن گواهی سلامت درختان مادری و نهالستان‌ها می تواند در کنترل و ممانعت از توسعه بیماری آتشک نقش ارزنده‌ای داشته باشد. برای تشخیص آلودگی باکتری *Erwinia amylovora*، ابزار و روش‌های مختلف از جمله کشت در محیط نیمه انتخابی، روش‌های سرولوژیکی، روش هیبریداسیون DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) توسعه یافته است. روش سرولوژیکی Lateral flow immunochromatography (LFIC) به عنوان یک روش

۱، ۲ و ۴- به ترتیب استادیار و کارشناسان موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی
(*-نویسنده مسئول: Email: moslemkhany@yahoo.com)
۳- دانشیار موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال وبذر، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

تشخیصی سریع و کم هزینه معرفی شده که با پیش غنی‌سازی، دقتی به اندازهٔ آزمون‌های مولکولی به همراه دشته است و قادر به ردیابی آلودگی‌های پنهان می‌باشد (۱). از روش‌های تشخیصی دقیق و حساس دیگر، روش PCR یا واکنش زنجیره‌ای پلیمراز است که قادر به ردیابی جمعیت‌های بسیار پایین باکتری در بافت گیاهی است. استفاده از این روش به همراه پیش غنی‌سازی علاوه بر کاهش اثرات منفی ممانعت کننده‌ها در آزمون، دقت این روش را به اندازهٔ PCR آشیانه ای (nested PCR) ارتقاء می‌دهد (۱). مطالعهٔ حاضر به بررسی آلودگی درونی *E. amylovora*، در تعدادی از ارقام تجاری مهم و شناسه‌دار سیب فاقد علائم بیماری در کرج و دماوند، با استفاده از تکنیک‌های دقیق و مطمئن، پرداخته است.

مواد و روش‌ها

نمونه گیاهی

در اواخر بهار و تابستان سال ۹۰، نمونه‌برداری از دو منطقه دماوند و کرج صورت گرفت. نمونه‌برداری از نهالستان‌های دماوند مربوط به ارقام گالا، سیب زرد (Golden Delicious)، سیب قرمز (Red Delicious)، گلاب و فوجی انجام شد. همچنین نمونه‌برداری از برخی ارقام سیب مستقر در باغ کمال آباد کرج و همچنین کلیه درختان سیب شناسه‌دار در کرج انجام شد. بدین صورت که از ۴ طرف هر درخت، قسمتی از شاخساره‌ها و جوانه‌ها برداشت شد و جهت انجام آزمون‌های تشخیصی در یخدان حاوی یخ به آزمایشگاه سلامت نهال و مواد تکثیری موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال منتقل گردید. ارقام نمونه‌برداری شده در کرج شامل کمپوتی، مشهد نوری، گلاب کهنز، سلطانی شبستر، مشهد، اردبیل حساس ۲، گلاب اصفهان، Janathan 1, 2, 3، unidentified IRI 4، Prime gold، Red Rome، Impire است. از شاخ و برگ‌های چند درخت سیب دارای علائم بیماری آتشک نیز نمونه‌برداری صورت گرفت و به عنوان کنترل مثبت به همراه جدایهٔ خالص باکتری در تست‌های تشخیصی استفاده گردید.

آزمون‌های تشخیصی

نمونه‌ها به مدت سه تا هفت روز در یخچال و تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شدند. پس از ضد عفونی سطحی، نمونه‌ها به تفکیک عصاره‌گیری شدند و به منظور غنی‌سازی با ۵۰۰ میکرولیتر محیط نیمه انتخابی CCT مایع (Ishimaru and Klos, 1984) ترکیب و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (۱).

پس از عصاره‌گیری و غنی‌سازی در محیط نیمه انتخابی، علاوه بر کشت روی محیط CCT، وجود آلودگی به‌وسیله آزمون (LFIC) Lateral flow immunochromatography طبق دستورالعمل شرکت bioreba ارزیابی گردید. همچنین جهت ردیابی دقیق و حساس‌تر از آزمون‌های Polymerase Chain Reaction (PCR) و nested PCR استفاده گردید. استخراج DNA به روش لیوپ و همکاران (۸) صورت گرفت. از جفت آغازگر A و B در آزمون PCR و از آغازگرهای بیرونی AJ75 و AJ76 و جفت آغازگرهای درونی PEANT1 و PEANT2 (۱۰) در آزمون nested PCR استفاده شد (جدول ۱) و سپس ۱۵ میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی گردید.

تست فوق حساسیت

به منظور انجام تست فوق حساسیت، سوسپانسیون کلنی‌های *E. amylovora* خالص شده در محیط CCT، با غلظت 10^9 cfu/ml (OD $_{620nm}$ =1) به برگ‌های توتون (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) در مرحله ۶-۵ برگی تزریق شد (۱۲) و واکنش گیاه ۲۴ ساعت بعد ارزیابی گردید.

آزمون بیماریزایی

آزمون بیماریزایی جدایه‌های خالص شدهٔ *E. amylovora* بر روی گلابی‌های رقم درگزی انجام شد. میوه‌های نارس گلابی پس از شستشو و ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد، با سوسپانسیون باکتری به غلظت 10^8 cfu/ml مایه‌زنی گردیده و به مدت یک هفته در دمای ۲۷-۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد نگهداری شدند.

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در آزمون PCR و Nested PCR

منبع	آزمون	محصول	توالی آغازگر	نام آغازگر
۱۶	PCR	۹۰۰ bp	5’-CGG TTT TTA ACG CTG GG	A
۱۶	PCR	۹۰۰ bp	5’-GGG CAA ATA CTC GGA TT	B
۱۰	Nested PCR	۸۴۴ bp	5’ CGT ATT CAC GGC TTC GCA GAT	AJ75
۱۰	Nested PCR	۸۴۴ bp	5’ ACC CGC CAG GAT AGT CGC ATA	AJ76
۸	Nested PCR	۳۹۱ bp	5’ TAT CCC TAA AAA CCT CAG TGC	PEANT1
۸	Nested PCR	۳۹۱ bp	5’ GCA ACC TTG TGC CCT TTA	PEANT2

نتایج و بحث

آزمون‌های تشخیصی PCR، Nested PCR، LFIC و کشت روی محیط انتخابی CCT به همراه غنی سازی با موفقیت آلودگی را در درختان دارای علائم بیماری آتشک و آلودگی پنهان را در درختان ظاهراً سالم ردیابی نمودند (شکل ۱)

واکنش فوق حساسیت جدایه‌های باکتری در برگ توتون اثبات گردید. بعد از گذشت ۲۴ ساعت در دمای اتاق، بافت‌های آلوده شده، نکروز شدند. واکنش مثبت HR حاکی از وجود ژن‌های hrp در ایزوله‌های مورد ارزیابی می‌باشد (۱۲).

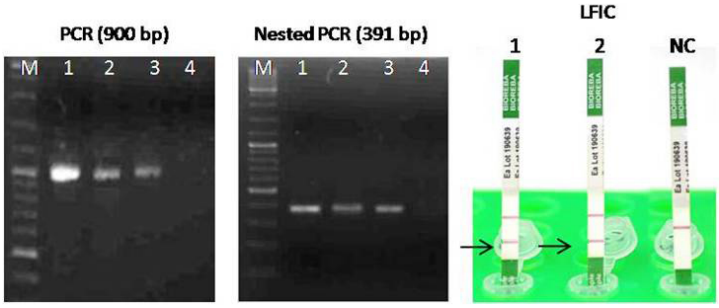
در آزمون بیماریزایی جدایه‌های باکتری روی میوه‌های نارس گلابی، بعد از گذشت ۱۰ روز علائم آبسوختگی و نکروزه شدن بافت مشاهده و بیماریزایی جدایه ها مورد ارزیابی محرز گردید.

نتایج نشان داد در ارزیابی صورت گرفته روی نهال‌های سیب ارقام گالا، سیب زرد، سیب قرمز، گلاب و فوجی واقع در نهالستان‌های دماوند هیچ گونه آلودگی پنهان یا آشکار به باکتری *E. amylovora* ردیابی نگردید. در حالی‌که بر اساس نتایجی که در جدول ۲ آمده در باغات کرج، آلودگی درونی بدون وجود علائم در ۱۳ درصد درختان سیب مورد ارزیابی (۲۳ رقم) با اطمینان مشخص گردید.

از آن‌جایی که اهمیت کنترل و جلوگیری از گسترش بیماری آتشک به خوبی در دنیا مشخص شده است و طغیان‌های اخیر حاکی از این است که تا چه حد کنترل این بیماری دشوار و گسترش بیماری سریع است (۸). لذا درک اپیدمیولوژی باکتری خصوصاً شناخت منابع آلودگی اولیه و ثانویه و حرکت سیستمیک باکتری در گیاه آلوده در کنترل گسترش بیماری بسیار موثر است. در مطالعه حاضر آلودگی درونی در سه رقم Janathan ، Red rome و گلاب کهنز بدون مشاهده علائم بیماری ردیابی گردید که در شرایط مناسب محیطی این نوع آلودگی‌ها می توانند منشاء شروع بیماری در فصل رویشی بعدی باشند. تحقیقات گذشته نیز نشان داده است که در مناطق آلوده، جمعیت‌های اندوفیت باکتری *E. amylovora* از جوانه‌های سالم سیب جدا سازی شده است. (۳ و ۵). همچنین آزمایشات انجام شده در شرایط کنترل شدهٔ گلخانه، نشان داده‌اند که *E. amylovora* قادر است بیش از ۲ سال در جوانه‌های سالم و بافت های مجاور، شانکرهای قدیمی بقاء یابند و قدرت بیماریزایی خود را حفظ نمایند (۷).

طغیان‌های بیماری آتشک در باغات جدید التاسیس گاهاً در اوایل فصل رشد روی درختان جوان دارای گل و یا فاقد گل رخ می‌دهد که در بسیاری از موارد به نظر می رسد این آلودگی‌ها در نهالستان‌ها وجود داشته و تا زمانی که عاملی باعث برانگیختن پاتوژن نشود، ظهور نمی کنند (۱۳).

کالزولاری (۴) *E. amylovora* را از جوانه‌های رویشی سیب که از نهالستان‌های هلند وارد ایتالیا شده بود، ردیابی نمود. مشاهدات محققین مختلف حاکی از آن است که از این طریق، پتانسیل انتقال بیماری به مناطق دوردست نیز وجود دارد. جداسازی باکتری از نمونه‌های گیاهی دارای علائم آسان است زیرا جمعیت باکتری قابل کشت بالا است در حالیکه در نمونه‌های فاقد علائم معمولا جمعیت باکتری در حد بسیار پایین می‌باشد که پیش غنی سازی باعث رفع این مشکل شده است (۱). همچنین تشخیص این مهم که جدایه‌های باکتری ردیابی شده از جوانه‌ها و شاخه‌ها، زنده و بیماریزا هستند یا نه؟ اهمیت بسیار زیادی دارد زیرا روش‌هایی مانند PCR و LFIC که قادر به تمایز سلول‌های زنده از مرده نیستند نمی‌توانند تعیین کننده این موضوع باشند که آیا باکتری ردیابی شده، زنده و قابل انتقال به مناطق سالم است یا خیر؟ لذا استفاده از روشی مانند کشت روی محیط انتخابی در اثبات زنده بودن جدایه‌های ردیابی شده کمک کننده است.



شکل ۱- ردیابی باکتری *Erwinia amylovora* با استفاده از تکنیک‌های LFIC، PCR و nested PCR. ۱: کنترل مثبت، ۲ و ۳: به ترتیب مربوط به ارقام red rome و Janathan با آلودگی درونی به آتشک (بدون ظهور علائم بیماری) ٤: کنترل منفی (NC)

جدول ۲- نتایج ارزیابی آلودگی درونی ارقام مختلف سیب مستقر در کرج به بیماری آتشک بدون ظهور علائم بیماری

نمونه Sample	روش LFIC LFIC Method	روش PCR PCR method	PCR آشیانه ای nested PCR
Janathan 1	–	–	–
Janathan 2	–	–	–
Janathan 3	+	+	+
114181(کمپوتی)	–	–	–
114153(مشهد نوری)	–	–	–
114177(گلاب کهنز)	+	+	+
114184(سلطانی شبستر)	–	–	–
اردبیل ۲ حساس	–	–	–
Unidentified IRI4	–	–	–
114170(مشهد)	+/ ضعیف	–	–
Prime gold	–	–	–
114151(مشهد نوری)	–	–	–
114173(گلاب کهنز)	–	–	–
114154(گلاب اصفهان)	–	–	–
114152(مشهد نوری)	–	–	–
114182(کمپوتی)	–	–	–
114155(گلاب اصفهان)	–	–	–
Red rome	+	+	+
114157(گوتی محلات)	–	–	–
114164(حیدر زاده)	–	–	–
Impire all red	–	–	–
114160(شیخ احمد)	+	–	–

+: Positive reaction; -: Negative reaction

با توجه به این‌که در ارزیابی حاضر روش کشت، تست فوق حساسیت و بیماریزایی به همراه آزمون PCR و LFIC استفاده شده نتایج ردیابی سلول‌های زنده و بیماریزا کاملاً قابل اطمینان است.

در مجموع از آن‌جایی که طبق تحقیقات صورت گرفته درصد بالایی از ارقام و ژنوتیپ‌های سیب ایران نسبت به بیماری آتشک حساس هستند (۲) لذا جلوگیری از کشت نهال‌های به ظاهر سالم ولی حامل آلودگی در مناطقی که هنوز بیماری آتشک گسترش نیافته اهمیت ویژه‌ای در کنترل بیماری خواهد داشت.

منابع

۱- مسلم خانی ک.، و صادقی ل. ۱۳۹۰. توسعه دقت و حساسیت روش‌های نوین در ردیابی باکتری *Erwinia amylovora* در مواد گیاهی با آلودگی‌های پنهان. مجله بیماری‌های گیاهی، ۷۴: ۴۷۵-۴۷۱

۲- ملکی بالاجو ا.، کشاورزی م.، رضایی دانش ی.، دامیار س.، و جعفری م. ۱۳۹۰. واکنش تعدادی از ژنوتیپ های کلکسیون سیب بومی ایران به *Erwinia amylovora* . مجله به نژادی نهال و بذر، ۲۷: ۳۶-۲۳.

3- Bonn W.G. 1979. Fire blight bacteria in symptomless dormant apple and pear buds. Phytopathology, 103: 156–162.

4- Calzolari A., Peddes P., Mazzucchi U., Mori P., and Garzena C. 1982. Occurrence of *Erwinia amylovora* in buds of asymptomatic apple plants in commerce. Canadian Journal of Plant Pathology, 1:61–62.

5- Dueck J., and Morand J.B. 1975. Seasonal changes in the epiphytic population of *Erwinia amylovora* on apple and pear. Canadian Journal of Plant Science, 55: 1007–1012.

6- Ishimaru C., and Klos E.J. 1984. New medium for detecting *Erwinia amylovora* and its use in epidemiological

studies. Phytopathology, 74: 13421345.
7- Keil H.L., and van der Zwet T. 1972. Recovery of *Erwinia amylovora* from symptomless stems and shoots of Jonathan apple and Bartlett pear trees. Phytopathology, 62: 39–42.
8- Llop P., Bonaterra A., Peñalver J., and Lopez M.M. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. Applied and Environmental Microbiology, 66: 2071- 2078.
9- Maes M., Garbeva P., and Crepel C. 1996. Identification and sensitive endophytic detection of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* with 23S ribosomal DNA sequences and the polymerase chain reaction. Plant Pathology, 45:1139–1149.
10- Mc Manus P.S., and Jones A.L. 1995. Detection of *Erwinia amylovora* by nested. PCR and PCR-dot-blot and reverse blot hybridisations. Phytopathology, 85: 618-623.
11- Momol M.T., Aldwinckle H.S., and Norelli J.L. 1998. Evaluation of several products for control of fire blight on apple blossom. Fungicide and Nematicide Tests, 53: 22.
12- OEPP/EPPO. 2004. *Erwinia amylovora*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 34 : 155 –157
13- Van der Zwet T., and Walter J. 1996. Presence of *Erwinia amylovora* in apparently healthy nursery propagating material. Acta Horticulturae, 411: 127–130
14- Van der Zwet T. 2002. Present worldwide distribution of fire blight. Acta Horticulturae, 590: 33-34.
15- Vanneste J.L. 2000. Fire Blight, the disease and its Causative Agent, *Erwinia amylovora*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK.
16- Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W., and Geider K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by polymerase chain reaction analysis. Applied and Environmental Microbiology, 58: 3522-3526.