

وقوع بیماری آتشک گلابی در اثر *Erwinia amylovora* در استان گیلان

مصطفی نیک نژاد کاظم پور^۱، اسماعیل کامران^۲ و بیتا علی^۱

چکیده

بیماری آتشک گلابی با عامل *Erwinia amylovora* یکی از بیماری‌های خطرناک درختان میوه دانه دار در بسیاری از مناطق دنیا می‌باشد که موجب نکرور شدن بافت‌های میزبان می‌گردد. این باکتری یک نکرورن تدریجی است که می‌تواند به تدریج با گسترش خود موجب تخریب تمام بافت‌های گیاه میزبان شود. در این بررسی طی بازدیدهای مکرر از مناطق کشت گلابی آستانه اشرفیه، لاهیجان و کیاشهر در استان گیلان از درختان آلوده به آتشک گلابی نمونه برداری به عمل آمد. علائم بیماری روی درختان گلابی آلوده به صورت نکرور سرشاخه‌ها همراه با ترشحات صمغ در بافت‌های آلوده بود. جهت جداسازی عوامل بیماری زای باکتریایی تعدادی از بافت‌های آلوده، شاخه، تنه و جوانه‌ها پس از شستشو و ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۵٪ و شستشوی مجدد با آب مقطر سترون در آب پیتونه له شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره روی محیط‌های کشت روی محیط آگار مغذی سوکروز دار حاوی آنتی بیوتیک سیکلوهاگزامید (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) با یک میله شیشه‌ای خمیده پخش گردید بعد از سه تا پنج روز کلنی‌های سفید مایل به کرم کم‌رنگ انتخاب و روی محیط‌های کشت مذکور خالص شدند. جدایه‌های باکتری به دست آمده به صورت میله‌ای شکل، گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری بودند. جدایه‌ها روی محیط کشت‌های غنی از سوکروز تولید لوان نموده، ولی قادر به تولید رنگدانه فلورسنت در محیط KB نبودند. تمام جدایه‌های مورد بررسی در توتون و شمعدانی فوق حساسیت ایجاد کردند. باکتری‌های جدا شده اکسیداز، نیترات، اوره آز و ایندول منفی بوده و قادر به لهانیدن برش‌های سیب زمینی، تولید گاز H_2S و هم‌چنین رشد در دمای $36^{\circ}C$ نبودند. به علاوه جدایه‌ها قادر به استفاده از سیترات، استوئین، سوربیتول و تری‌هالوز بوده و آزمون ژلاتین آنها نیز مثبت بود. بر اساس مجموع خصوصیات مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی و تکثیر یک قطعه ۹۳۷ جفت بازی از DNA با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی مرآز (PCR) به کمک آغازگرهای اختصاصی Ea1 و Ea2 جدایه‌های مذکور به عنوان *Erwinia amylovora* شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی: گلابی، *Erwinia amylovora*، آتشک، PCR، گیلان

مقدمه

مخرب‌ترین بیماری‌های مهم درختان میوه دانه دار به‌خصوص سیب (*Malus domestica*) و گلابی (*Pyrus communis*) محسوب می‌شود. کنترل و مهار این بیماری برای کشاورزان و

بیماری آتشک (fire blight) در اثر آلودگی به باکتری *Erwinia amylovora* (Burrill) یکی از شدیدترین و

۱. به ترتیب استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت

۲. کارشناس ارشد موسسه تحقیقات پرورش کرم ابریشم، رشت

غالب انتخاب و خالص سازی شدند.

آزمون اثبات بیماری زایی

برگ‌های گلابی رقم خوج جهت مایه زنی استفاده شدند. برای مایه زنی برگ‌ها و میوه‌ها، از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها در آب مقطر سترون استفاده شد. بدین منظور، یک توده از کشت جدایه‌ها در آب مقطر سترون به صورت سوسپانسیون با غلظت $10^8 \times 1$ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر با استفاده از روش سری رقت (Serial dilution) تهیه شد. جهت مایه زنی از روش یاسد و همکاران (۲۴) استفاده شد. بدین ترتیب، در ناحیه رگبرگ اصلی برگ، توسط چاقوی جراحی یک برش به شکل T زده شد و سپس ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در محل زخم قرار گرفت. برای مایه زنی میوه‌ها سوسپانسیون باکتری به بافت میوه تلقیح گردید. در تمام موارد آزمایش برای شاهد از آب مقطر استفاده گردید. برگ‌های جوان و میوه‌ها مایه زنی شده به منظور حفظ رطوبت بترتیب در تشتک‌های ۳۰۰ میلی متری و بشر ۲۵۰ میلی لیتری حاوی کاغذ صافی مرطوب به مدت ۱۰ الی ۱۵ روز قرار گرفتند. در صورت بروز علائم بیماری، جداسازی عامل بیماری از برگ‌های جوان و میوه‌های مایه زنی شده به روش قبلی تکرار شد.

آزمون‌های بررسی ویژگی‌های فنوتیپی

الف) ویژگی‌های مورفولوژیک

از کلنی‌های ۲۴ ساعته رشد یافته هر جدایه باکتری روی محیط LB برای رنگ آمیزی گرم به روش شاد و همکاران (۱۹)، واکنش در مقابل KOH به روش سالسو و همکاران (۲۰) استفاده شد. برای تعیین وجود یا عدم وجود رنگدانه فلورسنت از محیط KB، و برای مشاهده تولید لوان محیط آگار غذایی به اضافه پنج درصد ساکارز به کار گرفته شد (۱۸).

ب) ویژگی‌های فیزیولوژیک

برای آزمون تحریک فوق حساسیت در توتون و شمعدانی، یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml در

گلابی را ضروری می‌سازد در این منطقه مورد توجه قرار گیرد. از آنجایی که در بررسی‌های مقدماتی عامل بیماری آتشک گلابی در گیلان باکتریایی تشخیص داده شد (۶)، ضروری به نظر رسید که باکتری عامل بیماری به صورت دقیق تری شناسایی شود تا در آینده با انجام پژوهش‌های تکمیلی روش‌های پیشگیری و مبارزه با بیماری حاصل شود.

مواد و روش‌ها

بازدید از باغات

طی سال‌های ۱۳۸۳-۱۳۸۲ از باغ‌های گلابی مختلف استان گیلان در لاهیجان، آستانه اشرفیه بازدید به عمل آمد. در هنگام بازدیدها، انواع سوختگی و شانکر روی این درختان مورد بررسی قرار گرفت و از درختان گلابی که دارای سوختگی برگ و شانکر در سرشاخه‌ها بودند، نمونه برداری شد. نمونه‌ها پس از قرار دادن داخل کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی عوامل بیماری‌زا

نمونه‌های آلوده به آتشک گلابی ابتدا در جریان ملایم آب شسته شده و قطعاتی حدود یک سانتی متر مربع شامل قسمت سالم و بافت آلوده مورد نظر بریده شده و به‌طور جداگانه توسط هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و سپس سه بار (هر بار ده دقیقه) با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. بافت‌های آلوده در آب پپتونه کاملاً له شدند و ۳۰ دقیقه در شرایط آزمایشگاه قرار گرفتند. عصاره‌های به دست آمده توسط آب مقطر سترون تا یک میلیونوم رقیق شدند. سپس از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط آگار مغذی سوکروز دار (NAS)، King's B (KB) و LB (مخمر ۱۰ گرم، باکتو پپتون ۵ گرم، NaCl ۱۰ گرم، آگار ۱۷ گرم) حاوی آنتی بیوتیک سیکلوهاگزامید (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) با یک میله شیشه‌ای خمیده پخش گردید. تشتک‌های پتری در دمای 27°C به مدت ۳ روز نگهداری شدند. کلنی‌های رشد یافته براساس شکل ظاهری و رنگ، بررسی و کلنی‌های

بلافاصله لوله‌ها در ظرف محتوی یخ قرار گرفتند. از ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری جهت تکثیر استفاده گردید. برای تکثیر DNA از واکنش ۱۰۰ میکرولیتری محتوی دو میکرولیتر از آغازگرهای اختصاصی، چهار میکرولیتر مخلوط dNTP، شش میکرولیتر کلرور منیزیم ۲۵ مولار، ۱۰ میکرولیتر بافر ۱۰ برابر غلظت، ۰/۲ میکرولیتر *Taq polymerase*، ۶۵/۸ میکرولیتر آب مقطر سترون دو بار تقطیر شده استفاده گردید. سپس جهت اجتناب از تبخیر در طول انجام مراحل PCR به لوله ۲ قطره روغن معدنی اضافه گردید. لوله‌ها در دستگاه PCR (Mastercycler gradient, Germany) قرار داده شده و برنامه آن شامل ۶۰ ثانیه در 94°C جهت جدا شدن رشته‌های DNA و سپس به تعداد ۳۷ سیکل به ترتیب ۶۰ ثانیه در 52°C و سپس ۶۰ ثانیه در 72°C قرار گرفتند. جهت بسط نهایی لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دمای 72°C قرار گرفتند. در پایان لوله‌ها در 4°C نگه‌داری شدند. بعد از پایان یافتن تکثیر عملیات PCR مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر لوله برداشته و روی ژل آگارز ۲ درصد در داخل بافر TBE (۸ Tris/base گرم، اسید بوریک ۵/۵ گرم، EDTA نیم مولار با pH ۸ نیم مولار، و آب مقطر سترون ۱۰۰۰ میلی لیتر) بار گذاری شدند و سپس ژل آگارز را با جریان ۱۰۰ ولت الکتروفورز شد. بعد از اتمام الکتروفورز ژل آگارز را در اتیدیوم بروماید (۱۰ میکروگرم در میلی لیتر) به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت و سپس داده و سپس زیر نور ماورای بنفش DNA، ژل مرئی شد. از جدایه استاندارد *E.amylovora* CFBP 1430 ارسالی از مرکز تحقیقات باکتریولوژی آنژ - فرانسه، به‌عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. تمام باندها که در سطح شاهد مثبت قرار گرفتند، به‌عنوان تیمار مثبت در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

جدا سازی عامل بیماری

سه روز پس از کشت برگ‌های آلوده روی محیط SNA، کلنی‌های سفید مایل به کرم کم‌رنگ ظاهر شدند که اکثریت

پارانشیم تحتانی برگ‌های توتون و شمعدانی تزریق شد (۱۵). فعالیت پکتولیتیک جدایه‌های باکتریایی، حداکثر دمای رشد، درصد تحمل نمک طعام (۱۸)، طبق روش‌های توصیه شده تعیین گردید.

ج) ویژگی‌های بیوشیمیایی

آزمون‌های رشد هوازی و بی هوازی به روش هیو و لایفسن (۱۳)، اکسیداز به روش کواکس (۱۸) و کاتالاز به روش دای (۱۱) انجام شد. جهت انجام آزمون‌های تجزیه نشاسته و ژلاتین جدایه‌های باکتری از محیط کشت آگار مغذی محتوی ۲٪ نشاسته و ۴٪ ژلاتین استفاده شد. آزمون اوره آز به وسیله محیط پایه اوره آگار که به آن دو درصد اوره افزوده شد، انجام گردید. آزمون‌های تولید گاز هیدروژن سولفور (H₂S)، ایندول و مواد احیا کننده از ساکارز با استفاده از محیط‌های کشت آماده TSI و SIM و استفاده از معرف‌های کواکس و بندیکت انجام شد (۱۴). برای آزمون متیل رد و تولید استوئین، محیط کشت آماده MR-VP به مقدار دو درصد در آب مقطر تهیه شد و سه روز پس از مایه زنی جدایه‌ها در محیط کشت، با افزودن معرف‌های مربوطه واکنش‌ها بررسی گردید (۱۰ و ۱۱). تولید نیترات، هیدرولیز اسکولین، هیدرولیز DNase، و آزمون لستیناز بر پایه روش‌های توصیه شده لیلوت و استید (۱۶) انجام گرفت. تولید اسید از قندها با کاربرد محیط پایه آیر و همکاران بررسی شد (۱۸).

تشخیص جدایه‌ها به وسیله واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (PCR)

برای تشخیص سلول‌های *E.amylovora* با روش PCR از آغازگرهای اختصاصی زیر:

5' GGG) و Ea1 (5' GG TTT TTA ACG CTG GG 3')
Ea2 (CAA ATA CTC GGA TT 3') استفاده شد.

جهت استخراج DNA از سلول‌های *E.amylovora* یک کلنی از باکتری برداشته شد و در لوله‌های آزمایش محتوی ۴/۵ میلی لیتر آب مقطر سترون قرار گرفت. سپس باکتری به مدت ۱۰ دقیقه در حمام بن ماری در دمای 100°C قرار داده شد و

تشخیص جدایه‌های *E. amylovora* به وسیله PCR

جدایه‌های *E. amylovora* توسط آغازگرهای اختصاصی Ea1 و Ea2 تشخیص داده شدند. روی ژل الکتروفورز ۲ درصد باندهای ۹۳۷ جفت باز توسط آغازگرهای اختصاصی تشکیل شدند. باندهای ایجاد شده روی ژل با باندهای شاهد مثبت (جدایه استاندارد E. amylovora CFBP 1430) کاملاً مطابقت داشت (شکل ۱).

به جز چند استثنا همه جدایه‌های *E. amylovora* پلاسمید مشابه ۲۹ کیلو باز (kb) که pEA29 نامیده می‌شود را دارا می‌باشند. به دلیل این که آغازگرهای Ea1 و Ea2 از توالی این پلاسمید طراحی شده‌اند، لذا تکثیر قطعه ۰/۹ kb در این تحقیق مشخص نمود که جدایه‌های منطقه گیلان نیز واجد این پلاسمید هستند که در اکثر جدایه‌های *E. amylovora* وجود دارد. حساسیت شناسایی این جدایه‌ها با استفاده از روش nested-PCR و به وسیله آنزیم‌های برشی *psfI* روی قطعه kb ۰/۹ از قطعه ژن pEA29 بیشتر می‌شود (۲۲). در این تحقیق نتایج آزمون‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌های *E. amylovora* به دست آمده از درختان گلابی در استان گیلان با استفاده از روش PCR به کمک آغازگرهای اختصاصی مورد تأیید قرار گرفت. نتایج به دست آمده در روش PCR با کارهای برسویل و همکاران (۹) کاملاً مطابقت داشت. بر اساس نتایج به دست آمده از آزمون‌های فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و بیماری‌زایی و نتایج به دست آمده از تکثیر DNA جدایه‌های حاصل از درختان گلابی مبتلا به آتشک در استان گیلان مشخص گردید که عامل بیماری آتشک گلابی در این منطقه *E. amylovora* می‌باشد.

میزان آلودگی باغ‌های گلابی استان گیلان شامل آستانه اشرفیه، لاهیجان و کاشهر به آتشک بسیار شدید بود به طوری که علائم سوختگی برگ و سرشاخه روی رقم گلابی محلی (خوج) بیشتر مشاهده گردید. علائم بیماری در آزمایشگاه شباهت زیادی با علائم بیماری در باغ داشت. کنترل بیماری آتشک نیازمند استفاده از تمام دانش موجود

غالب کلنی‌های باکتریایی را شامل می‌شدند. از نمونه‌های جمع آوری ۲۶ جدایه که توانایی ایجاد فوق حساسیت روی توتون و شمعدانی را داشتند، انتخاب و آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک روی آنها انجام شد.

اثبات بیماری‌زایی

کلیه ۲۶ جدایه‌هایی که باعث ایجاد فوق حساسیت روی توتون و شمعدانی شدند در آزمون بیماری‌زایی روی برگ و میوه گلابی رقم خوج، پس از ۱۵ روز تولید علائم بیماری نمودند. علائم بیماری روی برگ به صورت سوختگی و نکروز برگ و علائم بیماری روی میوه به صورت نکروز و ترشح شیرابه باکتریایی مشاهده گردید که این شبیه علائم مشاهده شده در شرایط باغ روی درختان گلابی بود. علائم بیماری در همه جدایه‌ها روی برگ‌های جوان و میوه‌ها یکسان مشاهده گردید. برگ‌های جوان و میوه‌ها که توسط آب مقطر سترون مایه زنی شده بودند، هیچ‌گونه علائمی نشان ندادند.

علائم بیماری آتشک در باغ‌های گلابی استان گیلان به صورت سوختگی شکوفه، جوانه و شانکر مشاهده گردید. به نظر می‌رسد وجود شرایط محیطی مناسب در طی ماه‌های اسفند تا اواسط خرداد علائم بیماری در باغات گلابی استان گسترش می‌یابد. البته اظهار نظر دقیق در این زمینه نیاز به تحقیقات بیشتری دارد. در شرایط بارندگی و شب‌نم در طول گل‌دهی، سوختگی ناشی از باکتری‌های اپی فیت رخ می‌دهد که انتشار ثانویه آن توسط حشرات و سایر عوامل جوی باعث گسترش بیماری می‌گردد. آلودگی جوانه ناشی از حرکت سیستمیک باکتری از شانکرهای زمستان‌گذران می‌باشد (۲۳).

خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌های

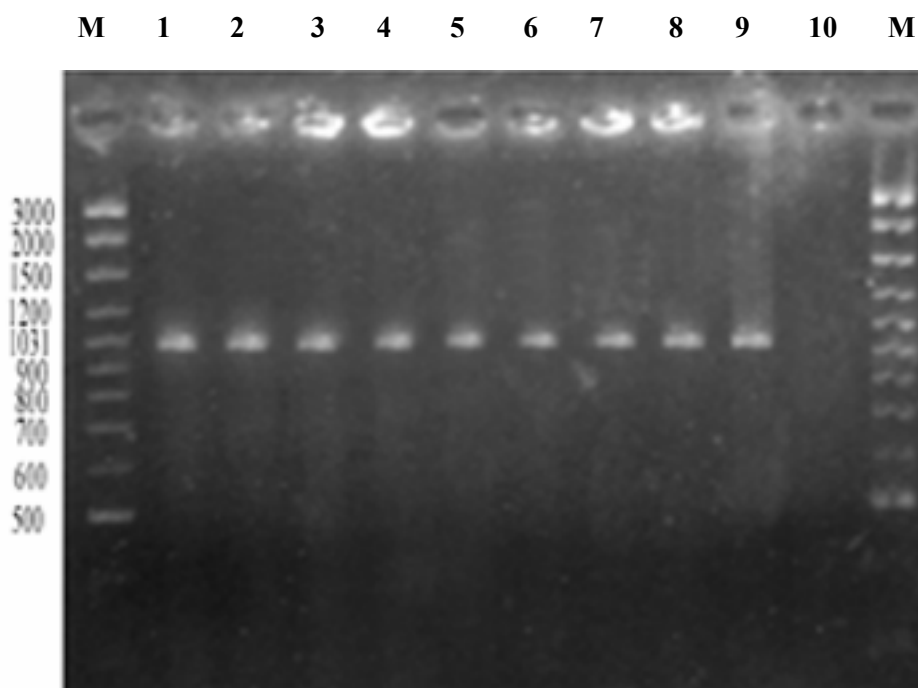
E. amylovora

مشخصات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای ایزوله‌های جدا شده از درختان گلابی مبتلا به آتشک در استان گیلان در جدول ۱ ذکر شده است. به‌طور کلی جدایه‌ها از لحاظ خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای تنوعی نداشتند.

جدول ۱. خصوصیات مورفولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای جدایه‌های *Erwinia amylovora* به‌دست آمده از درختان گلابی در استان گیلان

ویژگی	استرین‌های <i>E. amylovora</i>	ویژگی	استرین‌های <i>E. amylovora</i>
رنگ‌آمیزی گرم	-	تولید اسید از	
رشد بی‌هوایی	+	رافینوز	-
فوق حساسیت روی	-	دی مانوز	-
توتون	+	دی رافینوز	-
شمعدانی	+	دی گلوکز	+
لکه برگی روی گلابی	+	اسکولین	-
رشد در ۳۶ °C	-	سلوبیوز	-
احیاء نیترات	-	اینولین	-
کاتالاز	-	ال آرابینوز	+
لوان	+	میو اینوسیتول	-
اکسیداز	-	مانیتول	-
اوره آز	-	مالتوز	-
هیدرولیز نشاسته	-	دی - گالاکتوز	+
هیدرولیز ژلاتین	+	سوربیتول	+
DNase	-	ساکارز	+
ایندول	-	رایبوز	+
H ₂ S تولید	-	فروکتوز	+
لیسیتیناز	-	لاکتوز	-
متیل رد	-	تری هالوز	+
هیدرولیز کازئین	-	زایلوز	-
تحمل نمک طعام ۳/۵٪	+	دی ادنیتول	-
استفاده از تارتارات	-	گلیسرول	-
سیترات	+		
لاکتات	-		

+ : واکنش مثبت، وجود فعالیت و استفاده از ترکیبات
 - : واکنش منفی، عدم وجود فعالیت یا عدم استفاده از ترکیبات



شکل ۱. تکثیر قطعه ۹۳۷ جفت باز *Erwinia amylovora* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Ea1 و Ea2، چاهک‌های ۱ و ۱۲ شناساگر با وزن مولکولی ۱۰۰ تا بازی را نشان می‌دهند، چاهک ۲، شاهد مثبت (جدایه استاندارد *E.amylovora* CFBP 1430)، چاهک‌های ۳ الی ۱۰ جدایه‌های *E.amylovora* به‌دست آمده از درختان گلابی در استان گیلان و ۱۱، شاهد منفی (آب مقطر سترون) را شامل می‌شود.

به‌کارگیری ارقام متحمل بیماری آتشک را کنترل نمود (۱). میزان آلودگی باغات گلابی استان گیلان شامل آستانه اشرفیه، لاهیجان و کاشهر به آتشک بسیار شدید بود به‌طوری‌که علایم سوختگی برگ و سرشاخه روی رقم گلابی محلی (خوج) بیشتر مشاهده گردید. علائم بیماری در آزمایشگاه شباهت زیادی با علائم بیماری در باغ داشت.

اپیدمیولوژی بیماری می‌باشد (۲۲). بیماری آتشک را باید با استفاده از روش‌های کنترل تلفیقی و ردیابی و پایش باغ بیماری را کنترل نمود. بدین منظور می‌توان از روش‌های مدیریت زراعی (هرس و رعایت اصول بهداشتی)، کنترل بیولوژیک (باکتری‌های آنتاگونیست) و شیمیایی (در زمان مناسب با توجه به پیش آگاهی)، بر طرف نمودن منابع آلودگی، قرنطینه و

منابع مورد استفاده

۱. آهون منش، ع. ۱۳۷۹. اصول مبارزه با بیماری‌های گیاهی. انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان.
۲. افیونیان، م. ح. رحیمیان و م. مزارعی. ۱۳۷۴. مقایسه ایزوله‌های ایرانی *Erwinia amylovora* بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و الکتروفورز پروتئین. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج.
۳. حسن زاده، ن. ز. ذاکری و م. مزارعی. ۱۳۷۲. موقعیت فعلی بیماری آتشک در ایران. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه گیلان.
۴. داودی، ع. الف. مجیدی، ح. رحیمیان و م. ولیزاده. ۱۳۷۹. عکس العمل ارقامی از سیب و گلابی به بیماری آتشک (Fire blight). چهاردهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان.

۵. ذاکری، ز. و ب. شریف نبی. ۱۳۶۸. بیماری آتشک گلابی در کرج. خلاصه مقالات دهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرمان.
۶. علی، ب. و م. نیک نژاد کاظم پور. ۱۳۸۳. معرفی باکتری *Erwinia amylovora* عامل آتشک سیب و گلابی از استان گیلان. شانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه تبریز.
۷. مزارعی، م. ن. حسن زاده و م. ر. حاجی مراد. ۱۳۷۲. شناسایی سرولوژیکی باکتری *Erwinia amylovora* عامل بیماری آتشک. خلاصه مقالات یازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، دانشگاه گیلان.
8. Bell, A. 2001. Fire Blight : A bacterial disease of Rosaceous plants. Department of Horticulture Science, In: http://www.actahort.org/books/411/411_56.htm.
9. Berswill, S., A. Path, P. Belleman, W. Zeller and K. Geider. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* by PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3522-3526.
10. Bogs, J., I. Bruchmuler, C. Erbar and K. Geider. 1998. Colonization of host plant by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*, labeled with genes for bioluminescence and fluorescence. *Phytopathol.* 88:416-421.
11. Dye, D.W. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*, The amylovora group. *Newzealand J. Agric. Sci.* 11: 590-607.
12. Hugh, R. and E. Leifson. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative methabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. *J. Bacteriol.* 66 :24-26.
13. Kirally, Z.Z., F. Klement, F. Solymosy and J.Voros. 1974. *Methods in Plant Pathology*. Elsevier Scientific Pub. Co., Amesterdam.
14. Klement, Z., G.L. Fakas and L. Loverkovich. 1964. Hypersensitive reaction induced by pathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathol.* 54 : 474-477.
15. Lelliot, R.A. and D.E. Stead. 1987. *Methods for the Diagonosis of Bacterial Disease of Plant*. Blackwell Scientific Pub., London.
16. Momol, M.T., E.T. Momol, W.F. Lmboy, J.L. Norelli, S.V. Beer and H.S. Aldwinckle. 1997. Characterization of *Erwinia amylovora* strains using random amplified polymorphic DNA fragments (RAPDs). *J. Appl. Microbiol.* 82 : 389-398.
17. Momol T.M. and H.S. Aldwinckle. 2000. Genetic diversity and host range of *Erwinia amylovora*. PP. 55- 72. *In : Vanneste, J.L. (Ed.), Fire Blight, The Disease and Its Causative Agent, Erwinia amylovora*. Oxford. London.
18. Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Thrid eds. APS. St. Paul. Minnesota, USA. 373pp.
19. Sulsow, T.V., M.N. Schorth and M. Saka. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathol.* 72 : 917-918.
20. Thomason, S.V., M.N. Schorth, W.J. Moller and W.O. Reil. 1975. Occurrence of the fire blight of pear in relation to weather and epiphytic population of *Erwinia amylovora*. *Phytopathol.* 65 : 335-358.
21. Van der Zwet, T. 2002. Present worldwide distribution of fire blight. *Acta Hort.* 590: 33-34.
22. Van der Zwet, T. and H.I. Keil. 1979. Fire blight – A Bacterial Disease of Rosaceae Plant. *Agriculture Handbook* 510, US Department of Agriculture, Washington. DC. 200 pp.
23. Vanneste, J.L. 1995. *Erwinia amylovora*. PP. 21-41. *In: Singh. U.S., R.P. Singh and k. Kohmato (Eds.) Pathogenesis and host specificity in Plant Disease : Histopathological, Biotechnical, Genetic and Molecular Bases. Vol.1. Prokayotes, Progamon Press., Oxford. London*
24. Yassad-Carreau, S., C. Manceau and J. Luisetti. 1994. Occurrence of specific reaction induced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean pods, lilac and pear plants. *Phytopathol.* 43 :528-536.
25. Zhang, Y. and K. Geilder. 1997. Differentiation of *Erwinia amylovora* strains by pulse-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 4421-4426 .