

شناسایی و بررسی تنوع ژنوتیپی جدایه‌های *Erwinia amylovora* عامل باکتریایی آتشک درختان دانه‌دار در استان همدان

مصطفی درویش‌نیا^{۱*}، حسین میرزایی نجفقلی^۲، میلاد آئینی^۳ و امین جوشقانی^۴

- ۱- نویسنده مسوول: دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران (Mdarvishnia44@yahoo.com)
- ۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران
- ۳- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران
- ۴- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۱/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۰/۱۳

چکیده

بیماری آتشک سیب و گلابی یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار است که هر ساله خسارات فراوانی را به باغات میوه وارد می‌نماید. جهت شناسایی و تعیین تنوع ژنوتیپی عامل بیماری آتشک، نمونه‌های دارای علائم مشکوک به آتشک از باغات درختان میوه دانه‌دار جمع‌آوری گردید. در مجموع تعداد ۳۴ جدایه جداسازی و با توجه به نتایج آزمون‌های فنوتیپی، بیوشیمیایی، بیماری‌زایی و استفاده از آغازگرهای اختصاصی Ea71، به‌عنوان *Erwinia amylovora* شناسایی شدند. به‌منظور بررسی تنوع ژنوتیپی جدایه‌های عامل بیماری، از آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگرهای ERIC و BOX استفاده شد. با توجه به واکاوی داده‌های حاصل از rep-PCR، جدایه‌ها در سطح ۷۷ درصد به سه گروه تقسیم شدند. همچنین بر اساس تجزیه و تحلیل عددی داده‌های حاصل از بررسی تنوع فنوتیپی و بیوشیمیایی توسط نرم‌افزار Ntsys-pc 2.02، جدایه‌ها در سطح ۸۹ درصد باهم شباهت نشان دادند و جدایه‌های به‌دست آمده از یک میزبان و یک منطقه در یک گروه و یا گروه‌های بسیار نزدیک به هم قرار گرفتند. به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جدایه‌های باکتری *E. amylovora* یکنواخت بوده و شباهت خیلی بالایی با یکدیگر دارند.

کلیدواژه‌ها: آتشک، اروینیا آمیلوورا، سیب، فنوتیپ، فنوتیپ ژنوتیپ

مقدمه

بیماری آتشک با عامل باکتریایی *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) دامنه میزبانی وسیعی در میان گیاهان خانواده گل‌سرخیان دارد. به‌طوری‌که ۲۰۰ گونه گیاهی متعلق به ۴۰ جنس در این خانواده، به‌عنوان

به‌طور کلی محصولات درختان میوه دانه‌دار نقش بسیار مهمی را از لحاظ تغذیه‌ای، صنایع تبدیلی، صادرات و کسب درآمدهای ارزی در اقتصاد کشور به خود اختصاص داده است (Moarrefzadeh et al., 2009).

دبیر تخصصی: دکتر محمد رضی نتاج

تنوع ژنتیکی جدایه‌های *E. amylovora* نشان داد که استرین‌های جدا شده از درختان گلابی الگوی ژنتیکی متفاوتی را نسبت به سایر جدایه‌ها نشان دادند (Radunović et al., 2017). یکی از دلایل مهم عدم موفقیت در شناخت و مهار این بیماری، عدم وجود اطلاعات کافی در ارتباط با تنوع ژنتیکی جدایه‌های *E. amylovora* است؛ بنابراین، هدف از انجام این پژوهش، شناسایی عامل باکتریایی آتشک سیب و گلابی بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، مولکولی و همچنین بررسی تنوع ژنوتیپی استرین‌های موجود در باغات سیب، به و گلابی شهرستان‌های مورد مطالعه استان همدان است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری

از باغات میوه شهرستان‌های نهاوند، ملایر، همدان و توپسرکان از خردادماه تا شهریورماه ۱۳۹۶ بازدید و نمونه‌برداری صورت گرفت. جمع‌آوری نمونه از درختان گلابی، سیب و به دارای علائم آتشک انجام شد. جهت جداسازی باکتری، ابتدا نمونه‌ها چند دقیقه در جریان ملایم آب شسته و پس از ضدعفونی نمونه‌ها با هیپوکلریت سدیم، سوسپانسیون باکتری تهیه گردید. سوسپانسیون باکتری روی محیط کشت آگار غذایی به صورت خطی روی تشتک‌های پتری کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور به مدت سه روز نگهداری گردید. بعد از گذشت سه روز، تک کلنی‌های کوچک، براق، کرم تا شیری‌رنگ با حاشیه صاف انتخاب و برای خالص‌سازی، مجدداً روی محیط کشت آگار غذایی کشت گردید. پس از خالص‌سازی نمونه‌ها درون آب مقطر استریل در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی

جدایه‌ها

به‌منظور شناسایی و بررسی خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها آزمون‌های زیر انجام گردید. گرم به روش حلالیت در پتاس سه درصد (Sulso et al.,

میزبان این باکتری گزارش شده است که به درختان میوه دانه‌دار خسارت اقتصادی فراوانی وارد می‌کند (Bonn and van der Zwet, 2000). عامل بیماری، یک باکتری گرم منفی با یک تا هشت تاژک محیطی، دمای بهینه ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد با پرگنه‌های سفید و گنبدی شکل است (Dagher et al., 2020). باکتری عامل بیماری در کلاله شکوفه‌ها مستقر و با رشد اپیفیتی بالا سبب افزایش جمعیت باکتری می‌شود. این افزایش جمعیت سبب ایجاد عفونت در گل و انتشار بالای باکتری توسط باران و حشرات گرده‌افشان می‌گردد (Mirzai et al., 2012). عامل بیماری با تولید پروتئین‌های مختلف مانند HrpA، HopC1، HrpN، HrpW، AvrRpt2 و پروتئین‌های اختصاصی بیماری مانند DspA/E سبب کلونیزه کردن بافت، مرگ سلولی، ایجاد نکروز و توسعه بیماری می‌گردند (Abdollahi and Salehi, 2018). این بیماری در ایالت متحده آمریکا به‌تنهایی سالانه بیش از ۱۰۰ میلیون دلار خسارت وارد می‌کند (Norelli et al., 2003). آمیلووران به علت ساختار زنجیره‌ای پلیمری بلند، سبب انسداد عناصر آوند چوبی و در نتیجه، پژمردگی شاخسارهای سیب می‌شود (Koczan et al., 2009). آمیلووران اصلی‌ترین هتروپلی ساکارید موجود در اووز باکتری است که تولید آن به‌واسطه تعامل متقابل با میزبان تنظیم می‌شود. به دلیل مشاهده همبستگی مثبت بین تولید آمیلووران و پر آزاری باکتری، به نظر می‌رسد که آمیلووران برای پر آزاری *E. amylovora* بسیار ضروری است (Holtappels et al., 2016). روش‌های متعددی جهت مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های باکتریایی وجود دارد که می‌توان به چندشکلی طول قطعات تکثیر شده (AFLP)، هیبریداسیون دی‌ان‌ای، آنالیز ژن‌های خانه‌دار و توالی‌های تکرار شونده (Rep-PCR) اشاره نمود (Aeini and Taghavi, 2014, Ye et al., 2013). در مطالعه صورت گرفته با استفاده از روش rep-PCR با آغازگرهای REP، ERIC و BOX

(5'GCT ACC ACT GAT CGC TCG AAT)
CAA ATC GGC'3) با طول قطعه تکثیر ۱۸۷ جفت باز استفاده شد (Taylor et al., 2001). این آغازگرها توسط شرکت پیشگام (تهران، ایران) سنتز شدند. به منظور استخراج دی‌ان‌ای (DNA)، سوسپانسیون نیمه کدزی از کشت ۲۴ ساعته باکتری در ۵۰۰ میکرو لیتر آب مقطر سترون تهیه گردید. پس از قرار دادن سوسپانسیون باکتری در آب در حال جوش به مدت ۱۵ دقیقه، نمونه‌ها به مدت سه دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس از محلول رویی به‌عنوان دی‌ان‌ای الگو در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) استفاده شد.

واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio rad - USA) و با حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر شامل ۱۲/۵ میکرو لیتر Master mix red (شرکت پیشگام-ایران)، ۱ میکرو لیتر از هر کدام از آغازگرها (شرکت پیشگام-ایران)، ۹ میکرو لیتر آب مقطر سترون و ۲ میکرو لیتر DNA انجام شد. آشکارسازی قطعات ژنومی تکثیرشده در ژل آگارز یک درصد و عکس‌برداری با دستگاه Gel documentation انجام شد.

تعیین توالی ناحیه 16S rDNA

به‌منظور شناسایی دقیق‌تر و اطمینان بیشتر، توالی ناحیه‌ی 16S rDNA، جدایه‌های نماینده، با استفاده از آغازگر رفت 10F با توالی (5'AGTTTGATCATGGCTCAGATTG'3) و آغازگر برگشت 1507r با توالی (5'TACCTTGTTACGACTTCACCCCAG'3) تکثیر و برای تعیین توالی به شرکت تکاپو زیست ارسال گردید. نتایج تعیین توالی با استفاده از برنامه BLASTn موجود در سایت NCBI ارزیابی و میزان تشابه آن‌ها با سایر استرین‌های ثبت‌شده در این پایگاه بررسی شد. درخت فیلوژنتیکی با الگوریتم اتصال مجاور (Neighbor-joining) و آزمون صحت شاخه‌ها (Bootstrapping) با استفاده از نرم‌افزار Mega نسخه پنج با ۱۰۰۰ تکرار بررسی شد.

(1982)، کاتالاز (dye, 1986)، اکسیداز (Kovacs, 1956)، رشد هوازی و بی‌هوازی (Hugh and Leifson, 1953)، آزمون فوق حساسیت در شمع‌دانی (Klement et al., 1964)، لهیدگی ورقه‌های سیب‌زمینی، رشد در محیط کشت EMB، رشد در محیط کشت YDC، حرکت توده‌ای باکتری، اوره‌آز، متیل رد، تولید گاز از گلوکز، تولید لوان، لسیتیناز، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز اسکولین، تولید اندول، هیدرولیز توئین ۸۰، تولید گاز H₂S از سیستین، رشد در ۳۹ درجه سانتی‌گراد، تحمل نمک ۵ درصد، استفاده از سیترات، اگزالات، مالونات، تارتارات، لاکتات، آلانین، تولید اسید از گلوکز، گالاکتوز، سوکروز، زایلوز، مانیتول، لاکتوز، آدونتول، آرابینوز، سلوبیوز، سوربیتول، فروکتوز، ترهالوز، مانوز، گلیسرول و مالتوز به روش شاد و همکاران (Schaad et al., 2001) انجام شد.

آزمون بیماری‌زایی

برای اثبات بیماری‌زایی، سوسپانسیونی با غلظت ۱۰^۸ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر (CFU/ml) از کشت ۲۴ ساعته باکتری تهیه شد. جهت مایه‌زنی از برگ‌های جوان گلابی استفاده شد. پس از ضدعفونی برگ‌ها، مقدار ۵۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری روی زخم‌های ایجادشده در ناحیه رگبرگ اصلی قرار داده شد. برگ‌های مایه‌زنی شده در شرایط رطوبتی ۹۰ درصد و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و نتایج پس از هفت روز بررسی شد. برای هر جدایه سه تکرار استفاده شد و از آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد منفی استفاده گردید (Yassad et al., 1994).

انجام آزمون PCR

تشخیص جدایه‌های با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

برای تشخیص جدایه‌ها از آغازگر اختصاصی Ea71 با توالی رفت (5'CCT GCA TAA ATC ACC) و برگشت (GCT GAC AGC TCA ATG'3)

آزمون rep-PCR

با استفاده از نرم‌افزار Ntsys-pc 2.02 فاصله ژنتیکی جدایه‌ها رسم گردید. فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد به صورت وجود یا عدم وجود باند در ژل مشخص شد. تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش مراتبی (Hierarchical Technique) انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان کلاسترها از روش (UPGMA) و ضریب تشابه جاکار (J) استفاده گردید.

جهت بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های باکتری *E. amylovora* از روش rep-PCR و با آغازگرهای ERIC1 با توالی (ATgTAAgCTCCTggggATTAC) و ERIC2 با توالی (AAGTAAgTgACTggggTgAgCg) و آغازگر BOX با توالی (CTACggCAAgCgACgCTgAC) استفاده شد (Versalovic et al., 1994).

نتایج**علائم و جداسازی عامل بیماری آتشک سیب و گلابی**

طی بازدیدهای به عمل آمده، علائم مشکوک به آتشک درختان میوه دانه‌دار با شدت‌های مختلف مشاهده شد. این علائم شامل خشکیدگی شکوفه‌ها و میوه‌ها، قهوه‌ای شدن رگبرگ‌ها و بافت اطراف آن، آویزان شدن برگ‌ها و میوه‌های نارس و بروز شانکر و ترشحات صمغی در تنه درختان بود. دو تا سه روز پس از کشت سوسپانسیون نمونه‌ها، تک پرگنه‌های کوچک، براق، به رنگ کرم تا شیری با حاشیه صاف به شکل گرد و محدب انتخاب شد. در مجموع تعداد ۳۴ جدایه از نمونه‌های دارای علائم جداسازی گردید (جدول ۱).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی، از طریق محاسبه میزان شباهت جدایه‌ها با استفاده از ضریب تشابه ساده (Simple matching, SM) انجام گرفت و دندروگرام به روش Unweighted Pair- Group Method using Arithmetic average (UPGMA) با استفاده از نرم‌افزار Ntsys-pc version 2.02e (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) ترسیم گردید. خصوصیات فنوتیپی به صورت کدهای یک (برای خصوصیات مثبت) و صفر (برای خصوصیات منفی) برای این نرم‌افزار تعریف گردید. بر پایه خصوصیات فنوتیپی داده شده به آن، دندروگرام مربوط به ۳۴ جدایه مورد بررسی، توسط این نرم‌افزار رسم گردید.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *E. amylovora* عامل آتشک درختان میوه دانه‌دار جدا شده از مناطق مختلف استان همدان

Table 1. Characteristics of *E. amylovora* isolates, the causal agent of seeded fruit trees from different regions of Hammedan Province

Local of collection	Host	Isolate code
Nahavand	Apple	S1 to S8
Malayer	Apple	S15 to S18
Hammedan	Apple	S22 to S26
Tuysarkan	Apple	S34, S33, S32
Nahavand	Pear	G9, G10
Malayer	Pear	G19
Hammedan	Pear	G29, G28, G27
Nahavand	Quince	B11 to B14
Malayer	Quince	B21, B20
Hammedan	Quince	B31, B30

مشاهده گردید. برگ‌هایی که با آب مقطر مایه‌زنی شده بودند، هیچ‌گونه علائمی نشان ندادند (شکل ۱).

بر اساس تجزیه و تحلیل عددی داده‌های حاصل از آزمون‌های مختلف بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تغذیه‌ای با استفاده از نرم‌افزار Ntsys-pc version 2.02، ۳۴ جدایه‌ی *E. amylovora* در سطح ۸۹ درصد باهم شباهت نشان دادند. جدایه‌های به دست آمده از یک میزبان و یک منطقه در یک گروه و یا گروه‌های بسیار نزدیک به هم قرار گرفتند (شکل ۲).

جدایه‌های *E. amylovora* در آزمون PCR توسط جفت آغازگر اختصاصی Ea71، روی ژل الکتروفورز یک درصد، قطعه قابل انتظار ۱۸۷ جفت بازی را تکثیر نمودند (شکل ۳).

به منظور شناسایی دقیق‌تر و اطمینان بیشتر، توالی ناحیه S DNA ۱۶ دو جدایه B14 و S26، تکثیر شد. جهت مشخص شدن موقعیت فیلوژنیکی این دو جدایه در خانواده *Enterobacteriaceae*، با توالی گونه‌های نزدیک موجود در NCBI مقایسه شد (شکل ۴). نتایج نشان داد که جدایه B14 که از نهاندرخت، روی درخت به جدا شده بود با جدایه JN409472 گونه *E. amylovora*، ۱۰۰ درصد شباهت داشت و جدایه S26 که از همدان، روی درخت سیب جدا شده بود با جدایه‌های *E. amylovora*، ۹۷ درصد شباهت داشت.

بررسی خصوصیات فنوتیپی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

بر اساس آزمون‌های انجام شده، کلیه جدایه‌ها گرم منفی، دارای قابلیت رشد در شرایط بی‌هوازی، قادر به ذوب ژلاتین، تولید لوآن و کاتالاز مثبت بودند. ولی هیچ‌کدام قادر به تولید رنگدانه صورتی روی محیط کشت YDC، لمانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، تولید اوره‌آز، رشد در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد، احیای نیترات و هیدرولیز توین نبودند. کلیه جدایه‌ها توانایی استفاده از گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز، ساکارز، لاکتات و سیترات را داشتند که بر اساس نتایج شاد و همکاران (۲۰۰۱) به عنوان *E. amylovora* تشخیص داده شد؛ اما نتایج برخی از آزمون‌ها از قبیل تولید رنگدانه سبز متالیک روی محیط کشت EMB، تولید گاز از گلوکز، تولید اندول، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز آسکولین و تولید اسید از مانیتول، زایلوز، آرابینوز، آدونیتول، مانوز، گلیسرول، سوربیتول و سلوبیوز در بعضی از جدایه‌ها متفاوت بود. سایر خصوصیات در جدول ۲ آمده است.

همه‌ی ۳۴ جدایه، هفت روز پس از تلقیح باکتری روی برگ‌های گلایی، علائم بیماری آتشک را ایجاد کردند. علائم بیماری روی برگ‌ها به صورت نکروز و سوختگی بود که از محل خراش شروع و به طرفین توسعه یافت. همچنین قطرات شیرابه روی برگ‌ها

جدول ۲- خصوصیات فنوتیپی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های *E. amylovora* جدا شده از درختان میوه دانه‌دار در استان همدان

Table 2. Phenotypic, physiological and biochemical characteristics of *E. amylovora* isolates collected from fruit trees in Hammedan Province

Test	Result	Test	Result
Gram reaction	-	lecithinase	-
Oxidative-fermentative	+	Utilization of Citrate	+
Hypersensitivity reaction on Geranium	+	Oxalate	-
Growth at 39°C	-	Malonate	-
Levan production	+	Tartrate	-
Oxidase	-	Lactate	+
Catalase	+		

Table 2 continued:

Swarming motility	+	Alanine	-
Green pigment on EMB	-**	Acid production from	
Yellow pigment on YDC	-	Glucose	+
Nitrate reduction	-	Galactose	+
Gelatin hydrolysis	-*	Sucrose	+
Arginine dihydrolase	-	Cellobiose	-*
Tween 80 hydrolysis	-	Sorbitol	+*
Esculin hydrolysis	-*	Xylose	-*
Starch hydrolysis	-	Mannose	-*
Gas from Glucose	-*	Trehalose	+
Indole production	-*	Lactose	-
Salt 6 % tolerance	-	Maltose	-
Urease test	-	Fructose	+
Methyl red	-	Arabinose	+**
H ₂ S from cysteine	-*	Adonitol	-**
Potato soft rot	-	Glycerol	-*

+: indicates positive reaction, -: negative reaction, *: more than 80 percent of isolates,

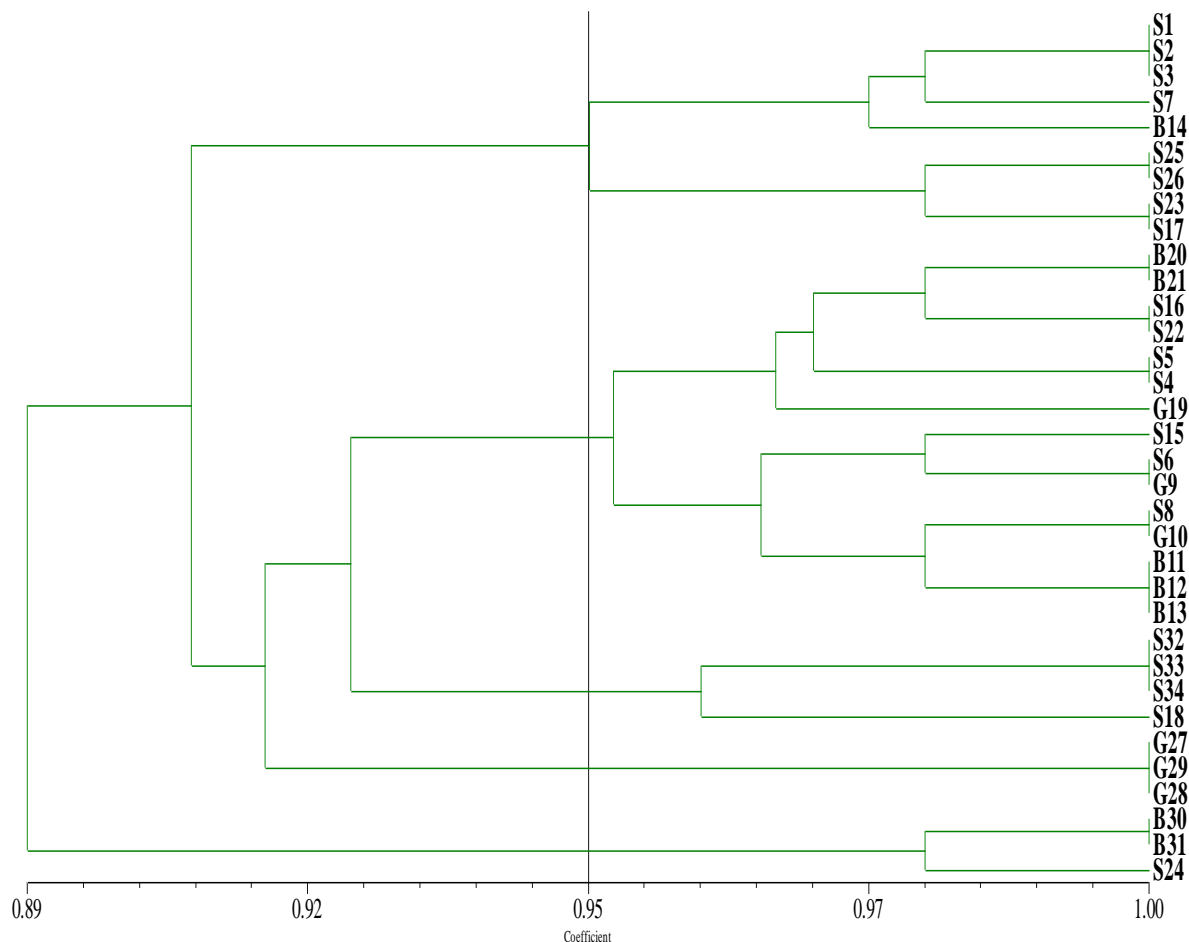
** : more than 60 percent.



شکل ۱- علائم بیماری آتشک روی برگ‌های گلابی تلقیح شده با باکتری *E. amylovora* (a) شاهد مایه‌زنی شده با آب

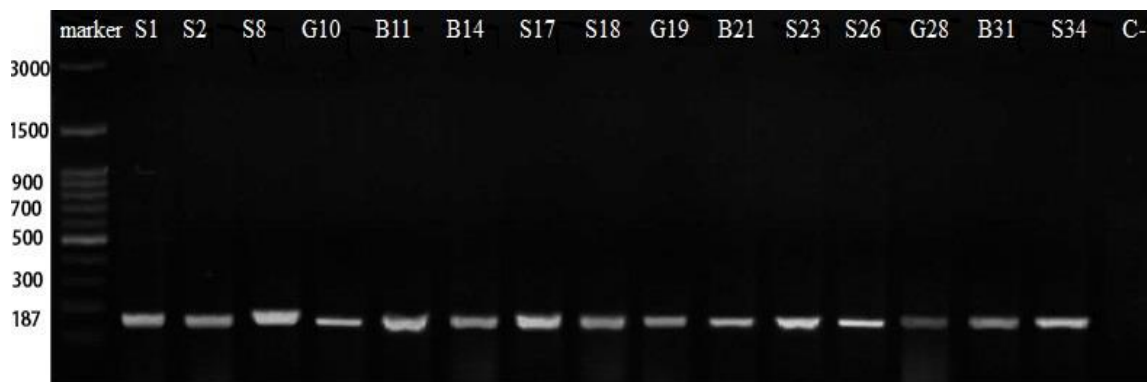
مقطر (b) نمونه مایه‌زنی شده با باکتری *E. amylovora*

Figure 1. Fire blight symptoms on pear leaves inoculated with *E. amylovora*. a) The control inoculated with distilled water, b) The sample inoculated with *E. amylovora*



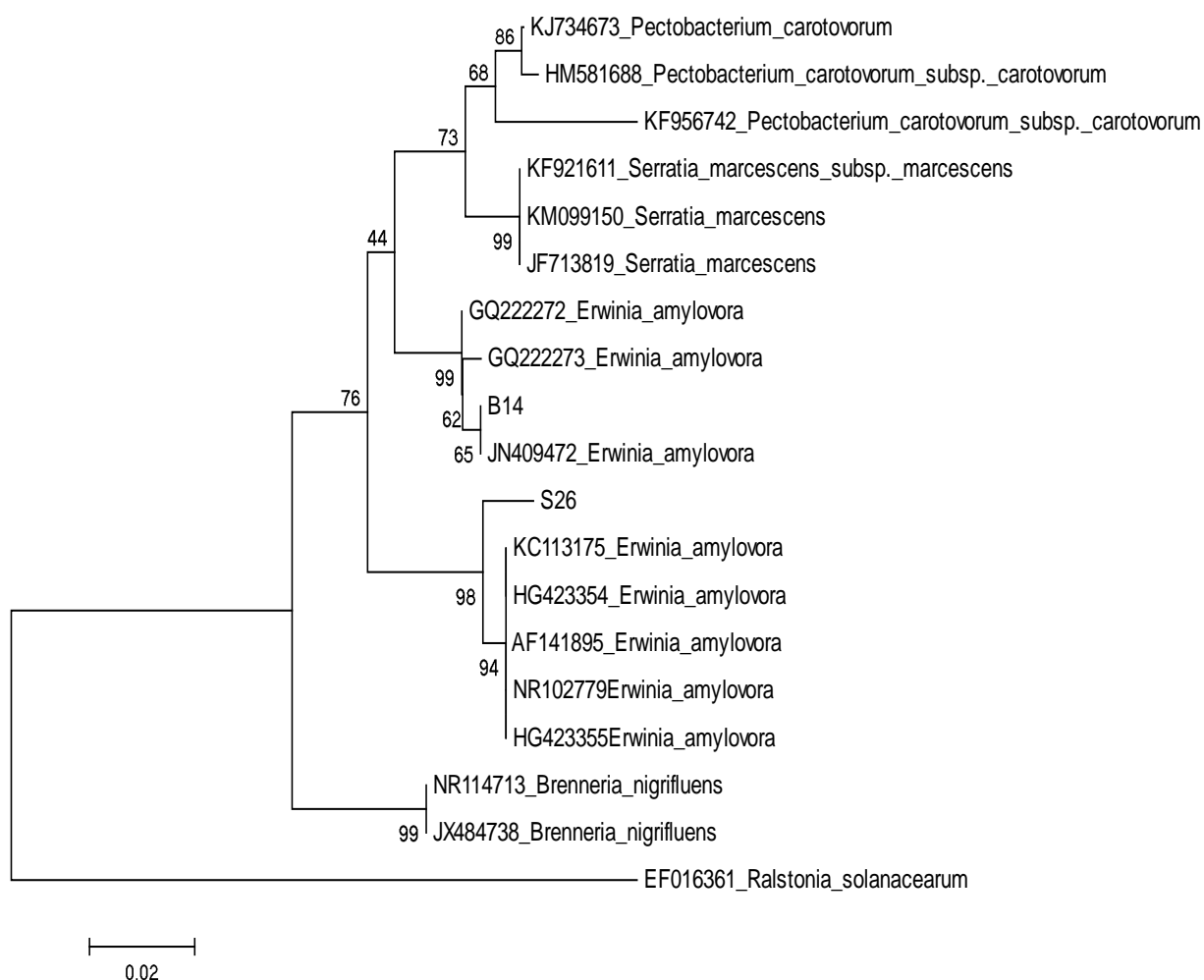
شکل ۲- گروه بندی جدایه های *E. amylovora* عامل آتشک درختان میوه در استان همدان بر اساس مثبت یا منفی بودن واکنش بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بر اساس الگوریتم UPGMA

Figure 2. *E. amylovora* grouping isolated from Hammedan province based on positive or negative biochemical and physiological reaction using UPGMA Algorithm



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی Ea71 از چپ به راست: مارکر (Standard molecular marker 100bp DNA Ladder), B31, G27, S25, S22, B20, G19, S15, B14, B11, G10, S8, S5, S1, S34, S33 (شاهد منفی) آب مقطر سترون

Figure 3. Electrophoretic profile of PCR product using Ea71 primer. From left-to-right: Standard molecular marker 100bp DNA Ladder, sample S1, S5, S8, G10, B11, B14, S15, G19, B20, S22, S25, G27, B31, S33, S34, C-sterile distilled water (negative control)



شکل ۴- دندروگرام قرابت ترادف ناحیه 16S rDNA، دو جدایه B14 و S26 با برخی از جدایه‌های خانواده

Enterobacteriaceae موجود در بانک اطلاعات NCBI

Figure 4. Dendrogram of 16S rDNA relatedness in isolates B14 and S26 along with some isolates of *Enterobacteriaceae* family available in NCBI database

تعیین تنوع ژنتیکی باکتری *E. amylovora* با استفاده از الگوی rep-PCR

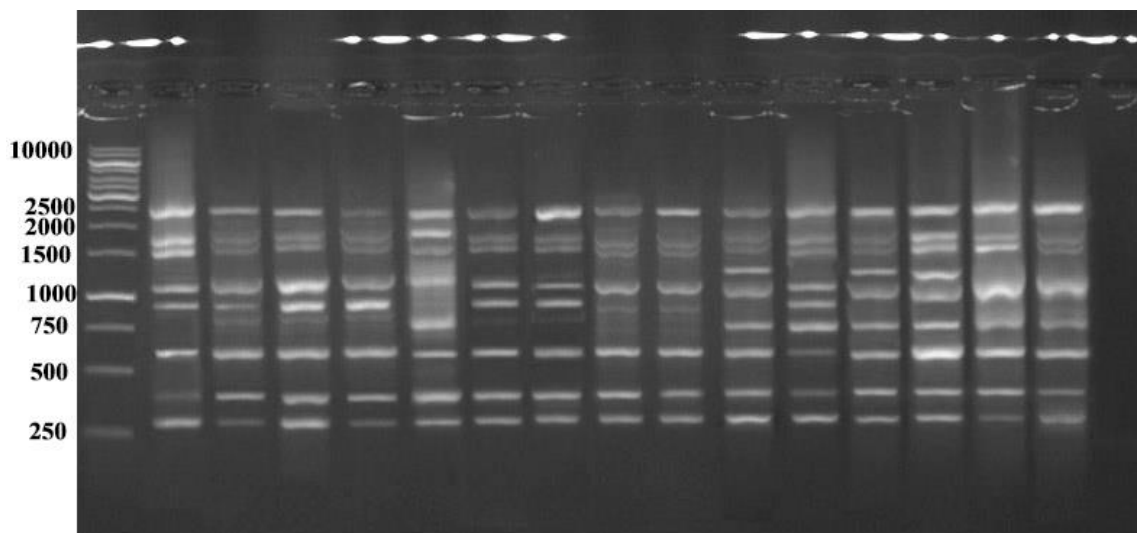
تنوع ژنتیکی ۱۵ جدایه انتخابی به‌عنوان نماینده جدایه‌ها بر اساس نتایج داده‌های فنوتیپی و همچنین پراکنش جغرافیایی با استفاده تکنیک rep-PCR و با آغازگرهای ERIC و BOX مورد مطالعه قرار گرفت. با استفاده از این آغازگرها، نقشه ژنتیکی مناسب جهت بررسی تنوع ژنتیکی به دست آمد (شکل‌های ۵ و ۶).

جدایه‌ها با استفاده از آغازگر ERIC در سطح تشابه ۷۵ درصد به چهار گروه تقسیم شدند، گروه اول جدایه‌های

جدایه‌های S1، S2، S8، B14، S1، S23 و G10، گروه دوم جدایه‌های B11 و G28، گروه سوم جدایه‌های S18، S26، B31، S34، B21 و G19 را شامل شدند (شکل ۷). با استفاده از آغازگر BOX، در سطح تشابه ۷۷ درصد به سه گروه تقسیم می‌شوند که گروه اول جدایه‌های S1، S8، S23، S2، S18، S17، B14، G19، S26 و گروه دوم جدایه‌های S2، S34، G28، B31 و گروه سوم جدایه‌های B21 را در برمی‌گیرد (شکل ۸). بر اساس

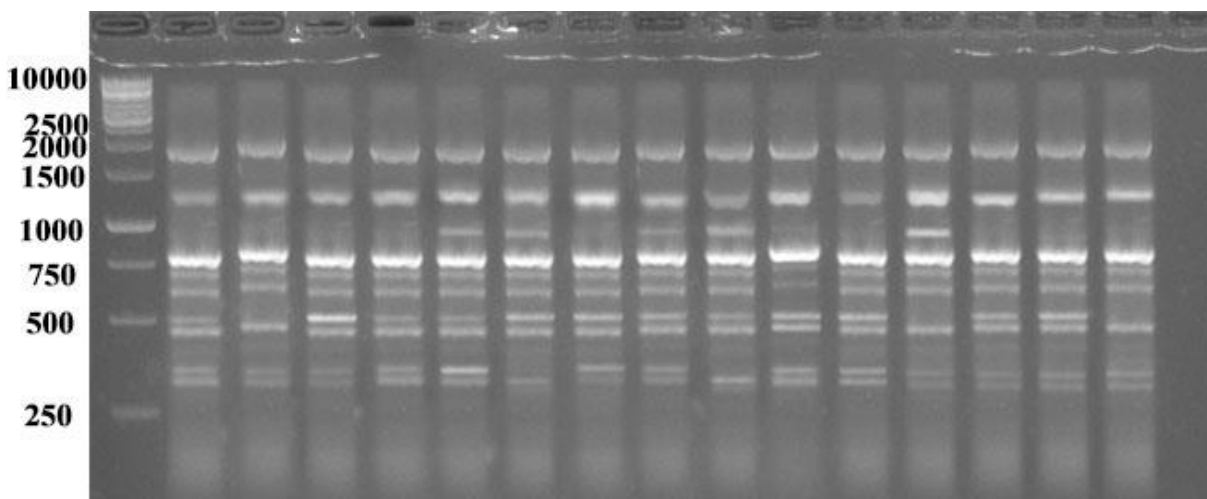
گروه دوم دو جدایه‌های S1، S2، S8، B14، S1، S23 و G10، گروه سوم جدایه‌های B11 و G28، گروه چهارم جدایه‌های S18، S26، B31، S34، B21 و G19 را شامل شدند (شکل ۷). با استفاده از آغازگر BOX، در سطح تشابه ۷۷ درصد به سه گروه تقسیم می‌شوند، گروه اول جدایه‌های S1، S8، S23، S2، S18، S17، B14، G19، S26 و گروه دوم جدایه‌های S2، S34، G28، B31 و گروه سوم جدایه‌های B21 را در برمی‌گیرد (شکل ۸). بر اساس

گروه‌بندی با استفاده از دندروگرام ترکیبی rep-PCR، جدایه‌ها در سطح تشابه ۷۷ درصد به چهار گروه تقسیم شدند. گروه اول جدایه‌های S1، G10، S17، S8، S18، B11، G19، B14، گروه دوم جدایه‌ی B21، گروه سوم جدایه‌های S2، S34، G28، B31 و گروه چهارم جدایه‌های S23 و S26 را شامل شدند (شکل ۹).



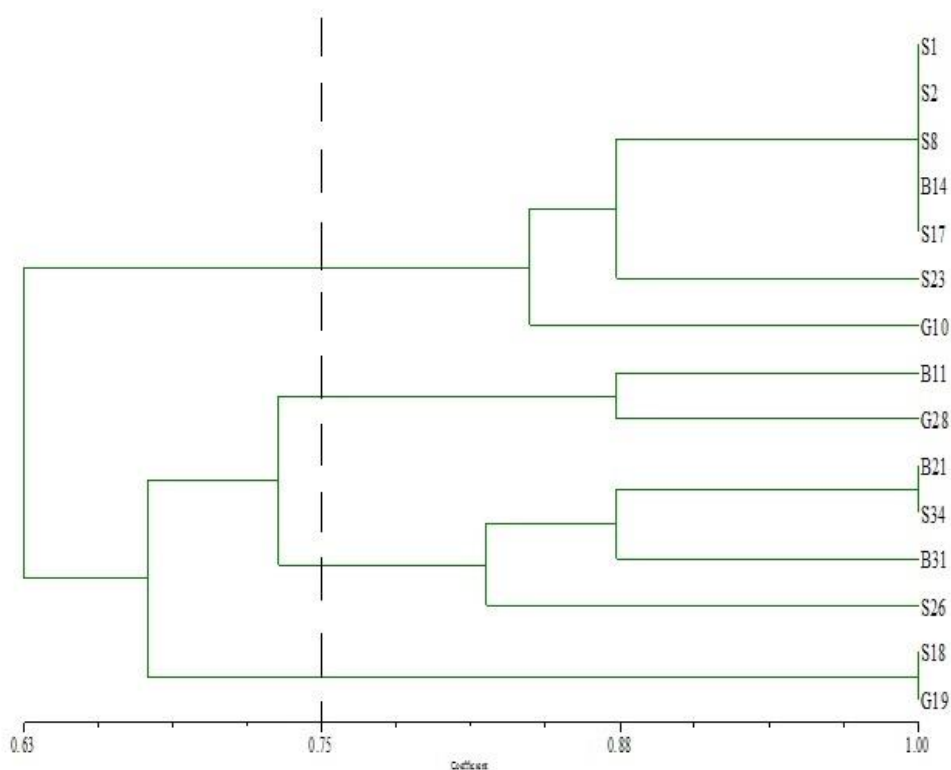
شکل ۵- نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC از چپ به راست: مارکر (Standard molecular marker 100bp DNA Ladder)، G28، S26، S23، B21، G19، S18، S17، B14، B11، G10، S8، S2، S1، آب مقطر سترون (شاهد منفی)، S34، B31

Figure 5. Electrophoretic profile of rep-PCR product using ERIC primer. From left-to-right: Standard molecular marker 100bp DNA Ladder, sample S1, S2, S8, G10, B11, B14, S17, S18, G19, B21, S23, S26, G28, B31, S34, sterile distilled water (negative control)



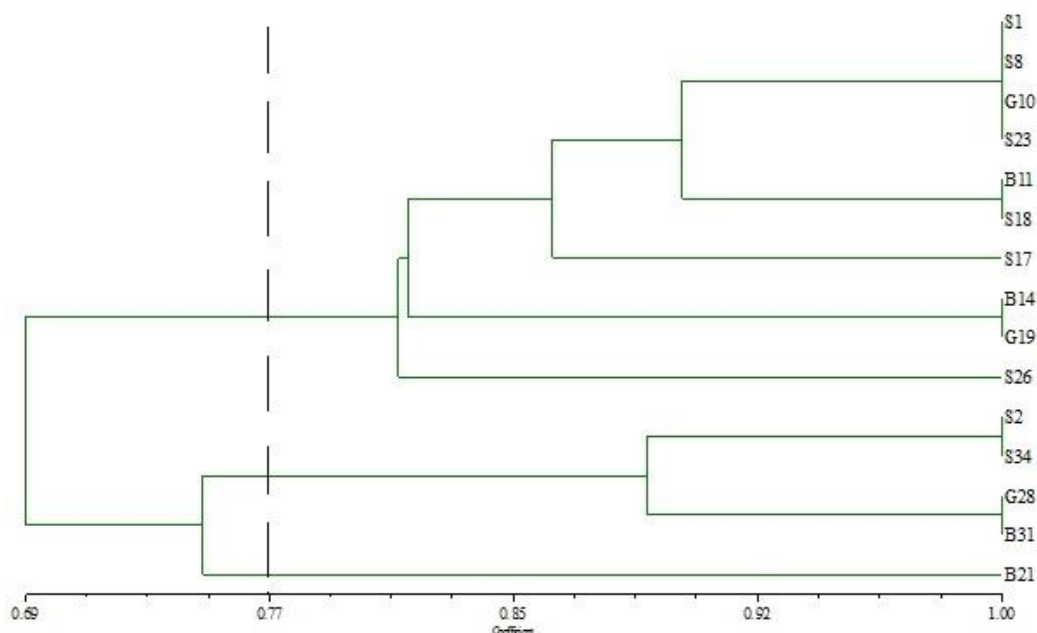
شکل ۶- نقوش الکتروفورزی محصول rep-PCR با استفاده از آغازگر BOX از چپ به راست: مارکر (Standard molecular marker 100bp DNA Ladder)، G28، S26، S23، B21، G19، S18، S17، B14، B11، G10، S8، S2، S1، آب مقطر سترون (شاهد منفی)، S34، B31

Figure 6. Electrophoretic profile of rep-PCR product using BOX primer. From left to right: Marker (Standard molecular marker 100bp DNA Ladder), sample S1, S2, S8, G10, B11, B14, S17, S18, G19, B21, S23, S26, G28, B31, S34, sterile distilled water (negative control)



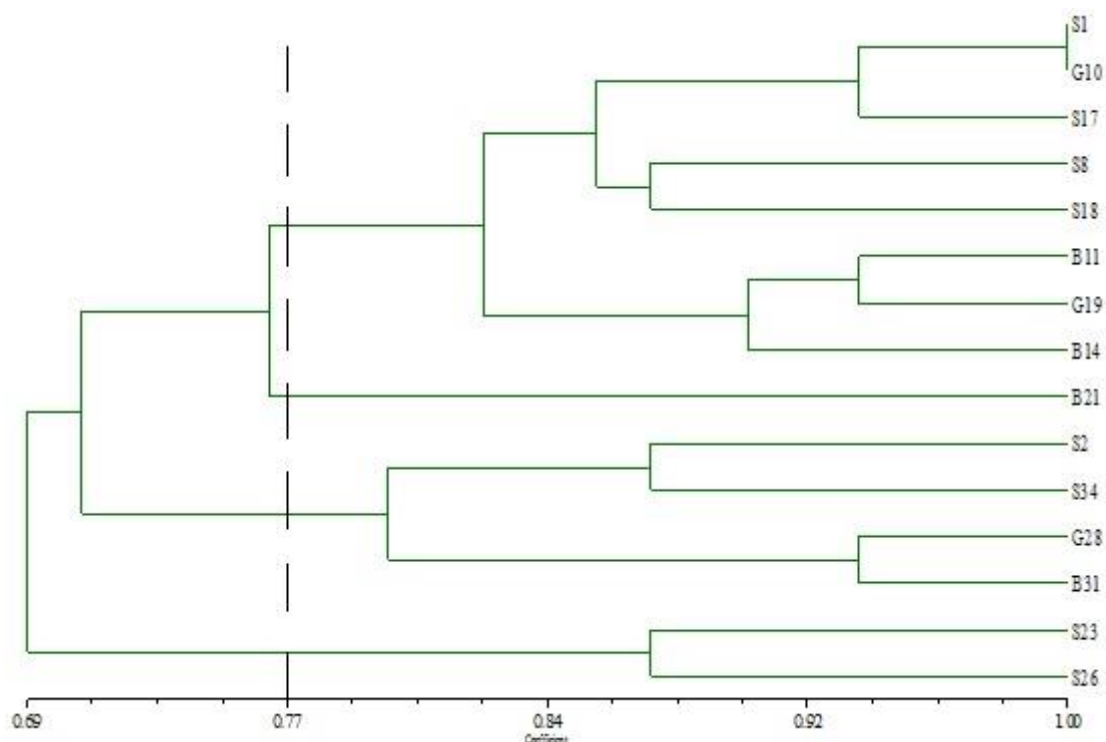
شکل ۷- دندروگرام جدایه‌های *E. amylovora* داده‌های حاصل از rep-PCR با استفاده از آغازگر ERIC و ضریب تشابه جاکارد توسط نرم‌افزار NTSYS Ver 2.02 جداشده از درختان میوه دانه‌دار در استان همدان

Figure 7. Dendrogram of *E. amylovora* isolates using rep-PCR data by ERIC primer and Jaccard similarity coefficient from different regions of Hammedan province



شکل ۸- دندروگرام داده‌های حاصل از rep-PCR با استفاده از آغازگر BOX و ضریب تشابه جاکارد توسط نرم‌افزار NTSYS Ver 2.02

Figure 8. Dendrogram of rep-PCR data using BOX primer and Jaccard similarity coefficient by NTSYS Ver 2.02 software.



شکل ۹- دندروگرام ترکیبی جدایه‌های *E. amylovora* عامل بیماری آتشک سیب و گلابی از استان همدان بر اساس آغازگرهای Box و Eric

Figure 9. Combined dendrogram of *E. amylovora* isolates based on Box and Eric primers from Hammedan province

۱۰۳ جدایه *E. amylovora* را بررسی نمودند، جدایه‌های مورد مطالعه از نظر خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی و الکتروفورز پروتئین‌ها علیرغم تفاوتشان در منشأ جغرافیایی و میزبان، کاملاً مشابه بودند. تحقیقات بیوشیمیایی دای (Dye, 1968) نیز به هموژن بودن جدایه‌های این گونه تأکید داشت. چراکه او نیز تفاوت عمده‌ای در صفات بیوشیمیایی یا مصرف کربوهیدرات در میان اعضاء گونه *E. amylovora* که همه از جدایه‌های درختان گلابی بودند، نیافت.

نتایج بسیاری از آزمون‌های غذایی، با تحقیقات انجام شده توسط هالت و همکاران (Holt et al., 1994) و افونیان و همکاران (Afunian et al., 2000) مطابقت داشت. در برخی موارد ممکن است اختلافاتی دیده شود که به دلیل توانایی مصرف کربوهیدرات توسط برخی باکتری‌های بیماری‌زای گیاه تحت تأثیر کشت‌های

بحث

طی بازدیدهای به عمل آمده از مناطق مختلف استان همدان شامل نهاوند، ملایر، همدان و تویسرکان علائم مشکوک به آتشک درختان میوه دانه‌دار با شدت‌های مختلف مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصل از آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، جدایه‌ها با ویژگی‌هایی که برای *E. amylovora* ذکر شده است، مطابقت داشت (Schaad et al., 2001). بر اساس تجزیه و تحلیل عددی ویژگی‌های فنوتیپی ۳۴ جدایه *E. amylovora* به دست آمده از میزبان‌های مختلف، گروه‌هایی با شباهت بیش از ۸۹ درصد ایجاد کردند. از آنجا که حداقل تشابه در ویژگی‌های فنوتیپی ۸۰ درصد ذکر شده و همچنین با توجه به نوع میزبان و منطقه، تنوع چندانی وجود ندارد و از یکنواختی بسیار بالایی برخوردار هستند. در تحقیقات وانتوم و همکاران (Vantomme et al., 1982) که

فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای از جمله روش‌های برآورد تنوع ژنتیکی در باکتری‌ها هستند. از آنجائی که این روش‌ها وقت‌گیر بوده و اغلب نتایج مبهمی می‌دهند. استفاده از خصوصیات مولکولی در دو دهه اخیر مورد توجه جدی قرار گرفته است. تنوع بین موجودات، حاصل دگرگونی‌های ناشی از جهش‌ها و تغییرات پیاپی ژنی می‌باشد و این تغییرات توسط نشانگرهای مولکولی قابل بررسی و تشخیص است. پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد که استرین‌های *E. amylovora* یک‌گونه هموزن را تشکیل می‌دهند (Rico et al., 2008).

از توالی‌های ERIC و BOX که آغازگرهای عمومی هستند برای تمایز استرین باکتری‌ها در سطح زیرگونه استفاده می‌شود. این روش به دلیل حساسیت بالا و سرعت بالا روش مناسب و یک ابزار آنالیز دقیق برای تفاوت جدایه‌هاست (Genersch and Otten, 2003).

در تجزیه و تحلیل اثر انگشت ژنتیکی حاصل از آغازگر ERIC جدایه‌ها ۷۵ درصد شباهت نشان دادند. این نتیجه با یافته‌های سایر محققین همخوانی دارد. نجفی پور و همکاران (Najafipour et al., 2015) با استفاده از آغازگر ERIC به این نتیجه رسیدند که جدایه‌های استان اصفهان ۷۲ درصد شباهت نشان می‌دهد. همچنین ملایی و همکاران (Molaei et al., 2010) دریافتند که جدایه‌های استان کردستان ۷۰ درصد همولوژی نشان می‌دهد. نقوش حاصل از واکنش rep-PCR با استفاده از آغازگر BOX در سطح ۷۷ درصد، جدایه‌ها را به سه گروه تقسیم کرد. نتایج به دست آمده به وسیله‌ی این آغازگر نیز نشان داد با استفاده از این روش نمی‌توان جدایه‌های مناطق و میزبان‌های مختلف را از یکدیگر متمایز کرد. این نتیجه نیز با نتایج نجفی پور و همکاران (Najafipour et al., 2015) و ملایی و همکاران (Molaei et al., 2010) همخوانی دارد. نقوش حاصل از واکنش rep-PCR با استفاده از دو آغازگر ERIC و BOX در سطح ۷۷ درصد، جدایه‌ها را به سه گروه تقسیم کرد. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل

مکرر محیط NA یا King B است. در آزمون بیماری‌زایی روی برگ‌های گلابی، تمامی جدایه‌ها هفت روز پس از تلقیح باکتری روی برگ‌های گلابی، علائم بیماری آتشک را ایجاد کردند. علائم بیماری روی برگ‌ها به صورت نکروز و سوختگی بود که از محل خراش شروع و به طرفین توسعه یافته بود. همچنین قطرات شیرابه روی برگ‌ها مشاهده گردید. این نتایج با یافته‌های یاسد و همکاران (Yassad et al., 1994) و همچنین نیک نژاد کاظم پور و همکاران (Niknejad Kazempour et al., 2007) مطابقت داشت. گسترش دانش ژنتیک علاوه بر کمک به طبقه‌بندی موجودات زنده، زمینه ایجاد روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA، برای تشخیص و شناسایی باکتری‌ها از جمله *E. amylovora* را فراهم کرده است. اختصاصی بودن و حساسیت تکنیک‌های مولکولی و ایمنوشیمیایی برای شناسایی مطمئن *E. amylovora* بررسی و مقایسه شده‌اند (Guilford et al., 1995). اکثر مطالعات در بیماری شناسی گیاهی به ویژه روش‌های مبتنی بر PCR در جهت طراحی آغازگرهای اختصاصی برای تشخیص و شناسایی بیماری‌های گیاهی است. تکنیک‌های مختلفی از PCR برای شناسایی باکتری عامل بیماری آتشک سیب و گلابی استفاده شده است (Bereswill et al., 1992). در ردیابی بیمارگر با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) از آغازگر اختصاصی Ea71 که بر مبنای DNA کروموزومی طراحی شده بود، استفاده شد. کلیه جدایه‌ها قطعه قابل انتظار ۱۸۷ جفت بازی را تکثیر نمودند. نتایج به دست آمده در روش PCR با نتایج تایلور و همکاران (Taylor et al., 2001) مطابقت داشت. تنوع در توالی DNA موجودات زنده به صورت‌های مختلفی ظاهر می‌شود. این تفاوت‌ها می‌تواند در صفات مورفولوژیکی تجلی یابد یا اینکه در پروتئین‌های موجودات (چه از نظر اندازه یا ساختار فضایی و غیره) نمود پیدا کند و یا اینکه از سطح DNA فراتر نرود. استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی،

دارای همگنی بیشتری نسبت به جدایه‌های استان همدان باشند. این امر دور از انتظار نیست، زیرا بیماری در مناطق استان فارس گسترش نیافته و تنها محدود به شهر شیراز است. یکنواخت بودن ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی در بین جدایه‌های یک گونه، به عوامل مختلفی از جمله منشأ جغرافیایی، تخصص میزبانی و دامنه میزبانی باکتری بستگی دارد. بررسی‌ها نشان داده است که جدایه‌های *E. amylovora* که از یک اقلیم مشخص جدا شده‌اند و دامنه میزبانی آن‌ها محدود به خانواده رزاسه است، به طور قابل ملاحظه‌ای همگن است. این احتمال وجود دارد که این باکتری‌ها نسبت به گونه‌هایی که دامنه میزبانی وسیع‌تر و پراکندگی جغرافیایی بیشتری دارند، فشار تکاملی کمتری را تحمل کرده باشند (Perombelon and Kelman, 1980).

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان به خاطر حمایت‌های مالی و تهیه امکانات قدردانی می‌گردد.

ژنوتیپی ناشی از rep-PCR در *E. amylovora* در استان همدان، مشخص گردید جدایه‌ها دارای یکنواختی بالایی هستند. مقایسه نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل انفرادی و ترکیبی آغازگرهای مورد استفاده در آزمون rep-PCR که در این پژوهش حاصل شده با یافته‌های نجفی پور و همکاران (Najafipour et al., 2015) و ملایی و همکاران (Molaei et al., 2010) مطابقت داشت، ولی با یافته‌های توکل باخدا و تقوی (Tavakol bakhoda and Taghavi, 2010) تفاوت‌هایی وجود داشت. در بیشتر موارد آن‌ها نشان دادند جدایه‌ها درصد تشابه بیشتری دارند. به نظر می‌رسد علت وجود اختلاف در درصد تشابه جدایه‌ها در استان همدان و فارس، جمع‌آوری آن‌ها از مناطق مختلف استان همدان باشد. این در حالی است که توکل باخدا و تقوی ۱۱ جدایه که از سطح شهر شیراز جداسازی شده بود را با استفاده از این آزمون مورد بررسی قرار دادند که تنوعی از لحاظ جغرافیایی در میان جدایه‌ها وجود نداشت. به همین دلیل جدایه‌ها در سطح بالاتری شباهت نشان دادند. علاوه بر این، ممکن است جدایه‌های استان فارس در مجموع

REFERENCES

- Abdollahi, H., and Salehi, Z. 2018. Histology of oxidative stress and generation of reactive oxygen species against progress of fire blight causal agent in pear cultivars. Seed and Plant Production Journal, 2(33): 139-162 (In Farsi with English summary).
- Aeini, M., and Taghavi, S. M. 2014. Genotypic characteristics of the causal agent of chinaberry gall. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47: 1466-1474.
- Afunian, M.R., Mohammadi, M., and Rahimian, H. 2000. Phenotypic characterization of Iranian strains Of *Erwinia amylovora*, the causal agent of fire blight disease pome trees. Iranian Journal of Agriculture Science, 31(3): 464-476 (In Farsi with English summary).
- 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.

Bonn, W.G., and Van der zwet, T. 2000. Distribution and economic importance of fire blight. In: Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*. J.L. Vanneste (ed.), CABI Publishing, Wallingford, Oxon, United Kingdom: 37-53.

Calzolari, A., Finelli, F., and Mazzoli, G. 1998. A severe unforeseen outbreak of fire blight in the Emilia-Romagna region. Pages 171-176. In: VIII International Workshop on Fire Blight 489.

Dagher, F., Olishavska, S., Philion, V., Zheng, J., and Déziel, E. 2020. Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora*. Heliyon, 6(10): 1-10.

Dye, D. 1968. A taxonomic study of the genus *Erwinia*. I. The 'amylovora' group. New Zealand Journal of Science, 11: 590-607.

Genersch, E., and Otten, C. 2003. The use of repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) for genetic subtyping of German field isolates of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*. Apidologie, 34: 195-206.

Guilford, P., Taylor, R., Clark, R., Hale, C., and Forster, R. 1995. PCR-based techniques for the detection of *Erwinia amylovora*. Pages 53-56. In: VII International Workshop on Fire Blight 411.

Gusberti, M., Klemm, U., Meier, M. S., Maurhofer, M., and Hunger-Glaser, I. 2015. Fire blight control: the struggle goes on. A comparison of different fire blight control methods in Switzerland with respect to biosafety, efficacy and durability. International Journal of Environmental Research and Public Health, 12: 11422-11447.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T., and Williams, S.T. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edn. Williams and Wilkins, Baltimore, Maryland, USA, 787 pp.

Holtappels, M., Noben, J.P., and Valcke, R. 2016. Virulence of *Erwinia amylovora*, a prevalent apple pathogen: Outer membrane proteins and type III secreted effectors increase fitness and compromise plant defenses. Proteomics, 16: 2377-2390.

Hugh, R., and Leifson, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram negative bacteria. Journal of Bacteriology, 66: 24.

Klement, Z., Fakas, G.L., and Loverkovich, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by pathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology, 54: 474-477.

Koczan, J.M., McGrath, M.J., Zhao, Y., and Sundin, G.W. 2009. Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides amylovoran and levan to biofilm formation: implications in pathogenicity. Phytopathology, 99(11): 1237-44.

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

- McManus, P. S., and Jones, A. L. 1995. Genetic fingerprinting of *Erwinia amylovora* strains isolated from tree-fruit crops and *Rubus* spp. *Phytopathology*, 85: 1547-1553.
- Mirzaee, H., Taghavi, S. M., and Aeini, M. 2015. Genotypic and Phenotypic Diversity of the Causal agent of Bacterial Blight of Walnut in Fars and Lorestan Provinces. *Agricultural Biotechnology*, 6(1): 51-58 (In Farsi with English summary).
- Mirzai, M., Aminian, H., and Roustae, A. 2012. The study of biological control of pear fire blight caused by *Erwinia amylovora* by some antagonistic bacteria. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 1: 39-47 (In Farsi with English summary).
- Moarrefzadeh, N., Mohamadi, M., Sharifitehrani, A., and Zakeri, Z. 2009. Evaluation of the effectiveness of some serological and PCR-based methods for detecting bacteria in the fire blight agent of pome fruit trees. *Iranian Journal of Plant Protection Sciences*, 40(1): 55-64 (In Farsi with English summary).
- Molaei, s., Harighi, B., and Rafipour, V. M. 2010. Investigation of phenotypic and genotypic characteristics of bud blight stains using rep-PCR technique. *National genetic and biological resource congress*. Tehran.
- Najafipour, G., Jamali, E., and Ayazpour, K. 2015. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Erwinia amylovora* in Pome Fruit Orchards in Isfahan Province. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, 4(1): 177-195.
- Niknejad Kazempour, M., Kamran, E., and Ali, B. 2007. Study of Fire Blight on Pear Trees in Guilan Province Caused by *Erwinia amylovora*. *Journal of Water and Soil Science*, 11(40): 257-265 (In Farsi with English summary).
- Norelli, J.L., Jones, A.L., and Aldwinckle, H.S. 2003. Fire blight management in the twenty-first century: using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease*, 87: 756-765.
- Perombelon, M.C., and Kelman, A. 1980. Ecology of the soft rot *Erwinia*. *Annual Review of Phytopathology*, 18: 361-387.
- Radunović, D., Gavrilović, V., Gašić, K., Paunović, M., Stojšin, V., and Grahovac, M. 2017. Molecular characterization of *Erwinia amylovora* strains originated from pome fruits and indigenous plant in montenegro. *Journal of Plant Pathology*, 99: 197-203.
- Rico, A., Führer, M. E., Ortiz-Barredo, A., and Murillo, J. 2008. Polymerase chain reaction fingerprinting of *Erwinia amylovora* has a limited phylogenetic value but allows the design of highly specific molecular markers. *Phytopathology*, 98: 260-269.
- Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chum, W. 2001. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. Third eds. American Phytopathological Society, St. Paul Minnesota, USA. 373pp.

Sulsow, T.V., Schorth, M.N., and Saka, M. 1982. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72: 917-918.

Tavakol Bakhoda, Sh., and Taghavi, M. 2010. Phenotypic and genotypic features of *Erwinia amylovora* from different hosts in Shiraz. *Iranian Plant Protection Science*, 41: 29-40 (In Farsi with English summary).

Taylor, R., Guilford, P., Clark, R., Hale, C., and Forster, R. 2001. Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29: 35-43.

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

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F.J., and Lupski, J.R. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods of Molecular and Cellular Biology*, 5: 25-40.

Yassad, C.S., Manceau, C., and Luisetti, J. 1994. Occurrence of specific reaction induced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean pods, lilac and pear plants. *Phytopathology*, 43: 528-536.

Ye, G., Hong, N., Zou, L.F. Zou H.S., Zakria, M., Wang, G.P., and Chen, G.Y. 2013. Tale-based genetic diversity of Chinese isolates of the citrus canker pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plant Disease*, 97: 1187-1194.



© 2021 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

Identification and genotypic characteristics of *Erwinia amylovora* isolates, the causal agents of fire blight on pome fruit trees in Hamadan province

M. Darvishnia^{1*}, H. Mirzaei-najafgholi², M. Aeini³ and A. Joshaghani⁴

1. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of plant protection, Faculty of agriculture, Lorestan university, Khoramabad, Iran (Mdarvishnia44@yahoo.com)
2. Assistant Professor, Department of plant protection, Faculty of agriculture, Lorestan university, Khoramabad, Iran
3. Assistant Professor, Department of plant protection, Faculty of agriculture, Sahid Chamran university of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4. M.Sc. graduate, Department of plant protection, Faculty of agriculture, Lorestan university, Khoramabad, Iran

(DOI): 10.22055/PPR.2021.16635

Received: 2 January 2021

Accepted: 16 February 2021

Abstract

Introduction

One of the most destructive diseases of pome fruit species which causes irreparable damage to gardening products worldwide is fire blight disease caused by *Erwinia amylovora*. In Iran, it was first observed in pear trees in Alborz province and then spread across fruit orchards in the country. One of the main problems in fire blight management is evaluating causal agent genotypic characteristics. Thus, the present research was conducted to characterize genotypic features of *E. amylovora* as the cause of fire blight disease in pome fruit species in Hamadan province, Iran.

Material and methods

In this study, the samples with symptoms of canker on shoots and blight blossoms were observed and collected from the orchards in Hamadan province located in the west of Iran. After isolation, the isolates were purified for further studies. Phenotypic, biochemical, and pathogenicity tests were performed due to standard bacterial criteria. Phenotypic and biochemical tests of strains were examined by Ntsys-pc 2.02 software. A total of 15 representative isolates were selected and analyzed due to the size of amplified DNA using primers Ea71 and genetic features of the rep-PCR test using primers ERIC and BOX. For more accuracy and higher reliability of the specific primers results, the 16S rDNA_ gene of two representative isolates was amplified and subjected to sequencing.

Results

Based on the biochemical, pathogenicity and molecular tests, a total of 34 isolates were identified as *E. amylovora*. Due to the numerical analysis, the data obtained by phenotypic and biochemical tests were similar at 89% level. Therefore, the isolates obtained from a specific host or region was grouped very close to each other. In the PCR tests survey, the isolates amplified 187 base pair expected fragments. The results of determining sequences indicated that both isolates were similar to *E. amylovora* showing

97% identity to the type of strains in the NCBI database. Due to data from the rep-PCR analysis, the isolates were divided into three groups at the similarity level of 77%.

Discussion

The results of genetic diversity using rep-PCR showed that there is no significant difference among *E. amylovora* bacterial isolates from different regions of Hamadan Province. Moreover, they showed high similarity to each other and placed close to each other. Our results confirm other studies regarding phenotypic characteristics of *E. amylovora*. Our results confirm that the isolates are homogenous in Hamadan province of Iran. To summary, these findings can be applied to breeding programs to better management of the bacterial disease.

Keywords: *Fire Blight, E. amylovora, Apple, Phenotype*