Evaluating the effect of the Rootstock on the Resistance of some Grafted Pear Cultivars to the Fire Blight Disease

Javad Samimi[1], Yahya Selahvarzi[* 2], Ali Tehranifar[3], Naser Beikzadeh[4]

1. Ph.D. student, Horticulture department , Ferdowsi University of Mashhad
2. Assistant professor, Horticulture department , Ferdowsi University of Mashhad (corresponding author: Selahvarzi@um.ac.ir)
3. professor, Horticulture department , Ferdowsi University of Mashhad
4. Assistant Professor of Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Areeo, Mashhad, Iran

Introduction

Pear (Pyrus communis L.) is a cold-climate fruit tree belonging to the Rosaceae family, and it is native to Western Asia and Eastern Europe. Fire blight disease is caused by the gram-negative bacterium *Erwinia amylovora*, and it is considered one of the most damaging and harmful diseases in pome fruit trees in cold and temperate regions worldwide. The most sensitive plant organ in pome fruit trees to this disease is flowers. Fire blight disease has five important stages, from initial infection to the final death of the tree trunk. These five stages include blossom blight, fruit blight, leaf blight, main branches, and trunk blight, and finally, root blight. The first and most important stage of pathogenicity in fire blight disease begins in early spring with high humidity, causing the burning and death of the flower.

Materials and methods

The Rootstock used in this experiment were Dargazi and Pyrodwarf, and the cultivars studied were Koshia and Dargazi. The experiment was conducted in two conditions, orchard and greenhouse. In the orchard, a factorial experiment was carried out in a completely randomized block design with five repetitions. The factors studied were Rootstocks (Dargazi and Pyrodwarf) and cultivars (Koshia and Dargazi). In the greenhouse, a factorial experiment was carried out in a completely randomized design with three repetitions. The factors studied were Rootstocks (Dargazi and Pyrodwarf) and cultivars (Dargazi and Kosha). Gardner scale was used to measure the severity of fire blight infection. In addition, the levels of sucrose, sorbitol, and pH in leaf tissue were measured. The sucrose content in the leaf tissue of Koshia/Pyrodwarf Rootstock increased from day 0 to 6 and reached its highest level (10%) on the 6th day, then decreased to 5% on the 12th day. In the Dargazi/Pyrodwarf base, sucrose levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (8%) on the 6th day, then decreased to 5% on the 12th day. In the Dargazi/Dargazi base, sucrose levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (7%) on the 6th day, then decreased to 4% on the 12th day. The sorbitol content in the leaf tissue of Koshia/Pyrodwarf base increased from day 0 to 6 and reached its highest level (2%) on the 6th day, then decreased to 1% on the 12th day. In the Dargazi/Pyrodwarf Rootstock, sorbitol levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (1.5%) on the 6th day, then decreased to 1% on the 12th day. In the Dargazi/Dargazi Rootstock, sorbitol levels increased from day 0 to 6 and reached its highest

level (1%) on the 6th day, then decreased to 0.5% on the 12th day. On the other hand, the pH of the leaf tissue in the Dargazi/Pyrodwarf base remained constant at 6.2 from day 0 to 12 and increased to 7.4 on the 12th day.

Results and discussion

The Rootstock used in this experiment were Dargazi and Pyrodwarf, and the cultivars studied were Koshia and Dargazi. The experiment was conducted in two conditions, orchard and greenhouse. In the orchard, a factorial experiment was carried out in a completely randomized block design with five repetitions. The factors studied were Rootstocks (Dargazi and Pyrodwarf) and cultivars (Koshia and Dargazi). In the greenhouse, a factorial experiment was carried out in a completely randomized design with three repetitions. The factors studied were Rootstocks (Dargazi and Pyrodwarf) and cultivars (Dargazi and Koshia). Gardner scale was used to measure the severity of fire blight infection. In addition, the levels of sucrose, sorbitol, and pH in leaf tissue were measured. The sucrose content in the leaf tissue of Koshia/Pyrodwarf Rootstocks increased from day 0 to 6 and reached its highest level (10%) on the 6th day, then decreased to 5% on the 12th day. In the Dargazi/Pyrodwarf Rootstock, sucrose levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (8%) on the 6th day, then decreased to 5% on the 12th day. In the Dargazi/Dargazi Rootstock, sucrose levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (7%) on the 6th day, then decreased to 4% on the 12th day. The sorbitol content in the leaf tissue of Koshia/Pyrodwarf Rootstock increased from day 0 to 6 and reached its highest level (2%) on the 6th day, then decreased to 1% on the 12th day. In the Dargazi/Pyrodwarf Rootstock, sorbitol levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (1.5%) on the 6th day, then decreased to 1% on the 12th day. In the Dargazi/Dargazi Rootstock, sorbitol levels increased from day 0 to 6 and reached its highest level (1%) on the 6th day, then decreased to 0.5% on the 12th day. On the other hand, the pH of the leaf tissue in the Dargazi/Pyrodwarf Rootstock remained constant at 6.2 from day 0 to 12 and increased to 7.4 on the 12th day. The collected data from both orchard and greenhouse experiments were analyzed to determine the effects of Rootstock and cultivar on fire blight resistance.

Conclusion

The results showed that the combination of Koshia/Dargaz had higher resistance to fire blight compared to Koshia/Pyrodwarf, and the pH and carbohydrate content in the leaf tissue of the Rootstock had an effect on the growth and proliferation of fire blight bacteria. The results of this study showed the existence of different levels of resistance to fire blight among the studied combinations, indicating sufficient potential for breeding and improving pear for resistance to this disease. The Dargazi cultivar showed very high resistance to fire blight in both orchard and greenhouse conditions. Overall, the resistance of the Dargazi Rootstock had some effect on the resistance of the sensitive Koshia cultivar

Key words: Cultivar, Fire blight disease, Gardner scale, Rootstock, USDA system

ارزیابی اثر پایه بر میزان مقاومت برخی ارقام گلابی پیوندی به بیماری آتشک

جواد صمیمی رباط [۱]، یحیی سلاح ورزی [۲*]، علی تهرانی فر [۳]، ناصر بیک زاده [۴]

چکیده

باکتری عامل بیماری آتشک (*Erwinia amylovora*) یکی از بزرگترین چالش‌ها در تولید میوه گلابی است و فقدان روش‌های کنترل موثر، بر نیاز به ارقام مقاوم به این بیماری تاکید می‌کند. بنابراین، آزمایشات تعیین سطوح حساسیت برای ایجاد برنامه‌های اصلاح نژادی که مقاومت در برابر این بیماری را تضمین کند، ضروری است. این مطالعه با هدف تعیین تاثیر پایه بر میزان مقاومت ارقام گلابی پیوندی به بیماری آتشک و بررسی اثر انتقال مقاومت یا حساسیت به بیماری از پایه‌های مقاوم به ارقام گلابی با سنجش سیستم USDA در باغات گلابی آستان قدس رضوی و باغات نیشابور با دو رقم گلابی (درگزی وکوشیا) پیوند شده بر روی دو پایه (درگزی و پیردوارف) اجرا شد، و مقیاس گاردنر نیز بر روی نهال‌های یکساله در گلخانه بررسی شد، همچنین مجموع قندهای سوربیتول ، ساکارز و pH عصاره برگی در روزهای ۰ تا ۱۸ پس از آلودگی طی چهار مرحله اندازه‌گیری شد. با القا باکتری مقدار قندها از روز ۶ تا ۱۲ پس از آلودگی در رقم و پایه کوشیا/ پیردوارف از ۳۰ به ۲۰ میلی‌گرم (۳۳ درصد کاهش قندها) ولی در رقم و پایه کوشیا/درگزی از ۳۵ به ۲۵ میلی‌گرم (۲۹ درصد کاهش قندها) و در دو رقم و پایه درگزی/درگزی و درگزی/پیردوارف ثابت ماند. در مورد pH هم، در نهال‌ها با رقم کوشیا پیوند شده روی پایه درگزی نیز این روند مشاهده شد. به این ترتیب pH در روزهای ۰، ۳، ۶ و ۱۲ به ترتیب برابر ۵/۵، ۶/۵، ۵/۳ و ۵/۲ اندازه‌گیری شد. این در حالی است که در بافت برگ‌های ارقام و پایه‌های درگزی/پیردوارف و درگزی/درگزی این مقدار بترتیب ۵/۵ و۵/۶ و این روند طی روزهای مختلف تقریبا ثابت بود. نتایج نشان داد که پایه درگزی تا حدودی اثر مقاومت خود را بر روی رقم حساس کوشیا گذاشت، به‌طوری که میزان مقاومت رقم و پایه کوشیا/درگزی بیشتر از میزان مقاومت رقم و پایه کوشیا/پیردوارف بود. بطورکلی طبق نتایج بدست آمده احتمال می‌رود که پایه مقاوم، مقاومت به بیماری آتشک را تا حدودی به ارقام حساس منتقل نموده است. بنابراین در برنامه به‌زراعی گلابی به‌منظور مقاومت به بیماری آتشک می‌توان از پایه مقاوم به بیماری آتشک استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: بیماری آتشک، پایه، رقم، سیستم USDA، مقیاس گاردنر.

مقدمه

گلابی (*Pyrus communis* L.) از درختان میوه سردسیری، و متعلق به خانواده رزاسه بوده و بومی آسیای غربی و اروپای شرقی می‌باشد (Stošić et al., 2021). بیماری آتشک توسط باکتری گرم منفی *Erwinia amylovora* ایجاد می‌شود و یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خسارت‌زا و زیان‌آور در درختان میوه دانه‌دار مناطق سردسیر و معتدله در جهان محسوب می‌شود (Choi et al., 2019; Dagher et al., 2020). حساس‌ترین اندام گیاهی درختان دانه‌دار، نسبت به این بیماری گل‌ها هستند (Mikiciński et al., 2020). بیماری آتشک دارای ۵ مرحله مهم جهت آلوده سازی اولیه تا مرگ نهایی تنه درخت می‌باشد که این پنج مرحله بترتیب شامل سوختگی شکوفه، میوه، برگ، شاخه اصلی و در نهایت مرگ کامل تنه درخت می‌شود. اولین و مهمترین مرحله بیماری‌زایی در بیماری آتشک در اوائل فصل بهار در رطوبت بالا با سوختگی و مرگ شکوفه که مهمترین منبع ورود عامل بیماری به گیاه محسوب می‌شود شروع می‌گردد، زیرا شکوفه

سرشار از مواد غذایی مورد نیاز باکتری و روزنه خوبی برای ورود عامل بیماری است به‌لیل اینکه سرتاسر کلاله پوشیده از بافت‌های کرکی است، سلول‌های واقع در پایه این کرک‌ها مایعی سرشار از مواد غذایی ترشح می‌کنند که باکتری‌های ساکن در آن‌ها از این مایع به‌عنوان غذا برای رشد استفاده می‌کنند (Jakab-Ilyefalvi et al., 2012). شناخت علل شیوع بیماری‌های باکتریایی به ویژه آن‌هایی که در درختان ایجاد بلایت، نکروز و حالت سوختگی می‌کنند بسیار ضروری به‌نظر می‌رسد (Khan et al., 2012). این بیماری بافت میوه، برگ، اندام هوایی و گل را آلوده می‌کند، که یک بیماری پیچیده است و تمام چرخه این بیماری در ارتباط نزدیک با گیاه میزبان سپری می‌شود. که قسمت‌های آلوده گیاه باعث تراوش مواد چسبناک و کهربایی حاوی باکتری از سطح آلوده می‌شود (Doolotkeldieva and Bobusheva, 2016). بیشترین خسارت بیماری در درختان گلابی و پس از آن برای سایر درختان دانه‌دار گزارش شده است (Aleksandrova and Dimitrova, 2021; Abdollahi et al., 2004; Azarabadi et al., 2017; SEIDGHASEMI et al., 2014). تعیین حساسیت پایه‌های درختی از اساسی‌ترین مراحل برای کنترل و کاهش بیماری آتشک است. چراکه به عقیده بسیاری از محققان، یکی از موثرترین و اقتصادی‌ترین روش‌های شناخته شده برای کنترل بیماری‌های گیاهی، تولید و کاشت ارقام و پایه‌های متحمل و مقاوم است. به‌همین دلیل استفاده از ارقام مقاوم در برابر آتشک ضروری به نظر می‌رسد. استفاده از ارقام مقاوم به بیماری آتشک و یا مقاوم کردن ارقام بومی که در هر منطقه کشت می‌شود است، نه تنها به طور طبیعی باعث کاهش آلودگی میکروبی در باغات می شود، بلکه هزینه سایر روش های مبارزه به بیماری را به طور وسیعی کاهش می‌دهد (Korba et al., 2008; van der Zwet and Kei, 1979). با توجه به مطالعات صورت گرفته استفاده از ارقام مقاوم یکی از مهمترین راه‌کارهای توصیه شده برای مبارزه با این بیماری می‌باشد، به همین دلیل برای ما مهم است بدانیم که آیا می‌شود از این ارقام به‌عنوان پایه جهت کنترل بیماری آتشک استفاده کرد، به‌عبارت دیگر آیا این فرض را می‌توان اثبات کرد که استفاده از این ارقام به‌عنوان پایه‌هایی که نسبت به بیماری آتشک مقاومت نسبتا خوبی نشان داده مقاومت به بیماری را به ارقام پیوند شده حساس که کیفیت میوه بالاتری دارند القا نموده و تا حد قابل قبولی از حساسیت آنها نسبت به بیماری بکاهند. یکی از روش‌های تعیین خسارت بیماری در باغات سیستم استاندارد USDA است که توسط وزارت کشاورزی ایالات متحده آمریکا (USDA) پیشنهاد و مورد اجرا قرار گرفته است (Van Der Zwet and Keil, 1979).

بر این اساس یک سیستم درجه بندی ساده برای برآورد میزان شدت آلودگی بنام سیستم گروه بندی USDA در برنامه‌های اصلاحی ارقام مختلف درختان میوه گلابی به بیمار آتشک ایجاد شده است، که این سیستم درجه بندی به‌صورت نزولی بوده و از ۱۰ تا ۱ می‌باشد. Salcedo and Matta, 2000; Vander Zevit et al., 1970; Vander (Zevit and Keli, 1979). همچنین از این روش برای ارزیابی بیماری آتشک در ارقام سیب نیز استفاده شده است، که پس از ارزیابی ۸۴ رقم سیب در ایالت میشیگان آمریکا با سیستم سنجش USDA بیان شد که بین این ارقام از لحاظ شدت بیماری اختلاف معنی‌داری وجود دارد (Thomas and Jones, 1992).

در آزمایش مشابه دیگری، و برای ارقام سیب در ایالت میشیگان با استفاده از این روش، شدت آلودگی ارقام سیب به بیماری باکتریایی آتشک مورد سنجش قرار گرفت (Jones and Thomas, 1992). برای ارزیابی و تعیین پیشرفت بیماری و شدت خسارت آلودگی بیماری در باغات گلابی در مقدونیه در خصوص بیماری آتشک با استفاده از روش USDA اثبات شد، که میزان پیشرفت اولیه علائم و همچنین میزان خسارت به هر رقمی از درختان گلابی چه میزان است. بیشترین میزان خسارت در باغات متراکم گلابی و بر روی ارقام پیوندی مشاهده شد (Ristevski and Ristevska, 1995). مقیاس گاردنر که اساس آن اندازه‌گیری درصد بخش هوایی بلایت شده نهال‌های گلابی کشت شده در گلدان است، به عنوان یکی از روش‌های متداول جهت تعیین میزان حساسیت ارقام پیوند شده به آتشک می‌باشد. بر طبق این مقیاس، درصد بخش هوایی بلایت شده نهال‌ها پس از تلقیح از طریق محاسبه بخش بلایت شده نسبت به

بخش سالم باقیمانده محاسبه و تعیین می‌شود (Şahin et al., 2020). باکتری *E. amylovora* با مصرف کربوهیدرات-ها انرژی خود را تامین می‌کند و افزایش کربوهیدرات‌ها در بافت‌های گیاهی باعث جذب بیشر این باکتری می‌شود. توانایی بیماری‌زایی در باکتری *E. amylovora* به توانایی تولید اگزوپلی‌ساکاریدهای مخصوص (Bellemann et al., 1994) جهت ایجاد واکنش فوق‌حساسیت[1] در گیاهان غیر میزبان است (Barny et al., 1990). همچنین این باکتری به متابولیسم سوربیتول در گیاهان میزبان نیز نیاز دارد (Aldridge et al., 1997). گیاهان خانواده رزاسه حاوی سوربیتول و ساکارز به‌عنوان منابعی از کربوهیدرات‌های قابل انتقال هستند (Grant and ap Rees, 1981). از سوی دیگر pH سلولی گیاه میزبان نیز روی رشد و تکثیر باکتری آتشک موثر است بطوریکه ماندگاری باکتری در محیط کشت در دامنه pH بین ۵ تا ۸/۵ ارزیابی شده است (Ark, 1973; Billing et al., 1961; Billing, 1974). با توجه به اینکه، بیماری آتشک به عنوان یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های درختان میوه دانه‌دار شناخته شده و درخت گلابی از حساس‌ترین میزبان‌های این بیماری محسوب می‌گردد، آزمایش‌های فوق با هدف بررسی تاثیر پایه بر میزان حساسیت و تغییرات بیوشیمیایی برخی ارقام گلابی به بیماری آتشک انجام شد.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

این آزمایش طی سال‌های ۱۳۹۹-۱۴۰۰ در مجموعه گلخانه‌های تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد و درختان پنج ساله باغات پایه رویشی آستان قدس رضوی مشهد و برخی از باغ‌های شهرستان نیشابور انجام شد. آزمایش در باغ بصورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک کامل تصادفی بر روی درختان شامل پایه‌های (درگزی[2] و پیردوارف[3]) و رقم (کوشیا [4]و درگزی) در پنج تکرار اجرا گردید. در گلخانه نیز آزمایشات به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با متغیرهای پایه (درگزی و پیردوارف) و ارقام گلابی (درگزی و کوشیا) در سه تکرار برای اندازه گیری مقیاس گاردنر و نمونه برداری برای آزمایشات اندازه‌گیری ساکارز، سوربیتول و pH بود. در هر تکرار یک نهال به‌صورت جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در اسفند ۱۳۹۹، نهال‌های گلابی دوساله که قبلا پیوند بر روی پایه‌های رویشی انجام شده بود ولی به منظور رشد شاخه‌های فرعی در پیوندک، نهال‌های ریشه لخت به گلدان‌های ۲۰ کیلویی حاوی مخلوطی از خاک، ماسه و خاک برگ به نسبت‌های مساوی منتقل و در شرایط گلخانه‌ای (فتوپریود معمولی، دمای ۵ ± ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۵-۷۰ درصد دارای سیستم رطوبت‌ساز و خنک کننده) نگهداری شدند. به منظور تحریک رشد شاخه‌های فرعی، کلیه نهال‌ها پس از انتقال به گلدان و قبل از آلوده‌سازی به باکتری عامل آتشک، از ارتفاع ۷۰ سانتی‌متری سربرداری شدند. دو ماه پس از انتقال، شاخه‌هایی به طول تقریبی ۴۵-۳۰ سانتی‌متر جهت تزریق در نظر گرفته شد.

بررسی میزان آلودگی باغات گلابی به آتشک براساس سیستم USDA

تحت شرایط طبیعی آلودگی برا ساس سیستم گروه‌بندی USDA تعداد چهار نوع ترکیب متفاوت شامل دو پایه درگزی (مقاوم به آتشک)، پیردوارف (نیمه مقاوم به آتشک) و دو رقم کوشیا (حساس به آتشک) و درگزی (مقاوم به آتشک)، در باغ نمونه آستان قدس رضوی و برخی از باغ‌های شهرستان نیشابور مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲).

1 Hypersensitive
2 Dargazi
3 Pyrodwarf
4 Koshia

شکل ۲–بررسی چشمی آلودگی به بیماری در برگ‌ها و شاخه‌های درختان موجود در باغات بر اساس سیستمUSDA

Figure 2- Visual examination of disease contamination in leaves and branches of trees in orchards based on the USDA system

این روش به گونه‌ای طراحی شده است که بر اساس یک درجه بندی نزولی از ۱۰ تا ۱ و به صورت براورد چشمی از خسارت می‌باشد. نحوه قرار دادن ترکیب‌های پیوندی مورد تحقیق در هر یک از گروه‌های ده‌گانه براساس شدت خسارت، آلودگی و پیشرفت بیماری در اندام‌های مختلف گیاه بر اساس (جدول ۲) انجام شد (Van Der Zwet and Keil, 1979).

جدول ۲– درجه بندی نزولی گروه‌های ۱۰ گانه شدت خسارت آتشک در سیستم USDA (Oitto et al., 1970).

Table 2- Descending grading of 10 pest intensity groups in the USDA system (Oitto et al., 1970).

گروه	تعاریف	شدت آتشک
۱۰	عدم ظهور علائم آتشک بر روی درخت	۰
۹	ظهور علائم بیماری فقط بر روی شاخه های فصل جاری	۱–۳
۸	ظهور علائم بر روی چوب های ۱تا ۲ ساله	۴–۶
۷	ظهور علائم بر روی چوب های ۳–۱ ساله و بالای ۱/۸ فوقانی درخت	۷–۱۲
۶	ظهور علائم بر روی چوب های ۳–۲ ساله و بالای ۱/۴ فوقانی درخت	۱۳–۲۵
۵	ظهور علائم بر روی چوب های ۳ ساله و بر روی ۱/۲ فوقانی درخت	۲۶–۵۰
۴	ظهور علائم بر روی چوب های پیرتر و پایین ۱/۲ تحتانی درخت	۵۱–۷۵
۳	ظهور علائم بر روی چوب های پیرتر و پایین ۱/۴ تحتانی درخت	۷۶–۸۸
۲	ظهور علائم روی تنه درخت	۸۹–۹۹
۱	مرگ کامل درخت	۱۰۰

بعد از تعیین درجه‌بندی نزولی ۱۰گانه ، میانگین اعداد که شدت آلودگی آتشک را تعیین می‌کند، بر اساس سیستم نمره‌دهی پنجگانه GRIN[5] (جدول ۳) به یک درجه‌بندی و یا نمره تبدیل شده که براساس آن می‌توان درختان را در گروه‌های مختلف جای‌گذاری نمود (Thomas and Jones, 1992). تحت شرایط آلودگی با استفاده از سیستم آلودگی USDA در باغات مزرعه نمونه آستان قدس رضوی مشهد و باغات نیشابور تعداد دو رقم گلابی حساس کوشیا و مقاوم درگزی که هر دو بر روی پایه‌های نیمه‌حساس پیردوارف و مقاوم درگزی پیوند شده بررسی شدند.

جدول۳– سیستم نمره‌دهی پنج گانه GRIN و گروه‌های واکنش در مقابل بیماری آتشک(Thomas and Jones, 1992).

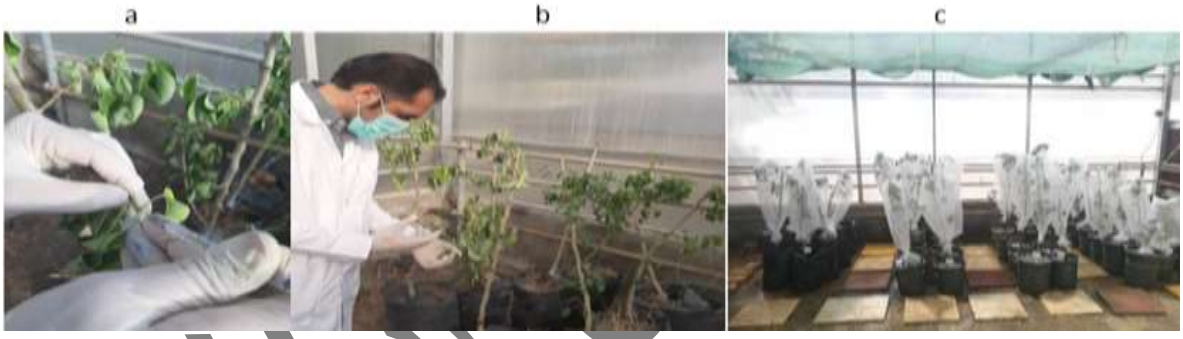
Table 3- GRIN five scoring system and reaction groups against fire blight disease (Thomas and Jones, 1992).

میانگین گروه شدت آلودگی	کد GRIN	مفهوم (گروه)
۹/۸–۱۰	۱	خیلی مقاوم
۸/۵–۹/۷	۲	نیمه مقاوم
۶/۶–۴/۸	۳	حد واسط
۵/۱–۶/۵	۴	نیمه حساس
۰–۵	۵	خیلی حساس

[5] Germplasm resources information network

تزریق عامل بیماری و نمونه‌گیری

باکتری مولد بیماری آتشک (*E. amylovora*) از مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه شد. به منظور آماده سازی مایه تلقیح مورد نیاز، از کشت‌های شب‌گذران[6] باکتری در محیط کشت لوریا برتانی براث[7] با کدورت (OD[8]) حدود ۲۰ در دمای ۲±۲۴ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. غلظت بهینه مایه باکتری با توجه به حداقل احتمال فرار (کمترین غلظت مورد نیاز باکتری که برای ایجاد بیماری‌زایی مناسب است) از بیماری در سر شاخه‌ها بر اساس گزارشات تعیین شد (Sahin et al., 2020). به این ترتیب مایه باکتری به میزان یک میلی‌لیتر به ازای هر سرشاخه و با قراردادن دست و پنبه در زیر سر سرنگ به منظور جلوگیری از جاری شدن باکتری در طول شاخه تزریق شد (شکل ۱- (a ,b)). بلافاصله پس از تزریق باکتری، آب‌پاشی سرشاخه‌ها با مه‌پاش حاوی آب مقطر انجام و کف گلخانه به مدت یک ماه در طول روز مرطوب نگه داشته شد. همچنین جهت حفظ بهتر رطوبت نایلون‌های پانچ شده در اطراف هر نهال پیچیده شد. رطوبت هوای گلخانه در گرم‌ترین ساعات روز حداقل ۸۰ در صد جهت انتقال و گسترش بیماری در گیاه بود که نهال را مستعد پذیرش باکتری می‌کرد. دمای گلخانه و خصوصاً دمای سطح برگ‌ها با استفاده از آبپاشی متراکم در اواسط روز در محدوده ۳۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. به منظور اطمینان از آلودگی شاخه‌ها، تزریق مجدد آنها ۱۲ ساعت بعد از اولین تزریق تکرار شد (شکل ۱-(c)).



شکل ۱- (a ,b) روش تزریق عامل بیماریزا، (c) شرایط نگهداری نهال‌ها و ایجاد بیماری به گیاهان در گلخانه با حفظ رطوبت

Figure 1- (a,b) The method of injecting the pathogen, *Erwinia amylovora* (c) The conditions of maintaining seedlings and inducing disease to the plants in the greenhouse and maintaining the humidity

اندازه‌گیری درصد شاخه‌های دارای علائم سوختگی در نهال‌های گلخانه

میزان حساسیت در ارقام با استفاده از درصد بلایت در بخش هوایی طبق جدول ۱ تعیین شد. طبق این روش پس از تزریق عامل بیماری‌زا به گیاهان در صد شاخه‌ها و بخش‌های هوایی بلایت شده برای هر نهال کشت شده در گلخانه طی روزهای صفر تا هجدهم اندازه‌گیری شد.

جدول ۱- مقیاس گاردنر برای تعیین میزان حساسیت به بلایت (Şahin et al., 2020).

Table 1- Gardner's scale for determining blight sensitivity (Şahin et al., 2020).

سطح حساسیت	درصد بلایت در بخش هوایی
بسیار مقاوم	۰-۱۰
مقاوم	۱۱-۳۰
نسبتاً حساس	۳۱-۵۰
حساس	۵۱-۹۰
بسیارحساس	۹۱-۱۰۰

[6] Overnight
[7] Luria-Bertani medium
8 Optical density

اندازه‌گیری میزان ساکارز بافت برگ نهال‌های گلخانه‌ای

برای اندازه گیری این قند از معرف آنترون استفاده شد، که ۰/۱ گرم بافت برگ با ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط و سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن ، به پنج میلی لیتر معرف آنترون ا ضافه شد. پس از آن نمونه یاد شده به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در نهایت مقدار جذب نور آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت شد (Miller, 1959).

اندازه گیری مقدار کمی و کیفی سوربیتول بافت برگ نهال‌های گلخانه‌ای

در این روش ابتدا مقداری از بافت برگ نهال‌های مورد نظر، در لوله یک و نیم میلی‌لیتری لیتری ریخته شد. پس از انجام سانتریفیوژ به منظور رسوب سلول‌ها، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی را با ۴۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این مخلوط با یک میلی لیتر سدیم متاپریودات که در اسیدکلریدریک حل شده، مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. سپس دو میلی لیتر رامنوز به آن اضافه شد. مخلوط یاد شده به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری با دمای ۵۳ درجه سانتیگراد نگهداری شد. پس از سرد کردن، مقدار سوربیتول تولید شده در طول موج ۴۱۲ نانومتر اندازه گیری شد (Bok et al., 1977).

سنجش pH بافت برگ نهال‌های گلخانه

میزان تغییرات pH بر میزان تکثیر باکتری در محیط کشت و بافت‌های باکتری تاثیر گذار است، بطوری‌که تغییر pH بافت در محیط کشت باکتری و همچنین سلول باعث تغییر میزان فعالیت در سلول‌های باکتری می شود و این تغییرات باعث کمتر یا بیشتر شدن فعالیت باکتری در محیط اطراف خود می‌گردد. به‌منظور تعیین میزان pH بافت ها ابتدا از روز صفر تا ۱۲ پس از آلودگی مقدار برگ‌های تزریق شده عامل بیماری‌زا به نهال‌ها در گلخانه جمع‌آوری شد و بعد از عصاره گیری از برگ‌ها بو سیله د ستگاه pH متر دیجیتالی میزان pH بافت‌های نمونه‌گیری شده اندازه‌گیری شد. زیرا اندازه‌گیری pH تفاوت در رشد باکتری در محیط‌هایی با اسیدیته مختلف را نمایان می‌کند (Shrestha et al., 2005).

نتایج و بحث

سیستم گروه‌بندی USDA

طبق نتایج جدول تجزیه واریانس جدول ۴ اثرات ساده و متقابل رقم و پایه بر شدت آلودگی ایجاد شده در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار شد. در اوائل و اواسط و اواخر تابستان پس از پایان پیشرفت علائم بیماری و شانکرها روی ارقام و پایه‌های مختلف درختان شدت آلودگی در درختان بر اساس جدول ۲ مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از جدول ۵ رقم و پایه کوشیا/درگزی (با میانگین ۸/۶) میزان مقاومت بیشتری را نسبت به رقم و پایه کوشیا/پیردوارف (با میانگین ۲/۵) نشان داد. همچنین بین رقم و پایه درگزی/پیردوارف (با میانگین ۹/۸) و درگزی/درگزی (با میانگین ۱۰) اختلاف معنی‌داری نداشت. بر اساس کد گرین جدول ۵ رقم و پایه کوشیا/پیردوارف نیمه حساس، کوشیا/درگزی نیمه مقاوم و ارقام و پایه‌های درگزی/پیردوارف و درگزی/درگزی خیلی مقاوم نسبت به بیماری آتشک دسته‌بندی شدند. رقم درگزی رقمی مقاوم به بیماری آتشک است و روی هر پایه‌ایی مقاومت خود را حفظ می‌کند حال آنکه اگر به‌عنوان پایه استفاده شود می‌تواند تا حدودی این مقاومت را به رقم حساس کوشیا منتقل کند. در پژوهش های مشابه در مقدونیه و ایالت میشیگان آمریکا نیز وجود چنین اختلاف معنی‌داری در بررسی باغات به این روش نسبت به مقاومت به آتشک در ارقام مورد آزمایش گزارش شده است (Ristevski and Ristevska, 1996; Thomas and Jones, 1992).

جدول ۴- میانگین مربعات اثر پایه‌های متفاوت بر شدت آلودگی دو رقم گلابی

Table 4- The mean square effect of different rootstocks on the intensity of contamination of two pear cultivars

منابع تغییرات	درجه آزادی	شدت آلودگی
بلوک	۴	۰/۰۰۶^{ns}
رقم	۱	۱۶/۲۰**
پایه	۱	۴۵**
رقم ×پایه	۱	۱۲/۸۰**
خطای آزمایش	۱۶	۰/۲۹

اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱%

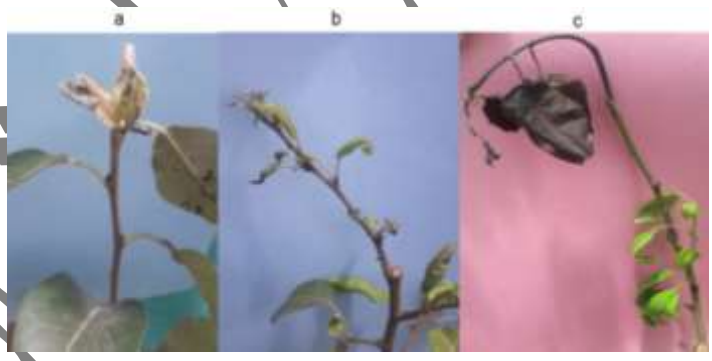
جدول ۵- میانگین شدت آلودگی ارقام پیوندی گلابی در سیستم USDA

Table 5- The average intensity of contamination of grafted pear cultivars in the USDA system

رقم/پایه	میانگین گروه شدت آلودگی	کد GRIN	مفهوم گروه بر اساس کد GRIN
کوشیا/پیردوارف	۲/۵c	۴	نیمه حساس
کوشیا/درگزی	۸/۶b	۲	نیمه مقاوم
درگزی/پیردوارف	۹/۸a	۱	خیلی مقاوم
درگزی/درگزی	۱۰a	۱	خیلی مقاوم

اندازه‌گیری مقدار حساسیت (درصد بلایت شده)

بعد از مایه‌زنی باکتری، بروز علائم آلودگی در سرشاخه‌ها بیانگر موفقیت آمیز بودن آلوده‌سازی سرشاخه‌ها بود. علائم بیماری مانند نکروز و بافت پژمرده در برگ‌ها و نوک ساقه م شاهده شد. نهال‌ها سه روز پس از تلقیح قهوه‌ای شدند و آلودگی به سرعت از طریق شاخه‌ها، گره‌ها و دمبرگ‌ها به تمام رگبرگ‌های برگ پیشرفت کرد. بر همین اساس در شاخه‌هایی که تزریق باکتری صورت گرفته بود میزان پیشرفت بیماری در هر شاخه نسبت به طول کل شاخه اندازه گیری شد (شکل ۳).



شکل ۳-علائم اولیه و نهایی بیماری در سرشاخه‌های درخت. (a) تغییر رنگ اولیه، (b) قهوه‌ای شدن، (c) بلایت کامل

Figure 3- Initial and final symptoms of the disease in tree branches. (a) initial discoloration, (b) browning, (c) complete blight.

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که اثرات ساده و متقابل ترکیب‌های پیوندی و زمان در سطح احتمال۱٪ معنی‌دار شد (جدول۶). به این ترتیب علائم بیماری آتشک در رقم و پایه درگزی/درگزی حتی ۱۸ روز پس از تلقیح آلودگی بر روی سرشاخه‌ها مشاهده نشد. اولین علائم آلودگی در روز سوم در رقم کوشیا (بر روی هر دو پایه درگزی و پیردوارف) شناسایی شد (۱۰٪بلایت). در رقم و پایه درگزی/پیرودوارف، علائم بسیار کمی از آلودگی در روز ششم (۱۰٪ بلایت) ظاهر شد و این میزان تا روز هجدهم پس از آلودگی ثابت ماند. بیشترین میزان آلودگی در رقم و پایه کوشیا/پیردوارف در روز هجدهم (۵۰٪ بلایت) است (جدول ۷). بطور کلی در مقیاس گاردنر طول شاخه‌های بلایت شده (SLB[9]) نسبت به

[9] Shoot length blighted

طول کل شاخه در نهال‌هایی که به باکتری آتشک آلوده شده میزان حساسیت یا مقاومت آنها را در برابر آتشک را مشخص می‌کند، که هر چه درصد بلایت در شاخه‌ها بیشتر باشد میزان مقاومت آن نسبت به بیماری آتشک کمتر در نظر گرفته می‌شود و درجه‌بندی آنها را از حساس تا مقاوم مورد بررسی قرار می‌دهد از همین رو استفاده از پایه‌ها و میان‌پایه‌های مقاوم بصورت تجربی را برای مقاومت به بیماری مورد تاکید قرار می‌دهد (Layne and Quamme 1975; Kellerhals et al. 2012; Şahin and Mısırlı 2016; Evrenosoğlu et al. 2019; Şahin et al. 2019).

جدول ۶- میانگین مربعات اثر پایه‌ها و ارقام متفاوت بر درصد بلایت در چهار مرحله زمانی پس از آلودگی

Table 6- The mean square effect of different bases and cultivars on blight percentage in four time stages after contamination

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
ترکیبات پیوندی	۳	۲۶۴۲**
زمان	۳	۸۴۲**
ترکیبات پیوندی ×زمان	۹	۲۵۸**
خطا	۳۲	۴۰/۶۲

اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۱%

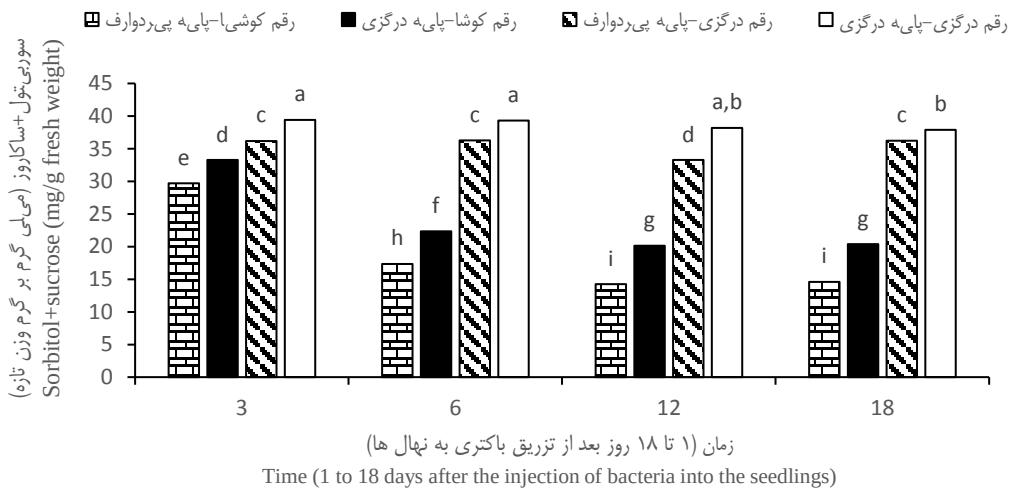
جدول۷-مقایسه میانگین برهم‌کنش ترکیب‌های پیوندی گلابی در مراحل زمانی متفاوت بر درصد بلایت

Table 7-Comparison of the average interaction of grafted pear compounds in different time stages on blight percentage blight

ترکیبات پیوندی	روز نمونه‌برداری			
	۳	۶	۱۲	۱۸
کوشیا/پیردوارف	۱۰ cd	۲۰ bc	۵۰ a	۵۰ a
کوشیا/درگزی	۱۰ cd	۲۵ b	۳۰ b	۳۰ b
درگزی/پیردوارف	۰ d	۱۰ cd	۱۰cd	۱۰ cd
درگزی/درگزی	۰ d	۰ d	۰ d	۰ d

مجموع قندهای ساکارز و سوربیتول

مقدار این قندها در رقم درگزی پیوندی مقاوم تا روز دوازدهم بعد از القای باکتری به‌طور جزئی کاهش یافت، میزان این قندها در رقم و پایه کوشیا/پیردوارف با شدت پیشرفت باکتری در بافت‌ها و مصرف قندها از روز ششم تا دوازدهم از۳۰ میلی‌گرم به ۲۰ میلی‌گرم کاهش یافت اما در رقم و پایه درگزی/درگزی بدلیل عدم نفوذ باکتری به گیاه بدلیل مقاومت ساختاری و بیوشیمیایی که در این رقم در برابر این بیماری دارد میزان قندها ثابت ماند. این قندها در مورد رقم و پایه کوشیا/درگزی در مقابل رقم و پایه کوشیا/پیردوارف از ابتدا بیشتر بود که با گذشت زمان از روز ششم به بعد در هردو رقم و پایه‌ها کاهش یافت (شکل ۴).



شکل ۴-مجموع قندهای ساکارز + سوربیتول (میلی گرم بر وزن تر تازه) ترکیب‌های مختلف پیوندی طی زمان
Figure 4-Total sugars of sucrose + sorbitol (mg/fresh weight) of different grafted compounds over time

در پژوهش‌های متفاوت لزوم استفاده از قندهای سوربیتول و ساکارز برای باکتری عامل آتشک در گیاهان مختلف اثبات شده است. باکتری عامل آتشک به قند نیاز دارد زیرا قندهای موجود در گیاه را مصرف و اگزوپلی‌ساکاریدی جهت تولید بیوفیلم[10](اجتماع باکتری در یک محیط) ایجاد می‌کند (Piqué et al., 2015). باکتری آتشک در بافت گیاه هم از ساکارز و هم از سوربیتول به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کند و در محیط کشت آگار با ۴۰ درصد ساکارز بخوبی رشد و گسترش پیدا می‌کند (Gross et al., 1992). همچنین بیماری‌زایی باکتری عامل آتشک به تولید اگزوپلی ساکارید آمیلووران بستگی دارد (Bernard et al., 1993; Bellemann and Geider, 1992).

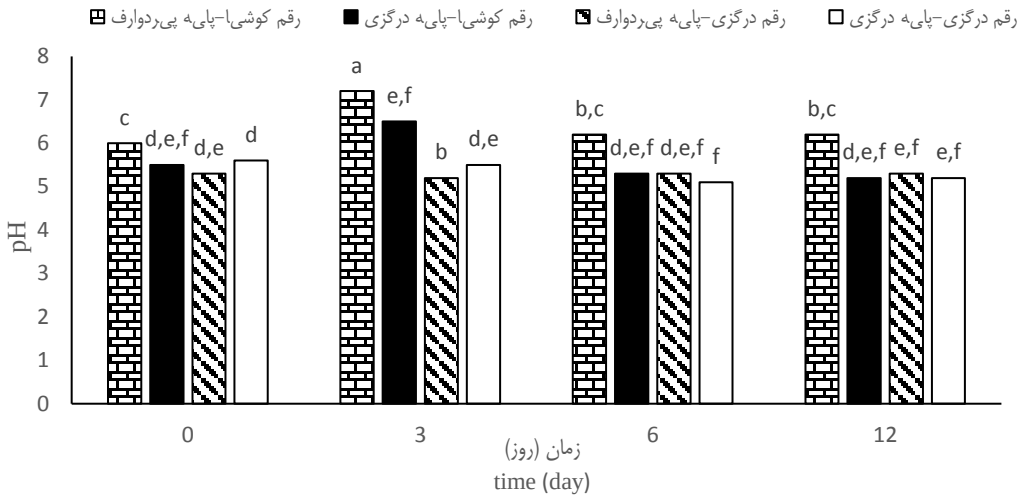
گیاهان خانواده رزاسه حاوی سوربیتول و ساکارز به‌عنوان منابعی از کربوهیدرات‌های انتقالی و ذخیره‌ایی مورد استفاده در سلول هستند (Grant and Rees, 1981). باکتری عامل آتشک می‌تواند گلوکز را از ساکارز آزاد کند (Gross et al., 1992). توانایی متفاوت برای متابولسیم ساکارز و سوربیتول موجود در سلول‌های گیاهی برای باکتری در سلول میزبان در میزان بیماری‌زایی باکتری عامل آتشک در سیب و گلابی تاثیرگذار است، بطوری‌که باکتری با مصرف این کربوهیدرات-ها به رشد خود در محیط داخل بافت گیاهان ادامه می‌دهد (Barny et al., 1990; Willis et al., 1991). به‌همین دلیل در بافت گیاه با نفوذ باکتری به داخل بافت‌ها مخصوصا در رقم و پایه کوشیا/درگزی و رقم و پایه کوشیا/پیردوارف با مصرف این قندها توسط باکتری با گذشت زمان میزان آن رو به کاهش گذاشته تا به ثبات برسد. اما تفاوت معنی‌داری در میزان کاهش در دو پایه مختلف با ارقام یکسان دیده می‌شود که نشان دهنده تاثیر پایه بر مقاومت ارقام می‌باشد.

اندازه گیری pH بافت گیاه

pH بافت برگ رقم کوشیای پیوند شده روی پایه پیردوارف از روز صفر تا دوازدهم ثابت نبوده بطوری که در روز سوم از ۶ به ۷/۲ رسید و در روزهای ششم و دوازدهم روی ۶/۲ ثابت ماند. در رقم و پایه کوشیا/درگزی نیز این روند مشاهده شد. به این ترتیب pH در روزهای ۰، ۳، ۶ و ۱۲ به ترتیب برابر ۵/۵، ۶/۵، ۵/۳ و ۵/۲ اندازه‌گیری شد. این در حالی است که در بافت برگ‌های رقم و پایه‌های درگزی/پیردوارف و درگزی/درگزی این روند تقریبا ثابت و بین ۵ تا ۵/۵ بوده است. این تفاوت در اسیدیته بافت‌ها می تواند ناشی از حساسیت بالاتر باشد به این دلیل که در بافت‌های حساس‌تر به باکتری با زخمی شدن و از بین رفتن سلول‌های آنها بدلیل مرگ برنامه ریزی سلول[11] که طی آن سلول‌های سالم برای جلوگیری

[10] Biofilm
[11] Apoptosis

از پیشرفت بیماری خود را نابود می‌کنند، و برای مقابله با باکتری میزان pH بافت‌ها مقداری تغییر می‌کند. ولی این تغییرات در بافت‌های حساس پیوند شده بر روی پایه مقاوم در مقایسه با بافت‌های حساس پیوند شده بر روی پایه نیمه حساس کمتر مشاهده شد (شکل ۵).



شکل ۵–تغییرات pH بافت‌های برگ ترکیب‌های مختلف پیوندی نسبت به زمان

Figure 5- pH changes of leaf tissues of different grafting compounds with respect to time

همه سلول‌های گیاهی پروتون‌ها را از داخل سلول و از طریق غشا به فضای بین سلولی منتقل می‌کنند. این شیب بار الکتریکی انرژی لازم را برای املاح برای ورود به سلول‌هاست (Heldt, 1997). در بیشتر گیاهان، فعالیت پمپ غشاء H+-ATPase در سیتوپلاسم pH را بین ۷/۳–۷/۶ و pH آپوپلاست را حدود ۵/۵ تنظیم می‌کند (Kurkdjian and Geum, 1989). با نفوذ پروتین هارپین باکتری *E. amylovora* به داخل غشا سلول باعث نشت پتاسیم به خارج سلول، پراکسیداسیون لیپیدها و همچنین از کار افتادن پمپ‌های سطح غشا و قلیایی شدن محیط آن می‌شود (Brisset and Paulin, 1992). بر این اساس در سلول‌های گیاهی آلوده شده توسط *E. amylovora* نشت الکترولیت‌ها و سایر مواد آلی از داخل سلول به محیط بین سلولی و متعاقب آن تغییرات pH رخ می‌دهد که البته این تغییرات در سلول‌های غیر مقاوم و ناسازگار بیشتر است (Vanneste, 1995).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که بین ترکیب‌های پیوندی مطالعه شده درجات مختلفی از مقاومت به بیماری آتشک وجود دارد که بیانگر وجود پتانسیل کافی برای برنامه به‌نژادی و به‌زراعی گلابی جهت مقاومت به این بیماری است. رقم درگزی هم در شرایط باغی و هم گلخانه‌ایی درجه بسیار بالایی از مقاومت را نسبت به بیماری آتشک دارد. به‌طور کلی پایه مقاوم درگزی تا حدودی اثر مقاومت خود را بر روی رقم کوشیا حساس می‌گذارد به‌طوری که میزان مقاومت ترکیب پیوندی کوشیا/درگزی بیشتر از میزان مقاومت ترکیب پیوندی کوشیا/پیردوارف است. البته ذکر این نکته ضروری است که تکرار این آزمایشات در طی سالیان مختلف با رطوبت متفاوت که عامل اصلی همه‌گیری بیماری است باعث بدست آمدن نتایج دقیق‌تر اثر پایه بر میزان مقاومت پیوندک به بیماری آتشک است. این مقاومت به‌صورت بیوشیمیایی در بافت نهال اعمال می‌شود. اما چیزی که در این آزمایش پر واضح است اثر مستقیم پایه مقاوم بر مقاومت رقم به بیماری آتشک است. رقم درگزی اغلب در شمال شرق کشور کشت می‌گردد، اما از نظر کیفیت میوه مطلوبیت زیادی ندارد و

عمدتا از بذر آن جهت تولید پایه بذری برای ســایر ارقام گلابی اســتفاده می‌شــود. همچنین در برنامه‌های به‌نژادی و به‌زراعی گلابی، رقم درگزی می‌تواند به‌عنوان یک والد برای انتقال ژن مقاومت به بیماری مورد استفاده قرار بگیرد.

منابع

Abdollahi, H., Rugini, E., Ruzzi, M., & Muleo, R. (2004). In vitro system for studying the interaction between *Erwinia amylovora* and genotypes of pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79(2), 203-212. https://doi.org/10.1007/s11240-004-0661-0

Aldridge, P., Metzger, M., & Geider. K. (1997). Genetics of sorbitol metabolism in *Erwinia amylovora* and its influence on bacterial virulence. *Molecular Genetics and Genomics* 256,611–619. https://doi.org/10.1007/s004380050609

Aleksandrova, D., & Dimitrova, N. (2021). The reaction of pear cultivars grafted on pear and quince rootstocks after artificial inoculation of *Erwinia amylovora*. *In IV International Symposium on Horticulture in Europe-SHE2021* 1327 (pp. 321-328). https://doi.org/10.17660/actahortic.2021.1327.43

Ark, P.A. (1973). Variability in the fire blight organism *Erwiniya amylovora*. *Phytopathology* 27: 1-28.

Azarabadi, S., Abdollahi, H., Torabi, M., Salehi, Z., & Nasiri, J. (2017). ROS generation, oxidative burst and dynamic expression profiles of ROS-scavenging enzymes of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and ascorbate peroxidase (APX) in response to *Erwinia amylovora* in pear (*Pyrus communis* L). *European Journal of Plant Pathology* 147(2), 279-294. https://doi.org/10.1007/s10658-016-1000-0

Barny, M. A., Guinebretiere, M. H., Marcais, B., Coissac, E., Paulin, J. P. , & Laurent, J. (1990). Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP1430 virulence. *Molecular Microbiology* 4:777–786. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1990.tb00648.x

Bellemann, P., Bereswill, S., Berger, S., & Geider, K. (1994). Visualization of capsule formation by *Erwinia amylovora* and assays to determine amylovoran synthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 16:290–296. https://doi.org/10.1016/0141-8130(94)90058-2

Bellemann, P., & Geider, K. (1992). Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *The Journal of General Microbiology* 138:931–940. https://doi.org/10.1099/00221287-138-5-931

Bernhard, F., Coplin, D. L,. & Geider, K. (1993). A gene cluster for amylovoran synthesis in *Erwinia amylovora*: characterization and relationship to cps genes in *Erwinia stewartii*. *Molecular Genetics and Genomics* 239:158–168. https://doi.org/10.1007/bf00281614

Billing, E. (1974). The effect of temperature on the fire blight pathogene, *Erwiniya amylovora*. *JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY*37:643-648.

Billing, E. Baker, L. A. E., Cross, J. E., & Garret, C. M. E. (1961). Characteristics of English isolation of *Erwiniya amylovora*. *JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY* 24: 195-211.

Brisset, N.M., & Paulin, J.P. (1992). A reliable strategy for the study of disease and hypersensitive reaction induced by *Erwinia amylovora*. *Plant Science* 85: 171–177. https://doi.org/10.1016/0168-9452(92)90113-z

Choi, H. J., Kim, Y. J., Lim, Y. J., & Park, D. H. (2019). Survival of *Erwinia amylovora* on Surfaces of Materials Used in Orchards. *Research in Plant Disease* 25(2), 89-93. https://doi.org/10.5423/rpd.2019.25.2.89

Dagher, F., Olishevska, S., Philion, V., Zheng, J., & Déziel, E. (2020). Development of a novel biological control agent targeting the phytopathogen *Erwinia amylovora*. *Heliyon* 6(10), e05222. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05222

Doolotkeldieva, T., & Bobusheva, S. (2016). Fire blight disease caused by *Erwinia amylovora* on Rosaceae plants in Kyrgyzstan and biological agents to control this disease. *Advances in Microbiology* 6(11), 831. https://doi.org/10.4236/aim.2016.611080

Evrenosoğlu, Y., Mertoğlu, K., Bilgin, N. A., Misirli, A., & Özsoy, A. N. (2019). Inheritance pattern of fire blight resistance in pear. *Scientia Horticulturae* 246, 887–892. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.11.069

Grant, C. R., & Rees, T. (1981). Sorbitol metabolism by apple seedlings. *Phytochemistry* 20:1505–1511. https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)98521-2

Gross, M., Geier, G., Rudolph, K., & Geider, K. (1992). Levan and levansucrase synthesized by the fireblight pathogen *Erwinia amylovora*. Physiol. *Molecular Plant Pathology* 40:371–381. https://doi.org/10.1016/0885-5765(92)90029-u

Jakab-Ilyefalvi, Z., Platon, I., & Festila, A. (2012). Fire blight susceptibility of some pear varieties (*Erwinia amylovora*, Burill). *Fruit Growing Research*, 28.

Heldt, H.W. (1997) Plant biochemistry and molecular biology. Oxford University Press, New York.

Kellerhals, M., Szalatnay, D., Hunziker, K., Duffy, B., Nybom, H., Ahmadi-Afzadi, M., Höfer, M., Richter, K., & Lateur, M. (2012). European pome fruit genetic resources evaluated for disease resistance. *Trees* 26(1), 179–189. https://doi.org/10.1007/s00468-011-0660-9

Korba, J., Šillerová, J., & Kůdela, V. (2008). Resistance of apple varieties and selections to *Erwinia amylovora* in the Czech Republic. *Plant Protection Science* 44(3), 91-96. https://doi.org/10.17221/19/2008-pps

Khan, M. A., Zhao, Y. F., & Korban, S. S. (2012). Molecular mechanisms of pathogenesis and resistance to the bacterial pathogen *Erwinia amylovora*, causal agent of fire blight disease in Rosaceae. *Plant Molecular Biology Reporter* 30(2), 247-260. https://doi.org/10.1007/s11105-011-0334-1

Layne, R. E. C., & Quamme, H. A. (1975). Pears. In J. Janick & J. N. Moore (Eds.), Advances in fruit breeding (pp. 38–70). Purdue University Press, West Lafayette.

Kurdjian, A., & Guem, J. (1989). Intracellular pH: measurement and importance in cell activity. Ann. Rev. Plant Physiol. *Plant Molecular Biology* 40: 271–303. https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.001415

Mikiciński, A., Puławska, J., Molzhigitova, A., & Sobiczewski, P. (2020). Bacterial species recognized for the first time for its biocontrol activity against fire blight (*Erwinia amylovora*). *European Journal of Plant Pathology* 156(1), 257-272. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1948157/v1

Millier, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry* 31(3): 426-428. https://doi.org/10.1021/ac60147a030

Risteveski, B. P., & Risteveska, A. B. (1996). Resistance of pear varietties to fire blight in the Ripoblic of Macedonia. *Acta Horticulturae* .311: 256-259. https://doi.org/10.17660/actahortic.1996.411.79

Şahin, M., & Mısırlı, A. (2016). Ülkemizde ve dünyada ayva ıslahı çalışmaları. *Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi* 286–294. https://doi.org/10.17100/nevbiltek.211008.

Şahin, M., Mısırlı, A., & Özaktan, H. (2019). Ege ve Doğu Marmara Bölgesi ayva plantasyonlarında ateş yanıklığı hastalığının değerlendirilmesi. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi* 29(1), 1-14. https://doi. org/10.18615/anadolu.568756.

Şahin, M., Mısırlı, A., & Özaktan, H. (2020). Determination of fire blight (*Erwinia amylovora*) susceptibility in Turkey's *Cydonia oblonga* Mill. Germplasm. *European Journal of Plant Pathology* 157(2), 227-237. https://doi.org/10.1007/s10658-020-01971-5

Salcedo, F., & Matta, B. (2000). Inflluence of nitrogen and calcium fertilizier on fire blight suceptibility of royal Gala apple tree. *Mississipi Agricultural and Experiment Station Res Rep*. 21: 1-6.

SEIDGHASEMI, A. et al. (2014). Occurrence of fire blight caused by *Erwinia amylovora* on quince in Kerman Province

Shrestha, R., Lee, S.H., Hur, J.H., & Lim, C.K. (2005). The effects of temperature, ph, and bactericides on the growth of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora*. *Plant Pathology* 21:127–131. https://doi.org/10.5423/ppj.2005.21.2.127

Stošić, S., Ristić, D., Savković, Ž., Grbić, M. L., Vukojević, J., & Živković, S. (2021). Penicillium and Talaromyces Species as Postharvest Pathogens of Pear Fruit (*Pyrus Communis*) in Serbia. *Plant Disease* 105(11), 3510-3521. https://doi.org/10.1094/pdis-01-21-0037-re

Tomas, T. M., & Jones, A. L. (1992). Severity of fire blight on apple cultivars an strains in Michigan . *Plant Disease*. 76: 1049-1052. https://doi.org/10.1094/pd-76-1049

Vander Zevit, T. W., Oitto, A., & Brooks, H. J. (1970). Scoring system for rating the severity of fire blight in pear. *Plant Disease* 54: 835-839.

Vanneste, J.L. (1995). *Erwinia amylovora*. In: Singh US, Singh RP & Kohmoto K (eds) Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases: Histopathological, Biochemical, Genetic and Molecular Bases, Vol. 1. (pp. 21–46).

VanderZevit, T., & Keli, H. L. (1979). Fire blight , A Bacterial Disease of Rosaceous Plants. Agric. Handbook, No. 510, U. S. Government printing office, washington D. C.

Venisse, J. S., Malnoy, M., Faize, M., Paulin, J. P., & Brisset, M. N. (2002). Modulation of defence responses of Malus during compatible and incompatible interactions with *Erwinia amylovora*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 15, 1204-1212. https://doi.org/10.1094/mpmi.2002.15.12.1204

Willis, D.K., Rich, J.J., & Hrabak, E.M. (1991). hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4: 132– 138. https://doi.org/10.1094/mpmi-4-132