

## بررسی اثرات متقابل ژنهای Pto/avrPto بر روی کلنیزاسیون اپی فیت باکتری *Pseudomonas syringae*

مصطفی نیک نژاد کاظم پور<sup>۱</sup> و حسن جهاننیده کودهی<sup>۲</sup>  
۱، استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان  
۲، مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه گیلان  
تاریخ پذیرش مقاله ۸/۸/۸۱

### خلاصه

مقاومت گیاهان در برابر دامنه وسیعی از بیماریهای گیاهی بستگی به ژن غیر بیماریزایی درعامل بیماری و ژن مقاومت در میزبان دارد. در این تحقیق ژن غیر بیماریزایی *avrPto* جدایه PT23 باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* در پلاسمید نو ترکیب *pLA(avrPto)* کلون گردید و سپس این پلاسمید از طریق الکتروپوریشن به داخل سلولهای جدایه‌های وحشی *P.s. pv. tomato*، *P.s. pv. phaseolicola* و *P.s. pv. syringae* منتقل شد. رقم حساس کانزیرو (فاقد ژن مقاومت *Pto*) و رقم مقاوم کاستون (واجد ژن مقاومت *Pto*) گوجه فرنگی بوسیله جدایه‌های وحشی و جدایه‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب *pLA(avrPto)* مایه زنی شدند. نتایج حاصله نشان داد هیچگونه اختلاف معنی داری بین جدایه‌های وحشی و جدایه‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب از نظر میزان تکثیر باکتری بر روی رقم حساس وجود ندارد در صورتیکه در رقم مقاوم میزان تکثیر باکتری در جدایه‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب *pLA(avrPto)* از نظر آماری بطور معنی داری پایین تر از جدایه‌های وحشی (فاقد پلاسمید نو ترکیب) بود. تأثیر تنوری ژن از برای ژن هم‌چنین بر روی میزان رشد طولی گیاه نیز قابل مشهود بود. رشد طولی در گیاهان رقم مقاوم که با جدایه‌های حاوی پلاسمید نو ترکیب *pLA(avrPto)* مایه زنی شده بودند از نظر آماری بطور معنی داری کمتر از گیاهانی بود که با جدایه‌های وحشی مایه زنی شده بودند. در مجموع چنین استنباط می‌شود که در هر دو حالت سازگاری و ناسازگاری کلنیزاسیون باکتری روی گیاه صورت می‌گیرد ولی کلنیزاسیون اپی فیت باکتری در شرایط مزرعه در حالت سازگاری به میزان بالاتری نسبت به حالت ناسازگاری در گیاه صورت می‌گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** گوجه فرنگی، ژن مقاومت *Pto*، ژن غیر بیماریزایی *avrPto*، *Pseudomonas syringae*

اپی فیت، دینامیزم جمعیت

### مقدمه

بیماریزایی‌شان با ژن مربوطه مقاومت در گیاهان به نژادهای مختلفی تفکیک شده‌اند. اولین ژن غیر بیماریزایی در باکتریها توسط کین و استاسکوویچ (۱۹۸۸) از *P.s. pv. glycinea (Psg)* گزارش شد. بدون تردید فرآورده‌های حاصل از ژنهای غیر بیماریزایی توسط گیاهان میزبان شناسایی شده و این عمل باعث بوجود آمدن واکنش ناسازگاری می‌شود (۱۸). ژنهای غیر بیماریزایی و مقاومت بنظر می‌رسد در اثر یکسری تحولاتی در باکتری غیر بیماریزا و گیاه مقاوم بوجود آمده باشند. واکنش

باکتری *Pseudomonas syringae* یک بیمار گر گیاهی است که باعث نکروز در قسمتهای هوائی گیاه می‌شود. این باکتری روی برخی از ارقام گونه‌های گیاهی حالت پارازیت اختصاصی دارد. حالت میزبان اختصاصی در واقع بعلت اثر متقابل بین ژن غیر بیماریزایی در باکتری و ژن مقاومت در گیاهان می‌باشد. باکتریهای بیمارگر گیاهی بر اساس هم‌کنش ژن (ژنهای)

ناسازگاری که بعلاوه اثرات متقابل یک ژن غیر بیماریزایی با یک ژن مقاومت پدیدار می‌گردد ممکن است باعث ایجاد واکنش فوق حساسیت<sup>۱</sup> در گیاه شود (۴). در گوجه‌فرنگی پیتبالدو مک‌نیل (۱۹۸۳) گزارش کردند که مقاومت برخی از ارقام گوجه‌فرنگی، به برخی از جدایه‌های *P.s.pv.tomato (Pst)* در اثر ورود ژن غالب مقاومت *Pto1* می‌باشد که بر روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۵ گوجه‌فرنگی قرار دارد. همچنین پیلوسکی و همکاران (۱۹۸۶) ژن مقاومت *Pto2* را در گونه *Lycopersicon histurum var. glabratum* شناسایی نمودند.

مدتی بعد، استوکینجر و همکاران (۱۹۹۴) دو ژن مقاومت *Pto3* و *Pto4* را در رقم *L.h.var. glabratum 134417* گزارش دادند. رونالد و همکاران (۱۹۹۲) ژن غیر بیماریزایی *avrPto* را پس از شناسایی بوسیله ژن مقاومت *Pto1* در گوجه‌فرنگی کلون نمودند. مارتین و همکاران (۱۹۹۴) نشان دادند که ژنهای مقاومت *Pto* در گوجه‌فرنگی نسبت به *Pst* از خود عکس‌العمل دفاعی نشان داده و پروتئین کیناز (protein kinase) را رمز سازی می‌نمایند. عمل پروتئین کینازها دریافت پیام از ژن *Pto* و سپس انتقال به ژنهای غیر بیماریزایی *avrPto* در *Pst* می‌باشد. توبیاس و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که شناسایی ژن غیر بیماریزایی *avrPto* در *Pst* بوسیله ژن مقاومت *Pto* در ارقام مقاوم گوجه‌فرنگی باعث می‌شود که نه‌تنها این گیاه به بیماری خال زدگی بلکه نسبت به برخی از بیماریهای ویروسی گوجه‌فرنگی مانند ویروس پنهان سیب زمینی (PVX) نیز مقاوم شود. سالمرون و همکاران (۱۹۹۴) با مطرح نمودن فرضیه رابطه اثر متقابل بین ژن مقاومت *Pto* و غشاء سلولی، معتقد بودند که پروتئین کیناز حاصل از ژن *Pto* با الیستورهای که غالباً خارج از سلولی هستند هم‌کنش دارند. حال اگر الیستورهایی با وزن مولکولی پایین وجود داشته باشند مستقیماً با پروتئین کینازهای در سیتوپلاسم سلول گیاهی و ژن غیر بیماریزایی *avrPto* در سلول باکتری واکنش کرده و بعد از دریافت علائم میکروبی توسط سیتوپلاسم سلول گیاهی، ژنهای دفاعی آنتی بیوتیک کد نموده که سبب تحریک سریع سلولهای گیاهی شده و این واکنش منجر به مرگ سلولهای میزبان می‌شود. تشکیل فرم فعال اکسیژن (پراکسید هیدروژن،

آنون سوپراکسید) از مشخصات اثر متقابل واکنش ناسازگاری در سلولهای گیاهی می‌باشد (۲۰). در *Pst* عمل نسخه برداری *avrPto* بوسیله فاکتورهای *cis* و *trans* تنظیم می‌شود. انواع الکلها، و اشکال مختلف قندها مانند فروکتوز، ساکارز و مانیتول موجب تشدید فعالیت ژن غیر بیماریزایی *avrPto* می‌شوند. کوبایاشی و همکاران (۱۹۹۹) علاوه بر ژن غیر بیماریزایی *avrPto* سه ژن غیر بیماریزایی دیگر بنامهای *avrD*، *avrE* و *avrA* را در جدایه PT23 از *Pst* گزارش نمودند ولی ژنهای مقاومت مربوط به این ژنهای غیر بیماریزایی در گوجه‌فرنگی شناسایی نشدند. با وجود این، ژنهای مقاومت مربوط به این ژنهای غیر بیماریزایی در لوبیای سویا را مشخص کردند. در سویا یک واکنش فوق حساسیت بوسیله جدایه‌های *Psg* نسبت به ژنهای غیر بیماریزایی *Pst* مشاهده گردید ولی نتایج بعدی نشان داد که بین ژنهای غیر بیماریزایی جدایه PT23 با واکنش فوق حساسیت در سویا هیچگونه ارتباطی وجود ندارد هر چند که نقش ژنهای *avrE* و *avrA* در افزایش بیماریزایی روی گیاه گوجه‌فرنگی مشخص شده است (۱۱). هی و لورانج (۱۹۹۴) دو عملکرد را برای ژنهای غیر بیماریزایی فرض نمودند. اول اینکه ژنهای غیر بیماریزایی روی میزان تهاجم باکتری تأثیر می‌گذارند و دوم اینکه این ژنها روی استعداد بقا و میزان جمعیت باکتری در بافتهای گیاهی تأثیر دارند.

هدف از این تحقیق، مشخص نمودن نقش ژنهای غیر بیماریزایی *avrPto* در کلنیزاسیون اپی فیت *Pst* روی گیاه گوجه‌فرنگی (میزبان) و کلون نمودن این ژنها در جدایه *Pss2027-37* و بیماریزایی روی گلایی بود. سپس مایه زنی جدایه‌های نو ترکیب *Pss* روی گوجه‌فرنگی (غیر میزبان) انجام گرفت.

### مواد و روشها

در این بررسی دو واریته گوجه‌فرنگی کانریو<sup>۲</sup> و کاستون<sup>۳</sup> بترتیب حساس و مقاوم به باکتری *Pst* مورد استفاده قرار گرفت. واریته کاستون دارای ژن مقاومت *Pto* می‌باشد که این ژن قادر است ژن غیر بیماریزایی *avrPto* را در نژاد صفر *Pst* ناسایی نماید.

1. hypersensitivity

2. cannery row  
3. caston

درجه‌سانتیگراد قرار داده شدند و بعد از ۷۲ ساعت کلنی‌ها فلورسنت باکتری در زیر نور ماوراء بنفش شمارش گردیدند. جهت برآورد میزان باکتری در گیاه از فرمول زیر استفاده شد:

$$N = X.V.D \times 20$$

تعداد سلول باکتری در هر گیاه = N

تعداد کلنی‌های باکتری شمارش شده در هر رقت = X

D = فاکتور رقت

V = حجم آب مقطری که به گیاه در کیسه پلاستیکی اضافه شد

### ۳- آنالیز آماری

بعد از شمارش کلنی‌های باکتری از روی تشتک پتری، تعداد سلولهای باکتری در هر گیاه به لگاریتم اعشاری تبدیل گردید. یکنواختی واریانس بوسیله آزمون بارتلت (۱۹۳۷) کنترل گردید. در صورتیکه واریانس‌ها توسط آزمون بارتلت یکنواخت تشخیص داده شد، آنالیز واریانس بوسیله آزمون فیشر دنبال گردید. اگر ارزش داده‌های محاسبه شده کوچکتر از F در جدول فیشر بود در این صورت تفاوت معنی داری بین داده‌های مورد مطالعه وجود ندارد. بالاخره برای مقایسه میانگین‌ها و گروه‌بندی آنها از آزمون دانکن (۱۹۵۵) استفاده گردید.

### ۴- خالص سازی DNA پلاسمیدی

برای خالص سازی پلاسمید از ۲ روش استفاده شد.

#### ۴-۱- روش STET (Chun-Keun, 1993)

در این روش ابتدا جدایه‌های باکتری *E. coli* روی محیط LB (مخمر ۱۰ گرم، باکتوپپتون ۵ گرم، NaCl ۱۰ گرم و آگار ۱۵ گرم در یک لیتر آب مقطر) کشت گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور نگهداری شدند. یک توده کلنی باکتری را برداشته و در یک لوله اپندورف<sup>۲</sup> ۴۰۰ میکرولیتر محلول STET (ساکارز ۸٪، ۵ درصد تریتون X-100، ۱۰ میلی لیتر EDTA نیم مولار، ۵ میلی لیتر Tris/HCl یک مولار، pH ۸/۰) قرار داده و بلافاصله ۳۲ میکرولیتر آنزیم لایزوزایم (۱۰ میلی گرم در میلی لیتر) به آن اضافه شد. لوله به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت تا دیواره سلولهای باکتری لیز شود. لوله‌ها در حمام بن ماری جوش به مدت یک دقیقه قرار داده شدند و سپس به مدت ۱۰

قبل از کشت، جهت ضد عفونی سطحی، بذرهاي گوجه فرنگی به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (۱/۶٪) درجه (کلر) قرار گرفتند و سپس سه بار (هر بار ۱۰ دقیقه) با آب مقطر سترون شستشو داده شده و جهت خشک کردن بذرها، روی کاغذهای صافی سترون در اطاقک کشت در زیر نور فلورسنت به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند.

### ۱- مایه زنی بذرهاي گوجه فرنگی با باکتری و کشت آنها

بذرهاي گوجه فرنگی بعد از ضد عفونی کردن سطحی و خشک شدن، به مدت ۲ ساعت در سوسپانسیون باکتری با غلظت  $1 \times 10^8$  سلول باکتری در میلی لیتر قرار گرفتند و سپس بذور مایه زنی شده بر روی کاغذ صافی سترون خشک شده و بلافاصله در داخل پلاک‌های سوراخدار از جنس پلی اتیلن (به ابعاد  $60 \times 40$  سانتی‌متر) محتوی پشم شیشه کشت گردیدند. پشم شیشه را قبل از کشت با محلول غذایی مرطوب شد. هر پلاک سوراخدار ۲۱ لیتر از محلول غذایی را جذب کرد. بذرهاي مایه‌زنی شده گوجه فرنگی بر روی سرپوشهای پشم شیشه قرار گرفتند و سپس بوسیله ورمیکولیت پوشانده شدند (۱۵۰ گرم ورمیکولیت برای هر پلاک). پلاک‌ها در دستگاه جوانه زنی<sup>۱</sup> در ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز (۱۷ ساعت) و ۱۸ درجه سانتی‌گراد در شب (۷ ساعت) در رطوبت نسبی ۹۵ درصد به مدت چهار هفته قرار داده شدند.

### ۲- جداسازی و شمارش باکتریها در گیاه

هر گیاهچه گوجه فرنگی بطور جداگانه در داخل کیسه پلاستیکی سترون قرار گرفته و به هر کدام یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردید. سپس بوسیله یک غلطک پلاستیکی، گیاهچه گوجه فرنگی در داخل کیسه پلاستیکی کاملاً له گردید و عصاره گیاه بوسیله آب مقطر سترون تا  $1 \times 10^6$  رقیق شد. سپس از هر رقت به میزان ۵۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط King B (King et al., 1954) محتوی ۵۰ میکرولیتر در میلی لیتر آنتی بیوتیک اکتیدینون، کشت گردید. بطویکه در هر تشک، عصاره مادر تا رقت  $1 \times 10^6$  قرار داده شد. برای هر تیمار پنج گیاه (تکرار) و برای هر گیاه سه تشتک پتری در نظر گرفته شد. سپس تشتک‌های پتری در انکوباتور در دمای ۲۷

2. eppendorf

1. germinator

مرتب‌ه ستون QIAGEN-tip-20 با بافر QC (یک مولار NaCl، ۵۰ میلی مولار MOPS، ۱۵ درصد الکل اتانول با pH ۷) شستشو گردید. سپس DNA خالص شده بر روی ستون QIAGEN با ۸۰۰ میکرولیتر بافر QF (۱۲ میلی مولار NaCl، ۱۵ درصد Tris/HCl، ۱۵ درصد الکل اتانول، pH ۸/۵) برداشت شد. جهت خالص سازی DNA به هر لوله ۱/۷ حجم DNA الکل ایزوپروپانول اضافه نموده و سپس تیوبها به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۱۰۰۰× g سانتیفریژ شد. رسوب بدست آمده که همان DNA می باشد به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه خشک کن در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد قرار داده تا خشک شود. بالاخره DNA در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دوباره تقطیر شد و حل گردید.

#### ۵- عیار سنجی DNA

DNA خالص شده در لوله های مخصوص قرار داده و به میزان یک صدم با آب مقطر دوبار تقطیر شده رقیق شد. لوله را در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده و میزان نور عبور داده شده در ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری گردید. میزان غلظت DNA پلاسمیدی با استفاده از فرمول (۱۳)  $(DNA)mg/ml = OD_{260} \times 50 \times DF$  همان فاکتور رقت DNA است. درجه خلوص DNA با فرمول  $OD_{260} / OD_{280}$  محاسبه شد که بایستی بین ۱/۷ تا ۲ باشد.

#### ۶- هضم DNA کروموزومی و لیگاسیون

پنج میکرولیتر از DNA را برداشته و به آن یک میکرولیتر آنزیم برشی (10 unit) و ۹ میکرولیتر بافر فعال کننده آنزیم اضافه گردید. هضم آنزیمی معمولاً برای اکثر آنزیمها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (بجز آنزیم Sma1 در ۲۵ درجه سانتیگراد) به مدت ۲ ساعت می باشد. سپس فعالیت آنزیم با قرار دادن در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. قطعه DNA که بوسیله آنزیمهای محدود کننده هضم شده را با ناقلین آنها (پلاسمیدهای pUC18 و pLA2917) که توسط همین آنزیمها هضم شده بودند و در دو انتها با یکدیگر سازگاری دارند در میکروتیوب قرار گرفتند (جدول ۱). لوله ها دمای ۱۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. لوله های شاهد این

دقیقه در ۱۱۰۰۰× g سانتیفریژ شد. رسوب<sup>۱</sup> بدست آمده بوسیله یک چوب کبریت سترون خارج شد. در هر تیوب یک میلی لیتر مخلوط فنل، کلروفرم، ایزوآمیل الکل (۵۰:۴۹:۱) اضافه شد و دو فاز تشکیل شده در لوله با تکان دادن آهسته مخلوط گردید و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۱۰۰۰× g سانتیفریژ شد. قسمت روئی به آرامی بوسیله میکروپیپت برداشته و به میزان ۰/۸ حجم برداشته شده به ژن ایزوپروپانول اضافه گردید. سپس لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. دوباره لوله به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۱۰۰۰× g در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتیفریژ شد. رسوب بدست آمده (DNA) را در دستگاه خشک کن تحت خلاء<sup>۲</sup> در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد خشک گردید و بالاخره رسوب DNA پلاسمیدی را در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر<sup>۳</sup> بار تقطیر شده سترون حل گردید.

#### ۲-۴- روش QIAGEN (Niknejad, 1998)

یک توده باکتری کشت ۲۴ ساعته بر روی محیط LB را برداشته و در یک لوله اپندورف ۱/۵ میلی لیتری محتوی ۳۰۰ میکرولیتر بافر P1 (۱۰ میلی مولار Tris/HCl، pH ۸، ۱۰ میلی مولار EDTA) قرار داده و بلافاصله ۳۰۰ میکرولیتر بافر P2 (۲۰ میلی مولار NaOH، یک درصد SDS) به آن اضافه شد و لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی یخ قرار داده شد. سپس تیوبها به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. بعد به هر تیوب ۳۰۰ میکرولیتر بافر P3 (۳ مولار استات پتاسیم pH ۵/۵) در دمای ۴ درجه سانتی گراد اضافه شد. در این زمان به ستون QIAGEN یک میلی لیتر بافر QBT (۷۵۰ میلی مولار NaCl، ۵۰ میلی مولار MOPS، ۱۵ درصد الکل اتانول، ۱۵ درصد triton X-100، pH ۷/۵) جهت متعادل کردن ستون ریخته شد. لوله ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۱۰۰۰× g سانتیفریژ می نمایم. بلافاصله قسمت روئی را برداشته و در ستون QIAGEN-tip-20 می ریزیم. بعد از خارج شدن قسمت روئی از ستون، DNA موجود در رزین قرار گرفت. چهار

3. pellet
1. speed vac
2. ultra pure



باکتری حاوی پلاسمیدهای نوترکیب pLAavrPto و PUCavrPto را تاکید کرد.

۱۰- انتقال پلاسمیدهای نوترکیب pLA avrPto از *E. coli* به جدایه‌های وحشی *P. s. pv. syringae* و *P. s. pv. tomato* با استفاده از عمل الکتروپوریشن<sup>۱</sup>

در ابتدا پلاسمید نوترکیب pLAavrPto از *E. coli* بوسیله روش QIAGEN استخراج گردید. سلولهای پاتووارهای باکتری

*P. syringae* قبل از اینکه عمل الکتروپوریشن روی آنها صورت بگیرد بخوبی شستشو داده شده و بصورت سوسپانسیون در غلظت  $1 \times 10^{10}$  سلول در میلی لیتر تهیه شد و برای اینکه در محیط حداقل یونهای ممکن وجود داشته باشد برای این منظور عملیات زیر انجام گردید.

#### ۱۱- آماده سازی سلولهای باکتری الکتروشایسته (۱۴)

پنج میلی لیتر از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌های پاتووارهای *P. syringae* در محیط کشت مایع LB برداشته و در فلاسکهای ۲۵۰ میلی لیتری محتوی ۱۶۰ میلی لیتر محیط کشت مایع LP

(۷ گرم مخمر، ۷ گرم پیتون، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر ۷ pH) قرار داده و آنرا در دستگاه تکان دهنده (۱۰۰ دور در دقیقه) در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت قرار داده تا چگالی نوری در ۶۰۰ به ۰.۴۵ تا ۰.۵ برسد. بلافاصله محیط کشت‌ها در بطری‌های حاوی ۳۰۰ میلی لیتر ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در  $150 \times g$  سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر سترون ۵ درجه سانتی گراد حل شد. دوباره عمل سانتریفوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد در  $g \times 1500$  به مدت ۱۰ دقیقه دنبال شد. رسوب بدست آمده با ۸۰ میلی لیتر آب مقطر سترون ۵ درجه سانتی گراد حاوی ۱۰ درصد گلیسرول حل گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در  $g \times 1500$  سانتریفوژ شد. همین عمل دوباره با ۵۰ میلی لیتر آب مقطر سترون حاوی ۱۰ درصد گلیسرول انجام گردید. رسوب بدست آمده با ۴۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حاوی ۱۰ درصد

به سلولهای شایسته انجام گرفت. مخلوط واکنش در جدول ۲ نشان داده شده است. هر لوله به مدت ۱۵ دقیقه در داخل ظرف حاوی یخ قرار داده شد. سپس مخلوط را به مدت ۴۵ تا ۹۰ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد شوک حرارتی داده شد که این عمل باعث انتقال DNA به درون سلولهای شایسته شد. بعد از شوک حرارتی، لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در داخل ظرف حاوی یخ قرار گرفت و سپس ۹۰۰ میکرولیتر محیط کشت مایع LB در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد را به هر لوله اضافه شد. لوله‌ها بلافاصله روی دستگاه تکان دهنده در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد.

جدول ۲- محلول واکنش برای انتقال پلاسمیدهای نوترکیب به جدایه *E. coli* DH5 $\alpha$  و شاهد

آزمایش	۱	۲	۳	۴	۵
DNA منتقل	آزمایش	آزمایش لیگاسیون	شاهد	شاهد بدون	شاهد آنتی بیوتیک
شونده	لیگاسیون بدون	آزمایش لیگاز	لیگاسیون	پلاسمید ناقل	آمپی سیلین
					پلاسمید ناقل
	۱۵ $\mu$ l	۱۵ $\mu$ l	۱۵ $\mu$ l	۱۵ $\mu$ l	۱۵ $\mu$ l
جدایه DH5 $\alpha$	۱۰۰ $\mu$ l	۱۰۰ $\mu$ l	۱۰۰ $\mu$ l	۱۰۰ $\mu$ l	۱۰۰ $\mu$ l
کل	۱۱۵ $\mu$ l	۱۱۵ $\mu$ l	۱۱۵ $\mu$ l	۱۱۵ $\mu$ l	۱۱۵ $\mu$ l

#### ۹- انتخاب کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب

بعد از عمل انتقال پلاسمیدهای نوترکیب به سلولهای شایسته، از هر تیوب ۵۰ میکرولیتر برداشته و بطور جداگانه روی محیط جامد LB حاوی  $25 \mu\text{g/ml}$  آنتی بیوتیک تتراسیکلین (برای جداسازی کلنی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pLAavrPt)،  $20 \mu\text{g/ml}$  آنتی بیوتیک آمپی سیلین همراه با  $20 \text{mg/ml}$  میلی گرم در میلی لیتر ماده X-Gal و ماده  $200 \mu\text{g/ml}$  IPTG برای غربال کلنی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pUCavrPto کشت گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت کلنی‌های رشد یافته به رنگ سفید از روی محیط کشت انتخابی جدا شدند. سپس جهت اطمینان، کلنی‌های جدا شده را یکبار دیگر روی محیط کشت انتخابی حاوی آنتی بیوتیک‌های فوق کشت داده و دوباره عمل انتخاب و غربال کلنی‌های رشد یافته انجام یافت. این عمل وجود سلولهای

1. electroporation

مولار NaCl) حل و مانند مرحله قبل به مدت یک دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید تا خشک شود. DNA بدست آمده در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دوبار تقطیر شده حل و لوله به مدت ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. لوله محتوی DNA به مدت یک دقیقه در  $11000 \times g$  سانتریفوژ شد و سپس بلافاصله ۳۰ میکرولیتر قسمت روئی محتوی DNA بوسیله میکروپیپت برداشت گردید.

### نتایج

۱- نقش ژن *avrPto* روی دینامیزم جمعیت باکتری *P.s.pv.tomato* روی واریته‌های حساس و مقاوم گوجه فرنگی

۱-۱- دینامیزم جمعیت جدایه‌های وحشی *P. syringae*

روی رقم ۲ رقم گوجه فرنگی کانریرو و کاستون به ترتیب حساس و مقاوم به *Pst* در ۲ آزمایش صورت گرفت:

نتایج اولین آزمایش نشان داد که هر دو رقم گوجه فرنگی که بوسیله *P.s.pv.syringae (Pss)* تلقیح شده بودند دارای رشد طولی یکسانی بوده بطوریکه رشد طولی بر روی هر دو رقم بعد از ۲۱ روز ۴۰ سانتی متر بود که هیچگونه تفاوت معنی داری با گیاهان شاهد (بدون مایه زنی) نداشت. اما با وجود این، اندازه رشد طولی رقم کاستون (دارای ژن مقاومت *Pto*) که با جدایه ۸۲۰۷ از نژاد صفر *Pst* (دارای ژن غیر بیماریزایی *avrPto*) مایه زنی شده بودند، ۷/۲ سانتی متر بوده که به طور معنی داری کوچکتر از گیاهان شاهد بودند. اندازه رشد طولی هر دو رقم که با جدایه‌های JN-54 و JN-53 از نژاد ۱ *Pst* فاقد ژن غیر بیماریزایی (*avrPto*) و رقم کانریرو (فاقد ژن مقاومت *Pto*) با جدایه ۸۲۰۷ مایه‌زنی شده بودند بطور معنی داری کوچکتر از گیاهان تلقیح شده و شاهد بودند. قسمت اعظم این گیاهان بعد از ۱۴ روز کاملاً نکروز شده بطوریکه دینامیزم جمعیت باکتری در مرحله رشد لگاریتمی (۱۴ روز بعد از کشت) به  $1 \times 10^8$  سلول باکتری در هر گیاه رسید.

دینامیزم جمعیت جدایه ۳۷-۲۰۲۷ از *Pss* روی هر دو رقم در مرحله رشد لگاریتمی (۱۴ روز بعد از کشت) به  $10^8$  cfu  $\times$  ۵ در گیاه رسید که به طور معنی داری کمتر از جدایه ۸۲۰۷ از *Pst* روی رقم حساس بود. با وجود این، دینامیزم

گلیسرول حل شد و قبل از عمل الکتروپوریشن لوله‌های ایندورف در ظرف حاوی یخ نگه‌درای گردید.

### ۱۲- الکتروپوریشن

مقدار ۴۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولهای باکتریهای الکتروشایسته را همراه با یک میلی گرم از پلاسمید نو ترکیب pLAavrPto در داخل لوله های مخصوص الکتروپوریشن بصورت سرد و سترون قرار گرفت. لوله‌های الکتروپوریشن وارد دستگاه الکتروپوریشن شدند و به آنها یک شوک الکتریکی ۱۶ کیلو ولت بر سانتی متر مربع به مدت ۴ تا ۵ ثانیه وارد شد و بلافاصله بعد از عمل الکتروپوریشن یک میلی لیتر از محیط کشت LP اضافه گردید. محیط کشت به مدت ۳ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد قرار داده و سپس آنرا روی محیط KingB حاوی  $20 \mu\text{g/ml}$  آنتی بیوتیک تتراسیکلین کشت نموده و به مدت ۳ روز در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. سپس کلنی‌های رشد یافته انتخاب و جدا شدند.

### ۱۳- استخراج و خالص سازی DNA از روی ژل الکتروفورز

قطعه ژل رزوفور<sup>۱</sup> حاوی ژن DNA در زیر نور ماوراء بنفش بوسیله چاقوی اسکالپل جدا شد و پس از وزن کردن در لوله ایندورف قرار داده شد. یک گرم ژل برابر با یک میلی لیتر در نظر گرفته شد و به اندازه ۱/۲ حجم ژل بافر حل کننده<sup>۲</sup> (۲۰ میلی لیتر Tris/HCl یک مولار، ۵ میلی لیتر NaCl ۱۵ مولار، ۵ میلی لیتر EDTA نیم مولار، ۵/۵ گرم SDS، ۲ گرم PVP، آب مقطر ۷۰ میلی لیتر) و سپس ۴/۵ برابر حجم ژل تامبون نمکی<sup>۳</sup> (۳۶ گرم NaI، ۰/۷۵ گرم  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ، ۴۰ میلی لیتر آب مقطر) اضافه گردید. تیوب‌ها در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه نگهداری شدند. بعد از ذوب شدن ژل، به آن ۱۰ میکرولیتر سیلیس (۶۰ گرم سیلیس در ۶۰ میلی لیتر آب مقطر) اضافه و تیوب به مدت ۵ ثانیه در  $1500 \times g$  سانتریفوژ گردید.

رسوب بدست آمده با یک میلی لیتر بافر شستشو<sup>۴</sup> (۲۰ میلی مولار Tris/HCl با pH ۷/۵، یک مولار EDTA، یک

1. resophore
2. solution buffer
3. salt buffer
4. washing buffer

جمعیت جدایه ۸۲۰۷ روی دو رقم حساس و مقاوم متفاوت بود. دینامیزم جمعیت باکتری روی واریته حساس در مرحله رشد لگاریتمی،  $10^8 \times 8/2$  cfu در هر گیاه بود در صورتیکه دینامیزم جمعیت باکتری در همان مرحله روی واریته مقاوم  $10^6 \times 1/77$  سلول باکتری در گیاه بود که به طور معنی داری با دینامیزم جمعیت باکتری در واریته حساس تفاوت داشتند (شکل ۱). در دومین آزمایش روی تعدادی از جدایه‌های نژاد صفر *Pst* که (جدایه‌های JN-14-7 و JN-52) رقم حساس و مقاوم گوجه فرنگی مایه زنی شدند. گیاهان رقم مقاوم که با جدایه‌های نژاد صفر مایه زنی شده بودند، ۲۱ روز بعد از کشت دارای رشد نسبتاً سریعی حدود ۱۲ سانتی متر بودند در صورتیکه همین واریته را وقتیکه با جدایه‌های نژاد یک مایه زنی شدند. ۲۱ روز بعد از کشت، تأخیر در رشد آنها پدید آمد و اندازه طولی آنها به  $6/5$  سانتی متر رسید. ۲۱ روز بعد از کشت، متوسط رشد طولی گیاهان رقم حساس که با جدایه‌های نژاد صفر *Pst* جدایه‌های (JN-52، JN-51، JN-14.7 و ۸۲۰۷) مایه زنی گردیدند بترتیب ۵ و  $2/7$  سانتی متر بود که از نظر آماری با یکدیگر تفاوت معنی داری داشتند. به نظر می‌رسد جدایه‌های JN-51، JN-52 و JN-14.7 حالت تهاجمی کمتری نسبت به جدایه ۸۲۰۷ داشتند با وجود این هر سه جدایه باعث ایجاد لکه‌های نکروز بر روی قسمتهای هوایی گیاه شدند. دو نوع دینامیزم جمعیت باکتری بر روی گوجه فرنگی مشاهده گردید: یک گروه از تمامی جدایه‌های نژادهای صفر و یک *Pst* روی رقم حساس و یک جدایه از نژاد یک (JN-52) روی رقم مقاوم مایه زنی شده بودند، ۱۰ روز بعد از مایه زنی رشد لگاریتمی به میزان  $10^8 \times 1$  در هر بوته رسید. هر دو رقم حساس و مقاوم که بوسیله *Pss* (جدایه ۳۷-۲۰۲۷) مایه زنی شده بودند دینامیزم جمعیت آنها با جدایه ۸۲۰۷ نژاد صفر *Pst* از نظر آماری تفاوت معنی داری نداشت. با وجود این وقتیکه جدایه ۸۲۰۷ روی رقم مقاوم مایه زنی گردید اثر متقابل *avrPto/Pto* در گیاه میزبان و باکتری باعث کاهش میزان تکثیر باکتری در گیاه شد، بطوریکه جمعیت باکتری بعد از ۲۱ روز به  $10^6 \times 8$  cfu در هر بوته رسید که از نظر آماری میزان جمعیت همین جدایه روی واریته حساس به  $10^8 \times 1$  cfu در هر بوته رسید که تفاوت معنی داری بین آنها وجود داشت. آزمایشات انجام شده تأثیر تئوری ژن از برای ژن روی

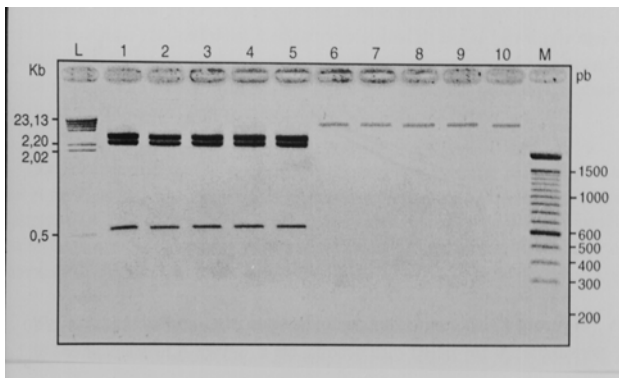
کلینزاسیون *Pst* در گیاه میزبان (گوجه فرنگی) مورد مطالعه قرار گرفت. جهت بررسی دقیق‌تر اثر ژن از برای ژن کلینزاسیون باکتری روی گیاه غیر میزبان قرار گرفت. برای این منظور ژن غیر بیماریزایی *avrPto* را در نژاد صفر باکتری *Pst* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) قرار داده تا تکثیر شود و سپس ژن غیر بیماریزایی *avrPto* را به *Pss* (بیماریزا روی گلابی) جدایه ۳۷-۲۰۲۷ معرفی شد تا تأثیر ژن *avrPto* این باکتری روی گیاه غیر میزبان (گوجه فرنگی) مورد بررسی قرار دهیم (شکل ۲، ۳ و ۴). بعد از عمل الکتروپوریشن حضور پلاسمید نوترکیب *avrPto pLA* در هر سه جدایه از *P. syringae* (جدایه‌های ۸۲۰۷، ۸۲۱۹ و ۳۷-۲۰۲۷) بعد از خالص سازی مجدد پلاسمید نوترکیب بر روی ژل الکتروفورز مورد تأیید قرار گرفت و بدین ترتیب جدایه‌های نوترکیب *P. syringae* تهیه شدند.

## ۲ - دینامیزم جمعیت جدایه‌های نوترکیب *P. syringae* با ژن *avrPto* روی گوجه فرنگی

آنالیز دینامیزم جمعیت جدایه‌های وحشی و جدایه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب *avrPto pLA* روی رقم حساس کانتریو نشان داد که بین آنها از نظر آماری هیچگونه اختلاف معنی داری وجود ندارد (شکل ۵). با وجود این بر روی رقم مقاوم کاستون دینامیزم جمعیت جدایه‌های نوترکیب (*avrPto-pLA*) ۳۷-۲۰۲۷، (*avrPto pLA*) ۸۲۰۷ و (*avrPto pLA*) ۸۲۱۹ از نظر آماری بطور معنی داری کمتر از جدایه‌های وحشی خود بود (شکل ۶). در رابطه بارشدار قام حساس و مقاوم، گیاهان رقم حساس که با جدایه‌های غیر بیماریزا *Pss* و *P.s.pv.* *phaseolicola (Psp)* مایه‌زنی شده بودند از نظر رشد طولی اختلاف معنی داری نداشتند و رشد طولی آنها بعد از ۲۱ روز به ۱۵ سانتی متر رسید. با وجود این، تعداد زیادی از این گیاهان که با جدایه‌های ۸۲۰۷ و (*avrPto pLA*) ۸۲۰۷ مایه زنی شده بودند بعد از ۱۰ روز دچار نکروز کامل شدند. بر روی گیاهان مقاوم که دارای ژن بیماریزای *Pto* بودند بطور کاملاً اختصاصی اثرات متقابل با جدایه‌هایی که دارای ژن غیر بیماریزای *avrPto* مشاهده گردید. این اثرات متقابل بین ژن مقاومت و ژن غیر بیکاریزا بر روی رشد طولی گیاه بعد از ۲۱ روز کاملاً مشهود بود. رشد طولی گیاهان رقم مقاوم مایه زنی شده با جدایه‌های (*avrPto pLA*)



ژن ۹۶۰ بازی) ۳ - با آنزیم محدود کننده *HindIII* (۲ قطعه ژن: ۳۶۰ و ۶۲۰ بازی) ۴ - با آنزیم محدود کننده *BamHI* (۲ قطعه ژن ۴۵۰ و ۵۵۰ بازی) ۵ - با آنزیم محدود کننده *HinIII* و *Sall* (۲ قطعه ژن قابل رؤیت: ۳۶۰ و ۶۰۰ بازی M - شناساگر با وزن مولکولی ۱۰۰ بازی



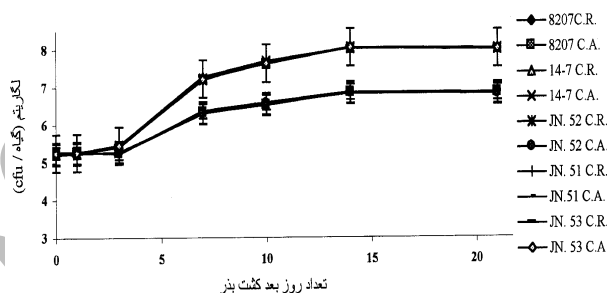
شکل ۳: الکتروفورز ژل آگارز ۲ در صد: ۱ الی ۵ هضم آنزیمی پلاسمید نو ترکیب

پلاسمید نو ترکیب *pUCavrPto* بوسیله آنزیم محدود کننده *HindIII* و *SmaI* که حاصل ۲ قطعه ژن *pUC18* (۲۶۸۸ بازی) و قطعه ژن کلون شده بوسیله آنزیم محدود کننده *SmaI*، ژن *Pto* (۶۰۰ بازی) ۶ الی ۱۰- پلاسمید *pLA2917* توسط آنزیمهای محدود کننده *HpaI* و *HindIII* هضم شده‌اند (۲۰ کیلو بازی L-DNA باکتریوفاژ  $\chi$  که توسط آنزیم *HindIII* هضم شده است M-شناساگر با وزن مولکولی ۱۰۰ بازی

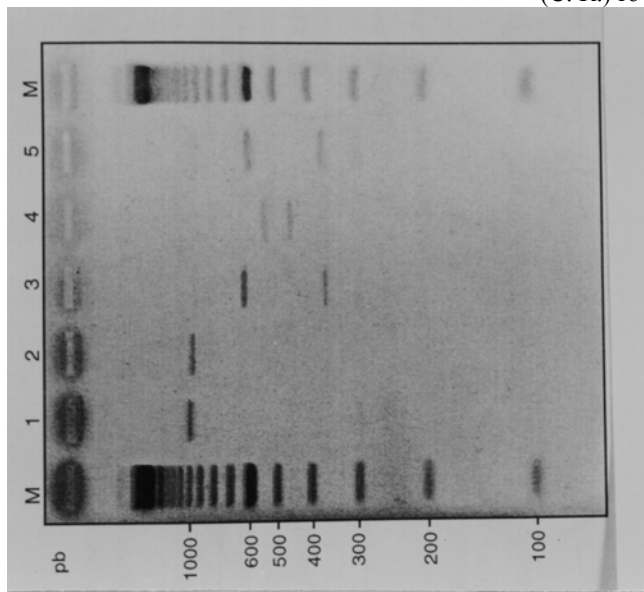
**بحث**

جدایه‌های وحشی نژاد یک *Pst* فاقد ژن غیر بیماریزایی *avrPto* قادر به شناسایی ژن مقاومت *Pto* در رقم مقاوم گوجه فرنگی نبودند و در نتیجه بعد از مایه زنی روی این بوته‌ها دچار نکرز بر روی قسمت‌های هوایی و کمی رشدی شدند. در رقم مقاوم، آنالیز دینامیزم جمعیت جدایه‌های وحشی *Pss* و *Psp* با *Pst* از نظر آماری تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند. با وجود این وقتیکه ژن غیر بیماریزای *avrPto* بر روی این جدایه‌ها کلون گردید از یک طرف بر روی رقم حساس که فاقد ژن مقاومت *Pto* می‌باشد هیچگونه تأثیری بر روی میزان تکثیر باکتری بر روی این گیاهان بجا نمی‌گذارد در صورتیکه بر روی رقم مقاوم که حاوی ژن مقاومت *Pto* می‌باشد میزان تکثیر جدایه‌های نو ترکیب حاوی ژن غیر بیماریزای *avrPto* بطور معنی داری در مقایسه با جدایه‌های وحشی آنها کاهش یافت. غیر

۲۰۲۷-۳۷ و *pLA avrPto* ۸۲۱۹ بطور معنی داری رشد طولی آنها کمتر از گیاهانی بودند که با جدایه‌های وحشی آنها (۲۰۲۷-۳۷ و ۸۲۱۹) مایه‌زنی شده بودند. گیاهان مقاوم مایه زنی شده با جدایه‌های ۸۲۰۷ و *pLA avrPto* (۸۲۰۷) که به ترتیب دارای ژن غیر بیماریزایی *avrPto* بر روی کروموزوم و پلاسمید نو ترکیب بودند هیچگونه اختلاف معنی داری با یکدیگر نداشتند با وجود این بطور معنی داری این گیاهان مایه‌زنی شده کوچکتر از سایر گیاهان مقاوم مایه‌زنی شده بودند و نیز هیچگونه علائم بیماری بر روی این گیاهان مشاهده نگردید.



شکل ۱- دینامیزم جمعیت نژاد صفر *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* جدایه‌های (۸۲۰۷، JN-14-7، JN-51، JN-52) و نژاد (جدایه JN-53) بر روی رقم حساس Caston (C.A.) و (C.R.) row



شکل ۲- الکتروفورز ژل ۲ در صد ۱ - قطعه ژن یک کیلو بازی تکثیر یافته بر روی جدایه

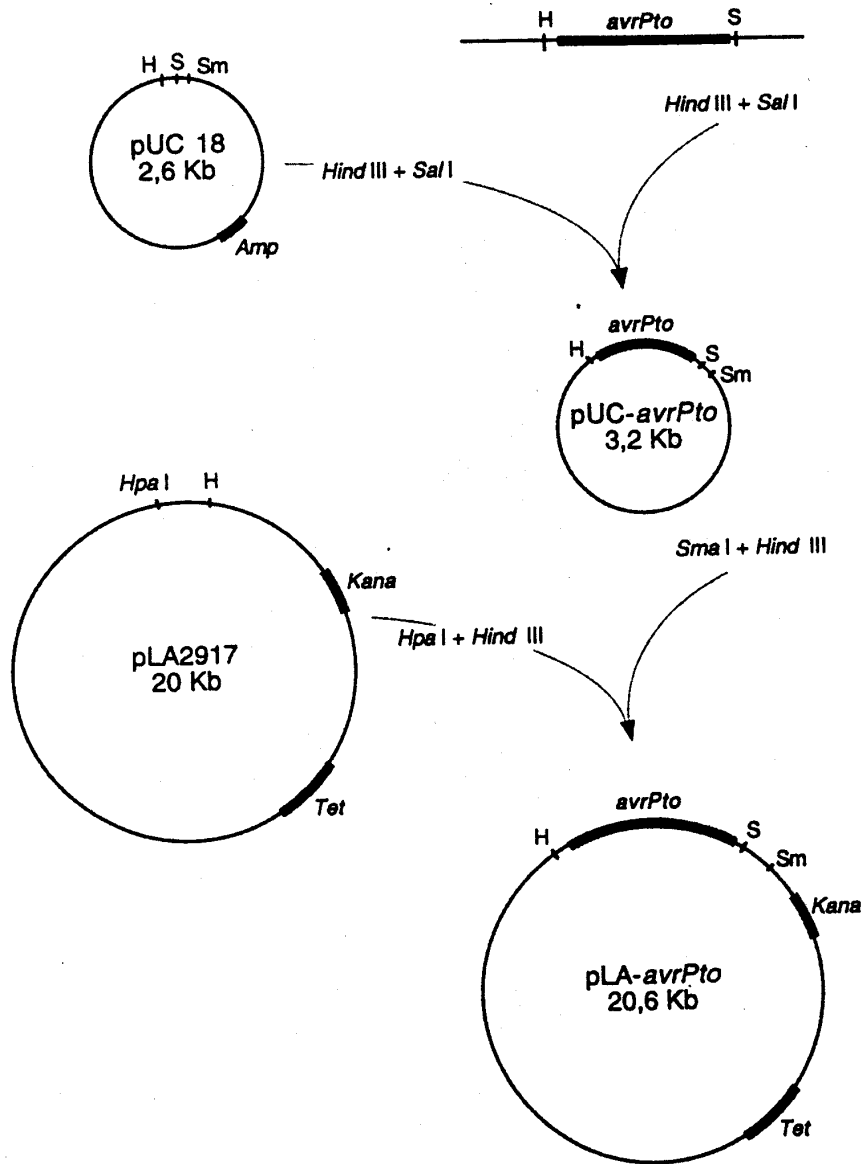
PT23 حاصل از آغازگرهای PTO1 و PTO2، نتیجه هضم آنزیمی این قطعه ژن شامل ۲ - با آنزیم محدود کننده *Sall* (قطعه

بیماری‌زایی بودن جدایه‌های وحشی *Pss* و *Psp* بر روی گوجه فرنگی نیز بخاطر داشتن سیستم شناسایی ژن از برای ژن از نوع *avrPto/Pto* مانند حالت نژاد صفر *Pst* روی رقم مقاوم کاستون نبود بلکه بدین علت بود که گیاه گوجه فرنگی اصولاً میزبان این پاتوارهای *P.syringae* نمی‌باشد. حال در این صورت اینطور می‌توان فرض نمود که این پاتوارها فاقد سیستم بیماری‌زایی جهت بوجود آوردن علائم بیماری بر روی گیاه گوجه فرنگی می‌باشند ولی بر روی گیاهان میزبان خود دارای این سیستم می‌باشند. اما سیستم شناسایی ژن از برای ژن که یک مکانیسم دفاعی برای گیاه محسوب می‌شود ربطی به گیاه میزبان و یا غیر میزبان ندارد و کافی است که سلولهای باکتری پاتوژن دارای ژن غیر بیماری‌زایی باشند و قادر شوند ژن مقاومت در گیاه میزبان و غیر میزبان خود را شناسایی نمایند و لذا از تکثیر آنها در درون بافتهای گیاهی جلوگیری بعمل آید.

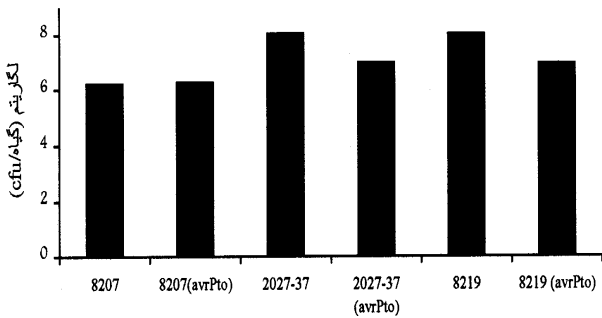
محققین دیگر نیز به نقش مهم تأثیر متقابل ژن از برای ژن بر روی میزان تکثیر باکتری روی گیاه برای (۵) *P.s.pv.pisi*، (۲۱) *P.s.pv.syringae* اثبات نموده‌اند. با وجود این، کارهای این محققین بر اساس تزریق سوسپانسیون باکتری در داخل بافتهای برگ و تکثیر سلولهای باکتری در فضای سلولی بر روی گیاه میزبان باکتری انجام گرفته است. در شرایط بررسی‌هایی که انجام شد، تکثیر جدایه‌های وحشی و نو ترکیب *P.syringae*

روی

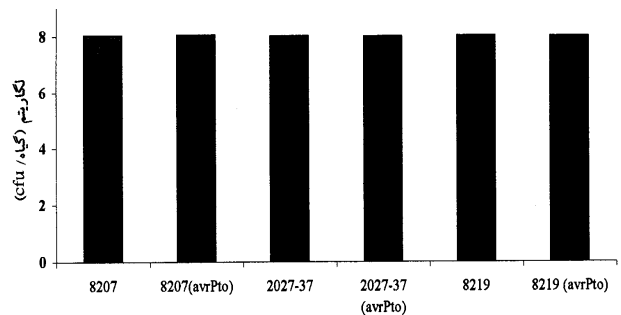
Archive of SID



شکل ۴- چگونگی ساخت پلاسمیدهای نو ترکیب pUC avrPto و pLA avrPto



شکل ۶- دینامیزم جمعیت (جدایه ۸۲۰۷) Pst و (جدایه ۲۰۲۷-۳۷) و جدایه Psp (۸۲۱۹) و جدایه‌های نو ترکیب (pLAavrPto) آنها بر



شکل ۵- دینامیزم جمعیت (جدایه ۸۲۰۷) Pst و (جدایه ۲۰۲۷-۳۷) و جدایه Psp (۸۲۱۹) و جدایه‌های نو ترکیب (pLAavrPto) آنها بر روی رقم حساس (Pto) Cannery row گوجه فرنگی، ۲۱ روز بعد از کشت بذر

تهاجم جدایه‌ها در بوجود آوردن علائم بیماری نداشت. بنابراین می‌توان چنین فرض نمود که رشد طولی گیاهان گوجه فرنگی بعد از مایه زنی جدایه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب pLAavrPto به میزان کمتری در کاهش رشد طولی بوته‌ها در مقایسه با جدایه‌های وحشی و نوترکیب Pst تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در شرایطی که رقم حساس گوجه فرنگی با جدایه‌های وحشی Pst مایه زنی شدند نتایج نشان داد که ترکیبات بیماریزایی بلافاصله بعد از زدن بذر وارد عمل شد و باعث بوجود آوردن علائم بیماری بر روی گیاه می‌شوند.

روی رقم حساس caston (Pto) گوجه فرنگی، ۲۱ روز بعد از کشت بذر

گیاه میزبان و غیر میزبان از طریق مایه زنی بذرسورت گرفت و این جدایه‌ها توانستند در سطح گیاه به راحتی تکثیر نمایند. تأثیر تئوری ژن از برای ژن همچنین بر روی رشد طولی گیاه هم قابل مشاهده بود. رشد بر روی گیاهان مقاوم که با جدایه‌های وحشی و جدایه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب-pLAavrPto مایه‌زنی شده بودند اختلاف معنی داری وجود داشت با وجود این اثرات متقابل ژن از برای ژن هیچگونه تأثیری بر روی

## REFERENCES

1. Bartlett, M. 1937. Properties of sufficiency and statistical tests. Proc. Roy.Soc. London Series, S., 160 : 268-282.
2. Chun-Keun, L. and D.A. Cooksey. 1993. Charectrization of chromosomal homologs of the plasmid-born copper resistance operon of *Pseudomonas syringae*. J. Bacteriol. 14 : 4492-4498.
3. Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multilpe of test. Biometric. 11 : 1-42.
4. Flor, H.H.1956. The complementary genetic system in flax and flax rust.Genetic. 8 : 29-54.
5. Grondeau, C., A. Mabiala, R. Ait- Oumeziane, and R. Samson. 1996.Epiphytic life is the main characteristic of the life cycle of *Pseudomonas syringae* pv.*pisi* pea bacterial blight agent. Europ. J. Plant Pathology. 102: 353-363
6. Hanhan, D. 1983. Study on transformation of *E. coli* with plasmids. Journal of Molecular Biology. 166 : 557-580.
7. He, S.Y. Bauer, D.W. Collmer, A. and S.V. Beer. 1994. Hypersensitive respons elicited by *Erwinia amylovora* harpin requires active plant metabolism. Mol. Plant-Microbe Interaction. 34 : 415-426.
8. Keen, N.T. and B.Stasckawicz. 1988. Host range determinants in plant pothogens and symbiots. Annu. Rev. Microbiology. 42 : 421-440.
9. Kobayashi, D.Y. Tamaki, S. Trollinger, D.j. Gold, S. and N.T. Keen. 1990.A gene from *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* with homology to avirulence gene D from *P.s.pv. tomato* but devoid of the avirulence phenotype.Mol. Plant-Microbe Interaction. 3 : 103-111.
10. King, E.O., Ward, M.K., and D.E.Raney.1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J.Lab. Clin. Medic. 44 : 301-307.
11. Lorang, J.M., and N.T. Keen.1994. Characterization of *avrE* from *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* : A *hrp* linked avirulence locus consisting of a at least two transcriptional units. Mol. Plant-Microbe Interaction. 1:49-57.
12. Martin, G.B. 1994. Analysis of the molecular basis *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* resistance in tomato. Euphytica, 79:187-193.
13. Maniatis, T., E.F. Fritsh and J. Sambrook. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory.
14. Niknejad, M. 1998. Caractere epiphyte et endophyte de la colonisation de la tomate par *Pseudomonas syringae* et etude du role des composant du pouvoir pathogene dans la survie et la multiplication des bacteries *in planta*. These. INA-PG. France. 136 p.
15. Pilowski, M. and D. Zutra. 1986. Reaction of different tomato genotypes to the bacteria speck pathogen (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*).Phytopathologica. 14 :39-42.
16. Pitbaldo, R.E. and J. MacNeil. 1983. Genetic basis of resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in field tomato. Cannd. J. Plant. Pathol. 5:251-255.

17. Ronal, P.C., J.M. Salmeron and B.J. Staskawicz. 1992. The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivar containing *Pto* resistance gene. J. Bacteriol. 174: 4604-1611.
18. Salmeron, J.M., S.J. Baker, A.Y. Carland, A. Mehta and B.J. Staskawicz. 1994. Tomato mutants altered in bacterial disease resistance provide evidence for a new locus controlling pathogen recognition. Plant Cell. 6: 511-520.
19. Stockinger, E.M. and L.L. Walling. 1994. *Pto3* and *Pto4*: novel genes from *Lycopersicon esculentum* var. *globatrum* that confer resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Theor. Appl. Genetic. 89 : 879-884.
20. Tobis, C.M., C.E.D. Oldroyd, J.H. Chang and B.J. Staskawicz. 1999. Plant expression the *Pto* disease resistance gene confers resistance to recombinant PVX containing the avirulence gene *avrPto*. Plant Cell. 17 : 41-50.
21. Yessad, S., C. Manceau and J. Luisetti. 1992. A detached leaf assay to evaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Plant Dis. 76 : 370-373.

Archive of SID

## The Interactive Effect of *Pto/avrPto* Genes on Epiphytic Colonization Fitness of *Pseudomonas syringae*

M. NIKNEJAD KAZEMPOUR<sup>1</sup> AND H. JAHANDIDEH KODEHI<sup>2</sup>

1, Assistant Professor, Plant Pathology Dept., Faculty of Agriculture, University of Guilan  
2, Instructor, Agronomy Dept., Faculty of Agriculture, University of Guilan  
Accepted Oct., 30, 2002

### SUMMARY

Resistance of plant to a wide variety of diseases depends on pathogen avirulence host resistance genes pair. In the present research *avrPto* genes were cloned on plasmid pLA2917 and then recombinant *avrPto* transferred to wild isolates of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *P.s.* pv. *phaseolicola* and *P.s.* pv. *syringae* by electroporation method. Then susceptible variety, cannery row (without *Pto* resistant genes) and resistant variety, caston (with *Pto* resistant gene) of tomato were inoculated by wild isolates and the isolates having pLA(*avrPto*) recombinant plasmid. The results indicate that there is no significant difference in bacterial population dynamics on susceptible variety between wild isolates having recombinant plasmid. However, these isolates significantly differ on the bacterial population dynamics on resistant variety. The effect of gene for gene theory was also noted on growth length of the plant. The growth length was significantly higher in resistant plant inoculated by recombinant plasmid isolates than those inoculated by wild isolates. On the whole, it is suggested that, in both cases, i.e. compatibility and incompatibility, the bacteria colonizes tomato plant but in a lower level in incompatible than in compatible interaction under field conditions.

**Key words:** Tomato, Avirulence, *avrPto/Pto*, *Pseudomonas syringae*, Epiphytic, Population dynamics, Plasmid.

Archive