Archive of SID

مطالعه بقاء باکتری *Pseudomonas syringae* در گیاه و خاک*

مصطفی نیک‌نژادکاظم‌پور[1]

چکیده

باکتری *Pseudomonas syringae* یکی از گونه‌های باکتریهای بیماریزا می‌باشد که دارای تنوع زیاد ژنتیکی، فیزیولوژیکی و بیولوژیکی می‌باشد. در این تحقیق، مقاومت *P.s.* pv.*syringae* و *P.s.* pv.*tomato* تحت شرایط خشک و مرطوب مورد بررسی قرار گرفت. هر دو این باکتریها نسبت به خشکی بسیار حساس بوده بطوریکه قادر نمی‌باشند تحت شرایط خشک بیش از سه روز بر روی سطح مواد بی جان نظیر کاغذ صافی، کاغذ تفلون و همچنین بر روی بذر گوجه‌فرنگی زنده باقی بمانند. انواع مواد مایه‌زنی که بکار گرفته شد در شرائط رطوبت نسبی پایین به مرگ سریع سلول‌های باکتری منجر می‌شد. ژنهای *hrp* که نقش بسیار مهمی در تکثیر باکتری دارند ولی در بقاء *P.syringae* هیچگونه نقش قابل ملاحظه‌ای از آنها بر روی بذر و مواد بی جان مشاهده نگردید. با وجود این، بعد از جوانه زدن بذر و ظهور گیاهچه، دینامیزم جمعیت جدایه‌های موتان *hrp* بطور معنی‌داری به میزان پایین‌تری نسبت به جدایه‌های وحشی خود بودند. انتقال *P.s.* pv.*tomato* بوسیله بذر بسیار پایین می‌باشد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که انتقال *P.s.* pv.*tomato* از سالی به سال دیگر می‌تواند از راههای دیگر نظیر آلودگی خاک و بقایای گیاهی صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: گوجه‌فرنگی، بقاء، *Pseudomonas syringae*، ژن‌های *hrp*، بذر، خاک، دینامیزم‌جمعیت، PCR

مقدمه

بیماری خال زدگی گوجه‌فرنگی در اثر *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* برای اولین بار در تایوان توسط اکابه (۱۶) گزارش شد و سپس در امریکا این بیماری توسط برایان (۵) مشاهده و گزارش گردید. در ابتدا این بیماری بعنوان یک بیماری کم اهمیت تصور می‌شد (۲) ولی کانون‌های بیماری در اکثر مزارع گوجه‌فرنگی در جنوب و شمال امریکا مشاهده گردید. میزان کاهش محصول در امریکا به ۱۲٪ می‌رسد(۸). در ایران بیماری خال زدگی گوجه‌فرنگی در مزارع گوجه‌فرنگی ورامین توسط شهریاری و رحیمیان (۱) گزارش گردید. این بیماری باعث کاهش ارزش کیفی و کمی محصول در اکثر مزارع گوجه‌فرنگی در جهان می‌شود(۳، ۱۰). در فلسطین اشغالی این بیماری وقتی که آلودگی اولیه از طریق بذر صورت گیرد باعث از بین رفتن کامل محصول می‌شود (۸). جونز و همکاران (۱۱) باکتری *P.s.*pv. *tomato* بر روی بذر تعداد زیادی از ارقام گوجه‌فرنگی جداسازی و شناسائی نمودند و اظهار داشتند که اگر آلودگی اولیه در بیماری خال زدگی گوجه‌فرنگی ازطریق بذر صورت گیرد باکتری قادر است از سالی به سال دیگر بوسیله بذر منتقل شود. با وجود این، نتایج کارهای چامبر مریمن (۶) نشان داد که در برخی از مزارع گوجه‌فرنگی آلوده به بیماری خال زدگی، پس از استخراج بذور از میوه‌های آلوده، هیچگونه سلول باکتری *P. s.* pv. *tomato* جداسازی نشد. کولین و مهتاج (۷) گزارش کردند که بقاء *P. s.* pv. *tomato* بر روی بذرهای گوجه‌فرنگی بستگی به شرایط محیطی دارد و در شرائط رطوبت نسبی پایین باکتری قادر نیست بین دو فصل رشد بر روی بذر بقاء یابد.این گزارشات باعث می‌شود که تولید کنندگان بذر گوجه‌فرنگی یک روش مناسبی را جهت مبارزه با این بیماری برای تولید بذر گواهی شده و عاری از باکتری

*- تاریخ دریافت ۷۹/۷/۴ تاریخ پذیرش ۸۰/۷/۷

۱- استادیار گروه گیاهپزشکی،دانشکده علوم‌کشاورزی،دانشگاه گیلان.

www.SID.ir

Archive of SID

اتخاذ نمایند. در اغلب باکتری‌های بذرزاد محل‌های تجمع باکتری مورد مطالعه قرار گرفته است. تایلور و همکاران (۱۷) تجمع *P. s.* pv. *phaseolicola* بر روی بذر لوبیا را در زیر پوسته داخلی بذر گزارش نمودند. بذر زاد بودن *P.s.* pv.*syringae* بر روی تعداد زیادی از ارقام گندم (۱۴) و سویا (۱۵) گزارش شده است. در این تحقیق شرایط محیطی مناسب تحت شرائط آزمایشگاه و مزرعه جهت بقاء *Pseudomonas syringae* بر روی بذر و داخل خاک و بقایای گیاهی مورد مطالعه گرفته و همچنین ارائه روشی مطمئن جهت تشخیص *Pseudomonas syringae* با استفاده از روش بیولوژی مولکولی بر روی بذر، بقایای گیاهی و در داخل خاک مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق جهت مطالعه بقاء باکتری *Pseudomonas syringae* پاتوارهای *P.s.* pv. *tomato* (جدایه‌های ۸۲۰۷ و موتان *hrp* آن ۸۲۰۸) و *P.s.*pv.*syringae* (جدایه‌های ۳۷-۲۰۲۷ و موتان *hrp* آن ۱-۸۸) مورد استفاده قرار گرفت. همچنین یک جدایه از *P. flourescens* نیز بکار گرفته شد.

۱ـ آماده کردن ماده مایه‌زنی

در این تحقیق ۵ نوع ماده مایه‌زنی مورد آزمایش قرار گرفتند:

استفاده از سلول‌های باکتری بر روی محیط کشت M9 (Na_2HPO_4 ۶گرم، NH_4Cl یک گرم، KH_2PO_4 ۳گرم، NaCl ۰/۵ گرم و pH محیط برابر ۷/۴) در مرحله رشد لگاریتمی[1] و رشد ثابت[2] استفاده از سلول‌های باکتری بر روی محیط کشت (۱۲)، مرحله رشد لگاریتمی و رشد ثابت و استفاده از سلول‌های باکتری در عصاره آلوده گیاه حاصل از علائم بیماری.

۲ـ تهیه ماده مایه‌زنی از محیط کشت مایع

دو فلاسک بطور جداگانه از محیط‌های کشت مایع King B و M9 بوسیله یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری ۲۴ ساعت رشد یافته (جدایه ۱۴۲۷) *P.s.*pv.*tomato* تلقیح شدند. محیط کشت‌های مایه‌زنی شده در دستگاه تکان‌دهنده (۱۷۵ دور در دقیقه) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگه‌داری شدند. ۱۴ ساعت بعد از تلقیح، نوری محیط کشت در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۴۵ برسد (مرحله رشد نمو لگاریتمی) و ۲۴ ساعت بعد از تلقیح (مرحله رشد ثابت)، در هر مرحله ۱۰ میلی لیتر از هر محیط کشت را برداشته و آنها را به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ می‌نمائیم. رسوب بدست آمده را در ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سترون (KH_2PO_4 ۰/۳۳ گرم، $Na_2HPO_4\ 12H_2O$ ۲/۶۶ گرم، NaCl ۸/۱۸ گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر و pH محیط برابر ۷) اضافه می‌نمائیم. چگالی نوری سوسپانسیون بدست آمده را بوسیله بافر فسفات در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۴۵ می‌رسانیم تا یکسری رقت‌های یک دهم الی یک میلیونیوم بوسیله آب مقطر سترون بدست آید. سپس جهت تعیین تعداد سلول باکتری زنده در سوسپانسیون باکتریائی بر روی محیط KingB کشت می‌نمائیم.

۳ـ تهیه ماده مایه‌زنی از روی برگ‌های دارای علائم بیماری

یک ماه بعد از کشت گوجه‌فرنگی در گلخانه، آنها را به اطاقک کشت با یک دوره نوری ۱۶ ساعت روز در ۲۷ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت شب در ۸ درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۹۵٪ درصد قرار میدهیم. جهت مایه‌زنی برگها از سوسپانسیون باکتری ۲۴ ساعته با غلظت 10^8 cfu[3] (واحد تشکیل‌دهنده کلنی) استفاده می‌نمائیم برای هر سری از مایه‌زنی یک شاهد در نظر گرفته می‌شود (مایه‌زنی با آب مقطر). هفت روز بعد از مایه‌زنی یک برگچه گوجه‌فرنگی را که دارای علایم مشخص بیماری می‌باشد در دو میلی‌لیتر بافر PBS له می‌نمائیم. عصاره آلوده بدست آمده را بمدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در

1- Exponential 2- Stationary
3- Colony forming unit

www.SID.ir

Archive of SID

دقیقه سانتریفوژ می‌گردد. رسوب بدست آمده را در ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات قرار داده و ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون بدست‌آمده را جهت شمارش باکتری با یکسری رقت‌های از یک دهم الی یک میلیونیوم در آب مقطر سترون استفاده می‌نمائیم و ۱/۵ میلی‌لیتر باقی مانده جهت ماده مایه‌زنی بذر بکار گرفته می‌شود.

۱-۳- مایه‌زنی

برای مطالعه بقاء باکتری ،سه نوع ماده جهت مایه‌زنی بکار گرفته شد .

الف - بذر گوجه‌فرنگی رقم کانری‌رو[1]

ب - دیسک‌های کاغذ صافی

ج - دیسک‌های تفلون

بذرهای گوجه‌فرنگی بوسیله هیپوکلریت سدیم (۶ درجه کلر) به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و بدنبال آن سه بار (هر بار ۱۰ دقیقه) با آب مقطر سترون شستشو داده شدند و جهت خشک شدن بر روی کاغذ صافی سترون به مدت ۳۰ دقیقه در اطاقک رشد قرار داده شدند. دیسک‌های تفلون و کاغذ صافی ابتدا در آب مقطر سترون شستشو داده شدند و سپس در اسید کلریدریک ۰/۱ مولار به مدت سه دقیقه قرار داده شدند و دوباره با آب مقطر سترون به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند و در نهایت به مدت ۳۰ دقیقه در اتوکلاو و ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد سترون شدند.

۴- مایه‌زنی بذرهای گوجه‌فرنگی

بذرهای گوجه‌فرنگی به مدت ۲ ساعت در سوسپانسیون رشد ۲۴ ساعته باکتری با غلظت تقریبی 10^8 cfu قرار داده شدند و سپس جهت خشک شدن ،بر روی کاغذ صافی سترون انتقال داده شدند .برای سایر مواد ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری در قسمت وسط دیسک‌های تفلون و کاغذ صافی قرار داده شد .

۱-۴- اعمال تیمارها بعد از مایه‌زنی بوسیله باکتری

روش‌های زیر بر روی تیمارها اعمال گردیدند:

الف - خشک کردن آهسته مواد تلقیح شده به مدت ۲ ساعت در اطاقک رشد

ب - خشک کردن سریع مواد مایه‌زنی شده به مدت ۳۰ دقیقه در ۲۵ درجه سانتی گراد در اطاقک رشد همراه با جابجائی سریع هوا

ج - بدون خشک‌کردن مواد مایه‌زنی شده

بذرهای گوجه‌فرنگی و دیسک‌های تفلون و کاغذ صافی را داخل پلاک‌های سوراخ‌دار قرار می‌دهیم. جهت ایجاد شرایط مرطوب درپوش پلاکها را یک کاغذ صافی مرطوب گذاشته و برای شرایط خشک درپوش پلاک را بدون کاغذ صافی مرطوب قرار میدهیم .پلاکها را به مدت الی ۸ روز در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌نمائیم .

۲-۴- استخراج و شمارش باکتری‌ها

هر حامل[2] بطور جداگانه آنالیز شد. هر بذر در داخل میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری محتوی ۰/۷ میلی لیتر آب مقطر سترون قرار داده شده و بوسیله پنس سترون بذرها له گردیدند. هر دیسک تفلون و کاغذ صافی در لوله آزمایش محتوی ۴/۵ میلی لیتر محیط کشت مایع LP (عصاره مخمر ۷ گرم ،باکتوپپتون ۷گرم، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی‌لیتر، pH= ۷) قرار گرفتند و سپس بر روی دستگاه تکان دهنده به مدت ۲ دقیقه آن را تکان داده شوند.

سوسپانسیون مادر را به مقدار یک صدم رقیق مینمائیم و سپس بطور جداگانه ۵۰ میکرولیتر از آنها را بر روی محیط کشت King B محتوی آنتی بیوتیک اکتیدیون با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر در دو تکرار کشت گردیدتا در زمان لازم مورد استفاده قرار گیرد. بعد از نگه‌داری در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت، شمارش کلنی‌های فلورسنت در زیر نور ماوراء بنفش بر روی محیط کشت انجام گرفت. تعداد سلول‌های باکتری جداشده بر روی هر محافظ بوسیله فرمول زیر محاسبه شد.

1- Cannery row 2- Support

www.SID.ir

Archive of SID

$N=X.V.D\times20$

تعداد سلول‌های باکتری جداشده روی هر حامل = N

تعداد کلنی‌های شمارش شده از روی هر رقت = X

فاکتور رقیق کردن = D

برای هر حجم مایع (۰/۷میلی‌لیتر برای بذر، ۴/۵لیتر = دیسک) = V

میانگین‌ها داده‌های حاصله را بوسیله آزمون چنددامنه‌ای دانکن(۹) با یکدیگر مقایسه می‌نمائیم.

۵ـ آلوده کردن خاک

آلوده کردن خاک بوسیله کشت بذر مایه‌زنی شده گوجه‌فرنگی در سوسپانسیون باکتری با غلظت تقریبی 10^8 cfu (جدایه ۸۲۰۷) *P.s.*pv.*tomato* و جدایه (۲۰۲۷-۳۷) *P.s.*pv. *syringae* انجام گرفت. چهارماه بعد از کشت بوته‌های گوجه‌فرنگی آلوده شده از خاک کنده شدند و قسمت‌های هوائی بریده شده در شرایط طبیعی به مدت چهار ماه در خارج از گلخانه نگه داری شدند تا کاملاً خشک شوند سپس جهت مطالعه بقاء باکتری در بقایای گیاهی خشک شده، مورد تجزیه قرار گرفتند.

خاک گلدانها نیز به مدت یکسال در شرایط طبیعی نگه‌داری شدند و سپس جهت مطالعه بقاء باکتری در خاک از آنها نمونه‌برداری بعمل آمد.

۶ـ تشخیص و جداسازی باکتری *P.syringae* در داخل خاک

۱-۶ـ جداسازی باکتری در داخل خاک بوسیله گیاهان تله‌ای

یکسال بعد از قرار گرفتن گلدانهادر معرض شرایط طبیعی، آنها را به مدت سه روز در اطاقک رشد (۱۶ ساعت روز دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و ۸ ساعت شب در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد)با رطوبت نسبی ۹۵ درصد قرار داده شدند. سپس بذرهای سالم و ضدعفونی سطحی شده گوجه‌فرنگی را در داخل گلدان‌ها کشت می‌نمائیم. ۱۴۰ روز بعد از اینکه گیاهان گوجه‌فرنگی به مرحله دو برگی رسیدند. بر روی گوجه‌فرنگی‌های آلوده تحقیق جهت شناسایی *P.s.*pv.*tomato* و *P.s.* pv. *syringae* انجام گرفت.

گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی بطور جداگانه در پلاستیک‌های استوماشر[1] سترون محتوی یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون قرار گرفتند و سپس بوسیله غلطک کاملاً له شدند. نیم میلی لیتر از عصاره بدست‌آمده جهت تهیه رقت‌های مختلف از یک دهم تا یک میلیونیوم در آب مقطر سترون استفاده گردید. ۵۰ μl (میکرولیتر) از هر وقت بروی محیط kingB محتوی آنتی‌بیوتیک اکتیدیون با غلظت ۵۰ $\mu g/ml$ (میکروگرم در میلی لیتر) کشت گردید. برای هر رقت ۲ تکرار در نظر گرفته شد.

بعد از نگه‌داری در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت شمارش کلنی‌های فلورسنت در زیر نور ماوراء بنفش بر روی محیط کشت انجام گرفت. همچنین کلنی‌های باکتری جهت تشخیص با روش PCR[2] برداشت شدند. در روش تشخیص بوسیله PCR از جلوبرهای کاملاً اختصاصی برای شناسائی *P.s.*pv.*tomato* و *P.s.*pv.*syringae* استفاده گردید.

۲-۶- تشخیص مستقیم بوسیله PCR

تشخیص بوسیله روش مستقیم PCR، بر روی بافت‌های زنده گیاهی ،بقایای خشک گیاهی و خاک صورت گرفت. یک گرم از هر نمونه در یک پلاستیک استوماشر محتوی یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون قرار داده شده و بوسیله غلطک کاملاً له گردیدند. ۰/۹ میلی‌لیتر از عصاره بدست آمده در میکروکلون ناسل[3] قرار داده شد سپس میکروکلون به مدت ۱۵ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب بدست آمده را در ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز (Tris یک مولار ۲۰ میلی‌لیتر، NaCl ۱۵ مولار ۵ میلی‌لیتر، EDTA نیم مولار ۵ میلی‌لیتر، SDS ۰/۵ گرم، PVP ۲ گرم، آب مقطر سترون ۷۰ میلی‌لیتر)، ۹۰۰ میکرولیتر بافر نمکی[4] (Na_2SO_3) ۰/۷۵گرم، NaI ۳۶ گرم، آب مقطر ۴۰ میلی لیتر) و ۱۰

1- Stomachaire
2- Polymerase Chain Reaction
3- Microcolonne nacelle4- salt buffer

www.SID.ir

Archive of SID

میکرولیتر سیلیس (سیلیس ۶۰ گرم، آب مقطر ۴۰ میلی لیتر در pH= ۲) اضافه گردید و به مدت ۵ دقیقه در شرائط آزمایشگاه نگه‌داری شد. با انجام سانتریفوژ به مدت ۵ تا ۱۰ ثانیه سیلیس رسوب داده می‌شود. رسوب بدست آمده در یک میلی لیتر بافر شستشو[1] (Tris یک مولار یک میلی لیتر ، EDTA نیم مولار یک میلی لیتر، NaCl ۵ مولار ۱۰ میلی لیتر، آب مقطر سترون ۵۰۰ میلی‌لیتر) حل گردید. مجدداً سیلیس مانند پروسه قبل رسوب داده شد. رسوب بدست آمده جهت خشک شدن به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داری شد و سپس در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل گردید. بعد از نگه‌داری به مدت ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید.

قسمت رویی را که در واقع DNA خالص شده می‌باشد جهت استفاده در روش PCR برداشت شد. DNA خالص شده قبل از استفاده PCR بایستی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد نگه داری شود. ۵ میکرولیتر از DNA خالص شده را در میکروتیوپ قرار داده و به آن ۵ میکرولیتر ماده Gen Releser اضافه می‌کنیم یک شاهد مثبت (سوسپانسیون *P.s.*pv. *tomato* و یا *P.s.* pv. *syringae* با غلظت 10^7 cfu/ml و یک شاهد منفی (آب مقطر سترون) در نظر گرفته شد.

دو قطره روغن معدنی مایع بر روی هر نمونه آزمایش اضافه شده و سپس لوله‌های حاوی نمونه‌ها جداگانه در دستگاه PCR قرار داده شدند و برنامه مخصوص به دستگاه PCR داده شد. بعد از پایان یافتن برنامه PCR، ۴۰ میکرولیتر از پرمیکس[2] شامل (۲ میکرولیتر از جلوبرهای[3] اختصاصی، ۲ میکرولیتر dNTP، ۵ میکرولیتر بافر ۱۰ بار غلیظ شده، کلرور منیزیم ۲۵ میلی مولار ۳ میکرولیتر، ۱/. میکرولیتر Taq polymerase، آب مقطر سترون دو بار تقطیر شده[4] ۲۷/۹ میکرولیتر) به هر لوله اضافه گردید و با استفاده از دستگاه DNA PCR هر یک از جدایه‌های *P.s.*pv.*tomato* و *P.s.*pv. *syringae* تکثیر گردید. بعد از پایان یافتن تکثیر DNA باکتری میزان ۱۰ میکرولیتر از هر تیوپ را برداشته و بر روی ژل آگاروز[5] ۲ درصد در داخل بافر TBE (Tris/base ۸ گرم، اسیدبوریک ۵/۵ گرم، EDTA با pH = ۸ نیم مولار و آب مقطر سترون ۱۰۰۰ میلی لیتر) قرار میدهیم. سپس ژل آگاروز را در دستگاه الکتروفورز با جریان ۱۰۰ ولت جهت حرکت DNA از قطب مثبت به منفی قرار میدهیم. بعد از اتمام الکتروفورز ژل آگاروز[5] را در اتیدیوم بروماید[6] (۱۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر) به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و سپس جهت رؤیت باندهای DNA، ژل در زیر نور ماوراء بنفش بررسی شد.

تمامی باندها که در سطح شاهد مثبت قرار گرفته‌اند بعنوان تیمار مثبت در نظر گرفته می‌شود میزان پررنگ بودن باندها رابطه مستقیمی با میزان سلول‌های باکتری در هر نمونه دارد.

۳-۶- هضم آنزیمی قطعه DNA تکثیر شده بوسیله PCR:

جهت مطالعه حضور محل‌های آنزیمی، قطعه تکثیر شده DNA بوسیله آنزیم‌های *Bsh* 1236I، *MSPI* هضم گردید. DNA موجود در آب مقطر را با اضافه نمودن $\frac{1}{10}$ حجم آن استات سدیم مولار با pH= ۵/۵ و ۲/۵ برابر حجم آن اتانول خالص ته‌نشین می‌نمائیم و سپس قطعه DNA را به مدت ۱۲ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ نموده تا کاملاً رسوب نماید. رسوب بدست آمده را در دستگاه‌خشک‌کن[7] به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده تا خشک شود. رسوب DNA را در ۲۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل می‌کنیم. جهت عملیات هضم آنزیمی یک میکروتیوپ ۵ میلی لیتر از DNA را با ۱۴ میلی لیتر بافر فعال کننده آنزیم و یک میکرو لیتر آنزیم ۱۰ واحد (*MSPI* و *Bsh 1236 I*) با هم مخلوط نموده و سپس میکروتیوپها

1- washing buffer
2- premix
3- primer
4- ultra pure
5- agarose
6- ethidium bromide
7- evaporateur rotatif

www.SID.ir

Archive of SID

حاوی محلولها را به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد نگه داری می‌نمائیم. جهت غیر فعال کردن آنزیم، لوله ها را به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و جهت رؤیت قطعه DNA هضم شده توسط آنزیمها آن را بر روی ژل الکتروفورز رزوفور[1] ۲ درصد در داخل بافر TBE قرار می‌دهیم.

۴-۶- جداسازی *P.syringae* بر روی محیط کشت KingB

جهت مطالعه بقاء باکتری بر روی گیاهچه گوجه‌فرنگی در خاک آلوده و همچنین بقایای خشک گیاهی، یک گیاهچه ۲ برگه گوجه‌فرنگی و یک گرم بقایای آلوده را بطور جداگانه در پلاستیک‌های استوماشر به ترتیب ۳ و ۱ میلی لیتر آب مقطر سترون قرار میدهیم و سپس بوسیله غلطک آنرا له می‌نمائیم. از عصاره بدست آمده به وسیله آب مقطر سترون رقت‌های یک دهم تا یک میلیونیوم را تهیه می‌نمائیم. ۵۰ میکرولیتر از هر رقت را در ظرف پتری محتوی محیط کشت KingB همراه با آنتی بیوتیک اکتیدیون با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر قرار میدهیم. سپس تشتک‌های پتری را به مدت ۴۸ ساعت در ۲۷ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری می‌نمائیم و کلنی‌های فلورسنت را در زیر نور ماوراءبنفش شمارش نموده و تشخیص کلنی‌های *P.s.*pv. *tomato* و *P.s.*pv.*syringae* بوسیله روش PCR با استفاده از جلوبرهای اختصاصی کنترل می‌نمائیم.

نتایج

۱- بقاء باکتری بر روی مواد بی‌جان

۱-۱- مقایسه بقاء چندگونه باکتری بر روی دیسک‌های تفلون

بقاء چند گونه باکتری که قادر بودند بذر گوجه‌فرنگی را آلوده نمایند بر روی دیسک‌های تفلون مورد بررسی قرار گرفتند. گونه‌های باکتری شامل گونه بیماریزا *Pseudomonas syringae* pv.*tomato* و *P.s.*pv. *syringae* و گونه غیر بیماریزا *P. flourescens* و *Stenotrophomonas maltophilia* می‌باشد. دینامیزم بقاء این گونه‌ها در شرایط خشک و مرطوب بکار رفته در این آزمایش یکسان بود.

در ابتدا میزان جمعیت طبیعی *S.maltophilia* بر روی بذر گوجه‌فرنگی بیشتر از آلودگی مصنوعی بود که بوسیله *P.s.*pv.*tomato* و *P.s.*pv. *syringae* بر روی بذر صورت گرفته بود. در شرایط مرطوب، دینامیزم جمعیت باکتری بطور یکنواختی به مدت یک هفته کاهش پیدا نمود. این کاهش میزان جمعیت به اندازه یک واحد لگاریتم در طی ۷ روز بعد از مایه‌زنی بود. در شرایط خشک تمامی سلول‌های باکتری بر روی دیسک‌های تفلون سریعاً از بین می‌روند بطوریکه بعد از دو روز هیچ کلنی باکتری بر روی محیط کشت king B تشخیص داده نشد.

۱-۲- بقاء *P.syringae* و موتان‌های *hrp* بر روی دیسک‌های تفلون و کاغذ صافی

بر روی دیسک‌های تفلون و کاغذ صافی که در شرایط مرطوب نگه‌داری شدند جدایه‌های وحشی pv.*tomato* و *P. s.* pv.*syringae* و موتان‌های *hrp* آنها در طی مدت ۶ روز دارای دینامیزم جمعیت یکسان بودند. میزان سلول‌های باکتری که بعد از مایه‌زنی به دیسکها چسبیدند 10^6 cfu تا 10^7 باکتری در هر دیسک بود که بعد از یک هفته به 10^5 cfu تا 10^6 رسید. در شرائط خشک تمامی سلول‌های باکتری در جدایه‌های وحشی و موتان باکتری در مدت ۲۴ ساعت بر روی دیسک‌های تفلون و کاغذ صافی از بین رفتند (نتایج نشان داده نشد).

بعد از شستشو دیسک‌های تفلون و کاغذ صافی، جهت مطالعه امکان اینکه سلول‌های باکتری به دیسک‌های تفلون و کاغذ صافی چسبیده‌اند آنها را در محیط کشت مایع LP غوطه‌ور نمودیم و در ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت نگه‌داری شدند. بعد از کشت محیط کشت مایع LP بر روی محیط King B انتقال داده شدند در

1- Resophore

www.SID.ir

Archive of SID

هیچکدام از نمونه‌ها ،هیچ کلنی باکتری بر روی محیط کشت King B مشاهده نشد بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که هیچ سلول باکتری بر روی دیسک‌های تفلون و کاغذ صافی بر جای نمانده است و کاهش سریع جمعیت باکتری در شرائط خشک ناشی از مرگ سلول‌های باکتریائی بوده است نه چسبیدن آنها به دیسک‌های تفلون و کاغذ صافی بود.

۲- بقاء باکتری *Pseudomonas syringae* بر روی بذرگوجه‌فرنگی

۲-۱- جذب و بقاء باکتری بر روی بذرگوجه‌فرنگی

جهت مایه‌زنی بذرها از جدایه‌های مختلف باکتری سوسپانسیون تهیه گردید. جمعیت باکتری در سوسپانسیون بر حسب نوع ماده مایه‌زنی بین $۱۰^۸$ x ۵/۸ تا $۱۰^۸$ x ۶/۱ سلول باکتری بوده و جمعیت باکتری در محیط کشت مایع سلول باکتری در سطح خود جذب نمودند. جمعیت باکتری در محیط کشت مایع King B در مرحله رشد ثابت بر روی بذر گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده بودند پایین‌تر از سایر روش‌های تلقیح بوده و همچنین بقاء کمتری بر روی بذر نسبت به روش تلقیح در مرحله رشد لگاریتمی باکتری داشتند. در روش مایه‌زنی توسط غصاره آلوده گیاهی بقاء باکتری بر روی بذر بیشتر از روش مایه‌زنی در مرحله رشد نمو لگاریتمی و ثابت بر روی محیط کشت M9 بود.

۲-۲- مطالعه نقش ترکیبات بیماریزا در بقاء باکتری بر روی بذرهای گوجه‌فرنگی

۲-۲-۱- در شرایط خشک

بعد از اینکه بذرهای گوجه‌فرنگی بوسیله سوسپانسیون باکتری cfu $۴/۳\times۱۰^۸$ تعداد سلول زنده مایه‌زنی‌شدند و سپس بر روی کاغذ صافی سترون به آرامی خشک شدند. جدایه‌های موتان *hrp* و جدایه‌های وحشی *P.s.*pv.*syringae* به میزان یکنواختی بذرها را آلوده نمودند (شکل ۱) در میزان جمعیت باکتری بر روی بذر بعد از سه روز هیچگونه اختلاف معنی داری، بین جدایه‌های وحشی و موتان دیده نشد و بطور یکنواخت کاهش پیدا نمود. میزان جمعیت باکتری بر روی بذر بعد از سه روز به زیر حد تشخیص بر روی محیط کشت King B رسید. رطوبت نسبی جهت نگه داری بذر ۶۰ درصد بود (شکل ۱).

۲-۲-۲- در شرایط مرطوب

دو نوع بذر از نظر جوانه زدن مورد آزمایش قرار گرفت:

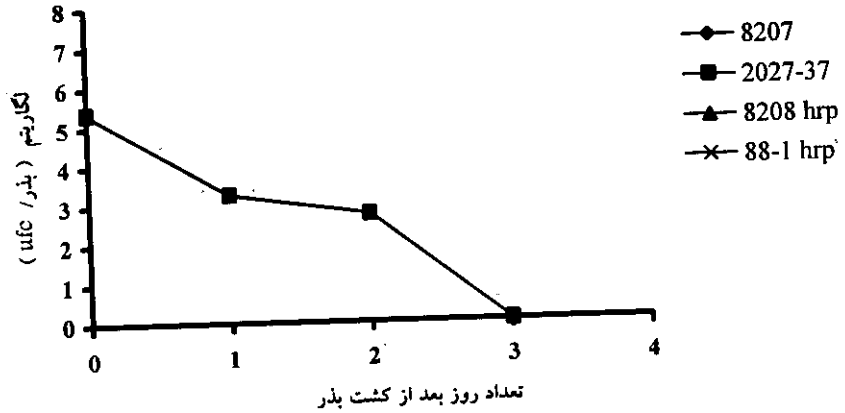
الف - بذرهایی که جهت از بین رفتن جوانه زنی با هیپوکلریت سدیم ۱/۲٪ بجای ۰/۶ ٪ ضد عفونی شدند. این بذرها در شرایط رطوبت نسبی ۱۰۰٪ نگهداری و توسط سوسپانسیون یا غلظت $۱۰^۸$ cfu/ml جدایه‌های پاتوژن و غیر بیماریزا مایه‌زنی شدند. دینامیک جمعیت باکتری‌های پاتوژن و غیر بیماریزا بر روی بذر بصورت یکنواخت با گذشت زمان کاهش می‌یابد بطوریکه بعد از ۷ روز به ۴×۱۰^۵ تا $۱/۵\times۱۰^۵$ cfu سلول زنده باکتری در هر بذر می‌رسد (شکل ۲).

ب- بذرهایی که با هیپوکلریت سدیم ۰/۶٪ ضد عفونی سطحی شدند بعد از سه روز در رطوبت نسبی ۱۰۰٪ جوانه می زنند. بذرها توسط سوسپانسیون جدایه‌های مختلف با غلظت cfu/ml $۵/۸\times۱۰^۸$ تا $۴/۱\times۱۰^۸$ سلول باکتریائی مایه‌زنی شدند. جمعیت‌های باکتری‌های جذب شده توسط بذر بین جدایه‌های موتان و وحشی هیچگونه تفاوت معنی‌داری نشان ندادند و بعد از جوانه‌زدن بذر، جمعیت جدایه‌های وحشی *P.s.*pv.*tomato* و *P.s.*pv.*syringae* بسیار سریعتر از جدایه‌های موتان آنها افزایش یافت (شکل۳).

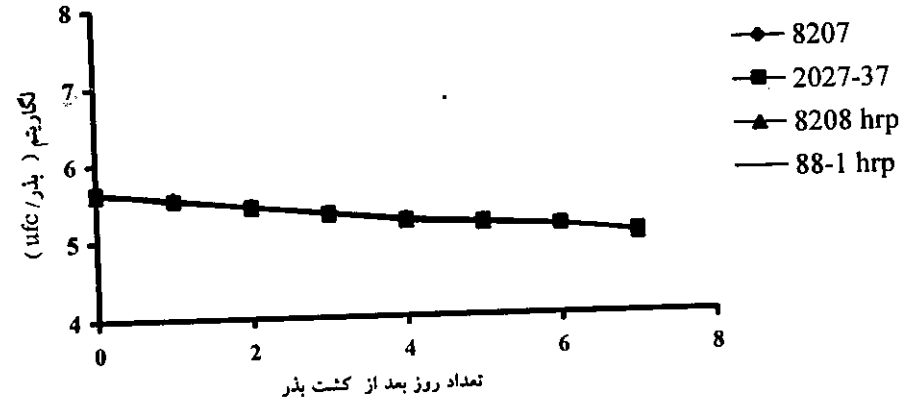
با وجود این، هیچگونه تفاوت معنی داری بین جدایه‌های وحشی ۲ پاتوار وجود نداشت همینطور هیچگونه تفاوت معنی‌داری هم بین جدایه‌های موتان ۲ پاتووار نیز مشاهده نشد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱ـ دینامیک بقاء جمعیت *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (جدایه وحشی ۸۲۰۷ و موتان *hrp* آن ۸۲۰۸) و *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (جدایه وحشی ۳۷-۲۰۲۷ و موتان *hrp* آن ۱-۸۸) بر روی بذر گوجه‌فرنگی تحت شرایط رطوبت نسبی ۶۰٪



شکل ۲ـ دینامیک بقاء جمعیت *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (جدایه وحشی ۸۲۰۷ و موتان *hrp* آن ۸۲۰۸) و *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (جدایه وحشی ۳۷-۲۰۲۷ و موتان *hrp* آن ۱-۸۸) بر روی بذر گوجه‌فرنگی تحت شرایط رطوبت نسبی ۹۰٪

www.SID.ir

Archive of SID

شکل ۳ـ دینامیک بقاء جمعیت *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (جدایه وحشی ۸۲۰۷ و موتان *hrp* آن ۸۲۰۸) و *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (جدایه وحشی ۳۷-۲۰۲۷ و موتان *hrp* آن ۱-۸۸) بر روی بذر گوجه‌فرنگی (ضدعفونی سطحی بذر با هیپوکلرید سدیم ۰/۶ درصد کلر) قبل و بعد از جوانه‌زدن بذور (گیاهچه)

۳- آلوده شدن میوه و بذر گوجه‌فرنگی بوسیله *P. syringae*

گیاهچه‌های دو برگی گوجه‌فرنگی بوسیله جدایه‌های *P.s.*pv.*syringae* (جدایه ۸۲۰۷ موتان *hrp* آن ۸۲۰۹) و (جدایه ۳۷-۲۰۲۷ و موتان *hrp* آن ۱-۸۸) مایه‌زنی شده بودند در اطاقک رشد با رطوبت نسبی ۹۵٪ به مدت ۶۰ روز نگه‌داری شدند، در این مدت میوه‌های گوجه‌فرنگی بر روی گیاه کاملا می‌رسند. میوه‌های رسیده بعد از برداشت جهت مطالعه میزان آلودگی با جدایه‌های وحشی و موتان *hrp* باکتری *P.syringae* بر روی گوشت میوه و بذر مورد آزمایش قرار می‌گیرد. جهت مطالعه میزان آلودگی باکتری بر روی بذر ۲ روش بکار گرفته شد.

الف - جستجوی باکتری بر روی بذر بلافاصله بعد از شستشو و جداشدن از گوشت میوه

ب - جستجوی باکتری بر روی بذر بعد از شستشو و جداشدن از گوشت میوه و خشک شدن بذر در شرائط طبیعی به مدت ۱۰ روز گوشت ۱۵ میوه گوجه‌فرنگی که با جدایه‌های وحشی *P.s.*pv.*tomato* (جدایه ۸۲۰۷) و *P.s.*pv.*syringae* (جدایه ۳۷-۲۰۲۷) مایه‌زنی شده بودند جدا گردیدند.

میزان جمعیت آلوده‌کننده *P. s.* pv.*syringae* و *P.s.* pv.*tomato* بر روی گوشت میوه بترتیب cfu $۲/۰۸\times۱۰^{۴}$ cfu $۳/۶\times۱۰^{۴}$ بود. هیچگونه سلول باکتری بر روی گوشت میوه که با جدایه‌های موتان *hrp* هر دو پاتوار مایه‌زنی شده بودند تشخیص داده نشد.

بر روی بذرهای تازه (قبل از خشک شدن) در تمامی میوه‌های آزمایش شده میزان جمعیت جدایه‌های وحشی *P. s.* pv.*tomato* و *P. s.* pv.*syringae* بترتیب cfu $۴/۲۵\times۱۰^{۵}$ cfu $۳/۳\times۱۰^{۵}$ بود. با وجود این، هیچگونه سلول باکتری از جدایه‌های موتان *hrp* در هر دو پاتوار بر روی بذرهای مورد آزمایش تشخیص داده نشد.

بر روی بذرهای خشک شده، تنها جدایه وحشی (جدایه ۸۲۰۷) *P. s.*pv.*tomato* بر روی ۵ میوه از ۱۵ میوه مورد آزمایش با میزان جمعیت cfu $۲/۹\times۱۰^{۳}$ جدا و تشخیص

www.SID.ir

Archive of SID

داده شد که این میوه مربوط به ۴ گیاه مختلف بود. بذرهای آلوده بدست آمده از این ۵ میوه دوباره در گلدان کشت شده و در اطاقک رشد با رطوبت نسبی ۹۵٪ نگه‌داری شدند. از بذرهای آلوده مربوط به ۵ میوه تنها بذرهای مربوط به سه میوه در داخل خاک گلدان جوانه زدند. گیاهچه‌های حاصل از بذر آلوده از نظر طولی کوچکتر از گیاهچه‌های شاهد بودند. برخی از این گیاهچه‌ها دارای لکه‌های نکروز با هاله زرد رنگ در اطراف لکه بودند که از علائم مشخص *P.s.*pv.*tomato* بر روی گوجه‌فرنگی می‌باشد.

از گیاهچه‌های آلوده دوباره باکتری *P.s.*pv.*tomato* جدا و تشخیص داده شد. بر روی بذرهای خشک، میزان جمعیت باکتری *S.maltophilia* بطور معنی‌داری بالاتر از جدایه‌های وحشی مایه‌زنی شده *P.syringae* بر روی گیاه مشاهده گردید.

۴ـ اندازه گیری میزان بقاء باکتری *P.syringae* در داخل خاک بعد از جدا کردن گیاه آلوده از آن

گیاهان آلوده گوجه‌فرنگی بعد از جدا کردن از خاک گلدان، آنها در مزرعه و تحت شرائط طبیعی نگه‌داری شدند. قسمت هوائی گیاهان آلوده جدا شده در شرائط آزمایشگاه نگه‌داری و خشک شدند. ۱۸ ماه بعد خاک و بقایای گیاهی خشک شده جهت مطالعه بقاء باکتری مورد آزمایش قرار گرفتند.

۱-۴- اندازه گیری بقاء باکتری در خاک

۱-۱-۴- استفاده از گیاهان تله

جهت مطالعه انتقال باکتری از طریق خاک آلوده به گیاه، روش تله گذاری بکار گرفته شد. بدین‌منظور گلدان‌های محتوی خاک که ۴۰ و ۳۴۱ روز بعد از جداکردن کامل گیاهان آلوده از خاک، جهت کشت بذر گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار گرفتند.

بطور متوسط در هر گلدان محتوی خاک آلوده ۵ بذر جوانه زدند. در حالیکه در گلدان‌های محتوی خاک غیر آلوده، بطور متوسط ۱۴ بذر جوانه زدند. رشد طولی گیاهچه‌ها در گلدان‌های آلوده بطور معنی داری پایین‌تر از رشد طولی گیاهچه‌ها در گلدان‌های شاهد بود. بر روی برگچه‌ها علائم بیماری بصورت نقاط نکروتیک همراه با یک هاله کلروتیک در گلدان‌های خاک آلوده مشاهده گردید. بعد از اینکه عصاره گیاهچه‌های آلوده بر روی محیط کشت King B کشت گردید بطور متوسط در هر گیاهچه $۶/۳\times۱۰^{۵}$ سلول باکتری *P.s.*pv.*tomato* تشخیص داده شد. در خاک گلدان‌هایی که ۳۴۱ روز از جدا کردن گوجه‌فرنگی‌های آلوده به *P.s.*pv.*tomato* می‌گذشت ۳۰ بذر سالم گوجه‌فرنگی کشت گردید و بطور متوسط ۱۲ بذر در گلدان‌های آلوده جوانه زد. در صورتیکه در گلدان‌های شاهد ۲۵ بذر جوانه زدند. چهار هفته بعد در گلدان‌های آلوده گیاهچه‌ها، لکه‌های لکه‌های کوچک نکروتیک بر روی برگ‌های کوتیلدون و برگ‌های اولیه قابل مشاهده بود. بعد از اینکه عصاره گیاهچه‌های آلوده بر روی محیط King B کشت گردید. بطور متوسط در هر گیاهچه cfu ۵×۱۰^{۶}، cfu $۲/۵\times۱۰^{۶}$ بترتیب *P.s.*pv.*tomato* و *P.s.*pv.*syringae* تشخیص داده شد. روش تشخیص کلنی‌های باکتری توسط PCR صورت گرفت. تمامی کلنی‌های جدا شده حاصل از گیاهچه‌های آلوده بر روی ژل الکتروفورز تشکیل باندهای ۳۸۰ و ۶۰۰ بازی را نشان دادند. که بترتیب مربوط به *P.s.*pv.*tomato* و *P.s.*pv.*syringae* بود.

۲-۱-۴- استفاده از روش PCR (۸)

تحقیق جهت یافتن *P.s.*pv.*tomato* (جدایه ۸۲۰۷) و (جدایه ۳۷-۲۰۲۷) *P.s.* pv.*syringae* بوسیله روش PCR بر روی خاک گلدان‌های که یکسال از جدا کردن کامل گیاهان آلوده به *P.s.*pv.*tomato* می‌گذشت صورت گرفت. از هر نمونه خاک آلوده یک گرم برداشته و در پلاستیک‌های استوماشر محتوی ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات قرار میدهیم. DNA باکتری خالص شده و سپس بوسیله جلوبرهای اختصاصی DNA خالص شده را در دستگاه PCR تکثیر نموده و سپس بر روی ژل الکترفورز انتقال

www.SID.ir

Archive of SID

می‌دهیم. تمامی نمونه‌های خاک تشکیل یک باند DNA با وزن مولکولی مشخص ۳۸۰pb و ۶۰۰pb نشان دادند که با شاهد مثبت کاملا مطابقت داشت (شکل ۴ و ۵). جهت تحقیق بیشتر، DNA تکثیر شده را با آنزیم *Bsh 1236I* هضم می‌نمائیم که همانندنتایج قبل نیز باندهای ایجاد شده بر روی ژل الکتروفورز با باندهای شاهد مثبت کاملا مطابقت داشت.

۵ـ شناسایی باکتری در بقایای گیاهی با استفاده از روش PCR

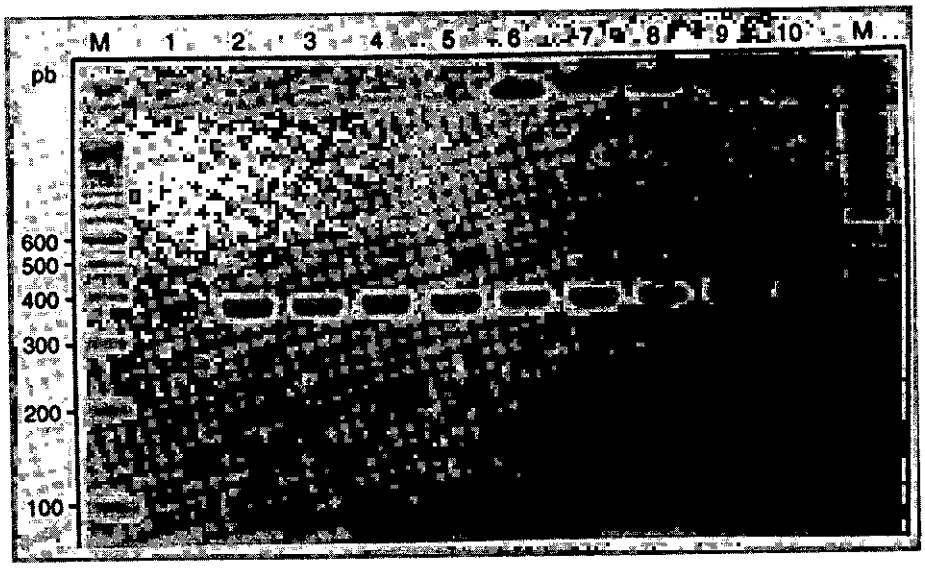
جهت مطالعه انتقال و بقاء باکتری از طریق بقایای گیاهی که یکسال از جدا کردن کامل گیاهان آلوده از خاک و خشک کردن قسمت‌های هوایی گیاه، انجام گردید و سپس عملیات شناسائی DNA بوسیله PCR بر روی نمونه ها صورت گرفت. در این تحقیق چهار نمونه بقایای گیاهی آلوده از چهار گیاه مختلف مورد استفاده قرار گرفت. بعد از خالص‌سازی DNA باکتری از بقایای گیاهی، DNA باکتری را با استفاده از جلوبرهای اختصاصی در دستگاه PCR تکثیر می‌دهیم و سپس بر روی ژل الکتروفورز انتقال داده شدند. نتایج حاصله نشان داد که باندهای تشکیل شده بر روی ژل کاملا با باندهای شاهد مثبت مطابقت داشت.

بحث

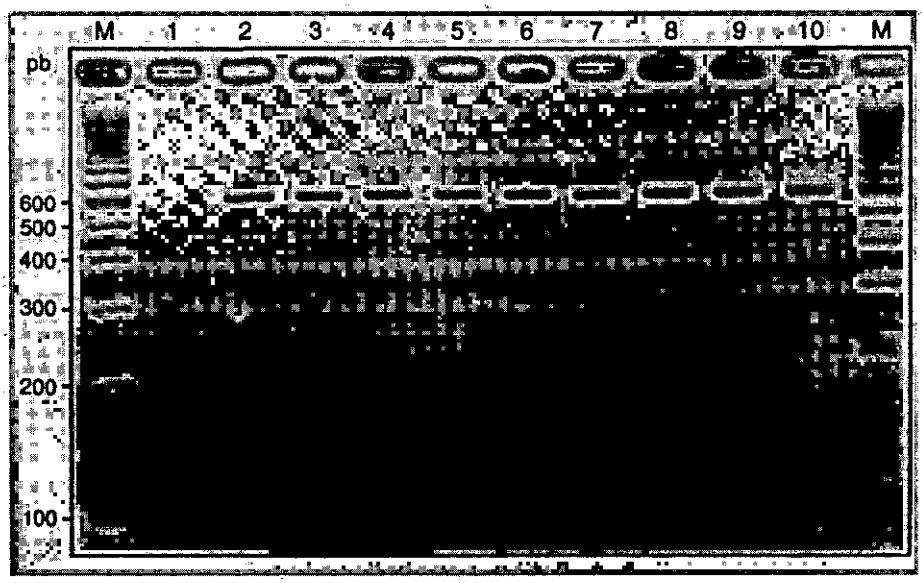
ضد عفونی بذرها بوسیله هیپوکلرید سدیم با غلظت ۶ درجه کلر در حذف کامل باکتری‌های ساپروفیت مؤثر نبود و برخی باکتری‌های ساپروفیت نسبت به این غلظت مقاوم بودند. در این تحقیق بیشترین گونه‌های باکتری ساپروفیت *P.flourescens* و *S.maltophilia* تشخیص داده شد. این دو گونه باکتری بر روی انواع مختلف بذرهای گوجه‌فرنگی با منشأ متفاوت وجود داشتند. استفاده از محیط King B برای کشت باکتری‌های فلورسنت عامل مهمی جهت شناسائی بعضی از گونه‌ها بود. این باکتریها احتمالا در فرورفتگی‌های سطح بذر قرار گرفت و در نتیجه در حین ضدعفونی مصون باقی می‌مانند و یا اینکه ممکن است در درون بذر قرار گرفته باشند (۷، ۳). تحقیقات مک کارتر و همکاران (۱۳) نشان دادند که *P.s.* pv. *tomato* در زیر پوسته بذر باکتریها بصورت مجتمع قرار دارند. بر روی ماده بی‌جان مانند کاغذ صافی و تفلون و همچنین بر روی بذر باکتریها قادر به تکثیر حتی در شرایط مرطوب هم نبودند بنابراین چنین بنظر می‌رسد که کمیت و کیفیت مواد غذایی در سطح بذر جهت بقاء و رشد باکتری کافی نباشد. باکتری *Pseudomonas* یک باکتری گرم منفی، بدون هیچگونه ارگانوژنز سازگار مانند اسپور جهت مقاومت به شرائط استرس می‌باشد. این باکتری بسیار حساس به شرائط رطوبتی می‌باشد. دروش و همکاران (۷) گزارش کردند که حساسیت باکتری *Pseudomonas* بستگی به کیفیت ماده غذایی دارد که بعنوان ماده مایه‌زنی بکار گرفته می‌شود. در محیطهای کشت حاوی NaCl، حساسیت باکتری به خشکی بیشتر از آب خالص می‌باشد. نتایج تحقیقات ما نشان داد که انواع مواد تلقیحی که بکار گرفته شد (رشد باکتری در مرحله نمو لگاریتمی و ثابت بر روی محیط کشت King B و Mg و عصاره آلوده گیاه به باکتری) در شرائط رطوبت پایین به مرگ سریع سلول‌های باکتری منجر می‌شود. ظاهراً متابولیسم سلول باکتری *Pseudomonas* فاقد یک سیستم کاربردی خاص جهت حفاظت سلول در شرایط خشک می‌باشد. سرعت مرگ سلولها باکتری در شرایطی که ماده تلقیح بصورت عصاره آلوده گیاهی (*In planta*) با ماده مایه‌زنی بصورت محیط کشت مصنوعی (*In vitro*) یکسان بود. با وجود این ماده تلقیح که بصورت رشد باکتری در مرحله ثابت بر روی محیط کشت King B حساستر از سایر مواد مایه‌زنی بکار گرفته بود و سرعت مرگ سلول‌های باکتری بستگی مستقیم به سرعت خشک شدن ماده مایه‌زنی داشت. دیسک‌های تفلون که بعنوان ماده‌ای خیلی صاف بوده و میزان تبخیر آب بر روی آنها سریعتر از دیسک‌های کاغذ صافی و یا بذر می‌باشد بنابراین مدت زمان بسیار کمی قادرند سلول‌های باکتری را در مقابل شرائط خشکی محافظت نمایند. میزان سرعت مرگ باکتری بر روی مواد بی‌جان (دیسک‌های تفلون

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴ـ ژل الکتروفورز اگارز ۲ درصد: قطعه ژن تکثیر شده (۳۸۰ بازی) توسط جلوبرهای اختصاصی: ۱ – شاهد منفی (آب مقطر) ۲ـ شاهد مثبت (جدایه ۸۲۰۷) ۳ الی ۱۰ – نمونه حاصل از خاک آلوده به *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (۳۴۰ روز بعد از مایه‌زنی) M – شناساگر با وزن مولکولی ۱۰۰ تا بازی.



شکل ۵ـ ژل الکتروفورز اگارز ۲ درصد: قطعه ژن تکثیر شده (۶۰۰ بازی) توسط جلوبرهای اختصاصی: شاهد منفی (آب مقطر) ۲– شاهد مثبت (جدایه ۳۷–۲۰۲۷) ۳ الی ۱۰ – نمونه حاصل از خاک آلوده به *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (۳۴۰ روز بعد از مایه‌زنی) M – شناساگر با وزن مولکولی ۱۰۰ تا بازی.

www.SID.ir

Archive of SID

و کاغذ صافی) در حالت خشک‌شدن سریع بیشتر از حالت خشک شدن مواد بی‌جان بصورت آهسته بود.

بر روی بذر، سلول‌های باکتری قادر نبودند که بیشتر از سه روز بقاء یابند. تکرار آزمایشات مکرر این فرضیه را کاملا تأیید نمود. سه روز بعد از مایه‌زنی، بذرهای مایه‌زنی شده را له نموده و عصاره و بقایای بذر بر روی محیط King B کشت گردید ولی هیچگونه کلنی باکتری تشخیص داده نشد. حال این فرضیه پیش می‌آید که اگر سلول‌های باکتری زنده بودند ولی قادر نبودند که از بذر جدا شوند. بایستی سلول‌های آنها در بقایای بذر بر روی محیط کشت رشد و تکثیر می‌یافتند.

ژن‌های *hrp* که نقش مهمی در تکثیر باکتری داشتند ولی در بقاء *P.syringae* هیچگونه نقش قابل ملاحظه‌ای از آنها بر روی بذر و مواد بی‌جان مشاهده نگردید. جدایه‌های موتان *hrp* با جدایه‌های وحشی هیچگونه اختلاف معنی‌داری بر روی دیسک‌های تفلون و کاغذ صافی و بذر در بقاء باکتری در شرایط خشک نداشتند. با وجود این، بعد از جوانه زدن بذر و ظهور گیاهچه، دینامیزم جمعیت جدایه‌های موتان *hrp* بطور معنی‌داری به میزان پایین‌تر نسبت به جدایه‌های وحشی خود بوند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اثرات متقابل بین باکتری بیماریزا بر روی گیاه میزبان و غیر میزبان بعد از جوانه زدن بذر و ظهور گیاهچه بوقوع می‌پیوندد. حال اگر قدرت جوانه زدن بذر از بین برود هیچگونه اثرات متقابلی بین گیاه و باکتری بیماریزا دیده نمی‌شود.

در این تحقیق همچنین نشان داده شده که گوشت میوه گوجه‌فرنگی و سطح داخلی بذر بوسیله یک باکتری ساپروفیت بنام *S.maltophilia* کلنیزه می‌شود. با وجود این، بایستی ذکر شود که میزان جمعیت *S.maltophilia* بر روی بذر حاصل از برداشت میوه و خشک شدن آنها، بطور معنی‌داری بیشتر از جمعیت جدایه‌های وحشی و موتان *hrp* بود. باکتری *S.maltophilia* قادر به بقاء بر روی دیسک‌های تفلون و کاغذ صافی و بر روی بذر در شرائط خشک نبود. این نتایج نشان میدهد نه تنها کلنیزاسیون *S.maltophilia* بر روی بذر گوجه‌فرنگی برداشت شده بصورت داخلی می‌باشد بلکه میزان کلنیزاسیون این باکتری در داخل بذر در حضور جدایه‌های وحشی *P.syringae* مساعدتر می‌شود. بی‌تردید این اثرات متقابل بین باکتری و گیاه در موقع رسیدن میوه و تشکیل بذر صورت می‌گیرد. زیرا در شرائطی که میوه کاملا رسیده باشد *P.s.*pv.*syringae* نه بر روی گوشت میوه و نه بر روی بذر تازه جداسازی گردید. میزان جمعیت *S.maltophilia* می‌تواند بعنوان یک مارکر غیر مستقیم در آلودگی گوجه‌فرنگی بوسیله *P.syringae* باشد.

در این تحقیق نشان داده شد که بذرهای برداشت شده حاصل از گوجه‌فرنگی‌های آلوده به *P.s.*pv.*tomato* بعد از جوانه‌زدن تولید گیاهچه‌های آلوده به باکتری می‌نماید. بعلاوه *P.s.*pv.*tomato* می‌تواند بر روی بذرهای برداشت شده حتی بعد از خشک شدن کامل جداسازی گردد. با وجود این، فراوانی آلودگی بوسیله بذر داخل میوه بعد از برداشت بسیار ضعیف می‌باشد. تحت شرائط کشت گوجه‌فرنگی در اطاقک رشد با رطوبت نسبی بالا، میزان آلودگی و جمعیت باکتری بر روی تمامی اندام‌های گیاهی بالاتر از رطوبت نسبی پایین بود. (نتایج نشان داده نشد). ولی تنها $\frac{1}{3}$ از میوه‌های برداشت شده و بذرهای آنها، بعد از خشک شدن *P.s.*pv.*tomato* جداسازی گردید. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که انتقال *P.syringae* از سالی به سالی دیگر می‌تواند از راههای دیگر نظیر آلودگی خاک و بقایای گیاهی صورت گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع مورد استفاده

۱- شهریاری، د. و رحیمیان، ح. ۱۳۷۴. خال زدگی باکتریائی گوجه‌فرنگی در ورامین. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. آموزشکده کشاورزی کرج.

2- Barksdal, T.H., Good, J.M., and L.L. Danielson. 1972. Tomato diseases and their control. U.S. Dep. Agric. Handbook. 109 pp.

3- Bashan, Y., Okon, Y., and Y. Henis. 1978. Infection studies of *Pseudomonas tomato* casual agent of bacterial speck of tomato. Phytopathologca. 6: 135-144.

4- Bashan, Y., Okon, and Y., Henis. 1982. Long-term survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato and pepper seeds. Phytopathol. 72 : 1143-1144.

5- Brayan, M.K. 1933. Bacterial speck of tomato. Phytopathol. 23 : 897-904.

6- Chambers, S.C., and P.R. Merriman. 1975. Penetration and control of *Pseudomonas tomato* in Victoria. J. Agric. Res. 26 : 657-663.

7- Collin , J., and B. Mahthaj. 1984. Study on the survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* under natural conditions in Marocco.Rijksuniv. Gent.Med.Fac. Landbouww. 49 : 525-533.

8- Devash, Y., Okon, Y., and Y. Henis. 1980. Survival of pseudomonas tomato in soil and seeds. Phytopathology. 99 : 175-185.

9- Duncan, D.B., 1955. Multiple range and multiple of test. Biometric. 11: 42 pp.

10- Good, M.J., and M. Sasser. 1980. The key to controling bacterial spot and bacterial speck of tomato. Plant Dis. 64 : 831-834.

11-Jones, J.B., MacCarter, S.M., and R.D. Gitaitis. 1981. Association of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* with a leaf spot disease of tomato transplants in southern Georgia. Phytopathol. 71 : 1281-1285.

12- King, E.O., Ward, M.K., and Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J.Lab. Clin. Medic. 44: 301-307.

13- McCarter, S.M., Jones, J.B., Gitaitis, R.D., and D.R. Smitley. 1983. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in association with tomato seed, soil, host tissue, and epiphytic weed hosts in Georgia. Phytopathol. 73 : 1393-1398.

www.SID.ir

Archive of SID

14- Nemeth, J. and A.N. Kovacs. 1998. Occurrence of *Pseudomonas syringae* pathovars on soybean in Hungary and their differentiation. Acta Phytopathologica et Enthomologica Hungarica. 33 : 245-254.

15- Rashid, A.Q.M.B. 1995. Detection of seed-borne *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in wheat. Plant Varieties & Seed. 8 : 47-54.

16- Okabe, N. 1933. Bacterial disease of plants occuring in Formosa. II. Bacterial leaf spot of tomato. J. Soc. Tropic. Agric. Taiwan. 5 : 26-36.

17- Taylor, J.D., Dudley, C.L., and Presly. 1979. Studies of halo-blight seed infection and disease transmission in dwarf beans. Annu. Appl. Biol. 93 : 267- 277.

www.SID.ir