بررسی اثر چند ژن بیماری‌زا در زندگی اپیفیتی *Pseudomonas syringae*

مصطفی نیک نژاد کاظم‌پور[۱]

چکیده

باکتری Pseudomonas syringae یک بیمارگر گیاهی است که دارای دامنه میزبان گسترده‌ای می‌باشد. چرخه زندگی این باکتری شامل دو مرحله اساسی است: مرحله نخست بروز عامل بیماری روی گیاه میزبان است، که عموماً به صورت نکروز در قسمت‌های هوایی گیاه می‌باشد (مرحله بیماری‌زایی)،و مرحله دوم، تکثیر باکتری در قسمت‌های هوایی گیاه به میزان زیاد است، بدون این که هیچ گونه واکنش دفاعی از خود نشان دهد (مرحله اپیفیتیک). تأثیر برخی ژن‌های بیماری‌زایی مانند hrp (hypersensitive reaction and athogenicity)، ice (ice nucleation) ، cor (coronatine) ، dsp (disease specificity) و agress (agressivity) ، *در مرحلهٔ اپیفیت Pseudomonas syringae در گیاه گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه دینامیزم جمعیت کلنیزاسیون باکتری در ریشه، ساقه و برگ انجام گرفت.*

نتایج نشان داد که سیستم ژن‌های hrp *در P. s.* pv. *tomato ، P. s.* pv. *syringae ، P. s.* pv. *phaseolicola و P. s.* cor *(ژن مسئول تولید توکسین) در P. s.* pv. *tomato به منظور کلنیزاسیون اپیفیتیک باکتری در گیاه میزبان و غیر میزبان ضروری است. جدایه‌های موتان* hrp و cor *در مقایسه با جدایه‌های وحشی، گیاه را در تمامی بخش‌ها (ریشه، ساقه و برگ) به میزان پایین‌تری کلنیزه نمودند. سیستم ژن‌های* ice ، agress و dsp *با جدایه‌های موتان و جدایه‌های وحشی خود هیچ گونه تأثیر معنی‌داری بر دینامیزم کلنیزاسیون اپیفیتیک باکتری P. s.* pv. *syringae در گیاه نداشتند. در شرایط in vitro هیچ گونه تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌های وحشی و موتان‌های آنها روی محیط کشت مصنوعی در دستگاه بیواسکرین مشاهده نگردید. چنین برمی‌آید که عدم تکثیر زیاد موتان‌های P. syringae در شرایط in planta نسبت به جدایه‌های وحشی، ناشی از اثر متقابل گیاه و باکتری می‌باشد.*

واژه‌های کلیدی: *گوجه‌فرنگی، Pseudomonas syringae* pv. *tomato ، اپیفیت، ژن‌های* hrp *، کروناتین، دینامیزم جمعیت، بیماری‌زایی*

۱. استادیار گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.11.3]

مقدمه

در باکتری‌ها گسترش آثار متقابل باکتری و گیاه، چه به صورت سازگار و چه به صورت ناسازگار، تحت کنترل گروهی از ژن‌ها به نام hrp است. موتان‌های hrp در اثر استقرار یک ترانسپوزان Tn5 (Transposon) در داخل توالی‌های قطعه ژن hrp به دست می‌آید. موتان‌های hrp نمی‌توانند در میزبان‌های خود علایم بیماری تولید نمایند. ژن‌های hrp در برخی از باکتری‌ها مانند *Erwinia caratovora* و *E. chrysanthemi* که فعالیت پکتولیتیک داشته و معمولاً واکنش فوق حساسیت قابل مشاهده‌ای تولید نمی‌کنند، نیز شناسایی شده است. ژن‌های hrp در بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی گرم منفی، به ویژه در بیشتر پاتووارهای *P. syringae* شناسایی شده‌اند. ژن‌های hrp در *P. flurescence* و *P. putida*، که غیر بیماری‌زا هستند، تا به حال شناسایی نشده‌اند (٦). در *P. syringae* ژن‌های hrp در یک ناحیه بین ٤١ تا ٤٢ کیلوبازی، و در *Ralostonia solanacearum* در یک مگاپلاسمید به اندازه بیش از ٢٠ کیلوباز قرار دارند (٤). پژوهش‌های مانسو و همکاران (١٤) نشان داد که ژن‌های hrp درکلنیزاسیون اپیفیت (Epiphytic) *P. syringae* ضروری می‌باشند.

تولید مواد متابولیک ثانویه سمی برای گیاهان در برگیرنده مکانیسم‌های مهمی در بیماری‌زایی باکتری‌های مولد نکروز مانند *P. syringae* است. با وجود این، توکسین تنها درتعدادی از پاتوارهای *P. syringae* شناسایی شده است. توکسین کرونـاتین (Coronatine) در ایجاد کلروز توسط pv. *P. s. tomato* مشخص شده است. کرونـاتین یک توکسین غیر اختصاصی است و تعداد زیادی از جدایه‌های pv. *P. s. maculicola* و pv. *P. s. glycinea* نیز آن را تولید می‌نمایند. تأثیر بیولوژیک کرونـاتین شامل تولید کلروز روی برگ، ایجاد هیپرتروفی در غده‌های سیب‌زمینی، و تولید ریشه‌چه در شلتوک برنج می‌باشد. در واقع تأثیر کرونـاتین بر بافت‌های خاص می‌باشد. پژوهش ما و همکاران (١٢) نشان داد که ژن‌های کد کننده تولید کرونـاتین که در یک قطعه ٣٠ کیلوبازی قرار دارند تقریباً در اکثر جدایه‌های pv. *P. s. maculicola* روی کروموزوم واقع شده‌اند. آنالیز RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphysis) نشان داد که ژن‌های روی کروموزوم و پلاسمید به طور معنی‌داری با یکدیگر تفاوت دارند. ژن‌های کرونـاتین به افزایش کلنیزاسیون اپیفیت pv. *P. s. tomato* کمک می‌نمایند (١٧).

برخی از پاتووارهای *P. syringae* پروتئینی تولید می‌کنند که می‌تواند آب را در درجه حرارت نزدیک به صفر یخ بزند. این ویژگی تولید هسته یخ نقش مهمی در قدرت بیماری‌زایی باکتری دارد. در واقع، تشکیل هسته یخ باعث ایجاد زخم در گیاه شده، و سبب می‌شود که باکتری به داخل بافت‌های گیاه رخنه نماید. ژن‌های مولد هسته (ice) در *Erwinia herbicola* و *P. fluorescence* نیز گزارش شده است (١٠). اشمیت و همکاران (١٩) ژن جدیدی به نام ina V را معرفی کردند که می‌تواند پروتئینی را رمزسازی نماید که نقشی فعال در تشکیل هسته یخ در سلول‌های گیاهی دارد. با استفاده از موتاژنز (Mutagenesis)، ژن‌هایی را به طور تصادفی در *P. syringae* pv. *syringae* شناسایی نموده‌اند که در گسترش بیماری نقش دارند. این ژن‌ها را بیماری اختصاصی (dsp) نام‌گذاری کردند. موتان‌های dsp در *E. amylovora* نیز شناسایی شده‌اند. یاسادکارو و همکاران (٢١) به وسیله ایجاد موتاژنز، و با استفاده از ترانسپوزان Tn_5، شمار زیادی جدایه‌های موتان dsp و مهاجم (agress) و بیماری‌زا (path) را در *P. s.* pv. *syringae* روی گلابی تولید نمودند. میتلشتات و رودولف (١٥) گزارش کردند که جدایه‌های *P. s.* pv. *syringae*، که توانایی ایجاد هسته یخ را دارند، ممکن است با تحریک تولید مواد غذایی در سطح برگ، در مدتی کوتاه به کلنیزاسیون اپیفیتیک باکتری کمک نمایند.

در این پژوهش تأثیر برخی از ژن‌های بیماری‌زا مانند hrp، cor، dsp، ice، agress و path در کلنیزاسیون اپیفیت *P. syringae* بررسی گردید.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.11.3]

مواد و روش‌ها

در این بررسی واریته کانری‌رو (Cannery row) گوجه‌فرنگی که حساس به باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* می‌باشد مورد استفاده قرار گرفت. پیش از کشت، به منظور ضدعفونی سطحی، بذرهای گوجه‌فرنگی به مدت پنج دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (۰/٦ درجه کلر) ضدعفونی شده و سپس سه بار (هر بار ۱۰ دقیقه) با آب مقطر سترون شست و شو داده شدند، و روی کاغذهای صافی سترون، در اطاقک کشت در زیر نور سفید، به مدت ۳۰ دقیقه خشک گردیدند.

مایه‌زنی برگ گلابی و بذرهای گوجه‌فرنگی با باکتری و کشت آنها

ویژگی‌های جدایه‌هایی که در این پژوهش مورد استفاده قرار گرفت در جدول ۱ آورده شده است. بذرهای گوجه‌فرنگی پس از ضدعفونی سطحی و خشک شدن، به مدت دو ساعت در سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 سلول باکتری در میلی‌لیتر قرار داده شدند. سپس بذور مایه‌زنی شده روی کاغذ صافی سترون خشک شده و بی‌درنگ در داخل پلاک‌های سوراخ‌دار از جنس پلی‌اتیلن (به ابعاد ٦۰ × ٤۰ سانتی‌متر) محتوی پشم شیشه کشت گردیدند. پشم شیشه پیش از کشت با محلول غذایی مرطوب شده بود. هر پلاک سوراخ‌دار ۲۱ لیتر از محلول غذایی را جذب می‌نماید. بذرهای مایه‌زنی شده گوجه‌فرنگی روی سرپوش‌های پشم شیشه قرار گرفته، و سپس به وسیله ورمیکولیت پوشانده شدند (۱۵۰ گرم ورمیکولیت برای هر پلاک). پلاک‌ها در دستگاه جوانه‌زنی (Germinator) در ۲۵ درجه سانتی‌گراد در روز (۱۷ ساعت)، ۱۸ درجه سانتی‌گراد در شب (۷ ساعت)، و رطوبت نسبی ۹۵ درصد به مدت چهار هفته نگهداری شدند.

مایه‌زنی برگ گلابی در شرایط گلخانه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۰ درصد انجام گرفت. روی برگ‌های جوان دو زخم طولی به فاصله یک میلی‌متر به موازی رگ‌برگ اصلی به وسیله اسکالپل ایجاد شد، و سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری $10^8 \times 3$ سلول باکتری در میلی‌لیتر روی زخم قرار داده شد. برای شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. شمارش باکتری‌ها در گیاه گوجه‌فرنگی تحت شرایط گلخانه انجام گرفت.

جدا سازی و شمارش باکتری‌ها

هر گیاهچه گوجه‌فرنگی به طور جداگانه در داخل کیسه پلاستیکی سترون قرار داده شد، و به هر کدام یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردید. پس از آن، گیاهچه گوجه‌فرنگی به وسیله یک غلطک پلاستیکی در داخل کیسه پلاستیکی کاملاً له، و عصاره گیاه به وسیله آب مقطر سترون تا میزان یک میلیونیوم رقیق شد. سپس، از هر رقت به میزان ۵۰ میکرولیتر برداشته و روی محیط King B (۸) محتوی ۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک اکتیدیون کشت گردید، به طوری که در هر تشتک، عصاره مادر تا رقت یک میلیونیوم قرار داده شد. برای هر تیمار پنج گیاه (تکرار)، و برای هر گیاه سه تشتک پتری در نظر گرفته شد. آن‌گاه تشک‌های پتری در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند و پس از ۷۲ ساعت کلنی‌های فلورسنت باکتری در زیر نور فرابنفش شمارش گردیدند. به منظور برآورد میزان جمعیت باکتری در گیاه از فرمول زیر استفاده شد (۱۱):

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

N = تعداد سلول باکتری در هر گیاه

X = شمار کلنی‌های باکتری شمارش شده در هر غلظت

D = فاکتور رقت

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

تعیین منحنی رشد جدایه‌های مختلف *Pseudomonas syringae* در شرایط *in vitro*

برای تعیین منحنی رشد جدایه‌های وحشی موتان *P. s.* pv. *tomato* در شرایط *in vitro* روی محیط کشت مایع King B و M_9، از دستگاه بیواسکرین استفاده گردید (۱۸). دو پلاک سترون شامل ۱۰۰ حفره، با ۳۵۰ میکرولیتر محیط کشت پر شد.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.11.3]

جدول ۱. ویژگی‌های جدایه‌های به کار رفته

جدایه	ویژگی‌ها	منبع
		P.s. pv. *tomato*
۸۲۰۷	جدایه وحشی نژاد صفر جدا شده از *Lycopersicom esculentum*	بوچر و همکاران (٤)
۸۲۰۸	۸۲۰۷ :: Tn_5 : hrp	مانسو و هارویز (۱۳)
۸۲۰۹	۸۲۰۷ :: Tn_5 : hrp	مانسو و هارویز (۱۳)
DC3118	۸۲۰۷ :: Tn_5 : cor	مانسو و هارویز (۱۳)
DC3118(pEC-18)	حاوی قطعه ژن PLARFI ۳۰ کیلوباز از ژنوم ۸۲۰۷ ، coronatin	مانسو و هارویز (۱۳)
		P. s. pv. *syringae*
۲۰۲۷-۳۷	جدایه وحشی جدا شده از *Pyrus communis*	مانسو و هارویز (۱۳)
۸۸-۱	۲۰۲۷-۳۷ :: Tn_5 : hrp	مانسو و هارویز (۱۳)
۵۹-۳۵	۲۰۲۷-۳۷ :: Tn_5 : ice, Km^r	مانسو و هارویز (۱۳)
٤۵-۲۵	۲۰۲۷-۳۷ :: Tn_5 : path, Km^r	مانسو و هارویز (۱۳)
٤۵-٤۸	۲۰۲۷-۳۷ :: Tn_5 : agress, Km^r	مانسو و هارویز (۱۳)
		P. s. pv. *phaseolicola*
۸۲۱۹	جدایه وحشی جدا شده از *Phaseolus vulgaris*	مانسو و هارویز (۱۳)
۸۲۱٤	۸۲۱۹ :: Tn_5 : hrp	مانسو و هارویز (۱۳)

سپس ۳۲ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری از رشد ٢٤ ساعته با غلظت 10^8 × ۱ سلول باکتری در میلی‌لیتر به هر یک از حفره‌ها اضافه گردید. شرایط نگهداری در ۲۷ درجه سانتی‌گراد و تحت تکان ۱۰۰ دور در دقیقه تنظیم شد. طول موج دستگاه بیواسکرین برای قرائت در ٤۱۰ نانومتر تنظیم گردید. اندازه‌گیری رشد باکتری با کدر شدن محیط کشت در هر دو ساعت بوده، و در کل به مدت ٦٤ ساعت به صورت اتوماتیک توسط دستگاه ثبت و به حافظه رایانه ارسال شد. با توجه به منحنی‌های به دست آمده از جدایه‌های مختلف، مرحله رشد و نمو لگاریتمی (Exponential phase) و رشد ثابت (Stationary phase) مشخص گردید.

واکاوی آماری

پس از شمارش کلنی‌های باکتری در تشتک پتری، شمار سلول‌های باکتری در هر گیاه به لگاریتم اعشاری تبدیل شد. یک‌نواختی واریانس به وسیله آزمون بارتلت (۲) کنترل گردید. در صورتی که واریانس‌ها توسط آزمون بارتلت یک‌نواخت تشخیص داده می‌شدند، واکاوی واریانس به وسیله آزمون فیشر دنبال می‌گردید. از آزمون دانکن (۵) برای مقایسه میانگین‌ها و گروه‌بندی آنها استفاده به عمل آمد.

نتایج

در این پژوهش نقش برخی فعالیت‌های ضروری *P. syringae*

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.11.3]

برای ایجاد بیماری در گیاه مورد بررسی قرار گرفت. این فعالیت‌ها به سه نوع اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند:

۱. تولید توکسین. به عنوان مثال *P. s.* pv. *tomato* تولید کروناتین می‌نمایند.

۲. سیستم ترشحی نوع دوم(Secretion type II)، که برای ایجاد علایم بیماری در گیاه حساس و ایجاد واکنش فوق حساسیت در گیاهان مقاوم و غیر میزبان ضروری است. این سیستم ترشحی به وسیله ژن‌های hrp رمزسازی و کنترل می‌شود.

۳. انواع متابولیت‌هایی که هنوز نحوه عمل آنها شناخته شده نیست، ولی در ایجاد علایم بیماری در گیاهان حساس دخالت دارند.

مقایسه رشد جدایه‌های موتان و وحشی در شرایط *in vitro*

رشد سلول‌های باکتری روی محیط کشت مایع در دستگاه بیواسکرین شامل مراحل زیر بود: الف) مرحله سکون، که طول مدت این مرحله نسبت به نوع محیط کشت King B و M_9 متفاوت است. ب) مرحله رشد لگاریتمی، که در این مرحله سلول‌های باکتری حداکثر فعالیت را دارند. این مرحله بین انتهای مرحله سکون و ابتدای مرحله رشد قرار دارد. ج) مرحله رشد ثابت، که در این مرحله چگالی نوری سلول‌های باکتری روی محیط کشت حداکثر می‌باشد. رشد جدایه‌های مختلف *P. syringae* به وسیله دستگاه بیواسکرین در مراحل چگالی نوری حداقل و حداکثر و مدت زمان مرحله سکون(Lag phase) اندازه‌گیری شد.

مدت زمان مرحله سکون روی محیط کشت King B در همه جدایه‌ها ۲-٤ ساعت بود. حداکثر شیب منحنی به دست آمده در جدایه‌های مختلف بین ۰/۲۰۵ برای *P. s.* pv. *tomato* (جدایه ۳۷-۲۰۲۷) و ۰/۱۰۷ برای *P. s.* pv.*phaseolicola* ثبت گردید، که بین آنها هیچ گونه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. بین جدایه‌های وحشی و موتان تفاوت معنی‌داری در چگالی حداکثر وجود نداشت.

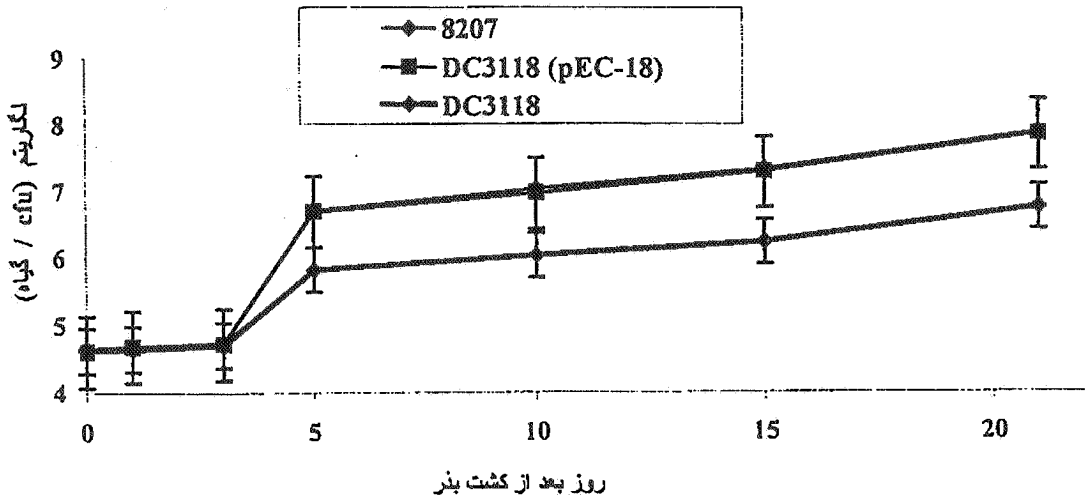
سرعت رشد جدایه‌های مختلف روی محیط کشت M_9 کندتر از محیط کشت King B بود. مدت زمان مرحله سکون در جدایه‌های مختلف ۸ تا ۲۳ ساعت بوده، و میانگین حداکثر شیب منحنی به دست آمده ۰/۵۰ ثبت گردید. میانگین چگالی حداکثر ۰/۸ به دست آمد، به طوری که هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌های وحشی و موتان وجود نداشت. قرار دادن ترانسپوزان Tn_5 تأثیری بر رشد سلول‌های باکتری در شرایط *in vitro* نداشت. پارامترهای متفاوتی که از جدایه‌های مختلف اندازه‌گیری شد، نشان داد که بین رشد جدایه‌های موتان و جدایه‌های وحشی در شرایط آزمایشگاهی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری وجود ندارد.

نقش توکسین کروناتین در دینامیزم کلنیزاسیون *P. s.* pv. *tomato* در گوجه‌فرنگی

پس از مایه‌زنی بذرهای گوجه‌فرنگی، دو ویژگی دینامیزم جمعیت باکتری در گیاه مایه‌زنی شده و میزان رشد طولی گیاهان پس از ظهور گیاهچه مورد بررسی قرار گرفت. تا پیش از جوانه زدن بذور، جدایه‌های مختلف *P. s.* pv. *tomato* دارای جمعیت یکسانی بودند، به طوری که هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نگردید. پس از جوانه زدن بذرها، تقریباً سه روز بعد از کشت، دینامیزم جمعیت جدایه‌های وحشی ۸۲۰۷ و جدایه موتان DC3118(pEC-18) (تولید کنندهٔ توکسین) با جدایه DC3118 (جدایه‌ای که قادر به ایجاد توکسین نبود) از نظر آماری اختلاف معنی‌دار داشتند. دو جدایه‌ای که می‌توانستند توکسین تولید کنند به راحتی در گیاه گوجه‌فرنگی تکثیر نمودند، به طوری که پس از ۱۲ روز میزان جمعیت آنها به بیش از $۱/٤ \times ۱۰^{۸}$ سلول باکتری در میلی‌لیتر در گیاه رسید. جمعیت جدایه موتان DC3118 که قادر به تولید توکسین نبود، در مرحله رشد لگاریتمی و رشد ثابت به طور معنی‌داری کمتر از جدایه‌هایی بود که قادر به تولید توکسین بودند. میزان جمعیت جدایه موتان DC3118 روی گوجه‌فرنگی برابر $۵/٦ \times ۱۰^{٦}$ سلول باکتری در گیاه بود. با وجود این، میزان جمعیت جدایه‌های DC3118 و DC3118(pEC-18) پایین‌تر از

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.11.3]



نگاره ۱. دینامیک جمعیت جدایه‌های *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* جدایه ۸۲۰۷، موتان DC3118toxin⁻ و موتان DC3118(pEC-18)toxin⁺ در رقم کانری‌رو گوجه‌فرنگی

جدایه وحشی بود (نگاره ۱).

افزودن براین، شمار زیادی از گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه ۸۲۰۷ ، پس از ۱۲ روز دچار نکروز کامل شدند. با این حال ، گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های DC3118 و DC3118(pEC-18) (به رغم داشتن لکه‌های نکروتیک روی برگ‌ها زنده ماندند.

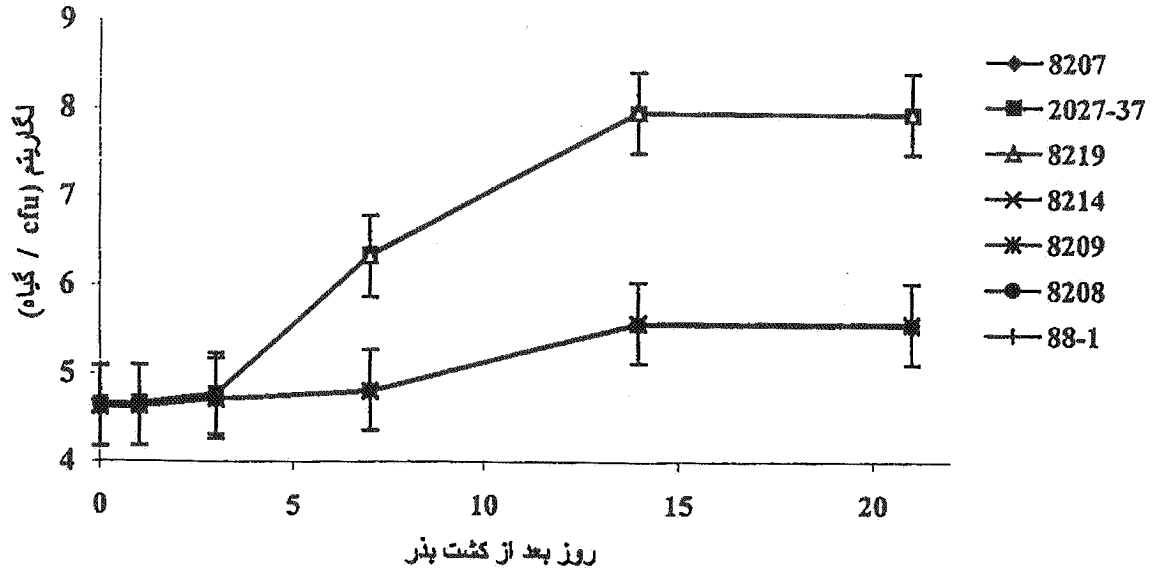
نقش ژن‌های hrp و *P. s.* pv. *tomato* ، *P. s.* pv. *syringae* و *P. s.* pv. *phaseolicola* در کلنیزاسیون اپیفیت آنها

برای بررسی نقش ژن‌های hrp رشد طولی گیاهان و دینامیزم در گیاهان مایه‌زنی شده جمعیت مورد آزمایش قرار گرفت. رشد طولی گیاهان مایه‌زنی شده، طی مدت ۲۱ روز به وسیله جدایه‌های *P. s.* pv. *phaseolicola* و جدایه‌های موتان hrp (جدایه‌های ۸۲۰۸ و ۸۲۰۹ از *P. s.* pv. *tomato* و ۱-۸۸ *P. s.* pv. *syringae*) از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. سرعت رشد طولی گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه وحشی *P. s.* pv. *syringae* کمتر بود. با وجود این، اندازه طولی گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه وحشی *P. s.* pv. *tomato* به طور معنی‌داری کمتر از دیگر گیاهان مایه‌زنی شده بود. شمار زیادی از گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های وحشی *P. s.* pv. *tomato* پس از ۱۰ روز کاملاً نکروزه شده و از بین رفتند. در حالی که در دیگر گیاهان مایه‌زنی شده هیچ گونه علایم بیماری مشاهده نگردید.

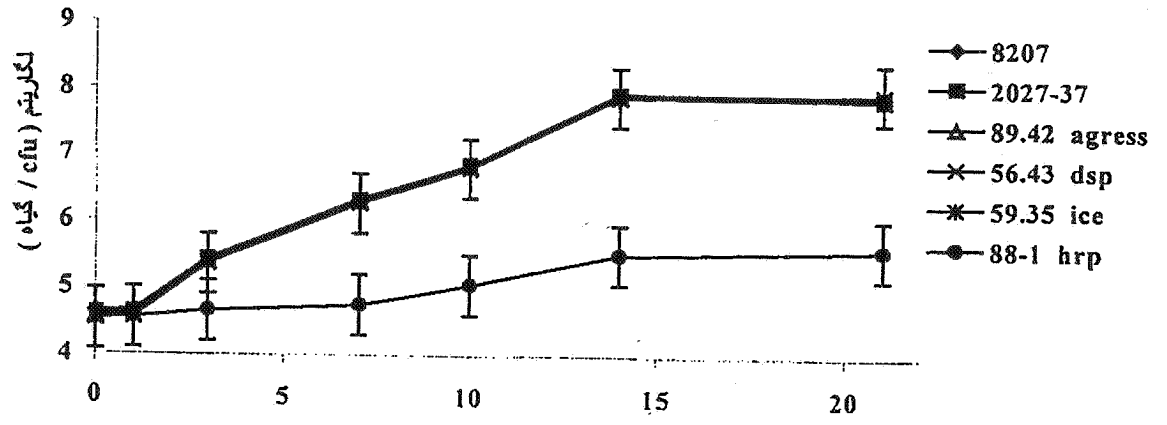
بررسی دینامیزم جمعیت جدایه‌های موتان hrp با جدایه‌های وحشی خود، نشان داد که بذرها در زمان کشت به میزان یکسانی سلول‌های باکتری جدایه‌های وحشی موتان را در سطح خود جذب نموده‌اند (cfu/ بذر $۱۰^{٤} \times ٤$ در زمان کشت). پس از جوانه زدن بذرها، جمعیت جدایه‌های وحشی (جدایه ۸۲۰۸) *P. s.* pv. *tomato* بعد از ۱۵ روز تا رسیدن به مرحله رشد لگاریتمی، به میزان $۱۰^{۷} \times ۲$ سلول باکتری در میلی‌لیتر افزایش یافته، و جدایه‌های وحشی *P. s.* pv. *syringae* و *P. s.* pv. *phaseolicola* تا مرحله رشد لگاریتمی به میزان کمی پایین‌تر از جدایه بیماری‌زایی (جدایه ۸۲۰۷) روی گیاه رسیده بود. ولی پس از رسیدن به مرحله رشد ثابت، میزان جمعیت جدایه‌های وحشی هر سه پاتووار یکسان می‌شود. میزان جمعیت جدایه‌های موتان *P. s.* pv. *tomato* در گیاه به طور معنی‌داری کمتر از جدایه‌های وحشی بود، به طوری که میزان جمعیت جدایه‌های موتان پس از رسیدن به رشد ثابت به ۳×۱۰^{۵} سلول باکتری در میلی‌لیتر رسید (نگاره ۲).

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.11.3]



نگاره ۲. دینامیک جمعیت جدایه‌های وحشی (جدایه ۸۲۰۷) *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*، (جدایه ۳۷-۲۰۲۷) *P. s.* pv. *syringae* (جدایه ۸۲۱۹) *P. s.* pv. *phaseolicola* و موتان‌های hrp آنها به ترتیب ۸۲۰۸، ۱-۸۸ و ۸۲۱٤ در گوجه فرنگی



نگاره ۳. دینامیک جمعیت (جدایه ۸۲۰۷) *P. s.* pv. *tomato*، (جدایه ۳۷-۲۰۲۷) *P. s.* pv. *syringae* و موتان‌های این جدایه، موتان hrp (جدایه ۱-۸۸)، موتان ice (جدایه ۳۵-۵۹)، موتاه agress (جدایه ٤۲-۸۹) و موتان dsp (جدایه ٤۳-٥٦) در گوجه فرنگی

نقش میزان تهاجم *P. s.* pv. *syringae* بر گیاه غیر میزبان گوجه‌فرنگی

جدایه‌های موتان در اثر استقرار ترانسپوزان Tn_5 به صورت تصادفی در متن کروموزوم جدایه وحشی *P. s.* pv. *syringae* به دست آمدند.

برخی از این جدایه‌های موتان، هنگامی که بر برگ گلابی مایه‌زنی شدند، علایم متفاوتی را ایجاد نمودند. بعضی از جدایه‌ها قادر نبودند علایم نکروز روی میوه و برگ گلابی به وجود آورند، ولی همواره توانستند واکنش فوق حساسیت روی برگ توتون تولید نمایند. این موتان‌ها dsp (Disease Specific) نامیده شدند. موتان‌های دیگر همیشه قادر بودند علایم بیماری روی میوه گلابی تولید کنند. این موتان‌ها به نام agress (مهاجم) نامیده شدند. سرانجام، موتان‌هایی که تنها قادر بودند روی برگ‌های جدا شده گلابی ایجاد علایم بیماری نمایند

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.11.3]

path$^+$ (بیماری‌زای خفیف) نامیده شدند. موتان‌های ice نمی‌توانستند در دمای ۵- درجه سانتی‌گراد باعث تشکیل هسته یخ در آب مقطر سترون شوند. همه این موتان‌ها قادر بودند گیاه گوجه‌فرنگی را کلنیزه نمایند. گوجه‌فرنگی به عنوان یک گیاه غیر میزبان برای این جدایه‌های *P. s.* pv. *syringae* محسوب می‌شود. همه جدایه‌های موتان و وحشی *P. s.* pv. *syringae* توان کلنیزه کردن گیاه گوجه‌فرنگی را داشتند، به طوری که هیچ گونه اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نگردید. تنها جدایه موتان hrp به طور معنی‌داری کمتر از موتان‌های دیگر گوجه‌فرنگی را کلنیزه نمود (نگاره ۳).

هیچ یک از موتان‌ها تأثیر معنی‌داری بر رشد طولی گوجه‌فرنگی نداشتند. تنها گوجه‌فرنگی‌هایی که با جدایه وحشی *P. s.* pv. *tomato* مایه‌زنی شده بودند دچار توقف رشد شدند. بیشتر این گیاهان کاملاً نکروزه شدند. با وجود این، تنها گوجه‌فرنگی‌هایی که دچار نکروز نشده بودند در بررسی دینامیزم جمعیت باکتری و رشد طولی گیاه مورد استفاده قرار گرفتند.

بحث

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که در اثر مایه‌زنی *P. s.* pv. *tomato* روی واریته حساس گوجه‌فرنگی، ترکیبات بیماری‌زایی به سرعت در تأثیر متقابل باکتری و گیاه در ایجاد علایم بیماری وارد عمل می‌شوند.

تولید توکسین، سلول‌های باکتری را در تکثیر سریع‌تر و کلنیزه نمودن بهتر گیاه و اختلال در رشد گیاه کمک می‌نماید. بنابراین، توکسین می‌تواند به عنوان یک عامل در میزان تهاجم جدایه‌های *P. s.* pv. *tomato* مطرح باشد. جدایه‌هایی که نمی‌توانستند توکسین تولید کنند، قادر بودند در گیاه تولید نکروز و علایم بیماری نمایند، و به عنوان جدایه‌های بیماری‌زا محسوب شدند.

ایجاد موتاسیون در ژن‌های hrp باعث تولید جدایه‌های موتان غیر بیماری‌زایی شد. اثر ژن‌های hrp بی‌درنگ پس از شروع کلنیزاسیون باکتری روی گیاه ظاهر می‌شود. رشد طولی گیاه حتی بلافاصله پس از جوانه زدن بذر تحت تأثیر موتان‌های hrp قرار نگرفت. ژن‌های hrp به عنوان یک عامل ضروری در تکثیر و کلنیزه کردن باکتری در گیاه محسوب می‌شوند. پژوهشگران دیگر نیز نقش مهم ژن‌های hrp را در تأثیر متقابل سلول باکتری و گیاه، برای *Pseudomonas syringae* (۷، ۹ و ۱۶)، *Xanthomonas compestris* pv. *vesicatoria* (۳) و *Erwinia amylovora* (۱) اثبات نموده‌اند. با وجود این، کارهای این پژوهشگران بر اساس تزریق سوسپانسیون باکتری به داخل بافت‌های برگ و تکثیر سلول‌های باکتری در فضای سلولی می‌باشد. در شرایط بررسی‌هایی که انجام شد، جدایه‌های موتان hrp توانستند در سطح گیاه به راحتی تکثیر نمایند، و از آن جایی که شرایط محیطی (دما و رطوبت) برای تکثیر اپیفیت باکتری مناسب بود، چنین استنباط می‌شود که اگرچه ژن‌های hrp برای این تکثیر لازمند، ولی برای رخنه باکتری و وارد شدن در فضای بین سلولی بافت‌های گیاهی به نظر نمی‌رسد وجود آنها ضروری باشد.

در بررسی‌های انجام شده مشخص گردید که وقتی پاتووارهای *P. s.* pv. *syringae* و *P. s.* pv. *phaseolicola* بر گیاه غیر میزبان خود (گوجه‌فرنگی) مایه‌زنی شدند، همه جدایه‌ها به همان میزان جدایه وحشی سازگار (*P. s.* pv. *tomato*) در این گیاه تکثیر می‌یابند. این در حالی است که به رغم تکثیر زیاد جدایه‌های وحشی روی گوجه‌فرنگی، هیچ گونه علایم بیماری خاص و یا کاهش رشد در گیاه به وجود نمی‌آید، و تکثیر جدایه‌های موتان hrp چه در گیاه میزبان و چه در گیاه غیر میزبان به شدت تحت تأثیر قرار می‌گیرد. نتایج به دست آمده این فرضیه را تقویت می‌کند که فعالیت ژن‌های hrp برای تکثیر سلول‌های باکتری، چه روی گیاه میزبان و چه روی گیاه غیر میزبان، کاملاً ضروری است.

ژن dsp، که به طور اختصاصی در بیماری‌زایی *P. s.* pv. *syringae* روی گلابی نقش دارد، به نظر نمی‌رسد برای تکثیر این باکتری روی گوجه‌فرنگی لازم باشد. جدایه‌های موتان dsp

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.11.3]

که با قرار گرفتن Tn_5 در محل این ژن روی کروموزوم *P. s.* pv. *syringae* به دست آمد، قادر به ایجاد علایم بیماری در گلابی نبود.

جدایه‌های موتان ice این پاتووار از نظر ژندگی اپیفیتی با جدایه وحشی تفاوتی نداشتند. بنابراین، ژن ice هم برای تکثیر باکتری و کلنیزه کردن بخش‌های هوایی گیاه ضروری به نظر نمی‌رسد. با وجود این، شول و سیمولر (۲۰) گزارش کردند که جدایه‌های موتان ice ، پس از مایه‌زنی روی برگ‌های گلابی، تولید زخم‌های کوچکی در بافت‌های گیاه نمودند.

مطالعه دینامیزم جمعیت موتان‌های hrp روی گیاه آشکارا مشخص نمود که کلیه فعالیت‌هایی که به وسیله ژن‌های hrp کد می‌شود، برای کلنیزاسیون باکتری روی گیاه میزبان و غیر میزبان ضروری است. دینامیزم کلنیزاسیون جدایه‌های موتان hrp بسیار پایین‌تر از جدایه‌های وحشی، بلافاصله پس از جوانه‌زدن بذر بود. از نتایج بررسی‌های انجام شده می‌توان این گونه تصور نمود که موادی که به وسیله ژن‌های hrp کد می‌شود در چگونگی تأثیر متقابل سلول باکتری و گیاه، که برای کلنیزاسیون اپیفیت باکتری روی گیاه ضروری است، دخالت دارند. به نظر می‌رسد فعالیت‌هایی که در میزان تهاجم باکتری مؤثرند، در مقایسه با مجموعه فعالیت‌های ژن‌های hrp که در گیاه تأثیر می‌گذارند، از اهمیت کمتری برخوردار باشد.

منابع مورد استفاده

1. Bartlett, M. S. 1937. Properties of sufficiency and statistical tests. Proc. Roy. Soc. London, Series S. 160: 268-282.
2. Barny, M. A., M. H. Guinebretiere, B. Marcais, J. P. Paulin, E. Coissac and J. Laurent. 1990. Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP 1430 virulence. Mol. Microbiol. 4: 777-786.
3. Bonas, U. 1994. Hrp genes of phytopathogenic bacteria. Current Tropic in Microbiology & Immunology: Bacterial Pathogenesis of Plants and Animals-Molecular and Cellular Mechanisms, ed. Dangl, J. L., (Springer, Berlin). 192: 79-98.
4. Boucher, C. A., F. Van Gijsegem, P. A. Barberis, M. Arlat and C. Zischek. 1987. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenisity and hypersensitivity on tobacco are clustered. J. Bacteriol. 169: 5626-5632.
5. Duncan, D. B. 1955. Multiple rage and multiple F test. Biometrics 11: 1-42.
6. Gopalan, S. and S. He. 1996. Bacterial genes involved in the elicitation of bypersensitivity response and pathogenesis. Plant Dis. 80: 604-610.
7. Huang, H. C., R. H. Lin, C. J. Chang, A. Collmer and W. L. Deng. 1995. The complete hrp gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of gene reaquired for Harpin Pss secretion that are arranged colineary with Yersina ysc homologs. Mol. Plant-Microbe Interact. 8: 733-746.
8. King, E. O., M. K. Ward and D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clin. Med. 44: 301-307.
9. Lindgren, P. B. 1997. The role of hrp genes during plant-bacterial interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 35: 129-152.
10. Lindow, S. E., D. C. Arny, W. R. Barchet and C. D. Upper. 1978. Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plant. Plant Physiol. 70:1084-1089.
11. Luisetti, J. and J. P. Paulin. 1972. Recherche de *Pseudomonas syringae* a la surface des organes aeriens du poirier et etude de ses variations quantitatives. Annu. Phytopathol. 4: 215-227.
12. Ma, S. W., V. L. Morris and D. A. Cuppels. 1991. Characterization of a DNA region required for production of the phytotoxine coronatine by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Mol. Plant-Microbe Interact. 4: 69-74.

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.11.3]

13. Manceau, C. and A. Horvais. 1997. Assessment of genetic diversity among strains of *Pseudomonas syringae* by PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons zith special emphasis on *P. s.* pv. *tomato*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 498-505.

14. Manceau, C., M. Niknejad and A. Claire. 1995. Hrp genes involved in epiphytic fitness of *Pseudomonas syringae*. 6th International Symposium on the Microbial of Aerial Plant Surface. France, 11-15 Sep.

15. Mittelstadt, H. and K. Rudolph. 1998. Ice nucleation activity of strains from *Pseudomonas syringae* pathovars *atrofaciens* and *syringae*, mainly isolated from cereals. J. Phytopathol. 146: 581-586.

16. Niepold, F., D. Anderson and D. Mills. 1985. Cloning determinants of qathogenesis from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 82: 406-410.

17. Niknejad, M. and C. Manceau. 1998. Colonisation epiphyte et endophyte de differents pathovars de *Pseudomonas syringae*. Troisiem Rencontres de Phytobacteriologie Aussois, 11-15 Janvier.

18. Saunier, M., L. Malandrin and R. Samson. 1996. Distribution of *pseudomonas syringae* pathovars into twenty three O serogroup. Appl. Environ. Microbiol. 62: 2360-2374.

19. Schmid, D., D. Pridmore, G. Capitani, R. Batistutta. Jr., A. Neeser and A. Jann. 1997. Molecular organisation of the ice nucleation PROTEIN Ina V from *Pseudomonas syringae*. FEBS Letters 414: 590-594.

20. Sule, S. and E. Seemuller. 1987. The role of ice formation in the infection of sour cherry leaves by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Phytopathol. 77: 173-177.

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

[Downloaded from jcpp.iut.ac.ir on 2024-03-29]

[DOR: 20.1001.1.22518517.1381.6.1.11.3]