

## مطالعه دینامیزم جمعیت برخی جدایه‌های *Pseudomonas spp.* تحت شرایط رطوبت نسبی مختلف روی اندامهای گوجه فرنگی

مصطفی نیک نژاد کاظم پور<sup>۱</sup> و چالز مانسو<sup>۲</sup>  
۱، استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، ۲، استاد باکتریولوژی گیاهی، ایتر، آنژه - فرانسه  
تاریخ پذیرش مقاله ۸۲/۴/۱۸

### خلاصه

در این تحقیق میزان جمعیت و نحوه انتشار جدایه های مختلف *Pseudomonas spp.* که از نظر ژنتیکی با یکدیگر نزدیک بودند روی اندامهای مختلف گوجه فرنگی (ریشه، طوقه، ساقه، برگ و مریستم انتهایی) تحت شرایط رطوبت نسبی پایین (گلخانه) و رطوبت نسبی بالا (اطاقک رشد) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج تحقیق نشان داد که تحت شرایط رطوبت نسبی بالا میزان کلنیزاسیون باکتری روی تمامی اندامهای گیاه افزایش می یابد و علائم بیماری خال زدگی با انتقال نشا های گوجه فرنگی به شرایط رطوبت نسبی بالا ظاهر شد. منطقه مریستم انتهایی و طوقه بیش از سایر اندامهای گیاه توسط سلولهای باکتری کلنیزه شد. میزان تکثیر جدایه های موتان *hrp* در شرایط رطوبت نسبی بالا روی تمامی اندامهای گیاهی بطور معنی داری پایین تر از جدایه های وحشی مربوطه بود. جدایه های موتان *hrp* در شرایط رطوبت نسبی پایین تنها در منطقه طوقه تشخیص داده شدند. میزان جمعیت باکتریهای ساپروفیت در شرایط گلخانه و اطاقک رشد تقریباً مشابه بود. از میان باکتریهای ساپروفیت بیشترین جمعیت مربوط به *Stenotrophomonas maltophilia* تشخیص داده شد. در مجموع اینطور استنباط می شود که با افزایش رطوبت نسبی، میزان تکثیر سلولهای باکتری در تمامی اندامهای گیاه افزایش یافته و این امر منجر به بوجود آمدن علائم بیماری در بافتهای حساس گیاه نظیر برگها و میوه ها گردید.

**واژه‌های کلیدی:** بیماری خال زدگی گوجه فرنگی، رطوبت نسبی، انتشار باکتری، *Pseudomonas spp.*،  
*Stenotrophomonas maltophilia*

### مقدمه

فضای زیر روزنه‌ها تکثیر می‌یابند. این محلها همچنین باعث محافظت باکتری در مقابل خشکی می شوند (۱۶). زندگی اپی فیت علاوه بر اندامهای هوایی روی ریشه و بذر نیز گزارش شده است (۱۷). ماریانو و مک کارتر (۱۹۹۲) گزارش کردند که *Ptt* و *P.syringae.pv.syrinae (Pss)* قادرند بصورت اپی فیت در ریشه و قسمتهای هوایی گوجه فرنگی و دامنه وسیعی از علفهای هرز دائمی در شرایط آب و هوایی مختلف به مدت طولانی زندگی نمایند. استفانی و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند که در ایتالیا شدت بیماری سوختگی باکتریایی سویا در اثر *P. savastanoi pv.glycinea (Psg)* ارتباط

بیماری خال زدگی گوجه فرنگی در اثر *Ptt* (بیماری خال زدگی گوجه فرنگی) برای اولین بار در تایوان توسط اکابه (۱۹۳۳) گزارش شد. در ایران این بیماری در مزارع گوجه فرنگی ورامین توسط شهریاری و رحیمیان گزارش گردید (۱). با توجه به بذر زاد بودن *Ptt* این بیماری احتمالاً در اکثر نقاط جهان پراکنده است (۱۲). در چرخه زندگی بیولوژیک باکتری *Ptt* دو مرحله بیمارزایی و اپی فیت وجود دارد. سلولهای باکتری ترجیحاً در محللهای غنی از مواد غذایی مانند فرو رفتگی‌های برگ، در امتداد رگبرگ اصلی و در

P. , P. tomato .pv. apiiii .P. savastanoi. pv. P. tomato. pv. , savastanoi. pv. passiflorae P. tomato pv. philadelphi و جدایه‌های مختلف maculicola (۱۴) با سوسپانسیون باکتری با غلظت  $1 \times 10^8$  cfu<sup>2</sup> / ml ( سلول باکتری در میلی لیتر) قرار داده شدند. سپس بذور تلقیح شده بر روی کاغذ صافی سترون خشک شده و بلافاصله در داخل بلاک‌های سوراخدار از جنس پلی استیلین ( به ابعاد ۶۰ × ۴۰ سانتی‌متر) محتوی پشم شیشه کشت گردیدند. پشم شیشه قبل از کشت با محلول غذایی مرطوب شد. هر پلاک سوراخدار ۲۱<sup>۳</sup> لیتر از محلول غذایی را جذب می‌نماید. بذرها تلقیح شده گوجه فرنگی بر روی سرپوشه‌های پشم شیشه قرار داده و سپس بوسیله ورمیکولیت (۱۵۰ گرم ورمیکولیت برای هر پلاک) پوشانده شدند. پلاک‌ها در دستگاه جوانه‌زنی<sup>۴</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 نگهداری شدند. نشا گوجه‌فرنگی پس از انتقال به گلدان به مدت ۶۰ روز در گلخانه تحت شرایط رطوبت نسبی ۶۵ درصد در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگه داری شدند. سپس بخشی از گوجه فرنگی‌ها به اطاقک رشد تحت شرایط رطوبت نسبی ۹۵ درصد در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد (۱۷ ساعت) در روز و ۲۰ درجه سانتی‌گراد در شب منتقل شدند.

## ۲- جداسازی و شمارش باکتریها در گیاه

پس از ۲۱ روز برای هر گیاهچه گوجه فرنگی بطور جداگانه در داخل کیسه پلاستیکی استوماشر<sup>۵</sup> سترون و برای هر قسمت از گیاه کامل (مریستم انتهایی، برگهای و ساقه انتهایی، برگهای و ساقه میانی، برگها و ساقه پایینی، طوقه، ریشه‌های اصلی و ریشه‌های فرعی) ۱ تا ۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردید. سپس بوسیله یک غلطک پلاستیکی، گیاهچه گوجه‌فرنگی در داخل کیسه پلاستیکی کاملاً له گردید و عصاره گیاه بوسیله آب مقطر سترون به میزان  $1 \times 10^{-6}$  رقیق شدند

مستقیم با میزان آلودگی بذر دارد. سلولهای این باکتری بصورت اپی فیت در بذر می باشند. درجه حرارت و رطوبت، تاثیر زیادی بر روی تکثیر باکتریهای اپی فیت می گذارد. این اثر همچنین جهت استقرار باکتری و توسعه و شدت بیماری نیز موثر است (۷). تحقیقات کلوک و همکاران (۲۰۰۰) نشان داد که در *Ptt* با الحاق ترانسپوزان Tn<sub>5</sub> در منطقه ژن *dspA* باعث کاهش عملکرد سیستم ترشح پروتئین نوع سوم (III) در سلولهای باکتری شده و این امر باعث کاهش تکثیر سلولهای باکتری و بیماریزایی در گوجه فرنگی می‌شود. نیک نژاد و همکاران اثرات متقابل ژنهای *Pto/avrPto* را در حالت سازگاری و ناسازگاری روی کلنیزاسیون باکتری *Ptt* گزارش کردند و اظهار نمودند که کلنیزاسیون اپی فیت باکتری در شرایط مزرعه در حالت سازگاری به میزان بالاتری نسبت به حالت ناسازگاری روی گیاه صورت می‌گیرد (۶).

هدف از این تحقیق تعیین میزان جمعیت جدایه‌های مختلف *Pseudomonas spp.* که از نظر ژنتیکی نزدیک به *Ptt* بوده و همچنین موتان‌های *hrp* آنها تحت شرایط رطوبت نسبی مختلف روی اندامهای مختلف (برگ، مریستم انتهایی، ساقه و طوقه) گوجه فرنگی می باشد.

## مواد و روش‌ها

در این بررسی وارپته کانپرو<sup>۱</sup> گوجه فرنگی که حساس به باکتری *Ptt* است استفاده شد. قبل از کشت، جهت ضدعفونی سطحی، بذرها گوجه فرنگی را به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (۰/۶ درصد کلر) قرار داده شد و سپس سه بار (هر بار ۱۰ دقیقه) با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. جهت خشک کردن بذرها، آنها را روی کاغذهای صافی سترون در اطاقک کشت در زیر نور فلورسنت به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند.

### ۱- تلقیح بذرها گوجه فرنگی با باکتری و کشت آنها

بذرها گوجه فرنگی بعد از ضدعفونی سطحی و خشک شدن، به مدت ۲ ساعت در توسط جدایه های مختلف *Pseudomonas spp.* که از نظر ژنتیکی نزدیک به *Ptt* بودند که شامل *P. tomato. pv. berberidis* و *lachrymans*

2. colony forming unit  
3. plaque alveolee  
4. germinator  
5. stomachair

1. cannery row

سایر گیاهان مایه زنی شده ما بین رشد طولی گیاهان شاهد و گیاهان مایه زنی شده با جدایه ۸۲۰۷ بود. تمامی جدایه های مختلف *Pseudomonas* بر روی گیاهانی که در اطاقک رشد (رطوبت نسبی ۹۵ درصد) نگه داری شده بودند باعث ایجاد لکه‌های نکروتیک گردیدند. تنها جدایه‌های *Ptt* ۸۲۰۷ و *P.t.pv.maculicola* ۱۷۴۰ باعث ایجاد نکروز کامل گیاه شدند. نتایج بدست آمده توسط مالش پنبه آغشته با سوسپانسیون باکتری (غلظت  $10^8 \times 1$ ) در همه پاتوارهای مورد مطالعه روی گیاهانیکه در شرایط گلخانه (رطوبت نسبی ۶۵ درصد) نگه داری شده بودند باعث ایجاد لکه های نکروتیک گردید. بجز جدایه *P.t.pv.anttirrhini* ۱۶۲۰ علائم نکروتیک تنها در گیاهانی که تحت شرایط اطاقک رشد نگه داری می شدند بوجود آمد. در شرایط گلخانه گیاهان مایه‌زنی شده با این جدایه هیچگونه علائمی از خود بروز ندادند (جدول ۱). میزان جمعیت باکتری روی گیاهان مایه زنی شده که در شرایط اطاقک رشد نگه داری شده بودند در جدایه‌های مختلف *Pseudomonas spp.* در جدول ۱ نشان داده شد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که میزان جمعیت باکتری در گونه‌های مختلف با یکدیگر تفاوت معنی‌داری وجود دارند.

#### ۲- نحوه پخش سلولهای باکتری در اندامهای مختلف گیاه

پس از ۲۱ روز نگه داری گیاهان در گلخانه و اطاقک رشد، میزان جمعیت جدایه های مختلف باکتری در اندامهای مختلف گیاه تعیین گردید.

#### ۲-۱- گیاهان مایه زنی شده در شرایط گلخانه

جدایه بیماریزا *Ptt* ۸۲۰۷ تمامی قسمتهای گیاه را کلنیزه کرده بود (شکل ۱). بطوریکه بیشترین کلنیزاسیون باکتری در ناحیه طوقه صورت گرفته بود. در این منطقه  $7/58 \times 10^5$  cfu تشخیص داده شد. ریشه‌ها نیز بشدت توسط سلولهای باکتری کلنیزه شده بودند. بطوریکه در منطقه ریشه‌های اصلی و ریشه‌های موئین بترتیب  $1/5 \times 10^5$  cfu و  $1/7 \times 10^5$  cfu تشخیص داده شد. در قسمتهای هوایی گیاه، بیشترین کلنیزاسیون باکتری در ناحیه مریستم انتهایی صورت گرفته بود. میزان کلنیزاسیون باکتری در این منطقه  $8/9 \times 10^4$  cfu بوده و در برگها بین  $7 \times 10^3$  cfu تا  $8 \times 10^4$  cfu تشخیص داده شد.

و سپس از هر غلظت به میزان ۵۰ (میکرولیتر) بوسیله میکروپیپت برداشته و بر روی محیط (۱۵) (King et al., 1954) King B (محتوی ۵۰ میکرو لیتر در میلی‌لیتر) آنتی بیوتیک اکتیدیون، کشت گردید. بطوریکه در هر تشتک، عصاره گیاه آلوده تا غلظت  $10^{-6} \times 1$  قرار داده شد. برای هر تیمار ۵ گیاه (تکرار) و برای هر گیاه ۳ تشتک پتری در نظر گرفته شد. سپس تشتک های پتری را در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند و بعد از ۷۲ ساعت، کلنی‌های فلورسنت باکتری در زیر نور ماوراء بنفش شمارش گردیدند. جهت برآورد میزان جمعیت باکتری در گیاه از فرمول زیر استفاده شد.

$$N = X \cdot V \cdot D \cdot 20$$

N = تعداد سلول باکتری در هر گیاه

X = تعداد کلنی های باکتری شمارش شده در هر غلظت

D = فاکتور غلظت

V = حجم آب مقطری که به گیاه در کیسه پلاستیکی

اضافه شد

#### ۳- آنالیز آماری

پس از شمارش کلنی های باکتری از روی تشتک پتری، میزان تعداد سلولهای باکتری در هر گیاه به لگاریتم اعشاری تبدیل گردید. یکنواختی واریانس بوسیله آزمون بارتلت (۱۹۹۳) کنترل گردید. در صورتیکه واریانس‌ها توسط آزمون بارتلت یکنواخت تشخیص داده شدند، آنالیز واریانس بوسیله آزمون فیشر دنبال گردید. اگر ارزش داده‌های محاسبه شده کوچکتر از F درجدول فیشر بود در این صورت تفاوت معنی‌داری بین داده‌های مورد مطالعه وجود ندارد. و بالاخره از آزمون دانکن (۱۳) جهت گروه‌بندی میانگین‌ها استفاده شد.

#### نتایج

#### ۱- مطالعه دینامیزم جمعیت جدایه‌های مختلف

##### *Pseudomonas spp.* و رشد طولی گیاهان مایه زنی شده

مطالعه رشد طولی گیاهچه‌های گوجه فرنگی که توسط جدایه‌های مختلف *Pseudomonas spp.* مایه‌زنی شده بودند نشان داد که میزان رشد طولی این گیاهان بطور معنی‌داری پایین تر از شاهد بود. جدایه بیماریزا *Ptt* ۸۲۰۷ باعث ایجاد نکروز شدید بر روی گیاهان مایه زنی شده گردید. رشد طولی

جدول ۱ - ویژگی‌های جدایه‌های بکار رفته

منبع	ویژگی‌ها	جدایه
		<i>P.t.pv.tomato</i>
بوچر و همکاران (۱۰)	جدایه وحشی نژاد صفر جدا شده از <i>Lycopersicon esculentum</i>	۸۲۰۷
مانسو و هارویز (۲۱)	<i>hrp</i> : Tn <sub>5</sub> :: ۸۲۰۷	۸۲۰۹
		<i>P.t.pv.maculicola</i>
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Raphanus sativus</i>	۱۷۴۰
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Raphanus oleacea</i>	JN-8-5
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Raphanus oleacea</i>	۱۶۵۷
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Raphanus sativus</i>	JN-8-10
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Raphanus oleacea</i>	۱۶۴۹
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Brassica nigra</i>	۲۷۴۴
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Raphanus oleacea</i>	۱۷۳۸
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Raphanus sativus</i>	۱۶۷۸
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Raphanus sativus</i>	۱۶۳۷
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Raphanus sativus</i>	۱۷۷۸
		<i>P.t.pv.antirrhini</i>
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Antirrhinum majus</i>	۱۶۲۰
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Antirrhinum majus</i>	۱۷۲۲
		<i>P.t.pv.apii</i>
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Apium graveolens</i>	۱۷۲۶
		<i>P.t.pv.berberidis</i>
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Brebris sp.</i>	۱۷۲۷
		<i>P.t.pv.passiflorae</i>
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Passiflora edulis</i>	۲۳۴۶
		<i>P.t.pv.philadelphi</i>
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Passiflora edulis</i>	۲۳۹۸
		<i>P.s.pv.lachrymans</i>
مانسو و هارویز (۲۱)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Cucumis sativus</i>	۲۴۴۰
		<i>P.s.pv.syringae</i>
یاسد و مانسو (۲۷)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Euphorbia pulcherrima</i>	۱۷۷۷
یاسد و مانسو (۲۷)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Magnolia sp.</i>	۱۶۸۸
یاسد و مانسو (۲۷)	جدایه وحشی جدا شده از <i>Pyrus cucuminus</i>	۲۰۲۷-۳۷
یاسد و مانسو (۲۷)	<i>hrp</i> : Tn <sub>5</sub> :: ۲۰۲۷-۳۷	۸۸-۱

جدول ۲: علائم بیماری و دینامیک جمعیت جدایه های *Pseudomonas* روی گوجه فرنگی تحت شرایط گلخانه و اطاقک رشد

	قدرت بیماری‌زایی		لگاریتم (تعداد گیاه cfu/) تحت شرایط اطاقک رشد
	روی گوجه فرنگی	تحت شرایط اطاقک رشد	
<i>P.t.pv.tomato</i>			
۸۲۰۷	<sup>(۱)</sup> +	+	۷/۷۲ a <sup>(۳)</sup>
<i>P.t.pv.maculicola</i>			
۱۷۴۰	+	+	۷/۷۲ a
JN-8-5	+	+	۷/۷۱ a
۱۶۵۷	+	+	۷/۶۹ ab
JN-8-10	+	+	۷/۶۸ ab
۱۶۴۹	+	+	۷/۶۷ ab
۲۷۴۴	-	+	۷/۶۹ ab
۱۷۳۸	+	+	۷/۶۶ ab
۱۶۷۸	+	+	۷/۶۳ abc
۱۶۳۷	+	+	۷/۶ bc
۱۷۷۸	+	+	۷/۵۵ c
<i>P.t.pv.antirrhini</i>			
۱۶۲۰	<sup>(۲)</sup> -	+	۷/۲۷ d
۱۷۲۲	+	+	۷/۳۹ e
<i>P.t.pv.apii</i>			
۱۷۲۶	+	+	۷/۳۰ de
<i>P.t.pv.berberidis</i>			
۱۷۲۷	+	+	۷/۳۱ de
<i>P.t.pv.passiflorae</i>			
۲۳۴۶	+	+	۷/۶۱ ab
<i>P.t.pv.philadelphii</i>			
۲۳۹۸	+	+	۷/۳۳ de
<i>P.s.pv.lachrymans</i>			
۲۴۴۰	+	+	۷/۶۶ ab
<i>P.syringae</i>			
۱۷۷۷	+	+	۷/۶ bc
۱۶۸۸	+	+	۷/۶۳ abc

(۱) + علائم بیماری خال‌زدگی (۲) - بدون علائم بیماری (۳) a, b, c, e حروف غیر مشابه در ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۰.۵٪ می‌باشد.

موتان *hrp* ، *Ptt* ۸۲۰۹ کلینیزاسیون باکتری تنها در ناحیه طوقه شناسایی شد که این میزان  $cfu \times 10^4 \times 4/3$  بود..

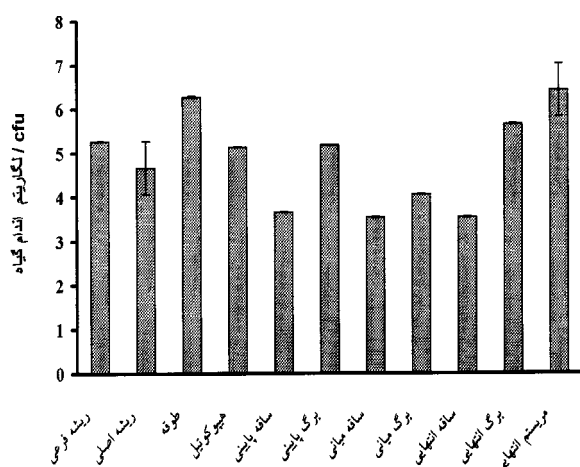
میزان کلینیزاسیون باکتری در قسمتهای مختلف ساقه  $cfu$   $10^3 \times 2/9$  تا  $10^3 \times 1/23$  بود. با وجود این در جدایه

از سایر قسمت‌ها توسط باکتری کلنیزه شده بود ( $2/13 \times 10^7$  cfu). جدایه موتان *hrp* ۸۸-۱ *Pss* در تمامی بخش‌های گیاه تشخیص داده شد. با وجود این، میزان کلنیزاسیون باکتری بطور معنی‌داری پایین‌تر از جدایه وحشی بود. در جدایه موتان نیز بخش مریستم انتهایی بیش از سایر قسمت‌ها کلنیزه شده بود.

### ۳- نحوه پخش باکتری‌های ساپروفیت

کلنیزاسیون یک میکروفلور ساپروفیت روی گیاهان مایه زنی شده توسط جدایه‌های *Ptt* و *Pss* تشخیص داده شد. این میکروفلور ساپروفیت را عمدتاً باکتری *Stenotrophomonas maltophilia* تشکیل داد. نحوه انتشار این باکتری مشابه جدایه‌های وحشی *Pseudomonas* بود. بیشترین جمعیت باکتری در ناحیه طوقه ( $9 \times 10^7$  cfu) و در ناحیه ریشه‌های اصلی و فرعی بترتیب  $2 \times 10^6$  cfu و  $1 \times 10^7$  cfu تشخیص داده شد. در قسمت‌های هوایی گیاه، بخش‌های انتهایی (مریستم انتهایی و برگ‌های جوان) و بخش‌های پایینی (هیپوکوتیل) بیش از سایر قسمت‌های گیاه کلنیزه شده بود.

میزان کلنیزاسیون باکتری‌های ساپروفیت روی گیاهان مایه‌زنی شده در شرایط اطاقک رشد و گلخانه هیچگونه تفاوت معنی‌داری نداشت. این امر احتمالاً بدین سبب بود که کلنیزاسیون باکتری به میزان بالایی در شرایط گلخانه افزایش پیدا کرده بود بطوریکه پس از انتقال گیاهان مایه‌زنی شده به شرایط اطاقک رشد، افزایش کلنیزاسیون در باکتری‌های ساپروفیت مشاهده نگردید.



شکل ۱: دینامیک جمعیت و انتشار جدایه (۸۲۰۷)

*Pseudomonas tomato* pv. *tomato* روی گوجه فرنگی در

شرایط گلخانه (میانگین ۵ تکرار).

جدایه غیر بیماریزا در گوجه فرنگی *Pss* ۲۰۲۷-۳۷ همانند جدایه بیماریزا *Ptt* ۸۲۰۷ تمامی اندام‌های گیاه را کلنیزه کرده بود. منطقه طوقه بیشتر از سایر مناطق دیگر گیاه توسط باکتری کلنیزه شده بود ( $5/75 \times 10^5$ ) و در منطقه ریشه‌های اصلی و ریشه‌های موئین  $8 \times 10^5$  cfu تشخیص داده شد. در ارتباط با بخش‌های هوایی گیاه بخش مریستم انتهایی بیشتر از سایر بخش‌های دیگر گیاه کلنیزه شده بود ( $9/5 \times 10^5$ ). با وجود این، منطقه بالایی ساقه میزان کلنیزاسیون باکتری  $3 \times 10^5$  cfu بود. سلول‌های باکتری در جدایه موتان *hrp* ۸۸-۱، *Pss* تنها در منطقه طوقه و به میزان پایین ( $4/88 \times 10^2$  cfu) تشخیص داده شد (شکل ۲).

### ۲-۲- گیاهان مایه زنی شده در شرایط اطاقک رشد

نحوه پخش سلول‌های باکتری در گیاهان مایه زنی شده در شرایط اطاقک رشد تفاوت قابل ملاحظه‌ای با گیاهان مایه زنی شده در شرایط گلخانه داشت. منطقه مریستم انتهایی بیش از سایر اندام‌های گیاه ( $1/2 \times 10^7$  cfu) کلنیزاسیون باکتری صورت گرفته بود. پس از ۱۵ روز انتقال گیاهان از گلخانه به اطاقک رشد، در بخش‌های انتهایی گیاه بروی برگ‌های جوان علائم بیماری خال زدگی مشاهده گردید.

جدایه بیماریزا *Ptt* ۸۲۰۷ تمامی قسمت‌های گیاه را کلنیزه کرده بود. میزان کلنیزاسیون باکتری در تمامی قسمت‌های گیاه (مریستم انتهایی، ساقه و برگ) که در شرایط مرطوب نگه داری شده بودند بطور معنی‌داری بالاتر از گیاهان نگه داری شده در شرایط گلخانه بود (شکل ۳).

جدایه موتان *hrp* ۸۲۰۹، *Ptt* در تمامی قسمت‌های گیاهان مایه زنی شده که در شرایط اطاقک رشد نگه داری شده بودند تشخیص داده شد. مریستم انتهایی بیش از سایر قسمت‌های گیاه توسط جدایه موتان کلنیزه شده بود ( $8/9 \times 10^3$  cfu). میزان کلنیزاسیون باکتری در برگ‌های پایینی،  $2/4 \times 10^2$  cfu و در طوقه  $1/6 \times 10^3$  cfu بود.

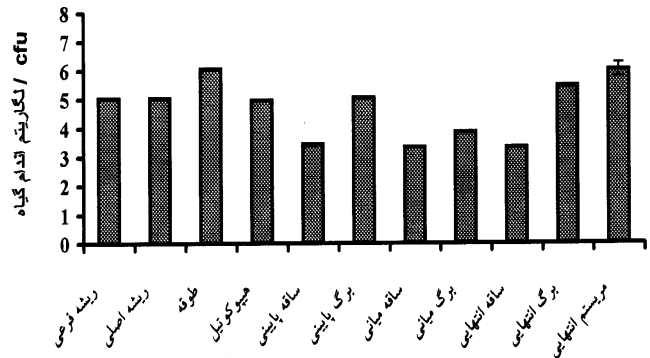
جدایه غیر بیماریزا *Pss* ۲۰۲۷-۳۷ همانند جدایه بیماریزا *Ptt* ۸۲۰۷ تمامی قسمت‌های گیاه را در شرایط اطاقک رشد کلنیزه کرده بود (شکل ۴). میزان کلنیزاسیون در تمامی قسمت‌های گیاه بطور معنی‌داری بیشتر از گیاهان مایه زنی شده در شرایط گلخانه بود. بخش مریستم انتهایی همانند قبل بیش

بین این دو باکتری روی گوجه فرنگی کاهش اندازه رشد طولی بوته‌ها گیاهانی بود که توسط *Pst* مایه زنی شده بودند. نحوه انتشار باکتری در قسمتهای مختلف گیاه یکسان نبود. علی‌رغم اینکه علائم بیماری خال زدگی روی برگها مشاهده گردید اما بیشترین کلنیزاسیون باکتری در ناحیه طوقه و مریستم انتهایی صورت گرفت. ریشه‌های گیاه نیز بشدت توسط *P.syringae* کلنیزه شد. این نتایج نشان میدهد که سلولهای باکتری بیشتر در منطقه اطراف ریشه متمرکز می‌باشند. برخی محققین گزارش کرده‌اند که *P.syringae* بصورت اپی فیت قسمتهای هوایی گیاه را کلنیزه می‌نماید (۲۲).

این محققین سلولهای *P.syringae* را در سطح ریشه‌های گیاهان مختلف گزارش کردند. ریزوسفر منطقه ای است که ترشحات ریشه در آن فراوان بوده و حاوی مواد غذایی قابل جذب برای سلولهای باکتری می‌باشد. همچنین منطقه ای است که تغییرات درجه حرارت و رطوبت نسبت به منطقه اطراف ریشه کمتر صورت می‌گیرد.

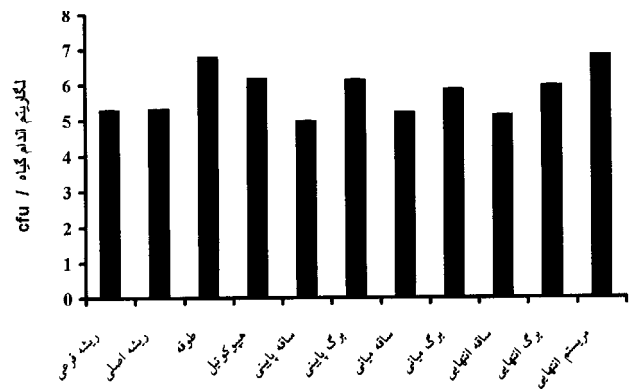
در مشاهدات میکروسکوپی مشخص شده است که سلولهای باکتری در اندامهای مختلف گیاه در فضای بین سلولی در منطقه پارانشیم و آوندها متمرکز هستند (۴). این نتایج بوضوح نشان میدهد که یک ارتباط متقابل بین سلولهای باکتری و سلولهای گیاه وجود دارد. *Ptt* یک باکتری همه‌جایی بوده که می‌تواند بصورت اپی فیت بسیاری از گیاهان را کلنیزه نماید. همچنین این باکتری قادر است به مدت دو سال در خاک و بقایای گیاهی دوام یافته و باعث انتقال بیماری از سالی به سال دیگر گردد (۲).

ناحیه دیگری که توسط سلولهای *Ptt* کلنیزه گردید مریستم انتهایی بود. این تفاوت در نحوه انتشار باکتری در قسمتهای مختلف گیاه در تمامی مراحل رشد مشاهده گردید. منطقه ساقه نسبت به سایر قسمتهای گیاه کمتر توسط باکتری کلنیزه شد. میزان کلنیزاسیون باکتری در قسمتهای هوایی گیاه بشدت تحت تاثیر میزان رطوبت نسبی در محل نگه داری گیاه داشت. در گلخانه که میزان رطوبت نسبی پایین بود، میزان جمعیت باکتری بین  $1 \times 10^3$  تا  $1 \times 10^4$  cfu در هر اندام بود. بلافاصله بعد از اینکه گیاهان در اتاقک رشد با رطوبت نسبی نزدیک به اشباع قرار داده شدند میزان جمعیت باکتری در



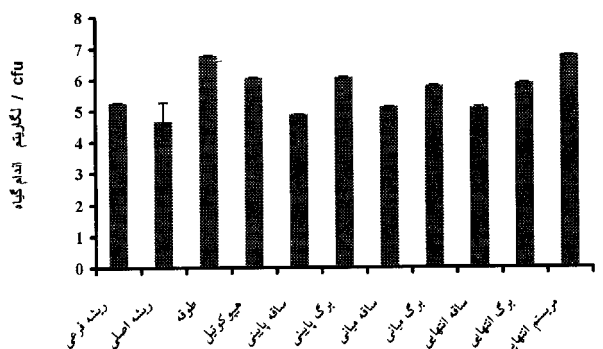
شکل ۲- دینامیک جمعیت و انتشار جدایه (۲۰۲۷-۳۷)

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* روی گوجه فرنگی در شرایط گلخانه (میانگین ۵ تکرار).



شکل ۳- دینامیک جمعیت و انتشار جدایه (۸۲۰۷)

*Pseudomonas tomato* pv. *tomato* روی گوجه فرنگی در شرایط اتاقک رشد (میانگین ۵ تکرار).



شکل ۴- دینامیک جمعیت و انتشار جدایه (۲۰۲۷-۳۷)

*Pseudomonas syringae* pv. *syringae* روی گوجه فرنگی در شرایط اتاقک رشد (میانگین ۵ تکرار).

## بحث

دینامیزم کلنیزاسیون جدایه‌های *Ptt* و *Pss* روی گیاه تحت شرایط گلخانه و اتاقک رشد تقریباً مشابه بود. تنها تفاوت

تمامی قسمت‌های گیاه افزایش یافت. در بخش‌های انتهایی گیاه میزان کلنیزاسیون باکتری بیش از سایر قسمت‌های هوایی گیاه بود بطوریکه در منطقه مریستم انتهایی  $5 \times 10^7$  cfu تشخیص داده شد. نتایج این تحقیق با مشاهدات میکروسکوپی انجام شده روی نحوه کلنیزاسیون *P. syringae* در بافتهای مختلف گیاه با استفاده از مارکر ژن *LacZ* کاملاً مطابقت دارد (۴). در منطقه انتهایی گیاه نخستین علائم بیماری خال زدگی روی برگ‌های جوان مشاهده گردید. منطقه مریستم انتهایی بعنوان یک منطقه مناسب جهت کلنیزاسیون باکتری محسوب می‌شود. عبارتی احتمالاً مریستم انتهایی منطقه‌ای است که تکثیر و حرکت سلولهای باکتری از منطقه عمق بافت به سطح بافتهای گیاه می‌باشد. رطوبت نسبی بالا این اجازه را میدهد که یک لایه آب در سطح گیاه قرار بگیرد. تحت چنین شرایط رطوبت نسبی، روزنه‌های طبیعی گیاه باز شده و باعث رخنه سلولهای باکتری به عمق بافتهای گیاه می‌گردد. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان چنین تصور نمود که کلنیزاسیون باکتری بصورت آندوفیت با ایجاد حالت تورژسانس بافتها در گیاه و تحت شرایط رطوبت نسبی بالا مساعد می‌گردد. ظهور علائم خال زدگی روی برگ‌های جوان تحت شرایط رطوبت نسبی بالا می‌تواند بعلت غلظت بالای سلولهای باکتری در عمق بافتهای گیاه باشد.

مطالعه دینامیزم کلنیزاسیون موتانهای *hrp* بخوبی نشان داد که پروتئین *Pss* harpin که توسط این ژنها کد می‌شود جهت تکثیر سلولهای باکتری روی گیاهان میزبان و غیر میزبان

ضروری است. میزان تکثیر جدایه های موتان *hrp* در مقایسه با جدایه های وحشی مربوطه پایین بود (۳). در این تحقیق پس از ۶۰ روز انتقال گیاهان مایه زنی شده با جدایه های موتان *hrp* به گلخانه، میزان جمعیت آنها تقریباً به صفر رسید بطوریکه جدایه های موتان *hrp* تنها در منطقه طوقه با یک جمعیت پایین قابل شناسایی بودند. اهمیت ژنهای *hrp* در ایجاد تاثیر متقابل بین سلول باکتری و گیاه، برای *Pseudomonas syringae* (۱۸، ۲۰)، *Xanthomonas campestris pv. vesicatoria* (۱۱) و *Erwinia amylovora* (۹) توسط سایر محققین تأیید شده است.

میزان جمعیت باکتریهای ساپروفیت در شرایط گلخانه و اطاقک رشد تقریباً مشابه بود. از میان باکتریهای ساپروفیت بیشترین جمعیت مربوط به *S. maltophilia* بود. این باکتری بعنوان گونه غالب در تمامی نمونه برداری های انجام شده شناسایی گردید. بنظر می‌رسد که آلودگی اولیه توسط *S. maltophilia* از طریق بذر صورت می‌گیرد (۵). مطالعه دینامیزم جمعیت *S. maltophilia* در گیاه نشان داد که این باکتری بخوبی قادر است قسمت‌های هوایی گیاه را به میزان بسیار بالایی کلنیزه نماید. نحوه انتشار این باکتری در قسمت‌های مختلف گیاه تقریباً یکسان نیست. همانند *Ptt* و *Pss* قسمت‌های ریشه و بخش‌های انتهایی گیاه بیشتر از سایر قسمت‌ها توسط این باکتری کلنیزه گردید و میزان جمعیت باکتری در این مناطق در تمامی مراحل رشد گیاه ثابت بود.

## REFERENCES

## مراجع مورد استفاده

۱. شهریاری، د. و ح. رحیمیان. ۱۳۷۴. خال زدگی باکتریایی گوجه فرنگی در ورامین. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. آموزشکده کشاورزی کرج. صفحه ۱۶۸.
۲. نیک‌نژاد کاظم پور، م. ۱۳۸۱. مطالعه بقاء *Pseudomonas syringae* در داخل گیاه و خاک. مجله دانش کشاورزی. دانشگاه تبریز. جلد ۱۱. شماره ۳. صفحه ۷۷-۹۱.
۳. نیک‌نژاد کاظم پور، م. ۱۳۸۱. بررسی اثر تعدادی از ژنهای بیماری‌زایی بر روی زندگی اپی فیت *Pseudomonas syringae*. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. دانشگاه صنعتی اصفهان. جلد ششم. شماره اول. صفحه ۲۲۹-۲۱۹.
۴. نیک‌نژاد کاظم پور، م. ۱۳۸۱. مطالعه کلنیزاسیون اپی فیت و آندوفیت باکتری *Pseudomonas syringae* در گیاه و خاک. مجله علوم کشاورزی و صنایع غذایی. دانشگاه فردوسی مشهد. جلد ۱۶. شماره اول. صفحه ۶۶-۵۷.
۵. نیک‌نژاد کاظم پور، ۱۳۸۱. روند استقرار باکتری *Pseudomonas syringae* روی ارقام مقاوم و حساس گوجه فرنگی در شرایط مزرعه. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی. دانشگاه علوم کشاورزی گرگان. سال نهم. شماره چهارم. صفحه ۱۷۱-۱۵۵.



۶. نیک‌نژاد کاظم‌پور، م. و ح. جهاندیده کودهی. ۱۳۸۲. بررسی اثرات متقابل ژنهای *Pto/avrPto* روی کلینزاسیون باکتری *Pseudomonas syringae*. مجله علوم کشاورزی ایران. جلد ۳۴. شماره اول.
7. Babelgeto, N.M., L. Varvaro, & M. Cirulli. 1988. Epiphytic and endophytic multiplication of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in susceptible and resistant tomato leaves. *Phytopathol. Med.* 27 :138-144.
8. Bartlett, M.S. 1937. Properties of sufficiency and statistical tests. *Proc. Roy. Soc. London Series, S.*,160: 268-282.
9. Barny, M.A., M.H. Guinebretiere, M.H. Marçais, J.P. Pulin, E. Coissac, & J. Laurent. 1990. Cloning of a large gene cluster involved in *Erwinia amylovora* CFBP 1430 virulence. *Mol. Microbio.* 4 (5): 777-786.
10. Boucher, C.A., F. Van Gijsegem, P. A. Barberis, M. Arlet, & C. Zischek. 1987. *Pseudomonas solanacearum* genes controlling both pathogenicity and hypersensitive on tobacco are clustered. *Journal of Bacteriology* 169 : 5626-5632.
11. Bonas, U. 1994. Hrp genes of phytopathogenic bacteria. *Current Topics in Microbiology & Immunology: Bacterial Pathogenesis of Plants and Animal-Molecular and Cellular Mechanisms*, ed. Dangl, J.L., (Springer, Berlin). 192 : 79-98.
12. Bradbury, J.F. 1986. *Guid to Plant Pathogenic Bacteria*. C.A.B. International , Slough, United Kingdom. 332 p.
13. Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multilpe of test. *Biometrice.* 11 : 1-42.
14. Glickmann, E. 1996. Etude biochimique et moleculaire de la production d'acide Indol -3 acetique chez *Pseudomonas syringae* . These Universite Paris IV. France. 254 p.
15. King, E. O., M. K. Ward, & D. E. Raney. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J.Lab. Clin. Medic.* 44: 301-307.
15. Kloek, A. P., D. M. Beooks, & B. N. Kunkel. 2000. A dsbA mutant of *Pseudomonas syringae* exhibits reduced virulence and partial impairment of type III secretion. *Mol. Plant Pathol.* 1 : 139-150.
16. Hirano, S. S. & C. D. Upper. 1990. Population biology and epidemiology of *Pseudomonas syringae* . *Annu. Rev. Phytopathol.* 28:155-177.
17. Hirano, S. S. & C. D. Upper. 1991. Bacterial community dynamics. P.271-294. In J.H. Andrews and S.S. Hirano (ed) *Microbial ecology of leaves*. Springer-Verlag. New Yourk.
18. Huang, H., C. Lin, R. H. Chang, C. J. Collmer & W.L. Deng. 1995. The complet *hrp* gene cluster of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 61 includes two blocks of gene required for Harpin *Pss* secretion that are arranged colineary with Yersina *ysc* homologs. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8 : 733-746.
19. Lindgren, P.B. 1997. The role of *hrp* genes during plant-bacterial interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*35: 129-152.
20. Mariano, R. I. R. & S. M. McCarter. 1992. Epiphytical of survival of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and weeds species. *Fitopathol. Brasilia.* 16 : 86-92.
21. Manceau, C. & A. Horvais. 1997. assessment of genetic diversity among strain of *Pseudomonas syringae* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of rRNA operons with special emphasis on *P.s.pv.tomato*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 498-505.
22. Niepold, F., D. Anderson, & D. Mills. 1985. Cloning determinants of pathogenesis from *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA.* Vol. 82 : 406-410.
23. Schneider, R. W. & G. Grogan. 1977. Tomato leaf trichomes a habitat for resident population of *Pseudomonas syringae*. *Phytopathology.* 67: 898-902.
24. Okabe, N. 1933. Bacterial disease of plants occuring in Formosa. II. Bacterial leaf spot of tomato. *J. Soc. Tropic. Agric. Taiwan.* 5 : 26-36.
25. Shafique, H. L. Taxonomie des *Pseudomonas* phytopathogen du groupe de *Pseudomonas syringae* : etude phenotipique et genotipique. These . Universite d'Angers. France. U.F.R. des Sciences. 107pp.
26. Stefanie, E., D. Caffier, & N. Fiore. 1998. The economic impact of the bacterial blight of soybean under european agroclimatic condition. *J. of Plant Pathol. Abstracts of papers .* Vol. 80 (3).
27. Yassad-Carreau. S., C. Manceau, & J. Luisetti. 1994. Occurrence of specific reaction induced by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* on bean pods, lilac and pear plants. *Phytopathology.* 43 :528-536.

## Population Dynamics of Certain *Pseudomonas* spp. Isolates under Different Relative Humidity Conditions on the Organs of Tomato

M. NIKNEJAD-KAZEMPOUR<sup>1</sup> AND CH. MANCEAU<sup>2</sup>

1, Assistant Professor Plant Protection Dept. Faculty of Agricultural Sciences,  
University of Guilan-Iran

2, Professor INRA, Station Phytobacteriology, Angers-France

Accepted July, 9, 2003

### SUMMARY

In this study, the dynamic population and distribution of several different isolates of *Pseudomonas* spp., which were genetically related, on various organs of tomato (roots, stems, crown, leaves and apex) were determined under conditions of relatively low as well as high humidity (greenhouse and growth chamber respectively). Results showed that under conditions of high humidity bacterial colonization increased on all organs. Symptoms of bacterial speck of tomato were observed when tomato plantlets were transferred to high humidity conditions. The apex and crown showed higher levels of bacterial colonization. Multiplication rates in *hrp* isolates, in high humidity conditions, were significantly lower than in wild type isolates on all organs. *Hrp* mutant in low humidity conditions could only be identified on the crown. Dynamic population of saprophytic bacteria in greenhouse and growth chamber conditions was similar. Amongst saprophytic bacteria, most were identified as *Stenotrophomonas maltophilia*. It is concluded on the whole that, under conditions of high humidity, bacterial multiplication rates on all organs increased leading to bacterial speck of tomato in sensitive plant organs such as leaves and fruits.

**Key words:** Bacterial speck of tomato, Distribution of bacteria, Relative humidity, *Pseudomonas* spp., *Stenotrophomonas maltophilia*