مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۴، شماره ۱، سال ۱۳۸۲ (۱۶۱-۱۴۹)

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

مصطفی نیک نژاد کاظم‌پور[1] و حسن جهاندیده کودهی[2]
۱، استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان
۲، مربی گروه زراعت و اصلاح نباتات دانشگاه گیلان
تاریخ پذیرش مقاله ۸۱/۸/۸

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* درپلاسمید نوترکیب pLA(*avrPto*)کلون‌گردیدوسپس‌این‌پلاسمیدازطریق الکتروپوریشن به داخل سلولهای جدایه‌های وحشی *P.s.* pv *tomato.* ، *P.s.*pv. *phaseolicola* و *P.s.*pv. *syringae* منتقل شد. رقم حساس‌کانریرو (فاقد ژن مقاومت *Pto*) و رقم مقاوم کاستون (واجد ژن مقاومت *Pto*) گوجه فرنگی بوسیله جدایه‌های وحشی و جدایه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب(*avrPto*) pLA مایه زنی شدند. نتایج‌حاصله نشان داد هیچگونه اختلاف معنی داری بین جدایه‌های وحشی و جدایه‌های حاوی‌پلاسمید نوترکیب از نظر میزان تکثیر باکتری بر روی رقم حساس وجود ندارد در صورتیکه در رقم‌مقاوم میزان تکثیر باکتری در جدایه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب (*avrPto*) pLA از نظر آماری بطورمعنی داری پایین‌تر از جدایه‌های وحشی (فاقد پلاسمید نوترکیب) بود. تأثیر تئوری ژن از برای ژن‌همچنین بر روی میزان رشد طولی گیاه نیز قابل مشهود بود. رشد طولی در گیاهان رقم مقاوم که با جدایه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب pLA (*avrPto*)مایه زنی شده بودند از نظر آماری بطور معنی‌داری 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 ولی‌کلنیزاسیون 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 غیربیماریزایی *avrPto* ، *Pseudomonas syringae*
اپی‌فیت، دینامیزم جمعیت

مقدمه

باکتری *Pseudomonas syringae* یک بیمار گر گیاهی است که باعث نکروز درقسمتهای 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 غیربیماریزایی در باکتری و ژن مقاومت در گیاهان می‌باشد. باکتریهای بیمارگر گیاهی بر اساس هم‌کنش ژن (ژنهای) بیماریزایی‌شان با ژن مربوطه مقاومت در گیاهان به نژادهای مختلفی تفکیک شده‌اند. اولین ژن غیربیماریزایی در باکتریها توسط کین و استاسکویچ (۱۹۸۸) از(*Psg*) *P.s.* pv.*glycinea* 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 ومقاومت بنظر می‌رسد در اثر یکسری تحولاتی در باکتری غیر بیماریزا و گیاه مقاوم بوجود آمده باشند. واکنش

مکاتبه کننده: مصطفی نیک‌نژاد کاظم‌پور

ناسازگاری که بعلت اثرات متقابل یک ژن غیر بیماریزایی با یک ژن مقاومت پدیدار می‌گردد ممکن است باعث ایجاد واکنش فوق حساسیت [1] در گیاه شود (۴). در گوجه‌فرنگی پیتبالدوو 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 کوتاه‌کروموزوم شماره ۵ گوجه فرنگی قرار دارد. همچنین پیلوسکی و همکاران (۱۹۸۶) ژن مقاومت *Pto2* را در گونه *Lycopersicon histurum* var. *glabatrum* شناسایی نمودند.

مدتی بعد، استوکینجر وهمکاران (۱۹۹۴) دو ژن مقاومت *Pto3* و *Pto4* را در رقم *L.h*.var. *glabatrum* 134417 گزارش‌دادند. 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 گوجه فرنگی نسبت به*Pst* از خود عکس‌العمل‌دفاعی‌نشان داده و پروتئین کیناز (protein kinase) را رمز سازی می‌نمایند. عمل پروتئین کینازها دریافت پیام از ژن*Pto* و سپس انتقال به ژنهای‌غیر بیماریزایی *avrPto*در *Pst* می‌باشد. توبیاس و همکاران (۱۹۹۹) گزارش کردند که شناسائی ژن غیربیماریزایی *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 گوجه فرنگی مانندویروس 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 الیسیتورهایی که غالبا خارج از سلولی هستند هم‌کنش دارند. حال اگر الیسیتورهایی با وزن مولکولی پایین وجود داشته باشند مستقیما با پروتئین کینازهای در سیتوپلاسم سلول گیاهی و ژن غیربیماریزایی*avrPto* در سلول باکتری واکنش کرده و بعد از دریافت علائم میکروبی توسط سیتوپلاسم سلول‌گیاهی، 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، آنیون‌سوپراکسید) از مشخصات اثر متقابل واکنش ناسازگاری در سلولهای گیاهی می‌باشد (۲۰) . در*Pst* عمل‌نسخه برداری *avrPto* بوسیله فاکتورهای *cis* و *trans* تنظیم می‌شود. انواع الکل‌ها، و اشکال‌مختلف 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 دیگربنامهای *avrE*، *avrD* و *avrA* را در جدایه PT23 از *Pst* گزارش نمودند ولی ژنهای مقاومت مربوط به این ژنهای غیر بیماریزایی در گوجه فرنگی شناسائی 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 جدایهPT23 با واکنش فوق حساسیت در سویا هیچگونه ارتباطی وجودندارد هر چند که نقش ژنهای *avrE* و *avrA* در افزایش بیماریزایی روی گیاه گوجه فرنگی مشخص‌شده 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 گوجه فرنگی (میزبان) و کلون نمودن این ژنها در جدایه *Pss*۲۰۲۷-۳۷ و بیماریزایی روی گلابی بود. سپس مایه زنی جدایه‌های نوترکیب *Pss* روی گوجه فرنگی (غیر میزبان) انجام گرفت.

مواد و روشها

در این بررسی دو واریته گوجه فرنگی کانریرو[2] و کاستون[3] بترتیب حساس و مقاوم به باکتری *Pst* مورد استفاده قرار گرفت. واریته کاستون دارای ژن مقاومت *Pto* می‌باشد که این ژن قادر است ژن‌غیر بیماریزایی *avrPto* را در نژاد صفر *Pst* ناسایی نماید.

1. hypersensitivity

2. cannery row
3. caston

قبل از کشت، جهت ضدعفونی سطحی، بذرهای گوجه فرنگی به مدت ۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت‌سدیم (۶/. درجه کلر) قرار گرفتند و سپس سه بار (هر بار ۱۰ دقیقه) با آب مقطر سترون شستشو داده‌شده و جهت خشک کردن بذرها، روی کاغذهای صافی سترون در اطاقک کشت در زیر نورفلورسنت به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند.

۱- مایه زنی بذرهای گوجه فرنگی با باکتری و کشت آنها

بذرهای گوجه فرنگی بعد از ضد عفونی کردن سطحی و خشک شدن، به مدت ۲ ساعت درسوسپانسیون باکتری با غلظت 1×10^{8} سلول باکتری در میلی لیتر قرار گرفتند و سپس بذور مایه زنی‌شده بر روی کاغذ صافی سترون خشک شده و بلافاصله در داخل پلاک‌های سوراخدار از جنس پلی‌اتیلن (به ابعاد ۶۰× ۴۰ سانتی‌متر) محتوی پشم شیشه کشت گردیدند. پشم شیشه را قبل از کشت بامحلول غذایی مرطوب شد. هر پلاک سوراخدار ۲۱ لیتر از محلول غذایی را جذب کرد. بذرهای مایه‌زنی شده گوجه فرنگی بر روی سرپوشهای پشم شیشه قرار گرفتند و سپس بوسیله ورمیکولیت‌پوشانده شدند (۱۵۰ گرم ورمیکولیت برای هر پلاک). پلاک‌ها در دستگاه جوانه زنی [1] در ۲۵ درجه‌سانتی گراد در روز (۱۷ ساعت) و ۱۸ درجه سانتی گراد 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 هرکدام یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردید. سپس بوسیله یک غلطک پلاستیکی، گیاهچه‌گوجه فرنگی در داخل کیسه پلاستیکی کاملا له گردید و عصاره گیاه بوسیله آب مقطر سترون تا 1×10^{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 اکتیدیون، کشت‌گردید. بطویکه در هر تشک، عصاره مادر تا رقت 1×10^{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 درجه‌سانتیگراد قرار داده شدند و بعد از ۷۲ ساعت کلنی‌ها فلورسنت باکتری در زیر نور ماوراء بنفش‌شمارش گردیدند. جهت برآورد میزان باکتری در گیاه از فرمول زیر استفاده شد :

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

N = تعداد سلول باکتری در هر گیاه

X = تعداد کلنی‌های باکتری شمارش شده در هر رقت

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 گیاه‌به 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 برای‌مقایسه 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 ۵گرم، 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 [2] ۴۰۰ میکرولیتر محلول STET (ساکارز ۸٪ ، ۵ درصد تریتون X-100، ۱۰ میلی لیتر EDTA نیم مولار، ۵ میلی لیتر Tris/HClیک مولار، pH۸ /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 قرارگرفت تا دیواره سلولهای باکتری لیز شود. لوله‌ها در حمام بن ماری جوش به مدت یک دقیقه قرارداده‌شدند و سپس به مدت ۱۰

1. germinator

2. eppendorf

دقیقه در g ×۱۱۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب[1] بدست‌آمده بوسیله یک چوب کبریت سترون خارج شد. در هر تیوب یک میلی لیتر مخلوط فنل، کلروفرم، ایزوآمیل الکل (۱:۴۹:۵۰) اضافه شد و دو فاز تشکیل شده در لوله با تکان دادن آهسته مخلوط گردید و سپس به مدت ۵ دقیقه در xg ۱۱۰۰۰ سانتریفوژ شد. قسمت روئی به آرامی بوسیله میکروپیپت برداشته و به میزان ۰/۸ حجم برداشته شده به ژن ایزوپروپانول اضافه گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار گرفت. دوباره لوله به مدت ۱۰ دقیقه در xg ۱۱۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده (DNA) را در دستگاه خشک کن تحت خلاء[2] در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد خشک گردید و بالاخره رسوب DNA پلاسمیدی را در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر۲ بار تقطیر شده[3] سترون حل‌گردید.

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 بافرP1 (۱۰میلی مولار Tris/HCl ، ۸ pH، ۱۰ میلی مولار EDTA) قرار داده و بلافاصله ۳۰۰ میکرولیتر بافر P2 (۲۰میلی مولارNaOH ، یک درصد SDS) به‌آن اضافه شد و لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه در ظرف حاوی یخ قرارداده 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 ۵/۵ pH) در دمای ۴ درجه سانتی گراد اضافه شد. در این زمان به ستونQIAGEN یک میلی لیتر بافر QBT (۷۵۰ میلی‌مولار NaCl، ۵۰ میلی مولار MOPS ، ۱۵درصد الکل اتانول، ۱۵ درصد triton X-100 ، ۷/۵ pH) جهت متعادل کردن ستون ریخته شد. لوله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در g × ۱۱۰۰۰ سانتریفوژ می‌نمائیم. بلافاصله قسمت روئی را برداشته و در ستون QIAGEN-tip-20 می‌ریزیم. بعد از خارج شدن قسمت روئی از ستون، DNA موجود در رزین قرار گرفت. چهار مرتبه ستونQIAGEN-tip-20 با بافر QC (یک مولار NaCl، ۵۰ میلی مولارMOPS ، ۱۵ درصد الکل اتانول با ۷ pH) شستشو گردید. سپس DNA خالص شده بر روی ستون QIAGEN با ۸۰۰ میکرولیتر بافر QF (۱۲ میلی مولار NaCl، ۱۵ درصدTris/HCl ، ۱۵ درصد الکل اتانول، ۸/۵ pH) برداشت شد. جهت خالص سازی DNA به هر لوله ۷/ . حجم DNA الکل ایزوپروپانول اضافه نموده و سپس تیوبها به مدت ۳۰ دقیقه در g ×۱۱۰۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب بدست‌آمده که همان DNAمی‌باشد به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه خشک کن در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا خشک شود. بالاخره DNAدر ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دوباره تقطیر شد و حل گردید.

۵ - عیار سنجی DNA

DNA خالص شده در لوله‌های 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 ۲۶۰و۲۸۰نانومتراندازه‌گیری‌گردید.میزان‌غلظت DNA پلاسمیدی با استفاده از فرمول (۱۳) (DNA)mg/ml=OD260x50xDF همان فاکتور رقت DNA است). درجه خلوص DNA با فرمولOD260 / OD280 محاسبه شد که بایستی بین۱/۷ 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 معمولا برای اکثر آنزیمها در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (بجز آنزیم *Sma*1 در ۲۵ درجه سانتی گراد) به مدت ۲ ساعت می‌باشد. سپس‌فعالیت 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 سازگاری‌دارند در میکروتیوب قرار گرفتند (جدول ۱). لوله‌ها دمای ۱۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. لوله‌های شاهد این

3. pellet
1. speed vac
2. ultra pure

اجازه را میدهد که کارائی آنزیم Taq DNA لیگاز [1] را جهت عمل لیگاسیون کنترل گردند.

۷-کلون ژن *avrPto* [2] از *P.s.*pv.*tomato* به پلاسمید pLA2917

استخراج DNA پلاسمیدی از استرین‌های DH5α (pUC18) و HB101(pLA2917) با استفاده از تکنیک STET و QIAGEN انجام شد و غلظت DNA بدست آمده بین ۸۰ تا۱۲۰ میکروگرم در میلی لیتر بود.

ژن غیر بیماریزای *avrPto* از *Pst* جدایه ۸۲۰۷ با استفاده از روش واکنش زنجیره ای پلی مراز و دو آغازگر [3] : PTO1 (5' GTC-GAC-GGA-TCT-GAA-CCT-GG-3') و PTO2 (5' TTG-CAT-CAC-AGC-TGC-CC-3') تکثیر گردید.

آغازگرPTO1 در ۴۰۷ باز در قسمت جلو و PTO2 در ۷۰۷ باز قسمت عقب قطعه ژن *avrPto* قرار داشت . بعداز تکثیر*avrPto* بوسیله PCR یک قطعه ژن تقریبا ۱ کیلو بازی بدست آمد (شکل۲). شناسایی قطعه بدست آمده بوسیله محلهای آنزیمی*Sal*I،*Hind*III و *Bam*HI موردبررسی قرار گرفت. دو قطعه ژن بعد از هضم توسط هر یک از آنزیمهای فوق با توجه به موقعیت محل آنها بدست‌آمد (شکل ۳). دو انتهای ژن تکثیر شده *avrPto* بوسیله آنزیمهای*Sal*I و *Hind*III هضم‌گردید و یک قطعه ژن ۶۰۰ بازی بدست آمد که با دو انتهای پلاسمید ناقل pUC18 که با همین‌آنزیمها هضم شده بودند سازگاری داشت. قطعه ژن *avrPto* با عمل لیگاسیون در پلاسمید pUC18 قرار گرفت و پلاسمید نوترکیب بدست آمده pUC*avrPto*با عمل الکتروپوریشن به جدایه*E. coli* DH5α وارد شد (شکل۴). پلاسمید نوترکیبpUC*avrPto* جهت انتقال ژن *avrPto* به پلاسمید pLA2917 با آنزیمهای*Sal*I و *Hin*III هضم گردید و پلاسمید pLA2917 با آنزیمهای *Hpa*I و*Hind*III نیز هضم گردید. بعد از هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب pUC*avrPto* ، ژن*avrPto* از روی ژل‌اگار۱/۲٪ جدا شده و پس از خالص سازی در بافر TBE قرار گرفت. ژن *avrPto* بوسیله عمل لیگاسیون به پلاسمید pLA2917 منتقل گردید. پلاسمید نوترکیب بدست آمده (pLA-*avrPto*) در *E. coli*جدایه DH5α قرار گرفت. جدایه (DH5α) pLA-*avrPto*بر روی محیط LB حاوی ۲۰ µg/ml آنتی بیوتیک‌های تتراسیکلین و کانامایسین کشت گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. سپس پلاسمید نوترکیب pLA*avrPto*از جدایه DH5α توسط QIAGENخالص سازی گردید و پلاسمید نوترکیب با عمل الکتروپوریشن به جدایه‌های (۳۷-۲۰۲۷) *Pss* ، (۸۲۱۹) *Psp* و (۸۲۰۷) *Pst* منتقل شدند. جدایه‌های (pLA-*avrPto*) ۳۷-۲۰۲۷،(pLA-*avrPto*) ۸۲۱۹ و (pLA-*avrPto*۸۲۰۷) روی محیط کشت King B حاوی آنتی بیوتیکهای تتراسیکلین و کاناماسین (۲۰ µg/ml) در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت کشت شدند.

جدول ۱- مخلوط واکنش‌جهت لیگاسیون قطعه DNA محتوی ژن غیربیماریزایی*avrPto* درپلاسمید ناقلpLA2917 یا(pUC18) و شاهد

	آزمایش لیگاسیون	شاهد بدون آنزیم لیگاز	شاهد (بدون پلاسمید ناقل)
پلاسمید ناقل (120µg /ml)	۷ µl	۷ µl	۷ µl
DNA (80µg/ml)	۷ µl	۷ µl	۰ µl
آنزیم Ligase 10X	۵ µl	۵ µl	۵ µl
آنزیم Taq DNA 600U/ml	۱ µl	۰ µl	۱ µl
آب مقطر سترون	۳۰ µl	۳۱ µl	۳۷ µl

۸ - انتقال پلاسمید نو ترکیبpUC-*avrPto* و pLA *avrPto* به *E.coli* و انتخاب کلنی‌های حاوی پلاسمید نوترکیب

جهت انتقال پلاسمیدهای نوترکیب به جدایه *E. coli* DH5α، ابتدا سلولهای این باکتری‌بایستی به حالت شایسته [4] درآیند که برای این منظور از روش هن هن (۱۹۸۳) استفاده گردید و عمل انتقال پلاسمیدهای نوترکیب حاصل از لیگاسیون

3. ligase
4. colonage
1. primer

2. electrocompetent

به‌سلولهای شایسته انجام گرفت. مخلوط واکنش در جدول ۲ نشان داده شده است. هر لوله به‌مدت ۱۵ دقیقه در داخل ظرف حاوی یخ قرار داده شد. سپس مخلوط را به مدت ۴۵ تا ۹۰ ثانیه دردمای ۴۲ درجه سانتیگراد شوک حرارتی داده شد که این عمل باعث انتقال DNA به درون‌سلولهای 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 لوله‌اضافه شد. لوله‌ها بلافاصله روی دستگاه تکان دهنده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت قرار داده شد.

جدول ۲- محلول واکنش برای انتقال پلاسمیدهای نوترکیب به جدایه *E.coli* DH5α و شاهد

آزمایش	۱	۲	۳	٤	٥
DNA منتقل شونده	آزمایش لیگاسیون	آزمایش لیگاسیون بدون آنزیم لیگاز	شاهد لیگاسیون پلاسمید ناقل	شاهد بدون پلاسمید ناقل	شاهد آنتی بیوتیک آمپی سیلین
	۱۵ µl	۱۵ µl	۱۵ µl	۱۵ µl	۱۵ µl
جدایه DH5α	۱۰۰ µl	۱۰۰ µl	۱۰۰ µl	۱۰۰ µl	۱۰۰ µl
کل	۱۱۵ µl	۱۱۵ µl	۱۱۵ µl	۱۱۵ µl	۱۱۵ µl

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 جامدLB حاوی۲۵ µg/ml آنتی بیوتیک تتراسیکلین (برای جداسازی کلنی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pLA*avrPt*)، ۲۰ µg/ml آنتی بیوتیک آمپی سیلین همراه با ۲۰mg/ml میلی گرم در میلی لیتر ماده X-Gal و ماده ۲۰۰ µg/ml ماده IPTG برای غربال کلنی‌های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب pUC*avrPto* کشت گردید و دردمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت کلنی‌های رشدیافته به رنگ سفید از روی محیط کشت انتخابی جدا شدند. سپس جهت اطمینان، کلنی‌های‌جدا 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 باکتری حاوی پلاسمیدهای‌نوترکیب pLA*avrPto* و pUC*avrPto* را تاکید کرد.

۱۰- انتقال پلاسمیدهای نوترکیب pLA *avrPto* از *E. coli* به‌جدایه‌های‌وحشی *P. s.* pv. *syringae*، *P.s.*pv. *phaseolicola* و *P. s.* pv. *tomato* با استفاده از عمل الکتروپوریشن [1]

در ابتدا پلاسمید نوترکیب pLA*avrPto* از *E. coli* بوسیله روش QIAGEN استخراج‌گردید. سلولهای پاتووارهای باکتری *P. syringae* قبل از اینکه عمل الکتروپوریشن روی آنها صورت بگیرد بخوبی شستشو داده شده و بصورت سوسپانسیون در غلظت 1×10^{10} سلول در میلی لیترتهیه شد و برای اینکه در محیط حداقل یونهای ممکن وجود داشته باشد برای این منظور عملیات‌زیر 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 پپتون، آب مقطر ۱۰۰۰ میلی لیتر ۷ pH) قرار داده و آنرا در دستگاه تکان دهنده (۱۰۰دور در دقیقه) در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت قرار داده تا چگالی نوری در ۶۰۰ به ۴۵/. تا ۵/. برسد. بلافاصله محیط کشت‌ها در بطری‌های حاوی ۳۰۰ میلی لیتر ریخته و به مدت ۲۰ دقیقه در g ×۱۵۰۰ سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده در ۸۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ۵ درجه سانتی گراد حل شد. دوباره عمل سانتریفوژ در دمای۴ درجه سانتی‌گراد در g × ۱۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه دنبال شد. رسوب بدست آمده با ۸۰ میلی لیتر آب مقطرسترون ۵ درجه سانتی گراد حاوی ۱۰ درصد گلیسرول حل گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در g × ۱۵۰۰ 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 ۱۰درصد

1. electroporation

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

۱۲- الکتروپوریشن

مقدار۴۰ میکرولیتر سوسبانسیون سلولهای باکتریهای الکتروشایسته را همراه با یک میلی گرم از پلاسمید نوترکیب pLA*avrPto* 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 ازعمل الکتروپوریشن یک میلی لیتر از محیط کشت LP اضافه‌گردید. محیط کشت به مدت ۳ ساعت در دمای ۲۷ درجه سانتی گراد قرار داده و سپس آنرا روی محیط KingB حاوی ۲۰ µg/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[1] حاوی ژنDNA در زیر نور ماوراء بنفش بوسیله چاقوی اسکالپل جدا شد و پس از وزن کردن در لوله اپندورف قرار داده شد. یک گرم ژل برابر با یک میلی لیتر درنظر گرفته شد و به اندازه ۱/۲ حجم ژل بافر حل کننده[2] (۲۰ میلی لیتر Tris/HCl یک مولار، ۵ میلی‌لیتر NaCl ۱۵ مولار، ۵ میلی لیتر EDTA نیم مولار، ۵/. گرم SDS ، ۲ گرم PVP، آب مقطر ۷۰ میلی لیتر) و سپس ۴/۵ برابر حجم ژل تامبون نمکی[3] (۳۶ گرم NaI، ۰/۷۵ گرم Na_2SO_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 g ×۱۵۰۰ سانتریفوژ گردید.

رسوب بدست آمده با یک میلی لیتر بافر شستشو[4] (۲۰ میلی مولار Tris/HCl با ۵/ ۷ pH ، یک‌مولار EDTA ، یک 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 در۵۰ 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 درg ×۱۱۰۰۰ سانتریفوژ شد و سپس‌بلافاصله ۳۰ میکرولیتر قسمت روئی محتویDNA بوسیله میکروپیپت برداشت گردید.

نتایج

۱-نقش‌ژن*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 ۲ رقم گوجه فرنگی کانریرو و کاستون به ترتیب حساس و مقاوم به *Pst* در ۲ آزمایش‌صورت گرفت:

نتایج اولین آزمایش نشان داد که هر دو رقم گوجه فرنگی که بوسیله(*Pss*) *P.s.*pv.*syringae* تلقیح شده بودند دارای رشد طولی یکسانی بوده بطوریکه رشد طولی بر روی هر دو رقم بعد از ۲۱روز ۴۰ سانتی متر بود که هیچگونه تفاوت معنی داری با گیاهان شاهد (بدون مایه زنی) نداشت. اما باوجود 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 داری‌کوچکتر از گیاهان شاهد بودند. اندازه رشد طولی هر دو رقم که با جدایه‌های JN- 53 وJN-54 از نژاد۱ *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 این‌گیاهان بعد از ۱۴ روز کاملا نکروز شده بطوریکه دینامیزم جمعیت باکتری در مرحله رشدلگاریتمی (۱۴ روز بعد از کشت) به 1×10^{8} سلول باکتری در هر گیاه رسید.

دینامیزم جمعیت جدایه ۳۷-۲۰۲۷ از *Pss* روی هر دو رقم در مرحله رشد لگاریتمی (۱۴ روزبعد از کشت) به 5×10^{8} cfu در گیاه رسید که به طور معنی داری کمتر از جدایه ۸۲۰۷ از *Pst* روی رقم حساس بود. با وجود این، دینامیزم

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

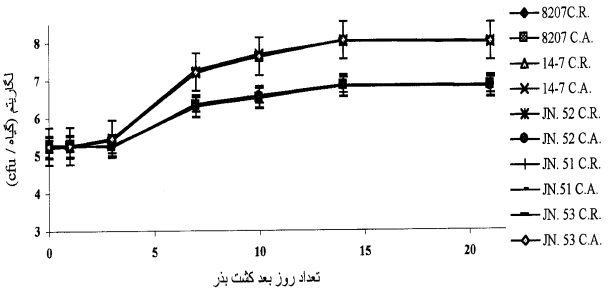
جمعیت جدایه ۸۲۰۷ روی دو رقم حساس و مقاوم متفاوت بود. دینامیزم جمعیت باکتری روی واریته حساس در مرحله رشد لگاریتمی، cfu $۱۰^{۸}$ × ۸/۲ در هر گیاه بود در صورتیکه دینامیزم جمعیت باکتری در همان مرحله روی واریته مقاوم cfu$۱۰^{۶}$× ۱/۷۷ سلول باکتری در گیاه بود که به طور معنی داری با دینامیزم جمعیت باکتری در واریته حساس تفاوت داشتند (شکل ۱). در دومین آزمایش روی تعدادی از جدایه‌های نژاد صفر *Pst* که (جدایه‌های JN-14-7 وJN-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 نسبتا سریعی حدود ۱۲ سانتی متر بودند در صورتیکه همین واریته را وقتیکه با جدایه‌هاینژاد یک مایه زنی شدند. ۲۱ روز بعد از کشت، تأخیر در رشد آنها پدید آمد و اندازه طولی آنها به ۶/۵ سانتی متر رسید. ۲۱ روز بعد از کشت، متوسط رشد طولی گیاهان رقم حساس که با جدایه‌های نژادصفر *Pst*جدایه‌های (JN-52 ،JN-51، JN-14.7 و ۸۲۰۷) مایه زنی گردیدند بترتیب ۵ و ۲/۷ سانتی‌متر 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 باوجود این هر سه جدایه باعث ایجاد لکه‌های نکروز بر روی قسمتهای هوائی گیاه شدند.

دو نوع دینامیزم جمعیت باکتری بر روی گوجه فرنگی مشاهده گردید: یک گروه از تمامی‌جدایه‌های 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 میزانcfu$۱۰^{۸}$×۱ در هر بوته رسید. هر دو رقم حساس و مقاوم که بوسیله *Pss*(جدایه ۳۷-۲۰۲۷) مایه زنی شده بودند دینامیزم‌جمعیت 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 $۱۰^{۶}$ ×۸ cfu در هر بوته رسید که از نظر آماری میزان جمعیت همین جدایه روی واریته حساس به $۱۰^{۸}$×۱ cfu در هر بوته رسید که تفاوت معنی داری بین آنها وجود داشت. آزمایشات انجام شده تأثیر تئوری ژن ازبرای ژن روی کلنیزاسیون *Pst* در گیاه میزبان (گوجه فرنگی) مورد مطالعه قرار گرفت. جهت‌بررسی دقیق‌تر اثر ژن از برای ژن کلنیزاسیون باکتری روی گیاه غیر میزبان قرار گرفت. برای این‌منظور 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 ازعمل الکتروپوریشن حضور پلاسمید نوترکیب pLA *avrPto* در هر سه جدایه از *P.syringae* (جدایه‌های ۸۲۰۷، ۸۲۱۹ و۳۷-۲۰۲۷) بعد از خالص سازی مجدد پلاسمید نوترکیب بر روی ژل الکتروفورز مورد تأیید قرار گرفتو بدین ترتیب جدایه‌های نوترکیب*P.syringae* تهیه شدند.

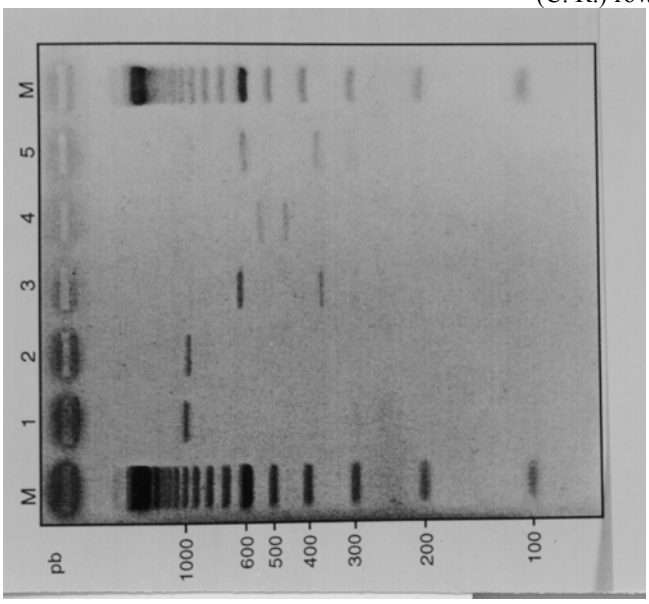
۲ - دینامیزم جمعیت جدایه‌های نوترکیب *P.syringae* با ژن *avrPto* روی گوجه فرنگی

آنالیز دینامیزم جمعیت جدایه‌های وحشی و جدایه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب pLA *avrPto* روی رقم حساس کانریرو نشان داد که بین آنها از نظر آماری هیچگونه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (شکل۵). با وجود این بر روی رقم مقاوم کاستون دینامیزم جمعیت جدایه‌های نوترکیب (pLA-*avrPto*) ۳۷-۲۰۲۷، ۸۲۰۷(pLA *avrPto*) و (pLA *avrPto*) ۸۲۱۹ از نظرآماری بطور معنی‌داری کمتر از جدایه‌های وحشی خود بود (شکل۶). دررابطه بارشدارقام حساس و مقاوم، گیاهان رقم حساس که با جدایه‌های غیربیماریزا *Pss* و *P.s*.pv. *phaseolicola* (*Psp*) مایه‌زنی‌شده 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 (pLA *avrPto*) ۸۲۰۷ مایه زنی شده بودند بعد از ۱۰ روز دچار نکروز کامل شدند. بر روی گیاهان مقاوم که دارای ژن‌بیماریزای *Pto* بودند بطور کاملا 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 کاملا مشهود بود. رشد طولی گیاهان رقم مقاوم مایه زنی شده با جدایه‌های (pLA *avrPto*)

۳۷-۲۰۲۷ و (pLA *avrPto*) ۸۲۱۹ بطور معنی داری رشد طولی آنها کمتر ازگیاهانی بودند که با جدایه‌های وحشی آنها (۸۲۱۹ و ۳۷-۲۰۲۷) مایه‌زنی شده بودند. گیاهان مقاوم‌مایه زنی شده با جدایه‌های ۸۲۰۷ و (pLA *avrPto*) ۸۲۰۷ که به ترتیب دارای ژن غیر بیماریزایی *avrPto* بر روی کروموزوم و پلاسمید نوترکیب بودند هیچگونه اختلاف معنی داری با یکدیگرنداشتند 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.

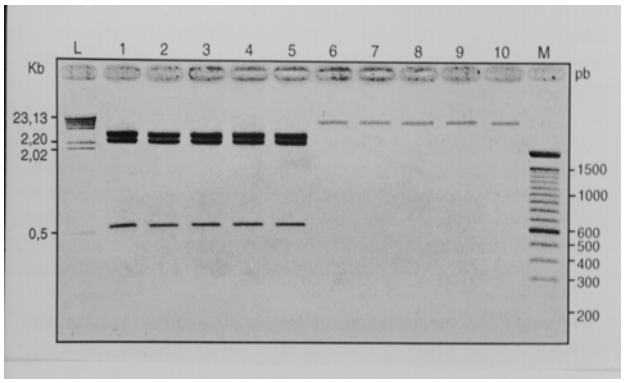


شکل ۱- دینامیزم جمعیت نژاد صفر *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* جدایه‌های (۸۲۰۷، JN-14-7، JN-51، JN-52) و نژاد (جدایه JN-53) بر روی رقم حساس(C.A.) Caston و cannery (C. R.) row



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

PT23 حاصل از آغازگرهای PTO1 وPTO2 ، نتیجه هضم آنزیمی این قطعه ژن شامل ۲ - با آنزیم محدودکننده *SalI* (قطعه 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*SalI* (۲ قطعه ژن قابل رؤیت: ۳۶۰ و ۶۰۰ بازی M - شناساگر با وزن مولکولی ۱۰۰بازی



شکل ۳ : الکتروفورز ژل اگارز ۲ در صد: ۱ الی ۵ هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب

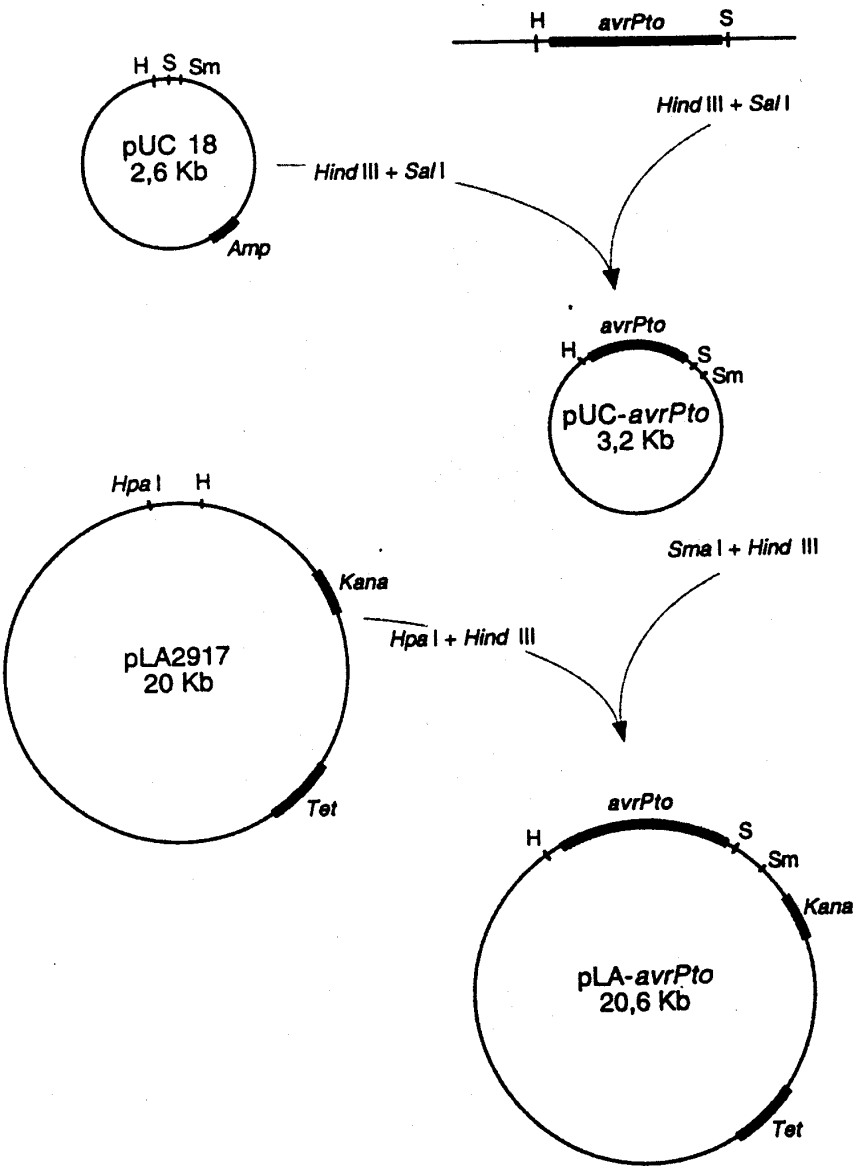
pUC*avrPto* بوسیله آنزیم محدود کننده *HindIII* و *SmaI* که حاصل ۲ قطعه ژن pUC18 (۲۶۸۸بازی) و قطعه ژن کلون شده بوسیله آنزیم محدود کننده *SmaI* ، ژن *Pto* (۶۰۰بازی) ۶ الی ۱۰- پلاسمید pLA2917 توسط آنزیمهای محدود کننده*HpaI* و *HindIII* هضم شده‌اند (۲۰کیلو بازی DNA -L باکتریوفاژ χ که توسط آنزیم *HindIII*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

بحث

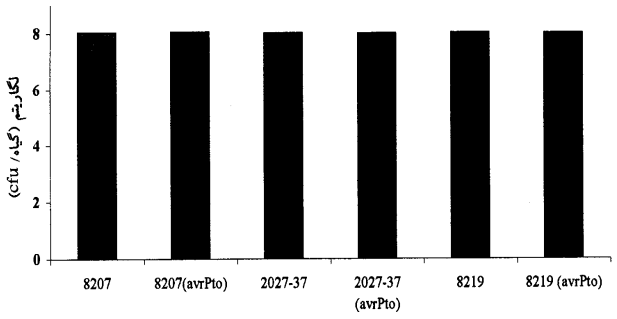
جدایه‌های وحشی نژاد یک*Pst* فاقد ژن غیر بیماریزایی *avrPto* قادر به شناسایی ژن مقاومت *Pto* در رقم مقاوم گوجه فرنگی نبودند و در نتیجه بعد از مایه زنی روی این بوته‌ها دچارنکروز بر روی قسمتهای هوائی و کمی رشدی شدند. در رقم مقاوم، آنالیز دینامیزم جمعیت‌جدایه‌های وحشی*Pss* و*Psp* با *Pst*از نظر آماری تفاوت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

بیماریزایی بودن جدایه‌های وحشی *Pss* و *Psp* بر روی گوجه فرنگی‌نیز 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 اصولا 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 گیاهان‌میزبان خود دارای این سیستم می‌باشند. اما سیستم شناسایی ژن از برای ژن که یک مکانیسم دفاعی‌برای 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 میزبان‌خود را شناسایی نمایند و لذا از تکثیر آنها در درون بافتهای گیاهی جلوگیری بعمل آید.

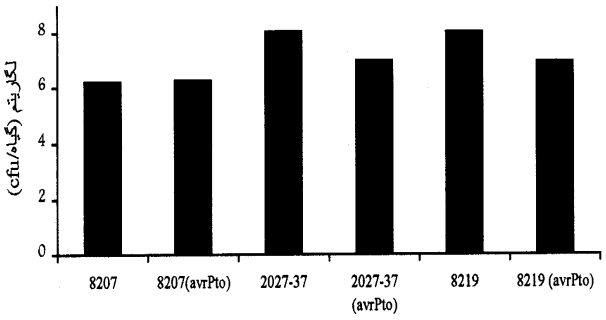
محققین دیگر نیز به نقش مهم تأثیر متقابل ژن از برای ژن بر روی میزان تکثیر باکتری روی گیاه برای (۵) *P.s.pv.pisi* ، (۲۱) *P.s.*pv.*syringae* اثبات نموده‌اند. با وجو د این، کارهای این محققین بر اساس تزریق سوسپانسیون باکتری در داخل بافتهای برگ و تکثیر سلولهای باکتری در فضای‌سلولی بر روی گیاه میزبان باکتری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



شکل ۴- چگونگی ساخت پلاسمیدهای نوترکیب pUC *avrPto* و pLA *avrPto*



شکل ۵- دینامیزم جمعیت (جدایه ۸۲۰۷) Pst و (جدایه ۳۷-۲۰۲۷) و جدایه (۸۲۱۹) *Psp* و جدایه‌های نوترکیب (pL*AavrPto*) آنها بر روی رقم حساس(*Pto*) Cannery rowگوجه فرنگی،۲۱روز بعد از کشت بذر



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

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

گیاه میزبان و غیر میزبان از طریق مایه زنی بذرصورت 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 روی‌گیاهان مقاوم که با جدایه‌های وحشی و جدایه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب-pLA *avrPto* مایه‌زنی شده بودند اختلاف معنی داری وجود داشت با وجود این اثرات متقابل ژن از برای ژن هیچگونه‌تأثیری بر روی تهاجم جدایه‌ها در بوجود آوردن علائم بیماری نداشت. بنابراین می‌توان چنین فرض‌نمود که رشد طولی گیاهان گوجه فرنگی بعد از مایه زنی جدایه‌های حاوی پلاسمید نوترکیب pLA*avrPto* 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 بعداز جوانه زدن بذر وارد عمل‌شد و باعث بوجود آوردن علائم بیماری بر روی گیاه می‌شوند.

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 charactristic 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. l: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 coloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tmato 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 evidencefor a new locus controlling pothogen recognition. Plant Cell.6: 511-520.
19. Stockingre, E.M. and L.L. Walling.1994. *Pto3* and *Pto4*: novel genes from *Lycopersicom historum* 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 confere 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 toevaluate virulence and pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* pv.*syringae*. Plant Dis. 76 : 370-373.

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

M. NIKNEJAD KAZEMPOUR [1] AND H. JAHANDIDEH KODEHI [2]
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 resarch *avrPto* genes were colonage on plasmid pLA2917 and then recombinant *avrPto* transferred to wild isolates of *Pseudomanas 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 signficant difference in bacterial population dynamism on suceptible variety between wild isolates having recombinant plasmid. However, these isolates singificantly differ on the bacterial population dynamism on resistant variety.The effect of gene for gene theory was also noted on growth lengh of the plant. The growth length was sinificantly 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. comatibility 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.