پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۰ (۱): ۵۷-۷۰ (۱۴۰۰)

DOI: 10.22034/ARPP.2021.12501

ارزیابی اثر تیمارهای مختلف در آلودگی‌زدایی بذرهای گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

دریافت: ۹۹/۶/۲۳ بازنگری: ۹۹/۷/۲۱ پذیرش: ۹۹/۱۰/۳

فرزانه محمدسور[۱]، مریم خضری[۲]✉، ابوالقاسم قاسمی[۲]

[۱] گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. [۲] موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. ✉ma_khezri@yahoo.com

چکیده

شانکر باکتریایی با عامل *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* از بیماری‌های مهم، با خسارت اقتصادی گوجه فرنگی در دنیا و ایران می‌باشد. مهار این بیماری به دلیل بذربرد بودن و بقای طولانی مدت باکتری روی بذر مشکل است. بهترین روش در کنترل بیماری، استفاده از یک برنامه مدیریتی بر اساس کاربرد بذرهای عاری از باکتری بیماری‌زا و ارقام مقاوم است. در این تحقیق، اثر تیمار حرارتی (طیف دمایی ۴۴ تا ۶۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه)، سموم شیمیایی (بردو، نوردوکس، کوپراکسی‌کلرید و مانکوزب در سه دُز مختلف) و آنتی‌بیوتیک (نالدیکسیک‌اسید، جنتامایسین، داکسی‌سیلین، استرپتومایسین، اریترومایسین، کلوگزاسیلین، ریفامپین، سفالکسین و فورازولیدون) بر سالم‌سازی سطحی بذرهای آلوده به باکتری، در آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد حرارت‌درمانی، روشی مناسب برای ضدعفونی سطحی بذرها است. تیمار دمایی ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۵ دقیقه، بدون تاثیر جانبی زیاد روی جوانه‌زنی بذرها، قادر به حذف ۹۸٪ باکتری از بذرهای تیمار شده بود. در دماهای پایین‌تر، عدم آلودگی زدایی موفقیت‌آمیز بذرها و در دماهای ۶۰ و ۶۴ درجه سلسیوس، تاثیر منفی زیاد روی جوانه‌زنی بذرها مشاهده شد. تیمار بذور با آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین، نالدیکسیک‌اسید، داکسی‌سایکلین و جنتامایسین منجر به حذف کامل (۱۰۰ ٪) باکتری‌ها، بدون تأثیر منفی روی جوانه‌زنی گردید. تیمار بذرها با سموم شیمیایی نشان داد، هیچ یک از ترکیبات یاد شده قادر به حذف کامل باکتری از بذرها نبودند و برخی از این سموم مورد استفاده باعث کاهش قابل توجه جوانه‌زنی بذرها شدند. به طور کلی، کاربرد آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه موثرترین روش سالم‌سازی سطحی بذرهای گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری در سطوح تحقیقاتی می‌باشد اما جهت کاربرد عملی تیمار حرارتی ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۵ دقیقه قابل توصیه می‌باشد.

کلمات کلیدی: شانکر، بذربرد، حرارت درمانی، گوجه فرنگی، آلودگی‌زدایی

Evaluation of various treatments on disinfestation of tomato seeds infected with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Received: 13 Sep 2020 Revised: 12 Oct 2020 Accepted: 23 Dec 2020

Farzaneh Mohammadsour[1], Maryam Khezri[2], Abolghasem Ghasemi[2]

[1]Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Urmia University, Urmia, Iran. [2]Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. ✉ma_khezri@yahoo.com

Abstract

Bacterial canker caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is one of the most serious and economically important diseases of tomato worldwide, including Iran. Control of this disease is difficult due to seed-borne nature and long term survival of the bacterial agent on seed. A preventive disease management program based on using pathogen-free seeds and resistant cultivars is the best method for the disease control. In this research, effects of thermal treatment (44-64 °C for 15, 25 and 35 minutes), chemical compounds (Bordeaux, Nordox, Copper oxychloride and Mancozeb at three different doses), and nine antibiotics (Nalidixic Acid, Gentamicin, Doxycycline, Streptomycin, Erythromycin, Cloxacillin, Rifampin, Cefalexin and Furazolidone) were investigated on tomato seeds disinfestation under laboratory conditions. The results showed that thermotherapy is a suitable approach for seed disinfestation as thermal treatment of 56 °C for 35 minutes eliminated 98% of bacterial infestation without any effect on seed germination. In lower temperature, seed disinfestation was unsuccessful, and treatments of 60 and 64 °C showed a significant negative effect on seed germination. Treatments with Rifampin, Nalidixic acid, Doxycycline and Gentamicin were effective in the elimination of 100% bacteria on seeds without any negative effect on seed germination. Treating infected seeds with the copper compounds showed that none of them were able to eliminate the bacteria, and significantly reduced seed germination. Overall, the application of the studied antibiotics is the most effective method for tomato seeds disinfestation for research purposes, but heat treatment at 56 °C for 35 minutes for the practical application is recommended.

Keywords: Canker, Disinfestation, Seed born, Thermotherapy, Tomato

How to cite:

Mohammadsour F, Khezri M, Ghasemi AG, 2021. Evaluation of various treatments on disinfestation of tomato seeds infected with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 10 (1): 57–70.

مقدمه

گیاه گوجه‌فرنگی با نام علمی *Solanum lycopersicum* L.، بومی آمریکای جنوبی و مرکزی است و تقاضا برای مصرف آن در سطح جهان بالا می‌باشد (Peralta & Spooner 2007; Bergougnoux 2014). بر اساس گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد، در سال ۲۰۱۸ سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی در دنیا ۴۷۶۲۴۵۷ هکتار و میزان تولید آن ۱۸۲۲۵۶۴۵۸ تن بوده است (Anonymous 2020). با افزایش سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی، این محصول بیش از پیش در معرض حمله بیمارگرهای مختلف قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتودی قرار گرفته است (Borkar & Yumlembam 2017; Parsa *et al.* 2018; Davari *et al.* 2020). این بیمارگرها از عوامل اصلی محدودکننده تولید و کاهش عملکرد محصول گوجه‌فرنگی می‌باشد. شانکر باکتریایی، لکه برگی باکتریایی، پژمردگی باکتریایی و خال‌زدگی از مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی گوجه‌فرنگی با خسارت زیاد و پراکنش جهانی هستند (Benton Jones 2007; Blancard 2012; Borkar & Yumlembam 2017).

بیماری شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی توسط باکتری *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* corrig. (Smith 1910) Davis *et al.* 1984 (Cmm) ایجاد می‌شود. این باکتری گرم مثبت، فاقد اندوسپور، هوازی اجباری و فاقد تاژک است (Schaad *et al.* 2001). بیماری شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی، اولین بار در سال ۱۹۰۹ از گلخانه‌ای در ایالت میشیگان آمریکا گزارش گردید (Sen *et al.* 2015). در ایران اولین نشانه‌های بیماری، در سال ۱۳۶۷ در یک مزرعه گوجه‌فرنگی در حومه شهرستان ارومیه در استان آذربایجان‌غربی مشاهده شد (Mazarei *et al.* 1993). گیاهان گوجه‌فرنگی آلوده به بیماری شانکر باکتریایی بسته به میزان حساسیت رقم، شرایط کاشت، زمان آلودگی، سیستمیک یا موضعی بودن آلودگی و شرایط محیطی، بویژه دما و رطوبت، نشانه‌های متنوعی بروز می‌دهند (de León *et al.* 2011). از دست رفتن سطوح فتوسنتزکننده، پژمردگی یک‌طرفه بوته، کوتولگی، شانکر ساقه، برگ‌ریزی، نکروز حاشیه‌برگ‌ها، تغییر رنگ بافت‌های آوندی به قهوه‌ای و ایجاد لکه‌های موسوم به "لکه‌های چشم پرنده‌ای" روی میوه‌ها از جمله نشانه‌های این بیماری هستند (Yang & Francis 2007; de León *et al.* 2011; Nandi *et al.* 2018).

کنترل بیماری شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی بسیار مشکل می‌باشد زیرا این بیماری دارای بروز نامنظم و فراوانی غیرقابل پیش‌بینی است. به دلیل اینکه بذر منبع اصلی آلودگی در این بیماری است، پیشگیری از بروز بیماری، از طریق تولید بذرهای گواهی شده و عاری از بیماری از راهکارهای مهم در مدیریت بیماری است که موجب جلوگیری از حضور و استقرار بیمارگر می‌شود (de León *et al.* 2011). استفاده از بذرهای عاری از بیمارگر که بصورت طبیعی و یا با استفاده از تیمارهای بذری حاصل می‌شوند، ممکن است منبع آلودگی بالقوه بیماری را از بین ببرد. روش‌هایی بر اساس تیمارهای شیمیایی یا حرارتی به منظور دستیابی به بذرهای عاری از بیماری شانکر بررسی شده‌اند. برخی از این روش‌ها مانند تیمار شیمیایی با اسید کلریدریک تا حد زیادی در کاهش جمعیت‌های Cmm موثر هستند، با این‌حال هیچ روشی وجود ندارد که بدون کاهش قدرت جوانه‌زنی بذرها، حذف کامل این بیمارگر را تضمین کند (Pradhanang & Collier 2007; Yang & Francis 2007). (Fatmi *et al.* 1991) نشان دادند که باکتری Cmm در عصاره استخراج شده از بذرهای غوطه‌ور شده در اسیدکلریدریک ۰/۶ مولار، اسیداستیک ۰/۲۵ یا ۰/۵٪، همچنین بذرهای تیمار شده با آب داغ ردیابی نشد. با این حال، نتایج این مطالعه نشان داد که اغلب تیمارهای بذری منجر به کاهش معنادار قدرت جوانه‌زنی بذرهای گوجه‌فرنگی می‌شوند. نتایج مطالعه محققان نشان داد که نشاءهای گوجه‌فرنگی که با آب داغ تیمار شده بودند، در شرایط گلخانه و مزرعه دچار بیماری باکتریایی نشدند (Lewis Ivey & Miller 2004). (Carisse *et al.* 2000) و (Nega *et al.* 2003) نیز پس از تیمار بذرهای سبزیجات با آب داغ، با هدف حذف باکتری زانتاموناس نتایج مشابهی را گزارش کردند.

با توجه به اهمیت استفاده از بذر سالم و عاری از باکتری بیمارگر در مدیریت بیماری شانکر باکتریایی گوجه‌فرنگی، این مطالعه با هدف بررسی تیمارهای مختلف حرارتی، شیمیایی و آنتی‌بیوتیکی روی سالم‌سازی سطحی بذرهای گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری Cmm با در نظر گرفتن حفظ قدرت زنده‌مانی بذر انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه سویه‌های باکتری

تعداد پنج سویه باکتری بیماری‌زای *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* جداسازی شده از مزارع گوجه‌فرنگی اطراف شهرستان ارومیه (Aghazadeh *et al.* 2017)، از کلکسیون

میکروبی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ارومیه تهیه و در آزمایش‌ها استفاده شدند.

بررسی قوه نامیه بذر

در آزمایش‌های مختلف از بذر گوجه‌فرنگی رقم Early Urbana Y استفاده شد. جهت تعیین قوه نامیه بذرها، تعداد ۲۰۰ عدد بذر ضدعفونی سطحی شده (با قرار دادن در اتانول ۷۰٪ به مدت دو دقیقه، محلول هیپوکلریت سدیم ۲٪ به مدت سه دقیقه و سه بار شست‌وشو با آب مقطر سترون)، روی کاغذ صافی سترون درون تشتک پتری قرار داده شد. به تشتک‌های پتری ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد. سپس تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. میزان جوانه‌زنی بذرها تا یک هفته بررسی شد (Olmez *et al.* 2007).

آلوده‌سازی بذر با سویه‌های باکتری بیماری‌زا

پس از ضدعفونی سطحی بذرها، سوسپانسیون 1×10^{9} سلول در میلی‌لیتر (Colony forming unit per milliliter) ($CFU\ ml^{-1}$) سویه‌های باکتری بیمارگر به بذرها اضافه شد و به مدت دو ساعت روی دستگاه شیکر-انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس بذرها روی کاغذ صافی سترون زیر هود لامینار قرار داده شدند. بذرهای آلوده، پس از خشک شدن کامل در آزمایش‌های مربوط به تیمارهای سالم‌سازی و جوانه‌زنی بذر مورد استفاده قرار گرفتند (Fatmi *et al.* 1991).

آزمون آنتی‌بیوگرام (Antibiogram)

مشخصات دیسک آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در آزمون آنتی‌بیوگرام در جدول ۱ آورده شده است (شرکت پادتن‌طب، ایران). مقدار ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون 1×10^{9} $CFU\ ml^{-1}$ باکتری، در سطح محیط کشت NA حاوی یک درصد گلوکز به طور یکنواخت پخش گردید. پس از ۳۰ دقیقه، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک به فاصله ۲۵ میلی‌متر از هم، روی محیط کشت قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت قطر هاله بازدارنده از رشد باکتری در اطراف دیسک‌ها، اندازه‌گیری و میزان حساسیت سویه‌های باکتری به آنتی‌بیوتیک‌ها تعیین گردید (Psallidas 1993).

جدول ۱. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مورد استفاده در آزمون آنتی‌بیوگرام.

Table 1. Antibiotic discs used in the antibiogram test.

Antibiotic	Concentration*	Antibiotic	Concentration*
Amikacin	30	Imipenem	10
Amoxicillin	25	Meropenem	10
Ampicillin	10	Nalidixic acid	30
Cefalexin	30	Nitrofurantoin	300
Ceftizoxime	30	Novobiocin	30
Chloramphenicol	30	Penicillin	10
Cloxacillin	1	Rifampin	5
Doxycycline	30	Streptomycin	10
Erythromycin	15	Tetracycline	30
Furazolidone	100	Trimethoprim sulfamethoxazole	75.23
Gentamicin	10	Vancomycin	30

* Microgram per disc

تیمارهای سالم‌سازی بذر تیمارهای حرارتی: این آزمایش در طیف دمایی ۴۴ تا ۶۴ درجه سلسیوس و در سه زمان ۱۵، ۲۵ و ۳۵ دقیقه انجام شد. مقدار پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون به ۲۰۰ عدد بذر گوجه‌فرنگی آلوده شده با باکتری اضافه گردید. لوله‌های آزمایش محتوی بذرها در حمام آب گرم که قبلاً دمای آن تنظیم شده بود، قرار داده شدند. در طول زمان آزمایش، دمای آب درون لوله‌ها با قرار دادن دماسنج در لوله‌ای مجزا کنترل شد. پس از گذشت زمان موردنظر، لوله‌ها از حمام آب گرم خارج شده و بذرها جهت آبگیری زیر هود لامینار روی کاغذ صافی سترون قرار داده شد (Fatmi *et al.* 1991; Kritzman 1993).

تیمارهای آنتی‌بیوتیک: با در نظر گرفتن نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام، کارایی ۹ آنتی‌بیوتیک برتر در سالم‌سازی بذر بررسی شد. برای این منظور، محلول ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک‌های نالدیکسیک‌اسید، جنتامایسین، داکسی‌سیلین، استرپتومایسین، اریترومایسین، کلوگزاسیلین، ریفامپین، سفالکسین و فورازولیدون در آب مقطر سترون تهیه شد. تعداد ۲۰۰ عدد بذر آلوده به باکتری، به مدت ۲ ساعت در محلول هر آنتی‌بیوتیک قرار داده شد (Fatmi *et al.* 1991).

تیمارهای سموم شیمیایی: در این آزمایش از غلظت‌های توصیه شده سموم مانکوزب، بردو، نوردوکس و کوپراکسی‌کلراید (جدول ۲)، همچنین دو و سه برابر غلظت‌های توصیه شده، استفاده گردید. تعداد ۲۰۰ عدد بذر گوجه‌فرنگی آلوده به باکتری Cmm به مدت ۲ ساعت در غلظت‌های موردنظر هر سم غوطه‌ور شد (Fatmi *et al.* 1991).

جدول ۲. سموم شیمیایی مورد استفاده در ضدعفونی بذرهای گوجه‌فرنگی.

Table 2. Chemical compounds used for tomato seeds disinfection.

Generic name	Trade name	Recommended concentration	Producer company
Mancozeb	Mancozeb 80% WP	2/1000	Nantong chemical Co. (China)
Bordeaux	Bordeaux Kimia 18% SC	2/100	Kavosh Kimia Kerman Co. (Iran)
Nordox	Cobre Nordox 75% WG	1.5/1000	Nordux chemical Co. (Norway)
Copper oxychloride	Copper oxychloride Ghazal 35% WP	3/1000	Ghazal Shimi Co. (Iran)

در همه تیمارهای سالم‌سازی سطحی، بذرها پس از خشک شدن کامل روی محیط کشت NA قرار داده شدند و از نظر رشد باکتری مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از یک هفته، تعداد بذرهای عاری از باکتری شمارش گردید. در تیمارهای شاهد، بذرهای آلوده شده با باکتری در آب مقطر سترون با دمای ۲۵ درجه سلسیوس (دمای اتاق) قرار داده شدند و پس از خشک شدن کامل، مانند بذرهای تیمار شده با حرارت، آنتی‌بیوتیک و سموم شیمیایی، روی محیط NA کشت شدند.

بررسی اثر تیمارهای مختلف روی زنده‌مانی بذر

جهت بررسی تاثیر تیمارهای مختلف حرارتی، آنتی‌بیوتیک و سموم شیمیایی روی زنده‌مانی بذر، برای هر تیمار تعداد ۲۰۰ عدد بذر تیمار شده روی کاغذ صافی سترون مرطوب، درون تشتک پتری قرار داده شد. جوانه‌زنی بذرهای تیمار شده تا یک هفته مورد بررسی قرار گرفت (Olmez *et al.* 2007).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار برای هر تیمار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.4) انجام شد و میانگین داده‌ها با روش توکی مقایسه شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel رسم شدند.

نتایج

بررسی قوه نامیه بذر

بر اساس نتایج آزمون قابلیت جوانه‌زنی بذر، قوه نامیه بذر گوجه‌فرنگی رقم Early Urbana Y، ۹۹/۶٪ تعیین شد.

تاثیر تیمارهای حرارتی و زمان روی صفات مورد مطالعه

با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها، تاثیر دما و اثر متقابل دما و زمان روی شاخص‌های مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار گردید. اثر زمان روی درصد جوانه‌زنی بذر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود، در حالیکه اثر زمان روی درصد سالم‌سازی بذر معنی‌دار نبود (جدول ۳).

تاثیر تیمارهای حرارتی روی سالم‌سازی سطحی بذر: تیمارهای حرارتی مختلف به طور معنی‌داری موجب سالم‌سازی بذر در مقایسه با تیمار شاهد شدند (جدول ۴). در این آزمایش، تیمارهای حرارتی مختلف و تیمار شاهد در گروه‌های مختلف آماری قرار گرفتند.

جدول ۳. تجزیه واریانس تیمارهای حرارتی و زمان روی سالم‌سازی و جوانه‌زنی بذر.

Table 3. Variance analysis of temperatures and times on seed disinfestation and seed germination.

		Mean squares	
Source of variation	**Degrees of freedom**	**Seed disinfestation (%)**	**Seed germination (%)**
Temperature	6	15144.7**	16267.5**
Time	2	4.22^{ns}	382.6**
Temperature×Time	12	35.93**	403.6**
Experimental error	63	8.41	13.31
Coefficient of variabilities (%)		3.64	4.45

^{ns} Not significant and **significance level at 1%

جدول ۴. اثر تیمارهای دمایی در زمان‌های مختلف روی صفات مورد مطالعه.

Table 4. The effect of temperatures at different times on the studied traits.

Temperature (°C)	Time (minute)	Seed disinfestation (%)	Seed germination (%)
Control (25)	15	0 ± 0^{h}	99.6 ± 0.24^{a}
	25	0 ± 0^{h}	99.6 ± 0.24^{a}
	35	0 ± 0^{h}	99.6 ± 0.24^{a}
44	15	80.5 ± 0.96^{g}	99.2 ± 0.48^{a}
	25	85.5 ± 4.94^{fg}	99.2 ± 0.48^{a}
	35	$87.5 \pm 0.50^{e\text{-}g}$	99.0 ± 0.58^{a}
48	15	85.0 ± 1.73^{fg}	99.0 ± 0.50^{a}
	25	$88.9 \pm 1.14^{d\text{-}f}$	98.7 ± 0.75^{a}
	35	$90.4 \pm 1.23^{c\text{-}f}$	98.7 ± 0.95^{a}
52	15	$90.5 \pm 1.50^{c\text{-}f}$	98.5 ± 0.64^{a}
	25	$91.5 \pm 0.46^{b\text{-}f}$	98.0 ± 1.41^{a}
	35	$92.6 \pm 0.43^{a\text{-}f}$	98.0 ± 0.82^{a}
56	15	$94.0 \pm 0.82^{a\text{-}e}$	98.0 ± 0.50^{a}
	25	$97.0 \pm 0.58^{a\text{-}c}$	97.3 ± 1.15^{a}
	35	$98.0 \pm 0.0^{a\text{-}c}$	97.2 ± 0.95^{a}
60	15	$96.0 \pm 2.45^{a\text{-}d}$	95.5 ± 2.22^{a}
	25	99.0 ± 0.58^{ab}	93.0 ± 6.35^{a}
	35	99.5 ± 0.50^{a}	48.5 ± 4.11^{b}
64	15	99.5 ± 0.50^{a}	0.0 ± 0.0^{c}
	25	99.5 ± 0.50^{a}	0.0 ± 0.0^{c}
	35	100 ± 0.0^{a}	0.0 ± 0.0^{c}

Numbers with different letters in each column have a statistically significance level at 5% based on the Tukey test.

بیشترین درصد سالم‌سازی بذر، به ترتیب در تیمارهای دمای ۶۴ درجه سلسیوس با زمان ۳۵ دقیقه و سپس ۶۴ درجه سلسیوس با زمان‌های ۲۵ و ۱۵ دقیقه و دمای ۶۰ درجه سلسیوس با زمان ۳۵ دقیقه مشاهده شد (جدول ۴). این تیمارها در گروه a قرار گرفتند. تیمار دمای ۶۴ درجه سلسیوس با زمان ۳۵ دقیقه، سبب سالم‌سازی ۱۰۰٪ و سایر تیمارها سبب سالم‌سازی ۹۹/۵٪ بذرهای تیمار شده در مقایسه با تیمار شاهد شدند. همچنین کمترین تعداد بذر غیرآلوده در دمای ۴۴ درجه سلسیوس با زمان ۱۵ دقیقه به دست آمد که نتیجه آن سالم‌سازی ۸۰/۵٪ بذرها در مقایسه با تیمار شاهد بود. در هر تیمار دمایی اعمال شده، اختلاف معنی‌دار، بین زمان‌های اعمال شده مشاهده نگردید (جدول ۴).

تاثیر تیمارهای حرارتی روی جوانه‌زنی بذر: مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای حرارتی روی جوانه‌زنی بذر نشان داد، تیمارها به همراه تیمار شاهد در سه گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۴). در دماهای ۴۴، ۴۸، ۵۲ و ۵۶ درجه سلسیوس در هر سه زمان مورد آزمایش و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس در زمان‌های ۱۵ و ۲۵ دقیقه اختلاف معناداری در مقایسه با تیمار شاهد دیده نشد و این تیمارها در گروه a قرار گرفتند. میزان جوانه‌زنی بذرها در این گروه آماری، بین ۹۹/۲ و ۹۳٪ متغیر بود. در دمای ۶۰ درجه سلسیوس با زمان ۳۵ دقیقه، جوانه‌زنی بذرها تا ۴۸/۵٪ کاهش یافت (گروه b). بیشترین اثر منفی روی جوانه‌زنی بذرها در دمای ۶۴ درجه سلسیوس در تمام زمان‌های مورد آزمایش دیده شد به طوری که هیچ یک از بذرهای تیمار شده، قادر به جوانه‌زنی نبودند (جدول ۴).

آزمون آنتی‌بیوگرام

بر اساس نتایج تجزیه واریانس آزمون آنتی‌بیوگرام (جدول ۵)، میزان حساسیت سویه‌های بیماری‌زای باکتری Cmm نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های مورد بررسی، در سطح احتمال یک درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود.

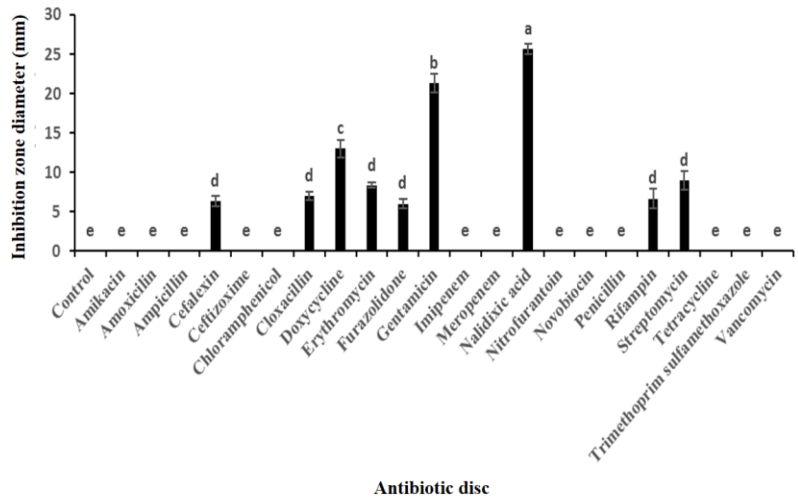
جدول ۵. تجزیه واریانس آزمون آنتی‌بیوگرام.

Table 5. Variance analysis of antibiogram test.

Source of variation	Degrees of freedom	Mean squares Inhibition zone diameter
Antibiotic disc	21	155.27**
Experimental error	46	942
Coefficient of variabilities (%)		21.60

**Significance level at 1%.

در آزمون آنتی‌بیوگرام، تفاوت قابل توجهی بین دیسک‌های آنتی‌بیوتیک مختلف، از لحاظ ایجاد هاله بازدارنده رشد باکتری مشاهده گردید. مقایسه میانگین داده‌های آزمون آنتی‌بیوگرام نشان داد که از ۲۱ دیسک آنتی‌بیوتیک مورد بررسی، تعداد ۱۳ آنتی‌بیوتیک اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد نداشتند و هاله بازدارنده از رشد باکتری در اطراف دیسک‌ها ایجاد نشد (شکل ۱). آنتی‌بیوتیک‌های نالدیکسیک‌اسید، جنتامایسین، داکسی‌سیلین، استرپتومایسین، اریترومایسین، کلوگزاسیلین، ریفامپین،سفالکسین و فورازولیدون به ترتیب بیشترین قطر هاله بازدارنده از رشد باکتری را در مقایسه با تیمار شاهد ایجاد کردند (شکل ۱). این ۹ آنتی‌بیوتیک برای انجام آزمون سالم‌سازی بذر مورد استفاده قرار گرفتند.



شکل ۱. اثر دیسک آنتی‌بیوتیک‌های مختلف روی رشد سویه‌های باکتری *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. ستون‌های با حروف یکسان با هم اختلاف معنی‌دار ندارند ($p \leq 0.05$).

Figure 1. Effect of different antibiotic discs on growth of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains. Columns with similar letters have no statistically significance difference ($p \leq 0.05$).

تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف روی صفات مورد بررسی

نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌های آزمایش آنتی‌بیوتیک‌ها نشان داد که اثر تیمار آنتی‌بیوتیک‌های مختلف روی درصد سالم‌سازی بذر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود اما آنتی‌بیوتیک‌های مختلف تاثیر معنی‌داری روی درصد جوانه‌زنی بذر نداشتند (جدول ۶).

جدول ۶. تجزیه واریانس آنتی‌بیوتیک‌های مختلف روی صفات مورد مطالعه.

Table 6. Variance analysis of different antibiotics on studied traits.

Source of variation	Degrees of freedom	Mean squares	
		Seed disinfestation (%)	Seed germination (%)
Treatment	9	4679.12^{**}	5.37^{ns}
Experimental error	30	9.43	3.06
Coefficient of variabilities (%)		4.27	1.79

^{ns} Not significant and **significance level at 1%.

تاثیر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف روی سالم‌سازی سطحی بذر: بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین، آنتی‌بیوتیک‌های مورد مطالعه به همراه تیمار شاهد آلوده در گروه آماری مختلف قرار گرفتند و از لحاظ آماری بر اساس آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند (جدول ۷).

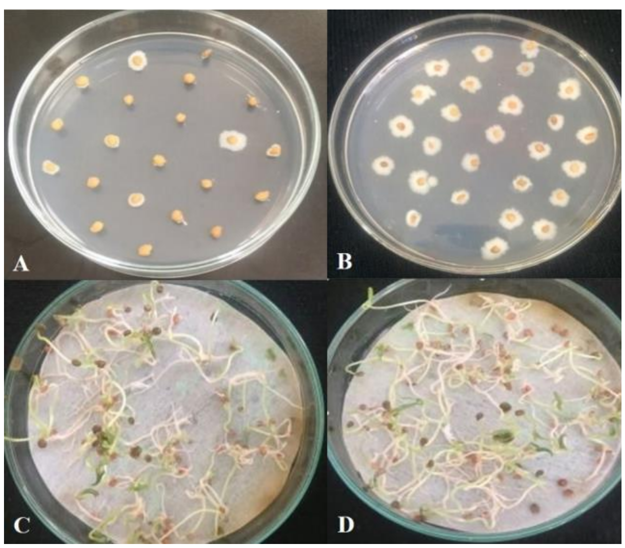
آنتی‌بیوتیک‌های ریفامپین، نالیدیکسیک‌اسید، فورازولیدون، داکسی‌سایکلین و جنتامایسین بیشترین اثر را در سالم‌سازی سطحی بذرها داشتند، به طوری که باعث سالم‌سازی ۱۰۰٪ بذرهای آلوده به باکتری شدند و در گروه آماری a قرار گرفتند (جدول ۷). آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین با ۶۴٪ سالم‌سازی بذر (شکل ۲ A و B) در گروه b، آنتی‌بیوتیک کلوگزاسیلین با ۵۸٪ در گروه bc و آنتی‌بیوتیک سفالکسین با ۵۲/۵٪ سالم‌سازی در گروه c قرار گرفتند. کمترین اثر روی سالم‌سازی سطحی بذر در تیمار آنتی‌بیوتیک اریترومایسین با ۴۴٪ سالم‌سازی مشاهده شد که در گروه آماری d قرار گرفت (جدول ۷).

جدول ۷. تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های منتخب روی سالم‌سازی سطحی و جوانه‌زنی بذر.

Table 7. Effect of selected antibiotics on seed disinfestation and germination.

Antibiotic	Seed disinfestation (%)	Seed germination (%)
Control	0.0 ± 0.0 [e]	99.6 ± 0.24 [a]
Rifampin	100 ± 0.0 [a]	98.1 ± 1.12 [a]
Nalidixic acid	100 ± 0.0 [a]	97.7 ± 1.03 [a]
Furazolidone	100 ± 0.0 [a]	97.7 ± 1.03 [a]
Doxycycline	100 ± 0.0 [a]	97.2 ± 0.43 [a]
Gentamicin	100 ± 0.0 [a]	97.7 ± [a]1.03 [a]
Streptomycin	64.0 ± 0.82 [b]	98.1 ± 0.87 [a]
Cloxacillin	58.0 ± 4.08 [bc]	96.9 ± 1.26 [a]
Cefalexin	52.5 ± 1.71 [c]	95.7 ± 0.85 [a]
Erythromycin	44.0 ± 1.83 [d]	97.9 ± 0.83 [a]

Numbers with different letters in each column have a statistically significance level at 5% based on the Tukey test.



شکل ۲. تاثیر آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین روی شاخص‌های سالم‌سازی سطحی و جوانه‌زنی بذر. **A.** ممانعت از رشد باکتری بیماری‌زا، **B.** تیمار شاهد، **C.** تاثیر منفی جزیی روی جوانه‌زنی بذر، **D.** تیمار شاهد.

Figure 2. Effect of streptomycin on seed disinfestation and germination indexes, **A.** Inhibition of pathogenic bacterial growth **B.** Control, **C.** Minor negative effect on seed germination, **D.** Control.

تاثیر آنتی‌بیوتیک‌ها روی جوانه‌زنی بذر: آنتی‌بیوتیک‌های استفاده شده در این آزمون تاثیر منفی قابل مشاهده‌ای روی جوانه‌زنی بذر نداشتند (شکل ۲ C و D). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که این تیمارها با تیمار شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند و بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد دیده نشد (جدول ۷).

اثر دُزهای مختلف سموم شیمیایی روی صفات مورد مطالعه

نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که نوع سم، دُزهای مورد بررسی و اثرات متقابل سم و دُز روی صفات مورد مطالعه اثر معنی‌دار داشتند (جدول ۸).

تاثیر سموم شیمیایی روی سالم‌سازی بذر: مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد تیمارهای سم و دُز اثرات مختلفی روی صفات مورد ارزیابی در سطح احتمال پنج درصد داشتند. سموم شیمیایی مورد استفاده برای ضدعفونی بذرها همراه با تیمار شاهد در گروه‌های آماری مختلف قرار گرفتند (شکل ۳). در همه تیمارها، سموم مورد آزمایش بر ضدعفونی سطحی بذر اثر مثبت داشتند. میزان ضدعفونی بذر با افزایش دُز در سموم مورد مطالعه افزایش یافت. بین دُزهای مختلف هر کدام از سموم، از نظر ضدعفونی سطحی بذر اختلاف معنی‌دار وجود داشت. کمترین درصد سالم‌سازی بذر مربوط به سم بردو بود که در دُزهای مختلف به ترتیب ۴۱/۹٪، ۵۵/۷٪ و ۷۸/۵٪ نسبت به تیمار شاهد، موجب سالم‌سازی بذر شد. سم کوپراکسی‌کلراید بیشترین اثر روی سالم‌سازی بذر را نشان داد و در دُزهای یک تا سه، آلودگی بذرهای مورد مطالعه را به ترتیب ۶۴/۹٪، ۷۸٪ و ۹۵/۷٪ در مقایسه با تیمار شاهد کاهش داد. تاثیر دُزهای مختلف سموم نوردوکس و مانکوزب روی این ویژگی نزدیک به هم بود (شکل ۳).

تاثیر سموم شیمیایی روی جوانه‌زنی بذر: مقایسه میانگین تاثیر دُزهای سموم مختلف بر جوانه‌زنی بذرها نشان داد که در هر چهار سم با افزایش دُز، میزان جوانه‌زنی بذرها کاهش یافت (شکل ۴). هر چهار سم در مقایسه با تیمار شاهد، در دُزهای توصیه‌شده تاثیر قابل مشاهده‌ای بر درصد جوانه‌زنی بذر نداشتند ولی در دُزهای دو و سه با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند. بیشترین تاثیر منفی روی جوانه‌زنی بذر در تیمار دُز سه کوپراکسی‌کلرید مشاهده شد که درصد جوانه‌زنی بذرها ۸۶/۲٪ بود. کمترین اثر بازدارندگی از جوانه‌زنی بذر، در سم بردو مشاهده شد (شکل ۴).

جدول ۸. تجزیه واریانس دُزهای مختلف سموم شیمیایی روی صفات مورد مطالعه.

Table 8. Variance analysis of different doses of antibacterial compounds on studied traits.

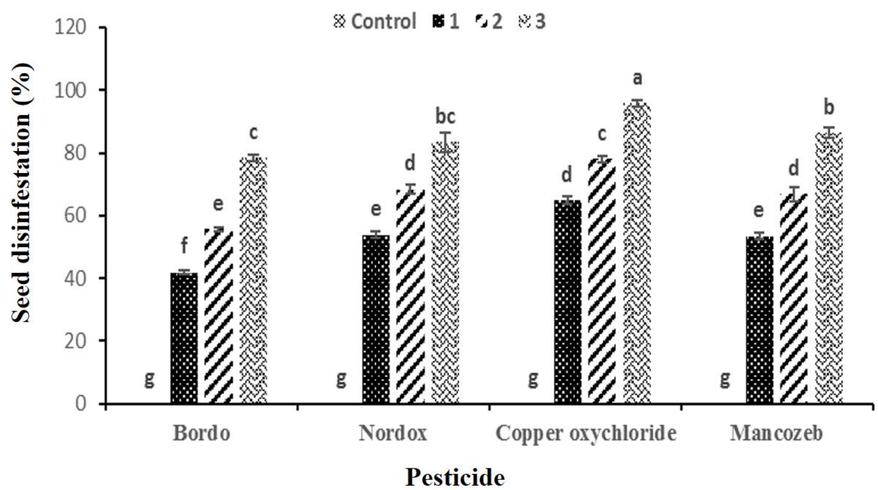
Source of variation	Degrees of freedom	Mean squares	
		Seed disinfestation (%)	Seed germination (%)
Pesticide	3	651.7**	14.5*
Dose	2	21826.1**	309.5**
Pesticide × Dose	6	81.5**	28.9*
Experimental error	48	6.71	5.08
Coefficient of variabilities (%)		5.01	2.39

** Significance level at 5% and * significance level at 1%.

بحث

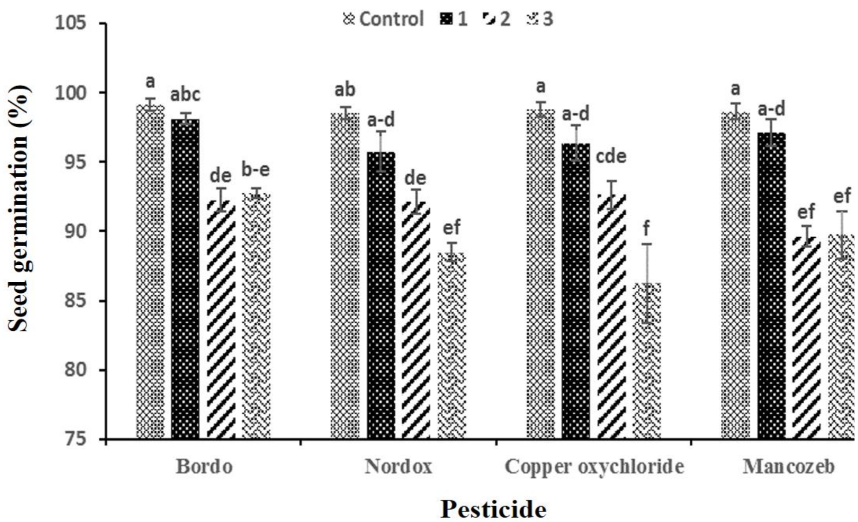
تیمار قطعات گیاهی با گرمادهی به صورت بخار یا آب داغ، از روش‌های مؤثر در از بین بردن میکروارگانیسم‌های مختلف با قدمت بیش از صد سال است (Divsalar *et al.* 2014). مطالعات مختلفی روی اثرات گرما در حذف باکتری Cmm از بذرهای آلوده انجام شده است. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار حرارتی، به عنوان روشی مناسب برای حذف باکتری عامل بیماری از بذرهای آلوده قابل توجه است به طوری که تیمار بذرها با دماهای ۴۴ تا ۶۴ درجه سلسیوس، ضدعفونی سطحی ۸۰/۵ تا ۱۰۰٪ بذرها را به همراه داشت. با افزایش درجه حرارت و زمان اعمال شده میزان سالم‌سازی بذرها نیز افزایش یافت. نتایج مطالعات پیشین نشان می‌دهد ضدعفونی بذرها با دماهای ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ یا ۲۵ دقیقه، ۵۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه و یا ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه (Fatmi *et al.* 1991; Ftayeh 2009) ، موجب حذف موفقیت‌آمیز

باکتری عامل بیماری از بذرهای گوجه‌فرنگی شده است. در ضدعفونی بذر با تیمارهای مختلف از جمله آب گرم، حفظ قدرت جوانه‌زنی بذرها یکی از شاخص‌های مهم در ارزیابی کاربردی بودن این روش‌ها است. بنابراین تعیین دما و مدت زمان بهینه که کمترین تأثیر را روی قدرت جوانه‌زنی بذر داشته باشد، امری ضروری است (de León *et al.* 2011; Divsalar *et al.* 2014). در مطالعه حاضر، تیمار با آب گرم در دماهای ۶۰ و ۶۴ درجه سلسیوس اگر چه تاثیر مناسبی در حذف باکتری عامل بیماری داشت، اما به دلیل از بین بردن قدرت جوانه‌زنی بذرها قابل توصیه نیستند. در مطالعات دیگر نیز اثرات سوء دماهای ۵۲، ۵۶ و ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه روی جوانه‌زنی بذر گزارش شده است (Fatmi *et al.* 1991; Ftayeh 2009; Divsalar *et al.* 2014; Nandi *et al.* 2018). تیمار بذرها با آب گرم در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ تا ۴۰ دقیقه، یک روش موثر تیمار بذر در حذف باکتری Cmm بوده است که اثر منفی چندانی در میزان جوانه‌زنی بذرها نداشته است (Fatmi *et al.* 1991).



شکل ۳. اثر سموم شیمیایی در دُزهای مختلف روی سالم‌سازی سطحی بذر. دُز ۱ (دُز توصیه‌شده سم: مانکوزب (۲ در هزار)، بردو (۲ درصد)، نوردوکس (۲/۵ در هزار) و کوپراکسی‌کلراید (۳ در هزار)؛ دُز ۲ (دو برابر دُز توصیه‌شده) و دُز ۳ (سه برابر دُز توصیه‌شده). ستون‌های با حروف یکسان، از نظر آماری بر اساس آزمون توکی با هم اختلاف معنی‌داری ندارند ($p \leq 0.05$).

Figure 3. Effect of chemical compounds in different doses on seed disinfestation percentage. Dose 1 (recommended dose of pesticide: Mancozeb (2/1000), Bordeaux (2/100), (Nordox (2.5/1000) and Copper oxychloride (3/1000)); dose 2 (twice recommended dose) and dose 3 (triple of recommended dose). Columns with similar letters do not have a statistically significance difference, based on the Tukey test ($p \leq 0.05$).



شکل ۴. اثر سموم شیمیایی در دُزهای مختلف روی درصد جوانه‌زنی بذر. دُز ۱ (دُز توصیه‌شده سم: مانکوزب (۲ در هزار)، بردو (۲ درصد)، نوردوکس (۲/۵ در هزار) و کوپراکسی‌کلراید (۳ در هزار)؛ دُز ۲ (دو برابر دُز توصیه‌شده) و دُز ۳ (سه برابر دُز توصیه‌شده). ستون‌های با حروف یکسان، از نظر آماری بر اساس آزمون توکی با هم اختلاف معنی‌داری ندارند ($p \leq 0.05$).

Figure 4. Effect of chemical compounds in different doses on seed germination percentage. Dose 1 (recommended dose of pesticide: Mancozeb (2/1000), Bordeaux (2/100), (Nordox (2.5/1000) and Copper oxychloride (3/1000)); dose 2 (twice recommended dose) and dose 3 (triple of recommended dose). Columns with similar letters do not have a statistically significance difference, based on the Tukey test ($p \leq 0.05$).

کاهش جمعیت باکتری و رشد بهتر بوته‌های گوجه‌فرنگی در تیمار بذرها با آب گرم ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۵ دقیقه گزارش شده است (Lewis Ivey & Miller 2004). برای حذف باکتری Cmm از بذرهای گوجه‌فرنگی دمای ۵۳ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه و دماهای ۵۰ تا ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۲۵ تا ۳۰ دقیقه نیز توصیه شده است (Aysan & Horuz 2016). در این پژوهش، تیمار بذرها در دمای ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۵ دقیقه، سالم‌سازی سطحی ۹۸٪ بذرها را به دنبال داشت و ۹۹٪ بذرهای تیمار شده قادر به جوانه‌زنی بودند. این تیمار مناسب‌ترین تیمار در بین تیمارهای حرارتی مورد مطالعه جهت حذف باکتری Cmm بود که تاثیر بسیار کمی در جوانه‌زنی بذر داشت.

از بین ۹ آنتی‌بیوتیک منتخب مورد بررسی در این تحقیق، جنتامایسین، داکسی‌سایکلین، ریفامپین، نالیدیکسیک اسید با ضدعفونی سطحی ۱۰۰٪، بهترین اثر را در سالم‌سازی بذر نشان دادند. از طرفی، هیچ کدام از این آنتی‌بیوتیک‌ها تأثیر سوء روی جوانه‌زنی بذرها نداشتند. گزارشی مبنی بر وجود مقاومت برخی سویه‌های Cmm نسبت به آنتی‌بیوتیک ریفامپین وجود دارد (Chang *et al.* 1992)، اما سویه‌های مورد مطالعه در این تحقیق نسبت به ریفامپین حساس بودند. در تحقیقی، اثر ۴۰ آنتی‌بیوتیک روی باکتری Cmm بررسی گردید. همانند نتایج این پژوهش، آنتی‌بیوتیک‌های اریترومایسین، ریفامپین و جنتامایسین قادر به بازداری از رشد سویه‌های Cmm بودند (Ftayeh 2009). مطالعات محدودی روی ضدعفونی بذرهای گوجه‌فرنگی با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، صورت گرفته است که می‌تواند به دلیل هزینه بالا و گزارش‌های متعدد مبنی بر بروز مقاومت در باکتری‌های بیمارگر گیاهی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها باشد. مکانیسم‌های مختلفی در مقاومت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها نقش دارند. اساس ژنتیکی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری Cmm به طور دقیق مشخص نشده است اما مقاومت سویه‌هایی از این باکتری به استرپتومایسین گزارش شده است که با جهش در ژن *rpsL*، در اثر

استفاده زیاد این آنتی‌بیوتیک مرتبط بوده است (Valenzuela *et al.* 2019). بررسی میزان مقاومت سویه‌های باکتری Cmm به آنتی‌بیوتیک‌های مختلف، مطالعه مکانیسم‌های مقاومت در این باکتری، همچنین مطالعه اثرات جانبی آنتی‌بیوتیک‌ها روی جوانه‌زنی بذرها و رشد و نمو گیاهان میزبان ضروری است (Bellino *et al.* 2018; Valenzuela *et al.* 2019).

ضدعفونی بذرها با ترکیبات شیمیایی، یکی از راه‌های موثر در کنترل بیماری‌های بذربرد است. ترکیبات شیمیایی مختلفی برای ضدعفونی بذرها و کاهش خسارت باکتری Cmm روی گیاه گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار گرفته است (de León *et al.* 2011; Sen *et al.* 2015). نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان داد، اثر ضدباکتریایی سموم شیمیایی مورد آزمایش وابسته به غلظت بوده و همراه با افزایش غلظت در هر چهار ترکیب شیمیایی، درصد سالم‌سازی بذر نیز افزایش یافت. همچنین بین غلظت سموم مورد مطالعه و درصد جوانه‌زنی بذرها رابطه عکس وجود داشت به نحوی که با افزایش غلظت سم، درصد جوانه‌زنی بذرها کاهش یافت (شکل‌های ۳ و ۴). بنابراین تیمار بذرها با ترکیبات شیمیایی قادر به سالم‌سازی کامل بذرهای آلوده نبوده و علاوه بر آن کاهش قابل توجه جوانه‌زنی بذرهای تیمار شده را به همراه دارند. استات مس یا استات مس اسیدی شده، ترکیباتی هستند که اثر آن‌ها در ضدعفونی بذر و حذف باکتری Cmm مورد مطالعه قرار گرفته است (Fatmi *et al.* 1991; Kritzman 1993). حذف کامل باکتری Cmm و عدم تاثیر در جوانه‌زنی بذر در تیمار با استات مس در دمای ۴۵ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه مشاهده شده است (Kritzman 1993). در تیمار با استات مس اسیدی شده به مدت ۲۰ دقیقه در دماهای مختلف نیز حذف کامل باکتری عامل بیماری گزارش شده است اما کاهش شدید جوانه‌زنی بذرها را به همراه داشته است (Fatmi *et al.* 1991). نکته حائز اهمیت در استفاده از این ترکیبات شیمیایی این است که مقاومت باکتری‌های بیمارگر گیاهی در برابر این ترکیبات گزارش شده است که این موضوع، کاربرد آنها را با محدودیت مواجه می‌سازد (Milijašević-Marčić *et al.* 2012). با توجه به استفاده گسترده از این ترکیبات شیمیایی در کنترل بیماری‌ها، ارزیابی مقاومت ایجاد شده در سویه‌های باکتریایی، سهم این ترکیبات در آلوده‌سازی اکوسیستم‌های زیست محیطی و تاثیر مستقیم و غیرمستقیم آن‌ها روی سلامت انسان، جانوران و محیط زیست ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

بخشی از هزینه این تحقیق از محل اعتبار پروژه شماره ۹۴۰۰۹۰۰۵ صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور تامین شده است. بدین وسیله، نویسندگان مقاله از حمایت این صندوق سپاسگزاری می‌نمایند.

Reference

Aghazadeh Z, Khezri M, Sadeghinasab F, 2017. Identification of pathogenic bacteria in tomato fields of Urmia. *1st International and 5th National Congress on Organic vs. Conventional Agriculture*, August 16–17, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. P. 278.

Anonymous. 2020. The Agricultural Production Domain. Available at: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC [accessed on 23 August 2020].

Aysan Y, Horuz S, 2016. Plant pathogenic bacteria control through seed application. In: Kannan VR, Bastas KK (eds.). Sustainable Approaches to Controlling Plant Pathogenic Bacteria. CRC Press, Boca Raton. Pp. 323–332.

Bellino A, Lofrano G, Carotenuto M, Libralato G, Baldantoni D, 2018. Antibiotic effects on seed germination and root development of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148: 135–141.

Benton Jones J, 2007. Tomato Plant Culture: In the Field, Greenhouse, and Home Garden. 2nd ed. CRC press, Boca Raton, USA. 420 pp.

Bergougnoux V, 2014. The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology Advances* 32 (1): 170–189.

Blancard D, 2012. A Color Handbook Tomato Diseases, Identification, Biology and Control. 2nd ed. CRC press, Boca Raton, USA. 688 pp.

Borkar SG, Yumlembam RA, 2017. Bacterial Diseases of Crop Plants. CRC Press, Boca Raton, USA. 594 pp.

Carisse O, Ouimet A, Toussaint V, Philion V, 2000. Evaluation of the effect of seed treatments, bactericides, and cultivars on bacterial leaf spot of lettuce caused by *Xanthomonas campestris* pv. *vitians*. *Plant Disease* 84 (3): 295–299.

Chang RJ, Ries SM, Pataky JK, 1992. Local sources of *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in the development of bacterial canker on tomatoes. *Phytopathology* 82: 553–560.

Davari AA, Rahnama K, Rabbani nasab H, 2020. Investigation of some effective factors on production and pathogenicity of zoospores of *Phytophthora capsici* and *P. nicotianae* on tomato fruit. *Journal of Applied Researches in Plant Protection* 9 (1): 1–12.

de León L, Siverio F, López MM, Rodríguez A, 2011. *Clavibacter michiganesis* subsp. *michiganensis*, a seedborne tomato pathogen: healthy seeds are still the goal. *Plant Disease* 95 (11): 1328–1338.

Divsalar M, Shakeri M, Khandan A, 2014. Study on thermotherapy treatment effects on seed germination and vigor of tomato cultivars. *International Journal of Plant and Soil Science* 3 (6): 799–809.

Fatmi M, Schaad NW, Bolkan HA, 1991. Seed treatments for eradicating *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from naturally infected tomato seeds. *Plant Disease* 75: 383–385.

Ftayeh R, 2009. Elimination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from tomato cultures and seeds by highly sensitive detection methods and effective seed treatments. PhD thesis, Plant Pathology, University of Göttingen, Germany.

Kritzman G, 1993. A chemo–thermal treatment for control of seed–borne bacterial pathogens of tomato. *Phytoparasitica* 21: 101–109.

Lewis Ivey ML, Miller SA, 2004. Evaluation of hot water seed treatment for the control of bacterial leaf spot and bacterial canker on fresh market and processing tomatoes. *Acta Horticulture* 695: 197–204.

Mazarei M, Orumchi S, Lora C, 1993. Investigation of bacterial canker of tomato in West Azarbaijan, Iran. *11th Iranian Plant Protection Congress*, 28 August–2 September, University of Gilan, Rasht, Iran. P. 160. (in Persian with English abstract).

Milijašević–Marčić S, Gartemann KH, Frohwitter J, Eichenlaub R, Todorović B, *et al.*, 2012. Characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from recent outbreaks of bacterial wilt and canker in Serbia. *European Journal of Plant Pathology* 134 (4): 697–711.

Nandi M, McDonald J, Liu P, Weselowski B, Yuan ZC, 2018. *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*: bacterial canker of tomato, molecular interactions and disease management. *Molecular Plant Pathology* 19 (8): 2036–2050.

Nega E, Ulrich R, Werner S, Jahn M, 2003. Hot water treatment of vegetable seed, an alternative seed treatment method to control seed–borne pathogens in organic farming. *Journal of Plant Diseases and Protection* 110 (3): 220–234.

Olmez Z, Gokturk A, Temel F, 2007. Effect of some pretreatments on seed germination of nine different droughts–tolerance shrubs. *Seed Science and Technology* 35 (1): 75–87.

Parsa N, Viani V, Arzanloo M, 2018. Evaluation of different tomato varieties cultivated in East–Azerbayjan province for resistance to the race 1 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Journal of Applied Researches in Plant Protection* 7 (3): 77–89.

Peralta IE, Spooner DM, 2007. History, origin and early cultivation of tomato (Solanaceae). In: Razdan MK, Mattoo AK (eds.), Genetic Improvement of Solanaceous Crops, vol. 2: Tomato. Science Publishers Inc, New Hampshire. Pp. 1–27.

Pradhanang P, Collier G, 2007. How effective is hydrochloric acid treatment to control *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* contamination in tomato seed? In II International Symposium on Tomato Diseases. Kusadasi, Turkey. P. 808.

Psallidas PG, 1993. *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* pathovar nov., the bacterium causing canker disease on *Corylus avellanae*. *Plant Pathology* 42 (3): 358–363.

Schaad NW, Jones JB, Chun W, 2001. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3th ed. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 373 pp.

Sen Y, der Wolf JV, Visser RGF, van Heusden S, 2015. Bacterial canker of tomato: current knowledge of detection, management, resistance and interaction. *Plant Disease* 99 (1): 1–13.

Valenzuela M, Méndez V, Montenegro I, Besoain X, Seeger M, 2019. Streptomycin resistance in *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains from Chile is related to an *rpsL* gene mutation. *Plant Pathology* 68: 426–433.

Yang WENCAI, Francis DM, 2007. Genetics and breeding for resistance to bacterial diseases in tomato: prospects for marker–assisted selection. In: Razdan MK, Mattoo AK (eds.), Genetic Improvement of Solanaceous Crops, vol. 2: Tomato. Science Publishers Inc., New Hampshire. Pp. 379–419.