نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار
جلد یازدهم، شماره دوم، ۱۴۰۰
۱۷۰-۱۵۹
http://ejsms.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/ejsms.2021.18733.2004
(مقاله کامل علمی- پژوهشی)

ارزیابی توان مهارکنندگی *اروینیا کاراتوورا* توسط باکتری‌های ریزوسفر و اندوفیت

منیره دینکو[۱]، آنیا آهنی آذری*[۲] و تینا دادگر[۲]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه میکروبیولوژی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
[۲]استادیار گروه میکروبیولوژی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۱/۲۶

چکیده

سابقه و هدف: باکتری *Erwinia carotovora* پاتوژن بسیاری از گونه‌های مهم گیاهی بوده و شمار فراوانی از گیاهان زینتی و کشاورزی مانند ذرت، برنج، گوجه‌فرنگی، پیاز، چغندرقند و نیز سبزی‌ها را آلوده می‌کند. این باکتری یکی از مهم‌ترین عواملی است که با پیدایش پوسیدگی نرم در ساقه و غده سیب‌زمینی پیش و پس از برداشت تا اندازه فراوانی بازدهی گیاهان را کاهش می‌دهد. اگرچه این بیماری در بیش‌تر مناطق سیب‌زمینی‌کاری کشور گزارش شده است اما هنوز یک اقدام مهاری سازگار با محیط زیست برای پیشگیری از این بیماری انجام نشده است. بنابراین شناسایی عوامل زیستی کارا در مهار بیماری پوسیدگی نرم به ویژه در قطب‌های کشاورزی کشور مانند استان گلستان امری ضروری به نظر می‌رسد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های ریزوسفر و اندوفیت با کارکرد آنتاگونیستی دربرابر *E. carotovora* در کشتزارهای سیب‌زمینی روستاهای مرزنکلا و فاضل‌آباد شهرستان گرگان واقع در استان گلستان بود.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های خاک، ریشه، برگ و ساقه سیب‌زمینی روی محیط نوترینت آگار کشت داده شده و پس از گرماگذاری پرگنه‌های رشدکرده از نظر ریخت‌شناسی بررسی شدند. پس از ناب‌سازی پرگنه‌ها، در آغاز شناسایی جدایه‌ها با انجام رنگ‌آمیزی گرم و بررسی توانایی ساخت اسپور انجام شد. کارکرد آنتاگونیستی جدایه‌ها به روش پخش از چاهک در آگار بررسی شد. در این روش پلیت‌ها در دمای اتاق برای ۳ تا ۵ روز گرماگذاری شده و هاله نبود رشد در پیرامون چاهک‌ها اندازه‌گیری شد. برای بررسی ساخت ماده پادزیست در جدایه‌های آنتاگونیست از آزمون کلروفورم بهره‌گیری شد. برای شناخت سرشت و زاد ماده پادزیست از آزمون های کاتالاز و حساسیت به پروتئازها بهره‌گیری گردید. سپس پایداری گرمایی ماده پادزیست و اثر pH روی کارکرد مهارکنندگی آن سنجیده شد. جدایه‌های با کارکرد آنتاگونیستی بیش‌تر بر پایه تعیین توالی ژن 16S rRNA شناسایی شدند.

یافته‌ها: سرهم ۴۲ سویه باکتریایی به ترتیب از ریشه (۱۳)، برگ (۷) ساقه (۵) و خاک ریزوسفر (۱۷) جدا شد. در میان جدایه‌ها، ۳۳ جدایه گرم مثبت و ۹ جدایه گرم منفی بودند. بر پایه نتایج به‌دست آمده از بررسی کارکرد آنتاگونیستی جدایه‌ها، ۸ جدایه در برابر *E. carotovora* کارکرد آنتاگونیستی از خود نشان دادند که همگی باسیل گرم

* مسئول مکاتبه: ania_783@yahoo.com

مثبت اسپوردار بوده و جنس *باسیلوس* بودند. کارکرد مهاری جدایه‌ها با یافته‌های به‌دست آمده از آزمون کلروفورم همخوانی داشت. در برابر گواه آزمایش، جدایه با هاله نبود رشد بزرگ‌تر، ماده پادزیست بیش‌تری ساخت. در آزمون کاتالاز آشکار گردید که سرشت ماده پادزیست ساخته شده در جدایه‌ها پراکسیدئیدروژن ندارد. آن‌ها پس از تیمار با پروتئازها ناکارا شدند که نشان می‌دهد، سرشت آن‌ها پروتئینی است. توان پادزیستی و مهارکنندگی آبگونه رویی کشتگاه این جدایه‌ها در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد از میان رفت و بهترین نشان مهارکنندگی را در pH ۷ تا ۸ داشتند. جدایه‌هایی که بیش‌ترین کارکرد مهاری را در برابر *E. carotovora* داشتند، بر پایه توالی ژن 16S rRNA شناسایی شدند. پس از بررسی توالی نوکلوتیدی آن ژن آشکار شد که این جدایه‌ها به ترتیب بیش از ۹۰ درصد به *Bacillus subtilis* سویه ZWQ-1 و *Bacillus Mycoides* سویه 29B-B9 همانندی دارند.

نتیجه‌گیری: از آن‌جایی‌که در این پژوهش جدایه‌های دارای بهترین نشان مهارکنندگی در برابر *E. carotovora* از جنس *Bacillus* بودند، شاید بتوان از توان بازدارندگی این باکتری‌ها برای مهار زیستی بیماری‌های گیاهی بهره‌گیری کرد، وانکه برای داوری بهتر در باره کارکرد آن‌ها انجام آزمایش‌های بیش‌تر در گلخانه و کشتزارها پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: آندوفیت، *اروینیاکاراتوورا*، پوسیدگی نرم، توان مهارکنندگی، ریزوسفر

مقدمه

باکتری *Erwinia carotovora* در جنس *Erwinia* در خانواده Enterobacteriaceae بوده که پاتوژن بسیاری از گونه‌های مهم گیاهی کشاورزی است. این باکتری یکی از مهم‌ترین عواملی است که در ساقه و غده سیب‌زمینی پیش و پس از برداشت پوسیدگی نرم پدید می‌آورد و تا اندازه فراوانی بازدهی گیاهان را کاهش می‌دهد (۵). البته این باکتری دامنه میزبانی گسترده‌ای دارد و شمار فراوانی از گیاهان کشاورزی مانند ذرت، برنج، گوجه‌فرنگی، پیاز، چغندرقند و نیز سبزی‌ها را آلوده می‌کند (۲). *E. carotovora* در نواحی معتدله و گرمسیری پخش گسترده‌ای داشته و به ویژه گیاهان دارای اندام‌های اندوخته‌ای گوشتی و آبدار را آلوده می‌نماید (۳، ۱۰). *E. carotovora* را می‌توان در رویه گیاهان و در خاک یافت، که از راه محل‌های زخم یا منافذ موجود در رویه گیاه مانند عدسک‌ها وارد گیاه شده و در بافت عروقی و فضاهای میان‌یاخته‌ای می‌ماند تا ویژگی‌های زیستگاه مانند آب آزاد، دسترسی به اکسیژن و دما برای پیدایش بیماری مهیا شود. این باکتری با ساخت چند اگزوآنزیم تخریب‌کننده دیواره یاخته‌ای به‌ویژه پکتینازها مایه نرم شدن بافت‌های گیاهی می‌گردد (۵). این بیماری با آلوده کردن غده‌های سیب‌زمینی در کشتزار و انبار، زیان اقتصادی زیادی را پدیدآورده و مایه کاهش چند و چون گیاه سیب‌زمینی می‌شود. بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی سیب‌زمینی در جهان گستردگی فراوانی داشته و زیان آن بسته به ارزش اقتصادی گیاهان از کشوری به کشور دیگر ناهمانند است (۲).

مهار پوسیدگی نرم باکتریایی بر پایه کارهای کشاورزی و بهداشتی است. بهره‌گیری از مواد شیمیایی برای مهار پوسیدگی نرم بسته به پیامد بد مانده‌های این زهرهای شیمیایی که می‌تواند بر بهداشت مردم زیانبار باشد، پیشنهاد نمی‌شود. در کشاورزی پایدار روش‌های حفاظت از گیاهان سازگار با محیط زیست بسیار دارای اهمیت هستند. بنابراین

توسعه اقدامات مهار دوستدار محیط زیست در برابر باکتری‌های پدیدآورنده پوسیدگی نرم می‌تواند زیان ناشی از ذخیره‌سازی را به حداقل رسانده و کیفیت سیب‌زمینی‌ها را بهبود ببخشند. مهار زیستی یک روش بالقوه برای مهار بیماری پوسیدگی نرم است. درمان‌های مهار زیستی متشکل از میکروارگانیسم‌های زنده یا گیاهان غیرزنده از طریق ساخت آنتی‌بیوتیک یا سایر مولکول‌های مضر برای رشد پاتوژن، رقابت با پاتوژن برای مواد مغذی و فضا و القاء مقاومت در گیاه در برابر بیماری محافظت پیدایش می‌کنند. این روش اثر اختصاصی‌تری بر روی پاتوژن و تأثیر محدودی بر محیط دارد (۵).

استراتژی مهار زیستی بیماری‌های گیاهی شامل بهره‌گیری از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست پیش یا پس از پیدایش عفونت است. عوامل مهار زیستی تجاری برای تیمار بذرها و بهسازی خاک برای نگهداری از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زای خاک در دسترس هستند. اکنون، بیش‌تر از باکتری‌های *Bacillus subtilis* و گونه‌های *Pseudomonas* برای مهار زیستی بهره‌گیری می‌شود. مهار زیستی باکتری‌های سازنده پوسیدگی نرم با باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده از ریزوسفر یا ریزوباکترهای تقویت‌کننده رشد، سودوموناده‌ای فلورسنت و باکتری‌های اندوفیت در بسیاری از گیاهان پیش‌تر نشان داده شده است. برای نمونه باکتری *B. subtilis* یکی از کاراترین عوامل زیستی در کاهش پوسیدگی نرم غده سیب‌زمینی انبار شده بوده است (۲۰). به تازگی، بهره‌گیری از باکتری‌های اندوفیت برای مهار زیستی بیماری‌های ریشه خاکزاد به دلیل توانایی جایگیری آن‌ها در بافت‌های گیاهی سالم و ساخت آنتی‌بیوتیک بسیار بررسی شده است (۷، ۸). چندین اندوفیت باکتریایی برای پشتیبانی از رشد و بهبود سلامت گیاهان گزارش شده‌اند و بنابراین می‌تواند خاستگاه مهمی از عوامل مهار زیستی باشند (۹، ۱۶). یکی از این گزارش‌ها از *استورز* و همکاران (۱۹۹۹) درباره مهار باکتری *Pectobacterium carotovorum* با باکتری‌های اندوفیتی مانند سویه‌های *Pseudomonas*، *Curtobacterium luteum* و *Pantoea agglomerans* بود (۱۷). اگرچه یافته‌های پژوهش‌های پیشین امیدوارکننده است، اما عوامل کمی برای مهار زیستی بیماری پوسیدگی نرم تا به امروز شناسایی شده است (۸).

اگرچه این بیماری در بیش‌تر مناطق سیب‌زمینی‌کاری کشور گزارش شده است اما هنوز یک پژوهش سودمند برای مهار آن که سازگار با محیط زیست باشد، برای پیشگیری از این بیماری انجام نشده است. بنابراین شناسایی عوامل زیستی کارا در مهار بیماری پوسیدگی نرم به ویژه در استان‌های شمالی کشور مانند استان گلستان می‌تواند راه‌گشا باشد. بنابراین هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی باکتری‌های ریزوسفر و اندوفیت با کارکرد آنتاگونیستی در برابر *E. carotovora* در کشتزارهای سیب‌زمینی روستاهای مرزنکلا و فاضل‌آباد شهرستان گرگان در استان گلستان بود.

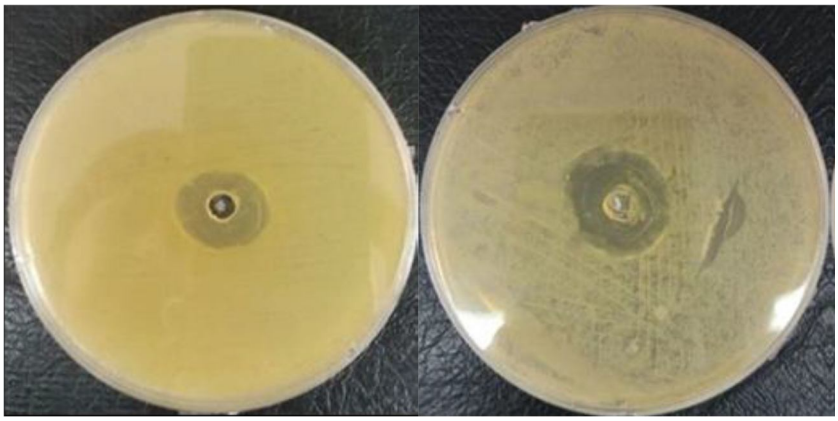
مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت: در این بررسی از ریشه، ساقه و برگ سیب‌زمینی کشتزارهای کشاورزی روستاهای مرزنکلا و فاضل‌آباد واقع در پیرامون شهرستان گرگان نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها پس از ترابری به آزمایشگاه در آغاز چند بار با آب شسته شده تا غبارها و میکروب‌های رویه گیاهان جدا شوند. سپس برای گندزدایی رویه نمونه‌های گیاهی هر یک در اتانول ۷۰ درصد برای یک دقیقه، در سدیم هیپوکلریت ۲/۵ درصد برای ۲۰ دقیقه و مجدداً در الکل ۷۰ درصد برای ۳۰

ثانیه قرار داده شده و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. یک میلی‌لیتر از آبگونه آخرین شستشو برای سنجش پاک شدن باکتری‌های رویه‌ای در محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد. در شرایط استریل نمونه‌های ضدعفونی شده در ۲۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به تکه‌های ۱ تا ۲ میلی‌متری قطعه قطعه شده و در هاون استریل کوبیده شدند. پس از نیم ساعت یک لوپ از سوسپانسیون روی محیط نوترینت آگار (ساخت شرکت مرک آلمان) کشت شده و برای ۳ تا ۵ روز در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. سپس پرگنه‌ها بر پایه ریخت‌شناسی (اندازه، رنگ و شکل) جداسازی و ناب‌سازی گردیدند (۱۱، ۱۳). شناسایی اولیه جدایه‌ها با انجام رنگ‌آمیزی گرم و بررسی توانایی ساخت اسپور انجام شد.

جداسازی و ناب‌سازی باکتری‌های ریزوسفر: ۱۰ گرم از نمونه خاک الک شده پیرامون ریشه سیب‌زمینی را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و روی شیکر با دور ۲۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس برای ۱۰ دقیقه سوسپانسیون ثابت گذاشته شد تا خاک رسوب کند. از بخش رویی سوسپانسیون با بهره‌گیری از آب مقطر استریل رقت‌های 10^{-4} و 10^{-3} به‌دست آید. از رقت نهایی به‌دست آمده ۰/۱ میلی‌لیتر روی رویه محیط کشت نوترینت آگار ریخته و با میله L- فرم استریل پخش شد. پس از خشک‌شدن رویه محیط کشت، پلیت‌ها در دمای اتاق برای ۴۸ ساعت گرماگذاری شدند. سپس پرگنه‌های رشد کرده بر پایه ریخت‌شناسی (اندازه، رنگ و شکل) جداسازی و ناب شدند (۲۰). برای شناسایی اولیه جدایه‌ها از رنگ‌آمیزی گرم و بررسی توانایی ساخت اسپور بهره‌گیری شد.

بررسی کارکرد آنتاگونیستی جدایه‌ها: برای بررسی کارکرد آنتاگونیستی جدایه‌ها از روش پخش از چاهک در آگار بهره‌گیری شد. جدایه‌ها جداگانه به ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع لوریا برتونی (ساخت شرکت هایمدیا هندوستان) در یک ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتر انتقال داده شده و برای ٤ روز روی شیکر با دور ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق گرماگذاری شدند. ۲۰ میلی‌لیتر محیط لوریابرتونی آگار در پلیت‌های استریل به قطر ۹۰ میلی‌متر ریخته شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی سویه استاندارد *E. carotovora* (تهیه شده از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران) (10^{8}CFU/ml) با ۳ میلی‌لیتر محیط لوریا برتونی آگار (۰/٦ درصد آگار) با دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد مخلوط شده و به سرعت روی پلیت‌های حاوی محیط کشت لوریا برتونی آگار پخش شدند. سپس چاهک‌هایی به قطر ٦ میلی‌متر در آگار حفر شدند. محیط‌های از پیش کشت شده جدایه‌ها برای۳۰ دقیقه در ۱۵،۰۰۰ دور در دقیقه برای زدایش مانده‌های یاخته‌ای سانتریفوژ شده، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه استریل شده با فیلتر ۰/٤٥ میکرون در درون چاهک‌ها ریخته شد. پلیت‌ها در دمای اتاق برای ۳ تا ۵ روز گرماگذاری‌شده و هاله نبود رشد در پیرامون چاهک‌ها اندازه‌گیری شد (شکل ۱). برای هر جدایه دو تکرار و دو آزمایش جداگانه انجام شد (۱۱).



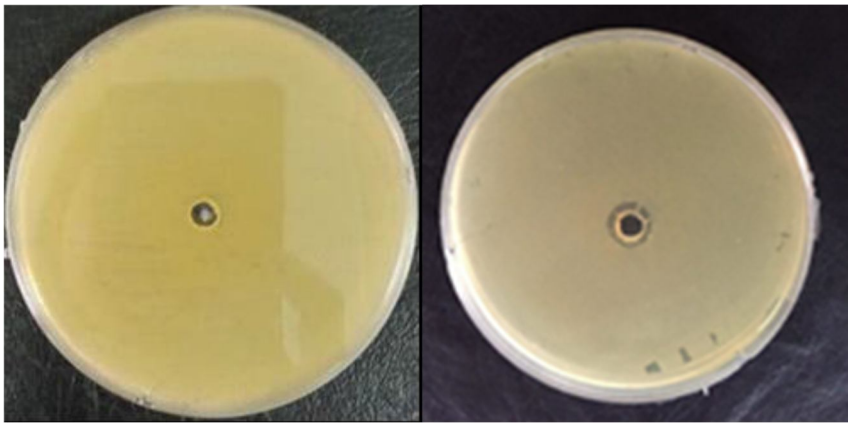
شکل ۱- هاله عدم رشد ایجاد شده توسط جدایه‌های آنتاگونیست.

Figure 1. Growth inhibition zone by antagonist isolates.

بررسی ساخت ماده پادزیست: برای بررسی ساخت ماده پادزیست با جدایه‌های آنتاگونیست از آزمون کلروفورم بهره‌گیری شد. برای انجام این آزمون جدایه‌ها به گونه خطی در محیط نوترینت آگار کشت داده شده و پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد باکتری‌ها با آب مقطر استریل از رویه پلیت شسته شدند. سپس یک تکه پنبه آغشته به کلروفورم روی درِب پلیت گذاشته و به گونه وارونه قرار داده شد، پس از خروج کامل بخار کلروفورم، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری *E. carotovora* با غلظت 10^3 CFU/ml به گونه یکنواخت روی رویه پلیت پخش شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای ٤٨ ساعت گرماگذاری شدند. پس از این پرگنه‌های باکتری *E. carotovora* شمارش شدند (۱۹).

شناخت سرشت و زاد ماده پادزیست: برای شناخت سرشت و زاد ماده پادزیست جدایه‌های آنتاگونیست از آزمون حساسیت به کاتالاز بهره‌گیری گردید. برای انجام این آزمون، ۱ میلی‌لیتر از آبگونه رویی بدون یاخته باکتری برای ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در بودن کاتالاز (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، سیگما-آلدریش، آلمان) گرماگذاری شد. بخشی از آبگونه رویی بدون یاخته همانند گواه آزمون شد. با پیدایش هاله نبود رشد در پیرامون چاهک‌های دارای کاتالاز و بدون آن ساخت یک آمیزه باکتری‌کش که پراکسیدئیدروژن نیست، آشکار می‌شود. حساسیت ترکیبات ضدباکتریایی به آنزیم پروتئولیتیک با گرماگذاری آبگونه رویی بدون‌یاخته پس از گرماگذاری برای ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با پروتئیناز K و پروتئاز قلیایی (هر دو آنزیم ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، سیگما-آلدریش، آلمان) آزمون و بررسی شد. پس از گرماگذاری، این آنزیم‌ها برای ۳ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد ناکارا شدند. سپس بود یا نبود هاله بدون رشد در پیرامون چاهک‌ها بررسی شد که در نبود هاله بدون رشد، پروتئینی بودن ماده پادزیست روشن می‌شود (شکل ۲) (۱۱).

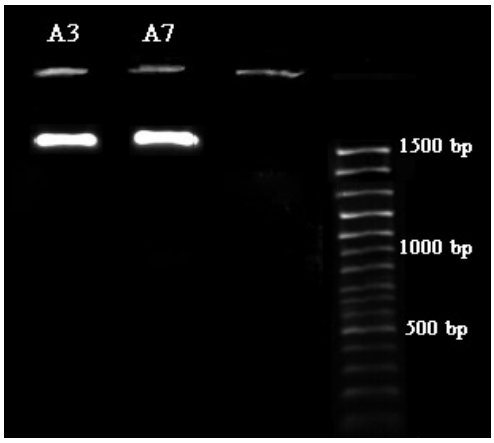
نشان گرما و pH بر کارکرد ضدباکتریایی: پایداری گرمایی کارکرد ضدباکتریایی با گرماگذاری ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی بدون‌یاخته در دماهای ٤٠، ٦٠، ٨٠ و ١٠٠ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه آزمون شد. کارکرد آمیزه‌های ضدباکتریایی در pHهای گوناگون پس از نهادن آبگونه رویی برای ۱ روز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در بافرهای فسفات با pH ۳ تا ۹ سنجش شد که پس از این زمان محیط خنثی شده و سنجش توان باکتری‌کشی آن آزمون شد (۱۱).



شکل ۲- از بین رفتن فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌ها بعد از حرارت‌دهی در ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد.

Figure 2. Loss of antagonistic activity of isolates after heating to 100 °C.

شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست بر پایه توالی ژن 16S rRNA: برای استخراج DNA یک پرگنه از جدایه آنتاگونیست در محیط کشت لوریابرتونی مایه‌زنی شد و برای ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری گردید. سپس با بهره‌گیری از کیت استخراج DNA (کیاژن، آلمان) یک میلی‌لیتر از این محیط کشت بر پایه دستورکار سازنده برای استخراج به کار رفت. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با بردن روی ژل آگاروز ۱ درصد بررسی شد (شکل ۳).



شکل ۳- نتایج واکنش PCR روی روی DNA ژنومی جدایه‌ها.

Figure 3. PCR results on the genomic DNA of isolates.

با بهره‌گیری از یک جفت آغازگر عمومی که توالی‌های آن‌ها در جدول ۱ آورده شده است تکثیر ژن 16S rRNA با واکنش PCR انجام شد. برای انجام PCR، به مسترمیکس 2X (سیناژن، ایران) یک میکرولیتر از هر آغازگر (۲۰ پیکومول)، ۵ میکرولیتر DNA و ۱۹ میکرولیتر آب مقطر استریل افزوده شد. فراوان‌سازی با ۳۰ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، پیوند در دمای ٥٦ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه و دراز شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه انجام شد.

واسرشت آغازین و درازشدن پایانی به ترتیب در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس فراورده PCR روی ژل آگاروز ۱ درصد برده شده و با بهره‌گیری از کیت استخراج از ژل (کیاژن، آلمان) ناب‌سازی گردید. برای شناخت توالی نوکلوتیدهای فرآورده ناب PCR به‌دست آمده به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد. توالی نوکلئوتیدی به‌دست آمده از دیدگاه همولوژی با توالی‌های بانک ژنی با بهره‌گیری از برنامه BLAST همخوانی داده شدند (۱).

جدول ۱- آغازگرهای باره بهره‌گیری در این تحقیق (۲۲).

Table 1. Primers used in this study (22).

آغازگر Primers	توالی (۳→۵) Sequence (5→3)	محصولات PCR PCR product
16S-F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	1500bp
16S-R	5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT3'	

نتایج و بحث

سرهم ٤۲ سویه باکتریایی به ترتیب از ریشه (۱۳)، برگ (۷) ساقه (۵) و خاک پیرامون ریشه (۱۷) جدا شد. در میان جدایه‌ها، ۳۳ جدایه گرم مثبت و ۹ جدایه گرم منفی بودند. بر پایه یافته‌های بررسی کارکرد آنتاگونیستی جدایه‌ها، ۸ جدایه در برابر *E. carotovora* کارکرد آنتاگونیستی از خود نشان دادند که همگی باسیل گرم مثبت اسپوردار بوده و از جنس *باسیلوس* بودند.

در میان این جدایه‌ها، جدایه‌های A3 و A6 به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین کارکرد مهاری را در برابر *E. carotovora* از خود نشان دادند (جدول ۲) که با یافته‌های به‌دست آمده از آزمون کلروفورم همخوانی داشت. یعنی در مقایسه با گواه آزمایش، جدایه A3 با هاله نبود رشدی به قطر ۱۸ میلی‌متر بیش‌ترین و جدایه A6 با هاله نبود رشدی به قطر ۵ میلی‌متر کم‌ترین میزان ماده پادزیست را ساخت کردند. در آزمون کاتالاز مشخص گردید که ماده پادزیست ساخته شده با جدایه‌ها سرشتی به جزء پراکسیدئیدروژن دارد. ماده پادزیست ساخته شده با این جدایه‌ها پس از تیمار با پروتئازها غیرفعال شدند که بیانگر سرشت پروتئینی آن‌ها بود. کارکرد مهاری مایع رویی بدون یاخته جدایه‌ها در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد از میان رفت در حالی‌که سایر تیمارهای گرمای روی آن‌ها بی‌تأثیر بودند. درباره اثر تغییرات pH روی کارکرد مهاری آن‌ها مشخص شد که مایع رویی بدون‌یاخته این جدایه‌ها بهترین اثر را در pH ۷ تا ۸ داشتند.

جدول ۲- مشخصات و میانگین قطر هالهٔ عدم رشد جدایه‌های آنتاگونیست.

Table 2. Characteristics and mean diameter of growth inhibition zone.

جدایه‌ها Isolates	واکنش گرم Gram reaction	اسپورزایی Sporulation	نمونه Sample	مکان Location	میانگین قطر هاله عدم رشد Mean diameter of inhibition zone (mm)
A1	+	+	برگ Leaf	فاضل‌آباد Fazelabad	11
A2	+	+	خاک Soil	مرزنکلا MarzanKola	8
A3	+	+	خاک Soil	فاضل‌آباد Fazelabad	18
A4	+	+	ریشه Root	مرزنکلا MarzanKola	10
A5	+	+	خاک Soil	فاضل‌آباد Fazelabad	6
A6	+	+	خاک Soil	فاضل‌آباد Fazelabad	5
A7	+	+	ریشه Root	مرزنکلا MarzanKola	16
A8	+	+	خاک Soil	فاضل‌آباد Fazelabad	10

جدایه‌های A3 و A7 که بیش‌ترین کارکرد مهاری را در برابر *E. Carotovora* داشتند، بر پایه توالی ژن 16S rRNA شناسایی شدند. پس از تعیین توالی ژن 16S rRNA مشخص شد که این جدایه‌ها به‌ترتیب بیش از ۹۰ درصد به *Bacillus subtilis* سویه ZWQ-1 و *Bacillus Mycoides* سویه 29B-B9 شباهت داشتند که اطلاعات مربوط به آنان در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- شناسایی جدایه‌ها بر پایه تعیین توالی ژن **16S Rrna**.

Table 3. Identification of isolates based on 16S rRNA gene sequencing.

جدایه‌ها Isolates	نزدیک‌ترین سویه NCBI Closest NCBI strain	شماره دسترسی Accession number	درصد مشابهت Percentage of similarity
A7	*Bacillus mycoides* strain 29B-B9	MF062608.1	92
A3	*Bacillus subtilis* strain ZWQ-1	FR729926.1	93

پژوهش‌های همانندی در درون و بیرون کشور در ویژه شناسایی باکتری‌های ریزوسفری و اندوفیت آنتاگونیست برای مهار زیستی پوسیدگی نرم ناشی از *E. carotovora* انجام شده است که از آن می‌توان از بررسی توفیک و همکاران (۲۰۰۱) یاد کرد که کارایی *Pseudomonas fluorescence*،

Pseudomonas Putida و گونه‌ای از *Bacillus* را در مهار باکتری *E. carotovora* و کاهش گسترش و همه‌گیری این بیماری در سیب‌زمینی نشان دادند (۱۸). شارگا و لیون (۱۹۹۸) نیز گزارش کردند که *B. subtilis* سویه Bs 107 در برابر *E. carotovora* و *Erwinia atroceptica* کارکرد مهاری دارد (۱۵). هم‌چنین در یک بررسی در مصر کارکرد آنتاگونیستی *P. fluorescence*، *Pseudomonas aeruginosa*، *B. subtilis* و گونه‌ای از *Streptomyces* در برابر دو جدایه *E. carotovora* نشان داده شد (۱٤). در همین رابطه رایان و همکاران (۲۰۰۱) نیز نقش مهارکنندگی سویه *B. subtilis* GBO3 و سویه IN937a *Bacillus amyloliquefaciens* را گزارش کردند (۲۱).

طی یک پژوهشی لمسا و زلر (۲۰۰۷) نیز نشان دادند که جدایه‌های آنتاگونیستی مانند *B. subtilis* و *Bacillus macerans* پتانسیل بهره‌گیری در مهار زیستی بیماری‌های سیب‌زمینی را دارند (۱۲). الیازل (۲۰۰۸) نیز گزارش کرد که گونه‌های *Streptomyces* با ساخت ترکیباتی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، یونوفورها و آنزیم‌های هیدرولیتیک کاندیداهای خوبی برای مهار زیستی بیماری‌های گیاهی منتقله از راه خاک هستند (٦). دولوتکلدیو و همکاران (۲۰۱٦) در قرقیزستان نشان دادند که سویه *Streptomyces diacetochromenesis* sk-6 و سویه *Streptomyces graminarus* sk-2 اثر مهاری قابل‌توجهی دربرابر *E. carotovora* دارند (۵). یافته‌های یک پژوهش در چین نیز نشان داد که سویه اندوفیت *Bacillus amyloliquefaciens* KC-1 قادر به مهار رشد باکتری *Pectobacterium pectovorum*، عامل پوسیدگی نرم کلم چینی، می‌باشد (٤).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش و پژوهش‌های انجام شده توسط دیگران بیش‌تر جدایه‌های مهارگر بیماریزای بررسی شده از جنس *Bacillus* بوده است که نشانگر این است که می‌توان از پتانسیل آنتاگونیستی این باکتری‌ها برای مهار زیستی بیماری‌های گیاهی بهره‌گیری کرد. به هر گونه برای داوری بهتر درباره کارکرد این باکتری‌های مهارگر انجام آزمایش‌های بیش‌تر در شرایط گلخانه و کشتزارها پیشنهاد می‌گردد.

از کمبودهای این پژوهش نبود بررسی توان این جدایه‌ها در کشتزار در مهار بیماری یاد شده است. در پژوهش‌های آینده برای معرفی عوامل مهار زیستی کارا در بیماری‌های گیاهی بررسی کارکرد آنتاگونیستی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه و زیستگاه‌های مختلف توصیه می‌شود.

منابع

1. Ahani Azari, A., Kouroshzadeh, N., and Pordeli, H. 2019. Keratinase producing bacteria: A promising approach for poultry waste management. International Journal of Molecular and Clinical Microbiology. 9: 1. 1090-1096.
2. Bagheri, A. 2019. Management of bacterial soft rot of potato. Applied Science of potatoes. 2: 2. 7-14. (In Persian)
3. Bagheri, A., and Zafari, D.M. 2005. Evaluation and identification of potatoes varieties resistant to black rot (soft rot). Agricultural Research (Water, Soil and Plants in Agriculture). 5: 2. 17-26. (In Persian)
4. Cui, W., He, P., Munir, S., He, P., He, Y., Li, X., Yang, L., Wang, B., and Wu, Y. 2019. Biocontrol of soft rot of Chinese cabbage using an endophytic bacterial strain. Frontiers in Microbiology. 10: 1471. 1-12.
5. Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S., and Suleymankisi, A. 2016. Biological control of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* by Streptomyces species. Advances in Microbiology. 6: 104-114.

6.Elyazel, HAM.S. 2008. Studies on potato brown rot disease under Egyptian conditions, M.Sc. Thesis, Agricultural botany and plant pathology department. Faculty of Agriculture Zagazig University, Egypt.
7.Gong, M., Lin, T., Huang, J., and Zeng, B. 2017. Screening of endophytic bacteria isolated from two kinds of antarctic plant antagonistic konjac soft rot disease. In: 2017 International Conference on Biotechnology and Bioengineering (ICBB-2017), Offenburg, Germany.
8.Hu, X., Shixiao, F., Li, O., Wu, J., and Chen, J. 2009. Isolation and characterization of endophytic and rhizosphere bacterial antagonists of soft rot pathogen from *Pinellia ternate*. FEMS Microbiology. 295: 10-16.
9.Kavino, M., Harish, S., Kumar, N., Saravanakumar, D., Damodaran, T., Soorianathasundaram, K., and Samiyappan, R. 2007. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of systemic resistance of banana plantlets against bunchy top virus. Soil Biology & Biochemistry. 39: 1087-1098.
10.Kazemi, F., Khodakarmian, G., Bagheri, A., and Qasemi, A. 2011. Pattern of rep-PCR of *pectobacterium* strains isolated from potatoes with symptoms of Soft rot and black leg in Hamedan province. Agricultural Biotechnology. 2: 1. 47-52. (In Persian)
11.Krid, S., Rhouma, A., Mogou, I., Quesada, J.M., Nesme, X., and Gargouri, A .2010. *Pseudomonas savastanoi* entophytic bacteria in olive endophytic bacteria in olive tree knots and antagonistic potential of strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. Journal of Plant Pathology. 92: 2. 335-341.
12.Lemessa, F., and Zeller, W. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. Biological Control. 42: 336-344.
13.Liaqat, F., and Eltem, R. 2016. Identification and characterization of endophytic bacteria isolated from in vitro cultures of peach and pear rootstocks. Biotechnology. 6: 120. 1-8.
14.Salem, E., and Abd El-Shafea, Y. 2018. Biological control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora*. Egyptian Journal of Biological Pest Control. 28: 94. 1-5.
15.Sharga, B.M., and Lyon, G.D. 1998. *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. Canadian Journal of Microbiology. 44: 777-783.
16.Smith, L., Keefe, D.O., Smith, M., and Hamill, S. 2003. The benefits of applying rhizobacteria to tissue cultured bananas. Banana Topics Newsletter. 33: 1-4.
17.Sturz, A.V., Christie, B.R., Matheson, B.G., Arsenault, W.J., and Buchanan, NA. 1999. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. Plant Pathology. 48: 360-369.
18.Tawfik, A.E., Hanna, A.I., El-Ghareeb, L.A., Gomah, A.A., and Mahmoud, S.M. 2001. Applied approach for controlling brown rot and soft rot bacteria of potatoes. Journal of Agricultural Science. 26: 6. 3631-3642.
19.Mirzai, M., Aminian, H., and Roustaee, A. 2012. The Study of Biological Control of Pear Fire Blight Caused by *Erwinia amylovora* by some Antagonistic Bacteria. Biological Control of Pets and Plant Diseases. 1: 39-47. (In Persian)
20.Rahman, M., Ali, M.E., Khan, A.A., Akanda, A.M., Uddin, M.D., Hashim, U., and AbdHamid, S.B. 2012. Isolation, Characterization, and identification of biological control agent for potato soft rot in Bangladesh. Scientific World Journal. Pp: 1-6.
21.Ryan, P.R., Delhaize, E., and Jones, D.L. 2001. Function and mechanism of organic onion exudation from plant roots. Annual Review of Plant Physiology. 52: 527-560.
22.Weisberg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology. 173: 2. 697-703.

J. of Soil Management and Sustainable Production, Vol. 11(2), 2021
http://ejsms.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/ejsms.2021.18733.2004

(Research Full Paper)

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Evaluation of inhibitory potential of rhizosphere and endophytic bacteria against *Erwinia carotovora*

M. Dinkou[1], A. Ahani Azari[*2] and T. Dadgar[2]
[1]M.Sc. Graduate, Dept. of Microbiology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
[2]Assistant Prof., Dept. of Microbiology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran
Received: 01.05.2021; Accepted: 02.14.2021

Abstract

Background and Objectives: *Erwinia carotovora* is a pathogen of many important plant species and infects a large number of ornamental and agricultural plants such as corn, rice, tomatoes, onions, sugar beets and vegetables. This bacterium is one of the most important factors that greatly reduces crop yields by causing soft rot in the stems and tubers of potatoes before and after harvest. Although the disease has been reported in most potato-growing areas of the country, no environmentally friendly control measure has been taken to prevent this disease. Therefore, identifying the biological factors effective in controlling soft rot disease, especially in agricultural hotspots such as Golestan province, seems to be essential. This study aimed to isolate and identify rhizosphere and endophytic bacteria with antagonistic activity against *E. carotovora* in potato fields of Marzankola and Fazelabad villages of Gorgan city located in Golestan province.

Materials and Methods: Soil, root, leaf and stem samples of potatoes were cultured on nutrient agar medium and after incubating at 26 °C for 3-5 days the grown colonies were morphologically examined. After purification of the colonies, the initial identification of the isolates was performed by Gram staining and the ability to produce spores. The antagonistic activity of the isolates was determined by agar well diffusion method. In this method, the plates were incubated at room temperature for 3-5 days and the growth inhibition zone was measured around the wells. Chloroform test was used to evaluate the production of antimicrobial agent by antagonist isolates. Catalase and protease sensitivity tests were used to determine the nature of the antimicrobial agent. Then, the thermal stability of the antimicrobial agent and the effect of pH on its inhibitory activity were measured. Isolates with more antagonistic activity were identified based on 16S rRNA sequencing.

Results: A total of 42 bacterial strains were isolated from roots (13), leaves (7), stems (5) and rhizosphere soil (17). Among the isolates, 33 isolates were Gram-positive and 9 isolates were Gram-negative. Based on the results of antagonistic activity of isolates, the 8 isolates showed antagonistic activity against *E. carotovora*, all of which were Gram-positive spore-forming bacilli and belonged to the genus *Bacillus*. The inhibitory activity of the isolates was consistent with the results obtained from the chloroform test. That is, compared to the control, the isolate with a greater amount of antimicrobial agent had the larger growth inhibition zone. In the catalase test, it was found that the antimicrobial substance produced by the isolates is of a nature other than hydrogen peroxide and it was inactivated after treatment with proteases, indicating their protein nature. The inhibitory activity of the supernatant of these isolates was lost at 100 °C and had the best inhibitory effect at pH 7 to 8. The isolates that had the highest inhibitory activity against *E. carotovora* were identified based on the sequence of 16 S rRNA gene. After sequencing, these isolates were found to be more than 90% similar to *Bacillus subtilis* strain ZWQ-1 and *Bacillus* Mycoides strain 29B-B9, respectively.

* Corresponding Author; Email: ania_783@yahoo.com

Conclusion: Considering that in the present study, the isolates with the best inhibitory effect against *E. carotovora* belonged to the genus *Bacillus*, it seems that the antagonistic potential of these bacteria can be used for biological control of plant diseases, of course, to better judge about their performance, it is necessary to conduct further experiments in greenhouse and field conditions.

Keywords: Antagonist, Endophyte, *Erwinia carotovora*, Rhizosphere, Sof rot