مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره چهارم، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۴
صفحه ۹۱-۷۹

شناسایی برخی عوامل بیوکنترل باکتری عامل پوسیدگی نرم سیب زمینی

Identification of some Biocontrol agents on Potato Soft Rot Bacterium

پریناز شیبانی[۱]، رضا خاکور[۲]، اکبر شیرزاد*[۱]

Parinaz Sheibani[1], Reza Khakvar [2], Akbar Shirzad*[1]

۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان تبریز
۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

1. Plant Protection Dept. Agriculture Faculty, Azarbijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
2. Plant Protection Dept. Agriculture Faculty, Tabriz University, Tabriz, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ashirzad98@yahoo.com
(تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۹۵/۷/۱)

چکیده

از جمله عمده‌ترین عوامل خسارت‌زای سیب‌زمینی، باکتری‌های خاکزاد عامل پوسیدگی نرم (Soft rot) می‌باشند که دارای طیف میزبانی وسیع بوده و با تولید آنزیم پکتیناز باعث پوسیدگی نرم در غده‌های سیب-زمینی می‌شوند. استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست به عنوان یک جایگزین مناسب برای سموم شیمیایی در کنترل بیمارگرها اهمیت دارد. در این مطالعه ابتدا ۳۰ نمونه غده مشکوک به بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی به همراه خاک اطراف غده‌ها از مزارع سیب‌زمینی جمع آوری و باکتری های عامل پوسیدگی نرم از غده‌های سیب‌زمینی، جداسازی شد. جدایه‌های باکتری بیمارگر با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی به عنوان *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* شناسایی گردید. باکتری‌های آنتاگونیست هم از نمونه‌های خاک اطراف غده‌ها جداسازی و روی این باکتری بیمارگر، تست غربالگری کنترل انجام شد. از بین ۲۵۰ جدایه آنتاگونیست، هفت جدایه روی باکتری بیمارگر، هاله بازدارندگی تشکیل دادند. از این میان، دو جدایه 37G و 41E با بیش از ۵۰ درصد بازدارندگی رشد بیمارگر، بیشترین اثر آنتی‌بیوز و سه جدایه 37B، 36A و 34B بازدارندگی نزدیک به ۵۰ درصد نشان دادند اما جدایه 11A با بازدارندگی ۴۰ درصد به علت بیماری‌زایی بر روی غده سیب‌زمینی کنار گذاشته شد. جدایه‌های آنتاگونیست با استفاده از روش‌های شناسایی بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و مولکولی به عنوان *Streptomyces* sp. شناسایی شدند. سه جدایه 37G، 41E و 36A کنترل قابل قبولی در تست گلخانه-ای روی عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی نشان دادند. استرپتومایسزها با مکانیسم‌های بیوکنترلی مختلف در کنترل باکتری‌های بیمارگر پتانسیل خوبی دارند.

واژه‌های کلیدی

استرپتومایسز،
پکتوباکتریوم،
پوسیدگی نرم،
سیب زمینی،
کنترل بیولوژیکی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) از خانواده *Solanaceae* پس از گندم، برنج و ذرت چهارمین محصول عمده کشاورزی است (FAO 2014) و از نظر بازدهی نسبت به غلات، مواد غذایی و انرژی بیشتری در واحد سطح تولید می‌کند. سیب‌زمینی مورد حمله آفات و بیماری‌های زیادی قرار می‌گیرد که از جمله خسارت‌زاترین این عوامل، باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم هستند. این باکتری‌ها با ترشح آنزیم‌های متعدد تجزیه کننده دیواره سلولی، به ویژه آنزیم‌های پکتیناز یا پکتولیتیک، باعث تجزیه پکتات کلسیم بین سلول‌ها و تخریب بافت‌های غده سیب‌زمینی می‌شوند و علاوه بر خسارت مستقیم، با ایجاد شرایط مساعد برای حمله سایر آفات و بیماری‌ها، سبب کاهش کمیت و کیفیت محصول و افزایش خسارت اقتصادی می‌گردند (Stevenson *et al*. 2001). چندین گونه باکتری به عنوان عامل پوسیدگی نرم شناسایی شده‌اند با این حال بیشترین خسارت مربوط به باکتری بیمارگر *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum (P.c.c.)* می‌باشد.

روش‌های معمول کنترل بیماری به استفاده از سموم شیمیایی محدود شده است ولی با توجه به احتمال پیدایش سویه‌هایی با بیماری‌زایی شدیدتر، خطر استفاده از سموم شیمیایی برای انسان و محیط زیست و هزینه زیاد روش‌های رایج کنترل، استفاده از روش‌های مناسب‌تر مانند کنترل بیولوژیک که همسو با کشاورزی پایدار است، ضروری می‌باشد. پژوهش‌های زیادی برای کنترل بیولوژیکی بیماری پوسیدگی نرم در سیب زمینی انجام شده است (جدول ۱).

جدول ۱- گزارشات مرتبط با کنترل بیولوژیکی عامل بیماری پوسیدگی نرم **Table1**- Reports of biocontroling of soft rot disease agents

عامل بیوکنترل	کنترل بیماری و مکانیسم کنترل	منبع
P. flourescens strain F113	کنترل پکتوباکتریوم عامل ساق سیاه سیب‌زمینی روی غده‌های سیب‌زمینی با تولید DAPG	Cronin *et al*. 1997
Lactobacillus plantarum *Lactobacillus acidophilus* *Lactobacillus buchneri* *Leuconostoc* spp	آنتاگونیست باکتری *P. carotovora* در میوه‌ها و سبزیجات تازه	Trias *et al*. 2008
Bacillus subtilis strain BS 107	کنترل باکتری عامل پوسیدگی نرم با تولید آنتی‌بیوتیکها	Sharga and lyon 1998
Bacillus licheniformis P40	کنترل باکتری *P. carotovora* با تولید ماده باکتریوسین و تجزیه شدن دیواره سلولی باکتری	Cladera-olivera *et al*. 2004
Rhodococcus spp *Ochrobacterium* spp *Delftia* spp	کنترل باکتری‌های *Pectobacterium* و *Dickeya* با روش Quorum Sensing و جلوگیری از ترشح آنزیم‌های پکتولیتیک	Jafra *et al*. 2006
Bdellovibrio bacteriovorans	کنترل گونه‌های پکتوباکتریوم در سیب‌زمینی با خاصیت شکارگری	Epton *et al*. 1990
Obesumbacterium spp *Serratia plymuthica* A30 *Rhodococcus* spp *Pseudomonas* spp *Bacillus* spp *Lysinibacillus* spp	کنترل باکتری *Dickeya* sp. Biovar3 در غده‌های سیب‌زمینی	Krzyzanowska *et al*. 2012 Czajkowski *et al*. 2009
Pseudomonas aeruginosa *Enterobacter asburiae* *Pantoea ananatis* *Mynoides odoratimimus*	کنترل بیمارگر *P.c.c.* در غده‌های گیاه *Pinellia ternata*	Hu *et al*. 2009
Curtobacterium luteum *Pantoea agglomerance* *Pseudomonas fluorescent*	کنترل بیمارگر *P. carotovorum* در سیب‌زمینی	Sturz *et al*. 1999
Bacillus subtilis *Pseudomonas fluorescent* *Bacillus turingiensis*	کنترل بیمارگر *P.c.c.* در سیب‌زمینی	Algeblawi and Adam 2013
Lactobacillus sp. *Bacillus* sp.	کنترل بیمارگر *P.c.c.* در سیب‌زمینی	Rahman *et al*. 2012

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]

برای اولین بار در سال ۱۹۸۳ جهت جلوگیری از آلوده شدن غده-های سیب‌زمینی به باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم از باکتری‌های جدا شده از ریزوسفر سیب‌زمینی استفاده شد (Kloepper 1983, Jafra *et al.* 2006). گونه‌های سودوموناد فلورسنت روی غده‌ها قادر به کاهش جمعیت باکتری عامل پوسیدگی نرم گزارش شده-اند (Kloepper 1983). باکتری‌های عامل کنترل بیولوژیک براساس توانایی‌شان به مهار رشد بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی (antibiosis) و یا براساس غیرفعال کردن acyl-homoserine lactones (AHLs) که در QS بیمارگر نقش دارد، گروه‌بندی شده اند. گروه دوم با دارا بودن ژن AHL lactonase gene (aiiA) در مقابل طیف وسیعی از گونه‌های *Pectobacterium* spp. و *Dickeya* spp. موثر بودند و بررسی‌ها نشان داد که تجزیه AHLs در باکتری‌های آنتاگونیست به عنوان یک مکانیسم اساسی علیه بیمارگرهاست (Krzyzanowska *et al.* 2012).

اکتینوباکتریها به علت تولید آنتی بیوتیک اهمیت اقتصادی زیادی دارند. این باکتری‌ها بر علیه بیمارگرهای باکتریایی از جمله *S. scabies* (Liu *et al.* 1996, Doumbou *et al.* 2001) و *Ralstonia solanacearum* (Bonjar *et al.* 2006) پتانسیل بیوکنترل خوبی نشان داده‌اند (McBride and Ensign 1987). در آزمایشی که توسط Baz و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد، ۱۶ جدایه از ۲۰۰ جدایه مورد آزمون از اکتینوباکتریها در مهار *P.c.c.* فعال بودند. براساس توالی 16srRNA چهار جدایه با بیشترین مهار بیمارگر از جنس *Streptomyces* گزارش شدند.

در راستای کنترل بیولوژیکی عامل پوسیدگی نرم سیب-زمینی که یکی از بیماریهای رایج و مهم سیب‌زمینی در استان آذربایجان شرقی می‌باشد، تحقیق حاضر برای رسیدن به دو هدف اصلی انجام شد: الف) جداسازی، شناسایی و اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های باکتریایی عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی از مزارع و انبارهای سیب‌زمینی استان آذربایجان شرقی. ب) جداسازی و شناسایی عوامل بیوکنترل عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی از خاک‌های منطقه.

مواد و روشها

جداسازی جدایه‌های باکتری بیمارگر از غده‌های سیب‌زمینی

در فصل زراعی سال ۱۳۹۲ حدود ۳۰ نمونه غده مشکوک به بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی به همراه خاک اطراف غده‌ها از مزارع سیب‌زمینی استان آذربایجان‌شرقی (جدول ۲) با برچسب تاریخ و محل، جمع‌آوری شد. نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی-گراد به آزمایشگاه منتقل شد و مراحل جداسازی انجام گرفت. جداسازی باکتری بیمارگر مطابق روش Schaad و همکاران (۲۰۰۱) انجام گرفت و با بازکشت خالص سازی شد. قطعات کوچک یک سانتی‌متری از غده‌های سیب‌زمینی (مرز بافت سالم و آلوده) تهیه شد. این قطعات ابتدا به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و سپس در هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت سه دقیقه استریل سطحی شدند. این قطعات بعد از سه بار شستشو در آب مقطر بر روی کاغذ صافی خشک شده و بر روی محیط کشت‌های عمومی مثل NA جامد قرار گرفتند و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس با بازکشت خالص سازی انجام گرفت.

شناسایی جدایه‌های بیمارگر با روشهای بیوشیمیایی و مولکولی

برای شناسایی جدایه های باکتری، آزمون‌های افتراقی شامل آزمون‌های گرم، اکسیداز، کاتالاز، تست رشد هوازی و بی‌هوازی (O/F)، تست لهانیدن سیب‌زمینی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک اریترومایسین، رشد در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تحمل شوری پنج درصد، هیدرولیز توئین ۸۰ درصد، هیدرولیز ژلاتین، لسیتین، کازئین، نشاسته، تولید ایندول، تولید گاز هیدروژن سولفوره (H_2S) از سیستئین، تست توانایی استفاده از سیترات، واکنش اوره‌آز انجام شد (Schaad *et al.* 2001). در نهایت برای تعیین هویت دقیق باکتریها از روش مولکولی مبتنی بر PCR برای تشخیص اختصاصی استفاده شد (جدول ۳).

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]

جدول۲- اطلاعات نمونه برداری غده‌های سیب‌زمینی و خاک اطراف غده‌ها **Table 2-** Information of potato tuber samples

شماره نمونه	محل نمونه برداری	شماره نمونه	محل نمونه برداری
۱	جاده سراب – روستای مهربان	۱۶	روستای اکین آباد
۲	جاده سراب–۱۰ کیلومتر مانده به سراب	۱۷	روستای اکین آباد
۳	سراب	۱۸	دوزدوزان
۴	دوزدوزان	۱۹	روستای کرگان
۵	سراب	۲۰	روستای عین الدین
۶	جاده بستان آباد – دوزدوزان	۲۱	روستای عین الدین
۷	بستان آباد	۲۲	جاده سراب
۸	جاده سراب– ۲ کیلومتر مانده به سراب	۲۳	بستان آباد
۹	سراب	۲۴	تیکمه داش
۱۰	سراب	۲۵	تیکمه داش
۱۱	روستای مهربان	۲۶	عین الدین
۱۲	جاده بستان آباد	۲۷	جاده بستان آباد
۱۳	بستان آباد	۲۸	تیکمه داش
۱۴	دوزدوزان	۲۹	جاده هروی – بیرق
۱۵	جاده باسمنج	۳۰	جاده هروی – بیرق

جدول ۳- توالی آغازگرها برای PCR جهت شناسایی اختصاصی جدایه‌های باکتری Table 3- Primers sequence for PCR detecting bacteria

ژن و محصول PCR	**توالی آغازگرها**	**تشخیص باکتری**
(Pel Y)پکتات لیاز ۴۳۴ جفت باز	F: TTA CCG GAC GCC GAG CTG TGG CGT R: CAG GAA GAT GTC GTT ATC GCG AGT Darrasse *et al*. 1994	*Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum*
ADE *pel* gene ۴۲۰ جفت باز	F: GAT CAG AAA GCC CGC AGC CAG AT R: CTG TGG CCG ATC (AGG ATG GTT TTG Nassar et al. 1996	*Dickeya solani*
16srRNA ۱۵۰۰ جفت باز	F: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG R: AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA Li and DeBoer, 1995	جهت انجام توالی‌یابی

برنامه حرارتی PCR شامل یک مرحله واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه سپس یک برنامه ۳۰ چرخه‌ای با هر چرخه شامل مرحله اول واسرشتگی (Denaturation) دو رشته DNA به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، مرحله دوم اتصال آغازگرها (Annealing) به مدت ۴۵ ثانیه در دمای۷۲، ۶۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌ترتیب برای ژنهای ADE، Y و 16srRNA و مرحله سوم گسترش (Extension) به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد و مرحله آخر شامل یک بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه اضافه گردید. محصول واکنش با آغازگر 16srRNA جهت توالی یابی به موسسه IBMP-CNRS استراسبورگ فرانسه ارسال شد.

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست از خاک

حدود ۳۰ نمونه خاک، در فصل زراعی سال ۱۳۹۲ از خاک اطراف غده‌های سیب‌زمینی با برچسب تاریخ و محل جمع‌آوری، از مزارع سیب‌زمینی استان آذربایجان‌شرقی جمع‌آوری و تا زمان جداسازی باکتری‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای جداسازی باکتری‌ها از خاک، حدود سه گرم خاک اطراف غده وزن و در ۹۸–۹۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل حاوی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]

NaCl ۰/۸۵درصد سوسپانسیون گردید. سوسپانسیون ۱۵ دقیقه روی شیکر با ۲۵۰ دور در دقیقه نگهداری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون خاک با رقت‌های 10^{-3}، 10^{-4} و 10^{-5} بر روی محیط کشت‌های عمومی ریخته شد و در سطح محیط با استفاده از پیپت پاستور استریل به‌طور یکنواخت پخش و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری شد (Krzyzanowska *et al*. 2012).

غربالگری جدایه‌های آنتاگونیست براساس خاصیت بازدارندگی علیه باکتری بیمارگر

غربالگری با دو روش انجام شد: الف) روش کاغذ صافی : در روش کاغذ صافی، باکتری بیمارگر و آنتاگونیست به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت مایع NB کشت داده شدند. کاغذهای صافی استریل به قطر پنج میلی‌متر به کشت باکتری آنتاگونیست (با غلظت 10^{8} cell/ml) آغشته شده و به مدت یک ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از کشت باکتری بیمارگر (با غلظت 10^{8} cell/ml) بر سطح محیط کشت جامد NA به‌طور یکنواخت پخش شد. پس از خشک شدن سطح محیط، کاغذ صافی‌های آغشته به باکتری آنتاگونیست بر روی پتری حاوی کشت بیمارگر قرار داده شده و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در نهایت، نواحی عدم رشد بیمارگر پس از هفت روز اندازه‌گیری شد (Nguyen and Ranamukhaarachchi 2010).

ب) در روش دوم غربالگری که بیشتر برای جدایه‌های اکتینومیست استفاده شد، ابتدا باکتری آنتاگونیست بر روی محیط کشت NA به‌صورت یک خط مستقیم کشت داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سپس باکتری بیمارگر (با غلظت 10^{8} cell/ml) که به مدت ۲۴ ساعت در محیط کشت NB کشت داده شده بود بر روی محیط حاوی باکتری آنتاگونیست اسپری شده و پتری به مدت هفت روز در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت، نواحی عدم رشد بیمارگر پس از هفت روز اندازه‌گیری گردید (Krzyzanowska *et al*. 2012).

شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست

برای شناسایی باکتری‌های آنتاگونیست از روش‌های بیوشیمیایی، مورفولوژیکی و مولکولی (توالی یابی 16SrRNA مطابق جدول ۳) استفاده شد. تست‌های گرم، اکسیداز، کاتالاز، رشد هوازی و بی‌هوازی، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز ژلاتین، تست بیماری‌زایی بر روی غده سیب‌زمینی (Schaad *et al*. 2001) تست تولید ملانین و بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی شامل تعیین نوع زنجیره اسپور (Shirling and Gottlie 1966) و شکل و رنگ کلونی انجام شد.

نتایج

جداسازی باکتری بیمارگر از غده‌های سیب‌زمینی

در این بررسی از ۳۰ مزرعه سیب‌زمینی استان آذربایجان‌شرقی، غده‌های سیب‌زمینی رقم آگریا مشکوک به بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی به همراه نمونه خاک اطراف غده‌ها به شرح جدول ۲ نمونه برداری به عمل آمد. باکتری‌های بیمارگر از غده‌های سیب-زمینی و باکتری‌های آنتاگونیست از نمونه‌های خاک جداسازی و خالص سازی شدند.

آزمون‌های افتراقی جهت شناسایی جدایه‌های بیمارگر

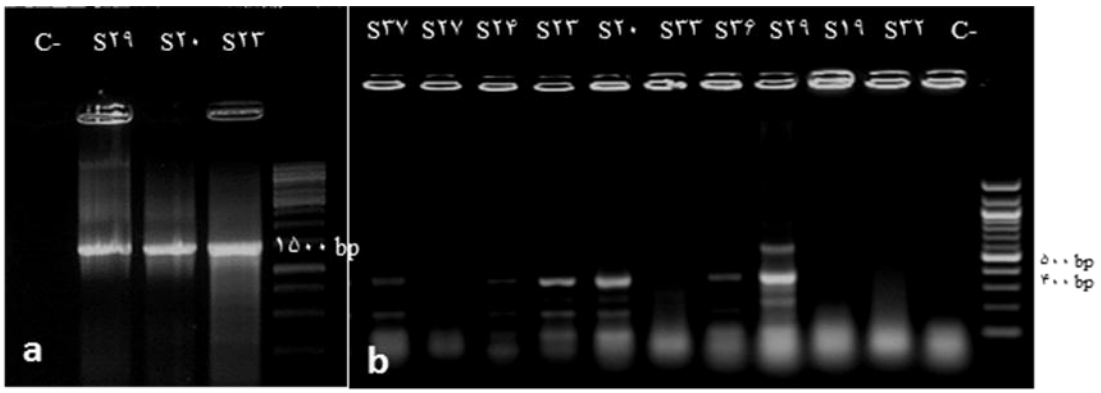
حدود ۴۰ جدایه باکتری بیمارگر از غده‌های سیب‌زمینی مشکوک به بیماری پوسیدگی نرم، جداسازی شدند سپس بر روی آن‌ها آزمون‌های گرم، اکسیداز، کاتالاز، رشد هوازی و بی‌هوازی و تست بیماری‌زایی بر روی غده سیب‌زمینی انجام شد از بین جدایه‌های فوق ۱۰ جدایه باکتری با قدرت بیماری‌زایی بالا روی غده سیب‌زمینی انتخاب شدند و تست‌های تکمیلی مطابق با جدول۴ بر روی آن‌ها انجام گرفت.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]

جدول ۴- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی بر روی جدایه‌هایی که تست بیماریزایی آنها روی سیب‌زمینی مثبت بود

Table 4- Results of biochemical tests on bacterial isolates whose pathogenicity test on potato were positive

S37	S36	S33	S32	S29	S27	S24	S23	S20	S19	تست بیوشیمیایی
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	رشد در دمای ۳۷
−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	تحمل شوری ٪۵
+	−	−	−	−	−	−	+	+	−	هیدرولیز توئین ٪۸۰
−	−	−	−	+	−	+	+	+	−	هیدرولیز ژلاتین
−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	هیدرولیز نشاسته
−	−	+	−	+	−	+	+	−	+	هیدرولیز کازئین
−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	هیدرولیز لسیتین
+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	مقاومت به اریترومایسین
−	+	+	−	−	−	+	−	−	+	تولید اندول
−	−	−	−	−	−	−	+	−	+	تولید H_2S
−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	استفاده از سیترات
−	−	+	−	−	−	−	−	−	+	تست اوره‌آز



شکل۱- تصویر الکتروفورز محصول PCR روی جدایه‌های باکتری a: با آغازگرهای 16SrRNA b: با آغازگرهای Y

Fig 1- Electrophoresis of PCR products performed on bacterial isolates a. by 16SrRNA primers b. by Y primers

روش‌های مولکولی جهت شناسایی جدایه‌های بیمارگر

برای شناسایی مولکولی ۱۰ جدایه باکتری بیماری‌زای فوق از PCR با آغازگرهای اختصاصی *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* و *D. solani* استفاده شد (مطابق جدول ۳). الکتروفورز محصول PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *D. solani* (ADE) نتیجه‌ای نشان نداد اما الکتروفورز محصول PCR روی شش جدایه S36، S24، S23 ، S20، S29 وS37 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی *P.c.c* (Y) باند ۴۳۴ جفت بازی را نشان داد (شکل۱). از بین جدایه‌های فوق، جدایه‌های S20، S29 و S23 که دارای بیشترین توان بیماری‌زایی بر روی غده‌ها بودند و از لحاظ نتایج تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی با *P.c.c* مطابقت بیشتری داشتند، با استفاده از آغازگرهای 16SrRNA (جدول۳) تکثیر شدند و با مشاهده محصول PCR ۱۵۰۰ جفت بازی (شکل ۱)، این محصول PCR پس از خالص سازی، جهت انجام توالی‌یابی ارسال شد.

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست از خاک اطراف غده‌ها

نزدیک به ۲۵۰ جدایه باکتری از ۳۰ نمونه خاک جداسازی شد. کلونی‌های متفاوت با اشکال متنوع و رنگ‌های زرد، سبز روشن،

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]

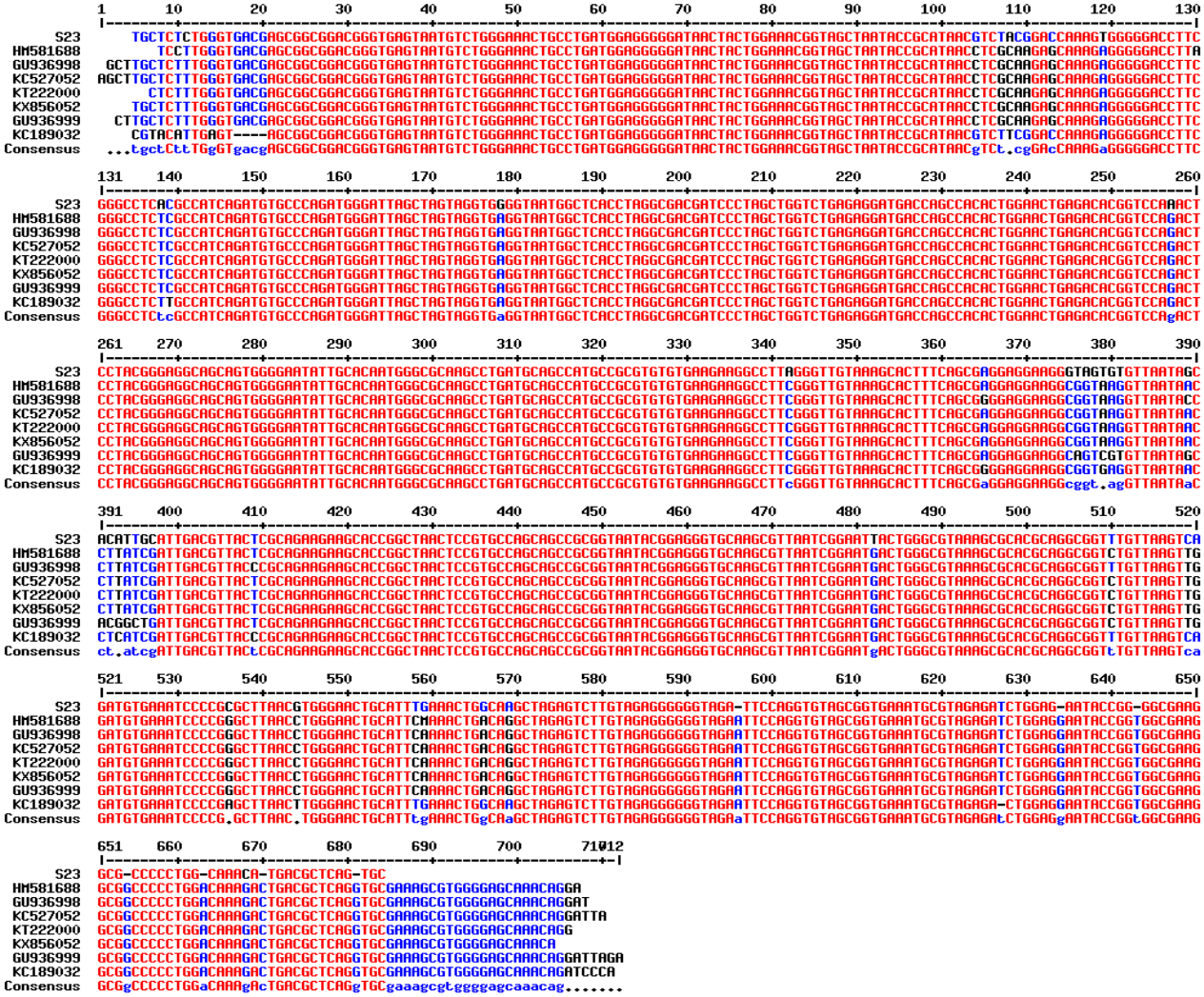
نارنجی و کرمی رنگ به‌دست آمد. از بین این جدایه‌ها نزدیک به ۳۰ جدایه دارای رشد رشته‌ای شکل بودند.

غربالگری خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌ها بر روی باکتری بیمارگر

جدایه‌های آنتاگونیست نسبت به باکتری بیمارگر S23 (*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*) غربال شدند و قطر هاله بازدارندگی اندازه‌گیری شد. از بین ۲۵۰ جدایه، ۱۴ جدایه خاصیت آنتاگونیستی نشان دادند که از بین آن‌ها هفت جدایه هاله بازدارندگی قابل توجه به شرح جدول (۵) ایجاد کردند. تست غربالگری با سه تکرار برای هر جدایه انجام شد. جدایه 11A با هر دو روش غربالگری نتیجه یکسان ایجاد کرد و سایر جدایه‌ها با روش اسپری‌پاشی غربال شدند.

تست‌های افتراقی جهت شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست

آزمون‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی به کار رفته جهت شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست در جدول ۶ و شکل ۳ و۴ آمده است.



شکل ۲- زیرهمچینی توالی جدایه اول بیمارگر جداسازی شده در این تحقیق (S23) با توالی های هفت جدایه *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* از ژن بانک. بین ۶۸۰ باز مقایسه شده کمتر از ۵ درصد اختلاف مشاهده می‌شود. تهیه شده با استفاده از نرم افزار آنلاین http://multalin.toulouse.inra.fr

Fig 2- Alignment of 16SrRNA sequences of isolated pathogen (S23) and seven *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* isolates from GeneBank. There is 5% difference among 680 bases. Performed on http://multalin.toulouse.inra.fr.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]

جدول۵- قطر هاله بازدارندگی ایجاد شده توسط جدایه‌های آنتاگونیست روی باکتری S23

Table 5- Diameter of inhibition zone by antagonist isolates on S23 pathogen bacterium

جدایه آنتاگونیست	قطر هاله بازدارندگی(cm)	درصد بازدارندگی
37G	۱/۵	۵۰
26A	۱/۵	۵۱
37B	۱	۴۲
11A	۱	۴۰
36A	۱	۴۱
41E	۱/۵	۵۵
34B	۱	۴۳

جدول ۶- نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی برای جدایه‌های باکتری آنتاگونیست

Table 6- Results of biochemical and morphological tests on antagonist bacteria

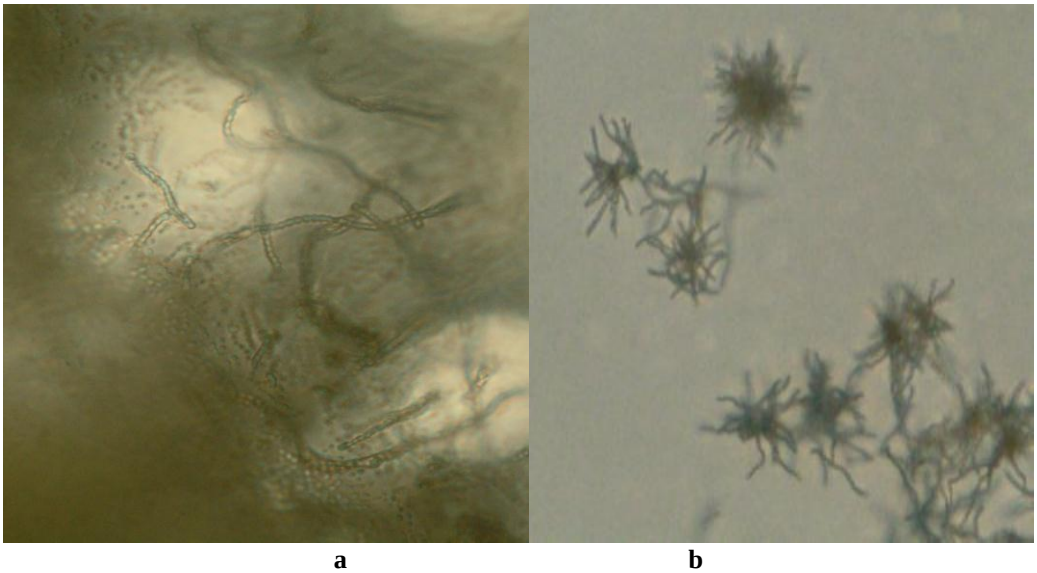
آزمون‌ها	37G	26A	37B	11A	36A	41E	34B
گرم	+	+	+	+	+	+	+
اکسیداز	–	–	–	–	–	–	–
کاتالاز	+	+	+	+	+	+	+
O/F	F	O	F	F	O	F	O
بیماری‌زایی	-	-	-	+	-	-	-
هیدرولیز نشاسته	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز کازئین	+	+	+	+	+	-	+
هیدرولیز ژلاتین	+	+	+	+	+	+	+
تولید ملانین	-	-	+	-	-	+	-
شکل اسپور	flexuous	flexuous	flexuous	–	flexuous	flexuous	flexuous
نوع کلونی	umbonate	umbonate	convex	-	raised	umbonate	convex
	Umbonate		Convex	–	Raised		Convex

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]

شکل ۳- a, b, c تصاویر کلونی‌های باکتری‌های آنتاگونیست a) تصویر کلونیumbonate، b) تصویر کلونیraised و c) تصویر کلونی convex و d) تصویرهاله بازدارندگی ایجاد شده توسط جدایه‌های باکتری آنتاگونیست روی باکتری بیمارگرS23

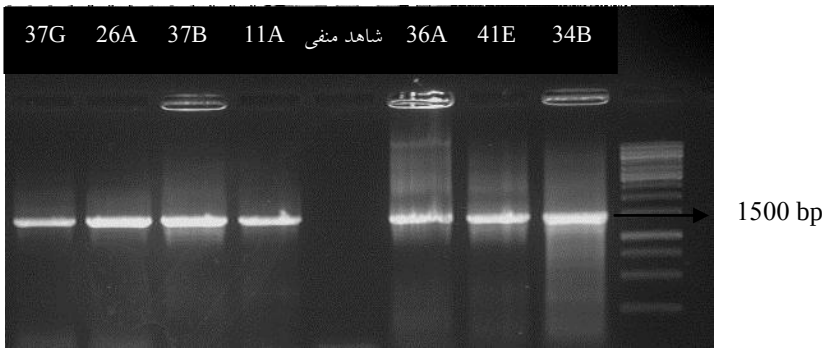
Fig 3- The morphology of colonies of antagonist bacteria



شکل۴- تصاویر رشد رشته‌ای و اسپور جدایه‌های باکتری آنتاگونیست در میکروسکوپ نوری a: 400x b: 1000x

Fig 4- The morphology of spores of antagonist bacteria

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]



شکل۵- تصویر الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای 16srRNA روی باکتری‌های آنتاگونیست

Fig 5- Electrophoresis of PCR products on antagonist bacteria with 16srRNA primers

شناسایی مولکولی جدایه‌های آنتاگونیست:

روی باکتری‌های آنتاگونیست با استفاده از آغازگرهای 16srRNA جهت انجام توالی‌یابی، آزمون PCR انجام شد (شکل۴). پس از مشاهده باند ۱۵۰۰ جفت بازی، محصول PCR خالص سازی شد و به مرکز تحقیقات IBMP-CNRS فرانسه ارسال گردید.

توالی‌های DNA به‌دست آمده از توالی‌یابی با توالی‌های موجود در Gene Bank با استفاده از nucleotide blast مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه به شرح زیر بود:

جدایه 11A متعلق به جنس .*Bacillus* sp می‌باشد که به علت مثبت بودن تست بیماریزایی بر روی غده سیب‌زمینی کنار گذاشته شد. جدایه‌های 34B، 37B، 37G و41E با احتمال ۹۸ درصد متعلق به جنس .*Streptomyces* sp هستند.

بحث

در سال‌های اخیر استفاده بیش از حد از سموم شیمیایی در کشاورزی، باعث بروز مشکلات زیست محیطی و ظهور سویه‌های مقاوم در برابر عوامل بیماری‌زا شده است (Ardakani 2009). از این رو تلاش برای یافتن روش‌های جایگزین با کاهش اثرات سوء بر محیط زیست از استراتژی‌های کشاورزی پایدار محسوب می‌شود که از آن به عنوان مدیریت تلفیقی بیماری‌ها یاد می‌شود. حفظ منابع طبیعی و کاستن از مواد آلاینده هوا، خاک و آب، استفاده از روش‌های طبیعی و بیولوژیک را جهت کنترل بیماری‌های گیاهی از اهمیت روزافزونی برخوردار کرده است. در این راستا شناسایی، جداسازی و استفاده از عوامل آنتاگونیست بومی مناطق آلوده کشور که دارای قدرت بالقوه مهار عوامل بیماری‌زا باشند بسیار ضروری است. یک عامل بیوکنترلی قوی باید با تولید آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های کارآمد که تاثیر طولانی مدت نیز دارند، با تولید اندام‌های مقاوم و اسپورهایی که مقاوم به شرایط گرما و خشکی هستند بقای خود را در شرایط نامساعد تضمین کند. علاوه بر آن قادر به حل مواد مغذی، عناصر کم مصرف و تثبیت نیتروژن اتمسفر بوده و با فعال نمودن چندین مکانیسم بیوکنترلی قادر به افزایش تحمل به آهن، شوری و فلزات سنگین باشد (Chet *et al.* 1997). مکانیسم‌های بیوکنترلی که عوامل آنتاگونیست در خاک بر علیه بیمارگرهای خاک‌زاد به کار می‌برند اغلب پیچیده بوده و بیشترین ویژگی کنترلی آن‌ها اغلب به تولید آنتی‌بیوتیک نسبت داده شده است (Howell *et al.* 1988).

این مطالعه به منظور بررسی پتانسیل باکتری‌های آنتاگونیست جدا شده ازخاک اطراف غده‌های سیب‌زمینی آلوده جهت کنترل پکتوباکتریوم انجام شد. استدلال بر این است که موفقیت یک عامل بیوکنترلی در کنترل بیمارگر بستگی به اشغال آشیان اکولوژیکی بیمارگر توسط آنتاگونیست، استفاده از همان منابع کربن و نیتروژن یا انطباق و تکثیر در شرایط محیطی یکسان دارد (Völksch and May 2001). بنابراین تصور ما برای پیدا کردن آنتاگونیست این است که آنتاگونیست‌های بالقوه بیشتر در اطراف بافت‌های آلوده به بیمارگر در مقایسه با بافت‌های سالم حضور دارند. بنابراین دراین تحقیق، ابتدا از مزارع مختلف استان

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]

آذربایجان‌شرقی نمونه‌های غده سیب‌زمینی و خاک همراه آن‌ها نمونه‌برداری شد. بیمارگر *Pectobacterium caratovorum* subsp. *caratovorum* از بین غده‌های آلوده به پوسیدگی نرم جداسازی، شناسایی و به‌صورت مولکولی با توالی‌یابی تایید گردید. سپس جدایه‌های باکتری آنتاگونیست از خاک اطراف همان غده‌ها جداسازی و غربال گردید. با آزمایش بر روی اثر آنتی‌بیوز ۲۵۰ جدایه جداسازی شده از خاک اطراف غده‌ها بر روی باکتری بیمارگر، توانستیم جدایه‌های استرپتومایسز 37G و 41E با درصد بازدارندگی ۵۵ و ۵۰ بر روی *P.c.c.* تحت شرایط آزمایشگاهی، به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک موثر بر باکتری *P.c.c* معرفی نماییم.

تاکنون در طی تحقیقات مختلف عوامل بیوکنترلی زیر برای *P.c.c* معرفی شده است:

باکتری‌های *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Leuconostoc* spp. *Lactobacillus buchneri* جدا شده از میوه‌ها و سبزیجات تازه در شرایط آزمایشگاهی نسبت به *P. carotovora* فعالیت آنتاگونیستی نشان دادند که به تولید پراکسید هیدروژن و اسیدی شدن محیط نسبت داده شده است (Trias *et al.* 2008). باکتری‌های *Delftia* spp., *Ochrobacterium* spp., *Rhodococcus* spp. با استفاده از مکانیسم quorum sensing قادر به کنترل باکتری‌های پکتولیتیک شدند (Jafra et al. 2006). باکتری *P. flourescens* strain F113 تولید کننده 2, 4-diacetylphloroglucinol (DAPG) و باکتری *Bacillus subtilis* strain BS 107 به علت فعالیت گسترده آنتی‌بیوتیکی قادر به مهار رشد باکتری بیمارگر بودند (Sharga and lyon ; Cronin *et al.* 1997; 1998).

قبلا مطالعات اندکی از فعالیت آنتاگونیستی *Actinobacteria* گزارش شده است (El Karkouri *et al.* 2010). از آن جمله می‌توان به معرفی *Streptomyces olivaceus* به عنوان عامل بیوکنترل بیمارگرهای خاک‌زاد اشاره کرد. این باکتری به علت دارا بودن ژن‌های کد کننده متابولیت‌های فعال بیولوژیکی پتانسیل خوبی برای کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای خاک‌زاد محسوب می‌شود (Shahidi and Aghighi 2005).

در تحقیقی دیگر اثر آنتاگونیستی باکتری *Streptomyces olivaceus* را بر علیه قارچ *Rhizoctonia solani* AG-3 بررسی کردند و مشاهده کردند اثر مهاری قابل توجهی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای از خود نشان می‌دهد (Sabaratnam and Traquair 2002).

در تحقیقی روی بیماری کپک سفید لوبیا ناشی از قارچ *Sclerotinia sclerotium* انجام شد، از بین جدایه‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاهان خانواده بقولات، جدایه‌های *Streptomyces* sp. توان بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ را نزدیک به ۶۰ درصد از خود نشان دادند که این نشانگر فعالیت کیتینازی باکتری‌های *Streptomyces* sp. است (Gholami *et al.* 2014). در تحقیقی که توسط Bonjar و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد از بین ۱۷۰ جدایه جداسازی شده از خاک، تنها باکتری *Streptomyces coralus* strain 63 اثر مهارکنندگی قابل توجهی بر علیه *Ralstonia solanacearum* در شرایط آزمایشگاهی از خود نشان داد. در تحقیقی دیگر، *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-70 بر علیه *Streptomyces scabies* عامل اسکب معمولی سیب‌زمینی، پتانسیل بیوکنترلی بالایی از خود نشان داد (Doumbou *et al.* 2001). در آزمایشی دیگر برای مهار *P.c.c.* ، چهار جدایه متعلق به جنس *Streptomyces* معرفی شدند (Baz *et al.* 2012). اکتینومیست‌ها به علت دارا بودن ترکیبات بالقوه در ممانعت یا حذف بیمارگرهای گیاهی متعدد، به‌ویژه قارچ‌ها و باکتری‌های بیمارگر خاک‌زاد شناسایی شده‌اند.

اکتینومیست‌ها، پروکاریوت‌هایی هستند که قدرت تولید متابولیت‌های مختلفی را دارا هستند. استرپتومایسزها از لحاظ اقتصادی مهم هستند زیرا از حدود ۱۰۰۰۰ آنتی‌بیوتیک شناخته شده، ۵۵ درصد آن‌ها توسط این جنس تولید می‌شود. علاوه بر آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی، از دیگر ویژگی‌های شاخص این باکتری‌ها که آن‌ها را جهت کنترل برخی از عوامل خسارت‌زای قارچی مناسب نموده است، ترشح آنزیم کیتیناز می‌باشد؛ به گونه‌ای که این باکتری‌ها تجزیه کننده اصلی کیتین و عامل اصلی برگرداندن این ماده سخت به چرخه طبیعت

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]

هستند (Deshpande 1986). از طرف دیگر این باکتری‌ها توانایی زنده ماندن در شرایط محیطی گوناگون را دارا هستند و این فاکتور در موفقیت آنها به عنوان عوامل بیوکنترل نقش مهمی دارد (McBride and Ensign 1987).

اکتینومیست‌ها علاوه بر مهار پکتوباکتریوم توسط آنتی-بیوز، با مکانیسم‌های دیگری مثل القای مقاومت در گیاه می‌توانند با بیماری مقابله کنند و جمعیت بیمارگر را در زیر سطح مورد نیاز برای توسعه علایم حفظ می‌کنند (Baz *et al.* 2012). از طرف دیگر *Streptomyces* ها دارای توانایی تخریب AHL تولید شده توسط *P.c.c.* هستند از این‌رو این قابلیت را دارند که بتوانند از طریق Quorum sensing بیماری را مهار کنند (Mahmoudi 2011).

از این‌رو استرپتومایسزها گزینه خوبی برای حفاظت محصول سیب‌زمینی در برابر *P.c.c.* هستند زیرا علاوه بر کنترل کنندگی بالای بیمارگر، هیچ گونه بیماری‌زایی توسط این عوامل در انسان و حیوانات گزارش نشده است و می‌توانند در برنامه کنترل تلفیقی این بیماری مفید باشند. در واقع هدف بلند مدت در کنترل پوسیدگی نرم باکتریایی بررسی و انتخاب جدایه‌های موثر در کنترل بیماری و ادغام آن‌ها با استراتژی‌های دیگر از جمله ارقام مقاوم، بذور سالم، شیوه‌های زراعی، از جمله خاک‌ورزی و تناوب زراعی برای کنترل بیماری است.

منابع

Algeblawi A, Adam F (2013) Biological control of *Erwinia carotovora* subsp. carotovora by *Pseudomonas*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus subtillis*. International Journal of Chemical, Environmental and Biological 1: 2320-4087.

Ardakani SS, Heydari A, Khorasani NA, Arjmandi R, Ehteshami M (2009) Prepathogen of new biofungicides using antagonistics bacteria and mineral compounds for controlling cotton seedlings damping-off disease **.** Journal of Plant Protection Reaearch 49: 1-8.

Baz M, Lahbabi D, Samri S, Val F, Hamelin G, Madore I, BouarabK, Beaulieu C (2012) Control of potato soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum* by Moroccan actinobacteria isolates. World J Microbiol Biotechnol. 28:303–311.

Bonjar SGH, Zamanian S, Aghighi S, Farrokhi PR, Mahdavi MJ, Saadoun I (2006) Antibacterial activity of Iranian *S. coralus* strain 63 against *R. solanacearum*. J Biol Sci. 6:127–129.

Chet I, Inbar J, Hadar I (1997) Fungal antagonists and mycoparasites. Environmental and microbial relationships Springer-Verlag, Berlin, Germany. 165-184.

Cladera-Olivera F, Caron GR, Brandelli A (2004) Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. Lett Appl Microbiol. 38: 251–256.

Cronin D, Moenne-Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowlling DN, O'Gara F (1997) Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. FEMS Microbiology Ecology. 23: 95–106.

Czajkowski R, Grabe G, Van Der Wolf JM (2009) Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in tubers of naturally infected seed potatoes. European Journal of Plant Pathology. 125: 263-75.

Darrasse A, Priou S, Kotoujansky A, Bertheau Y (1994) PCR and restriction fragment length polymorphism of a pel gene as a tool to identify Erwinia carotovora in relation to potato diseases. Appl Environ Microbiol, 60(5):1437-1443.

Deshpande MV (1986) Enzymatic degradation of chitin and biological application J. Sci. Ind. Res. 45: 273-281.

Doumbou CL, Salove MKH, Crawford DL, Beaulieu C (2001) Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. Phytoprotection 82:85–102.

El Karkouri A, El Hassani FZ, El Mzibri M, Benlemlih M, El Hassouni M (2010) Isolation and identification of an actinomycete strain with a biocontrol effect on the phytopathogenic *Erwinia chrysanthemi* 3937VIII responsible for soft rot disease. Ann Microbiol. 60: 263-268.

Epton HS, Walker NM, Sigee DC (1990) Bdellovibrio: a potential control agent for soft rot and blackleg of potato. In: Klement Z, ed. 7th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria, Budapest, Hungary, June, 207–212.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]

FAO Statistical Yearbooks (2013). Available on: http://faostat.fao.org

Gholami M, Khakvar R, Niknam G (2014) Use of gram positive endophyte bacteria in biocontrol of bean white mold disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Agriculture Scientific Journal 37(3):1-12. In Persian.

Howell CR, Beier RC, Stipanovic RD (1988) Production of ammonia by Enterobacter cloacae and its possible role in the control of *Pythium* preemergence damping off by the bacterium. Phytopathology 78:1075-1078**.**

Hu X, Fang Q, Li S, Wu J, Chen J (2009) Isolation and characterization of endophytic and rhizosphere bacterial antagonists of soft rot pathogen from *Pinellia ternata*. Federation of european microbiological societies. FEMS Microbiol Lett. 295:10-6.

Jafra S, Przysowa J, Czajkowski R, Michta A, Garbeva P, van der Wolf JM (2006) Detection and characterization of *N*-acyl homoserine lactone-degrading bacteria from the potato rhizosphere. Canadian Journal of Microbiology 52: 1006-1015.

Kloepper JW (1983) Effect of seed piece inoculation with growth promoting rhizobacteria on population of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* on potato roots and in daughter tubers. Phytopathology 73: 217-219.

Krzyzanowska DM, Potrykus M, GolanowskaM, Polonis K, Gwizdek-Wisniewska A (2012) Rhizosphere bacteria as potential biocontrol agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. strains. Plant Pathology 94(2): 367-378.

Li X, DeBoer SH (1995) Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Phytopathology 85:837-842.

Liu DQ, Anderson NA, Kinkel LL (1996) Selection and characterization of strains of *Streptomyces* suppressive to the potato scab pathogen. Can J Microbiol. 42:487–502.

Mahmoudi E, Tabatabaei BE, Venturi V (2011) Virulence attenuation of *Pectobacterium carotovurum* using N-Acyl-homoserine Lactone degrading bacteria isolated from potato rhizosphere. Plant Pathology. 27(3): 242-248.

McBride MJ, Ensign JC (1987) Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. J Bacteriol. 169(11):4995–5001.

Nassar A, Darrasse A, Lemattre M, Kotoujansky A, Dervin C, Vedel R, Bertheau Y (1996) Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isozyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of *pel* genes. Appl. Environ. Microbiol. 62:2228-2235.

Nguyen MT, Ranamukhaarachchi SL (2010) Soil-Borne Antagonists for Biological Control of Bacterial Wilt Disease Caused by *Ralstonia solanacearum* in Tomato and Pepper. Journal of Plant Pathology, 92:395-406.

Rahman MM, Ali ME, Khan AA, Akanda AM, Kamal Uddin MD, Hashim U, Abd Hamid SB (2012) Isolation, characterization and identification of biological control agent for potato soft rot in Bangladesh. The Scientific World. 42: 6-12.

Sabaratnam S, Traquair JA (2002) Formulation of a Streptomyces biocontrol agent for the suppression of Rhizoctonia damping-off in tomato transplants. Biol. Cont. 23: 245-253.

Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd. Ed. APS Press, St. Paul, MN. USA.

Shahidi GH, Aghighi S (2005) Chitinolytic and microsclerostatic activity of Iranian strains of *Streptomyces plicatus* and *Frankia* sp. on Olive isolate of *Verticillium dahliae*. Biotechnology 4:108-113.

Sharga BM, Lyon GD (1998) *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. Canadian Journal of Microbiology 44: 777-783.

Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J Syst Bacteriol. 16:313–340.

Stevenson WR, Loria R, Franc GD, Weingartner DP (2001) Compendium of Potato Diseases. APS net. 2: 144-146.

Sturz AV, Christie BR, Matheson BG, Arsenault WJ, Buchanan NA (1999) Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. Plant Pathol. 48: 360–369.

Trias R, Bañeras L, Montesinos E, and Badosa E (2008) Lactic Acid Bacteria from Fresh Fruit and Vegetables as Biocontrol Agents of Phytopathogenic Bacteria and Fungi. Int Microbiol. 11: 231-236.

Völksch B, May R (2001) Biological control of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* by epiphytic bacteria under field conditions. Microb. Ecol. 41: 132–139.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]

Identification of some Biocontrol agents on Potato Soft Rot Bacterium

Parinaz Sheibani[1], Reza Khakvar [2], Akbar Shirzad[*1]

1. Plant Protection Dept. Agriculture Faculty, Azarbijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.
2. Plant Protection Dept. Agriculture Faculty, Tabriz University, Tabriz, Iran.

* **Corresponding Author**: ashirzad98@yahoo.com

Abstract

One of the most important factors causing damage to potato is the soil-borne soft rot bacteria which have a wide host range and produce pectinase enzyme causing soft rot in potato tubers. Use of antagonistic bacteria is important as an alternative to chemical in control of pathogens. In this study, 30 samples of potato tubers suspected to be infected with soft rot bacteria along with surrounding soil samples were collected from potato farms in East Azarbaijan province. Then the soft rot bacteria were isolated from potato tuber samples. Pathogenic bacterial isolates were identified as *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* using biochemical and molecular methods. The antagonistic bacteria were isolated from soil samples around the tubers then screening test was performed on pathogen bacterium under laboratory conditions. Seven of 250 antagonists isolated from soil, formed inhibition zone on the pathogen. Two of them, 37G and 41E, with more than 50% inhibition on pathogen growth, show the most effective antibiosis and other three isolates 37B, 36A and 34B showed inhibition of nearly 50% but 11A isolate with 40% inhibition was excluded because of pathogenic activity on potato tubers. The antagonistic bacteria were identified as *Streptomyces* sp using biochemical, morphological and molecular methods. *Streptomyces* are good potential for control of plant pathogenic bacteria due to different biocontrol mechanisms, including the induction of host plant resistance and the ability to destroy the AHL.

Key words: Potato, Soft rot, *Pectobacterium*, Biocontrol, *Streptomyces*

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-18]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.1.7.5]