مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۱، بهار و تابستان ۹۹
صفحه ۳۹-۲۸

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 1

شناسایی عامل بیماری پژمردگی گوجه‌فرنگی و کنترل آن با استفاده از باکتری‌های آنتاگونیست در استان آذربایجان شرقی

Detection and Identification of Tomato wilt disease in East Azerbaijan Province and Controlling It Using Antagonist Bacteria

احمد اشرفی[۱]، مهرداد صالح زاده*[۲]، نبی خضری نژاد[۳]

Ashrafi Ahmad[1], Salehzadeh Mehrdad*[2], Khezrinezhad Nabi[3]

۱- کارشناس ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد واحد ملکان
۲- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، ایران
۳- گروه بیماری شناسی دانشگاه آزاد، واحد ملکان

1. MSc. of Plant Pathology, Department, Faculty of Agriculture, Malekan Branch, Islamic Azad University
2. PhD Student of Plant Pathology, Department, Faculty of Agriculture, University of Shiraz, Iran
3. Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Malekan Branch, Islamic Azad University

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Mehrdadsalehzadeh@gmail.com

(تاریخ دریافت: ۹۹/۲/۲۳ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۵/۲۰)

چکیده

یکی از عوامل محدود کننده تولید گوجه‌فرنگی در دنیا بیماری پژمردگی باکتریایی با عامل *Ralstonia solanacearum* است. با توجه به اهمیت این بیماری در گوجه‌فرنگی، استفاده از عوامل کنترل زیستی می‌تواند یک راهکار مؤثر در کاهش خسارت این بیماری باشد. در این پژوهش نمونه‌های گیاهی مشکوک به بیماری پژمردگی باکتریایی گوجه‌فرنگی، در سال ۱۳۹٤ از مناطق مختلف استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری شد. جداسازی باکتری از طریق شناسایی آن با آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی صورت پذیرفت. در بررسی‌های ژنوتیپی با جفت آغازگرهای ناحیه 16sRNA به نام PS96I و PS96H قطعه‌ای به اندازه‌ی ۱٤۸ جفت باز همچنین با جفت آغازگرهای F 759 و F 760 قطعه‌ای به اندازه ۲۸۰ جفت باز با PCR تکثیر شد. بر اساس مجموع بررسی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌های مورد بررسی از بیماری پژمردگی گوجه‌فرنگی به عنوان بیوار II از *R. solanacearum* شناسایی شدند. به منظور کنترل زیستی باکتری مذکور تعداد ۱۵ جدایه باکتری از خاک ناحیه ریزوسفر بوته‌های سالم، با استفاده از آزمون رقیق‌سازی جداسازی شد. اثر آنتاگونیستی این جدایه‌ها بر اساس توانایی آن‌ها در جلوگیری از رشد پاتوژن با استفاده از آزمون تشکیل هاله بازدارنده مورد بررسی قرار گرفت. از بین جدایه‌های مورد بررسی، سه جدایه به عنوان نماینده انتخاب و ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی آن‌ها تعیین گردید. بر این اساس جدایه ka1 به‌عنوان *Bacillus subtilis*، جدایه ka2 و Ka3 به‌عنوان *Pseudomonas fluorescens* شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی

باکتریهای آنتاگونیست،
پژمردگی گوجه‌فرنگی،
ریزوسفر،
کنترل زیستی،
گوجه فرنگی

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]

مقدمه

گوجه‌فرنگی(*Solanum lycopersicum*) به‌طور وسیع در سراسر جهان کشت می‌شود. اما کشت آن به دلیل بیماری‌های فراوان قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتدی در برخی موارد با محدودیت روبه‌رو شده است (Jones *et al.*,1997). در سال ۲۰۰۰ انجمن بیماری شناسی ژاپن ٤١ قارچ، ١٠ باکتری، ١٥ ویروس، ١٤ نماتد و یک فیتوپلاسما را به عنوان بیمارگرهای گوجه‌فرنگی گزارش کردند که بیشتر آن‌ها گسترش جهانی دارند (Arie *et al.*, 2007). پژمردگی باکتریایی گوجه‌فرنگی(*Ralstonia solanacearum*) یک بیماری مهم است که روی برخی گیاهان در نواحی مختلف جهان خسارت ایجاد می‌کند. نژاد ١ باکتری دارای بیشترین دامنه میزبانی است. به دلیل عدم کارایی و امکان استفاده از سموم شیمیایی در کنترل بیماری، استفاده از ارقام مقاوم و متحمل یکی از روش‌های مهم کاهش خسارت و پیشگیری از این بیماری است (Zimnoch-Guzowska., 2005). باکتری به دو شاخه با منشا جغرافیایی متفاوت تقسیم می‌شود. شاخه‌ی I (شامل بیوار سه، چهار و پنج) که منشا آسیایی دارند و شاخه‌ی II (شامل بیوار یک، 2A و 2T) منشا گرفته از آمریکای جنوبی است. بیشتر ارقامی که مقاومت نسبی نشان می‌دهند به نظر می‌رسد که نسبت به بیماری متحمل باشند. بخاردهی خاک یا استفاده از آنتی-بیوتیک‌ها از نظر زیست‌محیطی مخرب، گران و اثر زیادی روی پژمردگی باکتریایی ندارد (Takahashi & Murakoshi, 1997 ;Saddler, 2005). آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند استرپتومایسین، آمپی-سیلین، تتراسیکلین و پنی‌سیلین اثر اندکی روی بیماری دارند (Farag *et al*., 2001).

کنترل بیولوژیک در بیماری‌شناسی گیاهی به استفاده هدفمند از موجودات زنده اشاره دارد که باعث سرکوب یا کاهش فعالیت یک یا چند پاتوژن گیاهی، همچنین کاهش تولیدمثل آنها می‌شود (Denny, 2006). کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی یک روش مناسب برای مدیریت بیماری‌های گیاهی است و هدف از این پژوهش جداسازی، شناسایی جدایه‌های عامل پژمردگی گوجه‌فرنگی و همچنین شناسایی و بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست جداشده از رایزوسفر این گیاه در منطقه آذربایجان شرقی است.

باکتری (*R. Solanacearum*) یک بیمارگر خاکزاد، گرم منفی، میله‌ای شکل (به ابعاد ۲/۵-۱/۵×۰/۷-۰/۵ میکرومتر)، بدون اسپور، فاقد کپسول، هوازی اجباری، دارای یک تاژک قطبی و دارای گرانول Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) که به عنوان ذخیره سلولی عمل می‌کند (Denny, 2006). تولید پلی-ساکاریدهای باکتریایی باعث کاهش جریان در شیره گیاهی و در نهایت منجر به پژمردگی می‌شود. باکتری *R. solanacearum* آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی(Cell wall degradationenzymes) تولید می‌کند که توسط سیستم ترشحی تیپ II (Type II secration system (T2SS)) ترشح می‌شود (Huang *et al*., 2006). این آنزیم‌ها شامل بتا-١ و ٤ اندوگلوکوناز (β-1,4endogluconase (Eg1))، اندوگالاکتوروناز (PehA)، اگزوپلی‌گالاکتوروناز ((PehBandPehC Exopolygalactoronase)، بتا ١ و ٤ سلوبیوهیدرولاز ((CbhA Celobiohyrolase) و پکتین متیل استراز ((Pme Pectin methyl esteras) می‌باشند(Huang *et al*., 2006). در یک پژوهش در راستای مدیریت پژمردگی باکتریایی در گوجه‌فرنگی توسط ریزوباکترها، باکتری آنتاگونیست *Bacillus subtilis* در شرایط آزمایشگاهی توانست تا ٥٠ درصد از بیماری پژمردگی باکتریایی گوجه‌فرنگی را کاهش دهد (Vanitha *et al*., 2009). کاربرد کودهای آلی به همراه ریزوباکترها سبب افزایش تنوع عوامل کنترل زیستی در خاک شده و توانایی آن‌ها در غلبه بر عامل پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی افزایش می‌دهد (Alyie *et al.*, 2008).

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مزارع گوجه‌فرنگی: در بهار سال ١٣٩٤ طی بازدیدهای به عمل آمده از برخی مزارع گوجه‌فرنگی در استان آذربایجان شرقی (مراغه، بناب، ملکان و عجب‌شیر)، نمونه‌های گیاهی مشکوک به آلودگی با پژمردگی باکتریایی جمع‌آوری شد. در هر منطقه از مزارع مختلف نمونه‌برداری از بوته‌های مشکوک

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]

و آلوده (شامل زردی، پژمردگی و کاهش رشد) انجام شد. بخش‌هایی از هر مزرعه به صورت تصادفی انتخاب شده و از نظر وجود گیاهان آلوده مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان مشکوک به بیماری (شامل بوته‌های دارای علائم پژمردگی، زردی و کاهش رشد) انتخاب، جمع‌آوری و درون پاکت‌های مجزای کاغذی با ذکر محل و تاریخ جمع‌آوری به آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد ملکان منتقل و تا زمان کشت درون یخچال نگهداری شدند. برای اطمینان از وجود باکتری در گیاه، ساقه‌های بریده شده در آب قرار داده شدند. پس از گذشت ۱۵ دقیقه پلی‌ساکارید خارج سلولی باکتری به رنگ سفید شیری از آوندهای چوبی به بیرون تراوش کرد که با چشم غیرمسلح قابل مشاهده بود. ساقه‌ی بوته‌های آلوده با آب شسته شده و پس از خشک شدن به اتاق کشت و زیر هود منتقل شدند. سطح ساقه‌ها با اتانول ۷۰٪ ضدعفونی و با تیغ استریل (در کنار شعله) به قطعات کوچکی تقسیم شدند. قطعات بریده شده ساقه درون تشتک پتری حاوی آب مقطر استریل قرار داده شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه لوپ استریل را درون آب مقطر زده و به روش مخطط کردن داخل تشتک پتری کشت انجام شد. تشتکهای پتری درون انکوباتور و در دمای ۳۰-۲۸ درجه سلسیوس نگهداری و پس از ۷۲ ساعت از تک کلون‌های رشد یافته انتخاب و در محیط کشت جدید مایه‌زنی شد. عمل مخطط کردن چندین بار صورت پذیرفت. در نهایت تک کلونها به محیط کشت جدید انتقال داده شدند. برای کشت نمونه‌ها از محیط کشت افتراقی Potato Dextrose Agar (PDA) و Nutrient Agar (NA) حاوی فنیل تترازولیوم کلراید (Tetrazolium Choloride) با فرمول شیمیایی C19H15CIN4 استفاده گردید (John Thundyil *et al.*, 2013). بعد از گذشت چند روز در محیط TTC کلونی‌های مربوط به استرین‌های بیماری‌زا به صورت بزرگ، برآمده، لعاب‌دار، سفید و دارای مرکزی به رنگ قرمز روشن ایجاد شدند. کلونی‌های استرین‌های غیر بیماری‌زا مدور، قرمز تیره و اغلب با حاشیه آبی‌رنگ بودند. از هر پتری چهار کلونی که شبیه به کلنی به باکتری مورد نظر ما بود و به اندازه کافی از سایر کلونی‌ها فاصله داشت، انتخاب و به پتری‌های جدید منتقل گردید. جهت اطمینان از خالص‌سازی، باکتری‌ها دو بار به صورت مخطط کشت داده شدند. پس از گذشت ۲٤ ساعت از هر پتری یک کلونی برداشته شده و در محیط جدید حاوی PDA کشت شد. در این مرحله باکتری خالص شده و برای انجام بررسی‌های بعدی نگهداری شدند. برای نگهداری باکتری‌ها، سوسپانسیون غلیظی از آنها را در میکروتیوپ‌های ۱/۵ سی‌سی حاوی آب مقطر استریل تهیه کرده و به دمای ٤ درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند. آزمون بیماری‌زایی باکتری مطابق روش وینستد و کلمن (Winstead *et al.*, 1998) انجام شد. ٤٠-۳۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون باکتری با (OD=۰/۱) در طول‌موج ٦۰۰ نانومتر با غلظت 10^{7}-10^{6} سلول زنده در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل تهیه و به ساقه گیاهان گوجه‌فرنگی در مرحله ی ۸-۱۲ برگی مایه‌زنی شد. همچنین به گیاه شاهد فقط آب مقطر استریل تزریق شد. بوته‌های گوجه-فرنگی در شرایط گلخانه‌ای و میانگین دمای ۲٤ درجه‌ی سانتی-گراد نگهداری شدند. پس از گذشت یک هفته بوته‌ها از لحاظ وجود علائم پژمردگی مورد بررسی قرار گرفتند. مهم‌ترین و معمول‌ترین روش مورد استفاده برای تشخیص و شناسایی این باکتری جداسازی آن روی محیط TTC است. از این محیط کشت برای بررسی خصوصیات ظاهری کلنی و مقایسه کلونی‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا استفاده شد. واکنش فوق حساسیت در شمعدانی طبق روش (Lopper, 2004)، با تزریق سوسپانسیون باکتری با ۰/۱= OD و طول‌موج ٦۰۰ نانومتر به برگ‌های شمعدانی صورت پذیرفت. واکنش طی ۷۲-۲٤ ساعت مورد ارزیابی قرار گرفت. واکنش گرم به روش رنگ‌آمیزی و همچنین حلالیت در KOH سه درصد به روش شیپر و همکاران (Shipper *et al.*, 1999) انجام شد. آزمون اکسیداز با استفاده از کاغذهای صافی آغشته به محلول ۱٪ تترا متیل پارا فنیلین دی‌آمین دی - هیدرو کلراید انجام شد. تست کاتالاز با ریختن یک میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۳٪ روی کلنی باکتری با استفاده از روش شاد و همکاران انجام و نتایج بر اساس ایجاد یا عدم ایجاد حباب ارزیابی شد (Schaad *et al.*, 2001). آزمون استفاده از منابع کربنی با استفاده از محیط پایه آیر (Ayer) بررسی شد. غلظت نهایی منابع کربن و انرژی ۰/۲٪ بود و به روش تندالیزاسیون (Tendalization) استریل شدند. نتایج بسته به مورد تا ۲۰ الی ۳۰ روز پس از آغاز واکنش ارزیابی گردید. برای شناسایی ژنوتیپی، واکنش زنجیره‌ای

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]

پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ناحیه‌ی 16s rRNA شرکت سیناژن استفاده شد.

توالی آغازگرهای اختصاصی استفاده شده (5'-R: PS96H TCACCGAGCCGAATCCGCGTCCATCAC-3' و R: PS96H (5'TCACCGAGCCGAATCCGCGTCCATCAC-3') مربوط به ناحیه 16srRNA بودند (Heward *et al.* 1998). هرتانگ و همکاران(Hertung *et al.*, 1998) نشان دادند که آغازگرهای PS96H و PS96 بسیار اختصاصی بوده و توانستند با استفاده از این آغازگرها تمام استرینهای *R. Solanacearum* مربوط به نواحی جغرافیایی مختلف را از غده‌ی سیب‌زمینی شناسایی کنند. برای اطمینان بیشتر از توالی‌های(5'-F:760 و5'-R: 759 GTCGCCGTCAACTCACTTTCC-3') GTCGCCGTCAGCAATGCGGAATCG-3') مربوط به ناحیه‌ی 16srRNA استفاده شد (Opiana *et al.* 1997). مراحل PCR برای ژن 16srRNA برای هر دو جفت آغازگر شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، واسرشته سازی در دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ٤٥ ثانیه و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه و در ۳۵ سیکل انجام شد.

جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست: جهت جداسازی باکتری‌های آنتاگونیست، خاک فرا ریشه گیاهان سالم از مزارع مختلف گوجه-فرنگی کاری استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری و به صورت جداگانه درون پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه انتقال داده شد. یک گرم از خاک چسبیده به ریشه در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و با ورتکس به هم زده شد تا به صورت سوسپانسیون درآید. غلظت‌های مختلف به روش سری رقت تهیه شد. به این ترتیب که توسط پیپت استریل یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به یک لوله آزمایش دیگر محتوی ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل انتقال و این مراحل تا بدست آمدن رقت 10^{-3} ادامه یافت. با استفاده از پیپت پاستور یک قطره از سوسپانسیون‌های با رقت‌های 10^{-3} روی محیط کشت به‌طور جداگانه ریخته و با لوپ استریل به روش مخطط کردن کشت داده شد. پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت نگه‌داری شدند. تک کلون‌های رشد یافته بر اساس تفاوت در رنگ، شکل، اندازه و حاشیه کلونی‌ها انتخاب و روی محیط NAS (نوترینت- آگار- سوکروز) به روش مخطط کردن خالص‌سازی شدند. در مجموع ۲۰ استرین باکتری حاصل و اثر آنتاگونیستی باکتری‌های مذکور جهت ممانعت از رشد باکتری بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی به روش کشت سه نقطه‌ای و تشکیل هاله بازدارنده مورد بررسی قرار گرفت. استرین‌های باکتری آنتاگونیست به صورت سه نقطه در پتری حاوی محیط کشت NAS کشت و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از گذشت ٤٨ ساعت با ریختن چند قطره کلروفرم روی درب پتری‌ها و گذاشتن آنها به صورت وارونه (به مدت ۲۰ دقیقه) باکتری‌های مذکور از بین برده شدند. سپس درب پتری‌ها در زیر هود استریل نیمه باز گذاشته شد تا کلروفرم باقی‌مانده تبخیر شود. آنگاه سوسپانسیون باکتری بیمارگر با غلظت 10^{9} CFU و با ۰/۱ =OD تهیه شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون به صورت یکنواخت در پتری ریخته شد. پتری‌ها به درون انکوباتور منتقل و به مدت دو تا سه روز درون انکوباتور نگهداری شدند. در ادامه اثر استرین‌های مذکور با اندازه‌گیری هاله بازدارنده اطراف باکتری‌های آنتاگونیست مورد بررسی قرار گرفت. استرین‌هایی که اثر آنتاگونیستی روی باکتری بیمارگر داشتند انتخاب و آزمون‌های فنوتیپی بر اساس آزمون‌های رنگ‌آمیزی گرم، آزمون فوق حساسیت در شمعدانی(Shaad *et al.*, 2001)، تولید رنگ دانه فلورسنت روی محیط کینگ بی آگار و آزمون حلالیت در پتاس یا هیدروکسید پتاسیم ۳ درصد با روش شاد و همکاران (Schaad *et al.*, 2001) انجام شد. آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی ((Oxidative fermentation (O/F) در حضور گلوکز و به روش (Hugh and Leifsen *et al.*, 2001) انجام شد. همچنین آزمون‌های آرژنین دی هیدرولاز (Tornely, 1997)، اکسیداز و لوان (Schaad *et al.*, 2001) نیز در ادامه انجام شد. استفاده از کربوهیدرات‌ها با استفاده از محیط پایه و بر اساس روش شاد انجام شد (Schaad *et al.*, 2001). برای آزمون فوق حساسیت سوسپانسیون باکتری با غلظت تقریبی 10^{9} CFU در میلی‌لیتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ٦۰۰ نانومتر تهیه و توسط سرنگ بدون سوزن به پشت برگ‌های جوان

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]

شمعدانی تزریق شد. واکنش برگ‌های تزریق شده بعد از ۲۴-۱۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. جداسازی DNA از سلول‌های باکتریایی به روش لایز قلیایی انجام شد (Ausuble *et al*., 1995). جدایه‌ها پس از دو روز رشد در محیط NA در دمای ۲۸°C– ۲۵، در آب مقطر استریل به صورت سوسپانسیون درآمدند. OD سوسپانسیون‌ها در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۲ واحد تنظیم و به آن‌ها ۰/۱ حجم، هیدروکسید پتاسیم (KOH) ۱۰ درصد اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲ تا ۳ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند. شفاف شدن سوسپانسیون به عنوان لایز شدن سلول‌های باکتریایی تلقی گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۲ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ و در ادامه لایه رویی از لوله‌ها برداشته و در دمای ۲۰– درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. از این نمونه‌ها به عنوان DNA الگو در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی مراز استفاده شد. وجود یک باند با وزن مولکولی بالا و بدون کشیدگی در طول ژل به عنوان معیاری در مناسب بودن کیفیت DNA استخراج شده تلقی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): ابتدا ۲ میکرولیتر DNA از هر نمونه به داخل میکروتیوب‌های جداگانه ریخته و سپس ۲۳ میکرو لیتر از محلول پایه به هر میکرو تیوب حاوی DNA اضافه گردید. برای انجام PCR از آغازگر عمومی F27 (5-′TGGAAACAGRTGCTAATACCG-3′) و (5′-R1492 GYCCATTGTGGAAGATTCCC-3′) شرکت سیناژن جهت تکثیر ژن 16srRNA استفاده شد. تکثیر با دستگاه ترموسایکلر(مدل MY PCR ساخت کره‌ی جنوبی) انجام پذیرفت. برنامه زمانی و دمایی مراحل PCR برای سنتز رشته شامل واسرشته‌سازی اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۳ درجه‌ی سانتی-گراد، ۳۵ چرخه شامل، واسرشته‌سازی در دمای ۹۳ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دمای ۵۶ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتی-گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. توالی‌های نوکلئوتیدی به‌دست‌آمده از ژن 16SrRNA جدایه‌ها پس از هم ردیف سازی چندگانه با برنامه ClustalW با سایر توالی‌ها در گونه‌های مختلف باکتری‌های همزیست موجود در GenBank مقایسه شدند (Thompson *et al*. 1994). درخت فیلوژنی جدایه‌ها، با روش اتصال همسایه‌ای (Neighbour-joining) و با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 و با bootstrap ۱۰۰۰ تکرار ترسیم گردید.

بررسی تولید متابولیت‌های میکروبی مؤثر در خاصیت آنتاگونیستی آزمون تولید پروتئاز: با توجه به نقش پروتئازها به عنوان یکی از سازوکارهای مهم در کنترل بیولوژیکی، این آزمون بر اساس روش من هوفر و همکاران (Maurhofer.*et al*. 1998) بررسی شد. ابتدا محیط کشت شیر بدون چربی و آگار (SMA) تهیه و پتری دیش‌های حاوی محیط کشت (SMA) به صورت لکه‌ای توسط استرین‌های باکتریایی تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تشکیل یک هاله بی‌رنگ در اطراف کلنی‌های باکتری در طول این مدت نشانه فعالیت پروتئازی در استرین‌ها است.

آزمون تولید سیانید هیدروژن: برای بررسی تولید سیانید هیدروژن ابتدا سوسپانسیون هر یک از باکتری‌ها (مربوط به کشت‌های ۲۴–۴۸ ساعته) به طور جداگانه در یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه و میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از هر استرین روی محیط کشت NA پخش شد. قطعاتی از کاغذ صافی به ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر در محلول معرف سیانید هیدروژن که شامل ۵ گرم بیکربنات سدیم و ۰/۵ گرم اسید پیکریک در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب غوطه‌ور گردید. قطعات کاغذ صافی آغشته به معرف مذکور درون درب تشتک پتری حاوی کشت باکتری آنتاگونیست قرار داده شد و به صورت وارونه در ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. تغییر رنگ کاغذ صافی از زرد به قرمز پس از گذشت ۳ تا ۱۸ ساعت نشانه تولید سیانید هیدروژن است (Hayward, 2000).

آزمون تولید سیدروفور: در این آزمون استرین‌های باکتریایی روی محیط کینگ بی آگار (حاوی غلظت‌های ۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول کلرید آهن III) کشت شد. کشت‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. تولید رنگ دانه سبز – آبی فلورسنت بعد از گذشت این مدت حاکی از تولید سیدروفور توسط استرین‌های مورد نظر بود. از کشت نمونه‌های دارای علائم پژمردگی و زردی تعداد ۲۰ جدایه با کلنی‌های سفید

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]

رنگ، لعاب‌دار و محدب روی محیط نوترینت آگار رشد کرد که از بین آن‌ها ۱۰ جدایه (که روی محیط TTC به رنگ سفید با مرکز صورتی بودند) انتخاب و ویژگی‌های فنوتیپی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نام جدایه‌ها و مناطق جداسازی آن‌ها در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- نام محل جداسازی هریک از جدایه‌های *Ralstonia solanacearum* از استان آذربایجان شرقی.

Table 2. Name of the site and year of isolation of each *Ralstonia solanacearum* strain in East Azerbaijan Province.

نام جدایه‌ها	محل جمع‌آوری
Aa1, Aa2,Aa3.Aa4.Aa5,Aa6	مراغه
Aa7, Aa8,Aa9,Aa10,Aa11	بناب
Aa12, Aa13,Aa14,Aa15,Aa16	ملکان
Aa17, Aa18,Aa19,Aa20	عجب‌شیر

نتایج و بحث

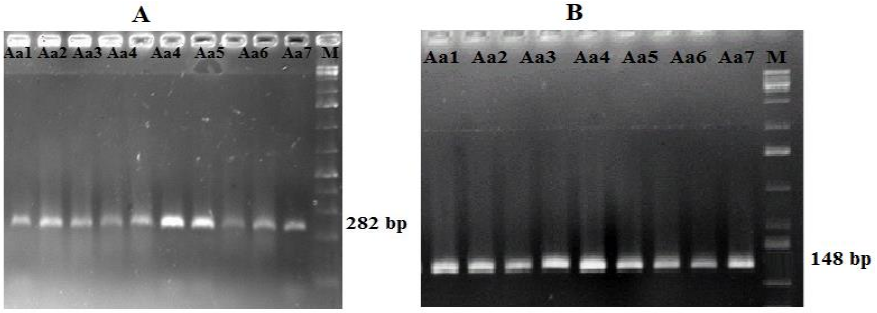
برای شناسایی مقدماتی، باکتری‌های جداشده روی گیاهان گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شدند و پس از گذشت حدود سه هفته علائم پژمردگی ظاهر شد (شکل۱). همه جدایه‌ها، گرم منفی، کاتالاز و اکسیداز مثبت، متحرک و هوازی بودند. جدایه‌ها از قندهای مالتوز، لاکتوز و سلوبیوز استفاده کردند ولی قادر به مصرف دولسیتول، مانیتول و سوربیتول نبودند. سایر خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها در جدول ۲ آمده است. بر اساس مجموع ویژگی‌های فنوتیپی باکتری‌های عامل بیماری پژمردگی گوجه‌فرنگی به عنوان بیوار ۲ باکتری *R. solanacearum* شناسایی شدند.



شکل ۱- آزمون بیماری‌زایی باکتری روی گیاه گوجه‌فرنگی، الف: گیاه شاهد (مایه‌زنی شده با آب مقطر) ب- علائم پژمردگی روی گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با جدایه‌ی Aa1

Figure 1. Bacterial pathogenicity test on tomato plant: A, control plant (Inoculated with distilled water), B, symptoms of wilting on tomato plant instilled by Aal strain.

برای شناسایی ژنوتیپی جدایه‌های بیماری‌زا، پس از جداسازی DNA، از پرایمرهای اختصاصی ۷۵۹ R ۷۶۰/F و PS96I (5'-TCACCGAGCCACGCGTCCATCAC-3') و PS96I (5'- AAGGTGTCGCATCGAACCCGCC-3') طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد که به ترتیب قطعاتی به طول ۲۸۲ و ۱۴۸ جفت بازی تولید کردند (شکل ۲). این نتایج ژنوتیپی تائید کننده شناسایی روش‌های فنوتیپی جدایه‌ها به‌عنوان باکتری *R. solanacearm* بود.



شکل ۲ - A- قطعه ۲۸۲ بازی تکثیرشده جدایه‌های *R. solanacearum* (Aa1 تا Aa7) با استفاده از آغازگرهای ۷۶۰/۷۵۹ **B** - قطعه ۱۴۸ بازی تکثیرشده جدایه‌های *R. solanacearum* (Aa1 تا Aa7) با استفاده از آغازگرهای PS96H /PS96I، در ژل اگارز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید.

Figure 2. A- Amplified fragment of 282 bp of strains of *R. solanacearum* Aa1 to Aa7 using 759 and 760 primers in agarose 1.5 % gel olored with Ethidium Bromide. **B-** Amplified fragment of 148 bp of strains of *R. solanacearum* Aa1 to Aa7 using PS961 and PS96H primers.

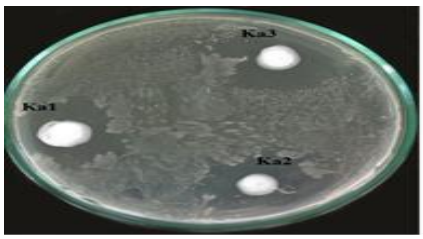
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]

جدول ۲- ویژگی‌های مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های عامل بیماری پژمردگی گوجه‌فرنگی

Table 2. Morphologic, biochemical and physiological properties of pathogenic strains of tomato wilt

Test	Reaction of strains	Test	Reaction of strains
catalase	+	Ramenose	+
oxidase	+	Sucrose	+
Ultrasensitivity on geranium	+	Fructose	+
Growth in 2%NaCl solution	-	Rafinose	+
Producing acid from:		Galactose	+
Maltose	+	Lactose	-
Cellobiose	+	Dolistole	
Mannitol	-	Use of	-
Maltose	+	Beta Alanine	-
Trehalose	+	L-Arginine	-
Glucose	+	L-Lysine	-
Sorbitol	-	Producing fluorescent pigments	+

پس از کشت باکتری‌های فرا ریشه مربوط به بوته‌های سالم گوجه‌فرنگی، تعداد ۱۵ جدایه با کلنی‌های متفاوت از نظر شکل و رنگ جداسازی شد. فعالیت آنتاگونیستی این باکتری‌ها با روش کشت سه نقطه‌ای و بخار کلروفورم همچنین توانایی آن‌ها در تولید آنتی‌بیوتیک و مواد بازدارنده مورد بررسی قرار گرفت. از بین ۱۵ جدایه تعداد سه جدایه علیه *R solanacearum* دارای خاصیت بازدارندگی بودند (شکل ۳). این جدایه‌ها Ka1، Ka2 و Ka3 نام‌گذاری شدند که به ترتیب قطر هاله بازدارندگی توسط آن‌ها ٦/٢٥، ٧/١٤ و ٨/٣ میلی‌متر بودند.



شکل ۳- اثر بازدارندگی باکتری‌های رایزوسفر جداشده از گوجه‌فرنگی علیه *Ralstonia solanacearum*

Figure 3. Preventive effect of Rhizosphere bacteria isolated from tomato against *Ralstonia solanacearum*

جدایه‌های آنتاگونیست بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، فنوتیپی و بیوشیمیایی شناسایی شدند. آزمون‌های انجام‌شده در جدول ۳ آمده است. بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی، مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی، باکتری Ka1 به عنوان جنس *Bacillus* و دو باکتری Ka2 و Ka3 به‌عنوان جنس *Pseudomonas* شناسایی شدند.

جدول ۳- ویژگی‌های مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های آنتاگونیست

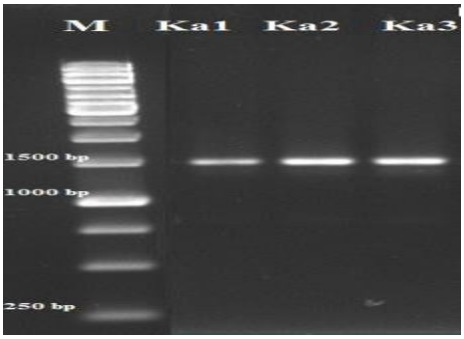
Table 3. Morphological, biochemical and physiological properties of antagonist strains

آزمون	واکنش جدایه ها		
	Ka1	**Ka2**	**Ka3**
واکنش گرم	+	-	-
کاتالاز	+	+	+
اکسیداز	-	+	+
فوق حساسیت در شمعدانی	-	-	-
تولید لوان	–	+	+
آرژنین دهیدرولاز	–	+	+
تولید اسید از			
رامنوز	–	+	+
سوکروز	+	+	+
مالتوز	+	+	+
سلوبیوز	–	+	-
مانیتول	+	+	+
مانوز	+	+	+
ترهالوز	–	+	+
گلوگز	+	+	+
لاکتوز	+	+	-
سوربیتول	–	+	+

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]

پس ازجداسازی DNA و اطمینان از حضور آن با الکتروفورز ژل آگارز، DNA به دست آمده از جدایه‌های آنتاگونیست جهت انجام PCR مورد استفاده قرار گرفت. برای تأیید شناسایی فنوتیپی و همچنین تعیین گونه‌های جدایه‌های آنتاگونیست، واکنش زنجیره-ای پلی‌مراز با استفاده از آغازگرهای عمومی برای ژن 16S rRNA انجام و باندی به اندازه‌ی ۱۵۰۰ جفت باز از استرین Ka1،Ka2 و Ka3 روی ژل آگارز تشکیل شد (شکل٤).



شکل ٤- قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی تکثیرشده از ژن 16 s rRNA در ژل اگارز ۱/۵ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. ka1، ka2 و ka3 : جدایه‌های آنتاگونیست جداشده از ریزوسفر گوجه‌فرنگی. M : نشانگر جرم مولکولی ۱kb

Figure 4. Amplified fragment of 1500 bp of strains from 16srRNA gene on Agarose 1.5% gel colored with Ethidium Bromide Ka1, Ka2 and Ka3 are the isolated strains from rhizosphere of tomato. M is the molecular weight Kb1.

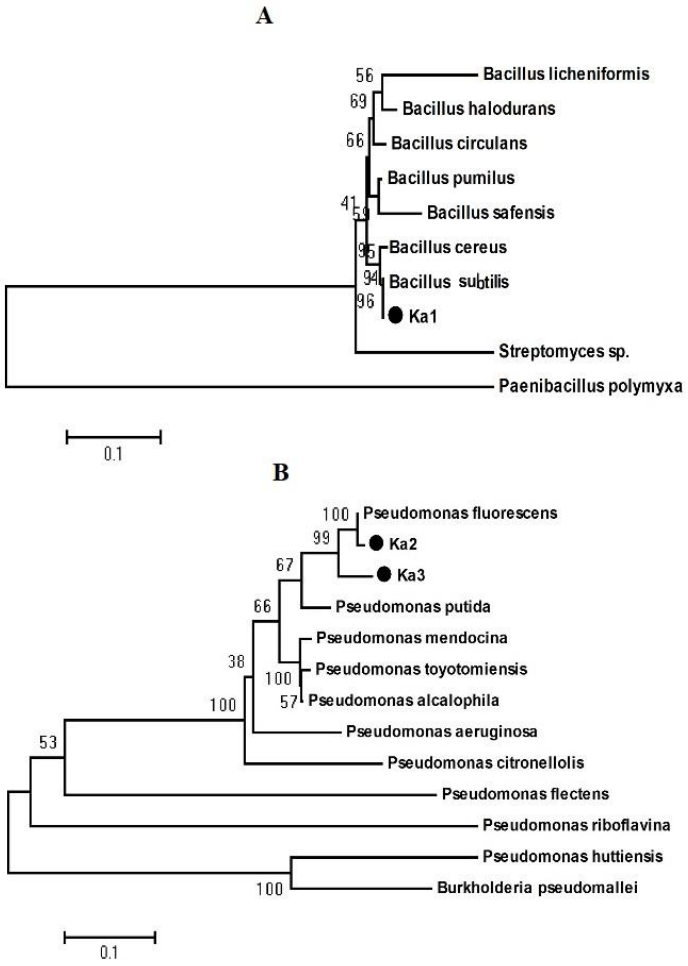
محصول واکنش حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA جدایه‌های آنتاگونیست برای توالی یابی به شرکت بایونر کره‌ی جنوبی ارسال شد. توالی‌های به دست آمده با سایر توالی‌های مربوط به این ناحیه در بانک اطلاعات NCBI به‌وسیله نرم‌افزار بلاست نوکلوتید هم‌تراز شد. جدایه‌ی ka1 با ۹۹/٤ درصد به گونه‌ی *B. subtilis*، جدایه‌های ka2 و ka3 به ترتیب با ۹۹/۵ و ۹۳/۳ به *P. fluorescens* شبیه بودند.

درخت فیلوژنی استرین‌ها با روش اتصال همسایه‌ای (Neighbour-joining) و با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 با boot ۱۰۰۰strap تکرار ترسیم شد. با توجه به دندروگرام حاصله، جدایه ka1 بیشترین شباهت را به *B.subtilis* و جدایه‌های ka2 و ka3 به *P.fluorescens* شباهت داشت و در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۵).

در این تحقیق مشخص شد جدایه‌های به دست آمده از استان، دارای خصوصیات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مشابه هستند. بر اساس مجموع ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی، مشخص شد باکتری عامل پژمردگی گوجه‌فرنگی در استان آذربایجان شرقی به‌عنوان بیوار ۲ از باکتری *R .solanacearum* است. با استفاده از جفت آغازگرهای ۷۶۰-۷۵۹ ، باندی با طول ۲۸۲ جفت باز تشکیل شد (شکل ۷). نتایج حاصل با گزارشات اوپینا و همکاران (Opina *et al.*, 1997) در رابطه با آغازگرهای ۷۶۰-۷۵۹ جهت شناسایی جدایه‌های *R. solanacearum* مطابقت دارد. همچنین نتایج حاصل با گزارش (Ushijima and Fujii., 1998) در رابطه با جفت آغازگرهای ۷۶۰-۷۵۹ و تشکیل باند ۲۸۲ جفت باز در جدایه‌های *R. solanacearum* مربوط به استرالیا، فیلیپین، تایوان، ژاپن و آمریکا مشابه است. در این تحقیق همچنین با آغازگرهای PS96I , PS96H باندی به طول ۱٤۸ جفت باز حاصل شد که با نتایج هارتانگ و همکاران (Hurtung *et al.*, 2000) که از آغازگرهای مذکور برای شناسایی ۲۸ جدایه *R. solanacearum* استفاده کرده بودند مشابه بود.

روش کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید جایگاه بسیار مهمی در برنامه‌های مدیریت زراعی دارد (Whipps, 2001). در این پژوهش ۲۰ جدایه *R. solanacearum* از بوته‌های دارای علائم پژمردگی گوجه‌فرنگی در استان آذربایجان شرقی جداسازی شد. آزمون بیماری‌زایی مشخص نمود که جدایه Aa1 نسبت به سایر جدایه-های این بیمارگر از شدت بیماری‌زایی بیشتری برخوردار است و برای مطالعات بعدی انتخاب شد. در این مطالعه جدایه‌های باکتری‌های آنتاگونیست از خاک اطراف ریشه گوجه‌فرنگی با روش سری رقت جداسازی شدند. آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد محرک رشد و ترکیبات بازدارنده تولید شده توسط این جدایه‌ها باعث کاهش رشد در بیماری عامل پژمردگی باکتریایی گوجه‌فرنگی شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]



شکل ۵- A- درخت فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه ژن 16S rRNA جدایه Ka1 جداشده از ریزوسفر گوجه‌فرنگی با سایر باکتری‌های موجود در NCBI و **B-** درخت فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه ژن 16S rRNA جدایه‌های Ka2 و Ka3 جداشده از ریزوسفر گوجه‌فرنگی با سایر باکتری‌های موجود در NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA5

Figure 5. Phylogenetic tree from the comparison between Ka1 strain isolated from rhizosphere of tomato with other bacteria present in NCBI and **B**- Phylogenetic tree from the comparison between 16SrRNA gene of Ka2 and Ka3 strains isolated from rhizosphere of tomato with other bacteria present in NCBI using MEGA5 program.

جدایه‌های مربوط به جنس *Pseudomonas spp* در مقایسه با سایر جدایه‌ها تأثیر بیشتری در این بازدارندگی در شرایط آزمایشگاه داشتند. در بررسی‌های آزمایشگاهی با روش کشت سه نقطه‌ای و بخار کلروفورم و درنتیجه تشکیل هاله بازدارنده، این جدایه‌ها Ka1 ، Ka2 و Ka3 نام‌گذاری شدند که به ترتیب قطر هاله بازدارندگی توسط آن‌ها ٦/٢٥، ٧/١٤ و ٨/٣ میلی‌متر بودند. فرآیند بازدارندگی از رشد عامل بیماری پژمردگی باکتریایی توسط جدایه‌های آنتاگونیست را در شرایط آزمایشگاه می‌توان به دلیل آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط جدایه‌های جنس باسیلوس از قبیل باسیلومایسین، مایکوباسیلین، باسیلیسین و همچنین آنتی-بیوتیک‌های تولیدشده توسط جدایه‌های جنس سودوموناس از قبیل فنازین ۱- کربوکسامید (pcn)، پیلوتئورین (plt)، پیرول نیترین و سیدروفور دانست (Defago *et al.*, 2000). در مورد ترکیبات موجود در ترشحات مایع جدایه‌های باسیلوس تحقیقات

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]

زیادی صورت گرفته است و مشخص‌شده که جدایه‌های باسیلوس طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها را تولید می‌کنند (Kerbs *et al.*, 1998). آنتی‌بیوتیک‌های تولیدشده توسط باسیلوس‌ها شامل: ایتورین آ، فنجی مایسین، باسیلومایسین، مایکوباسیلین، باسیلیسین و سورفاکتین است (Broadbent *et al.*, 2008). در مطالعات انجام شده توسط (Romanenko and Alimov, 2000)، جدایه‌های *B.subtilis* نسبت به سایر جدایه‌های آنتاگونیست (*Psudomonas putida*، *Psudomonas fluorescens* و *Burkhordia cepacia*) تأثیر بیشتری در کاهش رشد پرگنه قارچ *Bipolaris sorokiniana* داشتند، درحالی که در تحقیق حاضر جدایه‌های *P. fluorescens* نسبت به جنس باسیلوس از قدرت بازدارندگی بیشتری برخوردار بودند. در مورد سودوموناسهای فلورسنت کننده تحقیقات زیادی صورت گرفته است تا مواد تولید شده توسط آنها (که در فرآیند اثر متقابل بین آن‌ها و پاتوژن دخالت دارد) مشخص شود (Run *et al.*, 2005).

در تحقیق حاضر با توجه به متابولیت‌های ثانویه تولیدشده توسط سودوموناس‌های فلورسنت (پروتئاز، سیانید هیدروژن و سیدروفور) می‌توان چنین استنباط کرد که این جدایه‌ها با تولید آنتی‌بیوتیک‌هایی از قبیل فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید، فنازین ۱- کربوکسامید، پیرول نیترین، پیلوتئورین، آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی مانند بتا ٤ و ۱ اندوگلوکوناز و سیدروفور باعث جلوگیری از رشد بیمارگر می‌شوند. شر و همکاران نشان دادند که که *P. putida* با تولید سیدروفور از رشد پرگنه قارچ فوزاریم جلوگیری می‌کند (Scher and Baker, 2004). لوپر نشان داد که سیدروفور تولید شده توسط *P . fluorescens* در کنترل قارچ *Pythium ultimum* نقش دارد (loper, 2004). آزمون تولید سیدروفور برای جدایه‌های Ka2 و Ka3 (*Pseuodomonas fluorescens*) مثبت بود. نتایج آزمون تولید سیدروفور در این پژوهش با نتایج فوق مطابقت دارد و می‌توان استنباط کرد که احتمالا این جدایه‌ها با تولید سیدروفور از رشد عامل بیمارگر جلوگیری کرده‌اند. سیدروفورها مواد کلاته کننده آهن با وزن مولکولی کم هستند که تحت شرایط کمبود آهن تولید می‌شوند و با یون آهن سه ظرفیتی کمپلکس تشکیل می‌دهند (Defago and Hass, 2000). سیدروفور تولید شده توسط سودوموناس‌های فلورسنت از نوع سودوباکتین و پیووورین است که نسبت به سیدروفور سایر میکروارگانیسم‌ها قدرت رقابت آن‌ها بیشتر است. سیدروفور سریعاً ریشه گیاه را احاطه کرده و آهن را از منطقه ریشه غیر قابل دسترس می‌سازد (Fuchs, 2000). نتایج به‌دست‌آمده در این آزمایش با نتایج(Guo *et al.*, 2004) همچنین (Wydra *et al.*, 2005) که گزارشی مشابه از کاهش شدت بیماری توسط *R. solanacearum* و کنترل بیماری گیاهان گوجه‌فرنگی بعد از تیمار با *Bacillus sp* و *Pseuodomonas fluorescens* دارند مطابقت دارد.

منابع

Aliyet N, Fininsa C, and Hiskias Y. 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonist for their potential to bioprotect potato (*Solanum tubersoum*) against bacterial wilt (*R. solanacearum*). *Biological Control* 47: 282-288.

Arie T, Takahashi H, Kodama M, and Teraoka T. 2007. Tomato as a Plant model for Plant Pathogen interaction. *Plant Biotechnology* 24: 135-147.

Ausubel F. Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, and Struhl K. 2002. A Compendium of Method from Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley and Sons*, 900 pp.

Broadbent P, Baker K F. Franks N, and Holland J. 2008. Effect of *Bacillus spp* on inceased growth of seedling In steamed and in non treated soil. *Phytopathology* 67: 34 - 1027.

Defago G, Hass D. 2000. *Pseudomonas* as antagonists of soil-borne plant pathogens, mooda of action and geneticanalysis. *Soil Biochemistry* 6: 249-291.

Denny TP. 2006. Plant pathogenic *Ralstonia* species. In Gnanamanickam, S., S. (Eds). Plant - associated Bacteria, Dordrecht. *Springer*, 573- 644.

Farag M, Prior P. 2001. How complex is the *Ralstonia solanacearum* species complex. In: Allen, C., Prior, P., and Hayward, A. C. (Eds). Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *American Phytopathological Society*, 449-461.

Fuchs R, Schafer M, Geoffroy V, and Meyer JM. 2001. Sidero typing a powerful tool for the characterization of pyoverdines. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1: 31-57.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]

Gue J, Loyd AB. 2004. Survival of potato strain (race 3) of *Pseudomonas solanacearum* in the deeper soil layers. *Australian Journal of Agricultural Research* 30: 489-496.

Hayward AC. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29: 65-87.

Hayward AC. 2000. *Ralstonia solanacearum*. In: Encylopedia of Microbiology (2nd Ed). *Academic Press*, London, 32-42.

Huang Q, Clifford JM, Presting G, Gonzalez ET, Reddy J, Elphineston J, Yao V, Liu L, Farmerie W, Patnaikuni M, Balogh B, Norman D, Alvarez A, Castillo JA., Jones JB, Saddler G, Walunas T, Zhukov A, and Mikhailova N. 2006. Identification of Open Reading Frames Unique to a Select Agent, *Ralstonia solanacearum* Race 3 Biovar 2. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 69-79.

Liu H, Kang Y, Genin S, Schell MA, and Denny TP. 2001. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pillus system. *Microbiology- UK* 147: 3215-3229.

Loper JE. Buyer JS. 2004. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 4, 5-13.

Maurhofer M, Keel C, Schnider U, Voisord C, Hass D, Defsgo G. 1998. Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO it disease suppressive capacity. *Phytopathology* 82: 190-195.

Opina N, Tavaner F, Holloway G, Wang J, Li T, Maghirang R, Fegan M, Hayward A, Krishnapillai V, Hong W, Holloway B, and Timmis J. 1997. Anovel method for development of species and strain specific DNA probs and PCR Primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formly *Pseuodomonas solanacearum*). *Journal of Molecular Biotechnology* 5(1): 19-30.

Romareko V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, and Samiyappan R. 2006. Induction of systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria in crop plants against pests and disease. *Crop Protection* 20: 1-11.

Run LX, Liu CY, Wu GJ, Van Loon LC, Bakker PA. 2005. Supperission of bacterial wilt in Eucalyptus urophylla by fluorescence *Pseudomonas* spp In China. *Biological Control* 32:111-120.

Saddler GS. 2005. Management of bacterial wilt disease. In: Allen, C., Prior, P., and Hayward, A. C. (Eds). Bacterial Wilt Disease and the *Ralstonia solanacearum* Species Complex. *American Phytopathological Society*, 121-132.

Schaad NW, Jones JB, Chun W. 2001. Laboratory Guide for the Identification of Plant Pathogenic Bacteria, *Phytopathology Society* 25: 59-339.

Scher NW, Jones JB, and Chun W. 2004. Laboratory Guide For the Identification of Plant Pathogenic Bacteria. *Amer Phytopathology Society* 52: 487-51.

Shippers B, Baker AW, and Baker AHM. 1998. Interaction of deleterious and benefical rhizospher microorganism and the effect of cropping practices. *Annual Review of Phytopathology* 25: 59-339.

Urakami TC, Ito-Yoshida H, Araki T, Kijima KI, Komagata K. 1994. Transfer of *Pseudomonasplantarii* and *Pseudomonas glumaeto Burkholderia* as *Burkholderia spp* and description of B. vandii. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44: 235-245.

Vanitha S, Niranjana S, Mortensen C, and Umesha S. 2009. Bacterial wilt of tomato in Karnataka and its management by *Bacillus subtilis*. *Biological Control* 54: 685–695.

Whipps JM. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-51.

Winstead NN, Kelman A. 1998. Inoculation techniques for evaluating resistance to *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology* 42: 3946-3951.

Wydra S, Niranjana S, Mortensen C, and Umesha S. 2005. Bacterial wilt of tomato in Karnataka and its management by *Bacillus subtilis*. *Biological Control* 54: 685–695.

Zimnoch-Guzowska E, Lebecka R, and Flis B. 2005. Breeding for resistance to bacterial disease in potato. In: Proceeding 16th Triennial Conference of the European Association for Potato Research, Bilbao, Spain, Riculturist , 218-223.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 1

Detection and Identification of Tomato wilt disease in East Azerbaijan Province and Controlling It Using Antagonist Bacteria

Ashrafi Ahmad[1], Salehzadeh Mehrdad[*2], Khezrinezhad Nabi[3]

1. MSc. of Plant Pathology, Department, Faculty of Agriculture, Malekan Branch, Islamic Azad University
2. PhD Student of Plant Pathology, Department, Faculty of Agriculture, University of Shiraz, Iran
3. Plant Pathology Department, Faculty of Agriculture, Malekan Branch, Islamic Azad University

*Corresponding Author, Email: Mehrdadsalehzadeh@gmail.com

Abstract

Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most destructive diseases which negatively affects the tomato production worldwide. Considering the importance of the disease, using biological control agents could be effective approaches in reducing the damage of the pathogen. Plant specimens suspected to be infected by tomato bacterial wilt disease were collected from different regions of East Azerbaijan province in Iran. Phenotypic identification of the strains was performed using recommended biochemical and physiological tests. In genotypic assessment, using PCR, a 282 and 148 bp fragments with the PS96I/ PS96H primers were amplified. Based on phenotypic and genotypic properties, the strains that cause wilt of tomato were identified as *R. solanacearum* biovar 2. For biological control of this disease, 15 bacterial strains were collected from rhizosphere of healthy tomato plants using soil serial dilution method. Antagonistic effect of the strains was evaluated based on their growth inhibitory on pathogen. According to the results, three bacterial strains showed antagonistic activity against *R. solanacearum*. Based on phenotypic and genotypic characteristics, the antagonist strains Ka1, Ka2 and Ka3 were identified as *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*, respectively.

Key words: Biological control, Antagonist, Rhizosphere, Tomato, Tomato wilt disease

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-11-08]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.1.2.5]