

کنترل پوسیدگی نرم باکتریایی هویج با استفاده از اکتینومیسیت‌ها Control of bacterial soft rot of carrots using actinomycetes

فاطمه سمیعی^{۱*} و زینب فتوحیان^۲

دریافت: ۱۴۰۴/۳/۱

پذیرش: ۱۴۰۴/۵/۱۱

چکیده

پوسیدگی نرم باکتریایی از بیماری‌های شایع محصولات کشاورزی است که باعث ایجاد بافت آلوده، آبکی، نرم و پوسیده می‌شود. کنترل زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید خاک، روشی برای مهار عامل بیماری‌زا با هدف کنترل طولانی مدت بیماری و جایگزین روش‌های کنترل شیمیایی و کاهش مصرف سموم کشاورزی می‌باشد. در پژوهش حاضر امکان کنترل زیستی باکتری عامل پوسیدگی نرم هویج، توسط جدایه‌های اکتینومیسیت بررسی شد. ابتدا نمونه‌های هویج آلوده از مناطق مختلف شهرستان جیرفت جمع‌آوری و باکتری *Erwinia carotovora* از آنها جداسازی گردید. سپس جدایه‌های اکتینومیسیت از ریزوسفر خاک هویج سالم، جداسازی و روی باکتری بیمارگر اثر داده شد. نتایج نشان داد میانگین بازدارندگی رشد باکتری بیمارگر، توسط اکتینومیسیت، در شرایط آزمایشگاهی ۳۸ درصد و میانگین درصد بازدارندگی از رشد متابولیت‌های فرار و غیرفرار جدایه اکتینومیسیت علیه عامل پوسیدگی هویج به ترتیب به میزان صفر درصد و ۱۰۰ درصد بود. نتایج حاصل از بررسی میزان آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در نمونه‌های هویج تیمار شده با اکتینومیسیت، نشان از افزایش میزان هر دو آنزیم داشت. میزان آنزیم پراکسیداز و کاتالاز به ترتیب پنج و نه درصد افزایش نسبت به نمونه شاهد داشتند که این تفاوت در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بود. در شرایط انبار، علائم پوسیدگی در نمونه شاهد بعد از گذشت یک هفته ظاهر شد؛ اما علایم آلودگی در نمونه هویج تلقیح شده با عوامل آنتاگونیست بعد از گذشت سه هفته نمایان گشت. بنابراین بر اساس نتایج پژوهش حاضر در شرایط آزمایشگاه و انبار، از بین جدایه‌های اکتینومیسیت، جدایه A11، توانست به‌خوبی مانع از رشد باکتری عامل پوسیدگی هویج گردد.

واژگان کلیدی: پوسیدگی نرم، باکتری، متابولیت‌های فرار، کنترل زیستی

مقدمه

در چند سال گذشته پژوهشگران توجه زیادی به کاربرد عوامل کنترل زیستی بر علیه بیمارگرهای گیاهی معطوف داشته‌اند. علاوه بر مقرون به صرفه بودن، استفاده از عوامل کنترل زیستی، کاهش خطرات ناشی از مصرف بی‌رویه و نادرست سموم شیمیایی را هم به دنبال دارد (Sarwar et al., 2018). باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم (مانند پکتوباکتریوم، اروینیا و...) باکتری‌های گرم منفی و لاکتوز منفی هستند (تقی‌نسب و کریمی، ۱۳۹۱). بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی *Erwinia carotovora* در سبزیجات بسیار شایع است و باعث آسیب رساندن به محصولاتمانند هویج می‌گردد. هویج *Daucus carota* subs. *sativus* از پرمصرف‌ترین سبزیجات می‌باشد که برای کنترل آسیب بیمارگرهای گیاهی بر روی آن از سموم مختلف کشاورزی استفاده می‌شود. اما در بحث کنترل زیستی، بهترین راه مدیریت بیمارگرهای گیاهی، یافتن عامل آنتاگونیستی زیستی بر علیه عامل بیمارگر، از منطقه‌ای است که بیماری گسترش یافته و شروع شده است، چرا که قاعداً در ریزوسفر خاک، ارگانیسم‌هایی هستند که به‌طور طبیعی توانایی جلوگیری از رشد عامل بیمارگر را دارند و بایستی رشد آنها را تقویت کرد تا بتوانند به‌طور طبیعی در اکوسیستم عمل کنند (تقی‌نسب و

۱- استادیار، گروه گیاه پزشکی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

۲- استادیار، گروه گیاه پزشکی، واحد جیرفت، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: fa_samiee@yahoo.com

همکاران، ۱۳۸۷). اما متأسفانه استفاده از سموم شیمیایی قوی علاوه بر مضراتی که به آن اشاره شد، بر روی ارگانسیم‌هایی با خاصیت آنتاگونیستی نیز اثر گذاشته و آنها را از بین می‌برد (میجانی و همکاران، ۱۴۰۰). در پژوهش پیش‌رو باکتری بیمارگر (عامل پوسیدگی نرم هویج) جداسازی و بعد از اثبات بیماری‌زایی، تحت تأثیر باکتری‌های گرم مثبت رشته‌ای از خانواده اکتینومایست‌های جدا شده از خاک قرار گرفتند و اثرات بازدارندگی اکتینومایست‌ها روی باکتری عامل پوسیدگی با استفاده از شاخص‌های مختلف ارزیابی شد. در این تحقیق جداسازی اکتینومایست‌ها با خاصیت آنتاگونیستی برتر، انجام گرفت. سپس اثربخشی اکتینومایست آنتاگونیست بر روی باکتری عامل پوسیدگی نرم بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش از سه انبار مختلف شهرستان جیرفت نمونه‌های هویج آلوده به پوسیدگی نرم باکتریایی جمع‌آوری و بعد از تأیید بیماری پوسیدگی نرم، جداسازی و خالص‌سازی باکتری عامل پوسیدگی به روش خداکرمیان و همکاران (۱۳۹۳) انجام شد. سپس از سوسپانسیون تهیه شده باکتری بر روی محیط کشت EMB کشت داده و رشد باکتری بررسی شد و کشت خالص تک کلون انجام گردید. به منظور اطمینان از بیماری‌زا بودن باکتری‌های جداسازی شده، تست بیماری‌زایی انجام گرفت. جهت شناسایی باکتری تست‌های کاتالاز و اکسیداز، رنگ‌آمیزی گرم، TSI= Triple Sugar Iron Test، محیط سیمون سیترات آگار SCA= Simmons Citrate Agar، محیط SIM= Sulfide Indole Motility و آزمون MR=VP= Methyl Red-Voges-Proskauer استفاده گردید. با استفاده از محیط کشت SIM (محیط نیمه جامد افتراقی جهت تشخیص تولید سولفید)، تولید اندول و حرکت باکتری‌ها بررسی شد. در مرحله بعد تولید سولفید هیدروژن توسط باکتری با ایجاد رسوب در محیط TSI انجام شد (Chandrashekar, 2017). جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های اکتینومایست با نمونه‌برداری از خاک کشاورزی از مناطق مختلف شهرستان جیرفت انجام گردید (خداکرمیان و میرزایی، ۱۳۹۳). بدین منظور سریال رقت از خاک جهت جداسازی ایزوله‌های اکتینومایست تهیه و از رقت‌های 10^{-4} ، 10^{-6} و 10^{-2} سوسپانسیون خاک در محیط نشاسته کازئین آگار کشت انجام شد و کلنی‌های اکتینومایست ارزیابی شدند (رفعتی و شهنواز، ۱۳۹۶). جهت بررسی تأثیر اکتینومایست‌ها بر روی باکتری‌های بیمارگر در شرایط آزمایشگاه از روش کشت متقاطع استفاده شد، سپس هاله عدم رشد باکتری‌های بیمارگر مطابق فرمول زیر اندازه‌گیری و نتایج آن بررسی گردید. در فرمول C، رشد شعاعی در شاهد و T رشد شعاعی در تیمار است (Doolotkeldieva et al., 2016).

$$I = \frac{C-T}{C} \cdot 100$$

تأثیر اکتینومایست‌ها بر روی باکتری‌های بیمارگر در شرایط انبار

برای این منظور سه تیمار و پنج تکرار با نمونه‌های هویج سالم ضدعفونی در نظر گرفته شد. در تیمار اول، هویج‌ها با جدایه‌های باکتری بیمارگر، تیمار دوم با جدایه‌های اکتینومایست و تیمار سوم با مخلوط اکتینومایست و باکتری بیمارگر تلقیح شدند؛ سپس نمونه‌های هویج به مدت یک هفته در شرایط انبار قرار گرفتند و به‌طور روزانه از لحاظ تغییرات، ارزیابی شدند (Doolotkeldieva et al., 2016). نمونه‌های هویج آلوده به پوسیدگی نرم باکتریایی بعد از تهیه سوسپانسیون باکتری *Erwinia carotovora*، بر روی محیط EMB= The Eosin Methylene Blue آگار کشت و خالص‌سازی شدند. به منظور انتخاب باکتری‌های بیمارزا، آزمون بیماری‌زایی در ارتباط با تمامی جدایه‌ها انجام شد.

تأثیر ترکیبات فرار جدایه‌های اکتینومایست بر روی جدایه‌های بیمارگر

در این بخش ابتدا در محیط کشت NSA= Nutrient Starch Agar که از قبل ساخته و استریل شده بود، ایزوله‌های اکتینومایست به‌طور جداگانه به‌صورت سطحی کشت داده شدند. سپس پلیت‌های کشت داده شده به مدت پنج روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند تا ایزوله‌های اکتینومایست به خوبی رشد کنند. سپس باکتری‌های بیمارگر در

محیط کشت TSA= Tryptic Soy Agar به صورت خطی کشت شد، درب پلیت‌های کشت (پلیت‌های کشت اکتینومایست و پلیت‌های کشت باکتری‌های بیمارگر) برداشته شده و دو پلیت کشت داده شده بر روی یکدیگر قرار گرفت و با پارافیلیم به خوبی مسدود شدند. کلیه نمونه‌ها به مدت یک هفته در دمای ۳۰ درجه سلسیوس انکوبه شدند و سپس باکتری‌های بیمارگر از لحاظ رشد ارزیابی گردیدند و درصد بازدارندگی از رشد مطابق فرمول محاسبه شد (Salem and Abd el-Shafae, 2018).

تأثیر ترکیبات غیر فرار جدایه‌های اکتینومایست بر روی جدایه‌های بیمارگر

هدف از این آزمون بررسی تأثیر ترشحات مایع خارج سلولی (ترکیبات غیر فرار) جدایه‌های اکتینومایست در جلوگیری از رشد باکتری‌های بیمارگر (عامل پوسیدگی نرم در هویج) بود. ابتدا محیط کشت PGM= Peptone Glucose Molasses در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری به اندازه ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه و استریل شد. سپس اکتینومایست‌های آنتاگونیست به طور جداگانه به ارلن‌های حاوی محیط کشت تلقیح شده و به مدت یک هفته در سانتریفیوژ شیکردار با ۹۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند. برای تهیه ترشحات مایع، نمونه‌های کشت داده شده از کاغذ صافی استریل عبور داده شدند (تقی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۳). در این آزمون برای هر جدایه آنتاگونیست اکتینومایست، دو تیمار پنج و ده میلی‌لیتری از عصاره در نظر گرفته شد. عصاره‌ها و محیط کشت SDA= Sabouraud Dextrose Agar سترون با درجه حرارت مناسب به پلیت‌ها اضافه شد. بعد از بستن محیط کشت حاوی عصاره‌های جدایه‌های آنتاگونیست برتر، از باکتری بیمارگر به میزان ۲۰ میکرولیتر در پنج تکرار با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند در مرکز محیط قرار داده شد و بعد از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، تعداد کلنی‌های رشد یافته محاسبه گردید. سپس درصد بازدارندگی از رشد مطابق فرمول محاسبه شد (تقی‌زاده و همکاران، ۱۳۹۳).

تأثیر جدایه‌های اکتینومایست بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در هویج

ابتدا نمونه‌های هویج سالم توسط اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شده و سپس توسط ایزوله برتر مایه‌زنی و درون ظروف سترون قرار داده شدند. سپس سطح آنها با کیسه پلاستیکی پوشانیده و به مدت ۱۱ روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از روش (Maehly and Chance 1954) انجام گرفت. به منظور تهیه عصاره آنزیمی برای سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز، از بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۷) استفاده شد. بدین منظور پس از پودر کردن ۳۵۰ میلی‌گرم از هویج در حضور ازت مایع، ۱۵۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار حاوی دو درصد PVPP= Polyvinylpyrrolidone و ۱/۳ میلی‌مولار EDTA= Ethylenediaminetetraacetic acid به آن افزوده شد و پس از ورتکس، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. به منظور سنجش فعالیت آنزیمی ۶۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار به همراه ۲۷۰ میکرولیتر گوئیکول دو درصد و ۱۷۰ میکرولیتر پراکسید هیدروژن یک درصد به مدت نه دقیقه در بن‌ماری ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت و سپس ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به مخلوط واکنش افزوده و به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر، افزایش جذب نوری در طول مدت سه دقیقه ثبت شد. (مرتضی نیا و همکاران، ۱۳۸۹).

تأثیر جدایه‌های اکتینومایست بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هویج

ابتدا نمونه‌های هویج سالم ضدعفونی و توسط جدایه برتر اکتینومایست مایه‌زنی و درون ظروف پلاستیکی قرار داده شدند، سپس سطح آنها با کیسه پلاستیکی پوشانیده و به مدت ۱۱ روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز با استفاده از روش آبی اندازه‌گیری گردید. ابتدا به ۳۵۰ میلی‌گرم از بافت پودر شده، ۱۵۰۰ میکرولیتر از بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی‌مولار حاوی دو درصد PVPP و ۱/۳ میلی‌مولار EDTA، افزوده شد و پس از ورتکس، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰g سانتریفیوژ شدند و مایع رویی برای سنجش آنزیم به کار گرفته شد. مخلوط واکنش دارای ۳۰ میلی‌مولار پراکسید هیدروژن در بافر فسفات ۵۰ میلی‌مولار (با اسیدیته ۷) و ۱۰۰ میکرولیتر

عصاره آنزیم در حجم نهایی ۱۰۰۰ ماکرولیتتر بود. فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس مصرف پراکسید هیدروژن در واکنش و کاهش جذب نوری در طول موج ۲۴۰ نانومتر سنجیده شد (مرتضی نیا و همکاران، ۱۳۸۹).

آنالیز داده‌ها

در این مطالعه از طرح کامل تصادفی برای تمامی تیمارها استفاده شد. داده‌ها جمع‌آوری و شاخص‌های مورد مطالعه از لحاظ نرمال بودن و منحنی توزیع یکنواختی بررسی گردید؛ سپس تجزیه و تحلیل داده‌ها به روش تجزیه واریانس یک طرفه با استفاده از برنامه آماری SPSS انجام شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد (Duncan, 1995). برای رسم جداول و نمودارها از نرم‌افزار Excel و Word استفاده گردید.

نتایج

هفت جدایه قادر به ایجاد بیماری پوسیدگی نرم در هویج از مناطق مختلف به‌دست آمد. کدهای باکتریایی C5، C1، C7، C10، C11، C12 و C14 بیماری‌زا بودند و میزان و سرعت بیماری‌زایی باکتری C7 از بقیه بیشتر بود که جهت آزمون‌های بعدی انتخاب شد. نتایج شناسایی باکتری عامل پوسیدگی نرم در هویج در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- نتایج شناسایی باکتری کد C7
Table 1- Results of identification of bacteria code C7

رنگ‌آمیزی گرم	مورفولوژی میکروسکوپی	اکسیداز	کاتالاز	SIM	TSI	SCA	MR-VP	باکتری
Gram Stain	Microscopic Morphology	Oxidase	Catalase					Bacteria
منفی	کوکوباسیل	منفی	مثبت	حرکت مثبت/اندول	تولید H ₂ S	مثبت	+/-	<i>Erwinia</i>
Negative	Cocobacillus	Negative	Positive	منفی / H ₂ S منفی	H ₂ S Production	Positive		

باکتری شناسایی شده در این تحقیق گونه *Erwinia carotovora* بود. ۲۲ نمونه اکتینومایست از ۱۰ نمونه خاک از مکان‌های مختلف جمع‌آوری و جداسازی گردید. اکتینومایست‌ها، گرم مثبت و رشته‌ای هستند. در بررسی تأثیر اکتینومایست‌ها بر روی باکتری‌های بیمارگر در شرایط آزمایشگاه، اثر آنتاگونیستی تمامی ۲۲ جدایه اکتینومایست بر علیه هفت باکتری بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت.

تأثیر اکتینومایست‌ها بر روی باکتری‌های بیمارگر در شرایط آزمایشگاه

در این روش از کشت متقابل استفاده شد و اثر آنتاگونیستی تمامی ۲۲ جدایه اکتینومایست بر علیه هفت باکتری بیماری‌زا مورد بررسی قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد ایجاد شده بعد از پنج روز انکوباسیون در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در جدول ۲ ارائه شده است. بر اساس نتایج، اکتینومایست‌ها با کد A1، A2، A3، A4، A5، A8، A11، A13، A14، A15، A17، A19 و A20 دارای خاصیت آنتاگونیستی بودند. در میان باکتری‌های بیمارگر، باکتری با کد C7 دارای بیشترین میزان بیماری بود که درصد بازدارندگی از رشد آن توسط تمامی ایزوله‌های اکتینومایست که بر روی کد C7 اثر داشتند، محاسبه و در جدول ۳ ارائه شده است. با توجه جدول ۳، درصد بازدارندگی از رشد باکتری بیمارگر C7 توسط اکتینومایست A11، برابر با ۳۸ درصد بود.

تأثیر ترکیبات فرار ایزوله‌های اکتینومایست بر روی ایزوله‌های بیمارگر

ترکیبات فرار حاصل از جدایه برتر اکتینومایست A11، علیه باکتری بیمارگر با کد C7 که قدرت بیماری‌زایی بیشتری نسبت به بقیه جدایه‌های بیمارگر داشت، مورد آزمون قرار گرفت. در این آزمون جدایه باکتریایی C7 مانند نمونه شاهد بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس رشد داشت و ترکیبات فرار اکتینومایست A11 توانایی جلوگیری از رشد باکتری بیمارگر را نداشتند.

جدول ۲- قطر هاله عدم رشد جدایه های عامل پوسیدگی نرم در هویج در برابر جدایه های اکتینومایست (قطر هاله بر اساس میلی متر است).

Table 2. Diameter of the growth inhibition zone of soft rot isolates in carrots against actinomycetes isolates (diameter of the zone is in millimeters)

C9	C7	C6	C5	C4	C3	C1	کد باکتری
9	5	-	2	10	-	6	A1
-	-	-	5	-	-	-	A2
-	-	1	2	-	-	1	A3
4	6	1	-	1	-	4	A4
-	-	-	1	2	-	-	A5
-	-	-	-	-	-	-	A6
-	-	-	-	-	-	-	A7
2	13	1	5	5	-	-	A8
-	-	-	-	-	-	-	A9
-	-	-	-	-	-	-	A10
15	20	16	15	12	-	-	A11
-	-	-	-	-	-	-	A12
-	5	-	-	2	-	-	A13
-	2	-	-	-	-	1	A14
4	11	8	5	-	-	-	A15
-	-	-	-	-	-	-	A16
7	13	8	2	6	-	4	A17
-	-	-	-	-	-	-	A18
9	12	8	-	1	2	5	A19
1	6	5	4	-	-	1	A20
-	-	-	-	-	-	-	A21
-	2	-	-	-	-	-	A22

جدول ۳- قطر هاله بازدارندگی ایجاد شده توسط جدایه های اکتینومایست روی باکتری بیمارگر C7

Table 3. Inhibition zone diameters formed by actinomycetes isolates on the pathogenic bacterium C7

درصد بازدارندگی Percentage of deterrence	قطر هاله بازدارندگی (میلی متر) Diameter of the deterrent halo (mm)	کد باکتری Bacteria Code
27	5	A1
29	6	A4
37	13	A8
38	15	A11
27	5	A13
19	2	A14
35	11	A15
37	13	A17
36	12	A19
29	6	A20
19	2	A22

تأثیر ترکیبات غیرفرار ایزوله های آنتاگونیست اکتینومایست ها بر روی ایزوله های بیمارگر

نتایج مربوط به اثربخشی ترکیبات غیرفرار ایزوله برتر آنتاگونیست اکتینومایست (A11) بر علیه باکتری عامل پوسیدگی نرم در هویج (C7) که آزمون های مربوط به آن در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و در محدوده زمانی پنج روز انجام گرفت، نشان داد که ترکیبات غیرفرار اکتینومایست A11 به طور کامل در جلوگیری از رشد باکتری بیمارگر C7 موفق بوده است و درصد بازدارندگی از رشد ۱۰۰ درصد بود.

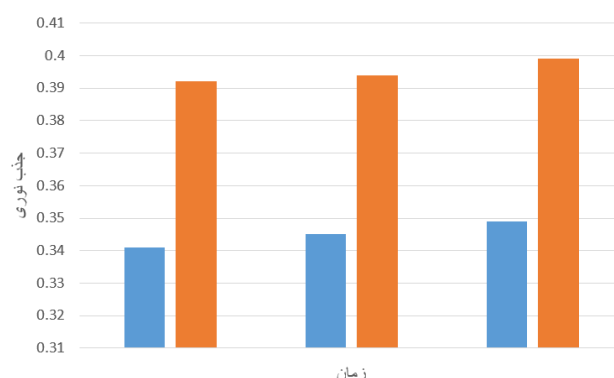
تأثیر جدایه‌های اکتینومایست بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در هویج

میانگین جذب نوری آنزیم پراکسیداز در نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با اکتینومایست در جدول ۴ ارائه شده است. در شکل ۱ جذب نوری دو نمونه شاهد و تیمار مقایسه شده که در تیمار هویج با اکتینومایست میزان آنزیم پراکسیداز بالا رفته است. میانگین جذب نوری آنزیم پراکسیداز در نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با اکتینومایست اختلاف معنی‌دار داشت. میانگین هر سه دقیقه در هر تیمار محاسبه و مشخص شد که آنزیم پراکسیداز در تیمار هویج تلقیح شده با اکتینومایست، پنج درصد افزایش داشته است.

جدول ۴- میانگین جذب نوری آنزیم پراکسیداز در نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با اکتینومایست

Table 4. Average optical absorption of peroxidase enzyme in control sample and actinomycetes treated sample

نمونه	Sample	دقیقه اول 1 st minute	دقیقه دوم 2 st minute	دقیقه سوم 3 st minute
نمونه شاهد (هویج) Control sample (carrot)		0.341	0.345	0.349
تیمار اکتینومایست و هویج Actinomycete and carrot treatment		0.392	0.394	0.399



شکل ۱- مقایسه جذب نوری آنزیم پراکسیداز دو نمونه شاهد و تیمار شده هویج با اکتینومایست (۱: شاهد ۲: تیمار شده)

Fig.1. Comparison of the optical absorption of peroxidase enzyme of two control and treated carrot samples with actinomycetes (1: control 2: treated)

تأثیر جدایه‌های اکتینومایست بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هویج

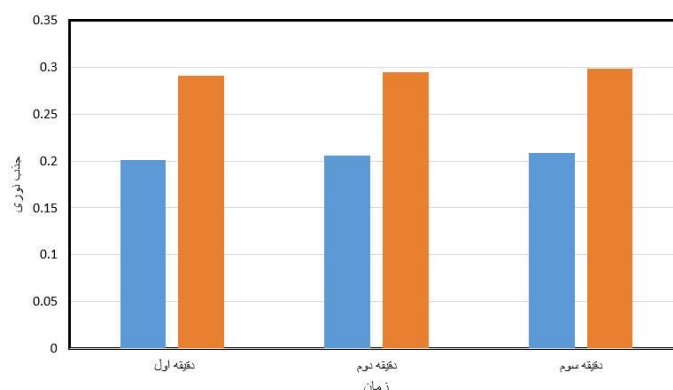
میانگین جذب نوری آنزیم کاتالاز در نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با اکتینومایست در جدول ۵ ارائه شده است.

جدول ۵- میانگین جذب نوری آنزیم کاتالاز در نمونه شاهد و نمونه تیمار شده هویج با اکتینومایست

Table 5. Average optical absorption of catalase enzyme in the control sample and carrot sample treated with actinomycetes

نمونه	Sample	دقیقه اول 1 st minute	دقیقه دوم 2 st minute	دقیقه سوم 3 st minute
نمونه شاهد (هویج) Control sample (carrot)		0.201	0.206	0.209
تیمار اکتینومایست و هویج Actinomycete and carrot treatment		0.291	0.295	0.299

در شکل ۲ طی مقایسه میزان جذب نوری دو نمونه شاهد و تیمار شده مشاهده می گردد که میزان آنزیم کاتالاز در حالت هویج تیمار شده با اکتینومایست بالا رفته است. بر این اساس میانگین جذب نوری آنزیم کاتالاز در نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با اکتینومایست اختلاف معنی دار داشت. طی میانگین هر سه دقیقه در هر تیمار مشخص شد که آنزیم کاتالاز در تیمار هویج تلقیح شده با اکتینومایست، نه درصد افزایش داشته است.



شکل ۲- مقایسه جذب نوری آنزیم کاتالاز دو نمونه شاهد و تیمار شده هویج با اکتینومایست (۱: شاهد ۲: تیمار شده)

Fig. 2. Comparison of the optical absorption of catalase enzyme in two control and treated carrot samples with actinomycetes (1: control 2: treated)

بحث

در این مطالعه، هویج های آلوده به پوسیدگی نرم باکتریایی از سه انبار مختلف شهرستان جیرفت جمع آوری شدند و جهت جداسازی باکتری عامل پوسیدگی مورد بررسی قرار گرفتند. کلنی های خالص انتخاب و جداسازی شدند. ۱۴ جدایه باکتریایی به دست آمد و طی تست بیماریزایی آنها بر روی نمونه های هویج، جدایه C7 که دارای قدرت بیماریزایی بیشتری بود، برای انجام مراحل بعدی تحقیق، انتخاب شد. در پژوهشی توسط خداکرمیان و میرزایی (۱۳۹۳) توانایی باکتری های ریزوسفر هویج در کنترل عامل پوسیدگی نرم در هویج بررسی شد. در این تحقیق بعد از شناسایی نمونه های هویج آلوده به بیماری پوسیدگی نرم، ۴۴ جدایه باکتریایی بیماریزا از جمله سویه هایی از *Pectobacterium* گزارش شدند. در مرحله بعد جدایه های خانواده اکتینومایست از خاک ریزوسفر جهت غربالگری جدایه برتر آنتاگونیست بر علیه باکتری عامل پوسیدگی نرم در هویج جداسازی گردید. نمونه خاک از ۱۰ منطقه کشاورزی جیرفت جمع آوری و برای جداسازی اکتینومایست ها به آزمایشگاه ارسال شد. برای جداسازی اکتینومایست ها از محیط کشت انتخابی نشاسته کازئین آگار استفاده شد و در مجموع ۲۲ جدایه اکتینومایست جداسازی و شناسایی گردید. جهت شناسایی باکتری های خانواده اکتینومایست ابتدا به مورفولوژی کلنی آنها توجه شد. کلنی های خانواده اکتینومایست به محیط کشت می چسبند و رنگ سفید گچی، زرد، آبی یا قهوه ای دارند و بوی خاک می دهند که شناسایی با توجه به مقالات مرتبط انجام گردید (Basik et al., 2020). در تحقیق حاضر، جدایه های اکتینومایست شناسایی شده عبارت بودند از جنس های *Actinomyces* و *Streptomyces*، که با نتایج مطالعات پیشین منطبق بود (خداکرمیان و میرزایی، ۱۳۹۳؛ Cao et al., 2021). در مطالعه ای کنترل بیماری پوسیدگی سیبزمینی ناشی از *Erwinia carotovora* با استفاده از عوامل بیولوژیکی، *Streptomyces* spp.، *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas aeruginosa* بررسی شد؛ نتایج این تحقیق نشان داد که *Streptomyces* spp. بهترین کارایی را در مهار باکتری های بیماریزا داشت (Salem and Abd el-Shafea, 2018). در تحقیق حاضر، تمامی باکتری های بیمارگر جدا شده در تقابل با جدایه های اکتینومایست قرار گرفت و کشت متقاطع انجام شد. سپس قطر هاله عدم رشد برحسب میلی متر اندازه گیری شد و درصد بازدارندگی محاسبه گردید. جدایه اکتینومایست با کد A11 به دلیل بازدارندگی بیشتر به عنوان

جدایه برتر انتخاب گردید و باکتری بیمارگر با کد C7 که قدرت بیماریزایی بیشتری داشت، در مقابل این ایزوله بیشترین قطر هاله عدم رشد برابر با ۲۰ میلی‌متر (۳۸ درصد بازدارندگی از رشد) را ایجاد کرد.

در مطالعه‌ای کنترل بیولوژیک *Erwinia carotovora* با استفاده از سویه‌های *Streptomyces* مورد مطالعه قرار گرفت (Doolotkeldieva et al., 2016). در این بررسی جهت مطالعه میزان کنترل بیولوژیک *Streptomyces* ابتدا *Streptomyces* در محیط NGA= Nutrient Glucose Agar به صورت یک خط کشت داده شد؛ سپس بیمارگرهای جداسازی شده به صورت عمود بر *Streptomyces* کشت داده شدند و رشد قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید. جدایه برتر در این پژوهش Sk6 نام داشت که برعلیه باکتری عامل پوسیدگی نرم در سیب‌زمینی با کد EcPo2 اثر آنتاگونیستی نشان داد و هاله عدم رشد آن، چهار میلی‌متر (۳۴ درصد بازدارندگی از رشد) گزارش شد. ترکیبات فرار ایزوله A11 برعلیه باکتری بیمارگر C7 مورد بررسی قرار گرفت و در نتیجه رشد کامل باکتری در پلیت، مشخص شد که ترکیبات فرار ایزوله A11 تأثیری بر روی باکتری بیمارگر نداشتند و رشد باکتری در نمونه شاهد و نمونه تیمار مشابه یکدیگر بود که با توجه به فرار بودن ترکیبات، احتمال تأثیر کم یا بدون اثر بودن این ترکیبات مفروض است که در مطالعات سایر محققان نیز بدان اشاره شده است (Doumbou et al., 2024). در بررسی ترکیبات غیرفرار جدایه اکتینوماست A11 مشخص شد که این ترکیبات به طور کامل مانع از رشد باکتری بیمارگر شدند و درصد بازدارندگی از رشد ۱۰۰ درصد بود، از این ترکیبات می‌توان در بیوکنترل باکتری بیمارگر استفاده کرد که نتایج به دست آمده با سایر محققین منطبق می‌باشد (Alblooshi et al., 2022; Meena et al., 2022).

پراکسیداز آنزیمی با حضور گسترده در طبیعت است و تقریباً در تمامی اندامک‌های سلولی گیاهان، مخمرها، جلبک‌ها، باکتری‌ها و جانوران وجود دارد. این آنزیم یکی از آنزیم‌های مهم در بافت‌های گیاهی است که با پراکسید هیدروژن (آب اکسیژنه) ترکیب و تولید کمپلکس فعالی می‌نماید که قادر به انجام واکنش با بسیاری از مولکول‌های دهنده الکترون می‌باشد. بنابراین غیرفعال‌سازی آن می‌تواند زمان ماندگاری سبزیجات را بالا ببرد (Gebily et al., 2021). در بررسی تأثیر جدایه‌های اکتینوماست بر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در هویج، میانگین جذب نوری آنزیم پراکسیداز در نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با اکتینوماست اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، در حالت تیمار هویج با اکتینوماست، میزان آنزیم پراکسیداز بالا رفته است و اکتینوماست تأثیری بر کاهش این آنزیم در تیمار با هویج نداشت. آنزیم دیگری که در تحقیق بررسی شد کاتالاز بود؛ کاتالاز آنزیمی است که آب اکسیژنه را به اکسیژن و آب تجزیه می‌کند. این آنزیم نیز در تمامی سلول‌ها وجود دارد و سلول را از آب اکسیژنه که یک ماده سمی برای آن است، حفاظت می‌کند. در بررسی تأثیر جدایه‌های اکتینوماست بر میزان فعالیت آنزیم کاتالاز در هویج تیمار شده با اکتینوماست، میزان این آنزیم نیز افزایش یافت که بر این اساس میانگین جذب نوری آنزیم کاتالاز در نمونه شاهد و نمونه تیمار شده با اکتینوماست اختلاف معنی‌داری داشت. مختاری و همکاران (۱۳۸۸) میزان آنزیم پراکسیداز در ریشه گوجه‌فرنگی تیمار شده با قارچ *Trichoderma* و باکتری *Pseudomonas* را اندازه گرفتند. میزان آنزیم پراکسیداز در روز اول افزایش نشان داد و در روز چهارم به اوج خود رسید و در روزهای بعد فعالیت نیز تغییرات آنزیم کاتالاز پراکسیداز را در برخی ارقام انگور در تیمارهای پاسخ به سرما بررسی کرده بودند که در این تحقیق کاهش دما بر روی فعالیت آنزیمی اثر گذاشته بود. در تحقیق دیگری، اکتینوماست‌های کنترل‌گر زیستی تعدادی از بیماری‌های گیاهی مانند باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم مطالعه گردید (Chaurasia et al., 2018). در این تحقیق جدایه‌های اکتینوماست حاصل از خاک و ریزوسفر گیاهان بر روی باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم اثر داده شد و تأثیر مثبتی در جلوگیری از رشد باکتری عامل پوسیدگی نرم داشتند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد.

با توجه به اینکه استفاده از سموم شیمیایی در کشاورزی از حد مجاز خود تجاوز کرده است و با مصرف آنها، سموم شیمیایی وارد چرخه غذایی انسان‌ها می‌شوند و خطرات جبران‌ناپذیری بر سلامتی وارد می‌آورند، لذا استفاده از عوامل کنترل‌زیستی در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی بسیار مهم و حیاتی هستند، یکی از عوامل کنترل‌زیستی باکتری‌های اکتینومایست هستند، اکتینوماست‌ها در خاک زندگی می‌کنند و دارای متابولیتهای

ضدمیکروبی هستند و با بررسی و شناخت این متابولیت‌ها می‌توان از آنها برای کنترل عوامل بیماری‌زای مختلف استفاده کرد. نتایج رضایت بخشی از کاربرد اکتینومایست‌ها بر علیه برخی از بیمارگرهای گیاهی به دست آمده است (Torres-Rodriguez et al., 2022).

نتیجه گیری

متابولیت های ضدمیکروبی و محرک رشد اکتینومایست‌ها پتانسیل بالایی برای کاربردهای تجاری دارند، توسعه محصولاتی مانند کودهای زیستی از این متابولیت‌ها می‌تواند جایگزینی سازگار با محیط زیست برای آفت‌کش‌های شیمیایی باشد و به حفاظت از محصول و بهره‌وری در شرایط مزرعه و کشاورزی پایدار کمک شایانی نماید. مطالعات آتی باید بر توسعه، فرمول‌بندی، آزمایش‌های میدانی و تعیین خصوصیات ثانویه این ترکیبات متمرکز شوند. در این تحقیق جدایه‌های اکتینومایست که از خاک و ریزوسفر گیاهان به‌دست آمدند و بر روی باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم اثر داده شدند، تأثیر مثبت و قابل قبولی در جلوگیری از رشد باکتری عامل پوسیدگی نرم داشتند. امید است بتوان از این جدایه‌ها در کنترل پوسیدگی محصولات کشاورزی در مزرعه و انبار استفاده نمود. با توجه به اینکه تولید محصول بر پایه باکتری مستلزم انجام تحقیقات فراتری است، لذا در تحقیقات تکمیلی پیشنهاد می‌شود، برهمکنش باکتری با سایر میکروارگانیسم‌های خاک و دامنه فعالیت ضدمیکروبی باکتری علیه سایر قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی بررسی شود و اثرات فاکتورهای محیطی در شرایط مزرعه و انبار بر کنترل زیستی پوسیدگی باکتریایی با استفاده از اکتینومایست‌ها ارزیابی گردد.

References

منابع

- تقی‌زاده، ز.، محمدی، ص. و علایی، ح. ۱۳۹۳. تأثیر ترکیبات فرار و غیرفرار جدایه‌های *Trichoderma spp.* در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ *Fusarium solani* عامل پوسیدگی خشک فوزاریومی سیب‌زمینی. تحقیقات نوین در گیاهپزشکی ۶ (۳): ۲۶۵-۲۷۸.
- تقی‌نسب، م. و کریمی، ا. ۱۳۹۱. گیاهان حساس به باکتری‌های مولد پوسیدگی نرم در ایران. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۱ (۲): ۶۴-۵۳.
- تقی‌نسب، م.، خادم‌لو، ا. و رحیمیان، ح. ۱۳۷۸. *Pectobacterium carotovorum* عامل پوسیدگی پیاز و ساقه گلابول در محصولات. هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. گرگان.
- خداکریمیان، غ. و میرزایی، س. ۱۳۹۳. ارزیابی توانایی باکتری‌های ریزوسفر هویج در القای رشد و کنترل بیماری پوسیدگی نرم. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان.
- رفعتی، ص. و شهناز، ب. ۱۳۹۶. جداسازی و شناسایی اکتینومایست‌های خاک به‌عنوان عوامل مؤثر در کنترل زیستی برخی بیمارگرهای گیاهی. مجله گیاهپزشکی ۴۰ (۱): ۶۵-۷۹.
- کریمی علویجه، م.، عبادی، ع.، موسوی، ا. و سلامی، ع. ۱۳۹۴. بررسی تغییرات آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز و پروتئین کل در پاسخ به تنش سرما در برخی از ارقام انگور. نشریه علوم باغبانی ۱۱ (۲۹): ۱۱۰-۱۰۳.
- مرتضی‌نیا، ح.، روحانی، ح. و صاحبانی، ن. ۱۳۸۹. بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز القاء توسط *تریکودرما هاریزانوم* در گیاهچه خیار و اثر آن در کنترل آلودگی پوسیدگی ریشه و طوقه در اثر *Pythium aphanidermatum*. حفاظت گیاهان ۲۴ (۳): ۲۶۸-۲۵۸.
- مختاری، س.، صاحبانی، ن. و اعتباریان، ح. ۱۳۸۸. بررسی کنترل بیولوژیک و القای سیستمیک فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاه گوجه‌فرنگی آلوده به نماتد مولد گره ریشه توسط باکتری انتاگونیست *Pseudomonas fluorescens* CHAO. مجله کشاورزی ۱۱ (۱۱): ۱۶۱-۱۵۱.

میجانی، ر.، شهپری، غ.، عقیقی، س. و صادقی، ا. ۱۴۰۰. ارزیابی تأثیر استرپتومیسس‌های خاک برد بر شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط تنش زیستی ناشی از شبه قارچ *Phytophthora nicotiana*. زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها ۳۸: ۵۷-۷۰.

- Alblooshi, A.A., Purayil, G.P., Saeed, E.E., Ramadan, G.A., Tariq, S., Altaee, A.S., El-Tarabily, K.A. and AbuQamar, S.F. 2022. Biocontrol potential of endophytic actinobacteria against *Fusarium solani*, the causal agent of sudden decline syndrome on date palm in the UAE. *Journal of Fungi* 8(1): 8. <http://doi.org/10.3390/jof8010008>.
- Basik, A.A., Juboi, H., Shamsul, S.S.G., Sanglier, J.J. and Yeo, T.C. 2020. Actinomycetes isolated from wetland and hill paddy during the warm and cool seasons in Sarawak, East Malaysia. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* 9(4): 774-780. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2020.9.4.774-780>.
- Chandrashekar, B.S. 2017. Studies on etiology and management of bacterial soft rot of carrot. M. Sc. Thesis, University Agriculture Science, Bangalore, 124 pp.
- Chaurasia, A., Meena, B. and Tripathi, A. 2018. Actinomycetes: an unexplored microorganisms for plant growth promotion and biocontrol in vegetable crops. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34(9): 132. <http://doi.org/10.1007/s11274-018-2517-5>.
- Cao, L., Gao, Y., Yu, J., Niu, S., Zeng, J., Yao, Q., Wang, X., Bu, Z., Xu, T., Liu, X. and Zhu, Y. 2021. *Streptomyces hygroscopicus* OsiSh-2-induced mitigation of Fe deficiency in rice plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 158: 275-283. <http://doi.org/10.1016/i.plaphy.2020.11.013>.
- Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S. and Suleymankisi, A. 2016. Biological control of *Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* by *Streptomyces* species. *Advance in Microbiology* 6: 104-114. <http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.62-11>.
- Doumbou, C.L., Hamby Salove, M.K., Crawford, D.L. and Beaulieu, C. 2024. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection* 82: 85-102. <https://doi.org/10.7202/706219ar>.
- Duncan, D. B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-42.
- Gebily, D.A.S., Ghanem, G.A.M., Ragab, M.M., Ali, A.M., Soliman, N.E.K. and Abd El-Moity, T.H. 2021. Characterization and potential antifungal activities of three *Streptomyces* spp. as biocontrol agents against *Sclerotinia sclerotiorum* de Bary infecting green bean. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 31: 33. <http://doi.org/10.1186/s41938-021-00373-x>.
- Maehly, A.C. and Chance, B. 1954. The assay of catalases and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis* 1:357-424. <http://doi.org/10.1002/9780470110171.ch14>.
- Meena, L.I., Rajeswari, E., Ahiladevi, P., Kamalakannan, A. and Kalaiselvi, T. 2022. Antifungal potential of *Streptomyces rameus* GgS 48 against mungbean root rot *Rhizoctonia bataticola*. *Journal Bioscience* 47: 10. PMID: 35092412.
- Salem, E.A. and Abd el-Shafea, Y.M. 2018. Biological control of potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 28: 94. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0100-x>.
- Sarwar, A., Latif, Z., Zhang, S., Zhu, J., Zechel, D.L. and Bechthold, A. 2018. Biological control of potato common scab with rare Isatropolone C compound produced by plant growth promoting *Streptomyces* A1RT. *Frontiers in Microbiology* 9: 1126. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01126>.
- Torres-Rodriguez, J., Evangelina, E.J., Quiñones-Aguilarand, E. and Hernandez-Montiel, L. 2022. Actinomycete potential as biocontrol agent of phytopathogenic fungi: mechanisms, source, and applications. *Plants* 11(23): 3201. <https://doi.org/10.3390/plants11233201>.

Control of bacterial soft rot of carrots using actinomycetes

F. Samiei^{1*} and F. Fotoohiyan²

Received: 22 May, 2025

Accepted: 2 Aug., 2025

ABSTRACT

Bacterial soft rot is one of the common diseases of agricultural products that causes watery, soft and rotten infected tissue. Biological control using beneficial soil microorganisms is a method to control the disease agent with the aim of long-term control of the disease and to replace chemical control methods and reduce the consumption of agricultural pesticides. In this study, the biocontrol of carrot soft rot bacteria was investigated by actinomycete isolates. First, carrot samples were collected from Jiroft city and *Erwinia cartuvara* bacteria was isolated from them. Then, actinomycete isolates were isolated from the rhizosphere of healthy carrot soil and tested on pathogenic bacteria. The results showed that the average growth inhibition of pathogenic bacteria by actinomycetes was 38% in laboratory conditions. Also, the average inhibition percentage of the growth of volatile and non-volatile metabolites of actinomycete isolate against carrot rot agent was 0% and 100%, respectively. The results of examining the amount of catalase and peroxidase enzymes in carrot samples treated with actinomycetes showed an increase in the amount of both enzymes. The enzyme peroxidase and catalase increased by five and nine percent, respectively, compared to the control sample, and this difference was significant at the 5% level. In storage conditions, rotting symptoms appeared in the control sample after one week, but contamination symptoms appeared in the carrot sample inoculated with antagonist agents after three weeks. Therefore, based on the results of the present research, in laboratory and storage conditions, among the actinomycete isolates, isolate A11 was able to effectively prevent the growth of the bacteria responsible for carrot rot.

Key words: Biocontrol, Bacteria, Soft rot, Volatile metabolites

1. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Ro.C., Islamic Azad University, Roudehen, Iran

2. Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Ji.C., Islamic Azad University, Jiroft, Iran

Corresponding author: fa_samiee@yahoo.com