Journal of Vegetables Sciences, Spring & Summer 2023, Vol 7, No 13(1), Pages 167-182

doi: 10.22034/IUVS.2022.555204.1209 Article Type: Research Online ISSN: 2676-4822

Isolation of Rhizospheric *Pantoea* sp. and *Pseudomonas* sp. Bacteria and Evaluation of Their Bio-control Ability against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Causes of Tubers and Vegetables Rot

Bita Kazemi[1], Mohammad Reza Alymanesh[2*] and Siamak Beigi[3]

1- M.Sc. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
2- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran
3- Agricultural Jihad Organization of Ilam Province, Ilam, Iran

[*]**Corresponding author:** m.alimanesh@ilam.ac.ir

(**Received:** 05 June 2022 **Revise:** 25 June 2022 **Accepted:** 03 July 2022)

Extended Abstract

1. **Introduction:** *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) is one of the main causes of soft rot disease in many economically important vegetables and tubers such as carrot, cabbage, potato, onion, cucumber, eggplant, garlic, bell pepper, radish, sweet potato, squash and tomato. The use of chemical bactericides is not suitable to control soft rot bacteria due to their toxic side effects and the emergence of resistance in bacterial populations. The use of bio-control bacteria to inhibit bacterial pathogens such as *Pcc* is a practical and useful method to overcome the issue. In this study, in order to control this disease with the help of bacterial biological control agents, some bacteria were isolated from rhizosphere of vegetables and potato. The aim of this study was to find bacteria with different bio-control mechanisms which are able to inhibit different isolates of *Pcc*. On the other hand, these bacteria (with different bio-control mechanisms) were combined to investigate the possibility of increasing their bio-control ability in a mixed manner.
2. **Materials and Methods:** 12 rhizospheric bacteria were isolated from vegetables and potato. Antibacterial properties were evaluated using chloroform vapor method. Also, 12 bacteria were isolated from rhizosphere of vegetables and potato by minimal medium to evaluate the quorum quenching (QQ) ability. *Chromobacterium violaceum* CV026 biosensor was used to assess QQ activity in bacteria. There were two types of bio-control tests: the first case was the application of bacteria individually and the second case was the mix of bacteria with different bio-control mechanisms, antibacterial property and QQ activity, and its application against two strains of *Pcc* including *PccK* and *PccM*. At first, before doing the second bio-control test, interaction test between bio-control bacteria was performed by culturing two bacteria perpendicular to each other on solid medium. Bio-control test of *Pcc* on plant tissues (potato tubers, carrots and bell peppers) was performed by calculating the weight of rotting tissue in comparison with the control (containing *Pcc* alone). Classical and molecular bacteriological tests were performed to detect these bacteria.
3. **Results and Discussion:** Among rhizospheric bacteria with antibacterial properties, A10 isolate had a large inhibitory halo, 16.67 mm, against one strain of *Pcc* (*PccK*) and it had the ability to bio-control of *PccK* on vegetables and potato tubers. Among bacteria, only SS5 isolate showed QQ ability in both biosensor and bio-control tests. A10 and SS5 were detected as *Pantoea* sp. and *Pseudomonas* sp. respectively. *Pseudomonas* SS5 had moderate bio-control activity against two *Pcc* strains with QQ mechanism as inhibition percentage on potato tubers rot for *PccM* and *PccK* were 53.92 % and 68 %, respectively. *Pantoea* A10 with antibacterial activity which had low or high bio-control properties against *Pcc* strains as inhibition percentage on potato tubers rot for *PccM* and *PccK* were 5.81 % and 91.33 %, respectively. The bio-control effect of A10 and SS5 bacteria against *Pcc* strains on carrots and bell peppers was better than potatoes. The interaction of two bacteria on solid medium, SS5 and A10, was not visible as a transparent area at their intersection, so they did not show an inhibitory effect against each other. Therefore, it is possible to use combination of two bacteria, A10 and SS5, for bio-control tests. The results showed that the bio-control ability of these two bacteria in the mixed state was much higher than the single application of each bacterium. In mix of two bio-control bacteria, disease was further reduced at least for *PccM*, in other words, the bio-control property was increased. In the case of the combination of two bacteria against *PccM*, compared to SS5 and A10 application alone, it produced 2.21 and 4.53 times less rot tissue, respectively.

4. **Conclusion:** There are two main bio-control mechanisms in bio-control bacteria for *Pcc* rot reduction including bacteria with antibacterial properties and bacteria with QQ abilities. In this study, for the first time, it was found that two bacteria with different bio-control mechanisms, including *Pantoea* sp. and *Psudomonas* sp., are able to control *Pcc* separately and in combination. For the first time, the improvement of the bio-control properties of these two bacteria in combination with each other was identified. It was also found that the effect of these different bio-control bacteria on the control of each *Pcc* isolate and even each host of vegetables or potato tuber could be different, so that one *Pcc* isolate was sometimes completely inhibited and the other *Pcc* isolate was not affected by the bio-control bacteria. Because QQ mechanism disrupts the basic common physiological pathways in all *Pcc* isolates. So, this mechanism in bio-control bacteria apparently has a more general effect than the antibacterial effect.

Keywords: *Pantoea*, *Pseudomonas*, Biosensors, Quorum quenching

Citation: Kazemi, B., Alymanesh, M. R. & Beigi, S. (2023). Isolation of rhizospheric *Pantoea* sp. and *Pseudomonas* sp. bacteria and evaluation of their bio-control ability against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causes of tubers and vegetables rot. *Journal of Vegetables Sciences*, 13(1), 167-182. doi: 10.22034/IUVS.2022.547778.1193

Copyrights:
Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to Journal of Vegetables Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/ by/4.0).

دوفصلنامه علمی علوم سبزی‌ها، سال ۷، دوره ۱۳، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۲، صفحات (۱۸۲-۱۶۷)

دانشگاه ایلام شاپا الکترونیکی: ۴۸۲۲-۲۶۷۶ نوع مقاله: پژوهشی doi: 10.22034/IUVS.2022.555204.1209

جداسازی باکتری‌های ریزوسفری *Pantoea* sp. و *Pseudomonas* sp. و بررسی توانایی آن‌ها در مهار زیستی *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* عامل لهیدگی غده‌ها و سبزیجات

بیتا کاظمی[۱]، محمدرضا عالی منش[۲*] و سیامک بیگی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲- استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۳- سازمان جهاد کشاورزی استان ایلام، ایلام، ایران

*نویسنده مسئول: m.alimanesh@ilam.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۱۵ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۰۴/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۴/۱۲)

چکیده

بیماری لهیدگی سبزیجات و غده‌های سیب‌زمینی در ایران و جهان می‌باشد. در این پژوهش جهت کنترل این بیماری با عوامل مهار زیستی ، ۱۲ باکتری از ریزوسفر سبزیجات کاهو، پیاز، کلم، سیر، هویج، فلفل دلمه‌ای و سیب‌زمینی جداسازی گردید و علیه دو جدایه بیمارگر *Pcc* به‌کار رفت. جدایه *Pantoea* A10 توانایی ایجاد هاله بازدارنده روی محیط کشت علیه بیمارگر را داشت و از توانایی مهار زیستی مناسبی علیه یک جدایه بیمارگر روی سبزیجات و غده سیب‌زمینی برخوردار بود. همچنین ۱۲ باکتری ریزوسفر از سبزیجات و سیب‌زمینی به‌منظور بررسی قدرت Quorum quenching (QQ) جداسازی گردیدند. تنها جدایه *Pseudomonas* SS5 هم در آزمون بیوسنسور توانایی QQ نشان داد و هم توانست لهیدگی ایجادشده توسط هر دو جدایه بیمارگر را در مقایسه با شاهد کاهش دهد. این دو باکتری اثرات منفی رشدی در محیط کشت علیه همدیگر نشان ندادند، لذا در ترکیب با یکدیگر در آزمون‌های کنترل لهیدگی غده به کار رفتند. نتایج نشان داد توانایی مهار زیستی این دو باکتری در حالت ترکیبی عملکرد بهتری در مقایسه با کاربرد جداگانه هر یک از آن‌ها دارد به‌نحوی که وزن بافت لهیده سیب‌زمینی از ۲/۴۱ گرم در شاهد و ۱/۱ گرم در کاربرد بهترین باکتری با توانایی مهار زیستی (SS5)، به ۰/۵ گرم در حالت کاربرد ترکیبی دو باکتری کاهش یافت. نهایتاً این تحقیق برای اولین بار توانایی کنترل *Pcc* با اثرات هم‌افزایی دو باکتری *Pantoea* sp. و *Pseudomonas* sp. با دو مکانیسم مختلف را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: *Pantoea*، *Pseudomonas*، Quorum quenching، بیوسنسور

استناد: کاظمی، ب.، عالی منش، م. ر. و بیگی، س. (۱۴۰۲). جداسازی باکتری‌های ریزوسفری *Pantoea* sp. و *Pseudomonas* sp. و بررسی توانایی آن‌ها در مهار زیستی *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* عامل لهیدگی غده‌ها و سبزیجات. *علوم سبزی‌ها*، ۱۳(۱)، ۱۸۲-۱۶۷.

حق چاپ:

حق چاپ برای نویسنده (گان) این مقاله محفوظ است. بر اساس قوانین انتشارات با دسترسی آزاد، تمام مطالعات چاپ شده در این مجله به‌صورت آزاد در وب سایت مجله برای عموم بدون پرداخت هزینه قابل‌دسترس است.

مقدمه

بیماری پوسیدگی نرم موجب پوسیدگی بافت‌های گوشتی سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum*) در مزرعه، طی مراحل حمل‌ونقل و انبارداری می‌شود (Algeblawi & Adam, 2013). اهمیت اقتصادی لهیدگی پس از برداشت سبزیجات توسط عوامل بیمارگر بسیار زیاد است (Sharma *et al.*, 2009). براساس گزارش سازمان خواربار و کشاورزی ایالات متحده (FAO) حدود ۴۵ درصد از میوه و سبزیجات جهان در دوره پس از برداشت به‌هدر می‌روند. حتی در کشورهای توسعه‌یافته میزان این خسارت که عمدتاً توسط بیمارگرها ایجاد می‌گردد در حدود ۲۰ تا ۲۵ درصد از کل محصول را شامل می‌شود (Huang *et al.*, 2021). با این حال، در کشورهایی که امکانات حمل‌ونقل و ذخیره‌سازی مناسب نیست، این خسارت می‌تواند شدیدتر باشد (Zhu, 2006). این بیماری توسط گونه-های مختلف پکتوباکتریوم از جمله *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) ایجاد می‌شود (Czajkowski *et al.*, 2011). *Pcc* از عوامل اصلی ایجادکننده بیماری مخرب پوسیدگی نرم در بسیاری از سبزیجات مهم اقتصادی مانند هویج (*Daucus carota*) کلم (*Brassica oleracea*)، سیب‌زمینی، پیاز (*Allium cepa*)، خیار (*Cucumis sativus*)، بادمجان (*Solanum melongena*)، سیر (*Allium sativum*)، فلفل دلمه‌ای (*Capsicum annuum*)، تربچه (*Raphanus sativus var.*)، سیب‌زمینی شیرین (*Ipomoea batatas*)، کدو (*Cucurbita maxima*) و گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) می‌باشد (Opra & Asuquo, 2016). استفاده از باکتری‌کش‌های شیمیایی مانند انواع آنتی‌بیوتیک‌ها، برای کنترل باکتری‌های پوسیدگی نرم به‌دلیل اثرات سمی جانبی، هزینه بالا و همچنین ایجاد مقاومت در جمعیت‌های باکتریایی مناسب نمی‌باشد (Vanneste, 2000). به‌کار بردن باکتری‌های مهارکننده زیستی جهت کنترل بیمارگرهای باکتریایی نظیر *Pcc* از روش‌های کاربردی و مفید است که کاربرد ترکیبات شیمیایی برای مهار بیماری را کاهش می‌دهد. استفاده از گونه‌های باکتریایی می‌تواند نقش مهمی در کنترل بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی در سبزیجات داشته باشد و دوره‌های نگهداری غده‌های سیب‌زمینی را در شرایط انبار بدون هیچ گونه عوامل سمی افزایش دهد (Abd-El-Khair *et al.*, 2021). عوامل کنترل زیستی باکتریایی نظیر *Bacillus subtilis* ،*B. pumilus* ،*B. megaterium* و *P. fluorescens* می‌توانند برخی جدایه‌های *Pcc* که باعث بیماری پوسیدگی نرم می‌شوند را کنترل کنند. از بین مشکلات مطرح‌شده در مورد کاربرد ترکیبات شیمیایی، ایجاد مقاومت در باکتری‌های بیمارگر نظیر *Pcc* یکی از مشکلات جدی بوده که راهکارهای مختلفی برای مقابله با آن وجود دارد، از جمله یکی از راه‌های مقابله با مقاومت باکتری‌های بیمارگر به ترکیبات ضد باکتریایی، استفاده از باکتری‌های دارای توانایی مهار زیستی مبتنی بر سیستم ضد احساس حدنصاب (Quorum Quenching: QQ) می‌باشد. سیستم احساس حد نصاب (Quorum Sensing: QS) در باکتری‌ها، توانایی باکتری در آگاهی از جمعیت باکتری‌های پیرامون خود، برای ایجاد تغییرات رفتاری متناسب با تراکم سلولی می‌باشد (Põllumaa *et al.*, 2012). سیستم ضد احساس حدنصاب (Anti-QS) روند ممانعت از اجرای سیستم QS از طریق ایجاد اختلال در پیام‌رسانی (Signaling) می‌باشد (Grandclement *et al.*, 2016). *Pcc* یکی از مهم-ترین باکتری‌هایی است که مسیرهای فیزیولوژیکی و ژنتیکی دخیل در QS در آن بیشتر از سایر باکتری‌های عامل پوسیدگی نرم مشخص شده است (Põllumaa *et al.*, 2012). چون جدایه‌های مختلف *Pcc* مقاومت-های متفاوتی در مقابل عوامل باکتریایی دارای پتانسیل مهار زیستی از خود نشان می‌دهند.

هدف از این مطالعه جداسازی باکتری‌هایی با توانایی مهار زیستی بود که با مکانیسم‌های متفاوت نظیر اثرات ضد باکتریایی یا توانایی QQ قادر به مهار *Pcc* باشند.

بدین امید که به ترکیبی سازگاز و قابل اختلاط از باکتری‌های مفید دست یافته شود که قادر به کنترل تعداد بیشتری از جدایه‌های *Pcc* باشند.

مواد و روش ها

جدایه‌های باکتری

جدایه‌های مورداستفاده که از مجموعه باکتری‌های آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه ایلام تهیه گردید، شامل *Pcc* سویه SCRI193 (*PccK*) و سویه 116B(*PccM*)، باکتری *Bacillus* دارای ژن *aiiA* به‌عنوان شاهد مثبت، باکتری *Chromobacterium violaceum* CV026 به‌عنوان بیوسنسور (حسگر زیستی) بود (Dong *et al.*, 2000; Morohoshi *et al.*, 2008; Põllumaa *et al.*, 2012).

جداسازی باکتری‌های ریزوسفر

جداسازی باکتری ریزوسفر سبزیجات و سیب‌زمینی طبق روش Tam و همکاران (۲۰۱۵) با اندکی تغییر انجام گرفت. بدین ترتیب که کل سیستم ریشه را به بشر حاوی آب مقطر منتقل کرده و به‌مدت ۲۰ دقیقه درون دستگاه شیکر قرار داده شد. پس از طی این مدت زمان، سوسپانسیون موردنظر بر روی محیط آگار مغذی کشت گردیدند و به‌مدت یک هفته درون انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از هر گیاه بیش از یک نوع کلنی باکتریایی روی محیط رشد می کرد، اما فقط یک کلنی از باکتری که جمعیت غالب را داشت جداسازی می‌گردید.

بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌های ریزوسفر روی باکتری بیمارگر *Pcc* به‌روش بخارکلروفرم

به‌منظور بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های باکتری آنتاگونیست علیه باکتری بیمارگر، از روش کشت سه نقطه و بخار کلروفرم استفاده شد (Ryan *et al.*, 2004). در این روش جهت بررسی اثر متقابل، کشت ۲۴ ساعته باکتری به‌صورت لکه‌ای روی محیط آگار مغذی کشت داده و درون انکوباتور نگهداری شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت از رشد باکتری‌ها، آن‌ها را توسط پنبه آغشته به الکل ۹۶ درصد پاک کرده و سپس پتری-ها به‌صورت وارونه قرار داده شد. در ادامه یک قطره کلروفرم درون درب پتری ریخته و به‌مدت ۲۰ دقیقه پتری‌ها بسته شد. پس از طی این مدت، درب پتری را برداشته و به‌مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در زیر هود هوادهی گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر (OD: ۰/۱ در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر) روی محیط به‌صورت یکنواخت پخش شد. پس از نگهداری در انکوباتور به‌مدت ۷۲ ساعت، قطر هاله بازدارنده جهت بررسی اثر بازدارندگی اندازه‌گیری شد. در نمونه شاهد به‌جای باکتری آنتاگونیست، از آب مقطر سترون استفاده شد. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت.

جداسازی باکتری‌های دارای توانایی مهارکنندگی زیستی حاصل از اثر Anti-QS از ریزوسفر

درابتدا یک گرم از ریشه هر گیاه در ۱۰ میلی‌لیتر محلول نمک ۰/۹ درصد ریخته شد و سه بار به‌مدت ۳۰ ثانیه ورتکس گردید. سپس، سانتریفیوژ ۲۰۰۰ دور در دقیقه برای مدت دو دقیقه انجام شد. بعد از رسوب قطعات بزرگ و انتقال فاز رونشین به لوله‌های جدید، سانتریفیوژ ۷۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت پنج دقیقه انجام شد. رسوب حاصل در ده میلی‌لیتر محلول نمک ۰/۹ درصد مجدداً حل گردید و از آن به‌عنوان منبع باکتریایی (Bacterial Consortia) محیط ریزوسفر استفاده شد. منابع باکتریایی در محیط حداقل که تنها منبع کربن و نیتروژن آن‌ها فقط سیگنال‌های AHL شامل C6-oxo-HSL و C8-oxo-HSL تهیه‌شده از شرکت Sigma-Aldrich بود، کشت شدند (Chan *et al.*, 2011). ترکیبات محیط حداقل برحسب میلی‌گرم بر لیتر شامل ۴۰۰ mg/L $MgCl_2$، ۱۰۰۰ mg/L NaCl، ۵۰۰ mg/L KCl، ۱۰۰ mg/L $CaCl_2$، KH_2PO_4 ۲۰۰۰mg/L، ۱۵۰ mg/L Na_2SO_4، Na_2HPO_4 ۲۲۵۰mg/L، ۱۰ mg/L $FeCl_3$، ۴۶ mg/L ZnCl و ۱۰۰ mg/L $MnCl_2$ بودند. در مرحله بعد، ۵۰ میکرولیتر از محیط‌های حداقل حاوی منابع باکتریایی روی محیط کشت‌های عمومی آگار مغذی در دمای ۲۸

درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. ۱۴ روز بعد از کشت، از هر گیاه فقط یک کلنی از باکتری که جمعیت غالب را داشت جداسازی و خالص‌سازی می‌گردید (Christiaen *et al.*, 2011).

غربال باکتری‌های با خاصیت Anti-QS

برای بررسی فعالیت QQ در باکتری‌های جدا شده، از باکتری بیوسنسور *C. violaceum* CV026 استفاده گردید. باکتری‌های مذکور در حضور مولکول‌های سیگنال QS تولید رنگ ارغوانی ویولاسئین می‌کنند ولی در صورت عدم وجود مولکول‌های سیگنال، یا تجزیه سیگنال‌ها رنگ ارغوانی تولید نمی‌شود (D'Angelo-Picard *et al.*, 2005). سیگنال‌های 3-oxo-C6-HSL و 3-oxo-C8-HSL در رقت ۱/۵ میکرومولار برای مدت زمان ۲۴ ساعت در حضور باکتری‌های ریزوسفر و در چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای کشت سلولی انکوبه شدند. هر چاهک حاوی باکتری که نسبت به شاهد رنگ کمرنگ‌تری داشت، به‌عنوان باکتری با توانایی QQ مدنظر قرار گرفت. محاسبه میزان رنگ به‌صورت درصد رنگ نسبت به شاهد با اسپکتروفتومتر انجام گردید. شاهد فقط حاوی باکتری بیوسنسور و سیگنال و فاقد باکتری ریزوسفری بود.

بررسی نوع فعّالیت خاصیت Anti-QS

به منظور بررسی نوع فعّالیت QQ از سه‌روش استفاده شد: ۱- فیلتر کردن نمونه، کشت ۲۴ ساعته باکتری‌های رشد کرده در محیط مایع نوترینت براس (Nutrient Broth)، سانتریفیوژ شدند و فاز رویی آن‌ها از فیلتر میکروبی (۰/۲ میکرون) عبور داده شدند تا باکتری در محیط نباشد. ۲- تیمار حرارتی، نمونه‌های فیلترشده و فیلترنشده به‌مدت ۳۰ دقیقه در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر اتوکلاو شدند. ۳- تیمار پروتئینازی، سوسپانسیون باکتری و محلول فیلترشده و حرارات دیده توسط پروتئیناز K (۸۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با ۱۰۰ میکرولیتر پروتئیناز K ۵۰۰ میلی‌مولار به‌مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد) تیمار شدند (Christiaen *et al.*, 2011). آزمایش برای هر سه حالت مثل روش بررسی فعّالیت QQ در محیط کشت مایع انجام شد. با این تفاوت که به جای باکتری زنده از سه تیمار مذکور استفاده گردید. لذا فقط در صورتی که باکتری آنزیم خارج سلولی یا متابولیت‌های کوچک مرتبط با فعّالیت QQ داشت، کاهش رنگ ارغوانی را نشان می‌داد.

بررسی عدم اثر آنتاگونیستی باکتری‌های با توانایی QQ روی باکتری بیمارگر و نگهداری باکتری‌ها

آزمون بخار کلروفرم مشابه مرحله قبل روی باکتری‌هایی که دارای خاصیت QQ بودند نیز انجام شد تا باکتری‌هایی جدا شوند که فاقد هاله بازدارنده باشند و مکانیسم مهار زیستی آنها بیشتر بر اساس QQ باشد. کلیه جدایه‌های باکتریایی در این پژوهش برای نگهداری طولانی‌مدت در گلیسرول ۲۰ درصد در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

بررسی برهمکنش (Intraction) باکتری‌ها

در ابتدا کلنی منفرد باکتری اول، در امتداد پتری در دو خط موازی کشت شد. بلافاصله پس از آن، کلنی‌هایی از باکتری دوم در نقطه کوچکی تقریباً با فاصله یکسان از هر خط باکتری اولیه قرار داده شد. سپس از یک گوش پاک‌کن سترون برای کشت گونه ثانویه در یک خط عمود بر باکتری اول استفاده شد، به‌طوری که آن‌ها را قطع کرده و ترکیب شوند. سپس پتری‌ها به‌مدت سه روز در دمای ۲۸ درجه‌ی سانتیگراد انکوبه شدند. نتیجه تأثیر برهمکنش بین باکتری‌ها درصورت وجود اثرات بازدارندگی بر هم، به‌صورت یک منطقه شفاف در محل تقاطع آن‌ها قابل مشاهده می‌باشد (Nguyen *et al.*, 2011).

آزمون مهار زیستی باکتری *Pcc* روی بافت سبزیجات

۱- آزمون با یک باکتری ریزوسفر: جهت بررسی توانایی جدایه‌های باکتری ریزوسفر در بازدارندگی از پوسیدگی سبزیجات توسط باکتری بیمارگر، از روش Dong و همکاران (۲۰۰۴) با اندکی تغییرات استفاده شد. بدین منظور، پس از شستشوی سیب‌زمینی، هویج و فلفل

دلمه‌ای جهت ضدعفونی‌کردن غده و سبزیجات، آن‌ها را درون هیپو کلریت سدیم یک درصد به‌مدت دو دقیقه قرار داده و سپس سه مرحله با آب مقطر سترون شستشو شدند. پس از آن، در وسط هر غده سیب‌زمینی، هویج و فلفل دلمه‌ای چاهکی ایجاد گردید. در ادامه، به‌صورت همزمان مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست (cfu/ml ۱۰^۸) و ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر (cfu/ml ۱۰^۸) درون هر چاهک تزریق شد و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۱±۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید. این آزمون با سه تکرار برای هر جدایه با کنترل مثبت (فقط باکتری بیمارگر) و کنترل منفی (فقط آب مقطر) انجام گرفت. برای محاسبه درصد بازدارندگی از محاسبه وزن بافت لهیده-شده تیمارها در مقایسه با شاهد مثبت استفاده گردید.

۲- آزمون مهارکننده زیستی با مخلوط باکتری‌های ریزوسفر: در این مرحله، آزمایشات تماماً مشابه آزمون قبلی انجام گردید، با این تفاوت که به‌جای یک باکتری از مخلوط دو باکتری آنتاگونیست استفاده گردید. غلظت باکتری‌های آنتاگونیست نیز مشابه آزمون قبلی بود (cfu/ml ۱۰^۸) ولی نصف حجم قبلی معادل پنج میکرولیتر از هر یک از دو باکتری همراه با ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بیمارگر (cfu/ml ۱۰^۸) درون هر چاهک ریخته شد.

تشخیص باکتری‌ها

آزمون‌های تشخیصی عمومی و کلاسیک باکتری‌شناسی شامل رنگ‌آمیزی گرم، آزمون رشد هوازی/بی‌هوازی (OF)، آزمون کاتالاز، اکسیداز، تولید رنگ فلئورسنت روی محیط کینگ‌بی، تولید رنگ زرد روی محیط‌های آگار مغذی و YDC، آزمون پکتیناز و لهیدن/عدم لهیدن سبزیجات (غده سیب‌زمینی، هویج، فلفل دلمه‌ای، پیاز، کلم و کاهو) و برخی آزمون‌های بیوشیمیایی دیگر انجام شد (Brenner *et al.*, 2005). جهت تشخیص نهایی حداقل در حد جنس، استخراج DNA از سلول‌های باکتریایی انجام گردید (Cheng & Jiang, 2006). آزمون‌های PCR با استفاده از آغازگرهای ناحیه 16S ریبوزومی انجام گردید (Mamphogoro *et al.*, 2021). الکتروفورز و مشاهده باند مورد نظر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد انجام گردید. محصول PCR برای تعیین توالی ارسال شد. تشخیص نوع باکتری، در پایگاه NCBI، Blast N انجام گرفت و اولین توالی‌هایی که بالاترین تشابه را به توالی هدف داشتند به‌عنوان باکتری احتمالی در نظر گرفته شدند. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها و رسم کلادوگرام از نرم افزار Mega 7 استفاده گردید. بر اساس وضعیت تاکسونومیکی باکتری Outgroup مناسب انتخاب و پس از هم‌ردیف کردن توالی‌های به‌دست آمده، کلادوگرام با هزار بار Bootstrap رسم گردید. آغازگر مورداستفاده -5′ :27f AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ و 1492r: 5′-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3′ بودند. چرخه‌های حرارتی برای انجام واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر شامل ۵ دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، به‌دنبال آن ۳۰ سیکل که هر دوره سیکل شامل ۳۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشتگی و ۳۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت تکثیر و در نهایت تکثیر نهایی به‌مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت.

نتایج و بحث

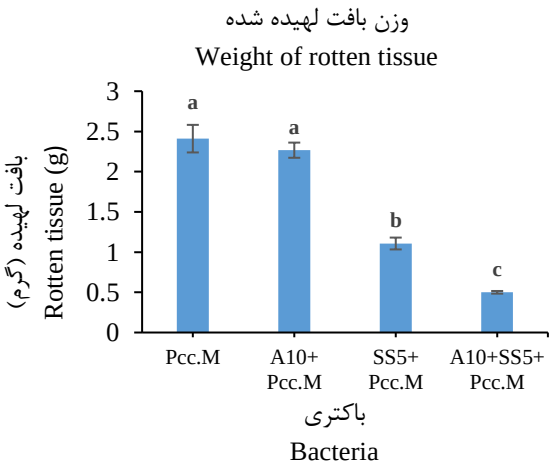
باکتری‌های جداشده با دو خاصیت ضد باکتریایی و Anti-QS

دو مکانیسم معمول برای مهار زیستی باکتری *Pcc* با استفاده از باکتری‌ها پرکاربرد هستند. مورد اول استفاده از باکتری‌های دارای ترکیبات ضدباکتریایی می‌باشد که معمولاً با روش‌هایی نظیر مشاهده هاله بازدارنده مشخص می‌گردد و مورد دوم باکتری‌های دارای مکانیسم QQ برای اختلال درسیستم QS باکتری *Pcc* و به تبع آن مهار بیماری‌زایی در این باکتری است. تعداد ۱۲ باکتری از سبزیجات و غده سیب‌زمینی جداسازی گردید که در جدول ۱ آمده است. یک باکتری با کد A10 خاصیت آنتاگونیستی قابل قبولی روی پتری علیه

Pcc نشان داد. بقیه تأثیرات جزئی داشتند یا فاقد اثرات مستقیم ضدباکتریایی بودند (جدول ۱). از بین باکتری-های جداشده فقط یک جدایه SS5 بود که هم خاصیت QQ در آزمون انجام‌شده با بیوسنسور علیه هر دو نوع سیگنال غالب در *Pcc* ها (C6-oxo-HSL و C8-oxo-HSL) نشان داد و هم توانست درصد لهیدگی روی تمام سبزیجات و غده سیب‌زمینی را بعد تلقیح دو جدایه *PccM* و *PccK* کاهش دهد (جدول ۱). در تحقیقات مختلف از ریزوسفر انواع گیاهان باکتری‌های متنوعی با توانایی QQ جداسازی شده است که قادر به کاهش بیماریزایی *Pcc* روی غده و سبزیجات می‌باشند (Padilla-Gálvez *et al.*, 2021). در این تحقیق نیز چنین باکتری یافت شد. در بررسی نوع فعالیت QQ مشخص گردید که بعد از فیلتر کردن و حرارت دادن و یا استفاده از پروتئیناز خاصیت QQ در SS5 از دست می‌رود لذا نوع فعالیت به‌احتمال زیاد آنزیمی و درون سلولی تشخیص داده شد. چون در عدم حضور باکتری فعالیت QQ مشاهده نگردید و از طرفی با حرارت و یا پروتئیناز خاصیت از دست می‌رفت که این ویژگی عمدتاً مرتبط با نوع فعالیت پروتئینی/آنزیمی است نه متابولیت و ترکیبات شیمیایی. لذا به احتمال زیاد یک یا چند آنزیم در این باکتری در بروز پدیده QQ نقش داشته‌اند، هرچند که اثبات دقیق آن مستلزم تحقیقات تکمیلی روی ژن‌های شناخته شده در این باکتری‌ها می‌باشد.

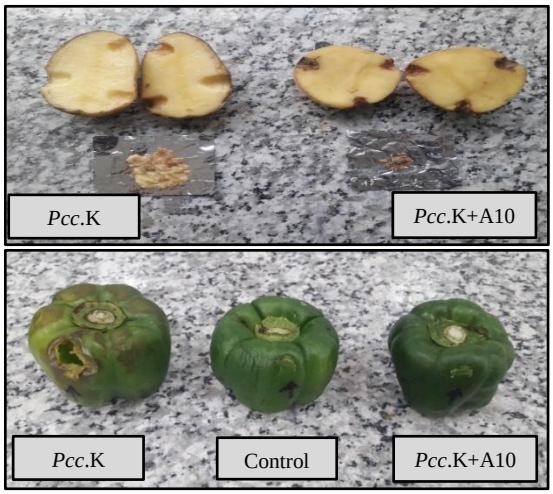
آزمون‌های مهارکنندگی زیستی روی بافت غده و سبزیجات

در این آزمایشات تمام باکتری‌ها روی غده آزمایش شدند و نتایج تقریباً با آزمون روی پتری همخوانی داشت. نتایج کار روی میزبان‌های مختلف نشان داد که سیب‌زمینی میزبان حساس به بیماری می‌باشد که تأثیر عوامل مهارکننده زیستی روی آن کمتر است. باکتری‌هایی که روی یک استرین *Pcc* روی سیب‌زمینی اثری نداشتند روی سایر سبزیجات و میزبان‌ها هم بی‌اثر بودند و نتایج مشابه بود. اما در مواردی که باکتری قادر به کنترل بیمارگر روی غده سیب‌زمینی با هر درصد کاهش بیماری (متوسط یا بالا) بود (در شرایط کاملاً مشابه با آزمون روی سیب‌زمینی مانند غلظت و میزان باکتری-های به‌کار رفته و شرایط محیطی و غیره) روی سایر میزبان‌ها تقریباً به‌طور کامل بیماری را کنترل می‌کرد (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱- نتایج کاربرد دو جدایه باکتری A10 و SS5 به‌صورت جداگانه و ترکیبی

Figure 1- Results of application of two isolates of A10 and SS5 bacteria, seperately and in combination



شکل ۲- مقایسه مقدار بافت لهیده بین کنترل مثبت و تیمار. *Pcc*K: کنترل مثبت (باکتری بیمارگر) و *Pcc*K+A10: تیمار (ترکیب باکتری بیمارگر و آنتاگونیست)

Figure 2- Comparison of the amount of rotten tissue between positive control and treatment. *PccK*: Positive control (pathogenic bacteria). *PccK* + A10: Treatment (combination of pathogenic bacteria and antagonist)

جدول۱- لیست باکتری‌های جداشده از ریزوسفر سبزیجات و سیب‌زمینی

Table 1- List of bacteria isolated from the rhizosphere of vegetables and potatoes

شماره Number	کد Code	میزبان Host	محل نمونه برداری Sampling location	صفت ۱ Trait 1	صفت ۲ Trait 2		صفت ۳ Trait 3			صفت ۴ Trait 4		
1	SS1	پیاز Onion	دره شهر (ایلام) Dare Shahr (Ilam)	-	0 c	0 a	0 c	0 c	0 c	0 d	0 d	0 d
2	SS2	پیاز Onion	دره شهر (ایلام) Dare Shahr (Ilam)	-	0	0	0	0	0	0	0	0
3	H23	هویج Carrot	مرودشت (فارس) Marvdasht (Fars)	+	0	0	1.5 bc	2.3 c	3 c	3 c	3.3 c	3.3 b
4	SS4	کاهو Lettuce	قیر و کارزین (فارس) Qir and Karzin (Fars)	-	0	0	0	0	0	0	0	0
5	SS5	سیب‌زمینی Potato	فریدون شهر (اصفهان) Fereydunshahr (Isfahan)	+	0	0	53.92a	95 a	100 a	68 b	94 b	100 a
6	SS6	سیب‌زمینی potato	فریدون شهر (اصفهان) Fereydunshahr (Isfahan)	-	0	0	0	0	0	0	0	0
7	SS7	سیب‌زمینی potato	داریان (فارس) Darian (Fars)	-	0	0	0	0	0	0	0	0
8	SS8	سیب‌زمینی potato	داریان (فارس) Darian (Fars)	-	0	0	0	0	0	0	0	0
9	SS9	کلم cabbage	شهرستان رستم (فارس) Fars (Rostam city)	-	0	0	0	0	0	0	0	0
10	SS10	کلم cabbage	شهرستان رستم (فارس) Fars (Rostam city)	-	0	0	0	0	0	0	0	0
11	SS11	پیاز Onion	شهرستان رستم (فارس) Fars (Rostam city)	-	0	0	0	0	0	0	0	0
12	SS12	سیر Garlic	بیضاء (فارس) Biza (Fars)	-	0	0	0	0	0	0	0	0
13	B70	کاهو Lettuce	قیر و کارزین (فارس) Qir and Karzin (Fars)	*	3 b	0	0	0	0	2.5 c	0	0

14	A8	پیاز Onion	ایلام (دره‌شهر) Dare Shahr (Ilam)	*	0	0	0	0	0	0	0	0
15	A9	پیاز Onion	ایلام (دره‌شهر) Dare Shahr (Ilam)	*	0	0	0	0	0	0	0	0
16	A10	پیاز Onion	ایلام (دره‌شهر) Dare Shahr (Ilam)	*	16.67a	2a	5.81b	15 b	21.6 b	91.33 a	100 a	100 a
17	A11	پیاز Onion	ایلام (کارزان) Ilam (Karezan)	*	0	0	0	0	0	0	0	0
18	C1	کلم cabbage	فارس (شهر رستم) Fars (Rostam city)	*	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
19	C2	کلم cabbage	فارس (شهر رستم) Fars (Rostam city)	*	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
20	C3	کلم cabbage	فارس (شهر رستم) Fars (Rostam city)	*	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
21	C4	کلم cabbage	فارس (شهر رستم) Fars (Rostam city)	*	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22	C5	کلم cabbage	فارس (شهر رستم) Fars (Rostam city)	*	0	0	0	0	0	0	0	0
23	H10	هویج Carrot	مرودشت (فارس) Marvdasht (Fars)	*	3b	2a	2 bc	2.5 c	2.8 c	2.5 c	3.5 c	4.1 b
24	R15	فلفل دلمه-ای Shiraz	شیراز	*	2b	1 a	1.1 bc	2.5 c	3.88 c	2 cd	3.2 c	3.6 b

حروف هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بین داده‌های همان ستون است. *: بر اساس این مکانیسم جداسازی صورت نگرفته است. ND: تعیین نشده. صفت ۱: خاصیتQQ علیه بیوسنسور، صفت ۲: میانگین قطر هاله بازدارنده (میلی‌متر) علیه *PccK-PccM*، صفت ۳: درصد بازدارندگی روی غده سیب‌زمینی، هویج و فلفل دلمه‌ای برای *PccM*، صفت ۴: درصد بازدارندگی روی غده سیب زمینی، هویج و فلفل دلمه‌ای برای *PccK*.

The letters in each column indicate a significant difference at the five percent probability level between the data in the same column. *: Isolation has not been done Trait 1: QQ property against biosensor, Trait 2: Average based on this mechanism. ND: Not determined.

تشخیص باکتری‌ها

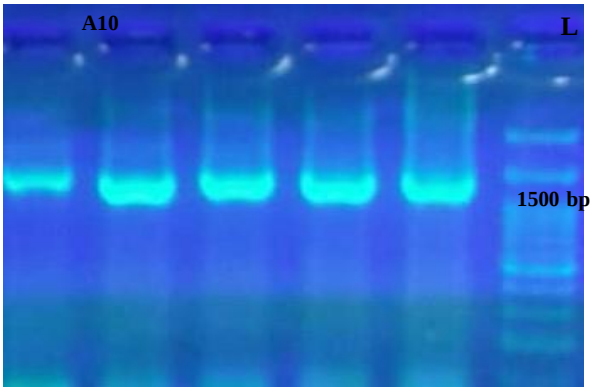
SS5 یک باکتری کرم رنگ، گرم منفی، هوازی اجباری، لوان، اکسیداز و کاتالار مثبت، ایجاد حالت فلئورسنت روی محیط KingB و فاقد توانایی لهانیدن سیب‌زمینی و سایر سبزیجات (کاهو ، هویج و فلفل دلمه‌ای) بود که باکتری .*Psudomonas* sp تشخیص داده شد (جدول ۲). به‌دلیل کافی بودن آزمون‌های کلاسیک جهت تأیید جنس سدوموناس، نتایج مولکولی برای SS5 ذکر نگردید. جدایه A10 یک باکتری زرد رنگ (روی محیط‌های آگار مغذی و YDC)، کاتالاز مثبت و اکسیداز منفی، لوان مثبت، بی‌هوازی اختیاری، فاقد توانایی لهانیدن سیب‌زمینی و سایر سبزیجات (کاهو ، هویج و فلفل دلمه‌ای) و تولیدکننده حالت سبز متالیک روی EMB بود (جدول ۲) که بعد از توالی‌یابی و Blast کردن .*Pantoea* sp تشخیص داده شد (کد دسترسی ON159735.1). مثال‌های متعددی در مورد مکانیسم-های مهار زیستی مبتنی بر خاصیت ضدباکتریایی و QQ وجود دارد. A10 یک باکتری از جنس *Pantoea* بوده و از ریزوسفر پیاز جدا گردید و روی گیاهان دیگری (سیب‌زمینی، فلفل دلمه‌ای و هویج) علیه *Pcc* مؤثر واقع گردید. در تحقیقات مختلف مشخص شده است که برخی از گونه‌های این جنس باکتریایی تأثیر مهار زیستی خوبی روی عوامل بیمارگر مختلف قارچی و باکتریایی نشان داده‌اند. به‌عنوان نمونه *P. jilinensis* D25 در مهار زیستی قارچ *Botrytis cinerea* تأثیر خوبی داشته است (Zheng *et al.*, 2021). همچنین باکتری *P. agglomerans* توانایی مناسبی در کنترل بیماری باکتریایی *Ralstonia solanacearum* در شرایط گلخانه نشان داده است (Abo-Elyousr & Hassan, 2021). در تحقیقی دیگر مشخص گردید گونه‌هایی از این جنس که از گیاهان دیگری جداسازی شده‌اند مانند *Pantoea agglomerans* R190 (که از سیب جدا گردید) قادر به مهار *Pcc* می‌باشد (Lim *et al.*, 2015). در این تحقیق جدایه SS5 از جنس *Pseudomonas* با خاصیت QQ شناسایی شد که قادر به کاهش قابل توجه میزان بیماری‌زایی بود بطوریکه حتی روی یکی از جدایه‌های *Pcc*، تنها باکتری دارای توان مهار زیستی بالا بود. در تحقیقات دیگری نیز *Pseudomonas*ها به‌عنوان باکتری‌های مختل‌کننده سیستم احساس حد نصاب شناخته شدند که قادر هستند بیماری‌زایی را در باکتری‌های بیمارگر گیاهی نظیر *P. atrosepticum*، *Dickeya solani* و *Pcc* کاهش دهند (Rodriguez *et al.*, 2020). سازوکارهای مختلفی برای QQ وجود دارد. دو مکانیسم مهم در باکتری‌های دارای توانایی QQ شناخته شده است. مورد اول وجود ترکیبات با ساختار مشابه سیگنال‌های QS باکتری بیمارگر، در باکتری QQ است. این ترکیبات شیمیایی دارای ساختار مشابه مولکول خود القاءگر باکتری بیمارگر می‌باشند که می‌توانند با جایگزین شدن به‌جای سیگنال باکتری بیمارگر و تقلید از این مولکول سیگنال، به پروتئین تنظیمی متصل شده و در نتیجه این پروتئین نمی‌تواند به جایگاه اختصاصی خود متصل گردد. در نتیجه این عمل، QS و به‌دنبال آن پدیده‌های مرتبط با آن مثل بیماری‌زایی در باکتری بیمارگر مختل می‌شود. مثلاً برخی ترکیبات با خواص مذکور مانند N-[2-(1H-indol-3-yl)ethyl]-urea در باکتری *Staphylococcus* شناخته شده اند (Chu *et al.*, 2013). مکانیسم دیگر استفاده از آنزیم‌هایی است که حلقه AHL یا زنجیره کربنی آن را شکسته و با تجزیه و غیر فعّال کردن مولکول سیگنال باکتری، QS را مختل می‌کنند. این آنزیم‌ها در موجودات مختلف از جمله برخی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی وجود دارند (Wang *et al.*, 2022). یکی از مکانیسم‌هایی که در *Pseudomonas*ها باعث کنترل بیماری و پدیده QQ می‌گردد وجود آنزیم‌هایی تحت عنوان AHL-acylaseها در این باکتری‌ها است که عمل این آنزیم‌ها براساس شکستن باند کربن نیتروژن آمیدی بین زنجیره اسید چرب و جزء هموسرین لاکتون می‌باشد. امروزه آنزیم‌های آسیلازی نظیر QuiP، PvdQ و HacB در گونه‌ها و جدایه‌های مختلف *Pseudomonas*ها شناسایی گردیده‌اند (Shen *et al.*, 2021). از آنجا که در بررسی نتایج مکانیسم QQ در سودوموناس تحقیق

اخیر با استفاده از حرارت دادن و فیلتر کردن مشخص شد که به احتمال زیاد مکانیسم QQ در این باکتری هم از نوع آنزیمی و درون سلولی می‌باشد؛ لذا به احتمال زیاد یک یا چند مورد از آنزیم‌های ذکرشده در بالا در بروز پدیده QQ در این باکتری نقش داشته‌اند. هرچند که اثبات دقیق آن مستلزم تحقیقات تکمیلی روی ژن های شناخته شده در این باکتری‌ها می‌باشد. شکل ۳، اندازه باندها در باکتری‌های مختلف در محدوده bp ۱۴۵۰-۱۵۰۰ و شکل ۴، کلادوگرام به‌دست آمده برای جدایه A10 را نشان می‌دهد.

جدول ۲- مشخصات دو باکتری با توانایی مهار زیستی بر اساس آزمون‌های کلاسیک باکتری‌شناسی

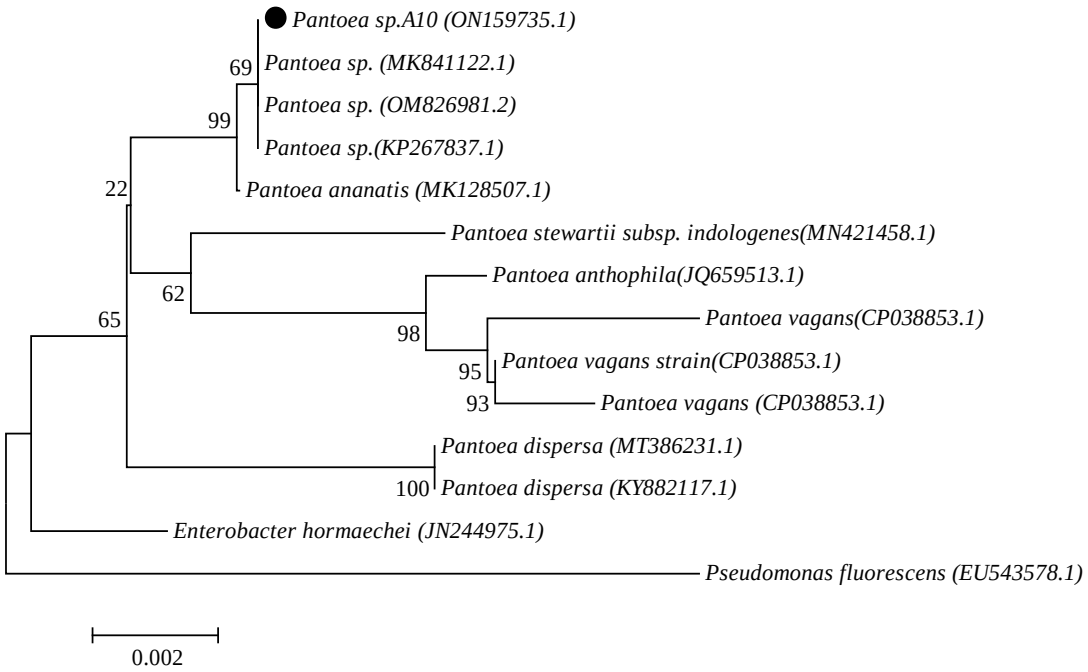
Table 2 - Characteristics of two bacteria with the bio-control ability based on classic bacteriological tests

آزمون‌ها Tests	SS5	A10
گرم Gram	گرم منفی Gram-negative	گرم منفی Gram-negative
هوازی/ بی‌هوازی Oxidative/Fermentative	هوازی اجباری Obligate aerobic	بی‌هوازی اختیاری Facultative anaerobic
کاتالاز Catalase	+	+
اکسیداز Oxidase	+	-
تولید رنگ فلئورسنت روی محیط King B Production of fluorescent pigment on King B medium	+	-
لهانیدن سیب زمینی و سایر سبزیجات Potato and other vegetables rot	-	-
رنگ روی محیط‌های آگار مغذی و YDC Color on nutrient agar and YDC media	کرم Cream	زرد Yellow
رنگ سبز متالیک روی محیط EMB The metallic green color on EMB medium	-	+
تولید لوان Levan production	+	+



شکل ۳- تصویر ژل الکتروفورز، اندازه باندها در باکتری‌های مختلف در محدوده 1450-1500 bp می‌باشد. از سمت راست چاهک اول لدر (L) است و چاهک آخر جدایه A10 می باشد.

Figure 3 - Image of gel electrophoresis, the size of the bands in different bacteria are in the range of 1500-1450 bp. To the right, the first and the last wells are ladder (L) and the A10 isolate, respectively.



شکل۴– کلادوگرام به‌دست آمده برای جدایه A10

Figure 4 - Cladogram obtained for A10 isolate

بررسی اثرات برهمکنشی دو جدایه باکتری با مکانیسم های متفاوت در محیط کشت و روی بافت گیاه

باکتری دارای بیشترین هاله بازدارنده در آزمون بخار-کلروفرم (A10) در ترکیب با باکتری دارای مکانیسم QQ با بهترین اثر زیستی (جدایه SS5) روی بافت غده و سبزیجات آزمایش شدند. این دو باکتری اثرات بازدارندگی علیه یکدیگر روی محیط کشت نشان ندادند. مشاهده گردید که ترکیب این دو باکتری به طور معنی-داری اثر مهار زیستی بیشتری روی *PccM* در مقایسه با کاربرد تنهای هر کدام از باکتری‌ها دارد (شکل۱). کاربرد ترکیب دو باکتری در آزمون مهار زیستی، در مقایسه با حالت کاربرد تنهای SS5، ۲/۲۱ برابر و در مقایسه با کاربرد تنهای A10، ۴/۵۳ برابر کمتر بافت لهیده ایجاد کرد. درمورد *PccK* اثر ترکیبی از تأثیر انفرادی بیشتر نبود. در برخی پژوهش‌ها مشخص شده است که گاهاً ترکیب چند باکتری دارای پتانسیل مهار زیستی با یکدیگر باعث افزایش اثرات مهار زیستی آن‌ها روی بعضی از بیمارگرهای گیاهی می‌گردد. به‌عنوان مثال ترکیب دو سویه اندوفیت *Bacillus subtilis* و یک سویه *Pseudomonas fluorescens* در مقایسه با کاربرد تنهای هر عامل، باعث افزایش عملکرد آن‌ها در کنترل پژمردگی فلفل در اثر *Fusarium solani* می-گردد (Sundaramoorthy *et al.*, 2012). تاکنون تحقیقات بسیارکمی مشابه با پژوهش اخیر در مورد اثرات کاربرد مخلوط باکتری‌های مهار زیستی ریزوسفر در کاهش بیماری‌زایی *Pcc* صورت گرفته است، خصوصاً در این حالت که به‌طور مثال در بررسی‌های ساده اولیه روی محیط کشت و بافت گیاه تقریباً اثر معنی‌داری ضد *PccM* در کاربرد باکتری A10 مشاهده نگردید، ولی وقتی با SS5 ترکیب گردید، حالت افزایشی در خاصیت مهار زیستی را باعث شد. در پژوهش‌های مشابه عمدتاً دو باکتری که به‌تنهایی اثرات مهار زیستی خوبی را نشان داده‌اند، ترکیب آن‌ها نیز باعث افزایش این ویژگی گردیده است، اما در این پژوهش در اثر ترکیب دو - باکتری که یکی از آن‌ها خاصیت مهار زیستی با مکانیسم QQ داشت و دیگری تقریباً فاقد اثر مهار زیستی یا دارای اثرات محدود روی برخی میزبان‌ها بود؛ بیماری در مقایسه با کاربرد تنهای یک باکتری، بیشتر کاهش پیدا کرد یا به عبارتی خاصیت مهار زیستی افزایش یافت.

همچنین در سال‌های اخیر مطالعاتی صورت گرفته که نشان می‌دهد برخی باکتری‌ها و عوامل میکروبی در ترکیب با یکدیگر در محیط کشت (Co-culture) ترکیباتی تولید می‌کنند که در کشت تنها در محیط کشت مشابه، این ترکیبات تولید نمی‌گردند (Cheng *et al.*, 2020; Abd-El-Khair *et al.*, 2021). اما در این تحقیق شرایط آزمایش متفاوت بود و باکتری‌ها برای مدت طولانی در محیط کشت با هم ترکیب نشدند که منجر به تولید متابولیت‌های احتمالی مؤثر در مهار زیستی گردند. جالب‌توجه اینکه اثر ترکیب دو باکتری برای کنترل جدایه *PccM* که سخت‌تر کنترل می‌گردید بیشتر مؤثر واقع شد و این نکته از جنبه کاربردی اهمیت دارد چون ثابت می‌کند با ترکیب باکتری‌های مهارکننده زیستی امکان مهار جدایه‌های بیمارگر مشکل زا وجود دارد. با این حال، با تحقیق اخیر نمی‌توان علت پدیده را به‌طور کامل مشخص نمود و بررسی و درک مکانیسم واقعی آن‌ها مستلزم مطالعات جدید و تکمیلی در پژوهشی مجزا دارد. در عین حال امید است این پژوهش ساده دریچه‌ای به سوی تحقیقات گسترده‌تر در این زمینه و زمینه‌های مشابه باز کند.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش برای اولین بار مشخص گردید که دو باکتری با مکانیزم‌های متفاوت مهار زیستی از دو جنس مختلف شامل سدوموناس و پانتوآ به‌طور جداگانه و در ترکیب باهم قادر به کنترل *Pcc* هستند. برای اولین بار بهبود خاصیت مهارکنندگی زیستی این دو باکتری در ترکیب با یکدیگر مشخص گردید. همچنین مشخص شد نتیجه تأثیر این باکتری‌های مختلف روی کنترل هر جدایه *Pcc* و حتی هر یک از میزبان‌های سبزیجات یا غده سیب‌زمینی می‌تواند متفاوت باشد. به‌نحوی که یک جدایه گاهاً کاملا مهار می‌شد و جدایه دیگر، باکتری‌ها روی آن تأثیر کمتری داشتند. مکانیسم QQ در باکتری‌های مهارکننده زیستی ظاهراً تأثیر عمومی‌تری نسبت به تأثیر ضد باکتریایی دارد به‌نحوی که هرچند اثر آن‌ها از جدایه به جدایه فرق دارد، اما چون مسیر فیزیولوژیکی پایه‌ای و اساسی مشترک در تمام *Pcc*ها را مختل می‌کند، روی همه جدایه‌های *Pcc* موثر است.

References

- Abd-El-Khair, H., Abdel-Gaied, T. G., Mikhail, M. S., Abdel-Alim, A. I. & El-Nasr, H. I. S. (2021). Biological control of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, the causal agent of bacterial soft rot in vegetables, in vitro and in vivo tests. *Bulletin of the National Research Centre*, 45(1), 1-9.
- Abo-Elyousr, K. A. & Hassan, S. A. (2021). Biological control of *Ralstonia solanacearum* (Smith), the causal pathogen of bacterial wilt disease by using *Pantoea* spp. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1), 1-8.
- Algeblawi, A. & Adam, F. (2013). Biological control of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Chemical, Environmental Biological Sciences*, 1(5), 1-15.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T., Garrity, G. M., Boone, D. R., Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F. & Schleifer, K. (2005). In Bergey s manual of systematic bacteriology: the *proteobacteria*; part B: the *gammaproteobacteria*, 1106-1106.
- Chan, K.-G., Yin, W.-F., Sam, C.-K. & Koh, C.-L. (2009). A novel medium for the isolation of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 36(2), 247-251.

- Cheng, H. R. & Jiang, N. (2006). Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology letters*, 28(1), 55-59.
- Cheng, F., Li, G., Peng, Y., Wang, A. & Zhu, J. (2020). Mixed bacterial fermentation can control the growth and development of *Verticillium dahliae*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34(1), 58-69.
- Christiaen, S. E., Brackman, G., Nelis, H. J. & Coenye, T. (2011). Isolation and identification of quorum quenching bacteria from environmental samples. *Journal of Microbiol Methods*, 87(2), 213-219.
- Chu, Y. Y., Nega, M., Wölfle, M., Plener, L., Grond, S., Jung, K., & Götz, F. (2013). A new class of quorum quenching molecules from *Staphylococcus* species affects communication and growth of gram-negative bacteria. *PLoS Pathogens*, 9(9), e1003654.
- Czajkowski, R., Perombelon, M. C., van Veen, J. A. & van der Wolf, J. (2011). Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology*, 60(6), 999-1013.
- D'Angelo-Picard, C., Faure, D., Penot, I. & Dessaux, Y. (2005). Diversity of N-acyl homoserine lactone-producing and-degrading bacteria in soil and tobacco rhizosphere. *Environmental Microbiology*, *7*(11), 1796-1808.
- Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z. & Zhang, L. H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7), 3526-3531.
- Dong, Y. H., Zhang, X. F., Xu, J. L., & Zhang, L. H. (2004). Insecticidal Bacillus thuringiensis silences *Erwinia carotovora* virulence by a new form of microbial antagonism, signal interference. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 954-960.
- Grandclement, C., Tannières, M., Moréra, S., Dessaux, Y. & Faure, D. (2016). Quorum quenching: role in nature and applied developments. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 86-116.
- Huang, X., Ren, J., Li, P., Feng, S., Dong, P. & Ren, M. (2021). Potential of microbial endophytes to enhance the resistance to postharvest diseases of fruit and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(5), 1744-1757.
- Opara, E. & Asuquo, A. (2016). An overview of characterization and identification of soft rot bacterium *Erwinia* in some vegetable crops. *Greener Journal of Biological Sciences*, 6(3), 046-055.
- Lim, J. A., Lee, D. H., Kim, B. Y. & Heu, S. (2014). Draft genome sequence of *Pantoea agglomerans* R190, a producer of antibiotics against phytopathogens and foodborne pathogens. *Journal of biotechnology*, 188, 7-8.
- Mamphogoro, T. P., Kamutando, C. N., Maboko, M. M., Aiyegoro, O. A. & Babalola, O. O. (2021). Epiphytic bacteria from sweet pepper antagonistic in vitro to *Ralstonia solanacearum* BD 261, a causative agent of bacterial wilt. *Microorganisms*, 9(9), 1947.
- Morohoshi, T., Kato, M., Fukamachi, K., Kato, N. & Ikeda, T. (2008). N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. *FEMS microbiology letters*, 279(1), 124-130.
- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer,

K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J. & Wang, Y. (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science*, 3P34(6058), 982-986.

- Padilla-Gálvez, N., Luengo-Uribe, P., Mancilla, S., Maurin, A., Torres, C., Ruiz, P., France, A., Acuna, I. & Urrutia, H. (2021). Antagonistic activity of endophytic actinobacteria from native potatoes (Solanum tuberosum subsp. tuberosum L.) against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Pectobacterium atrosepticum*. *BMC microbiology*, 21(1), 1-17.
- Põllumaa, L., Alamäe, T. & Mäe, A. (2012). Quorum sensing and expression of virulence in *pectobacteria*. *Sensors*, 12(3), 3327-3349.
- Rodriguez, M., Torres, M., Blanco, L. & Bejar, V. (2020). Plant growth-promoting activity and quorum quenching-mediated biocontrol of bacterial phytopathogens by *Pseudomonas segetis* strain P6. *Scientific Reports*, 10: 4121.
- Ryan, A. D., Kinkel, L. L. & Schottel, J. L (2004). Effect of pathogen isolate, potato cultivar, and antagonist strain on potato scab severity and biological control. *Biocontrol Science Technology*, 14(3), 301-311.
- Sharma, R., Singh, D., & Singh, R. J. B. c. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control*, 50(3), 205-221.
- Shen, Y., Cui, F., Wang, D., Li, T. & Li, J. (2021). Quorum Quenching Enzyme (PF-1240) Capable to Degrade AHLs as a Candidate for Inhibiting Quorum Sensing in Food Spoilage Bacterium Hafnia alvei. *Foods*, 10(11).
- Sundaramoorthy, S., Raguchander, T., Ragupathi, N. & Samiyappan, R (2012). Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biological Control*, 60(1), 59-67.
- Tam, H. M. & Diep, C. N. (2015). Isolation and identification of Rhizospheric bacteria in sugarcane (Saccharum spp. L.) cultivated on Acrisols and Ferrasols of Dong Nai Province, the southeast of Vietnam. *American Journal of Life Science*, 3, 109-118.
- Vanneste, J. L. (2000). Fire blight: the disease and its causative agent, *Erwinia amylovora*: CABI.
- Wang, D., Chen, H., Li, J., Li, T., Ren, L., Liu, J. & Shen, Y. (2022). Screening and validation of quorum quenching enzyme PF2571 from *Pseudomonas fluorescens* strain PF08 to inhibit the spoilage of red sea bream filets. *International Journal of Food Microbiology*, 362, 109476.
- Zheng, L., Zhang, J., Wu, X., Gu, X., Wang, Sh. & Zhang, H. (2021). A novel bio-control strain *Pantoea jilinensis* D25 for effective bio-control of tomato gray mold (causative agent *Botrytis cinerea*). *Biological Control*, 164, 104766.
- Zhu, S. (2006). Non-chemical approaches to decay control in postharvest fruits. *Advances in postharvest technologies for horticultural crops*, 12(1), 297-313.