Research Article

Iranian Journal of Forest and Poplar Research Vol. 31 No. 4, 2024
Vol. 31, No. 4, Page 277-291 (2024)
DOI: 10.22092/ijfpr.2023.363172.2114

Assessment of the Phenotypic and Genotypic Diversity of Endophytic Bacillus Strains Isolated from the Roots of Hornbeam (*Carpinus betulus* L.) in Mazandaran and Golestan Provinces, Iran

S.M. Alavi [1], H. Rahimian [2*], S. Tarighi [3] and M. Mehrvar [3]

1- Ph.D. Student of Phytopathogenic Prokaryotes, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2*- Corresponding author, Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail: h.rahimian@sanru.ac.ir
3- Associate Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 10.08.2023 Accepted: 30.09.2023

Abstract

Background and objectives: The beneficial characteristics of endophytic bacteria in general and environmental safety features of *Bacillus* spp. in particular, have made them potentially efficacious bacteria for plant growth promotion as well as plant defense elicitation against biotic and abiotic stresses. Given that the preservation of biodiversity and sustainability of the Hyrcanian forests in Iran is of utmost importance ecologically and environmentally, proper management of this ecosystem demands considerable attention and care. Studying the microbiome structure and activities, including determination of microorganisms living as endophytes or commensals can be regarded as the starting steps in this context. This study was aimed at the molecular identification and physiological characterization of endophytic *Bacillus* isolates recovered from the roots of hornbeam (*Carpinus betulus* L.) trees in some different locations of Hyrcanian forests.

Methodology: Samples of hornbeam roots were randomly collected from Mazandaran and Golestan provinces, Iran, in the early spring of 2020. Root segments were surface-disinfected, washed in sterile distilled water (SDW) and crushed in drops of SDW using a sterile mortar and pestle. Isolation of bacteria was done by spreading drops of the suspension on plates of tryptic soy agar (TSA). Single colonies were selected after 3-4 days of incubation at 28˚C and restreaked on TSA to obtain pure cultures. Initial identification of the isolates was based on colony morphology, Gram-stain reaction, position of endospores, and production of catalase and oxidase. The isolates were characterized phenotypically, and their diversity was assessed by comparing their DNA fragment patterns following their amplification by REP-, BOX- and IS50-PCR and electrophoresis on agarose gels. The data were converted into a binary matrix using TotalLab TL120 software, where the digits 1/0 represented the presence/absence of a DNA band. Similarity matrix and clustering were generated using NTSYS 2.02e software based on the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) clustering algorithm. A representative isolate was selected for each of the DNA profile groups and a fragment of the 16S rRNA and HSP60 genes of each was amplified by PCR. PCR products were sequenced by Microsynth company (Switzerland) through the Sanger sequencing method. The nucleotide sequences were aligned and compared with those of a collection of *Bacillus* species retrieved from GenBank using the BLASTn program. Phylogenetic trees were constructed using the Maximum-Likelihood and Neighbor-Joining methods with 1000 bootstraps in MEGA X software package. Antibacterial activity of *Bacillus* isolates against *Brenneria roseae*, the causal agent of hornbeam wetwood disease, was investigated using sterilized blank paper disk impregnated with extracts prepared in dichloromethane. The isolates were assessed for their capacity to produce Indole acetic acid (IAA), hydrogen cyanide, protease, and biofilm.

Results: Thirty bacterial strains were isolated from hornbeam roots on TSA medium and subsequently characterized. The absence of bacterial colonies on the TSA plates inoculated with the final rinse water from the uncrushed bark fragments indicated the effectiveness of the surface disinfection procedure. The isolates were grouped into three clusters based on their phenotypic and genotypic characteristics. Comparison of the nucleotide sequences of the 16S rDNA and HSP60 with the sequences obtained from GenBank (NCBI) led to the identification of *Bacillus thuringiensis*, *B. subtilis*, and *B. mycoides* as the species constituting the three clusters, with *B. thuringiensis* being the predominant group. *B. subtilis* was the most populated and B. mycoides the least encountered species. Phylogenetic analysis based on the HSP60 gene sequence proved to be a reliable approach for determining the Bacillus species. IAA production level varied from eight to 75 mg/L among the species, with B. mycoides isolates producing the highest and *B. subtilis* the lowest levels of IAA. Most of the isolates had the capability to produce lipase, gelatinase, lecithinase, protease, and amylase. The isolates of B. thuringiensis produced higher levels of protease than the rest of the isolates. Biofilm production was particularly prominent in isolates of *B. subtilis*. The dichloromethane extract of B. subtilis isolate rAqa2 exhibited the highest growth inhibition (18.3 ± 0.25mm in diameter) of *Brenneria roseae*.

Conclusion: A high level of genotypic and phenotypic heterogeneity existed among the endophyte isolates recovered from the roots of *C. betulus*, despite their isolation from a common source species. This could be partly justified by viewing the Hyrcanian forests as a mixed-species ecosystem and a source of microbial consortia that could protect plants against stresses. This study is the first investigation on the molecular identification and characterization of endophytic *Bacillus isolates* from hornbeam roots in Iran.

Keywords: *Bacillus*, endophyte, hornbeam, IAA, isolate, sequences.

تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی گونه‌های باسیلوس درون‌رُست در ریشه درختان ممرز (*Carpinus betulus* L.) در استان‌های مازندران و گلستان

سیدمحمد علوی [۱]، حشمت اله رحیمیان [۲*]، سعید طریقی [۳] و محسن مهرور [۳]

۱ – دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲*– نویسنده مسئول، استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

پست الکترونیک: h.rahimian@sanru.ac.ir

۳– دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۸/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۷/۰۸

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های درون‌رُست به‌ویژه گونه‌های باسیلوس (*Bacillus* spp.)، به‌دلیل ویژگی‌های سودمند و ایمنی محیط‌زیستی به عنوان منبعی مهم برای افزایش رشد و مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده استفاده می‌شوند. باتوجه‌به اینکه حفاظت از تنوع گیاهی و پایداری موجود در جنگل‌های هیرکانی، اهمیت ویژه‌ای در مدیریت این بوم‌سازگان حیاتی شمال کشور دارد، شناسایی و تعیین ویژگی‌های باکتری‌های مفید و ارزشمند با اثرات محافظت‌کنندگی در گیاهان این منطقه می‌تواند نقش مهمی در این زمینه داشته باشد. پژوهش پیش‌رو با هدف جداسازی، شناسایی و ارزیابی تنوع جدایه‌های باسیلوس درون‌رست در ریشه درختان ممرز (*Carpinus betulus* L.) در جنگل‌های هیرکانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: جدایه‌های باسیلوس با روش نمونه‌برداری تصادفی از ریشه درختان ممرز در جنگل‌های استان‌های مازندران و گلستان جداسازی شدند. سوسپانسیون حاصل از ریشه‌های ضدعفونی سطحی و سپس خردشده در آب مقطر در محیط Tryptic soy agar کشت شد. تک‌کلونی‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی انتخاب و با واکشت خالص شدند. تعلق جدایه‌های به‌دست‌آمده برپایه ریخت‌شناسی کلونی، تولید اندوسپور، واکنش گرم و فعالیت اکسیداز و کاتالاز به جنس باسیلوس مشخص شد. ویژگی‌های فنوتیپی و نیز مولکولی جدایه‌ها با به‌کارگیری PCR با آغازگرهای IS50، BOX و REP تعیین شد. داده‌ها در صورت حضور با عدد یک و عدم حضور با عدد صفر با استفاده از نرم‌افزار TotalLab TL120 کدگذاری و ماتریس تشابه و درخت فیلوژنتیکی به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزار NTSYS 2.02e و الگوریتم UPGMA ترسیم شدند. یک نماینده از جدایه‌های هر گروه انتخاب شد. سپس، آن‌ها برای شناسایی مولکولی با به‌کارگیری آغازگرهای ناحیه ۱۶S rDNA و ژن HSP60 با PCR تکثیر شدند. قطعه تکثیرشده پس از خالص‌سازی برای تعیین ترادف به شرکت Microsynth سوئیس ارسال شد. ترادف‌های به‌دست‌آمده با ترادف‌های موجود در ژن‌بانک NCBI به روش BLASTn مقایسه شد. درخت فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه ترادف‌های نوکلئوتیدی جدایه‌ها با گونه‌های باسیلوس موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA X و به‌کارگیری الگوریتم‌های درست‌نمایی بیشینه و اتصال همسایه با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰ رسم شد. فعالیت ضدباکتریایی جدایه‌های باسیلوس با کاربرد عصاره دی‌کلرومتان و روش دیسک کاغذی برعلیه باکتری *Brenneria roseae*، عامل بیماری خیسی چوب درختان ممرز بررسی شد. توانایی جدایه‌ها در تولید زی‌لایه (بیوفیلم)، پروتئاز، سیانید هیدروژن و هورمون ایندول استیک اسید (IAA) نیز ارزیابی شد.

نتایج: درمجموع، ۳۰ جدایه باکتری از نمونه‌های تهیه‌شده از ریشه درختان ممرز جداسازی شد. هیچ کلونی باکتری در تشتک‌های شاهد مشاهده نشد که می‌تواند نمایانگر کارایی مطلوب روش ضدعفونی‌سازی سطحی به‌کاربرده‌شده و شاهدی بر درون‌رست بودن جدایه‌های

به‌دست‌آمده محسوب شود. جدایه‌ها براساس ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی در سه گروه مجزا قرار گرفتند. مقایسه ترادف ناحیه تکثیرشده از ۱۶S rDNA و HSP60 با ترادف‌های موجود در ژن‌بانک NCBI و درخت فیلوژنتیکی ترسیمی نشان‌دهنده وجود گونه‌های *Bacillus thuringiensis*، *B. subtilis* و *B. mycoides* در نمونه‌ها بود. گونه *B. thuringiensis* بیشترین فراوانی و *B. subtilis* در رتبه بعدی و *B. mycoides* واجد کمترین فراوانی بودند. ترادف‌های حاصل از HSP60، تعیین دقیق موقعیت تاکسونومیکی جدایه‌های باسیلوس در سطح گونه را امکان‌پذیر کرد. سطح IAA تولیدی جدایه‌ها از هشت تا ۷۵ میلی‌گرم در لیتر متغیر بود. جدایه‌های *B. mycoides* بیشترین و جدایه‌های *B. subtilis* کمترین سطح تولید را داشتند. اغلب جدایه‌ها قادر به تولید آنزیم‌های لیپاز، ژلاتیناز، لسیتیناز، پروتئاز و آمیلاز بودند. جدایه‌های *B. thuringiensis* بیشینه سطح پروتئاز را تولید کردند و بیشینه مقدار زی‌لایه توسط جدایه‌های *B. subtilis* تولید شد. بیشترین هاله بازدارنده عصاره‌ی دی‌کلرومتان جدایه‌های باسیلوس برعلیه *B. roseae* متعلق به جدایه rAqa2 گونه *B. subtilis* (با قطر بازداری ۳/۲۵±۱۸/۰ میلی‌متر) بود.

نتیجه‌گیری کلی: علاوه‌بر تنوع حاصل از گروه‌بندی فنوتیپی و مولکولی، وجود تنوع در برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی در جدایه‌های باسیلوس می‌تواند نشانگر تأثیر بالقوه بعضی از جدایه‌ها در تولید هورمون‌های محرک رشد و افزایش ایمنی گیاهان باشد. همچنین، اثرات ضدباکتریایی و حفاظتی آن‌ها می‌تواند به‌عنوان عوامل زیست‌کنترل در گیاهان جنگلی در برابر عوامل بیماری‌زای باکتریایی محسوب شود. این پژوهش، اولین بررسی در زمینه شناسایی مولکولی و تعیین ویژگی‌های جدایه‌های باسیلوس درون‌رست ریشه ممرز در ایران است.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، ایندول استیک اسید، باسیلوس، ترادف، جدایه، ممرز.

مقدمه

درون‌رُست‌ها یا اندوفیت‌ها (Endophytic)، گروهی از ریزجانداران هستند که به بافت‌های درونی گیاهان وارد و در آن‌ها مستقر می‌شوند، اما علائم مشهودی در گیاه میزبان ایجاد نمی‌کنند (Wilson, 1995). این ریزجانداران، نقش مهمی در ایجاد و توسعه یک بوم‌سازگان پایدار در تولید محصولات کشاورزی دارند. درون‌رست‌ها، مزیت‌های گوناگونی برای گیاهان ازجمله بهبود رشد (Kang *et al*., 2007)، کاهش شدت بیماری (Kloepper *et al*., 2004; Senthilkumar *et al*., 2007)، ایجاد مکانیسم‌های دفاعی (Bargabus *et al*., 2002; Bakker *et al*., 2007)، تثبیت زیستی نیتروژن (Stoltzfus *et al*., 1997) و افزایش جذب عناصر غذایی (Malinowski *et al*., 2000) دارند. مهم‌ترین ویژگی‌های باکتری‌های درون‌رست، توانایی سنتز هورمون‌های گیاهی ازجمله ایندول استیک اسید (IAA)، حل‌کنندگی فسفات، ترشح سیدروفور و افزایش تحمل گیاهان در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده هستند (Kandel *et al*., 2017). این باکتری‌ها به دلیل موقعیت مکانی مشابهی که با بسیاری از عوامل بیماری‌زای گیاهی در درون گیاهان دارند، سبب مهار یا کنترل بیمارگرهای گیاهی با روش‌های مختلفی همچون رقابت تغذیه‌ای و مکانی، تولید مواد بازدارنده و القا مقاومت سیستمیک می‌شوند. مزیت‌هایی که درون‌رست‌ها برای گیاهان دارند، سبب افزایش پژوهش‌ها در زمینه‌های شناسایی، ژنتیک، زیست‌شناسی و بررسی تأثیر آن‌ها بر فعالیت‌های گیاهان حامل آن‌ها در زیستگاه‌های طبیعی شده است (Kloepper *et al*., 2004).

یکی از مهم‌ترین گروه‌های درون‌رست گیاهان، باسیلوس (*Bacillus*) و جنس‌های نزدیک یا جداشده از آن هستند. جنس باسیلوس توسط F. Cohn در سال ۱۸۷۲ ضمن مشاهده ویژگی تولید اسپور توسط آن‌ها توصیف شد (Fritze, 2004; Ki *et al*., 2009). باسیلوس‌ها متعلق به خانواده Bacillaceae هستند و گروه متنوعی از باکتری‌ها به شمار می‌آیند. این باکتری‌ها، گرم مثبت، میله‌ای، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری و دارای قابلیت تولید اندوسپور هستند. برخی ویژگی‌های باسیلوس مانند دیواره سلولی چندلایه، تولید متابولیت‌های ثانویه به‌ویژه آنتی‌بیوتیک‌ها، سازگاری

به تغییرات نامطلوب محیط زیست ازجمله دما، مواد شیمیایی و اشعه فرابنفش و رشد و تکثیر سریع اغلب گونه‌های آن‌ها سبب اهمیت گونه‌های این جنس شده است (Turenne *et al*., 2015). گونه‌های باسیلوس، یکی از اولین باکتری‌هایی بوده‌اند که در بسیاری از پژوهش‌ها ازجمله در روابط همزیستی مطالعه شده‌اند (Maughan & Van der Auwera, 2011). به دلیل قابلیت تولید طیف وسیعی از متابولیت‌ها ازجمله مواد ضدمیکروبی، آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های تجزیه‌کننده و ایمنی، گونه‌های این جنس، جایگزین‌های مناسبی برای کاربرد به عنوان عوامل کنترل زیستی محسوب می‌شوند و به صورت گسترده نیز استفاده می‌شوند (Fernando *et al*., 2007; Sari *et al*., 2006). به عنوان مثال، گونه‌های *B. subtilis* و *B. amyloliquefaciens* در کنترل بیماری آتشک سیب و گلابی به کار می‌روند. گزارش‌های زیادی در زمینه توانایی زیست‌کنترلی برخی استرین‌های *B. subtilis* در بیماری‌های ناشی از برخی گونه‌های *Fusarium* و *Rhizoctonia* وجود دارند (Pérez-García *et al*., 2011). استفاده از استرین‌های متعددی از گونه‌های *B. subtilis*، *B. amyloliquefaciens* و *B. licheniformis* مورد تائید سازمان‌های غذا و دارو، امنیت غذایی و حفظ نباتات هستند (Gardener & Fravel, 2002).

شناسایی باسیلوس‌ها در گذشته بر پایه شکل‌شناسی و ویژگی‌های فیزیولوژیکی و زیست‌شیمیایی آن‌ها استوار بود، اما با پیدایش یا برخورد با جدایه‌های بیشتر و روند نه‌چندان سریع توسعه روش‌های شناسایی، پژوهشگران با نمونه‌هایی مواجه شدند که با ویژگی‌های فنوتیپی قابل شناسایی نبودند (Suihko & Stackebrandt, 2003). ویژگی‌های ژنتیکی و فیلوژنتیکی به روش‌های شناسایی سنتی اضافه شد. از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به تعیین ویژگی و ترادف rRNAها اشاره کرد. بررسی‌های فیلوژنی باسیلوس‌ها با استفاده از ترادف ناحیه ۱۶S rDNA هتروژن بودن آن‌ها را آشکار کرد (Maughan & Van der Auwera, 2011). اطلاعات حاصل از ترادف ۱۶S rDNA سبب جداسازی چند گونه از جنس باسیلوس و قرار دادن آن‌ها در جنس‌های دیگر شده است. در حال حاضر، این جنس دارای بیشتر از ۳۸۰ گونه است که حدود یک‌صد گونه آن، نام‌های مترادفی دارند. به عقیده بسیاری از پژوهشگران، عمده گونه‌های باسیلوس نیاز به رده‌بندی مجدد دارند (Gupta *et al*., 2020). به‌تازگی، با دسته‌بندی مولکولی از روی توالی ژنوم ۳۵۲ گونه خانواده Bacillaceae در سال۲۰۲۰، بیشتر از یک‌صد گونه باسیلوس دوباره مجزا شدند و در شش جنس *Alkalibacillus*، *Cytobacillus*، *Mesobacillus*، *Metabacillus*، *Neobacillus* و *Peribacillus* قرار گرفتند. دوباره در یک آنالیز فیلوژنتیکی مولکولی صورت‌گرفته در سال ۲۰۲۰ که برپایه اطلاعات موجود از توالی‌های حفاظت‌شده ۱۴۸ گونه دیگر باسیلوس انجام شد، این گونه‌ها در ۱۷ جنس دیگر گروه‌بندی شدند. این جنس‌ها شامل *Alteribacillus*، *Ectobacillus*، *Evansella*، *Ferdinandocohnia*، *Gottfriedia*، *Heyndrickxia*، *Lederbergia*، *Litchfieldia*، *Margalitia*، *Niallia*، *Priestia*، *Robertmurraya*، *Rossellomorea*، *Schinkia*، *Sutcliffiella*، *Siminovitchia* و *Weizmannia* هستند (Patel & Gupta, 2020).

پژوهش‌های معدودی روی درون‌رست‌های گیاهان جنگلی در مقایسه با درون‌رست‌های محصولات مختلف کشاورزی انجام شده است. گونه‌هایی از *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Acinetobacter*، *Actinibacteria*، *Sphingomonas* و *Enterobacter* از درختان جنگلی جداسازی شده‌اند، اما بیشترین پژوهش‌ها روی گونه‌های سودوموناس و باسیلوس انجام شده است (Pirttila & Frank, 2011). در ایران، جدایه‌های درون‌رست *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Stenotrophomonas* از ریشه و برگ درختان بلوط مناطقی از شهر بانه و مریوان (استان کردستان) جدا و شناسایی شده‌اند (Tashi-Oshnoei *et al*., 2017). پژوهش پیش‌رو با هدف جداسازی، شناسایی و ارزیابی تنوع جدایه‌های باسیلوس درون‌رست ریشه درختان ممرز

(*Carpinus betulus* L.) به‌عنوان یکی از گونه‌های درختی غالب در جنگل‌های مازندران و گلستان انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی

نمونه‌برداری از ریشه‌های درختان ممرز در جنگل‌های مازندران (نواحی قائم‌شهر، ساری و بهشهر) و گلستان (نواحی گرگان، نهارخوران و توسکستان) در ارتفاع ۷۰۰ تا ۱۵۰۰ متر بالاتر از سطح دریا با متوسط بارندگی ۷۸۹ میلی‌متر در سال و دمای متوسط سالانه ۱۷/۹°C (Zeraatpisheh *et al*., 2020) در نیمه اول بهار ۱۳۹۹ انجام گرفت. پس از جدا کردن خاک‌های اطراف ریشه، نمونه‌ها با آب سترون شسته و قسمت‌هایی از پوست این ریشه‌ها جدا شد و با اتانول ۷۵ درصد به مدت پنج دقیقه و سپس با محلول ۰/۵ درصد هیپوکلریت سدیم خالص (۱۰ درصد هیپوکلریت سدیم تجاری) دوباره به مدت پنج دقیقه به‌صورت سطحی ضدعفونی شد. سپس سه‌بار با آب مقطر سترون شسته شدند (Shen & Fulthorpe, 2015). قطعه‌ها در تشتک پتری سترون حاوی دو تا چهار میلی‌لیتر کلرورسدیم یک درصد سترون خرد شدند. هر نمونه به مدت ۱۰ تا ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس به مدت دو دقیقه در ۵۰۰g سانتریفیوژ شد. محلول رویی در ۱۲۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس، رسوب حاصله در یک سی‌سی آب سترون حل و به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۸۰ سانتی‌گراد قرار داده شد. یک لوپ پر از سوسپانسیون گرمادیده در محیط Tryptic soy agar (TSA) به صورت خطی کشت شد. به منظور افزایش راندمان جداسازی، یک تکرار از هر سوسپانسیون گرمادیده با حجم برابر از محیط کشت Brain Heart Infuxion 2X که به آن به مقدار هم‌حجم، محلول سترون جوانه‌زنی اندوسپور (حاوی ۱٪ D-glucose، ۰/۵٪ Casaminoacid و ۰/۱٪ DL-Alanine) افزوده شده بود، مخلوط شد. این مخلوط به مدت سه ساعت در دمای ۲۸ سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور با ۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد (Wakisaka & Koizumi, 1982; Turenne *et al*., 2015; Poormontaseri *et al*., 2017). حدود ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اخیر روی محیط کشت TSA به صورت مخطط کشت و تشتک‌ها در دمای ۲۸ سانتی‌گراد نمایان شدن کلونی‌ها نگهداری شدند. تک‌کلونی‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی انتخاب و با واکشت خالص شدند. از هر جدایه سوسپانسیونی در گلیسرول ۳۰ درصد، استریل تهیه و در ۸۰- سانتی‌گراد نگهداری شد.

آزمون‌های فنوتیپی

جدایه‌های به‌دست‌آمده از نظر ریخت‌شناسی کلونی، تولید اندوسپور، واکنش گرم و فعالیت اکسیداز و کاتالاز به‌منظور تأیید تعلق آن‌ها به جنس باسیلوس بررسی شدند. سپس، جدایه‌ها به منظور تعیین تنوع، مورد آزمون‌های فنوتیپی شامل هیدرولیز آسکولین، توئین ۸۰، نشاسته، ژلاتین و لسیتین، تولید آرژینین دی‌هیدرولاز و اوره‌آز، احیای نیترات، تولید استوئین (VP) و قابلیت استفاده از سیترات، گلیکوژن، گلیسرول، ال-رامنوز، دی-رافینوز، دی-گلوکز، مایواینوزیتول، دی-مالتوز، سلوبیوز، دولسیتول، دی-مانوز، ال-آرابینوز- اینولین، دی-رایبوز، دی-فروکتوز، دی-ترهالوز، دی-ملی‌بیوز، دی-زایلوز، سوکروز، دی-ملی‌زیتوز، دی-مانیتول و سالیسین به عنوان منبع کربن قرار گرفتند (Schaad *et al*., 2001; Turenne *et al*., 2015). کشت‌ها در دمای ۲۸ سانتی‌گراد نگهداری و واکنش‌های تغییر رنگ و یا تشکیل هاله در جدایه‌ها به‌شکل روزانه تا ۲۸ روز ارزیابی شد.

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها به روش‌های rep-PCR و IS50-PCR

جدایه‌ها به مدت یک شبانه‌روز در محیط Tryptic soy broth (TSB) به‌منظور استخراج DNA کشت داده شدند. سوسپانسیون سلول‌ها در بافر تریس (Tris-HCl ۱۰ میلی‌مولار، pH 8) تهیه و در ۵۰۰۰ دور به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ و رسوب حاصله با بافر یادشده شسته شد. DNA

سلول‌های رسوب‌یافته با استفاده از بافر استخراج و مطابق با دستورالعمل کیت GeneJET Genomic DNA Purification Kit شرکت ترمو (Thermo Scientific, Germany) استخراج شد.

روش rep-PCR با استفاده از نشانگرهای REP و BOX انجام شد. از آغازگرهای REP1-I: 5′ -IIIICGICGICATCIGGC-3′ و REP2-I: 5′ -ICGICTTATCIGGGCTAC-3′ برای REP-PCR و از آغازگر 5′ -BOX- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3′ A1R: برای BOX-PCR استفاده شد. IS50-PCR با به‌کارگیری آغازگر 5′ -CAGGACGCTACTTGTGT- IS50: 3′ انجام شد. هر واکنش PCR، متشکل از ۱۲/۵میکرولیتر مخلوط واکنش PCR Master Mix 2X شرکت ترمو، ۱/۵ میکرولیتر از آغازگرهای خاص با غلظت ده نانوگرم، دو میکرولیتر DNA خالص و آب مقطر عاری از نوکلئاز تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. واکنش برای هر نشانگر به طور جداگانه صورت گرفت (Satomi *et al.*, 2006; Freitas *et al.*, 2008). دمای اتصال آغازگرهای REP، BOX و IS50 به‌ترتیب ۴۲، ۵۳ و ۴۰ سانتی‌گراد و زمان برای اتصال و گسترش هر سه نشانگر به‌ترتیب ۶۰ و ۱۵۰ ثانیه در نظر گرفته شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Veriti 96 Well، شرکت Applied Biosystem) انجام شد. نمونه‌های تکثیرشده در ژل آگاروز دو درصد الکتروفورز شدند. ژل‌ها در دستگاه ژل داکیومنت مدل Kodak Gel Logic 212 PRO با نور فرابنفش تصویربرداری و داده‌ها در صورت حضور با عدد یک و عدم حضور با عدد صفر با استفاده از نرم‌افزار TotalLab TL120 کدگذاری شدند. ماتریس تشابه و درخت فیلوژنتیکی به‌ترتیب با استفاده از نرم‌افزار NTSYS 2.02e و الگوریتم UPGMA ترسیم شدند.

تکثیر و تعیین ترادف ژن‌های ۱۶S rDNA و HSP60

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از DNA کل خالص‌شده از جدایه‌های منتخب در آزمون‌های فنوتیپی و تنوع ژنتیکی با به‌کارگیری جفت آغازگرهای عمومی ۲۷f: 5′ -AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′ و ۱۴۹۲r: 5′ -GGTTACCTTGTTACGACTT-3′ انجام شد (Weisburg *et al.*, 1991). دمای اتصال برای آغازگرهای عمومی ۵۴°C و زمان مرحله‌های اتصال و گسترش به‌ترتیب ۶۰ و ۹۰ ثانیه در دستگاه ترموسایکلر در نظر گرفته شد. برای تکثیر ناحیه ژن HSP60 از آغازگرهای دژنره مستقیم (5′ -GGNCCNAARGGNA(C)GNAAYGT-3′) و معکوس (5′ -TCNCCRAANCCNGGNGCYTTNACNGC-3′) استفاده شد (Sen *et al.*, 2015). دما برای اتصال آغازگرهای HSP60 به‌کاربرده‌شده ۵۶°C و زمان اتصال و گسترش برای هرکدام ۶۰ ثانیه در برنامه PCR در نظر گرفته شد. محصول PCR با استفاده از GeneJET PCR Purification Kit شرکت ترمو خالص و به منظور ترادف‌یابی به شرکت Microsynth سوئیس ارسال شد. ترادف‌های حاصل از جدایه‌ها با ترادف‌های موجود در ژن بانک NCBI مقایسه شد و نزدیک‌ترین گونه‌ها به ترادف‌های به‌دست‌آمده با استفاده از روش BLASTn مشخص شد. درخت فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه ترادف‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد بررسی با گونه‌های باسیلوس موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA X و به‌کارگیری الگوریتم‌های درست‌نمایی بیشینه (Maximum-Likelihood) و اتصال همسایه (Neighbour-Joining) با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰ رسم شد. ترادف نوکلئوتیدی S ۱۶rDNA و HSP60 باکتری *Staphylococcus aureus* به عنوان ترادف‌های گونه خارج گروه (outgroup) در نظر گرفته شد.

بررسی تولید زی‌لایه (بیوفیلم)

ارزیابی تولید زی‌لایه به روش میکروپلیت (Tissue culture plate, TCP) طبق دستورالعمل Stepanović و همکاران (2007) انجام شد. سوسپانسیون حاوی $۱۰^{۸}$ سلول (جذب نوری ۰/۱ در ۶۰۰ نانومتر) هر جدایه در یک میلی‌لیتر محیط TSB تهیه شد و ۲۰۰ میکرولیتر آن به هر چاهک در بشقابک ۹۶ خانه پلی‌استیرن منتقل شد. بشقابک‌ها در دمای ۲۸°C به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. چاهک‌ها پس از تخلیه محتویات، با متانول ۹۵ درصد به مدت ۱۵ دقیقه شسته و سپس با کریستال ویوله یک درصد به مدت پنج دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. پس از شستشو با آب مقطر و افزودن ۲۰۰ میکرولیتر محلول اسیداستیک ۳۳ درصد، جذب نوری در طول موج ۵۴۵ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر MPR 4 PLUS شرکت HIPERION اندازه‌گیری شد. مقدار تولید زی‌لایه به روش گروه‌بندی سطوح جذب نوری (ODc: optical density cut-off) با به‌کارگیری رابطه: (میانگین OD کنترل منفی) + (۳ × انحراف معیار کنترل منفی) تعیین شد. چهار سطح تولید قوی، متوسط، ضعیف و منفی در نظر گرفته شد. جدایه‌ها با $OD_{نمونه}>۴\times ODc$ به عنوان قوی و $۲\times ODc<OD_{نمونه}\leq ۴\times ODc$، $ODc<OD_{نمونه}\leq ۲\times ODc$ و $OD_{نمونه}\leq ODc$ به‌ترتیب به عنوان متوسط، ضعیف و منفی گروه‌بندی شدند. محیط کشت خالی TSB به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

تولید پروتئاز

فعالیت پروتئازی جدایه‌ها با به‌کارگیری محیط کشت آگار غذایی حاوی شیر بدون چربی (Skim milk agar) تیندال‌شده (Tyndalized) و ۰/۵ درصد عصاره مخمر استریل انجام شد (Maurhofer *et al*., 1995; Schaad *et al*., 2001). ابتدا لایه نازکی از محیط LB در پتری‌دیش ریخته شد. پس از انجماد، محیط کشت حاوی شیر روی آن ریخته شد. پس از گذشت یک روز، جدایه‌ها به صورت نقطه‌ای در سطح محیط و تشتک‌ها کشت و در دمای ۲۸°C نگهداری شدند. تشکیل هاله شفاف در اطراف و یا زیر محل رشد باکتری پس از ۴۸ ساعت از زمان کشت، نشانگر توانایی جدایه‌ها در تولید آنزیم پروتئاز تلقی شد.

تولید سیانید هیدروژن

سوسپانسیون کدری از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط آگار غذایی در آب مقطر استریل تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن در سطح محیط TSA (دارای ۴/۴ گرم در لیتر گلایسین) پخش شد. کاغذ صافی آغشته به دو درصد کربنات سدیم و ۰/۵ درصد اسید پیکریک در قسمت داخلی درب تشتک کشت‌داده‌شده قرار گرفت و لبه تشتک با نوار پارافیلم مسدود شد. نمونه شاهد نیز به روش مشابه تهیه شد، اما فاقد کشت باکتری بود. تشتک‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ سانتی‌گراد قرار داده شدند. تولید سیانید هیدروژن و مقدار نسبی آن براساس تغییر رنگ کاغذ معرف به زرد، آجری تا قهوه‌ای پررنگ که به‌ترتیب مؤید تولید کم تا متوسط و زیاد بودند، ارزیابی شد (Alström & Burns, 1989).

تولید ایندول استیک اسید

جدایه‌ها در محیط کشت LB حاوی ۰/۵ تا ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸°C کشت داده شدند (Patten & Glick, 1996). دو میلی‌لیتر از محیط کشت به میکروتیوب منتقل شد و میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. یک میلی‌لیتر از محلول رویی با دو میلی‌لیتر محلول Salkowski (یک میلی‌لیتر محلول کلریدآهن ۳ (FeCl3) نیم مولار در ۵۰ میلی‌لیتر پرکلریک اسید ۳۵ درصد) مخلوط و در دمای ۲۸ سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. شدت رنگ صورتی تولیدشده با اندازه‌گیری جذب نوری (OD) نمونه‌ها در طول موج ۵۳۰ نانومتر تعیین شد. غلظت بهینه تریپتوفان برای رشد باکتری‌ها با اندازه‌گیری کدورت کشت‌ها در ۶۰۰ نانومتر محاسبه شد. منحنی استاندارد ایندول استیک اسید با به‌کار بردن غلظت‌های صفر، سه، شش، ۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۲۵ میلی‌گرم در لیتر IAA خالص (ساخت مرک آلمان) رسم شد.

استخراج عصاره خام متابولیت‌های ثانویه جدایه‌های باسیلوس و بررسی فعالیت ضدباکتریایی

جدایه‌های باسیلوس در محیط کشت TSB به مدت هفت روز در دمای ۲۸ سانتی‌گراد در شیکر انکوباتور ۱۸۰ دور در دقیقه انکوبه شدند. نمونه‌ها در شرایط تاریکی (فویل آلومینیومی در اطراف شیشه حاوی محیط کشت) رشد کردند. محیط کشت حاوی سوسپانسیون باکتری با اسیدکلریدریک پنج نرمال به pH~۲ رسانده شد و در ۱۰۰۰۰g به مدت پنج دقیقه در دمای ۲۰ سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. محلول رویی با استفاده از غشا نیتروسلولز ۰/۲۲ میکرون فیلتر شد. عصاره باکتریایی در شرایط تاریکی با استفاده از حلال دی‌کلرومتان با درجه خلوص Gas chromatography (GC) در سه مرحله به نسبت برابر محیط کشت و حلال (حجم/حجم) در قیف دکانتور استخراج شد. عصاره دی‌کلرومتان با افزودن یک گرم نمک سولفیت سدیم به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط آب‌زدایی شد.

جدول ۱- ویژگی‌های فنوتیپی گروه‌های مختلف باسیلوس به‌دست‌آمده از ریشه درختان ممرز مازندران و گلستان

Table 1. Phenotypic characteristics of the *Bacillus* strain groups isolated from hornbeam root in Mazandaran and Golestan provinces

Group number	1	2	3	4
Spore position	S	S, C	S	S, C
Nitrate reduction	+	+	+	+
Voges-Proskauer (VP)	+	+	+	+
Urease	-	+	+	+
Arginine dihydrolase	+	-	+	-
Gelatin hydrolysis	+	-	+	+
Lecithinase	+	+	+	+
Starch hydrolysis	+	+	+	+
Tween 80 hydrolysis	-	+	+	+
Aesculin hydrolysis	+	+	+	+
Utilization of:				
Citrate	+	+	+	+
Glycogen	+	+	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	-
D-Raffinose	-	+	-	-
D-Glucose	+	+	+	+
Glycerol	-	+	+	+
Myo-Inositol	-	+	-	-
D-Maltose	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	-
L-Arabinose	-	+	-	-
Inulin	-	+	-	-
D-Ribose	-	+	+	-
D-Fructose	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	-	+
D-Xylose	-	+	-	-
Sucrose	+	+	+	+
D-Melisitose	-	-	-	-
D-Manitol	-	+	-	-
Salicin	+	+	+	-

+: Positive, -: Negative, C: Central, S: Subterminal

1, 3: Thuringiensis-like group, 2: Subtilis-like group, 4: Mycoides-like group

پس از حلال‌پرانی در دمای ۶۰°C به مدت یک ساعت، رسوب حاصله در پنج میلی‌لیتر دی‌کلرومتان حل و در فریزر در دمای ۲۰- سانتی‌گراد در شرایط تاریکی تا زمان استفاده نگهداری شد (Al-Saraireh *et al*., 2015).

جدایه استاندارد MS9 گونه *Brenneria roseae* ICMP 21597 عامل بیماری خیسی چوب درختان ممرز از آزمایشگاه باکتری‌شناسی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تهیه شد.

تحلیل آماری داده‌ها

مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ انجام شد.

نتایج

جداسازی و تعیین تنوع فنوتیپی

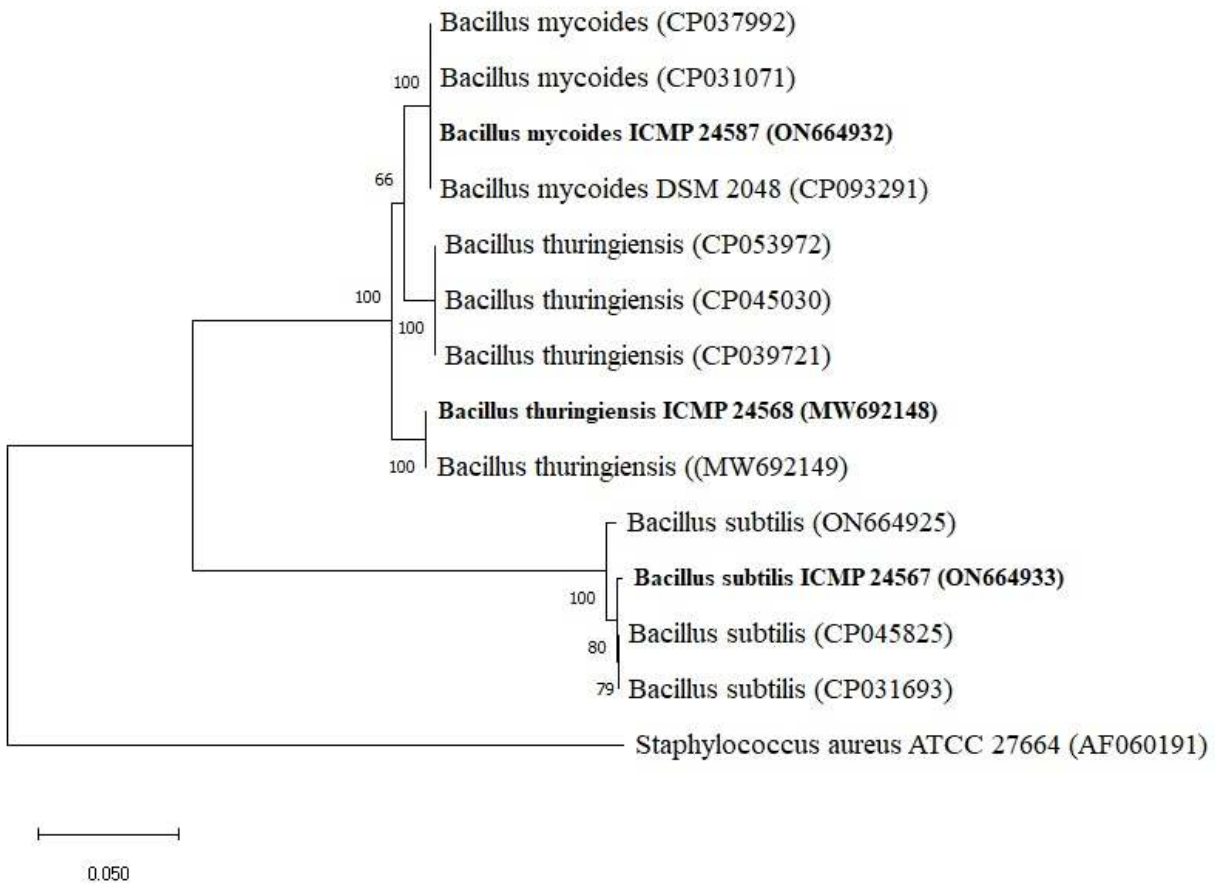
درمجموع، ۳۰ جدایه باکتری از نمونه‌های تهیه‌شده از ریشه درختان ممرز جنگل‌های مازندران (۱۹ جدایه) و گلستان (۱۱ جدایه) جداسازی شد. هیچ کلونی باکتری در تشتک‌های شاهد (محلول شستشو در مرحله آخر و سوسپانسیون پوست سترون و خردنشده) مشاهده نشد. جمعیت سلول‌های باکتری درون‌رست در بافت خردشده $۱۰^{۳}$ تا $۱۰^{۴}$ کلونی در هر گرم بافت ریشه تخمین زده شد. با به‌کارگیری روش غنی‌سازی، این جمعیت به $۱۰^{۵}$ تا $۱۰^{۶}$ افزایش یافت. کلونی اغلب جدایه‌ها پس از ۴۸ ساعت در محیط کشت پدیدار شد. جدایه‌ها دارای کلونی‌های سفید یا سفید مایل به کرم، میله‌ای‌شکل، گرم مثبت، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری و قادر به تولید اسپور بودند و متعلق به جنس باسیلوس یا شبه‌باسیلوس تلقی شدند. اندوسپور در برخی جدایه‌ها، زیرقطبی، در برخی دیگر، مرکزی و در اغلب جدایه‌ها به هر دو نوع زیرقطبی و مرکزی مشاهده شدند. درمجموع، جدایه‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی شناسایی و در چهار گروه متمایز قرار گرفتند (جدول ۱).

تنوع و گروه‌بندی ژنتیکی جدایه‌ها

در ارزیابی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با روش rep-PCR و IS_{50}-PCR، نتایج به صورت تنوع در تعداد و اندازه باندهای DNA تکثیرشده تعیین و منعکس شد. در REP-PCR، ۲۹ باند ۲۰۰ تا ۴۰۰۰ جفت‌باز (bp)، در BOX-PCR، ۳۵ باند با اندازه‌های ۲۵۰ تا ۳۰۰۰ جفت‌بازی و در IS_{50}-PCR، ۳۳ باند ۵۰۰ تا ۴۰۰۰ جفت‌باز مشاهده شد. براساس گروه‌بندی تجمیعی، جدایه‌ها در سطح تشابه ۳۵ درصد به سه گروه و در سطح تشابه ۶۵ درصد به پنج گروه تقسیم شدند.

موقعیت تاکسونومیکی جدایه‌ها

از هر گروه سه‌گانه ژنتیکی متمایزشده، یک نماینده انتخاب شد. سپس، قطعه‌هایی از ژن‌های ۱۶S rDNA و HSP60 با PCR تکثیر و تعیین ترادف شدند. هم‌ردیف‌سازی ترادف‌های هر جدایه با ترادف‌های موجود در ژن‌بانک (NCBI) با استفاده از نرم‌افزار BLASTn انجام شد. درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد بررسی و جدایه‌های *Bacillus* مرجع برگرفته از ژن‌بانک به روش اتصال همسایه با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰ ترسیم شد (شکل ۱). *Staphylococcus aureus* ATCC 27664 به عنوان گونه خارج گروه به‌کار برده شد. جدایه‌های rm، rpass4 و rker2 به‌دست‌آمده از ریشه درختان ممرز به‌ترتیب متعلق به سه گونه *B. thuringiensis*، *B. subtilis* و *B. mycoides* بودند. ترادف‌های ژن HSP60 جدایه‌های منتخب تحت رس (Accession) شماره MW692148، ON664933 و ON664932 و ژن ۱۶S rDNA با رس شماره MW652676، ON644444 و ON644442 به‌ترتیب برای گونه‌های *B. thuringiensis*، *B. subtilis* و *B. mycoides* ثبت و رهاسازی شد. جدایه‌های شناسایی‌شده در کلکسیون میکروبی نیوزیلند (International Collection of Microorganisms from Plants, ICMP, www.landcarersearch.co.nz) با شماره‌های ICMP 24568، ICMP 24567 و ICMP 24587 به‌ترتیب برای گونه‌های *B. thuringiensis*، *B. subtilis* و *B. mycoides* بایگانی و ثبت شد.



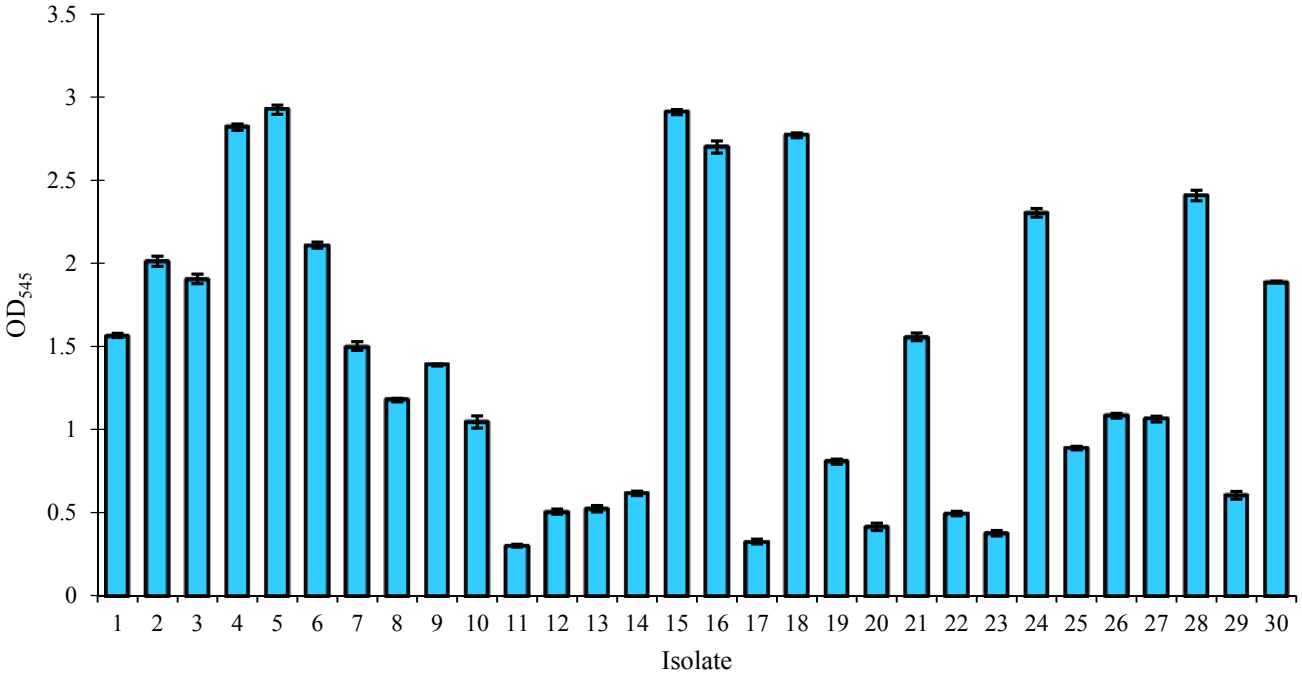
شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی ژن **HSP60** جدایه‌های به‌دست‌آمده از ریشه درختان ممرز با گونه‌های باسیلوس موجود در بانک ژن به روش اتصال همسایه، با استفاده از نرم‌افزار **MEGA X**

Figure 1. Phylogenetic tree of HSP60 of *Bacillus* isolates from hornbeam roots, constructed with the Neighbour-joining method using MEGA X

تولید زی‌لایه (بیوفیلم)

در آزمون تشکیل زی‌لایه به روش TCP، ۲۹ جدایه دارای توانائی cdhnd (جذب در ۴۵۴ نانومتر بیشتر از ۰/۳) در تولید زی‌لایه بودند. ۱۴ جدایه تولیدکننده زی‌لایه قوی (جذب نوری بیشتر از ۱/۵) و ۱۵ جدایه تولیدکننده زی‌لایه در سطح‌های متوسط و ضعیف (جذب نوری بین ۰/۳ تا ۱/۵) بودند (شکل ۲).

بیشترین تولید زی‌لایه مربوط به جدایه‌های گروه *B. subtilis* (جدایه‌های شماره ۲، ۴، ۵، ۱۵، ۱۸، ۲۱ و ۲۸) بودند. جدایه‌های گروه *B. thuringiensis* (جدایه‌های ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۷، ۲۰، و ۲۳) زی‌لایه کمتری تولید کردند. جدایه‌های *B. mycoides* (جدایه‌های ۸، ۹، ۲۶ و ۲۷) تولیدکننده زی‌لایه متوسط بودند.



شکل ۲- مقایسه سطح تولید زی‌لایه در جدایه‌های باسیلوس درون‌رست در ریشه درختان ممرز در جنگل‌های مازندران و گلستان به روش میکروپلیت و تعیین شدت رنگ کریستال ویوله در طول موج ۵۴۵ نانومتر

Figure 2. Levels of biofilm production of endophytic *Bacillus* isolates from hornbeam roots in tissue culture plate stained with crystal violet

تولید پروتئاز

تولید هاله شفاف در اطراف و زیرکلونی در محیط Skim milk agar نشان داد که اغلب جدایه‌ها (۸۷ درصد) در گروه‌های مختلف، قابلیت هیدرولیز پروتئین در محیط شیر آگار را دارند. فقط چهار جدایه (۱۳ درصد) فاقد این ویژگی بودند. جدایه rlajamr2 متعلق به گروه *B. thuringiensis* بیشترین پروتئاز را تولید کرد. درمجموع، جدایه‌های گروه *B. thuringiensis* بیشترین مقدار پروتئاز را تولید کردند.

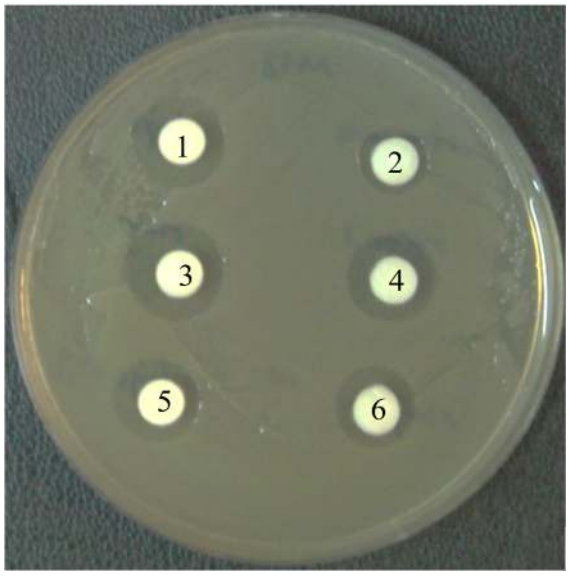
تولید سیانید هیدروژن

بیست و یک جدایه از میان ۳۰ جدایه به‌دست‌آمده از ریشه درختان ممرز، توانایی تولید سیانید هیدروژن را داشتند. مقدار تولید سیانید هیدروژن بین جدایه‌ها متفاوت بود. تولید در سه جدایه rm، rpass6 و raqa2 در سطح زیاد (به رنگ قهوه‌ای تیره) بود. جدایه‌های گروه *B. subtilis* درمجموع بیشترین مقدار تولید را داشتند. پس از آن، جدایه‌های *B. mycoides* و درنهایت، جدایه‌های *B. thuringiensis* در رتبه آخر تولید سیانید هیدروژن قرار گرفتند.

تولید ایندول استیک اسید

رشد باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف تریپتوفان نشان داد که این پیش‌ساز تا غلظت چهار میلی‌گرم در لیتر تأثیری بر رشد باکتری ندارد، اما افزایش این مقدار سبب توقف یا کاهش رشد برخی جدایه‌های باسیلوس شد. از سوی دیگر با افزایش غلظت تریپتوفان تا شش میلی‌گرم بر لیتر، مقدار تولید ایندول استیک اسید، افزایش نشان داد. بر این اساس، ارزیابی تولید ایندول استیک اسید جدایه‌های باسیلوس در غلظت چهار میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان انجام شد. همه ۳۰

جدایه باسیلوس بررسی‌شده، توانایی تولید اکسین را داشتند. بین جدایه‌ها، اختلاف معنی‌داری ($P<$ ۰/۰۰۰۱) در مقدار تولید اکسین مشاهده شد. درمجموع، هفت جدایه، کمتر از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر و یازده جدایه، بیشتر از ۳۰ میلی‌گرم در لیتر اکسین تولید کردند. جدایه‌های گروه *B. mycoides* بیشینه سطح تولید و جدایه‌های گروه *B. thuringiensis* بیشترین تنوع را در تولید اکسین داشتند. البته تولید سطوح زیاد هورمون اکسین، معیار مناسبی برای انتخاب جدایه بالقوه و مفید نیست (Lodewyckx *et al*., 2002; Szilagyi-Zecchin *et al*., 2014).



شکل ۳- هاله بازدارنده عصاره دی‌کلرومتان شش جدایه باسیلوس برعلیه ***Brenneria roseae***

جدایه‌ها: ۱; **rPass4** (***B. subtilis***)، ۲; **rLajamr3** (***B. thuringiensis***)، ۳; **rAqa1** (***B. subtilis***)، ۴; **rPass7** (***B. subtilis***)، ۵; **rKer1** (***B. mycoides***) و ۶; **rLajamr2** (***B. thuringiensis***).

Figure 3. Zone of inhibition produced by the six isolates of endophytic *Bacillus* against *Brenneria roseae*

Isolates: 1; rPass4 (*B. subtilis*), 2; rLajamr3 (*B. thuringiensis*), 3; rAqa1 (*B. subtilis*), 4; rPass7 (*B. subtilis*), 5; rKer1 (*B. mycoides*), and 6; rLajamr2 (*B. thuringiensis*).

ارزیابی فعالیت ضدباکتریایی جدایه‌های باسیلوس

کاهش pH محیط کشت، تأثیر زیادی بر تولید هاله بازدارنده برعلیه باکتری *Brenneria roseae* ایجاد کرد. عصاره دی‌کلرومتان همه جدایه‌های درون‌رست باسیلوس توانستند هاله بازدارنده برعلیه باکتری مولد خیسی چوب درختان ممرز در شرایط محیط کشت ایجاد کنند (شکل ۳).

بیشترین هاله بازدارنده متعلق به جدایه rAqa2 گونه *B. subtilis* با قطر ۱۸/۳±۰/۲۵ و کمترین آن نیز مربوط به جدایه rLaj1 گونه *B. thuringiensis* با قطر ۹/۲۷±۰/۱۵ میلی‌متر بود. میانگین هاله بازدارنده جدایه‌های *B. subtilis* برابر با ۱۲/۹۷ میلی‌متر و برای جدایه‌های *B. mycoides* برابر با ۱۲/۹۴ میلی‌متر به‌دست آمد. کمترین میانگین هاله بازدارنده نیز مربوط به جدایه‌های *B. thuringiensis* با قطر ۱۱/۷۲ میلی‌متر بود.

بحث

تنوع باسیلوس‌های درون‌رست در درختان ممرز جنگل‌های هیرکانی به عنوان پرجمعیت‌ترین گونه درختی در جنگل‌های شمال ایران (Sabeti, 1994) در پژوهش پیش‌رو تعیین شد. درمجموع، سه گونه مهم *B. thuringiensis*، *B. subtilis* و *B. mycoides* در ریشه‌ها جداسازی و شناسایی شدند. در جداسازی‌ها، جمعیت زیادی از کلونی‌های هم‌شکل وجود داشت که نمایانگر کارایی مطلوب روش ضدعفونی سطحی به‌کاربرده‌شده و شاهدی بر درون‌رست بودن جدایه‌های به‌دست‌آمده بود. نتایج پژوهش‌های پیشین در جداسازی درون‌رست بر پایه محیط کشت نشان داده‌اند که شرایط آب و هوایی و تغییرات فصلی، تأثیر بسزایی بر جداسازی درون‌رست‌ها در گیاه میزبان دارند (Shen & Fulthorpe, 2015). در پژوهش پیش‌رو نیز این مسئله مشاهده شد. چنانچه با گرم شدن هوا در انتهای بهار، جداسازی باسیلوس درون‌رست از نمونه‌های درختی دشوار شد، بنابراین به منظور افزایش راندمان جداسازی در فصل‌های گرم، فرایند غنی‌سازی سوسپانسیون ریشه در محیط کشت Brain Heart Infusion همراه با محلول جوانه‌زنی حاوی گلوکز و آلانین DL و یک منبع غنی از ویتامین‌ها و اسیدهای‌آمینه (عصاره مخمر) صورت گرفت. استفاده از محیط کشت‌های غنی در فرایند جداسازی سبب

حمایت از رشد گونه‌های تندرشد در مقایسه با گونه‌های کندرشد می‌شود (Poormontaseri *et al*., 2017)، بنابراین ضروری است که در بررسی تنوع جمعیت باکتری‌های درون‌رست، نمونه‌برداری‌ها در فصل‌های مختلف سال تکرار شوند. برای تخمین تنوع و شناسایی دقیق‌تر جدایه‌ها از نشانگرهای ژنومی کارآمد ازجمله BOX، REP و IS50 استفاده شد. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای تجمیعی داده‌های مولکولی با گروه‌بندی حاصل از نشانگر BOX-PCR تشابه بیشتری داشت. علاوه بر این، اطلاعات حاصل از انگشت‌نگاری BOX با آنالیز فیلوژنتیکی ژن HSP60 شباهت داشت. این یافته‌ها نشان می‌دهند که کلاستربندی حاصل از BOX برای جدایه‌های باسیلوس، کارآمدتر از بقیه نشانگرهای تعیین تنوع است. چنین نتیجه‌ای در برخی از پژوهش‌های گذشته نیز گزارش شده است (Freitas *et al*., 2008). شناسایی مولکولی باسیلوس با استفاده از ترادف‌های ۱۶S rDNA تفکیک لازم در سطح گونه را انجام نداد، اما ترادف‌های حاصل از HSP60 در مورد جدایه‌های باسیلوس در تعیین دقیق موقعیت تاکسونومیکی و شناسایی گونه‌ها بسیار مؤثر بود. با توجه به تاکسونومی پلی‌فازی استفاده‌شده در بررسی تنوع جدایه‌های درون‌رست باسیلوس در درختان ممرز، وجود هتروژنی زیاد در جدایه‌های به‌دست‌آمده از یک گونه درختی می‌تواند نشانگر تنوع میکروبی در جنگل‌های هیرکانی ایران باشد. در پژوهش‌های گذشته نشان داده شده است که اگرچه تولید هورمون IAA به عنوان هورمون مهم گیاهی و شاخص ارزیابی افزایش‌دهندگی رشد گیاهان توسط باکتری‌های درون‌رست محاسبه می‌شود، اما تولید زیاد IAA می‌تواند مانع رشد رویشی گیاهان شود. این پدیده در مورد یکی از جدایه‌های باسیلوس در تعامل با نهال‌های اوکالیپتوس مشاهده و مشخص شد که علی‌رغم تولید مقدار زیاد هورمون اکسین توسط جدایه باسیلوس، گیاه‌چه‌های اوکالیپتوس رشد طولی کمتری داشتند (Paz *et al*., 2012)، بنابراین تولید زیاد این هورمون نمی‌تواند به تنهایی معیار مناسبی برای گزینش جدایه‌های مفید باکتری‌های درون‌رست محسوب شود. اگرچه تولید سیانید هیدروژن به عنوان معیار زیست‌کنترل و عامل محافظت‌کننده در برابر بیمارگرها است و به طور غیرمستقیم در رشد گیاهان تأثیر دارد (Rijavec & Lapanje, 2016)، نتایج حاصل از ارزیابی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی نمی‌توانند نشان‌دهنده ویژگی‌های حقیقی جدایه‌های درون‌رست در شرایط طبیعی باشند. فعالیت ضدباکتریایی عصاره خام جدایه‌های باسیلوس نشان‌دهنده توانایی بالقوه آن‌ها در غلبه برعلیه باکتری بیماری‌زای *Brenneria roseae* در درختان جنگلی ممرز است. این نتایج بیانگر اهمیت این باکتری‌ها در محافظت از درختان ممرز برعلیه بیماری خیسی چوب درختان جنگلی در شمال ایران است. جدایه‌های باسیلوس درون‌رست، توانایی تولید ترکیب‌های متابولیتی و هورمونی دارای اثرات القاکننده و محرک رشد دارند. این جدایه‌ها دارای اثرات ضدمیکروبی با تولید متابولیت‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که اثرات محافظت‌کنندگی چندگانه آن‌ها در مواجهه با تنش‌های زنده و غیرزنده را نشان می‌دهند (Lodewyckx *et al*., 2002). این اولین پژوهش در زمینه شناسایی جدایه‌های باسیلوس درون‌رست ریشه ممرز و ارزیابی اثرات ضدمیکروبی آن برعلیه باکتری مولد بیماری خیسی چوب این درختان در ایران است. لازم است که شناسایی تکمیلی با روش‌های دارای توان عملیاتی زیاد مانند متاژنوم روی درون‌رست‌های ریشه درختان جنگلی به‌ویژه ممرز و بلوط در جنگل‌های هیرکانی انجام گیرد.

منابع مورد استفاده

- Al-Saraireh, H., Al-Zareini, W.A. and Tarawneh, K.A., 2015. Antimicrobial activity of secondary metabolites from a soil *Bacillus* sp. 7B1 isolated from south Al-karak, Jordan. Jordan Journal of Biological Sciences, 8: 127-132.
- Alström, S. and Burns, R.G., 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biology and Fertility of Soil, 7: 232-238.
- Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J. and van Loon, L.C., 2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology, 97: 239-243.
- Bargabus, R.L., Zidack, N.K., Sherwoodand, J.E. and Jacobsen, B.J., 2002. Characterisation of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycoides*, biological control agent. Physiological and Molecular Plant Pathology, 61: 289-298.

Alkalihalobacillus gen. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70: 406-438.
- Patten, C.L. and Glick, B.R., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Canadian Journal of Microbiology, 42: 207-220.
- Paz, I.C.P., Santin, R.C.M., Guimarães, A.M., Rosa, O.P.P., Dias, A.C.F., Quecine, M.C., ... and Matsumura, A.T.S., 2012. Eucalyptus growth promotion by endophytic *Bacillus* spp. Genetics and Molecular Research, 11: 3711-3720.
- Pérez-García, A., Romero, D. and de Vicente, A., 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. Current Opinion in Biotechnology, 22: 187-193.
- Pirttila, A.M. and Frank, A.C., 2011. Endophyte of Forest Trees: Biology and Application, First Edition. Springer, Amsterdam, Netherlands, 322p.
- Poormontaseri, M., Ostovan, R., Berizi, E. and Hosseinzadeh, S., 2017. Growth rates of *Bacillus* species probiotics using various enrichment media. International Journal of Nutrition Sciences, 2: 39-42.
- Rijavec, T. and Lapanje, A., 2016. Hydrogen cyanide in the rhizosphere: not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. Frontiers in Microbiology, 7: 1785.
- Sabeti, H., 1994. Forests, Trees and Shrubs of Iran. Published by University of Yazd, Yazd, 884p (In Persian with English summary).
- Sari, E., Etebarian, H.R., Roustaei, A. and Aminian, H., 2006. Biological control of *Gaeumannomyces graminis* on wheat with *Bacillus* spp. Plant Pathology Journal, 5: 307-314.
- Satomi, M., La Duc, M.T. and Venkateswaran, K., 2006. *Bacillus safensis* sp. Nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56: 1735-1740.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W., 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria, Third Edition. American Phytopathological Society Press, Saint Paul, Minnesota, 373p.
- Sen, R., Tripathy, S., Padhi, S.K., Mohanty, S. and Maiti, N.K., 2015. Assessment of genetic diversity of *Bacillus* spp. isolated from eutrophic fish culture pond. 3 Biotec, 5: 393-400.
- Senthilkumar, M., Govindasamy, V. and Annapurna, K., 2007. Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus* sp. HKA-15. Current Microbiology, 55: 25-29.
- Shen, S.Y. and Fulthorpe, R., 2015. Seasonal variation of bacterial endophytes in urban trees. Frontiers in Microbiology, 6: 427.
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Bonaventura, G.D., Djukić, S., Ćirković, I. and Ruzicka, F., 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Journal of Pathology, Microbiology and Immunology, 115: 891-899.
- Stoltzfus, J.R., So, R., Malarvithi, P.P., Ladha, J.K. and de-Bruijn, F.J., 1997. Isolation of endophytic bacteria from
- Fernando, W.G.D., Nakkeeran, S., Zhang, Y. and Savchuk, S., 2007. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. Crop Protection, 26: 100-107.
- Freitas, D.B., Reis, M.P., Lima-Bittencourt, C.I., Costa, P.S., Assis, P.S., Chartone-Souza, E. and Nascimento, A.M.A., 2008. Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. BMC Research Notes, 1: 92.
- Fritze, D., 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. Phytopathology, 94: 1245-1248.
- Gardener, B.B.M.S. and Fravel, D.R., 2002. Biological control of plant pathogens: research, commercialization, and application in the USA. Plant Health Progress, 3: 17.
- Gupta, R.S., Patel, S., Saini, N. and Chen, S., 2020. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the Subtilis and Cereus clades of species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 70: 5753-5798.
- Kandel, S.L., Joubert P.M. and Doty, S.L., 2017. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. Microorganisms, 5: 77.
- Kang, S.H., Cho, H.S., Cheong, H., Ryu, C.M., Kim, J.F. and Park, S., 2007. Two bacterial entophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Microbiology and Biotechnology, 17: 96-103.
- Ki, J.S., Zhang, W. and Qian, P.Y., 2009. Discovery of marine *Bacillus* species by 16S rRNA and rpoB comparisons and their usefulness for species identification. Journal of Microbiological Methods, 77: 48-57.
- Kloepper, J.W., Ryu, C.M. and Zhang, S., 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology, 94: 1259-1266.
- Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R.B., Taghavi, S., Mezgeay, M. and van der Lelie, D., 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. Critical Reviews in Plant Sciences, 21: 583-606.
- Malinowski, D.P., Alloush, G.A. and Belesky, D.P., 2000. Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral uptake in tall fescue. Plant and Soil, 227: 115-126.
- Maughan, H. and Van der Auwera, G., 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. Infection, Genetics and Evolution, 11: 789-797.
- Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D. and Defago, G., 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced antibiotic production. Plant Pathology, 44: 40-50.
- Patel, S. and Gupta, R.S., 2020. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and

- Turenne, C.Y., Snyder, J.W. and Alexander, D.C., 2015. *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria: 441-461. In: Jorgensen, J.H., Carroll, K.C., Funke, G., Pfaller, M.A., Landry, M.L., Richter, S.S. and Warnock, D.W. (Eds.). Manual of Clinical Microbiology, Eleventh Edition. ASM Press, Washington DC, 2892p.
- Wakisaka, Y. and Koizumi, K., 1982. An enrichment isolation procedure for minor *Bacillus* populations. The Journal of Antibiotics, 35: 450-457.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. and Lane, D.J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173: 697-703.
- Wilson, D., 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. Oikos, 73: 274-276.
- Zeraatpisheh, M., Bakhshandeh, E., Hosseini, M. and Alavi, S.M., 2020. Assessing the effects of deforestation and intensive agriculture on the soil quality through digital soil mapping. Geoderma, 363: 114139.
rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. Plant and Soil, 194: 25-36.
- Suihko, M.L. and Stackebrandt, E., 2003. Identification of aerobic mesophilic bacilli isolated from board and paper products containing recycled fibres. Journal of Applied Microbiology, 94: 25-34.
- Szilagyi-Zecchin, V.J., Ikeda, A.C., Hungria, M., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Glienke, C. and Galli-Terasawa, L.V., 2014. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. AMB Express, 4: 26.
- Tashi-Oshnoei, F., Harighi, B. and Abdollahzadeh, J., 2016. Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol potential from oak trees. Forest Pathology, 47: e12360.