Iranian Journal of Plant ProtectionScience
Vol 51, No 1, spring and summer 2020 (27-37)
DOI: 10.22059/ijpps.2020.289465.1006908

دانش گیاهپزشکی ایران
دورۀ ۵۱، شمارۀ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۹ (ص۳۷-۲۷)

شناسایی مولکولی باکتری‌های اندوفیت مرکبات در شرق استان گیلان

سیده لیلا اکبری کیارود[۱]، رهنما، کامران[۲]، مرتضی گل محمدی[۳*]، سعید نصرالله نژاد[۴]
۱، ۲ و ۴. به ترتیب، .دانشجوی دکتری، دانشیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولیدگیاهی، دانشگاه علوم‌کشاورزی و منابع‌طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۳. استادیار موسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده مرکبات و میوه های نیمه گرمسیری سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران
(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۷/۰۱ - تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۲/۱۸)

چکیده

این پژوهش به‌منظور شناسایی اندوفیت‌های باکتریایی درخت‌های مرکبات بالای پنج سال در شرق استان گیلان انجام شد. تعداد ۶۳ باکتری اندوفیت از برگ‌های سالم نارنج، پرتقال محلی و تامسون ناول، نارنگی انشو، لیموشیرین، کامکوات و بالنگ جداسازی گردید. جدایه‌های به‌دست‌آمده بر اساس شکل و رنگ پرگنه گروه‌بندی شدند، سپس خصوصیات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی شش جدایه از آن‌ها به‌عنوان نماینده گروه‌های مختلف ارزیابی شد. بر اساس ارزیابی‌های مولکولی و مطالعات تبارزایی ناحیه 16S rRNA مشخص شد که این جدایه‌ها به گونه‌های *Bacillus megaterium*، *Bacillus cereus*، *Arthrobacter agilis*، *Acinetobacter junii* و *Pseudomonas azotoformans* تعلق دارند؛ که از این میان سه گونه *A. agilis*، *A. junii* و *P. azotoformans* برای اولین بار به‌عنوان باکتری‌های اندوفیت مرکبات از ایران و جهان گزارش می‌گردند. ویژگی‌های ریخت‌شناسی، بیوشیمیایی، مولکولی و تجزیه‌وتحلیل‌های تبارزایی به‌خوبی قادر به تمایز جنس‌ها و گونه‌های اندوفیت جداشده است.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت باکتریایی، مرکبات، **16S rRNA**، تبارزایی.

Molecular identification of citrus endophytic bacteria in the east of Guilan province

Seyedeh Leila Akbari Kiarood [1], Rahnama, Kamran [2], Morteza Golmohammadi [3 *], Saeed Nasrollahnejad [4]
1, 2 and 4. Respectively, PhD student, Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. Assistant Professor Horticultural Scince Reserarch Institute, Citrus and Subtropical Fruits Reserarch Education and Extension Organizationand (AREEO),Ramsar, iran.
(Received: September 23, 2019 - Accepted: May 7, 2020)

ABSTRACT

This research was conducted to identify endophytic bacteria over five years old citrus trees in the east of Guilan province. A total of 63 endophytic bacteria were isolated from symptomless leaves of *Citrus aurantium*, *Citrus sinensis*, *Citrus sinensis* var. *thomson*, *Citrus unshiu*, *Citrus limon*, *Fortunella margarita*, and *Citrus medica*. Isolates were grouped based on colony type and color. Then, morphological and biochemical characteristics of the six isolates were assessed as the candidate of different groups. According to molecular studies and phylogenetic analyses of the 16S rRNA region, these isolates were identified as *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Arthrobacter agilis*, *Acinetobacter junii*, and *Pseudomonas azotoformans* species. Among them, three species including *A. agilis*, *A. junii*, and *P. azotoformans* are reported as citrus endophytic bacteria from Iran and the world for the first time. Morphological, biochemical, molecular, and phylogenetical analyses are able to differentiate the genus and species of the endophyte isolates.

Keywords: Bacterial endophyte, Citrus, 16S rRNA, Phylogeny.

* Corresponding author E-mail: mgolm2009@gmail.com

مقدمه

اندوفیت‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که دست‌کم یک مرحله از چرخه زندگی خود را داخل گیاه مستقر می‌شوند بدون اینکه هیچ‌گونه علائم بیماری ایجاد نمایند. واژه اندوفیت نخستین بار توسط دباری در سال ۱۸۸۶ به کار گرفته شد که به معنی حضور میکروارگانیسم‌ها در داخل بافت‌های گیاهی بوده بدون اینکه هیچ‌گونه اثر منفی روی میزبان خود داشته باشند (Golinska *et al*., 2015). در ابتدا این اصطلاح برای قارچ‌هایی به کار می‌رفت که در درون بافت گیاه مستقر بودند اما بعداً در مورد باکتری و هر میکروارگانیسمی که در نواحی داخلی بافت‌های گیاهی وجود داشت، معمول شد. ازآنجاکه باکتری‌های اندوفیت علائم آشکاری بروز نمی‌دهند تخمین صحیح جمعیت آن‌ها مشکل است (Schulz & Boyle, 2006).

تنوع باکتری‌های اندوفیت نه‌تنها در بین گیاهان مختلف، بلکه حتی در میان رده‌های باکتریایی قابل‌ملاحظه است، به‌طوری‌که باکتری‌های فراوان از جنس‌ها و گونه‌های مختلف، به‌عنوان اندوفیت معرفی گردیده‌اند (Bashan & Holguin, 1998). این باکتری‌ها ممکن است دارای هزاران گیاه میزبان باشند و یا دامنه میزبانی آن‌ها محدود به خانواده گیاهی مشخصی باشد (Kobayashi & Palumbo, 2000) .اندوفیت‌های باکتریایی شامل انواع باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی هستند. هرچند که پژوهش‌های پیشین حاکی از آن هستند که بخش عمده‌ای از این نوع اندوفیت‌ها به باکتری‌های گرم منفی تعلق دارد (Hallmann *et al*., 1997). به‌طورکلی باکتری‌های رده‌های آلفا، بتا و گاما پروتوباکتریا به‌عنوان جمعیت غالب اندوفیت‌های باکتریایی گزارش شده‌اند و از اکتینوباکتریاها و فرمیکوت‌ها نیز به‌عنوان اندوفیت یاد شده است. جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus* ، *Burkholderia*، *Stenotrophomonas*، *Micrococcus*، *Microbacterium* و *Pantoea* به‌عنوان عمده‌ترین اندوفیت‌های باکتریایی معرفی گردیده‌اند (Santoyo *et al*., 2016) و از بافت‌های داخلی خرما (ریشه و برگ) نیز جنس‌های باکتریایی *Arthrobacter*، *Microbacterium*، *Bacillus* ، *Achromabacter*، *Pseudomonas*، *Actinobacter* و *Serratia* به‌عنوان اندوفیت جداسازی شده است (Siala *et al*., 2016). بررسی جمعیت باکتری‌های اندوفیت یک نوع خزه (*Grimmia montana*) حاکی از آن است که اندوفیت‌های جداسازی شده به ۵۴ جنس و چهار شاخه پروتوباکتریاها، فرمیکیوت‌ها، اکتینوباکتریاها و سیتوفاگا/فلکسی باکتر/باکتریوئید تعلق دارند؛ که دراین‌بین بیشترین جمعیت به شاخه پروتوباکتریا و فرمیکیوت‌ها اختصاص داشت (Liu *et al*., 2014). درواقع اندوفیت بودن یک برتری بوم‌شناختی‌ای است که به‌واسطه آن برخی از باکتری‌ها قادرند بافت‌های درونی گیاه را کلونیزه نمایند و از طریق ایجاد رابطه همزیستی داخلی با گیاه یک محیط سودمند بوم‌شناختی‌ای را به وجود آورند که به‌واسطه آن رشد گیاه بهبود و افزایش یافته و در برابر تنش‌های محیطی متحمل می‌شود (Hallmann *et al*., 1997). شایان‌ذکر است که علیرغم قدمت طولانی کشت مرکبات در ایران و گزارش‌های فراوانی که در خصوص عوامل بیمارگر این محصول و راه‌های کنترل آن وجود دارد، پژوهش‌های محدودی برای شناسایی باکتری‌های اندوفیت مرکبات در ایران انجام شده است (Akbari Kiarood *et al*., 2018; Akbari Kiarood *et al*., 2019). بر این اساس، هدف از این بررسی تعیین تنوع باکتری‌های اندوفیت مرکبات در شرق استان گیلان با استفاده از تعیین توالی بخشی از ژن 16S rRNA و تعیین ارتباط تبارزایی آنان بوده است. اهمیت این پژوهش با تأکید بر پژوهش‌های بی‌شمار انجام‌شده در خصوص کاربرد اندوفیت‌ها در مهندسی ژنتیک به‌منظور انتقال ژن‌های خاص به میزبان (Li *et al*., 2017)، نقش آن‌ها به‌عنوان منبع بالقوه‌ای از متابولیت‌های ثانویه با کاربردهای متعدد در صنایع مختلف اعم از داروسازی و کشاورزی (Golinska *et al*, 2015)، افزایش‌دهنده مقاومت گیاه در برابر عوامل استرس‌زایی چون فلزات سنگین، خشکی، شوری، آنتی‌بیوتیک‌ها و دمای بالا، همچنین بهبوددهنده رشد گیاه (Shi *et al*., 2011; Ma *et al*.,

2017) و عامل مهار زیستی بیماری‌های گیاهی (Chen *et al*., 1995; Azevedo *et al*., 2016) بیش‌ازپیش مشخص می‌گردد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

به‌منظور انجام این پژوهش در فاصله زمانی آبان ۱۳۹۵ تا اردیبهشت ۱۳۹۶، از برگ‌های سالم و بدون علائم درخت‌های مرکبات (پرتقال محلی و تامسون، نارنگی، نارنج، لیموشیرین، کامکوات) با سن بالای پنج سال واقع در شرق استان گیلان نمونه‌برداری شد. در هر مرحله نمونه‌های برگی گردآوری‌شده در پاکت‌های پلاستیکی تمیز و مجزا که حاوی مشخصات زمان، مختصات جغرافیایی و گیاه نمونه‌برداری شده بود قرار داده شدند و در شرایط دمای پایین به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

جداسازی اندوفیت‌های باکتریایی

در این بررسی قسمت میانی برگ‌های سالم ارقام مختلف مرکبات گردآوری‌شده، پس از شستشو با آب به‌موازات رگبرگ اصلی برش داده شد و به‌منظور ضدعفونی سطحی، نمونه‌های تهیه‌شده به ترتیب در اتانول ۹۶ درصد به مدت یک دقیقه، هیپوکلرید سدیم ۳/۵ درصد به مدت ۵ دقیقه و مجدداً در اتانول ۹۶ درصد به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شدند و پس از ۲ بار شستشو با آب مقطر سترون با کاغذ صافی سترون آبگیری شدند و سپس روی محیط کشت نوترینت آگار (NA) (Qlab, Canada)، کشت گردیده در دمای ۲۶ درجه سلسیوس به مدت ۱۴-۱۰ روز نگهداری شدند (Douanla-Meli *et al*., 2013).

ارزیابی ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی اندوفیت‌های باکتریایی

در این بررسی ابتدا باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده بر اساس شکل و رنگ پرگنه گروه‌بندی شدند. سپس خصوصیات بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی شش جدایه از آن‌ها به‌عنوان نماینده گروه‌های مختلف بر اساس کلید شناسایی معتبر در باکتری‌شناسی گیاهی (Schaad *et al*, 2001)، ارزیابی شد.

ارزیابی مولکولی اندوفیت‌های باکتریایی انتخابی

به‌منظور استخراج DNA جهت انجام ارزیابی مولکولی، ابتدا جدایه‌های اندوفیت انتخابی موردنظر در محیط کینگ بی براث (KB Broth) (Schaad *et al*., 2001)، کشت و به مدت ۲ روز روی دستگاه شیکر (GFL3015, Germany) با ۱۶۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس‌ازاین مدت یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون هرکدام از این باکتری‌ها به لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد. سوسپانسیون ذکرشده به مدت ۵ دقیقه در g ×۱۲۰۰۰ با استفاده از سانتریفیوژ (Micro 200R, Germany)، سانتریفیوژ گردید و بعد فاز بالایی دور ریخته شد. پس‌ازاین مرحله به هرکدام از لوله‌ها ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (SDS (0.5%), PVP(2%) , pH7.5,) NaCl (250 Mmol) , EDTA,(25 Mmol) Tris-HCl (200 Mmol) اضافه شد. سپس لوله‌ها ورتکس‌شده به مدت یک ساعت روی دستگاه شیکر با ۸۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. در پایان این مرحله سوسپانسیون به‌دست‌آمده به مدت ۵ دقیقه در g × ۱۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و ۴۵۰ میکرولیتر از فاز بالایی به لوله‌های اپندورف جدید منتقل و هم‌حجم آن ایزوپروپانول به هر لوله اضافه شد. دو ماده فوق با حرکت دست مخلوط گردیدند و سوسپانسیون به‌دست‌آمده به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. بعدازاین مرحله سوسپانسیون به‌دست‌آمده به مدت ۵ دقیقه با دور g×۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. سپس فاز رویی حذف و درنهایت پس از خشک شدن در دمای اتاق، به رسوب DNA موجود در هر لوله ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه سترون اضافه شد تا DNA در آن حل شود (Liop, 1999). نمونه‌ها به‌منظور نگهداری طولانی‌مدت در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

به‌منظور شناسایی مولکولی و ارزیابی تبارزایی اندوفیت‌های جداسازی شده، ناحیه ژنی 16S rRNA

هر جدایه تکثیر و تعیین توالی گردید. جهت تکثیر این ناحیه از ترکیب آغازگرهای (5´-pA(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´ و (5´-pH(AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3´ به ترتیب به‌عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس استفاده شد (Mahmoudi *et al.*, 2011). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، با حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر (2x PCR Master mix)، ۰/۵ میکرولیتر از هر آغازگر (غلظت ۱۰ پیکومولار)، یک میکرولیتر DNA الگو (غلظت تقریبی ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۱۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه سترون تهیه گردید (Sambrook & Russell, 2001). واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (MJ Research PTC-200, Peltier thermal cycler, Waltham, Massachusetts) با واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل مراحل واسرشت‌سازی در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۵۶ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، تکثیر در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام شد (Mahmoudi *et al*., 2011). سپس محصولات PCR از طریق الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد ارزیابی شدند. تعیین توالی نواحی تکثیرشده توسط شرکت بایونیر (Bioneer, South Korea) انجام شد. پس از اخذ توالی‌ها، جهت اطمینان از صحت داده‌ها، توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی بلاست (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST) با توالی‌های موجود در بانک اطلاعات ژنی (GenBank) مقایسه شدند. سپس توالی مربوط به هر باکتری به بانک ژن ارسال و کد شناسایی (Accession Number) مربوطه دریافت گردید.

تجزیه‌وتحلیل تبارزایی

پس از شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتریایی اندوفیت انتخابی، توالی‌هایی از هر گونه جهت مطالعات تبارزایی از بانک اطلاعات ژنی انتخاب شد (جدول ۴). مقایسه تبارزایی شش جدایه به‌دست‌آمده به همراه جدایه‌هایی که توالی آن‌ها از بانک ژن اخذ شده بود انجام گرفت و گونه DSM 2661 *Methanocaldococcus jannaschii* به‌عنوان گروه خارجی (out-group) در نظر گرفته شد. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 مرتب‌سازی شدند. ارزیابی توالی‌ها، مقایسه آن‌ها و ترسیم درخت تبارزایی با روش maximum likelihood (ML) (Tamura & Nei, 1993) و به کمک این نرم‌افزار صورت گرفت. برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در درخت‌های حاصل، از تجزیه‌وتحلیل اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار استفاده گردید (Felsenstein, 1985).

نتایج

زمان، مختصات جغرافیایی و نام محل‌های نمونه‌برداری

مختصات جغرافیایی و نام مناطق نمونه‌برداری شده جدایه‌های انتخابی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. نام و مختصات جغرافیایی محل‌های نمونه‌برداری

Table1. Name and geographical coordinates of sampling areas

Region Name	Longitude	Latitude
Siyahkal	399295	4109676
Lahigan	412966	4117118
Komleh	426514	4112472
Parashkoh	426015	4110967

ارزیابی خصوصیات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی اندوفیت‌های باکتریایی جداسازی شده

در این بررسی تعداد ۶۳ اندوفیت باکتریایی جداسازی گردید که پس از گروه‌بندی، بر اساس شکل و رنگ پرگنه خصوصیات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی شش جدایه از آن‌ها به‌عنوان نماینده گروه‌های مختلف بر

اساس کلید شناسایی معتبر در باکتری‌شناسی (Schaad *et al*, 2001)، ارزیابی شد (جدول ۲).

جدول ۲. خصوصیات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی باکتری‌های اندوفیت‌های انتخابی

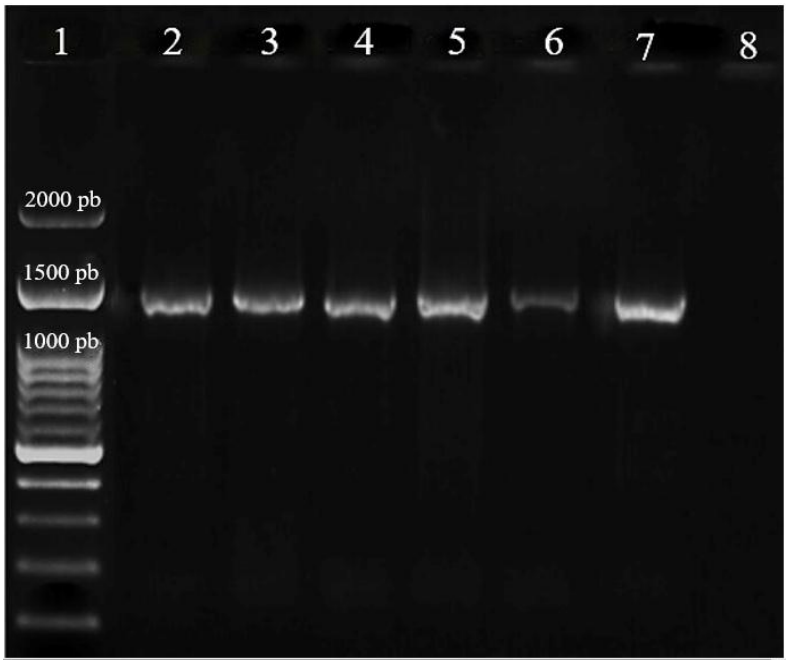
Table 2. Morphological and biochemical characteristics of selected endophytic bacteria

Isolate	Colony characters on NA	Shape	Gram Staining	Endospore	Oxidase	Starch	Catalase	Urease	Aerobically growth	Anaerobically growth	Fluorescent pigment on KB	Yellow pigment on YDC
Kom-Po5	White to milky color, Round to irregular	Rod shape	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
Parash-Po12	White to milky color, Round to irregular	Rod shape	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Ab-Pom 1-1	non-pigmented and mucoid	Coccobacilli shape	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Ton-Pom1-1	Red-pink, convex and round *colonies* with an entire edge	Rod shape	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Si-Ps1	Bright grey-white, feathery with low wavy edge	Bacilli shape	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-
La-Pot3-3	Bright color with smooth edge	Rod shape	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-

ارزیابی مولکولی و تبارزایی جدایه‌های باکتری اندوفیت انتخابی و جدایه‌های وابسته به آن‌ها

پس از تعیین توالی شش جدایه باکتری اندوفیت انتخابی مشخص گردید که این جدایه‌ها به گونه‌های *Bacillus megaterium*، *Bacillus cereus*، *Arthrobacter agilis*، *Acinetobacter junii* و *Pseudomonas azotoformans* تعلق دارند؛ که از این میان سه گونه *A. agilis*، *A. junii* و *P. azotoformans* برای اولین بار به‌عنوان اندوفیت مرکبات از ایران گزارش می‌گردند. نتیجه بررسی‌های صورت گرفته و کد دریافتی از بانک ژن در جدول ۳ ارائه گردیده است.

در ارزیابی تبارزایی، طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه 16S rRNA توالی‌یابی شده در جدایه‌های موردبررسی از ۷۳۰ تا ۱۰۸۵ جفت باز متغیر بود. در درخت تبارزایی نگاشته‌شده بر اساس ارزیابی توالی نوکلئوتیدی ناحیه 16S rRNA روش ML، گونه‌های *B. megaterium*، *A. agilis*، *B. cereus*، *A. junii* و *P. azotoformans* در کلدهای مجزا قرار گرفتند و ناحیه ژنی 16S rRNA قادر به تفکیک اندوفیت‌های جداسازی شده در حد گونه بود.



شکل ۱. محصول واکنش زنجیره پلی‌مراز DNA استخراج‌شده باکتری‌های اندوفیت روی ژل آگارز. نشانگر DNA ۱۰۰ جفت باز. راهک ۱، نشانگر DNA، ۱۰۰ جفت باز. راهک ۲، جدایه Lapot 3-3. راهک ۳، جدایهAb-Pom1-1 . راهک ۴، جدایه Kom-Po5. راهک ۵، جدایه Si-Ps1، راهک ۶، جدایهTon-Pom1-1 . راهک ۷، جدایه Parash-Po12. راهک ۸، شاهد منفی (مواد واکنش زنجیره پلی مراز بدون DNA).

Figure 1. PCR product of extracted DNA from endophytic bacteria on agarose gel. Lane 1, DNA Ladder 100bp; lane 2, Lapot 3-3 isolate; lane 3, Ab-Pom1-1 isolate; lane 4, Kom-Po5 isolate; lane 5, Si-Ps1 isolate; lane 6, Ton-Pom1-1 isolate; lane 7, Parash-Po12 isolate; lane 8, negative control (PCR materials without DNA).

جدول ۳. مشخصات جدایه‌های انتخابی اندوفیت باکتریایی توالی‌یابی‌شده در این پژوهش

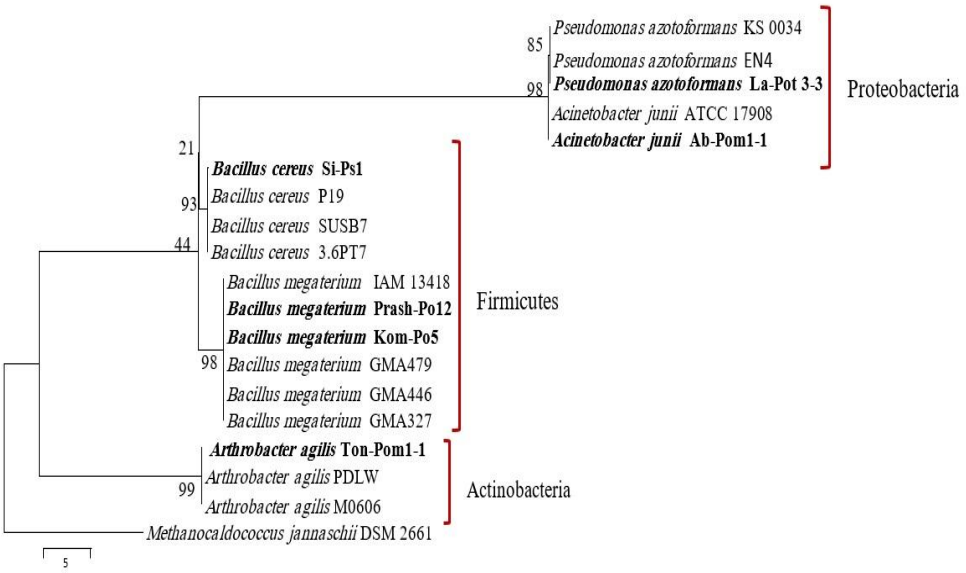
Table 3. The properties of selected endophytic bacterial isolates sequenced in this research

Isolate	Taxon	Host	Isolation region	Isolation time	GenBank accession no.
Parash-Po12	*Bacillus megaterium*	*Citrus sinensis*	Parashkoh	May 2017	MG199053
Ton-Pom1-1	*Arthrobacter agilis*	*Citrus sinensis*	Tonkabon	December 2016	MG199051
Si-Ps1	*Bacillus cereus*	*Citrus sinensis*	Siyahkal	March 2017	MG199050
Kom-Po5	*Bacillus megaterium*	*Citrus sinensis*	Komleh	May 2017	MG199049
Ab-Pom1-1	*Acinetobacter junii*	*Citrus sinensis*	Abasabad	May 2017	MG199048
La-Pot 3-3	*Pseudomonas azotoformans*	*Citrus sinensis* var. *thomson*'s	Lahigan	March 2017	MG199047

جدول ۴. مشخصات جدایه‌های باکتریایی اخذشده از بانک ژن.

Table 4. The characters of bacterial isolates obtained from GenBank.

Isolate	Taxon	Reference	GenBank accession no.16S rRNA (NCBI)
IAM 13418	*Bacillus megaterium*	Suzuki & Yamasato, 1994	NR_043401
GMA479	*Bacillus megaterium*	Hattori et al, 2012	AB 738793
GMA446	*Bacillus megaterium*	Hattori et al, 2012	AB 738785
GMA327	*Bacillus megaterium*	Hattori et al, 2012	AB 738784
3.6PT7	*Bacillus cereus*	Luang et al, 2019	MK 648344
P19	*Bacillus cereus*	Das & Thakur,2018	MK 088296
SUSB7	*Bacillus cereus*	Bhutia et al,2019	MK 780061
PDLW	*Arthrobacter agilis*	Ben Chobba et al., 2011	JN 934384
M0606	*Arthrobacter agilis*	Zhang et al, 2013	KF 924209.1
ATCC 17908	*Acinetobacter junii*	Maslunka, 2012	HE 651916
KS 0034	*Pseudomonas azotoformans*	Anzai et al, 2019	NR_037092
EN4	*Pseudomonas azotoformans*	Hassanshahian& Ghafari, 2013	HF 572854
DSM 2661	*Methanocaldococcus jannaschii*	Bult et al, 2019	NR_074233



شکل ۲. درخت تبارزایی رسم‌شده با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ناحیه ژنی 16S rRNA به روش Maximum Likelihood. توالی سویه *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 به‌عنوان توالی خارج گروه در نظر گرفته شد. توالی ۱۳ جدایه از بانک ژن اخذ شده است (جدایه‌های موردمطالعه به‌صورت توپر مشخص شده‌اند). اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی‌از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهند. خط شاخص نشان‌دهنده تغییر پنج نوکلئوتید در هر جایگاه است.

Figure 2. Phylogenetic tree constructed with maximum likelihood method based on 16S rRNA. The sequence of *Methanocaldococcus jannaschii* DSM 2661 was used as an out group. Thirteen related sequences were obtained from GenBank (isolates studied are marked in bold). Numbers above the branches show the bootstrap values with 1000 replicates. The index line represents the change of five nucleotides in each position

بحث

به دلیل نقش اندوفیت‌های باکتریایی در حمایت از گیاهان در مقابل عوامل استرس‌زای محیطی نظیر خشکی (Rolli *et al.*, 2015)، شوری (Ali *et al.*, 2014) و دمای پایین (Su *et al.*, 2015)، تحریک سریع‌تر و قوی‌تر سامانه دفاعی گیاه در برابر بیمارگرهای گیاهی و افزایش عملکرد گیاهان از طریق بهبود جذب مواد غذایی خاک و تثبیت نیتروژن در برگ‌ها (Liu *et al.*, 2017) شناسایی آن‌ها در گیاهان مختلف ضروری به نظر می‌رسد. باکتری‌های اندوفیت شناسایی‌شده در این پژوهش جزء باکتری‌های گرم منفی و مثبت بودند که از برگ‌های بدون علائم و ضدعفونی‌شده مرکبات جداسازی گردیدند. این سویه‌های جداسازی شده به شاخه‌های Firmicutes، Actinobacteria و Proteobacteria تعلق داشتند. بررسی‌های پیشین نیز حاکی از آن است که جمعیت غالب اندوفیت‌های جداسازی شده از ارقام مختلف مرکبات به شاخه‌های Firmicutes، Proteobacteria (Mushtaq *et al.*, 2018) و Actinobacteria (Shutsrirung *et al.*, 2013) تعلق دارد. جنس *Bacillus* عمده‌ترین جنس باکتری اندوفیت جداسازی شده در این پژوهش بود؛ که بر اساس گزارش‌های پیشین از مرکبات (Araújo *et al.*, 2001)، آفتابگردان (Forchetti *et al.*, 2007)، کتان (Misaghi & Donndelinger, 1990) و قهوه عربی (Vega *et al.*, 2005) نیز به فرم اندوفیت جداسازی گردیده است. بررسی‌ها حاکی از آن است که سویه اندوفیت *B. velezensis* EB-39 جداسازی شده از مرکبات قادر به مهار شدید سه تیپ مهاجم و شش سویه مقاوم به استرپتومایسین باکتری *Xanthomonas citri* subsp. *citri* عامل شانکر باکتریایی مرکبات است (Rabbee *et al.*, 2019). بر اساس گزارش‌های پیشین، باکتری‌های *Bacillus megaterium*، *Bacillus cereus* و *Pseudomonas* sp. اندوفیت‌هایی هستند که از

ارقام مختلف مرکبات جداسازی گردیده‌اند (Mushtaq *et al.*, 2018).

علاوه‌براین چهار سویه اندوفیت *Bacillus cereus* RNS_01، *Pantoea agglomerans* ZFJ-15، *Bacillus subtilis* 55C1-1 و *Bacillus pumilus* SH-B11 نیز از برگ‌های لیموترش جداسازی شده‌اند (Jannah *et al.*, 2018) در این بررسی باکتری *Arthrobacter agilis*، برای اولین بار از ایران و جهان به‌عنوان اندوفیت مرکبات معرفی می‌گردد هرچند که گزارش‌هایی مبنی بر وجود این باکتری به‌صورت اندوفیت در گیاهانی چون سالیکورینا (Shuai *et al.*, 2016)، نارون (Alizadeh, 2017) و پیچک سمی آمریکایی (Tran *et al.*, 2015) ارائه گردیده است. باکتری *A. junii* اندوفیت دیگری است که در این بررسی از مرکبات جداسازی شده است. این سویه نیز برای اولین بار از ایران و جهان به‌عنوان اندوفیت مرکبات گزارش می‌گردد البته تحقیقات پیشین مؤید وجود آن در گیاهانی چون سویا (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2005) ، گیلاس وحشی (Quambusch *et al.*, 2014) ، برنج (Ashfaq *et al.*, 2016) و انگور (Kántor *et al.*, 2017) به فرم اندوفیت است. سویه اندوفیت *P. azotoformans* نیز در این پژوهش جداسازی شده است و مانند دو سویه پیشین این باکتری نیز برای اولین بار از ایران و جهان به‌عنوان اندوفیت مرکبات گزارش می‌گردد، هرچند که فرم اندوفیت آن از گیاهان دیگری چون ارکیده (Herrera *et al.*, 2020) و علف‌های هرزی چون مرغ، مامیران و علف طلایی (سولیداگو) جداسازی گردیده است (Goryluk-Salmonowicz *et al.*, 2018).

تجزیه‌وتحلیل‌های تبارزایی صورت گرفته در این پژوهش بر اساس ناحیه ژنی 16S rRNA به‌خوبی توانست گونه‌های متعلق به چهار جنس *Bacillus* sp.، *Arthrobacter* sp.، *Acinetobacter* sp. و *Pseudomonas* sp. را از یکدیگر تفکیک نماید. بر اساس درخت تبارنمای ترسیم‌شده گونه‌های جنس *Arthrobacter* sp. (Actinobacteria) در پایه درخت نمایه شده قرار دارند و گونه‌های جنس *Bacillus* sp. (Firmicutes) پس از آن‌ها در کلدی مجزا قرار گرفته‌اند. هر دو شاخه نام‌برده جزء باکتری‌های گرم مثبت هستند. گونه‌های جنس‌های *Acinetobacter* sp. و *Pseudomonas* sp. جزء Proteobacteriaهای گرم منفی هستند که با بیشترین فاصله از توالی خارج گروه و در بالاترین قسمت درخت نگاشته شده در کلدی مجزا از دو کلد نام‌برده قرار دارند.

پژوهش‌های پیشین حاکی از آن است که Actinobacteriaها و Firmicutesها دارای جد مشترکی بوده‌اند و حدود سه میلیون سال پیش از هم اشتقاق یافته‌اند (Lewin *et al.*, 2016) از سوی دیگر مشخص شده که فشار انتخابی ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها عامل مهمی در تکامل باکتری‌های گرم منفی بوده است. درواقع این باکتری‌ها در اثر فشار انتخابی لایه لیپوپلی‌ساکارید (LPS) را دریافت نموده‌اند که در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت، مزیتی است که منجر به مقاومت بیشتر آن‌ها نسبت به شرایط محیطی می‌گردد (Gupta, 2011). به‌عبارت‌دیگر این نظریات مطرح‌شده بر درستی تبارنمای نگاشته شده صحه می‌گذارد.

درمجموع با توجه به گزارش‌هایی که در خصوص توانمندی اندوفیت‌های باکتریایی به‌عنوان تولیدکننده ترکیبات متعددی چون لیپوپپتیدها، هورمون‌های گیاهی، پلی‌ساکاریدها و آنزیم‌های مختلف با پتانسیل بالا در مهار بیمارگرهای گیاهی (Ek-Ramos *et al.*, 2019) و بهبود رشد گیاهان با محلول سازی فسفات، تولید اندول‌استیک‌اسید و غیره وجود دارد (Qin *et al.*, 2014) بررسی نقش این اندوفیت‌ها در بهبود رشد و مهار بیمارگرهای مرکبات در پژوهش‌های آینده مورد انتظار خواهد بود.

پژوهش حاضر رویکرد مؤثری را در مورد تنوع اندوفیت‌های باکتریایی مرکبات ارائه می‌نماید که بیانگر ضرورت مطالعه بیشتر در مورد این اندوفیت‌ها به‌عنوان منبع بالقوه‌ای از متابولیت‌های ثانویه و برهمکنش آن‌ها با سایر عوامل میکروبی در آینده خواهد بود.

نتیجه‌گیری کلی

درمجموع نتایج حاصل از این پژوهش بیانگر این واقعیت است که درختان مرکبات زیستگاهی برای انواع باکتری‌های اندوفیت گرم مثبت و گرم منفی هستند که بررسی‌های بیشتر درزمینه نقش آن‌ها به‌عنوان عامل مهار زیستی، بهبوددهنده رشد گیاه و حتی افزایش‌دهنده مقاومت گیاه در شرایط استرس‌زای محیطی نظیر شوری و خشکی ضروری به نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به خاطر فراهم کردن اعتبارات پژوهشی این پژوهش و همچنین از موسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری رامسر به جهت در اختیار قرار دادن فضای تحقیقاتی و آزمایشگاهی صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند.

REFERENCES

1. Akbari kiarood, S. L., Rahnama, K., Golmohammadi, M. & Nasrollahnejad, S. (2018). Identification of one species of *Xylaria sp.* as endophytic fungi on Thomson Novel sweet Orange In: Proceedings of *23rd Iranian Plant Protection Congress*, 27-30 August, Gorgan, Iran**.** (In Farsi).
2. Akbari kiarood, S. L., Rahnama, K., Golmohammadi, M. & Nasrollahnejad, S. (2019). *Epicoccum nigrum*, from Citrus and Kiwi trees common endophytes in the North of Iran. In: Proceedings of *4thIranian Mycological Congress*, 26-28 August, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran. (In Farsi).
3. Ali, S., Charles, T. C. & Glick, B. R. (2014). Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. *Plant Physiology* and *Biochemistry*, 80, 160-167.
4. Alizadeh, M. (2017). First Report of *Arthrobacter agilis* Associated with Elm Trees in Iran. *Journal of Plant Chemistry and Ecophysiology*, 2(1), 1013.
5. Araújo, W. L., Maccheroni, W. J., Aguilar-Vildoso, C. I., Barroso, P. A., Saridakis, H. O. & Azevedo, J. L. (2001). Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus rootstocks. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(3), 229-236.
6. Ashfaq, M., Haider, M. S., Ali, A., Ali, M., Saleem, I. & Mubashar, U. (2016). Morphological characterization of endophytic bacterial strains isolated from discolored rice grain. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 28(1), 01-08.
7. Azevedo, J. L., Araújo, W. L., Luiz, W. & Lacava, P. T. (2016). The diversity of citrus endophytic bacteria and their interactions with *Xylella fastidiosa* and host plants. *Genetics and Molecular Biology*, 39(4), 476-491.
8. Bashan, Y. & Holguin, G. (1998). Proposal for the division of plant growth promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth-promoting bacteria) and PGPB. *Soil Biology Biocheimistry*, 30, 1225-1228.
9. Chen, C., Bauske, E. M., Musson, G., Rodriguez- kabana, R. & Kloepper, J. W. (1995). Biological control of *Fusarium* wilt on cotton by use of endophytic bacteria. *Biological Control*, 5, 83-91.
10. Douanla-Meli, C. & Langer, E. (2013). Diversity and molecular phylogeny of fungal endophytes associated with *Diospyros crassiflora*. *Mycology, An International Journal on Fungal Biology*, 3, 175-187.
11. Ek-Ramos, M.J., Gomez-Flores, R., Orozco-Flores, A. A., Rodríguez-Padilla. C., González-Ochoa. G. & Tamez-Guerra. P. (2019). Bioactive products from plant-endophytic gram-positive bacteria. *Frontiers Microbiology*, 10, 463.
12. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
13. Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D. & Abdala, G. (2007). Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1145-1152.
14. Golinska, P., Wypij, M., Agarkar, G., Rathod, D., Dahm, H. & Rai, M. (2015). Endophytic actinobacteria of medical plants: diversity and bioactivity. *Antonie van Leeuwenhoek*, 108, 267-28.
15. Goryluk-Salmonowicz, A., Orzeszko-Rywka, A., Piórek, M., Rekosz-Burlaga, H., Otłowska, A., Gozdowski, D. & Błaszczyk, M. (2018). Plant growth promoting bacterial endophytes isolated from Polish herbal plants. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 17(5), 37-46.

16. Gupta, R. S. (2011). Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(2), 171-182.
17. Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W. F. & Kloepper, J. W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadin Journal of Microbiology*, 43, 895-914.
18. Herrera, H., Sanhueza, T., Novotná, A., Charles T. C. & Arriagada, C. (2020). Isolation and identification of endophytic bacteria from mycorrhizal tissues of terrestrial orchids from southern chile. *Diversity*, 12 (2), 55.
19. Jannah, M., Agustien, A., Zam, S. I., Lalfari, R. S., Aldi, Y., Dewi, A. P. & Djamaan, A. (2018). Isolation and characterization of antibiotic-producing endophytic bacteria from *citrus aurantifolia* swingle. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(3), 1473-1481.
20. Kántor, A., Mareček, J., Ivanišová, E., Terentjeva, M. & Kačániová, M. (2017). Microorganisms of grape berries. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B. Natural, Exact, and Applied Sciences*, 6 (711), 502-508.
21. Kobayashi, D. Y. & Palumbo, J. D. (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: C. W. Bacon & J. F. White (Ed), *Microbial Endophytes*. (pp. 99-233). Marcel Dekker, New York.
22. Kuklinsky-Sobral, J., Araujo, W. L., Mendes, R., Pizzirani-Kleiner, A. A. & Azevedo, J. L. (2005). Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (Glycine max) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant and soil*, 273(1-2), 91-99.
23. Lewin, G. R., Carlos, C., Chevrette, M. G., Horn, H. A., McDonald, B. R., Stankey, R. J., Fox, B. G. & Currie, C. R. (2016). Evolution and ecology of Actinobacteria and their bioenergy applications. *Annual review of microbiology*, 70, 235-254.
24. Li, Y., Wu, C., Xing, Z., Gao, B. & Zhang, L. (2017). Engineering the bacterial endophyte *Burkholderia pyrrocinia* JK-SH007 for the control of lepidoptera larvae by introducing the *cry218* genes of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31, 1167-1172.
25. Liop, P., Caruso, P., Cubero, J., Morente, C. & López, M. M. (1999). A simple extraction procedure for efficient routine detection of pathogenic bacteria in plant material by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods*, 37, 23-31.
26. Liu, H., Carvalhais, L. C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P. G., Pieterse, C. M. & Schenk, P. M. (2017). Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2552.
27. Liu, X. L., Liu, S. L., Liu, M., Kong, B. H., Liu, L. & Li, Y. H. (2014). A primary assessment of the endophytic bacterial community in a xerophilous moss (*Grimmia montana*) using molecular method and cultivated isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(1), 163-173.
28. Ma, Y., Rajkumar, M., Moreno, A., Zhang, C. & Freitas, H. (2017). Serpentine endophytic bacterium *Pseudomonas azotoformans* ASS1 accelerates phytoremediation of soil metals under drought stress. *Chemosphere*, 185, 75-85.
29. Mahmoudi, E., Ahmadi, A., Sayed-Tabatabaei, B.E., Ghobadi, C., Akhavan, A., Hasanzadeh, N. & Venturi, V. (2011). A novel AHL- degrading rhizobacterium quenches the virulence of *Pectobacterium atrosepticum* on potato plant. *Journal Plant Pathology*, 93 (3), 587-594.
30. Misaghi, I. J. & Donndelinger, C. R. (1990). Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, 80, 808-811.
31. Mushtaq, S., Shafiq, M., Asim, M. & Haider, M. S. (2018). Effect of bacterial endophytes isolated from citrus on the physiology of *Brassica Oleracea*. *International Journal of Biosciences*, 12(6), 225-234.
32. Qin, S., Zhang, Y. J., Yuan, B., Xu, P. Y., Xing, K., Wang, J. & Jiang, J. H. (2014) Isolation of ACC deaminase-producing habitat-adapted symbiotic bacteria associated with halophyte *Limonium sinense* (Girard) Kuntze and evaluating their plant growth-promoting activity under salt stress. *Plant Soil*, 374, 753-766.
33. Quambusch, M., Pirttilä, A. M., Tejesvi, M. V., Winkelmann, T. & Bartsch, M. (2014). Endophytic bacteria in plant tissue culture: differences between easy-and difficult-to-propagate *Prunus avium* genotypes. *Tree Physiology*, 34(5), 524-533.
34. Rabbee, M. F., Ali, M. & Baek, K. H. (2019). Endophyte *Bacillus velezensis* isolated from *citrus* spp. controls Streptomycin-Resistant *Xanthomonas citri* subsp. *citri* that causes citrus bacterial canker. *Agronomy*, 9(8), 470.
35. Rolli, E., Marasco, R., Vigani, G., Ettoumi, B., Mapelli, F., Deangelis, M. L., Gandolfi, C., Casati, E., Previtali, F., Gerbino, R., Pierotti, C. F., Borin, S., Sorlini, C., Zocchi, G. & Daffonchio, D. (2015).

Improved plant resistance to drought is promoted by the root-associated microbiome as a water stress-dependent trait. *Environmental Microbiology*, 17, 316-331.

36. Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001*) Molecular Cloning, a Laboratory Manual* (3rd Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
37. Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda, M. C. & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99.
38. Schaad, N. W., Jones, J. B. & Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria.* APS Press. St. Paul, Minnesota, USA.
39. Schulz, B. & Boyle, C. (2006). What are endophytes? In: Schulz B, Boyle C and Sieber T.N (eds). *Microbial Root Endophytes*, Springer-Verlag, Berlin, pp. 1-13.
40. Shi, Y., Lou, K & Li, C. (2011). Growth promotion effects of the endophyte *Acinetobacter johnsonii* strain 3-1 on sugar beet. *Journal of Genetic Resources*, 54(3), 159-166.
41. Shuai, Z., Na, Z., Zheng-Yong, Z., Ke, Z., Guo-Hua, W & Chang-Yan, T. (2016). Isolation of endophytic plant growth-promoting bacteria associated with the halophyte *Salicornia europaea* and evaluation of their promoting activity under salt stress. *Current Microbiology*, 73(4), 574-81.
42. Shutsrirung A., Chromkaew Y., Pathom-Aree W., Choonluchanon S. & Boonkerd N. (2013). Diversity of endophytic *actinomycetes* in mandarin grown in northern Thailand, their phytohormone production potential and plant growth promoting activity. *Soil Science and Plant Nutrition*, 59(3), 322-330.
43. Siala, R., Chobba, I. B., Vallaeys, T., Triki, M. A., Jrad, M., Cheffi, M., Ayedi, I., Elleuch, A., Nemsi, A., Cerqueira, F., Gdoura, R., Drira, N. and & Gharsallah, N. (2016). Analysis of the cultivable endophytic bacterial diversity in the date palm (*Phoenix dactylifera* L.) and evaluation of its antagonistic potential against pathogenic *Fusarium* species that cause date palm bayound disease. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 4(5), 93-104.
44. Su, F., Jacquard, C., Villaume, S., Michel, J., Rabenoelina, F., Clément, C., Barka, E. A., Dhondt-Cordelier, S. & Vaillant-Gaveau, N. (2015). *Burkholderia phytofirmans* PsJN reduces impact of freezing temperatures on photosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers Plant Science*, 6, 810.
45. Tamura, K. & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
46. Tran, P. N., Tan, N. E. H., Lee, Y.P., Gan, H. M., Polter, S. J., Dailey, L. K., Hudson, A. O. & Savka, M. A. (2015). Whole-genome sequence and classification of 11 endophytic bacteria from poisonivy (*Toxicodendron radicans*). *Genome Announcement* 3(6):e01319-15.
47. Vega, F. E., Pava-Ripoll, M., Posada, F. & Buyer, J. S. (2005). Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. *Journal Basic Microbiology*, 45, 371-380.