



گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)

جلد ۴۵، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۱

doi 10.22055/ppr.2022.17563

جداسازی، شناسایی و بررسی خصوصیات باکتری‌های اندوفیت ارقام ایرانی گندم

الهه طاهری^۱، سعید طریقی^{۲*} و پریسا طاهری^۳

- ۱- دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
- ۲- *نویسنده مسوول: دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران (starighi@um.ac.ir)
- ۳- استاد گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۲۸

چکیده

گندم یکی از محصولات زراعی مهم در سراسر جهان است. امروزه کشاورزی سنتی وابسته به کنترل شیمیایی می‌باشد که می‌تواند اکوسیستم‌ها را نابود نماید. هدف از این تحقیق، شناسایی باکتری‌های اندوفیت عامل مهار زیستی و افزایش دهنده رشد گندم بود. در این پژوهش ۶۶۴ باکتری از بذرها، اندام‌های هوایی و ریشه‌های ۱۴ رقم ایرانی گندم (ارگ، بهار، بهاران، بهرنک، چمران، چمران ۲، دنا، فلات، حیدری، پارس، پیشگام، سایون، سیروان و سیوند) جداسازی شدند و علیه دو بیمارگر مهم *Fusarium graminearum* و *Xanthomonas translucens* مورد ارزیابی قرار گرفتند. حداکثر شاخص بازدارندگی از رشد قارچ در کشت متقابل، ۸۶/۶۶ درصد مربوط به جدایه CB2 و حداکثر هاله جلوگیری از رشد باکتری، ۴۹/۳۳ میلی‌متر در جدایه‌های PaR28 و PiR5 مشاهده شد. دوازده جدایه آنتاگونیست قوی که جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه را نیز در آزمایشگاه بالا بردند، برای بررسی بیشتر خصوصیاتشان انتخاب شدند. همگی قادر به تولید پروتئاز، پکتیناز، سلولاز، آمیلاز، IAA، آمونیاک، سیدروفور و قابل حل نمودن فسفات بودند. شاخص‌های رشدی گیاه از جمله طول، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه‌ها، در گیاهچه‌های گندم تیمار شده با اندوفیت‌ها، افزایش یافتند. پنج جدایه نماینده با توالی‌یابی ژن 16S rRNA به عنوان *Bacillus sp.* (MT258405) و *Paenibacillus sp.* (MT258403، MT258407، MT258404 و MT258406) شناسایی شدند. شباهت جدایه *Bacillus* با گونه‌های *B. subtilis*، *B. amyloliquefaciens* و *B. velezensis* و شباهت جدایه‌های *Paenibacillus* با *P. jamilae*، *P. polymyxa* و *P. peoriae* بیش از ۹۹ درصد بود. نتایج بیانگر وجود دو جنس غالب باکتری اندوفیت همراه گندم بود که توانایی مهار زیستی و تحریک رشد گیاه را داشتند.

کلیدواژه‌ها: سم و کود زیستی، *Bacillus sp.*، *Fusarium graminearum*، *Paenibacillus sp.*، *Xanthomonas translucens*

دبیر تخصصی: دکتر میلاد آئینی

Citation: Taheri, E., Tarighi, S. & Taheri, P. (2022). Isolation, identification, and characterization of bacterial endophytes in Iranian wheat cultivars. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 45(2), 91-108. <https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17563>.

مقدمه

گندم با نام علمی *Triticum aestivum* L. در کشورهای که بخش بزرگی از جیره غذایی مردم را تشکیل می‌دهد، به عنوان یک محصول استراتژیک است. آفات و بیماری‌ها خسارت‌های کمی و کیفی زیادی را به این گیاه وارد می‌کنند. بیماری قارچی بلایت سنبله گندم یا اسکب یک بیماری ویرانگر است که گندم و سایر غلات دانه ریز را آلوده می‌کند. معمول‌ترین عامل بیماری با فرم جنسی *Gibberella zeae* (Schwein.) Petch و فرم غیرجنسی *Fusarium graminearum* (Schwabe) می‌باشد (Pereyra & Dill-Macky, 2010; Moya-Elizondo et al., 2011). بیماری لکه نواری یکی از بیماری‌های مهم باکتریایی گندم بوده و در صورت آلودگی گلوم‌ها، به آن گلوم سیاه نیز گفته می‌شود. عامل این بیماری، باکتری گرم منفی *Xanthomonas translucens* است (Smith et al., 1919).

تولید محصول سالم یکی از دغدغه‌های بشر در سال‌های اخیر می‌باشد. استفاده نابجا و بیش از حد از سموم و کودهای شیمیایی، خسارات جبران ناپذیری به سلامت انسان و محیط زیست وارد می‌کند. باکتری‌های اندوفیت که بخش داخلی گیاه را کلنیزه می‌کنند، می‌توانند جایگزینی مناسب برای ترکیبات شیمیایی باشند. برخی از این باکتری‌ها قادرند رشد گیاه را با تولید هورمون‌های گیاهی از جمله ایندول-۳-استیک اسید (IAA) و یا فراهم کردن مواد غذایی/سوبستراها برای گیاه مثل فسفر (با قابل حل نمودن فسفات)، نیتروژن (با تولید آمونیوم) و آهن (با تولید سیدروفور)، افزایش دهند (Santoyo et al., 2016; Puri et al., 2018). اثرات مفید غیرمستقیم باکتری‌های اندوفیت بر گیاهان به واسطه خاصیت آنتاگونیستی آن‌ها علیه بیمارگرهای گیاهی می‌باشند (Fadji & Babalola, 2020; Morales-Cedeno et al., 2021).

این پژوهش با هدف جداسازی باکتری‌های اندوفیت دارای خاصیت قارچ‌کشی علیه *F. graminearum* و باکتری‌کشی علیه *X. translucens* از بافت‌های مختلف (برگ، ریشه و بذر) ۱۴ رقم ایرانی گندم، بررسی تولید آنزیم‌های خارج سلولی و فاکتورهای دخیل در بهبود رشد گیاه و ارزیابی تأثیر باکتری‌ها بر جوانه‌زنی و رشد گندم در آزمایشگاه و گلخانه انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی اندوفیت‌ها

جهت جداسازی باکتری‌های اندوفیت از گیاه گندم، ۱۴ رقم به نام‌های ارگ، بهار، بهاران، بهرننگ، چمران، چمران ۲، دنا، فلات، حیدری، پارس، پیشگام، سایونز، سیروان و سیوند که از مرکز تحقیقات بذر مؤسسه نهال و بذر کرج تهیه شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. بذرها در گلدان‌های حاوی خاک غیر استریل مزرعه کشت شدند. نمونه برداری در مرحله ظهور سنبله انجام شد (Conn & Franco, 2004). اندوفیت‌ها از ریشه‌ها و اندام‌های هوایی به روش (Liu et al., 2017) و از بذرها به روش (Kiani et al., 2018) استخراج شدند. از سوسپانسیون‌های حاصله، سری رقت تهیه گردید و بر روی محیط‌های NA^2 ، LBA^1 و TSA^3 ۱۰ درصد به صورت چمنی کشت داده شدند. بعد از سه روز نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، تعدادی از کلنی‌های باکتریایی، بر اساس رنگ، اندازه، شکل و فراوانی برای بررسی‌های بیشتر، انتخاب شدند. جمعیت باکتری‌ها نیز در ارقام مختلف، با شمارش کلنی‌های موجود بر روی محیط کشت‌ها و محاسبه لگاریتم واحد تشکیل کلنی CFU/mL^4 در یک گرم از بافت‌های بررسی شده، تخمین زده شد.

1- Luria-Bertani agar

2- Nutrient agar

3- Tryptic soy agar

4- Colony-forming units

حساسیت باکتری‌های اندوفیتی به تنش اکسیداتیو مورد استفاده قرار گرفت (Hassett et al., 1995).

بررسی اثر باکتری‌ها بر رشد و تولید محصول گندم در شرایط گلخانه

جهت بررسی فاکتورهای رشدی گیاه در حضور باکتری‌های اندوفیت، بذرهاى گندم رقم فلات ضد عفونی سطحی شدند. دو هفته بعد از جوانه‌زدن در سینی‌های کشت استریل با مخلوط کوکویت پرلیت ضد عفونی شده (۸۰ به ۲۰)، سوسپانسیون جدایه‌های باکتریایی (10^8 CFU/mL) برای تیمار گیاهچه‌ها به کار رفت. برای این منظور، ریشه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون خیس خوردند (Botta et al., 2013). شاهد منفی تنها با محلول آب مقطر استریل تیمار گردید. آزمایش به صورت بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار برای هر تیمار انجام شد و در هر گلدان که با مخلوط مساوی خاک و ماسه استریل پر شده بودند، چهار گیاهچه کاشته شد. رطوبت نسبی گلخانه ۵۰ درصد بود و شرایط گلخانه به صورت ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد برای روز و ۲۰ درجه سانتی‌گراد در شب تنظیم شد. آبیاری با آب مقطر استریل صورت گرفت. گیاهچه‌ها بعد از شش هفته برداشت شدند. فعالیت افزایش دهنده‌گی رشد گیاه، بر اساس میزان افزایش فاکتورهای رشدی (طول، وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه) گیاهچه‌های تیمار شده در مقایسه با شاهد منفی، ارزیابی گردید.

شناسایی جدایه‌های منتخب

آزمون گرم برای همه باکتری‌های جداسازی شده به روش حلالیت در پتاس (۳ KOH درصد) انجام شد (Suslow et al., 1982). ریخت‌شناسی کلنی‌های منتخب با استفاده از میکروسکوپ نوری OLYMPUS BH-2 با بزرگنمایی 4X بررسی شد. DNA ژنومی باکتری‌ها به روش (De et al., 2010) استخراج گردید. شناسایی به کمک توالی 16S rRNA با پرایمرهای عمومی ۲۷F

بررسی خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌ها علیه *F. graminearum* و *X. translucens* و اثر بر جوانه‌زنی بذر گندم

به منظور بررسی خاصیت ضدقارچی جدایه‌ها علیه *Fusarium graminearum* (تهیه شده از کلکسیون میکروارگانیسم‌های آزمایشگاه میکروبیولوژی، دانشگاه ساری) در شرایط آزمایشگاهی، روش کشت متقابل استفاده شد (Boruah & Kumar, 2002). درصد بازدارندگی آنتاگونیست‌ها از رشد میسلیم با روش (Noori and Saud, 2012) محاسبه شد. جدایه‌های اندوفیتی که فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ بیمارگر نشان دادند، برای فعالیت ضد باکتری‌شان علیه *Xanthomonas translucens* (تهیه شده از کلکسیون میکروارگانیسم‌های گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد) نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور نیز روش کشت متقابل استفاده شد (Hend et al., 2016). با هدف انتخاب جدایه‌هایی که علاوه بر خاصیت مهارزیستی، توانایی افزایش رشد گیاه را نیز داشتند، اثر جدایه‌های آنتاگونیست بر جوانه‌زنی بذر گندم در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت (Hashmi et al., 2019). طول ریشه و ساقه گیاهچه‌ها نیز اندازه گرفته شدند.

آزمیم‌های خارج سلولی و فاکتورهای بهبود دهنده رشد گیاه

تولید آزمیم‌های پروتئاز (Smibert & Krieg, 1994)، پکتیناز (Ma et al., 2011)، سلولاز (Yang et al., 2014) و آمیلاز (An et al., 2005) مورد ارزیابی قرار گرفتند. از میان فاکتورهای مؤثر در رشد گیاه، تولید سیدروفور (Hu & Xu, 2011; Louden et al., 2011)، ایندول استیک اسید (IAA) (Patten & Glick, 2002)، آمونیاک (Cappucino & Sherman, 1992) و حل‌کنندگی فسفات (Mehta & Nautiyal, 2001) بررسی شدند. تولید بیوفیلیم به روش (Shukla and Rao, 2017) انجام شد. روش دیسک گذاری برای بررسی

در بذرها از ۰/۶۰۲ (چمران ۲) تا ۱/۵۴۴ (پارسی) تخمین زده شد. طبق محاسبات انجام شده ۵۱، ۱۹۴ و ۲۱۹ باکتری به ترتیب از بذرها، اندام‌های هوایی و ریشه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. در این پژوهش جمعیت باکتری‌های اندوفیتی در میان ارقام مختلف گندم نیز متفاوت بود به طوری که ارقام پر محصول، اندوفیت‌های فراوان و متنوع‌تری را نشان دادند (جدول ۱). ۳۴/۰۵ و ۶۵/۹۵ درصد از جدایه‌ها به ترتیب گرم منفی و گرم مثبت بودند. در ادامه متن مقاله جدایه‌هایی که از بذرها، ریشه‌ها و اندام‌های هوایی جدا شده‌اند، به ترتیب با پسوند‌های B، R و S بعد از کد ارقام (ارائه شده در جدول ۱)، ذکر گردیده‌اند.

بررسی خاصیت آنتاگونیستی اندوفیت‌ها علیه قارچ و باکتری بیمارگر و اثر بر گیاهچه در آزمایشگاه

از میان ۴۶۴ جدایه اندوفیت بررسی شده، ۱۴۲ جدایه علیه قارچ فوزاریوم خاصیت آنتاگونیستی نشان دادند. کارایی آن‌ها برای جلوگیری از رشد قارچ در روش کشت متقابل از صفر تا ۸۶/۶۶ درصد متغیر بود. تغییر شکل هیف‌ها و هاله جلوگیری از رشد قارچ مشاهده شد، اما برخی از جدایه‌ها بدون ایجاد هاله شفاف، از رشد بیمارگر جلوگیری کردند. از میان ۱۴۲ جدایه بررسی شده، ۸۸ اندوفیت که قوی‌ترین خاصیت ضدقارچی را داشتند برای بررسی علیه باکتری زانتوموناس انتخاب شدند. ۴۴ جدایه خاصیت ضدباکتری نیز نشان دادند که قطر هاله بازدارندگی از صفر تا ۴۹/۳۳ میلی‌متر متغیر بود. ۷۹/۶، ۱۳/۶ و ۶/۸ درصد از آن‌ها به ترتیب از ریشه‌ها، اندام‌های هوایی و بذرها بدست آمده بودند. ۶۶ درصد از آن‌ها گرم مثبت و ۳۴ درصد گرم منفی بودند.

جهت انتخاب اندوفیت‌های آنتاگونیست که قادر به بالا بردن رشد گیاه بودند، بررسی‌های آزمایشگاهی انجام شدند. نتایج نشان دادند جدایه‌های BR13، PaR28، PaR25، PaR23، CB2، CR11، BR20

(5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3') و (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3') ۱۴۹۲R (Jiang et al., 2006) و fd1 (-5' CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGA (TCCTGGCTCAG-3' rD1 و Segonds et al.,) انجام شد (1999). محصول تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت ماکروژن کره جنوبی فرستاده شد. برای شناسایی جدایه‌ها، قطعات تعیین ترادف شده در بانک ژن NCBI بلاست^۱ شدند. به منظور رسم درخت فیلوژنتیکی از نرم افزار MEGA-X ورژن ۱۰/۰/۵ استفاده گردید (Kumar et al., 2018) و درخت بر اساس روش اتصال همسایه‌ای^۲ رسم شد (Saitou & Nei, 1987). بوت استرپ ۱۰۰۰ برای بررسی پایداری گروه بندی به کار گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری

بررسی‌های آماری به کمک نرم افزارهای اکسل و SPSS (ورژن ۲۶) انجام گرفتند. آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه انجام شد و مقایسه میانگین داده‌ها به کمک آزمون دانکن با درصد احتمال معنی داری ۵ درصد محاسبه گردید.

نتایج

جداسازی باکتری‌های اندوفیت

چهارصد و شصت و چهار باکتری اندوفیت از گیاهچه‌های گندم جداسازی شدند. از آبی که در آخرین مرحله برای ضدعفونی سطحی بافت‌ها استفاده شد، بعد از مدت سه روز، باکتری رشد نکرد که نشان دهنده صحت مرحله ضدعفونی بود. لگاریتم تراکم جمعیت باکتری‌های اندوفیت در ریشه‌ها از ۳/۹۰۳ (چمران) تا ۵/۰۶۴ (سیروان)، در اندام‌های هوایی از ۳/۱۴۶ (ارگک) تا ۴/۹۵۴ (پیشگام) و

1- Basic Local Alignment Search Tool
2- Neighbor-joining

شده با جدایه‌های CB2، BaR4 و BaR15 مشاهده شد. حداکثر افزایش معنی‌دار در طول اندام‌های هوایی را، بذره‌های تیمار شده با جدایه SeR8، نشان دادند. بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون‌های آنتاگونیستی و بررسی آزمایشگاهی جوانه‌زنی بذر، ۱۲ جدایه نام برده شده، برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند.

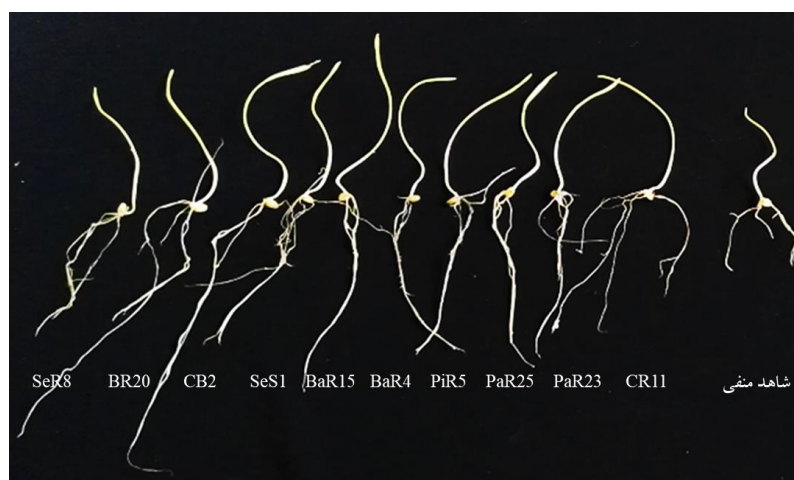
BaR15 و BaR4، SeR8، SeS1، PiR5 قادر به تحریک جوانه‌زنی بذر حداقل ۱۰ درصد بیشتر از بذره‌های تیمار نشده بعد از ۱۵ روز بودند. جدایه‌های BR20، PaR23، PaR25، PaR28، PiR5 و SeS1 به طور معنی‌داری طول ریشه را افزایش دادند. افزایش طول ریشه و اندام‌های هوایی در بذره‌های تیمار

جدول ۱- تخمین جمعیت باکتری‌های اندوفیت در بافت‌های متفاوت ارقام ایرانی گندم.

Table 1. Estimation of endophytic bacterial population in different tissues of Iranian wheat cultivars.

Wheat cultivars	Log CFU/g seed	Number of isolates evaluated from seeds	Log CFU/g shoot	Number of isolates evaluated from shoots	Log CFU/g root	Number of isolates evaluated from roots
Arg (A)	0.845	2	3.146	10	4.602	24
Baharan (B)	0.903	2	4.361	16	4.556	26
Chamran (C)	1.414	8	3.255	9	3.903	9
Sirvan (Si)	1.531	8	3.301	7	5.064	14
Parsi (Pa)	1.544	8	4.204	13	4.656	28
Heidari (H)	0.778	3	3.447	13	4.380	29
Chamran 2 (Ch)	0.602	1	3.271	17	4.146	9
Pishgam (Pi)	1.204	1	4.954	29	5.021	10
Falat (F)	0.778	2	3.204	19	4.041	6
Bahar (Ba)	0.903	4	4.301	18	5	20
Dena (D)	0.778	2	4.079	5	4.702	19
Behrang (Be)	1	2	4	14	4.301	12
Sivand (Se)	1.255	4	3.602	9	4.505	5
Sayonz (Sa)	1	4	3.342	15	4.113	8

The code for the isolates is followed by the names of the cultivars in parentheses.



شکل ۱- اثر برخی از باکتری‌های اندوفیت بر رشد گیاهچه در شرایط آزمایشگاهی در مقایسه با شاهد منفی (بدون تیمار باکتریایی)

Figure 1. The effect of some endophytic bacteria *in vitro* on seedling growth promotion in comparison with negative control (without any bacterial inoculation).

تشکیل دادند که میزان آن‌ها از 0.066 ± 0.06 تا 0.105 ± 0.06 سانتی‌متر متغیر بود. جدایه BaR4 بالاترین میزان تولید پکتیناز را داشت و در مرتبه بعدی PaR28 با تشکیل هاله 0.33 ± 0.03 سانتی‌متری قرار گرفت. همه جدایه‌ها سلولاز مثبت بودند و هاله شفاف ایجاد شده اطراف آن‌ها از 0.33 ± 0.03 تا 1.03 ± 0.28 سانتی‌متر متغیر بود. CR11 بالاترین تولید سلولاز را داشت که در مرتبه بعدی BR20 با میزان 0.33 ± 0.06 سانتی‌متر قرار گرفت. همه جدایه‌ها بر روی محیط نشاسته آگار، آمیلاز تولید نمودند که میزان هاله تشکیل شده از 0.33 ± 0.43 تا 0.57 ± 0.21 سانتی‌متر متغیر بود. CB2 بالاترین مقدار این آنزیم را در میان اندوفیت‌های بررسی شده نشان داد (شکل ۳).

نتایج آزمون‌های انجام شده بر روی جدایه‌های

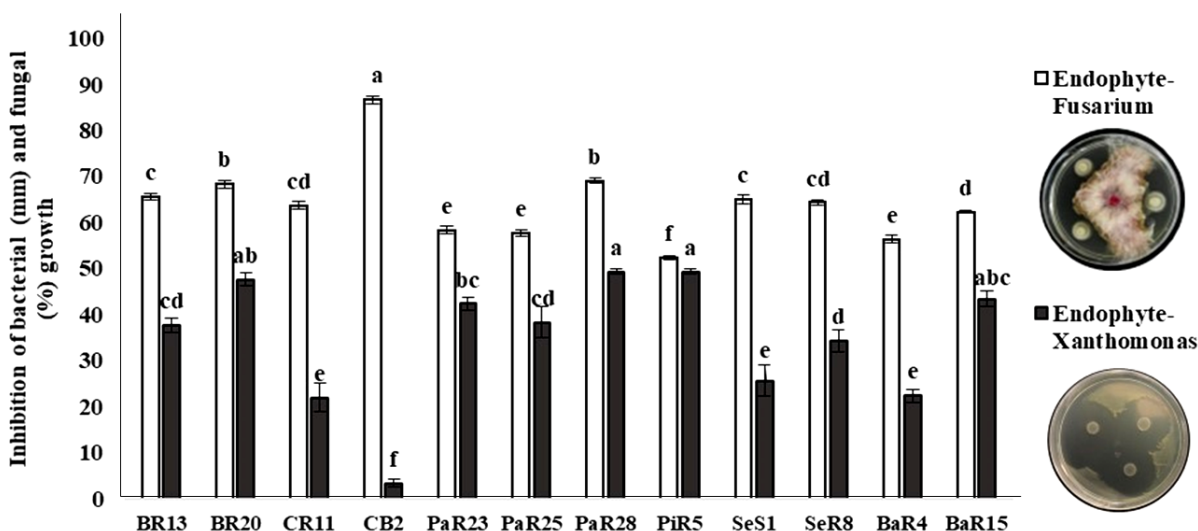
منتخب

خاصیت ضدقارچی و ضدباکتریایی

خاصیت آنتاگونیستی ۱۲ جدایه منتخب با یکدیگر مقایسه شدند. جدایه CB2 به عنوان قوی‌ترین اندوفیت در جلوگیری از قارچ و جدایه‌های PaR28 و PiR5 به عنوان قوی‌ترین آنتاگونیست‌ها علیه باکتری بیمارگر مشخص شدند (شکل ۲).

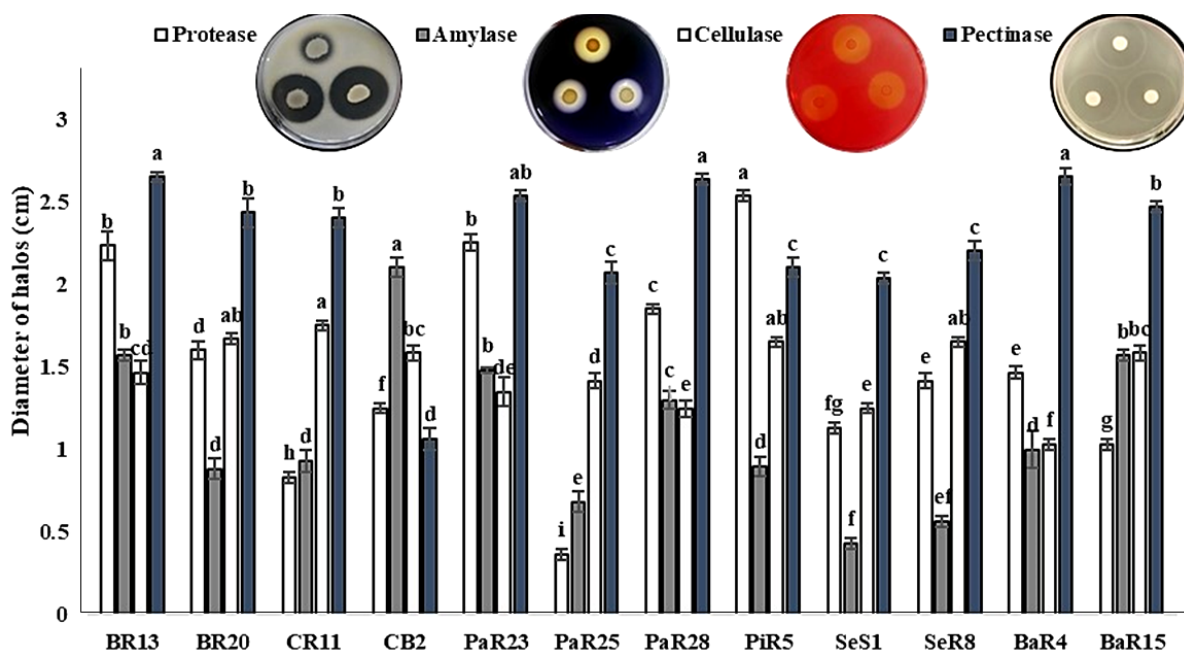
تولید آنزیم‌های خارج سلولی

همه جدایه‌ها هاله شفافی در محیط اسکیم میلک نشان دادند. فعالیت پروتئاز از 0.33 ± 0.36 تا 0.33 ± 0.33 نشان دادند. جدایه PiR5 بالاترین میزان پروتئاز را تولید نمود. همه جدایه‌ها هاله تولید پکتیناز را



شکل ۲- ستون‌های سفید نشان‌دهنده درصد بازدارندگی از رشد قارچ *Fusarium graminearum* هستند. ستون‌های سیاه مربوط به قطر هاله جلوگیری از رشد باکتری *Xanthomonas translucens* اطراف اندوفیت‌های آنتاگونیست می‌باشند (mm). نتایج میانگینی از سه تکرار هستند و حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار را برای هر تیمار نشان می‌دهند که با آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد محاسبه شده‌اند.

Figure 2. The white columns indicate the percent of inhibition of the *Fusarium graminearum* growth. The black columns show the clear halos of the inhibition zone of *Xanthomonas translucens* growth around the antagonistic endophytes (mm). Results are the means of three replicates per plate. Different lower-case letters indicate significant differences for each treatment identified with analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's Multiple Range Test ($P \leq 0.05$).



شکل ۳- ستون‌های سفید رنگ فعالیت پروتئاز را بر روی محیط اسکیم میلک نشان می‌دهند (cm). ستون‌های خاکستری تیره نشان دهنده تولید آمیلاز توسط جدایه‌ها بر روی محیط نشاسته آگار بعد از استفاده از محلول ید می‌باشند (cm). ستون‌های خاکستری روشن نشان دهنده هاله شفاف فعالیت سلولازی، بعد از استفاده از کنگورد و NaCl هستند (cm). ستون‌های آبی تیره نشان دهنده هاله شفاف بعد از استفاده از CTAB می‌باشند که فعالیت پکتینازی را مشخص می‌کنند (cm). نتایج میانگینی از سه تکرار هستند و حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار را برای هر تیمار نشان می‌دهند که با آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد محاسبه شده‌اند.

Figure 3. The white columns show the diameter of the clear zone around isolates which represented protease activity in Skimmed milk agar medium (cm). The dark gray columns show the diameter of the clear zone around isolates which represented the amylase production on starch agar medium after using Iodide solution (cm). The light gray columns indicate the diameter of the clear zone around isolates which represented the cellulase activity after using Congo Red and NaCl (cm). The dark blue columns represent the diameter of the clear zone after using CTAB which shows pectinase activity (cm). Results are the means of three replicates per plate. Different lower-case letters indicate significant differences for each treatment identified with analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's Multiple Range Test ($P \leq 0.05$).

مقدار $0.001 \pm 1/17$ قرار داشت. اطراف همه جدایه‌ها هاله نارنجی رنگ تشکیل شد که مشخصه تولید سیدروفور است. جدایه SeR8 بیشترین میزان تولید را با قطر هاله $0.33 \pm 1/46$ سانتی‌متر نشان داد (شکل ۴).

تولید IAA، آمونیوم و حل‌کنندگی فسفات

بیوسنتز هورمون ایندول ۳-استیک اسید برای همه جدایه‌ها در حضور تریپتوفان مثبت بود. بدون تریپتوفان اندوفیت‌ها نتوانستند IAA را تولید نمایند. مقادیر تولید آن

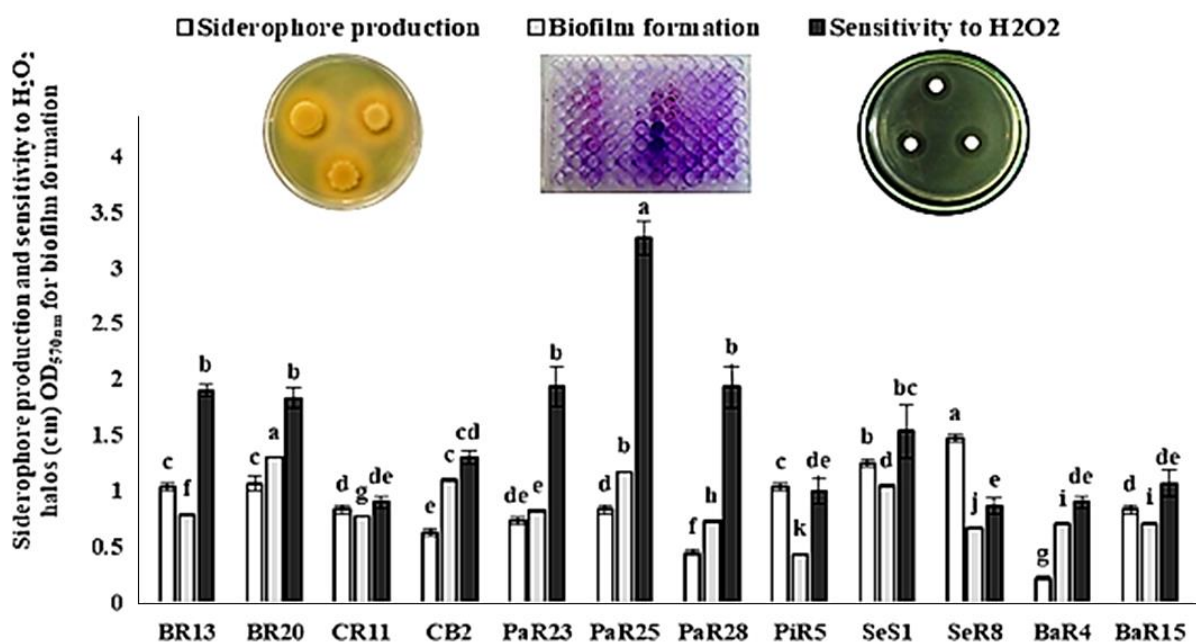
میزان حساسیت به تنش اکسیداتیو، تولید بیوفیلم و سیدروفور

همه جدایه‌ها به $3\% \text{H}_2\text{O}_2$ درصد حساس بودند. جدایه PaR25 بیشترین میزان حساسیت با هاله کشندگی $0.145 \pm 3/26$ سانتی‌متر را نشان داد و کم‌ترین میزان حساسیت مربوط به SeR8 با هاله $0.66 \pm 0/86$ سانتی‌متر بود. جدایه BR20 با میزان $0.02 \pm 1/29$ بالاترین فعالیت تشکیل بیوفیلم را نشان داد که در مرتبه بعدی PaR25 با

بررسی اثر باکتری‌ها بر فاکتورهای رشدی گیاه در شرایط گلخانه

فعالیت افزایش دهندگی رشد گیاه بسیار متنوع بود. گیاهان تیمار شده افزایش چشمگیری را در رشد طولی اندام‌های هوایی (۱۳/۱۹ تا ۳۳/۲۲ درصد) و ریشه‌ها (۲۹/۲۲ تا ۶۳/۰۴ تا ۶۲/۹۷ درصد)، وزن تر اندام‌های هوایی (۱۵/۶ تا ۶۳/۰۴ درصد) و ریشه‌ها (۸/۰۴ تا ۳۹/۸۸ درصد)، وزن خشک اندام‌های هوایی (۲۳/۵۲ تا ۶۳/۰۷ درصد) و ریشه‌ها (۱۳/۲۷ تا ۶۱/۵۰۵ درصد)، نشان دادند. بیشترین اثر بر طول ریشه در جدایه‌های CB2، PaR28 و BR20 مشاهده شد.

از ۰/۲۳۷ ± ۷/۰۵ تا ۱/۳۷ ± ۱۴/۱۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر بعد از هفت روز متغیر بود که به ترتیب متعلق به PiR5 و BaR15 بودند. نتایج نشان دادند همه جدایه‌ها توانایی قابل حل نمودن فسفات را داشتند. مقادیر آن از ۰/۱۳۹ ± ۶/۰۹ تا ۰/۱۷۱ ± ۱۴/۹۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ثبت گردید که به ترتیب متعلق به PaR23 و CB2 بودند. همه جدایه‌ها آمونیوم تولید نمودند که مقادیر آن‌ها از ۰/۰۲۲ ± ۰/۲۹۱ تا ۰/۰۲۱ ± ۳۴/۴۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بودند. جدایه BaR4 بیشترین مقدار را داشت که بعد از آن BaR15 با مقدار ۰/۱۲۸ ± ۳۲/۵۱ قرار گرفت (شکل ۵).



شکل ۴- ستون‌های سفید نشان‌دهنده قطر هاله‌های نارنجی اطراف اندوفیت‌ها هستند که مشخصه تولید سیدروفور جدایه‌ها بر روی محیط CAS می‌باشند (cm). ستون‌های خاکستری روشن نشان‌دهنده تشکیل بیوفیلم با اندازه‌گیری جذب در 570nm هستند. ستون‌های خاکستری تیره قطر هاله‌های شفاف حساسیت به H₂O₂ را نشان می‌دهند (cm). نتایج میانگینی از سه تکرار هستند و حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار را برای هر تیمار نشان می‌دهند که با آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد محاسبه شده‌اند.

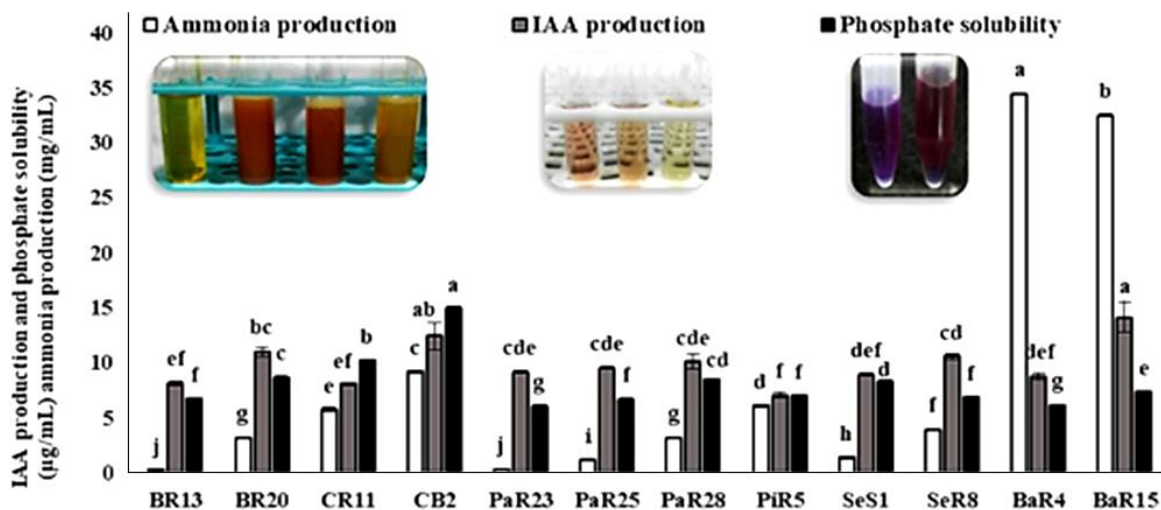
Figure 4. The white columns show the diameter of orange halos around endophytes which indicated the siderophore production of isolates on CAS agar medium (cm). The light gray columns indicate biofilm formation by measuring optical density at 570nm. The dark gray columns represent clear halos of sensitivity to H₂O₂ (cm). Results are the means of three replicates per plate. Different lower-case letters indicate significant differences for each treatment identified with analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's Multiple Range Test (P ≤ 0.05).

خورده، کمی برآمده به رنگ کرمی مایل به سفید بودند که زیر میکروسکوپ، کدر دیده می‌شدند. جدایه‌های PaR23، PaR25، PaR28 و PiR5 در گروه C قرار گرفتند که مشابه گروه B بودند اما حاشیه لوب‌دار داشتند. CR11، SeS1، BaR4 و BaR15 در گروه D طبقه بندی شدند که کلنی‌ها به فرم بی‌شکل، بی‌رنگ، به صورت مسطح بودند و زیر میکروسکوپ نیمه شفاف در نظر گرفته شدند. گروه E جدایه SeR8 را شامل می‌شد که شبیه گروه D بود ولی حالت دمل داری داشت (شکل ۶). توالی یابی پنج جدایه CB2، BaR15، SeR8، BR20 و PaR28 که هر کدام از یک گروه ریخت‌شناسی متفاوت بودند و خواص قابل قبولی داشتند، انجام شد. داده‌ها نشان دادند جدایه‌ها به جنس‌های *Bacillus* و *Paenibacillus* تعلق دارند.

جدایه‌های CB2، SeR8 و BR20 بیشترین اثر را در افزایش رشد اندام‌های هوایی نشان دادند. بهترین اثر بر وزن تر ریشه‌ها در جدایه‌های CB2 و BR20 مشاهده شد و جدایه‌های SeR8 و BaR15 اثر قابل توجهی بر افزایش وزن تر اندام‌های هوایی نشان دادند. وزن خشک ریشه‌ها در گیاهان تیمار شده با CB2 و BR20 و وزن خشک اندام‌های هوایی در گیاهان تیمار شده با CB2، SeR8 و BaR15، بیشتر از سایر جدایه‌ها افزایش یافت.

شناسایی جدایه‌های منتخب

جدایه‌ها با توجه به خواص ظاهری در پنج دسته طبقه‌بندی شدند. گروه A (CB2) گرد، سفید، دارای سطحی صاف بوده و زیر میکروسکوپ، نیمه شفاف مشاهده شدند. گروه B (BR20 و BR13) دارای حاشیه چین



شکل ۵- ستون‌های سفید نشان دهنده مقدار تولید آمونیاوم در آب پپتون می‌باشند. ستون‌های خاکستری تیره تولید IAA را در محیط مایع LB حاوی ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ال-تریپتوفان نشان می‌دهند. ستون‌های سیاه فعالیت حل‌کنندگی فسفات را در محیط مایع NBRIP نشان می‌دهند. نتایج میانگینی از سه تکرار هستند و حروف متفاوت، اختلاف معنی‌دار را برای هر تیمار نشان می‌دهند که با آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد محاسبه شده‌اند.

Figure 5. The white columns show the amount of ammonia productivity in peptone water broth. The dark gray columns indicate IAA production in LB broth supplemented with 5 mg/mL of L-tryptophan. The black columns declare phosphate solubilization activity in the NBRIP broth medium. Results are the means of three replicates per plate. Different lower-case letters indicate significant differences for each treatment identified with analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's Multiple Range Test ($P \leq 0.05$).

Bacillus در نظر گرفته شد و با شماره دسترسی MT258405 در سایت موجود است. سایر جدایه‌ها به عنوان گونه‌ای از *Paenibacillus* در نظر گرفته شدند که شماره‌های دسترسی برای BaR15، SeR8، BR20 و PaR28 به ترتیب عبارتند از MT258403، MT258404، MT258406 و

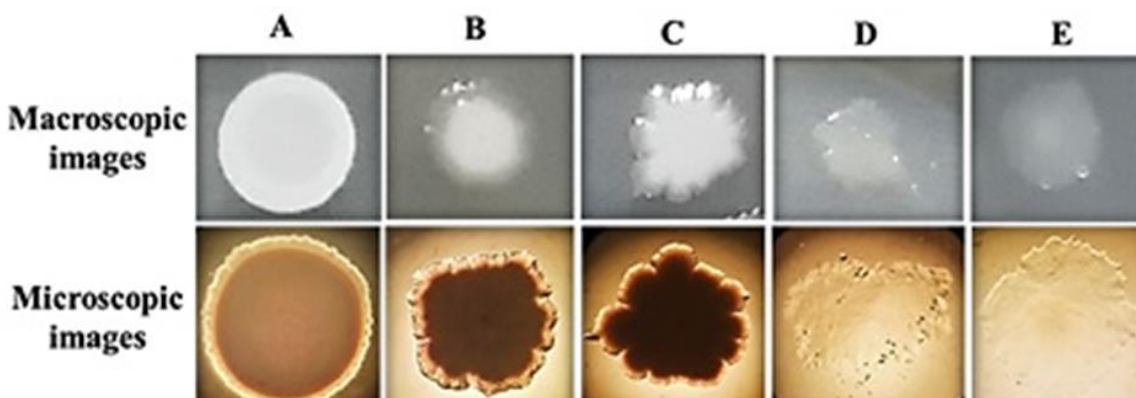
شبهت CB2 با *B. subtilis*، *B. amyloliquefaciens* و *B. velezensis* و شبهت جدایه‌های BaR15، SeR8، BR20 و PaR28 با *P. jamilae*، *P. polymyxa* و *P. peoriae* بیش از ۹۹ درصد بود. درخت فیلوژنتیکی برای جدایه‌های بررسی شده رسم گردید (شکل ۷). توالی‌ها در بانک ژن بارگزاری شدند. CB2 به عنوان گونه‌ای از

جدول ۲- مقایسه میانگین اثر باکتری‌های اندوفیت منتخب بر فاکتورهای رشدی گیاهچه‌های گندم در بررسی‌های گلخانه‌ای.

Table 2. Mean comparison of the effects of selected endophytic bacteria on growth characteristics of wheat seedlings in greenhouse trials.

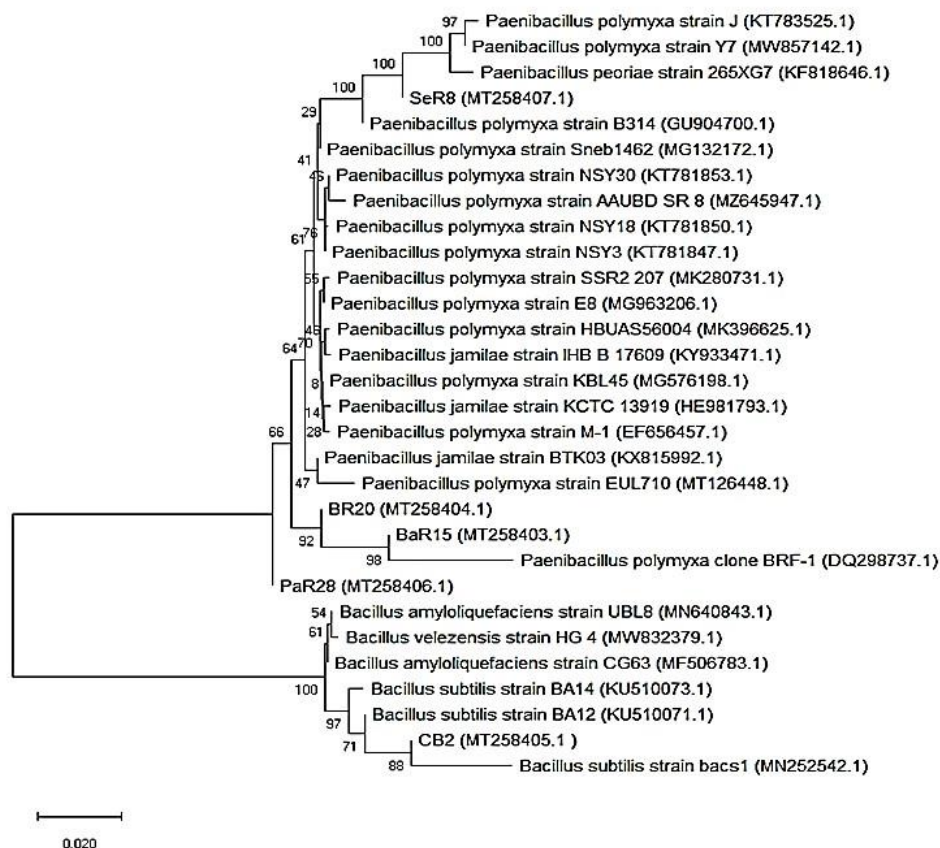
Isolates	Shoot length (cm)	Root length (cm)	Shoot fresh weight (g/plant)	Root fresh weight (g/plant)	Shoot dry weight (g/plant)	Root dry weight (g/plant)
BR13	47.312 ^{ab}	47.25 ^{ab}	2.328 ^{abc}	1.424 ^e	0.401 ^d	0.291 ^{cd}
BR20	50.25 ^a	52.042 ^{ab}	2.365 ^{abc}	1.649 ^{ab}	0.403 ^d	0.362 ^a
CR11	47.5 ^{ab}	47.375 ^{bc}	1.83 ^e	1.33 ^f	0.382 ^d	0.257 ^{de}
CB2	52.375 ^a	56.125 ^a	2.265 ^{bc}	1.722 ^a	0.499 ^a	0.365 ^a
PaR23	44.625 ^b	47.812 ^{bc}	1.965 ^{de}	1.33 ^f	0.378 ^d	0.316 ^{abc}
PaR25	44.5 ^b	48.5 ^{bc}	1.96 ^{de}	1.447 ^{de}	0.38 ^d	0.296 ^{bcd}
PaR28	49.75 ^a	52.062 ^{ab}	2.127 ^{cd}	1.591 ^{bc}	0.415 ^{bcd}	0.337 ^{abc}
PiR5	47.625 ^{ab}	48.375 ^{bc}	1.977 ^{de}	1.5 ^{de}	0.409 ^{cd}	0.331 ^{abc}
SeS1	47.625 ^{ab}	44.5 ^c	1.92 ^{de}	1.453 ^{de}	0.391 ^d	0.322 ^{abc}
SeR8	51.062 ^a	48.75 ^{bc}	2.581 ^a	1.527 ^{cd}	0.463 ^{ab}	0.343 ^{ab}
BaR4	48.937 ^{ab}	47.5 ^{bc}	2.151 ^{cd}	1.445 ^{de}	0.384 ^d	0.309 ^{bc}
BaR15	48.125 ^{ab}	51.875 ^{ab}	2.512 ^{ab}	1.431 ^e	0.454 ^{abc}	0.324 ^{abc}
Control	39.312 ^c	34.437 ^d	1.583 ^f	1.231 ^g	0.306 ^e	0.226 ^e

Controls include plants without bacterial treatment. The results are an average of 16 replicates. Means follow by different lower-case letters indicate significant differences for each treatment which were determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's Multiple Range Test ($P \leq 0.05$).



شکل ۶- ریخت‌شناسی کلنی اندوفیت‌های منتخب. جدایه‌ها در پنج دسته طبقه بندی شدند که با حروف A تا E مشخص شده‌اند. تصاویر میکروسکوپی به کمک میکروسکوپ نوری OLYMPUS BH-2 با بزرگنمایی 4X تهیه شده‌اند.

Figure 6. Colony morphotyping of selected endophytes. The isolates are grouped into five classes which are indicated by the A to E letters. Microscopic pictures were taken by optical microscope OLYMPUS BH-2 with 4X magnification.



شکل ۷- دندروگرام فیلوژنتیکی بر اساس ژن 16S rRNA از باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده از رقم‌های مختلف گندم در ایران. درخت با استفاده از نرم افزار MEGA-X و روش اتصال همسایه‌ای رسم شده که ارتباط گونه‌های *Bacillus* و *Paenibacillus* را نشان می‌دهد. شماره‌های موجود در پرانتزها نشان دهنده شماره دسترسی در بانک ژن می‌باشند.

Figure 7. Phylogenetic dendrogram based on 16S rRNA gene from endophytic bacterial isolates obtained from wheat cultivars in Iran. The tree generated by using MEGA-X with the neighbor-joining method shows the relationship between *Bacillus* and *Paenibacillus* species. The numbers in parentheses represent the accession numbers of sequences in GenBank.

تراکم جمعیت باکتری‌های اندوفیتی اثر بگذارند که عبارتند از، گونه‌های گیاه، بافت بررسی شده، سن، فصل نمونه‌برداری، رقم گیاه، ارتباط با سایر میکروارگانیسم‌ها، استراتژی‌های مدیریتی و غیره (Overbeek & Elsas, 2008; Robinson et al., 2016; Gdanetz & Trail, 2017). به طور کلی تعداد باکتری‌های اندوفیت در ریشه‌ها بیشتر از اندام‌های هوایی و بذر بودند که این یافته‌ها با نتایج Zinniel et al. (2002) و Rosenblueth and Martínez-Romero (2004) تطابق داشتند. در این

بحث

با توجه به اهمیت اندوفیت‌ها در بهبود رشد گیاه و حفاظت از آن‌ها در برابر بیمارگرها، هدف از این مطالعه مقایسه جمعیت میکروبی اندوفیتی ارقام گوناگون گندم بود تا بررسی شود که چه رقمی حامل باکتری‌های قوی‌تر دارای خاصیت بالقوه سم یا کود زیستی می‌باشد. با مقایسه تراکم جمعیت باکتری‌های اندوفیت در ریشه‌ها، اندام‌های هوایی و بذرهای ارقام مختلف، جمعیت‌های متفاوتی از $\log \text{CFU/g}$ ۰/۶۰۲ تا ۵/۰۶۴ مشاهده شد. فاکتورهای بسیاری می‌توانند بر

حل کنندگی فسفات، در دسترس بودن این عنصر را برای گیاه افزایش می‌دهند که منجر به بهبود رشد گیاه می‌شود (Verma et al., 2013; Patel & Archana, 2017). برخی از جدایه‌های اندوفیت با تولید آمونیاک، نیتروژن را برای گیاه فراهم می‌کنند که منجر به افزایش رشد (طویل شدن ریشه و اندام‌های هوایی) و بهبود مکانیسم‌های دفاعی می‌شوند (Minaxi et al., 2012; Li et al., 2016). ارتباط متقابل مثبتی بین تولید آمونیاک با همه فاکتورهای رشدی به جز وزن تر ریشه مشاهده شد.

در نهایت پنج جدایه که بهترین خاصیت آنتاگونیستی و فعالیت بهبود دهندگی رشد گیاه را داشتند، شناسایی شدند. جدایه CB2 به عنوان *Bacillus sp.* و باکتری‌های PaR28، BaR15، SeR8 و BR20 به عنوان *Paenibacillus sp.* ثبت شدند. تاکنون در رابطه با نقش باکتری‌های اندوفیتی در کنترل باکتری *X. translucens* گزارشی وجود ندارد. مطالعات قبلی اثر باکتری‌های *Pantoea* و *Pseudomonas spp.* مانند *agglomerans* را در کنترل این باکتری مهم بیان کرده‌اند (Stromberg et al., 2000). بسیاری از گونه‌های *Bacillus* و *Paenibacillus* با خاصیت مهارکنندگی زیستی علیه بیمارگرهای قارچی و باکتریایی گزارش شده‌اند که قادر به تولید سیدروفور و آنزیم‌های خارج سلولی هستند (Díaz Herrera et al., 2016; Wang et al., 2019; Ghanadi et al., 2020; Khan et al., 2020; Ali et al., 2021; Chávez-Ramírez et al., 2021; Fallahzadeh-Mamaghani et al., 2021).

نقش باکتری‌های *Bacillus* و *Paenibacillus* در بهبود رشد گندم توسط محققان دیگری نیز بیان شده است (Liu et al. 2009; Zhao et al., 2015; Yousaf et al., 2017; Aslam et al., 2018; Ali et al., 2021). Emami et al. (2019) فرضیه اثر سینرژیستی

پژوهش جمعیت باکتری‌های اندوفیتی در میان ارقام مختلف گندم نیز متفاوت بود به طوری که ارقام پر محصول اندوفیت‌های فراوان و متنوع‌تری را نشان دادند. نتایج بدست آمده منطبق بر گزارشات (Yousaf et al., 2017) بودند.

داده‌ها نشان دادند آنزیم‌های پروتئاز، سلولاز و پکتیناز با فعالیت ضدباکتری و آنزیم‌های سلولاز و آمیلاز با فعالیت ضد قارچی ارتباط متقابل مثبتی دارند. این آنزیم‌ها همچنین ورود و انتشار اندوفیت‌ها در داخل گیاه را نیز تسهیل می‌کنند (Piromyou et al., 2015; Weselowski et al., 2016). بیوفیلم برای کلنیزاسیون بافت‌های گیاه توسط اندوفیت‌ها ضروری است (Lucero et al., 2020; Hazarika et al., 2021). تشکیل بیوفیلم در این باکتری‌ها با طول ریشه و اندام‌های هوایی و وزن تر و خشک ریشه‌ها ارتباط مثبت نشان داد. نتایج مشخص کردند که ارتباط متقابل مثبتی بین تولید سیدروفور با افزایش طول و وزن تر اندام‌های هوایی و وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه وجود دارد. این نتایج با یافته‌های (Carvalhais et al., 2013) و (Grobelaq and Hiller, 2017) مطابقت داشتند که نشان دادند سیدروفورهای باکتریایی برای رشد اندام‌های هوایی و توسعه گیاهان مفید هستند. تولید سیدروفور توسط اندوفیت‌ها یکی از مکانیسم‌های مقابله با بیمارگرهای گیاهی به واسطه جلوگیری از رشد آن‌ها و القای مقاومت نیز می‌باشد (Yu et al., 2011).

اندوفیت‌هایی که هورمون IAA بیشتری تولید کردند توانستند رشد ریشه و اندام‌های هوایی، وزن تر و خشک گیاه را بیشتر از شاهد افزایش دهند. محققان نشان دادند که IAA تولید شده توسط اندوفیت‌ها اندازه ریشه و گسترش آن را بالا می‌برند که منجر به جذب بهتر آب و مواد غذایی می‌گردد (Pandey et al., 2017). ارتباط متقابل مثبتی بین حلالیت فسفات با همه فاکتورهای رشدی بجز وزن تر اندام‌های هوایی مشاهده شد. باکتری‌های اندوفیت با قابلیت

شده است. ارزیابی متابولیت‌های با فعالیت ضدقارچی و ضدباکتریایی این اندوفیت‌ها و اثبات کارایی آن‌ها علیه بیمارگرهای مهم دیگر در شرایط آزمایشگاهی و محیط زنده در حال بررسی هستند.

سپاس‌گزاری

از دانشگاه فردوسی مشهد بابت تأمین بودجه لازم برای انجام این پژوهش در قالب طرح پژوهشی به شماره ۳/۴۷۴۸۱ قدردانی می‌گردد.

را بیان کردند و نشان دادند ویژگی‌هایی از باکتری‌ها که بهبود رشد گیاه را موجب می‌شوند به تنهایی عمل نمی‌کنند، بلکه اثر همزمان چندین مکانیسم در افزایش رشد گیاه دخیل هستند. بنا بر اطلاعات موجود در مقالات منتشر شده، این اولین تحقیق راجع به جمعیت اندوفیت‌ها در ارقام مذکور است. باکتری‌های شناسایی شده در این پژوهش، برای اولین بار از بافت‌های ارقام بررسی شده جداسازی شده‌اند و همچنین اثر آنتاگونیستی آن‌ها برای اولین بار در دنیا بر روی بیمارگر *X. translucens* اثبات

References

- Ali, M. A., Lou, Y., Hafeez, R., Li, X., Hossain, A., Xie, T., Lin, L., Li, B., Yin, Y., Yan, J., & An, Q. (2021). Functional analysis and genome mining reveal high potential of biocontrol and plant growth promotion in nodule-inhabiting bacteria within *Paenibacillus polymyxa* complex. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 618601.
- An, J. M., Kim, Y. K., Lim, W. J., Hong, S. Y., An, C. L., Shin, E. C., Cho, K. M., Choi, B. R., Kang, J. M., Lee, S. M., Kim, H., & Yun, H. D. (2005). Evaluation of a novel bifunctional xylanase–cellulase constructed by gene fusion. *Enzyme and Microbial Technology*, *36*, 989-95.
- Aslam, A., Zahir, Z. A., Asghar, H. N., & Shahid, M. (2018). Effect of carbonic anhydrase-containing endophytic bacteria on growth and physiological attributes of wheat under water-deficit conditions. *Plant Production Science*, *21*, 244-255.
- Boruah, D. H. P., & Kumar, D. B. S. (2002). Plant disease suppression and growth promotion by a fluorescent *Pseudomonas* strain. *Folia Microbiologica*, *47*, 137-143.
- Botta, A. L., Santacecilia, A., Ercole, C., Cacchio, P., & Del Gallo, M. (2013). In vitro and in vivo inoculation of four endophytic bacteria on *Lycopersicon esculentum*. *New Biotechnology*, *30*, 666-674.
- Cappucino, J. C., & Sherman, N. (1992). *Microbiology: A Laboratory Manual* (5th ed.). Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Carvalho, L. C., Muzzi, F., Tan, C. H., Choo, J. H., & Schenk, P. M. (2013). Plant growth in *Arabidopsis* is assisted by compost soil-derived microbial communities. *Frontiers in Plant Science*, *4*, 235.
- Chávez-Ramírez, B., Rodríguez-Velázquez, N. D., Mondragón-Talonia, C. M., Avendaño-Arrazate, C. H., Martínez-Bolaños, M., Vásquez-Murrieta, M. S., & de Los Santos, P. E. (2021). *Paenibacillus polymyxa* NMA1017 as a potential biocontrol agent of *Phytophthora*

tropicalis, causal agent of cacao black pod rot in Chiapas, Mexico. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114, 55-68.

Conn, V. M., & Franco, C. M. (2004). Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 1787-1794.

De, S., Kaur, G., Roy, A., Dogra, G., Kaushik, R., Yadav, P., Singh, R., Datta, T. K., & Goswami, S. L. (2010). A Simple Method for the Efficient Isolation of Genomic DNA from Lactobacilli Isolated from Traditional Indian Fermented Milk (dahi). *Indian Journal of Microbiology*, 50, 412-418.

Díaz Herrera, S., Grossi, C., Zawoznik, M., & Groppa, M. D. (2016). Wheat seeds harbour bacterial endophytes with potential as plant growth promoters and biocontrol agents of *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research*, 186, 37-43.

Emami, S., Alikhani, H. A., Pourbabaei, A. A., Etesami, H., Sarmadian, F., & Motessharezadeh, B. (2019). Effect of rhizospheric and endophytic bacteria with multiple plant growth promoting traits on wheat growth. *Environmental Science and Pollution Research*, 29, 19804-19813.

Fadji, A. E., & Babalola, O. O. (2020). Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 467.

Fallahzadeh-Mamaghani, V., Golchin, S., Shirzad, A., Mohammadi, H., & Mohamadivand, F. (2021). Characterization of *Paenibacillus polymixa* N179 as a robust and multifunctional biocontrol agent. *Biological Control*, 154, 104505.

Ghanadi, H., Khakvar, R., & Shirzad, A. (2020). Investigating of efficacy of endophytic bacteria isolated from cucumber in biocontrol of *Fusarium* crown and root rot disease of cucumber. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 44(1).

Gdanetz, K., & Trail, F. (2017). The wheat microbiome under four management strategies, and potential for endophytes in disease protection. *Phytobiomes Journal*, 1, 158-168.

Grobelak, A., & Hiller, J. (2017). Bacterial siderophores promote plant growth: screening of catechol and hydroxamate siderophores. *International Journal of Phytoremediation*, 19, 825-833.

Hashmi, I., Paul, C., Al-Dourobi, A., Sandoz, F., Deschamps, P., Junier, T., Junier, P., & Bindschedler, S. (2019). Comparison of the plant growth-promotion performance of a consortium of Bacilli inoculated as endospores or as vegetative cells. *FEMS Microbiology Ecology*, 95, f147.

Hassett, D. J., Schweizer, H. P., & Ohman, D. E. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* sodA and sodB mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase

activity demonstrate the importance of the iron cofactored form in aerobic metabolism. *Journal of Bacteriology*, 177, 6330-6337.

Hazarika, S. N., Saikia, K., Borah, A., & Thakur, D. (2021). Prospecting endophytic bacteria endowed with plant growth promoting potential isolated from *Camellia sinensis*. *Frontiers in Microbiology*, 12, 738058

Hend, M. M., Nasisa, S., Gomaa, N., & Essa, A. M. M. (2016). Antagonistic effect of the endophytic bacteria and against some phytopathogens. *Egyptian Journal of Botany*, 56, 613-626.

Hu, Q. P., & Xu, J. G. (2011). A simple double-layered chrome azurol S agar (SDCASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus*. *African Journal of Microbiological Research*, 5, 4321-4327.

Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L. R., & Fields, M. W. (2006). Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an Athalassohaline lake in northwestern China. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 3832-45.

Khan, M. S., Gao, J., Chen, X., Zhang, M., Yang, F., Du, Y., Moe, T. S., Munir, I., Xue, J., & Zhang, X. (2020). Isolation and Characterization of Plant Growth-Promoting Endophytic Bacteria *Paenibacillus polymyxa* SK1 from *Lilium lancifolium*. *BioMed Research International*, 8650957, 17.

Kiani, T., Abdi Khan, S. H., Noureen, N., Yasmin, T., Zakria, M., Ahmed, H., Mehboob, F., & Farrakh, S. (2018). Isolation and characterization of culturable endophytic bacterial community of stripe rust-resistant and stripe rust-susceptible Pakistani wheat cultivars. *International Journal of Microbiology*, 22, 191-201.

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35, 1547-1549.

Li, X., Geng, X., Xie, R., Fu, L., Jiang, J., Gao, L., & Sun, J. (2016). The endophytic bacteria isolated from elephant grass (*Pennisetum purpureum* Schumach) promote plant growth and enhance salt tolerance of Hybrid *Pennisetum*. *Biotechnology for Biofuels*, 9, 1-12

Liu, B., Qiao, H., Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q., Kang, Z., & Gong, Y. (2009). Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control*, 49, 277-285.

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.

Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology and Biology Education*, 12, 51-53.

- Lucero, C. T., Lorda, G. S., Ludueña, L. M., Anzuay, M. S., & Taurian, T. (2020). Motility and biofilm production involved in the interaction of phosphate solubilizing endophytic strains with peanut, maize and soybean plants. *Rhizosphere*, *15*, 100228.
- Ma, Y., Rajkumar, M., Luo, Y., & Freitas, H. (2011). Inoculation of endophytic bacteria on host and non-host plants-effects on plant growth and Ni uptake. *Journal of Hazardous Materials*, *195*, 230-237.
- Mehta, S., & Nautiyal, C. S. (2001). An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology*, *43*, 51-6.
- Minaxi, N. L., Yadav, R. C., & Saxena, J. (2012). Characterization of multifaceted *Bacillus* sp. RM-2 for its use as plant growth promoting bioinoculant for crops grown in semi-arid deserts. *Applied Soil Ecology*, *59*, 124-135.
- Morales-Cedeno, L. R., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Loeza-Lara, P. D., Parra-Cota, F. I., de Los Santos-Villalobos, S., & Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre-and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research*, *242*, 126612.
- Moya-Elizondo, E. A., Rew, L. J., Jacobsen, B. J., Hogg, A. C., & Dyer, A. T. (2011). Distribution and prevalence of *Fusarium* crown rot and common root rot pathogens of wheat in Montana. *Plant Disease*, *95*, 1099-1108.
- Noori, M. S. S., & Saud, H. M. (2012). Potential plant growth-promoting activity of *Pseudomonas* sp. isolated from paddy soil in Malaysia as biocontrol agent. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, *3*(2), 1-4.
- Overbeek, L. V., & Elsas, J. D. V. (2008). Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiology Ecology*, *64*, 283-296.
- Pandey, P. K., Singh, M. C., Singh, M. C., Singh, S., Singh, A. K., Kumar, M., Pathak, M., Shakywar, R. C., & Pandey, A. K. (2017). Inside the plants: endophytic bacteria and their functional attributes for plant growth promotion. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, *6*, 11-21.
- Patel, J. K., & Archana, G. (2017). Diverse culturable diazotrophic endophytic bacteria from Poaceae plants show cross-colonization and plant growth promotion in wheat. *Plant and Soil*, *417*, 99-116.
- Patten, C. L., & Glick, B. R. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of host plant root system. *Applied Environmental Microbiology*, *68*, 3795-3801.
- Pereyra, S., & Dill-Macky, R. (2010). *Fusarium* species recovered from wheat and barley grains in Uruguay, pathogenicity and deoxynivalenol content. *Agrociencia*, *14*, 33-44.

Piromyou, P., Songwattana, P., Greetatorn, T., Okubo, T., Kakizaki, K. C., Prakamhang, J., Tittabutr, T., Boonkerd, N., Teaumroong, N., & Minamisawa, K. (2015). The Type III secretion system (T3SS) is a determinant for rice-endophyte colonization by non-photosynthetic *Bradyrhizobium*. *Microbes and Environmental*, 30, 291-300.

Puri, A., Padda, K. P., & Chanway, C. P. (Eds.). (2018). *Nitrogen-fixation by endophytic bacteria in agricultural crops: recent advances. Nitrogen in agriculture*. Intech Open, London, GBR.

Robinson, R. J., Fraaije, B. A., Clark, I. M., Jackson, R. W., Hirsch, P. R., & Mauchline, T. H. (2016). Endophytic bacterial community composition in wheat (*Triticum aestivum*) is determined by plant tissue type, developmental stage and soil nutrient availability. *Plant and Soil*, 405, 381-396.

Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2004). *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Archives of Microbiology*, 181, 337-344.

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., Orozco-Mosqueda Mdel, C., & Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99.

Segonds, C., Heulin, T., Marty, N., & Chabanon, G. (1999). Differentiation of *Burkholderia* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene and application to cystic fibrosis isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 37, 2201-2208.

Shukla, S. K., & Rao, T. S. (2017). An improved crystal violet assay for biofilm quantification in 96-well microtiter plate. *Biorxiv*, 100214.

Smibert, R. M., & Krieg, N. R. (1994). *Phenotypic characterization. In: Methods for General and Molecular Bacteriology*. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., & Krieg, N.R. (Eds.). American Society for Microbiology.

Smith, E. F., Jones, L. R., & Reddy, C. S. (1919). The black chaff of wheat. *Science*, 50, 48.

Stromberg, K. D., Kinkel, L. L., & Leonard, K. J. (2000). Interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, the Causal Agent of Bacterial Leaf Streak of Wheat, and Bacterial Epiphytes in the Wheat Phyllosphere. *Biological Control*, 17, 61-72.

Suslow, T. V., Schorth, M. N., & Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology*, 72, 917-918.

Verma, J. P., Yadav, J., Tiwari, K. N., & Kumar, A. (2013). Effect of indigenous *Mesorhizobium* spp. and plant growth promoting rhizobacteria on yields and nutrients uptake of chickpea (*Cicer aritenium* L.) under sustainable agriculture. *Ecological Engineering*, 51, 282-286.

Wang, X., Li, Q., Sui, J., Zhang, J., Liu, Z., Du, J., Xu, R., Zhou, Y., & Liu, X. (2019). Isolation and Characterization of Antagonistic Bacteria *Paenibacillus jamilae* HS-26 and Their Effects on Plant Growth. *Hindawi BioMed Research International*, 3638926, 13.

Weselowski, B., Nathoo, N., Eastman, A. W., MacDonald, J., & Yuan, Z. C. (2016). Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production. *BMC microbiology*, 16, 1-10.

Yang, W., Meng, F., Peng, J., Han, P., Fang, F., Ma, L., & Cao, B. (2014). Isolation and identification of a cellulolytic bacterium from the Tibetan pig's intestine and investigation of its cellulase production. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17, 262-267.

Yousaf, M., Rehman, Y., & Hasnain, S. (2017). High-yielding wheat varieties harbour superior plant growth promoting-bacterial endophytes. *Applied Food Biotechnology*, 4, 143-154.

Yu, X., Ai, C., Xin, L. & Zhou, G. (2011). The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology*, 47, 138-145.

Zhao, L., Xu, Y., Lai, X., Shan, C., Deng, Z., & Ji, Y. (2015). Screening and characterization of endophytic *Bacillus* and *Paenibacillus* isolates from medicinal plant *Lonicera japonica* for use as potential plant growth promoters. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46, 977-989.

Zinniel, D. K., Lambrecht, P., Harris, N. B., Feng, Z., Kuczmarski, D., Higley, P., Ishimaru, C. A., Arunakumari, A., Barletta, R. G., & Vidaver, A. K. (2002). Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2198-2208.



© 2022 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)



Isolation, identification, and characterization of bacterial endophytes in Iranian wheat cultivars

E. Taheri¹, S. Tarighi^{2*}, P. Taheri³

1. PhD student of plant pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran (starighi@um.ac.ir)
3. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 19 March 2022

Accepted: 20 May 2022

Abstract

Background and Objectives

Wheat (*Triticum aestivum* L.) is one of the most important crops worldwide, responsible for a large portion of the human diet. In light of the increasing population, increased demand of 20 million tons by 2025 has been predicted by the Iranian Ministry of Agriculture. However, *Fusarium graminearum* and *Xanthomonas translucens* are among the most destructive diseases that lead to high yield loss. The present study aimed to isolate and evaluate the antagonistic plant growth-promoting endophytic bacteria in Iranian wheat cultivars.

Materials and Methods

In this study, endophytic bacteria were isolated from different tissues (e.g., seeds, roots, and shoots) of 14 wheat cultivars: Arg, Bahar, Baharan, Behrang, Chamran, Chamran 2, Dena, Falat, Heidari, Parsi, Pishgam, Sayonz, Sirvan, and Sivand. Bacterial strains were cultured in different media (i.e., NA, LBA, and TSA 10%). Then, their antifungal and antibacterial activity against *F. graminearum* and *X. translucens* were analyzed by dual culture assays. Moreover, the effect of isolates on seed germination was evaluated *in vitro*. In addition, extracellular enzyme production and plant growth-promoting properties were assessed. Furthermore, the effect of endophytes on plant growth was evaluated in greenhouse trials, and finally, the selected isolates were identified by 16S rRNA gene sequencing using two sets of universal primers (rD1, fD1, and 27F, 1492R).

Results

In this study, a total of 464 endophytic bacteria were isolated from wheat surface-sterilized tissues. Forty-four isolates successfully suppressed both *Fusarium* and *Xanthomonas* *in vitro*. The highest percentage of the fungal growth inhibition was evaluated at 86.66% (CB2), and the highest clear halo around isolates, which indicated the antibacterial activity, was 49.33% (PaR28, PiR5). Among the isolated bacteria, twelve were capable of increasing seed germination *in vitro* by at least 10% more than untreated seeds and could increase shoot

and root length, which were selected for further characterization. The clear halos, which indicated enzyme production, were calculated as follows: protease 0.36 to 2.53, cellulase 1.03 to 1.75, pectinase 1.06 to 2.65, and amylase 0.43 to 2.1 cm. The diameter of siderophore production on CAS agar medium varied from 0.21 to 1.46 cm. Moreover, IAA was between 7.05 and 14.14 $\mu\text{g/mL}$, ammonia production varied from 0.29 to 34.49 mg/mL , and phosphate solubilization was between 6.09 and 14.95 $\mu\text{g/mL}$. Greenhouse experiments indicated that the biomass was significantly increased in plants treated with endophytes. In addition, DNA sequencing using the 16S rRNA gene showed that the isolate CB2 had 99.06% homology with *B. subtilis*, *B. velezensis*, and *B. amyloliquefaciens*. Plus, the isolates PaR28, SeR8, BaR15, and BR20 indicated a homology of more than 99% with *P. jamilae*, *P. polymyxa*, and *P. peoriae*. The sequence of the mentioned isolates has been deposited in the GenBank under accession numbers MT258405 (CB2), MT258403 (BaR15), MT258407 (SeR8), MT258404 (BR20), and MT258406 (PaR28).

Discussion

The present study is the first report on the endophytic population in mentioned wheat cultivars and an indication of their significance in the biocontrol of *X. translucens*. As isolates identified in this study have several desirable characteristics, a better-informed knowledge of them can be expected to have promising applications as biofertilizers and biopesticides.

Keywords: *Biofertilizers and biopesticides, Bacillus sp., Fusarium graminearum, Paenibacillus sp., Xanthomonas translucens*

Associate editor: M. Aeini (Ph.D.)

Citation: Taheri, E., Tarighi, S. & Taheri, P. (2022). Isolation, identification, and characterization of bacterial endophytes in Iranian wheat cultivars. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 45(2), 91-108. <https://doi.org/10.22055/ppr.2022.17563>.