OPEN ACCESS
CC BY NC

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
بوم‌شناسی جنگل‌های ایران

"مقاله پژوهشی"

جداسازی و شناسایی مولکولی گونه‌های باسیلوس اندوفیت ریشه درختان کچف در استان‌های مازندران و سمنان

سید محمد 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
۲- استاد، گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، (نویسنده مسوول: h.rahimian@sanru.ac.ir)
۳- دانشیار، گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۷/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۸/۴
صفحه: ۹۹ تا ۱۱۰

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: گونه‌های باسیلوس (*Bacillus* spp.) اندوفیت به دلیل ویژگی‌های سودمند زیستی بیشتر از دیگر جنس‌های باکتریایی در تحقیقات با هدف کنترل زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از آنجایی‌که حفظ تنوع‌زیستی و پایداری جنگل هیرکانی از اهمیت ویژه‌ای در مدیریت این بوم‌سامانه حیاتی برخوردار است شناسایی و مطالعه باکتری‌های مفید و حفاظت‌کننده از گیاهان می‌تواند در برنامه‌های محافظت از گونه‌های گیاهی ارزشمند موجود در آن نقش بسزایی ایفا نماید. این تحقیق با هدف شناسایی جدایه‌های باسیلوس اندوفیت ریشه درختان کچف (*Carpinus orientalis* Mill.) و تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی آنها در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: برای جداسازی اندوفیت‌های باکتریایی، نمونه‌برداری تصادفی از ریشه درختان کچف ارتفاعات بالابند نوار مرزی استان‌های مازندران و سمنان (کوه‌های نواحی جنوبی مازندران و نوار باریک شمال سمنان) در بهار ۱۳۹۷ انجام شد. سوسپانسیون ریشه‌های ضدعفونی و سپس خرد شده در آب مقطر در محیط‌کشت Tryptic soy agar کشت شد. نقوش پروتئین‌های کل سلولی با الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل‌آمید (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis)، تعیین ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها و استفاده از نشانگرهای مولکولی IS_{50} و BOX و REP به‌منظور گروهبندی جدایه‌ها و وجود تنوع در آنها مورد بررسی قرار گرفت. یک نماینده از جدایه‌های هر گروه انتخاب شده و برای شناسایی مولکولی با بکارگیری آغازگرهای عمومی ۲۷f و ۱۴۹۲r قطعه ۱۵۰۰ جفت‌باز ناحیه ۱۶S rDNA با PCR تکثیر شد. پس از خالص‌سازی قطعه تکثیر شده برای تعیین ترادف به شرکت Microsynth سوئیس ارسال شد. ترادف‌های بدست آمده با ترادف‌های موجود در بانک ژن NCBI به روش BLASTn مقایسه شد. توانایی جدایه‌ها در تولید سیانید هیدروژن، هورمون IAA، پروتئاز و بیوفیلم نیز ارزیابی شد.

یافته‌ها: سی جدایه باسیلوس از ریشه‌های درختان مناطق مختلف در محیط کشت باکتریایی جدا و خالص شدند. بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و مولکولی، جدایه‌های باسیلوس حداقل در چهار گروه متفاوت قرار گرفتند. مقایسه ترادف ناحیه تکثیر شده از ۱۶S rDNA با ترادف‌های موجود در ژن‌بانک NCBI و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با الگوریتم Maximum-Likelihood نشان‌دهنده وجود گونه‌های *Bacillus thuringiensis*، *B. cereus*، *B. subtilis* و *B. velezensis* در نمونه‌ها بود. گونه‌ی *B. thuringiensis* به‌عنوان گونه غالب و *B. subtilis* به‌عنوان گونه‌ی پرجمعیت شناسایی گردید. هورمون IAA تولیدی جدایه‌ها بین ۵ تا ۸۵ میلی‌گرم در لیتر متغیر بود که بیشترین مقدار آن مربوط به جدایه‌های گروه *B. thuringiensis* و کمترین مقدار آن مربوط به جدایه‌های گروه *B. velezensis* بود. اکثر جدایه‌ها توانایی تولید آنزیم‌های لیپاز، ژلاتیناز، لسیتیناز، پروتئاز و آمیلاز را داشتند. جدایه‌های *B. cereus* و *B. thuringiensis* به مقدار قابل توجهی پروتئاز تولید کردند. بیشترین مقدار بیوفیلم توسط جدایه‌های گروه *B. velezensis* تولید شد.

نتیجه‌گیری: توانایی بالقوه و وجود تنوع در ویژگی‌های سودمند فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جدایه‌های باسیلوس اندوفیت ریشه کچف نشان داد که آنها می‌توانند به‌عنوان منابع مناسب افزاینده رشد گیاهان و کنترل زیستی مورد توجه قرار گیرند. این ویژگی‌ها در گونه‌های *B. thuringiensis* و *B. cereus* قابل ملاحظه بود. پژوهش حاضر اولین بررسی در زمینه شناسایی و تعیین ویژگی‌های بیوشیمیایی و سودمند زیستی جدایه‌های باسیلوس اندوفیت ریشه کچف در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، ایندول استیک اسید، باسیلوس، ترادف، جدایه، کچف

مقدمه

گیاهان با گروه متنوعی از ریزجانداران به اشکال متفاوت ارتباط دارند. در این میان اندوفیت‌ها به‌عنوان گروهی از ریزجانداران بدون علائم هستند که حداقل یک مرحله از چرخه زندگی خود را فضای بین‌سلولی و آوند چوب درون گیاه مستقر هستند و به صورت همزیست درونی با گیاهان زندگی می‌کنند. واژه اندوفیت برای اولین بار توسط دباری در سال ۱۸۸۶ به کار گرفته شد و به معنی حضور ریزجانداران در داخل بافتهای گیاهی بوده بدون اینکه هیچ‌گونه اثر منفی روی میزبان خود داشته باشند (۲۵). ریزوسفر گیاهان خاستگاه مهم باکتری‌های اندوفیت می‌باشد که با مکانیسم جلب به سوی مواد مغذی (کموتاکسیز) به میزبان نزدیک می‌شوند و ورود این باکتری‌ها به بافت‌های گیاهی از طریق روزنه، عدسک، زخم‌های ناشی از شکسته شدن تریکوم‌ها و منطقه خروج ریشه‌های جانبی صورت می‌گیرد. اغلب باکتری‌های اندوفیت در فضای بین‌سلولی ریشه تکثیر می‌کنند و یا ممکن است وارد سلول‌های دایره محیطیه و سپس وارد سلول‌های پارانشیم شوند و سبب فعال شدن سیستم‌های ژنتیکی دخیل در تعامل باکتری و گیاه گردند (۱۵،۲۰). اندوفیت‌ها به‌عنوان منابع جدید و بالقوه‌ای از ژن‌ها، پروتئین‌ها و ترکیبات بیوشیمیایی طبیعی هستند که در داروسازی، کشاورزی و صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند. مطالعات زیادی در زمینه فعالیت‌های ضدمیکروبی اعم از ضدباکتری، ضدقارچی و نماتدکش ناشی از حضور اندوفیت‌ها در گیاهان مختلف انجام شده است (۲۹). این گروه از ریزجانداران در ایجاد و توسعه یک بوم‌سامانه پایدار در تولید محصولات کشاورزی نقش مهمی دارند. اندوفیت‌ها دارای مزیت‌های گوناگونی برای گیاهان از جمله بهبود رشد (۵،۲۱)، کاهش شدت بیماری (۱۰،۲۳،۴۱)، ایجاد مکانیسم‌های دفاعی (۳،۴،۳۰)، تولید مواد با خاصیت علف‌کشی (۳۹،۴۶)، تثبیت زیستی نیتروژن (۱۳) و

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.21.9.5]
[DOI: 10.61186/ifej.11.21.99]

افزایش جذب عناصر غذایی (۲۶) می‌باشند. 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 القاء مقاومت سیستمیک می‌گردند. مزایایی که اندوفیت‌ها برای گیاهان دارند سبب افزایش اهمیت آنها در شناسایی و بررسی تاثیر آنها در فعالیت‌های گیاهان حامل آنها در زیستگاه‌های طبیعی شده است (۴،۲۳). در همین راستا تحقیقات زیادی در زمینه نقش اندوفیت‌ها در سمیت‌زدایی آلودگی‌های محیطی به ویژه برخی آلودگی‌ها که توسط گیاهان قابل حذف یا خنثی‌سازی نیست انجام شده است (۱۲). وجود یک یا چند اندوفیت مختلف و همچنین سطح جمعیت آنها در بافتهای گیاهی به برخی از عوامل زیستی و محیطی همچون ژنوتیپ، مرحله رشد و سن گیاه، نوع بافت و شرایط محیطی خاک وابسته است (۳۳).

گونه‌های باسیلوس باکتری‌هایی گرم مثبت، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری و با تنوع بالا بوده و قابلیت تولید اندوسپور را دارا هستند. ویژگی‌های فیزیولوژیکی باسیلوس نظیر دیواره سلولی چند لایه، مقاومت به شرایط نامساعد نظیر دمای بالا، مواد شیمیایی و اشعه فرابنفش، ترشح آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های خارج سلولی و بقاء و دوام طولانی در شرایط مساعد و نامساعد سبب اهمیت آنها شده است. گونه‌های باسیلوس یکی از اولین باکتری‌هایی بوده‌اند که در بسیاری از بررسی‌ها از جمله در روابط همزیستی مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۲۷). توصیف اولیه باسیلوس توسط F. Cohn در سال ۱۸۷۲ با دیدن تولید اسپور توسط آنها انجام شد. گونه‌های این جنس مزوفیل و نئوتروفیل می‌باشند (۱۷،۲۲). گونه‌های اندوفیت باسیلوس به علت تولید طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های هیدرولیتیک و ویژگی‌های زیستی دیگر بیشتر از سایر جنس‌های باکتریایی در کنترل بیولوژیک مورد مطالعه و استفاده قرار گرفته‌اند (۱۴،۳۶). از مهم‌ترین گونه‌های باسیلوس اندوفیت که به‌عنوان محرک مقاومت القائی در گیاهان شناسایی شده‌اند می‌توان به *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. mycoides*, *B. endophyticus*, *B. azotofixans*, *B. pasteurii* اشاره کرد. از گونه‌های این جنس در صنعت، کشاورزی و پزشکی، به ویژه در تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده به‌طور گسترده استفاده شده است (۲۹).

آزمون‌های شکل‌شناسی و آزمایش‌های بیوشیمیایی جزء اولین روشهای شناسایی باسیلوس‌ها بود. اکثر آزمون‌های توصیه شده مبتنی بر قابلیت مصرف مواد غذایی و برخی فعالیت‌های فیزیولوژیکی بود. روش‌های بیوشیمیایی مبتنی بر ۵۰ آزمون به نام API50CHB ساخت شرکت Biomerieux گسترش یافت که در شناسایی سریع و کاربرد آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت ولی به گونه‌هایی برخورد شد که از نظر فنوتیپی قابل شناسایی نبودند (۴۵). برخی استرین‌های جنس باسیلوس از نظر فنوتیپی بسیار مشابه می‌باشند بررسی‌های فیلوژنی باسیلوس‌ها با استفاده از ناحیه‌ی S ۱۶rDNA تائید کننده‌ی هتروژنی باسیلوس‌ها بود. بنابراین، استرین‌های با فنوتیپ مشابه لزوماً از نظر ترادف‌های ژن ناحیه ۱۶S rDNA به هم نزدیک نبودند (۲۷). بررسی‌ها نشان داد که به جز ترادف ژنوم، اطلاعات دیگری نیز از باسیلوس‌ها می‌توان از طریق پروتئین‌های سلولی بدست آورد. بر این اساس نقوش پروتئینی که با الکتروفورز در ژل اکریل آمید (SDS-PAGE) قابل رویت است اغلب شباهت زیادی با یافته‌های هیبریداسیون DNA-DNA داشته و می‌تواند در شناسایی سریع باکتری‌ها به کار گرفته شود (۸). در حال حاضر این جنس دارای بیش از ۳۸۰ گونه است که حدود یکصد گونه‌ی آن دارای نام‌های مترادف[1] می‌باشند. به عقیده‌ی بسیاری از محققین، عمده‌ی گونه‌های باسیلوس نیاز به رده‌بندی مجدد[2] دارند. اطلاعات حاصل از تعیین ترادف S ۱۶rDNA منجر به جداسازی چند گونه از جنس باسیلوس و قرار دادن آنها در جنس‌های دیگر شده است (۱۹).

اگرچه بیشتر تحقیقات بر روی اندوفیت‌های گیاهان زراعی و مثمر متمرکز شده است اما اندوفیت‌های گیاهان جنگلی که کمتر مورد توجه بوده‌اند نیز حائز اهمیت می‌باشد. معمول‌ترین باکتریهای اندوفیت در درختان جنگلی گونه‌هایی از *Pseudomonas*، *Bacillus*، *Acinetobacter*، *Actinibacteria*، *Sphingomonas* و *Enterobacter* می‌باشند که از میان آنها بیشترین پژوهش‌های صورت گرفته روی گونه‌های سودوموناس و باسیلوس متمرکز بوده است (۳۳). حریقی و همکاران (۲۰۱۷) جدایه‌های اندوفیت *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Stenotrophomonas* را از ریشه و برگ بلوط از مناطق مختلف شهرستان‌های بانه و مریوان استان کردستان خالص‌سازی و مورد ارزیابی قرار دادند. از آنجاکه جنگل‌های هیرکانی دارای تنوع بالای گونه‌های درختی می‌باشد، بررسی حاضر با هدف جداسازی و شناسایی تنوع گونه‌ها و جدایه‌های اندوفیت باسیلوس موجود در درختان کچف (*Carpinus orientalis* Mill.) بالای ۲۰۰۰ متر از سطح دریا در ارتفاعات بالابند نواحی مرزی مازندران و سمنان (ارتفاعات جنوبی مازندران و همچنین در امتداد آن در نوار شمالی استان سمنان) انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی

نمونه‌برداری در اردیبهشت ۱۳۹۷ از ریشه‌های درختان کچف نواحی بالابند جنگل‌های جنوب ساری و بهشهر در استان مازندران و از روستای رودبارک و منطقه پرور واقع در شمال استان سمنان (در امتداد مرز جنوبی مازندران) انجام گرفت. نمونه‌ها با آب استریل شسته و قسمت‌هایی از پوست این ریشه‌ها جدا شده و با اتانول ۷۵٪ برای یک دقیقه ضدعفونی سطحی گردیدند. پس از دوبار شستشو با آب مقطر استریل قطعات پوست با کلرید مرکوریک ۰/۱٪ به مدت شش دقیقه تیمار شده و سپس پنج‌بار با آب مقطر استریل شسته شدند (۴۲). قطعات استریل در تشتک پتری استریل حاوی چند میلی‌متر آب مقطر استریل خرد گردید و سوسپانسیون حاصله در حجم برابر در محیط کشت مایع Brain Heart Infuxion 2X که به آن به میزان هم‌حجم محلول جوانه‌زنی اندوسپور استریل (حاوی ۱٪D-glucose، ۰/۵٪

1- Synonyms
2- Reclassification

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.21.9.5]
[DOI: 10.61186/ifej.11.21.99]

Casaminoacid و ۰/۱٪ DL-Alanin) افزوده شده بود مخلوط شد. این مخلوط به مدت ۵ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور با ۸۰ دور در دقیقه قرار داده شد (۳۴ و ۴۹). حدود ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اخیر روی محیط کشت TSA[1] به صورت مخطط کشت و تشتک‌ها در دمای ۲۸°C تا نمایان شدن کلونی‌ها نگهداری شد. تک کلونی‌ها بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی انتخاب و با واکشت خالص شدند.

آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

آزمون‌های متداول باکتری‌شناسی روی جدایه‌های به دست آمده از درختان کچف انجام شد. در ابتدا بررسی واکنش گرم، ریخت‌شناسی کلونی، تولید اندوسپور، فعالیت اکسیداز و کاتالاز جهت تایید جنس باسیلوس انجام گرفت. سپس آزمون‌های هیدرولیزآسکولین، توئین ۸۰، نشاسته، ژلاتین و لسیتین، تولید آرژینین دی‌هیدرولاز و اوره‌آز، احیای نیترات 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 به‌عنوان منبع کربن مورد آزمون قرار گرفتند (۳۸،۴۹).

بررسی نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی

یک لوپ از رشد ۴۸ ساعته هر جدایه روی TSA در یک میلی‌لیتر آب مقطر پخش گردیده و سوسپانسیون به مدت ۳ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و رسوب سلول‌ها سه بار با آب مقطر شسته شد. به رسوب ۲۰۰ میکرولیتر بافر لایزوزیم (۱۰ میلی‌گرم لایزوزیم در یک میلی‌لیتر بافر ۰/۰۵ مولار Tris-HCl حاوی ۰/۰۲ مولار EDTA با pH ۸/۲) اضافه و مخلوط شد. سوسپانسیون با قرار دادن در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس منجمد و در آب ۶۰ درجه ذوب شد. چرخه انجماد و ذوب دو بار دیگر تکرار شد. در هر مرحله بعد از ذوب شدن نمونه‌ها با سونیکاتور (اولتراسونیک مدل UP-200H شرکت Dr Hielscher آلمان) به مدت ۲۰ ثانیه در شدت ۲۰KHz هموژنیزه گردید. به هر نمونه ۱۰۰ میکرولیتر محلول حل‌کننده (0.06 M Tris-HCL, 2.5% Glycerol, 2% SDS, 1.25% β-mercaptoethanol) اضافه و مخلوط شده و لوله‌ها به مدت دو دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول شفاف رویی به میکروتیوب‌های جدید منتقل و پس از افزودن یک چهارم حجم گلیسرول استریل به آنها تا زمان الکتروفورز در ۷۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (۶،۹).

پروتئین‌های محلول شده جدایه‌ها در چاهک‌های ژل پلی‌اکریل‌آمید متشکل از لایه رویی ۴٪ فشرده‌کننده و لایه ۱۲٪ جداکننده با ضخامت ۰/۷ میلی‌متر و مطابق با سیستم بافری ناپیوسته در دستگاه BIORAD مطابق با روش Laemmli در شدت جریان ثابت ۲۰ میلی‌آمپر تا رسیدن رنگ بروموفنل بلو به انتهای ژل الکتروفورز گردید (۲۴). ژل به مدت یک ساعت در کومازی بریلیانت بلو (R-250) ۰/۱٪ (وزنی- حجمی) در مخلوط متانول-اسید استیک-آب (۵:۴:۱) رنگ‌آمیزی شد. رنگ‌زدایی در همان محلول اخیر ولی فاقد رنگ به مدت یک‌شبانه‌روز انجام شد و ژل در اسید استیک ۷٪ شفاف گردید. ژل‌ها با استفاده از اسکنر (۳۰۰ dpi) اسکن شد و داده‌ها به ترتیب در صورت حضور با عدد ۱ و عدم حضور با عدد ۰ کدگذاری شدند. دندروگرام خوشه‌بندی بر اساس الگوی پروتئینی جدایه‌های باسیلوس با نرم‌افزار TotalLab TL120 رسم شد.

تولید پروتئاز

بررسی توانایی تولید آنزیم پروتئاز به روش مارهوفر و همکاران و با به‌کارگیری محیط کشت Skim milk تیندالیزه[2] حاوی ۰/۵ درصد عصاره مخمر استریل انجام شد (۲۸). جدایه‌ها بعد از کشت به صورت نقطه‌ای در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. تشکیل هاله شفاف در اطراف و زیرکلنی‌های باکتری نشان از توانایی جدایه‌ها در تولید آنزیم پروتئاز دارد.

تولید سیانید هیدروژن

این آزمایش با استفاده از روش آلستروم و برنز (۱۹۸۹) انجام گردید. سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته باکتری در تشتک‌های پتری حاوی محیط TSA که دارای ۴/۴ گرم گلایسین در لیتر بود به‌طور یکنواخت پخش شد. کاغذ صافی آغشته به محلول معرف کربنات سدیم دو درصد و اسید پیکریک ۰/۵ درصد در قسمت درب تشتک پتری قرار داده شد (۱). تشتک‌ها توسط نوار پارافیلم مسدود شدند و به صورت وارونه به مدت ۴۸ الی ۷۲ ساعت در دمای ۱±۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. یک تشتک پتری نیز به‌عنوان شاهد بدون تلقیح باکتری در نظر گرفته شد. تولید سیانید هیدروژن توسط باکتری‌ها با تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به معرف از زرد تا آجری ارزیابی گردید بطوریکه تغییر رنگ از زرد به کرم نشان‌دهنده تولید کم سیانید هیدروژن (HCN)، قهوه‌ای روشن تولید HCN متوسط، قهوه‌ای تیره نشان‌دهنده HCN زیاد و آجری نمایانگر HCN خیلی زیاد می‌باشد.

ارزیابی تولید اکسین (ایندول استیک اسید، IAA)

تولید IAA با روش پیشنهاد شده توسط پاتن و گلیک (۱۹۹۶) ارزیابی گردید. باکتری در لوله‌های فالکون حاوی۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت لوریا براث[3] و ۴ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان استریل شده به روش تیندال کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بر روی شیکر با ۱۰۰ دور در دقیقه نگهداری شد (۳۲). دو میلی‌لیتر از محیط کشت به میکروتیوب منتقل و میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. یک میلی‌لیتر از محلول رویی با دو میلی‌لیتر محلول سالکووسکی (۱ میلی‌لیتر محلول کلریدآهن۳ ($FeCl_3$) نیم مولار در ۵۰ میلی‌لیتر پرکلریک اسید ۳۵ درصد) مخلوط و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. غلظت IAA تولید شده در طول موج ۵۳۰ نانومتر با اسپکتوفوتومتر تعیین شد.

بررسی قابلیت تولید بیوفیلم

بررسی تولید بیوفیلم در جدایه‌های باسیلوس به روش میکروپلیت (TCP[4]) پیشنهاد شده توسط استپانوویچ و همکاران (۲۰۰۷) انجام شد. از کشت ۲۴ ساعت جدایه‌ها در محیط TSA سوسپانسیونی حاوی 10^8 سلول در میلی‌لیتر در

1- Tryptic soy ag 2- Tyndalized 3- Luria broth 4- Tissue culture plate

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.21.9.5]
[DOI: 10.61186/ifej.11.21.99]

۱۰ میلی‌لیتر محیط TSB تهیه و ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه به چاهک پلی‌استیرن بشقابک ۹۶ خانه منتقل شد. بشقابک‌ها در دمای ۲۸ تا ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت نگه‌داری شدند. پس از تخلیه چاهک‌ها با بافر فسفات (pH =۷) دو مرتبه شسته شدند. چاهک‌ها با متانول ۹۵ درصد به‌مدت ۱۵ دقیقه شسته و سپس با رنگ کریستال ویوله (یک درصد) به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. بعد از تخلیه چاهک‌ها با آب مقطر استریل شسته شده و به هر یک ۲۰۰ میکرولیتر محلول اسیداستیک ۳۳ درصد اضافه شد (۴۴). جذب نوری در طول موج ۵۴۵ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر (MPR 4 PLUS شرکت HIPERION) اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی تولید بیوفیلم از روش طبقه‌بندی مقادیر جذب نوری (ODc)[1] استفاده شد که از رابطه: (میانگین[2] OD کنترل منفی) + (۳ × انحراف معیار کنترل منفی) بدست آمد. جدایه‌ها در تولید بیوفیلم در چهار سطح قوی، متوسط، ضعیف و منفی به شرح زیر دسته‌بندی شدند: جدایه‌ها با $OD_{نمونه} > ۴\times ODc$ به‌عنوان قوی، با $۲\times ODc < OD_{نمونه} \leq ۴\times ODc$ در گروه متوسط، با $ODc < OD_{نمونه} \leq ۲\times ODc$ در دسته ضعیف و با $OD_{نمونه} \leq ODc$ به‌عنوان منفی تلقی شدند. محیط کشت خالی TSB به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد.

بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با نشانگرهای BOX[3]، IS_{50}[4] و REP[5]

جدایه‌ها در محیط کشت TSB تا مرحله رشد لگاریتمی کشت داده شدند. سوسپانسیون سلولی در ۵۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و رسوب حاصله با Tris-HCL ۱۰ میلی‌مولار سه بار شسته شد. سلول‌های رسوب یافته با استفاده از بافر استخراج و مطابق با دستورالعمل کیت GeneJET Genomic DNA Purification Kit شرکت ترمو (Thermo Scientific, Germany) استخراج DNA شد. نشانگر REP با آغازگر REP1-I: 5'-IIIICGICGICATCIGGC-3' و REP2-I: 5'-ICGICTTATCIGGGCTAC-3' و BOX با آغازگر 5'-BOX- CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3' و IS_{50} با آغازگر 5'-A1R: IS_{50}: CAGGACGCTACTTGTGT-3' انجام شد (۴۰،۳۷،۱۶). در هر واکنش PCR[6] از ۱۲/۵ میکرولیتر مخلوط واکنش PCR Master Mix 2X شرکت ترمو، ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ده نانوگرم، ۲ میکرولیتر DNA و آب مقطر بدون نوکلئاز تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. PCR در دستگاه ترموسایکلر (Veriti 96 Well، شرکت Applied Biosystem) انجام شد. شرایط واکنش در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- زمان و دمای به کار برده شده در مراحل مختلف PCR با آغازگرهای BOX-A1R، IS_{50} و REP-PCR

Table 1. PCR temperature and time cycling profile using primers of BOX-A1R, IS_{50} and REP-PCR

چرخه Cycle	زمان (دقیقه) Time (min)	دما (درجه سلسیوس) Temperature	مرحله Step
1	5	94	واسرشت اولیه Initial denaturation
30	1	94	واسرشت Denaturation
	1	*	اتصال Annealing
	3	72	گسترش Extension
1	10	72	گسترش نهایی Final extension

*: دمای اتصال برای آغازگرهای REP، BOX و IS_{50} به ترتیب ۴۲، ۵۳ و ۴۰ درجه سلسیوس بود

Annealing temperature for primers of REP, BOX, and IS_{50} were 42, 53, and 40°C, respectively

تکثیر و تعیین ترادف ۱۶S rDNA

DNA کل خالص شده جدایه‌ها در واکنش PCR برای تکثیر ناحیه‌ی ۱۶S rDNA به کار برده شد. PCR با استفاده از جفت آغازگر عمومی ۲۷f: 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' و ۱۴۹۲r: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' انجام شد (۵۱). محصول PCR با استفاده ازکیت GeneJET PCR Purification Kit شرکت Thermo Scientific خالص و به‌منظور ترادف‌یابی به شرکت Microsynth سوئیس ارسال شد. ترادف‌های ۱۶S rDNA جدایه‌ها با ترادف‌های موجود در ژن بانک NCBI مقایسه شده و با استفاده از BLASTn نزدیکترین گونه‌ها مشخص گردید. درخت فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه ترادف‌های نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rDNA جدایه‌های بدست آمده از ریشه درختان کچف با گونه‌های باسیلوس موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA X با الگوریتم‌های Maximum-Likelihood و Neighbour-Joining و با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰ رسم گردید. ترادف ژن ۱۶S rDNA یک جدایه *Staphylococcus aureus* به‌عنوان گونه خارج گروه[7] در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹/۴ انجام شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با به‌کارگیری آزمون دانکن با نرم‌افزار یاد شده انجام گردید.

نتایج و بحث

در مجموع ۳۰ جدایه باکتری از ریشه‌های درختان کچف نوار مرزی استان‌های مازندران و سمنان (مناطق جنگلی ارتفاعات بالابند جنوب مازندران و نوار باریک شمالی سمنان) جهت شناسایی اندوفیت‌های باسیلوس جداسازی شد. نمونه‌های ریشه در فواصل فروردین تا خرداد جمع‌آوری شدند. در دوره‌های بعدی نمونه‌برداری که در تابستان و پاییز انجام گرفت به جز در تعداد معدودی از نمونه‌ها، باکتری قابل جداسازی نبود، ولی متعاقب به کار بردن روش غنی‌سازی این

1- Optical density cut-off 2- Optical density 3- BOX-A1R- based repetitive extragenic palindromic-PCR
4- Insertion sequence 50-PCR 5- Repetitive element palindromic sequence 6- Polymerase chain reaction
7-Outgroup

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.21.9.5]
[DOI: 10.61186/ifej.11.21.99]

مشکل برطرف شد (۴۲). کلونی اکثر جدایه‌ها بعد از ۴۸ ساعت در محیط کشت قابل مشاهده بود. جدایه‌ها گرم مثبت و دارای کلونی به رنگ سفید یا سفیدکرم، میله‌ای شکل، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری که توانایی تشکیل اسپور را دارند و در جنس باسیلوس قرار گرفته بودند (شکل ۱). در کل۳۰ جدایه باسیلوس بر اساس ویژگی‌های مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی شناسایی و در هفت گروه تفکیک شدند (جدول ۲).

شکل ۱- کلونی‌های *Bacillus thuringiensis* بعد از سه روز کشت سوسپانسیون ریشه در محیط TSA
Figure 1. Colony of a representative isolate of *Bacillus thuringiensis* 3days after growth at 28˚C on tryptic soy agar

مشخصات فنوتیپی ممکن است برای شناسایی دقیق در سطح گونه و زیرگونه کارایی لازم را نداشته باشند. مورای (۱۹۹۰) پیشنهاد کرده است بکارگیری تکنیک الکتروفورز پروتئین‌های سلولی به‌عنوان روشی عملی همراه با ویژگی‌های فنوتیپی می‌تواند جهت شناسایی جنس‌های باکتریایی در برخی سطوح مفید باشد (۳۱).

نقوش الکتروفورزی پروتئین‌های سلولی جدایه‌های باسیلوس اختلافات مورد توجه و قابل قبولی در تعیین تنوع و تفکیک گونه‌های باسیلوس جدا شده از ریشه درختان کچف داشت. این یافته‌ها با نتایج Zheng and Slavik (1999) و Berber and Cokmus (2001) مطابقت دارد. البته انجام مرحله اولتراسونیک در وضوح و افزایش غلظت پروتئین‌ها در اکثر جدایه‌ها تاثیر بسزایی بر روی الکتروفورز ایجاد نمود. نوارهای پروتئینی مشابهی بین جدایه‌های باسیلوس وجود داشت. بر اساس نقوش پروتئینی، باکتری‌ها در پنج گروه متفاوت قرار گرفتند که از میان آنها گروه *B. thuringiensis* از نظر جمعیت غالب و کمترین تنوع درون گونه‌ای را داشتند. نقوش الکتروفورزی جدایه‌های *B. cereus* تنوع بیشتری نشان دادند. الکتروفورز پروتئین ابزار مناسبی جهت گروهبندی گونه‌های بی‌شماری بوده است (۱۱). نتایج برخی بررسی‌ها نشان داده است که پروفیل پروتئین‌های محلول سلولی و پروتئین‌های خارج سلولی در تمایز جدایه‌ها در سطح گونه و پایین‌تر از گونه مناسب می‌باشند (۸). استرین‌های گونه‌های *Proteus*، *B. sphaericus* و *Streptomyces* تا سطح زیرگونه نیز بر اساس نقوش پروتئینی قابل تمایز بوده‌اند (۲). اما با این اوصاف ایراد موجود در ارزیابی الکتروفورز پروتئین مربوط به استخراج پروتئین از سلول‌های باسیلوس است که در مقایسه با برخی دیگر از باکتری‌های گیاهی به ویژه گرم منفی‌ها از دشواری‌های بیشتری برخوردار است به‌طوریکه در برخی موارد نیاز به استفاده مکرر از دستگاه اولتراسونیک و چرخه‌های یخ زدن و ذوب کردن سوسپانسیون در ترکیب با روش اصلی می‌باشد که بالعکس در مورد استخراج DNA چنین مشکلاتی ایجاد نشد.

نماینده‌های جدایه‌های گروهبندی شده بر اساس نقوش پروتئینی مورد بررسی مولکولی قرار گرفتند. در برخی موارد DNAهای استخراج شده به روش‌های متداول سنتی برای تکثیر قطعات هدف مناسب نبود ولی بکارگیری کیت استخراج GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo نمونه‌های DNA بهتری به دست آمده و در الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگاروز مشخص گردید که آغازگرهای مورد استفاده به خوبی توانستند نواحی مورد نظر را تکثیر کنند.

در نتایج بدست آمده از REP-PCR جدایه‌ها در سطح تشابه ۳۰ درصد به ۴ گروه و در سطح تشابه ۵۵ درصد به شش گروه تقسیم شدند. بر اساس نتایج حاصل از IS_{50}-PCR، جدایه‌ها در سطح تشابه ۵۵ درصد به ۴ گروه و در سطح تشابه ۶۵ درصد به ۷ گروه تقسیم شدند. نتایج نشانگر BOX-PCR نشان داد که جدایه‌ها در سطح تشابه 60 درصد به ۴ گروه و در سطح تشابه ۶۵ درصد به ۶ گروه تقسیم شدند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای با ترکیب داده‌های BOX-PCR و REP-، IS_{50}- انجام و دندروگرام تجمیعی آنها ترسیم شد. بر اساس گروهبندی ترکیبی، جدایه‌ها در سطح تشابه ۳۵ درصد به ۴ گروه و در سطح ۵۵ درصد به ۶ گروه تقسیم میشوند. نتایج تجزیه و تحلیل خوشه‌ای ترکیبی داده‌ها و گروهبندی جدایه‌ها با نتایج حاصل از BOX-PCR تشابه بیشتری داشت.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.21.9.5]
[DOI: 10.61186/ifej.11.21.99]

جدول ۲- ویژگی‌های فنوتیپی گروه‌های مختلف باسیلوس بدست آمده از ریشه درختان کچف مازندران و سمنان
Table 2. Phenotypic characteristics of the *Bacillus* strain groups isolated from oriental hornbeam in Mazandaran and Semnan

شماره‌ی گروه Group Number	1	2	3	4	5	6	7
موقعیت اندوسپور Endospore position	S	S	C و S	S	S	S	S
احیاء نیترات Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+
تولید استوئین (VP) Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+
تولید اوره‌آز Urease production	-	+	+	-	+	-	+
آرزینین دی هیدرولاز Arginine dihydrolase	+	-	+	+	-	+	+
هیدرولیز ژلاتین Gelatin hydrolysis	+	+	+	+	-	+	+
تولید لسیتیناز Lecithinase test	+	+	+	+	+	-	+
تولید آمیلاز Amylase production	-	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز توئین ۸۰ Tween 80 hydrolysis	+	+	+	-	+	+	+
هیدرولیز اسکولین Aesculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+
استفاده از: **Utilization of:**							
سیترات Citrate	+	-	+	+	+	+	+
گلیکوژن Glycogen	+	+	+	+	+	+	+
ال-رامنوز L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-
دی-رافینوز D-Raffinose	-	+	-	-	+	-	-
دی-گلوکز D-Glucose	-	+	+	+	+	-	+
گلیسرول Glycerol	-	+	+	-	+	+	+
مایواینوزیتول Myo-Inositol	-	+	-	-	+	-	-
دی-مالتوز D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+
سلوبیوز Cellobiose	+	-	+	+	+	+	+
دولسیتول Dulcitol	-	+	+	-	-	-	-
دی-مانوز D-Mannose	-	+	-	+	+	-	+
ال-آرابینوز L-Arabinose	–	+	+	–	+	–	–
اینولین Inulin	–	+	+	–	+	–	–
دی-رایبوز D-Ribose	–	+	+	–	+	+	+
دی-فروکتوز D-fructose	–	+	+	+	+	–	+
دی-ترهالوز D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+
دی-ملی‌بیوز D-Melibiose	–	+	+	+	+	–	–
دی-زایلوز D-Xylose	–	+	+	–	+	–	–
سوکروز Sucrose	+	–	+	+	+	+	+
دی-ملی‌زیتوز D-Melisitose	–	–	–	–	–	–	–
دی-مانیتول D-Manitol	–	+	–	–	+	–	–
سالیسین Salicin	+	–	+	+	+	+	+

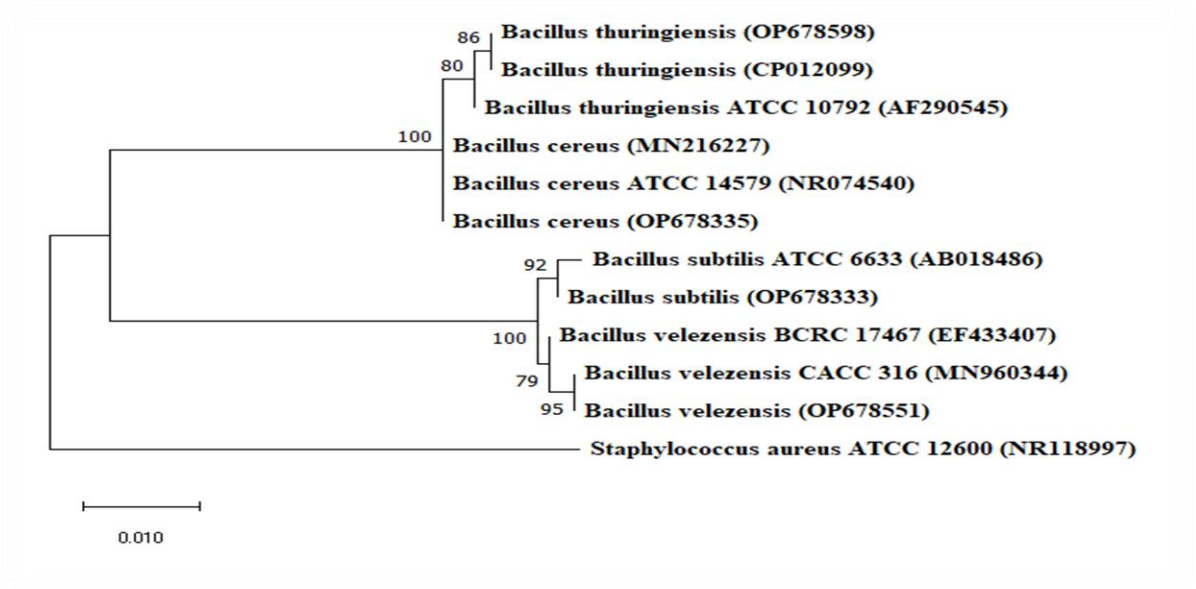
+: Positive -: Negative C: Central S: Sub-central
1, 3, 6: cereus 4, 7: thuringiensis 2: velezensis 5: subtilis

همه‌ی جدایه‌ها گرم مثبت، میله‌ای شکل، دارای اندوسپور، هوازی، متحرک و کاتالاز مثبت بودند.
All the isolates were Gram-positive, rod-shaped, endospore-forming, aerobic, motile, and Catalase positive.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.21.9.5]
[DOI: 10.61186/ifej.11.21.99]

شناسایی مولکولی

یک نماینده از چهار گروه متمایز شده با بررسی‌های فنوتیپی، بیوشیمایی و تنوع مولکولی REP-PCR، BOX- و IS_{50}- انتخاب و موقعیت تاکسونومیکی آنها با تکثیر و تعیین ترادف ژن ۱۶S تعیین گردید. ویرایش و هم‌ردیف‌سازی ترادف‌های ۱۶S rDNAجدایه‌ها با ترادف‌های موجود در ژن بانک NCBI با استفاده از BLASTn انجام شد. درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های تعیین ترادف شده باسیلوس و جدایه‌های مرجع برگرفته از ژن‌بانک، به روش بیشینه تشابه (ML) با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰۰ ترسیم گردید (شکل ۲). گونه *Staphylococcus aureus* ATCC12600 به‌عنوان گونه‌ی خارج گروه به‌کار برده شد. جدایه‌های درختان کچف متعلق به چهار گونه *B. thuringensis*، *B. cereus*، *B. subtilis* و *B. velezensis* می‌باشند. گونه‌ی *B. cereus* به دلیل نزدیکی با *B. thuringiensis* در یک شاخه‌ی نزدیک به هم و گونه‌ی *B. velezensis* با گونه‌ی *B. subtilis* در شاخه دیگر در فاصله نزدیک به هم قرار گرفتند. نزدیکی گونه‌های تعیین ترادف شده با گونه‌های مشابه در ژن‌بانک بیش از ۹۹٪ بود. ترادف‌ها تحت رس شماره OP678333، OP678551، OP678598، OP678335 به ترتیب برای گونه‌های *B. subtilis*، *B. velezensis*، *B. thuringiensis* و *B. cereus* ثبت و رهاسازی گردید. تنها گونه اندوفیت باکتریایی جنگل که از پوست درختان بلوط در ایران گزارش شد مربوط به گونه *B. firmus* استان کردستان با شماره KU693281 در ژن بانک NCBI می‌باشد (۴۸).



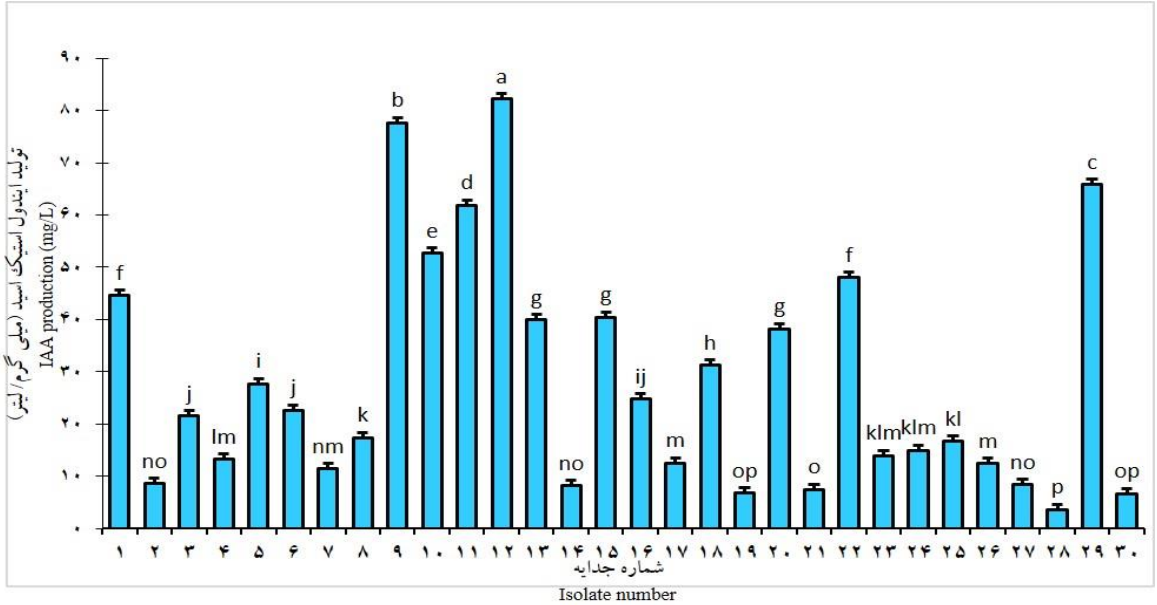
شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی حاصل از مقایسه توالی‌های نوکلئوتیدی ژن ۱۶S rDNA جدایه‌های بدست آمده از درختان کچف با گونه‌های باسیلوس موجود در بانک ژن به روش بیشینه تشابه، با استفاده از نرم‌افزار MEGA X، (استحکام خوشه‌بندی‌ها با ذکر درصد در محل‌های انشعابات بر اساس تکرار ۱۰۰۰ بار (Bootstrap) مشخص شده است)

Figure 2. Phylogenetic tree of 16S rDNA of *Bacillus* isolates from oriental Hornbeam. The tree was constructed with the Maximum-likelihood method using MEGA X

ارزیابی تولید ایندول استیک اسید

تمامی جدایه باسیلوس (۳۰ جدایه) که از ریشه درختان کچف ارتفاعات جنوبی شهرهای ساری، بهشهر و مهدیشهر (رودبارک و پرور) جدا و خالص‌سازی شدند توانایی تولید اکسین را داشتند. بین جدایه‌ها اختلاف آماری معنی‌داری در میزان تولید اکسین وجود داشت ($p<$ ۰/۰۰۰۱). هفت جدایه کمتر از ۱۰ میلی‌گرم در لیتر، هشت جدایه بین ۱۰ تا ۲۰ و چهار جدایه بین ۲۰ تا ۳۰ و یازده جدایه بیشتر از ۳۰ میلی‌گرم در لیتر اکسین تولید نمودند. جدایه‌های گروه *B. thuringiensis* (جدایه ۹ و ۱۲) بیشترین سطح تولید و جدایه‌های گروه *B. cereus* (۶،۸،۲۹) بالاترین تنوع را در تولید اکسین داشتند. جدایه‌های *B.velezensis* (۲،۱۴،۱۹،۲۸) کمترین سطح تولید اکسین را دارا بودند (شکل ۳). البته تولید سطوح بالای هورمون اکسین معیار مناسبی برای انتخاب جدایه بالقوه و مفید نیست (۲۵،۴۷).

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.21.9.5]
[DOI: 10.61186/ifej.11.21.99]



شکل۳- سطح تولید اکسین توسط جدایه‌های باسیلوس ریشه کچف سه روز پس از کشت در محیط مایع TSB حاوی ۴ میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان (بین تیمارها از نظر آماری در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بارها نشان دهنده خطای استاندارد می‌باشند. میانگین‌ها با حروف مشترک در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشند)

Figure 3. Levels of IAA production by *Bacillus* isolates after 3days of growth in TSB medium containing 4mg/l L-tryptophan (There is a statistically significant difference between the treatments at the probability level of 1%. Bars indicate standard error. Averages with common letters in each column indicate no significant difference based on the multi-range test. They are Duncan)

ارزیابی تولید هیدروژن سیانید

بیست و یک جدایه (۷۰ درصد) از جدایه‌های بررسی شده توانایی تولید هیدروژن سیانید را داشتند. از نظر مقدار تولید هیدروژن سیانید بین جدایه‌ها اختلاف وجود داشت. در سیزده جدایه در سطح کم به رنگ کرم تغییر یافت، در هفت جدایه به رنگ قهوه‌ای روشن (در سطح متوسط) و فقط در یک جدایه به رنگ قهوه‌ای تیره (سطح زیاد) تولید نمودند. جدایه‌های گروه‌های *B. thuringiensis* و *B. cereus* بالاترین میزان تولید و گروه *B. velezensis* کمترین سطح تولید را داشتند. تولید هیدروژن سیانید به‌عنوان یک عامل کنترل زیستی مهم محسوب می‌شود چون تولید زیاد آن سبب حفاظت گیاهان در برابر بیمارگرهای گیاهی محسوب و به‌طور غیرمستقیم سبب تقویت رشد گیاهان نیز می‌شود (۱۸).

تولید پروتئاز

تولید هاله شفاف در اطراف و زیرکلونی در محیط Skim milk agar نشان‌دهنده هیدرولیز پروتئین تلقی شد (شکل ۴). اکثر جدایه‌ها (۹۴٪) قابلیت هیدرولیز پروتئین را در محیط شیر آگار نشان دادند و تنها دو جدایه (۶٪) فاقد این ویژگی بودند. جدایه‌های گروه *B. cereus* بیشترین میزان تولید پروتئاز را تولید کرده و جدایه‌ها دو گروه *B. thuringiensis* و *B. subtilis* از این نظر در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. کمترین سطح تولید پروتئاز در جدایه‌های گروه *B. velezensis* دیده شد.

شکل ۴- تولید هاله شفاف در اثر تولید پروتئاز توسط جدایه‌های باسیلوس در محیط کشت شیر آگار بعد از سه روز رشد در دمای ۲۸ درجه سلسیوس

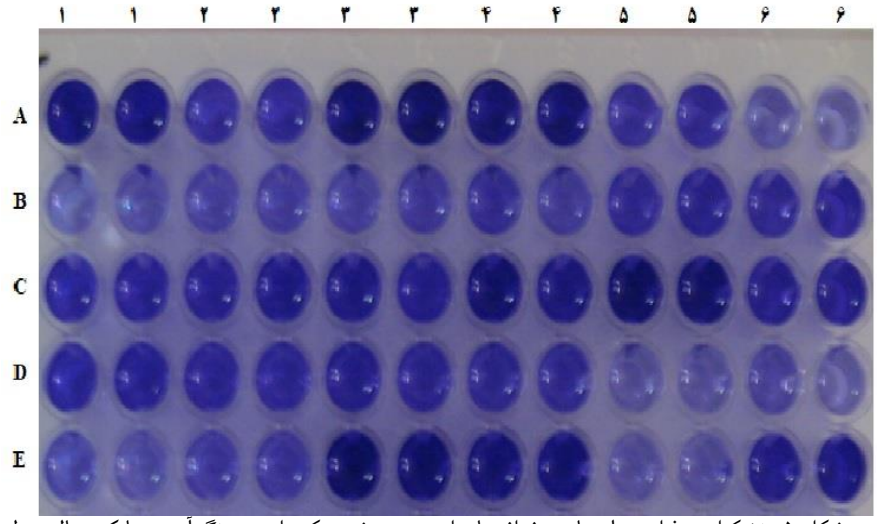
Figure 4. Appearance of clear zones around the growth of *Bacillus* isolates, due to protease production, 3days after culture on skim milk agar

تولید بیوفیلم

در آزمون تشکیل بیوفیلم به روش میکروپلیت (TCP)، ۲۵ جدایه قابلیت تولید بیوفیلم را نشان دادند (شکل ۵). سی درصد جدایه‌ها (۹ جدایه A۱، A۳، A۴، C۴، C۵، C۶، E۳، E۴ و E۶) بیوفیلم قوی تولید کردند و ۴۰٪ جدایه‌ها (A۲، A۵، B۴، B۵، B۶، C۱، C۲، C۳، D۱، D۲، D۳ و D۴)

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.21.9.5]
[DOI: 10.61186/ifej.11.21.99]

تولیدکننده بیوفیلم متوسطی بودند (شکل ۵). بیشترین تولید بیوفیلم مربوط به جدایه‌های گروه *B. velezensis* و *B. subtilis* بوده و جدایه‌های گروه *B. cereus* و گروه *B. thuringiensis* به‌ترتیب بیوفیلم کمتری تولید نمودند.



شکل ۵- تشکیل بیوفیلم جدایه‌های مختلف باسیلوس به روش میکروپلیت و رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله
Figure 5. Biofilm production of *Bacillus* isolates in tissue culture plate stained with crystal violet

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به وجود جمعیت بالایی از کلونی‌های هم شکل حاصل از کشت نمونه ریشه‌های به خوبی ضدعفونی شده، باکتری‌های جدا شده را می‌توان بطور قطع به‌عنوان اندوفیت‌های ریشه کچف تلقی نمود. تحقیقات گذشته نشان داده است که شرایط آب و هوایی و فصل نمونه‌برداری تاثیر زیادی در حضور و موقعیت جداسازی به علت تفاوت‌های شدید در سطح جمعیت اندوفیت‌ها در بافت‌های گیاهی دارد. در جداسازی‌های بررسی‌های اخیر نیز این مساله مشاهده گردید. با گرم شدن هوا، جداسازی در اغلب موارد غیرممکن بود و برای افزایش جمعیت باکتری به‌منظور جداسازی مناسب، نیاز به انجام فرایند غنی‌سازی سوسپانسیون ریشه در محیط کشت Brain Heart Infusion همراه با محلول جوانه‌زنی حاوی گلوکز به اضافه DL-Alanine و یک منبع غنی از ویتامین‌ها و اسیدهای‌آمینه بوده است. بنابراین ضروری است که نمونه‌برداری برای بررسی تنوع جمعیت باکتری‌های اندوفیت کچف و به احتمال قوی برای دیگر گیاهان درختی در فصول مختلف سال تکرار شود. وجود برخی از ویژگی‌های فیزیولوژیکی در جدایه‌های باسیلوس می‌تواند نشانگر تاثیر بالقوه بعضی از آنها در افزایش رشد گیاهان و همچنین به‌کارگیری آنها به‌عنوان عوامل کنترل زیستی محسوب شود. اگرچه تولید هورمون IAA به‌عنوان شاخص ارزیابی افزایش‌دهندگی رشد گیاهان در باکتری‌های اندوفیت محاسبه می‌گردد اما تولید میزان بالای IAA می‌توانند مانع رشد رویشی گیاهان نیز شود و بنابراین تولید بالای این هورمون نمی‌تواند به تنهایی معیار مناسبی برای گزینش جدایه‌های مفید باکتری‌های اندوفیت محسوب گردد. تولید آنزیم‌ها خصوصاً پروتئازها می‌تواند در کنترل زیستی و فعالیت هیپرپارازیتی موثر باشد. این اولین بررسی در زمینه شناسایی جدایه‌های باسیلوس اندوفیت ریشه کچف (*Carpinus orientalis* Mill.) در ایران می‌باشد. لازم است بررسی‌های تکمیلی در زمینه ویژگی‌ها و قابلیت کنترل زیستی این جدایه‌ها بر روی عوامل تهدید کننده سلامت درختان از جمله کچف صورت پذیرد.

منابع

1. Alström, S. and R.G. Burns. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biology and Fertility of Soil, 7: 232-238.
2. Atalan, E., G.P. Manfio, A.C. Ward, R.M. Kroppenstedt and M. Goodfellow.2000. Biosystematic studies on novel *streptomycetes* from soil. Antonie van Leeuwenhoek, 77: 337-353.
3. Bakker, P.A., C.M. Pieterse and L.C. Van Loon.2007. Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. Phytopathology, 97: 239-243.
4. Bargabus, R.L., N.K. Zidack, J.E. Sherwood and B.J. Jacobsen. 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.
5. Barka, E.A., S. Gognies, J. Nowak, J.C. Audran and A. Belarbi.2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biological Control, 24: 135-142.
6. Berber, I. 2004. Characterization of *Bacillus* species by numerical analysis of their SDS–PAGE proteins profiles. Journal of Cell and Molecular Biology, 3: 33-37.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.21.9.5]
[DOI: 10.61186/ifej.11.21.99]

7. Berber, I. and C. Cokmus. 2001. Characterization of *Bacillus sphaericus* strains by Native-PAGE. Bulletin of Pure and Applied Sciences, 20: 17-21.
8. Berber, I., C. Cokmus and E. Atalan. 2003. Characterization of *Staphylococcus* species by SDS–PAGE of whole-cell and extracellular proteins. Microbiology, 72: 42-47.
9. Chassy, B.M. and A. Gluffridia. 1980. Method for the lysis of gram-positive, asporogenous bacteria with lysozyme result. Applied and Environmental Microbiology, 32: 315-326.
10. Coombs, J.T., P.P. Michelsen and C.M. Franco.2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. Biological Control, 29: 359-366.
11. Costas, M. 1992. Classification, identification and typing of bacteria by the analysis of their one-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic protein patterns. Advances in Electrophoresis, 5: 351-408.
12. de-Bashan, L.E., J.P. Hernandez and Y. Bashan. 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation-a comprehensive evaluation. Applied Soil Ecology. 61: 171-189.
13. de-Bruijn, F.J., J.R. Stoltzfus, R. So, P.P. Malarvithi and J.K. Ladha. 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. In: Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes, 25-36 pp. Springer, Netherlands.
14. Fernando, W.G.D., S. Nakkeeran, Y. Zhang and S. Savchuk. 2007. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary by *Pseudomonas* and *Bacillus* species on canola petals. Crop Protection, 26: 100-107.
15. Frank, A.C., J.P.S. Guzmán and J.E. Shay. 2017. Transmission of bacterial endophytes. Microorganisms, 5: 21.
16. Freitas, D.B., M.P. Reis, C.I. Lima-Bittencourt, P.S. Costa, P.S. Assis, E. Chartone-Souza and A.M.A. Nascimento. 2008. Genotypic and phenotypic diversity of *Bacillus* spp. isolated from steel plant waste. BMC Research Notes, 1: 92.
17. Fritze, D. 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. Phytopathology, 94: 1245-1248.
18. Glick, B.R. and J.J. Pasternak. 2003. Plant growth promoting bacteria. In: B. R. Glick, & J. J. Pasternak (eds.), Molecular biotechnology principles and applications of recombinant DNA. 436-454 pp. Washington DC, ASM Press.
19. Gupta, R.S., S. Patel, N. Saini and S. Chen. 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.
20. Kandel, S.L., P.M. Joubert and S.L. Doty. 2017. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. Microorganisms, 5: 77.
21. Kang, S.H., H. Cho, H. Cheong, C. Ryu, J.F. Kim and S. Park. 2007. Two bacterial entophytes eliciting both plant growth promotion and plant defense on pepper (*Capsicum annuum* L.). Journal of Microbiology and Biotechnology, 17: 96.
22. Ki, J.S., W. Zhang and P.Y. Qian. 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.
23. Kloepper, J.W., C.M. Ryu and S. Zhang. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology, 94: 1259-1266.
24. Laemmli, U.K. and E. Kellenberger. 1970. Polymorphic Assemblies Related to the Head of Phage T4. Macromolecules Biosynthesis and Function, 21: 159.
25. Lodewyckx, C., J. Vangronsveld, F. Porteous, E.R.B. Moore, S. Taghavi, M. Mezgeay and D.van der Lelie. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. Critical Reviews in Plant Sciences, 21: 583-606.
26. Malinowski, D.P., G.A. Alloush and D.P. Belesky. 2000. Leaf endophyte *Neotyphodium coenophialum* modifies mineral uptake in tall fescue. Plant and Soil, 227: 115-126.
27. Maughan, H. and G. Van der Auwera. 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases, 11: 789-797.
28. Maurhofer M., C. Keel, D. Haas and G. Defago. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO with enhanced production. Plant Pathology, 44: 40-50.
29. Mercado-Blanco, J. and B.J.J. Lugtehberg. 2014. Biotechnological applications of bacterial endophytes. Current Biotechnology, 3: 60-75.
30. Mishra, A.K. and B. Mulgrew. 2006. Bistatic SAR ATR using PCA-based features. In: Defense and Security Symposium (pp. 62340U-62340U). International Society for Optics and Photonics.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.21.9.5]
[DOI: 10.61186/ifej.11.21.99]

31. Murray, B.E., K.V. Singh, J.D. Heath, B.R. Sharma and G.M. Weinstock.1990. Comparison of genomic DNAs of different enterococcal isolates using restriction endonucleases with infrequent recognition sites. Journal of Clinical Microbiology, 28: 2059-2063.
32. Patten, C.L. and B.R. Glick.1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. Canadian Journal of Microbiology, 42: 207-220.
33. Pirttila, A.M. and A.C. Frank. 2011. Endophyte of forest trees: Biology and Application. 1st ed. pp. 319. Springer, Amsterdam, Netherlands.
34. Poormontaseri, M., T. Ostovan, E. Berizi and S. Hosseinzadeh. 2017. Growth rate of Bacillus species probiotics using various enrichment media. International Journal of Nutrition Sciences, 2: 39-42.
35. Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.1989. Molecular cloning. Vol. 2, 14-9 pp. Cold spring harbor laboratory press. New York, USA.
36. Sari, E., H.R. Etebarian, A. Roustaei and H. Aminian. 2006. Biological control of *Gaeumannomyces graminis* on wheat with *Bacillus* spp. Plant Pathology Journal, 5: 307-314.
37. Satomi, M., M.T. La Duc and K. Venkateswaran. 2006. *Bacillus safensis* sp. Nov., isolated from spacecraft and assembly-facility surfaces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56: 1735-1740.
38. Schaad, N.W., J.B. Jones and W. Chun. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria3rd ed. pp 373. American Phytopathological Society, APS Press, St. Paul, MN, USA.
39. Scott, B. 2001. Epichloë endophytes: fungal symbionts of grasses. Current Opinion in Microbiology, 4: 393-398.
40. Sen, R., S. Tripathy, S.K. Padhi, S. Mohanty and N.K. Maiti. 2015. Assessment of genetic diversity of *Bacillus* spp. Isolated from eutrophic fish culture pond. 3 Biotec, 5: 393-400.
41. Senthilkumar, M., V. Govindasamy and K. Annapurna. 2007. Role of antibiosis in suppression of charcoal rot disease by soybean endophyte *Paenibacillus sp*. HKA-15. Current Microbiology, 55: 25-29.
42. Shen, S.Y. and R. Fulthorpe. 2015. Seasonal variation of bacterial endophytes in urban trees. Frontiers in Microbiology, 6: 427.
43. Slepecky, N.B. and M. Ulfendahl. 1992. Actin-binding and microtubule-associated proteins in the organ of Corti. Hearing Research, 57: 201-215.
44. Stepanović, S., D. Vuković, V. Hola, G.D. Bonaventura, S. Djukić, I. Ćirković and F. Ruzicka. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica, 115: 891-899.
45. Suihko, M.L. and E. Stackebrandt. 2003. Identification of aerobic mesophilic bacilli isolated from board and paper products containing recycled fibres. Journal of Applied Microbiology, 94: 25-34.
46. Sullivan, T.J., J. Rodstrom, J. Vandop, J. Librizzi, C. Graham, C.L. Schardl and T.L Bultman. 2007. Symbiont-mediated changes in *Lolium arundinaceum* inducible defenses: evidence from changes in gene expression and leaf composition. New Phytologist, 176: 673-679.
47. Szilagyi-Zecchin, V.J., A.C. Ikeda, M. Hungria, D. Adamoski,V. Kava-Cordeiro, C. Glienke and V.G. Galli-Terasawa. 2014. Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mayz* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. AMB Express, 4: 26.
48. Tashi-Oshnoei, F., B. Harighi and J. Abdollahzadeh. 2016. Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol potential from aok trees. Forest Pathology, 47: 1-8.
49. Turenne, C.Y., J.W. Snyder and D.C. Alexander. 2015. *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In: Manual of Clinical Microbiology (11th ed.). ASM press. Jorgensen. J.H., K.C. Carroll, G. Funke, M.A. Pfaller, M. L. Landry, S.S. Richter and D.W. Warnock. (eds). Washington DC, 441–462 pp.
50. Wakisaka, Y. and K. Koizumi. 1981. An enrichment isolation procedure for minor *Bacillus* populations. The Journal of Antibiotics, 450-457 pp.
51. Weisburg, W.G., S.M. Barns, D.A. Pelletier and D.J. Lane. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173: 697-703.
52. Zheng, G. and M.F. Slavik. 1999. Isolation, partial purification and characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus subtilis* strain. Letters in Applied Microbiology, 28: 363-367.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.21.9.5]
[DOI: 10.61186/ifej.11.21.99]

OPEN ACCESS
CC BY NC

Isolation and Molecular Identification of Endophytic *Bacillus* from the Roots of *Carpinus Orientalis* in Mazandarn and Semnan Provinces

Seyed Mohamad Alavi[1], Heshmat Rahimian[2], Saeed Tarighi[3] and Mohsen Mehrvar[3]

1- Ph.D. Student of Phytopathogenic Prokaryotes, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
2- Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran, (Corresponding author: h.rahimian@sanru.ac.ir)
3- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
Received: 1 October, 2022 Accepted: 26 October, 2022

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1402.11.21.9.5]
[DOI: 10.61186/ifej.11.21.99]

Extended Abstract

Introduction and Objective: Because of possessing a myriad of biological features useful in the biocontrol area, *Bacillus* species have been in the forefront of studies in this vast yet expanding area of research. Given the preservation of biodiversity and sustainability of the Hyrcanian ecosystems are of utmost importance ecologically and environmentally proper management of this ecosystem warrants serious attention and care. Studies on the microbiome and identification of the species living as endophytes and commensals are by itself a vast area of research in this regard. The present study was aimed at the identification and preliminary biological characterization of the *Bacillus* strains living as endophyte in the roots of the oriental hornbeam (*Carpinus orientalis*) growing in Mazandaran and Semnan provinces.

Material and Methods: Samples of oriental hornbeam roots were randomly collected from the mountain site of southern Mazandaran and northern Semnan in the Spring 2018. Root segments were surface-disinfected, washed in sterile distilled water (SDW) and crushed in drops of SDW in sterile mortar and pestle. Isolation of bacteria were done following spreading drops of the suspension on plates of tryptic soy agar (TSA) and 3-4 days incubation at 28˚C. The isolates were characterized phenotypically and their protein profiles were determined by electrophoresis on polyacrylamide gel. Diversity of the isolates were assayed by comparing DNA fragment pattern on agarose gels after their amplification by REP-, BOX- and IS-50 PCR. A representative isolate from each of the four DNA profile groups was selected and a 1500bp fragment of the 16S rDNA of each amplified by PCR and sequenced. The nucleotide sequences were aligned and compared with those of a collection of *Bacillus* species deposited in GenBank using the BLASTn program. A phylogenetic tree of the isolates was constructed using the Maximum-Likelihood method. The ability of the isolates to produce IAA, hydrogen cyanide, protease and biofilm was evaluated.

Results: Thirty *Bacillus* isolates were recovered from the roots of hornbeam on TSA medium. Based on their phenotypic and molecular characteristics the isolates were differentiated into four groups. Comparison of the nucleotide sequences of their 16S rDNA with the sequences retrieved from GenBank indicated affiliation of the isolates with *Bacillus thuringensis*, *B. cereus, B. subtilis,* and *B. velezensis* among which *Bacillus thuringiensis* was the most prevalent and *B. subtilis* the most populated group. All isolates produced indole acetic acid at 5 to 85 mgl^{-} with *B. thuringiensis* producing the highest and *B. velezensis* the lowest concentration of the hormone. The majority of isolates were capable of producing lipase, gelatinase, lecithinase, protease, and amylase. Isolates of *B. cereus* and *B. thuringiensis* were considerably more proteolytic among all. Producing of biofilm was confined to the isolates of *B. velezensis*.

Conclusion: The possession of and the diversity in the capacity of producing various biologically beneficial biochemical and enzymes and of having other attributes of value in biocontrol, makes the *Bacillus* spp. understudy as potentially capable bacteria in the promotion of plant growth and in the biological control of pathogens. Isolates of *B. thuringiensis* and *B. cereus* appeared to be superior among the four species studies. This is the first report on the identification and partial characterization of the potentially beneficial *Bacillus* species living as endophyte in the root tissues of oriental hornbeam in Iran.

Keywords: *Bacillus*, Endophyte, IAA, Isolate, Oriental hornbeam, Sequences