مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی online
دوره ۱۳، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۳
صفحه ۲۱-۱۰

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2024
Volume 13, Number 1, Pages: 10-21

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

10.61186/gebsj.13.1.7

شناسایی باکتری‌های اپی فیت جداشده از آفتابگردان در استان آذربایجان غربی و بررسی توانایی آنها در انگیزش رشد

Identification of epiphyte bacteria isolated from sunflower in West Azarbaijan province and investigation of their ability to growth promotion

نبی خضری نژاد[۱]، غلام خداکرمیان[۲*]، فاطمه شهریاری[۳]

Nabi Khezrinejad[1], Gholam Khodakaramian[2*], Fatemeh Shahryari[3]

۱-دانش آموخته دکتری گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران،
۲- استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۳- استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، ایران

1. Ph.D graduated of Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan
2. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Bu Ali Sina University, Hamadan, Iran.
3. Assistant Professor, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email

khodakaramian@basu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۹/۳۰ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۱۰- تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۶/۷)
Received: 2023/12/21 | Accepted: 2024/04/29 | Published: 2024/08/28

Abstract

In order to identify epiphyte bacteria and investigate their effect on growth promoting, samples were randomly collected from the leaves and stems of sunflower plants before the flowering stage from West Azarbaijan province. 250 bacterial strains were isolated from the surface of organs (epiphytes). Four tests of indole acetic acid, ammonia, siderophore production, and phosphate solubility ability were used for initial screening and selection of strains with higher ability. The results showed that among 250 strains, 100 strains were positive in at least one out of the four tests and were selected as growth enhancing strains. The identification of representative bacteria was done based on the comparison of phenotypic characteristics and sequencing of 16S rRNA and *gyrB* genes. The results showed that the representatives of the selected strains were *Burkholderia multivorans*, *Paenibacillus polymyxa*, *Pantoea conspicua*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Sphingomonas aquatica*. *S. aquatica* was reported for the first time in the world and *P. polymyxa*, *P. conspicua* and *B. multivorans* species were reported for the first time from Iran as species associated with sunflower. The ability to stimulate growth in plants by bacteria isolated in greenhouse conditions was investigated using the representatives of the groups of strains. The results showed that the studied treatments had a significant difference at the statistical 1% probability. Among the studied strains, E71 (*P. fluorescens*) showed the highest effect (54%) in increasing growth factors in greenhouse conditions, and E48 and E80 strains had less effect than the control.

Key words: Ammonia, Indole acetic acid, Siderophore, West Azarbaijan

رفرانس دهی این مقاله Citation

Khezrinejad N, Khodakaramian G, Shahryari F. (2024). Identification of epiphyte bacteria isolated from sunflower in West Azarbaijan province and their ability to growth promote. Genetic Engineering and Biosafety Journal, 13 (1): 10-21. doi: 10.61186/gebsj.13.1.7.
URL: http://gebsj.ir/article-1-478-fa.html

خضری نژاد ن، خداکرمیان غ، شهریاری ف. (۱۴۰۳). شناسایی باکتری‌های اپی فیت جداشده از آفتابگردان در استان آذربایجان غربی و بررسی توانایی آنها در انگیزش رشد. مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی. ۱۳ (۱): ۱۰- ۲۱.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.7]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 13, Number 1, 2024

خلاصه

به منظور شناسایی باکتری‌های اپی‌فیت و بررسی تاثیر آنها در انگیزش رشد، گیاهان آفتابگردان کمی پیش از گلدهی از مناطق مختلف استان آذربایجان‌غربی به طور تصادفی گردآوری و تعداد ۲۵۰ استرین باکتریایی، از سطح اندام‌ها (اپی‌فیت) جداسازی شدند. با توجه به تعداد زیاد استرین‌های جدا شده، برای غربال‌گری اولیه و گزینش استرین‌های با توانایی بالاتر، چهار آزمون تولید ایندول استیک اسید، آمونیاک و سیدورفور و توانایی حلالیت فسفات به کار گرفته شد. نتایج نشان داد که از میان ۲۵۰ استرین، تعداد ۱۰۰ استرین دست کم در یکی از آزمون‌های چهارگانه مثبت بودند و به عنوان استرین‌های افزاینده رشد برگزیده شدند. شناسایی باکتری‌های نماینده، بر مبنای مقایسه ویژگی‌های فنوتیپی و توالی‌یابی ژن‌های 16S rRNA و *gyrB* انجام شد و نتایج نشان داد که نماینده‌های استرین‌های برگزیده، گونه‌های *Pantoea* ،*Escherichia coli* ،*Pseudomonas fluorescens* ،*Pantoea conspicua* ،*Paenibacillus polymyxa* ،*Burkholderia multivorans* ،*agglomerans* ،*Bacillus subtilis* ،*Bacillus thuringiensis* ،*Sphingomonas aquatica* هستند. گونه‌ی *S. aquatica* اولین بار در دنیا و گونه‌های *P. polymyxa* ،*P. conspicua* و *B. multivorans* اولین بار از ایران به عنوان گونه‌های همراه با آفتابگردان گزارش شد. توانایی انگیزش رشد در گیاه بوسیله باکتری‌های جدا شده در شرایط گلخانه‌ای با استفاده از نماینده گروه‌های استرین‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که تیمارهای مورد بررسی در سطح احتمال آماری یک درصد دارای تفاوت معنی‌دار بودند.از میان استرین‌های مورد بررسی، استرین E71 (*P. fluorescens*) بیشترین تاثیر (٥٤ درصد) را در افزایش فاکتورهای رشدی در شرایط گلخانه نشان داد و در مقابل استرین‌های E48 و E80 تاثیر کمتری نسبت به شاهد داشتند.

واژه‌های کلیدی: آذربایجان‌غربی، آمونیاک، ایندول استیک اسید، سیدروفور

مقدمه

Introduction

آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) محصول مهم روغنی است که در سراسر جهان به‌طور وسیع کشت می‌شود و سطح زیر کشت آن به دلیل عملکرد بالای روغن و نیازهای کشتی متوسط، مرتباً در حال افزایش است (Forchetti et al., 2010). سطح کاشت جهانی آفتابگردان در سال ۲۰۲۰ در حدود ۷/۲٦ میلیون هکتار با عملکرد متوسط ۱۹٤۸ کیلوگرم در هکتار و تولید ۵۲ میلیون تن دانه بود. سطح کاشت آفتابگردان در سال ۱٤۰۰ در ایران به صورت آبی و دیم به ترتیب ۷۳۳۹ و ۷۲۸۰ هکتار بود. آفتابگردان در دامنه وسیعی از شرایط محیطی رشد می‌کند و به همراه دیگر دانه‌های روغنی سهم قابل‌توجهی از تولید روغن گیاهی خوراکی در جهان را بر عهده دارد. روغن آفتابگردان دارای رنگ و بوی ملایم، نقطه اشتعال بالا بوده و شامل غلظت بالای اسیدهای چرب اشباع‌نشده و لینولئیک اسید است (Malik et al., 2001). این ویژگی‌ها روغن آفتابگردان را به یکی از بهترین روغن‌های سرخ‌کردنی گیاهی در صنایع غذایی تبدیل کرده است (Jabbar et al., 2009).

امروزه استراتژی جهانی گرایش به کاهش مصرف سموم و کودهای شیمیایی دارد (Santoyo et al., 2016). روش‌های رایج برای کنترل بیماری‌های گیاهی و همچنین افزایش رشد و باروری گیاهان، مبارزه شیمیایی، استفاده از کودهای شیمیایی و استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد که علاوه بر مشکلات زیاد در راستای اعمال این روش‌ها قادر به کنترل کافی بیماری‌ها نمی‌باشند (Kumar et al., 2016). باتوجه به اینکه کود شیمیایی به طور وسیعی در کشاورزی استفاده می‌شوند. عمده‌ترین معضلات ناشی از مصرف سموم و کودهای شیمیایی، بر جای ماندن بقایای سموم در محصولات کشاورزی، فراورده‌های آن‌ها، ایجاد مقاومت به سموم، آلودگی منابع طبیعی همچون هوا، آب، خاک، پخش ناخواسته سموم و ایجاد آلودگی در مناطق مسکونی، عوارض جانبی و

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.7]

زیست‌محیطی، سرطان‌زا بودن سموم و انباشتگی آن‌ها در بدن موجودات زنده است (Dinesh et al., 2015). علاوه بر این از جنبه اقتصادی، سالانه در کشور مبالغ زیادی صرف واردات سموم و کود، توزیع آن‌ها و سمپاشی می‌شود. در این میان، میکروارگانیسم‌های مفید مرتبط با گیاهان به‌ویژه باکتری‌های محرک رشد گیاهان (PGPR)، باکتری‌های اپی‌فیت به لحاظ داشتن پتانسیل بالقوه در کنترل بسیاری از بیماری‌ها و همچنین توانایی انگیزش رشد، می‌توانند جایگزین مناسبی در این خصوص باشند (Shoebitz, 2009). باکتری‌ها یکی از اجزای مهم فلور متنوع میکروبی بوده که به‌صورت اپی‌فیت، اندوفیت و یا در منطقه فراریشه زندگی می‌کنند و شامل باکتری‌های اپی‌فیت بیماریزای گیاهی، باکتری‌های اپی‌فیت عامل کنترل بیولوژیک، باکتری‌های فعال تشکیل هسته یخ و تشکیل‌دهنده بیوفیلم هستند (Fürnkranz et al., 2008). برخی از جنس‌های اپی‌فیت مثل *Psudomonas*، *Sphingomonas* و *Erwinia* به عنوان عامل کنترل بیولوژیک علیه بیمارگرهای گیاهی استفاده شده‌ان (Nongkhlaw and Joshi, 2014). اپی‌فیت‌ها باکتری‌هایی هستند که قادر به زندگی در سطوح گیاهی هستند (Henis et al., 1986) و در مقایسه با آنهایی که به عنوان باکتری اندوفیت در نظر گرفته می‌شوند، باکتری‌های اپی‌فیت را می‌توان با شست‌وشوی سطحی حذف کرد. باکتری‌های اپی‌فیت حاضر در سطح برگ یا اضافه شده به صورت محلول پاشی در سرکوب پاتوژن‌های گیاهی از اهمیت جهانی برخوردار است (Nongkhlaw and Joshi, 2014).

هدف از این تحقیق شناسایی باکتری‌های اپی‌فیت گیاه آفتابگردان با استفاده از روش‌های فنوتیپی، توالی‌یابی ژن 16S rRNA، ژن پربیان *gyrB* و همچنین بررسی توانایی القای رشد گیاه آفتابگردان توسط این جدایه‌های اپی‌فیت می‌باشد.

مواد و روش‌ها
Materials and Methods

نمونه برداری و جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت: برای جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت، قطعاتی از برگ و ساقه گیاهان آفتابگردان از مزارع مختلف در استان آذربایجان‌غربی (مناطق ارومیه، خوی، میاندوآب، نقده، بوکان، مهاباد، سلماس، شاهین‌دژ و ماکو) جمع‌آوری شد. نمونه‌ها به طور جداگانه به ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون منتقل و به مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر تکان داده شدند. پس از گذشت این مدت، با استفاده از پیپت پاستور، یک قطره از سوسپانسیون برداشته و روی محیط کشت آگار مغذی (NA) به‌طور جداگانه پخش گردید. تشتک‌های پتری به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سیلسیوس نگه‌داری شدند.

نگهداری استرین‌ها: برای نگهداری کوتاه مدت و استفاده روزانه یا هفتگی، باکتری‌ها پس از رشد روی محیط NA به مدت ۳-۲ هفته در یخچال نگهداری شدند و پس از گذشت این مدت باکتری‌ها تجدید کشت شدند. برای نگهداری طولانی‌مدت، از کشت ٢٤ ساعته باکتری، سوسپانسیون غلیظی در میکروتیوب‌های حاوی یک میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه و در دمای ٤ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

به منظور انتخاب استرین‌های برتر و مفید از نظر توانایی افزایش رشد گیاه، آزمون‌های تولید ایندول استیک اسید، تولید آمونیاک، حلالیت فسفات و تولید سیدروفور روی تمام استرین‌ها انجام شد.

آزمون تولید ایندول استیک اسید: برای ارزیابی تولید هورمون ایندول استیک اسید توسط استرین‌ها از روش ذکر شده استفاده شد (Weber and Gordon, 1951). بدین منظور ابتدا از استرین‌های باکتریایی به میزان یک لوپ برداشته و در محیط جنسن برات (۲۰ گرم سوکروز، ۱ گرم فسفات آمونیوم، ۰/۵ گرم سولفات منیزیوم، ۰/۵ گرم کلرید سدیم، ۰/۱ گرم سولفات آهن و ۲ گرم کربنات کلسیم در یک لیتر آب مقطر) به همراه ۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر تریپتوفان، به صورت سوسپانسیون درآمدند. این محیط‌ها به مدت ٤٨ ساعت روی شیکر و در دمای ۲۷ درجه سیلسیوس نگهداری شدند. پس از گذشت مدت زمان مذکور، ۲ میلی‌لیتر از محلول سالکوفسکی (کلرید آهن، ۰/۵ مولار به میزان ۷/۵ میلی‌لیتر، ۱۵۰ میلی لیتر سولفات هیدروژن، ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر سترون) به محیط کشت‌ها اضافه گردید. تغییر رنگ

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-04-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.7]

محیط‌های کشت به صورتی مایل به قرمز به عنوان مثبت بودن آزمون و تولید ایندول استیک اسید توسط استرین‌ها تلقی گردید.

تولید آمونیاک: برای بررسی توانایی تولید آمونیاک توسط استرین‌ها، یک لوپ از باکتری به محیط مایع پپتون (چهار درصد) تلقیح شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلیسوس نگهداری شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول نسلر (یدور پتاسیم ۵۰ گرم، کلرید جیوه ۳۵ میلی‌لیتر، آب مقطر سترون ۲۵ میلی‌لیتر و هیدروکسید پتاسیم ٤٠ درصد به میزان ٤٠٠ میلی‌لیتر) به محیط‌های کشت اضافه شد. ایجاد رسوب زرد مایل به قهوه‌ای به عنوان مثبت بودن نتیجه آزمون و تولید آمونیاک تلقی گردید (Cappuccino and Sherman, 1992).

حلالیت فسفات: آزمون حلالیت فسفات در محیط پیکوفسکایا صورت گرفت. این محیط کشت شامل ۱۰ گرم گلوکز، ۵ گرم فسفات کلسیم، ۰/۵ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۱ گرم سولفات منیزیوم، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر سترون است. پس از اتوکلاو کردن محیط مذکور، باکتری‌ها به صورت لکه‌ای کشت شده و تشتک‌های پتری به مدت سه الی پنج روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. ایجاد هاله روشن در اطراف استرین‌ها به عنوان مثبت بودن آزمون و توانایی حلالیت فسفات توسط باکتری‌ها تلقی گردید (Gaur, 1990).

تولید سیدروفور: برای بررسی تولید سیدروفور توسط استرین‌ها از محیط آبی رنگ CAS (Chrome Azurol S) استفاده شد. باکتری‌ها به صورت نقطه‌ای روی این محیط، کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در صورتی‌که باکتری سیدروفور تولید کند، باعث تغییر رنگ محیط از آبی به نارنجی می‌شود که در اثر خارج ساختن آهن از محیط CAS است (Schaad et al., 2001).

جداسازی DNA ژنومی: جداسازی DNA از سلول‌های باکتریایی به روش لایز قلیایی انجام شد (Ausuble et al., 1992). استرین‌ها پس از دو روز رشد در محیط NA در دمای ۲۸–۲۵ درجه سلسیوس، در آب مقطر سترون به صورت سوسپانسیون درآمدند. کدری سوسپانسیون‌ها در ٦٠٠ نانومتر به ۰/۲ واحد تنظیم و به آنها ۰/۱ حجم هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد اضافه شد. نمونه‌ها به مدت دو تا سه دقیقه در آب جوش قرار داده شدند، شفاف شدن سوسپانسیون به عنوان لایز شدن سلول‌های باکتریایی تلقی گردید، نمونه‌ها به مدت پنج دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. سپس فاز رویی از میکروتیوب‌ها برداشته شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. از این نمونه‌ها به عنوان DNA الگو در واکنش‌های زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد.

تکثیر ژن‌های 16S rRNA و *gyrB* : برای تکثیر ژن‌های 16SrRNA و *gyrB*، واکنش‌ها به حجم ۲۵ میکرولیتر، شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۲/۵میلی مولار MgCl2، ۰/۲ میلی مولار از مخلوط dNTP، ۱/۵ میکرولیتر DNA الگو، ۱/۵ واحد آنزیم تک پلیمراز (شرکت سیناژن) و ۱۰پیکو مول از جفت آغازگرهای fD1 (′3 -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -′5) و rD1 (′3 -AAGGAGGTGATCCAGCC -′5) برای ژن 16S rRNA و جفت آغازگرهای gyrB-F (AGCATYAARGTGCTGAARGG) و gyrB-R (GGTCATGATGATGATGTTGTG) برای ژن *gyrB* ساخته شده توسط شرکت سیناژن انجام شد. برنامه زمانی ودمایی شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۹۵ درجه سیلسیوس به مدت یک دقیقه، ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی، ۹٤ درجه سیلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر به DNA، ۵۷ درجه سیلسیوس (برای تکثیر ژن *gyrB*) و ٦٠ درجه سیلسیوس (برای ژن 16S rRNA) به مدت یک دقیقه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت یک دقیقه و در آخر گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سیلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه به کار برده شد.

الکتروفورز محصولات PCR: ژل آگارز ۱/۵ درصد (۱/۵ گرم آگارز در ۱۰۰ میلی لیتر بافر TBE (1X)) تهیه و در سینی مخصوص الکتروفورز ریخته شد و با شانه مخصوص، چاهک‌های مورد نظر در ژل ایجاد شد. پس از خنک و سفت شدن ژل، سینی حاوی ژل در تانک الکتروفورز قرار گرفت و در بافر TBE (1X) غوطه ور شد، مقدار هفت میکرولیتر از محصولات PCR با دو میکرولیتر محلول حاوی ۰/۱۵ درصد برم فنل بلو و ۵۰ درصد گلیسرول مخلوط و هر نمونه در یکی از

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-04-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.7]

چاهک‌های ایجاد شده ریخته شد. در یکی از چاهک‌ها چهار میکرولیتر از نشانگر اندازه‌ای DNA نیز بارگذاری گردید. ژل حاوی نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۹۰ ولت تا رسیدن رنگ به یک سانتی‌متری انتهای ژل، الکتروفورز شد. ژل با اتیدیوم بروماید (محلول۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی و پس از شستشوی مختصر با آب مقطر، درون دستگاه ژل داکیومنت قرار گرفت و از آن عکسبرداری شد (Ausuble et al., 1992).

پردازش داده‌ها و رسم درخت تبارزایی: توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده از ژن‌های 16S rRNA و *gyrB* ابتدا در نرم‌افزار Chromas بررسی و در صورت نیاز به‌صورت دستی ویرایش شدند. توالی‌های ویرایش شده با توالی‌های موجود در بانک داده‌های ژنی مورد مقایسه بلاست قرار گرفتند و توالی‌های معتبر با شباهت بالا از بانک ژن اخذ شدند. توالی‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار Clustal W همردیف‌سازی شدند. تبارنما به روش اتصال همسایه‌ای (Saitou and Nei, 1987) با استفاده از نرم افزار MEGA10 و با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap، ترسیم شد.

شناسایی استرین‌ها براساس آزمون‌های بیوشیمیایی: آزمون‌های زیر که برای شناسایی جنس‌ها و گونه‌های مختلف باکتری‌ها مورد توصیه است، برای تمامی استرین‌ها به کار برده شد (Schaad et al., 2001). آزمون‌های رشد هوازی و بی‌هوازی به روش هیو و لایفسن، آزمون اکسیداز به روش اوینگ- جانسون، استفاده از مالونات به روش لیفسن وسیمونز، اوره‌آز، کاتالاز، تحمل نمک، هیدرولیز ژلاتین و هیدرولیز نشاسته به روش شاد انجام گرفت (Schaad et al., 2001). استفاده از منابع کربنی با استفاده از محیط پایه آیر وهمکاران و به روش شاد انجام شد. قندها، اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه با روش تندال و برخی با عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری سترون و به غلظت نهائی ۰/۵ تا یک درصد به محیط پایه اضافه شدند. نتایج استفاده یا عدم استفاده از منابع کربنی بر اساس مقایسه میزان رشد و تغییر اسیدیته محیط کشت نسبت به شاهد (محیط آیر فاقد منبع کربنی) تا چهار هفته پس از کشت و نگهداری محیط‌های کشت در دمای ۲۸-۲۵ درجه سلسیوس ارزیابی شد.

بررسی‌های گلخانه‌ای

تهیه خاک: برای بررسی‌های گلخانه‌ای از مخلوطی از خاک زراعی، ماسه و کود آلی به نسبت ۱:۱:۲ استفاده شد. بعد از اختلاط کامل اجزاء خاک، کمی مرطوب شد و به مدت نیم ساعت در دو روز متوالی در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو گردید. گلدان‌ها از این خاک پر شده و زهکش نیز برای آن در نظر گرفته شد.

آغشته‌سازی بذور و کاشت: سوسپانسیونی از باکتری‌های منتخب با غلظت ۱×۱۰^{۹} و ۰/۱ = OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه و به عنوان مایه تلقیح استفاده شد. از بذور رقم رکورد برای انجام آزمون‌های گلخانه‌ای استفاده شد. به‌این منظور ابتدا بذور با سوسپانسیون باکتری به مدت دو دقیقه آغشته و سپس در گلدان‌ها کشت شدند. همچنین مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به غلظت ۱×۱۰^{۹} به طور جداگانه به گلدان‌های مذکور اضافه شد. تیمار شاهد بدون آغشته سازی و بدون اضافه کردن سوسپانسیون باکتریایی به خاک کشت گردید. گلدان‌ها آبیاری شدندوو در گلخانه با شرایط نوری و دمایی مناسب قرار گرفتند. بعد از گذشت دو ماه از کاشت، بوته‌ها از خاک بیرون آورده شده و طول ریشه و ساقه، وزن تر و خشک ساقه و ریشه در آن‌ها اندازه‌گیری شد.

طرح آزمایش و آنالیز نتایج: این آزمایش در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با ۱۳ تیمار (۱۲ تیمار باکتریایی و یک شاهد) انجام شد. هر تیمار دارای سه تکرار بود. نتایج حاصل با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.4 تجزیه گردید. میانگین تیمارها توسط آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد مقایسه شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.7]

نتایج و بحث

Results and Discussion

جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت و تعیین ویژگی‌های محرک رشدی آن‌ها

از کشت ۶۰ نمونه برگ و ۵۸ نمونه ساقه گیاهان آفتابگردان که از مناطق مختلف آذربایجان غربی به دست آمده بود، در مجموع ۲۵۰ استرین اپی‌فیت جداسازی شدند که از بین آنها ۱۰۰ استرین توانایی حلالیت فسفات، تولید سیدورفور، ایندول استیک اسید و آمونیاک را داشتند و از این بین ۲۵ استرین گرم مثبت و ۷۵ استرین گرم منفی بودند.

در تحقیق حاضر استرین‌های اپی‌فیت آفتابگردان بدست آمده از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی از نظر توانایی تولید ایندول استیک اسید، به عنوان استرین‌های موثر جداسازی و تفکیک شدند. محققین دیگر نیز برای تفکیک اولیه باکتری‌های افزایش دهنده رشد در ذرت از آزمون تولید هورمون توسط باکتری‌ها استفاده کردند (Bhattacharyya Jha, 2012). ایندول استیک اسید در فرآیندهایی از قبیل تقسیم یاخته‌ای، نمو گیاه، تحریک جوانه‌زنی بذر، شکوفه‌دهی، افزایش سرعت رشد ریشه‌ها، کنترل رشد گیاه، شکل‌گیری ریشه‌های جانبی، واکنش به نور و جاذبه، فتوسنتز، تشکیل رنگدانه و سوخت و ساز گیاه دخالت دارد (Spaepen and Vanderleyden , 2011). تلقیح نوع وحشی *P. putida* GR12-2 به بذر، باعث تشکیل ریشه‌هایی شد که ۵۰-۳۵ درصد بلندتر از ریشه‌های بذرهای تیمار شده با جهش‌یافته فاقد IAA بودند. در مجموع، IAA باکتریایی باعث نرم شدن دیواره سلولی ریشه می‌شود که در نتیجه‌ی آن، رشد ریشه افزایش یافته و دسترسی گیاه به مواد مغذی خاک بیشتر می‌شود.

در مطالعه کنونی، برخی از استرین‌های اپی‌فیت توانایی تولید سیدروفور را داشتند. تولید سیدروفور برای اکثر باکتری‌های افزاینده رشد در گیاهان گوجه فرنگی، سیب‌زمینی، گندم، ذرت و خیار نیز گزارش شده است (Ross et al., 2000; Berg, 2002; Shaharoona et al., 2006; Almaghrabi et al., 2013; Xu et al., 2014). در تحقیق حاضر ۷۰ استرین توانایی حلالیت فسفات را داشتند. محققین دیگری نیز حلالیت فسفات را یک آزمون مهم در جداسازی باکتری‌های افزاینده رشد و مفید از دیگر استرین‌ها معرفی کردند (Wang et al., 2022). این محقیقن در بین استرین‌های جداشده از ریزوسفر گندم، استرین‌های *P. moraviensis*، *Bacillus safensis* و *Falsibacillus pallidus* را به عنوان حل کننده فسفات شناسایی کردند. همچنین در تحقیق حاضر مشخص شد که ۳۸ استرین، توانایی تولید آمونیاک را دارند. ازت به عنوان یک عنصر کلیدی در ساختمان بسیاری از ترکیبات موجود در سلول‌های گیاهی مطرح است. عدم دسترسی به ازت برای گیاهان زراعی از عوامل مهم محدود کننده تولیدات کشاورزی است. محققین تولید آمونیاک مخصوصا توسط استرین‌های باکتریایی را در افزایش رشد گیاهان مهم ارزیابی کردند (Hayat et al., 2010).

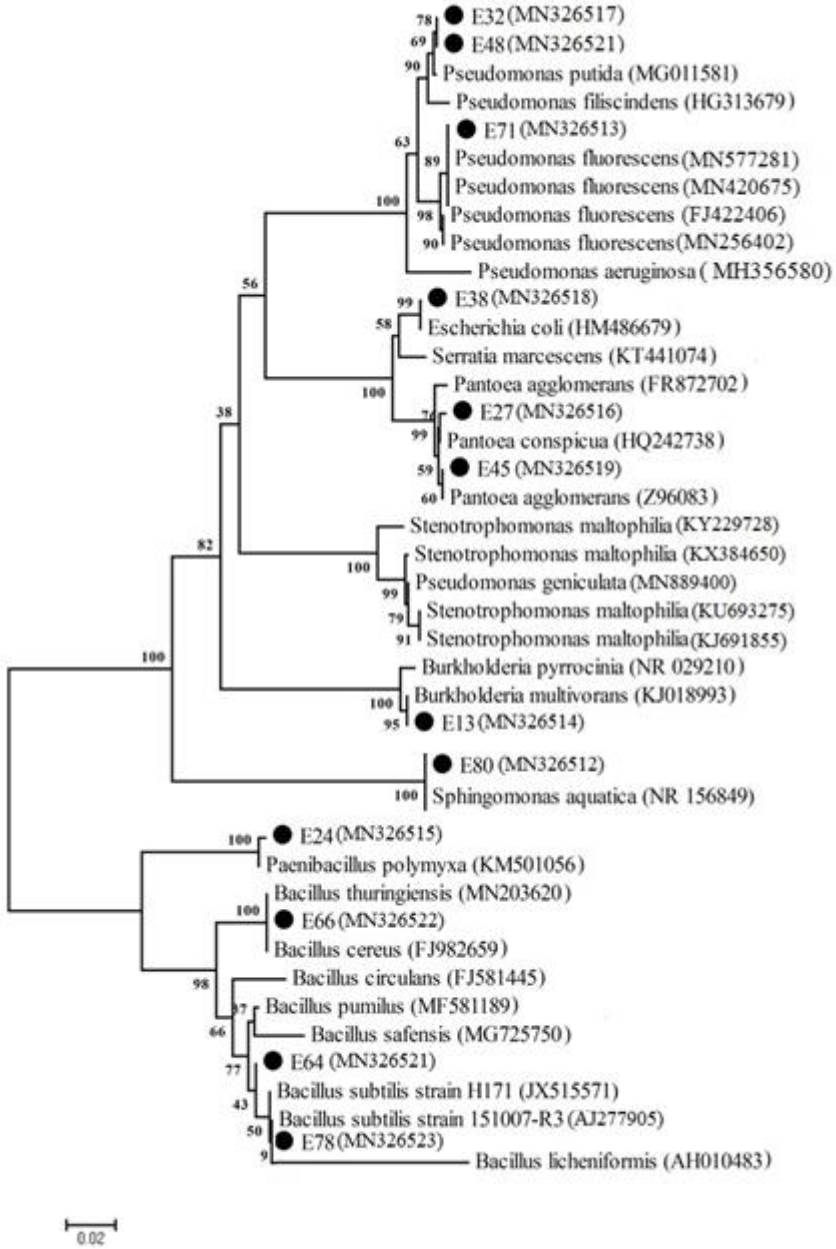
تکثیر و توالی‌یابی ژن‌های 16S rRNA و *gyrB*

تعداد ۱۲ استرین با کدهای (E13، E24، E27، E32، E38، E45، E48، E64، E66، E71، E78، E80) به عنوان نماینده انتخاب و در آزمون PCR مورد آزمایش قرار گرفتند. در همه‌ی استرین‌های بررسی شده، قطعه‌ی ۱۵۰۰ جفت‌بازی از ژن 16S rRNA و قطعه ۱۲۰۰ جفت‌بازی از ژن *gyrB* به‌ترتیب با جفت آغازگرهای fD1/rD1 و gyrb-F/gyrb-R تولید گردید.

پس از تکثیر ژن‌های مزبور، محصول PCR برای توالی یابی به شرکت تکاپوزیست ارسال گردید. توالی‌های بدست آمده با سایر توالی‌های موجود دربانک ژن مقایسه شده و در این پایگاه ثبت شدند. تبارنمای ترسیم شده بر اساس توالی ژن 16S rRNA و ژن *gyrB* (شکل ۱) ارتباط تبارشناختی استرین‌های مورد مطالعه با سایر گونه‌های باکتریایی را نشان می‌دهد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.7]



شکل ۱- درخت فیلوژنتیک ترسیم شده بر اساس توالی‌های ژن‌های 16S rRNA و *gyrB* در استرین‌های اپی‌فیت بدست آمده در این مطالعه همراه با سایر باکتری‌های موجود در بانک داده‌های ژنومی NCBI با استفاده از نرم افزار MEGA10 با bootstrap هزار تکرار. (اعداد داخل پارانتز شماره دسترسی ژن‌ها)

Table1. The phylogenetic tree drawn based on the sequences of 16S rRNA and *gyrB* genes in the epiphyte strains obtained in this study along with other bacteria in the NCBI genomic data bank using MEGA10 software with bootstrap thousand repetitions. (The numbers in parentheses are accession numbers of genes)

خصوصیات مرفولوژیکی، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی استرین‌های اپی‌فیت

خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای استرین‌های منتخب در جدول ۱ ارائه شده است که بر این اساس مشاهده شد که این باکتری‌ها از طیف وسیع منابع کربنی می‌توانند استفاده کنند و از نظر خصوصیات بیوشیمیایی نیز با همدیگر متفاوت هستند

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-04-03]
[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.7]

.**جدول ۱**- خصوصیات بیوشیمایی، تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی استرین‌های اپی‌فیت جداشده از آفتابگردان از مناطف مختلف استان آذربایجان‌غربی

Table 1. Biochemical, nutritional and physiological characteristics of epiphyte strains isolated from sunflower from different regions of West Azerbaijan Province

Strain reaction						
E27, E45	E71 E80	E38	E13	E78, E24,E64,E66	E32, E48	Test
-	-	-	-	+	-	Gram
+	+	+	+	+	+	Catalase
-	-	-	+	-	+	Oxidase
+	+	+	+	+	+	Tolerance Nacl 2%
-	-	-	-	-	-	Growth at pH 5
-	-	-	-	-	-	Growth at pH 9
-	-	-	+	+	+	Starch hydrolysis
-	-	+	+	+	+	Gelatin hydrolysis
+	-	+	-	-	-	O/F
-	+	-	-	-	+	Ketolactose production
-	-	+	-	+	+	Urease
+	+	-	+	+	+	Motility at pH=7
						Acid production from:
+	-	+	-	+	+	Adonitol
-	+	+	+	V	+	Ribose
-	-	-	-	V	+	Sorbitol
+	-	-	-	+	+	Erytrithol
-	+	-	+	+	+	Xylitol
-	+	+	-	+	+	Dulcitol
-	-	+	-	--	+	Arabinise
+	-	-	-	+	+	Sorbose
-	+	-	-	-	-	Melsitose
-	-	+	+	-	-	Celebiose
+	+	+	+	+	+	Glucose
-	+	-	-	-	+	Maltose
-	+	-	-	-	+	Rhamnose
+	-	+	+	-	+	Mannose
-	+	+	-		-	Terehalose
-	+	-	+	+	-	Manitol
-	+	-	-	-	-	Inositol
+	-	-	-	+	+	Melebiose
-	+	-	v	+	-	L-Tartarate
-	-	+	-	+	+	Malonate

در تحقیق حاضر با استفاده از آزمون‌های بیوشیمایی، فیزیولوژیکی، تغذیه‌ای و همچنین توالی‌یابی ژن‌های 16S rRNA و *gyrB*، ۱۵ جدایه اپی‌فیت بدست آمده از گیاه آفتابگردان به عنوان جنس‌های *Pseudomonas*، *Pantoea*، *Paenibacillus*، *Burkholderia*، *Escherichia*، *Bacillus* و *Sphingomonas* شناسایی شدند که اکثرا از گروه باکتری‌های گرم منفی هستند. در مطالعات صورت گرفته در نقاط مختلف دنیا، نشان داده شد که اکثر باکتری‌های اپی‌فیت جدا شده از گیاهان، گونه‌های گرم منفی بودند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Gnanamanickam and Immanuel, 2005). گونه‌ی *S. aquatica* اولین بار در دنیا و گونه‌های *P. polymyxa*، *P. conspicua* و *B. multivorans* اولین بار از ایران به عنوان گونه‌های همراه با آفتابگردان گزارش می‌شود.

بررسی‌های گلخانه‌ای: در بررسی‌های گلخانه‌ای پس از گذشت ۲ ماه از کاشت، بوته‌های آفتابگردان از خاک ظاهر شدند و تاثیر

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.7]

استرین‌ها روی شاخص‌های مختلف گیاهان تیمار شده از قبیل طول ساقه و ریشه، وزن تر و خشک ساقه و ریشه در آن‌ها به دقت اندازه‌گیری و یادداشت گردید. با تجزیه داده‌ها مشخص شد که بین گیاهان تیمار شده با استرین‌ها و شاهد (بدون باکتری) اختلاف معنی‌دار وجود دارد.

تاثیر استرین‌ها بر طول ریشه: بر اساس نتایج تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده در این مطالعه، بین استرین‌ها از نظر تاثیر بر طول ریشه و ساقه، وزن تر ریشه و ساقه و همچنین وزن خشک ریشه و ساقه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده شد. مقایسه میانگین تیمارها نشان داد استرین E71 بیشترین و استرین E48 کمترین تاثیر را بر طول ریشه، استرین E45 بالاترین و استرین E27 کمترین تاثیر را بر طول ساقه، استرین E71 بالاترین و استرین E48 کمترین تاثیر را بر وزن تر ریشه، استرین E66 بالاترین و استرین E80 و E48 کمترین تاثیر را بر وزن تر ساقه، استرین E24 بیشترین و استرین E48 کمترین تاثیر را بر وزن خشک ریشه و استرین E66 بیشترین و استرین E80 کمترین تاثیر را بر وزن خشک ساقه نسبت به شاهد دارا بودند. تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف باکتریایی بر طول ریشه و ساقه، وزن تر ریشه و ساقه و وزن خشک ساقه و ریشه در جدول (۲)، مقایسه میانگین وگروه‌بندی تیمارها در جدول (۳) نشان داده شده است.

جدول۲- تجزیه واریانس تاثیر تیمارهای مختلف باکتریایی روی صفات رشدی آفتابگردان

Table 2. Analysis of variance of the effect of different bacterial treatments on sunflower growth traits

Stem dry weight	Root dry weight	Stem fresh weight	Root fresh weight	Stem length	Root length	Degree of freedom	Source of variations
4.68^{ns}	2.05^{ns}	7.5^{ns}	4.53^{ns}	58.33^{ns}	40.13^{ns}	2	Block
9.77^{**}	7.47^{*}	12.57^{**}	8.86^{*}	207.38^{**}	178.27^{**}	12	Treatment
2.19	1.20	5.18	4.34	70.15	31.88	24	Test error
7.22	9.10	5.11	10.78	8.66	7.96	_	CV

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی داری در سطح ۵ و ۱ درصد

ns, * and ** non-significant, significant at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

جدول ۳- مقایسه میانگین تاثیر تیمارهای مختلف روی طول ریشه و ساقه، وزن تر و خشک ریشه و ساقه گیاه آفتابگردان

Table 3. Comparisons of the average effect of different treatments on root and stem length, fresh and dry weight of sunflower root and stem

Strain	Root length* (cm)	Stem length (cm)	Root Fresh weight (gr)	Stem fresh weight (gr)	Root dry weight (gr)	Stem dry weight (gr)
E13	35.4^{f}	87.6^{c}	40.3^{c}	46.8^{e}	8.7^{c}	22.2^{c}
E24	39.8^{d}	73.2^{i}	37.2^{e}	40.1^{g}	10.9^{a}	18.1^{f}
E27	42.3^{c}	69.4^{k}	39.5^{d}	45.5^{f}	7.4^{e}	20.5^{d}
E32	34.7^{g}	76.7^{h}	35.3^{h}	41.7^{f}	6.8^{e}	19.6^{e}
E38	45.2^{b}	86.6^{d}	40.2^{c}	49.2^{c}	6.9^{e}	22.2^{c}
E45	39.1^{d}	90.4^{a}	32.5^{i}	40.2^{g}	7.4^{d}	18.4^{f}
E48	30.3^{i}	83.3^{f}	31.1^{g}	39.1^{h}	6.3^{f}	16.9^{g}
E64	33.4^{h}	85.2^{e}	44.8^{b}	50.5^{b}	8.2^{c}	22.4^{c}
E66	39.5^{d}	77.9^{g}	36.6^{f}	52.1^{a}	9.6^{b}	24.2^{a}
E71	46.5^{a}	86.3^{d}	45.4^{a}	46.3^{e}	8.4^{c}	21.2^{cd}
E78	35.2^{f}	70.4^{j}	39.4^{d}	47.4^{d}	8.6^{c}	23.9^{b}
E80	38.5^{e}	89.8^{b}	32.6^{i}	39.2^{h}	6.5^{ef}	16.1^{h}
Control	23.6^{j}	57.8^{l}	28.6^{j}	35.3^{i}	4.1^{g}	10.2^{i}

- میانگین سه تکرار
- اعداد دارای حروف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۵٪ در آزمون دانکن هستند.

• Average of three replicates
• Numbers with common letters have no significant difference at the 5% statistical probability level in Duncan's test.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.7]

بررسی گلخانه‌ای در مرحله آغشته سازی بذر با باکتری نشان داد که استرین E71 (*P. fluorescens*) موثرترین باکتری در افزایش شاخصه‌های رشدی بوته‌های آفتابگردان هستند و در مقابل استرین‌های E48 و E80 تاثیر کمتری نسبت به شاهد داشتند. در این بررسی مشاهده شد که استرین‌هایی که باعث افزایش وزن تر و خشک ریشه و همچنین طول ساقه و ریشه می‌شوند، سبب افزایش عملکرد محصول می‌شوند. محققین دیگری نیز نشان دادند که تلقیح آفتابگردان با باکتری‌های *Pseudomonas* sp. و *Bacillus* sp. باعث افزایش چشمگیر وزن تر و خشک ریشه و ساقه می‌شود (Adeleke et al., 2021). در یک مطالعه‌ی دیگر، نشان دادند که تلقیح بذر گوجه‌فرنگی با باکتری‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* باعث افزیش چشمگیر وزن تر و خشک گیاه می‌شود (Filho et al., 2010).

در مورد باکتری‌های سودوموناس فلورسنت کننده و باسیلوس تحقیقات زیادی صورت گرفته است تا مواد تولید شده توسط این باکتری‌ها که در فرآیند تاثیر متقابل بین آن‌ها و گیاه دخالت دارند، مشخص شوند (Ran et al., 2005). سودوموناس‌های فلورسنت به همراه باسیلوس جدا شده از ریزوسفر سیب زمینی توانستند بیومس گیاه را به میزان ۱۵ درصد افزایش دهند (Kurabachew and Wydra, 2013).

در سال‌های اخیر باکتری‌های اپی‌فیت به دلیل توانایی ورود به درون گیاهان و عدم ایجاد علائم بیماری، به عنوان عوامل محرک رشد و نهایتا تبدیل شدن به باکتری‌های اندوفیت اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند (Compant et al., 2010).

نتایج حاصل از یک بررسی نشان داد که جمعیت باکتری *P. fluorescens* در مرحله بلوغ گیاه میزبان افزایش می‌یابد. این بررسی مشخص کرد که این خصوصیت به‌وسیله ژن‌هایی کنترل می‌شود که روی پلاسمید باکتری مورد بررسی وجود دارد. به‌نظر می‌رسد باکتری‌هایی که قدرت کلنیزاسیون بیشتری دارند، دارای فراوانی بیشتر و تنوع قابل توجه فنوتیپی هستند. محققین نشان دادند که از بین ۸۵۳ استرین مختلف باکتریایی، استرین‌هایی که دارای کلنیزاسیون مؤثرتری بودند، از جمعیت باکتریایی بیشتری برخوردار بودند (Zinnel et al., 2002). لذا به نظر می‌رسد الگوی فراوانی و تنوع فنوتیپی باکتری‌های به‌دست آمده در این بررسی به عوامل گفته شده بستگی داشته باشد. باکتری‌های همراه گیاهان به لحاظ توانایی برای تحت تأثیر قرار دادن سلامت گیاه، ویژگی‌های ژنوتیپی، فنوتیپی و فیلوژنی متنوع هستند (Glick, 2012).

در تحقیق حاضر استرین اپی فیت E27 به عنوان *Pantoea conspicua* شناسایی شد. گزارش اندکی در مورد نقش استرین‌های *Pantoa* در افزایش رشد گیاه در دسترس است (Barea, 2015). گزارش شده است که استرین‌های *Pantoa* با حل کردن فسفات و تولید ایندول‌استیک‌اسید و سیانید هیدروژن موجب افزایش رشد گیاه می‌گردند (Yang et al., 2017).

منابع

References

Adeleke, B. S., Ayangbenro, A. S., & Babalola, O. (2021). Bacterial community structure of the sunflower (Helianthus annuus) endosphere. Plant Signaling and Behavior, 16(12), 1-13. https://doi.org/10.1080/15592324.2021.1974217

Almaghrabi, O. A., Massoud, S. I., Abdelmoneim, T. S. (2013). Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. Saudi Journal of Biological Science, 20, 57-61. https:// doi.org/10.1016/j.sjbs.2012.10.004.

Ausuble, F., Brent, F. M., Kingestone, R. E., Moor, D. D., Smith, J. A., Seideman, J. G., & Struhl, K. (1992). Current Protocol in Molecular Biology. Wiley Interscience, New York. 4757 pp. https://www.wiley.com/en-au/

Barea, J. M. (2015). Future challenges and perspectives for applying microbial biotechnology in sustainable agriculture based on a better understanding of plant-microbiome interactions. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 15, 261-282. http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162015005000021.

Berg, G., Krechel, A., Ditz, M., Sikora, R. A., Ulrich, A., & Hallmann A. (2002). Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.7]

antagonistic function against plant pathogenic fungi. FEMS in Microbiology and Ecology, 51, 215-229.

Bhattacharyya, P. N., & Jha, D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28, 1327-1350. https://doi.org/10.1007/s11274-011-0979-9

Cappuccino, J. C., Sherman, N. (1992). Microbiology: A Laboratory Manual, Benjamin/Cummings, New York, USA. https://www.amazon.com/Laboratory-experiments-microbiology.

Dinesh, R., Anandaraj, M., Kumar, A., Kundil, Y., Subila, K. P., & Aravind, R. (2015). Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger. Microbiological Research, 173, 34-43.

Filho, R. L., Romeiro, R. S., & Alves, E. (2010). Bacterial spot and early blight biocontrol by epiphytic bacteria in tomato plants. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 45, 1381-1387.

Forchetti, G., Masciarelli, O., Alemano, S., Alvarez, D., & Abdala, G. (2010). Endophytic bacteria in sunflower (Helianthus annuus L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. Applied Microbiology and Biotechnology, 76, 1145-1152. http://doi.org/10.1007/s00253-007-1077-7.

Fürnkranz, M., Wanek, W., Richter, A., Abell, G., Rasche, F., & Sessitsch, A. (2008). Nitrogen fixation by phyllosphere bacteria associated with higher plants and their colonizing epiphytes of a tropical lowland rainforest of Costa Rica. ISME Journal, 2, 561-570. https://doi.org/10.1038/ismej.2008.14

Gaur, A. C. (1990). Physiological functions of phosphate solubilizing microorganisms. Phosphate Solubilizing Microorganisms as Biofertilizers. Omega Science Publish, Pp 172. https:// doi.org/10.3390/life13030782.

Glick BR. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. Hindawi Publishing Corporation, Scientifica. 475 pp. https://doi.org/10.6064/2012/963401

Gnanamanickam, S. S., Immanuel, J. E. (2007). Epiphytic bacteria, their ecology and functions. In: Gnanamanickam, S.S. (eds) Plant-Associated Bacteria. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_4

Gordon, S. A., & Weber, R. P. (1951). Colorimetric estimation of indole acetic acid. Plant Physiology, 26, 192. http://doi.org/ 10.1104/pp.26.1.192

Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. Annals of Microbiology, 60, 579-598. http://doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1.

Henis, Y., & Bashan, Y. (1986). Epiphytic survival of bacterial leaf pathogens. In: Fokkema, N. J. van den Heuvel, J. (Eds.). Microbiology of the phyllosphere, Cambridge University Press, New York, pp. 252-268. http:// doi.org/10.1016/j.micres.2015.01.014 .

Jabbar, M. A., Marghazani, I. B., & Saima, L. (2009). Effect of replacing cotton seed cake with sunflower meal on milk yield and milk composition in lactating Nile Ravi buffaloes. Journal of Animal and Plant Sciences, 19, 6-9. www.thejaps.org.pk/docs/19-no-1-2009/08-855.

Kurabachew, H., & Wydra, K. (2013). Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioprotectant against tomato bacterial wilt caused by Ralstonia solanacearum. Biological Control, 67, 75-83.

Malik, M. A., Shah, S. H., Mahmood, S., & Cheema, M. A. (2001). Effect of various planting geometries on the growth, seed yield and oil content of new sunflower hybrid (SF-187). International Journal of Agricultural Biology, 3, 55-56. http://doi.org/ 1560-8530/2001/03-1-55-56.

Nongkhlaw, F. M. W., & Joshi, S. R. (2014). Distribution pattern analysis of epiphytic bacteria on ethnomedicinal plant surfaces: A micrographical and molecular approach. Journal of Microscopy Ultrastructure, 2, 34-40. https://doi.org/10.1016/j.jmau.2014.02.003

Ran, L. X., Liu, C. Y., Wu, G. J., Van Loon, L. C., & Bakker, P. A. H. (2005). Supperission of bacterial wilt in Eucalyptus urophylla by fluorescent Pseudomonas spp. in China. Biological Control, 32, 111-120. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2004.08.007

Ross, I., Alami, Y., Harvey, P. R., Achouak, W., & Ryder, M. H. (2000). Genetic diversity and biological control activity of novel species of closely related Pseudomonads isolated from wheat field soils in South Australia. Applied and Environmental Microbiology, 66, 1609-1616. http://doi.org/ 10.1128/AEM.66.4.1609-1616.2000

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution, 4, 406-425. http://doi.org/ 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454 .

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Glick, B. R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiology Research, 183, 92-99. http://doi.org/ 10.1016/j.micres.2015.11.008

Schaad, N. W., Jones, B. J., Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd ed. APS Press, St. Paul, MN, U.S.A. 379 pp.

Shaharoona, B., Arshad, M., Zahir, Z. A., Khalid, A. (2006). Performance of Pseudomonas spp. containing ACC deaminase for improving growth and yield of maize (Zea mays L.) in the presence of nitrogenous

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.7]

fertilizer. Soil Biology and Biochemistry 38: 2971-2975.

Shoebitz M, Ribaudo CM, Pardo MA, Cantore ML, Ciampi L, Curá JA. 2009. Plant growth promoting properties of a strain of Enterobacter ludwigii isolated from Lolium perenne rhizosphere. Soil Biology and Biochemistery, 41, 1768-1774. http:// doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.12.031.

Spaepen, S., Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 3, 1-13. http:// doi.org/ 10.1101/cshperspect.a001438 .

Wang, Z., Zhang, H., Liu, L., Shaojian, L., Xie, J., & Jiang Y. (2022). Screening of phosphate-solubilizing bacteria and their abilities of phosphorus solubilization and wheat growth promotion. BMC Microbiology, 22, 296-311. https://doi.org/10.1186/s12866-022-02715-7

Xu, Z., Zhang, R., Wang, D., Qiu, M., Feng, H., & Zhang, N. (2014). Enhanced control of cucumber wilt disease by Bacillus amyloliquefaciens SQR9 by altering the regulation of its DegU phosphorylation. Applied and Environmental Microbiology, 80, 2941-2950. http://doi.org/ 10.1128/AEM.03943-13.

Yang, L., Choufei, W., Zhong, X., Gao, B., Liqin, Z. (2017). Engineering the bacterial endophyte Burkholderia pyrrocinia JK-SH007 for the control of lepidoptera larvae by introducing the cry218 genes of Bacillus thuringiensis. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 31, 1167-1172. http://doi.org/ 10.1080/13102818.2017.1379361.

Zinnel DK, Lambrecht P, Harris NB, Feng Z, Kuczmarski D, Higley P, Ishimaru CA, Arunakumari A, Barletta RG, Vidaver AK. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. Applied and Environmental Microbiology 68: 2198-2208. https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2198-2208.2002

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-04-03]

[DOI: 10.61186/gebsj.13.1.7]