مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت انگور در استان آذربایجان غربی

سیده الهام وقاری سوران[۱]، اعظم شکاری اسفهلان[۲]، فاطمه اشرفی[۳]، شهرام نعیمی[۴]، ابوالقاسم قاسمی[۵]

۱ و ۳– به ترتیب دانشجوی دکتری، استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲، ۴ و ۵– به ترتیب استادیار، دانشیار، استادیارموسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

مسئول مکاتبات: اعظم شکاری اسفهلان، ایمیل: azshek5713@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۱۴ ۹(۱) ۱۳۱–۱۴۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۸

چکیده

انگور یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی در ایران بوده و استان آذربایجان غربی به‌خاطر شرایط مناسب آب و هوایی به‌عنوان قطب تولید آن محسوب می‌شود. از آنجا که این محصول تنوع وسیعی از باکتری‌ها و قارچ‌های اندوفیت را دارا بوده و در سال‌های اخیر حضور اندوفیت‌ها و عملکرد مفید آنها در آن مورد توجه قرار گرفته است، هدف از این پژوهش شناسایی باکتری های اندوفیت انگور در استان آذربایجان‌غربی بود. در این مطالعه، ۶۷ جدایه باکتری اندوفیت از بخش‌های ساقه و ریشه گیاه انگور در سال ۱۳۹۸جداسازی شد. سپس خصوصیات بیوشیمیایی از جمله واکنش فوق حساسیت، بررسی خاصیت فلورسنت و آزمون لهانیدن سیب زمینی و توانایی تولید آنزیم‌های پروتئاز، آمیلاز و ژلاتیناز بر روی باکتری‌ها انجام شد. یازده جدایه باکتری برای شناسایی مولکولی براساس تعیین ترادف ناحیه 16S rDNA انتخاب شدند و مشخص شد جنس‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* فراوانی بیشتری بین جدایه‌های شناسایی شده دارند. دو گونه *Bosea lathyri* و *Frigoribacterium faeni* و جنس *Stenotrophomonas* برای اولین بار در ایران به‌عنوان باکتری‌های اندوفیت انگور گزارش می‌شوند. همچنین اثر ضدقارچی باکتری‌های اندوفیت بر روی سه گونه قارچی شامل *Cytospora chrysosperma*، *Fusarium* sp. و *Chaetomium globosum* با روش کشت متقابل انجام شد و سه جدایه GI6، GI43 وGI45 به ترتیب شامل *Priestia* sp.، *Pseudomonas kilonensis* و *Bacillus* sp. بیشترین خاصیت بازدارندگی رشد را در مقابل این قارچ‌ها نشان دادند. با توجه به اهمیت باکتری‌های اندوفیت، جداسازی و شناسایی آنها از مناطق مختلف کشور ضروری به‌نظر می‌رسد که در نتیجه آن می‌توان از این باکتری‌ها در کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهان بهره برده و آن را جایگزین مناسبی برای کنترل شیمیایی نمود.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، باکتری، انگور، خصوصیات بیوشیمیایی، اثر ضدقارچی، کنترل بیولوژیک

مقدمه

انگور یکی از قدیمی‌ترین گیاهان از خانواده Vitaceae و جنس *Vitis* می‌باشد و یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی بوده و میوه آن سرشار از ویتامین‌ها و مواد معدنی است. ایران به عنوان یکی از ده کشور مطرح جهان در زمینه تولید این محصول بوده و چندین استان برای کشت انگور فعالیت دارند (FAO, 2018). در این میان، آذربایجان‌غربی به دلیل وضعیت مطلوب آب و هوایی و خاک مناسب، و به دلیل داشتن موقعیت جغرافیایی فوق العاده و آب و هوای مناسب برای کشاورزی یکی از استان‌های برتر در تولید انگور بوده و با ۲۱۹۴۵ هکتار سطح زیر کشت و تولید ۱۹۷۹۹۵ تن محصول، به‌عنوان یکی از قطب‌های تولید انگور مطرح می‌باشد. در مطالعات اکولوژی رابطه بین میکروارگانیسم‌ها و گیاهان اثبات شده است، به‌طوریکه این ریزموجودات در چرخه زندگی گیاه نقش مهمی داشته و بدون آن‌ها میزبان گیاهی نمی‌تواند زنده بماند (Turner *et*

(2013 ,.*al*. میکروارگانیسم‌هایی که حداقل بخشی از زندگی خود را در داخل گیاه به‌سر می برند بدون اینکه هیچ گونه علائم بیماری در آن ایجاد نمایند به‌عنوان اندوفیت نامیده می‌شوند. در ابتدا این اصطلاح برای قارچ‌هایی به کار می‌رفت که در درون بافت گیاه مستقر بودند اما بعدها در مورد باکتری و هر میکروارگانیسمی که در نواحی داخلی بافت‌های گیاهی وجود داشت، معمول شد. ازآنجایی‌که باکتری‌های اندوفیت علائم آشکاری بروز نمی‌دهند تخمین صحیح جمعیت آن‌ها مشکل است (Schulz & Boyle, 2006). باکتری‌های اندوفیت در بین گیاهان تنوع قابل ملاحظه‌ای را نشان می‌دهند به طوری که باکتری‌های فراوان از جنس‌ها و گونه‌های مختلف، به عنوان اندوفیت معرفی گردیده‌اند (Bashan & Holguin, 1998). این باکتری‌ها ممکن است دارای تعداد زیادی میزبان گیاهی بوده و یا دامنه میزبانی آن‌ها محدود به خانواده گیاهی مشخصی باشد (Kobayashi & Palumbo, 2000). افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماریزای گیاهی و عوامل استرس‌زای محیطی مانند خشکی، شوری ، اسیدیته خاک و دمای بالا و همچنین تحرک رشد گیاه (Khan *et al*., 2012; Santoyo *et al*., 2016) به عنوان ویژگی‌های مثبت این میکروارگانیسم‌ها ثبت شده است. اندوفیت‌های انگور نیز شامل ریزموجودات همزیستی می‌باشند که نقش آنها به عنوان محرک افزایش رشد گیاه و تولیدکننده متابولیت‌های فعال زیستی به اثبات رسیده است. از مهم‌ترین خانواده‌های باکتری‌های اندوفیت که حضور آنها در انگور به اثبات رسیده می‌توان *Enterobacteriaceae*، *Comamonadaceae*، *Moraxellaceae*، *Neisseraceae Pseudomonadaceae* *Sphingomonadaceae*و *Streptococcaceae* را نام برد (Pinto & Gomes, 2016; Zarraonaindia & Gilbert, 2015). با توجه به اینکه اندوفیت‌ها دارای اثرات ضدقارچی و ضدباکتریایی علیه عوامل بیماریزای گیاهی می‌باشند (Ebrahimi *et al*., 2010) ، در این مطالعه برای بررسی خاصیت ضدقارچی اندوفیت‌های جدا شده، عملکرد آن‌ها روی سه گونه قارچی جداسازی شده از درختان انگور *Cytospora chrysosperma*، *Fusarium* sp. و *Chaetomium globosum* سنجیده شد. گونه‌های *Cytospora* از قارچ‌های بیماری‌زا در گیاهان می‌باشند که باعث مرگ و شانکر چوب در درختان می شوند. فتوحی فر و همکاران (۲۰۱۰) دو گونه *Cytospora cincta* و *Cytospora leucostoma* را از انگورهای آلوده در ایران جدا کردند. ارزنلو و نرمانی (۲۰۱۵) در یک تحقیق در شمال ایران، جدایه‌های *Cytospora* جدا شده از درختان انگور با علائم زوال را طی آزمایشی در شرایط گلخانه در داخل گیاه مورد بررسی قرار داده و نتیجه به‌صورت بیماریزایی با علایم زوال انگور قابل مشاهده بود که گونه آن در شناسایی مولکولی و مورفولوژیک با *Cytospora chrysosperma* مطابقت داشت. در یک مطالعه، قارچ *Fusarium* sp. از انگورهای دارای علایم بیماری جدا شد و مشخص شد که این قارچ می‌تواند با قدرت بیماریزایی نسبی منجر به بروز بیماری شود (Akg¨ul *et al*., 2019). از طرفی *Fusarium proliferatum* و *Fusarium lateritium* می‌توانند به عنوان عوامل بیوکنترل علیه بیماری زوال انگور مطرح شوند (Compant & Mathieu, 2017; Mondello *et al*., 2019). جنس *Chaetomium* عمدتا از گیاهان در برابر عوامل بیماریزا محافظت کرده و به طور فعال در کنترل بیولوژیکی نقش دارد. همچنین نشان داده شده است جدایه‌های *Chaetomium* می‌توانند رشد *Neofusicoccum parvum* و *Diplodia seriata* را که از انگورهای دارای علایم زوال انگور جدا شده اند، کاهش دهند (Silva–Valderrama *et al*., 2021). هدف از غربالگری باکتری‌ها علیه قارچ *Chaetomium*، بررسی اثر بازدارندگی باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده علیه این قارچ عامل بیوکنترل بود.

شایان ذکر است علیرغم قدمت طولانی کشت انگور در ایران و گزارشاتی مبنی بر وجود عوامل بیماریزا در این محصول، پژوهش‌های محدودی برای شناسایی باکتری‌های اندوفیت انگور در استان‌های مختلف ایران صورت گرفته است. بر این اساس، هدف از این مطالعه، جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت انگور از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی و همچنین بررسی خصوصیات بیوشیمیایی

و ضدقارچی در آن‌ها بود. شناخت ویژگی‌ها و متابولیت‌های تولیدی این باکتری‌ها، می‌تواند در زمینه مبارزه با بیمارگرهای گیاهی کمک کرده و منجر به افزایش بهره‌وری محصول انگور شود.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

در آبان ماه ۱۳۹۸، از بخش‌های ساقه و ریشه درختان انگور در تاکستان‌های واقع در مناطق مختلف استان آذربایجان غربی به منظور جداسازی باکتری‌های اندوفیت، نمونه برداری انجام شد و نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی تمیز و مجزا قرار داده شده و در داخل جعبه حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی باکتری‌های اندوفیت

نمونه‌های ساقه و ریشه جداشده به منظور حذف ذرات خارجی زیر جریان آب شستشو داده شد؛ سپس به قطعات کوچکتر تقسیم شده و مراحل ضدعفونی روی آن‌ها انجام شد؛ به این ترتیب که نمونه‌ها در اتانول ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت دو دقیقه و اتانول ۷۰ درصد به مدت دو دقیقه غوطه ور شده و در نهایت سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند (Costa *et al.*, 2012). در ادامه، نمونه‌ها با تیغ به قطعاتی به اندازه پنج میلی‌متر خرد و سپس در ظرف پتری حاوی آب مقطر غوطه‌ور شدند، بعد از ۲۰ دقیقه از آب اطراف بافت مقداری با لوپ برداشته شده و به صورت چمنی روی محیط کشت نوترینت آگار Nutrient agar (NA) کشت شدند. پلیت‌های حاوی نمونه‌ها در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت سه تا پنج روز نگه‌داری شدند. به منظور خالص سازی جدایه‌ها، پرگنه‌هایی با شکل، رنگ و اندازه متفاوت انتخاب شده و روی محیط کشت نوترینت آگار به صورت خطی کشت گردید. برای نگه‌داری طولانی مدت باکتری‌ها، پس از رشد جدایه در محیط کشت نوترینت براث، محلول نگه‌داری شامل ۶۵ درصد گلیسرول، ۱۰ درصد Tris–HCl pH=8 1M و ۲/۵ درصد $MgSO_4$ 1M به نمونه اضافه و نمونه‌ها به فریزر ۲۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

واکنش فوق حساسیت (Hypersensitive Response Test)

برای انجام تست فوق حساسیت، سوسپانسیونی از باکتری جدا شده با رقت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه و ۱۰۰ میکرولیتر از آن توسط سرنگ به برگ‌های گیاهچه توتون تزریق شده و نتایج مربوطه پس از ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت. این تست جهت بررسی عدم بیماریزایی جدایه‌های باکتریایی جدا شده بکار رفت.

بررسی خاصیت فلورسنت (Fluorescent on KB)

به منظور بررسی خاصیت فلورسنت، پس از کشت باکتری بر روی محیط کشت King B، پلیت‌ها به‌مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس از نظر پرتوافشانی زیر نور ماورای بنفش (UV) بررسی شدند.

آزمون لهانیدن سیب زمینی (Potato soft rot test)

برای انجام این تست یک عدد سیب زمینی پس از شستشو به قطعات مکعبی کوچک تقسیم شد و برش‌ها با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی و در یک پتری دیش حاوی آب مقطر استریل قرار گرفتند، در ادامه با استفاده از سوزن استریل از کشت تازه باکتری بر روی برش‌های سیب زمینی به‌صورت ضربه‌ای کشت داده شده و پتری‌ها به‌مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگه داری شدند. در بررسی نتایج برش‌هایی با لهیدگی گسترش یافته مثبت و با لهیدگی جزئی یا عدم تغییر، منفی ارزیابی شدند.

بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌ها

جهت بررسی ویژگی‌های بیوشیمیایی باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده، علاوه بر رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، سیترات، کازئین، لوان، اسکولین و هیدرولیز آرژنین بر اساس روش‌های معمول در باکتری‌شناسی گیاهی انجام شد (Schaad *et al.*, 2001).

بررسی توانایی تولید آنزیم‌های مختلف توسط جدایه‌ها

تولید آنزیم پروتئاز

جهت بررسی توانایی تولید آنزیم پروتئاز، از محیط کشت شیرخشک بدون چربی آگار (Skim milk agar (SMA), Merck) استفاده شد. پس از کشت جدایه‌های باکتری روی محیط کشت SMA، ظروف پتری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت نگه‌داری شدند. در بررسی، تشکیل هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری وجود آنزیم پروتئازی را تایید کرد (Castro *et al*., 2014).

تولید آنزیم آمیلاز

برای بررسی فعالیت آمیلازی، از محیط کشت نشاسته آگار(Starch agar (SA), Merck) استفاده شد. بعد از کشت جدایه‌های باکتری روی محیط کشت SA، ظروف پتری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت نگه‌داری شدند. پس از رشد باکتری‌ها، ایجاد هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری‌ها بعد از اضافه کردن محلول یک درصد ید، حاکی از وجود آنزیم آمیلاز بود (Hankin & Anagnostakis, 1975).

تولید آنزیم ژلاتیناز

از محیط کشت ژلاتین آگار (Gelatin agar (GA برای بررسی وجود آنزیم ژلاتیناز، استفاده شد. پس از کشت جدایه‌های باکتری در محیط کشت GA و ۴۸ ساعت نگه‌داری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، مایع شدن ژلاتین موجود در محیط کشت نشانه حضور آنزیم ژلاتیناز بود (Balan *et al*., 2012).

تولید آنزیم لسیتیناز

جهت بررسی تولید آنزیم لسیتیناز، از محیط کشت حاوی زرده تخم مرغ آگار (Egg Yollk Agar (EYA), Merck) استفاده شد. برای انجام تست، با آنس استریل از باکتری موردنظر برداشته و به‌صورت یک خط مستقیم بر روی محیط، کشت داده شد. پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت نگه داری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، ظهور هاله مات در اطراف خط کشت، نشان دهنده مثبت بودن آزمایش بود (Tille, P. & Forbes, B. 2014)

شناسایی مولکولی باکتری‌های اندوفیت

ابتدا جداسازی DNA کروموزومی باکتری با روش CTAB تغییر یافته، انجام شد. به‌این ترتیب که باکتری در محیط کشت نوترینت براث (NB) کشت داده شد و پس از رشد، نمونه‌ها با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به‌مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس رسوب به دست آمده در ۷۵۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی مولار Tris HCl با pH=8 و ۱ میلی مولار EDTA) حل گردید. نمونه‌ها بعد از اضافه کردن ۲۰ میکرولیتر لیزوزیم ۱۰۰mg/ml، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. در ادامه با اضافه کردن ۴۰ میکرولیتر SDS 10%، نمونه‌ها به مدت یک تا سه ساعت در دمای ۵۶ درجه سلسیوس قرار گرفتند تا شکستن سلول‌ها صورت گیرد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر NaCl ۵ مولار به نمونه‌ها اضافه و به خوبی حل شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول CTAB/NaCl (۴/۱ گرم NaCl و ۱۰ گرم CTAB در ۸۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به مدت ۳ ساعت در دمای ۶۵ درجه سلسیوس حل شده و سپس حجم محلول به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد) به نمونه‌ها اضافه شده و به مدت ده دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس نگه داری شد. در ادامه ترکیب کلروفرم–ایزوآمیل الکل با نسبت ۱:۲۴ به نمونه‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰rpm و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. بعد از این مرحله هر نمونه شامل سه فاز می‌باشد که فاز بالایی شامل مایع رویی نمونه‌ها برداشته شده و به حجم یک برابر اتانول ۱۰۰٪ به آن‌ها اضافه گردید. نمونه‌ها بعد از ورتکس به مدت حداقل یک ساعت در ۲۰– درجه سلسیوس قرار گرفتند. بعدا نمونه‌ها مجددا به مدت دو دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰rpm و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل که حاوی DNA کل باکتری بود در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل حل شده و سپس به منظور بررسی کیفیت و تخمین کمیت با استفاده از نمونه‌ای با غلظت استاندارد، از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی شد. نمونه‌ها در دمای ۲۰– درجه سلسیوس برای

استفاده بعدی نگه‌داری شدند (William & Helene Feil, 2004).

برای انجام PCR از ۳۰ میکرولیتر مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۱۵ میکرولیتر Master mix، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر ژن 16S rRNA شامل fD2 (5'– AGAGTTTGATCATGGCTCAG–3') و rP1 (5'– ACGGTTACCTTGTTACGACTT–3')، و یا آغازگرهای ژن rpoB شامل LAPS(5'– TGGCCGAGAACCAGTTCCGCGT–3') و LAPS27 (5'–CGGCTTCGTCCAGCTTGTTCAG–3')، ۲ میکرولیتر DNA استخراج شده و ۱۳ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (BIO–RAD thermal cycler) با واسرشت سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت سه دقیقه شروع و در ادامه به‌صورت ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۵ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و تکثیر در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و تکثیر نهایی در ۷۳ درجه سلسیوس به مدت هشت دقیقه انجام شد. محصول واکنش PCR از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ ارزیابی شد. تعیین توالی نواحی تکثیر شده توسط Sequencer kit شرکت Microsynth کشور سوئیس (بواسطه شرکت توپازژن) انجام شد و توالی‌های دریافتی با نرم افزار Bio Edit نسخه 7.0.5.3 ویرایش و با توالی‌های موجود در بانک ژن با استفاده از ابزار جستجوی BLAST مقایسه گردید. آنالیز فیلوژنتیکی داده‌های توالی با استفاده از نرم افزار MEGA6 به روش Neighbor Joining انجام شد.

بررسی اثر ضدقارچی باکتری‌های اندوفیت جدا شده در شرایط آزمایشگاه

در این مطالعه، از قارچ‌های *Chaetomium globosum* OK310892, *Cytospora chrysosperma* OK310893 و *Fusarium* sp. استفاده شد که از کلکسیون قارچ آزمایشگاه پروتئومیکس موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه شدند. برای بررسی خاصیت ضدقارچی جدایه‌های اندوفیتی از روش کشت متقابل بر روی مخلوط محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (Potato dextrose agar) و نوترینت آگار استفاده شد (نصف مقدار دستورالعمل استاندارد هر کدام از محیط‌های کشت مذکور در تهیه محیط کشت، به کار رفت). بدین ترتیب که یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت پنج روزه قارچ موردنظر در مرکز پتری تهیه شده (PDA+NA) قرار گرفته و سپس با لوپ استریل از سوسپانسون باکتری‌های جدا شده با غلظت 10^8 cfu/ml در چهار نقطه از اطراف دیسک قارچ قرار داده شد. به عنوان شاهد از دیسک قارچ به تنهایی در محیط کشت جداگانه استفاده شد. ظروف پتری در انکوباتور با دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس نگه‌داری و پس از گذشت ۷۲ ساعت، از نظر ایجاد هاله عدم رشد مورد بررسی قرار گرفتند (Moreira *et al*., 2014).

نتایج

جداسازی باکتری‌های اندوفیت

در این مطالعه تعداد ۶۷ جدایه اندوفیت باکتریایی از دوازده منطقه واقع در استان آذربایجان غربی شامل دیزج، اشنویه، پیرانشهر، زینالو، علیان، بزیله، بیلوکه، ده گرجی، گچی،خوی، قطورلار، سردشت و امامزاده جدا شدند. در شکل زیر مناطق جداسازی نمونه‌ها بر روی نقشه استان نشان داده شده است (شکل ۱)

شکل ۱– نقشه موقعیت جغرافیایی نمونه‌های جدا شده از استان آذربایجان غربی

Fig.1. Geographical location map of samples from West Azerbaijan province

ارزیابی خصوصیات بیوشیمیایی و توانایی تولید آنزیم در جدایه‌ها

در آزمون فوق حساسیت، جدایه‌های باکتریایی مورد آزمایش بر روی گیاهچه‌های توتون، پس از ۷۲ ساعت هیچ علایم نکروزی را نشان ندادند که دلیل بر عدم بیماریزایی آنها بود. در بررسی نتایج تست بررسی خاصیت فلورسنت ، از میان باکتری‌های گرم منفی که توانایی رشد بر روی محیط KB را داشتند، در زیر لامپ UV پنج جدایه خاصیت پرتوافشانی فلورسنت را دارا بودند.

نتایج آزمون لهانیدن سیب زمینی نشان داد که هیچ یک از باکتری‌های موردنظر در برش‌های سیب زمینی تغییری ایجاد نکرده و علایم لهیدگی سیب زمینی مشاهده نشد. در بررسی توانایی تولید آنزیم‌های مختلف توسط جدایه‌ها، بیشترین تعداد باکتری‌های جدا شده توانایی تولید آنزیم ژلاتیناز را دارا بودند ولی در تولید آنزیم لسیتیناز کمترین تعداد را داشتند. نتایج خصوصیات بیوشیمیایی و آنزیمی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱– خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی اندوفیت

Table1. Biochemical characteristics of the endophytic bacterial isolates

Biochemical tests	Positive (Number of isolates)	Negative (Number of isolates)	Not tested
General Test			
Gram reaction	38	29	0
Catalase	55	12	0
Oxidase	50	17	0
Casein	31	36	0
Citrate	15	52	0
Esculin	44	23	0
Arginine dihydrolase	7	22	38
Levan	3	26	38
Potato rot	0	29	38
Fluorescent on KB	5	24	38
HR	0	29	38
Gelatinase	43	24	0
Protease	17	50	0
Amylase	32	35	0
Lecitinase	3	64	0

شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتریایی اندوفیت

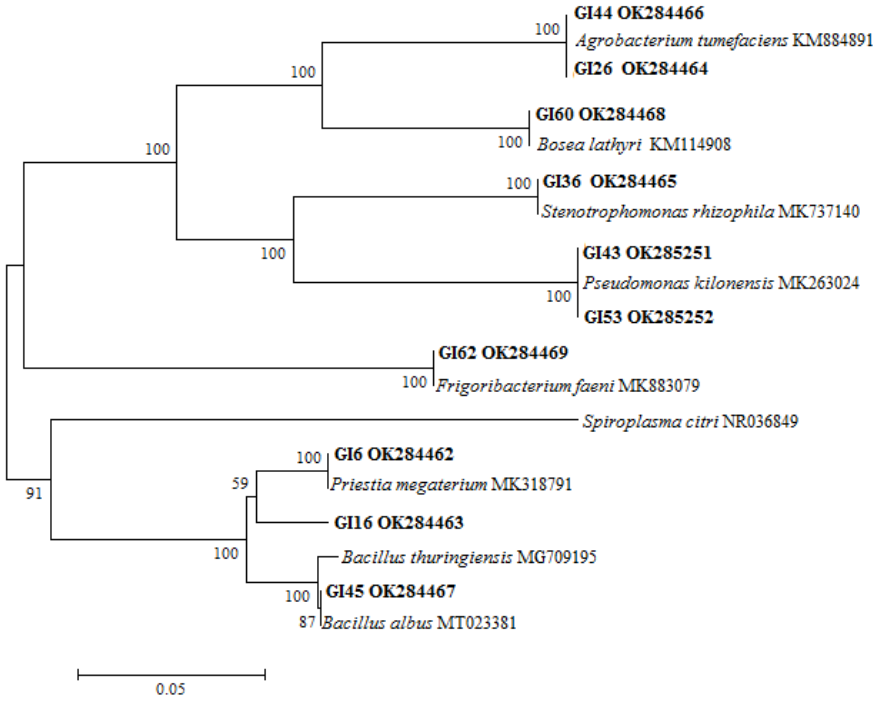
با بررسی خصوصیات بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی، یازده جدایه جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند. پس از دریافت داده‌های توالی‌یابی از شرکت موردنظر و انجام BLAST در سایت NCBI شباهت‌یابی توالی‌های جدایه‌های باکتریایی با توالی‌های استاندارد موجود در بانک ژن انجام گردید. نتایج نشان داد که ۶۷٪ از جدایه‌های شناسایی شده مربوط به شاخه *Proteobacteria* شامل جنس‌های *Agrobacterium* (*Alphaproteobacteria*) و *Bosea*، *Pseudomonas* (*Gammaproteobacteria*) و *Stenotrophomonas* (*Betaproteobacteria*) می باشد. از نظر فراوانی در سطح جنس، باسیلوس و سودوموناس، هر کدام با سه گونه شناسایی شده، بیشترین تعداد را داشتند. جدول ۲ جدایه‌های شناسایی شده باکتری‌های اندوفیت را به همراه منطقه جداسازی و رقم انگور نشان می‌دهد. همچنین جدایه‌های با درصد تشابه بالای ۹۸٪ با جدایه‌های شناسایی شده در جدول ۲ نشان داده شده است. باکتری‌ها به اختصار GI (Grapevine Isolate) نامگذاری شده و با شماره‌های ۱ تا ۶۷ نشان داده شدند. در شکل ۲ و ۳ درخت فیلوژنتیکی جدایه‌های شناسایی شده در این تحقیق، با علامت اختصاری

و کد دسترسی مربوطه آنها در NCBI نشان داده شده است. به منظور ایجاد امکان مقایسه، از نتایج بلاست هر یک از گونه‌ها در NCBI، یک جدایه باکتری انتخاب شده و در ترسیم درخت فیلوژنتیکی استفاده شد. همچنین یک جدایه با نسبت خویشاوندی نسبتا دور از باکتریهای این تحقیق، به عنوان out–group استفاده شد (شکل ۲ و ۳). با توجه به متفاوت بودن آغازگرهای توالی سنجی، دو درخت فیلوژنی جداگانه بترتیب برای ۱۰ عدد ازجدایه‌ها (شکل۲) و جدایه GI57 (شکل۳) ترسیم شد.

جدول ۲– تعیین تاکسونومی جدایه‌های باکتریایی اندوفیت

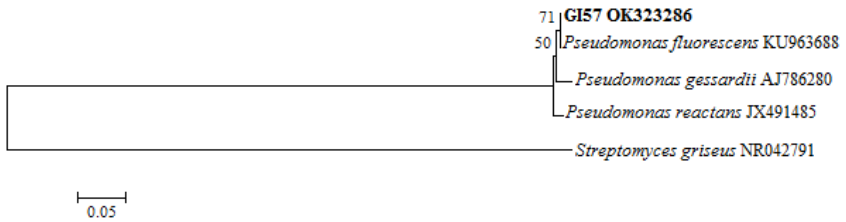
Table 2. Taxonomical assignment of the endophytic bacterial strains

Isolates	Geographic origin	Variety	Accession No.	Closest phylogenetic relative	Identity (%)
GI6	Dizaj–West Azerbaijan	Seedless Keshmeshi	OK284462	(MK318791) *Priestia* sp.	100%
GI16	Dizaj–West Azerbaijan	Red Keshmeshi	OK284463	(MG709195) *Bacillus* sp.	97%
GI26	Bilukeh–West Azerbaijan	Black grape	OK284464	*Agrobacterium tumefaciens* (KP744141)	100%
GI36	Khoy–West Azerbaijan	Asgari	OK284465	*Stenotrophomonas* sp. (MK737140)	99%
GI43	Oshnavieh–West Azerbaijan	Seedless Keshmeshi	OK285251	*Pseudomonas kilonensis* (MK263024)	100%
GI44	Oshnavieh–West Azerbaijan	Seedless Keshmeshi	OK284466	*Agrobacterium tumefaciens* (KM884891)	99.93%
GI45	Oshnavieh–West Azerbaijan	Seedless Keshmeshi	OK284467	*Bacillus* sp. (JX010983)	98%
GI53	Zeynalu–West Azerbaijan	Asgari	OK285252	*Pseudomonas* sp. (KU726259)	99%
GI57	Bezileh–West Azerbaijan	Black grape	OK323286	*Pseudomonas fluorescens* (KU963688)	100%
GI60	Oshnavieh–West Azerbaijan	Asgari	OK284468	*Bosea lathyri* (KM114908)	100%
GI62	Emamzadeh–West Azerbaijan	Seedless Keshmeshi	OK284469	*Frigoribacterium faeni* (MK883079)	100%



شکل۲ – ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های باکتری اندوفیت انگور براساس توالی بخشی از ژن 16S rRNA. مقادیر بوت استرپ برپایه ۱۰۰۰ تکرار مربوط به آنالیز Neighbor–joining روی شاخه‌ها نشان داده شده است. جدایه‌های دارای کد GI مربوط به این تحقیق بوده، جدایه *Spiroplasma citri* NR036849 به عنوان out–group و بقیه جدایه‌ها به منظور مقایسه از NCBI انتخاب شده‌اند. خط نشانه منعکس کننده تعداد ۰/۰۵ تغییرات نوکلئوتیدی در هر جایگاه است.

Fig.2. Phylogenetic relationship of grapevine endophytic bacterial isolates based on the sequence of the 16S rRNA gene. Bootstrap values related to Neighbor–joining analysis are given at branch nodes and are based on 1000 replicates. The isolates which have the GI code belong to this study, *Spiroplasma citri* NR036849 is an out–group isolate and others have chosen from NCBI for comparison. The scale bar reflects the number of 0.05 nucleotide changes at each site.



شکل۳– ارتباط فیلوژنتیکی جدایه GI57 OK323286 بر اساس توالی بخشی از ژن rpoB . مقادیر بوت استرپ برپایه ۱۰۰۰ تکرار مربوط به آنالیز Neighbor–joining روی شاخه‌ها نشان داده شده است. جدایه دارای کد GI مربوط به این تحقیق بوده، جدایه *Streptomyces griseus* NR042791 به عنوان out–group و بقیه جدایه‌ها از NCBI به منظور مقایسه انتخاب شده‌اند. خط نشانه منعکس کننده تعداد ۰/۰۵ تغییرات نوکلئوتیدی در هر جایگاه است.

Fig.3. Phylogenetic relationship of GI57 OK323286 isolate based on the sequence of the rpoB gene. Bootstrap values related to Neighbor–joining analysis are given at branch nodes and are based on 1000 replicates. The isolate which have the GI code belong to this study, *Streptomyces griseus* NR042791 is an out–group isolate and others have chosen from NCBI for comparison. The scale bar reflects the number of 0.05 nucleotide changes at each site.

ارزیابی فعالیت ضدقارچی باکتری‌های اندوفیت

آزمون بررسی اثر ضدقارچی جدایه‌های باکتریایی جدا شده (۶۷ نمونه) انجام شد. نتایج حاصل از روش کشت متقابل نشان داد ۲۵٪ از کل باکتری‌ها در مقابل قارچ *Cytospora chrysosperma* OK310892 و ۲۷٪ در برابر قارچ *Fusarium* sp. و ۳۵٪ در مقابل قارچ *Chaetomium globosum* OK310893 خاصیت آنتاگونیستی دارند. جدول ۳ باکتریهایی را که نسبت به حداقل یکی از قارچ‌ها، بیشترین فعالیت ضدقارچی داشته اند، نشان می‌دهد.

جدول۳– فعالیت ضدقارچی جدایه های باکتریایی اندوفیت برعلیه قارچ‌ها در شرایط آزمایشگاه

Table 3. In vitro antifungal activities of endophytic bacterial isolates against three fungi.

Isolates	*Cytospora chrysosperma*	*Fusarium* sp.	*Chaetomium globosum*
GI6 (*Priestia* sp. OK284462)	+++	+++	++
GI12	++	+	–
GI16 (*Bacillus* sp. OK284463)	+++	+++	–
GI25	++	–	++
GI36 (*Stenotrophomonas* sp. OK284465)	+++	++	++
GI38	++	++	–
GI43 (*Pseudomonas kilonensis* OK285251)	+++	+++	++
GI45 (*Bacillus* sp. OK284467)	+++	+++	+++
GI53 (*Pseudomonas* sp. OK285252)	++	++	+
GI54	++	–	+
GI57 (*Pseudomonas fluorescens* OK323286)	+++	++	++
GI60 *(Bosea lathyri* OK284468)	++	++	–
GI62 (*Frigoribacterium faeni* OK284469)	++	++	–
GI64	++	++	–

(–منفی، + ۴/۹۹>قطر>۰ ، ++ ۹/۹۹>قطر>۵، +++ قطر≥ ۱۰ میلی متر)

(– negative, + 0 < d < 4.99, ++ 5 < d < 9.99, +++ d ≥ 10 (d: diameter in milimeters))

بحث

به دلیل اهمیت باکتری‌های اندوفیت در حفاظت از گیاهان نظیر مقاومت در برابر عوامل استرس‌زای محیطی و خاصیت آنتاگونیستی در برابر بیمارگرهای گیاهی، شناسایی آن‌ها در گیاهان مختلف ضروری به نظر می‌رسد (Rolli *et al.*,2015, Liu *et al.*, 2017). در این مطالعه جدایه‌های باکتریایی اندوفیت شامل باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی بودند که از نمونه‌های ریشه و ساقه درختان انگور از مناطق مختلف آذربایجان غربی جداسازی گردیدند و جدایه‌های شناسایی شده به شاخه‌های *Proteobacteria*، *Firmicutes* و *Actinobacteria* و جنس‌های *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Agrobacterium*، *Bosea* ، *Stenotrophomonas* و ***Frigoribacterium*** تعلق داشتند. برای اولین بار در ایران، جنس‌های *Bosea*، *Stenotrophomonas* و *Frigoribacterium* به عنوان باکتری‌های اندوفیت از انگور جداسازی شدند. در پژوهشی، اصغری و همکاران (۱۳۹۸) از استان آذربایجان غربی و کردستان اندوفیت‌هایی را از بخش‌های شاخه، برگ، ریشه و میوه انگور جداسازی نمودند که باکتری‌ها متعلق به شاخه‌های Proteobacteria و Actinobacteria و شامل جنس‌های *Pseudomonas*,

Erwinia, Pantoea, Serratia, Enterobacter و Micrococcus بودند. با هدف جداسازی باکتری‌های حل کننده فسفات از ریزوسفر انگور، علاوه بر *Bacillus aryabhattai, B. megaterium, Klebsiella variicolla*، دو گونه *Stenotrophomonas rhizophila* و *Enterobacter aerogenes* را شناسایی شد (Liu et al., 2016). همچنین اندوفیت Frigoribacterium از درختچه‌های *Anabasis elatior* جداسازی گردید که در شناسایی مولکولی ۹۶/۵ ٪ مشابه گونه *Frigoribacterium faeni* بود (Wang *et al*., 2015).

در ایالت Zamora اسپانیا از ریشه گیاهان کلزا، ۳۱ جدایه اندوفیت را شناسایی نمودند که با شناسایی مولکولی جدایه PDABN26 جدا شده با ۹۹/۲۲٪ شباهت با باکتری *Bosea* ***lathyri*** مطابقت داشت. در این مطالعه نیز سه ایزوله GVI36 ، GVI60 و GVI62 در شناسایی مولکولی با درصد تشابه ٪۱۰۰، بترتیب با باکتری‌های .*Stenotrophomonas* sp، *Bosea lathyri* و *Frigoribacterium faeni* مطابقت داشتند و هر سه از ریشه گیاه انگور جداسازی شده بودند (Jiménez–Gómez *et al.*, 2020).

باکتری‌های جنس *Bacillus* و *Pseudomonas* در بین جدایه‌های شناسایی شده در این تحقیق بیشترین فراوانی را داشتند که در پژوهش‌های دیگر نیز جداسازی این جنس ها از گیاهان مختلف به‌عنوان متداول‌ترین باکتریهای اندوفیت، بارها صورت گرفته است. در ایران علیجانی و همکاران (۲۰۲۰) از بخش‌های استولون و دمبرگ گیاهچه های سالم مزارع توت فرنگی مناطق مریوان، سه جدایه از جنس ***Bacillus*** را جداسازی کردند که در شناسایی مولکولی با درصد تشابه ۹۷/۷۷ ٪، ۹۶/۶۶ ٪ و ۹۹/۷۹ ٪ بترتیب با گونه‌های *B. tequilensis*، *B. licheniformis* و *B. subtilis* مشابهت داشتند. در مطالعه دیگری، اکبری و همکاران (۱۳۹۹) از درختان مرکبات در شرق استان گیلان، اندوفیت‌هایی مختلفی را شناسایی کردند که دو باکتری *Bacillus megaterium* و *Bacillus cereus* از جمله آن‌ها بودند. در تحقیقی گزارش شد که جنس *Bacillus* بیشترین باکتری جدا شده از نمونه‌های انگور می باشد که ۵۵٪ از کل جدایه‌ها را شامل می‌شود (West *et al.*, 2010).

در یک آنالیز که بر روی اندام‌های هوایی گیاه انگور صورت گرفت، مشخص شد گونه‌های مختلف دو جنس *Pseudomonas* و *Bacillus* دارای بیشترین فراوانی نسبت به دیگر اندوفیت‌ها می‌باشند (Compant *et al.*, 2011). در این تحقیق، جدایه‌های متعلق به دو جنس *Bacillus* و *Pseudomonas* بودند. در یک مقاله تحقیقی، با بررسی تاثیر اندوفیت‌های انگور در بیوسنتز ترکیب آلی استیلبن، علاوه بر اندوفیت‌های متداول، یک باکتری .*Agrobacterium* sp نیز جداسازی شد که در شناسایی مولکولی با ۹۹/۱۷٪ تشابه متعلق به گونه *Agrobacterium* rubi بود. در این تحقیق نیز، در بین جدایه‌های شناسایی شده به روش مولکولی، دو گونه *Agrobacterium tumefaciens* با درصد تشابه ۹۹/۳۳٪ و ۱۰۰٪ با جدایه های NCBI مورد شناسایی قرار گرفتند که در بین سایر باکتریهای اندوفیت شناسایی شده در نمونه انگور، غیرمعمول بود.

در بررسی خاصیت ضدقارچی باکتریهای اندوفیت جدا شده، جدایه‌های GI6، GI16، GI36، GI643، GI45، GI57 در برابر قارچ *Cytospora chrysosperma* دارای بیشترین خاصیت آنتاگونیستی بودند که برطبق جدول شناسایی مولکولی به جز GI36 که با باکتری *Stenotrophomonas rhizophila* یا *S. maltophilia* تشابه بالا دارد، بقیه جدایه‌ها متعلق به جنس‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* می‌باشند. همچنین جدایه‌های GI6، GI16، GI43 و GI45 در مقابل قارچ .*Fusarium* sp دارای بالاترین خاصیت ضدقارچی بودند که برطبق شناسایی مولکولی با جنس‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* مشابهت دارند. در یک مطالعه، با بررسی خاصیت ضدقارچی گونه‌های مختلف باکتری باسیلوس، مشاهده شد که جدایه *B. subtilis* 30VD–1 بیشترین اثر آنتاگونیستی را بر .*Fusarium* sp دارد که احتمالا بخاطر تولید آنزیم‌ها و ترکیبات آلی موثره توسط باکتری باشد (Khan *et al.*, 2018).

در این تحقیق، تعدادی از جدایه‌ها اثر بازدارندگی در رشد قارچ *Chaetomium globosum* نشان دادند اما میزان قطر هاله‌های عدم رشد چشمگیر نبوده و تنها جدایه GI45 دارای اثر قابل توجهی بود. این جدایه در شناسایی مولکولی با باکتری *Bacillus* sp. مطابقت داشت. اکثرا قارچ *Chaetomium globosum* به دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه موثر و عملکرد مثبت آن در کنترل زیستی به عنوان اندوفیت مطرح می‌شود (Fatima *et al.*, 2016). با توجه به اهمیت محصولات کشاورزی در چرخه غذایی، مدیریت بیماری‌های گیاهی جهت حفظ کیفیت آن‌ها ضروری است و از آنجایی‌که در اغلب موارد برای کاهش این بیماری‌ها از سموم شیمیایی استفاده می‌شود بنابراین آلودگی زیست محیطی و اثرات مخرب این ترکیبات شیمیایی بر سلامتی انسان همواره مطرح است. در سال‌های اخیر، تلاش محققین بر جایگزین کردن مواد شیمیایی با عوامل بیوکنترل زیستی می‌باشد که در این بین با شناسایی اندوفیت‌های گیاهی و بررسی متابولیت‌های تولید شده توسط آن‌ها، می‌توان بیماریهای گیاهی را به روشی ایمن تر با کمترین آسیب زیستی مدیریت نمود.

References

Akg ul, D. & Ahio˘glu, M. 2019. Fungal pathogens associated with young grapevine decline in the southern Turkey vineyards. Proceedings of the 42nd world congress of vine and wine, 15–19 July, Geneva, Switzerland, 01027.

Akbari Kiarood, S., Kamran, R., Golmohammadi, M. & Nasrollahnejad, S. 2020. Molecular identification of citrus endophytic bacteria in the east of Guilan province, Iranian Journal of Plant Protection Science, 51: 27–37. (In Persian with English summary)

Aleynova, O., Suprun, A., Nityagovsky, N., Dubrovina, A. & Kiselev, K. 2021. The influence of the grapevine bacterial and fungal endophytes on biomass accumulation and stilbene production by the in vitro cultivated cells of *Vitis amurensis* Rupr. Plants, 10: 1276.

Alijani, Z., Amini, J., Ashengroph, M. & Bahramnejad, B. 2020. Isolation of strawberry endophytic bacteria and investigation of their antifungal effects on *Colletotrichum nymphaeae*, the causal agent of strawberry anthracnose, Biocontrol in Plant Protection, 8: 29–46. (In Persian with English summary).

Arzanlou, M. & Narmani, A. 2015. ITS sequence dataand morphology differentiate *Cytospora chrysosperma* associated with trunk disease of grapevine in northern Iran. Journal of Plant Protection Research, 55: 117–125.

Asghari, S., Harighi, B., Mozafari, A.A., Esmaeel, Q. & Barka, E.A. 2019. Screening of endophytic bacteria isolated from domesticated and wild growing grapevines as potential biological control agents against crown gall disease. Biocontrol, 64: 723–735.

Balan, S.S., Nethaji, R., Sankar, S. & Jayalakshmi, S. 2012. Production of gelatinase enzyme from *Bacillus* spp isolated from the sediment sample of Porto Novo Coastal sites. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2: 1811–1816.

Bashan, Y. & Holguin, G. 1998. Proposal for the division of plant growth promoting *Rhizobacteria* into two classifications: biocontrol–PGPB (plant growth–promoting bacteria) and PGPB. Soil Biology Biocheimistry, 30: 1225–1228.

Castro, R., Quecine, M., Lacava, P., Batista, B., Luvizotto, D. & Marcon, J. 2014. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. Springer Plus, 3: 382–391.

Compant, S. & Mathieu, F. 2017. Biocontrol of major grapevine diseases. Leading Research, CABI, Wallingford, UK.

Compant, S., Mitter, B., Colli–Mull, J., Gangl, H. & Sessitsch, A. 2011. Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. Microbial Ecology, 62: 188–197.

Costa, L., Queiroz, M., Borges, A., Moraes, C. & Araújo, E. 2012. Isolation and characterization of endophytic bacteria isolated from the leaves of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Brazilian Journal of Microbiology, 43: 1562–1575.

Ebrahimi, A., Asgharian, S. & Habibian, S. 2010. Antimicrobial activities of isolated endophytes from some Iranian native medicinal plants. Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences, 6: 217–222.

Fatima, N., Mukhtar, U., Ihsan–Ul–Haq, M., Jadoon, M. & Ahmed S. 2016. Biological evaluation of endophytic fungus *Chaetomium* sp. NF15 of Justicia adhatoda L.: A potential candidate for drug discovery. Jundishapur Journal of Microbiology, 9:e29978.

Fotouhifar, K., Hedjaroude G. & Leuchtmann, A. 2010. ITS rDNA phylogeny of Iranian strains of *Cytospora* and associated teleomorphs. Mycologia, 102: 1369–82.

Hankin, L. & Anagnostakis, S.L. 1975. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. Mycologia, 67: 597–607.

Jiménez–Gómez, A., Saati–Santamaría, Z., Kostovcik, M., Rivas, R., Velázquez, E., Mateos, P.F., Menéndez, E. & García–Fraile, P. 2020. Selection of the root endophyte *Pseudomonas brassicacearum* CDVBN10 as plant growth promoter for *Brassica napus* L. Crops. Agronomy, 10:1788.

Khan, A., Hamayun, M., Kang, S., Kim, Y., Jung, H. & Lee, J. 2012. Endophytic fungal association via gibberellins and indole acetic acid can improve plant growth under abiotic stress: an example of *Paecilomyces formosus* LHL10. BMC Microbiology, 12: 3.

Khan, N., Martínez–Hidalgo, P., Maymon, M., Humm, EA., Nejat, N., Sanders, E.R., Kaplan, D. & Hirsch, A.M. 2018. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. Frontiers in Microbiology, 9: 23–63.

Kobayashi, D. & Palumbo, J. 2000. Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: C. W. Bacon & J. F. White (Ed), Microbial Endophytes, 99–233.

Liu, H., Carvalhais, L., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P., Pieterse, C. & Schenk, P. 2017. Inner plant values: diversity, colonization and benefits from endophytic bacteria. Frontiers in Microbiology, 8: 25–52.

Liu, M., Liu, X., Cheng, B., Ma, X., Lyu, X., Zhao, X., Ju, Y., Min, Z. & Fang, Y. 2016. Selection and evaluation of phosphate–solubilizing bacteria from grapevine rhizospheres for use as biofertilizers. Spanish Journal of Agricultural Research, 14: e1106.

Mondello, V., Spagnolo, A., Larignon, P., Clément, C. & Fontaine, F. 2019. Phytoprotection potential of *Fusarium proliferatum* for control of *Botryosphaeria* dieback pathogens in grapevine. Phytopathologia Mediterranea, 58: 293–306.

Moreira, R., Nesi, C. & De Mio, L. 2014. *Bacillus* spp. and *pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control *Glomerella* leaf spot. Biological Control, 72: 30–37.

Pacifico, D., Squartini, A. & Crucitti, D. 2019. The role of the endophytic microbiome in the grapevine response to environmental triggers. Frontiers in Plant Science, 10:1256.

Pinto, C., & Gomes, A.C. 2016. *Vitis vinifera* microbiome: from basic research to technological development. BioControl, 61: 243–256.

Rolli, E., Marasco, R., Vigani, G., Ettoumi, B., Mapelli, F., Deangelis, M. L., Gandolfi, C., Casati, E., Previtali, F., Gerbino, R., Pierotti, C. F., Borin, S., Sorlini, C., Zocchi, G. & Daffonchio, D. 2015. Improved plant resistance to drought is promoted by the root–associated microbiome as a water stress–dependent trait. Environmental Microbiology, 17: 316–331.

Santoyo, G., Moreno–Hagelsieb, G., Orozco–Mosqueda, M. & Glick, B. 2016. Plant growth–promoting bacterial endophytes. Microbiological Research, 183: 92–99.

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. St. Paul, MN: APS press. 373 P.

Schulz, B. & Boyle, C. 2006. What are endophytes? pp.1–13. In: Schulz B, Boyle C and Sieber T.N (eds). Microbial Root Endophytes, Springer–Verlag, Berlin.

Silva–Valderrama, I., Toapanta, D., Miccono, M.A., Lolas, M., Díaz, G.A., Cantu, D. & Castro, A. 2021. Biocontrol potential of grapevine endophytic and rhizospheric fungi against trunk pathogens. Frontiers in Microbiology,11: 614–620.

Tille, P. & Forbes, B. 2014. Bailey & Scott's diagnostic microbiology (Thirteenth edition.). St. Louis, Missouri: Elsevier.

Turner, T., James, E. & Poole, P. 2013. The plant microbiome. Genome Biology, 14.

Wang, H., Zhang, Y, Chen, J., Guo, J., Li, L., Hozzein, W., Zhang, Y., Wadaan M. & Li W. 2015. *Frigoribacterium* endophyticum sp. nov., an endophytic *actinobacterium* isolated from the root of *Anabasis elatior* (C. A. Mey.) Schischk. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 4: 1207–1212.

West, E., Cother, E., Steel, C. & Ash, G. 2010. The characterization and diversity of bacterial endophytes of grapevine. Canadian Journal of Microbiology, 56:209–216.

William, S. & Helene Feil, A. 2004. Bacterial genomic DNA isolation using CTAB. DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek, California.

Zarraonaindia, I. & Gilbert, J. 2015. Understanding grapevine–microbiome interactions: implications for viticulture industry. Microbial Cell, 2: 171–173.

Isolation and Identification of grapevine endophytic bacteria in west Azerbaijan province

Seyedeh Elham Vaghari Souran[1], Azam Shekariesfahlan[2], Fatemeh Ashrafi[1], Shahram Naeimi[2], Abolghasem Ghasemi[2]

1, 3. PhD. student, Assistant Professor, Department of Microbiology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2, 4, 5. Assistant Professor, Associate Professor, Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
Corresponding author: Azam Shekariesfahlan, email: azshek5713@gmail.com

Received: Oct., 06, 2021 9(1) 131–143 Accepted: Jan., 18, 2022

Abstract

Grapevine is one of the most important agricultural products in Iran. West Azerbaijan province is considered as one of the biggest production centers of grape in Iran, due to its suitable climatic conditions. The aim of this study was to identify grape endophytic bacteria in West Azarbaijan. In this study, 67 endophytic bacteria were isolated from the stems and roots of grapevines. Then, biochemical properties such as hypersensitive reaction, fluorescent and potato soft rot test and the ability to produce proteases; amylase and gelatinase enzymes were tested. Eleven bacterial isolates were selected for molecular identification and it was found that the *Bacillus* and *Pseudomonas* are the most abundant genera. According our knowledge, three species of *Stenotrophomonas* sp., *Bosea lathyri* and *Frigoribacterium faeni* are reported for the first time in Iran as grapevine endophytic bacteria. Also, the antifungal effect of endophytic bacteria on three fungal species: *Chaetomium globosum*, *Cytospora chrysosperma* and *Fusarium* sp. was done by dual culture method and three isolates of GI6 (*Priestia* sp.), GI43 (*Pseudomonas kilonensis*) and GI45 (*Bacillus* sp.) showed the most growth inhibitory properties against fungi. Due to the importance of endophytic bacteria, their isolation and identification from different parts of the country seems necessary, as the result, these bacteria can be used in biological control of plant diseases and can be replaced by chemical control.

Keywords: Endophyte, bacteria, grape, biochemical properties, antifungal effect, biological control