فصلنامه علمی زیست‌شناسی کاربردی دانشگاه الزهرا(س)
دوره ۳۵، شماره۳، پیاپی ۷۳، پاییز ۱۴۰۱، ص ۱۶۰- ۱۴۳
نوع مقاله: مقاله پژوهشی

The Quarterly Scientific Journal of Applied Biology
Vol.35, No.3, Sering.72, Fall 2022, P. 143-160
Article type: Research paper

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۶/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸
وب سایت نشریه: https://jab.alzahra.ac.ir
10.22051/JAB.2021.34309.1398

جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت ریشه گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) و بررسی تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه

شیدا نظرپور[۱]، مریم محمدی سیچانی*[۲]، منیره رنجبر[۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۶/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۱۸

چکیده

مقدمه: امروزه باکتری های اندوفیت محرک رشد به عنوان کود زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. هدف از این مطالعه شناسایی باکتری‌های اندوفیت ریشه گیاه گلرنگ و بررسی تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه بود. سویه‌های اندوفیتی از ریشه گلرنگ جداسازی شدند و توانایی تولید اکسین و حل‌کنندگی فسفات آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت.

روشها: اثر جدایه‌های منتخب در دو غلظت $۱/۵\times۱۰^{۵}$ و $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر (cfu/ml) بر روی جوانه‌زنی بذر گلرنگ و رشد آن مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین اثر ضدقارچی جدایه‌های اندوفیتی با روش پورپلیت ارزیابی شد.

نتایج: باکتری‌های اندوفیت NMR ،*Micrococcus luteus* NMR ،*Pseudomonas corrugota* ،*Pseudomonas fluorescence* NMR ، *Pseudomonas brassicacearum* NMR و *Bacillus megaterium* NMR از ریشه گلرنگ جدا شدند. در تیمار با سویه *Bacillus megaterium* NMR ، میانگین بذرهای جوانه‌زده هنگام تماس با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۵}$ باکتری در هر میلی‌لیتر (cfu/ml) ، نسبت به هنگام تماس با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ cfu/ml، به طور معناداری بیشتر بود. طول ساقه‌چه و ریشه‌چه در گروه شاهد نسبت به گروه تیمار به طور معناداری کمتر بود. ارتباط مستقیمی بین مقدار اکسین تولیدی جدایه‌های اندوفیتی و توانایی حلالیت فسفات آن‌ها با افزایش طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و تعداد بذرهای جوانه‌زده گلرنگ وجود داشت. ایزوله *Pseudomonas*

---

۱ . دانشجوی کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران
۲ . استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد فلاورجان، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران *(نویسنده مسئول: Ma.Mohammadi1347@iau.ac.ir)

brassicacearum NMR هر چهار نوع آنزیم پکتیناز، آمیلاز، پروتئاز و زایلاناز را تولید کرد. نتایج نشان داد ایزوله *Pseudomonas fluorescence* NMR رشد *Aspergillus niger* را به میزان ۳۰/۷۶ درصد مهار کرد.

نتیجه گیری: باکتری‌های اندوفیت جداسازی شده در تحقیق حاضر به دلیل قابلیت تولید اکسین و حلالیت فسفات و تأثیر مستقیم آنها بر فاکتورهای رشد گلرنگ، به عنوان عوامل محرک رشد پیشنهاد می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های محرک رشد، ریشه گیاه، فعالیت ضدقارچی، گلرنگ

مقدمه

گیاه گلرنگ با نام علمی *Carthamus tinctorius* L. یکی از گیاهان خانواده کاسنی‌ها (*Asteraceae*) است. دانه‌های گلرنگ دارای ۲۵ تا ۴۰ درصد روغن و حدود ۲۰ درصد پروتئین هستند. روغن این گیاه در مقایسه با سایر روغن‌های گیاهی از کیفیت بالایی برخوردار است. گلرنگ از گیاهان روغنی است و مصارف صنعتی، دارویی و غذایی دارد. این گیاه را می‌توان در شرایط دیم مناطق مختلف کشور ایران کشت داد. گونه های وحشی گلرنگ در مناطق مختلف ایران دیده شده‌اند. ارقام بومی و خارجی گلرنگ از نظر عملکرد دانه، زودرسی، رنگ و شکل گل، تنوع ژنتیکی بسیاری دارند. گلرنگ یک گیاه زراعی مناسب جهت کشت در آب و هوای خشک و زمین‌های نسبتا شور است و به همین دلیل در بسیاری از نقاط گرم مرکزی و جنوبی کشور ایران بصورت کشت پاییزه و در مناطق سردسیر به صورت کشت بهاره کاشته می‌شود (Turgumbayeva *et al.*, 2018, Chakradhari *et al.*, 2020).

باکتری‌های محرک رشد گیاه، گروه وسیعی از باکتری‌هایی هستند که در ریزوسفر گیاهان حضور دارند و از راه‌های مختلف سبب افزایش و تحریک رشد گیاه می‌شوند (Santoyo *et al.*, 2016). گروهی از این باکتری‌ها به نام اندوفیت‌ها وارد بافت‌های داخلی گیاه می‌شوند. این میکروارگانیسم‌ها بدون ایجاد آسیب‌های ظاهری و آشکار، در فضای خارج یا داخل سلول‌های گیاهی رشد می‌کنند. در این نوع ارتباط، زندگی متعادلی بین گیاه و باکتری‌های اندوفیت فراهم می‌گردد. باکتری‌های اندوفیت با تولید هورمون‌های گیاهی محرک رشد مثل ایندول‌استیک‌اسید و یا ممانعت از تولید هورمون‌های گیاهی ممانعت‌کننده از رشد، مثل اتیلن به رشد گیاه میزبان کمک می‌کنند (Fouda *et al.*, 2021). باکتری‌های اندوفیت در داخل بافت گیاه سالم، بدون ایجاد علائم و آسیب حضور دارند و تخمین صحیح جمعیت آن‌ها مشکل است. باکتری‌های اندوفیت ابتدا سطح ریشه را آلوده نموده و پس از نفوذ درون بافت‌های گیاه در آن‌ها مستقر می‌شوند. اکثر باکتری‌های اندوفیت در فضای بین‌سلولی جایگزین می‌شوند ولی تعداد معدودی از آن‌ها قادرند به درون سلول‌ها نیز نفوذ کنند (Sun *et al.*, 2016). کاربرد باکتری‌های اندوفیت به عنوان کودهای زیستی کاربرد مفیدی از این باکتری‌ها در کشاورزی ایجاد کرده است (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2021). مطالعات مختلفی در

مورد تأثیر باکتری‌های اندوفیتی بر روی افزایش عملکرد گیاه میزبان از طریق تولید هورمون‌های رشد اکسین و جیبرلین، انحلال فسفات، تثبیت ازت، تولید سیدروفور، توانائی کنترل زیستی میکروارگانیسم‌های بیماریزا و افزایش مقاومت گیاهان به تنش‌های غیرزیستی و زیستی درحال اجراست (Gamalero *et al.*, 2020). مطالعات نشان داده‌اند که اغلب اندوفیت‌های گیاهی رشد و تحمل گیاه در برابر تنش‌های محیطی افزایش می‌دهند. در تحقیقی بر روی اندوفیت‌های باکتریایی سه گیاه مهم اقتصادی مانند سورگوم ، خیار و گوجه فرنگی در سه منطقه مختلف با درجه شوری متفاوت سویه‌ای از *Pseudomonas brassicacearum* را جداسازی کردند که توانایی تولید آنزیم آمینو سیکلوپروپان کربوکسیلات دآمیناز را داشت. این آنزیم در افزایش تحمل استرس در گیاهان نقش مهمی دارد (Gamalero *et al.*, 2020).

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت ریشه گیاه گلرنگ و بررسی تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه گلرنگ به عنوان یک گیاه استراتژیک و همچنین ارزیابی اثر مهاری آن‌ها بر قارچ‌های بیماریزای گیاهی بود.

مواد و روش ها

جداسازی باکتری‌های اندوفیت از ریشه گلرنگ

در اواخر فصل بهار ۱۳۹۹ بیست عدد گیاه کامل گلرنگ رقم صفه اصفهان از زمین‌های کشاورزی شمال اصفهان جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه منتقل گردید. بخش‌هایی از ریشه شستشو داده شده گلرنگ توسط اسکالپل استریل به قطعات ۲ تا ۳ سانتی‌متری برش داده شد و ۳ بار با آب مقطر شسته شدند. قطعات ریشه ۲ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و پس از آن به مدت ۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۳ درصد غوطه‌ور شدند تا باکتری‌های سطحی ریشه کاملا حذف شوند. سپس برای حذف اثر مواد ضدعفونی‌کننده قطعات ریشه ۵ بار در آب مقطر استریل آبکشی شدند. قطعات ریشه به یک هاون استریل منتقل شده و به طور کامل له شدند. مایع مترشحه و بافت له شده ریشه در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت به منظور دستیابی به کلنی‌های مجزا نمونه‌ها بر روی محیط کشت نوترینت آگار به روش خطی کشت داده شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند (Duan *et al.*, 2013, Khan *et al.*, 2020).

بررسی خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌های اندوفیتی

خصوصیات ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه‌ها روی محیط نوترینت آگار مورد بررسی قرار گرفت. پس از تهیه لام مستقیم، با توجه به نتیجه واکنش گرم هر جدایه، از آزمون‌های بیوشیمیایی مانند کاتالاز، اکسیداز، VP، MR ، SIM، OF، TSI و اوره‌آز برای شناسایی جدایه‌ها استفاده شد (Nahon *et al.*, 2015).

غربالگری جدایه‌های اندوفیتی ریشه گلرنگ

آزمون فعالیت اکسین: مقدار ۲۵ میلی‌لیتر از محیط کشت LB-T درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری توزیع و در اتوکلاو استریل گردید. یک میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی تازه هر جدایه به ارلن تلقیح گردید. ارلن‌ها بر روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۷۲ ساعت ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. یک میلی‌لیتر از محلول شفاف رویی به ۲ میلی‌لیتر معرف سالکووسکی(Salkowski Reagent) اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفتند. رنگ تولید شده به روش طیف‌سنجی در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت گردید. مقادیر جذب قرائت شده با منحنی استاندارد اندول‌استیک‌اسید مقایسه و مقدار اکسین تولیدشده توسط هر جدایه محاسبه و ثبت شد (Glickmann & Dessaux, 1995, Torres-Rubio *et al.*, 2000).

آزمون انحلال فسفات: مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی به ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت اسپربر مایع اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۷ درجه‌سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس در شیکر با ۱۳۸ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از ۵ روز سوسپانسیون باکتری به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول رویی با ۳ میلی‌لیتر آب مقطر و یک میلی‌لیتر معرف آمونیوم مولیبدات وانادات مخلوط گردید. پس از ۲۰ دقیقه شدت جذب نور با استفاده از روش طیف‌سنجی در طول موج ۴۳۰ نانومتر قرائت شد. مقدار فسفر محلول در محیط کشت در مقایسه با منحنی استاندارد محاسبه گردید (Alikhani *et al.*, 2006, Sharma *et al.*, 2013).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب با تکثیر قطعه 16S rDNA باکتری‌ها با واکنش زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. مخلوط PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ نانو گرم بر میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر رفت و برگشت (۵ Pmol/µl)، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۰/۲ mM)، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۱/۵ mM)، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR، ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم DNA Taq پلیمراز (۱/۲۵ U/µl) و ۱۹ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. برای شناسایی باکتری‌ها از آغازگرهای ۲۷F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و ۱۴۹۲R (5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3′) استفاده شد. دستگاه ترموسایکلر (اپندورف-آلمان) تحت شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن اولیه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله ویرایش شدن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر قطعه مورد نظر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (Sogandi & Nilasari, 2019). پس از بررسی کیفیت محصول PCR

بر روی ژل، قطعه تکثیر شده جهت تعیین توالی به شرکت رویان زیست‌ژن ارسال شد. نتایج تعیین توالی توسط نرم‌افزار Chromas بررسی گردید و به کمک سرور BLAST در پایگاه NCBI ارزیابی و گونه‌های منسوب جدایه‌ها شناسایی شدند (Suhandono *et al.*, 2016).

بررسی فعالیت آنزیم‌های پکتیناز، زایلاناز، آمیلاز، پروتئاز جدایه‌های انتخاب شده

فعالیت آنزیم‌های پکتیناز، زایلاناز، آمیلاز و پروتئاز در جدایه‌های انتخاب شده در محیط‌های کشت پایه لوریا برتانی آگار حاوی به ترتیب ۱درصد سوبسترای پکتین، زایلان، نشاسته و کازئین بررسی شد. هر یک جدایه‌ها به مدت ۱ هفته در دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد در کنار هر یک از سوبستراها اینکوبه شدند. فعالیت آنزیم پکتیناز، آمیلاز و پروتئاز با اضافه کردن معرف لوگل بر روی محیط کشت و مشاهده هاله روشن ارزیابی شد. فعالیت آنزیم زایلاناز نیز با محلول ۱درصد کنگورد بررسی گردید (Amore *et al.*, 2015, Bhange *et al.*, 2016).

اثر باکتری‌های اندوفیت جداشده از گلرنگ بر درصد جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه

بذرهای گلرنگ رقم صفه اصفهان با درصد خلوص ۹۹درصد و قوه نامیه ۸۰درصد از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذرها قبل از انجام آزمایش به مدت ۱ دقیقه در الکل ۷۰درصد قرار داده شدند. سپس با هیپوکلریت‌سدیم ۳ درصد به مدت ۵ دقیقه ضدعفونی گردید و ۵ بار با آب مقطراستریل آبکشی شدند .

تیمار بذرهای گلرنگ با باکتری‌های اندوفیت به روش کشت بذرها در گلدان انجام شد. گلدان‌ها با مخلوطی از کوکوپیت، پیت‌ماس و خاک معمولی استریل مناسب رشد گیاه آماده و نشانه‌گذاری شدند. در هر گلدان ۲۰ عدد بذر استریل شده در عمق ۰/۵ سانتی‌متری خاک قرار داده شد. هرگلدان با مخلوطی از ۴ میلی‌لیتر سوسپانسیون جدایه اندوفیتی و ۶ میلی‌لیتر آب آبیاری شد. این آزمایش با دو غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ و $۱/۵\times۱۰^{۵}$ باکتری در هر میلی‌لیتر و با ۶ جدایه اندوفیتی و با سه بار تکرار انجام گردید. گلدان شاهد با ۱۰ میلی‌لیتر آب آبیاری گردید. آبیاری دو روز در میان و با خشک شدن سطح خاک انجام گردید. گلدان‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. نگهداری از گلدان‌ها به مدت ۲۱ روز ادامه یافت. شمارش بذور جوانه‌زده به صورت روزانه و در ساعت معینی از روز انجام گرفت. در آخرین روز شمارش، گیاهچه‌های درون هر گلدان جهت اندازه‌گیری طول ریشه‌چه و ساقه‌چه خارج شدند (Walitang *et al.*, 2017).

بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌ها

اثر مهارکننده ۵ جدایه منتخب از باکتری‌های اندوفیتی ریشه گلرنگ بر روی *Aspergillus niger* (ATCC: 9142) و *Alternaria alternata* (PTCC: 5224) مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت ضدقارچی جدایه‌ها به روش غذای سمی ارزیابی شد. میزان ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های میکروبی با غلظت $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ از هر جدایه به ۱۵ محیط کشت PDA مذاب با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه شد و پس از مخلوط شدن به پلیت استریل منتقل شد. از محیط کشت PDA ساده به عنوان شاهد استفاده شد. هر یک از نمونه‌های قارچ به صورت یک نقطه در وسط محیط‌کشت‌های PDA ساده و محیط PDA حاوی سوسپانسیون جدایه‌ها تلقیح شدند. پلیت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. بعد از این مدت، قطر ناحیه رشد قارچ‌ها در همه محیط‌های کشت اندازه‌گیری شد و میزان فعالیت ضدقارچی جدایه‌ها به کمک رابطه [(DC- DS)/DC] [100× محاسبه گردید. در این رابطه DC، قطر ناحیه رشد قارچ در محیط شاهد و DS، قطر ناحیه رشد قارچ در محیط‌کشت حاوی سوسپانسیون باکتری بود (Balouiri *et al.*, 2016, Bolivar-Anillo *et al.*, 2021).

تجزیه و تحلیل‌های آماری

داده‌های جمع‌آوری شده با نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۷ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن با $P=۰/۵$ انجام شد.

یافته ها

بر روی محیط‌کشت آگار غذایی و محیط کشت PDA، ۵ جدایه متفاوت رشد کردند. بر حسب نتایج حاصل از واکنش گرم، تست‌های بیوشیمیایی شامل اکسیداز، کاتالاز، تخمیر قند در TSI، هیدرولیز اوره، مصرف سیترات، MR، VP، تولید H_2S، تولید اندول، حرکت و OF بر روی ۵ جدایه انجام شد (جدول۱).

جدول ۱- نتایج شناسایی باکتری‌های اندوفیت ریشه گلرنگ به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی

Table 2 -

ردیف	نام جدایه	اکسیداز	کاتالاز	TSI	اوره	سیترات	MR	VP	اندول	H_2S	حرکت	OF
۱	A	-	+	*	*	*	*	*	*	*	*	*
۲	C	+	+	K/K	-	-	+	-	-	-	+	+/-
۳	H	+	+	K/K	-	-	+	+	-	-	+	+/-
۴	J	+	+	K/K	-	-	+	-	-	-	+	+/-
۵	K	-	+	A/A	-	-	+	-	-	-	+	*

*آزمون انجام نشده است.

نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌ها

شناسایی مولکولی جدایه‌ها از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تعیین توالی قطعه تکثیرشده انجام شد. توالی تکثیر شده با توالی‌های موجود در پایگاه اطلاعات ژنومی با استفاده از نرم‌افزار BLAST مقایسه شد. جدایه‌های شناسایی شده در بانک ژن ثبت شدند (جدول۲).

جدول ۲- جدایه‌های شناسایی شده طبق توالی‌های مشابه در پایگاه NCBI

Table 2-

جدایه	نام جدایه	درصد مشابهت	درصد هم‌پوشانی	شماره دسترسی در بانک ژن
A	*Micrococcus luteus* NMR	۹۹/۷	۱۰۰	MT912852
C	*Pseudomonas corrugota* NMR	۹۹/۶	۱۰۰	MT912854
H	*Pseudomonas fluorescence* NMR	۹۹/۵	۱۰۰	MT916774
J	*Pseudomonas brassicacearum* NMR	۹۸/۱	۱۰۰	MT912918
K	*Bacillus megaterium* NMR	۱۰۰	۱۰۰	MT912853

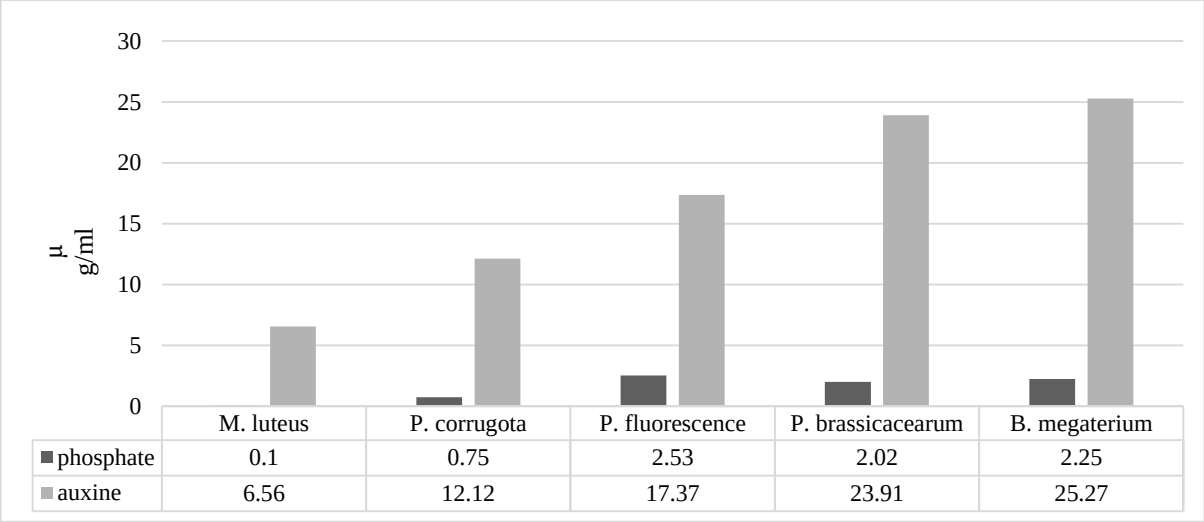
نتایج بررسی تولید اکسین و میزان انحلال فسفات جدایه‌ها

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان تولید اکسین در بین ۵ جدایه اندوفیتی مورد آزمایش اختلاف معناداری داشت ($P<۰/۰۱$). مقدار تولید اکسین در جدایه *B. megaterium* NMR و *P. brassicacearum* NMR بیشتر از سایر جدایه‌ها و به ترتیب ۲۵/۲۷ و ۲۳/۹۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد. حدود نیمی از جدایه‌ها نیز مقادیر متوسطی اکسین تولید کردند (شکل۱).

همچنین نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که میزان انحلال فسفات در بین ۵ جدایه اندوفیتی مورد آزمایش اختلاف معناداری دارد ($P<۰/۰۱$). مقدار انحلال فسفات در جدایه‌های *B. megaterium* NMR ، *P. fluorescence* NMR و *P. brassicacearum* NMR بیشتر از سایر جدایه‌ها و به ترتیب ۲/۲۵، ۲/۵۳ و ۲/۰۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌دست آمد (شکل۱).

شکل۱- میزان تولید اکسین و حلالیت فسفات در جدایه‌های اندوفیتی ریشه گلرنگ

Figure 1.



	M. luteus	P. corrugota	P. fluorescence	P. brassicacearum	B. megaterium
phosphate	0.1	0.75	2.53	2.02	2.25
auxine	6.56	12.12	17.37	23.91	25.27

فعالیت آنزیم‌های پکتیناز، زایلاناز، آمیلاز و پروتئاز در ۵ جدایه اندوفیتی ریشه گلرنگ متفاوت بود. فعالیت آنزیمی این جدایه-ها در جدول۳ ارائه شده است.

جدول۳- بررسی فعالیت آنزیمی در جدایه‌های اندوفیتی ریشه گلرنگ

Table 3.

جدایه	فعالیت آنزیمی			
	پکتیناز	زایلاناز	آمیلاز	پروتئاز
Micrococcus luteus NMR	−	+	−	+
Pseudomonas corrugota NMR	+	+	−	+
Pseudomonas fluorescence NMR	+	+	+	−
Pseudomonas brassicacearum NMR	+	+	+	+
Bacillus megaterium NMR	−	−	+	+

نتایج تاثیر تیمار با دو غلظت مختلف جدایه‌های اندوفیتی بر جوانه‌زنی بذر، طول ساقه‌چه و طول ریشه‌چه گلرنگ

میانگین درصد بذرهای جوانه‌زده در گروه شاهد برابر ۵/۸ ± ۴۸/۳ درصد، گروه بذرهای تیمارشده با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۵}$ باکتری در هر میلی‌لیتر برابر ۱۲/۴ ± ۵۲/۰ درصد و گروه بذرهای تیمارشده با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر ۱۵/۸ ± ۴۴/۷ درصد بدست آمد. بر اساس تجزیه و تحلیل‌های آماری تفاوت معناداری بین میانگین تعداد بذرهای جوانه‌زده بین گروه‌های تیمار شده با دو غلظت مختلف از سوسپانسیون‌های باکتریایی و گروه شاهد مشاهده نشد (p=۰/۵۸۲ آزمون کراسکال والیس). همچنین میانگین بذرهای جوانه‌زده در تیمار با دو غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ و $۱/۵\times۱۰^{۵}$ باکتری در هر میلی‌لیتر جدایه‌های *M. luteus* NMR ، *P. brassicacearum* NMR ، *P. fluorescence* NMR و *P. corrugota* NMR تفاوت معناداری نشان نداد (p>۰/۰۵ آزمون تی مستقل)، ولی در جدایه *B. megaterium* NMR میانگین بذرهای جوانه‌زده در تیمار با غلظت $۱/۵\times۱۰^{۵}$ باکتری در هر میلی‌لیتر نسبت به غلظت $۱/۵\times۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر بطور معناداری بیشتر بود (p=۰/۰۰۱) (جدول۴).

جدول ۴- درصد جوانه‌زنی بذر، طول ساقه‌چه و ریشه‌چه در تیمار با دو غلظت مختلف از جدایه‌های اندوفیت ریشه گلرنگ (میانگین± SD)

جدایه‌ها	غلظت (cfu/ml)	درصد جوانه‌زنی بذر	مقدار P	طول ساقه‌چه (mm)	مقدار P	طول ریشه‌چه (mm)	مقدار P
M. luteus NMR	$۱/۵\times۱۰^{۵}$	۴۳/۳ ± ۱۱/۶	۰/۳۲۸	۵/۸ ± ۳/۹	۰۰۱	۱۰/۷ ± ۳/۶	۰/۰۰۱
	$۱/۵\times۱۰^{۸}$	۵۳/±۳ ۱۰/۴		۲۹/۲ ± ۵/۸		۱۸/۸ ± ۷/۷	
P. corrugota NMR	$۱/۵\times۱۰^{۵}$	۶۶/۷ ± ۱۱/۶	۰/۰۸۳	۳۶/۲ ± ۵/۱	۰/۰۰۱	۲۱/۴ ± ۷/۶	۰/۰۰۴
	$۱/۵\times۱۰^{۸}$	۵۰/۰ ± ۵/۰		۱۹/۹ ± ۲/۸		۱۵/۳ ± ۴/۷	
P. fluorescence NMR	$۱/۵\times۱۰^{۵}$	۴۱/۷ ± ۴/۹	۰/۶۰۹	۱۷/۳ ± ۹/۶	۰/۰۱۱	۱۴/۲ ± ۱/۶	۰/۲۰۱
	$۱/۵\times۱۰^{۸}$	۴۵/۰ ± ۱۰/۰		۲۳/۸ ± ۶/۳		۱۶/۷ ± ۵/۰	
P. brassicacearum NMR	$۱/۵\times۱۰^{۵}$	۵۱/۷ ± ۱۲/۶	۰/۵۶۶	۳۰/۲ ± ۵/۲	۰/۰۸۰	۱۷/۰ ± ۵/۷	۰/۵۱۴
	$۱/۵\times۱۰^{۸}$	۵۶/۷ ± ۵/۷		۲۰/۶ ± ۶/۳		۱۵/۷ ± ۴/۴	
B. megaterium NMR	$۱/۵\times۱۰^{۵}$	۵۶/۷ ± ۲/۹	۰/۰۰۱	۱۰/۴ ± ۳/۵	۰/۳۹۸	۱۲/۳ ± ۳/۷	۰/۳۹۰
	$۱/۵\times۱۰^{۸}$	۱۸/۲ ± ۷/۶		۱۴/۸ ± ۴/۱		۱۴/۱ ± ۴/۹	
شاهد		۴۸ /۳ ± ۵/۷	۰/۵۸۲	۱۱/۴ ± ۳/۱	۰/۰۲۹	۹/۵ ± ۴/۷	۰/۰۰۱

میانگین طول ساقه‌چه در گروه شاهد برابر ۷/۰ ± ۱۱/۳۶، گروه تیمار با غلظت ۱/۵×۱۰^۵ باکتری در هر میلی‌لیتر ۱/۷±۲۳/۴۸ و گروه تیمار با غلظت ۱/۵×۱۰^۸ باکتری در هر میلی‌لیتر ۱۵/۰ ± ۲۳/۳ درصد بدست آمد. آزمون‌های آماری نشان داد طول ساقه‌چه در گروه شاهد نسبت به هر دو گروه تیمار ۱/۵×۱۰^۸ و ۱/۵×۱۰^۵ باکتری در هر میلی‌لیتر به طور معناداری کمتر بود ($P<۰/۰۵$ آزمون تعقیبی من‌ویتنی). بر اساس نتایج، میانگین طول ساقه‌چه در هر دو غلظت تیمار با جدایه‌های *P. brassicacearum* NMR و *B. megaterium* NMR تفاوت معناداری نشان نداد ($p>۰/۰۵$ آزمون تی‌مستقل). در تیمار با جدایه‌های *Micrococcus luteus* ($p<۰/۰۰۱$ آزمون تی‌مستقل) و *P. fluorescence* NMR ($p =۰/۰۱۱$) میانگین طول ساقه چه در غلظت ۱/۵×۱۰^۸ باکتری در هر میلی‌لیتر نسبت به غلظت ۱/۵×۱۰^۵ باکتری در هر میلی‌لیتر بطور معناداری بیشتر بود و در جدایه *P. corrugota* NMR میانگین طول ساقه‌چه در تیمار با غلظت ۱/۵×۱۰^۸ باکتری در هر میلی‌لیتر نسبت به غلظت ۱/۵×۱۰^۵ باکتری در هر میلی‌لیتر بطور معناداری کمتر بود ($p=۰/۰۰۱$) (جدول۳).

میانگین طول ریشه‌چه در گروه شاهد ۴/۷ ± ۹/۵ میلی‌متر، گروه تیمارشده با غلظت ۱/۵×۱۰^۵ باکتری در هر میلی‌لیتر ۶/۷ ± ۱۶/۳۳ میلی‌متر و گروه تیمارشده با غلظت ۱/۵×۱۰^۸، ۵/۷ ± ۱۶/۲ میلی‌متر بود. بر اساس تجزیه و تحلیل‌های آماری طول ریشه‌چه در گروه شاهد نسبت به گروه‌های تیمارشده با دو غلظت ۱/۵×۱۰^۸ و ۱/۵×۱۰^۵ باکتری در هر میلی‌لیتر از جدایه‌ها به طور معناداری کمتر بوده است ($P <۰/۰۵$ آزمون تعقیبی من ویتنی). آزمون‌های آماری بین میانگین طول ریشه‌چه در تیمار با جدایه‌های *P. brassicacearum* NMR ، *B. megaterium* NMR و *P. fluorescence* NMR تفاوت معناداری بین دو غلظت ۱/۵×۱۰^۸ و ۱/۵×۱۰^۵ باکتری در هر میلی‌لیتر نشان نداد ($p>۰/۰۵$ آزمون تی‌مستقل). در تیمار با جدایه *M. luteus* NMR میانگین طول ریشه‌چه در غلظت ۱/۵×۱۰^۸ باکتری در هر میلی‌لیتر نسبت به غلظت ۱/۵×۱۰^۵ باکتری در هر میلی‌لیتر بطور معناداری بیشتر بود ($p=۰/۰۰۱$). در تیمار با جدایه *P. corrugota* NMR میانگین طول ریشه‌چه در تیمار با غلظت ۱/۵×۱۰^۸ باکتری در هر میلی‌لیتر نسبت به غلظت ۱/۵×۱۰^۵ باکتری در هر میلی‌لیتر بطور معناداری کمتر بود ($p=۰/۰۰۴$) (جدول ۳).

بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌های اندوفیتی ریشه گلرنگ

هیچ یک از جدایه‌های اندوفیت ریشه گلرنگ اثر بازدارندگی روی رشد قارچ *Alternaria alternata* نداشتند. دو جدایه اندوفیت *P. fluorescence* NMR و *P. corrugota* NMR در برابر قارچ *Aspergillus niger* فعالیت ضدقارچی از خود نشان دادند. فعالیت مهارکنندگی رشد *Aspergillus niger* توسط جدایه *P. fluorescence* NMR ۳۰/۷۶ درصد و در جدایه *P. corrugota* NMR ۱۵/۳۸درصد بدست آمد.

بحث

در سال‌های اخیر باکتری‌های اندوفیت به دلیل توانایی مهاجرت به درون گیاهان و عدم ایجاد علایم بیماری، به عنوان عوامل محرک رشد و بیوکنترل اهمیت زیادی پیدا کرده‌اند. اندوفیت‌ها به دلیل تولید مواد ضدباکتریایی، ضدقارچی، القای مقاومت و حفاظت بهتر از بافت‌های گیاهی، در مقایسه با میکروارگانیسم‌های اپی‌فیت، مزایای بیشتری به عنوان محرک رشد و عوامل بیوکنترل دارند. بررسی‌های انجام شده روی توانایی القای رشد گیاهان توسط باکتری‌های مختلف ریزوسفر نشان داده است که اثر اندوفیت‌ها روی افزایش رشد گیاه متفاوت است (Yousefi *et al.*, 2017; Bahmani *et al.*, 2018). برخی از سویه‌های اندوفیت که به عنوان عامل کنترل بیولوژیک میکروارگانیسم‌های بیماریزای گیاهی به کار رفته‌اند، توانسته‌اند از راه بهبود گردش مواد معدنی از جمله نیتروژن، فسفات و دیگر مواد معدنی و تـولید ایندول اسید استیک، سیدروفور و تأمین ویتامین‌های ضروری گیاهان سبب افزایش رشد گیاه شوند. افزون بر این، شماری دیگر از اثرات مفید روی رشد گیاهان از جمله تنظیم فشاراسمزی، تنظیم روزنه، بهسازی مورفولوژی ریشه، افزایش جذب موادمعدنی و تغییر تجمع نیتروژن و تنظیم سوخت و ساز به اندوفیت‌ها نسبت داده می شود (Fadiji & Babalola, 2020). با توجه به اثراتی که اندوفیت‌های گیاهی در تحریک رشد گیاه، فراهم کردن عناصر ضروری آن و حذف میکروارگانیسم‌های بیماریزای گیاهی دارند تحقیق و شناسایی این باکتری‌ها در مورد گیاه گلرنگ به عنوان گیاهی با ارزش اقتصادی بالا ضروری به نظر می‌رسد.

در این مطالعه اندوفیت‌های جدا شده از ریشه گیاه گلرنگ مورد شناسایی مولکولی قرار گرفتند که در نتیجه، ۵ سویه مختلف وابسته به جنس‌های *Micrococcus*، *Bacillus* و *Pseudomonas* جداسازی شدند. از بین این سویه‌ها، سویه *Bacillus megaterium* NMR بیشترین میزان تولید اکسین (۲۵/۲۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و سویه *Pseudomonas fluorescence* NMR بیشترین میزان حلالیت فسفات (۲/۵۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را نشان دادند (Liu *et al.*, 2017). در مطالعه‌ای چهار باکتری اندوفیت شامل *Micrococcus luteus*، *Bacillus megaterium* ، *Pseudomonas chlororaphis* و *Pseudomonas fluorescence* از گلرنگ جدا کردند. میزان تولید اکسین در هر باکتری به ترتیب برابر با ۱۵/۳، ۳۰/۶، ۲۲/۴۸ و ۱۹/۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود (Singh & Dubey, 2018). یافته‌های این طرح در بالاترین میزان تولید اکسین با یافته‌های طرح حاضر در جنس *Bacillus* مشابهت دارد. Reyad و همکاران دو باکتری اندوفیت متعلق به گونه‌های *Bacillus cereus* و *Bacillus aerius* را از برگ و ساقه گیاه گلرنگ جداسازی کردند و جدایه‌ها را از طریق تعیین توالی ژن 16S rRNA شناسایی کردند. رشد گیاه از طریق تعیین وزن خشک و مقایسه با وزن خشک گیاه شاهد مورد بررسی قرار گرفت. این باکتری‌ها علاوه بر تحریک رشد گیاه، موجب افزایش مقاومت گیاه نسبت به شوری (NaCl تا غلظت میلی‌مول در لیتر) شدند. وجودکلرید سدیم منجر به افزایش رشد گیاه و ترکیب شیمیایی آن در مقایسه با گروه شاهد تلقیح نشده با اندوفیت‌ها گردید. نهال آبیاری شده با غلظت های مختلف NaCl کاهش قابل توجهی در تولید اکسین و جیبرلیک اسید نشان داد، در حالی که میزان اتانول در این نهال به طور قابل توجهی در مقایسه با شاهد افزایش یافت. تلقیح سویه‌های اندوفیت توانایی دستیابی به تحمل سیستمیک را از طریق تولید آنزیم ۱- آمینو

سیکلوپروپان ۱- کربوکسیلاز دآمیناز داشتند که موجب کاهش تولید هورمون استرس‌زای اتیلن می‌شود (Reyad *et al.*, 2017). نتایج این مطالعه در راستای مطالعه حاضر نشان دهنده افزایش رشد گیاه گلرنگ با تلقیح سویه‌های اندوفیت، از طریق تولید هورمون‌های محرک رشد است. Naserzadeh و همکاران (۲۰۱۸) به طور موفقیت‌آمیزی اثرات تقویت کننده رشد سه سویه *Pseudomonas fluorescence* را بر روی عملکرد تولید و برخی از صفات رشد رویشی گیاه گلرنگ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه ایلام مشاهده کردند. گیاهان تلقیح شده با باکتری‌ها از نظر خصوصیات قطر ساقه، تعداد شاخه اولیه، شاخص سطح برگ، زیست توده خشک، میزان تولید دانه، درصد روغن بذر و وزن بذر نسبت به گیاهان تلقیح شده با ریزوباکتری‌های محرک رشد، برتر بودند (Naserzadeh *et al.*, 2018). در مطالعه حاضر نیز بیشترین فراوانی باکتری‌های محرک رشد متعلق به جنس *Pseudomonas* بود. Lack و همکاران (۲۰۱۳) تأثیر باکتری‌های *Azotobacter chroococcum*، *Azospirillum brasilense* و *Pseudomonas fluorescence* و همچنین کنسرسیوم‌های دوتایی این باکتری‌ها را بر روی خصوصیات مورفوفیزیولوژیک و تولید گیاه گلرنگ مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که اثر تلقیح باکتری بر عملکرد دانه، عملکرد بیولوژیک و صفات مورفولوژیکی مانند ارتفاع بوته و تعداد گره در بوته در سطح احتمال ۱درصد معنی دار بود (Lack *et al.*, 2013). در این مطالعه و همچنین تحقیق Naserzadeh و همکاران از سویه‌هایی استفاده شده است که بطور طبیعی اندوفیت گیاه گلرنگ نبوده‌اند، درحالی که در مطالعه حاضر سویه‌های مورد استفاده به دلیل جداسازی از ریشه گیاه می‌توانند سازگاری بیشتری با شرایط رشدی گیاه گلرنگ داشته باشند.

در این پژوهش نتایج محاسبه ضریب همبستگی اسپیرمن نشان داد که ارتباط مستقیمی بین مقدار اکسین و مقدار حلالیت فسفات بر روی طول ساقه‌چه و طول ریشه‌چه وجود داشت. Hardoim و همکاران در پژوهشی به بررسی تأثیر باکتری‌های اندوفیت جدا شده از برگ گیاه گلرنگ بر رشد اندام این گیاه پرداختند. *Enterobacter*، *Pseudomonas* و *Micrococcus luteus* باکتری-های اندوفیت جدا شده از برگ گیاه گلرنگ بودند و میزان تولید اکسین در هر سه باکتری به ترتیب برابر با ۲۱/۲، ۳۰/۶ و ۲۹/۵۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. افزایش ۱۰ تا ۳۰ درصدی عملکرد گلرنگ در تلقیح باکتری‌ها را ناشی از باکتری *Pseudomonas* دانسته و این تأثیر مثبت را بیشتر به تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه مانند اکسین ها نسبت دادند (Hardoim *et al.*,, 2015). در پژوهش حاضر نیز افزایش میزان اکسین با رشد اندام گیاه گلرنگ رابطه مستقیم داشت. علت همخوانی نتایج این دو مطالعه را می‌توان به دلیل تولید بالای میزان اکسین توسط باکتری‌های اندوفیت جدا شده از اندام‌های مختلف گیاه گلرنگ دانست. در مطالعه‌ای باکتری *Erwinia* تأثیر معنی‌داری در افزایش طول اندام هوایی برنج در مقایسه با سایر تیمارها نشان داد و باکتری *Staphylococcus* با اختلاف معنی‌دار باعث افزایش طول ریشه در مقایسه با سایر تیمارها شد. تاثیر اندوفیت‌ها بر مورفولوژی ساقه به واسطه تولید هورمون‌هایی نظیر اکسین، جیبرلین و غیره است. برخی از فیتوهورمون‌هایی که توسط اندوفیت‌ها تولید و ترشح می‌شوند باعث تغییر در مورفولوژی ریشه می‌گردند. به عنوان مثال اکسین باعث افزایش طول سلول‌ها، تحریک

ریشه‌دهی و تحریک تقسیم سلول‌ها می‌شود (Dang *et al.*,, 2020). افزایش معنی‌داری در طول ریشه و ساقه گیاه تیمار شده با اندوفیت مشاهده شد. در تحقیق حاضر نیز جدایه‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* به دلیل تولید اکسین و توانایی انحلال فسفات رابطه مستقیمی در رشد ساقه‌چه، ریشه‌چه و بذر جوانه‌زده نشان دادند.

در مطالعه حاضر جدایه‌های *Micrococcus luteus* NMR ، *Bacillus megaterium* NMR ، *Pseudomonas brassicacearum* NMR و *Pseudomonas corrugota* NMR به جز جدایه *Pseudomonas fluorescence* NMR دارای فعالیت آنزیم پروتئازی بودند و هاله شفاف اطراف کلنی‌شان نشان داده شد. در فعالیت آنزیمی آمیلاز سه جدایه *Pseudomonas corrugota* NMR ، *Pseudomonas fluorescence* NMR و *Bacillus megaterium* NMR هاله شفاف اطراف کلنی ایجاد کردند. نتیجه تولید آنزیم پکتیناز در سویه‌های *Pseudomonas brassicacearum* NMR ، *Pseudomonas fluorescene* NMR و *Pseudomonas corrugota* NMR هاله شفاف اطراف کلنی بود و تولید آنزیم زایلاناز تمامی سویه‌ها به جز *Bacillus megaterium* NMR مثبت بود. Abdalla و McGaw به جداسازی باکتری‌های اندوفیت از ساقه گیاه گلرنگ پرداختند. جنس *Pseudomonas* ، *Micrococcus luteus*، جنس *Staphylococcus* و *Bacillus sp.* باکتری‌های اندوفیت جدا شده از ساقه گیاه گلرنگ بودند. هر چهار باکتری توانایی تولید آنزیم‌های آمیلاز، زایلاناز و پکتیناز را داشتند به طوری که تلقیح باکتری‌ها با افزایش تولید آنزیم منجر به افزایش جذب عناصر غذایی توسط گیاه شد. میزان پتاسیم و گوگرد به عنوان عناصر پر مصرف دارای اهمیت بسیار زیادی بود و افزایش تولید آنزیم در گیاه تلقیح‌شده با باکتری‌های اندوفیت به تمامی مراحل رشد رویشی و زایشی آن کمک نمود (Abdalla & McGaw, 2018). نتایج دو طرح نشان می‌دهد که باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گیاه گلرنگ توانایی فعالیت آنزیمی به میزان بالا را دارند.

در مورد فعالیت ضدقارچی جدایه‌های منتخب، طبق نتایج به دست آمده جدایه *Pseudomonas fluorescence* دارای ۳۰/۷۶ درصد و جدایه *Pseudomonas corrugota* دارای ۱۵/۳۸ درصد فعالیت ضدقارچی بودند. در نتیجه جدایه *Pseudomonas fluorescence* دارای بیشترین اثر ضدقارچی در برابر قارچ *Aspergillus niger* بود. در تحقیقی اثر آنتاگونیستی گونه‌های مختلف *Bacillus* را روی *Aspergillus niger*، *fusarium oxysporum* ، *Candida albicans* و *Mucor* بررسی و مشاهده کردند که بین قارچ‌های مختلف از لحاظ مهار رشد تفاوت معنی‌داری وجود داشت به طوری که بیشترین بازدارندگی روی *Aspergillus niger* مشاهده شد (Dalal *et al.*, 2014). در مطالعه صورت گرفته توسط Pavithra و همکاران بر روی گیاه ریحان، ۴۰ جدایه اندوفیتی مختلف از برگ و ساقه گیاه ریحان به دست آمد. فعالیت ضدمیکروبی اندوفیت‌های به دست آمده، در برابر طیفی از قارچ‌های مختلف از جمله *Aspergillus*، *fusarium* و *Alternaria* بررسی شد و بیشترین هاله بازدارنده به اندازه ۲۲-۱۰ میلی‌لیتر در برابر قارچ *Aspergillus niger* مشاهده شد (Pavithra *et al.*, 2012). نتایج تحقیق حاضر با نتایج این محققین مبنی بر پتانسیل بالای باکتری‌های اندوفیت در کنترل قارچ‌های بیماریزای گیاهی مطابقت دارد. بنابراین ترکیبات باکتریایی تولید شده

توسط اندوفیت‌ها گزینه‌های مناسبی را برای حل مشکلات مقاومت‌های دارویی در باکتری‌های بیماریزا فراهم می‌کنند و منابعی با ارزش از عوامل دارویی، برای درمان مؤثر بیماری‌های انسانی، گیاهی و جانوری هستند (Christina *et al.*, 2013, Ek-Ramos *et al.*, 2019).

نتیجه گیری

باکتری های اندوفیت جدا شده از ریشه گیاه گلرنگ در تحقیق حاضر به عنوان عوامل مؤثر در تحریک رشد گیاه در مزرعه پیشنهاد می‌شوند. این قابلیت به دلیل توانایی تولید اکسین و انحلال فسفات و با توجه به مشاهده ارتباط مستقیم بین میزان تولید اکسین و حلالیت فسفات با طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و تولید بذر جوانه‌زده اثبات می‌شود. همچنین، این باکتری‌ها توانایی تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک را داشتند و از این طریق می‌توانند مواد غذایی قابل جذب برای گیاه را تولید نمایند. بیشترین فراوانی جدایه‌ها در تحقیق حاضر مربوط به جنس *Pseudomonas* بود که در میان آنها NMR *Pseudomonas fluorescence* دارای بیشترین اثر ضدقارچی در برابر قارچ *Aspergillus niger* بود. این سویه باکتری علاوه بر اثرات محرک رشد گیاه به دلیل اثر محافظتی در مقابل عفونت‌های قارچی نیز قابل توجه است و برای تولید کود زیستی پیشنهاد می‌شود.

References

Abdalla, M.A. and McGaw, L.J. (2018) Bioprospecting of South African Plants as a Unique Resource for Bioactive Endophytic Microbes. Frontiers in pharmacology, 9: 456-456.

Alikhani, H., Saleh-Rastin, N. and Antoun, H. (2006) Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. Plant and Soil, 287(1/2): 35-41.

Amore, A., Parameswaran, B., Kumar, R., Birolo, L., Vinciguerra, R., Marcolongo, L., Ionata, E., La Cara, F., Pandey, A. and Faraco, V. (2015) Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 90(3): 573-581.

Bahmani, M., Naghdi, R. and Kartoolinejad, D. (2018) Milkweed seedlings tolerance against water stress: Comparison of inoculations with Rhizophagus irregularis and *Pseudomonas putida*. Environmental Technology & Innovation, 10: 111-121.

Balouiri, M., Sadiki, M. and Ibnsouda, S.K. (2016) Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. Journal of Pharmaceutical Analysis, 6(2): 71-79.

Bhange, K., Chaturvedi, V. and Bhatt, R. (2016) Simultaneous production of detergent stable keratinolytic protease, amylase and biosurfactant by *Bacillus subtilis* PF1 using agro industrial waste. Biotechnology Reports, 10: 94-104.

Bolivar-Anillo, H.J., González-Rodríguez, V.E., Cantoral, J.M., García-Sánchez, D., Collado, I.G. and Garrido, C. (2021) Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis*, Isolated from Zea mays, as Potential Biocontrol Agent against Botrytis cinerea. Biology, 10(6): 492.

Chakradhari, S., Perkons, I., Mišina, I., Sipeniece, E., Radziejewska-Kubzdela, E., Grygier, A., Rudzińska, M., Patel, K.S., Radzimirska-Graczyk, M. and Górnaś, P. (2020) Profiling of the bioactive components of safflower seeds and seed oil: cultivated (*Carthamus tinctorius* L.) vs. wild (*Carthamus oxyacantha* M. Bieb.). European Food Research and Technology, 246(3): 449-459.

Christina, A., Christapher, V. and Bhore, S.J. (2013) Endophytic bacteria as a source of novel antibiotics: An overview. Pharmacognosy Reviews, 7(13): 11-16.

Dalal, J., Kulkarni, N. and Bodhankar, M. (2014) Antagonistic and plant growth promoting potentials of indigenous endophytic fungi of soybean (Glycine max (L) Merril). Indian Journal of Advances in Plant Research, 7(1): 9-16.

Dang, H., Zhang, T., Li, G., Mu, Y., Lv, X., Wang, Z. and Zhuang, L. (2020) Root-associated endophytic bacterial community composition and structure of three medicinal licorices and their changes with the growing year. BMC Microbiology, 20(291): 1-18.

Duan, J.L., Li, X.J., Gao, J.M., Wang, D.S., Yan, Y. and Xue, Q.-H. (2013) Isolation and identification of endophytic bacteria from root tissues of *Salvia miltiorrhiza* Bge. and determination of their bioactivities. Annals of Microbiology, 63(4): 1501-1512.

Ek-Ramos, M.J., Gomez-Flores, R., Orozco-Flores, A.A., Rodríguez-Padilla, C., González-Ochoa, G. and Tamez-Guerra, P. (2019) Bioactive Products From Plant-Endophytic Gram-Positive Bacteria. Frontiers in Microbiology, 10(463): 1-12.

Fadiji, A.E. and Babalola, O.O. (2020) Elucidating Mechanisms of Endophytes Used in Plant Protection and Other Bioactivities With Multifunctional Prospects. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8(467): 1-20.

Fouda, A., Eid, A., Elsaied, A., El-Belely, E., Barghoth, M., Azab, E., Gobouri, A. and Hassan, S. (2021) Plant Growth-Promoting Endophytic Bacterial Community Inhabiting the Leaves of *Pulicaria incisa* (Lam.) DC Inherent to Arid Regions. Plants 10(1): 76.

Gamalero, E., Favale, N., Bona, E., Novello, G., Cesaro, P., Massa, N., Glick, B.R., Orozco-Mosqueda, M.d.C., Berta, G. and Lingua, G. (2020) Screening of Bacterial Endophytes Able to Promote Plant Growth and Increase Salinity Tolerance. Applied Sciences , 10(17): 5767.

Glickmann, E. and Dessaux, Y. (1995) A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology Journal, 61(2): 793-796.

Hardoim, P., van Overbeek, L., Berg, G., Pirttilä, A., Compant, S., Campisano, A., Döring, M. and Sessitsch, A. (2015) The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 79(3): 293-320.

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

Lack, S., Ghooshchi, F. and Hadi, H. (2013) The Effect of Crop Growth Enhancer Bacteria on Yield and Yield Components of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). International Journal of Farming and Allied Sciences, 2(20): 809-815.

Liu, H., Carvalhais, L.C., Crawford, M., Singh, E., Dennis, P.G., Pieterse, C.M. and Schenk, P.M. (2017) Inner Plant Values: Diversity, Colonization and Benefits from Endophytic Bacteria. Microbiology, 8(2552): 1-17.

Nahon, C., Lehman, D. and Manuselis, G. (2015) Textbook of Diagnostic Microbiology, Saundera Elsevier.

Naserzadeh, Y., Kartoolinejad, D., Mahmoudi, N., Zargar, M., Pakina, E., Heydari, M., Astarkhanova, T. and Kavhiza, N.J. (2018) Nine strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida* : Effects on growth indices, seed and yield production of Carthamus tinctorius L. Research on crops, 19(4): 622-632.

Orozco-Mosqueda, M.d.C., Flores, A., Rojas-Sánchez, B., Urtis-Flores, C.A., Morales-Cedeño, L.R., Valencia-Marin, M.F., Chávez-Avila, S., Rojas-Solis, D. and Santoyo, G. (2021) Plant Growth-Promoting Bacteria as Bioinoculants: Attributes and Challenges for Sustainable Crop Improvement. Agronomy, 11(6): 1167.

Pavithra, N., Sathish, L. and Ananda, K. (2012) Antimicrobial and enzyme activity of endophytic fungi isolated from Tulsi. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 16(12): 1-6.

Reyad, A., Radwan, T., Hemida, K., Al-Qasee, N. and Ali, R. (2017) Salt tolerant endophytic bacteria from carthamus tinctorius and their role in plant salt tolerance improvement. International Journal of Current Research, 3(12): 1467-1488.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M. and Glick, B.R. (2016) Plant growth-promoting bacterial endophytes. Microbiology Research, 183: 92-99.

Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A. (2013) Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus, 2: 587-587.

Singh, R. and Dubey, A.K. (2018) Diversity and Applications of Endophytic Actinobacteria of Plants in Special and Other Ecological Niches Frontiers in Microbiology, 9(1767): 1-10.

Sogandi, S. and Nilasari, P. (2019) Isolation and molecular identification of Endophytic bacteria from Noni fruits (*Morinda citrifolia* l.) and their antibacterial activity. Earth and environmental sciences, 299: 012020.

Suhandono, S., Kusumawardhani, M.K. and Aditiawati, P. (2016) Isolation and Molecular Identification of Endophytic Bacteria From Rambutan Fruits (*Nephelium lappaceum* L.) Cultivar Binjai. HAYATI Journal of Biosciences, 23(1): 39-44.

Sun, L., Wang, X. and Li, Y. (2016) Increased plant growth and copper uptake of host and non-host plants by metal-resistant and plant growth-promoting endophytic bacteria. International Journal of Phytoremediation, 18(5): 494-501.

Torres-Rubio, M.G., Valencia-Plata, S.A., Bernal-Castillo, J. and Martínez-Nieto, P. (2000) Isolation of Enterobacteria, Azotobacter sp. and Pseudomonas sp., producers of indole-3-acetic acid and siderophores, from Colombian rice rhizosphere. Revista Latinoamericana de Microbiología, 42: 171-176.

Turgumbayeva, A.A., Ustenova, G.O., Yeskalieva, B.K., Ramazanova, B.A., Rahimov ,K.D., Aisa, H. and Juszkiewicz, K.T. (2018) Volatile oil composition of *Carthamus tinctorius* L. flowers grown in Kazakhstan. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 25(1): 87-89.

Walitang, D.I., Kim, K., Madhaiyan, M., Kim, Y.K., Kang, Y. and Sa, T. (2017) Characterizing endophytic competence and plant growth promotion of bacterial endophytes inhabiting the seed endosphere of Rice. BMC Microbiology, 17(1): 209.

Yousefi , S., Kartoolinejad, D., Bahmani, M. and Naghdi, R. (2017) Salinity tolerance of *Dodonaea viscosa* L. inoculated with plant growth-promoting rhizobacteria: assessed based on seed germination and seedling growth characteristics. Folia Oecologica, 44(1): 20-27.

Isolation and identification of endophtic bacteria from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) root and investigating their effect on seed germination and plant growth

Sh. Nazarpour[1], M. Mohammadi-Sichani[2]*, M. Ranjbar[3]

Received:2021.9.18
Accepted: 2022.07.02

Abstract

Background: The growth-promoting endophytic bacteria are highly regarded as bio-fertilizers. The aim of this study was to identify safflower endophytic bacteria and to detect their effects on seed germination and plant growth.

Methods: Endophytic strains were isolated from safflower roots and their auxin production and phosphate solubility were evaluated. The effects of isolates were evaluated on the safflower seed germination and growth. Also, the activity of enzymes produced by the selected isolates were investigated. The antifungal effects of endophytic isolates were also evaluated by pour plate method.

Results: Endophytic bacteria including *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas brassicacearum*, and *Bacillus megatrium* were isolated from safflower roots. In the treatments with *Bacillus megatrium* NMR isolate, the mean of germinated seeds by exposure to the concentration of 10^5 cfu/ml was significantly higher than concentration of 10^8 cfu/ml. Coleoptile length and root length in the control group were significantly shorter than the treatment groups. There was a direct relationship between the amount of auxin produced by endophytic isolates and their ability for phosphate solubility with increasing safflower coleoptile and root length, and germinated seeds. *Pseudomonas brasicacearum* NMR isolate produced all the four enzymes, pectinase, amylase, protease and xylanase. The *Pseudomonas fluorescence* NMR with the most effectiveness inhibited the growth of *Aspergillus niger* by 30.76%.

Conclusion: The isolated endophytic bacteria in the present study are suggested as stimulants of plant growth in the field due to their ability to produce auxin and to dissolve phosphate and their direct effect on safflower growth factors.

Key words: Antifungal effect, Growth-promoting bacteria, Plant root, Safflower

---

1MSc in Microbiology, Islamic Azad University, Falavarjan Branch, Isfahan, Iran
2Department of Microbiology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
3Department of Biology, Falavarjan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran