مجله دنیای میکروب‌ها
سال هشتم شماره چهارم (پیاپی ۲۵) زمستان ۱۳۹۴
صفحات ۲۹۸-۲۹۰

Original Article

# جداسازی و شناسایی مولکولی *لیزنی باسیلوس ماکروئیدس* از ریشه گندم و بررسی فعالیت ضد قارچی آن علیه گونه های تریکودرمایی

**محبوبه چوپان وامرزانی*[۱]، حمیدرضا پردلی[۲]، مجید مقبلی[۳]**

[۱] کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروب شناسی، [۲]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد گرگان، دانشکده علوم زیستی, گروه میکروب شناسی، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروب شناسی

## چکیده

*سابقه و هدف:* باکتری *لیزنی باسیلوس* باکتری اندوفتیک است که از گیاه در برابر شرایط فیزیولوژیکی و زیست محیطی حفاظت می نماید. این مطالعه با هدف جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری اندوفیت *لیزنی باسیلوس ماکروئیدس* از ریشه گندم و بررسی فعالیت ضد قارچی آن علیه گونه های *تریکودرمایی* انجام شد.

*مواد و روش ها:* به منظور جداسازی باکتری های اندوفتیک از عصاره ریشه و ساقه گندم های کشت شده در مناطق مختلف استان مازندران و گلستان استفاده گردید. فعالیت ضد قارچی آن ها با روش کشت متقابل بر روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از استخراج DNA ژنومی، از روش PCR به منظور تکثیر ژن *16S rRNA* استفاده گردید. به منظور شناسایی دقیق باکتری جداسازی شده، محصول PCR تعیین توالی و ترادف بازی آن *BLAST* گردید.

*یافته ها:* باکتری جداسازی شده قادر به مهار رشد قارچ های بیوکنترلی بود. نتایج تعیین توالی نشان داد که باکتری جداسازی شده متعلق به جنس *لیزنی باسیلوس* است و شباهت ۹۹ درصدی به گونه *لیزنی باسیلوس ماکروئیدس* 1W دارد.

*نتیجه گیری:* این مطالعه اولین گزارش جداسازی *لیزنی باسیلوس* از گیاه تحت عنوان اندوفتیک است. باکتری اندوفیت جداسازی شده در این بررسی می تواند به منظور استخراج، شناسایی و به کارگیری متابولیت های مهاری آن در طراحی و تولید داروهای ضد قارچی مورد استفاده قرار گیرد.

*واژگان کلیدی:* *لیزنی باسیلوس ماکروئیدس*، اندوفتیک، آنتاگونیست، ژن *16S rRNA*.

دریافت مقاله: اردیبهشت ماه ۹۴ پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۴

## مقدمه

امروزه باکتری های اندوفیتیک در تازه ترین تعریف به عنوان باکتری یا قارچی شناخته می شوند که برای تمام یا بخشی از زندگی خود به بافت های گیاهان زنده حمله می کنند. در معنای تجربی، اندوفیت ها باکتری های جدا شده از درون گیاه بوده که هیچ مشخصه یا نشانه ای از بیماری را ایجاد نمی نمایند (۱). امروزه باکتری های اندوفیتیک در ۳۰ کلاس، ۱۶ خانواده و با بیش از ۲۰۰ جنس باکتری وجود دارند (۲). *لیزنی باسیلوس* (*Lysinibacillus*) یک باسیل گرم مثبت مزوفیل از خانواده باسیلاسه است که اسپور مقاوم به حرارت، مواد شیمیایی و اشعه *UV* تولید می کند. در گذشته در جنس *باسیلوس* قرار می گرفت. اما در سال ۲۰۰۷ بر اساس rRNA در جنس جدید *لیزنی باسیلوس* قرار گرفت. *لیزنی باسیلوس* به جای DAP (دی آمینو پایمیلیک اسید) دارای لیزین و آسپارتات در دیواره سلولی است. این باکتری به دلیل تولید توکسین های ضد حشره اهمیت زیادی دارد و به عنوان ابزاری مهم در بیوکنترل حشرات مورد استفاده قرار می گیرد. *لیزنی باسیلوس* در خاک یافت شده و از بافت های گیاهی مختلف به عنوان

*) آدرس برای مکاتبه: دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، گروه میکروب شناسی.
تلفن: ۰۹۱۱۲۵۸۰۶۲۵ پست الکترونیک: mahboobeh.mehrnia@yahoo.com

یک باکتری اندوفیتیک جدید جداسازی شده است (۳ و ٤). میکروارگانیسم های اندوفیت به عنوان ساپروفیت در نظر گرفته نمی شوند. زیرا آنها همراه با بافت زنده هستند و ممکن است به رفاه گیاه نیز کمک نمایند. همچنین به نظر می رسد که فرم های دیگر میکروبی مانند *مایکوپلاسما* (*Mycoplasma*) و *آرکی باکتر* (*Archaebacteria*) که اغلب در گیاه وجود دارند نیز جز اندوفیتیک ها باشند. اما تاکنون مدرکی که نشان دهنده این نظریه باشد وجود ندارد. باکتری های اندوفیتیک در یک جایگاه اکولوژیکی مشابه عوامل بیماری زا استقرار می یابند. اما با میکروارگانیسم های بیماریزای گیاه تفاوت دارند. زیرا در گیاه ایجاد بیماری نمی کنند و با میکروارگانیسم های اپی فیت که در سطح بافت و اندام گیاهی زندگی می کنند نیز متفاوت هستند (۵). جمعیت اندوفیتیک ها به عنوان زیر مجموعه ای از جمعیت میکروب های ریزوسفر در نظر گرفته می شوند. همچنین تراکم جمعیت اندوفیت ها در مقایسه با باکتری های ریزوسفر و باکتری های بیماری زای گیاهی بسیار کم می باشد (٦). جمعیت اندوفیت ها توسط برخی از فاکتورهای زیستی و محیطی مانند نوع گیاه، سن گیاه، نوع بافت، زمان نمونه برداری و شرایط محیطی خاک تحت تاثیر قرار می گیرند (۷). علاوه بر این ژنوتیپ گیاه نیز می تواند جمعیت اندوفیت ها را در شرایط کلون شدن تحت تاثیر قرار دهد (۸ و ۹). استرس های پاتوژنی مانند باکتری های بیماری زای گیاه، به طور مثال *اروینیا کاراتوورا* (*Erwinia carotovora*) نیز اثر قابل ملاحظه ای در جمعیت اندوفیت ها نسبت به ژنوتیپ گیاه دارند (۱۰). باکتری های اندوفیتیک می توانند رشد گیاه را به طور مستقیم از طریق تثبیت بیولوژیکی نیتروژن، تولید هورمون گیاهی، انحلال فسفات، تولید سیدروفور و جلوگیری از سنتز اتیلن در پاسخ به عوامل حیاتی (زنده و غیر زنده) یا به طور غیر مستقیم از طریق القای مقاومت به عوامل بیماری زا افزایش دهند (۱۱). از اهمیت و فواید دیگر وجود این باکتری ها در طبیعت می توان به توانایی آن ها در تولید موادی مانند ویتامین $B_1$، $B_{12}$ و آنتی بیوتیک اشاره نمود (۹). از آنجایی که باکتری های اندوفیتیک قوی ترین سد دفاعی گیاه محسوب می شوند حتی تصور می شود که بتوانند بر روی عوامل بیوکنترلی مانند گونه های مختلف قارچ *تریکودرما* نیز اثر بگذارند.

هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری اندوفیت *لیزنی باسیلوس ماکروئیدس* از ریشه گندم و بررسی فعالیت ضد قارچی آن علیه گونه های تریکودرمایی بود.

## مواد و روش ها

*الف) جداسازی باکتری اندوفتیک و شرایط رشد:* در این مطالعه از عصاره ریشه و ساقه گندم های کشت شده در مناطق مختلف استان مازندران و گلستان استفاده گردید. به منظور جداسازی باکتری اندوفیتیک از روش کان (Conn) و همکاران استفاده گردید (۱۲). ابتدا چند گیاه سالم گندم به آزمایشگاه منتقل و گل و لای آنها زدوده شد. سپس به وسیله اسکالپل استریل به قطعات ۱ سانتی متری برش داده شدند. این قطعات به مدت ۱ دقیقه در بافر (۱۲٤ mM $Na_2Hpo_4$.NAP $H_2O$) غوطه ور گردیدند. سپس با آب مقطر استریل شست و شو داده شدند. در ادامه قطعات بریده شده به ترتیب در اتانول ۹۹ درصد به مدت ٦۰ ثانیه، هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ٦ دقیقه و اتانول ۹۹ درصد به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده شدند. در انتها چندین بار عمل شست و شو با آب مقطر استریل صورت گرفت تا تمامی مواد ضدعفونی کننده حذف گردند.

ساقه ها و ریشه ها در هاون کوبیده شدند تا عصاره آنها خارج گردد و به صورت یک سوسپانسیون همگن درآیند. این سوسپانسیون به کمک لوپ استریل در سطح پلیت حاوی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و به مدت ۷۲-۲٤ ساعت در دمای ۲۷ درجه سلیسیوس نگهداری گردید. در نهایت کلنی های باکتریایی متفاوت رشد یافته خالص سازی شدند.

*ب) بررسی میکروسکوپی و ماکروسکوپی کلنی خالص:* کلنی های خالص از نظر ویژگی های ماکروسکوپی مانند: رنگ، اندازه، شکل، حاشیه، برجستگی، قوام و بو مورد ارزیابی قرار

گرفتند. سپس به کمک رنگ آمیزی گرم، کلنی ها از نظر خواص میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند. مجموعه ای از قابلیت های باکتری مانند تولید اسید از قند، $H_2S$، بررسی آزمون های کاتالاز، اکسیداز، حرکت، سیمون سیترات، MR/VP، هیدرولیز ژلاتین، نشاسته و کازئین بر اساس جداول کتاب برگی بررسی شدند (۱۳).

*ج) تهیه جدایه قارچی:* در مطالعه حاضر به منظور ارزیابی ترکیبات ضد قارچی تولید شده توسط باکتری اندوفیت جداسازی شده از گیاه گندم از سویه های قارچی *تریکودرما وریده* (*Tricoderma virida* 222-35)، *تریکودرما هاریزانوم* (*Tricoderma harizanum* 115) و *تریکودرما آسپریلوم* (*Tricoderma asperellum* Fyt 222.2) تهیه شده از مرکز پژوهش های علمی و صنعتی ایران استفاده گردید.

*د) ارزیابی فعالیت ضد قارچی باکتری اندوفتیک علیه گونه های تریکودرمایی:* در این روش قارچ های بیوکنترلی به صورت جداگانه در محیط PDA کشت داده شدند. قطر کلنی (شاهد) پس از رشد اندازه گیری شد. سپس فاصله بین مرکز کلنی قارچ تا لبه باکتری آنتاگونیست که به صورت خطی و عمود برهم کشت داده شدند (تیمار) نیز اندازه گیری و بر اساس فرمول ارزیابی هاله عدم رشد، میزان مهار رشدی آن ها مورد ارزیابی قرار گرفت (۱٤ و ۱۵).

$$\text{میزان مهار رشد} = \frac{\text{قطر کلنی تیمار} - \text{قطر کلنی شاهد}}{\text{قطر کلنی شاهد}}$$

*ه) تولید آنزیم β-۱و٤ گلوکاناز (سلولاز):* تولید یا عدم تولید آنزیم سلولاز توسط باکتری مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور محیط کشت کربوکسی متیل سلولز آگار (CMC) یک درصد شامل ۳۲/۲ گرم نوترینت آگار و ۱ گرم کربوکسی متیل سلولز در یک لیتر آب مقطر تهیه گردید. سپس باکتری به صورت خطی بر روی محیط کشت داده شد و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری گردید. ۱۵ دقیقه پس از افزودن معرف قرمزکنگو بر روی کلنی باکتری، عمل رنگ بری به کمک محلول نمکی به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری معیاری برای تولید آنزیم سلولاز توسط باکتری می باشد (۱٦).

*و) استخراج DNA و واکنش زنجیره ای پلی مراز:* به منظور استخراج DNA های ژنومی باکتری از کیت استخراج DNA سیناژن استفاده شد. کمیت و کیفیت DNA جداسازی شده با الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.

در این مطالعه به منظور تکثیر ژن *16srRNA* از پرایمرهای ab$_1$.F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و ab$_1$-R 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' استفاده گردید (۱۷).

واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر شامل ۵ میکرولیتر PCR buffer (10x)، ۱/۵ میلی مولار $Mgcl_2$، ۰/۲ میلی مولار dNTPs، ۱/۵ واحد آنزیم DNA پلی مراز Taq، ۰/۲۵ میکرومولار از هر پرایمر و ۵ میکرولیتر از نمونه DNA انجام گرفت. سپس واکنش PCR با شرایط دمایی ۵ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس و در ادامه ٤۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای ٦۰ درجه سلیسیوس به مدت ۱ دقیقه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱/۵ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس محصول PCR همراه با سایز مارکر به ژل آگارز ۱ درصد حاوی بافر اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله دستگاه BioDoc Analyze (Biometra) مورد ارزیابی قرار گرفت.

*ز) تعیین توالی:* به منظور شناسایی کامل باکتری جداسازی شده محصول PCR خالص سازی شده به وسیله شرکت ماکروژن (کره جنوبی) تعیین توالی گردید. سپس توالی به دست آمده با استفاده از نرم افزار کروماس بررسی و در بانک جهانی ژن NCBI بلاست گردید. در نهایت با توجه به بلاست توالی به دست آمده و مقایسه آن با توالی های *16srRNA* موجود در

بانک جهانی ژن بیشترین شباهت ها بررسی و باکتری مورد نظر تا حد سویه شناسایی گردید.

*ح) تجزیه و تحلیل داده ها:* ارزیابی فعالیت ضد قارچی باکتری اندوفتیک بر علیه گونه های *تریکودرمایی* به صورت فاکتوریل و دو فاکتور (فاکتور اول: ٤ زمان (٢٤، ٤٨، ٧٢ و ٩٦) و فاکتور دوم: ٣ نوع قارچ (*تریکودرما وریده*، *تریکودرما آسپریلوم* و *تریکودرما هاریزانوم*) در غالب طرح کاملاً تصادفی با ٣ تکرار اجرا گردید. داده های حاصل از آزمایش توسط نرم افزار آماری *SAS*، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین ها توسط آزمون دانکن در سطح احتمال ٥ درصد انجام گرفت. رسم نمودار توسط نرم افزار *Excel* انجام شد.

## یافته ها

*الف) ویژگی میکروسکوپی و ماکروسکوپی:* پس از کشت سوسپانسیون باکتری بر روی محیط نوترینت آگار کلنی به صورت سفید مایل به شیری، مات، کناره صاف و سطح صاف ایجاد گردید. ویژگی های ماکروسکوپی و میکروسکوپی به دست آمده از کشت خالص و رنگ آمیزی گرم نشان داد که باکتری میله ای، گرم مثبت و اسپوردار می باشد و تنها نتایج تست کاتالاز و حرکت مثبت بودند.

**جدول ١:** مقایسه میانگین اثر زمان بر روی قطر هاله.

| زمان (ساعت) | میانگین (میلی متر) | گروه بندی |
|---|---|---|
| ٢٤ | ٠/٦٦٦٦ | **c** |
| ٤٨ | ٢/٦٦٦٦ | **b** |
| ٧٢ | ٣ | **ab** |
| ٩٦ | ٣/٦٦٦٦ | **a** |

* تیمارهای دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ٥ درصد اختلاف معنی دار ندارند.

*ب) ارزیابی فعالیت ضد قارچی باکتری اندوفتیک علیه گونه های تریکودرمایی:* نتایج حاصل از کشت باکتری در مجاورت قارچ های مورد بررسی نشان داد که باکتری یاد شده قادر به مهار رشد هر ٣ گونه *تریکودرمایی* می باشد. با استفاده از آزمون تجزیه واریانس مشخص گردید که اثر زمان در سطح احتمال ١ درصد معنی دار می باشد. به عبارت دیگر زمان بر روی قطر هاله عدم رشد تاثیر گذار بوده است. به طوری که بیشترین قطر هاله در زمان ٩٦ ساعت با میانگین ٣/٦٦٦٦ میلی متر و کمترین مقدار در زمان ٢٤ ساعت با میانگین ٠/٦٦٦٦ میلی متر محاسبه شد (جدول ١).

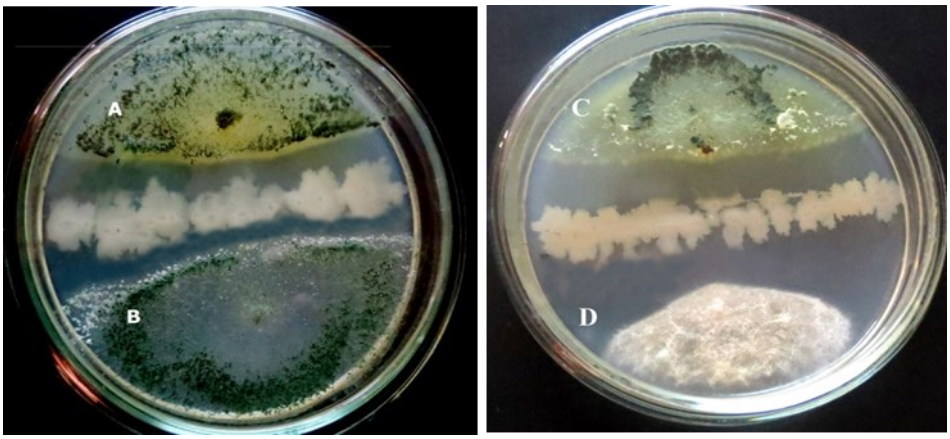
همچنین اثر قارچ در سطح احتمال ١ درصد معنی دار بود. به عبارت دیگر از نظر آماری بین ٣ گونه قارچ از نظر تولید سطح هاله اختلاف معنی داری وجود داشت. به طوری که بیشترین میزان رشد با توجه به نمودار با میانگین ٥ در گونه *تریکودرما آسپریلوم* و کمترین میزان رشد با میانگین ٠/٧٥ در *ترکودرما وریده* مشاهده گردید. همچنین اثر متقابل گونه قارچ و زمان بر روی میزان سطح هاله در سطح احتمال ٥ درصد معنی دار بود. به عبارت دیگر بیشترین اثر متقابل را *ترکودرما آسپریلوم* و کمترین اثر متقابل را *تریکودرما وریده* و *تریکودرما هاریزانوم* به خود اختصاص دادند (جدول ٢). در نهایت با استفاده از آزمون رگرسیون مشخص گردید که با افزایش هر ساعت به زمان مورد نظر، قطر هاله به میزان ٠/٩٣٣٣ میلی متر افزایش می یابد. در شکل ١ نیز هاله عدم رشد به صورت کشت متقابل آورده شده است.

*ج) قابلیت تولید سلولاز:* در بررسی به عمل آمده باکتری توانایی تولید سلولاز را از خود نشان نداد.

**جدول ٢:** مقایسه میانگین اثر متقابل زمان (ساعت) و قارچ بر روی قطر هاله عدم رشد.

| *تریکودرما آسپریلوم* | | *تریکودرما هاریزانوم* | | *تریکودرما وریده* | | اثر متقابل |
|---|---|---|---|---|---|---|
| میانگین | گروه بندی | میانگین | گروه بندی | میانگین | گروه بندی | زمان*قارچ |
| ٢ | cd | ٠ | e | ٠ | e | ٢٤ |
| ٥ | b | ٢ | cd | ١ | de | ٤٨ |
| ٦ | ab | ٢ | cd | ١ | de | ٧٢ |
| ٧ | a | ٣ | c | ١ | de | ٩٦ |

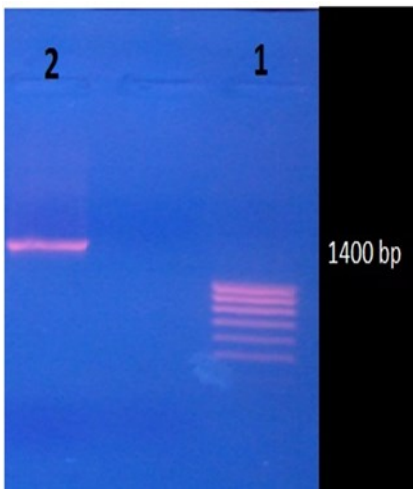
* تیمارهای دارای حروف مشترک بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معنی دار ندارند.




**شکل ۱:** فعالیت ضد قارچی *لیزنی باسیلوس ماکروئیدس* به روش کشت متقابل علیه. A) *تریکودرما وریده* B) *تریکودرما هاریزانوم* C) *تریکودرما آسپریلوم* D) *فوزاریوم مونیلی فرم*.

د) *PCR* و *تعیین توالی:* نتایج PCR ژن *16S rRNA*، تکثیر قطعه ۱٤۰۰ جفت بازی را نشان داد (شکل ۲).

نتایج به دست آمده از آنالیز و بلاست توالی *16S rRNA* باکتری جداسازی شده نشان داد که این باکتری متعلق به جنس *لیزنی باسیلوس* است و دارای شباهت ۹۹ درصد به گونه *ماکروئیدس* 1W می باشد. بنابراین با توجه به عدم شباهت ۱۰۰ درصد، باکتری جداسازی شده به عنوان سویه جدید معرفی گردید. این باکتری به عنوان *لیزنی باسیلوس ماکروئیدس* سویه Tethys نام گذاری و در بانک جهانی ژن ثبت گردید.




**شکل ۲:** الکتروفورز محصول PCR. ستون ۱) مارکر، ستون ۲) قطعه ۱٤۰۰ جفت بازی حاصل از تکثیر ژن *16S rRNA*.

## بحث

باکتری های اندوفتیک تقریبا در بیشتر گیاهان مطالعه شده یافت شده اند (۱۸). گزارشات زیادی در رابطه با باکتری های اندوفتیک و گیاهانی که در آن ساکن اند مانند گوجه فرنگی، سیب زمینی، گندم، ذرت، پنبه، کلزا، برنج، سویا و غیره وجود دارد (۱۹ و ۲۰). گاهی این میکروارگانیسم ها می توانند به عنوان عوامل بیوکنترلی در برابر عوامل بیماری زا، بهبود باروری و توسعه گیاهان بدون هیچ آسیب محیطی عمل نمایند (۲۱). این میکروارگانیسم ها منبع جدیدی از ترکیبات فعال زیستی و شیمیایی با پتانسیل بالقوه برای بهره برداری در پزشکی، کشاورزی و در عرصه های صنعتی می باشند. به طوری که امروزه مطالعات زیادی بر روی آن ها انجام شده است (۲۲). بر همین اساس در تحقیق حاضر به جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های اندوفتیک و بررسی فعالیت ضد قارچی آن ها علیه گونه های *تریکودرمایی* به روش کشت متقابل پرداخته شد. در پژوهش حاضر *لیزنی باسیلوس ماکروئیدس* برای اولین بار به عنوان باکتری اندوفتیک از گیاه گندم گزارش شد. در حالی که در مطالعات مختلف *لیزنی باسیلوس ماکروئیدس* از کود گاو، ریزوسفر و گیاه پوسیده در آب جداسازی شده است (۲۳).

تیان (Tian) و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه ای توانستند ۲٤٤ گونه باکتری اندوفتیک را از یک گیاه دارویی با عنوان

*پلیگونوم کاسپیداتوم* (*Polygonum cuspidatum*) جداسازی نمایند. در این بررسی گونه های مختلف باکتریایی مانند *لیزنی باسیلوس*، *پانی باسیلوس* (*Paenibacillus*)، *سودوموناس*، *باسیلوس*، *استرپتومایسس* (*Streptomyces*)، *پروویدنشیا* (*Providencia*)، *ریزوبیوم* (*Rhizobium*)، *لوکوباکتر* (*Leucobacter*)، *براکی باکتریوم* (*Brachybacterium*) و *مایکوباکتریوم* (*Mycobacterium*) جداسازی گردید (۲٤). در مطالعه حاضر (که این مقاله بخشی از نتایج طرح تحقیقاتی می باشد) با جداسازی جنس های مختلف باکتریایی (*باسیلوس*، *سودوموناس*، *استافیلوکوکوس* و *میکروکوکوس*) می توان این موضوع که بیشتر اندوفیت های مورد مطالعه متعلق به ۳ رده (*آسینتوباکتر*، *پروتئوباکتر* و *فیرمیکوتیس*) می باشند را تایید نمود.

مقایسه تحقیقات گذشته و حال بیانگر آن است که باکتری های اندوفتیک جداسازی شده از بافت گیاهان مختلف از نظر تنوع و پراکندگی متفاوت می باشند. همچنین شرایط آب و هوایی، نوع محیط کشت انتخابی، نوع عامل بیماری زای گیاه مورد آزمایش و ماده تولید شده توسط باکتری های اندوفتیک می تواند با یکدیگر متفاوت باشند (۱ و ۲۵). بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر باکتری های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بیشتر جداسازی شده اند. این یافته در تحقیقات انجام شده توسط سایر محققین نیز تایید شده است (۲٦).

در حال حاضر ۱۰ گونه از جنس *لیزنی باسیلوس* شامل *لیزنی باسیلوس بورونی تولرانس* (*L. boronitolerans*)، *لیزنی باسیلوس فوزی فورمیس* (*L. fusiformis*)، *لیزنی باسیلوس ماکروئیدس* (*L. macroides*)، *لیزنی باسیلوس مانگیفریهامی* (*L. mangiferihumi*)، *لیزنی باسیلوس ماسیلنسیس* (*L. massiliensis*)، *لیزنی باسیلوس اودیسئی* (*L. odyssey*)، *لیزنی باسیلوس پارویبورونیکاپینس* (*L. parviboronicapiens*)، *لیزنی باسیلوس سیندورینسیس* (*L. sinduriensis*)، *لیزنی باسیلوس اسفائریکوس* (*L. sphaericus*) و *لیزنی باسیلوس زیلانیتیکوس* (*L. xylanilyticus*) گزارش شده است (۲۷). در این پژوهش به منظور شناسایی دقیق باکتری جداسازی شده از روش تعیین توالی ژن *16S rRNA* استفاده گردید. نتایج به دست آمده از آنالیز و بلاست نشان داد که این باکتری دارای شباهت ۹۹ درصد به گونه *لیزنی باسیلوس ماکروئیدس* 1W می باشد. مشخصات میکروسکوپی و ماکروسکوپی نیز تایید کننده نوع گونه می باشد.

## نتیجه گیری

این مطالعه اولین گزارش جداسازی *لیزنی باسیلوس* از گیاه تحت عنوان اندوفتیک است. نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان می دهد که می توان از *لیزنی باسیلوس ماکروئیدس* به دلیل قدرت بالا در کنترل قارچ های بیوکنترلی که خود کنترل کننده عوامل بیماری زای قارچی بوده به عنوان یک گزینه مناسب در کنترل این عوامل استفاده نمود.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاون محترم پژوهشی و کارکنان آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی گرگان به دلیل همکاری صمیمانه در اجرای این پژوهش کمال امتنان را دارند.

## References

1. Wilson D. Endophyte the evolution of a term and clarification of its use and definition, Oikos, 1995; 73: 274-276.
2. Malfanova NV. Endophytic bacteria with plant growth promoting and biocontrol abilities. Leiden University dissertation. 2013.
3. Ahmed I, Yokota A, Yamazoe A, Fujiwara T. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen.

nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. Int J Syst Evol Microbiol. 2007; 57: 1117-1125.

**4.** Miwa H, Ahmed I, Yokota A, Fujiwara T. *Lysinibacillus parviboronicapiens* sp. nov., a low-boron-containing bacterium isolated from soil. Int J Syst Evol Microbiol. 2009; 59: 1427-1432.

**5.** Rodriguez-Kabana R, Kloepper JW, Quadt-Hallmann A, Mahaffee WF, Kloepper JW. Bacterial endophytes in agricultural crops. Can J Microbiol. 1997; 43: 895-914.

**6.** Christina A, Christapher V, Bhore SJ. Endophytic bactrria as a source of novel antibiotic: An overview. Pharmacogn Rev. 2013; 7(13): 11-16.

**7.** Coombs J, Franco Ch. Isolation and identification of *Actinobacteria* from surface-sterilized wheat roots. Appl Environ Microbiol. 2003; 69: 5303-5308.

**8.** Smith KP, Goodman RM. Host variation for interations with beneficial plant-associated microbes. Ann Rev Phytopathol. 1999; 37: 473-491.

**9.** Stępniewska Z, Kuźniar A. Endophytic microorganisms promising applications in bioremediation of greenhouse gases. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97(22): 9589-9596.

**10.** Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, Sessitsch A. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. Atroseptica. Appl Environ Microbiol. 2002; 68: 2261-2268.

**11.** Jha PN, Gupta G, Jha P, Mehrotra R. Association of rhizospheric/endophytic bacteria with plants: a potential gateway to sustainable agriculture. J Agric Sci. 2013; 3(2): 73-84.

**12.** Conn VM. Molecular interactions of endophytic *Actinobacteria* in wheat and *Arabidopsis*, department of medical biotechnology school of medicine. Faculty of health sciences, Flinders University. 2005.

**13.** Garrity GM. Bergeys manual of systematic bacteriology. 2ed. Springer. New York. 2002.

**14.** Mohapatra BR, Bapuji M, Sree A. Antifungal efficacy of bacteria isolated from marine sedentary organisms. Folia Microbiol. 2002; 47(1): 51-55.

**15.** Prachyakij P, Schnurer J, Charernjiratrakul W, Kantachote D. Selection and identification of lactic acid bacteria that inhibit yeast contaminants isolated from fermented plant beverages. J Sci Technol. 2007; 29(2): 211-218.

**16.** Irfan M, Safdar A, Syed Q, Nadeem M. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. Turk J Biochem. 2012; 37(3): 287-293.

**17.** Marin M, Garcia-Lechuz JM, Alonso P, Villanueva M, Alcal L, Gimeno M, Cercenado E, Snchez-Somolinos M, Radice C, Bouza E. Role of universal *16S rRNA* gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. J Clin Microbiol. 2011; 50(3): 583-589.

**18.** Ryan RP, Germaine K, Franksand A, Ryan DJ. Bacterial endophytes: recent developments and applications FEMS. Microbiol Lett Plant Sci. 2008; 278(1): 1-9.

**20.** Sturz AV, Christie BR, Nowak J. Bacterial endophytes: Potential role in developing

sustainable systems of crop production. Crit Rev Plant Sci. 2000; 19(24): 1-30.

**20.** Rosenblueth M, Martinez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts, USA Phytopatholl Soc. 2006; 19(8): 827-837.

**21.** Cherry AJ. Development of biopesticide registration and risk assessment guidelines for Ghana. Natural Resources Institute University of Greenwich , 2005; 2: 1-5.

**22.** Haggag WM. Role of entophytic microorganisms in biocontrol of plant diseases. Life Sci J. 2010; 7(2): 57-62.

**23.** Dinsdale AE, Heyrman J, Schumann P, Landschoot AV, Logan N, Vos PD. *Lysinibacillus* macroides sp. Nov ; nom. Rev. 2012; 62(5): 1121-1127.

**24.** Tian Y, Ye R, Xiao Q, He Y, Sun H. Isolation, characterization, and antimicrobial activity of endophytic bacteria from *Polygonum cuspidatum.* Afr J Microbiol Res. 2013; 7(16) : 1496-1504.

**25.** Velázquez-Sepúlveda I, Orozco-Mosqueda MC, Prieto-Barajas CM, Santoyo G. Bacterial diversity associated with the rhizosphere of wheat plants (*Triticum aestivum*): Toward a metagenomic analysis. QYTON . 2012; 81: 81-87.

**26.** Hung PQ, Annapurna K. Isolation and characterization of endophytic bacteria in Soybean (Glycine sp.) Omonrice. 2004; 12(4): 92-101.

**27.** Li WJ, Zhai YL, Mo MH, Cao YH, Zhe W, Wang WY, Wang MF, Li QQ, He ST, Duan YQ. *Lysinibacillus tabacifolii* sp. nov., a novel endophytic bacterium isolated from Nicotiana tabacum leaves. 2013; 51(3): 289-294.

Journal of Microbial World
Volume 8, No. 4, January 2016

Original Article

# Isolation and molecular identification of *Lysinibacillus macroides* isolated from wheat roots and investigate their antifungal activity against *Trichoderma* spp.

**Mahboobeh Choopan Vamarzani[1] , Hamidreza Pordeli[2], Majid Moghbeli[3]**

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Islamic Azad University, Damghan branch, Damghan, Iran.[2]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Islamic Azad University, Gorgan branch, Gorgan, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Science, Islamic Azad University, Damghan branch, Damghan, Iran.

## Abstract

*Background & Objectives*: *Lysinibacillus* is an endophytic bacterium that protects plant against environmental and physiological condition. The purpose of this study was to isolation and molecular identification of *Lysinibacillus macroides* from wheat roots and to analyse their antifungal activity against *Trichoderma* spp.

*Material & Methods:* The extract of root and stem cultivated wheats in different areas of Mazandaran and Golestan were used for isolation of endophytic bacteria. Their antifungal activity was evaluated in a dual culture method on the Potato Dextros Agar (PDA) medium. After genomic DNA extraction, *16S rRNA* gene was amplified using PCR. Then, the PCR product was sequenced by BLAST.

*Results:* The isolated bacteria were able to inhibit the growth of biocontrol fungi. Based on the *16srRNA* sequence studies, this bacterium belonged to *Lysinibacillus* and showed 99% similarity to *L. macroides 1W*.

*Conclusion:* This study is the first report of isolation of *Lysinibacillus* from the endophytic plants. The endophytic bacteria isolated in this study can be used for extraction, identification and application of its inhibitory metabolites for design and the production of antifungal agents.

*Keywords:* *Lysinibacillus macroides*, Endophytic, Antagonist, *16srRNA* gene.

**Correspondence to**: Mahboobeh Choopan Vamarzani

Tel: +98 9112580625

E-mail: mahboobeh.mehrnia@yahoo.com

Journal of Microbial World 2016, 8(4): 290-298.