



جداسازی و شناسایی باکتری‌های فیلوسفر ذرت و تعیین ویژگی‌های محرک رشدی گیاه آن‌ها

وحیداله جهاندیده مهجن‌آبادی^۱، *مژگان سپهری^۲، هادی اسدی رحمانی^۳، مهدی زارعی^۴،

عبدالمجید رونقی^۵ و سید محسن تقوی^۶

^۱دانشجوی دکتری گروه علوم خاک، دانشگاه شیراز، ^۲استادیار گروه علوم خاک، دانشگاه شیراز،

^۳استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ^۴دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه شیراز،

^۵استاد گروه علوم خاک، دانشگاه شیراز، ^۶استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۰۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۲/۰۷

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه ساکن در فیلوسفر گیاهان مختلف ابزاری برای استفاده کارآمدتر از باکتری‌ها به‌عنوان منبعی برای تولید کودهای زیستی را فراهم می‌کند. استفاده از فن‌آوری‌های مولکولی منجر به پژوهش عمیق در مورد ریزجانداران فیلوسفری می‌شود و ممکن است راه‌های جدیدی را برای توسعه و اعتباردهی عملیات کشاورزی مدرن فراهم نموده و سبب افزایش چشمگیر بهره‌وری شود. هدف از این پژوهش بررسی ویژگی‌های محرک رشد باکتری‌های جدا شده از فیلوسفر ذرت (*Zea mays* L.) رشدیافته در مناطق مختلف جغرافیایی کشور (ایران) و شناسایی مولکولی آنها با روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA بود.

مواد و روش‌ها: در شهریور سال ۱۳۹۵، ۱۱۶ نمونه برگ سالم بالغ از مزارع ذرت واقع در ۶ استان ایران (البرز، تهران، خراسان رضوی، خوزستان، فارس و قزوین) جمع‌آوری و سپس باکتری‌های فیلوسفری از آنها جداسازی شدند. ویژگی‌های محرک رشد باکتری‌ها از جمله، تولید ایندول استیک اسید (Indole-3 Acetic acid, IAA)، انحلال فسفات آلی نامحلول، تولید سیدروفور، تولید پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی (Exopolysaccharides, EPS) و نیز فعالیت آنزیم نیتروژناز با استفاده از روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند. سویه‌های برتر بر اساس روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA در حد گونه شناسایی شدند.

یافته‌ها: ۱۰ سویه از ۲۴۲ باکتری جداسازی شده از فیلوسفر ذرت براساس ویژگی‌های محرک رشد آن‌ها انتخاب شدند. همه سویه‌های انتخابی دارای فعالیت آنزیم نیتروژناز، انحلال فسفات آلی و قابلیت تولید IAA و EPS بودند. بیش‌ترین فعالیت آنزیم نیتروژناز ($70/31 \text{ nM ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$) و انحلال فسفات آلی ($75/05 \text{ g l}^{-1}$) در سویه THE15 مشاهده شد، اگرچه کم‌ترین مقدار این ویژگی‌ها به ترتیب متعلق به سویه‌های $5/55 \text{ nM ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ KHO57 و $15/90 \text{ g l}^{-1}$ KHO51 بودند. سویه‌های QAZ26 و TEH15 دارای بیش‌ترین مقدار IAA (به ترتیب ۳۱/۵۶ و $30/00 \mu\text{g ml}^{-1}$) بودند و سویه ALB32 کم‌ترین مقدار IAA ($4/50 \mu\text{g ml}^{-1}$) را تولید کرد. تولید EPS به وسیله

* مسئول مکاتبه: m.sepehri@shirazu.ac.ir

سویه‌ها بین ۱/۸۰۵-۰/۱۲۰ g I⁻¹ متغیر بود. در میان سویه‌های بررسی شده، تنها KUU32، KHU53، ALB32 و QAZ26 توانستند سیدروفور تولید کنند. توالی‌یابی 16S rRNA نشان داد که ۱۰ سویه متعلق به جنس‌های *Enterobacter*، *Stenotrophomonas*، *Pseudomonas*، *Pseudarthrobacter*، *Microbacterium*، *Bacillus* و *Kocuria* هستند. *Bacillus* با ۴ گونه مختلف (شامل *Bacillus megaterium*، *Bacillus subtilis* و *Bacillus pumilus* و *Bacillus paralicheniformis*) غالب‌ترین جنس بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج این پژوهش باسیلوس غالب‌ترین جنس باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد در فیلوسفر ذرت بود. از میان باکتری‌های جداسازی شده، *Enterobacter hormaechei* TEH15 توانایی بالایی در فعالیت آنزیم نیتروژناز، تولید ایندول استیک اسید و انحلال فسفات آلی داشت. بنابراین این سویه شایسته پژوهش بیشتر در بررسی‌های میدانی (مطالعات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای) کشت ذرت و گیاهان هم‌خانواده ذرت است.

واژه‌های کلیدی: میکروبیوم فیلوسفر، ویژگی‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه، *Enterobacter hormaechei* 16S rRNATEH15

مقدمه

طبق برآوردهای صورت گرفته، جمعیت جهان تا سال ۲۰۵۰ به حدود ۹/۳ میلیارد نفر یعنی ۳۴ درصد بالاتر از میزان کنونی خواهد رسید. بنابراین، تأمین غذای جمعیت در حال رشد جهان با تولید بیش‌تر محصولات کشاورزی از راه افزایش سطح کشت و یا افزایش تولید در واحد سطح اراضی موجود با استفاده از کودهای شیمیایی توأم گشته است. در حال حاضر افزایش تولیدات کشاورزی بیش‌تر از راه مصرف کودهای شیمیایی انجام می‌گیرد (۲ و ۴۷). اما، هزینه‌های تولید و کاربرد این کودها و مشکلات زیست‌محیطی ناشی از کاربرد آن‌ها مانند پیامدهای نامناسب بر چرخه‌های زیستی و خودپایداری بوم‌نظام‌های کشاورزی از یک سو و تأمین غذای سالم برای جمعیت روزافزون جهان از سوی دیگر، اهمیت بازنگری در روش‌های افزایش تولید محصولات زراعی را ضروری ساخته است.

امروزه، فن‌آوری مایه‌زنی گیاهان زراعی با استفاده از ریزجانداران افزایش‌دهنده رشد گیاه (PGPMs)^۱ به‌همراه کاربرد سطوح مناسب از کودهای شیمیایی

به‌عنوان راهکاری مهم برای مدیریت پایدار و کاهش مشکلات زیست‌محیطی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (۲، ۱۹ و ۲۰). زیستگاه‌های ریزوسفر و فیلوسفر (سطح گیاهان) جایگاه سکونت بسیاری از ریزجاندارانی هستند که در برهمکنش با گیاه پیامدهای سودمند و کارآمد فراوانی دارند و افزون بر بهبود رشد و عملکرد، توان روبرویی گیاه را با تنش‌های محیطی را نیز افزایش می‌دهند. استفاده از ظرفیت‌های طبیعی موجودات مفید این زیستگاه‌ها در تولید کودهای زیستی و آمیختن کاربرد این کودها با دیگر روش‌های تغذیه معدنی و آلی گیاهان زراعی، افزون بر کاهش هزینه‌های اقتصادی از جنبه زیست‌محیطی نیز دارای اهمیت بسیاری است (۳۸).

فیلوسفر به‌دلیل دارا بودن رطوبت و ترکیب‌هایی گوناگونی مانند کربوهیدرات‌ها جایگاه مناسبی برای رشد بسیاری از جنس‌های مختلف ریزجانداران شامل باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای، مخمرها، جلبک‌ها و تعداد کم‌تری از پروتوزوا و نماتدها است. باکتری‌ها به‌دلیل دارا بودن جمعیت بالا (۱۰^۶ تا ۱۰^۷ سلول در هر سانتی‌متر مربع برگ) از متداول‌ترین ریزجانداران

1- Plant growth promoting microorganisms

فیلسفر موجب افزایش کاربرد زیست‌فن‌آوری در راستای استفاده از پتانسیل‌های پرشمار آن‌ها و نهایتاً افزایش تولید زیست‌توده گیاهی و بهبود سلامت گیاهان خواهد شد. بر خلاف اکوسیستم‌های مرطوب حاره‌ای تعداد باکتری‌های فیلسفر در مناطق خشک و نیمه‌خشک به دلیل رطوبت کم و تابش‌های بالای اشعه ماورای بنفش بر سطح برگ محدود است (۱، ۱۱ و ۳۶). از این‌رو، گسترش دانش در مورد جامعه باکتری‌های فیلسفری گیاهان مناطق خشک و نیمه‌خشک کشور بینش جدیدی را برای ایجاد هم‌بستگی بین جامعه این باکتری‌ها و ویژگی‌های رشدی گیاهان میزبان در این مناطق فراهم می‌کند.

بیش‌تر پژوهش‌های انجام شده درباره باکتری‌های فیلسفری بر جداسازی و شناسایی آن‌ها با استفاده از روش‌های سنتی (فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی) تمرکز کرده‌اند (۱۵ و ۳۲). روش‌های مولکولی نیز برای شناسایی این باکتری‌ها به‌کار گرفته شده‌اند. روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)^۳ مانند توالی‌یابی ژن 16Sr RNA ابزار مناسبی را برای شناسایی دقیق باکتری‌ها فراهم نموده‌اند.

با وجود این‌که در تعدادی از مطالعات به نقش باکتری‌های فیلسفری در کنترل زیستی در شرایط آب و هوایی ایران پرداخته شده است، اما پژوهش که بتواند از نگرش جداسازی باکتری‌های بومی فیلسفر و بررسی ویژگی‌های محرک رشد آن‌ها در راستای استفاده برای تولید کود زیستی و بهبود رشد گیاه استفاده کند، در دست نیست. بنابراین، این پژوهش با هدف جداسازی باکتری‌های فیلسفری از مزارع ذرت در مناطق مختلف کشور، تعیین برخی ویژگی‌های محرک رشدی آن‌ها و شناسایی کارآمدترین آن‌ها به روش توالی‌یابی ژن 16Sr RNA انجام شد.

این زیستگاه هستند و بیش‌تر پژوهش‌ها درباره ریزجانداران فیلسفر بر روی آن‌ها انجام شده است (۳۱). از ریزجانداران مفید فیلسفری می‌توان به دلیل دارا بودن نقش تحریک‌کنندگی رشد گیاه و حفاظت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی در تولید کودهای زیستی و آفت‌کش‌های زیستی^۱ استفاده نمود (۵، ۹ و ۴۹). باکتری‌های فیلسفری می‌توانند رشد گیاه را به روش‌های گوناگون شامل تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های گیاهی مانند ایندول استیک اسید (IAA)^۲، انحلال فسفات و تولید هیدروژن سیانید افزایش دهند (۶). اسیتکن و همکاران (۲۰۱۰) اثر باکتری‌های فیلسفری محرک رشد گیاه را به دو روش مایه‌زنی به ریشه و به برگ‌پاشی گیاه توت‌فرنگی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که مایه‌زنی به ریشه با *Bacillus M3* و برگ‌پاشی با *Pseudomonas BA-8* یا *Bacillus OSU-142* موجب افزایش عملکرد و غلظت فسفر، آهن، مس و روی در گیاه توت‌فرنگی و افزایش قابلیت دسترسی فسفر، آهن، روی، پتاسیم و منگنز در خاک شد (۱۰).

اگرچه ریزجانداران فیلسفر نقش مهمی در حفاظت از گیاهان و هم‌چنین رشد و توسعه آن‌ها دارند، اما در حال حاضر اطلاعات علمی زیادی درباره برهمکنش‌های بین ریزجانداران فیلسفری و گیاهان میزبان آن‌ها و سازوکارهای عملی ریزجانداران فیلسفری در بهبود رشد گیاه وجود ندارد. برای استفاده از این باکتری‌ها در تولید کودهای زیستی بهتر است از باکتری‌های جدا شده از فیلسفر گیاهان رشدیافته در شرایط آب و هوایی مختلف استفاده نمود. زیرا این باکتری‌های بومی به شرایط گیاه میزبان و شرایط آب و هوایی مورد نظر سازگار شده‌اند. هم‌چنین، شناخت هرچه بیش‌تر جامعه میکروبی

1- Biopesticides
2- Indole-3-acetic acid

3- Polymerase chain reaction

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری برگ و جداسازی باکتری‌ها: نقاط نمونه‌برداری برای جداسازی باکتری‌های فیلوسفری در درجه اول بر اساس سطح زیر کشت ذرت و در درجه دوم بر اساس امکان نمونه‌برداری در استان موردنظر انتخاب شدند. در هر استان نیز نمونه‌برداری از مزارع مختلف کشت ذرت علوفه‌ای انجام شد. بر این اساس استان‌های البرز، تهران، خراسان رضوی، خوزستان، فارس و قزوین با تقریباً بیش‌ترین سطح کشت ذرت علوفه‌ای انتخاب گردیدند و در شهریور سال ۱۳۹۵ نمونه‌برداری برگ از مزارع ذرت آن‌ها (تعداد نمونه‌برداری به ترتیب استان‌ها: ۱۰، ۲۰، ۲۶، ۲۰، ۲۰ و ۲۰) انجام شد. در مرحله نمونه‌برداری گیاه ذرت در مرحله ۶ تا ۸ برگگی بوده و نمونه‌گیری از برگ‌های سالم و شاداب (برگ سوم و چهارم از هر گیاه) صورت پذیرفت. در هر منطقه نمونه‌برداری، برگ‌های جمع‌آوری شده در کیسه‌های پلی‌اتیلن مهر و موم شده و در دمای صفر درجه سلسیوس در یک یخچال قابل حمل قرار داده شدند. نمونه‌ها پس از گذشت ۹۶-۷۲ ساعت (حداکثر) پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

برای جداسازی و شمارش جمعیت کل باکتری‌های برگ از روش Plate count استفاده شد. به‌منظور کاهش کشش سطحی چند قطره Tween 20 به آب مقطر مورد نیاز افزوده شده و سپس سترون گردید. نمونه‌های برگ به‌وسیله آب مقطر بر روی الک شستشوی سطحی داده شده و پس از قطعه‌قطعه کردن (بدون له شدن کردن) در ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری دارای ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی Tween 20 ریخته شدند. ارلن‌ها روی شیکر با دور ۲۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شدند، سپس سوسپانسیون حاصل تا رقت 10^{-5} رقیق‌سازی شد و بر روی محیط

کشت عمومی نوترینت آگار در پتری‌دیش پخش گردید. پتری‌دیش‌ها به مدت ۵-۲ شبانه‌روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. برای شمارش جمعیت کل باکتری‌ها سری‌های رقت با تعداد کلنی بین ۳۰-۳۰۰ در نظر گرفته شدند و به‌صورت واحد تشکیل کلنی (CFU)^۱ محاسبه گردید. باکتری‌هایی که بر روی محیط کشت نوترینت آگار رشد کرده بودند به دقت جداسازی و طی چند مرحله تا حصول اطمینان از خالص بودن باکتری، خالص‌سازی شد (۱۵).

اندازه‌گیری توانایی تثبیت نیتروژن و فعالیت آنزیم نیتروژناز: به‌منظور بررسی توانایی باکتری‌ها در تثبیت نیتروژن و اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیتروژناز از محیط کشت رنی^۲ استفاده شد (۳۷). این محیط کشت دارای همه اجزای لازم برای رشد باکتری به‌جز نیتروژن است. محیط کشت رنی دارای دو محلول اصلی ۱ (شامل: ۰/۸ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۲ گرم KH_2PO_4 ، ۰/۱ گرم $NaCl$ ، ۰/۰۲۸ گرم $Na_2FeEDTA$ ، ۰/۰۲۵ گرم $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ، ۵ گرم Monitol، ۵ گرم Sucrose، ۰/۳ Sodium lactate و ۰/۷ گرم Agar) و ۲ (شامل: ۰/۲ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ و ۰/۰۶ گرم $CaCl_2$) می‌باشد. اجزای محلول شماره ۱ به‌جز آگار در ۸۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند و pH آن بر روی ۷/۲ تنظیم و سپس ۰/۷ گرم آگار به آن اضافه شد. اجزای محلول شماره دو نیز در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شدند. این دو محلول به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۲۰ درجه سلسیوس سترون شده و پس از رسیدن دمای آن‌ها به‌میزان مناسب، با هم مخلوط گردیدند. در ادامه مقادیر ۰/۰۰۵ میلی‌گرم biotin و ۰/۰۱ میلی‌گرم para-aminobenzoic acid وزن و به‌طور جداگانه

1- Colony forming units

2- Rennie

TSB^۳ بدون تریپتوفان کشت شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بر روی یک شیکر با دور rpm ۱۲۰ قرار داده شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی در ویال ریخته شده و به مدت ۱ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ گردید. آن‌گاه مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول رویی با ۲ میلی‌لیتر معرف سالکوسکی^۴ (۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، ۱۵۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸ درصد و ۷/۵ میلی‌لیتر FeCl₃-6H₂O ۰/۵ مولار) درون لوله‌های تمیز (شسته شده با اسید) ریخته شد و لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق و در محفظه تاریک قرار داده شدند. سپس با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Perkin-Elmer 3030) میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۵۳۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید. پیش از اندازه‌گیری میزان جذب نمونه‌ها، غلظت‌های مناسبی از ایندول استیک اسید به‌عنوان استاندارد تهیه شد و میزان جذب آن‌ها اندازه‌گیری و نمودار کالیبراسیون رسم گردید. میزان تولید ایندول استیک اسید به‌وسیله باکتری‌ها با معادله کالیبراسیون محاسبه و به‌صورت $\mu\text{g ml}^{-1}$ گزارش شد (۱۶).

اندازه‌گیری توانایی تولید پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی (EPS): برای بررسی توانایی تولید پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی توسط سویه‌های باکتری جداسازی شده از محیط کشت قنددار MY استفاده شد (۳۰). در ابتدا ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی با جمعیت 10^8 CFU/ml به ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت MY افزوده شد و به مدت ۵ شبانه‌روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بر روی یک شیکر با دور rpm ۱۲۰ قرار داده شد. محتویات محیط کشت به مدت ۳۰ دقیقه در rpm ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد. برای جداسازی پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی، یک حجم از محلول

در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون شده حل شدند. سپس محلول‌های به‌دست آمده (۵ میلی‌لیتر از هر ماده) از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد و به محیط کشت اضافه گردیدند. پنج میلی‌لیتر از این محیط کشت درون لوله‌های آزمایش ۱۵ میلی‌لیتری ریخته شده و زمان کافی به آن داده شد تا محیط کشت به‌صورت نیمه جامد درآید.

برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم نیتروژناز باکتری‌ها از روش سنجش کاهش استیلن (ARA)^۱ استفاده شد (۳۴). به این صورت که ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با جمعیت 10^8 CFU/ml درون لوله‌های آزمایش دارای محیط کشت نیمه جامد رنی ریخته شد و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباسیون با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس لوله‌ها با درپوش‌های لاستیکی سترون پوشانده شدند تا محیط هوابندی شده و جلوی ورود و خروج هوا گرفته شود. به اندازه ۱/۲ میلی‌لیتر از هوای درون لوله‌ها با سرنگ خالی شد و به جای آن ۱/۲ میلی‌لیتر گاز استیلن با خلوص ۹۹/۹۹ درصد تزریق شد. لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. پس از انکوباسیون، با یک سرنگ همپلتون ۱۰ میکرولیتر از هوای درون لوله‌ها کشیده شده و به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC)^۲ (Shimadzu GC-14B) تزریق شد. با استفاده از منحنی استاندارد و سطح زیر منحنی حاصل از نمونه‌ها میزان اتیلن تولید شده محاسبه و به‌عنوان فعالیت آنزیم نیتروژناز به‌صورت $\text{nM ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$ گزارش شد.

اندازه‌گیری توانایی تولید ایندول استیک اسید: برای بررسی توان تولید ایندول استیک اسید، ابتدا کلنی خالص باکتری‌ها در داخل ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت

3- Tryptic soy broth
4- Salkowski reagent
5- Exopolysaccharide

1- Acetylene reduction assay
2- Gas chromatography

صاف شده به وسیله کاغذ صافی واتمن ۴۲ با سه حجم اتانول ۹۶ درصد مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. مایع رویی خارج و رسوب باقی مانده در لوله سانتریفیوژ به مدت یک شب در آن با دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. وزن خشک این رسوب اندازه گیری شده و به عنوان میزان تولید EPS به صورت $g\ I^{-1}$ گزارش شد.

اندازه گیری توانایی انحلال فسفات آلی: برای بررسی توانایی سویه های باکتریایی جداسازی شده در انحلال فسفات آلی از محیط کشت اسپربر^۱ (۴۱) (شامل: ۱۰ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم عصاره مخمر، ۰/۳۲ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۱۴ گرم $CaCl_2$ ، ۱/۵ گرم فیتات، ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر و pH ۷/۲) استفاده شد. در ابتدا ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی با جمعیت 10^8 CFU/ml به ۲۵ میلی لیتر محیط کشت اسپربر افزوده شد و به مدت ۵ شبانه روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بر روی یک شیکر با دور ۱۲۰ rpm قرار داده شد. در ادامه ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری در ویال ریخته شده و با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. یک میلی لیتر از محلول رویی به یک ارلن ۲۵ میلی لیتری ریخته شده و پس از افزودن ۵ میلی لیتر معرف آمونیم مولیبدات وانادات با آب مقطر به حجم رسانده شد. نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شده و سپس مقدار جذب نور در طول موج ۴۷۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه گیری گردید. میزان حلالیت فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده از جذب نوری غلظت های گوناگون KH_2PO_4 محاسبه و به صورت $g\ I^{-1}$ گزارش گردید (۲۹).

اندازه گیری توانایی تولید سیدروفور: برای بررسی توانایی باکتری های جداسازی شده در تولید سیدروفور از محیط کشت chrome azurol S (CAS) استفاده شد. برای تهیه این محیط چهار محلول شامل معرف Fe-CAS، محلول بافر، محلول غذایی و محلول کازامینواسید به طور جداگانه تهیه و سترون شدند (۴). محلول معرف Fe-CAS از مخلوط کردن ۱۰ میلی لیتر $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ یک میلی مولار (در اسیدکلریدریک ۱۰ میلی مولار) با ۵۰ میلی لیتر محلول CAS (۱/۲۱ میلی گرم در لیتر) تهیه شد. محلول ارغوانی تیره حاصل به آرامی و همراه با تکان دادن پیوسته به ۴۰ میلی لیتر HDTMA (۱/۸۲ میلی گرم در لیتر) اضافه شد. محلول حاصل که دارای رنگ آبی تیره بود سترون شد و در دمای محیط تا ۵۰ درجه سلسیوس سرد گردید. محلول بافر با حل کردن ۳۰/۲۴ گرم بافر PIIES در ۷۵۰ میلی لیتر محلول نمکی حاوی ۰/۳ گرم NH_4Cl ، ۰/۵ گرم $NaCl$ و ۰/۵ گرم KH_2PO_4 تهیه گردید و pH آن به ۶/۸ رسانده شد. به این محلول ۱۵ گرم آگار اضافه شد و پس از افزودن حجم آن به ۸۰۰ میلی لیتر با آب مقطر، سترون شد. این محلول بعد از سترون شدن تا ۵۰ درجه سلسیوس سرد شد. محلول غذایی حاوی ۲ گرم مانتول، ۴۹۳ میلی گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۱۱ میلی گرم $CaCl_2$ ، ۱/۱۷ میلی گرم $MnSO_4 \cdot H_2O$ ، ۱/۴ میلی گرم H_3BO_3 ، ۰/۰۴ میلی گرم $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ، ۱/۲ میلی گرم $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ و ۱/۰ میلی گرم $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ است. این محلول نیز به طور جداگانه سترون و سرد شد. برای تهیه محلول کازامینواسید ۳ گرم کازامینواسید به ۳۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. این محلول از فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد تا سترون گردد.

پس از آماده کردن ۴ محلول بالا، محلول غذایی به محلول بافر و محلول کازامینواسید افزوده شد. در ادامه همراه با به هم زدن آرام و بدون ایجاد حباب، محلول معرف Fe-CAS به آن‌ها اضافه و در ظرف پتری‌دیش پخش گردید. ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون باکتریایی با جمعیت 10^8 CFU/ml به روش لکه‌گذاری بروی پلیت دارای محیط کشت CAS ریخته و به مدت ۳-۵ روز در یک انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. توانایی تولید سیدروفور بر مبنای تغییر رنگ محیط کشت از آبی به نارنجی ارزیابی شد و شدت رنگ بیش‌تر نارنجی به معنی تولید بیش‌تر سیدروفور در نظر گرفته شد.

محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA به وسیله الکتروفورز در ژل آگاروز ۱/۲ درصد (v/v) رنگ‌آمیزی شده با DNA Safe Stain، در بافر TBE (1X) (Tris base) ۰/۰۹ M، sodium borate ۰/۰۹ M EDTA ۲/۵ mM (pH=۸) با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۱ ساعت عبور داده شد. سپس ژل تحت نور UV نمایان شده و با استفاده از دستگاه ژل داگ (Alpha Imager TM1200) تصویر ژل ثبت گردید. مقایسه باند تکثیرشده با یک نشانگر DNA به اندازه ۱۵۰۰ جفت باز (bp)°، تکثیر بخش موردنظر ژنوم را نشان داد.

استخراج DNA و تکثیر ژن 16S rRNA باکتری‌ها: در ابتدا ۱۰ سویه کارآمد بر اساس ویژگی‌های محرک رشدی گیاه انتخاب شدند. این سویه‌ها در ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت LB^۱ کشت شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس بر روی یک شیکر با دور ۱۲۰ rpm شیک شدند. به منظور استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها از کیت استخراج DNA (CinnaGen Co., Ltd. Iran) به‌طور جداگانه برای باکتری‌های گرم مثبت و منفی استفاده شد. برای تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA از آغازگرهای عمومی 27F (5'-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3') و 1492R (5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3')

استفاده گردید (۲۱). تکثیر با استفاده از یک ترموسایکلر GTC96S (Cleaver Scientific Ltd.) در ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۰/۴ میکرولیتر DNA ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$)، ۲/۵ میکرولیتر بافر پی سی آر [10X mM KCL، ۵۰ mM

توالی‌یابی ژن 16S rRNA باکتری‌ها و آنالیز فیلوژنی: محصول PCR حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA این سویه‌ها با استفاده از کیت خالص‌سازی خالص شده و به‌منظور تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتایج، توالی نوکلئوتیدی

استفاده گردید (۲۱). تکثیر با استفاده از یک ترموسایکلر GTC96S (Cleaver Scientific Ltd.) در ۲۵ میکرولیتر مخلوط واکنش شامل ۰/۴ میکرولیتر DNA ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$)، ۲/۵ میکرولیتر بافر پی سی آر [10X mM KCL، ۵۰ mM

- 2- Initial denaturation
- 3- Annealing
- 4- Extension
- 5- Base pair

- 1- Luria-bertani

سویه‌ها توسط نرم‌افزار Vector NTI اصلاح شده و یک توالی کانتینگ برای هر سویه به دست آمد. سپس این توالی‌های کانتینگ در پایگاه NCBI با استفاده از Blastn با توالی‌های موجود مقایسه شدند. تعداد مناسبی از توالی‌های ژن 16S rRNA برای هر کدام از سویه‌های باکتری از طریق این پایگاه انتخاب و سپس به کمک نرم‌افزار MEGA 5.1 بین این توالی‌ها و توالی‌های ۳۶ سویه باکتری هم‌ردیفی انجام شد. با استفاده از این نرم‌افزار، درخت فیلوژنتیکی به وسیله روش neighbor joining ترسیم و میزان صحت آن با روش bootstrap تعیین شد (۴۲). در پایان و پس از شناسایی سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، توالی ژن 16S rRNA همه آن‌ها در GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>) ثبت و شماره دسترسی^۱ برای هر یک از آن‌ها به دست آمد.

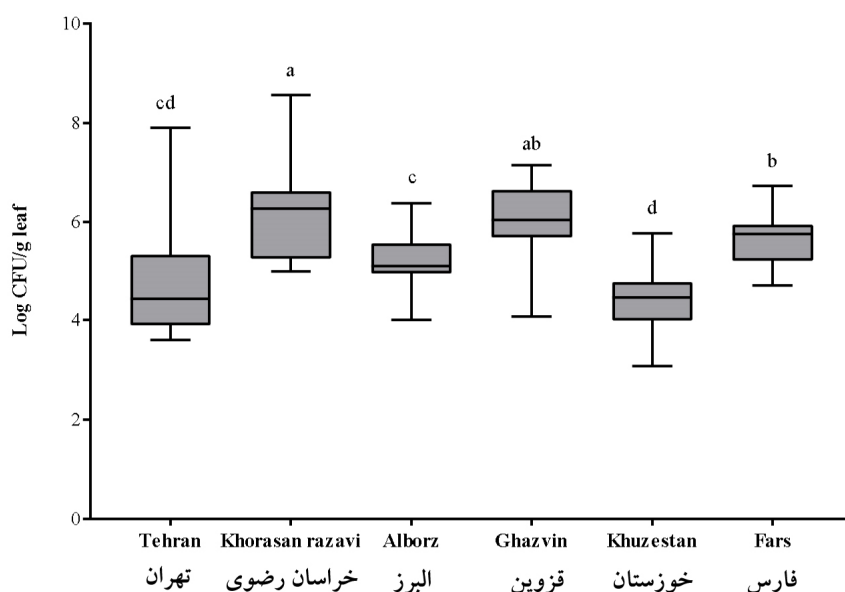
آنالیز آماری: برای تعیین ویژگی‌های محرک رشدی گیاه باکتری‌های جداسازی شده از طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار استفاده شد. تجزیه و تحلیل‌های آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

جداسازی باکتری‌ها: ۲۴۲ سویه باکتری فیلوسفری از ۱۱۶ نقطه نمونه برداری از شش استان (۳۳، ۴۲، ۶۵، ۵۴، ۵ و ۴۳ سویه به ترتیب از استان‌های البرز، تهران، خراسان رضوی، خوزستان، فارس و قزوین) جداسازی شد. فراوانی باکتری‌های فیلوسفری قابل کشت از یک استان به استان دیگر و در بین مناطق مختلف یک استان متفاوت بود. بیش‌ترین میانگین جمعیت باکتری‌های فیلوسفر در استان خراسان رضوی

کم‌ترین میانگین در استان خوزستان (۶/۱۶ Log CFU/g leaf) و کم‌ترین میانگین در استان خوزستان (۴/۴۱ Log CFU/g leaf) مشاهده شد (شکل ۱). هم‌چنین بیش‌ترین میانگین جمعیت باکتری‌ها پس از استان خراسان رضوی در استان قزوین مشاهده شد که به‌طور معنی‌داری کم‌تر از استان خراسان رضوی و بیش‌تر از استان‌های تهران، البرز و خوزستان است. این نتایج همسو با پژوهش‌های پیشین است که نقش مهم مناطق جغرافیایی را در تعیین جوامع باکتریایی در فیلوسفر نشان داده‌اند (۷، ۸، ۱۳، ۲۳ و ۲۴). به‌عنوان مثال، جوامع باکتری‌های فیلوسفری در گونه‌های مختلف درخت *Tamarix* در یک مکان، بسیار مشابه بودند، اگرچه گونه‌های مشابه *Tamarix* که در مناطق مختلف رشد کرده‌اند دارای جوامع باکتریایی مجزا بودند (۱۳). با این وجود باید توجه داشت که در مناطق مختلف جغرافیایی عوامل گوناگونی مانند اشعه ماورای بنفش، بارندگی، دسترسی رطوبت، دما، گرد و غبار، نوع خاک، مدیریت زراعی و ... متفاوت است که هر یک به نوبه خود می‌تواند به‌طور مستقیم و غیرمستقیم بر جمعیت و ترکیب باکتری‌های فیلوسفری تأثیرگذار باشد (۸). ما احتمال می‌دهیم که در دوره کشت ذرت و زمان نمونه‌برداری شرایط در استان خوزستان برای استقرار باکتری‌ها در فیلوسفر نامناسب بوده است و مجموعه‌ای از عوامل فوق (نه یک علل خاص) منجر به کاهش جمعیت باکتری‌ها در سطح برگ شده است. از طرف دیگر این نتایج صرفاً جمعیت باکتری‌ها بر سطح برگ را نشان می‌دهند و برای تفسیر دقیق‌تر، اطلاعاتی در مورد ترکیب جمعیت باکتری‌ها مورد نیاز است که در ادامه به این موضوع پرداخته خواهد شد.

1- Accession number



شکل ۱- جمعیت (Log CFU/g leaf) باکتری‌های فیلوسفری جداسازی شده از استان‌های مختلف. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد و خط روی پلات‌ها نشان‌دهنده میانه است.

Figure 1. Population (Log CFU/g leaf) of phyllosphere bacteria isolated from different provinces. Different letters indicate significant difference at 0.05 level and the line on the plots represents the median.

مقدار متعلق به سویه KHO57 بود. اگرچه، سویه KHO57 اختلاف معنی‌داری با سویه‌های KHU32، KHO47 و THE36 نشان نداد (جدول ۱). از آن‌جایی که فیلوسفر به‌طور مستقیم در معرض جو است، فراوانی و زیاد بودن باکتری‌های توانمند در تثبیت نیتروژن در این زیستگاه منطقی است (۶، ۲۳ و ۳۲). در سایر پژوهش‌ها نیز بودن باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن در آرایش جمعیتی باکتری‌های فیلوسفر گزارش شده است. اگرچه سازوکارهای درگیر در انتقال ترکیب‌های نیتروژنی تثبیت‌شده توسط باکتری‌ها به گیاهان میزبان به‌طور کامل شناسایی نشده‌اند (۹ و ۱۸)، اما به‌نظر می‌رسد فعالیت آنزیم نیتروژناز و توانایی تثبیت نیتروژن در این باکتری‌ها بتواند بخشی از نیتروژن مورد نیاز گیاه را برآورده کند. گزارش شده است

ویژگی‌های محرک رشد باکتری‌ها: با توجه به زیاد بودن تعداد سویه‌های باکتریایی جداسازی شده، پس از بررسی ویژگی‌های محرک رشدی آن‌ها، در مجموع ۱۰ سویه برتر انتخاب و تمرکز این پژوهش بر روی آن‌ها قرار گرفت. نتایج نشان داد که اثر نوع باکتری بر فعالیت آنزیم نیتروژناز، ایندول استیک اسید، انحلال فسفات آلی، پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است ($P < 0.01$). نتایج نشان داد که همه سویه‌ها از توانایی فعالیت آنزیم نیتروژناز، انحلال فسفات آلی نامحلول و تولید ایندول استیک اسید و پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی برخوردار بودند (جدول ۱).

فعالیت نیتروژناز باکتری‌ها بین $0.31/70-0.55/50$ $\text{nmol ml}^{-1} \text{h}^{-1}$ متغیر بود. بیش‌ترین فعالیت آنزیم نیتروژناز در سویه THE15 مشاهده شد و کم‌ترین

که در برخی از زیستگاه‌های حاره‌ای، باکتری‌های ساکن فیلوسفر گیاه توانستند بیش از ۶۰ کیلوگرم نیتروژن در هکتار تولید کنند، اما در مورد گیاهان زیستگاه‌های معتدل، این مقدار نسبتاً پایین‌تر است (۲۲، ۲۷ و ۴۸).

باکتری‌های فیلوسفر هم‌چنین در بیوسنتز هورمون‌های گیاهی مانند اکسین‌ها از جمله ایندول استیک اسید و سیتوکینین‌ها دخیل هستند که به فرآیند رشد و توسعه گیاه مانند طویل شدن، تقسیم سلولی، تمایز بافت و ... کمک می‌کنند. ویژگی ساخت ایندول استیک اسید به‌عنوان ابزاری سودمند در غربالگری ریزجانداران افزایش‌دهنده رشد گیاه مورد توجه بوده است که این امر نشان‌دهنده اهمیت زیاد ایندول استیک اسید بر رشد گیاه است (۴۶). نتایج نشان داد که ۱۰ سویه باکتری جداسازی‌شده ایندول استیک اسید را در مقادیر متفاوتی (۳۱/۵۶-۴/۵۰ $\mu\text{g ml}^{-1}$) تولید کردند. سویه QAZ26 دارای بیش‌ترین مقدار ایندول استیک اسید (۳۱/۵۶ $\mu\text{g ml}^{-1}$) بود و پس از آن سویه TEH15 با $30/00 \mu\text{g ml}^{-1}$ قرار داشت که اختلاف معنی‌داری با سویه QAZ26 داشت. هم‌چنین سویه ALB32 از کم‌ترین مقدار ایندول استیک اسید (۴/۵۰ $\mu\text{g ml}^{-1}$) برخوردار بود (جدول ۱). بین ایندول استیک اسید تولید شده به‌وسیله سویه‌های KHO57، KHO53 و THE36 اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۱). پیامد مثبت باکتری‌های تولیدکننده ایندول استیک اسید بر بهبود رشد گیاه به‌وسیله پژوهشگران زیادی گزارش شده است (۲۶، ۳۹ و ۴۵). افزون بر نقش مستقیم ایندول استیک اسید تولید شده به‌وسیله باکتری‌ها بر رشد گیاه، این هورمون هم‌چنین، کلونیزاسیون موفق باکتری در فیلوسفر را آسان می‌کند. احتمالاً ساخت ایندول استیک اسید یک

سازوکار مهم برای افزایش تراوش مواد از برگ به‌منظور اصلاح ریززیستگاه باکتری‌های فیلوسفری فقیر از مواد غذایی است. در واقع فرض بر آن است که ایندول استیک اسید تولید شده به‌وسیله باکتری‌ها در فیلوسفر منجر به افزایش قابلیت دسترسی به مواد غذایی از راه افزایش تراوش پلی‌ساکاریدها از دیواره سلولی برگ می‌شود (۲۵ و ۴۵). این امر هم‌چنین به‌طور غیرمستقیم از راه افزایش زنده‌مانی باکتری‌های ساکن در فیلوسفر منجر به بهبود رشد گیاه خواهد شد. بنابراین، سویه‌های جداسازی‌شده در این پژوهش که توانایی بالا در تولید ایندول استیک اسید دارند، یک منبع بالقوه برای استفاده به‌عنوان کودهای زیستی هستند و در پژوهش‌های آینده باید بیش‌تر به آنها پرداخته شوند.

افزون بر پیامد باکتری‌های فیلوسفری در چرخه عناصر غذایی مانند تثبیت نیتروژن، آن‌ها در انحلال فسفات نامحلول نیز نقش دارند (۳۳). انحلال فسفات نامحلول یکی از ویژگی‌های مهم محرک رشد گیاه است. بیش‌ترین مقدار انحلال فسفات آلی نامحلول به‌میزان $75/05 \text{ g l}^{-1}$ در سویه THE15 یافت شد و کم‌ترین مقدار به‌میزان $15/90 \text{ g l}^{-1}$ متعلق به سویه KHO51 بود. بین سویه‌های KHO47، KHO57، KHO53، QAZ26 و THE36 اختلاف معنی‌دار از نظر انحلال فسفات نامحلول مشاهده نشد (جدول ۱). توانایی انحلال فسفات در فیلوسفر به‌وسیله باکتری‌ها از چندین جنبه می‌تواند مهم باشد. نخست این‌که باکتری با انحلال مواد آلی دارای فسفر در سطح برگ و آزادسازی و مصرف فسفر شرایط مناسبی را برای زنده‌مانی خود در سطح برگ به‌وجود می‌آورد که این امر می‌تواند منجر به کلونیزاسیون موفق سطح برگ توسط باکتری شود. در درجه دوم، باکتری‌ها با تجزیه

مواد آلی تراوش یافته از دیواره‌های سلولی برگ و آزادسازی و مصرف عناصر غذایی یک شیب غلظت را برای آن‌ها از ریشه به سمت برگ‌ها به وجود آورده و در نتیجه ممکن است منجر به افزایش جذب عناصر غذایی شوند (۴۳). ما احتمال می‌دهیم این موضوع در مورد فسفر نیز صادق باشد.

ناهمگونی محیطی یک چالش تکاملی برای باکتری‌های فیلوسفری است و به خوبی تشخیص داده شده است که این باکتری‌ها ممکن است مکانیسم‌های سازگاری گوناگونی را در مواجهه با تغییرات محیطی ایجاد کنند (۳۵). پارامترهای مختلف درگیر ممکن است شامل قابلیت دسترسی به رطوبت، اشعه فرابنفش، درجه حرارت، قابلیت دسترسی به عناصر غذایی و منابع، رقابت درون و بین گونه‌ها، آفت‌کش‌ها، عوامل کنترل زیستی و حضور جمعیت‌های بیماری‌زا باشند (۱۷ و ۲۵). بنابراین برخی از باکتری‌ها سازوکارهای زیادی را برای چیره شدن بر این کاستی‌ها در پیش گرفته‌اند که طی فرآیندهای تکامل ایجاد شده‌اند (۷، ۸، ۱۴ و ۲۳). در این بین تولید پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی به وسیله باکتری‌ها به نگهداری آب در پیرامون یاخته آن‌ها و در نهایت زنده‌مانی و کلونیزاسیون بهتر آن‌ها کمک می‌کنند (۲۵ و ۴۵)؛ بنابراین تولید این مواد به طور غیرمستقیم می‌تواند در افزایش رشد گیاه نقش داشته باشند. نتایج این پژوهش نشان داد که توانایی سویه‌های باکتریایی در تولید پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی متفاوت است؛ به طوری که سویه KHU53 از بیش‌ترین مقدار

توانایی تولید سیدروفور نیز یک راه‌کار مهم در برخی از باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه در شرایط کم‌بود آهن است (۱۲). هم‌چنین سودمندی دیگر سیدروفور برای گیاه کنترل زیستی عوامل بیماری‌زا می‌باشد، زیرا آن به شدت با آهن پیوند برقرار کرده و بنابراین این عنصر غذایی مهم را برای عوامل بیماری‌زا غیر قابل دسترسی می‌کند (۳). در میان سویه‌های جداسازی شده در این پژوهش، KUU32، KHU53، ALB32 و QAZ26 هاله نارنجی در پیرامون کلنی ایجاد کردند و توانستند سیدروفور تولید کنند. در یک پژوهش دیده شد که اسپری برگی هم‌زمان آهن و سیدروفور تولید شده به وسیله باکتری‌ها منجر به افزایش عملکرد و غلظت آهن دانه گیاهان سویا و گندم شد (۴۰). بنابراین این سویه‌ها می‌توانند برای افزایش رشد و کنترل زیستی گیاه دارای اهمیت باشند.

تولید پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی به عنوان یک ویژگی محرک رشد برای باکتری‌ها مطرح نیست اما، به نظر می‌رسد آن‌ها در بهبود شرایط نامناسب فیلوسفر بسیار دارای اهمیت باشند و بنابراین در این پژوهش بررسی شده‌اند.

توانایی تولید سیدروفور نیز یک راه‌کار مهم در برخی از باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه در شرایط کم‌بود آهن است (۱۲). هم‌چنین سودمندی دیگر سیدروفور برای گیاه کنترل زیستی عوامل بیماری‌زا می‌باشد، زیرا آن به شدت با آهن پیوند برقرار کرده و بنابراین این عنصر غذایی مهم را برای عوامل بیماری‌زا غیر قابل دسترسی می‌کند (۳). در میان سویه‌های جداسازی شده در این پژوهش، KUU32، KHU53، ALB32 و QAZ26 هاله نارنجی در پیرامون کلنی ایجاد کردند و توانستند سیدروفور تولید کنند. در یک پژوهش دیده شد که اسپری برگی هم‌زمان آهن و سیدروفور تولید شده به وسیله باکتری‌ها منجر به افزایش عملکرد و غلظت آهن دانه گیاهان سویا و گندم شد (۴۰). بنابراین این سویه‌ها می‌توانند برای افزایش رشد و کنترل زیستی گیاه دارای اهمیت باشند.

تولید پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی به عنوان یک ویژگی محرک رشد برای باکتری‌ها مطرح نیست اما، به نظر می‌رسد آن‌ها در بهبود شرایط نامناسب فیلوسفر بسیار دارای اهمیت باشند و بنابراین در این پژوهش بررسی شده‌اند.

تولید پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی به عنوان یک ویژگی محرک رشد برای باکتری‌ها مطرح نیست اما، به نظر می‌رسد آن‌ها در بهبود شرایط نامناسب فیلوسفر بسیار دارای اهمیت باشند و بنابراین در این پژوهش بررسی شده‌اند.

جدول ۱- مقایسه میانگین ویژگی‌های اندازه‌گیری شده سویه‌های باکتری جداسازی شده از فیلوسفر ذرت.

Table 1. Compare mean of measured properties of bacteria strains isolated from maize phyllosphere.

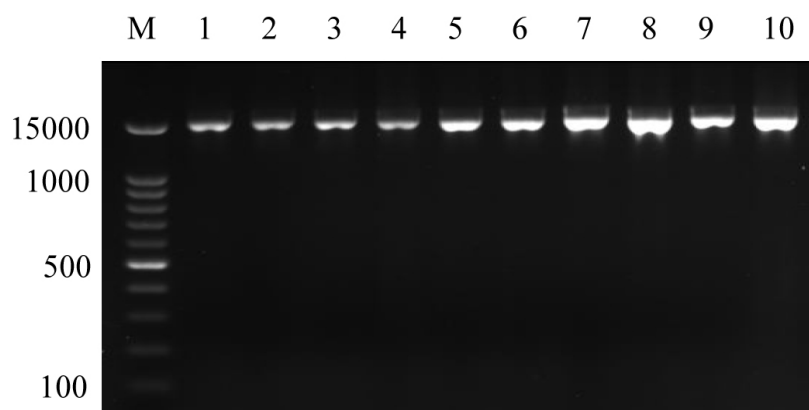
سیدروفور Sidrophore	پلی ساکاریدهای برون سلولی Exopolysaccharides (g l ⁻¹)	انحلال فسفات آلی Organic phosphorus dissolution (g l ⁻¹)	ایندول استیک اسید Indole acetic acid (μg ml ⁻¹)	نیتروژناز Nitrogenase (mM ml ⁻¹ h ⁻¹)	سویه‌های جداسازی شده Isolate strains
+	0.875 ± 0.115 ^b	58.15 ± 5.37 ^c	4.50 ± 0.200 ^h	17.48 ± 0.98 ^e	ALB32
-	0.495 ± 0.095 ^{cd}	37.27 ± 5.96 ^e	18.7 ± 0.338 ^c	7.44 ± 0.93 ^{fg}	KHO47
-	0.660 ± 0.100 ^c	15.90 ± 4.79 ^f	15.70 ± 0.760 ^d	24.92 ± 1.96 ^d	KHO51
-	0.420 ± 0.060 ^d	37.27 ± 2.58 ^e	12.96 ± 0.336 ^e	5.55 ± 0.93 ^g	KHO57
-	1.000 ± 0.190 ^b	48.21 ± 3.10 ^d	8.50 ± 0.612 ^g	40.30 ± 2.84 ^b	KHU19
++	1.035 ± 0.095 ^b	66.10 ± 3.10 ^b	11.07 ± 0.028 ^f	8.80 ± 1.27 ^{fg}	KHU32
++	1.805 ± 0.085 ^a	36.28 ± 4.79 ^e	13.66 ± 0.140 ^e	35.93 ± 2.97 ^c	KHU53
+	0.460 ± 0.010 ^d	38.77 ± 6.50 ^e	31.56 ± 0.845 ^a	10.17 ± 0.93 ^f	QAZ26
-	0.120 ± 0.010 ^e	75.05 ± 2.27 ^a	30.00 ± 2.395 ^b	70.31 ± 4.75 ^a	THE15
-	0.465 ± 0.095 ^d	35.76 ± 3.94 ^e	14.14 ± 0.225 ^e	6.10 ± 2.97 ^g	THE36

-: پاسخ منفی، +: پاسخ مثبت و ++: پاسخ مثبت قوی. مقادیر نشان‌دهنده میانگین ± انحراف استاندارد (۳ تکرار) هستند. حروف متفاوت در کنار میانگین‌ها در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

-: negative response, +: positive responses and ++: strong positive response. Values are the means ± standard deviation (n = 3). In each column different letters beside means indicate significant difference at 0.05 level.

باکتری‌های برتر فیلوسفر ذرت (از نظر ویژگی‌های محرک رشد) استفاده شد. نتایج حاصل از تکثیر ژن 16S rRNA ده سویه باکتری جداسازی شده به وسیله آغازگرهای عمومی 27F و 1492R در شکل ۲ نشان داده شده است. این آغازگرها برای ۱۰ سویه باکتری جداسازی شده یک باند با اندازه حدود ۱۵۰۰ جفت باز را تکثیر نمودند (شکل ۲).

شناسایی ژنتیکی سویه‌های باکتریایی جداسازی شده: بیش‌تر پژوهش‌های انجام شده در زمینه شناسایی باکتری‌های فیلوسفری، به استفاده از محیط‌های کشت انتخابی و سنجش‌های بیوشیمیایی متکی بوده‌اند (۱۵ و ۳۲). توسعه و استفاده از روش‌های مبتنی بر rRNA (بیش‌تر 16S rRNA) منجر به شناسایی دقیق‌تر جوامع باکتریایی می‌شود. در این پژوهش، از روش توالی‌یابی ژن 16S rRNA برای شناسایی



شکل ۲- تکثیر باند ۱۵۰۰ جفت باز ناحیه ژنی 16S rRNA سویه‌های جداسازی‌شده. شماره‌های ۱-۱۰ نشان‌دهنده سویه‌های KHU32, KHU19, KHU53, KHO51, KHO47, KHO57, ALB32, QAZ26, TEH15 و TEH36 هستند. M نشانگر DNA با اندازه ۱۰۰ تا ۱۵۰۰ جفت باز است.

Figure 2. The 1500 bp band amplification of the 16S rRNA gene region of the isolates. Numbers 1-10 represent isolates of KHU32, KHU19, KHU53, KHO51, KHO47, KHO57, ALB32, QAZ26, TEH15 and TEH36, respectively. M is a 100-1500 bp DNA marker.

تشکیل آندوسپورها به‌عنوان یک راه‌برد زنده‌مانی مهم به‌کار رفته به‌وسیله باکتری‌های خاصی از جمله گونه‌های *Bacillus* در سطح برگ است که به‌طور بالقوه در معرض نوسانات شدید در دسترس بودن رطوبت، تابش بالای اشعه ماوراءبنفش، دمای زیاد و کمبود مواد غذایی است (۴۴ و ۴۵). زیست‌لایه^۱ هم‌چنین برای محافظت از باکتری‌ها در برابر تنش‌های محیطی، مکانیسم‌های دفاعی میزبان و ترکیبات ضد میکروبی شناخته شده است (۳۵). اتصال و زنده‌مانی باکتری‌ها بر روی بافت میزبان به تولید پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی برای تشکیل زیست‌لایه نیازمند است. بنابراین، جای تعجب ندارد که فراوانی بیش‌تر گونه‌های *Bacillus* در نمونه‌های برگ با توانایی بالای آن‌ها در تولید پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی و تشکیل اسپور در ارتباط باشد. هم‌چنین فراوانی *Bacillus* در نمونه‌های بررسی‌شده در این پژوهش ممکن است به‌دلیل فراوانی آن‌ها در خاک

در ادامه با توالی‌یابی فرآورده PCR مربوطه به تکثیر ژن 16S rRNA، ده سویه جداسازی‌شده شناسایی و در حد جنس تعریف شدند. برای مقایسه توالی‌های 16S rRNA سویه‌ها با توالی‌های موجود، از Blastn پایگاه NCBI استفاده شد و سطح بالایی از همانندی (≥ 99) برای تعریف بیش‌تر گونه‌ها به‌دست آمد (جدول ۲). درخت فیلوژنتیکی حاصل از توالی‌های 16S rRNA سویه‌ها نشان داد که ۱۰ باکتری جداسازی‌شده در ۱۰ گونه متفاوت متعلق به ۷ جنس دسته‌بندی شدند (شکل ۳). جنس *Bacillus* با ۴ گونه مختلف (شامل سویه‌های KHU32, KHU19, KHU53 و KHO51 به‌ترتیب تعریف‌شده به‌عنوان گونه‌های *Bacillus subtilis*, *Bacillus paralicheniformis*, *Bacillus megaterium* و *Bacillus pumilus*) غالب‌ترین جنس بود. دلایل مختلفی وجود دارد که می‌تواند توجیه‌کننده فراوانی بیش‌تر باکتری جنس *Bacillus* دارای ویژگی‌های محرک رشد در بین باکتری‌های جداسازی‌شده باشد.

نشان داد. در صورتی که انتظار بر آن بود که گونه‌های *Bacillus* توانایی بالایی در انحلال فسفات داشته باشند. با توجه به این نتایج می‌توان اختلاف در منطقه جغرافیایی را به‌عنوان یکی از عوامل وجود چنین نتایجی بیان کرد. هم‌چنین این چهار باکتری چهار گونه مختلف از جنس *Bacillus* هستند که این موضوع نیز به نوبه خود بر توانایی باکتری‌ها بر ویژگی‌های محرک رشد گیاه تأثیرگذار است. باتول و همکاران (۲۰۱۶) نیز گزارش کردند که گونه‌های مختلف جنس *Bacillus* ایزوله شده از فیلوسفر گندم دارای توانایی متفاوتی در انحلال فسفات نامحلول بودند (۶). در این مطالعه *Bacillus amyloliquefaciens*، *Bacillus subtilis* و *Bacillus aerius* قادر به انحلال فسفات نامحلول بودند، اگرچه *Bacillus stratosphericus* از این توانایی برخوردار نبود. هم‌چنین در بین باکتری‌های شناسایی شده سوبه فعالیت آنزیم نیتروژناز، تولید ایندول استیک اسید و انحلال فسفات نامحلول آلی داشت. در صورتی که انتظار بر این بود که باکتری *Pseudomonas putida* به‌عنوان یک باکتری شاخص مطرح باشد. اگرچه در یک پژوهش مشخص شد که باکتری *Pseudomonas syringae* ایزوله شده از فیلوسفر گندم از مقدار بسیار پایین تولید ایندول استیک اسید برخوردار بود (۶). شاید از دلایل این نتایج بتوان علاوه بر اختلاف در منطقه جغرافیایی به ماهیت متفاوت فیلوسفر نسبت به سایر زیستگاه‌های گیاه از جمله ریزوسفر اشاره کرد.

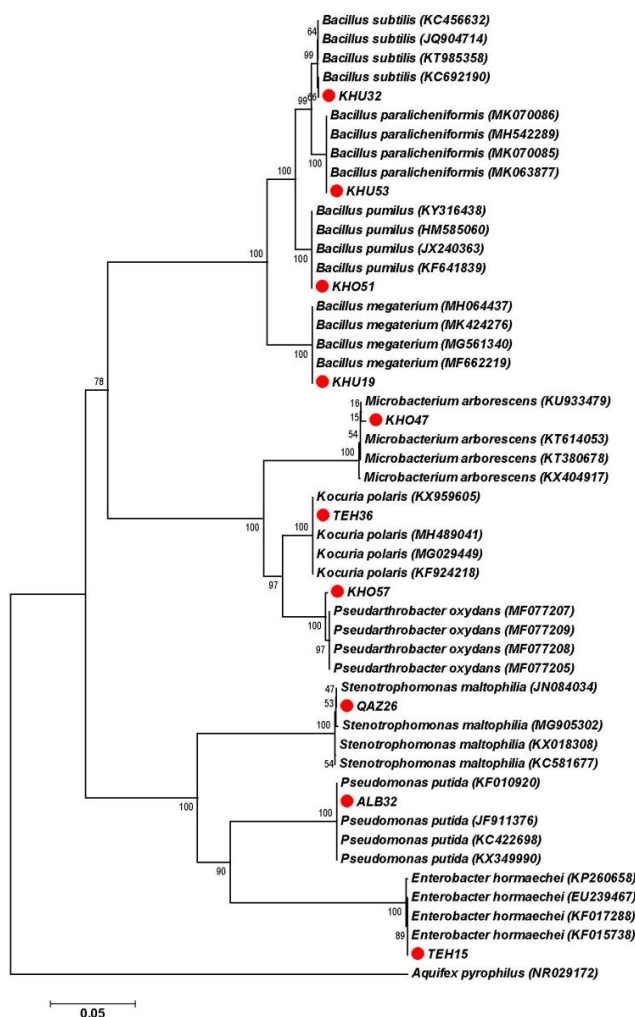
(۲۸) و در نتیجه حرکت به سمت برگ‌ها باشد. از طرف دیگر از چهار گونه باکتری *Bacillus* سه گونه متعلق به استان خوزستان بود. بنابراین با توجه به این نتیجه و هم‌چنین پایین بودن میانگین جمعیت باکتری‌ها در این استان می‌توان نتیجه گرفت که به احتمال زیاد عوامل مؤثر بر باکتری‌های ساکن فیلوسفر ذرت در این استان نامناسب بوده و منجر به کاهش جمعیت باکتری‌ها و پدیدار شدن باکتری‌های اسپوردار گرم مثبت *Bacillus* شده‌اند. هم‌چنین گونه‌های KHO47، TEH36 و TEH15، QAZ26، ALB32، KHO57 به‌ترتیب به‌عنوان جنس‌های *Microbacterium*، *Pseudarthrobacter oxydans*، *arborescens*، *Stenotrophomonas*، *Pseudomonas putida* و *Enterobacter hormaechei maltophilia* و *Kocuria Polar* تعریف شدند.

ارتباط باکتری‌های شناسایی شده با ویژگی‌های محرک رشد گیاه: نکته جالب توجه ارتباط بین سوبه‌های شناسایی شده و توانایی آن‌ها در ویژگی‌های محرک رشد گیاه است. در این راستا می‌توان به چهار گونه از جنس *Bacillus* اشاره کرد. به‌طور مثال باکتری‌های *Bacillus subtilis*، *Bacillus megaterium* و *Bacillus paralicheniformis* که از فیلوسفر ذرت استان خوزستان جداسازی شده‌اند توانایی متفاوتی در انحلال فسفات آلی نشان دادند. *Bacillus subtilis* از توانایی بالایی در انحلال فسفات آلی نسبت به دو گونه دیگر *Bacillus* برخوردار بود. هم‌چنین گونه *Bacillus pumilus* که از استان خراسان رضوی جداسازی شده بود نسبت به سه گونه فوق توانایی کم‌تری در انحلال فسفات آلی

جدول ۲- باکتری‌های شناسایی شده بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA.

Table 2. Bacteria identified by 16S rRNA gene sequencing.

همانندی Similarity (%)	نزدیک‌ترین سویه NCBI و شماره دسترسی Closest NCBI strain and accession number	شماره دسترسی Accession number	سویه‌های جداسازی شده Isolate strains
100	<i>Pseudomonas putida</i> KX349990	MN099371	ALB32
99	<i>Microbacterium arborescens</i> KX404917	MN099379	KHO47
99	<i>Bacillus pumilus</i> KY316438	MN099364	KHO51
99	<i>Pseudarthrobacter oxydans</i> MF077207	MN099386	KHO57
100	<i>Bacillus megaterium</i> MH064437	MN099367	KHU19
99	<i>Bacillus subtilis</i> KT985358	MN099359	KHU32
99	<i>Bacillus paralicheniformis</i> MK070086	MN099362	KHU53
99	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> KX018308	MN099392	QAZ26
99	<i>Enterobacter hormaechei</i> EU239467	MN099393	TEH15
99	<i>Kocuria polaris</i> KF924218	MN099382	TEH36



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی باکتری‌های شناسایی شده بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA.

Figure 3. Phylogenetic tree of bacteria identified based on 16S rRNA gene sequencing.

نتیجه‌گیری کلی

فیلسفر نسبت به سایر زیستگاه‌های گیاهی از جمله ریزوسفر اشاره کرد. در بین باکتری‌های جداسازی شده سویه TEH15 (*E. hormaechei*) توانایی بالایی در فعالیت نیتروژناز، تولید ایندول استیک اسید و انحلال فسفات نامحلول آلی داشت. بنابراین بهتر است این سویه در پژوهش‌های میدانی (گلخانه‌ای و مزرعه‌ای) در آینده بیش‌تر بررسی شود. هم‌چنین پیشنهاد می‌گردد جوامع باکتریایی فیلسفر سایر گیاهان کشاورزی رشدیافته در شرایط آب و هوایی و جغرافیایی مختلف را مورد بررسی قرار داده تا به‌طور جامع بتوان نقش باکتری‌های سودمند فیلسفر را در افزایش رشد و عملکرد محصولات زراعی مشخص کرد.

این پژوهش نخستین گزارش در مورد جداسازی و شناسایی باکتری‌های فیلسفر ذرت رشدیافته در مناطق جغرافیایی مختلف ایران به‌وسیله روش 16Sr RNA و تعیین ویژگی‌های محرک رشدی آن‌ها است. بر اساس یافته‌های این پژوهش باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه از ساکنان معمول فیلسفر ذرت هستند. نتایج بیانگر آن است که برخی از باکتری‌های فیلسفری بومی قادر به تثبیت نیتروژن، انحلال فسفات نامحلول و تولید ایندول استیک اسید، سیدروفور و پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی هستند. با این وجود توانایی انجام این فعالیت‌های محرک رشد گیاه در بین باکتری‌های جداسازی‌شده یکسان نبود. از دلایل این اختلاف باکتری‌ها در ویژگی‌های محرک رشد گیاه می‌توان به اختلاف در منطقه جغرافیایی و ماهیت متفاوت

منابع

1. Abril, A.B., Torres, P.A., and Bucher, E.H. 2005. The importance of phyllosphere microbial populations in nitrogen cycling in the Chaco semi-arid woodland. *J. Trop. Ecol.* 21: 103-107.
2. Adesemoye, A.O., Torbert, H.A., and Kloepper, J.W. 2009. Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial Ecology.* 58: 921-929.
3. Ahmed, E., and Holmström, S.J. 2014. Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microbial Biotechnology.* 7: 196-208.
4. Alexander, D., and Zuberer, D. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils.* 12: 39-45.
5. Ali, N., Sorkhoh, N., Salamah, S., Eliyas, M., and Radwan, S. 2012. The potential of epiphytic hydrocarbon-utilizing bacteria on legume leaves for attenuation of atmospheric hydrocarbon pollutants. *J. Environ. Manage.* 93: 113-20.
6. Batool, F., Rehman, Y., and Hasnain, S. 2016. Phylloplane associated plant bacteria of commercially superior wheat varieties exhibit superior plant growth promoting abilities. *Frontiers in Life Science.* 9: 313-322.
7. Bokulich, N.A., Thorngate, J.H., Richardson, P.M., and Mills D.A. 2014. Microbial biogeography of wine grapes is conditioned by cultivar, vintage, and climate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 111: E139-E48.
8. Chaudhary, D., Kumar, R., Sihag, K., and Kumari, A. 2017. Phyllospheric microflora and its impact on plant growth: A review. *Agricultural Reviews.* 38: 51-59.
9. Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., and Vorholt, J.A. 2009. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 106: 16428-16433.

10. Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercisli, S., Donmez, M.F., Turan, M., and Gunes, A. 2010. Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulturae*. 124: 62-66.
11. Farnsworth, R., Romney, E., and Wallace, A. 1977. Nitrogen fixation by microfloral-higher plant associations in arid to semiarid environments. P 17-19, In: N.E. West and J.J. Skujins (eds), *Nitrogen in desert ecosystems*. Dowden Hutchinson & Ross, Stroudsburg, Pennsylvania, USA.
12. Ferreira, C.M., Vilas-Boas, Â., Sousa, C.A., Soares, H.M., and Soares, E.V. 2019. Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express*. 9: 78.
13. Finkel, O.M., Burch, A.Y., Lindow, S.E., Post, A.F., and Belkin, S. 2011. Phyllosphere microbial communities of a salt-excreting desert tree: geographical location determines population structure. *Applied and Environmental Microbiology*. 77: 7647-7655.
14. Finkel, O.M., Castrillo, G., Paredes, S.H., González, I.S., and Dangl, J.L. 2017. Understanding and exploiting plant beneficial microbes. *Current Opinion in Plant*. 38: 155-163.
15. Giri, S., and Pati, B. 2004. A comparative study on phyllosphere nitrogen fixation by newly isolated *Corynebacterium* sp. & *Flavobacterium* sp. and their potentialities as biofertilizer. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 51: 47-56.
16. Gordon, S.A., and Weber, R.P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant Physiology*. 26: 192-195.
17. Hirano, S.S., and Upper, C.D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 64: 624-653.
18. Holland, M. 2011. Nitrogen: give and take from phylloplane microbes. P 215-30, In: J.C. Ploaccoand and C.D. Todd (eds), *Ecological aspects of nitrogen metabolism in plants*. Wiley-Blackwell, London.
19. Hungria, M., Campo, R.J., Souza, E.M., and Pedrosa, F.O. 2010. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*. 331: 413-425.
20. Hungria, M., Nogueira, M.A., and Araujo, R.S. 2013. Co-inoculation of soybeans and common beans with rhizobia and azospirilla: strategies to improve sustainability. *Biology and Fertility of Soils*. 49: 791-801.
21. Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L.R., and Fields, M.W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology*. 72: 3832-3845.
22. Jones, K. 1970. Nitrogen fixation in the phyllosphere of the Douglas fir, *Pseudotsuga douglasii*. *Annals of Botany*. 34: 239-244.
23. Knief, C., Delmotte, N., Chaffron, S., Stark, M., Innerebner, G., Wassmann, R., Wassmann, R., von Mering, C., and Vorholt, J.A. 2012. Metaproteogenomic analysis of microbial communities in the phyllosphere and rhizosphere of rice. *ISME J*. 6: 1378-1390.
24. Li, Y., Wu, X., Wang, W., Wang, M., Zhao, C., Chen, T., Liu, G., Zhang, W., Li, S., Zhou, H., Wu, M., Yang, R., and Zhang, G. 2019. Microbial taxonomical composition in spruce phyllosphere, but not community functional structure, varies by geographical location. *PeerJ*. 7:e7376.
25. Lindow, S.E., and Brandl, M.T. 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*. 69: 1875-1883.
26. Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Lee, H., Hari, K., Sundaram, S., and Sa, T. 2005. Pink-pigmented facultative methylotrophic bacteria accelerate germination, growth and yield of sugarcane clone Co86032 (*Saccharum officinarum* L.). *Biology and Fertility of Soils*. 41: 350-358.

27. Maignien, L., DeForce, E.A., Chafee, M.E., Eren, A.M., and Simmons, S.L. 2014. Ecological succession and stochastic variation in the assembly of *Arabidopsis thaliana* phyllosphere communities. *MBio*. 5:e00682-e13.
28. Meena, V.S., Maurya, B.R., Meena, S.K., Meena, R.K., Kumar, A., Verma, J.P., and Singh, N.P. 2016. Can *Bacillus* species enhance nutrient availability in agricultural soils? P 367-95, In: M. Islam, M. Rahman, P. Pandey, C. Jha and A. Aeron (eds), *Bacilli and agrobiotechnology*, Springer. Cham, Switzerland.
29. Mehta, S., and Nautiyal, C.S. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria. *Current Microbiology*. 43: 51-56.
30. Moraine, R., and Rogovin, P. 1966. Kinetics of polysaccharide B-1459 fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 8: 511-524.
31. Müller, T., and Ruppel, S. 2014. Progress in cultivation-independent phyllosphere microbiology. *FEMS Microbiology Ecology*. 87: 2-17.
32. Mwajita, M.R., Murage, H., Tani, A., and Kahangi, E.M. 2013. Evaluation of rhizosphere, rhizoplane and phyllosphere bacteria and fungi isolated from rice in Kenya for plant growth promoters. *SpringerPlus*. 2: 606.
33. Parasuraman, P., Pattnaik, S., and Busi, S. 2019. Phyllosphere microbiome: functional importance in sustainable agriculture. P 135-48, In: J.S. Singh and D.P. Singh (eds), *New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering*, Elsevier.
34. Pariona-Llanos, R., de Santi Ferrara, F.I., Gonzales, H.H.S., and Barbosa, H.R. 2010. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic endophytic bacteria isolated from sugarcane. *Europ. J. Soil Biol.* 46: 387-393.
35. Parsek, M.R., and Fuqua, C. 2004. Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *J. Bacteriol.* 186: 4427-4440.
36. Puente, M.E., and Bashan, Y. 1994. The desert epiphyte *Tillandsia recurvata* harbours the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas stutzeri*. *Can. J. Bot.* 72: 406-408.
37. Rennie, R. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* 27: 8-14.
38. Rossmann, M., Sarango-Flores, S.W., Chiaramonte, J.B., Kmit, M.C.P., and Mendes, R. 2017. Plant microbiome: composition and functions in plant compartments. P 7-20, In: V. Pylro and L. Roesch (eds), *The brazilian microbiome*, Springer.
39. Ryu, J., Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Yim, W., Indiragandhi, P., Kim, K., Anandham, J., Yun, J., Kim, K.H., and Sa, T. 2006. Plant growth substances produced by *Methylobacterium* spp. and their effect on tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and red pepper (*Capsicum annuum* L.) growth. *J. Microbiol. Biotechnol.* 16: 1622-1628.
40. Sharma, S., Chandra, S., Kumar, A., Bindraban, P., Saxena, A.K., Pande, V., and Pandey, R. 2019. Foliar application of iron fortified bacteriosiderophore improves growth and grain Fe concentration in wheat and soybean. *Ind. J. Microbiol.* 59: 344-350.
41. Sperber, J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Austr. J. Agric. Res.* 9: 778-781.
42. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 24: 1596-1599.
43. Thapa, S., Prasanna, R., Ranjan, K., Velmourougane, K., and Ramakrishnan, B. 2017. Nutrients and host attributes modulate the abundance and functional traits of phyllosphere microbiome in rice. *Microbiological Research*. 204: 55-64.
44. Toyota, K. 2015. *Bacillus*-related spore formers: attractive agents for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*. 30: 205-207.

45. Vorholt, J.A. 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nature Reviews Microbiology*. 10: 828-840.
46. Wahyudi, A.T., Astuti, R.P., Widyawati, A., Meryandini, A., and Nawangsih, A.A. 2011. Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting rhizobacteria. *J. Microbiol. Antimicrobial*. 3: 34-40.
47. Warttainen, I., Eriksson, T., Zheng, W., and Rasmussen, U. 2008. Variation in the active diazotrophic community in rice paddy-nifH PCR-DGGE analysis of rhizosphere and bulk soil. *Applied Soil Ecology*. 39: 65-75.
48. Whipps, J., Hand, P., Pink, D., and Bending, G.D. 2008. Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype. *J. Appl. Microbiol.* 105: 1744-1755.
49. Zhou, Y., Qiao, X., Li, W.J., Xu, J., Wang, W., and Chen, X. 2011. Phyllosphere bacterial communities associated with the degradation of acetamiprid in *Phaseolus vulgaris*. *J. Biotechnol.* 10: 3809-3817.



Isolation and identification of maize phyllosphere bacteria and determination of their plant growth promoting traits

V.A. Jahandideh Mahjen Abadi¹, *M. Sepehri², H. Asadi Rahmani³,
M. Zarei⁴, A.M. Ronaghi⁵ and S.M. Taghavi⁶

¹Ph.D. Student, Dept. of Soil Science, Shiraz University, ²Assistant Prof., Dept. of Soil Science, Shiraz University, ³Professor, Soil and Water Research Institute, AREEO, Iran, ⁴Associate Prof., Dept. of Soil Science, Shiraz University, ⁵Professor, Dept. of Soil Science, Shiraz University, ⁶Professor, Dept. of Plant Protection, Shiraz University

Received: 12.23.2019; Accepted: 04.26.2020

Abstract

Background and Objectives: The plant growth promoting bacteria (PGPB) inhabiting the phyllosphere of different plants provides a tool for more efficient use of bacteria as a source of biofertilizers. The use of molecular technologies leads to in-depth research of the phyllosphere microorganisms and may provide new avenues for the development and validation of modern agricultural operations and significantly increase productivity. The aim of this research was to investigate the plant growth promoting (PGP) traits of bacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) phyllosphere cultivated in different geographical zones of country (Iran) and their molecular identification by 16S rRNA sequencing.

Materials and Methods: In September (2016), 116 samples of healthy mature leaves were collected from the maize fields located in 6 provinces of Iran (Fars, Alborz, Qazvin, Khuzestan, Tehran and Khorasan) and then, phyllosphere bacteria were isolated from them. Growth promoting traits of bacteria including Indole-3 Acetic acid (IAA) production, organic phosphate dissolution, siderophore production, exopolysaccharides (EPS) production and also nitrogenase enzyme activity were measured using standard methods. Superior strains were identified based on 16S rRNA sequencing method.

Results: The 10 from 242 bacterial strains isolated from maize phyllosphere were selected based on their growth promoting traits. All strains selected demonstrated nitrogenase activity, organic phosphate dissolution and IAA and EPS production capability. The highest nitrogenase activity ($70.31 \text{ nM ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and organic phosphate dissolution (75.05 g l^{-1}) were observed in THE15 strain, while the lowest amount of these properties belonged to KHO57 ($5.55 \text{ nM ml}^{-1} \text{ h}^{-1}$) and KHO51 (15.90 g l^{-1}) strains, respectively. The QAZ26 and TEH15 strains had the highest amount of IAA production (31.56 and $30.00 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$, respectively) and the ALB32 strain produced the lowest amount of IAA ($4.50 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$). The EPS production by strains ranged from 0.120 to 1.805 g l^{-1} . Among the strains investigated, only KUU32, KHU53, ALB32 and QAZ26 were able to produce siderophore. 16S rRNA sequencing revealed that the 10 strains selected belong to *Bacillus*, *Microbacterium*, *Pseudarthrobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* and *Kocuria* genera. The *Bacillus* with 4 different species (including *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus paralicheniformis* and *Bacillus pumilus*) was the most dominant genus.

* Corresponding Author; Email: m.sepehri@shirazu.ac.ir

Conclusion: Based on the results of this study, *Bacillus* was the most dominant genus of plant growth promoting bacteria in the maize phyllosphere. Among the isolated bacteria, *Enterobacter hormaechei* TEH15 was highly capable of nitrogenase enzyme activity, IAA and organic phosphate solubility. Therefore, this strain deserves further research in greenhouse and field studies of maize cultivation and maize family plants.

Keywords: 16S rRNA, *Enterobacter hormaechei* TEH15, Phyllosphere microbiome, Plant growth promoting traits

