جایگاه فیلوژنتیکی باکتری اندوفیت *Bacillus* sp. Bp91 جداشده از سیب زمینی و فعالیت ضدمیکروبی آن علیه باکتری *Ralstonia solanacearum*

کامبیز بهمنی[۱]، نادر حسن‌زاده[۲*]، بهروز حریقی[۳] و علیرضا معرفت[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۷/۱۹)

چکیده

بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی ناشی از *Ralstonia solanacearum* یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های سیب‌زمینی در سراسر جهان و از جمله در استان کردستان ایران است. استفاده از باکتری‌های اندوفیت یکی از راهکارهای مؤثر در کنترل بیماری مذکور است. در این تحقیق از سویه *Bacillus* sp. Bp91 که به‌عنوان اندوفیت هم‌ستیز برتر از مزارع سیب زمینی استان کردستان جداسازی شده بود برای آزمون‌های تکمیلی استفاده شد. نتایج آزمون‌های بررسی مکانیسم بازدارندگی نشان داد تولید پروتئاز در سویه *Bacillus* sp. Bp91 مثبت و برای آزمون‌های سیانید هیدروژن و سیدروفور به ترتیب منفی و مثبت ضعیف بود. جایگاه تبارزایی سویه *Bacillus* sp. Bp91 نشانگر شباهت بسیار نزدیک به گونه‌های شناخته شده جنس *Bacillus* بویژه *B. pulmilus* می‌باشد. همچنین بررسی‌های متابولومیکسی توسط دستگاه GC-mass نشان‌داد دو متابولیت Eicosane و Dibutyl phthalate از شاخص‌ترین متابولیت‌های ضدمیکروبی باکتری مذکور می‌باشند.

کلیدواژه: مهار زیستی، باکتری اندوفیت، سیب زمینی، متابولیت، *16S rRNA*، GC-MS

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: hasanzadehr@yahoo.com

۱ و ۲. به ترتیب دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۳. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

۴. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.

Phylogenetic status of the endophyte *Bacillus* sp. Bp91 isolated from potato and its antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum*

K. Bahmani[1], N. Hasanzadeh[2*], B. Harighi[3], and A. Marefat[4]

(Received: 15.8.2020; Accepted: 10.10.2020)

Abstract

Bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* is one of the most destructive diseases in the world, including Kurdistan province of Iran. Using the endophytic bacteria is one of the most effective and applicable methods to control of the disease. In this study, *Bacillus* sp. Bp91 which was isolated from potato fields in Kurdistan province was used as a superior antagonist against *R. solanacearum*. The results of the supplementary tests showed that the production of protease in the mentioned strain is positive. This was negative and relatively weak for hydrogen cyanide and siderophore production, respectively. The phylogenetic tree derived from *16S rRNA* gene sequence showed the stain belongs to the genus *Bacillus* sharing the highest level of sequence homology with to *B. pumilus*. Metabolic studies by GC-mass were also indicated that the two metabolites Eicosane and Dibutyl phthalate are the most prominent antimicrobial metabolites produced by the bacterium.

Keywords: Biological Control, Endophytic Bacteria, Metabolite, Potato, *16S rRNA*, GC-MS

* Corresponding author's E-mail: hasanzadehr@yahoo.com
1 and 2. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
4. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

مقدمه

بیماری پژمردگی باکتریایی ناشی از *Ralstonia solanacearum* (Smith) (Yabuuchi *et al.* 1995) یکی از بیماریهای مهم خسارت‌زا در سیب‌زمینی است. این بیماری به پوسیدگی قهوه ای نیز معروف بوده و عامل آن یک بیمارگر خاکزاد است (Hayward, 1991). میزبان‌های این بیمارگر شامل طیف گسترده‌ای از گیاهان متعلق به ۵۴ خانواده و بیش از ۴۵۰ گونه گیاهی است (Hayward, 2000; Swanson *et al.* 2005; Wicker *et al.* 2007). این بیماری در ایران نخستین بار از اصفهان گزارش (Danesh & Bahar, 1984) و سپس به تدریج در اکثر نقاط کشور نیز مشاهده شد (Pireh & Harighi, 2017). توانایی بیمارگر در زنده ماندن در آب و خاک، تنوع ژنتیکی، انتشار گسترده و نیز وسیع بودن دامنه میزبانی بیمارگر موجب شده است روشهای اعمال شده برای مدیریت آن از موفقیت محدودی برخوردار باشند (Ramesh & Phadke, 2012). لذا رویکردهای جدیدی چون مهار زیستی به عنوان یک گزینه جایگزین مورد توجه قرارگرفته است. تاکنون مطالعات متعددی برای یافتن عوامل زیستی مؤثر در کاهش آسیب بیماری پژمردگی باکتریایی انجام شده است (Kheirandish & Harighi, 2015) و چندین گونه باکتریایی مورد شناسایی و بررسی قرار گرفته‌اند. یکی از گروه‌های مورد مطالعه، باکتری‌هایی هستند که در داخل گیاهان زندگی می‌کنند و به نام باکتری‌های اندوفیت نامیده شده و می‌توانند به عنوان عوامل مؤثر مهار زیستی به کار گرفته شوند (Reiter *et al.* 2002). این عوامل در گیاهان سالم بدون ایجاد خسارت و نشانه‌های قابل مشاهده، کلونیزه شده و با ضدعفونی سطحی و یا عصاره‌گیری از گیاه قابل جداسازی هستند (Hallmann *et al.* 1997).

گرچه نقش باکتری‌های اندوفیت هنوز به درستی مشخص نشده، اما مطالعات مختلف نشان‌دهنده این است که باکتری‌های اندوفیت با افزایش رشد گیاهان میزبان‌شان، مهار زیستی بیمارگرها و یا هر دو، نقش مؤثری در حفظ و تأمین سلامت گیاهان میزبان داشته باشند (Sessitsch *et al.* 2004). فرضیه‌هایی وجود دارد مبنی بر اینکه گیاهان میزبان از راههای مختلفی همچون تغذیه، کاتابولیسم آلاینده‌ها و تقویت واکنش دفاعی گیاه در برابر تنش‌های محیطی یا حمله بیمارگر به گیاهان، از باکتری‌های اندوفیت بهره می گیرند (Bent & Chanway, 2002). مطالعات دیگر نشان داده‌اند که باکتری‌های اندوفیت با تولید سیدروفورها (Burd *et al.* 1998)، هورمون‌های گیاهی (Feng *et al.* 2006) و افزایش مقاومت در برابر بیمارگرها باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند (Reiter *et al.* 2002). در همین ارتباط کمتر به پتانسیل متابولیکی آنها توجه شده است (Brader *et al.* 2014). بیشتر اندوفیت‌ها قادر به تولید متابولیت‌های فعال هستند. انواع مختلفی از ترکیبات تولید شده توسط باکتری‌های مختلف اندوفیت شامل ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، فنیل پروپانوئیدها، ترکیبات آلیفاتیک، پلی‌کتیدها و پپتیدها دارای فعالیت ضدمیکروبی هستند (Astuti *et al.* 2014). تاکنون گونه‌های مختلف *Bacillus* به عنوان اندوفیت از گیاهان مختلف جداسازی شده‌اند که جایگاه ویژه‌ای در بین هم‌ستیزها داشته و به عنوان عوامل مهار زیستی موفق علیه بیمارگرهای متنوع مطرح هستند. گونه‌های این جنس به جهت سنتز متابولیتهای ثانویه با تنوع چشمگیر از نظر ساختار و عملکرد شناخته شده‌اند (Amin *et al.* 2012). یکی از مهم‌ترین سازوکارهای این جنس تولید انواع آنتی-بیوتیک‌ها به ویژه لیپوپپتیدهای حلقوی آمفی‌فیلیک است (Afsharmanesh & Ahmadzadeh, 2016). این آنتی-بیوتیک‌ها، پلی‌پپتیدهای با وزن مولکولی کم هستند که

توسط مکانیسم‌های ریبوزومی یا غیرریبوزومی تولید می‌شوند (Amin *et al.* 2012). روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری متابولیت‌ها به کار رفته است (Bajad *et al.* 2006). از جمله آنها روش استفاده از کروماتوگرافی گازی (Gas chromatography) است که از قابلیت ردیابی و شناسایی ترکیبات نمونه پیچیده برخوردار می‌باشد. اتصال با طیف‌سنجی جرمی (Mass Spectrometry) بسترهای تجزیه و تحلیل بسیار قوی را در مقایسه با کروماتوگرافی مایع (Liquid chromatography-mass spectrometry) فراهم می‌کند و امکان شناسایی ترکیبات را براساس استفاده از کتابخانه‌ها و منابع MS در دسترس تجاری و عمومی در ترکیب با داده‌های شاخص زمان بازداری (Retention Time) فراهم می‌کند (Rohloff, 2015).

هدف از مطالعه حاضر، بررسی توان هم‌ستیزی و تعیین جایگاه تبارزایی سویه Bp91 متعلق به جنس *Bacillus* از باکتری‌های اندوفیت جدا شده از مزارع سیب‌زمینی استان کردستان و بررسی طیف متابولیت‌های تولید شده توسط آن با بکارگیری روش GC-MS است.

مواد و روش‌های بررسی

انتخاب سویه مورد مطالعه

در این مطالعه از سویه *Bacillus* sp.Bp91 (MN326732) که یک باکتری اندوفیت جداشده از مزارع سیب‌زمینی استان کردستان و دارای اثر هم‌ستیزی بر روی *Ralstonia solanacearum* می‌باشد (تحقیقات منتشر نشده نگارندگان) استفاده شد. سویه‌های باکتری بیمارگر *R. solanacearum* (بیوار۲/ نژاد۳) از آزمایشگاه باکتری‌شناسی مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور و آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاه پزشکی دانشگاه کردستان تهیه شدند.

بررسی اثر هم‌ستیزی سویه *Bacillus* sp. Bp91 علیه *Ralstonia solanacearum*

آزمون تولید پروتئاز: **ب**رسی توانایی سویه مذکور در تولید پروتئاز با استفاده از محیط کشت شیربدون چربی(Skim Milk) حاوی ۱/۵ درصد آگار، صورت گرفت. محیط اسکیم میلک آگار، تهیه و به روش فیلتر-کردن سترون گردید. جدایه باکتری اندوفیت Bp91 در تشتک پتری حاوی محیط کشت به صورت نقطه‌ای کشت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. تشکیل هاله بی‌رنگ در اطراف پرگنه باکتری نشانه توانایی تولید پروتئاز است (Chantawannakul *et al.* 2002; Chakravarty and Kalita, 2012).

آزمون تولید سیانید هیدروژن: در این آزمون از روش آلستروم و برنز (Alstrom & Burns, 1989) با کمی تغییرات استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده از کشت ۴۸ ساعته جدایه هم‌ستیز به غلظت 10^8 CFU/mL در سطح تشتک پتری حاوی محیط کشت آگار غذایی، پخش گردید. سپس کاغذ صافی سترون آغشته به معرف (شامل کربنات سدیم دو درصد و اسید پیکریک پنج درصد) در قسمت درب تشتک پتری قرار داده شد و درب آن با نوار پارافیلم مسدود گردید تا از خروج هرگونه متابولیت فرار جلوگیری شود. تشتک پتری به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. در صورت تولید HCN توسط باکتری هم‌ستیز، رنگ کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از زرد به نارنجی، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره، آجری و کرم تغییر رنگ می‌دهد.

آزمون بررسی تولید سیدروفور: سنجش تولید

سیدروفور با استفاده از محیط کشت CAS agar و طبق روش شووین و نیلندز (Schwyn and Neilands, 1987) انجام شد. در این روش، جدایه هم‌ستیز در تشتک‌پتری حاوی محیط کشت مذکور به صورت نقطه‌ای کشت گردید. تشتک پتری سپس در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. واکنش مثبت با تشکیل هاله نارنجی در اطراف جدایه هم‌ستیز در حال رشد مشخص شد.

جداسازی DNA کروموزومی باکتری‌ها

باکتری در محیط کشت مایع نوترینت براث کشت داده شد و بعد از رشد به میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل و به مدت ۱/۵ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب بدست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر نگه‌داری و سپس در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. ۸ میکرولیتر لیزوزیم (از محلول پایه ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به سوسپانسیون حاصل اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. سپس ۴۰ میکرولیتر سدیم پرکلرات ۴ مولار، ۲۴ میکرولیتر SDS (Sodium dodecyl sulfate) ده درصد و ۸ میکرولیتر پروتئیناز K[1] (از غلظت پایه ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محلول اضافه و بعد از هم‌زدن (وارونه کردن) به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. به محلول به‌دست آمده در مرحله قبل، ۲ حجم اتانول خالص (نگه‌داری شده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در فریزر نگه‌داری گردید. سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل چند ثانیه در محیط معمولی اتاق نگه‌داری شد تا خشک گردد سپس، در ۵۰۰ میکرولیتر بافر TE حل گردید. DNA به‌دست آمده با حجم مساوی ترکیب فنل: کلروفرم: آیزوآمیل الکل[2] (۱:۲۴:۲۵) مخلوط شده و در درجه حرارت معمولی اتاق به صورت وارونه کردن هم‌زده شد تا کاملاً یکنواخت گردد. سپس به مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ گردید تا سه فاز مجزا تشکیل گردید. فاز رویی به میکروتیوب تمیز و سترون منتقل و مرحله قبل ۳ بار تکرار شد. در هر بار محلول رویی به میکروتیوب سترون منتقل گردید. محلول رویی یک‌بار نیز با اضافه نمودن کلروفرم: ایزوآمیل الکل (۱:۲۴) رسوب داده شد. محلول رویی به میکروتیوب سترون منتقل و DNA با اضافه نمودن ۲ حجم اتانول خالص و ۰/۱ درصد حجم محلول استات سدیم (Sodium acetate) ۳ مولار با PH= ۴/۸ و سپس نگه‌داری در فریزر به مدت یک شب، رسوب داده شد. ترکیب به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ گردید و رسوب به دست آمده توسط اتانول ۷۰ درصد شسته شد. رسوب حاصله پس از خشک شدن در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حاوی ریبونوکلئاز[3] (از محلول پایه ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به غلظت نهایی ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) حل و آماده استفاده برای آنالیز PCR شد (Sambrook & Russell, 2001).

تشخیص مولکولی جدایه هم‌ستیز و مقایسه جایگاه با سایر جدایه‌های استاندارد باسیلوس

برای این منظور از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از یک جفت آغازگر (Primers) عمومی ژن *16S rRNA* (جدول ۱) استفاده شد (Weisberg *et al.* 1991).

[1] Proteinase K

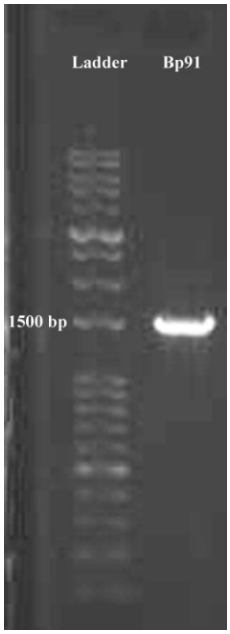
[2] *Phenol:Chloroform:Isoamyl* Alcohol

[3] *Ribonuclease*

جدول ۱. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز برای تکثیر بخشی از ژن *16S rRNA*

Table 1. Primers used in the polymerase chain reaction to amplify a part of the *16S rRNA* gene

Primer	Primer Sequence (5' to 3')	Amplification length	Reference
rp1 fD2	ACGGTTACCTTGTTACGACTT AGAGTTTGATCATGGCTCAG	1.5 Kb	Weisburg *et al.* 1991



شکل ۱. نوار الکتروفورزی محصول PCR در سویه Bp91 مربوط به تکثیر ناحیه *16S rRNA* با جفت آغازگرهای اختصاصی rp1 و fD2 بر روی ژل آگاروز یک درصد. مارکر 1kb DNA Ladder می‌باشد.

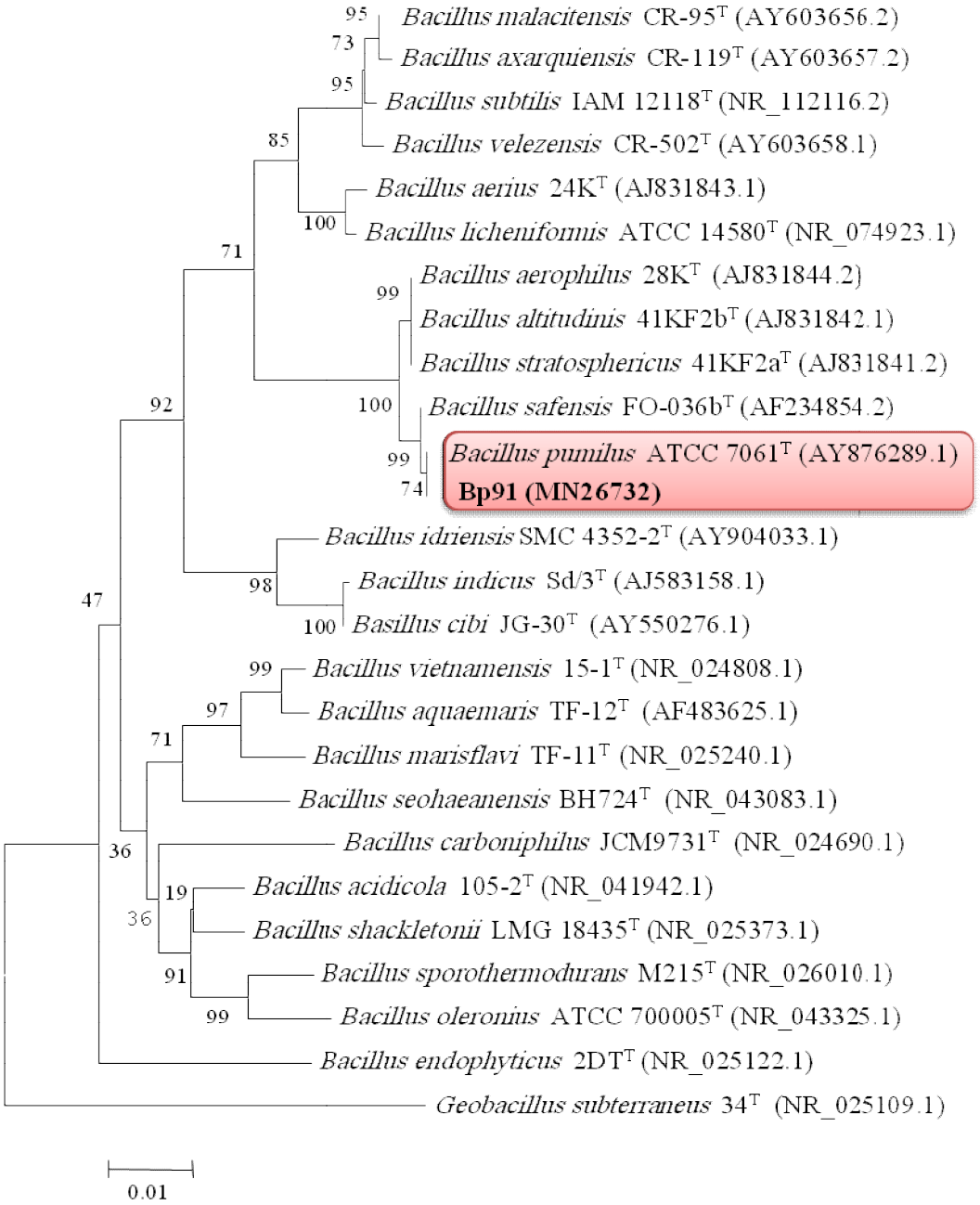
Fig 1. Electrophoresis patterns of PCR product in Bp91 strain related to amplification of *16S rRNA* region with specific primers pair rp1 and fD2 on 1% agarose gel. Ladder: 1kb DNA Ladder

پس از تکثیر ژن مورد نظر و الکتروفورز آن (شکل ۱)، محصول PCR به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و توالی‌یابی دو طرفه شد. توالی‌های خام با استفاده از نرم افزار BioEdit Sequence Alignment Editor v 7.0.9.0 ویرایش شد (Hall, 1999, 2011) و سپس با استفاده از نرم افزار BLAST توالی باکتری مورد نظر با سایر توالی‌های موجود درNCBI مقایسه شد (Altschul *et al.* 1990). بر اساس میزان شباهت (similarity) بین جدایه Bp91 با سایر توالی‌ها، جدایه مورد نظر در سطح جنس و گونه شناسایی شد. آنالیزهای تبارزایی به روش Neighbor-Joining به کمک نرم‌افزار MEGA 6.06 (Tamura *et al.* 2013) انجام شد. درخت حاصل از آنالیزهای تبارزایی به وسیله نرم افزار TreeView (Page, 1996) مشاهده شد. روش NJ با تصحیح دو پارامتری و ۱۰۰۰ تکرار (Bootstrap) انجام شد (Kimura, 1980).

استخراج متابولیت‌های باکتری اندوفیت

جدایه باکتری اندوفیتBp91 در ۲۰۰ میلی لیتر محیط کشت مایع NB کشت و به مدت ۷ روز در شیکر انکوباتور با دور ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از رشد باکتری، محیط کشت حاوی باکتری در ۷۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مایع رویی (Supernatant) با حجم مساوی اتیل‌استات خالص۱۰۰ درصد مخلوط و به مدت نیم‌ساعت تکان داده شد (shake) تا دو فاز مایع تشکیل گردد. سپس فاز رویی حاوی اتیل‌استات جهت ادامه‌ی کار توسط دکانتور (قیف جداکننده)[4]، جدا و جهت نگهداری به یک فلاسک تمیز منتقل گردید. این مرحله سه بار تکرار شد. اتیل‌استات حاوی متابولیت‌های ثانویه توسط دستگاه تبخیرکننده روتاری[5] خشک گردید. نهایتاً عصاره‌های

[4] Separatory funnel
[5] Rotary evaporator



شکل ۲. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش Neighbour-Joining ترسیم و خطای معیار برآورد شده با استفاده از روش بوت‌استرپ و براساس ۱۰۰۰ تکرار محاسبه شد. *Geobacillus subteraneus* به عنوان گونه خارج از گروه انتخاب شد.

Fig 2. Phylogenetic tree derived from *16S rRNA* gene sequence showing the relationship between isolate Bp91 and selected reference strains belonging to the genus *Bacillus*. The tree was constructed using the neighbour-joining method. Bootstrap values were expressed as percentages of 1000 replications. *Geobacillus subteraneus* has been selected as an out-group species.

اتیل‌استات (متابولیت‌های) خشک شده وزن گردید و در مقدار کافی اتیل‌استات جهت ایجاد غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل شد. با استفاده از فیلتر سترون ۰/۲۲ میکرون، محلول فیلتر شد و جهت انجام آزمایشات

بعدی در فریزر۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید (Murate *et al.* 2015; Akinsanya *et al.* 2015; Beiranvand *et al.* 2017).

سنجش اثر ضد میکروبی متابولیت‌های استخراج شده در شرایط پتری

این آزمایش بر مبنای روش دینگرا و سینکلیر (Dhingra & Sinclair, 1995) و با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا سوسپانسیون باکتری بیمارگر *R. solanacearum* با غلظت ۲×۱۰^{۸} CFU/mL به شکل یکنواخت روی پتری حاوی محیط کشت آگارمغذی (NA) پخش و به مدت ۵ دقیقه در زیر هود سترون گذاشته شد. پس از خشک شدن، دیسک کاغذی با قطر حدود ۷ میلی‌متر آغشته به اتیل-استات حاوی متابولیت‌های استخراج شده از باکتری اندوفیت سویه Bp91 روی محیط کشت قرار داده شد. سپس تشتک پتری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از گذشت ۷۲-۴۸ ساعت قطر هاله بازدارندگی رشد در اطراف دیسک اندازه‌گیری شد. از دیسک آغشته به حلال اتیل‌استات به عنوان شاهد استفاده گردید.

بررسی طیف متابولیت‌های تولید شده

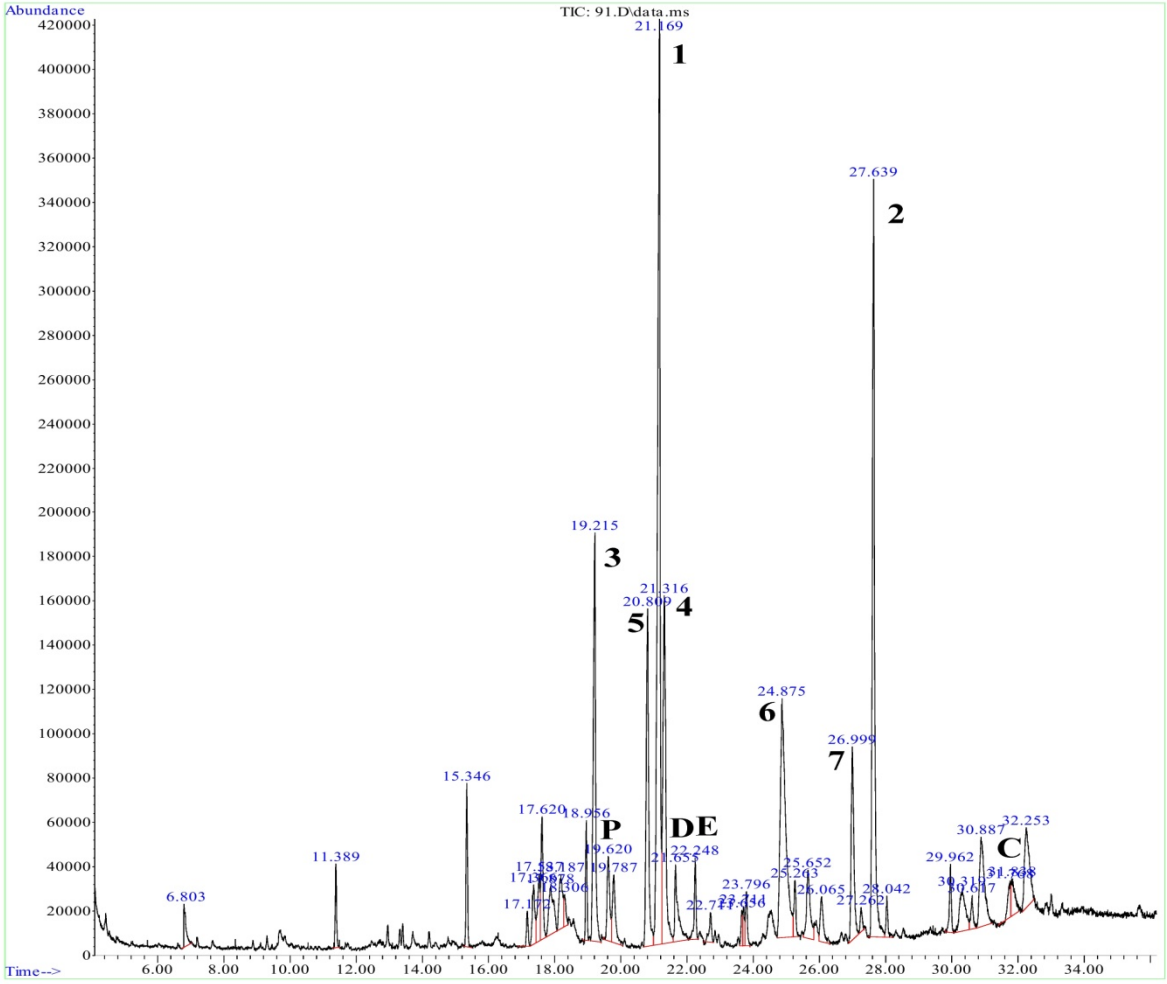
به منظور آنالیز ترکیبات و شناسایی نوع و میزان مواد موجود در عصاره، یک میکرولیتر از عصاره به‌دست آمده به دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌نگار جرمی(GC/MS) مدل Agilent 7890B GC System/ 5977A MSD (Agilent Technologies, USA)، مجهز به انژکتور تقسیم/ شکاف[۶]، تزریق شد. ترکیبات در ستون‌های مویرگی HP-5 (با طول ستون ۳۰ متر، قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر) از هم جدا شدند. انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت انتخاب شد. دمای انژکتور در حالت split (۱:۲۰) به مدت ۳ دقیقه در دمای ۳۰۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و گاز هلیوم (۹۹/۹۹۹%) به عنوان گاز حامل استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل GC، برنامه دمای ستون از ۶۰ درجه سلسیوس آغاز شد، به مدت ۲ دقیقه نگه داشته شد و با سرعت ۶ درجه سلسیوس در دقیقه به ۲۶۰ درجه سلسیوس افزایش یافته و به مدت ۳ دقیقه در آن دما نگهداری شد (Ahsan *et al.* 2017; Gholamveisi *et al.* 2017; Ezati *et al.* 2018). تفسیر طیف‌های GC-MS با استفاده از کتابخانه GC-MS و به-کارگیری داده‌های NIST[۷] و WILEY انجام و طیف‌های جرمی ناشناخته با طیف‌های شناخته شده موجود در کتابخانه‌های مذکور، مقایسه و نام، وزن مولکولی و ساختار ترکیب مواد جداسازی شده تأیید شد (Mirzaie & Zare Karizi, 2016; Arianfar *et al.* 2017; Ezati *et al.* 2018).

نتایج و بحث

باکتری *R. solanacearum* دارای دامنه میزبانی بسیار وسیعی شامل ۵۴ خانواده و بیش از ۴۵۰ گونه گیاهی است (Hayward, 2000; Swanson *et al.* 2005; Wicker *et al.* 2007). کنترل بیماری بدلیل ویژگی‌های بیمارگر بسیار دشوار است. از میان روش‌های کنترل بیولوژیک، بکارگیری باکتری‌های اندوفیت روش نسبتاً جدیدتری است. انواع مختلفی از اندوفیت‌ها با قابلیت هم‌ستیزی علیه پاتوژن‌های باکتریایی و قارچی گزارش شده‌اند (Sturz *et al.* 2000; Sessitsch *et al.* 2004; Miliute *et al.* 2015). تاکنون باکتری‌های اندوفیت مختلفی از سیب‌زمینی جدا شده‌اند، اما در بررسی‌های مبتنی بر کشت باکتری‌های

[6] split/ splitless

[7] National Institute Standard and Technology



شکل ۳. کروماتوگرام عصاره باکتری *Bacillus* sp. Bp91. پیک‌های موجود در کروماتوگرام، تعداد ترکیبات موجود در عصاره را نشان می‌دهد. اعداد ۱ تا ۷ به‌ترتیب نشان‌دهنده متابولیت‌های دارای بلندترین پیک‌ها است. حرف P نشانگر متابولیت Phenol, 3,5-dimethoxy-، حرف E نشانگر متابولیت Eicosane، حرف D نشانگر متابولیت Dibutyl phthalate و حرف C نشانگرمتابولیت Carbamic acid, 3-methylphenyl-, butyl ester است.

Fig 3. Chromatogram of *Bacillus* sp. Bp91. The peaks in the chromatogram show the number of compounds in the extract.
1&3: Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-
2&7: Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-
4: Filicinic acid
5: L-Leucine, N-cyclopropylcarbonyl-, methyl ester
6: 2,5-Piperazinedione, 3,6-bis(2-methylpropyl)-
P: Phenol, 3,5-dimethoxy-
D: Dibutyl phthalate
E: Eicosane
C: Carbamic acid, 3-methylphenyl-, butyl ester

اندوفیت، تعداد جنس‌ها اغلب کمتر از ۲۰ عدد بوده و جنس‌های *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Enterobacter* و *Agrobacterium* از رایج‌ترین آنها بوده است (Manter *et al.* 2010). در ارتباط با کنترل نژاد ۳ باکتری *R.*

جدول ۲. شناسایی باکتری اندوفیت هم‌ستیز بر اساس توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rRNA*

Table 2. Identification of antagonistic endophytic bacterium by partial sequencing of *16s rRNA*

Isolate	GenBank Accession no.	*16s rRNA* sequence (5' to 3')	% Similarity
Bp91	MN326732	Range 1: 30 to1383	100% with *Bacillus pumilus* ATCC 7061^T (AY876289.1)

solanacearum توسط باکتری‌های اندوفیت جدا شده از سیب‌زمینی تعداد گزارش‌ها اندک است. اما گزارش‌های متعددی درخصوص کنترل این بیماری توسط گونه‌های هم‌ستیز غیراندوفیت که اغلب در گروه ریزوباکترهای محرک رشد قرار دارند وجود دارد. از جمله می‌توان به گونه‌های *Bacillus subtilis*، *Paenibacillus macerans*، *Serratia marcescens*، *Bacillus pumilis* و *Pseudomo-nas fluorescens* اشاره کرد (Kurabachew *et al.* 2007; Alyie *et al.* 2008; Kurabachew and Wydra, 2013). در گزارش‌های متعدد به توان بازدارندگی و سودمندی گونه‌های *Bacillus* در مقابل بیمارگرهای باکتریایی و قارچی گیاهان اشاره شده است (Tan *et al.* 2013).

جدایه *Bacillus* sp. Bp91 یکی از جدایه‌های باکتری اندوفیت جدا شده از بخش‌های مختلف سیب‌زمینی در استان کردستان است (مطالعات منتشر نشده نگارندگان) که از کارآیی بالای هم‌ستیزی برخوردار است.

تجزیه و تحلیل مقایسه توالی اجماعی[9] ژن *16S rRNA* جدایه Bp91 با سایر توالی‌های سویه‌های استاندارد موجود در سایت NCBI با استفاده از نرم افزار BLAST مشخص نمود که جدایه مذکور مشخصاً به جنس *Bacillus* تعلق دارد (جدول ۲). نتایج آنالیز تبارزایی جدایه *Bacillus* sp. Bp91 با توالی‌های سویه‌های تیپ به‌دست آمده از پایگاه

[8] Beneficial microorganisms
[9] Consensus

جدول ۳. نتایج آزمون های سنجش هم‌ستیزی سویه اندوفیت باکتریایی *Bacillus* sp. Bp91

Table 3. Results of biocontrol assay tests of bacterial endophyte strain *Bacillus* sp. Bp91

Biocontrol assays tests	Result
Siderophore production	$+^w$
Hydrogen cyanide production	-
Protease production	+

positive '+'(>5mm), Weak '$+^w$'(≤5mm), negative '-'

داده جهانی بانک ژن[10]، به روش Neighbor- Joining و به کمک نرم‌افزار MEGA 6.06، نشان داد که جدایه Bp91 با تکرار (Bootstrap) ۷۴ در گروه *Bacillus pumilus* قرار می‌گیرد. برای رسم درخت تبارزایی، ۲۴ گونه متعلق به جنس *Bacillus* استفاده شد. *Geobacillus subteraneus* به عنوان استرین برون‌گروه[11] در نظر گرفته شد. مقادیر تکرار (Bootstrap) روی شاخه‌ها در شکل ۲ نشان داده شده است. سویه مورد مطالعه در بانک ژن مرکز ملی اطلاعات زیست‌فناوری[12] (NCBI) به شماره دسترسی[13] (MN326732) به ثبت رسید.

توان هم‌ستیزی *Bacillus* sp. Bp91 در نتایج مربوط به آزمون‌های سنجش هم‌ستیزی چون تولید سیدروفور و تولید پروتئاز منعکس است (جدول ۳). تولید پروتئاز توسط سویه مذکور در تأیید نتایج مطالعات انجام شده (Mantsala and Zalkin, 1980; Pant *et al.* 2015) است. طبق منابع موجود گونه‌های باسیلوس از زمره تولیدکننده-

[10] GenBank
[11] Out group
[12] National Center for Biotechnology Information
13 Accession number

های اصلی پروتئازهای خارج سلولی هستند (Pant *et al.* 2015). نقش سیدروفورها در محدود کردن رشد تعداد زیادی از عوامل بیماری‌زا گزارش شده است (Saha *et al.* 2016.). گرچه گونه‌های جنس باسیلوس بیشتر به دلیل داشتن آنتی‌بیوتیک‌ها، حشره‌کش‌ها و اسپورها شناخته شده‌اند و سیدروفورهای آنها کمتر مورد توجه قرار گرفته است (Yu *et al.* 2017).

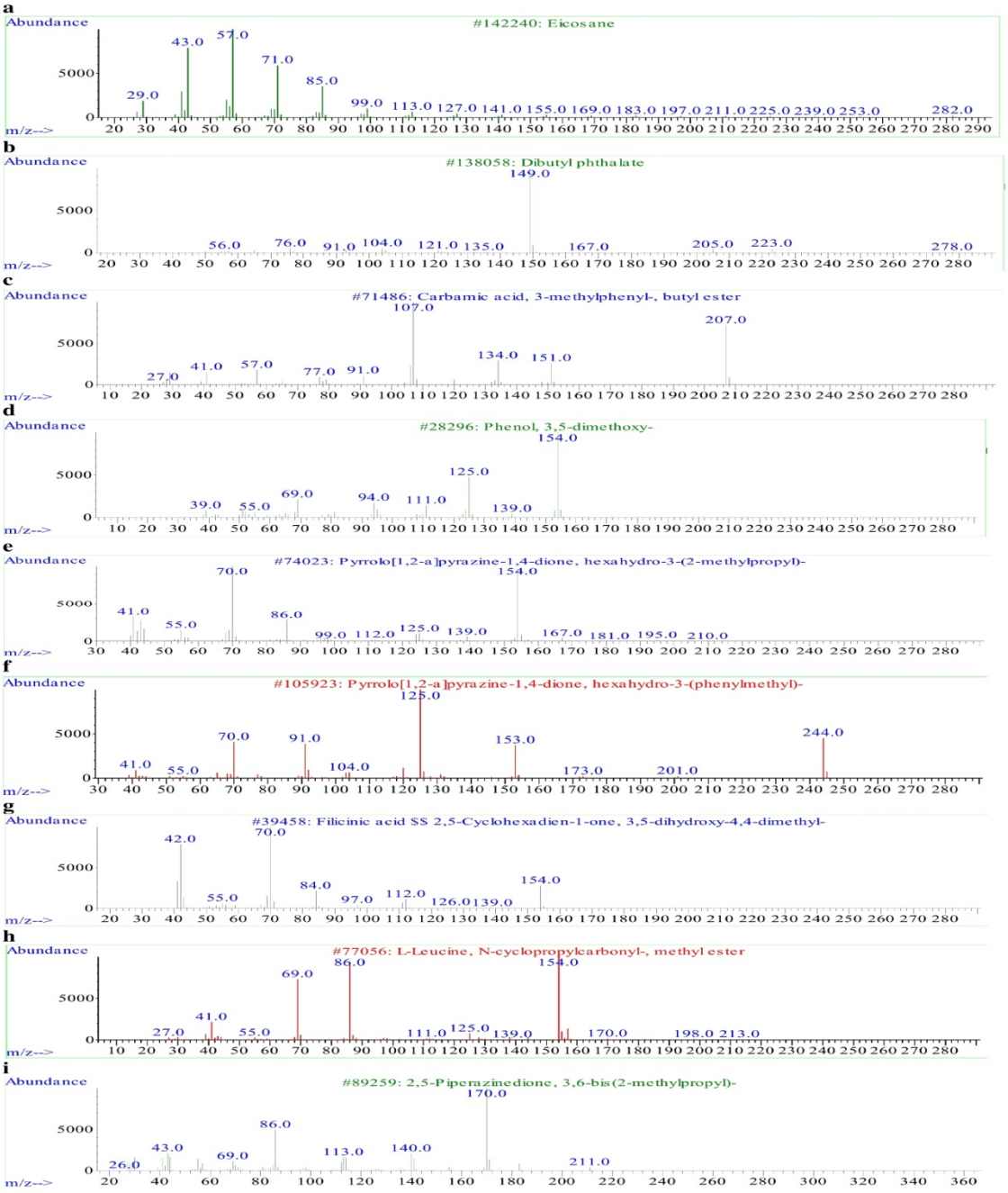
نتایج حاصل از بررسی اثر ضدمیکروبی و مهارگری متابولیت‌های تولیدی استخراج شده از جدایه *Bacillus* sp. Bp91 در شرایط آزمایشگاهی نشان داد دلیل ایجاد هاله بازدارنده درتقابل با *R. solanacearum* در سطح پتری، متابولیت‌های تولید شده می‌باشند که این نتیجه با تحقیقات دیگر محققان نیز منطبق است (Yu *et al.* 2011). گونه‌های باسیلوس برای سنتز متابولیت‌های ثانویه هم از بعد ساختار و هم عملکرد از تنوع زیادی برخوردار می‌باشند (Silo-Suh *et al.* 1994; Amin *et al.* 2012). شناسایی این متابولیت‌ها از محیط‌های کشت مایع حاوی باکتری‌ها توسط کروماتوگرافی گازی–طیف سنج جرمی (GC-MS) یک روش شناخته شده می‌باشد (Ahsan *et al.* 2017). در فرآیند بررسی طیف متابولیت‌های تولیدشده، طیف GC مشخص‌کننده تعداد ترکیبات پایدار در نمونه مجهول می‌باشد و هر چه میزان جذب یک پیک بیشتر باشد نشان‌دهنده آن است که آن ترکیب در نمونه مجهول درصد بیشتری دارد. همچنین هرچه پیک در زمان بازداری طولانی‌تری ظاهر شود، نشان‌دهنده جرم مولکولی بیشتر آن ماده است (Zabeti *et al.* 2014). در تحقیق حاضر پس از بررسی عصاره توسط کروماتوگرافی گازی–طیف سنج جرمی (GC-MS) و تجزیه و تحلیل طیف GC به دست آمده و مقایسه طیف‌های جرمی اجزاء تشکیل دهنده با کتابخانه‌های NIST14.L و WILEY275.L، ۳۸ پیک که نشانگر ۳۸ ترکیب آلی مختلف بود شناسایی گردید (جدول ۴)، که ترتیب ظهور آنها در شکل ۳ نشان داده شده است. آنالیز GC-MS نشان داد که اکثر ترکیبات، مشتقات ترکیبات آروماتیک و نیز مشتقات هیدروکربن‌های مختلف و لیپوپپتیدها بودند. این ترکیبات معمولاً دارای خاصیت ضدمیکروبی و ضدقارچی هستند (Ongena & Jacques, 2007; Raaijmakers *et al.* 2010; Brader *et al.* 2014; Ahsan *et al.* 2017). ترکیبات آلی فرار و مشتقات آروماتیک چند حلقه‌ای دارای پتانسیل ضدقارچی هستند (Müller *et al.* 2009; Memić *et al.* 2011). در بین مشتقات شناسایی شده، دو ترکیب ضدقارچ به ترتیب Eicosane (C_20H_{42}) و Dibutyl phthalate ($C_{16}H_{22}O_4$) با مدت زمان بازداری ۲۲/۲۴۹ (شکل۴–a) و ۲۱/۶۵۴ (شکل۴–b) شناسایی شدند. Eicosane به‌عنوان ترکیب ضدقارچی (Karanja *et al.* 2012; Nandhini *et al.* 2015) و Dibutyl phthalate نیز به همان شکل به‌عنوان ترکیب ضدقارچی (Roy *et al.* 2006; Nandhini *et al.* 2015) گزارش شده‌اند. هر دو ترکیب در میان ترکیبات شناسایی شده عصاره باکتری، از شاخص‌ترین متابولیت‌های ضدمیکروبی هستند. علاوه بر ترکیبات ذکرشده، ترکیبات Tetradecane ($C_{14}H_{30}$)، Dodecane ($C_{12}H_{26}$)، Hexadecane ($C_{16}H_{34}$)، 1-Chlorohexadecane ($C_{16}H_{33}Cl$)، Octadecane ($C_{18}H_{38}$) از گروه هیدروکربن‌های آلکان نیز در ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره استخراج شده از جدایه Bp91 تشخیص داده شدند. تحقیقات محققان قبلی نشان می‌دهد که این ترکیبات دارای اثرات ضدمیکروبی هستند (Ezati *et al.* 2018). ترکیبات مهم دیگر مشاهده شده در عصاره استخراج شده از جدایه Bp91، متابولیت‌های Carbamic acid, 3-methylphenyl-butyl ester و Phenol,3,5-dimethoxy- می‌باشند (شکل

جدول ٤. ترکیبات شناسایی شده موجود در عصاره اتیل استات سویه *Bacillus* sp. Bp91 توسط GC-MS.

Table 4. Compounds identified in ethyl acetate extract of *Bacillus* sp. Bp91 by GC-MS.

Peak No.	Retention time	Area%	Name of compound	Chemical formula	Molecular weight
1	6.803	0.67	2-Piperidinone	C5H9NO	99
2	11.39	0.8	Tetradecane	C14H30	198
3	15.348	1.69	Hexadecane	C16H34	226
4	17.172	0.42	Tricyclohexylmethane	C19H34	263
5	17.365	1.13	5-Ethyl-1-nonene	C11H22	154
6	17.58	3.1	N-Acetyl-N-(4-methoxyphenyl)acetamide	C11H13NO3	207
7	17.878	1.68	DL-Alanyl-l-leucine	C9H18N2O3	202
8	18.245	1.87	Hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione	C7H10N2O2	154
9	18.956	1.16	Octadecane	C18H38	255
10	19.218	6.91	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	C11H18N2O2	210
11	19.62	1.62	Phenol, 3,5-dimethoxy-	C8H10O3	154
12	19.789	1.57	1-N-Butylhydantoin	C7H12N2O2	156
13	20.809	6.06	L-Leucine, N-cyclopropylcarbonyl-, methyl ester	C11H19NO3	213
14	21.171	17.4	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)-	C11H18N2O2	210
15	21.316	7.42	Filicinic acid	C8H10O3	154
16	21.654	1.87	Dibutyl phthalate	C16H22O4	278
17	22.249	1.05	Eicosane	C20 H42	283
18	22.709	0.5	Ethyl 6-amino-6-oxohexanoate	C8H15NO3	173
19	23.654	0.41	Oleamide	C18H35NO	282
20	23.712	0.45	Fluoranthene	C16H10	202
21	23.794	0.76	Bergamotane	C15H28	208
22	24.872	9.43	2,5-Piperazinedione, 3,6-bis(2-methylpropyl)-	C12H22N2O2	226
23	25.262	0.83	Dodecane	C12H26	170
24	25.653	1.82	Filicinic acid	C8H10O3	154
25	26.067	1.08	2,5-Piperazinedione, 3-benzyl-6-isopropyl-	C14H18N2O2	246
26	26.999	3.77	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-	C14H16N2O2	244
27	27.262	0.34	Cyclo(L-leucyl-L-phenylalanyl)	C15H20N2O2	260
28	27.64	12.6	Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)-	C14H16N2O2	244
29	28.043	0.54	Heneicosane	C21H44	297
30	29.96	0.94	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	C24H38O4	391
31	30.322	1.79	2,5-dipropylthiazole	C9 H15 N S	169
32	30.619	0.55	1-Chlorohexadecane	C16H33Cl	261
33	30.887	3.21	Cyclo(L-leucyl-L-phenylalanyl)	C15H20N2O2	260
34	31.802	1.66	Carbamic acid, 3-methylphenyl-, butyl ester	C12H17NO2	207
35	32.251	2.85	l-Proline, N-allyloxycarbonyl-, hexyl ester	C15H25NO4	283

d،c-۴). ترکیبات حاوی فنل بطور کلی دارای خواص ضدمیکروبی هستند. ترکیبات کاربامیک‌اسید نیز دارای خاصیت قارچ‌کشی هستند (Rich & horsfall, 1961). در آنالیز صورت گرفته، ترکیبات Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione,hexahydro-3-(2-methylpropyl)-، Pyrrolo [1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmet، Filicinic acid، L-Leucine, N-cyclopropylcarb onyl-, methyl ester و 2,5-Piperazinedione, 3,6-bis (2-methylpropyl)- (شکل۴-e، f، g، h، i) بلندترین پیک‌ها و بیشترین درصد مساحت را نسبت به سایر



شکل ٤. کروماتوگرام اختصاصی تعدادی از متابولیت‌های مهم جدا شده از عصاره باکتری *Bacillus* sp. Bp91

Fig 4. Separate chromatograms of a number of important metabolites isolated from the extract of *Bacillus* sp. Bp91. (a)Eicosane (b)Dibutyl phthalate (c)Carbamic acid, 3-methylphenyl-, butyl ester (d)Phenol, 3,5-dimethoxy- (e)Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)- (f)Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)- (g)Filicinic acid (h)L-Leucine, N-cyclopropylcarbonyl-, methyl ester (i)2,5-Piperazinedione, 3,6-bis(2-methylpropyl)-

ترکیبات دارا بودند. بالاترین پیک با مساحت ۱۷/۴ درصد و سومین پیک با مساحت ۶/۹۱ درصد متعلق به ترکیب Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(2-methylpropyl)- است. دومین پیک با مساحت ۱۲/۶

درصد و هفتمین پیک با مساحت ۳/۷۷ درصد متعلق به ترکیب Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl)- می‌باشد. پیک چهارم با مساحت ۷/۴۲ درصد متعلق به Filicinic acid است. پنجمین پیک با مساحت ۶/۰۶ درصد متعلق به ترکیب L-Leucine, N-cyclopropylcarbonyl-, methyl ester و ششمین پیک با مساحت ۹/۴۳ درصد متعلق به 2,5-Piperazinedione, 3,6-bis(2-methylpropyl)- بود. بر-اساس تجزیه و تحلیل GC-MS، داشتن بالاترین عدد پیک و درصد سطح نشان‌دهنده این است که این پنج ترکیب در عصاره ایزوله باکتری، ترکیبات اصلی بوده‌اند. این ترکیبات بیشترین احتمال دارا بودن مواد فعال مؤثر در برابر *R. solanacearum* را دارند، از اینرو در میان ترکیبات شناسایی شده تشکیل دهنده عصاره، به نظر می‌رسد ترکیبات دارای ساختار حلقوی و گروه‌های عاملی، بیشترین سهم اثرات ضدمیکروبی را به خود اختصاص می‌دهند.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از رساله دکتری نگارنده اول است. اجرای این تحقیق با همکاری‌های بی شائبه ریاست محترم مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان کردستان جناب آقای دکتر محمدحسین سدری و راهنمایی‌های ارزنده جناب آقای دکتر سامان بهرامی کمانگر استادیار محترم آن مرکز میسر گردید. همکاری‌ها و راهنمایی‌های بزرگوارانه و صمیمانه جناب آقای دکتر جواد رزمی استادیار محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، همواره رهگشا بوده است؛ همچنین همکاری بی‌دریغ جناب آقای دکتر سیروان محمدی آذر استادیار محترم دانشگاه آزاد اسلامی واحد سنندج جهت کمک در انجام GC-MS ستودنی است، که بدین وسیله از زحمات و همکاری‌های کلیه عزیزان تشکر و قدر دانی می‌گردد.

منابع

Afsharmanesh H., and Ahmadzadeh M. 2016. The iturin lipopeptides as key compounds in antagonism of *Bacillus subtilis* UTB96 toward *Aspergillus flavus*. Biological Control of Pests and Plant Diseases, 5(1):79-95.(in Persian with English Summary).

Ahsan T., Chen J. G., Zhao X. X., Irfan M., Wu YH. 2017. Extraction and identification of bioactive compounds (eicosane and dibutyl phthalate) produced by *Streptomyces* strain KX852460 for the biological control of *Rhizoctonia solani* AG-3 strain KX852461 to control target spot disease in tobacco leaf. AMB Express, 7(1): 54.

Akinsanya M. A., Goh J. K., Lim S. P., Ting A. S. Y. 2015. Diversity, antimicrobial and antioxidant activities of culturable bacterial endophyte communities in *Aloe vera*. FEMS Microbiology Letters, 362(23): fnv184.

Alstrom S. and Burns R. G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biology and Fertility of Soils, 7: 232-238.

Altschul S. F., Gish W., Miller W., Mayers E. W. and Lipman D. J. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215(3): 403-410.

Aliye N., Fininsa C., Hiskias Y. 2008. Evaluation of rhizosphere bacterial antagonists for their potential to bioprotect potato (*Solanum tuberosum*) against bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*). Biological Control 47(3), 282–288.

Amin A., Khan M. A., Ehsanullah M., Haroon U., Azam S. M. F., Hameed A. 2012. Production of peptide antibiotics by *Bacillus* sp. GU 057 indigenously isolated from saline soil. Brazilian Journal of Microbiology, pp: 1340-1346.

Arianfar A., Mehraban Sang Atash M., Salhe Abadi S., 2017. Identification of chemical constituents of essential

oil from aerial parts of Florida Rubia. Journal of North Khorasan University of Medical Sciences, 9(1): 15-26 (in Persian with English Summary).

Astuti P., Wahyono., Nababan O. A. 2014. Antimicrobial and cytotoxic activities of endophytic fungi isolated from *Piper crocatum* Ruiz & Pav. Asian pacific Journal of Tropical Biomedicine, 4(2): 592-596.

Bajad S. U., Lu W., Kimball E. H., Yuan J., Peterson C., Rabinowitz J. D. 2006. Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography, 1125(1): 76-88.

Beiranvand M., Amin M., Hashemi-Shahraki A., Romani B., Yaghoubi S., Sadeghi P. 2017. Antimicrobial activity of endophytic bacterial populations isolated from medical plants of Iran. Iranian journal of microbiology, 9(1): 11-18.

Bent E., Chanway C. P. 2002. Potential for misidentification of spore-forming *Paenibacillus polymyxa* isolate as an endophyte by using culture-based methods. Applied and Environmental Microbiology, 68: 4650–4657.

Brader G., Compant S., Mitter B., Trognitz F. and Sessitsch A. 2014. Metabolic potential of endophytic bacteria. Current Opinion in Biotechnology, 27: 30–37.

Burd G. I., Dixon D. G., Glick B. R. 1998. A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. Applied and Environmental Microbiology, 64: 3663–3668.

Chakravarty G., Kalita M. C. 2012. Biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* against bacterial wilt of Brinjal and its possible plant growth promoting effects. Annals of Biological Research, 3(11): 5083–5094.

Chantawannakul P., Oncharoen A., Klanbut K., Chukeatirote E. & Lumyong S. 2002. Characterization of proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in Northern Thailand, Science Asia, 28: 241-245.

Danesh D. and Bahar M. 1984. Occurrence of bacterial wilt of potato in Iran. In: Proceedings of the ninth triennial conference of the European association for potato research, Interlaken, Switzerland, pp: 407–408.

Dhingra Onkar D., Sinclair James B. (Eds.). 1995. Basic Plant Pathology Methods, 2nd ed. CRC Press, USA. 448 P.

Ezati Sh., Mirzaie A., Zandi M. 2018. Evaluation of anti-efflux activity of *Anthemis atropatana* extract against ciprofloxacin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. Journal of Medicinal Plants, 66: 122-134.

Feng Y., Shen D., Song W. 2006. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates. Journal of Applied Microbiology, 100(5): 938– 945.

Gholamveisi N., Mohammadi Azar S., Moravej R. 2018. *Bacillus thuringiensis* strain NG, a novel isolated strain for production of various polyhydroxyalkanoates. Biological Journal of Microorganism, 6(24): 13-20.

Hall T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic acid symposium series, 41:95-98.

Hall T. 2011. Reviewed By: Dr. Ahmed Mansour Alzohairy. BioEdit: An important software for molecular biology. GERF Bulletin of Biosciences. 2(1): 60–61.

Hallmann J., Quadt-Hallmann A., Mahaffe W. F., and Kloepper J. W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology, 43: 895–914.

Hayward A. C. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudamonas solanacearum*. Annual Review of Phytopathology, 29: 65–87.

Hayward A. C. 2000. *Ralstonia solanacearum*. In: Lederberg, J. (Ed.), Encyclopedia of Microbiology. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp: 32–42.

Karanja E., Boga H., Muigai A., Wamunyokoli F., Kinyua J., Nonoh J. 2012. Growth characteristics and production of secondary metabolites from selected novel *Streptomyces* species isolated from selected Kenyan national parks. In: Annual Scientific conference proceedings, pp: 51-80.

Kheirandish Z. and Harighi, B. 2015. Evaluation of bacterial antagonists of *Ralstonia solanacearum*, causal agent of bacterial wilt of potato. Biological Control.86:14–19.

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16: 111-120.

Kurabachew H., Assefa F., Hiskias Y. 2007. Evaluation of Ethiopian isolates of *Pseudomonas fluorescens* as biocontrol agent against potato bacterial wilt caused by *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *solanacearum*. Acta agriculturae Slovenica, 90(2): 125–135.

Kurabachew H. and Wydra, K. 2013. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria and their potential as bioprotectant against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Biological Control, 67(1): 75–83.

Manter D. K., Delgado J. A., Holm D. G. and Stong, R. A. 2010. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. Plant Microbe Interactions , 60(1): 157–166.

Mantsala P, Zalkin H. 1980. Extracellular and membrane-bound proteases from *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology, 141(2): 493–501.

Memić M., Selović A., Sulejmanović J. 2011. Antifungal activity of polycyclic aromatic hydrocarbons against ligninolytic fungi. Hemijska industrija , 65(5): 575–581.

Miliute I., Buzaita O., Baniulis D. and Stanys, V. 2015. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: a review. Zemdirbyste-Agriculture, 102(4): 465–478.

Mirzaie A., Zare Karizi Sh. 2016. Study of chemical composition and characteristics of *Centurea cyanus* extract on colon cancer cell line and analysis of apoptosis gene expression. Tehran University Medical Journal (TUMJ), 74(9): 626-34. (in Persian with English Summary).

Müller H., Westendorf C., Leitner E., Chernin L., Riedel K., Schmidt S., Eberl L., Berg, G. 2009. Quorum-sensing effects in the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* HRO-C48. FEMS Microbiology Ecology, 67(3): 468–478.

Murate L. S., de Oliveira A. G., Higashi A. Y., Barazetti A. R., Simionato A. S., Silva C. S., et al. 2015. Activity of secondary bacterial metabolites in the control of citrus canker. Agricultural Sciences, 6(3): 295–303.

Nandhini S. U., Sangareshwari S., Lata K. 2015. Gas chromatography–mass spectrometry analysis of bioactive constituents from the marine *Streptomyces*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 8: 244–246.

Ongena M., and Jacques Ph. 2007. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology, 16(3): 115-125.

Page R. D. M. 1996. Tree view: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer applications in the biosciences: CABIOS, 12(4): 357-358.

Pant G., Prakash A., Pavani J. V. P., Bera S., Deviram G. V. N. S., Kumar A., Panchpuri M., Prasuna R. G. 2015. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. Journal of Taibah University for Science, 9(1): 50–55.

Pireh S. and Harighi, B. 2017. Phenotypic and genetic properties of *Ralstonia solanacearum* strains, the causal agent of bacterial wilt of potato isolated from Kurdistan province, Iranian Journal of Plant Pathology, 53(1): 1–13 (in Persian with English Summary).

Raaijmakers J. M., Bruijn I. de., Nybroe O. & Ongena, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. FEMS Microbiology Reviews, 34(6): 1037–1062

Ramesh R. and Phadke G.S. 2012. Rhizosphere and endophytic bacteria for the suppression of eggplant wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Crop Protection, 37: 35–41.

Reiter B., Pfeifer U., Schwab H. & Sessitsch A. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. Applied and Environmental Microbiology, 68(5): 2261–2268.

Rich S. and J. G. Horsfall. 1961. Fungitoxicity of carbamic and thiocarbamic acid esters. Connecticut Agricultural Experiment Station Bulletin, Number 639. 95 p.

Rohloff, J. 2015. Analysis of phenolic and cyclic compounds in plants using derivatization techniques in combination with GC-MS based metabolite profiling. Molecules, 20(2): 3431-3462.

Roy R., Laskar S., Sen S**.** 2006**.** Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2. Microbiological Research, 161(2):121-126.

Saha M., Sarkar S., Sarkar B., Sharma B. K., Bhattacharjee S., Tribedi P. 2016. Microbial siderophores and their potential applications: a review. Environmental Science and Pollution Research, 23: 3984–3999.

Sambrook, J. and Russell, D.W. 2001. Molecular Cloning, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1863 p.

Schwyn B., Neilands J. B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Analytical Biochemistry, 160(1): 47–56.

Sessitsch A., Reiter B. & Berg G. 2004. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant growth-promoting and antagonistic abilities. Canadian Journal of Microbiology, 50(4): 239-249.

Silo-Suh L. A., Lethbridge B. J., Raffel S. J., He H., Clardy J., Handelsman J. 1994. Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. Applied and Environmental Microbiology, 60(6): 2023–2030.

Sturz A. V., Christie B. R. and Nowak J. 2000. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable system of crop production. Critical Reviews in Plant Sciences, 19(1): 1-30.

Swanson J. K., Yao J., Tans-Kersten J. and Allen, C. 2005. Behavior of *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2 during latent and active infection of geranium. Phytopathology, 95(2): 136-143.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution, 30(12): 2725-2729.

Tan S. Y., Dong Y., Liao H. P., Huang J. F., Song S., Xu Y. C., Shen Q. R. 2013. Antagonistic bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* induces resistance and controls the bacterial wilt of tomato. Pest Management. Science, 69: 1245–1252.

Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., Lane D. J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. Journal of Bacteriology, 173(2): 697–703.

Wicker E., Grassart L., Coranson-Beaudu R., Mian D., Guilbaud C., Fegan M. 2007. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential. Applied and Environmental Microbiology. 73(21): 6790–6801.

Yabuuchi E., Kosako Y., Yano I., Hotta H., Nishiuchi Y. 1995. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. Nov.: proposal for *Ralstonia pickettii*, *Ralstonia solanacearum* and *Ralstonia eutropha*. Microbiology and Immunology, 39: 897–904.

Yu X., Ai C., Xin L. & Zhou G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. European Journal of Soil Biology, 47(2): 138–145.

Yu S., Teng C., Bai X., et al. 2017. Optimization of Siderophore Production by *Bacillus* sp. PZ-1 and its potential enhancement of phytoextration of Pb from soil. Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(8): 1500-1512.

Zabeti S. M., Ismaili A., Madah-Arefi H., Nazarian-Firouzabadi F. and Mojiri F. 2014. Separation of secondary metabolites in DNA extraction process of Thymus and analysis of them by GC mass. Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology). 27(1): 66-74 (in Persian with English Summary).