مقاله تحقیقی

بررسی تاثیر باکتری‌های فیتوسفر بر خصوصیات جوانه‌زنی بذر و گیاهچه پنبه

محمد رضی‌نتاج[۱]، غلام خداکرمیان[۲]

۱– استادیار پژوهشی موسسه تحقیقات پنبه کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران.

۲– استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران.

مسئول مکاتبات: محمد رضی‌نتاج، ایمیل: moh_razinataj@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۱/۱۲ ۱۲(۲) ۱۰۱–۱۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۲/۰۴

چکیده

فیلوسفر سطح اندام‌های هوایی گیاهان و مکانی برای زندگی ریزموجودات است. ریزوسفر ناحیه‌ای از ریشه بوده که میکروارگانیسم‌های خاک تمایل زیادی به آن دارند و از ترشحات ریشه به عنوان منابع کربن و انرژی استفاده و بر سر غذا و مکان با هم رقابت می‌کنند. به منظور بررسی تاثیر باکتری‌های فیتوسفر پنبه در خصوصیات و میزان رشد گیاه‌چه پنبه، باکتری‌هایی از فیتوسفر به صورت اپی‌فیت و اندوفیت از بوته و بذر گیاه پنبه در مناطق مختلف پنبه‌کاری و مزارع استان گلستان جداسازی شد. تک کلنی‌های باکتریایی خالص‌سازی شده، بر اساس خصوصیات مورفولوژیک نظیر رنگ، اندازه، فرم حاشیه و ظاهر کلنی‌ها خالص‌سازی شدند. به منظور تاثیر باکتری‌ها روی رشد گیاه‌چه، بذور به مدت ۱۰ دقیقه با سوسپانسون باکتری به رقت 10^6 CFU خیسانده و تعداد بذور جوانه‌زده در روزهای سوم و ششم شمارش شده، تعداد ۱۰ عدد بذر به صورت تصادفی در هر تیمار انتخاب و صفاتی مانند سرعت جوانه‌زنی، طول رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه، وزن تر و خشک ریشه‌چه، وزن تر و خشک ساقه‌چه، وزن تر و خشک کل، مقدارآب بافت ریشه‌چه، ساقه‌چه و کل اندازه گیری شدند براساس آزمون‌های بیوشیمیایی و فنوتیپی، تکثیر و تعیین ترادف ژن 16SrRNA نمایندگان برتر سویه‌ها مشخص شدند. جدایه‌های *Bacillus pumilus* MR11، *B. pumilus* MR12، *B. pumilus* MR13، *B. safensis* MR21، *B. safensis* MR22 و *Stenotrophomonas pavanii* MR31 به عنوان جدایه‌های برتر به صورت اندوفیت و از ریزوسفر جداسازی و شناسایی شدند. همچنین گونه‌های *Pseudomonas fluorescens*، *P. syringae* و *Pantoea annanatis* نیز به عنوان گونه‌های اپی‌فیت از گیاه و بذر جداسازی و شناسایی شدند. براساس مقایسه میانگین‌های صفات مورد بررسی گیاه‌چه‌های شش روزه تیمار ناشی از سویه *Bacillus pumilus* MR11 و *B. pumilus* MR12 بالاترین طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و وزن تر ساقه‌چه رابه ترتیب با ۶/۶۷، ۶/۷۶ سانتیمتر، ۱/۱۵ گرم، ۵/۷، ۶/۲۵ سانتیمتر و ۱/۱۷ گرم داشتند. با توجه به اینکه سویه‌های *B. pumilus* MR12 و *S. pavanii* MR31 بالاترین درصد و سرعت جوانه‌زنی را نیز دارا بودند، لذا استفاده آنها به عنوان تیمار بذری می‌توانند، موجب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور شده و در کاهش میزان خسارت ناشی از بیماری‌های اول فصل و مرگ گیاه‌چه موثر باشند. نظر به اینکه از نظر ظرفیت مقدار آب گیاه‌چه نیز این سویه‌ها برتر بودند بررسی تاثیر آنها در جوانه‌زنی بذور پنبه در شرایط شور در تحقیقات آتی توصیه می‌گردد. این اولین گزارش از جداسازی باکتری‌های *B. safensis*، *B. pumilus* و *S. pavanii* از ریزوسفر و به صورت اندوفیت پنبه در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری، اندوفیت، گیاهچه، پنبه

مقدمه

فیلوسفر سطح اندام‌های هوایی گیاهان و مکانی برای زندگی ریزموجودات است. قندهای ساده مانند گلوکز، فروکتوز و سوکروز مواد کربنی غالب در روی برگها و ساقه بوده که از قسمت‌های زخمی یا منافذ ترشحی به خارج راه می‌یابند. در این قسمت‌ها بیشترین جمعیت رورستی را می توان مشاهده کرد (Mercier &Lindow, 2000). ساکنین میکروبی فیلوسفر شامل جنس‌های مختلف باکتری‌ها، قارچ‌های رشته‌ای، مخمرها، جلبک‌ها و با جمعیت کمتری پروتوزواها و نماتدها هستند. باکتری‌ها بخصوص باکتری‌های *Pseudomonas syringae* و *Pantoea* sp. فراوان‌ترین ساکنین فیلوسفر هستند (Andrews &Harris, 2000). گونه گیاه و نوع برگ تاثیر به‌سزایی در تعداد باکتری‌های فیلوسفر دارد. برای مثال تعداد باکتری در فیلوسفر گیاهان پهن برگ مانند خیار و لوبیا به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان پهن برگ دارای برگ‌های مومی و گراس‌ها است. از سوی دیگر سطح قسمت‌های هوائی گیاه (فیلوسفر) در معرض تغییرات سریع و مداوم دما، رطوبت، اشعه ماورا بنفش، رطوبت نسبی و شیب غلظت مواد غذائی است (Brencic & Winans, 2005).

ریزوسفر ناحیه ای از ریشه بوده که میکروارگانیسم‌های خاک تمایل زیادی به آن دارند و از ترشحات ریشه به عنوان منابع کربن و انرژی استفاده و بر سر غذا و مکان با هم رقابت می‌کنند. باکتری‌هایی نظیر *Bacillus*، *Pseudomonas*، *Azospirillium*، *Azotobacter*، *Arthrobacter*، *Entrobacter* و *Serratia* از جمله باکتری‌های محرک رشد می‌باشند که دو جنس *Bacillus* و *Pseudomonas* بیشترین جمعیت را به خود اختصاص داده‌اند (Podile & Kishore, 2006). باکتری‌های افزاینده رشد گیاه، جزیی از برنامه مدیریت تلفیقی بیماری بوده و موجب کاهش مصرف مواد شیمیایی و عملیات کنترل زراعی می‌شوند (Shivalingaiah *et al.* 2013). این باکتری‌ها می توانند در مقابل طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زای گیاهی، سیستم مقاومت القایی را تحریک کنند. (Pieterse *et al.*, 2003). القای مقاومت در برابر بیماری‌های مختلف در محصولات متعدد نظیر موز، لوبیا، برنج، و خیار توسط باکتری‌های *Pseudomonas* و *Bacillus* گزارش شده است (Harish *et al.*, 2008, Hasan *et al.*, 2010). از جمله عوامل محرک رشد سودوموناس‌ها می‌توان تولید سیدروفور، پروتئاز، ترکیبات ضدمیکربی و آنزیم‌های تثبیت کننده فسفات را نام برد (Suresh *et al.*, 2010).

اغلب گونه‌های *Pseudomonas* به طور معنی‌داری طول گیاه، طول ریشه، و ماده خشک را افزایش داده و منجر به تولید جوانه و ریشه گیاه می‌شود. اغلب باکتری‌های تحریک کننده رشد گیاه مخصوصا اگر قبل از کاشت در بذر تلقیح شوند قادر به استقرار در ریشه هستند. استفاده از باکتری‌های تحریک کننده رشد گیاه به عنوان عامل کنترل بیولوژیک جایگزینی برای استفاده از کودهای شیمیایی است که منجر به آلودگی محیط زیست شده‌اند (Ali *et al.*, 2010). سودوموناس‌ها گروه عمده باکتری‌های ریزوسفر در بین جمعیت باکتریایی تحریک کننده رشد گیاه هستند که با راهکارهایی نظیر تولید هورمون‌های گیاهی، تحریک جذب مواد غذایی و کنترل بیمارگران گیاهی فعالیت می‌کنند (Minaxi, 2010).

گونه‌های باسیلوس در داخل بافت‌های مختلف گیاهان به عنوان اندوفیت گزارش شدند. گونه *B. megaterium* فراوان‌ترین گونه در ریزوسفر و *B. pumilus* و *B. subtilis* فراوان‌ترین گونه‌های فیلوسفر سویا گزارش شده‌اند (Arias, *et al.*, 1999). باکتری *B. endophyticus* از بافت داخلی الیاف پنبه (Reva, *et al.*, 2002)، باکتریهای *Erwinia* sp.، *Clavibacter* sp.، *B. brevis*، *B. pumilus*، *Bacillus* sp. و *Xanthomonas* sp. از سطح سترون ریشه، ساقه، غنچه و غوزه دو رقم پنبه به صورت اندوفیت جداسازی شدند (Misaghi & Donndelinger, 1990). باکتری *Enterobacter asburiae* به صورت اندوفیت و همچنین از ریزوسفر پنبه جداسازی شد که نتایج نشان داد که این باکتری قادر است به طور سیستمیک در گیاه گسترش یابد (Hallmann *et al.*, 1998). باکتری *P. fluorescens* باعث افزایش معنی‌دار جوانه‌زنی و وزن خشک پنبه در شرایط گلخانه شد (Salaheddin *et al.*, 2010). جدایه *P.*

fluorescens موجب تحریک ظهور و رشد گیاهچه و افزایش عملکرد همراه با کاهش بیماری گردید (Safyazov *et al.*, 1995).

مواد و روش‌ها

در طول مدت رشد گیاه پنبه از اواخر اردیبهشت تا شهریور، از قسمت‌های مختلف هوائی وریشه گیاه در مزارع پنبه‌کاری مناطق مختلف استان گلستان به صورت تصادفی نمونه‌بردای انجام شد. به منظور بررسی باکتری‌های ریزوسفر نیز بوته‌ها به طور کامل همرا ه با ریشه و خاک همراه با آن در داخل پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی باکتری‌ها از قسمت‌های مختلف گیاهی

جهت جداسازی باکتری‌های ریزوپلان از روش احمد و همکاران (Ahmad *et al.*, 2008) استفاده شد و باکتری‌های اندوفیت بذر و اندام گیاهی با استفاده از روش ارائه شده توسط میثاقی و دوندلینگر (Misaghi & Donndelinger, 1990) و باکتری‌های اپی‌فیت با روش مهتا و همکاران (Mehta *et al.*, 2005) جداسازی شدند.

بررسی ویژگی‌ها ظاهری سویه‌ها

پس از خالص سازی تک کلنی‌های باکتریایی، به منظور شناسایی، آزمون‌های گرم (Suslow *et al.*, 1982)، لوان (Lelliott *et al.*, 1966)، اکسیداز (Lelliott *et al.*, 1966)، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی (Lelliott *et al.*, 1966)، ایجاد فوق حساسیت (Klement *et al.*, 1964)، کاتالاز (Fahy & Persley, 1983) ، رشد هوازی و بی‌هوازی (Fahy & Persley, 1983)، تولید رنگدانه فلورسنت در محیط King– B (King *et al.*, 1954)، استفاده از قندها، اسیدهای آمینه، الکل‌ها و اسیدهای آلی (Schaad, *et al.*, 2001) و سایر آزمون‌های تکمیلی انجام شد.

ارزیابی تاثیر باکتری روی رشد گیاهچه

بذور به مدت ۱۰ دقیقه با سوسپانسون باکتری به رقت CFU ۱۰^{۶}خیسانده، سپس تعداد ۱۰۰ عدد بذر، در ۳ تکرار داخل حوله کاغذی (واتمن) به ابعاد (۲۵×۲۵) سانتی‌مترمربع کشت و در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و با دوره روشنایی ۱۶ ساعت نور و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. تعداد بذور جوانه‌زده در روزهای سوم و ششم شمارش، تعداد ۱۰ عدد بذر به صورت تصادفی در هر تیمار انتخاب و صفاتی مانند سرعت جوانه‌زنی، طول رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه، وزن تر و خشک ریشه‌چه، وزن تر و خشک ساقه‌چه، وزن تر و خشک کل، مقدارآب بافت ریشه‌چه، ساقه‌چه و کل اندازه گیری شدند. جهت بدست آوردن وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه تمامی پاکت‌ها در داخل آون با دمای ۷۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند و سپس وزن خشک نمونه‌ها ثبت شد (ISTA, 2015).

شناسائی باکتری‌های منتخب با استفاده از مطالعات مولکولی

بررسی موقعیت تاکسونومیکی باکتری‌های منتخب بر اساس تعیین ترادف ناحیه ژنی 16s rRNA انجام شده است. برای تکثیر این ناحیه از آغازگرهای ساخت شرکت سیناژن با توالی F27: 5´–AGAGTTTGATCMTGGCTCAG– 3´ و R1492: 5´–TACGGYTACCTTGTTACGACTT– 3´ استفاده شد (Lane, 1991). برای استخراج دی ان ای، جدایه‌های باکتری بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت شدند. ۲۴ ساعت پس از رشد در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، سلول‌های باکتری در آب مقطر استریل، سوسپانسیون شدند. میزان کدری سوسپانسیون (Optical Density–OD) در ۶۰۰ نانومتر به میران ۰/۲—۰/۱ واحد تنظیم شد. به هر نمونه ۰/۱ حجم هیدروکسید پتاسیم یک نرمال اضافه شد. نمونه‌ها پس از ورتکس، به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و پس از ۵ دقیقه سانتریفوژ در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه، محلول بالائی جدا و به عنوان محلول حاوی DNA برای برخی از آزمون‌های ژنوتیپی به‌کار برده شد (Arabi *et al.*, 2006). برای تکثیر این ناحیه ژنی با استفاده از PCR، واکنش در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر به شرح ذیل انجام شد: مخلوط واکنش شامل ۲ میکرولیتر DNA، ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer 1X، ۱ میکرومول از هر نوع آغازگر، ۰/۲

میلی‌مول از هر یک dNTPs، ۱/۵ میکرومول کلرید منیزیم و ۳ واحد Taq پلی‌مراز و میزان آب نیز ۱۷/۹۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. شرایط زمانی و دمایی شامل مرحله واسرشته سازی اولیه در دمای۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و سپس ۳۵ چرخه مجزا (شامل واسرشته‌سازی در دمای۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر به DNA ژنومی به مدت یک دقیقه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و تکثیر DNA در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه) و سرانجام، یک مرحله بسط نهائی در دمای۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد (Ausubel, *et al.*, 1992). پس از تایید وجود باند تکثیر در ژل آگارز ۱/۵ درصد در محصول PCR، نمونه‌های تکثیر شده برای تخلیص و در نهایت تعیین ترادف توالی به شرکت Macrogen (کره‌جنوبی) ارسال گردید. برای هم‌ردیف‌سازی چندگانه (multiple alignment)، ترادف‌های بدست آمده از جدایه‌های مورد بررسی، از نرم‌افزار Bioedit 7.0.9.0 استفاده شد. برای مقایسه تشابه و فاصله ژنتیکی ترادف‌های حاصل از نرم‌افزار Mega5 استفاده شد (Felsenstein, 1989). درخت فیلوژنتیکی با روش Neighbour–Joining و ماتریکس فاصله Jukes–Cantor با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap محاسبه و برای باکتری‌های گرم منفی از *E. coli* و باکتری‌های گرم مثبت از *Paenibacillus bracinonensis* به عنوان outgroup در ترسیم استفاده گردید (Jukes & Cantor, 1969) و برای مشاهده و تحلیل آن، از برنامه Tree View 1.6.6 (Page, 1996) استفاده شد.

نتایج

براساس تجزیه واریانس ویژگی‌های طول ریشه‌چه، وزن تر ریشه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه، درصد و سرعت جوانه‌زنی، مقادیر آب ریشه‌چه، ساقه‌چه و گیاه‌چه در گیاه‌چه‌های سه روزه در سطح یک درصد معنی‌دار بودند و در سایر صفات اثر معنی‌داری نداشتند. همچنین ویژگی‌های طول ریشه‌چه، وزن تر ریشه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه، وزن خشک گیاه‌چه، درصد و سرعت جوانه‌زنی، مقدار آب ریشه‌چه، ساقه‌چه و سرعت جوانه‌زنی نهایی در سطح یک درصد و صفات طول ساقه‌چه، وزن تر گیاه‌چه و مقدار آب گیاه‌چه‌های شش روزه، در سطح پنج درصد معنی‌دار بودند. براساس مقایسه میانگین‌های صفات مورد بررسی گیاه‌چه‌های شش روزه تیمار ناشی از سویه *B. pumilus* MR 11 و *B. pumilus* MR12 بالاترین طول ریشه‌چه و ساقه چه و وزن تر ساقه‌چه را داشتند و در سایر ویژگی‌ها نیز برتر از سایرین بودند. نتایج تجزیه واریانس و گروه بندی صفات مختلف گیاه‌چه‌های سه و شش روزه در تیمارهای باکتریایی بذری در جداول ۴ الی ۷ اشاره شده است.

جدول ۱– ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌های باکتریایی جدا شده از ریزوسفر و اندوفیت پنبه

Table 1– Phenotypic and biochemical characteristics of bacterial isolates from rhizosphere and endophyte of cotton

Test \ Isolat	*S. pavanii* MR31	*B. pumilus* MR13	*B. pumilus* MR12	*B. pumilus* MR11	*B. safensis* MR22	*B. safensis* MR21
Gram	–	+	+	+	+	+
Oxidase	–	–	–	–	–	–
Flourescent on KB medium	–	–	–	–	–	–
Oxidative metabolism	+	+	+	+	+	+
Fermentative metabolism	–	–	–	–	–	–
Soft rot on Potato	–	–	–	–	–	–
Starch hydrolysis	–	–	–	–	–	–
Nitrate reduction	–	–	–	–	–	–
Gelatin hydrolysis	–	+	+	+	+	+
Lipase	–	–	–	–	–	–
Growth on NaCl 3%	+	+	+	+	+	+
Growth on NaCl 5%	–	+	+	+	+	+
Utilization of:						
Glucose	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	–	+	+
D–mannose	+	+	+	+	+	+
D–galactose	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	–	–	+
Arabinose	+	–	+	–	–	+
D–fructose	+	–	+	+	+	+
Trehalose)	+	+	+	+	+	+
Acetate)	–	–	–	–	–	–
Malonate	–	+	+	–	–	–
L–tartrate	–	–	+	–	+	+
Urate	–	–	–	–	–	–
Citrate	+	–	–	–	–	–
D–galactorunate	–	+	–	–	–	–
L–maleate	–	–	–	–	–	–
Lactate	+	+	–	+	+	–
Nicutinate	–	–	–	–	–	–
Meso–inositol	–	+	–	+	–	–
L–cysteine	–	–	–	–	–	–
Ganine	–	–	–	–	–	–
Glysine	+	+	+	+	+	+
Caseine	+	+	+	+	+	+

براساس نتایج ناشی از تکثیر ژن 16S rRNA (جدول ۴) و نتایج ناشی از خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی (جدول ۱)، جدایه‌های *S. pavanii* MR31، *B. safensi s* MR21، *B. safensis* MR22، *B. pumilus* MR13، *B. pumilus* MR12 و *B. pumilus* MR11 شناسایی و نام‌گذاری شدند.

جدول ۲– مقایسه میانگین های صفات مختلف گیاه‌چه پنبه سه روزه در تیمارهای بذری نمایندگان باکتری‌های محرک رشد.

Table 2. Mean comparison of different characteristics of three–day cotton seedling in seed treatments representing cotton growth bacteria.

Characteristics / Isilates	Seedling dry weight (g)	Germination percentage	Germination velocity	Radicle water (g)	Shoot water (g)	Seedling water (g)	Radicle length (cm)	Pedicle length (cm)	Pedicle wet weight (g)	Radicle wet weight (g)
Control	0.3 a	93 bcd	30.99 bcd	0.817 d	0.347 f	0.41 e	2.3 c	1.31 a	0.445 a	0.065 ef
B.pumilus MR 11	0.282 ab	84 ef	27.99 ef	0.817 d	0.362 f	0.42 de	2.01 cd	1.23 a	0.427 a	0.057 f
B. pumilus MR13	0.285 ab	92 cd	30.66 cd	0.89 abc	0.417 cde	0.512 bc	2.73 bc	1.37 a	0.47 a	0.122 b–e
P. fluorescens	0.25 b	94 bc	31.33 bc	0.882 abc	0.42 cde	0.482 c	1.44 d	1.35 a	0.419 a	0.062 f
B. pumilus MR12	0.27 ab	97 a	32.33 a	0.87 bc	0.397 de	0.56 bc	2.48 c	1.15 a	0.42 a	0.127 bcd
B. pumilus	0.287 ab	95 ab	31.66 ab	0.895 abc	0.442 bc	0.56 bc	3.25 ab	1.33 a	0.49 a	0.167 b
P. annanatis	0.285 ab	86 e	28.66 e	0.872 bc	0.392 e	0.462 cde	2.1 cd	1.2 a	0.46 a	0.082 def

ادامه جدول ۲– مقایسه میانگین های صفات مختلف گیاهچه پنبه سه روزه در تیمارهای بذری نمایندگان باکتری‌های محرک رشد.

Table 2. Continued.

Characteristics / Isilates	Seedling wet weight (g)	Pedicle dry weight (g)	Radicle dry weight (g)	Radicle length (cm)	Pedicle length (cm)	Pedicle wet weight (g)	Radicle wet weight (g)	Seedling wet weight (g)	Pedicle dry weight (g)	Radicle dry weight (g)
P. annanatis	0.51 cde	0.29 a	0.01 c	2.5 c	1.25 a	0.46 a	0.107 c–f	0.57 b–e	0.265 a	0.012 bc
B. safensis MR22	0.485 de	0.272 a	0.01 c	3.51 a	1.3 a	0.457 a	0.147 bc	0.605 bc	0.247 a	0.02 a
B. safensis MR21	0.59 bcd	0.275 a	0.01 c	2.31 c	1.35 a	0.43 a	0.102 c–f	0.532 cde	0.252 a	0.01 c
P. syringae	0.482 e	0.242 a	0.007 c	2.23 c	1.3 a	0.452 a	0.077 def	0.532 cde	0.272 a	0.01 c
S. pavanii MR31	0.55 cde	0.252 a	0.017 ab	2.21 c	1.29 a	0.45 a	0.09 c–f	0.537 cde	0.262 a	0.01 c
P. fluorescens	0.657 ab	0.272 a	0.017 ab	2.14 cd	1.28 a	0.485 a	0.112 b–f	0.595 bc	0.272 a	0.01 c
P. syringae	0.535 cde	0.277 a	0.01 c	3.26 ab	1.31 a	0.487a	0.22 a	0.705 a	0.252 a	0.017 ab

The numbers in each column, which are in at least one common letter, are statistically grouped together.

ادامه جدول ۲– مقایسه میانگین های صفات مختلف گیاهچه پنبه سه روزه در تیمارهای بذری نمایندگان باکتری‌های محرک رشد.

Table 2– Continued.

Characteristics / Isilates	Seedling dry weight (g)	Germination percentage	Germination velocity	Radicle water (g)	Shoot water (g)	Seedling water (g)
P. annanatis	0.28 ab	95 ab	31.66 ab	0.877 abc	0.427 cd	0.512 bc
B. safensis MR22	0.265 ab	91 d	30.33 d	0.867 bc	0.46 ab	0.555 b
B. safensis MR21	0.265 ab	95 ab	31.74 ab	0.885 abc	0.41 cde	0.502 bc
P. syringae	0.282 ab	82 f	27.33 f	0.86 c	0.402 de	0.47 cd
S. pavanii MR31	0.275 ab	95 ab	31.66 ab	0.875 abc	0.412cde	0.49 c
P. fluorescens	0.28 ab	86 e	28.66 e	0.905 ab	0.437 bc	0.522 bc
P. syringae	0.267 ab	92 cd	30.66 cd	0.915 a	0.485 a	0.62 a

The numbers in each column, which are in at least one common letter, are statistically grouped together.

جدول ۳– مقایسه میانگین های صفات مختلف گیاهچه پنبه شش روزه در تیمارهای بذری نمایندگان باکتری‌های محرک رشد.

Table 3– Mean comparison of different characteristics of six–day cotton seedling in seed treatments representing cotton growth bacteria

Characteristics / Isilates	Radicle length (cm)	Pedicle length (cm)	Pedicle wet weight (g)	Radicle wet weight (g)	Seedling wet weight (g)	Pedicle dry weight (g)	Radicle dry weight (g)
Control	2.74 f	4.67 de	0.937 bc	0.014ef	0.948cd	0.282abc	0.004 fg
B..pumilus MR11	6.67 a	6.76 a	1.15 ab	0.034 b–f	1.18 a–d	0.256 abc	0.012 ab
B. pumilus MR13	5.95 ab	5.33 a–e	0.867 c	0.033 c–f	1.05 bcd	0.228 c	0.011abc
P. fluorescens	2.67 f	4.98 cde	1.12 ab	0.019 ef	1.14 a–d	0.285 abc	0.003 g
B. pumilus MR12	5.7 abc	6.25 abc	1.17 ab	0.042 b–d	1.16 a–d	0.233 c	0.009a–d
B. pumilus	5.2 bc	5.15 b–e	0.92 bc	0.025 c–f	0.944 d	0.245 bc	0.009a–d
P. annanatis	3.73 ef	5.21 b–e	1 bc	0.045 abc	1.04 bcd	0.265 abc	0.005 efg

The numbers in each column, which are in at least one common letter, are statistically grouped together.

ادامه جدول ۳– مقایسه میانگین های صفات مختلف گیاه‌چه پنبه شش روزه در تیمارهای بذری نمایندگان باکتری‌های محرک رشد.

Table 3– Coninued.

Characteristics / Isilates	Seedling dry weight (g)	Germination percenta	Germination velocity	Radicle water (g)	Shoot water (g)	Seedling water (g)	Total Germination Velocity
Control	0.287abc	96 b	15.99b	0.662bcd	0.697bcd	0.695d	46.99cde
B..pumilus MR11	0.27abc	96 b	15.99b	0.61cd	0.777 a	0.772abc	43.99 f
B. pumilus MR13	0.24 c	93 c	15.5 c	0.667cd	0.735abc	0.772abc	46.16 e
P. fluorescens	0.29abc	98 ab	16.33ab	0.822abc	0.745abc	0.745a–d	47.66 a–d
B. pumilus MR12	0.262 c	98 ab	16.33ab	0.77a–d	0.787 a	0.787ab	48.66 a
B. pumilus	0.255bc	96 b	15.99b	0.555d	0.727abc	0.725bcd	47.66 a–d
P. annanatis	0.27abc	87 d	14.49d	0.884ab	0.732abc	0.74a–d	43.16 f

The numbers in each column, which are in at least one common letter, are statistically grouped together.

ادامه جدول ۳– مقایسه میانگین های صفات مختلف گیاه‌چه پنبه شش روزه در تیمارهای بذری نمایندگان باکتری‌های محرک رشد.

Table 3– Coninued.

Characteristics / Isilates	Radicle length (cm)	Pedicle length (cm)	Pedicle wet weight (g)	Radicle wet weight (g)	Seedling wet weight (g)	Pedicle dry weight (g)	Radicle dry weight (g)
P. annanatis	4.95bcd	5.55a–e	1.04bc	0.019ef	1.06bcd	0.251bc	0.007c–f
B. safensis MR22	4.4cde	4.76de	0.952bc	0.047ab	1.09a–d	0.243bc	0.01a–d
B. safensis MR21	4.85bcd	5.3b–e	0.957bc	0.011f	1.17a–d	0.323a	0.008cde
P. syringae	3.37ef	6.59ab	1.37a	0.059a	1.33a	0.27abc	0.005efg
S. pavanii MR31	5.46abc	4.1e	0.98bc	0.058a	1.19abc	0.305ab	0.013a
P. fluorescens	4.56b–e	4.75de	0.942bc	0.021def	0.963bcd	0.287abc	0.007def
P. syringae	5bcd	5.79a–d	1.05abc	0.035b–e	1.2۱/ab	0.252bc	0.007efg

The numbers in each column, which are in at least one common letter, are statistically grouped together.

ادامه جدول ۳– مقایسه میانگین های صفات مختلف گیاه‌چه پنبه شش روزه در تیمارهای بذری نمایندگان باکتری‌های محرک رشد.

Table 3– Coninued.

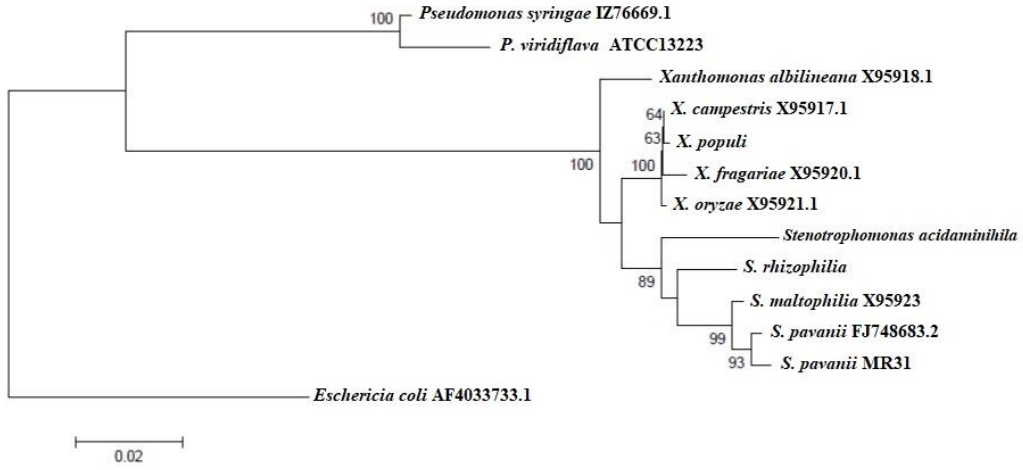
Characteristics / Isilates	Seedling dry weight (g)	Germination percentage	Germination velocity	Radicle water (g)	Shoot water (g)	Seedling water (g)	Total Germination Velocity
P. annanatis	0.257bc	100a	16.66a	0.595cd	0.76ab	0.755a–d	48.32ab
B. safensis MR22	0.255bc	98ab	16.33ab	0.775a–d	0.745abc	0.767abc	46.66de
B. safensis MR21	0.33a	96b	15.99b	0.26e	0.657d	0.717cd	47.74abc
P. syringae	0.275abc	96b	15.99b	0.92a	0.785a	0.79a	43.32f
S. pavanii MR31	0.317ab	100a	16.66a	0.844ab	0.687dc	0.732a–d	48.32ab
P. fluorescens	0.295abc	92c	15.33c	0.64bcd	0.692bcd	0.696d	43.99f
P. syringae	0.262abc	100a	16.66a	0.732a–d	0.76ab	0.782ab	47.32bcd

The numbers in each column, which are in at least one common letter, are statistically grouped together.

جدول ۴– مشخصات جدایه‌های باکتری براساس توالی ژن 16S rRNA.

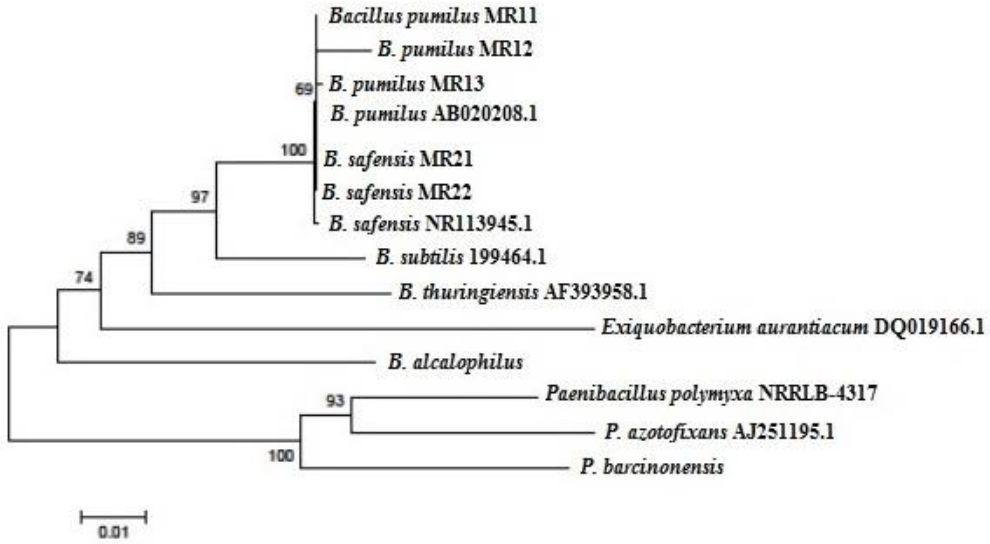
Table 4. Characteristics of the bacteria isolates based on 16S rRNA gene sequence.

Isolate	Accession numbers	Closest type strain	Similarity
B. pumilus MR11	KY067432.1	*B. pumilus* AB020208.1	99
B. pumilus MR12	KY067433.1	*B. pumilus* AB020208.1	98
B. pumilus MR13	KY067435.1	*B. pumilus* AB020208.1	99
B. safensis MR21	KY067431.1	*B. safensis* NR–113945.1	99
B. safensis MR22	KY067434.1	*B. safensis* NR–113945.1	99
S. pavanii MR31	KY067436.1	*S. pavanii* FJ748683.2^{T}	99



شکل ۱– ارتباط فیلوژنتیکی سویه *S. pavanii* MR31 با سویه‌های گونه‌های شناسایی شده سایر باکتری‌ها بر اساس توالی ژن 16S rRNA– دندروگرام به روش Neighbour–Joining ترسیم و ماتریکس فاصله بر اساس روش Jukes–Cantor با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap محاسبه شده است. باکتری *E. coli* به عنوان outgroup به‌کار برده شده است. خط نشانه منعکس کننده تعداد ۰/۰۲تغییرات نوکلئوتیدی در هر جایگاه است.

Fig 1. Phylogenetic analysis of *S. pavanii* MR31 with other identified strains based on *16S rRNA* gene sequences. The tree was constructed using the neighbor–joining method, and bootstrap values (based on 1000 replications) are shown at the nodes to indicate statistical support for each branch. *S. pavanii* MR31 clustered closely with its closest type strain from the GenBank database, confirming its taxonomic classification. The tree was rooted with Escherichia coli as an outgroup to provide evolutionary context.



شکل ۲– ارتباط فیلوژنتیکی سویه‌های *B. pumilus* MR11، *B. pumilus* MR12، *B. pumilus* MR13، *B. safensis* MR21 و *B. safensis* MR22 با سویه‌های گونه‌های شناسایی شده سایر باکتری‌ها بر اساس توالی ژن *16S rRNA*– دندروگرام به روش Neighbour–Joiningترسیم و ماتریکس فاصله بر اساس روش Jukes–Cantor با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap محاسبه شده است. باکتری *Paenibacillus barcinonensis* به عنوان outgroup به‌کار برده شده است. خط نشانه منعکس کننده تعداد ۰/۰۱تغییرات نوکلئوتیدی در هر جایگاه است.

Fig 2. Phylogenetic analysis of *Bacillus pumilus* MR11, *B. pumilus* MR12, *B. pumilus* MR13, *B. safensis* MR21, and *B. safensis* MR22 based on *16S rRNA* gene sequences. Bootstrap values (1,000 replicates) are shown at the nodes, indicating the reliability of the branching pattern. The tree was rooted with *Paenibacillus barcinonensis* to provide evolutionary context. The analysis confirms the close relationship among *B. pumilus* and *B. safensis* isolates while distinguishing them from other Bacillaceae members.

بحث

نظربه اینکه سویه *B. pumilus* MR12 و *S. pavanii* MR31 بالاترین درصد و سرعت جوانه‌زنی را نیز دارا بودند (جداول ۲ و ۳)، لذا استفاده از آن به عنوان تیمار بذری می‌تواند موجب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور شده و در کاهش میزان خسارت ناشی از بیماری‌های اول فصل و مرگ گیاهچه و افزایش سطح سبز و تراکم بوته در سطح هکتار موثر باشد. جدایه MR31، برخلاف نتایج برنر و همکاران (Brenner, *et al.*, 2006)، قادر به احیای نیترات نبود (جدول ۱). بر اساس خصوصیات بیوشیمیایی ایزوله MR31 به عنوان جنس *Stenetrophomonas* و براساس نتایج آنالیز ژن 16S rRNA به عنوان گونه *S. pavanii* شناسایی شد. جدایه‌های MR11، MR12 و MR13 در استفاده از آرابینوز، فروکتوز، سلوبیوز، گالاکتوز و مزواینوزیتول نتایجی برنر و همکاران (Brenner, *et al.*, 2006) حاصل شد. گونه *B. safensis* با تولید اسید از اینوزیتول، مالتوز، دی–تورانوز، متیل آلفا دی گلوکوپیرانوزید و استفاده از اینوزیتول و نتایج منفی در لیپاز و هیدرولیز کازئین از *B. pumilus* قابل تمایز است (Sotami *et al.*, 2006). براساس خصوصیات فنوتیپی، بیوشیمیایی و مطالعات مولکولی ژن 16S rRNA (جدول ۴)، جدایه‌های MR11، MR12 و MR13 به عنوان *B. pumilus* و جدایه‌های MR21 و MR22 به عنوان *B. safensis* شناسایی شدند. گونه *B. pumilus* به صورت اندوفیت از ریشه، ساقه، غنچه و غوزه پنبه جداسازی شد (Misaghi & Donndelinger, 1990). براساس خصوصیات فنوتیپی، آزمایشات بیوشیمیایی و تعیین ترادف ژن 16S rRNA، گونه *B. pumilus* در کاج (Kovaleva *et al.*, 2015) و با استفاده

از تعیین ترادف ژن‌های 16S rRNA و *gyrase B* باکتری *B. safensis* شناسایی شدند (Fonseca *et al.*, 2015). براساس نتایج ارتباط فیلوژنتیکی گونه‌های *B. pumilus* و *B. safensis* در یک گروه قرار گرفتند که با نتایج کاکاد و شافالکر، ۲۰۱۷، مطابقت داشت (Kakade & Chaphalkar, 2017).

براساس خصوصیات فنوتیپی، آزمایشات بیوشیمیایی و تعیین ترادف ژن *16S rRNA*، گونه *B. pumilus* (Kovaleva *et al.*, 2015) و با استفاده از تعیین ترادف ژن‌های 16S rRNA و gyrase B باکتری *B. safensis* شناسایی شدند (Fonseca *et al.*, 2015). میزان شباهت ترادف ۱۵۰۰ جفت باز ژن 16S rRNA، در ایزوله *S. pavanii* MR31 با ایزوله FJ748683.1 بانک ژن، ایزوله‌های *B. safensis* MR21 و *B. safensis* MR22 با ایزوله NR113945.1 بانک ژن و *B. pumilus* MR13 و *B. pumilus* MR11 با ایزوله AB020208.1 بانک ژن به میزان ۹۹ درصد بود و ایزوله *B. pumilus* MR12 با ایزوله AB020208.1 بانک ژن، ۹۸ درصد شباهت داشت (شکل‌های ۱ و ۲). براساس نتایج حاصل از اثر هشت سویه باسیلوس در مقابل هفت جدایه قارچ عامل مرگ گیاهچه پنبه، رابطه بسیار معنی‌داری در خصوصیاتی مانند مرگ گیاهچه پیش و پس‌رویشی، بقا، ارتفاع و وزن خشک گیاه مشاهده شد (Khiyami *et al.*, 2014) استفاده از باکتری *P. fluorescens* اثرات معنی‌داری در افزایش جوانه‌زنی، شادابی و وزن خشک گیاهچه پنبه در شرایط گلخانه داشت. این گونه موجب تحریک ظهور و رشد گیاهچه و افزایش عملکرد همراه با کاهش بیماری شد (Safyazov *et al.*, 1995). طول ریشه و جوانه گوجه‌فرنگی، خیار، کاهو و سیب‌زمینی در نتیجه استفاده از باکتری *Pseudomonas* sp. افزایش یافت (VanPeer & Schippers, 1988). در مقایسه با سودموناس‌های فلورسنت محرک رشد گیاه، در خصوص *Bacillus* sp. شناخت کمتری وجود دارد در حالی‌که آنها به عنوان باکتری‌های تیپیک خاک، نقش موثری را در رشد گیاه و بیوکنترل ایفا می‌کنند (Kloepper *et al.*, 2004b). نظر به اینکه از نظر ظرفیت مقدار آب گیاهچه نیز این سویه‌ها برتر بودند بررسی تاثیر آنها در جوانه‌زنی بذور پنبه در شرایط شور در تحقیقات آتی توصیه می‌گردد. این اولین گزارش از جداسازی باکتری‌های *B. pumilus*، *B. safensis* و *S. pavanii* از فیتوسفر پنبه در ایران می‌باشد.

References

Ahmad, F., Ahmad, I. & Khan, M.S. 2008. Screening of free–living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. Microbiology Research, 163: 173–181.

Ali, B., Sabri, A.N. & Hasnain, S. 2010. Rhizobacterial potential to alter auxin content and growth of *Vigna radiata* (L.). World Journal of. Microbiology and Biotechnology, 26: 1379–1384.

Andrews, L.H. & Harris, R.F. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. Annual Review of Phytopathology, 38: 145–180.

Arias, R.S., Sagardoy, M.A. & van Vuurde, J.W.L. 1999. Spatio–temporal distribution of naturally occurring *Bacillus* spp. and other bacteria on the phylloplane of soybean under field conditions. Journal of Basic Microbiology, 39: 283–292.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K. 1992. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing Association; Wiley–Interscience, v.1, New York.

Brencic, A. & Winans, S.C. 2005. Detection of and response to signals involved in host–microbe interaction by plant–associated bacteria. Microbiology and Molecular Biology Review, 69: 155–194.

Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. & Garrity, G.M. 2006. Bergy's Mannual of Systematic Bacteriology. Gammaproteobacteria, 2nd ed. Vol 2, Part B. 1106 pp.

Fahy, P.C. & Persley, G.J. 1983. Plant Bacterial Disease: A Diagnostic Guide. Academic Press. Sydney, 393 pp.

Felsenstein, J. 1989. PHYLIP–Phylogeny inference package (Ver. 3.2). Cladistics, 5: 164–166.

Fonseca, F.S.A., Angolini, C.F.F., Arruda, M.A.Z., Junior, C.A.L., Santos, C.A., Saraiva, A.M., Pilau, E., Souza, A.P., Laborda, P.R., de Oliveira, P.F.L., de Oliveira, V.M., Reis, F.A.M. & Marsaioli, A.J. 2015. Identification of oxidoreductases from the petroleum *Bacillus safensis* strain. Biotechnology Reports, 8: 152–159.

Hallmann, J., Quadt–Hallmann, A., Rodriguez–Kabana, R. & Kloepper, J.W. 1998. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteriain cotton and cucumber. Soil Biology and Biochemistry, 30: 925–937.

Harish, S., Kavino, M., Kumar, N., Saravanakumar, D., Soorianathasundaram, K. & Samiyappan, R. 2008. Biohardening with plant growth promoting rhizosphere and endophytic bacteria induces systemic resistance against Banana bunchy top virus. Appl. Soil Ecology, 39: 187–200.

Hasan, M.N., Afghan, S. & Hafeez, F.Y. 2010. Suppression of red rot caused by *Coletotrichium falcatum* on sugarcane plants using plant growth–rhizobacteria. Biological Control, 55: 531–542.

ISTA. 2015. Handbook for International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Zurich, Switzerland, 276pp.

Jeong, H., Choi, S.K., Kloepper, J.W. & Ryu, C.M. 2014. Genome Sequence of the Plant Endophyte *Bacillus pumilus* INR7, Triggering Induced Systemic Resistance in Field Crops. Genome Announc, 2(5): e01093–14. doi:10.1128/genomeA.01093–14.

Jukes, T.H. & Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. In Munro H.N., editor, Mammalian Protein Metabolism, pp. 21–132, Academic Press, New York.

Kakade, P.D. & Chaphalkar, S.R. 2017. Isolation and purification of antibacterial peptide from *Bacillus safensis*, endophytica bacteria from *Anthocephalus kadamba*. International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 6: 504–511.

Khiyami, M.A., Omar, M.R., Abd–Elsalam, K.A. & Aly, A.A. 2014. Bacillus–based biological control of cotton seedling disease complex. Journal of Plant Protection Research, 54: 340–348.

King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.E. 1954. The simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory Clinic Medicine, 44: 301–307.

Klement, Z., Farkas, G.L. & Loverkovich, L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. Phytopathology, 54: 474–477.

Kloepper, J.W., Reddy, M.S., Kenney, D.S., Vavrina, C., Kokalis–Burelle, N. & Martinez–Ochoa, N. 2004b. Theory and applications of rhizobacteria for transplant production and yield enhancement. In: Nicola S, Nowak J, Vavrina CS, editors. Proceedings of the XXVI IHC – transplant production and stand establishment. Acta Horticulture, 631: 217–229.

Kovaleva, V.A., Shalovylo, Y.I., Gorovik, Y.N., Lagonenko, A.L., Evtushenkov, A.N. & Gout, R.T. 2015. *Bacillus pumilus*–a new phytopathogen of Scots pine–Short Communication. Journal of Forest Science, 61: 131–137.

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics.* Eds Stackebrandt E., Goodfellow M. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, England, 115–175.

Lelliott, R.A., Billing, E. & Hayward, A.C. 1966. A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. Journal of Applied Bacteriology, 29: 470–89.

Mehta, Y.R., Boonfeti, C. & Bolognini, V. 2005. a semi–selective agar medium to detect the presence of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* naturally infected cotton seed. Fitopathologia Brasileria, 30: 489–496.

Mercier, J. & Lindow, S.E. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. Applied and Environmental Microbiology, 66: 369–374.

Minaxi, S.J. 2010. Disease suppression and crop improvement in moong beans (*Vigna radiata*) through *Pseudomonas* and *Burkholderia* strains isolated from semi–arid region of Rajasthan, India. Bio Control, 55: 799–810.

Misaghi, I.J. & Donndelinger, C.R. 1990. Endophytic bacteria in symptom–free cotton plants. Phytopathology, 80: 808–811.

Misk, A. and Franco, C. 2011. Biocontrol of chick pea root rot using endophytic actinobacteria. Bio Control, 56:811–822.

Page, R.D.M. 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Application in the. Biosciences, 12: 357–358.

Pieterse, C.M.J., Pelt, J.A., Verhagen, B.W.M., Jurriaan, T., Wees, S.C.M., Léon–Kloosterziel, K.M. & Loon, L.C. 2003. Induced systemic resistance by plant growth–promoting rhizobacteria. Symbiosis, 35: 39–54.

Podile, A.R. & Kishore, G.K. 2006. Plant growth promoting rhizobacteria. In: S.S. Gnanamanickam. Plant Associated Bacteria. Springer Publishers. The Netherlands, pp. 195–230.

Reva, O.N., Smirnov, V.V., Pettersson, B. & Priest, F.G. 2002. *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52: 101–107.

Safyazov, J.S., Mannanov, R.N. & Sattarova, R.F. 1995. The use of bacterial antagonists for the control of cotton diseases. Field Crops Researches, 43: 51–54.

Salaheddin, K., Valluvaparidasan, V., Ladhalakshmi, D. & Velazhahan, R. 2010. Management of bacterial blight of cotton using a mixture of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. Plant Protection Sciences, 46: 41–50.

Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3nd edition. APS Press. St. Minnesota, USA. 373pp.

Shivalingaiah, S & Umesh, S. 2013. *Pseudomonas fluorescens* inhibits the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. Canadian Journal of Plant Protection, 1: 147–153.

Sotami, M., Laduc, M.T. & Venkateswaran, K. 2006. *Bacillus safensis* sp. Nov. isolated from spacecraft and assembly facility surfaces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56: 1735–1740.

Suresh, A., Pallavi, P., Srinivas, P., Kumar, V.P. & Chandra, S.J. 2010. Plant growth promoting activities of fluorescent pseudomonads associated with some crop plants. African Journal of Microbiology Researches, 4: 1491–1494.

Suslow, T.V. Schroth, M.N. & Isaka, M. 1982. Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72: 917–918.

Van Peer, R. & Schippers, B. 1988. Plant growth response in bacterization with selected *Pseudomonas* spp. strains and rhizosphere microbial development in hydroponic cultures. Canadian Journal of Microbiology, 35: 456–463.

Study of bacteria of cotton phytosphere on the cotton seed germination and characteristics of seedling

Mohammad Razinataj[1], Gholam Khodakaramian[2]

1. Assisstant Professor, Plant Protection Dept, Cotton Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Gorgan, Iran.

2. Professor of Dept of Plant protection, Faculty of Agriculture, Bu–Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Corresponding author: Mohammad Razinataj, email: moh_razinataj@yahoo.com

Received: Feb., 01, 2026 12(2) 101–113 Accepted: Feb., 23, 2026

Abstract

The phyllosphere is the surface of the aerial parts of plants and a place for microorganisms to live. The rhizosphere is a region of the root that soil microorganisms have a strong affinity for, and use root secretions as carbon and energy sources and compete for food and space. In order to investigate the effect of cotton phytospheric bacteria on the characteristics and growth rate of cotton seedlings, phytospheric bacteria were isolated as epiphytes and endophytes from cotton plants and seeds in different cotton growing areas and fields of Golestan province. After growth, single bacterial colonies were purified based on morphological characteristics such as color, size, edge shape, and appearance of the colonies. In order to determine the effect of bacteria on seedling growth, seeds were soaked for 10 minutes with a bacterial suspension diluted to 10^6 CFU and the number of germinated seeds was counted on the third and sixth days. 10 seeds were randomly selected in each treatment and traits such as germination rate, root and shoot growth length, root and dry weight, shoot and fresh weight, total fresh and dry weight, root, shoot and total tissue water content were measured. Based on biochemical and phenotypic tests, amplification and *16SrRNA* gene sequencing, the representatives of the strains were identified. *Bacillus pumilus* MR11, *B. pumilus* MR12, *B. pumilus* MR13, *B. safensis* MR21, *B. safensis* MR22 *and Stenotrophomonas* pavanii MR31 isolates were isolated and identified as superior isolates as endophytes and from the rhizosphere. Also, *Pseudomonas fluorescens*, *P. syringae* and *Pantoea annatis* were isolated and identified as epiphytic species from plants and seeds. Based on the comparison of the means of the studied traits, six–day–old seedlings treated with *Bacillus pumilus* MR11 and *B. pumilus* MR12 strains had the highest root and shoot lengths and shoot fresh weights. Considering that *B. pumilus* MR12 and *S. pavanii* MR31 strains also had the highest germination percentage and speed, their use as seed treatments can increase the percentage and speed of seed germination and be effective in reducing the amount of damage caused by early season diseases and seedling death. Considering that these strains were also superior in terms of seedling water capacity, it is recommended to investigate their effect on cotton seed germination under saline conditions in future research. This is the first report of the isolation of *B. safensis*, *B. pumilus*, and *S. pavanii* bacteria from the rhizosphere as cotton endophytes in Iran.

Keywords: bacteria, endophyte, rhizosphere and cotton