



## Research Article

Vol. 38, No. 2, 2024, p. 147-157

## Inhibitory Effect of Endophytic Bacteria with Auxin Production Ability on *Diplodia bulgarica*, the Causative Agent of Apple Canker in East Azerbaijan Province

S. Hagverdi<sup>1</sup>, R. Khakvar<sup>1</sup><sup>\*</sup>, M. Arzanlou<sup>2</sup><sup>\*</sup>, N. Aliasgharzad<sup>3</sup><sup>\*</sup>

1 and 2- Former M.Sc Student and Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, respectively.

(\* - Corresponding Author Email: [khakvar@tabrizu.ac.ir](mailto:khakvar@tabrizu.ac.ir))

3- Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Received: 18-06-2023

Revised: 12-04-2024

Accepted: 15-04-2024

Available Online: 21-07-2024

**How to cite this article:**

Hagverdi, S., Khakvar, R., Arzanlou, M., & Aliasgharzad, N. (2024). Inhibitory effect of endophytic bacteria with auxin production ability on *Diplodia bulgarica*, the causative agent of apple canker in East Azerbaijan province. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, 38(2), 147-157. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/jpp.2024.82876.1148>

### Introduction

The apple (*Malus domestica* Borkh.), a cornerstone of Iran's agricultural exports, plays an important role in the nation's economy. The cultivation of this fruit, however, is frequently exposed to a multitude of pests and diseases, especially fungi from the Botryosphaeriaceae family emerging as a significant threat. Among these, *Diplodia bulgarica* is a particularly harmful fungus that causes a lot of damage to apple orchards. Traditional management strategies have predominantly relied on chemical fungicides; however, these methods have several problems, including environmental contamination, food safety concerns, and the potential for pathogen resistance. These issues highlight the critical need for alternative solutions. To deal with these problems, experts in plant diseases are looking more at using biological control agents as a viable and environmentally friendly option. Endophytic bacteria, a group of non-pathogenic microorganisms that inhabit plant tissues, are leading this change. By producing essential growth factors, these bacteria not only enhance the metabolic processes of their host plants but also protect them from many diseases and environmental stress. Their mode of action is not limited to direct antagonistic actions like nutrient competition and antibiotic production; they also take in a range of indirect strategies that effectively inhibit plant diseases. Using endophytic bacteria to control plant diseases is a new, exciting and promising direction toward sustainable agriculture. Their dual role as biocontrol agents and promoters of plant health offers a comprehensive strategy for enhancing crop resilience. Ongoing research is revealing how endophytic bacteria could transform the way we protect plants and increase farm yields, marking a new era in the management of apple and other fruit tree diseases.

### Materials and Methods

This study aimed to isolate auxin-producing endophytic bacteria from apple trees in the orchards of East Azerbaijan province and assess their capacity to inhibit the pathogenic fungus *Diplodia bulgarica* the major causal agent of apple tree decline in Northwest Iran. To do this, healthy branches from apple trees in East Azerbaijan



©2024 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/jpp.2024.82876.1148>

province in northwest Iran were sampled, resulting in 110 isolates of endophytic bacteria being isolated and subsequently analyzed. Employing the dual-culture method, researchers identified the most effective isolate exhibiting the strongest antagonistic effect. Subsequently, fifty isolates out of the initial 110 were chosen for further investigation based on their promising antifungal properties. To statistically analyze the auxin production data, researchers conducted a variance analysis (ANOVA). Finally, Duncan's multiple range test (DMRT) at a 1% significance level was used to compare the mean auxin production values among these selected isolates. Identification was carried out based on polymerase chain reaction (PCR) and sequencing of the 16S rDNA region, along with biochemical assays including gram staining, catalase, oxidase, arginine hydrolase, and others.

### Results and Discussion

The dual-culture assay results led to the selection and preservation of 50 isolates demonstrating varying degrees of antagonistic potential. Of these, 37 isolates (74%) were identified as gram-positive, while the remaining 13 isolates were gram-negative. The inhibition percentage of these isolates ranged from 10% to 79%. Notably, five endophytes exhibited high inhibition rates (74-79%), were also effective in auxin production. The auxin production assay revealed that, on average, bacterial isolates produced 5.5 mg/ml of auxin in the absence of tryptophan and 8.58 mg/ml in its presence. Based on biochemical and molecular identification, all five isolates belonged to the *Bacillus* genus, with more than 99% similarity. These included *Bacillus xiamenensis*, *Bacillus sonorensis*, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus mojavenensis*, and *Bacillus subtilis*. *Bacillus mojavenensis* demonstrated the highest auxin production, yielding up to tenfold more auxin without tryptophan and fivefold more with tryptophan compared to other isolates. The study also found that adding L-tryptophan to the bacterial growth medium generally increased auxin production. In the qualitative evaluation, a pink color change was observed exclusively in the *B. mojavenensis* isolate.

### Conclusion

While fungicides are highly effective, their escalating use has led to serious repercussions, including environmental pollution, toxic residues in food, pathogen resistance, and socio-economic issues. The substantial costs and consumer demand for chemical-free produce have spurred researchers to seek viable alternatives to these agents. In this study, five *Bacillus* bacterial isolates were identified from apple trees in Iran's northwestern regions. These isolates not only exhibit strong inhibitory effects against the fungus *Diplodia bulgarica* but also possess the capability to produce significant amounts of the phytohormone auxin (IAA). Consequently, they can be recommended to farmers as both an alternative to fungicides and as biofertilizers. The deployment of these bacteria promises not only the effective and safe mitigation of pathogens but also supports plant growth and development through hormone production.

**Keywords:** *Bacillus*, Biocontrol, Pphytohormone, Trunk canker

مقاله پژوهشی

جلد ۳۸ شماره ۲، تابستان ۱۴۰۳، ص. ۱۴۷-۱۵۷

## بررسی اثر بازدارندگی باکتری‌های اندوفیت با توان تولید اکسین، روی قارچ *Diplodia bulgarica* عامل بیماری شانکر سیب در استان آذربایجان شرقی

سمانه حق‌وردی<sup>۱</sup> - رضا خاک‌ور<sup>۲\*</sup> - مهدی ارزنلو<sup>۲</sup> - ناصر علی‌اصغرزاد<sup>۳</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۱/۲۷

### چکیده

درخت سیب از عمده‌ترین محصولات باغی و صادراتی ایران و استان آذربایجان شرقی می‌باشد. از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول در منطقه، بیماری شانکر ناشی از قارچ *Diplodia bulgarica* می‌باشد. روش‌های مختلفی برای کنترل این بیماری معرفی شده است که در بین آن‌ها استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک، به‌عنوان روشی دوستدار محیط‌زیست و پایدار مورد توجه گیاه‌پزشکان می‌باشد. از عوامل کنترل بیولوژیک نوین که اخیراً بسیار مورد توجه بوده است استفاده از باکتری‌های اندوفیت می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر، جداسازی باکتری‌های اندوفیت تولیدکننده اکسین، از درختان سیب در باغات اطراف شهرستان تبریز و بررسی توان آن‌ها در کنترل قارچ بیمارگر *Diplodia bulgarica* بود. بدین منظور، نمونه برداری از شاخه‌های سالم درختان سیب باغات استان آذربایجان شرقی انجام پذیرفت و ۱۱۰ جدایه باکتری اندوفیت جداسازی و مورد بررسی قرار گرفت. انتخاب بهترین جدایه با بیشترین اثر آنتاگونیستی به روش کشت متقابل انجام پذیرفت. پنجاه جدایه باکتریایی از ۱۱۰ جدایه جمع‌آوری شده که اثر بازدارندگی روی قارچ را از خود نشان دادند، از لحاظ تولید اکسین مورد آزمایش قرار گرفتند. تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده انجام و مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ صورت گرفت و شناسایی براساس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس و تعیین توالی ناحیه 16S rDNA و تعدادی آزمون‌های بیوشیمیایی صورت گرفت. نتایج به‌دست آمده نشان داد که پنج جدایه باکتریایی از مجموع جدایه‌های مورد آزمایش با ۷۹-۷۴٪ بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر، توان تولید مؤثر اکسین را نیز داشتند. براساس داده‌های بیوشیمیایی و توالی‌یابی انجام گرفته در پژوهش حاضر، هر پنج جدایه انتخاب شده متعلق به جنس *Bacillus* می‌باشند. کاربرد چنین باکتری‌هایی علاوه بر کنترل بهینه و بی‌خطر بیمارگر، می‌تواند در رشد و نمو گیاه نیز باعث تولید هورمون‌های گیاهی مفید واقع شوند.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس، بیوکنترل، شانکر تنه، هورمون گیاهی

### مقدمه

غیرنفتی کشور در بخش کشاورزی می‌باشد به طوری که در حال حاضر کشور ایران مقام هفتم تولید سیب در جهان و در مقام دهم از لحاظ صادرات را در دنیا دارا می‌باشد (Najari, 2020). گونه‌های مختلفی از تیره Botryosphaeriaceae به‌عنوان عوامل مولد پوسیدگی و شانکر شاخه و تنه روی درختان سیب از مناطق مختلف دنیا گزارش شده‌اند که در بین آن‌ها گونه *Diplodia bulgarica* یکی از مخرب‌ترین قارچ‌های بیمارگر سیب در جهان است که باعث شانکر شاخه، تنه و سرانجام زوال درخت می‌شود (Zeynali Eken, 2022; et al., 2021). برای کنترل این بیماری روش‌های مختلف شیمیایی،

سیب با نام علمی *Malus domestica* Borkh. در ایران یکی از محصولات مهم کشاورزی و یکی از اصلی‌ترین منابع صادرات

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و استناد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران  
(\*) نویسنده مسئول: (Email: khakvar@tabrizu.ac.ir)

۳- استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران  
<https://doi.org/10.22067/jpp.2024.82876.1148>

محیط کشت سیب زمینی - دکستروز آگار (PDA) تجدید کشت گردید.

به منظور جداسازی باکتری‌های اندوفیت، شاخه‌ها با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. پس از خشک شدن روی کاغذ صافی، نمونه‌ها با قیچی باغبانی سترون، به قطعات کوچک‌تر خرد و با غوطه ور نمودن در محلول‌های ضد عفونی (پنج دقیقه الکل ۷۰٪، ده دقیقه هیپوکلریت سدیم ۱٪، سی ثانیه الکل ۹۶٪ سپس سه بار شستشو با آب مقطر سترون) سترون شدند. بافت‌های ضد عفونی شده به قطعات ۱ الی ۲ سانتی متری تقسیم شدند و در زیر جریان هوای هود لامینار خشک شده و در روی محیط NA قرار گرفتند. پتری‌ها به مدت ۱۴ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (Javadi-Dodoran *et al.*, 2022). برای اثبات اندوفیت بودن جدایه‌های جمع‌آوری شده و حذف باکتری‌های اپی‌فیت احتمالی، از روش غلامی و همکاران (Gholami *et al.*, 2013) استفاده گردید. بدین منظور قطعاتی از بافت‌هایی که به روش بالا ضد عفونی شده بودند در ۵ میلی لیتر آب مقطر سترون فرو برده شدند و به مدت ۱ دقیقه تکان داده شدند. ۳/۰ میلی لیتر از سوسپانسیون حاصل روی محیط NA مایه‌زنی و در ۲۸ درجه سانتی گراد جهت بررسی رشد احتمالی میکروبی نگهداری شد.

#### بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی

برای انجام این آزمایش و به منظور انتخاب جدایه‌های مناسب از روش کشت متقابل استفاده گردید. برای شروع کار در پتری‌های ۹ سانتی متری محیط کشت NA+PDA (به نسبت ۱:۱) تهیه شد (Arzanlou *et al.*, 2016). سپس به فاصله یک سانتی متری از حاشیه پتری، باکتری‌ها به صورت خطی کشت داده شدند. یک قرص ۵ میلی متری از کشت تازه جدایه قارچی برش داده شد و در مرکز پتری قرار گرفت. پتری شاهد حاوی دیسک جدایه قارچی در مرکز بود. پتری‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در داخل انکوباتور نگهداری شدند. این آزمون در ۴ تکرار انجام شد و درصد بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در مقایسه با شاهد براساس فرمول زیر محاسبه و یادداشت گردید (Gholami *et al.*, 2014). تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده انجام و مقایسه میانگین رشد با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ صورت گرفت.

$$PIRG(\%) = [(R_1 - R_2) / R_1] \times 100$$

PIRG = درصد بازدارندگی رشد شعاعی بیمارگر

$R_1$  = رشد شعاعی بیمارگر در تیمار شاهد

$R_2$  = رشد شعاعی بیمارگر در تیمار حاوی بیمارگر و آنتاگونیست

فیزیکی و بیولوژیک توصیه شده است که در بین آن‌ها کنترل شیمیایی با استفاده از قارچ‌کش‌ها به عنوان مهم‌ترین روش در مدیریت بیماری‌های شانکر ناشی از قارچ‌های خانواده Botryosphaeriaceae در نظر گرفته می‌شود (Hanifeh *et al.*, 2017). با وجود این که کارایی سموم قارچ‌کش زیاد می‌باشد، استفاده روز افزون از سموم شیمیایی تأثیرات منفی شدیدی از جمله آلودگی‌های زیست‌محیطی، وجود باقی مانده سموم روی مواد غذایی، ظهور مقاومت در بیمارگر و همچنین بروز مشکلات اجتماعی و اقتصادی را به دنبال دارد (Cawoy *et al.*, 2014).

از بین روش‌های نوین و دوست‌دار محیط‌زیست، استفاده از باکتری‌های اندوفیت بعنوان عامل بیوکنترل به سرعت در حال توسعه می‌باشد (Vasebi *et al.*, 2023; Jacob *et al.*, 2020). باکتری‌های اندوفیت از میکروارگانیسم‌های غیر بیماری‌زای ساکن بافت گیاهی‌اند که با حفظ بقای خود در گیاه میزبان، نه تنها زیانی به میزبان نمی‌رسانند بلکه با تولید فاکتورهای رشدی باعث افزایش متابولیسم، رشد و مقاومت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا و تنش‌های محیطی می‌شوند (Luna *et al.*, Mantelin & Touraine, 2004; 2002). باکتری‌های اندوفیت علاوه بر روش‌های مستقیم (رقابت غذایی با بیمارگر، پارازیتسم و یا تولید آنتی بیوتیک‌ها علیه بیمارگر) بصورت غیر مستقیم نیز باعث کنترل بیمارگرهای مختلف گیاهی می‌شوند (Moslehi *et al.*, 2021). یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌هایی که انواع مختلف باکتری‌های اندوفیت به وسیله آن موجب ارتقا رشد و افزایش عملکرد گیاه می‌شوند، تولید گروهی از فیتوهورمون‌های محرک رشد می‌باشد که مهم‌ترین آن‌ها ایندول استیک اسید (IAA) است (Thoa *et al.*, 2022). لذا هدف از این پژوهش بررسی فعالیت ضد قارچی باکتری‌های اندوفیت با توان تولید اکسین علیه قارچ *Diplodia bulgarica* عامل شانکر سیب می‌باشد.

#### مواد و روش‌ها

##### تهیه جدایه‌های باکتریایی و قارچی

به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های اندوفیت درختان سیب، نمونه‌های گیاهی از ساقه‌های یکساله و دوساله از درختان سیب بالغ، سالم و بدون هیچ گونه نشانه‌ی بیماری از باغات سیب استان آذربایجان شرقی در سال ۱۴۰۰-۱۳۹۹ طی ماه‌های تیر تا شهریور به صورت تصادفی جمع‌آوری گردید. نمونه‌های بلافاصله پس از جمع‌آوری، به آزمایشگاه باکتری‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تبریز انتقال یافتند و در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری و حداکثر تا ۴۸ ساعت پس از نمونه برداری در محیط آگار غذایی (NA) کشت داده شدند. جدایه قارچی *Diplodia bulgarica* از آزمایشگاه قارچ‌شناسی تحصیلات تکمیلی دانشگاه تبریز، تهیه و در

## اندازه‌گیری توان تولید اکسین جدایه‌ها

توان تولید اکسین یا ایندول استیک‌اسید (IAA) جدایه‌های بدست آمده با استفاده از محیط کشت عاری از نیتروژن (N-free media; NF) در ۳ تکرار انجام شد. از کلرید آمونیوم به مقدار یک گرم در لیتر جهت تأمین نیتروژن مورد نیاز باکتری‌ها در این محیط استفاده شد. ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه هر جدایه به ۳۰ میلی‌لیتر محیط حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر ال-تریپتوفان منتقل شد و بعد از ۷۲ ساعت سوسپانسیون باکتری رسوب داده شد ( $rpm=5000$ ) به مدت ده دقیقه) و دو میلی‌لیتر از محلول رویی با چهار میلی‌لیتر از معرف سالکوفسکی (۵، ۰ مولار  $FeCl_3$  در ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده ۳۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک  $H_2SO_4$  یک مولار به آن اضافه می‌گردد) مخلوط شد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس مقدار جذب نوری با استفاده از اسپکتوفوتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. مقدار تولید IAA توسط هر جدایه از مقایسه جذب نور در سوسپانسیون آن جدایه با منحنی استاندارد (تهیه شده در غلظت‌های ۰، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر IAA) محاسبه شد. تولید اکسین توسط جدایه‌ها در دو حالت حضور (۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) و عدم حضور تریپتوفان مورد بررسی قرار گرفت (Deaker et al., 2011). سنجش کیفی تولید IAA توسط جدایه‌های باسیلوس براساس روش ساریواستاوا و کومار (Sharivastava & Kumar, 2011) با اندکی تغییر انجام شد. در این روش پتری حاوی محیط کشت جامد NF دارای ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اسید آمینه L-تریپتوفان (سترون شده با روش فیلتر) آماده شد. پتری به چهار قسمت مساوی تقسیم و در هر قسمت، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری با چگالی نوری (Optical Density) یکسان مایه‌زنی شد. پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. واکنش مثبت در تولید اکسین سی دقیقه بعد از اضافه کردن معرف سالکوفسکی به صورت ظهور هاله به رنگ صورتی مشخص گردید. در انتهای آزمایش قطر هاله (HD) و قطر پرگنه (CD) اندازه‌گیری و متوسط نسبت قطر هاله به قطر پرگنه CD/HD برای هر جدایه محاسبه و این میزان مبنای درجه‌بندی نیمه‌کمی توان تولید IAA قرار گرفت (Bric et al., 1991). از محلول‌های استاندارد IAA در غلظت‌های متفاوت، برای سهولت تشخیص و شدت رنگ هاله‌ی صورتی استفاده شد.

## شناسایی باکتری‌ها

شناسایی باکتری‌های اندوفیت که توان آنتاگونیستی بالا همراه با توان تولید اکسین را از خود نشان دادند با استفاده از تعدادی آزمون بیوشیمیایی شامل آزمون گرم، اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز نشاسته و تجزیه آرژنین (Schaad et al., 2001) و توالی‌یابی نوکلئیدی ناحیه

16s rDNA انجام گرفت. پس از استخراج DNA باکتریایی به روش (Sambrook, 1990) واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی 8f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و 1492r (3'-GGTTACCTTGTTACGACTT-5') و در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام گردید (Alizadeh et al., 2017).

محصولات PCR در ژل آگاروز ۱٪ به مدت ۴۵ دقیقه در اختلاف پتانسیل ۸۰ ولت الکتروفورز گردید. محصول PCR جهت تعیین توالی به شرکت ژن فن‌آوران ارسال گردید. توالی بدست آمده پس از ویرایش با نرم‌افزار BioEdite با فرمت FASTA ذخیره و با توالی‌های موجود در بانک توالی‌های ژنی (NCBI) و با آزمون مشابهت‌یابی Blastn مقایسه شدند. آنالیز توالی‌ها و رسم درخت فیلوژنی با Bootstrap بر پایه ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از نرم‌افزار MEGA Neighbor (MEGA X) و به روش اتصال مجاور (Joining) انجام گردید.

## نتایج

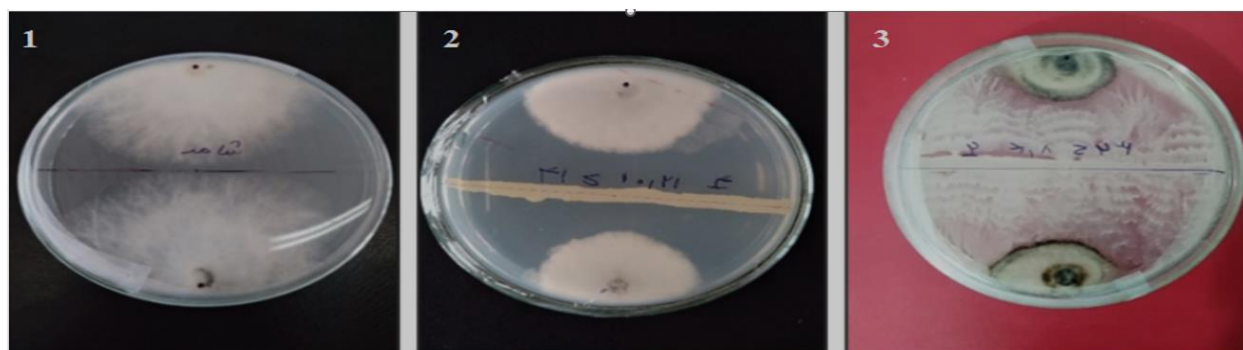
در مجموع ۱۱۰ جدایه‌ی باکتری اندوفیت از شاخه‌های درختان سالم سبب باغات استان آذربایجان شرقی جداسازی گردید و برای ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ *Diplodia bulgarica* آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفتند. براساس نتایج آزمون کشت متقابل، در بین جدایه‌های بدست آمده، ۵۰ جدایه که درجاتی از توان آنتاگونیستی از خود نشان دادند انتخاب و نگهداری شدند (شکل ۱). ۳۷ جدایه از این ۵۰ جدایه، گرم مثبت (۷۴٪) و ۱۳ جدایه (۲۶٪) گرم منفی مشخص شدند. درصد بازدارندگی این جدایه‌ها از رشد قارچ بیمارگر بین ۱۰ تا ۷۹٪ تعیین گردید.

## ارزیابی کمی و کیفی تولید اکسین

تمام ۵۰ جدایه منتخب با توان آنتاگونیستی، مورد ارزیابی کمی و کیفی تولید اکسین قرار گرفتند. از بین ۵۰ جدایه منتخب، فقط شش جدایه تولید حد قابل توجه اکسین در بازه ۳ تا ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر (ppm) از خود نشان دادند که نتایج در جدول ۱ آورده شده است. میانگین تولید اکسین توسط جدایه‌های باکتریایی در عدم حضور تریپتوفان ۵،۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در حضور تریپتوفان ۸،۵۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. بیشترین میزان تولید اکسین در هر دو حالت مربوط به جدایه Sh-4 بود. نتایج نشان داد که افزودن ال-تریپتوفان به محیط رشد باکتری‌ها، کم و بیش باعث تولید بیشتر اکسین شده است (جدول ۱). در روش ارزیابی کیفی، تغییر رنگ صورتی در هیچ‌کدام یک از جدایه‌ها بغیر از جدایه Sh-4 مشاهده نگردید (شکل ۲). همچنین برای این جدایه، مقدار تولید اکسین  $CD/HD=3.2/1.3=1.76$  تعیین گردید. از شش جدایه با

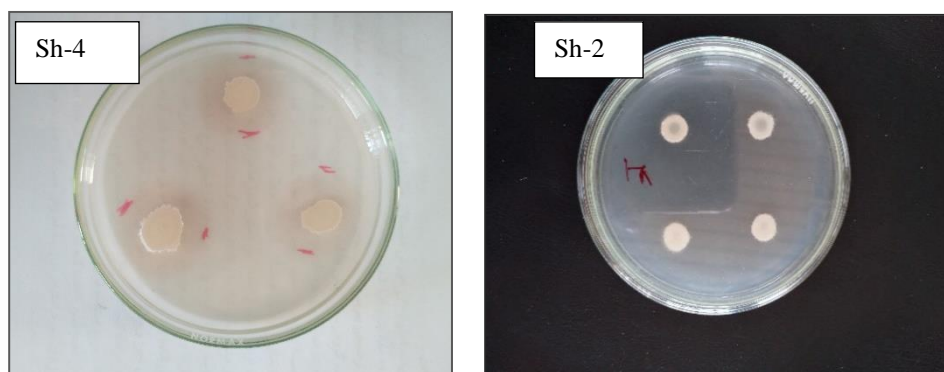
روش‌های مولکولی و بیوشیمیایی مورد شناسایی قرار گرفتند (جدول ۲)(شکل ۳).

توان تولید اکسین به جز یک جدایه (Sh-5) بقیه توان آنتاگونیستی بالای ۷۰٪ را از خود نشان دادند. بنابراین این پنج جدایه به



شکل ۱- کشت متقابل قارچ *Diplodia bulgarica* با جدایه‌های باکتریایی اندوفیت جداشده از درختان سیب در استان آذربایجان شرقی جهت ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی

Figure 1- Dual-culture of *Diplodia bulgarica* with endophytic bacteria isolated from apple trees in East Azerbaijan for antagonistic activity assay



شکل ۲- آزمون کیفی توان تولید اکسین توسط جدایه‌های باکتریایی اندوفیت شاخه درختان سیب باغات استان آذربایجان شرقی - تولید مشخص رنگ صورتی در حضور معرف سالکوفسکی در نمونه قوی (Sh-4)(چپ) و تولید اندک رنگ صورتی در حضور معرف سالکوفسکی در نمونه ضعیف (Sh-2) (راست)

Figure 2- Qualitative assessment of auxin (IAA) production capability by endophytic bacterial isolates from apple tree in East Azerbaijan Province for antagonistic activity assay- the distinct production of a pink color in the presence of Salkowski's colorimetric assay (left)(Sh-4) and weaker (right)(Sh-2) samples

جدول ۱- مقایسه میانگین تولید اکسین توسط جدایه‌های باکتریایی اندوفیت در حضور و عدم حضور تریپتوفان

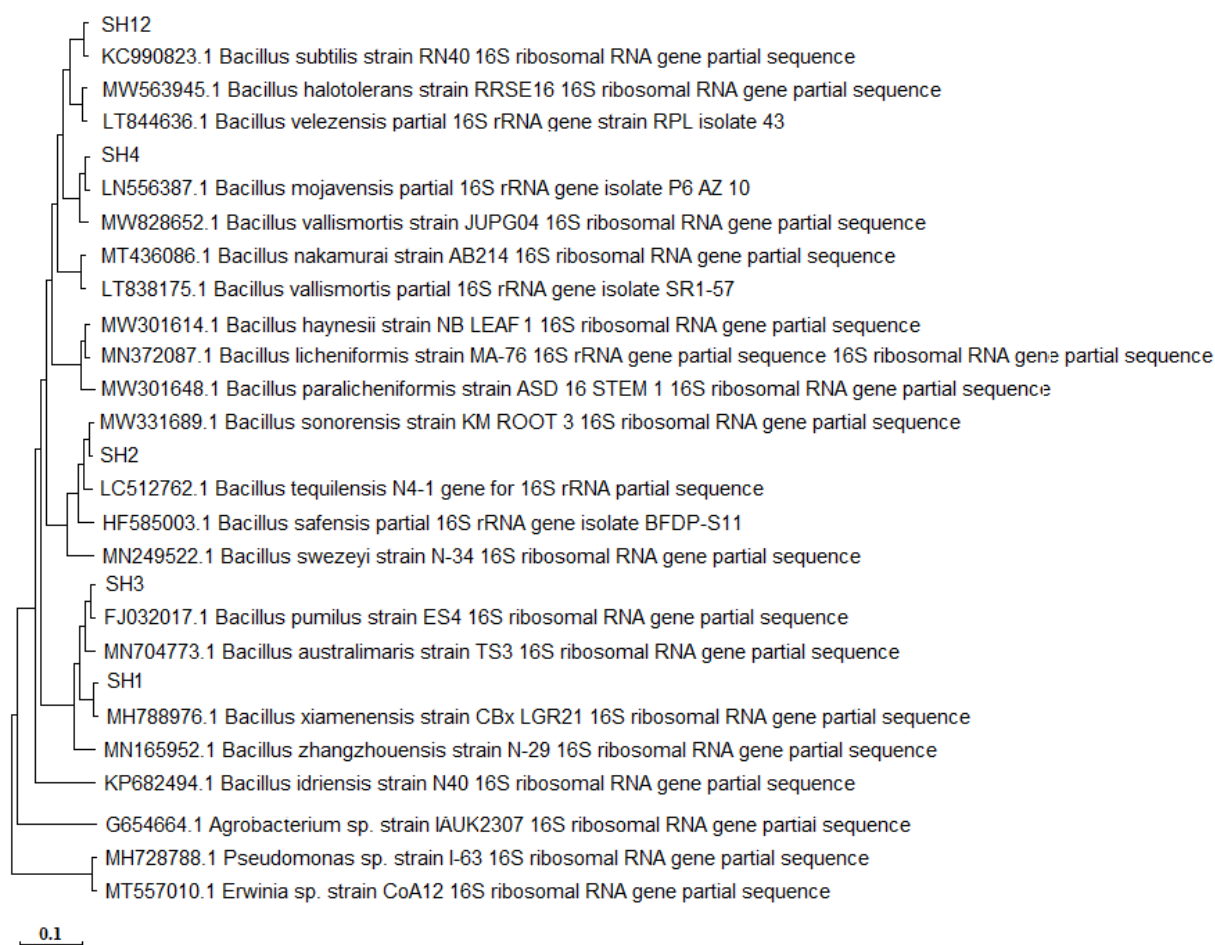
Table 1- Mean comparison of IAA production by endophytic bacteria in presence and absent of Tryptophan

تولید اکسین در حضور تریپتوفان	تولید اکسین در عدم حضور تریپتوفان	جدایه باکتری
Auxin production in Tryptophan presence (ppm)	Auxin production in Tryptophan absence (ppm)	Bacterial Isolate code
8.04 <sup>bc</sup>	3.58 <sup>d</sup>	Sh-1
1.46 <sup>e</sup>	2.15 <sup>e</sup>	Sh-2
7.88 <sup>cd</sup>	5.33 <sup>c</sup>	Sh-3
10.26 <sup>b</sup>	5.49 <sup>c</sup>	Sh-12
15.04 <sup>a</sup>	7.56 <sup>a</sup>	Sh-4
8.79 <sup>bc</sup>	6.85 <sup>bc</sup>	Sh-5
1.66 <sup>e</sup>	0.39 <sup>f</sup>	Control

جدول ۲- درصد بازدارندگی جدایه‌های باسیلوس اندوفیت منتخب در برابر قارچ *Diplodia bulgarica* و نتیجه توالی‌یابی ناحیه 16S rDNA و نیز برخی آزمون‌های بیوشیمیایی

Table 2- The inhibition percentage of selected endophytic *Bacillus* isolates on *Diplodia bulgarica*, and the outcomes of 16S rDNA sequencing alongside with biochemical assays

گونه Species	کد جدایه Code	درصد بازدارندگی Inhibition percentage	تست ارژنین Arginine assay	اکسیداز Oxidase assay	کاتالاز Catalase assay	لهانیدن سیب‌زمینی Potato softening assay	تست گرم Gram staining
<i>Bacillus xiamenensis</i>	Sh-1	79%	-	-	+	-	+
<i>Bacillus sonorensis</i>	Sh-2	74.5%	+	+	-	+	+
<i>Bacillus tequilensis</i>	Sh-3	76%	-	-	-	-	+
<i>Bacillus mojavensis</i>	Sh-4	78%	-	-	-	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	Sh-12	74%	+	+	-	+	+



شکل ۳- تبارنمای رسم شده بر اساس ناحیه 16S rDNA با روش Neighbor Joining و با بوت استرپ برابر با ۱۰۰۰ برای باکتری‌های اندوفیت جدا شده از درختان سیب با توان تولید اکسین، سه جدایه از باکتری‌های گرم منفی شامل (*Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*) بعنوان گروه خارجی استفاده شده است

Figure 3- Phylogenetic tree drawn for 16srDNA region using Neighbor Joining algorithm with 1000 bootstrap replication for endophytic bacteria with IAA production capability isolated from apple trees; three gram-negative bacteria (*Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Erwinia*) were used as out-group

۱۵۰۰ باند تقریباً rDNA نوکلئوتیدی تولید کردند. محصولات PCR پس از توالی‌یابی و رسم درخت فیلوژنتیک همگی جز جنس باسیلوس

پنج باکتری منتخب مورد شناسایی مولکولی و بیوشیمیایی قرار گرفتند. هر پنج جدایه منتخب با پرایمرهای عمومی ناحیه 16S

شناسایی شدند (جدول ۲) (شکل ۳). آزمون‌های بیوشیمیایی نتایج شناسایی مولکولی را تأیید کردند.

## بحث

در این تحقیق پنج جدایه از باکتری‌های جنس باسیلوس از درختان سیب استان آذربایجان شرقی جداسازی و شناسایی شدند که هم علاوه بر قدرت بازدارندگی بالا علیه قارچ *Diplodia bulgarica* توان تولید فیتوهورمون اکسین (IAA) را دارا هستند. قبلاً نیز گونه‌های متعددی از جنس باسیلوس بعنوان عنوان کنترل بیولوژیک مفید گزارش شده است. در تحقیق بیننده (Binanadeh, 2016) نیز از ۱۷ گونه باسیلوس برای کنترل بیمارگر مهم قارچی *Roselinia necatrix* در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد؛ که بالاترین کنترل مربوط به جدایه‌های *B. subtilis* و *B. amyloliquefaciens* به ترتیب با ۶۶/۹ و ۶۵/۹ درصد بود. مطالعات سوتو و همکاران هم نشان داده است که متابولیت‌های ثانویه که توسط باکتری *B. amyloliquefaciens* تولید می‌شود، بشدت مانع رشد مسیلیوم قارچ‌های *R. solani*، *Fusarium solani*، *Sclerotinia sclerotiorum*، *F. oxysporum* f.sp. *lycopercici* شده‌اند (Souto et al., 2004). طی این مطالعه مشخص گردید که عامل کنترل بیولوژیک از جنس باسیلوس می‌تواند جایگزینی ایده‌آل برای قارچ‌کش‌های شیمیایی برای پیشگیری و کنترل بیماری کپک‌خاکستری باشد؛ در آن تحقیق گونه ضدقارچی جدا شده از ریزوسفر گیاهان (*B. velezensis*) فعالیت ضدقارچی زیادی در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی از جمله *Botrytis cinerea*، *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*، *F. sclerotiorum*، *Colletotrichum moniliforme*، *S. orbiculare*، *Alternaria nees*، *F. equiseti*، *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* نشان داد.

در ایران در تحقیقات نوروزی و همکاران (Norozi et al., 2024) توانایی جدایه‌های بومی باسیلوس و تولید متابولیت توسط آن‌ها به منظور ممانعت از رشد بیمارگرها را نشان داده شده است. در این تحقیق برخی جدایه‌های باسیلوس توان کنترل‌کنندگی در حد قارچ‌کش قوی رورال تی اس (Rovral-TS) در برابر قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* را از خود نشان دادند. در تحقیقی دیگر جهان بخش و همکاران (Jahanbakhsh et al., 2014) طی مطالعه گلخانه‌ای ثابت کردند که برخی جدایه‌های باکتری‌های جنس باسیلوس در کنار کنترل بیمارگرهای مهمی مثل *Meloidogyne javanica* می‌توانند باعث بهبود رشد گیاه گوجه‌فرنگی گردند. کلاً گونه‌های مختلف *Bacillus* spp. باکتری‌های مناسبی برای تجاری‌شدن به‌عنوان ترکیبات بیوکنترلی هستند. در حال حاضر فرمولاسیون‌های مختلف و موفقی از محصولات بیولوژیک بر پایه باکتری باسیلوس در سطح جهان و ایران تولید شده که به‌عنوان قارچ

کش‌ها و کودهای زیستی در سطح مزارع مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ahmadzadeh & Sharifi-Tehrani, 2021) کنترل بیولوژیک قارچ *Diplodia bulgarica* با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست قبلاً گزارش شده است (Alijani et al., 2016) ولی کنترل این قارچ با استفاده از باکتری‌های اندوفیت تا کنون گزارش نشده است و این تحقیق اولین تلاش در این زمینه در ایران می‌باشد. تولید فیتوهورمون‌های گیاهی نظیر اکسین، سیتوکینین و جیبرلین توسط گونه‌های باسیلوس قبلاً گزارش شده است. اکسین از مهم‌ترین هورمون‌های گیاهی می‌باشد که به‌عنوان تنظیم‌کننده رشد گیاه شناخته می‌شود و تأثیر آن بر رشد و نمو و تمایز گیاه قابل ذکر می‌باشد (Duca et al., 2014). مهم‌ترین نوع اکسین (ایندول استیک اسید) IAA است که از طریق متابولیسم ال-تریپتوفان توسط گیاهان و ریزومواد مختلف مانند باکتری‌های اندوفیت ساخته می‌شود که به‌طور مستقیم به‌وسیله تحریک طویل شدن سلول‌های گیاه و یا تقسیم سلولی و یا به‌صورت غیرمستقیم به‌وسیله تأثیر بر فعالیت ACC دآمیناز، رشد ریشه‌های اولیه و شاخه‌ها را بیشتر نموده و تعداد ریشه‌های جانبی را افزایش می‌دهد (Geetha et al., 2012). باکتری‌های وابسته به جنس *Bacillus* جزء گروه باکتری‌های بهبوددهنده رشد گیاهی محسوب می‌شوند و قادرند از طریق ترشح بعضی هورمون‌های گیاهی مانند ایندول استیک اسید (IAA)، جیبرلین و سیتوکینین، رشد گیاه را افزایش دهند. این ترکیبات باعث می‌شوند که ریشه‌های آسیب دیده توسط عوامل بیماری‌زا هر چه سریع‌تر توسط ریشه‌های جدید جایگزین شوند و به این ترتیب خسارت بیماری را کاهش دهند (Sadfi et al., 2002). کومار و همکاران (Kumar et al., 2011) گزارش کردند گونه‌های *Bacillus* قادر به تولید ایندول استیک اسید می‌باشد که نتایج آن‌ها مشابه نتایج پژوهش حاضر می‌باشد. همچنین در مطالعه مجید و همکاران (Majeed et al., 2015) مشخص شد که گونه‌های *Bacillus* به‌طور متوسط قادر به تولید ۰/۵۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندول استیک اسید می‌باشند. سزیالگی-زچین و همکاران (Szilagyi-Zeechin et al., 2014) باکتری *Bacillus* را از ریشه و ساقه گیاه ذرت جداسازی کردند و به این نتیجه دست یافتند که این باکتری قادر به تولید هورمون ایندول استیک اسید به میزان ۳/۱ میلی‌گرم بر لیتر می‌باشد. امارسان و همکاران (Amaresan et al., 2012) نیز بیان داشتند که جدایه‌های *Bacillus* قادر به تولید هورمون ایندول استیک اسید هستند که بیشترین مقدار آن ۴۴ و کمترین مقدار آن ۹/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. بهبود جوانه‌زنی بذر، افزایش طول ریشه، طول شاخه و تعداد ریشه‌های جانبی گیاهچه‌های سویا به علت توانایی جدایه‌های *Bacillus* spp. در تولید ایندول استیک اسید و محلول‌سازی فسفات در آزمایشات نشان داده شده است (Wahyundi et al., 2011). محققین زیادی از جمله



جدایه، پنج جدایه به‌عنوان آنتاگونیست قوی (بازدارندگی از رشد بالای ۷۰٪) با توان تولید اکسین انتخاب و شناسایی شدند. هر پنج جدایه شناسایی شده در این تحقیق متعلق به جنس *Bacillus* هستند. بررسی سایر ویژگی‌های بیوکنترلی و رشدی جدایه‌های اندوفیت منتخب، توانایی آنها در کاهش شانکر شاخه سیب در شرایط گلخانه و باغ در تحقیقات تکمیلی تر پیشنهاد می‌گردد.

### سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از کلیه کارکنان آزمایشگاه‌های باکتری شناسی و قارچ‌شناسی گروه گیاهپزشکی دانشگاه تبریز کمال تشکر را دارند.

پارنت و همکاران (Parent et al., 2018) احمد و همکاران (Ahmad et al., 2018) و علی و همکاران (Ali et al., 2009) ثابت کرده‌اند که با افزایش غلظت تریپتوفان در محیط میزان تولید IAA توسط باکتری‌ها افزایش پیدا می‌کند که این مورد در پژوهش حاضر نیز قابل مشاهده است.

### نتیجه‌گیری

طی این بررسی ۱۱۰ جدایه اندوفیت از شاخه‌های سالم درختان سیب باغات استان آذربایجان شرقی جداسازی گردید. سنجش فعالیت آنتاگونیستی این جدایه‌ها در آزمایشگاه با روش کشت متقابل نشان داد که ۵۰ جدایه بین ۱۰ تا ۷۹ درصد توان کاهش در رشد میسلومی قارچ بیمارگر *Diplodia bulgarica* را دارا هستند. از بین این ۵۰

### References

1. Abdollahzadeh, J. (2015). *Diplodia bulgarica*, as a new pathogen and potential threat to the apple industry in Iran. *Phytopathologia Mediterranea*, 54, 128–132. [https://doi.org/10.14601/Phytopathol\\_Mediterr-14686](https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-14686)
2. 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. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.04.001>
3. Ahmadzadeh, M., & Sharifi-Tehrani, A. (2021). *Plant probiotic bacteria*. University of Tehran Press, 629 pp. (In Persian)
4. Ali, B., Sabri, N., Ljung, K., & Hasnain, S. (2009). Quantification of indole-3-acetic from plant associated *Bacillus* spp. and their phytostimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25, 519-526. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9918-9>
5. Alijani, N., Manafi Shabestari, M., & Ghosta, Y. (2016). *Biocontrol effects of endophytic fungi isolated from apple trees against Diplodia bulgarica the causal agent of apple canker disease*. In 22<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress (p. 339). (In Persian)
6. Alizadeh, M., Khakvar, R., & Babai-Ahari, A. (2017). Isolation and characterization of bacterial agents associated of wetwood disease on elm trees in Iran. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 52, 157-168. <https://doi.org/10.1556/038.52.2017.028>
7. Amaresan, N., Jayakumar, V., & Thajuddin, N. (2012). Isolation and characterization of endophytic bacteria associated with chili (*Capsicum annuum*) grown in coastal agricultural ecosystem. *Indian Journal of Biotechnology*, 13, 247-255.
8. Arzanlou, M., Mousavi, S., Bakhshi, M., Khakvar, R., & Bandehagh, A. (2016). Inhibitory effects of antagonistic bacteria inhabiting the rhizosphere of the Sugar beet plants, on *Cercospora beticola* Sacc., the causal agent of *Cercospora* leaf spot disease on Sugar beet. *Journal of Plant Protection Research*, 56, 6-14. <https://doi.org/10.1515/jppr-2016-0002>
9. Binandeh, N. (2016). biological control of white rot of root in some cultivars of apples and pears using antagonistic bacteria. Master thesis. Tarbiat Modarres University. 125Pp. (In Persian)
10. Bric, J.M., Bosrock, R.M., & Silversone, S.E. (1991). Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilization on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 535-538. <https://doi.org/10.1128%2Faem.57.2.535-538.1991>
11. Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., & Vasilyeva, N. (2014). Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus depends* on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27, 87–100. <https://doi.org/10.1094/mpmi-09-13-0262-r>
12. Deaker, R., László Kecskés, M., Timothy Rose, M., Amprayn, K., & Krishnen, G. (2011). Practical methods for the quality control of inoculant biofertilizers. *Australian Center for International Agriculture Research*, 104.
13. Duca, D., Lorr, J., Chery, L., Rose, D., & Bernard, R. (2014). Indol-3- acetic acid in plant- microbe interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 106, 85-125. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-0095-y>
14. Eken, C. (2022). *Diplodia bulgarica*, cause of postharvest rot on apples in Turkey. *Australasian Plant Disease Notes*, 17, 15. <https://doi.org/10.1007/s13314-022-00460-4>
15. Geetha, T., Vishwaprakash, N., Sycheva, M., & Babu, J.R. (2012). Sequestosome 1/p62: across diseases. *Biomarkers*, 17, 99–103. <https://doi.org/10.3109/1354750x.2011.653986>

16. Gholami, M., Khakvar, R., & Aliasgarzad, N. (2013). Application of endophytic bacteria for controlling anthracnose disease (*Colletotrichum lindemuthianum*) on bean plants. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 46, 1831-1838. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.778477>
17. Gholami, M., Khakvar, R., & Niknam, G. (2014). Introduction of some new endophytic bacteria from *Bacillus* and *Streptomyces* genera as successful biocontrol agents against *Sclerotium rolfsii*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47, 122-130. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.805043>
18. Hanifeh, S., Zafari, D., & Soleimani, M.J. (2017) Reaction of some apple cultivars to *Diplodia bulgarica* in Iran. *Mycosphere*, 8, 1253-1260. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/8/2/9>
19. Jacob, J., Krishnan, G.V., Thankappan, D., & Amma, D.K.B. (2020). Endophytic bacterial strains induced systemic resistance in agriculturally important crop plants. In *Microbial Endophytes* (pp. 75-105). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819654-0.00004-1>
20. Jahanbakhsh, V., Mahdikhani Moghadam, E., Baghaee Ravari, S., & Rouhani, H. (2014). Study plant growth promoting *Bacillus* isolates in tomato root colonization and *Meloidogyne javanica* population reduction. *Journal of Iranian Plant Protection Research*, 28, 79-86. <https://doi.org/10.22067/jpp.v28i1.36035>
21. Javadi-Dodaran, N., Khakvar, R., & Aliasgarzad, N. (2022). Isolation and characterization of bacterial endophytes from weeds against *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial canker of stone fruit trees. *Fundamental and Applied Agriculture*, 7, 104-111. <https://doi.org/10.5455/faa.26526>
22. Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B.N. (2011). *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. *Bacteria in Agrobiology. Crop Ecosystems*, 1, 37-59. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2)
23. Luna, C.L., Mariano, R.L.R., & Souto-Maior, A.M. (2002). Production of a biocontrol agent for crucifers black rot disease. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19, 133-140. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322002000200007>
24. Majeed, A., Abbasi, M.K., Hameed, S., Imran, A., & Rahim, N. (2015). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from wheat rhizosphere and their effect on plant growth promotion. *Frontiers in Microbiology*, 6, 198. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00198>
25. Mantelin, S., & Touraine, B. (2004). Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of Experimental Botany*, 55, 27-34. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh010>
26. Moslehi, S., Pourmehr, S., Shirzad, A., & Khakvar, R. (2021). Potential of some endophytic bacteria in biological control of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00396-4>
27. Najari, H.H. (2020). *Guide to planting and growing apples*. Jahad Daneshgahi Press. 430 Pp. (In Persian)
28. Norozi, H., Baghaee-Ravari, S., & Mojerlou, S. (2023). Biocontrol potential of *Bacillus* strains in interaction with *Rhizoctonia solani* pathogen of potato. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 54, 187-205. <https://doi.org/10.22059/ijpps.2023.357079.1007026>
29. Parent, P.Z., Basime, G.C., Nachigera, G.M., Thonart, P., & Ongena, M. (2018). Efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* as biocontrol agent to fight fungal diseases of maize under tropical climates: from lab to field assays in south Kivu. *Environmental Science and Pollution Research International*, 25(30), 29808-29821. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9314-9>
30. Sadfi, N., Cherif, M., Hajlaoui, M.R., Boudabbous, A., & Belanger, R. (2002). Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*. *Annals of Microbiology*, 52, 323-338.
31. Sambrook, J., Russell, D.W., & Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual* (3-volume set). New York: Cold spring harbor laboratory press, 999, 502-510.
32. Schaad, N.W., Jones, J.B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria* (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press). 373Pp.
33. Shrivastava, U.P., & Kumar, A. (2011). A simple and rapid plate assay for the screening of indole-3- acetic acid (IAA) producing microorganisms. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2, 120-124.
34. Souto, G.I., Correa, O.S., Montecchia, M.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L., Bachur, M., & García, A.F. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 1247-1256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02408.x>
35. Szilagyi-Zecchin, V.J., Ikeda, A.C., Hungria, M., Adamoski, D., Kava-Cordeiro, V., Glienke, C., & Galli-Terasawa, L.V. (2014). Identification and characterization of endophytic bacteria from corn (*Zea mays* L.) roots with biotechnological potential in agriculture. *AMB Express*, 4, 2-9. <https://doi.org/10.1186/2155-9076-4-2>
36. Thoa, N.T.K., Mai, D.T.H., Hiu, B.L., Duong, C.A., Chau, N.N.B., Nghiep, N.M., & Quoc, N.B. (2022). Roles of  $\beta$ -Indole acetic acid (IAA) producing endophytic bacteria on the recovery of plant growth and survival ability of sugarcane infected white leaf disease (SWLD). *Current Microbiology*, 79, 389. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-03091-1>

37. Vasebi, Y., Khakvar, R., & Vinatzer, B.A. (2023). Characterization of culturable epiphytic and endophytic bacteria of *Prunus* spp. and their potential for plant growth promotion and antagonistic activity against bacterial canker disease. *Journal of Plant Pathology*, 105(3), 749-766. <https://doi.org/10.1007/s42161-023-01342-z>
38. Wahyudi, A.T., Astuti, R.P., Widyawati, A., Meryandini, A., & Nawangsih, AA. (2011). Characterization of *Bacillus* sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. *Journal of Microbiology and Antimicrobials*, 3, 34-40.
39. Zeynali Bari, R., Abrinbana, M., & Ghosta, Y. (2021). Genetic variation, vegetative compatibility, and aggressiveness diversity of *Diplodia bulgarica* isolates from apple orchards in West Azarbaijan province of Iran. *Plant Pathology*, 70, 1326-1341. <https://doi.org/10.1111/ppa.13374>