



توالی‌یابی و رسم درخت فیلوژنیک باکتری‌های اندوفیت گیاه *Rhabdosciadium Aucheri* به

روش Sanger Sequencing و تعیین اثر ضد قارچی آنها

نگیسا زارعی^۱، رضا حبیبی‌پور^{۲*}

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران.

۲- دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد همدان، دانشگاه آزاد اسلامی، همدان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۰۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۷

چکیده

مقدمه: خواص منحصر به فرد باکتری‌های اندوفیت به خوبی مشخص نیست. باکتری‌های اندوفیت برخی گیاهان مانند *Rhabdosciadium aucheri* ممکن است با خواص ضد میکروبی قارچ‌های بیماری‌زا از بین ببرند. هدف از این مطالعه توالی‌یابی و رسم درخت فیلوژنیک باکتری‌های اندوفیت گیاه *R. aucheri* به روش sanger sequencing و تعیین اثر ضد قارچی آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های گیاهی در این مطالعه توصیفی-تحلیلی با روش تصادفی و آسان و در دسترس جمع‌آوری شدند. روش کشت بر روی پلیت برای شناسایی اولیه باکتری‌های اندوفیت استفاده گردید. روش PCR برای تشخیص مولکولی باکتری‌های اندوفیت و تعیین توالی بهینه‌سازی شد. اثر مهارتی این باکتری‌های اندوفیت بر *آسپرژیلوس نایجر* و *کاندیدا آلبیکنز* به روش کشت متقاطع سنجیده شد.

نتایج: از مجموع ۱۰۰ ایزوله‌ی باکتریایی جدا شده از *R. aucheri* ۹ ایزوله (۹٪) باسیلوس پومیلوس، ۱۵ ایزوله (۱۵٪) باسیلوس سوبتیلیس، ۱۲ ایزوله (۱۲٪) سریشیا فیکاریا، ۱۴ ایزوله (۱۴٪) باسیلوس آمیلولیکوفاسینس، ۸ ایزوله (۸٪) پانتوئه آگلومرانس و ۷ ایزوله (۷ درصد) سوداروباکتر اکسیدانسان بودند. نتایج تعیین توالی نشان دادند که تفاوت گونه‌های مختلف باسیلوس مربوط به جایگاه‌های T و G بودند. همچنین باسیلوس‌های جداسازی شده بیشترین تأثیر را بر روی قارچ *آسپرژیلوس نایجر* نشان دادند.

نتیجه‌گیری: با استناد به نتایج ما، ریشه گیاه *R. aucheri* محلی مناسب برای جداسازی باسیلوس‌های دارای پتانسیل بالای ضد میکروبی است. همچنین مشخص شد که گونه باسیلوس سوبتیلیس در مقایسه با باکتری‌های دیگر قدرت بیشتری برای مهار قارچ‌های بیماری‌زا دارد.

واژه‌های کلیدی: باسیلوس، تعیین توالی، باکتری‌های اندوفیت، *آسپرژیلوس*.

*نویسنده مسئول گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان، تلفن: ۰۹۱۸۳۱۶۹۷۶۰، شماره: ۰۸۱۴۴۹۴۰۶۴، Email: habibipour.r@gmail.com

ارجاع: زارعی نگیسا، حبیبی‌پور رضا. توالی‌یابی و رسم درخت فیلوژنیک باکتری‌های اندوفیت گیاه *Rhabdosciadium aucheri* به روش Sanger Sequencing و تعیین اثر ضد قارچی آنها. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۴؛ ۲۰(۲): ۲۴-۱۵.



مقدمه

حضور باکتری‌های اندوفیت در طیف وسیعی از گیاهان، به اثبات رسیده است. این باکتری‌ها در بخش‌های اصلی گیاه مانند ساقه، ریشه برگ و میوه حضور دارند (۱). جنس و گونه‌های مختلف باکتری‌های اندوفیت از بافت‌های داخلی گیاهان سالم، جدا شدند که جنس‌های انتروباکتر و باسیلوس از شایع‌ترین جنس‌ها می‌باشند. به‌طور کلی باکتری‌های اندوفیت از نظر تراکم جمعیتی نسبت به بیمارگرها در سطوح پایین‌تری قرار دارند. از لحاظ تراکم جمعیتی، ریشه بالاترین جمعیت باکتریایی را دارد. جمعیت باکتری‌ها در ساقه پایین‌تر از ریشه بوده و در دمبرگ و دمگل جمعیت باکتری‌ها به پایین‌تر می‌رسد (۳-۱).

در سال‌های اخیر با وجود پیشرفت‌هایی که در زمینه‌ی جداسازی و تولید اسانس‌های گیاهی و استفاده دارویی از آنها صورت گرفته، هنوز هم شاهد استفاده حداقلی از داروهای گیاهی در بازار فرآورده‌های دارویی هستیم (۴ و ۵) و داروهای شیمیایی هنوز هم در صدر فروش ترکیبات دارویی قرار دارند. داروهایی که سبب شکل‌گیری مقاومت‌های دارویی در میکروب‌ها شده و مشکلات بی‌شماری را برای جوامع بشری رقم زده است (۵ و ۶). جمعیت اندوفیت‌ها توسط برخی از فاکتورهای زیستی و محیطی مانند، نوع گیاه، سن گیاه، نوع بافت، زمان نمونه‌برداری در شرایط محیطی خاک تحت تأثیر قرار می‌گیرد. علاوه بر این ژنوتیپ گیاه نیز می‌تواند جمعیت اندوفیت‌ها را در شرایط کلون شدن تحت تأثیر قرار دهد (۲ و ۷).

باسیلوس‌ها، از مهمترین باکتری‌های اندوفیت می‌باشند که در بخش‌های مختلف گیاهان حضور دارند. از مهم‌ترین خصوصیات این جنس می‌توان به، رشد در شرایط هوازی-بی‌هوازی، گرم مثبت بودن و توانایی تشکیل اسپور اشاره کرد (۸). ویژگی خاص دیواره سلولی این باکتری‌ها، به باسیلوس‌ها توان مقابله در برابر شرایط نامساعد نظیر دمای بالا، مواد شیمیایی، ترشح آنتی‌بیوتیک‌ها و اشعه فرابنفش را می‌دهد (۹ و ۱۰). گونه‌های اندوفیت این باکتری، به دلیل تولید طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌های هیدرولیتیک و ویژگی‌های زیستی دیگر بیشتر از سایر جنس‌های باکتریایی در کنترل بیولوژیک مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از گونه‌های این جنس در صنعت، کشاورزی و پزشکی، به ویژه در تولید آنزیم‌های هیدرولیزکننده به‌طور گسترده استفاده می‌شود (۹ و ۱۱).

جنس *Rhabdosciadium* یکی از مهم‌ترین گیاهان پراکنده در ایران و ترکیه می‌باشد. این جنس در خانواده *Apiaceae* و رده *Magnoliopsida*، گروه‌بندی شده است. این جنس دارای ۵ گونه می‌باشد که تمامی آنها به‌طور طبیعی در ایران پراکنش دارند. گونه

Rhabdosciadium aucheri یکی از سه گونه انحصاری ایران می‌باشد که با ساقه‌ای به ارتفاع ۳۰ تا ۱۰۰ سانتیمتر، نازک، سخت شکننده یا تقریباً قابل ارتجاع می‌باشد. فصل گلدهی و میوه‌دهی این گونه اواسط تابستان می‌باشد و گیاه متعلق به منطقه ایرانی-تورانی می‌باشد (۱۲). در سال‌های اخیر به دلیل کاربردهای مفید باکتری‌های باسیلوس‌های اندوفیت توجه زیادی به جداسازی و شناسایی این میکروارگانیسم شده است.

اثرات ضدقارچی باسیلوس‌های جدا شده از *R. aucheri* و عملکرد آن علیه میکروارگانیسم‌های مضر انسانی، مشخص نمی‌باشد. از این رو، هدف از مطالعه حاضر بررسی تنوع گونه‌های مختلف باسیلوس‌ها در گیاه *R. aucheri* بر اساس روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی و تعیین اثرات ضد میکروبی آنها می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، نمونه‌های گیاهی *R. aucheri* از سه منطقه متفاوت شهرستان همدان طی یک دوره ۱۶ ماهه جمع‌آوری شد. شیوه نمونه‌برداری بر اساس روش تصادفی و در دسترس انتخاب گردید. به‌منظور تعیین جنس و گونه باکتری‌های اندوفیت، نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان منتقل شدند.

در ابتدا، نمونه‌ها در زیر جریان ملایم آب به مدت ۵ دقیقه شسته شدند تا آلودگی‌های اولیه از سطح آنها گرفته شود. برای ضد عفونی کردن نمونه‌ها، هر یک از آنها به قطعات کوچک (حدود یک سانتی‌متر) برش داده شد. سپس، قطعات در اتانول ۷۰٪ به مدت دو دقیقه سپس در هیپوکلریت سدیم به مدت پنج دقیقه و سپس سه بار در آب مقطر هر کدام به مدت پنج دقیقه قرار گرفت. با استفاده از گاز و چاقوهای استریل، قطعات گیاهی به قسمت‌های کوچک‌تر (سه تا چهار برش) برش داده شد تا داخل میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری قرار بگیرند. بعد، دو قطعه از گیاه برش داده شده داخل میکروتیوب حاوی آب مقطر استریل قرار داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردید. سپس، ۵۰ ماکرولیت از محلول آماده شده، در دو طرف پلیت‌های حاوی محیط نوترینت آگار (*Hi-Media*، هند) ریخته شد. گرمخانه‌گذاری در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. در نهایت با استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی جنس و گونه‌ی باسیلوس‌های شناسایی شدند (۱۲).

جهت شناسایی اولیه کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کالاتالاز و اکسیداز، رنگ‌آمیزی کپسول و اسپور، احیای نیترا، آزمون حرکت، سیمون سیترا، اوره‌آز، هیدرولیز ژلاتین و همچنین آزمون تخمیز کربوهیدرات‌های مختلف شامل ارابینوز، اینوزیتول، ترهالوز، رافینوز، رامنوز،

استریل یک بلوک میسلیم (۵×۵ میلی‌متر) بریده شد و در فاصله ۲ سانتی‌متری از لبه پلیت محیط PDA قرار داده شد. یک کلونی متوسط از باکتری‌های اندوفیتیک در یک خط مستقیم روی پلیت PDA در طرف مقابل بلوک قارچی با فاصله ۲ سانتی‌متر از لبه دیگر رگه‌ها کشت داده شد. پلیت PDA حاوی یک بلوک میسلیم بدون باکتری اندوفیت به‌عنوان شاهد استفاده شد. رشد شعاعی کریپتوکوکوس نئوفورمنس و کاندیدا گلابراتا بعد از ۱۴ روز گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق، اندازه‌گیری گردید (۱). نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۸ و آزمون آماری χ^2 به منظور بررسی کیفی داده‌ها استفاده گردید. از آزمون‌های آماری آنوا دوطرفه و آزمون-تی برای بررسی ارتباط بین متغیرها استفاده گردید ($P \geq 0.05$) و $P \geq 0.001$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. با استفاده از نرم‌افزار Chromas نسخه ۶/۶ توالی تجزیه و تحلیل شدند. با استفاده از پایگاه داده NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)، تجزیه و تحلی توالی‌ها به‌منظور تعیین جنس و گونه‌ی باکتری‌های اندوفیت انجام شد. نمودار فیلوژنیک گونه‌های مختلف باسیلوس با استفاده از نرم‌افزار BioEdit نسخه ۳ رسم گردید.

نتایج

در این مطالعه توصیفی-تحلیلی، نمونه‌های گیاهی *R. aucheri* از سه منطقه متفاوت شهرستان همدان طی یک دوره ۱۶ ماهه جمع‌آوری شد. شیوه نمونه‌برداری بر اساس روش تصادفی و در دسترس انتخاب گردید. به‌منظور تعیین جنس و گونه باکتری‌های اندوفیت، نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان منتقل شدند.

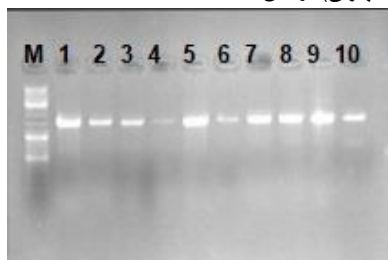
در ابتدا، نمونه‌ها در زیر جریان ملایم آب به مدت ۵ دقیقه شسته شدند تا آلودگی‌های اولیه از سطح آنها گرفته شود. برای ضد عفونی کردن نمونه‌ها، هر یک از آنها به قطعات کوچک (حدود یک سانتی‌متر) برش داده شد. سپس، قطعات در اتانول ۷۰٪ به مدت دو دقیقه سپس در هیپوکلریت سدیم به مدت پنج دقیقه و سپس سه بار در آب مقطر هر کدام به مدت پنج دقیقه قرار گرفت. با استفاده از گاز و چاقوهای استریل، قطعات گیاهی به قسمت‌های کوچک‌تر (سه تا چهار برش) برش داده شد تا داخل میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری قرار بگیرند. بعد، دو قطعه از گیاه برش داده شده داخل میکروتیوب حاوی آب مقطر استریل قرار داده شد و به مدت ۲۰ دقیقه ورتکس گردید. سپس، ۵۰ ماکرولیت از محلول آماده شده، در دو طرف پلیت‌های حاوی محیط نوترینت آگار (Hi-Media، هند) ریخته شد. گرمخانه‌گذاری در شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. در نهایت با

ریبوز، زایلوز، ساکاروز، سلوبیوز، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکوز، مانوز، مانیتول، ملوبیوز و سالیسین استفاده شد. همچنین برای تأیید ایزوله‌های شناسایی شده به روش فنوتیپی، از ژن srRNA16 نیز استفاده گردید (۱۳). به‌منظور استخراج DNA از روش Tris-EDTA (TE) با کمی بهینه‌سازی استفاده گردید (۱۴). برای شروع کار، کلنی‌های خالص شده در میکروتیوب‌های حاوی محیط نوترینت برات (Hi-Media، هند)، حل شدند. بعد از گرمخانه‌گذاری اولیه به مدت ۲۴ ساعت و حصول اطمینان از رشد باکتری‌ها و تیره شدن محیط کشت، میکروتیوب‌ها به آرامی ورتکس شدند. سپس، حاوی میکروتیوب‌ها با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از خارج کردن مایع رویی ۵۰۰ ماکرولیت بافر Tris-EDTA (TE) به آن اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد، ۱۰۰ ماکرولیت محلول NaCL یک طبیعی، ۱۰۰ ماکرولیت ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) و ۲۰۰ ماکرولیت آمونیوم استات اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از آن، به میکروتیوب‌ها ایزوآمینوالکل اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ RPM در شرایط دمایی ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفیوژ گردید. از روش الکتروفورز ژل آگارز روی آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ V85 به مدت ۱ ساعت جهت تعیین کیفیت DNA استخراج شده، استفاده گردید.

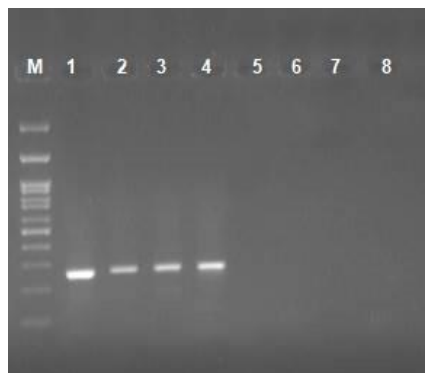
با استفاده از پرایمرهای جدول ۱، مراحل آماده‌سازی واکنش PCR برای تکثیر ژن srRNA16 در دانه دمایی ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل (۳۰ ثانیه ۳۰.۹۴°C، ۴۰ ثانیه ۵۶°C و ۷۳°C) و ۷۳°C نهایی به مدت ۵ دقیقه، انجام شد. حجم نهایی واکنش ۵۰ میکرولیتر که شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۵ پیکومولار و ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon، آلمان) تعیین شد (۱۵). برای ژن مورد مطالعه از ترموسایکلر BioRad MJ Mini (ساخت آمریکا) استفاده گردید. در نهایت، حضور ژن‌ها بر روی آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ V85 به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید. سپس، به‌منظور تعیین توالی نمونه‌های بررسی شده طبق پروتکل‌های مخصوص، نمونه‌های تکثیر شده به همراه پرایمرهای اختصاصی به شرکت نیازن نور (تهران) ارسال شد. اثردهی عصاره باسیلوس‌ها علیه کریپتوکوکوس نئوفورمنس، کاندیدا گلابراتا

برای این کار از روش کشت متقاطع استفاده شد. ابتدا، کریپتوکوکوس نئوفورمنس و کاندیدا گلابراتا بر روی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار (Hi-Media، PDA، هند) کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری شدند. سپس، با استفاده از چاقوی جراحی

مخصوص، نمونه‌های تکثیر شده به همراه پرایمرهای اختصاصی به شرکت نیاژن نور (تهران) ارسال شد.



شکل ۲- نتایج الکتروفورز نمونه‌های DNA استخراج شده با ژل آگارز یک و نیم درصد. چاهک M: مارکر ۱۰۰ Kb، چاهک ۱: کنترل مثبت، چاهک‌های ۲ تا ۱۰: ایزوله‌های استخراج شده



شکل ۳- الکتروفورز ژن 16S rRNA به منظور شناسایی گونه‌های مختلف باسیلوس جدا شده از گیاه *R. aucheri*. طول قطعه تکثیر شده ۲۵۰ تا ۳۰۰ جفت باز تعیین شده است. چاهک ۱ کنترل مثبت. M: مارکر ۱۰۰- جفت بازی، چاهک ۸: کنترل منفی، چاهک‌های ۲ تا ۷: ایزوله‌های بررسی شده برای اثردهی عصاره باسیلوس‌ها علیه کریپتوکوکوس *نئوفورمنس*، *کاندیدیا گلابراتا* از روش کشت متقاطع استفاده شد. ابتدا، کریپتوکوکوس *نئوفورمنس* و *کاندیدیا گلابراتا* بر روی محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار (PDA) (Hi-Media، هند) کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه گرمخانه‌گذاری شدند. سپس، با استفاده از چاقوی جراحی استریل یک بلوک میسلیم (۵×۵ میلی‌متر) بریده شد و در فاصله ۲ سانتی‌متری از لبه پلیت محیط PDA قرار داده شد. یک کلونی متوسط از باکتری‌های اندوفیتیک در یک خط مستقیم روی پلیت PDA در طرف مقابل بلوک قارچی با فاصله ۲ سانتی‌متر از لبه دیگر رگه‌ها کشت داده شد. پلیت PDA حاوی یک بلوک میسلیم بدون باکتری اندوفیت به‌عنوان شاهد استفاده شد. رشد شعاعی کریپتوکوکوس *نئوفورمنس* و *کاندیدیا گلابراتا* بعد از ۱۴ روز گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق، اندازه‌گیری گردید (۱).

استفاده از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی جنس و گونه‌ی باسیلوس‌های شناسایی شدند (۱۲).

جهت شناسایی اولیه کلنی‌ها، رنگ‌آمیزی گرم، آزمون کالاتالاز و اکسیداز، رنگ‌آمیزی کپسول و اسپور، احیای نیتрат، آزمون حرکت، سیمون سترات، اوره‌آوز، هیدرولیز ژلاتین و همچنین آزمون تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف شامل ارابینوز، اینوزیتول، ترهالوز، رافینوز، رامنوز، ریبوز، زایلوز، ساکاروز، سلوبیوز، فروکتوز، گالاکتوز، گلوکوز، مانوز، مانیتول، ملوبیوز و سالیسین استفاده شد. همچنین برای تأیید ایزوله‌های شناسایی شده به روش فنوتیپی، از ژن 16S rRNA نیز استفاده گردید (۱۳).

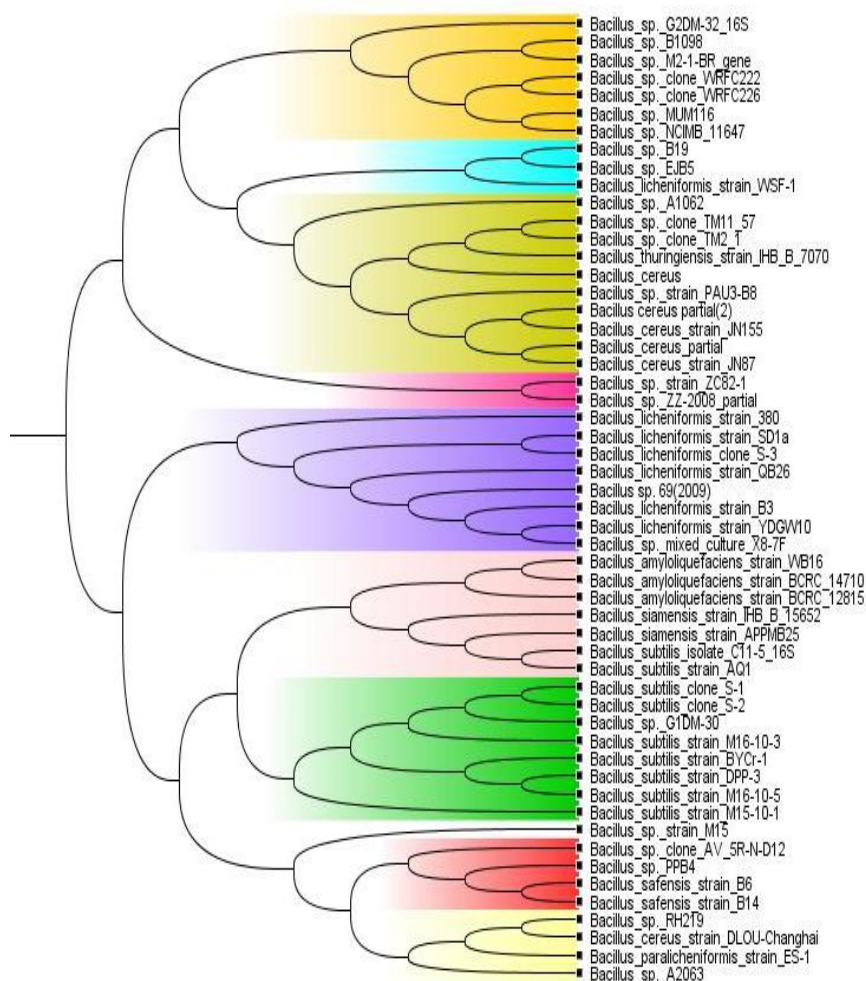
به‌منظور استخراج DNA از روش Tris-EDTA (TE) با کمی بهینه‌سازی استفاده گردید (۱۴). برای شروع کار، کلنی‌های خالص شده در میکروتیوب‌های حاوی محیط نوترینت برات (Hi-Media، هند)، حل شدند. بعد از گرمخانه‌گذاری اولیه به مدت ۲۴ ساعت و حصول اطمینان از رشد باکتری‌ها و تیره شدن محیط کشت، میکروتیوب‌ها به آرامی ورتکس شدند. سپس، حاوی میکروتیوب‌ها با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از خارج کردن مایع رویی ۵۰۰ میکرولیتر بافر Tris-EDTA (TE) به آن اضافه شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتریگراد انکوبه گردید. بعد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول NaCl یک طبیعی، ۱۰۰ میکرولیتر سیتیل تری‌متیل آمونیوم بروماید (CTAB) و ۲۰۰ میکرولیتر آمونیوم استات اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتریگراد انکوبه گردید. بعد از آن، به میکروتیوب‌ها ایزوآمینوالکل اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۱۴۰۰۰ RPM در شرایط دمایی ۴ درجه سانتریگراد، سانتریفیوژ گردید. از روش الکتروفورز ژل آگارز روی آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۷۵V به مدت ۱ ساعت جهت تعیین کیفیت DNA استخراج شده، استفاده گردید.

با استفاده از پرایمرهای جدول ۱، مراحل آماده‌سازی واکنش PCR برای تکثیر ژن 16S rRNA در دما ۹۴°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ سیکل (۳۰ ثانیه ۹۴°C، ۳۰ ثانیه ۵۶°C، ۴۰ ثانیه ۷۲°C) و ۷۲°C نهایی به مدت ۵ دقیقه، انجام شد. حجم نهایی واکنش ۵۰ میکرولیتر که شامل ۲ میکرولیتر DNA الگو، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۲۵ پیکومولار و ۲۵ میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon، آلمان) تعیین شد (۱۵). برای ژن مورد مطالعه از ترموسایکلر BioRad MJ Mini (ساخت آمریکا) استفاده گردید. در نهایت، حضور ژن‌ها بر روی آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۵V به مدت ۱ ساعت الکتروفورز گردید. سپس، به منظور تعیین توالی نمونه‌های بررسی شده طبق پروتکل‌های



شکل ۴- نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل تعیین توالی ژن 16srRNA در جهت شناسایی گونه‌های مختلف باسیلوس جدا شده از گیاه *R.aucheri*. عکس بالا: تعیین گونه‌های مختلف باسیلوس. عکس پایین: تعیین کیفیت محصولات تعیین توالی شده به وسیله نرم‌افزار کروماتس

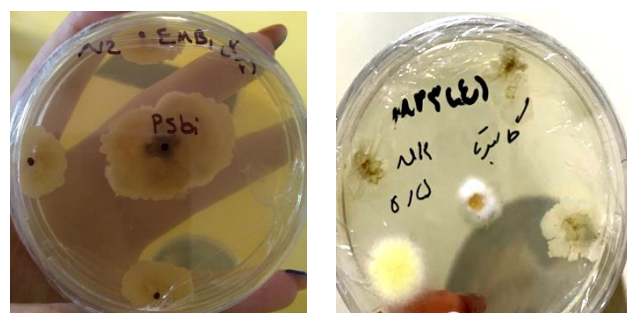
جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه			
نام ژن	توالی نوکلئوتیدی	طول قطعه	منبع
16srRNA	F: GAGTTTGATTGATCMTGGCT CAG R: TACCTTGTTACGACCTT	۲۱۸	(۱۵)



شکل ۵- درخت فیلوژنیک-دندروگرام حاصل از تعیین توالی گونه‌های باسیلوس جدا شده از گیاه R.aucheri

جدول ۲- درصد بازدارندگی باکتری‌های اندوفیت گیاه R.aucheri بر روی قارچ‌های بیماری‌زای انسانی

قارچ بیماری‌زا		تیمار (باکتری اندوفیت)
کاندیدا گلابراتا	کریپتوکوکوس نئوفورمنس	
۷۷/۷۸	۰/۰۰	باسیلوس پومیلوس
۷۷/۷۸	۱۲/۴۴	باسیلوس سوتیلیس
۶۱/۱۱	۳۴/۳۳	باسیلوس آمیلولیکوفاسینس
۳۸/۸۹	۱۳/۳۳	پانتونه آگلومرانس
۶۱/۱۱	۱۴/۲۲	سوداروباکتر اکسیدانس
۷۷/۷۸	۶/۶۷	سراشیا فیکاریا
-	-	کنترل



شکل ۶- تشخیص اثر مهارتی گونه‌های مختلف باسیلوس جدا شده از گیاه R.aucheri علیه کاندیدا گلابراتا (راست) و کریپتوکوکوس نئوفورمنس (چپ) توسط آزمون کشت متقاطع و نتایج عدم رشد قارچ‌های بیماری‌زا تیمار شده با باکتری‌های اندوفیت جدا شده از R.aucheri

می‌تواند به دسته‌بندی بهتر باکتری‌ها کمک کند که مشابه با مطالعات انجام شده می‌باشد (۱۸).

توجه به این نکته اهمیت زیاد دارد که، حساسیت و دقت بالای روش‌های مولکولی در شناسایی جنس و گونه‌های باکتریایی سبب کاهش هزینه و افزایش سرعت تشخیص می‌گردد (۱۹). به‌طوری‌که در مطالعه حاضر به‌عنوان یک روش تکمیلی و تأییدی در کنار روش‌های فنوتیپی برای دسته‌بندی گونه‌های باکتریایی به‌کار برده شده است. در مطالعه‌ای که چاتریدیموپولوس و همکاران بر روی قارچ‌های مختلف داشتند با استفاده از روش‌های مولکولی و سایت‌های ژنی $srRNA^{۱۶}$ و $srRNA^{۲۳}$ گونه‌های دارای همولوژی را با کمترین خطای ممکن شناسایی کرده‌اند (۲۰ و ۲۱). با این حال، برخی از پژوهشگران بیان کرده‌اند که گرچه روش کشت از نظر سرعت عملکردی و شناسایی در مقایسه با روش‌های مولکولی قدیمی به نظر می‌رسد، ولی می‌توان با استفاده از برخی محیط‌های اختصاصی و همچنین فراهم کردن شرایط استریلاسیون از نتایج خوبی برخوردار شد (۲۱، ۲۲ و ۲۶).

روش خط متقاطع روش غربالگری سریع میکروارگانسیم‌ها از لحاظ رابطه‌ی آنتگوانیسمی می‌باشد. این آزمون با حفظ شرایط استاندارد، حساسیت و اختصاصیت قابل قبولی دارد، اما در مقایسه با روش‌های مولکولی کمبودهایی دارند. بر اساس نتایج ما، تجزیه و تحلیل تعیین توالی‌های ژنومی مختلف نشان داد که بیشترین فراوانی مربوط به جنس باسیلوس می‌باشد. همچنین تفاوت جنس و گونه‌های باکتریایی و ساختار مولکولی اندوفیت‌های بررسی شده، بر اساس توالی‌های G و C مشخص شدند. در مطالعه تانیواکی و همکاران و طهماسبی و همکاران شناسایی گونه‌های مختلف میکروبی با استفاده از روش تعیین توالی صورت گرفت. آنها مطرح کردند که یکی از مهم‌ترین مسائل در شناسایی گونه‌های دارای همولوژی، تعیین جهش‌های ژنی و توالی‌های مرتبط با C و G می‌باشد که با نتایج ما همخوانی داشت (۲۳ و ۲۴).

تحقیقات انجام شده توسط داس و همکاران (۲۵)، ثابت کرد که باکتری‌های اندوفیت مشتق شده از گیاهان ماکینو از رشد کاندیداها جلوگیری می‌کند. یافته‌های به‌دست آمده از آزمون‌ها و مشاهدات انجام شده در این مطالعه حاضر نیز نشان داد که گونه‌های باسیلوس جدا شده از *R. aucheri* مهار رشد کاندیدا گلوبراتا را به خوبی انجام می‌دهند. با این حال، پالمیری و همکاران (۸) نشان دادند که برخی از گونه‌های باسیلوس نمی‌توانند گونه‌های مختلف کاندیدا را از بین ببرند. برخی نشان دادند که تفاوت در ساختار باکتری‌ها و قارچ‌ها، مؤثرترین عامل در اختلاط عملکرد ضدقارچ‌های به‌دست آمده از باکتری‌های اندوفیت بودند (۱ و ۲۶).



شکل ۱- نتایج میکروسکوپی (سمت راست) و ماکروسکوپی (سمت چپ) جدایه‌های به‌دست آمده از بخش‌های مختلف گیاه *R. aucheri*

نرم‌افزار GraphPad Prism و آزمون آماری χ^2 به منظور بررسی کیفی داده‌ها استفاده گردید. از آزمون‌های آماری آنوا دو طرفه و آزمون-تی برای بررسی ارتباط بین متغیرها استفاده گردید ($P \leq 0.05$ و $P \leq 0.001$ معنی‌دار در نظر گرفته شد). با استفاده از نرم‌افزار Chromas، توالی تجزیه و تحلیل شدند. با استفاده از پایگاه داده NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)، تجزیه و تحلی توالی‌ها به‌منظور تعیین جنس و گونه‌ی باکتری‌های اندوفیت انجام شد. نمودار فیلوژنیک گونه‌های مختلف باسیلوس با استفاده از نرم‌افزار BioEdit نسخه ۳ رسم گردید.

بحث

بر اساس مطالعه ما، ریشه گیاه *R. aucheri* بهترین محل برای جداسازی باکتری‌های اندوفیت، به خصوص گونه‌های مختلف باسیلوس، می‌باشند. در تأیید نتایج مطالعه حاضر، پالمیری و همکاران (۸) و کاظمینی و همکاران (۱۲) نشان دادند که شیوع گونه‌های باسیلوس در ریشه گیاه *R. aucheri* در مقایسه با سایر بخش‌های گیاه بیشتر می‌باشد. با این حال، بر خلاف نتایج مطالعه حاضر از نظر شیوع بالای باسیلوس پارامایکوتیدس، محمد و همکاران (۴) نشان دادند که باسیلوس آتروفیتوس بیشترین فراوانی را در ریشه گیاه *R. aucheri* داشت که با نتایج ما مغایرت داشت. روش‌های مولکولی یکی از سریع‌ترین و دقیق‌ترین روش‌ها به منظور شناسایی میکروارگانسیم‌های مختلف می‌باشد که می‌تواند گونه‌های دارای شباهت فنوتیپی نزدیک را به‌راحتی تشخیص دهد (۱۶). استفاده از ژن $srRNA^{۱۶}$ و خوانش توالی‌های تکثیر شده توسط این ژن، از جمله روش‌های مولکولی می‌باشد که در مطالعه حاضر نشان از شباهت نزدیک بین گونه‌های مختلف باسیلوس جدا شده از *R. aucheri* داشت. در مطالعه کاظمینی و همکاران و مانیز و همکاران (۱۷) روش‌های مولکولی یکی از حساس‌ترین و دقیق‌ترین روش‌های مورد استفاده در زمینه تشخیص میکروارگانسیم‌ها معرفی شده است می‌باشد. این مطالعه همچنین مشخص کرد که روش‌های مختلف توالی‌یابی از جمله سنگر و MLST

افزایش کاربرد ضدمیکروب‌های طبیعی در مهار میکرواورگانیزم‌های بیماری‌زا دارد.

با توجه به نتایج حاصل شده می‌توان نتیجه گرفت که غالب اندوفیت‌های به‌دست آمده از قسمت ریشه گیاه *R.aucheri* اثرات مهاری بیشتری را علیه قارچ‌های بیماری‌زا ایفا می‌کند. با توجه به گونه‌های مختلف باسیلوس در گیاه *R.aucheri* می‌توان چنین استنتاج کرد که برخی خواص ضد میکروبی ممکن است به دلیل انباشت این باکتری در بخش ریشه و ساقه آن باشد. از طرفی، باید به این نکته توجه داشت که ماهیت و جنس و گونه قارچ‌های مورد مطالعه نیز نقش مهمی در مهار و یا عدم مهار توسط باکتری‌های اندوفیت را دارد. زیرا در برخی گونه‌های قارچی ساختار دیواره سلولی دارای کمترین میزان نفوذپذیری و بیشتری ضخامت می‌باشد که معادلات مهارکنندگی باکتری‌های اندوفیت را بر هم می‌زند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله مراتب قدردانی و تشکر خود را از معاونت محترم پژوهش دانشگاه آزاد واحد همدان اعلام می‌دارند.

ملاحظات اخلاقی

این تحقیق با اصول اخلاقی معاهده هلسینکی و منشور اخلاق پژوهش معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد همدان انجام شده است. تهیه سویه‌های استاندارد باکتریایی این پژوهش مورد تأیید کمیته اخلاق دانشگاه آزاد واحد همدان با کد اخلاق IR.IAU.H.REC.1401.026 می‌باشد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی را اعلام نکردند.

مشارکت نویسندگان

تمامی اعضای نویسندگان در پژوهش و آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشته‌اند.

حمایت مالی

این مقاله با حمایت‌های مالی دانشگاه آزاد واحد همدان از رساله کارشناسی ارشد خانم نگیسا زارعی استخراج شده است.

کد اخلاق

IR.IAU.H.REC.1401.026

References

1. Yunita M, Lumbantobing R, Tahitu R. Antifungal Activity of Endophytic Bacteria Isolated from Miana Plants (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.) against *Candida albicans*. *Folia Medica Indonesiana* 2023;59:274-81.
2. Mamarasulov B, Davranov K, Umruzaqov A, Ercisli S, Ali Alharbi S, Ansari MJ, Krivosudská E, Datta R, Jabborova D. Evaluation of the antimicrobial and antifungal activity of endophytic bacterial crude extracts from medicinal plant *Ajuga turkestanica* (Rgl.) Brig

به‌طوری‌که در قارچ‌ها ساختار دیواره سلولی کاملاً متفاوت و در مقایسه با باکتری ضخامت بیشتری دارد.

یکی از مهم‌ترین نتایج مطالعه حاضر اثربخشی ضعیف عصاره باکتری‌های اندوفیت علیه کاندیداها بود. چنین می‌توان توضیح داد که ساختار دیواره سلولی و غشای پلاسمایی در کاندیداها ممکن است با مهار کردن نفوذ متابولیت‌های باکتریایی زمینه اثر بخشی اندوفیت‌های به‌دست آمده از گیاه *R.aucheri* را رقم زده باشند. نتایج مشابه در مطالعات اپریتی و همکاران (۲۷) و نورسالوا و همکاران (۲۸) نیز گزارش شده است. با این حال، داس و همکاران (۲۹) اثرات ضد میکروبی باسیلوس‌های جدا شده از برخی گیاهان دارویی علیه کاندیداها را اثبات کردند که همسو با نتایج ما می‌باشد.

مطالعه حاضر نشان داد که پانتوئه آ آگلومرانس و سرایشیا فیکاریا بیشترین اثر مهاری را بر رشد کریپتوکوکوس نئوفورمنس داشت. همچنین، در کشت دوطرفه اندوفیت باسیلوس سیمپلکس در مقابل کاندیدا گلابراتا با ۸۹/۷۸ درصد و باسیلوس پومیلوس، باسیلوس سوبیتیلیس و سرایشیا فیکاریا نیز با ۷۸/۷۷ درصد بیشترین اثر مهارکنندگی را بر کاندیدا گلابراتا را داشته‌اند. بر اساس مطالعات نایسا و همکاران (۳۰) و ایرجایی و همکاران (۳۱)، غلظت استفاده شده باکتری‌ها در میزان عملکرد ضد میکروبی آنها نقش بسیار مهمی را نشان داد. آنها مشخص کردند که با بالا بردن غلظت و تراکم باکتری‌های استفاده شده علیه قارچ‌های مختلف تخریب ساختار قارچ در زمان کمتری صورت گرفته و میزان مرگ و میر بیشتر از تکثیر خواهد بود. در این حالت، قدرت مهار افزایش یافته و کلنی‌های قارچی در حضور باکتری‌های اندوفیت‌ها تشکیل نخواهند شد. تشابه نتایج مطالعات فوق با مطالعه حاضر می‌تواند نوید بخش اثر مثبت عصاره‌های باکتری‌های اندوفیت علیه برخی قارچ‌ها باشد.

همراستا با نتایج ما، مطالعه بویو و همکاران (۹) نشان داد که برخی گونه‌های باسیلوس جدا شده از گیاه *R.aucheri* به‌طور معنی‌داری قادر به مهار کاندیدا و اسپروزیلوس بودند. با این حال، در شکل‌گیری این ارتباط عوامل بسیار مهمی نقش دارند که ممکن است در برخی موارد سبب اختلاف نتایج گردد. مدیسون و همکاران (۳۲) مطرح کردند که عواملی مانند نوع گیاه دارویی که اندوفیت از آن جدا شده است، جنس و گونه باکتری اندوفیت و همچنین قارچ‌های مهار شده، نقش مهمی در ایجاد این ارتباط انتاگونیستی دارد. توجه به این نکته ضروری است که در برخی مطالعات عصاره و پپتیدهای باکتریایی برای بررسی اثرات ضدمیکروبی استفاده شده است که عاملی تأثیرگذار در نتایج متفاوت مطالعات ما با سایر مطالعات می‌باشد (۱۱). از این رو، توجه به نوع گیاه دارویی، محل جداسازی باکتری اندوفیت و متابولیت‌های باکتریایی، کمک بزرگی در

19. Bokaeian M, Tahmasebi H. Molecular identification of genes responsible for resistance to aminoglycosides and methicillin in clinical samples of *Staphylococcus Aureus*. *J Babol Univ Med Sci*. 2017;19:38-46.
20. Chatzidimopoulos M, Ganopoulos I, Vellios E, Madesis P, Tsiftaris A, Pappas AC. Development of a two-step high-resolution melting (HRM) analysis for screening sequence variants associated with resistance to the QoIs, benzimidazoles and dicarboximides in airborne inoculum of *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;360:126-31.
21. Heydari N, Alikhani MY, Tahmasebi H, Asghari B, Arabestani MR. Design of Melting Curve Analysis (MCA) by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Distinction of *Staphylococci* and Antibiotic Resistance. *Arch Clin Infect Dis*. 2019;14(2):e81604.
22. Dehbashi S, Tahmasebi H, Sedighi P, Davarian F, Arabestani MR. Development of high-resolution melting curve analysis in rapid detection of *vanA* gene, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium* from clinical isolates. *Trop Med Health*. 2020;48(1):8.
23. Taniwaki MH, Pitt JI, Iamanaka BT, Sartori D, Copetti MV, Balajee A, Fungaro MHP, Frisvad JC. *Aspergillus bertholletius* sp. nov. from Brazil Nuts. *PLOS ONE*. 2012;7(8):e42480.
24. Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. High resolution melting curve analysis method for detecting of carbapenemases producing *pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Krishna Institute of Medical Sciences University*. 2018;7(4):70-7.
25. Das G, Park S, Choi J, Baek KH. Anticandidal Potential of Endophytic Bacteria Isolated from *Dryopteris uniformis* (Makino). *Jundishapur J Microbiol*. 2019;12(1):e69878.
26. Santra HK, Dutta R, Banerjee D. Antifungal activity of bio-active cell-free culture extracts and volatile organic compounds (VOCs) synthesised by endophytic fungal isolates of *Garden Nasturtium*. *Sci Rep*. 2024;14(1):11228.
27. Aprianti T. Utilization of sugarcane bagasse and banana midrib mixture as raw materials for paper making using acetosolve method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2019;620:012020.
28. Baharuddin N, Zakaria N. The biodiversity and conservation status of the marine gastropod (Mollusca; Gastropoda) in Pulau Bidong, Terengganu, Malaysia. *AACL Bioflux*. 2018;11:988-1000.
29. Das, Patra JK, Choi J, Baek K-H. Anticandidal effect of endophytic bacteria isolated from *Equisetum arvense* L. against *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2017;60.
30. Nisa S, Shoukat M, Bibi Y, Al Ayoubi S, Shah W, Masood S, Sabir M, Asma Bano S, Qayyum A. Therapeutic prospects of endophytic *Bacillus* species from *Berberis lycium* against oxidative stress and microbial pathogens. *Saudi J Biol Sci*. 2022;29(1):287-95.
31. Erjaee Z, Shekarforoush SS, Hosseinzadeh S. Identification of endophytic bacteria in medicinal plants and their antifungal activities against food spoilage fungi. *J Food Sci Technol*. 2019;56(12):5262-70.
32. Medison RG, Tan L, Medison MB, Chiwina KE. Use of beneficial bacterial endophytes: A practical strategy to achieve sustainable agriculture. *AIMS Microbiology*. 2022;8(4):624-43.
3. Taheri E, Tarighi S, Taheri P. An endophytic bacterium with biocontrol activity against important wheat pathogens. *Biol Control*. 2023;183:105243.
4. Mohamad OAA, Li L, Ma J-B, Hatab S, Xu L, Guo J-W, Rasulov BA, Liu Y-H, Hedlund BP, Li W-J. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Endophytic Bacterial Populations From Chinese Traditional Medicinal Plant Licorice and Characterization of the Bioactive Secondary Metabolites Produced by *Bacillus atrophaeus* Against *Verticillium dahliae*. *Front Microbiol*. 2018;9.
5. Tahmasebi H, Arjmand N, Monemi M, Babaeizad A, Alibabaei F, Alibabaei N, Bahar A, Oksenysh V, Eslami M. From Cure to Crisis: Understanding the Evolution of Antibiotic-Resistant Bacteria in Human Microbiota. *Biomolecules*. 2025;15:93.
6. Soltani J, Hosseini Moghaddam MS. Fungal endophyte diversity and bioactivity in the Mediterranean cypress *Cupressus sempervirens*. *Curr Microbiol*. 2015;70(4):580-6.
7. Schulz B, Boyle C, Draeger S, Römmert A-K, Krohn K. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites* *Paper presented at the British Mycological Society symposium on Fungal Bioactive Compounds, held at the University of Wales Swansea on 22-27 April 2001. *Mycological Research*. 2002;106(9):996-1004.
8. Palmieri D, Vitale S, Lima G, Di Pietro A, Turrà D. A bacterial endophyte exploits chemotropism of a fungal pathogen for plant colonization. *Nature Communications*. 2020;11(1):5264.
9. Boiu-Sicuia O-A, Toma RC, Diguță CF, Matei F, Cornea CP. In Vitro Evaluation of Some Endophytic *Bacillus* to Potentially Inhibit Grape and Grapevine Fungal Pathogens. *Plants*. 2023;12(13):2553.
10. Khazaei M, Parsasefat M, Bahar A, Tahmasebi H, Oksenysh V. Behavioral Cooperation or Conflict of Human Intestinal Roundworms and Microbiomes: A Bio-Activity Perspective. *Cells* [Internet]. 2025; 14(7).
11. Idiyatov II, Eroshin AI, Yusupov SA, Tremasova AM, Biryulya VV. Endophytic bacteria antagonists of the micromycete *Aspergillus flavus*: the prospect of improving the quality of food raw materials and food products. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2022;949(1):012072.
12. Kazemeini F, Asri Y, Mostafavi G, Kalvandi R, Mehregan I. RAPD-based evaluation of genetic diversity among populations of the Iranian endemic species *Rhabdosciadium aucheri* Boiss. (Apiaceae). *Mol Biol Rep*. 2020;47(12):9345-52.
13. Zamani N, Akhavan Sepahi A, Fazeli MR, Shariatmadari F. Isolation and Biochemical and Molecular Identification of *Lactobacilli* from Traditional Dairy in Fars Province and Investigation of Their Probiotic Potential. *Journal of food science and technology(Iran)*. 2022;19(123):41-53.
14. Kim J-S, Seo S-G, Jun B-K, Kim J-W, Kim S-H. Simple and Reliable DNA Extraction Method for the Dark Pigmented Fungus, *Cercospora sojae*. *The Plant Pathology Journal*. 2010;26:289-92.
15. Abell GCJ, and McOrist AL. Assessment of the diversity and stability of faecal bacteria from healthy adults using molecular methods. *Microb Ecol Health Dis*. 2007;19(4):229-40.
16. Tahmasebi H, Dehbashi S, Arabestani MR. New approach to identify colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by high-resolution melting curve analysis assay. *Lett Appl Microbiol*. 2020;70(4):290-9.
17. Manias D, Verma A, Soni DK. 1 - Isolation and characterization of endophytes: Biochemical and molecular approach. In: Kumar A, Singh VK, editors. *Microbial Endophytes*: Woodhead Publishing; 2020. p. 1-14.
18. Woksepp H, Ryberg A, Billström H, Hällgren A, Nilsson LE, Marklund B-I, Olsson-Liljequist B, Schön T. Evaluation of high-resolution melting curve analysis of ligation-mediated real-time PCR, a rapid method for epidemiological typing of ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* Species) pathogens. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4339-42.





Sequencing and Drawing the Phylogenic Tree of Endophytic Bacteria Collected from *Rhabdosciadium Aucheri* by the Sanger Sequencing and Determining their Antifungal Effect

Naqisa Zarei (M.Sc.)¹, Reza Habibipour (Ph.D.)^{2*}

1- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran.

2- Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Hamedan Branch, Islamic Azad University, Hamedan, Iran.

Received: 29 December 2024, Accepted: 7 May 2025

Abstract:

Introduction: The unique properties of endophytic bacteria are not well known. Endophytic bacteria of some plants, such as *Rhabdosciadium aucheri*, may inhibit pathogenic fungi with antimicrobial effects. The purpose of this study is to sequence and draw the phylogenetic tree of *R. aucheri* endophytic bacteria by the Sanger sequence method and determine their antifungal effect.

Methods: In this descriptive-analytical study, plant samples were collected using a random, convenient, and accessible method. The initial identification of endophytic bacteria was performed using the plate culture technique. Molecular detection and sequencing of the bacteria were carried out using optimized PCR methods.

Results: Out of 100 bacterial isolates obtained from *R. aucheri*, the distribution was as follows: *Bacillus pumilus* made up 9% (9 isolates), *Bacillus subtilis* 15% (15 isolates), *Serratia ficaria* 12% (12 isolates), *Bacillus amyloliquefaciens* 14% (14 isolates), *Pantoea agglomerans* 8% (8 isolates), and *Pseudarthrobacter oxydans* 7% (7 isolates). Sequencing analysis indicated that variations among the *Bacillus* species were primarily associated with differences at the cytosine (C) and guanine (G) nucleotide positions. Among the isolates, those belonging to the *Bacillus* genus displayed the most significant inhibitory effect against *Aspergillus niger*.

Conclusion: Our findings indicate that the roots of the *R. aucheri* plant provide a favorable environment for isolating *Bacillus* species with high antimicrobial activity. Among the isolated bacteria, *Bacillus subtilis* exhibited the most potent antifungal effect against pathogenic fungi.

Keywords: Bacillus, Sequencing, Endophytic bacteria, Aspergillus.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: R. Habibipour, Email: habibipour.r@gmail.com

Citation: Zarei N, Habibipour R. Sequencing and drawing the phylogenic tree of endophytic bacteria collected from *rhabdosciadium aucheri* by the sanger sequencing and determining their antifungal effect. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2025;20(2):15-24.

