اثر ژنوتیپ گیاه و مکان جغرافیایی بر روی فراوانی باکتری اندوفیت *متیلوباکتریوم* در میوه دو رقم توت‌فرنگی

محمد اختری، بهمن بهرام‌نژاد[1]، بهروز حریقی و محمد ناجی

دانش‌آموخته ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج؛ **akhtari.m92@gmail.com**

دانشیار بیوتکنولوژی گیاهی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج؛ **b.bahramnejad@uok.ac.ir**

دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج؛ **b.harighi@uok.ac.ir**

دانش‌آموخته ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج؛ **Mohammad.naji72@gmail.com**

دریافت: **98/4/23** و پذیرش: **1400/3/19**

چکیده

اندوفیت به گروهی از میکروارگانیسم ها اطلاق می‌گردد که در قسمتهای داخلی بافت‌های گیاهان زندگی نموده و بر بسیاری از خصوصیات گیاه میزبان تأثیر می‌گذارند. گونه‌های مختلف باکتری اندوفیت *متیلوباکتریوم* در سنتز کاراتنوئیدها، تولید ترکیبات فنولی و فرار، همچنین در افزایش سطح تولید اجزای سازنده عطر و طعم در میوه مؤثر می‌باشند. تنوع و فراوانی این باکتری‌ها تحت تأثیر ژنوتیپ گیاه میزبان، شرایط اقلیمی و خاک می‌باشد. این مطالعه به منظور جداسازی باکتری‌های جنس *متیلوباکتریوم* از دو رقم توت‌فرنگی در مناطق مختلف استان کردستان انجام شد. در این پژوهش باکتری‌های اندوفیت از میوه دو رقم توت‌فرنگی کردستان و پاروس جمع‌آوری شده از سه منطقه انگوژان، گاورود و نشور در استان کردستان جداسازی شدند. شناسایی جدایه های باکتری براساس تعیین توالی ژن 16S rDNA انجام گردید. بدین منظور پس از استخراج DNA ژنومی جدایه‌ها، ژن 16S rDNA به روش PCR تکثیر و پس از تعیین توالی میزان شباهت توالی‌های به دست آمده با توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rDNA سایر باکتری‌های مرجع با استفاده از نرم افزار Blastn محاسبه گردید. سپس جمعیت جدایه‌های باکتری در زمان‌های (مراحل) مختلف رسیدگی میوه تعیین گردید. نتایج به دست آمده نشان داد که باکتری جدا شده در هر دو رقم کردستان و پاروس متعلق به جنس *متیلوباکتریوم* (*Methylobacterium*) می باشد. جمعیت باکتری‌های متیلوباکتریوم در ارقام مورد مطالعه در مناطق مشابه از لحاظ آماری متفاوت بود. رقم کردستان در مقایسه با رقم پاروس، در هر سه منطقه برتری معنی‌داری از لحاظ جمعیت باکتری نشان داد ($p< 0.05$). بیشترین جمعیت باکتری در هر دو رقم و در مناطق جغرافیایی مورد مطالعه در مرحله رسیدگی میوه محاسبه گردید. با توجه به تفاوت دو رقم گیاه از لحاظ عطر و طعم و همچنین تفاوت معنی‌دار جمعیت باکتری احتمال تأثیر این باکتری‌ها در عطر و طعم این دو رقم وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: باکتری اندوفیت، توت‌فرنگی، پاروس، کردستان، *16S rDNA*

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: سنندج، دانشگاه کردستان، دانشکده کشاورزی، گروه زراعت و اصلاح نباتات

مقدمه

توت‌فرنگی[1] متعلق به جنس *Fragaria* از خانواده *Rosaceae* و زیر خانواده *Rosoideae* می‌باشد. توت‌فرنگی‌های کشت شده امروزی حاصل تلاقی *Fragaria × ananassa*، با عدد کروموزومی $n = 8\ x = 56$ 2 اکتاپلوئید می‌باشند (ایگر، 2019). سطح زیر کشت و تولید جهانی توت‌فرنگی در 35 سال اخیر دائماً در حال افزایش بوده است (سیمپسون، 2018). میوه توت‌فرنگی دارای ترکیبات متابولیتی متنوعی است که بر روی بهبود و حفظ سلامتی انسان تاثیر دارند. توت‌فرنگی منبع خوبی برای فیبر، ویتامین‌ث، آهن، پتاسیم، کلسیم، آهن و فسفر است (هینونن و همکاران، 1998).

باکتری‌های اندوفیت به عنوان باکتری‌های مفیدی شناخته شده‌اند که به طور فعال رابطه طولانی مدت با گیاه میزبان دارند و در اندام‌های مختلف از جمله ریشه، ساقه، برگ، بذر، غده و در برخی موارد در گل و میوه یافت می‌شوند (کواد- هالمان و همکاران، 1997). باکتری‌های اندوفیت باعث القاً مقاومت در گیاهان در برابر برخی تنش‌ها مانند کم‌آبی، شوری، کمبود مواد غذایی و حتی بعضی بیماری‌ها می‌شوند. این باکتری‌ها در اکثر گونه‌های گیاهی وجود دارند و جنس‌های متنوعی از قبیل *Pseudomonas*، *Bacillus*،*Enterobacter* و *Agrobacterium* را شامل می‌شوند (لودویک و همکاران، 2002). باکتریهای اندوفیت مانند *Acetobacter diazoterophic* و *Herbaspirillium seropedica* با توانایی تثبیت نیتروژن اتمسفری به عنوان تامین کننده این عنصر غذایی در نیشکر شناخته شده‌اند (هورک و همکاران، 2002). افزایش مواد معدنی قابل دسترس گیاه از جمله فسفر و جلوگیری از تولید اتیلن در سطوح بالا نیز توسط این دسته از باکتری‌ها گزارش شده است (کری و همکاران، 2013). امروزه نقش باکتری‌های اندوفیت در تولید متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات دارویی گیاهی با ارزش از جمله آلکالوئیدها، استروئیدها، ترپنوئیدها، ایزوکومارین‌ها، کوئینونها، فلاونوئیدها، فنیل پروپانوئیدها، لیگنانها، پپتیدها، فنولیکها، آلیفاتیکها ثابت شده است (کومارا و همکاران، 2014).

تحقیقات نشان داده است که جمعیت باکتری‌ها در بین گونه‌ها و حتی اندام‌های مختلف گیاهان می‌تواند متفاوت باشد (هالمن و همکاران، 1997). تنوع باکتری-های موجود در خاک می‌تواند بر روی ترکیب اندوفیت-های گیاهی مؤثر باشد (دونبار و همکاران، 2002؛ ترینگ و همکاران، 2005). بعلاوه می‌تواند تحت تأثیر طیف وسیعی از عوامل زیستی و غیرزیستی باشد (باکلی و اشمیت، 2002). برای مثال تأثیر نیچ[2] اکولوژیک (اندوسفر در برابر ریشه)، پستی و بلندی بر جمعیت باکتری‌های اندوفیت صنوبر شرقی (*Populus deltoids*) به اثبات رسیده است (گوتل و همکاران، 2011؛ شاکیا و همکاران، 2013). شرایط محیطی نیز نقش مهمی در تعیین نوع باکتری اندوفیت گیاه میزبان دارد؛ به عنوان مثال، باکتری-های اندوفیت که تحمل گیاه به شوری را موجب می‌شوند معمولاً از گیاهان رشد یافته در خاک‌های شور جداسازی می‌شوند (ردمن و همکاران، 2011).

جنس *متیلوباکتریوم* مهمترین باکتری جداسازی شده از میوه توت‌فرنگی می‌باشد. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که باکتری‌های متعلق به جنس *متیلوباکتریوم* در سنتز ترکیبات آروماتیک مرتبط با عطر و طعم میوه توت‌فرنگی مؤثر می‌باشد؛ به طوری که در حضور و یا عدم حضور آن‌ها سنتز این ترکیبات تحت تأثیر قرار می‌گیرد (زابتاکیس، 1997). مطالعه بر روی ترکیبات معطر در توت‌فرنگی از جمله ترکیب 4 هیدروکسی 2 و 5 دی‌متیل فورانون HDMF[3] نشان می‌دهد که میزان کمی این ترکیب در حضور باکتری اندوفیت افزایش می‌یابد (زابتاکیس و همکاران، 1999؛ کوتسومپوگراس و همکاران، 2006). بررسی و مطالعه مکان‌یابی ژن‌های توت‌فرنگی و ژن‌های

1. *Strawberry*

2. Niche

3. 4-hydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furanone (HDMF)

باکتریایی توسط هیبریداسیون در محل نشان داد که ارتباط مستقیمی بین باکتری اندوفیت و سلول‌های میوه توت‌فرنگی (*Fragaria×ananassa*) وجود دارد. محققین نتیجه‌گیری کردند که حضور این باکتری‌ها میزان تولید ترکیبات معطر در میوه را افزایش می‌دهد. بعلاوه افزایش عطر و طعم نتیجه افزایش بیان ژن‌های مؤثر در سنتز این ترکیبات می‌باشد (ناسوپولو و همکاران، 2014).

فراوانی و تنوع باکتری‌های اندوفیت تحت تأثیر اندام‌های مختلف گیاهی، تنوع خاک و ژنوتیپ گیاهی است. با بررسی باکتری‌های اندوفیت در ارقام مختلف و همچنین مناطق مختلف کشت یک گیاه، می‌توان اطلاعات مفید و مؤثری در مورد تنوع و تراکم این باکتری‌ها به دست آورد. براین اساس هدف از تحقیق حاضر، مقایسه باکتری‌های اندوفیت جنس *متیلوباکتریوم* جداسازی شده از دو رقم توت‌فرنگی کردستان و پاروس در مناطق مختلف استان کردستان و در زمان‌های مختلف رسیدگی میوه بود.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این مطالعه از ارقام توت‌فرنگی زراعی (پاروس و کردستان) استفاده شد. این نمونه‌ها در اردیبهشت ماه سال 94 از مناطق اطراف کامیاران شامل سه منطقه انگوژان با موقعیت جغرافیایی"E (33'05°68 طول،"964N'71°38عرض و m 1476 ارتفاع)، گاورود با موقعیت جغرافیایی ("67E'11 °67 طول، "730N '69°38 عرض و m 1957 ارتفاع) و نشور با موقعیت جغرافیایی ("85E' 04 °65 طول، "937N '81°38 عرض و 1397m ارتفاع) با فاصله زمانی و مکانی متفاوت و در مراحل مختلف رشدی، از میوه‌های رسیده، نیمه رسیده و نارس از هرسه منطقه، نمونه برداری شد. بعد از انجام نمونه-برداری، نمونه‌های گیاهی به آزمایشگاه منتقل گردید و توسط آب معمولی و سپس آب مقطر سترون شستشوی سطحی داده شد. نمونه ها تا زمان جداسازی باکتری در دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

جداسازی باکتری‌های اندوفیت

جداسازی باکتری با روش دی ملو[1] و همکاران (2012) با اندکی تغییر انجام شد. ابتدا میوه‌های توت‌فرنگی جمع‌آوری شده در زیر هود و در شرایط سترون با محلول هیپوکلریت سدیم[2] 0/5 درصد به مدت 1 دقیقه ضد عفونی سطحی گردید و سپس توسط آب مقطر سترون، سه بارشستشو داده شد. هر کدام از نمونه‌ها سپس جداگانه در درون هاون سترون به طور کامل له شدند و پس از گذشت 40 دقیقه، از سوسپانسیون حاصله روی محیط کشت King B کشت داده شد.نمونه‌های کشت داده شده جهت رشد باکتری‌ها در دمای 28 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جهت حصول اطمینان از ضدعفونی سطحی کامل نمونه‌ها، از آب مقطر سترونی که جهت شستشو استفاده شده بود نیز به عنوان شاهد کشت داده شد. کلونی‌های منفرد باکتری رشد یافته بر روی محیط کشت که از نظر رنگ (باکتری‌های صورتی متمایل به قرمز)، شکل و اندازه متفاوت بودند، انتخاب شده و بر روی محیط کشت King B مجدداً خالص سازی گردیدند.

جداسازی DNA باکتری

جداسازی DNA باکتری به روش سالونن[3] و همکاران (2010) با کمی تغییر انجام شد. سلول باکتری در محیط مایع King B به مدت زمان 24 ساعت کشت داده شد و پس از سانتریفوژ نمودن، رسوب حاصله در بافر TE[4] حل و با لیزوزیم تیمار شد. سپس، 40 میکرولیتر سدیم‌پرکلرات[5] 4 مولار، 24 میکرولیتر SDS[6] 10% و 8 میکرولیتر پروتیناز K[7] (از غلظت پایه 20 میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محلول اضافه گردید و به مدت 2 ساعت در 45 درجه سانتی گراد نگهداری گردید. به محلول به دست آمده 2 برابر حجم، اتانول[8] خالص اضافه گشته و به

1. De Melo
2. 15Sodiumhypochlorite
3. Salonen
4. Tris-EDTA Buffer (TE)
5. Sodium perchlorate
6. Sodium dodecyl sulfate
7. Proteinase K
8. Ethanol

مدت 30 دقیقه یا بیشتر در فریزر نگه‌داری وسپس با سرعت 12000g سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصله پس ازخشک شدن در دمای اتاق در 500 میکرولیتر بافر TE حل گردید. DNA به دست آمده دو بار با ترکیب فنل: کلروفورم: ایزوآمیل‌الکل (به ترتیب به نسبت 25 :24 :1) مخلوط شده و در دمای اتاق هم زده شد تا کاملاً یکنواخت گردد. DNA با اضافه نمودن اتانول خالص و استات‌سدیم 3 مولار با اسیدیته 4/8 به مدت یک شب در فریزر رسوب داده شد. ترکیب به مدت 5 دقیقه با 12000g سانتریفیوژ شد و رسوب توسط اتانول 70% شسته شد. رسوب بعد از خشک شدن در بافر TE حاوی ریبونوکلئاز[1] حل گردید.

تکثیر ژن 16S rDNA

برای انجام واکنش PCR به منظور تکثیر ژن 16S rDNA به اندازه تقریبی 1500 جفت باز از آغازگر مستقیم با توالی 5’AGAGTTTGATCATGGCTCAG3’ و آغازگر معکوس با توالی 5’ACGGTTACCTTGTTACGACTT3’ (گیدر، 2009) با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر شرکت بیوراد مدل icycler (Thermal cycler (BioRad; USA)) استفاده گردید. چرخه حرارتی به صورت ذیل صورت گرفت: واسرشت اولیه در دمای 94°C به مدت 5 دقیقه (مرحله اول)، 35-33 چرخه واسرشت سازی در دمای 94°C به مدت 30 ثانیه، اتصال در دمای 52°C به مدت 30 ثانیه، بسط در دمای 72°C به مدت 30 ثانیه (مرحله دوم)، و بسط نهایی در دمای 72°C به مدت 7 دقیقه (مرحله سوم و نهایی).

آنالیز بیوانفورماتیکی و رسم درخت فیلوژنتیکی (تبار زایی)

محصول PCR ابتدا توسط شرکت Bioneer کره‌جنوبی تعیین توالی گردید و توالی‌های به دست آمده توسط نرم افزار BioEdit ویرایش و اصلاح شد. سپس توالی‌ها در پایگاه داده NCBI با استفاده از هم‌ردیفی نوکلئوتیدی (Nucleotide BLAST) مورد جستجو قرار گرفت. توالی نوکلئوتیدی ژن 16S rDNA جدایه‌های استاندارد نزدیک به باکتری جنس *متیلوباکتریوم* از سایت Strain info دریافت شد و آنالیز فیلوژنتیکی بر اساس توالی‌های به دست آمده انجام شود. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MEGA6 و به روش نزدیک‌ترین همسایگی[2] با بوت‌استرپ[3] 1000 رسم شد.

اندازه‌گیری جمعیت باکتری

به منظور اندازه‌گیری تراکم باکتری در دو رقم کردستان و پاروس، نمونه‌های میوه هر سه منطقه انگوژان، گاورود و نشور جهت ضدعفونی سطحی، در هیپوکلریت سدیم 0/5% (جهت از بین بردن باکتری‌های سطحی) به مدت 1 تا 2 دقیقه قرار داده شد و سپس سه مرتبه توسط آب مقطر سترون شستشو انجام شد. یک گرم از قسمت-های مختلف میوه (نارس، نیمه رسیده و رسیده) جدا شده و بعد از له کردن، 50 میکرولیتر از سوسپانسیون[4] تشکیل شده در پتری‌دیش حاوی محیط King B کشت داده شد. نمونه‌ها در دمای 28 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و پس از ظاهر شدن کلونی‌ها شمارش انجام شد. تراکم باکتری براساس تعداد کلنی رشد یافته در یک گرم بافت میوه محاسبه گردید (رونا، 2015). آزمون شامل سه تکرار (شامل سه میوه، سه منطقه، دو رقم و سه تکرار) بود و نتایج توسط برنامه SAS نسخه 9.1 به صورت طرح آشیانه‌ای مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

1. Ribonuclease

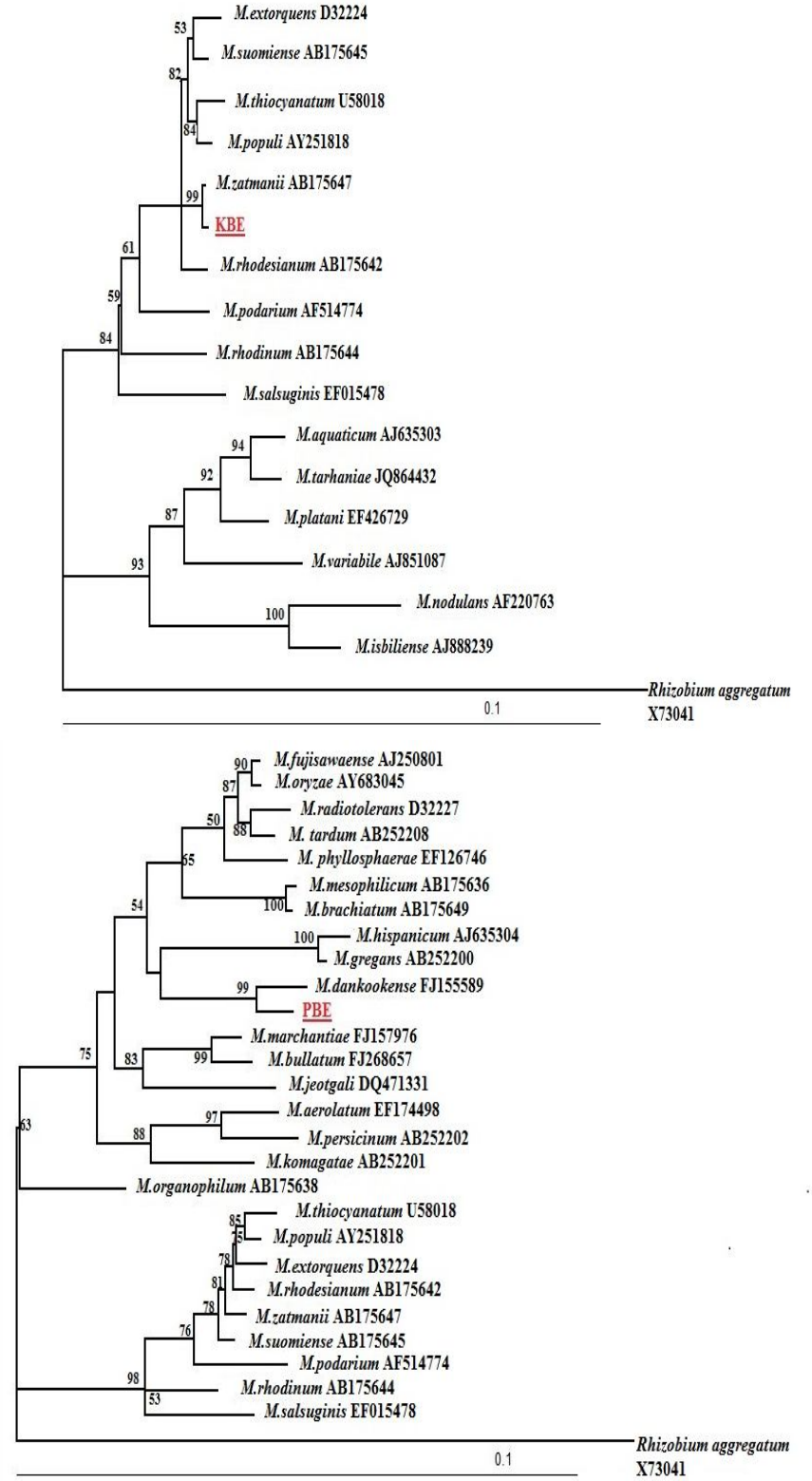
2. Neighbor-joining
3. Bootstrap
4. Suspension

جدول 1- نتیجه بلاست توالی 16S rDNA مربوط به جدایه باکتری جداسازی شده از توت‌فرنگی رقم کردستان

	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Methylorubrum zatmanii strain PSBB041 chromosome, complete genome	2375	11879	100%	0.0	99.54%	CP021054.1
Methylorubrum extorquens strain PSBB040 chromosome, complete genome	2375	11879	100%	0.0	99.54%	CP019322.1
Uncultured bacterium clone BJ201307-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2375	2375	100%	0.0	99.54%	KX508034.1
Methylobacterium extorquens strain IARI-IIWP-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2375	2375	100%	0.0	99.54%	KF572999.1
Methylobacterium zatmanii gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: z15a	2375	2375	100%	0.0	99.54%	KF572997.1
Methylobacterium zatmanii gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: z15a	2375	2375	100%	0.0	99.54%	AB698688.1
Methylobacterium zatmanii gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence, strain: 37d	2375	2375	100%	0.0	99.54%	AB698687.1
Uncultured bacterium clone 16slp87-03h04.p1ka 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2375	2375	100%	0.0	99.54%	FJ512822.1
Methylobacterium sp. 5b.2.1 collection-date 15-Sep-2003 from Germany 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2375	2375	100%	0.0	99.54%	FJ157971.1
Methylobacterium extorquens str. DM4 chromosome, complete genome	2375	11879	100%	0.0	99.54%	FP103042.2

جدول 2- نتیجه بلاست توالی ژن *16S rDNA* مربوط به جدایه های باکتری اندوفیت جداسازی شده از توت‌فرنگی رقم پاروس

	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Methylobacterium sp. PB133 gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: PB133	2348	2348	99%	0.0	99.23%	AB220083.1
Phenanthrene-degrading bacterium M10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2331	2331	99%	0.0	99.00%	AY177363.2
Phenanthrene-degrading bacterium M10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2331	2331	99%	0.0	99.00%	AY177358.2
Methylobacterium sp. DDW-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2326	2326	98%	0.0	99.23%	FJ225120.1
Methylobacterium dankookense strain SW08-7 16S ribosomal RNA, partial sequence	2314	2314	98%	0.0	99.07%	NR_116545.1
Methylobacterium sp. NBCS22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2314	2314	98%	0.0	99.07%	GQ281067.1
Methylobacterium sp. F15 partial 16S rRNA gene, strain F15	2314	2314	98%	0.0	99.07%	AM910533.1
Uncultured bacterium clone BJ201208-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2303	2303	98%	0.0	98.91%	KX507658.1
Uncultured bacterium clone B8-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2303	2303	98%	0.0	98.91%	KF010709.1
Methylobacterium sp. strain CECT 9862 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2302	2302	96%	0.0	99.76%	MN154398.1



شکل 1- دندوگرام حاصل از مقایسه توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن 16S rDNA باکتری های جداسازی شده از توت‌فرنگی رقم کردستان (KBE) و رقم پاروس (PBE) با توالی نوکلئوتیدی سایرگونه‌های جنس *Methylobacterium* که به روش نزدیکترین همسایگی و با بوت-استرپ 1000 توسط نرم‌افزار MEGA6 رسم شده است. *Rhizobium aggregatum* به عنوان فرد برون گروه انتخاب شده است.

نتایج

شناسایی باکتری‌های اندوفیت براساس توالی ژن *16S rDNA*

توالی‌های نوکلئوتیدی حاصل از تعیین توالی *16S rDNA* جدایه‌ها بعد از انجام بلاست (Blastn) در پایگاه داده NCBI باتوجه به درصد یکسانی و E-value با سایر توالی‌های موجود در پایگاه داده مورد بررسی ابتداییقرار گرفت و مشخص شد که دارای بیش‌ترین شباهت به جنس *متیلوباکتریوم* می‌باشد (جدول 1 و 2). آنالیز فیلوژنتیکی براساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rDNA* جدایه‌های مورد مطالعه با سایرگونه‌های متعلق به جنس *متیلوباکتریوم* انجام گردید.

آنالیز فیلوژنتیکی ژن 16S rDNA

رسم درخت فیلوژنتیکی هر دو رقم به صورت جداگانه و با استفاده از توالی‌های استاندارد جنس مورد نظر انجام شد. توالی مورد نظر بیشترین تشابه را در هر دو رقم کردستان و پاروس به ترتیب به گونه‌های *Methylobacterium zatmani* و *M. dankookense* با میزان تشابه 99 درصد داشته و با بوت استرپ 99 جدا شده است (شکل 1).

همچنین در یک درخت سویه های جداشده از هر دو رقم استفاده شدند که نتایج بدست آمده تفاوتی با درخت‌های جداگانه هر کدام از رقم‌ها نداشت. انتخاب فرد برون‌گروه[1] در درخت فیلوژنتیکی بر اساس نزدیکی به جنس مورد نظر می‌باشد، که از یکی از جنس‌های نزدیک به جنس مورد مطالعه استفاده می‌شود تا نشان دهنده تفکیک بهتر جنس مورد مطالعه از جنس نزدیک باشد (شکل 2).

هم‌ردیفی دو سویه جداسازی شده با هم میزان شباهت بالایی را نشان می‌دهد، ولی احتمالاً مربوط به یک گونه نیستند. این تشابه بالای دو سویه جداسازی شده نشان دهنده این است که این توالی‌های نوکلئوتیدی مربوط به جنس *Methylobacterium* می‌باشند که در بررسی درخت فیلوژنتیکی با بوت‌استرپ بالایی در کنار گونه‌های مورد اشاره قرار گرفته‌اند. لازم به ذکر است دو سویه جداسازی شده با وجود آنکه تشابه بالایی با هم داشته و در حد چند نوکلئوتید اختلاف داشتند، مربوط به گونه‌های متفاوتی بودند.

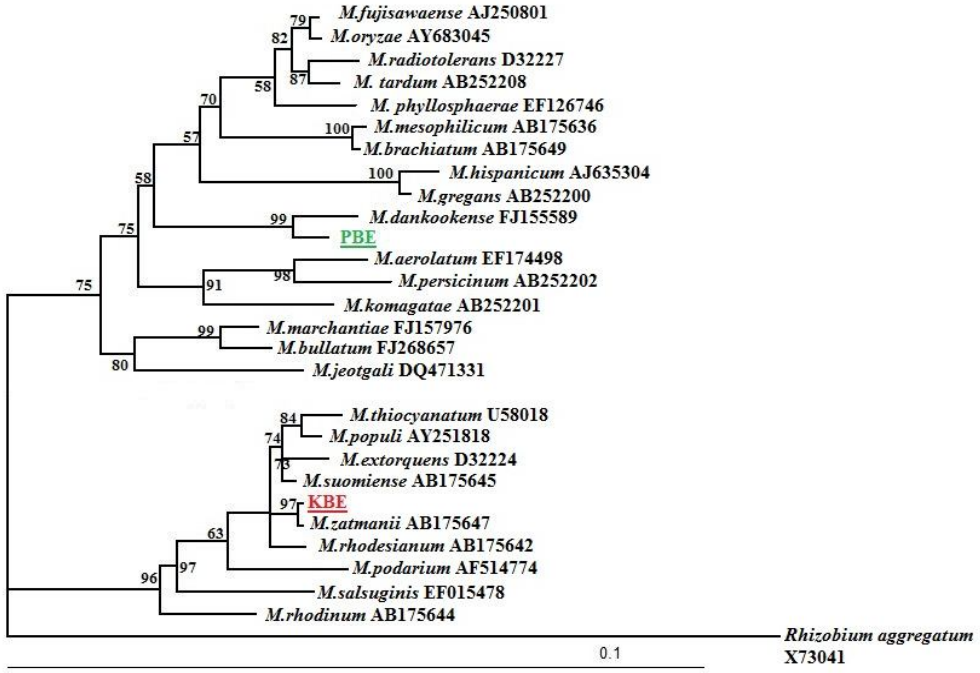
اندازه‌گیری جمعیت باکتری‌های اندوفیت در ارقام پاروس و کردستان

بر اساس نتایج به دست آمده میزان جمعیت باکتری‌های اندوفیت در ارقام پاروس و کردستان در مناطق مختلف از نظر نمونه برداری متفاوت و معنی‌دار ($P < 0.05$) بود. در منطقه نشور در رقم کردستان میزان جمعیت باکتری در مقایسه با سایر مناطق و رقم پاروس تفاوت معنی‌داری نشان داد. همچنین بالاترین جمعیت در هر منطقه مربوط به میوه‌های رسیده بود که جمعیت بالایی در میوه‌های رسیده نسبت به میوه نارس و نیمه رسیده مشاهده شد. نمودار مربوط به منطقه انگوزان (شکل 3) نشان می‌دهد که میزان جمعیت باکتری اندوفیت در میوه رسیده در مقایسه با میوه نارس و نیمه رسیده بالا می‌باشد که این افزایش جمعیت در رقم کردستان در مقایسه با رقم پاروس معنی‌دار می‌باشد. در منطقه گاورود (شکل 3) در میوه‌های رسیده و نیمه رسیده و نارس هر رقم تفاوت معنی‌دار مشاهده گردید؛ ولی در مقایسه دو رقم تفاوتی در میزان جمعیت مشاهده نشد. در نمودار مربوط به منطقه نشور (شکل 3) بالاترین میزان جمعیت در میوه‌های رسیده در رقم کردستان نسبت به پاروس مشاهده شد که میوه‌های نارس و نیمه رسیده نیز در این رقم در مقایسه با پاروس تفاوت معنی‌داری نشان داد (شکل 3).

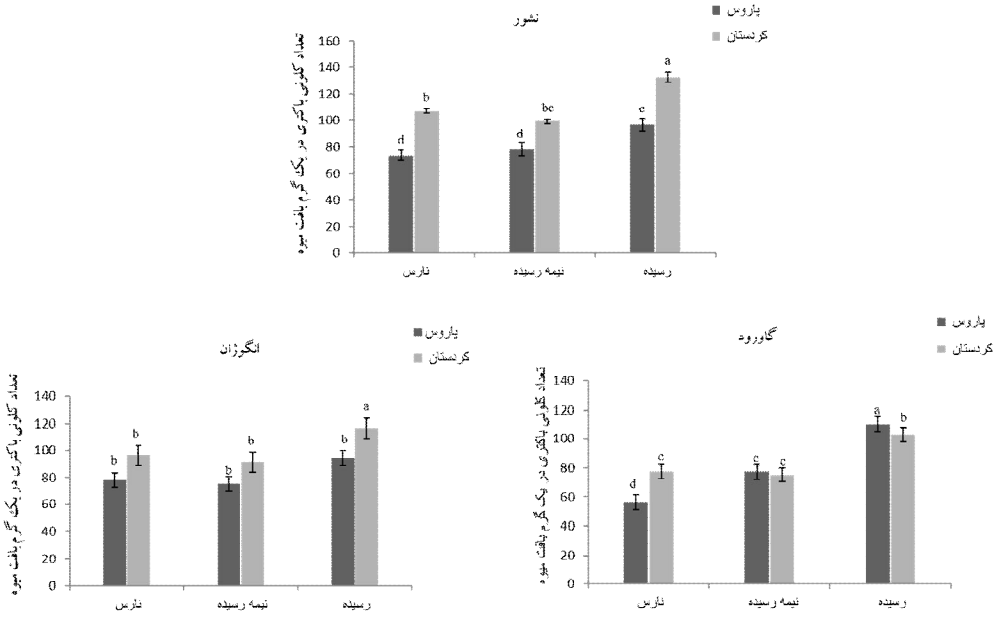
در نمودار مربوط به شکل 5 مشاهده می‌شود که در حالت کلی میزان جمعیت در منطقه نشور در میوه‌های نارس، نیمه رسیده و رسیده در هر دو رقم در مقایسه با سایر مناطق تفاوت معنی‌داری دارد. میزان بالای جمعیت در منطقه نشور مربوط به سایر مناطق به دلیل عوامل زنده و غیر زنده، فاکتورهای مربوط به گیاه و سن گیاه و شرایط دمایی و خاک مناسب و نحوه ورود باکتری به داخل گیاه میزبان بستگی دارد. با این حال میزان جمعیت باکتری اندوفیت توسط بافت گیاهی و شرایط محیطی کنترل می‌شود تا به سطح مناسب از تراکم برسد (برادر و

[1] Outgroup

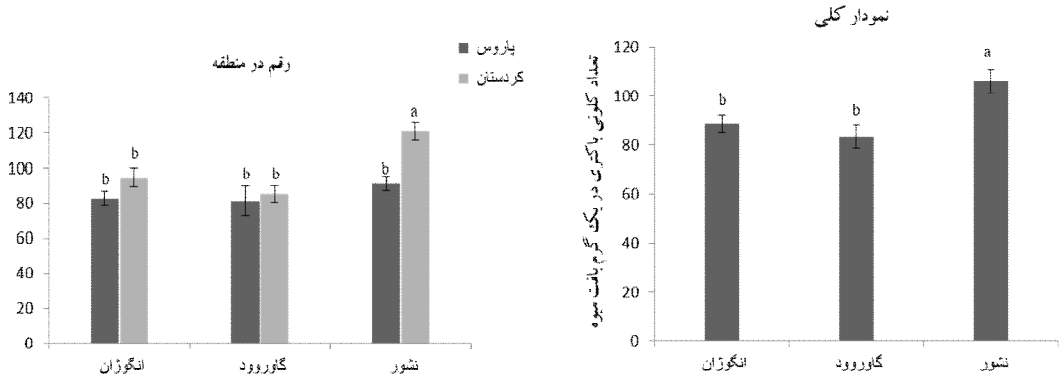
همکاران، 2014). همچنین نمودار کلی(رقم در منطقه) نشان می‌دهد که میزان جمعیت در منطقه نشور در هر دو رقم تفاوت بالایی با سایر مناطق دارد و رقم کردستان نیز جمعیت بالاتری را در مقایسه با رقم پاروس نشان داد ($P < 0.05$) که نتایج طبق نمودارهای زیر قابل مشاهده می‌باشد (شکل 5).



شکل 2- دندوگرام حاصل از مقایسه توالی نوکلئوتیدی بخشی از ژن *16SrDNA* باکتری جداسازی شده از توت‌فرنگی رقم پاروس (PBE) و کردستان (KBE) با سایر توالی‌های نوکلئوتیدی سویه های استاندارد گونه‌های جنس *Methylobacterium* در پایگاه داده strain info که به روش نزدیکترین همسایگی و با بوت‌استرپ 1000 توسط نرم‌افزار MEGA6 رسم شده است. *Rhizobium aggregatum* به عنوان فرد برون گروه انتخاب شده است.



شکل 3- میزان جمعیت باکتری در نمونه های جمع آوری شده از نشور، گاورود و انگوزان برای دو رقم کردستان و پاروس در طی مراحل رسیدگی میوه، حروف متفاوت روی ستون‌ها نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است.



شکل 4- میزان جمعیت باکتری (اثر رقم در منطقه و اثر کلی فاکتورهای رقم، منطقه و بافت میوه) در دو رقم کردستان و پاروس در طی مراحل رسیدگی میوه. حروف متفاوت روی ستون ها نشانه اختلاف معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ است

بحث

در این مطالعه باکتری‌های اندوفیت از میوه دو رقم کردستان و پاروس توت‌فرنگی جداسازی و مورد شناسایی قرار گرفتند. نتایج آنالیز فیلوژنی جدایه‌ها براساس مقایسه توالی نوکلئوتیدی ژن *16S rDNA* نشاندهنده تعلق جدایه‌ها به جنس *متیلوباکتریوم* بود. *متیلوباکتریوم‌ها* در انواع زیادی از گیاهان به صورت اندوفیت وجود دارند (دلموته و همکاران، 2009). جنس *متیلوباکتریوم* در گونه‌های مختلف به شکل صورتی رنگ مشاهده شده است که در سنتز کاراتنوئید[1]ها و تولید ترکیبات آلی مانند متانول، متیل‌آمین، ترکیبات فرار و فنولیکی مؤثر می‌باشد،. مهمترین جنسی که در میوه توت‌فرنگی از این باکتری‌ها جداسازی و شناسایی شده، جنس *متیلوباکتریوم* است. در بررسی انجام شده بر روی این ترکیبات و حضور این باکتری‌ها در توت‌فرنگی مشاهده شده است که این باکتری در سنتز عطر و طعم میوه مؤثر بوده و بر اساس رابطه همزیستی نزدیک با میزبان می‌توانند در سنتز این ترکیبات اثر قابل توجهی داشته باشند؛ به طوری که در حضور و یا عدم حضور آن-ها سنتز این ترکیبات تحت تأثیر قرار می‌گیرد (زاباتسکی، 1997). حضور باکتری‌های اندوفیت در بافت میوه توت فرنگی توسط پروب‌هایی برای ژن های 16SrDNA, الکل دی هیدروژناز و ۵،۲-دی متیل-4-هیدروکسی-H2-فوران-3-وان (DMHF) بصورت همزمان نشان دادکه باکتری‌ها در تولید الکل دی هیدروژناز و DMHF نقش دارند (ناسوپولو و همکاران 2014).

در رقم کردستان میزان تراکم جمعیت به مراتب بالاتر از رقم پاروس در منطقه نشور بوده که به احتمال زیاد وجود مواد غذایی کافی و خاک مناسب جهت رشد باکتری و همچنین کمبود میکروارگانیسم‌های رقیب، شرایط دمایی و وجود آشیان مناسب می‌تواند از عوامل افزایش تراکم جمعیت بالای باکتری در این منطقه نسبت به سایر مناطق باشد (کوکلینسکی- سوبرال و همکاران، 2004). جمعیت بالا در این منطقه نسبت به سایر مناطق به احتمال زیاد مربوط به شرایطی می‌باشد که باکتری توانسته است از لحاظ جمعیتی به تراکم مناسب برسد و این شرایط می‌تواند مربوط به عوامل زنده و غیر زنده و شرایط محیطی و دمایی مناسب جهت رشد و تکامل باکتری باشد (روزنبلوث و مارتینز- رومرو، 2006).

در حالت کلی میزان تراکم در میوه‌های رسیده بالاتر از میوه‌های نارس یا نیمه رسیده بود. این افزایش تراکم در میوه رسیده، به گیاه میزبان و شرایط مناسب جهت رشد و

1. carotenoide

تکثیر باکتری برای رسیدن به سطح تراکم مناسب بستگی دارد، که در میوه‌های رسیده نسبت به میوه‌های نارس و نیمه رسیده در هر منطقه، بیشتر قابل مشاهده بود. در مطالعات انجام شده بر روی باکتری‌های اندوفیت و نقش آن‌ها در عطر و طعم میوه نشان می‌دهد که این باکتری‌ها در میزان افزایش سطح تولید ترکیباتی که در سنتز عطر و طعم دخالت دارند، مؤثر می‌باشند. در واقع باکتری‌های اندوفیت بر اساس یک رابطه همزیستی که با میزبان برقرار می‌کنند، در سنتز ترکیبات طعم دهنده دخالت دارند و باعث افزایش سنتز این ترکیبات شده و بر روی میزان بیان ژن‌های موثر در سنتز این ترکیبات، تأثیر می‌گذارند (زبتاکیس و پیرتیلا، 2012؛ زبتاکیس و همکاران، 1999). در مطالعه‌ای که ناسوپولو و همکاران (2014) انجام دادند، مشاهده شده است که یک رابطه همزیستی قوی بین باکتری‌های اندوفیت و توت‌فرنگی وجود دارد که به‌واسطه حضور آن‌ها میزان تولید ترکیباتی که در عطر و طعم میوه مؤثر می‌باشند، افزایش می‌یابد (ناسوپولو و همکاران، 2014). این نتایج بر اساس مطالعات انجام شده توسط زابتاکیس مورد تأیید می‌باشد که افزایش این ترکیبات به‌واسطه حضور باکتری‌های اندوفیت، سبب افزایش بیان ژن‌های مؤثر در سنتز این ترکیبات می‌باشد (زبتاکیس و پیرتیلا، 2012). *متیلوباکتریوم‌ها* تأثیرات مثبتی بر روی رشد و نیز تولید ترکیبات ثانویه در گیاهان داشته و حتی در تعامل و میانکنش با گیاه می‌توانند بر روی بهبود عطر و طعم نیز موثر واقع شوند (آباندا- نک‌پوات و همکاران، 2006).

متیلوباکتریوم‌ها به عنوان پیش‌ساز فورانون‌ها[1] در توت‌فرنگی گزارش شده‌اند (پیسارنیتسکی و همکاران، 1992). بررسی‌ها تأثیر باکتری‌های اندوفیت *متیلوباکتریوم* بر عطر و طعم توت‌فرنگی را تأیید کرده است. ورجینر[2] و همکاران (2010) اثر مثبت *Methylobacterium extorquens* را بر عطر و طعم توت‌فرنگی به اثبات رسانده‌اند (ورجینر و همکاران، 2010). *متیلوباکتریوم‌ها* در میزبان‌های مختلفی از جمله پنبه (مک‌اینرو و کولپیپر، 1994)، ذرت شیرین (مک‌اینرو و کولپیپر، 1994)، سویا و حتی کاج اسکاتلندی گزارش شده است. در کاج اسکاتلندی *متیلوباکتریوم* با حضور در سلول‌های اپتلیال مجاری رزین مؤثر بر تولید متابولیت‌های ثانویه گزارش شده است (پیرتیلا و همکاران، 2000).

برای بررسی اثرات مستقیم و غیر مستقیم باکتری‌های جنس *متیلوباکتریوم* نیاز به تحقیقات بیشتری وجود دارد. علاوه بر اثرات این باکتری‌ها بر عطر و طعم شاید متابو لیت‌های ثانویه مهم دیگری نیز تولید کنند که هم ارزش تغذیه‌ای و دارویی دارد و هم باعث سازگاری و مقاومت بیشتر توت‌فرنگی بشوند. استفاده از باکتری‌های اندوفیت برای افزایش متابولیت‌های ثانویه در گیاهان بصورت عملی تأثیرگذار بوده است. تلقیح ریزوم زردچوبه با باکتری اندوفیت *Azotobactor chroococcum* CL13 باعث افزایش تولید کورکومین در ریشه این گیاه شده است (کومار و همکاران، 2014). در مطالعه دیگری اسپری برگی باکتری *Stenotrophomonas maltophilia* (N5-18) در گیاه خشخاش باعث افزایش تولید آلکالوئیدها و مخصوصا مورفین شد (بونیلا و همکاران، 2014). به علاوه تلقیح گیاه پروانش (*Catharanthus roseus*) با *باکترهای اندوفیت Staphylococcus sciuri* و *Micrococcus* sp. سبب افزایش تولید متابولیت‌های ضد سرطانی در این گیاه شد (تیواری و همکاران، 2013). یک گونه *متیلوباکتریوم* قادر به تولید گلیوکسیلات می‌باشد که این ماده در تولید مواد معطر و همچنین بعضی از حشره کش‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (شن و وو، 2007). بنابراین احتمالاً بتوان از اسپری باکتری‌های جنس *متیلوباکتریوم* پس از آزمایشات تکمیلی در توت‌فرنگی استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه کردستان به لحاظ تأمین هزینه -های پژوهشی این تحقیق اعلام میدارند

1. Furanones
2. Verginer

فهرست منابع:

1. Abanda-Nkpwatt, D., Müsch, M., Tschiersch, J., Boettner, M. and Schwab, W. 2006. Molecular interaction between Methylobacterium extorquens and seedlings: growth promotion, methanol consumption, and localization of the methanol emission site. Journal of experimental botany 57: 4025-4032.
2. Bonilla, A., Sarria, AL., Algar, E., Muñoz Ledesma, FJ., Ramos Solano, B., Fernandes, JB. and Gutierrez Mañero, FJ. 2014. Microbe associated molecular patterns from rhizosphere bacteria trigger germination and *Papaver somniferum* metabolism under greenhouse conditions. Plant Physiology and Biochemistry 74: 133-40.
3. Brader, G., Compant, S., Mitter, B., Trognitz, F. and Sessitsch, A. 2014. Metabolic potential of endophytic bacteria. Current opinion in biotechnology 27: 30-37.
4. De Melo Pereira, G.V., Magalhaes, K.T., Lorenzetii, E.R., Souza, T.P. and Schwan, R.F. 2012. A multiphasic approach for the identification of endophytic bacterial in strawberry fruit and their potential for plant growth promotion. Microbial ecology 63: 405-417.
5. Delmotte, N., Knief, C., Chaffron, S., Innerebner, G., Roschitzki, B., Schlapbach, R., von Mering, C. and Vorholt, J.A. 2009. Community proteogenomics reveals insights into the physiology of phyllosphere bacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences 106: 16428-16433.
6. Dunbar, J., Barns, S.M., Ticknor, L.O. and Kuske, C.R. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. Applied and Environmental Microbiology 68: 3035–3045.
7. Edger, P.P., Poorten, T.J., VanBuren, R., Hardigan, M.A., Colle, M., McKain, M.R., Smith, R.D., Teresi, S.J., Nelson, A.D., Wai, C.M. and Alger, E.I. 2019. Origin and evolution of the octoploid strawberry genome. Nature Genetics 51: 541–547.
8. Geider, K., Auling, G., Jakovljevic, V. and Völksch, B. 2009. A polyphasic approach assigns the pathogenic Erwinia strains from diseased pear trees in Japan to Erwinia pyrifoliae. Letter of Applied Microbiology 48: 324–330.
9. Gottel, N.R., Castro, H.F., Kerley, M., Yang, Z.M., Pelletier, D.A., Podar, M., Karpinets, T., Uberbacher, E., Tuskan, G.A., Vilgalys, R., Doktycz, M.J., Schadt, C.W. 2011. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. Applied and Environmental Microbiology 77: 5934-5944.
10. Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. Canadian Journal of Microbiology 43: 895–9 14.
11. Hancock, J.F. 2000. 17 Strawberries. Temperate Fruit Crops in Warm Climates 445-455.
12. Heinonen, I.M., Meyer, A.S. and Frankel, E.N. 1998. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46: 4107-4112.
13. Hurek, T., Handley, L.L., Reinhold-Hurek, B. and Piche, Y. 2002. Azoarcus grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. Molecular Plant-Microbe Interaction 15: 233-242.
14. Khan, Z., Guelich, G., Phan, H., Redman, R., Doty, S. 2012. Bacterial and Yeast Endophytes from Poplar and Willow Promote Growth in Crop Plants and Grasses. ISRN Agronomy 2012: 1–11 (doi:10.5402/2012/890280).
15. Knoth, J.L., Kim, S.H., Ettl, G.J. and Doty, S.L. 2013. Effects of cross host species inoculation of nitrogen□fixing endophytes on growth and leaf physiology of maize. Gcb Bioenergy 5: 408-418.
16. Koutsompogeras, P., Kyriacou, A. and Zabetakis, I. 2006. Characterizing NAD-dependent alcohol dehydrogenase enzymes of *Methylobacterium extorquens* and strawberry (*Fragaria*× *ananassa* cv. elsanta). Journal of agricultural and food chemistry 54: 235-242.

17. Krey, T., Vassilev, N., Baum, C. and Eichler-Lobermann, B. 2013. Effects of long- term phosphorus application and plant-growth promoting rhizobacteria on maize phosphorus nutrition under field condition. European Journal of Soil Biology 55: 124-130.
18. Kuklinsky-Sobral, K., Araujo, W.L., Mendonça, C., Geran, L.C., Piskala, A. and Azevedo, J.L. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. Environmental Microbiology 6: 1244-1251.
19. Kumar, A., Singh, R., Giri, DD., Singh, PK. and Pandey, KD. 2014. Effect of *Azotobacter chroococcum* CL13 inoculation on growth and curcumin content of turmeric (*Curcuma longa* L.). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 3: 275–283.
20. Kumara, P. M., Shweta, S., Vasanthakumari, M. M., Sachin, N., Manjunatha, B. L., Jadhav, S. S., Shaanker, R. U. 2014. Endophytes and plant secondary metabolite synthesis: molecular and evolutionary perspective. In Advances in Endophytic Research (pp. 177-190). Springer, New Delhi.
21. Lodewyckx, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E.R., Taghavi, S., Mezgeay, M. and der Lelie, D.V. 2002. Endophytic bacteria and their potential applications. Critical Reviews in Plant Sciences 21: 583-606.
22. McInroy, J.A. and Kloepper, J.W. 1994. and the release of GMOs 19-28.
23. Nasopoulou, C., Pohjanen, J., Koskimaki, J.J., Zabetakis, I. and Pirttila, A.M. 2014. Localization of strawberry (*Fragaria ananassa*) and *Methylobacterium extorquens* genes of strawberry flavor biosynthesis in strawberry tissue by *in situ* hybridization. Journal of Plant Physiology 171: 1099-1105.
24. Pirttilä, A.M., Laukkanen, H., Popsiech, H., Myllyla, R., Hohtola, A. 2000. Detection of intracellular bacteria in the buds of scotch pine (Pinus sylvestris L.) by *in situ* hybridisation. Applied and Environmental Microbiology 66: 3073-3077.
25. Pisarnitskii, A.F., Demechenko, A.G., Egorov, I.A. and Gvelesiani, R.K. 1992. Methylpentoses are probable precursors of furanones in fruits. Applied Biochemistry and Microbiology 28: 97-100.
26. Quadt- Hallmann, A., Benhamou, N. and Kloepper, J.W. 1997. A Bacterial endophtes in cotton: mechanisms of entering the plant. Canadian Journal of Microbiology 43: 577- 582.
27. Redman, R.S., Kim, Y.O., Woodward, C., Greer, C., Espino, L., Doty, S.L., Rodriguez, R.J. 2011. Increased fitness of rice plants to abiotic stress via habitat adapted symbiosis: a strategy for mitigating impacts of climate change. PLoS ONE 6: p.e14823.
28. Rosenblueth, M. and Martinez-Romero, E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. Molecular plant-microbe interactions 19: 827-837.
29. Rovna, K., Bakay, L., Petrova, J., Terentjeva, M., Cerna, J. and Kacaniova, M. 2015. Characterization of endophytic microflora of Rosa canina fruits. Journal of microbiology. Biotechnology and food sciences 4: 65-68.
30. Salonen, A., Nikkila, J., Jalanka-Tuovinen, J., Immonen, O., Rajilic-Stojanovic, M., Kekkonen, R.A. and de Vos, W.M. 2010. Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. Journal of microbiological methods 81: 127-134.
31. Shakya, M., Gottel, N., Castro, H., Yang, Z., Gunter, L., Labbé, J., Muchero, W., Bonito, G., Vilgalys, R., Tuskan, G., Podar, M., Schadt, C.W. 2013. A multifactor analysis of gungal and bacterial community structure in the root microbiome of mature *Populus deltoides* trees. PLOS one 8: p.e76382.
32. Shen P.-H. and Wu B. 2007. Over-expression of a hydroxypyruvate reductase in *Methylobacterium* sp. MB200 enhances glyoxylate accumulation. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 34: 657–663.

33. Siciliano, S.D., Theoret, C.M., De Freitas J.R., Hucl, P.J. and Germida, J.J. 1998. Differences in the microbial communities associated with the roots of different cultivars of canola and wheat. Canadian Journal of Microbiology 44: 844-851.
34. Simpson D. 2018. The Economic Importance of Strawberry Crops. In: Hytönen T., Graham J., Harrison R. (eds) The Genomes of Rosaceous Berries and Their Wild Relatives. Springer, Cham 1-7.
35. Song, C., Hong, X., Zhao, S., Liu, J., Schulenburg, K., Huang, F.C. and Schwab, W. 2016. Glucosylation of 4-hydroxy-2, 5-dimethyl-3 (2H)-furanone, the key strawberry flavor compound in strawberry fruit. Plant physiology 171: 139-151.
36. Sturz, A.V. and Nowak, J. 2000. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Applied soil ecology 15: 183-190.
37. Tiwari, R., Awasthi, A., Mall, M., Shukla, AK., Srinivas, KS., Syamasundar, KV. and Kalra, A. 2013. Bacterial endophyte mediated enhancement of in planta content of key terpenoid indole alkaloids and growth parameters of *Catharanthus roseus*. Industrial Crops Production 43: 306-310.
38. Tringe, S.G., Von Mering, C., Kobayashi, A., Salamov, A.A., Chen, K., Chang, H.W., Podar, M., Short, J.M., Mathur, E.J., Detter, J.C. and Bork, P. 2005. Comparative metagenomics of microbial communities. Science 308: 554-557.
39. Verginer, M., Siegmund, B., Cardinale, M., Müller, H., Choi, Y., Míguez, C.B., Leitner, E. and Berg, G. 2010. Monitoring the plant epiphyte Methylobacterium extorquens DSM 21961 by real-time PCR and its influence on the strawberry flavor. FEMS microbiology ecology 74: 136-145.
40. Zabetakis, I. 1997. Enhancement of flavour biosynthesis from strawberry (*Fragaria* x *ananassa*) callus cultures by *Methylobacterium* species. Plant cell, tissue and organ culture 50: 179–183.
41. Zabetakis, I., Gramshaw, J.W. and Robinson, D.S. 1999. 2, 5-Dimethyl-4-hydroxy-2H-furan-3-one and its derivatives: analysis, synthesis and biosynthesis a review. Food chemistry 65: 139-151.
42. Zabetakis, L. and Pirttila, A.M. 2012. The biosynthesis of strawberry flavor and the role of the endophyte *Methylobacterium extorquens.* COST Action 2012; FA11O3: 82.

Effect of plant genotype and geographical location on the frequency of endophytic Methylobacterium in two strawberry cultivars fruit

M. Akhtari, B. Bahramnejad[1], B. Harighi, and M. Naji

Former Master of Science student of University of Kurdistan; E-mail: akhtari.m92@gmail.com
Associated professor in Plant Biotechnology, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan; E-mail: b.bahramnejad@uok.ac.ir
Associated professor in Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan; E-mail: b.harighi@uok.ac.ir
Former Master of Science student of University of Kurdistan; E-mail: Mohammad.naji72@gmail.com

Received: July, 2019 & Accepted: june, 2021

Abstract

Endophytes are microorganisms (bacteria or fungi or actinomycetes) that reside inside the internal tissues of plant with no negative effect on host plants. Endophytic bacteria trigger many positive effects on host plants. The aroma and flavor of strawberry fruit are important characteristics that is affected by endophytic bacteria such as *Methylobacterium.* Endophytic bacteria, are effective in the synthesis of carotenoids and the production of volatile and phenolic compounds. In addition, they are effective in producing the aromatic components in fruit. Endophytic bacterial frequency and genotype can be affected by host plant genotype, climatic and soil conditions. This study was carried out to isolate endophytic bacteria from two strawberry cultivars (Kurdistan and Parous) in three regions (Angouzan, Gavrood and Noshur) in Kurdistan province. For accurate identification of bacterial isolates, 16S-rRNA gene sequencing was used for identification of purified endophytic isolates and their frequency determined at different times of fruit ripening. The results revealed that the all endophytic bacterial isolates from both cultivars were belong to the genus *Methylobacterium.* The frequency of these bacteria was statistically different in two cultivars and in different sampling time. The frequency of Methylobacterium significantly was higher in Kurdistan cultivar compared to Parous cultivar in all three regions ($p < 0.05$). The highest frequency of *Methylobacterium* was observed in the fruit ripening time. It seems that *Methylobacterium* and its frequency probably have an effect on the aroma and delicacy of these two varieties.

Keywords: Kurdistan, Parous, Endophytic Bacteria, 16SrRNA, Strawberry

[1] Corresponding author: Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj.