

## باکتری‌های همراه بذر چغندرقدند: شناسایی و اثر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذر

### Sugar beet seed-associated bacteria: Identification and their effect on seed germination

میلاذ آئینی<sup>۱</sup> و غلام خداکریمیان<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۸/۰۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۸/۰۶

م. آئینی و غ. خداکریمیان. ۱۳۹۶. باکتری‌های همراه بذر چغندرقدند: شناسایی و اثر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذر. چغندرقدند، ۳۳(۱): ۱۰۳-۱۱۵.

DOI:10.22092/jsb.2017.104600.1111

#### چکیده

بذر چغندرقدند دارای اهمیت ویژه‌ای است زیرا به‌عنوان انتقال‌دهنده باکتری‌های مفید و مضر نقش ایفا می‌کند. جهت شناسایی و تعیین اثر باکتری‌های همراه بذر چغندرقدند بر جوانه‌زنی، بذر بوجاری‌شده و ضدعفونی نشده از بخش تحقیقات چغندرقدند مرکز تحقیقات کشاورزی استان همدان تهیه گردید. در مجموع تعداد ۸۰ استرین اندوفیت و اپی‌فیت از بذر چغندرقدند جداسازی شد. بر پایه الگوی پروتئینی به روش لاملی، تعداد سه الکتروتیپ نماینده انتخاب‌شده و خصوصیات بیوشیمیایی و مولکولی آن‌ها بررسی گردید. بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و تعیین توالی ژن *16S rRNA* استرین‌های نماینده، گونه‌های *Stenotrophomonas rhizophila* و *Pseudomonas geniculata* به‌عنوان گونه‌های اپی‌فیت و گونه *Stenotrophomonas maltophilia* به‌عنوان تنها گونه اندوفیت بذر چغندرقدند شناسایی شدند. جهت انجام آزمون جوانه‌زنی بذر، سه گروه متفاوت از لحاظ تأثیر استرین‌ها بر جوانه‌زنی بذور چغندرقدند ایجاد گردید. با تلقیح پنج استرین نماینده از هر گروه در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار شامل یک پتری دیش با ۱۰ عدد بذر، آزمون جوانه‌زنی بذر انجام شد. بر اساس نتایج، بذور تلقیح شده با استرین‌های نماینده *S. maltophilia*، بیشترین میزان درصد جوانه‌زنی (۹۰ درصد)، سرعت جوانه‌زنی (۱۷۴٪/۰ بر ساعت)، وزن تر ساقه‌چه (۱۰۰ میلی‌گرم) و ریشه‌چه (۱۲۶/۲ میلی‌گرم)، وزن خشک ساقه‌چه (۵۰ میلی‌گرم) و ریشه‌چه (۴۳/۷ میلی‌گرم)، طول ساقه‌چه (۶/۵ سانتی‌متر) و ریشه‌چه (۸ سانتی‌متر) و کم‌ترین میزان یکنواختی بذر (۱۳۸/۷ ساعت) را نسبت به شاهد دارا بودند. بنابراین می‌توان پیشنهاد کرد که به‌منظور بهبود شاخص‌های جوانه‌زنی و رشد گیاهچه تلقیح بذور چغندرقدند با باکتری *S. maltophilia* صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، اپی‌فیت، جوانه‌زنی بذر، چغندرقدند

۱- دانشجوی دوره دکتری گروه گیاهپزشکی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

۲- استاد گروه گیاهپزشکی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران. \* - نویسنده مسئول

## مقدمه

چغندرقد با نام علمی (*Beta vulgaris* L.) متعلق به خانواده *Chenopodiaceae* است. این خانواده دارای حدود ۱۴۰۰ گونه است که در ۱۰۵ جنس قرار گرفته‌اند. اعضای این خانواده دولپه بوده و در طبیعت به صورت علفی یافت می‌شوند. یکی از گونه‌های مهم و اقتصادی در این خانواده چغندرقد است (Watson and Dallwitz 1992). بذر چغندرقد دارای اهمیت ویژه‌ای است زیرا به‌عنوان یک انتقال‌دهنده باکتری‌های مفید و مضر نقش ایفا می‌کند. باکتری‌های همراه با بذر نقش مهمی را در سلامت گیاهان ایفا می‌کنند و همچنین گیاهان مختلف باکتری‌های مختلفی را در بذور خود دارند و این جوامع میکروبی نقش مهمی را در جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهان دارند. باکتری‌هایی که همراه بذر هستند به دو صورت اپی‌فیت و اندوفیت هستند که هر دوی این دو گروه در تکامل میکروبی بذور دارای اهمیت هستند (Johnston-Monje and 2011). Raizad باکتری‌های اندوفیت بذرزاد به‌عنوان منبع مهمی از باکتری‌ها برای سایر بافت‌های گیاهان به شمار می‌روند (Lucero et al. 2011). باکتری‌های اندوفیت بذرزاد دارای اهمیت ویژه‌ای در گیاهان هستند زیرا از نسلی به نسل دیگر انتقال می‌یابند (Rudgers et al. 2009). علی‌رغم تحقیقات گسترده‌ای که در مورد باکتری‌های اندوفیت بذر انجام شده است، باکتری‌های اپی‌فیت مرتبط با بذر کم‌تر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Rastogi et al. 2012). باکتری‌های همراه بذر ممکن است دارای اثرات مخربی مانند بازداری از جوانه‌زنی و یا اثرات مفیدی مانند القای جوانه‌زنی داشته باشند (Kremer 1987).

ظهور سریع و یکنواخت گیاهچه‌ها در مزرعه از جمله عوامل در استقرار و حصول تراکم بوته مطلوب برای دستیابی به

عملکرد کمی و کیفی بالقوه گیاهان زراعی است. در حال حاضر، تقویت زیستی بذر با به‌کارگیری باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه از جمله کارآمدترین روش‌های پرایمینگ بذر بوده و در حال جایگزینی تدریجی با تیمارهای شیمیایی است (Bashan et al. 2004). پرایمینگ بذر به‌طور بسیار گسترده‌ای در تجارت استفاده شده است که جوانه‌زنی مطلوب و در پی آن استقرار مناسب محصول و محصول سبز یکنواخت در مزرعه را به دنبال دارد (Halmer 2003). امروزه تحقیقات انجام شده در مورد تأثیر پیش تیمار باکتریایی بذور گیاهان زراعی بر عملکرد و اجزای آن متعدد است. این امر در حالی است که به‌ندرت به نقش این باکتری‌ها در بهبود ویژگی‌های جوانه‌زنی و استقرار بهتر گیاهچه پرداخته شده است. در این راستا مشاهده گردید تلقیح بذور ذرت با باکتری‌های محرک رشد باعث افزایش جوانه‌زنی بذور و ظهور گیاهچه شده است (Nezarat and Gholami 2009). همچنین تلقیح سویا با *Rhizobium japonicum* و *Pseudomonas* sp جوانه‌زنی و ایستادگی گیاهچه را بهبود بخشید (Zaidi 2003). هدف از تحقیق حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های اپی‌فیت و اندوفیت مرتبط با بذر چغندرقد و همچنین اثر این باکتری‌ها بر روی جوانه‌زنی بذور چغندرقد است.

## مواد و روش‌ها

### جداسازی

برای انجام این پژوهش، از بخش چغندرقد مرکز تحقیقات کشاورزی واقع در استان همدان، بذر بوجاری شده و ضدعفونی نشده رقم اکباتان تهیه شد. برای جداسازی باکتری‌های اندوفیت از بذر ابتدا با آب سطحی اندام موردنظر را

در حمام بن ماری (دمای جوش) قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از برداشت لایه رویی، نصف حجم به آن گلیسرین سترون اضافه شد و به‌عنوان پروتئین باکتری در چاهک‌های ژل مورد استفاده قرار گرفتند. الکتروفورز پروتئین استخراج شده در ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) تخت عمودی بر مبنای روش اصلاح شده لاملی انجام شد (Laemli 1970). در این روش از ژل جداکننده ۱۴ درصد و ژل متراکم کننده پنج درصد استفاده گردید. بعد از تهیه ژل ۴۰ میکرولیتر از هر نمونه در چاهک‌های ژل قرار داده شد و الکتروفورز به کمک جریان ۸۰ ولتی تا رسیدن ماده رنگی به ابتدای ژل جداکننده و سپس ۱۰۰ ولت و آمپر ثابت در بافر تانک تریس - گلیسین (۳.۲ گرم تریس، ۱۴.۴ گرم گلیسین، ۱ گرم SDS) به حجم نهایی یک لیتر با  $\text{pH} = 8.3$  انجام شد (Paradis 1994). رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری: بعد از اتمام الکتروفورز، ژل را در محلول رنگ ۰/۱ درصد کوماسی بلو آر-۲۵۰ در متانول، آب و اسید استیک به نسبت حجمی ۱:۵:۵ به مدت حداقل دو ساعت رنگ‌آمیزی گردید. سپس در همان محلول (بدون کوماسی بلو) رنگ‌بری شد. در نهایت الگوهای پروتئینی به‌صورت چشمی با همدیگر مقایسه گردیدند. جهت نگه‌داری ژل‌ها از اسید استیک پنج درصد استفاده شد.

#### آزمون‌های بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی

جهت تشخیص گونه آزمون‌های بیوشیمیایی نظیر آزمون گرم، کاتالاز، هوازی اجباری، تخمیر گلوکوز و لاکتوز، تولید اندول، اکسیداز، آرژنین دهیدرولاز، رشد در دمای ۴ و ۴۱ درجه سانتی‌گراد، رشد در حضور نمک ۵ درصد (NaCl) و لسیتیناز بر اساس روش‌های استاندارد باکتری‌شناسی و کلیدهای معتبر

شسته و با اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس با محلول سدیم هیپوکلرایت سه درصد به مدت پنج دقیقه ضدعفونی سطحی شده و با آب مقطر استریل شستشوی سطحی شد. پس از آن، بذور ضدعفونی سطحی شده در داخل محلول فسفات ۱۰ درصد له شد. پس از گذشت ۳۰ تا ۶۰ دقیقه قطراتی از سوسپانسیون موردنظر را در محیط کشت آگار مغزی دارای ۳ گرم در لیتر عصاره مخمر کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جهت جداسازی باکتری‌های اپی‌فیت نیز بذر ضدعفونی نشده چغندر قند در محلول آب استریل حاوی ۱ درصد ژلاتین قرار داده شده و پس از گذشت زمان ۳۰ الی ۴۵ دقیقه سوسپانسیون حاوی باکتری را در محیط آگار مغزی دارای ۳ گرم در لیتر عصاره مخمر کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از رشد کلنی‌های باکتریایی برحسب شکل ظاهری و رنگ کلنی از هر نمونه در هر پتری‌دیش تعداد ۲ تا ۳ کلنی انتخاب و روی محیط کشت مزبور خالص شد. برای انتخاب نماینده استرین‌های باکتریایی ابتدا پروتئین‌های محلول سلولی استخراج و به روش ناپیوسته لاملی الکتروفورز شدند.

#### الکتروفورز پروتئین‌های سلولی

برای انتخاب نماینده استرین‌های باکتریایی ابتدا پروتئین‌های محلول سلولی استخراج و به روش ناپیوسته لاملی الکتروفورز شدند. جدایه‌ها روی محیط آگار مغزی کشت شده و بعد از ۲۴ ساعت سوسپانسیونی از آن‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر تهیه و چگالی نوری آن‌ها به یک واحد (Optical Density) OD در ۶۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر تنظیم گردید. به‌منظور لیز شدن سلول‌ها، به‌اندازه یک‌دهم حجم سدیم دو دسیل سولفات (SDS) ۱۰ درصد به هر سوسپانسیون اضافه شد و به مدت ۴ الی ۵ دقیقه

در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه، اتصال در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه و بسط در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه بود که با یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه خاتمه یافت. برای اطمینان از اندازه صحیح قطعه تکثیر شده از الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد استفاده شد. جهت تعیین توالی این بخش از ژنوم، محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس حاصل از جفت آغازگرهای مورد استفاده به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. برای ترسیم درخت فیلوژنتیکی بر اساس توالی ژن *16S rRNA* از روش اتصال مجاور (neighbour-joining) و نرم‌افزار MEGA نسخه ۷ استفاده شد.

### آزمون جوانه‌زنی بذر

قبل از انجام آزمایش جوانه‌زنی بذر جهت عاری ساختن بذور از میکروارگانیسم‌های اپی‌فیت و اندوفیت، ابتدا تمامی بذور توسط محلول سدیم هیپوکلرایت سه درصد ضد عفونی سطحی و سپس تیمار گرمایی شدند. به این صورت که ابتدا بذور به مدت پنج دقیقه در محلول سدیم هیپوکلرایت سه درصد قرار گرفته پس از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل در ظرف محتوی آب مقطر استریل به آرامی و با دقت تا آستانه تحمل بذور (۵۵ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه حمام آب (بن ماری) تیمار گرمایی شدند (Grondeau *et al.* 2011). جهت گروه‌بندی استرین‌های همراه بذر چغندر قند از لحاظ تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذور، در ابتدا تمامی استرین‌ها بر روی بذور چغندر قند رقم اکباتان عاری از میکروارگانیسم آزمایش شدند. نحوه انجام این گروه‌بندی بدین صورت بود که ابتدا هر استرین بر روی ۱۰ بذر در داخل هر پتری‌دیش تلقیح شده و به صورت چشمی تمامی

باکتری‌شناسی (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) صورت پذیرفت (Wolf *et al.* 2002; Bergey *et al.* 1994; Schaad *et al.* 2001; Fahy and Persley 1983).

به منظور شناسایی و تأیید نهایی جدایه‌ها، روش PCR ژن *16S rRNA* به کار گرفته شد. از آغازگرهای عمومی (5'-fD1 CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3') و (5'-rD1 CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCA GCC-3') برای تکثیر توالی ژن *16S rRNA* استفاده شد (Weisburg *et al.* 1991). تکثیر ژن *16S rRNA* با استفاده از واکنش PCR با حجم نهایی ۵۰ میکرو لیتر برای هر مخلوط واکنش انجام شد. یک لوپ از پرگنه‌های باکتری روی محیط-کشت آگار مغذی (NA) برداشته شد و در ۵۰۰ میکرو لیتر آب مقطر سترون حل گردید. به منظور استخراج DNA، نمونه‌ها در یک ظرف حاوی آب جوش به مدت ۱۰ دقیقه جوشانده و بلافاصله به مدت چند دقیقه روی یخ قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت سه دقیقه سانتریفیوژ و از فاز رویی برای انجام آزمون PCR استفاده گردید. مواد لازم برای انجام واکنش PCR در حجم ۵۰ میکرو لیتر عبارت‌اند از:

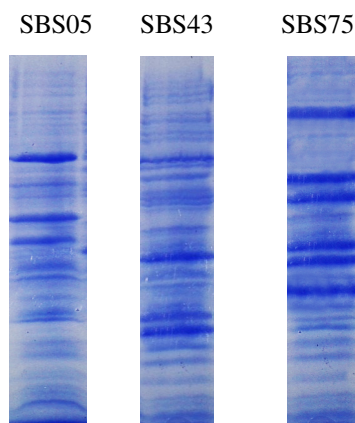
پنج میکرو لیتر بافر واکنش (PCR buffer 10X)، ۳ میکرو لیتر منیزیم کلراید (۲/۵ mM)، یک میکرو لیتر dNTPs (۱۰ mM)، ۰/۵ میکرو لیتر آنزیم تک پلی‌مراس (۱۰ U/μl)، ۲ میکرو لیتر آغازگر رفت (۱۰ μM)، ۲ میکرو لیتر آغازگر برگشت (۱۰ μM)، ۶ میکرو لیتر DNA و ۳۰/۵ میکرو لیتر آب سترون. چرخه‌های حرارتی شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی

Excel ویرایش و برای تجزیه و تحلیل آماری آماده شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS صورت گرفت. طرح آماری استفاده شده، طرح کاملاً تصادفی بوده و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD با سطح احتمال خطای آلفا برابر ۰/۰۵ درصد انجام شد.

### نتایج و بحث

تعداد ۲۵ جدایه اندوفیت و ۵۵ جدایه اپی‌فیت از بذر چغندر قند تهیه شده از مرکز تحقیقات چغندر قند همدان، جداسازی شد. الگوی الکتروفورز پروتئینی SDS\_PAGE با نتایج ژنوتیپی ارتباط بسیار نزدیکی دارد به طوری که این روش برای گروه‌بندی سریع باکتری‌ها روش بسیار مؤثری است (Vauterin *et al.* 1990). گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس الگوی الکتروفورز پروتئینی انجام پذیرفت. به این صورت که الگوهای پروتئینی مشابه در یک گروه قرار گرفتند. الکتروتیپ پروتئینی به عنوان گروهی از استرین‌ها با الگوی پروتئینی تقریباً مشابه در نظر گرفته شد. در نهایت سه الکتروتیپ اصلی و متفاوت تشخیص داده شده و هر الکتروتیپ به عنوان نماینده گروه جهت شناسایی گونه انتخاب گردید (شکل ۱). الکتروتیپ SBS05 شامل ۲۵ جدایه بود که از ناحیه اندوفیت بذر جداسازی شده بود و به عنوان نماینده این گروه انتخاب گردید. الکتروتیپ‌های SBS43 و SBS75 نیز به ترتیب جدایه‌های متعلق به اپی‌فیت بذر بودند که هر گروه به ترتیب شامل ۳۰ و ۲۵ جدایه بودند. یک استرین متعلق به هر الکتروتیپ جهت انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی انتخاب شدند (جدول ۱).

پتری‌دیش‌ها باهم مقایسه شدند و نمره دهی شدند (۰-۱۰). در نهایت گروه‌های متفاوت بر اساس تأثیر جوانه‌زنی این باکتری‌ها بر بذور چغندر قند، ایجاد شد. از هر یک از گروه‌ها نیز پنج استرین نماینده انتخاب گردید و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار شامل یک پتری‌دیش با ۱۰ عدد بذر تلقیح شدند. برای پرایمینگ بذرها میزان هفت گرم مایه تلقیح که هر گرم آن دارای  $10^7$  عدد باکتری زنده و فعال است، استفاده گردید. همچنین از کربوکسی متیل سلولز برای چسبندگی بهتر مایه تلقیح به بذرها استفاده شد. در تیمار شاهد نیز از آب مقطر استریل جهت مایه‌زنی به بذور ضد عفونی شده استفاده گردید. ابتدا در کف هر پتری‌دیش کاغذ صافی قرار گرفت. سپس تعداد ده عدد از بذره‌های تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد در پتری‌دیش قرار داده شده و کاغذ صافی دیگری با همان ابعاد روی بذرها قرار داده شد. شمارش بذره‌های جوانه‌زده در فواصل زمانی ۲۴ ساعت انجام گرفت. قابل ذکر است که در هنگام شمارش، بذرهایی جوانه‌زده تلقی شدند که طول ریشه‌چه آن‌ها حداقل دو میلی‌متر بود. شمارش تا زمانی ادامه یافت که برای مدت سه روز متوالی تعداد بذره‌های جوانه‌زده در هر نمونه ثابت بماند. برخی پارامترها اعم از طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه و وزن خشک ساقه‌چه اندازه‌گیری شدند. برای ارزیابی اجزای جوانه‌زنی، منحنی پیشرفت درصد جوانه‌زنی تجمعی در مقابل زمان از کاشت بذرها (برحسب ساعت) ترسیم شد و سپس از این منحنی‌ها، حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و میزان یکنواختی جوانه‌زنی با استفاده از روش درون‌یابی خطی با استفاده از نرم‌افزار Germin محاسبه شد (Soltani *et al.* 2001). کلیه داده‌های جمع‌آوری شده در طول آزمایش با استفاده از نرم‌افزار



شکل ۱ نقش الکتروفورزی الکتروتیپ‌های نماینده

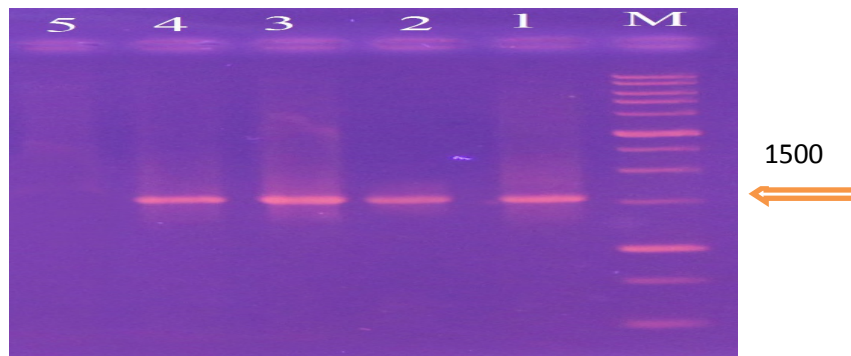
جدول ۱ نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی استرین‌های نماینده

الکتروتیپ نماینده			نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی
SBS75	SBS43	SBS05	
-	-	-	آزمون گرم
+	+	+	هوازی اجباری
+	+	+	کاتالاز
-	-	-	تولید اندول
+	+	+	سیترات
-	-	-	متیل رد
-	-	-	تخمیر گلوکز
-	-	-	تخمیر لاکتوز
+	-	-	اکسیداز
+	+	-	رشد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد
+	-	+	رشد در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد
+	-	-	آرژنین دهیدرولاز
-	-	+	لیستیناز
+	-	+	رشد در حضور NaCl ۵ درصد
<i>Pseudomonas geniculata</i>	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	نتایج مولکولی
			شناسایی مولکولی بر اساس توالی یابی ژن <i>16S rRNA</i> و مقایسه با NCBI

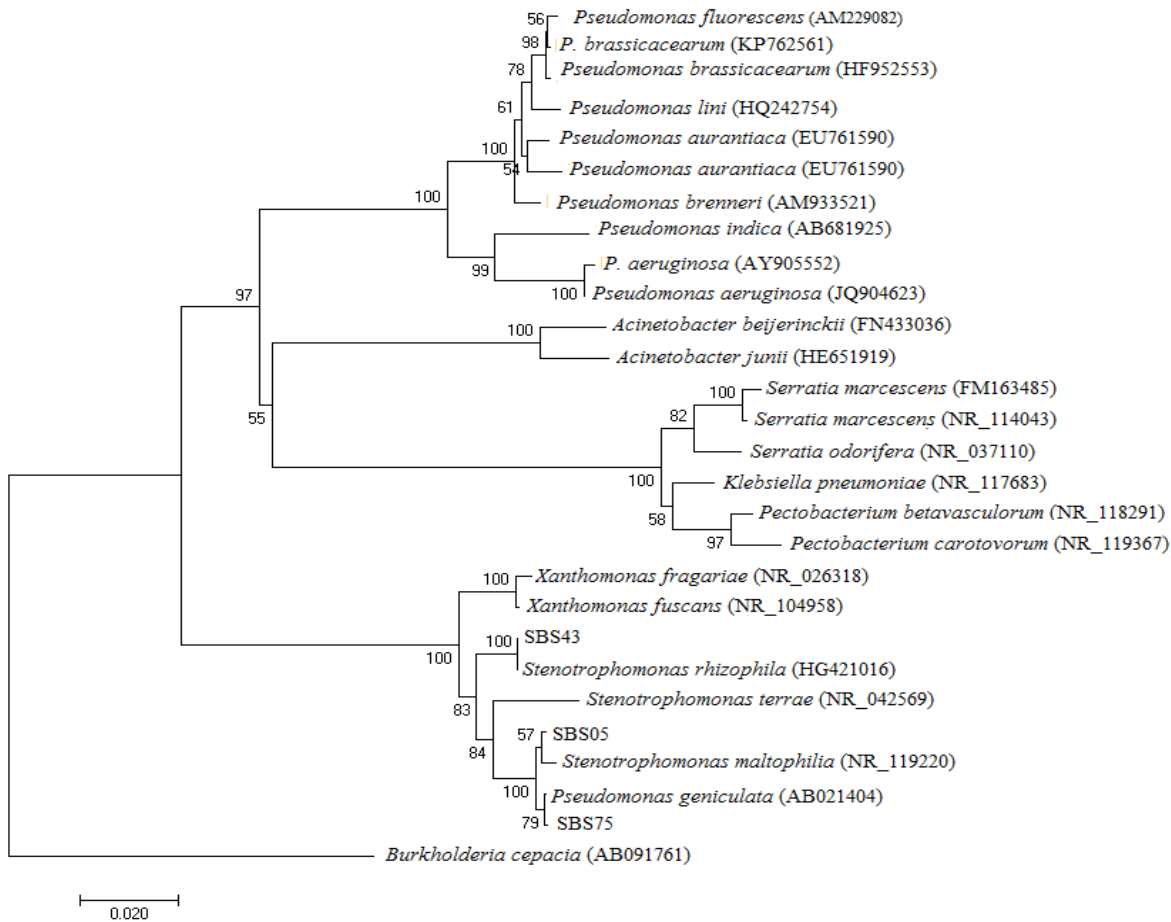
علامت + بیانگر مثبت بودن واکنش و - بیانگر عدم واکنش است.

به‌عنوان اندوفیت و *Stenotrophomonas rhizophila* و *Pseudomonas geniculata* به‌عنوان دو گونه باکتریایی غالب اپیفیت بذور چغندر قند تعیین شدند. پس از توالی‌یابی نمونه‌ها و مقایسه آن‌ها با بانک داده‌های NCBI، درخت فیلوژنی بر پایه ژن *16S rRNA* رسم شد (شکل ۳).

جدایه‌های نماینده هر سه گروه قطعه قابل‌انتظار ۱۵۰۰ جفت بازی را تکثیر نمودند (شکل ۲). شناسایی استرین‌های نماینده بر پایه آزمون‌های بیوشیمیایی و توالی‌یابی ژن *16S rRNA* صورت پذیرفت. بر پایه آزمون‌های بیوشیمیایی و تکثیر و توالی‌یابی ژن *16S rRNA* و مقایسه آن‌ها با بانک داده‌های NCBI، گونه‌های *Stenotrophomonas maltophilia*



شکل ۲ نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آغازگر عمومی fD1 و rD1. به ترتیب لاین M: مارکر 1kb، SBS05، 1: SBS43، 2: SBS43، 3: SBS75، 4: کنترل مثبت (*Pseudomonas syringae*) و 5: به عنوان کنترل منفی است.



شکل ۳ درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس مقایسه توالی ژن *16S rRNA* استرین های بذر چغندر قند با سایر باکتری های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم افزار MEGA 7. استرین های نماینده با حروف SBS43، SBS05، SBS75 مشخص شده اند.

*S. maltophilia* می‌تواند بذر زراد و دارای زندگی اندوفیتی داخل بذر و گیاه باشد (Berg et al. 2010) که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. این باکتری به صورت اندوفیت در بذر برنج گزارش شده است (Hordoim et al. 2014). *Pseudomonas geniculata* توانایی تجزیه نیکوتین را دارد و تاکنون بر روی چغندر قند گزارش نشده است. همچنین گونه *S. rhizophila* تاکنون از بذر چغندر قند گزارش نشده است. در این تحقیق میانگین مؤلفه‌های جوانه‌زنی بذور چغندر قند در اثر تلقیح با باکتری‌های جدا شده از بذر اندازه‌گیری شد. با تلقیح تمامی استرین‌های جدا شده بر روی بذر، استرین‌ها در سه گروه، استرین‌های با اثر مثبت بر جوانه‌زنی بذر، بدون تأثیر بر جوانه‌زنی بذر و نهایتاً با تأثیر منفی بر جوانه‌زنی بذر به صورت چشمی قرار گرفتند (جدول ۲).

جنس *Stenotrophomonas* نیز نخستین بار همراه با *Pseudoxanthomonas maltophila* در سال ۱۹۶۱ معرفی شده است. این باکتری‌ها گرم منفی میله‌ای شکل با مقدار C+G بالا در DNA هستند. تاکنون هشت گونه *Stenotrophomonas* شناسایی شده است (Hayward et al. 2010). اگرچه *Stenotrophomonas* به فراوانی در محیط یافت می‌شود، اما خاک و گیاه از منابع اصلی محیطی آنان است. *S. maltophilia* که گونه معمول و غالب جوامع میکروبی است بر روی و یا داخل گیاهان یافت می‌شود و دارای پراکنش جهانی است (Denton and Kerr 1990). اعضای جنس استنتروفوموناس در چرخه نیتروژن و گوگرد بسیار مهم می‌باشند و بعضی از گونه‌های جنس استنتروفوموناس مانند *S. maltophilia* و *S. rhizophila* دارای اثرات مفیدی بر روی گیاهان است (Park et al. 2008; Banerjee et al. 2002).

**جدول ۲** گروه‌بندی اولیه استرین‌ها بر اساس تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذر چغندر قند (استرین‌های متعلق به گونه *S. maltophilia* با نماد Sm1-25 و *S. rhizophila* با نماد Sr1-25 و *P. geniculata* با نماد Sp1-30 کدگذاری شده‌اند)

تأثیر استرین‌ها بر جوانه‌زنی بذر چغندر قند (۱۰-۰)	استرین‌های گروه
استرین‌های دارای تأثیر مثبت بر جوانه‌زنی بذر (۱۰-۷)	Sm1, sm2, sm3, sm4, sm5, sm6, sm7, sm8, sm9, sm10, sm11, sm12, sm13, sm14, sm15, sm16, sm17, sm18, sm19, sm20, sm21, sm22, sm23, sm24, sm25
استرین‌های دارای اثر خنثی بر جوانه‌زنی بذر (۷-۵)	Sr1, sr2, sr3, sr4, sr5, sr6, sr7, sr8, sr9, sr10, sr11, sr12, sr13, sr14, sr15, sr16, sr17, sr18, sr19, sr20, sr21, sr22, sr23, sr24, sr25
استرین‌های دارای تأثیر منفی بر جوانه‌زنی بذر (۵-۰)	Sp1, sp2, sp3, sp4, sp5, sp6, sp7, sp8, sp9, sp10, sp11, sp12, sp13, sp14, sp15, sp16, sp17, sp18, sp19, sp20, sp21, sp22, sp23, sp24, sp25, sp26, sp27, sp28, sp29, sp30

افزایش درصد جوانه‌زنی بذور چغندر قند در مقایسه با شاهد گردید ( $P < 0.05$ ). در حالی که استرین‌های گونه *P. geniculata*، سبب کاهش معنی‌دار و چشم‌گیر درصد جوانه‌زنی بذور در مقایسه با

از هریک از گروه‌ها پنج استرین نماینده جهت بررسی خصوصیات جوانه‌زنی بر بذر چغندر قند انتخاب گردید (جدول ۳). تلقیح استرین‌های نماینده متعلق به گونه *S. maltophilia* سبب



تیمارها بیشترین تفاوت معنی دار را پیدا کرد، درحالی که در سایر استرین‌های نماینده متعلق به سایر گونه‌ها تفاوت معناداری را نسبت به شاهد در سرعت جوانه‌زنی بذور چغندر قند نشان ندادند.

شاهد گردید. تلقیح بذور با استرین‌های گونه *S. rhizophila* اثر معنی‌داری بر افزایش درصد جوانه‌زنی نداشت ( $P > 0.05$ ). سرعت جوانه‌زنی در اثر تلقیح بذور با استرین Sm9 متعلق به گونه *S. maltophilia* به میزان ۰/۰۱۷۴ در ساعت نسبت به شاهد و بقیه

جدول ۳ مقایسه میانگین مؤلفه‌های جوانه‌زنی بذور چغندر قند در اثر تلقیح با باکتری‌های جدا شده از بذر

جدایه باکتری	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	یکنواختی جوانه‌زنی	وزن تر ساقه‌چه (میلی‌گرم)	وزن تر ریشه‌چه (میلی‌گرم)	وزن خشک ساقه‌چه (میلی‌گرم)	وزن خشک ریشه‌چه (میلی‌گرم)	طول ساقه‌چه (سانتی‌متر)	طول ریشه‌چه (سانتی‌متر)
Sm5	۸۵*	۰/۰۱۴*	۱۵۱/۴*	۸۸/۵*	۱۰۹/۲*	۴۰/۵*	۳۹/۵*	۵/۹*	۸*
Sm9	۸۵*	۰/۰۱۷۴*	۱۵۳/۷*	۹۳/۷*	۱۰۳/۷*	۴۰/۵*	۳۸*	۵/۲*	۷/۲*
Sm12	۹۰*	۰/۰۱۳۸*	۱۳۸/۷*	۱۰۰*	۱۱۲/۵*	۵۰*	۴۳/۷*	۶/۵*	۷/۳*
Sm21	۸۲/۵*	۰/۰۱۴۴*	۱۵۲*	۹۳/۷*	۱۰۳/۷*	۴۱/۷*	۴۱/۷*	۵/۳*	۷/۲*
Sm24	۸۷/۵*	۰/۰۱۵۹*	۱۵۱/۱*	۹۷/۵*	۱۲۶/۲*	۴۱/۲*	۳۶/۲*	۶*	۷/۵*
Sr2	۶۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۶۳ <sup>ns</sup>	۱۸۴/۷ <sup>ns</sup>	۵۹/۲ <sup>ns</sup>	۷۲/۵ <sup>ns</sup>	۲۱/۲ <sup>ns</sup>	۲۰/۲ <sup>ns</sup>	۴/۲ <sup>ns</sup>	۵ <sup>ns</sup>
Sr6	۶۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۶۷ <sup>ns</sup>	۱۹۶/۳ <sup>ns</sup>	۵۸/۷ <sup>ns</sup>	۷۱ <sup>ns</sup>	۲۴/۲ <sup>ns</sup>	۲۰/۵ <sup>ns</sup>	۳/۵ <sup>ns</sup>	۵/۶ <sup>ns</sup>
Sr14	۶۵ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۰۷ <sup>ns</sup>	۱۸۶/۳ <sup>ns</sup>	۵۸/۷ <sup>ns</sup>	۸۰ <sup>ns</sup>	۲۰/۵ <sup>ns</sup>	۳۱/۷ <sup>ns</sup>	۳/۱۲ <sup>ns</sup>	۵/۸ <sup>ns</sup>
Sr19	۷۰ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۶۲ <sup>ns</sup>	۱۹۰/۹ <sup>ns</sup>	۵۵ <sup>ns</sup>	۷۱/۲ <sup>ns</sup>	۱۸/۵ <sup>ns</sup>	۲۵ <sup>ns</sup>	۴ <sup>ns</sup>	۵/۶ <sup>ns</sup>
Sr23	۷۰ <sup>ns</sup>	۰/۰۰۸۱ <sup>ns</sup>	۱۸۷/۵ <sup>ns</sup>	۶۲/۵ <sup>ns</sup>	۷۳ <sup>ns</sup>	۲۱/۲ <sup>ns</sup>	۲۰/۵ <sup>ns</sup>	۳/۷ <sup>ns</sup>	۵ <sup>ns</sup>
Sp5	۴۵*	۰/۰۰۰۸ <sup>ns</sup>	۲۱۲/۵*	۳۴/۲*	۵۳/۷*	۵/۵*	۱۱/۲*	۱/۳*	۳/۷*
Sp11	۴۷/۵*	۰/۰۰۰۹ <sup>ns</sup>	۲۰۸/۵*	۴۰*	۵۱/۵*	۵*	۱۰/۲*	۰/۴*	۳/۸*
Sp16	۴۲/۵*	۰/۰۰۷۲ <sup>ns</sup>	۲۱۱*	۴۲/۲*	۶۰*	۹/۵*	۸/۲*	۱*	۴*
Sp22	۵۰*	۰/۰۰۷۶ <sup>ns</sup>	۲۱۳/۲*	۴۵/۷*	۵۵*	۱۴*	۱۴/۵*	۱/۱*	۳/۱*
Sp29	۵۰*	۰/۰۰۶۴ <sup>ns</sup>	۲۱۵/۸*	۳۸/۷*	۴۶/۲*	۱۵*	۱۳/۵*	۱/۸*	۲/۴*
شاهد	۶۸	۰/۰۰۰۸	۱۹۵/۵	۵۸/۸	۷۷	۲۲/۵	۲۳/۷	۳/۶	۵/۶
LSD%۵	۱۰/۶۶۳	۰/۰۰۱۷	۱۱/۷۸۳	۶/۹۳۶	۶/۹۶۲	۴/۲۳۴	۴/۵۶۵	۰/۶۰۱۱	۰/۸۰۲۷
P- تیمار	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱

ns و \* به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد است.

*geniculata* سبب عدم یکنواختی جوانه‌زنی بذور گردیده و در نتیجه می‌تواند در عملکرد نهایی محصول دارای اهمیت باشد. تلقیح بذور با استرین‌های متعلق با باکتری *S. maltophilia* به ترتیب سبب افزایش پارامترهایی نظیر طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن تر ریشه‌چه، وزن تر ساقه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه و وزن خشک ساقه‌چه گردید درحالی که در تلقیح با

طبق نتایج سلطانی و همکاران (2001) که گزارش نمودند که هر چه عدد محاسبه شده برای یکنواختی جوانه‌زنی کمتر باشد، یکنواختی بیشتر است، لذا این صفت به‌ویژه در اثر تلقیح بذور چغندر قند با استرین‌های متعلق به گونه *S. maltophilia* به علت یکنواختی در سبز شدن بذور چغندر قند در مزرعه دارای اهمیت است. درحالی که تلقیح با استرین‌های *P.*

اطراف ریشه‌چه را کلونیزه نمایند (Kaga *et al.* 2009). باکتری *S. maltophilia* به دلیل ویژگی‌هایی مانند افزایش دهندگی رشد در گیاهان مورد توجه تحقیقات در بیوتکنولوژی است (Suckstorff and Berg 2003). نتایج تحقیقات نشان داده است که این باکتری سبب افزایش رشد در کلزا شده است (De Freitas *et al.* 1987). آشر و ویلیام (1996) افزایش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه چغندر قند را در اثر استفاده از باکتری *Pseudomonas spp* مشاهده کردند (William and Asher 1996)؛ هولاند و پولاکو (1994) گزارش کردند که باکتری‌های اندوفیت بذر در هنگام جوانه‌زنی می‌تواند سبب افزایش درصد جوانه‌زنی در بذر گیاهان شوند و هنگامی که این باکتری‌ها از بین بروند جوانه‌زنی کاهش پیدا می‌کند که با نتایج این تحقیق سازگار است (Holland and Polacco 1994). در این راستا، فرمولاسیون تهیه‌شده از باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد در گیاه سویا سبب افزایش نرخ جوانه‌زنی بذر و همچنین رشد بیشتر سایر قسمت‌های هوایی در این گیاه شده است (Habazar *et al.* 2014). با توجه به این که تلقیح بذر با باکتری *S. maltophilia* موجب تسریع مؤلفه‌های جوانه‌زنی در بذر چغندر قند شده، بهتر است به‌منظور تسریع و رشد بهتر و یکنواخت این محصول، تلقیح بذر با این باکتری صورت گیرد.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از آقای حسن ابراهیمی کولایی عضو هیئت علمی بخش تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی همدان جهت مساعدت‌های بی‌دریغشان نهایت سپاس و قدردانی را دارند.

استرین‌های *P. geniculata* سبب کاهش معنی‌دار این پارامترها در مقایسه با شاهد گردید. در اثر تلقیح بذر با *S. rhizophila* اثر معنی‌داری بر این پارامترها در مقایسه با شاهد مشاهده نشد. میکروارگانیسیم‌ها ممکن است اثر مثبت، منفی و یا خنثی بر روی گیاهان داشته باشند (Schippers *et al.* 1987). باکتری‌های مخرب (Deleterious bacteria) یا بازدارنده رشد به باکتری‌های ساپروفیت و غیرپارازیتی گفته می‌شود که سبب بازدارندگی از رشد و جوانه‌زنی گیاهان از طریق تولید متابولیت‌های مضر می‌شوند. این متابولیت‌ها شامل متابولیت‌های مضرمانند فیتوهورمون‌ها در غلظت بالا، فیتوتوکسین‌های ناشناخته و یا سیانید است (Compant *et al.* 2005). جاگادیش و همکاران (2006) اثر باکتری‌های مخرب را بر روی جوانه‌زنی بذر گوجه‌فرنگی مقایسه کردند و مشاهده کردند که باکتری‌های مخرب به‌طور چشم‌گیری سبب کاهش جوانه‌زنی بذر در مقایسه با شاهد شد. در تحقیق حاضر نیز باکتری *P. geniculata* در گروه باکتری‌های مخرب قرار گرفته و مانع از رشد و سایر مؤلفه‌های مؤثر در جوانه‌زنی بذر چغندر قند گردید. بر اساس نتایج این تحقیق، باکتری *S. rhizophila* که در سطح بذر چغندر قند وجود دارد دارای اثر خنثی بر مؤلفه‌های جوانه‌زنی بذر چغندر قند است.

باکتری‌های مفید که افزایش‌دهنده رشد (Plant growth

promoting bacteria) نامیده می‌شوند سبب افزایش رشد گیاهان از طریق تولید محرک‌های رشد، یا دسترسی به مواد غذایی و یا رقابت با باکتری‌های مضر می‌شوند (Schippers *et al.* 1987; li and kermer 2006). باکتری‌های اندوفیتی که داخل بذر وجود دارند می‌توانند سریعاً و به‌سادگی بذر و محیط

**References:****منابع مورد استفاده:**

- Banerjee M, Yesmin L. Sulfur-oxidizing plant growth promoting rhizobacteria for enhanced canola performance. US Patent. 2002; 07491535.
- Bashan Y, Holguin G, De-Bashan L. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. *Can J Microbiol.* 2004; 50: 521-577.
- Berg G, Egamberdieva D, Lugtenberg B, Hagemann M. Symbiotic plant-microbe interactions: stress protection, plant growth promotion, and biocontrol by *Stenotrophomonas*. In Seckbach, J. and Grube, M. *Symbiosis and Stress. Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology.* 2010; 4: 445-460.
- Bergey DH, Holt JG, Noel RK. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Ninth edition). Baltimore, MD. Williams & Wilkins. 1994; 1: 1935-2045.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 4951-4959.
- De Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biol Fertl Soils.* 1997; 24:358-364.
- Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 57-80.
- Fahy PC, Persley GJ. *Plant Bacterial Disease: A Diagnostic Guide.* Academic Press. Sydney, Australia. 1983; 393p.
- Grondeau C, Samson R, Sands DDC. A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. *Crit Rev Plant Sci.* 2011; 13: 57-75.
- Habazar T, Yanti Y, Ritonga C. Formulation of indigenous rhizobacterial isolates from healthy soybean's root, which ability to promote growth and yield of soybean. *Int J Sci Engg Tech.* 2014; 4: 2088-5334.
- Halmer P. Methods to improve seed performance. In: Benech-Arnold RL, Sanchez RA (eds) *Seed Physiology, Applications to Agriculture.* Food Product Press, New York. 2003.
- Hayward AC, Fegan NM, Stirling GR. *Stenotrophomonas* and *Lysobacter*: ubiquitous plant-associated gamma-proteobacteria of developing significance in applied microbiology. *J Appl Microbiol.* 2010; 108: 756-770.
- Holland MA, Polacco JC. PPFMs and other covert contaminants: is there more to plants physiology than just plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 1994; 45: 197-209.
- Hardoim PR, Hardoim CCP, van Overbeek LS, van Elsas JD. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PLoS ONE.* 2012; 7: e30438.
- Jagadish DR. Evaluation of different methods of application of *Pseudomonas* B-25 strain for biological control of early blight of tomato caused by *Alternaria solani* Mill. M. Sc. (Agri.) Thesis, Univ. of Agri. Sci. Dharwad (India) 2006.

- Johnston-Monje D, Raizada MN. Conservation and diversity of seed associated endophytes in *Zea* across boundaries of evolution, ethnography and ecology. PLoS ONE. 2011; 6: e20396.
- Kaga H, Mano H, Tanaka F, Watanabe A, Kaneko S, Morisaki H. Rice seeds as sources of endophytic bacteria. Microbes Environ. 2009; 24: 154–162.
- Kremer RJ. Identity and properties of bacteria inhabiting seeds of selected broadleaf weed species. Microb Ecol. 1987; 14: 29-37
- Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage. Nature. 1970; 227: 680- 685.
- Li J, Kremer RJ. Growth response of weed and crop seedlings to deleterious rhizobacteria. Biol Control. 2006; 39: 58–65.
- Lucero ME, Unc A, Cooke P, Dowd S, Sun S. Endophyte microbiome diversity in micropropagated *Atriplex canescens* and *Atriplex torreyi* var *griffithsii*. PLoS One. 2011 Mar 17; 6(3):e17693.
- Nezarat S, Gholami A. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. Pak J Biol Sci. 2009; 12(1):26-32.
- Paradis E, Goyer C, Hodge NC, Houge R, Robert ES, Beaulieu C. Fatty acid and protein profiles of *Streptomyces scabies* strains isolated in eastern Canada. Int J Sys Bacteriol. 1994; 44: 561- 564.
- Park M, Kim C, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S, Sa T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. Microbiol Res. 2005; 160: 127–133.
- Rastogi G, Sbodio A, Tech JJ, Suslow TV, Coaker GL, Leveau JHJ. Leaf microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial community composition on field grown lettuce. ISME Journal. 2012; 6: 1812–1822.
- Rudgers JA, Afkhami ME, Rua MA, Davitt AJ, Hammer S, Huguet VM. A fungus among us: broad patterns of endophyte distribution in the grasses. Ecology. 2009; 90: 1531–1539.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathology Society Minnesota. 2001; 373pp.
- Schippers B, Bakker AW, Bakker AHM. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganism and the effect of cropping practices. Ann Rev Phytopathol. 1987; 25: 339-358.
- Soltani A, Zeinali E, Galeshi S, Latifi N. Genetic variation for and interrelationships among seed vigor traits in wheat from the Caspian Sea Coast of Iran. Seed Sci and Technol. 2001; 29: 653-662.
- Suckstorff I, Berg G. Evidence for dose-dependent effects on plant growth by *Stenotrophomonas* strains from different origins. J Appl Microbiol. 2003; 95: 656–663.
- Vauterin L, Vantomme R, Pot B, Hoste B, Swings J, Kersters K. Taxonomic analysis of *Xhantomonas campestris* pv. *begonidae* and *X. campestris* pv. *pelargonii* by means of phythopathological, phenotypic, protein electrophoretic and DNA hybridization methods. Syst Appl Bacteriol. 1990; 13: 166–167.

- Watson L, Dallwitz MJ. The Families of Flowering Plants: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval. Version: 15th October 1998.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. J Bacteriol. 1991; 173: 697-703.
- William GE, Asher MJC. Selection of rhizobacteria for the control of *Pythium ultimum* and *aphanomyces cochioides* on sugar beet seedling. Crop prot. 1996; 15: 479-486.
- Wolf A, Fritze A, Hagemann M, Gabriele B. *Stenotrophomonas rhizophila* sp. nov. a novel plant-associated bacterium with antifungal properties. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52: 1937–1944.
- Zaidi SFA. Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* and fluorescent *Pseudomonas* to control *Rhizoctonia solani* in soybean [*Glycine max* L. Merr]. Ann Agr Res. 2003; 24: 151-153.