باکتری‌های همراه بذر چغندرقند: شناسایی و اثر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذر

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

میلاد آئینی[1] و غلام خداکرمیان[2*]

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

م. آئینی و غ. خداکرمیان. ۱۳۹۶. باکتری‌های همراه بذر چغندرقند: شناسایی و اثر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذر. **چغندرقند، ۳۳(۱): ۱۰۱- ۱۱۳.**
DOI:10.22092/jsb.2017.104600.1111

چکیده

بذر چغندرقند دارای اهمیت ویژه‌ای است زیرا به‌عنوان انتقال‌دهنده باکتری‌های مفید و مضر نقش ایفا می‌کند. جهت شناسایی و تعیین اثر باکتری‌های همراه بذر چغندرقند بر جوانه‌زنی، بذر بوجاری‌شده و ضدعفونی نشده از بخش تحقیقات چغندرقند مرکز تحقیقات کشاورزی استان همدان تهیه گردید. درمجموع تعداد ۸۰ استرین اندوفیت و اپی‌فیت از بذر چغندرقند 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 چغندرقند شناسایی شدند. جهت انجام آزمون جوانه‌زنی بذر، سه گروه متفاوت ازلحاظ تأثیر استرین‌ها بر جوانه‌زنی بذور چغندرقند 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 (۰/۰۱۷٤ بر ساعت)، وزن‌تر ساقه‌چه (۱۰۰ میلی‌گرم) و ریشه‌چه (۱۲٦/۲ میلی‌گرم)، وزن خشک ساقه‌چه (۵۰ میلی‌گرم) و ریشه‌چه (٤۳/۷ میلی‌گرم)، طول ساقه‌چه (٦/۵ 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 چغندرقند با باکتری *S. maltophilia* صورت گیرد.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، اپی‌فیت، جوانه‌زنی بذر، چغندرقند

۱- دانشجوی دوره دکتری گروه گیاهپزشکی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
۲- استاد گروه گیاهپزشکی دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران. *- نویسنده مسئول hodakaramian@yahoo.com

مقدمه

چغندرقند با نام علمی (*Beta vulgaris* L.) متعلق به خانواده *Chenopodiaceae* است. این خانواده دارای حدود ۱۴۰۰ گونه است که در ۱۰۵ جنس قرارگرفته‌اند. اعضای این خانواده دولپه بوده و در طبیعت به‌صورت علفی یافت می‌شوند. یکی از گونه‌های مهم و اقتصادی در این خانواده چغندرقند است (Watson and Dallwitz 1992). بذر چغندرقند 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 هردوی این دو گروه در تکامل میکروبی بذور دارای اهمیت هستند (Johnston-Monje and Raizad 2011). 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 انجام‌شده است، باکتری‌های اپی‌فیت مرتبط با بذر کم‌تر موردتوجه قرارگرفته‌اند (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 ازجمله 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 افزاینده رشد گیاه ازجمله 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 پرداخته‌شده 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 *Pseudomonas* sp و *Rhizobium japonicum* جوانه‌زنی و ایستادگی گیاهچه را بهبود بخشید (Zaidi 2003). هدف از تحقیق حاضر، جداسازی و شناسایی باکتری‌های اپی‌فیت و اندوفیت مرتبط با بذر چغندرقند و همچنین اثر این باکتری‌ها بر روی جوانه‌زنی بذور چغندرقند است.

مواد و روش‌ها

جداسازی

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

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. پس‌ازآن، 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 مغذی 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 چغندرقند در محلول آب استریل حاوی ۱ درصد ژلاتین قرار داده‌شده و پس از گذشت زمان ۳۰ الی ۴۵ دقیقه سوسپانسیون حاوی باکتری را در محیط آگار مغذی 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 کشت‌شده و بعد از ۲۴ ساعت سوسپانسیونی از آن‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر تهیه و چگالی نوری آن‌ها به یک واحد OD (Optical Density) 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 حمام بن ماری (دمای جوش) قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریوفیوژ شدند. پس از برداشت لایه رویی، نصف حجم به آن گلیسیرین سترون اضافه شد و به‌عنوان پروتئین باکتری در چاهک‌های ژل مورداستفاده قرار گرفتند. الکتروفورز پروتئین استخراج‌شده در ژل پلی آکریل آمید (SDS-PAGE) تخت عمودی بر مبنای روش اصلاح‌شده 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 PH =۸/۳ 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. درنهایت 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

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).

به‌منظور شناسایی و تأیید نهایی جدایه‌ها، روش PCR ژن *16S rRNA* به کار گرفته شد. از آغازگرهای عمومی fD1 (5′-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و rD1 (5′-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-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 میکرولیتر آب مقطر سترون حل گردید. به‌منظور 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 میکرولیتر بافر واکنش (PCR buffer 10X)، ۳ میکرولیتر منیزیم کلراید (۲/۵ mM)، یک میکرولیتر dNTPs (۱۰ mM)، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم تک پلی‌مراز (۱۰ U/µl)، ۲ میکرولیتر آغازگر رفت (۱۰ µM)، ۲ میکرولیتر آغازگر برگشت (۱۰ µM)، ۶ میکرولیتر DNA و ۳۰/۵ میکرولیتر آب سترون. چرخه‌های حرارتی شامل واسرشته سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۳۵ چرخه شامل واسرشته سازی 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 تکثیرشده از الکترفورز در ژل آگارز یک درصد استفاده شد. جهت تعیین توالی این بخش از ژنوم، محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز حاصل از جفت آغازگرهای مورداستفاده 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.

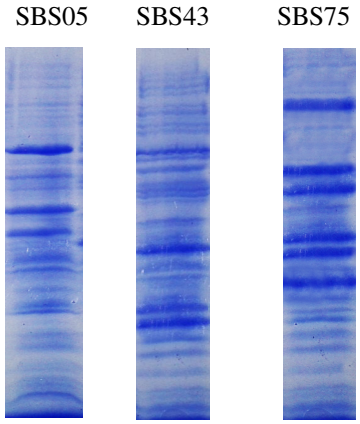
آزمون جوانه‌زنی بذر

قبل از انجام آزمایش جوانه‌زنی بذر جهت عاری ساختن بذور از میکروارگانیسم‌های اپی‌فیت و اندوفیت، ابتدا تمامی بذور توسط محلول سدیم هیپوکلرایت سه درصد ضدعفونی سطحی و سپس تیمار گرمایی شدند. به این صورت که ابتدا بذور به مدت پنج دقیقه در محلول سدیم هیپوکلرایت سه درصد قرارگرفته پس از چندین بار شستشو با آب مقطر استریل در ظرف محتوی آب مقطر استریل به‌آرامی 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 چغندرقند ازلحاظ تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذور، در ابتدا تمامی استرین‌ها بر روی بذور چغندرقند رقم اکباتان عاری از میکروارگانیسم آزمایش شدند. نحوه انجام این گروه‌بندی بدین‌صورت بود که ابتدا هر استرین بر روی ۱۰ بذر در داخل هر پتری‌دیش تلقیح شده و به‌صورت چشمی تمامی

پتری‌دیش‌ها باهم مقایسه شدند و نمره دهی شدند (۰-۱۰). درنهایت گروه‌های متفاوت بر اساس تأثیر جوانه‌زنی این باکتری‌ها بر بذور چغندرقند، 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 پتری دیش با ۱۰ عدد بذر تلقیح شدند. برای پرایمینگ بـذرها میـزان هفت گرم مایه تلقیح که هر گرم آن دارای $۱۰^{۷}$ عدد باکتری زنده و فعال است، استفاده گردید. همچنین از کربوکسی متیل سلولز بـرای چسبندگی بهتر مایه تلقیح به بذرها استفاده شد. در تیمار شاهد نیز از آب مقطر استریل جهت مایه‌زنی به بذور ضدعفونی شده استفاده گردید. ابتدا در کف هر پتری‌دیش کاغذ صافی قرار گرفت. سپس تعداد ده عدد از بـذرهای تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد در پتری‌دیش قرار داده‌شده و کاغذ صافی دیگری با همان ابعاد روی بذرها قرار داده شـد. شـمارش بذرهای جوانه‌زده در فواصل زمانی ۲۴ سـاعت انجـام گرفـت. قابل‌ذکر است که در هنگام شمارش، بذرهایی جوانه‌زده تلقـی شـدند که طول ریشه‌چه آن‌ها حداقل دو میلی‌متر بود. شمارش تا زمانی ادامـه یافت که برای مدت سه روز متوالی تعـداد بـذرهای جوانه‌زده در هـر نمونه ثابت بماند. برخی پارامترها اعم از طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن خشک ریشه-چه و وزن خشک ساقه‌چه اندازه‌گیری شدند. برای ارزیابی اجزای جوانه‌زنی، منحنی پیشرفت درصد جوانه‌زنی تجمعی در مقابل زمان از کاشت بذرها (برحسب ساعت) ترسیم شـد و سپس از این منحنی‌ها، حداکثر جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی و میزان یکنواختی جوانه‌زنی با اسـتفاده از روش درون‌یابی خطی با استفاده از نرم‌افزار Germin محاسبه شد(Soltani *et al*. 2001). کلیه داده‌های جمع‌آوری‌شده در طول آزمایش با استفاده از نرم‌افزار Excel ویرایش و برای تجزیه‌وتحلیل آماری آماده شدند. تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS صورت گرفت. طرح آماری استفاده‌شده، 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 چغندرقند تهیه‌شده از مرکز تحقیقات چغندرقند همدان، جداسازی شد. الگوی الکتروفورز پروتئینی SDS_PAGE با نتایج ژنوتیپی ارتباط بسیار نزدیکی دارد به‌طوری‌که 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 به‌عنوان گروهی از استرین‌ها با الگوی پروتئینی تقریباً مشابه در نظر گرفته شد. درنهایت سه الکتروتیپ اصلی و متفاوت تشخیص داده‌شده و هر الکتروتیپ به‌عنوان نماینده گروه جهت شناسایی گونه انتخاب گردید (شکل ۱). الکتروتیپ SBS05 شامل ۲۵ جدایه بود که از ناحیه اندوفیت بذر جداسازی شده بود و به‌عنوان 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).



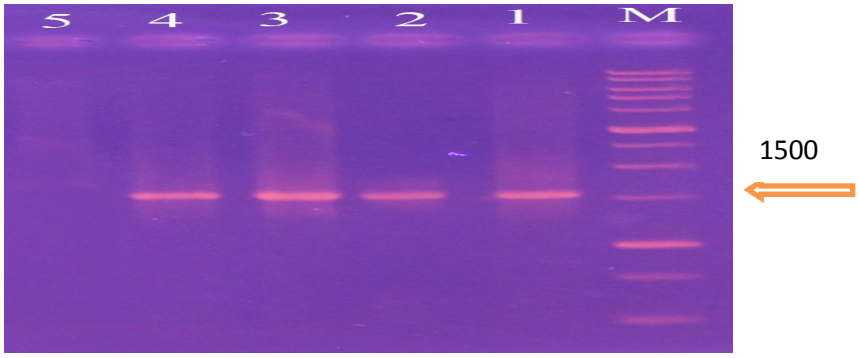
شکل ۱ نقوش الکتروفورزی الکتروتیپ‌های نماینده

جدول ۱ نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی استرین‌های نماینده

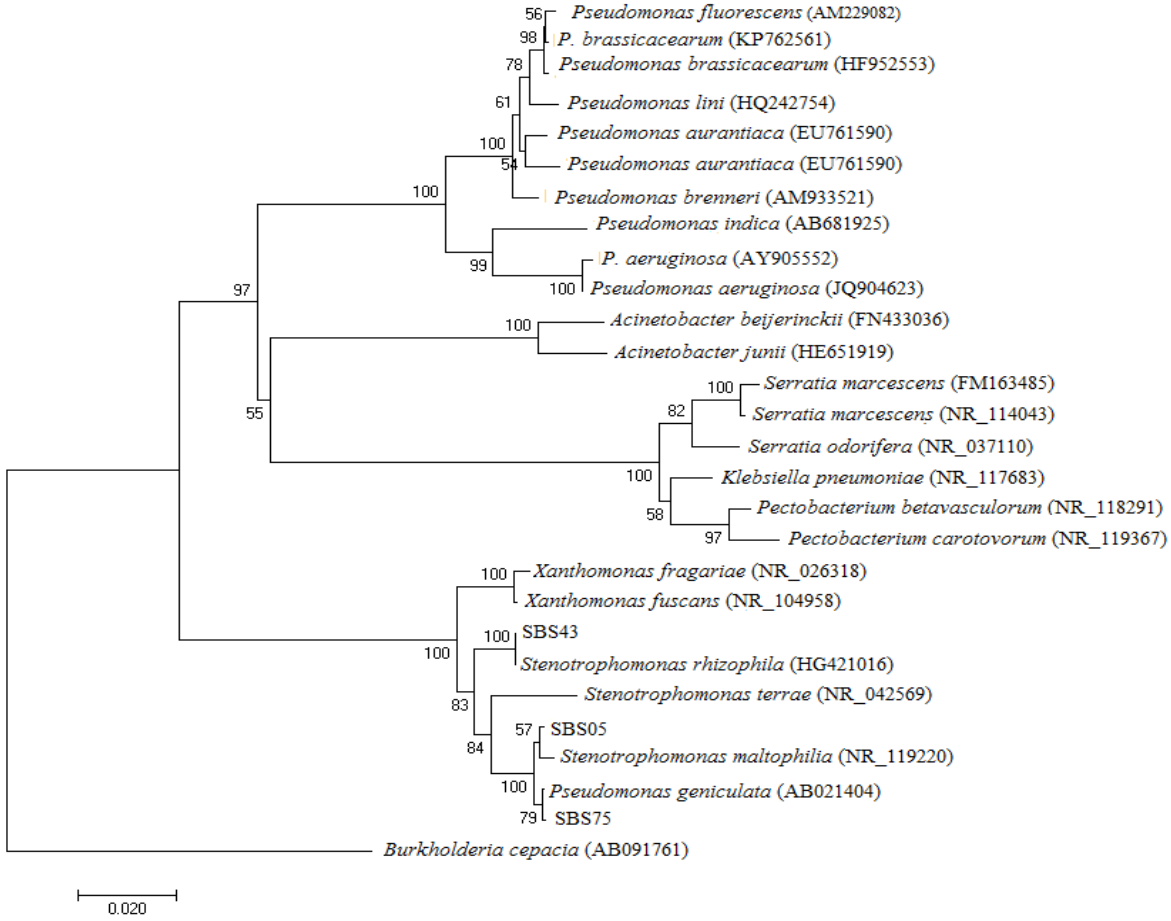
	الکتروتیپ نماینده		
	SBS05	SBS43	SBS75
نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی			
آزمون گرم	-	-	-
هوازی اجباری	+	+	+
کاتالاز	+	+	+
تولید اندول	–	–	–
سیترات	+	+	+
متیل رد	–	–	–
تخمیر گلوکز	-	-	-
تخمیر لاکتوز	-	-	-
اکسیداز	-	-	+
رشد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد	-	+	+
رشد در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد	+	–	+
آرژنین دهیدرولاز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

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

جدایه‌های نماینده هر سه گروه قطعه قابل‌انتظار ۱۵۰۰ جفت بازی را تکثیر نمودند (شکل ۲). شناسایی استرین‌های نماینده بر پایه آزمون‌های بیوشیمیایی و توالی یابی ژن *16S rRNA* صورت پذیرفت. بر پایه آزمون‌های بیوشیمیایی و تکثیر و توالی یابی ژن *16S rRNA* و مقایسه آن‌ها با بانک داده‌های NCBI، گونه‌های *Stenotrophomonas maltophilia* به‌عنوان اندوفیت و *Stenotrophomonas rhizophila* و *Pseudomonas geniculata* به‌عنوان دو گونه باکتریایی غالب اپی‌فیت بذور چغندرقند تعیین شدند. پس از توالی یابی نمونه‌ها و مقایسه آن‌ها با بانک داده‌های NCBI، درخت فیلوژنی بر پایه ژن *16S rRNA* رسم شد (شکل ۳).



شکل ۲ نقوش الکتروفورزی محصول PCR با استفاده از آغازگر عمومی fD1 وrD1. به ترتیب لاین M: مارکر 1kb، 1: SBS05، 2: SBS43، 3: SBS75، 4:کنترل مثبت (*Pseudomonas syringae*) و 5 : به‌عنوان کنترل منفی است.



شکل ۳ درخت فیلوژنتیکی ترسیم‌شده بر اساس مقایسه توالی ژن *16S rRNA* استرین‌های بذر چغندرقند با سایر باکتری‌های موجود در بانک ژن با استفاده از نرم‌افزار MEGA 7. استرین‌های نماینده با حروف SBS43، SBS05 و SBS75 مشخص‌شده‌اند.

جنس *Stenotrophomonas* نیز نخستین بار همراه با *Pseudoxanthomonas maltophila* در سال ۱۹۶۱ معرفی‌شده است. این باکتری‌ها گرم منفی میله‌ای شکل با مقدار C+G بالا در DNA هستند. تاکنون هشت گونه *Stenotrophomonas* شناسایی‌شده 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).

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

جدول ۲ گروه‌بندی اولیه استرین‌ها بر اساس تأثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی بذر چغندرقند (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)

استرین‌های گروه	تأثیر استرین‌ها بر جوانه‌زنی بذر چغندرقند (۱۰-۰)
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 تأثیر مثبت بر جوانه‌زنی بذر (۱۰-۷)
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 اثر خنثی بر جوانه‌زنی بذر (۷-۵)
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	استرین‌های دارای تأثیر منفی بر جوانه‌زنی بذر (۵-۰)

از هریک از گروه‌ها پنج استرین نماینده جهت بررسی خصوصیات جوانه‌زنی بر بذر چغندرقند انتخاب گردید (جدول ۳). تلقیح استرین‌های نماینده متعلق به گونه *S. maltophilia* سبب افزایش درصد جوانه‌زنی بذور چغندرقند در مقایسه با شاهد گردید ($P<$ ۰/۰۵). درحالی‌که استرین‌های گونه *P. geniculata*، سبب کاهش معنی‌دار و چشم‌گیر درصد جوانه‌زنی بذور در مقایسه با

شاهد گردید. تلقیح بذور با استرین‌های گونه *S. rhizophila* اثر معنی‌داری بر افزایش درصد جوانه‌زنی نداشت ($P>$ ۰/۰۵). 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 تیمارها بیشترین تفاوت معنی‌دار را پیدا کرد، درحالی‌که در سایر استرین‌های نماینده متعلق به سایر گونه‌ها تفاوت معناداری را نسبت به شاهد در سرعت جوانه‌زنی بذور چغندرقند نشان ندادند.

جدول ۳ مقایسه میانگین مؤلفه‌های جوانه‌زنی بذور چغندرقند در اثر تلقیح با باکتری‌های جداشده از بذر

جدایه باکتری	درصد جوانه‌زنی	سرعت جوانه‌زنی	یکنواختی جوانه‌زنی	وزن‌تر ساقه‌چه (میلی‌گرم)	وزن‌تر ریشه‌چه (میلی‌گرم)	وزن خشک ساقه‌چه (میلی‌گرم)	وزن خشک‌ریشه چه (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 ns	۰/۰۰۶۳ ns	۱۸۴/۷ ns	۵۹/۲ ns	۷۲/۵ ns	۲۱/۲ ns	۲۰/۲ ns	۴/۲ ns	۵ ns
Sr6	۶۵ ns	۰/۰۰۶۷ ns	۱۹۶/۳ ns	۵۸/۷ ns	۷۱ ns	۲۴/۲ ns	۲۰/۵ ns	۳/۵ ns	۵/۶ ns
Sr14	۶۵ ns	۰/۰۰۷ ns	۱۸۶/۳ ns	۵۸/۷ ns	۸۰ ns	۲۰/۵ ns	۳۱/۷ ns	۳/۱۲ ns	۵/۸ ns
Sr19	۷۰ ns	۰/۰۰۶۲ ns	۱۹۰/۹ ns	۵۵ ns	۷۱/۲ ns	۱۸/۵ ns	۲۵ ns	۴ ns	۵/۶ ns
Sr23	۷۰ ns	۰/۰۰۸۱ ns	۱۸۷/۵ ns	۶۲/۵ ns	۷۳ ns	۲۱/۲ ns	۲۰/۵ ns	۳/۷ ns	۵ ns
Sp5	۴۵*	۰/۰۰۸ ns	۲۱۲/۵*	۳۴/۲*	۵۳/۷*	۵/۵*	۱۱/۲*	۱/۳*	۳/۷*
Sp11	۴۷/۵*	۰/۰۰۹ ns	۲۰۸/۵*	۴۰*	۵۱/۵*	۵*	۱۰/۲*	۰/۴*	۳/۸*
Sp16	۴۲/۵*	۰/۰۰۷۲ ns	۲۱۱*	۴۲/۲*	۶۰*	۹/۵*	۸/۲*	۱*	۴*
Sp22	۵۰*	۰/۰۰۷۶ ns	۲۱۳/۲*	۴۵/۷*	۵۵*	۱۴*	۱۴/۵*	۱/۱*	۳/۱*
Sp29	۵۰*	۰/۰۰۶۴ ns	۲۱۵/۸*	۳۸/۷*	۴۶/۲*	۱۵*	۱۳/۵*	۱/۸*	۲/۴*
شاهد	۶۸	۰/۰۰۸	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.

طبق نتایج سلطانی و همکاران (2001) که گزارش نمودند که هر چه عدد محاسبه‌شده برای یکنواختی جوانه‌زنی کمتر باشد، یکنواختی بیشتراست، لذا این صفت به‌ویژه در اثر تلقیح بذور چغندرقند با استرین‌های متعلق به گونه *S. maltophilia* به علت یکنواختی در سبز شدن بذور چغندرقند در مزرعه دارای اهمیت است. درحالی‌که تلقیح با استرین‌های *P. geniculata* سبب عدم یکنواختی جوانه‌زنی بذور گردیده و درنتیجه 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، وزن‌تر ریشه‌چه، وزن‌تر ساقه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه و وزن خشک ساقه‌چه گردید درحالی‌که در تلقیح با

استرین‌های *P. geniculata* سبب کاهش معنی‌دار این پارامترها در مقایسه با شاهد گردید. در اثر تلقیح بذور با *S. rhizophila* اثر معنی‌داری بر این پارامترها در مقایسه با شاهد مشاهده نشد.

میکروارگانیسم‌ها 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 مضری مانند 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 بذور در مقایسه با شاهد شد. در تحقیق حاضر نیز باکتری *P. geniculata* در گروه باکتری‌های مخرب قرارگرفته و مانع از رشد و سایر مؤلفه‌های مؤثر در جوانه‌زنی بذور چغندرقند گردید. بر اساس نتایج این تحقیق، باکتری *S. rhizophila* که در سطح بذور چغندرقند وجود دارد دارای اثر خنثی بر مؤلفه‌های جوانه‌زنی بذر چغندرقند 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 اطراف ریشه‌چه را کلونیزه نمایند (Kaga *et al.* 2009). باکتری *S. maltophilia* به دلیل ویژگی‌هایی مانند افزایش دهندگی رشد در گیاهان موردتوجه 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 چغندرقند 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 بذور گیاهان شوند و هنگامی‌که 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 این‌که تلقیح بذور با باکتری *S. maltophilia* موجب تسریع مؤلفه‌های جوانه‌زنی در بذور چغندرقند شده، بهتر است به‌منظور تسریع و رشد بهتر و یکنواخت این محصول، تلقیح بذور با این باکتری صورت گیرد.

سپاسگزاری

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

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 Phtopathology 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.