مطالعه تاثیر باکتری *Cupriavidus metallidurans* بر جوانه‌زنی و ویگور بذر گندم

محمدکریم هراتی[1]، علیرضا سیفی[2*]

۱-دانشجوی ارشد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی ، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی/*۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی و به-نژادی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

***- نویسنده مسئول: Email:arseifi@um.ac.ir**

ارائه‌دهنده: محمدکریم هراتی

نحوه ارجاع به مقاله:

هراتی، م.، سیفی، ع.(۱۴۰۳). مطالعه تاثیر باکتری *Cupriavidus metallidurans* بر جوانه‌زنی و ویگور بذر گندم. هجدهمین کنگره ملی و چهارمین کنگره بین‌المللی علوم زراعت و اصلاح نباتات ایران. ۲۰-۲۲ شهریور ۱۴۰۳، دانشگاه فردوسی مشهد.

چکیده

گیاهان در طبیعت با طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها در ارتباط هستند که به مجموعه آن‌ها میکروبیوتا[1] گیاهی گفته می‌شود که ممکن است به صورت همزیست یا بیماریزا عمل کنند. امروزه یکی از روش‌های نوینی که برای بهبود بخشیدن به جوانه‌زنی و بنیه گیاهچه صورت می‌پذیرد عمل بایوپرایمینگ[2] بذر است که از میکروارگانیسم‌های همزیست گیاه برای بهبود این ویژگی‌ها استفاده می‌شود. طی مطالعات قبلی مشخص شد که باکتری *Cupriavidus metallidurans* تاثیر چشمگیری در افزایش رشد و عملکرد گیاهان دارد. هدف از این بررسی مطالعه مکانیزم‌های دخیل در تاثیر این باکتری بر جوانه‌زنی بذر گندم بود. برای این‌کار تاثیر باکتری زنده، باکتری کشته شده و همچنین اثر ترکیبات آلی فرار (VOC[3]) منتشر شده از باکتری بر جوانه‌زنی سنجیده شد. بذور استریل شده توسط باکتری زنده و همچنین باکتری کشته شده (دما ۸۰ درجه به مدت ۲۰ دقیقه) تلقیح شدند. به منظور بررسی تاثیر ترکیبات آلی فرار باکتری در پلیت کشت چمنی داده شده و تاثیر آن بر جوانه‌زنی بررسی شد. نتایج نشان داد که بایوپرایمینگ با باکتری زنده و باکتری کشته شده بطور معنی داری باعث افزایش طول ریشه‌چه اولیه شد، اما ترکیبات آلی فرار تولید شده توسط باکتری اثر بازدارنده بر جوانه‌زنی داشت. در قیاس با شاهد در بذور پوشش دار شده با باکتری طول ریشه‌چه اولیه و وزن تر ریشه بترتیب حدود ۱۰۰ و ۵۰ درصد افزایش یافت. این نتایج درک بهتری از نحوه استفاده از این باکتری به عنوان یک عامل پرایمینگ برای بذر محصولات زراعی فراهم می‌آورد.

بیان مسئله

[1] Microbioat
[2] Biopriming
[3]Volatile Organic Compounds

گیاهان در طبیعت همواره در تعامل با میکروب‌ها هستند که به مجموعه این میکروب‌ها میکروبیوتا گیاهی گفته می‌شود. این میکروب‌ها ممکن است به صورت همزیست یا بیماریزا عمل کنند [۱]. دو منطقه رایزوسفر[۴] و اندوسفر[۵] در تعاملات گیاهان و میکروارگانیسم‌ها نقش اساسی را ایفا می‌کنند. منطقه رایزوسفری عموما غنی از انواع باکتری‌ها و قارچ‌هایی است که در تعامل با گیاه منجر به ترشح ترکیبات فنلی، فیتوهورمون‌ها و سایر متابولیت‌ها می‌شوند و از این طریق رشد گیاه را افزایش می‌دهند [۲ و۳].

جوانه‌زنی بذر یک مرحله بسیار حیاتی در نمو گیاه است. رشد و نمو و همچنین عملکرد محصول زراعی به طور مستقیم به جوانه‌زنی یکنواخت و استقرار گیاهچه وابسته است. بایوپرایمینگ بذر به معنای استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای افزایش صفاتی مانند بهبود جوانه‌زنی و استقرار گیاهچه است و با استفاده از بایوپرایمینگ نتایج قابل توجهی در گیاهان زراعی مختلف به دست آمده است [۴]. برای مثال پوشش‌دار کردن بذرهای گندم و لوبیا چشم بلبلی با باکتری *Variovorax paradoxus* RAA3 باعث افزایش رشد گیاهان شد [۵]. همچنین لیپوپلی‌ساکاریدهای استخراج شده از دو باکتری *Azospirillum brasilense* Sp245 و *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 بر روی گندم باعث افزایش رشد گیاه شده است [۶].

مواد و روش‌ها:

باکتری *Cupriavidus metallidurans*،که در پروژه های تحقیقاتی قبلی گروه شناسایی شده است [۷]، در این مطالعه استفاده شد. در این آزمایش از بذر گندم رقم سیروان استفاده شده است.

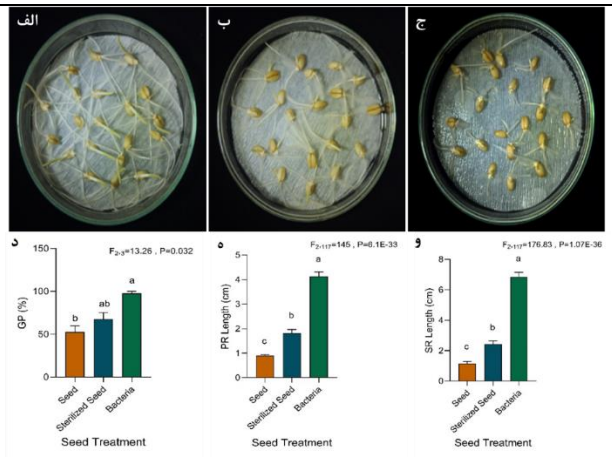
تعداد ۲۰ عدد بذر برای هر تکرار و ۲ تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. بذور ابتدا با هیپوکلریت سدیم ۱درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدفونی شد و سپس سه مرتبه با آب مقطر استریل شست و شو داده شد. برای پوشش‌دار کردن بذور با باکتری ابتدا یک تک کلون باکتری به ۱۰ میلی‌لیتر LB مایع منتقل شد و به مدت یک شبانه روز در انکوباتور شیکردار (۱۶۰ دور بر دقیقه) و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده‌شد. پس از رشد باکتری، نمونه‌ها و به مدت ۱۰ دقیقه با شدت g ۲۴۰۰ سانتریفیوژ شد. با افزودن آب مقطر استریل به رسوب باکتری سوسپانسیونی با غلظت $OD_{۶۰۰}$=۰/۵ به دست آمد. در نهایت بذور استریل شده به مدت ۱ ساعت در دمای ۲۸ درجه با سوسپانسیون باکتری تلقیح شدو سپس روی کاغذ صافی استریل داخلی پتری دیش کشت شدند.

برای بررسی اثر باکتری کشته‌شده، سوسپانسیون باکتری در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. سپس بذور به شرح بالا با این سوسپانسیون باکتری کشته شده پوشش دار شدند. به منظور بررسی اثر ترکیبات آلی فرار انتشار یافته از باکتری، یک سینگل کلونی در محیط مایع رشد داده شد و میزان ۵۰ میکرولیتر به یک پلیت حاوی محیط جامد LB، کشت چمنی داده شد. پلیت حاوی باکتری در داخل یک پتری‌دیش در کنار بذور استریل شده قرار گرفت [۸]. پس از گذشت ۲۴ ساعت از کشت، درصد جوانه‌زنی (تعداد بذور جوانه زده تقسیم بر کل تعداد بذر)، طول ریشه‌چه اصلی، طول ریشه‌های فرعی، و وزن کل ریشه‌چه‌ها اندازی گیری شد. خروج ریشه‌اولیه از پوسته بذر به عنوان معیار جوانه‌زنی در نظر گرفته‌شد. داده‌های حاصل با تجزیه واریانس یک طرفه و به دنبال آن آزمون مقایسه میانگین توکی HSD آنالیز شد.

نتایج و بحث

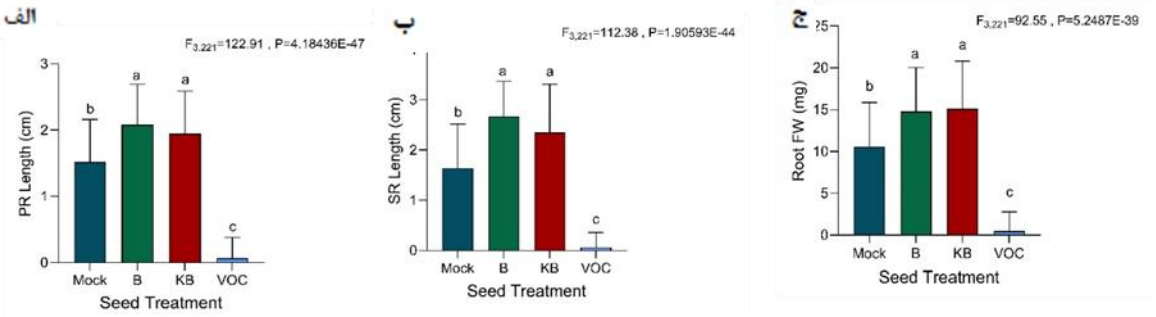
درصد جوانه‌زنی بذور پوشش دار شده با باکتری و بذور استریل شده نسبت به بذور استریل نشده فاقد پوشش باکتری بالاتر بود (شکل ۱). مهمتر اینکه طول ریشه‌چه اولیه و ریشه‌چه‌های ثانویه در بذور پوشش دار شده بطور معنی‌داری افزایش یافت. در بذور پوشش‌دار شده با باکتری طول ریشه‌چه اولیه بطور میانگین حدود ۴ سانتی‌متر و بذور پوشش‌دار نشده بطور متوسط حدود ۲ سانتی‌متر بود (شکل ۱-ه).

[4] Rhizosphere
[5] Endosphere



شکل ۱ : تاثیر باکتری بر درصد جوانه‌زنی و رشد ریشه‌چه گیاهچه‌های گندم. الف: بذورتلقیح شده با باکتری، ب: بذور استریل شده بدون تلقیح با باکتری، ج: بذور بدون استریل بدون تلقیح باکتری، د: درصد جوانه‌زنی، ه: طول ریشه‌چه اولیه، و: مجموع طول ریشه‌های بذری.

همچنین طول ریشه‌چه‌های فرعی بطور معنی‌داری در اثر پوشش باکتری افزایش یافت، بطوریکه مجموع طول این ریشه‌چه‌ها در بذور پوشش‌دار شده بطور متوسط بیش از ۶ سانتی‌متر و در بذور بدون پوشش به حدود ۲ سانتی‌متر رسید (شکل ۱-و). نکته جالب توجه این بود که باکتری کشته‌شده اثرات مثبت مشابهی بر جوانه‌زنی و رشد ریشه‌چه داشت ولی ترکیبات فرار باکتریایی اثرات منفی بر این شاخص‌ها داشت (شکل ۲).



شکل ۲ : اثر باکتری کشته شده و ترکیبات آلی فرار در جوانه‌زنی بذر گندم. الف: طول ریشه‌چه اولیه، ب: مجموع طول ریشه‌های بذری، ج: وزن تر ریشه

با توجه به نتایج بدست آمده از این آزمایشات، از آنجا که باکتری کشته شده باعث افزایش رشد ریشه‌چه شد، احتمال کارکرد و تولید متابولیت توسط باکتری وجود دارد که حتی پس از مرگ قادر به تاثیر گذاری بر رشد گیاه است. در این پژوهش ترکیبات آلی فرار منتشر شده اثر بازدارنده‌ای بر روی رشد گذاشته است که احتمال می‌رود علت آن غلظت بالای این ترکیبات باشد. به طور خلاصه باکتری *C. metallidurans* تاثیر شایان و قابل توجهی را بر رشد گیاه زراعی گندم می‌گذارد و می‌توان از آن در اهداف زیادی استفاده کرد.

مهمترین یافته‌ها:

۱- *C. metallidurans* باکتری مناسبی برای بایوپرایمینگ بذر گندم است.

۲- این باکتری باعث افزایش درصد جوانه‌زنی، و افزایش سرعت رشد ریشه‌چه می‌شود.

۳- احتمالا متابولیت‌های تولید شده توسط این باکتری باعث افزایش درصد جوانه‌زنی و رشد ریشه‌چه می‌شوند

۴-

واژگان کلیدی: میکروبیوتا، ویگورگیاهچه، **VOC**، پوشش دهی بذر

Effects of *Cupriavidus metallidurans* bacteria on wheat seed germination and vigor

Abstract

Naturally, plants are associated with a wide range of microorganisms called microbiota. Plants and their associated microbiota collaborate in the rhizosphere to enhance nutrient uptake and plant growth rate. The growth, development, and productivity of plants are highly related to the germination stage; thus, germination is one of the most important stages in plants. Biopriming by symbiotic microorganisms is used as a novel method to enhance seed germination and seedling vigor. Previously we identified *Cupriavidus metallidurans* as a plant growth-promoting bacterium. Here, we investigated the effects of this bacteria on wheat seed germination parameters. We tested the effects of the bacteria, the killed bacteria, and volatile organic compounds (VOCs) of bacteria on wheat seed germination and seedling vigor. The results showed that both bacteria and killed bacteria significantly increased germination percentage, and root length and fresh weight. Compared to the mock-treated seeds, in bacteria-coated seeds the primary root length and root fresh weight increased by 100 and 50%, respectively. However, VOCs showed negative effects on these parameters. The results provide better understanding of the mode of action of the bacteria in enhancing seed germination and seedling establishment.

Keywords: Microbiota, Seedling vigor, VOC, seed coating

منابع

1. Chialva M, Lanfranco L, Bonfante P. The plant microbiota: composition, functions, and engineering. Current Opinion in Biotechnology. 2022;73:135-42. Doi: 10.1016/j.copbio.2021.07.003
2. Tkacz A, Poole P. The plant microbiome: The dark and dirty secrets of plant growth. Plants, People ,Planet. 2021;3(2):124-9. Doi: doi.org/10.1002/ppp3.10167
3. Finkel OM, Salas-González I, Castrillo G, Spaepen S, Law TF ,Teixeira PJPL, et al. The effects of soil phosphorus content on plant microbiota are driven by the plant phosphate starvation response. PLoS Biology. Doi:2019;17(11):e3000534. doi.org/10.1371/journal.pbio.3000534
4. Shah A, Subramanian S, Smith DL. Seed priming with Devosia sp. cell-free supernatant (CFS) and citrus bioflavonoids enhance canola and soybean seed germination. Molecules. 2022;27(11):3410. Doi: 10.3390/molecules27113410
5. Kumar A, Chandra D, Pallavi, Sharma AK. Impact of seed applied rhizobacterial inoculants on growth of wheat (*Triticum aestivum*) and cowpea [*Vigna unguiculata*] and their influence on rhizospheric microbial diversity. Agricultural Research. 2022;11(1):1-14. Doi: doi.org/10.1007/s40003-021-00546-y
6. Hernández-Esquivel AA, Castro-Mercado E, García-Pineda E. Comparative effects of *Azospirillum brasilense* Sp245 and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 lipopolysaccharides on wheat seedling growth and peroxidase activity. Journal of Plant Growth Regulation. 2021; 40: 1903- 1911. Doi: doi.org/10.1007/s00344-020-10241-x
7. Abedinzadeh M, Etesami H, Alikhani HA. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. Biotechnology Reports. 2019;21:e00305. Doi: doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00305
8. Fadia A, Ibtissam L, Anass W, Laila R, Moustapha A, Imane W. Comparison of the effect of two categories of *Arthrospira platensis* polysaccharides (exo and endopolysaccharides) on tomato growth: Effect on morphological, histological and biochemical plant growth traits. Journal of Applied Phycology. 2023;35(3):1183-92. Doi: doi.org/10.1007/s10811-023-02948-7