علوم و تحقیقات بذر ایران
سال یازدهم/ شماره دوم/ ۱۴۰۳ (۲۸ - ۱۷)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/jms.2024.8661

اثر باکتری بذرزاد بیماریزای *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* و غیر بیماریزای *Pantoea agglomerans* با قابلیت تولید اکسین و بیوفیلم بر ویژگی‌های کیفی بذر لوبیا

کبری مسلم‌خانی[۱]، بیتا اسکویی[۲]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۳/۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۵/۲۴

چکیده

بذر با کیفیت یکی از پیش نیازهای اصلی تولید محصولات کشاورزی با بازدهی مناسب است. تحقیقات نشان داده از بین عوامل زیستی، باکتریها می‌توانند نقش اساسی در تغییر وضعیف کیفی بذر ایفا نمایند. اثر این میکروارگانیسم‌ها به صورت تعاملات مثبت، خنثی یا خسارت‌زا در گیاهان گزارش شده است. باکتری *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (*Xpp*) یکی از عوامل بذرزاد و بیماریزای مهم در لوبیا است که با وجود اهمیت و خسارتزا بودن آن در مزرعه، تحقیقات چندانی در رابطه با اثرات مستقیم این باکتری بر ویژگی‌های کیفی بذر و قدرت رویشی گیاهچه‌های لوبیا، انجام نشده است. باکتری *Pantoea agglomerans* (*Pa*) هم به عنوان یک باکتری بذرزاد خاص با دامنه متنوعی از سویه‌های بیماریزا و غیر بیماریزا شناخته شده که اثرات آن بر بذر لوبیا همچنان ناشناخته است. تحقیق حاضر پس از جداسازی دو سویه S68 (*Pa*) و SM3(*Xpp*) از بذر لوبیا رقم یاقوت و تعیین پتانسیل این باکتریها در بیماریزایی، تولید هورمون ایندول استیک اسید (IAA)، بیوفیلم، حلالیت فسفات و فیتاز، به بررسی اثر این دو باکتری بذرزاد مهم بر ویژگی‌های کیفی بذر لوبیا پرداخته است. سویه S68 (*Pa*) برخلاف سویه SM3(*Xpp*) قادر به ایجاد علائم بیماری در گیاه لوبیا نبود و توانایی تولید IAA و بیوفیلم آن به ترتیب حدود دو تا سه برابر سویه بیماریزای SM3(*Xpp*) تعیین شد. همچنین این باکتری دارای توانایی حلالیت فسفات و فیتاز مثبت تشخیص داده شد و اثر معنی‌داری در بهبود ویژگی‌های رشدی گیاهچه، افزایش وزن خشک، طول ریشه و گیاهچه و قدرت جوانه‌زنی بذرهای لوبیا داشته است. بذرهای تیمار شده با باکتری بیماریزای SM3(*Xpp*) برخلاف انتظار تفاوت معنی‌داری با بذرهای سالم نداشت و به نظر می رسد تا زمان استقرار کامل باکتری در بافت ساقه و برگ، خسارت مشخصی بر بذر حامل آلودگی وارد نمی شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری، بذرزاد ، بیمارگر ، محرک رشد

۱- دانشیار پژوهش، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کاورزی، تهران، ایران. moslemkhany@yahoo.com
۲- استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کاورزی، تهران، ایران. b_oskouei@yahoo.com
*نویسنده مسئول: moslemkhany@yahoo.com

مقدمه

کیفیت و سلامت بذر، تعیین کننده قدرت جوانه‌زنی، استقرار، رشد گیاه و میزان محصول است (Gupta *et al*., 2017). بذرها حامل میکروارگانیسم‌های متعددی هستند که ممکن است اثرات مثبت یا مخرب بر گیاه داشته باشند (Kefela *et al*., 2015). بسیاری از باکتری‌های بیمارگر از طریق استقرار در سطح بذر بقاء و پراکنش دارند (Darrasse *et al*., 2007) از جمله باکتری‌های بذرزاد برخی گونه‌های Xanthomonas گزارش شده‌اند که بیشتر آنها باعث بروز علائم بیماری در گیاهان می‌شوند اما اثرات مستقیم آنها در کیفیت بذر کمتر مورد توجه قرار گرفته است. باکتری *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (*Xpp*) با استقرار در سطح بذر باعث شروع آلودگی می شود و به دلیل حفاظت باکتری از طریق تولید بیوفیلم، پتانسیل خوبی برای اشغال قسمت‌های هوایی گیاه توسط باکتری گزارش شده است(Darrasse *et al*., 2007; Jacques *et al*., 2005).

Pantoea agglomerans (*Pa*) باکتری شناخته شده بذرزاد دیگری است که سویه‌های آن با تنوع ژنتیکی بالا ممکن است به صورت عوامل بیماریزا یا عوامل باکتریایی مفید معرفی شده باشند (Khodakaramian *et al*., 2020; Wang *et al*., 2022).

برخی گزارشات از اثرات مثبت باکتری *Pa* در القاء رشد گیاهان و حفاظت آنها از بیماری‌ها وجود دارد (Feng *et al*., 2010; Xie *et al*., 2017). برخی از استرین‌های این باکتری به عنوان باکتری‌های بیماریزای بذرزاد مهم در ذرت، برنج و پنبه نیز گزارش شده است (Cao, 2010) و حتی اثرات منفی این باکتری در ویژگی‌های کیفی بذر مشخص شده است (Wang *et al*., 2022). باکتری *Pa* ضمن استقرار در خاک به عنوان باکتری همزیست گیاه نیز سازگار شده است (Zhang and Qiu, 2015). در واقع برخی از ویژگی-های بیوشیمیایی این باکتری باعث سازگاری با طیف وسیعی از میزبان‌ها و شرایط مختلف محیطی شده است (Nadarasah and Stavrinides, 2014; Völksch *et al*., 2009).

تحقیقات متعددی نشان داده‌اند که باکتری‌های مفید مستقر در بذر با تولید متابولیت‌های محرک رشد گیاه به عنوان محرک‌های زیستی باعث رشد گیاه، افزایش جذب مواد مغذی و فتوسنتز و همچنین افزایش کیفیت محصول و مقاومت گیاه به تنش‌های زنده و غیر زنده می‌شوند (Wu and Zou, 2009; Ruzzi and Aroca, 2015; Woo and Pepe, 2018). برخی میکروارگانیسم‌ها نیز قادر به سنتز یا متابولیسم هورمون‌های گیاهی هستند که این هورمون‌ها به دلیل ایجاد تعادل بین رشد گیاه و دفاع در برابر تنش‌ها و عوامل بیماریزا از اهمیت خاصی برخوردارند (Saia *et al*., 2020; Bonini *et al*., 2020).

توانایی سنتز اکسین IAA در هر دو گروه باکتری‌های بیمارگر و باکتری‌های محرک رشد گزارش شده است. تولید این هورمون در باکتری‌های بیماریزا ممکن است پیامدهای بیولوژیکی و اکولوژیکی متفاوتی را برای باکتری به همراه داشته باشد (Duca *et al*., 2014).

محققین نشان داده اند برخی باکتری‌ها نظیر سویه‌های *Pa* می‌توانند IAA و ترکیبات مرتبط با اکسین را تولید کنند (Spaepen, 2015). البته تولید اکسین‌های باکتریایی در بین سویه‌های مختلف متفاوت است و تحت تاثیر شرایط رشد و وجود پیش ساز (تریپتوفان) تغییر می‌کند (Duca *et al*., 2014). برخی از استرین های این باکتری ضمن اینکه به عنوان محرک رشد گیاه با توانایی انحلال فسفات، تولید IAA و تولید سیدروفور شناخته شده‌اند (Luziatelli *et al*. , 2020)، قابلیت بیوکنترل بیماری‌ها از طریق تولید آنتی بیوتیک‌ها یا مکانیسم‌های دیگر را هم نشان داده‌اند (Dutkiewicz *et al*., 2016; Pusey *et al*., 2011).

با توجه به اینکه دو باکتری مورد اشاره از مهمترین میکروارگانیسم‌های بذرزاد در لوبیا هستند و اثرات دقیق این باکتر ها بر ویژگی‌های کیفی بذر لوبیا مشخص نشده است؛ تحقیق حاضر ضمن بررسی برخی از توانایی‌های این دو باکتری به بررسی اثرات آنها بر فاکتورهای کیفی و رویشی بذر لوبیا پرداخته است.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری از بذر لوبیا

برای جداسازی باکتری‌های ابتدا ۲۵۰ گرم از بذر بوته-های آلوده لوبیا (رقم یاقوت) به باکتری *X. phaseoli* pv *phaseoli* برداشت و با دو و نیم برابر حجم خود بافر نمکی به‌مدت چهار ساعت در دمای یخچال نگهداری و سپس در محیط YDC (Yeast dextrose carbonate agar) به‌صورت سری رقت کشت شدند. کلنی‌های زرد رنگ لعابدار و بدون لعاب پنج روز پس از کشت از محیط جدا و خالص شدند. در تمام مراحل آزمایشات سویه‌های استاندارد باکتری

X. phaseoli pv *phaseoli* و *P. agglomerans* که به ترتیب از کلکسیون دانشگاه ولی عصر رفسنجان و مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال دریافت شده بود به عنوان شاهد برای بهینه سازی آزمون‌های تشخیصی استفاده شد. کلنی های منتخب برای شناسایی اولیه از نظر آزمون گرم، فوق حساسیت (روی توتون) و بیماریزایی (روی غلاف و گیاهچه لوبیا) بررسی شدند (Gilbertson *et al*., 2017).

توالی‌یابی و همردیفی

برای شناسایی دقیق‌تر سویه‌های زرد رنگ گرم منفی، پس از استخراج DNA با روش جوشاندن، تکثیر و تعیین توالی ناحیه ژن حفاظت شده 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) 27F (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) و 1492R (Lane 1991) با استفاده از محلول Taq 2x Master Mix Red طبق دستورالعمل شرکت سازنده (آمپلیکون) و در واکنش ۲۵ میکرولیتری انجام شد. چرخه‌های دمایی واکنش به صورت واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه انجام شد. محصول تکثیر شده پس از بررسی کیفیت روی ژل آگاروز یک و نیم درصد، جهت تعیین توالی به شرکت بیومجیک (Bio Magic Gen Co, China) ارسال شد. بر اساس شباهت توالی‌های دریافت شده با توالی‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی NCBI باکتری شناسایی شد. تشخیص اختصاصی باکتری *Xpp* با استفاده از آزمون PCR و پرایمرهای p7X4c و p7X4e انجام شد (Audy *et al*. ,1994).

تولید ایندول استیک اسید

توانایی سویه های منتخب در تولید ایندول استیک اسید به روش رنگ سنجی سالکوفسکی انجام شد. سویه ها درون محیط کشت NB حاوی ۲۰۰ میلی گرم در لیتر ال-تریپتوفان کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ^{o}C ۲۸ درانکوباتور شیکردار با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت آنها به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و یک میلی لیتر از فاز رویی با ۲ میلی لیتر معرف Salkowski (۷,۵ میلی لیترFeCl3.6H2O نیم مولار، ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر استریل ، ۱۵۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ) مخلوط و ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد و در نهایت غلظت نوری آنها در طول موج ۵۳۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفت (Bent *et al*., 2001).

آزمون تولید آنزیم فیتاز

برای بررسی تولید آنزیم فیتاز ابتدا یک لوپ از کشت تازه باکتری به صورت نقطه‌ای در محیط غربالگری مربوط به آنزیم فیتاز PSM (Phytase Screening Medium) کشت و درون انکوباتور با دمای ۳۰ درجه نگهداری شدند. پس از ۴۸ ساعت مشاهده هاله شفاف اطراف کلنی باکتری نشان دهنده تولید آنزیم فیتاز و تجزیه فیتات محیط می‌باشد. محیط اختصاصی PSM شامل ۱۵ گرم گلوکز، ۵ گرم فیتات سدیم Na-phytate ، ۵ گرم آمونیوم سولفات (NH4)2 SO4، ۰/۵ گرم کلرید پتاسیم KCl، ۰/۵ گرم منیزیم سولفات Mg SO4.7H2O ، ۰/۱ گرم سدیم کلرید NaCl، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم CaCl2، ۰/۰۱ گرم سولفات آهن FeSo4.7H2O، ۰/۰۱ گرم سولفات منگنز MnSo4.H2O، و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب با pH=6.5 – 7 می‌باشد (Sasirekha *et al*., 2012).

آزمون توانایی محلول‌سازی فسفات

سویه‌های مختلف باکتری از نظر توان حل فسفات ارزیابی شدند. برای این منظور سویه‌های باکتری روی محیط کشت حاوی ۵ گرم MgCl2. 6H2O، ۰/۲۵ گرمMgSO4. 7H2O، ۰/۲ گرم KCl، ۰/۲ (NH4)2SO4، ۵ گرم Ca3(PO4)2، ۱۰ گرم گلوگز و ۱۵ گرم آگار به صورت نقطه‌ای کشت داده شدند و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. مشاهده هاله شفاف اطراف کلونی باکتری نشان دهنده توانایی در محلول-سازی فسفات و مثبت بودن آزمون برای سویه مورد نظر می‌باشد (Castagno *et al*., 2011).

تولید بیوفیلم

تشکیل بیوفیلم از طریق سنجش کمی با استفاده از پلیت‌های الیزا حاوی ۹۶ چاهک با رنگ آمیزی کریستال ویوله انجام (Sorroche *et al*., 2012) شد. بدین صورت که باکتری‌ها در ۱,۵ میلی‌لیتر محیط مایع مغذی به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس رشد داده شدند، سپس به صورت ۱۰۰/۱ رقیق شده و به مدت ۴۸ ساعت

تحت شرایطی مشابه نگهداری شدند. پس از آن سوسپانسیون باکتری به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ °C نگهداری شد. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون با دو تکرار داخل چاهک پلیت ریخته شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت سوسپانسیون باکتری داخل پلیت الایزا به آرامی تخلیه و پلیت با بافرسالین فسفات PBS (NaCl ۸ گرم، Na_2HPo_4 ۱,۱۵ گرم، KH_2Po_4 ۰,۲ گرم، KCl ۰,۲ گرم، PH:7.2) شستشو داده شد. پس از شستشو و تخلیه چاهک‌ها جهت تشخیص بیوفیلم، ۲۰۰ میکرولیتر محلول استات سدیم ۲ درصد به هر چاهک اضافه و پس از چند دقیقه به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۰,۱ درصد اضافه و پس از ۱۵ دقیقه با آب مقطر دوبار تقطیر شستشو داده شد. پس از آن درهر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر الکل ۹۵ درصد ریخته شد. سپس تراکم نوری (OD) چاهک ها در طول موج ۴۹۰ و ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه MicroELISA Auto Reader ثبت و نتایج بر اساس روش باسون و همکاران امتیاز دهی و تحلیل انجام شد (Basson *et al*., 2008).

بررسی اثر تیمار بذر با باکتریهای منتخب بر ویژگی های کیفی بذر

سوسپانسیونی از سلول‌های جوان باکتری‌های *Xpp* و *Pa* (کشت ۲۴ ساعته) با جمعیت 10^8 CFU/ml به صورت جداگانه تهیه شد. به منظور افزایش میزان چسبندگی سلول‌های باکتریایی به بذر و جلوگیری از آبشویی CMC (Carboxymethyl cellulose) یک درصد به آنها اضافه شد. سپس بذرها به مدت ۱۵ دقیقه درون سوسپانسیون نگهداری و پس از خروج از سوسپانسون بذرها به مدت یک شب در دمای اتاق خشک شدند. از بذرهای تیمار نشده با باکتری به عنوان شاهد در آزمایشات استفاده شد.

اثر تیمار باکتریایی بر کیفیت بذرها در آزمایشگاه تجزیه کیفی بذر موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال کرج طبق دستورالعمل های ISTA بررسی شد. آزمایشات بصورت طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام شدند. از هر تیمار چهار تکرار ۱۰۰ بذری به‌طور تصادفی انتخاب و در بستر بین کاغذ (BP) کشت شد. کاغذ کشت مورد استفاده از جنس سلولز، اسیدیته ۷-۶ و هدایت الکتریکی آن ۱۰۰ میکروزیمنس بر سانتی‌متر بود (Anonymous, 2024) . سپس بسترهای کشت به مدت ۹ روز در شرایط نور کامل و دمای ثابت ۲۵ درجه سیلسیوس قرار گرفتند (Anonymous, 2024). مشخصات نور مورد استفاده در این مطالعه ۳۰۰۰ کلوین از نوع سفید مهتابی بود (Anonymous, 2024). شمارش بذرهای جوانه‌زده روزانه انجام شد و معیار جوانه‌زنی خروج ریشه‌چه به مقدار ۲ میلی‌متر بود (Ghaderi-Far and Soltani., 2014). در پایان دوره آزمایش درصد گیاهچه عادی و درصد گیاهچه غیر عادی مطابق دستورالعمل انجمن بین المللی آزمون‌های بذر شناسایی و محاسبه شد (Anonymous, 2018).

به‌منظور بررسی و ارزیابی بنیه بذر و گیاهچه پس از پایان آزمون جوانه‌زنی استاندارد، تعداد ۱۰ گیاهچه عادی به‌طور تصادفی از هر تکرار انتخاب و طول گیاهچه، ساقه و ریشه اولیه با استفاده از خط‌کش مدرج برحسب سانتی‌متر اندازه گیری شد، در مرحله بعد وزن خشک گیاهچه ها پس از خشک شدن در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت، توزین شدند. با استفاده از داده‌های به‌دست آمده، دو شاخص طولی و وزنی بنیه گیاهچه از طریق رابطه-های زیر تعیین شدند (Ranal and Santana, 2006):

(رابطه ۱): درصد جوانه‌زنی نهایی × (میانگین طول گیاهچه = شاخص طولی بنیه گیاهچه

(رابطه ۲): درصد جوانه‌زنی نهایی × وزن خشک گیاهچه = شاخص وزنی بنیه گیاهچه

تجزیه‌وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارها SAS V. 9 انجـام شد (Joosen *et al*., 2010; SAS Institute. 1994).

نتایج و بحث

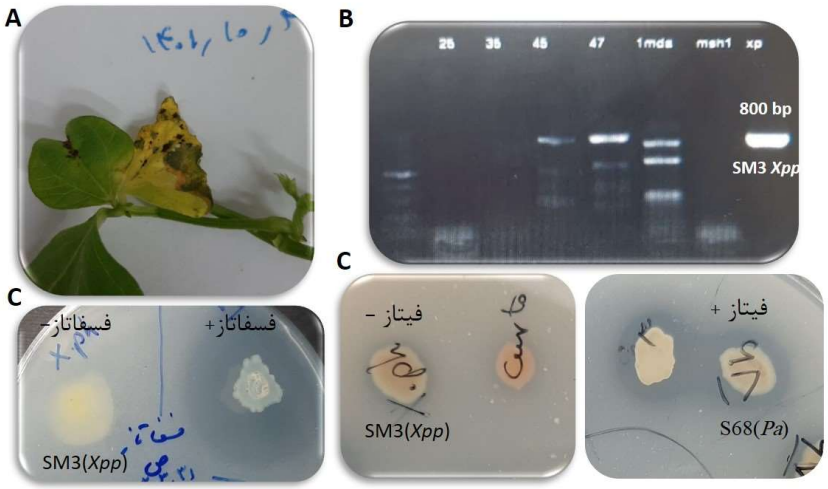
از بذرهای برداشت شده از بوته آلوده به بیماری بلایت باکتریایی لوبیا، هر دو باکتری *Xpp* و *Pa* جدا سازی شد. کلنی های هر دو باکتری با نام‌های S68(*Pa*) و SM3(*Xpp*) روی محیط YDC به رنگ زرد و مشابه دیده می شوند با این تفاوت که کلنی های SM3(*Xpp*) کمی لعابدارتر بودند. سویه S68(*Pa*) برخلاف SM3(*Xpp*) روی توتون واکنش فوق حساسیت نشان ندادند و قادر به ایجاد علائم بیماری روی گیاهچه‌های لوبیا نبود و علائم آبسوختگی روی غلاف لوبیا ایجاد ننمود (جدول ۱). برخی از سویه‌های باکتری *Pa* به عنوان بیمارگر در گیاه فعالیت می‌نمایند در حالیکه برخی سویه‌ها در تحریک رشد گیاه و کنترل سایر عوامل بیماریزا بسیار مؤثر عمل می‌کنند بنابراین تمایز سویه‌های مضر و مفید به ویژه در تولید محصولات بیولوژیک از این باکتری بسیار حائز اهمیت است (Lorenzi *et al*., 2022).

جدول ۱- برخی ویژگی های بررسی شده دو باکتری *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* و *Pantoea agglomerans*

Table 1. Some investigated traits of *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and *Pantoea agglomerans*

نام سویه strain name	مورفولوژی و رنگ کلنی در YDC Colony morphology and color in YDC	واکنش بیماریزایی در لوبیا Pathogenicity on bean	واکنش فوق حساسیت در توتون Hypersensitivity reaction in tobacco	واکنش گرم Gram reaction	تولید اکسین Auxin production	تولید بیوفیلم Biofilm production	حلالیت فسفات Phosphate solubility	فیتاز Phytase
S68(*Pa*)	زرد با لعاب کم high mucoid -yellow	-	-	-	++	+++	++	++
SM3(*Xpp*)	زرد با لعاب متوسط medium mucoid -yellow	+	+	-	+	+	-	-

بر اساس توالی یابی و همردیفی توالی‌های 16Sr DNA در NCBI سویه S68(*Pa*) (با شماره دسترسی PQ01074) ۹۵/۰۶ درصد شباهت با توالی سویه Y03 باکتری *Pa* (با شماره دسترسی CP144368.1) نشان داد. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی p7X4c و p7X4e نیز با تکثیر قطعه مورد انتظار ۸۰۰ bp تعلق سویه SM3(*Xpp*)، به باکتری *Xpp* مشخص شد (شکل ۱).



شکل۱-A. علائم بیماریزایی باکتری *Xanthomonas phaseoli* pv *phaseoli* روی گیاهچه لوبیا (رقم یاقوت)، B- ردیابی *XPP* با استفاده از آزمون PCR و پرایمر اختصاصی با محصول ۸۰۰ جفت باز. C: برخلاف SM3(*Xpp*)، سویه S68(*Pa*) قادر به تولید آنزیم فیتاز و توانایی حلالیت فسفات می‌باشد (ظهور هاله اطراف کلنی مثبت بودن آزمون را نشان می دهد).

Figure 1. A: Disease symptoms of *Xanthomonas phaseoli* pv *phaseoli* on bean plantlet (Yaghout cultivar). B: Detection of *Xpp*, using PCR and specific primer with 800 bp product. C: Unlike SM3(*Xpp*), S68(*Pa*) isolate produced phytase enzyme and showed the ability to phosphate solubility (the appearance of the halo around the colony determined the positive reaction).

گونه‌های جنس Pantoea به عنوان میکروارگانیسم‌های پیچیده با سویه‌های متنوعی هستند که رفتارهای متفاوت مفید و مضری را از خود در تعامل با گیاهان نشان می‌دهند برخی از سویه‌ها از طریق مکانیسم‌های مستقیم یا غیر مستقیم و عمدتاً تثبیت نیتروژن، تامین فسفات و تولید فیتوهورمون‌ها (مانند اکسین) باعث بهبود فاکتورهای رویشی گیاهان میزبان می‌شوند (Lorenzi *et al*., 2022).

آزمایشات نشان داد هر دو باکتری ضمن تولید بیوفیلم، قابلیت تولید هورمون اکسین ایندول استیک اسید را در حضور پیش ماده ال-تریپتوفان دارد و تغییر رنگ محیط به

صورتی مایل به قرمز نشان‌دهنده تولید اکسین توسط سویه های باکتری می‌باشد.

استرین های *Pa* تولید اکسین ایندول استیک اسید می‌کنند که اثرات فیزیولوژیکی مهمی در تعاملات باکتری-گیاه دارد و در تغییرات سیستم ریشه و ساختار بافت ریشه تعیین کننده است (Spaepen, 2015). در مجموع IAA و عناصر مرتبط با آن اغلب همراه با سایر تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تولید می‌شوند که می‌توانند اثر محرک رشد فیتوهورمون‌های میکروبی را افزایش دهند (Stringlis *et al*., 2018).

هورمون IAA توسط باکتری‌های بیمارگر از جمله *Xpp* نیز تولید می شود این هورمون در تعامل گیاه میزبان با بیمارگر نقش کلیدی دارد و از نظر فیزیولوژیکی اشغال بافت ریشه توسط بیمارگر را تسهیل می‌نماید (Ahmad *et al*., 2022). در واقع این هورمون از طریق تعاملات بین باکتری های مفید یا بیمارگر مولد IAA و گیاهان منجر به نتایج متنوعی در گیاه می شود که می تواند از تسهیل بروز بیماری تا تحریک رشد گیاه متفاوت باشد. باکتری‌ها از این هورمون گیاهی برای تعامل با گیاهان به عنوان بخشی از استراتژی استعمار خود، از جمله دور زدن مکانیسم‌های دفاعی پایه گیاه استفاده می‌کنند (Spaepen *et al*., 2007).

نتایج نشان داد سویه S68(*Pa*) قابلیت رهاسازی فسفات از منابع آلی و معدنی فسفات را برخلاف سویه بیماریزای SM3(*Xpp*) نشان داد. فسفر به عنوان یک درشت مغذی مهم است که گیاه در جذب آن محدودیت دارد. گزارشات مختلفی اثر سویه‌های *P. agglomerans* مستقر در خاک را در رهاسازی فسفر از ترکیبات نامحلول و افزایش جذب آن توسط گیاه را تایید کرده‌اند (Saadouli *et al*., 2021; Malboobi *et al*., 2009).

محققان نشان داده‌اند ژنوم سویه‌های مفید *Pa* دارای چندین ژن هستند که مرتبط با ویژگی‌های محرک رشدی آنها است؛ به ویژه این ژن‌ها با توانایی حلالیت فسفات و تولید IAA توسط باکتری مرتبط هستند (Zhang *et al*. ,2019; Wu *et al* 2021).

هر دو باکتری مورد بررسی بیوفیلم تولید می‌نمایند. تحقیقات نشان داده است که تولید بیوفیلم توسط باکتری‌ها در بقاء آنها اهمیت دارد. سویه S68(*Pa*) دارای قدرت تولید بیوفیلم بسیار قویتری نسبت به سویه بیماریزای SM3(*Xpp*) است. ایجاد بیوفیلم منافع زیادی برای باکتری فراهم می آورد. در واقع اتصال به سطح گیاه، معمولاً اولین مرحله ایجاد تجمع باکتریایی است که می‌تواند جمعیت باکتری را در برابر سیستم دفاعی گیاه محافظت نماید (Danhorn and Fuqua, 2007). همچنین بیوفیلم در محافظت از سلول‌های باکتریایی در برابر تنش‌های مختلف محیطی ایفای نقش می‌نمایند (Ansari *et al*., 2024). در باکتری‌های مفید بیوفیلم از عوامل دخیل در تحریک رشد گیاه و سرکوب بیمارگرهای گیاهی شناخته شده است (Haque *et al*., 2020).

نتایج تجزیه واریانس داده‌های آزمون‌های تجزیه کیفی بذر نشان داد که اثر تیمار بذر با سویه غیر بیماریزا S68 (*Pa*) بر تمامی ویژگی‌های بررسی شده از جمله درصد جوانه زنی، درصد گیاهچه‌های عادی، وزن خشک، طول گیاهچه و شاخص طولی بنیه گیاهچه، شاخص وزنی بنیه گیاهچه معنی دار بوده است این در حالی است در مقایسه با بذور سالم، بذوری که توسط سویه بیماریزای SM3 (*Xpp*) تیمار شده بودند، تغییر معنی داری در هیچکدام از ویژگی-های ذکر شده نشان ندادند (جدول ۲ و ۳).

همانگونه که نتایج مقایسه میانگین (جدول ۳) نشان می‌دهد درصد جوانه‌زنی و درصد گیاهچه های عادی در تیمار S68(*pa*) حدود پنج درصد بیش از تیمارهای شاهد و SM3(*Xpp*) بود. از طرف دیگر درصد گیاهچه غیرعادی در تیمار شاهد و SM3(*Xpp*) بیش از دو برابر تیمار S68(pa) بوده است که نشان‌دهنده اثر مثبت سویه S68(*pa*) بر کیفیت جوانه زنی بذر می‌باشد.

نتایج مقایسه میانگین وزن خشک و طول گیاهچه و همچنین شاخص‌های وزنی و طولی بنیه گیاهچه نشان داد بذرمال نمودن بذرها به باکتری S68(*pa*) منجر به افزایش معنی‌دار صفات مورد اندازه‌گیری شده است (جدول ۳)

نتایج نشان داد سویه SM3 (*Xpp*) علی‌رغم اینکه یک عامل بیماریزای خسارت‌زا در گیاه لوبیا محسوب می‌شود اما در مراحل اولیه جوانه‌زنی اثرات مخربی بر بذر و گیاهچه نشان نداده است و اختلاف آماری معنی‌داری در بذر تیمار نشده (شاهد) و بذر تیمار شده با سویه SM3(*Xpp*) در کیفیت جوانه‌زنی و بنیه گیاهچه مشاهده نشد (جدول ۳).

سویه S68(*Pa*) از طریق ترشح هورمون‌های تحریک کننده رشد مانند اکسین و سایر ویژگی‌های مثبت آن نظیر

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) شاخص‌های جوانه‌زنی بذر لوبیا در تیمارهای بذر به وسیله باکتری‌های بذرزاد بیمارگر *Xpp* و غیر بیماریزا *Pa*

Table 2. Analysis of variance (mean squared) of seed germination indices of *Phaseolus vulgaris* under different treatments with seed borne pathogenic bacteria, *Xpp* and non-pathogenic *Pa*.

منابع تغییر SOV	درجه آزادی DF	درصد جوانه زنی Germination percentage	درصد گیاهچه عادی Normal seedling percentage	درصد گیاهچه غیرعادی Abnormal seedling percentage	وزن خشک گیاهچه Seedling dry matter	طول گیاهچه Seedling length	شاخص بنیه وزنی Weight vigour index	شاخص بنیه طولی Length vigour index
تیمار Treatment	2	74.00**	206.16**	33.16**	0.040**	427.98**	486.91**	5522005.68**
خطا Error	9	26.25	66.75	21.50	0.009	31.80	92.15	441896.47
CV		1.78	3.01	15.98	11.74	4.78	11.95	5.86

**، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح یک درصد آزمون دانکن

** Indicates significant at 1 percent levels of Duncan test

جدول۳- مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی بذر لوبیا در تیمارهای بذر به وسیله باکتری‌های بذرزاد بیمارگر *Xpp* و غیر بیماریزا *Pa*

Table 3. Mean comparison of seed germination indices of *Phaseolus vulgaris* under different treatments with seed borne pathogenic bacteria, *Xpp* and non-pathogenic *Pa*.

تیمار Treatment	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	درصد گیاهچه عادی Normal seedling percentage	درصد گیاهچه غیرعادی Ab normal seedling percentage	وزن خشک گیاهچه Seedling dry matter	طول گیاهچه Seedling length	شاخص بنیه وزنی Weight vigour index	شاخص بنیه طولی Length vigour index
شاهد (Control)	93.75b	87.00b	6.75a	0.23b	34.40b	22.22b	3228.6b
SM3(*Xpp*)	94.250b	88.00b	6.25a	0.237b	35.77b	22.31b	3372.7b
S68(*Pa*)	99.25a	96.25a	3.00b	0.36a	47.7a	35.78a	4734.3a

میانگین‌های دارای حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار با آزمون دانکن در سطح یک درصد می‌باشند.

Means followed by similar letter are not significantly different at 1% probability levels using Duncan test.

قدرت بیوفیلم بالا و تولید آنزیم فسفاتاز و فیتاز در افزایش تعداد و طول سلول‌های ریشه چه و ساقه چه و افزایش طول و وزن آنها موفق عمل نموده است و درصد جوانه زنی را به طور معنی‌داری تا حدود شش درصد نسبت به بذور شاهد (بدون تیمار) افزایش داده است. محققان نشان داده‌اند ویژگی‌های کیفی بذر با مکانیسم‌های مختلفی کنترل می شود، هورمون‌های گیاهی که برخی از آنها توسط باکتری‌ها نیز تولید می‌شوند یکی از عوامل مهم در جوانه زنی و رشد بذر به شمار می روند.

در بین هورمون‌های گیاهی اکسین به خودی خود هورمون لازم برای جوانه زنی بذر نیست. با این حال بررسی بیان ژن‌های مرتبط با اکسین نشان داده است اکسین در نوک ریشه چه در طول و بعد از جوانه‌زنی بذر وجود دارد و اگرچه برای جوانه زنی بذر یک فاکتور ضروری نمی باشد اما برای رشد گیاهچه‌ها بسیار حائز اهمیت است (Hentrich *et al*., 2013). در واقع برخی ژن‌های گیاهی وجود دارند که با سیگنال دهی هورمونی IAA و جیبرلین ها فعال می‌شوند (Miransari and Smith, 2014; Graeber *et al*., 2012) و نقش محوری این هورمون ها را در ظهور ریشه های فرعی و تنظیم ساختار ریشه مشخص می‌نمایند (Li *et al*., 2009; Waidmann et al., 2020). در مورد باکتری بیمارگر *Xpp* به دلیل تولید بسیار اندک اکسین به نظر می رسد این هورمون صرفاً به حمایت باکتری جهت استقرار در ریشه گیاه میزبان می‌پردازد و اثرات مؤثری در رشد گیاه نداشته است.

باکتری *Pa* قادر به تولید آنزیم فسفاتاز و فیتاز می باشد. اسید فیتیک (فیتات) شکل اصلی فسفر آلی در خاک است و به دلیل تشکیل کمپلکس با کاتیون‌ها یا جذب شدن به

ترکیبات شیمیایی موجود درخاک، نمی‌تواند به راحتی در دسترس گیاهان به عنوان منبع فسفر قرار گیرد (Singh and Satyanarayana, 2011). به نظر می‌رسد تولید آنزیم فیتاز توسط سویه S68(*Pa*) باعث هیدرولیز این فرم فسفر آلی در خاک می شود و تحریک رشد گیاه از طریق دریافت فسفر کافی را به ارمغان می آورد (Jorquera *et al*., 2008). تحقیقات دیگری نشان داده تیمار گیاه با باکتری‌هایی با توانایی تولید آنزیم فیتاز باعث افزایش وزن خشک و محتوای فسفات در جوانه‌ها می شود که با نتایج مطالعه حاضر انطباق دارد (Patel *et al*., 2010; Singh and Satyanarayana, 2011).

در خصوص سویه SM3(*Xpp*) علی‌رغم اینکه این باکتری به عنوان یک عامل بیماریزای بذرزاد شناخته شده است و یکی از روش‌های اصلی انتشار آن نیز بذر آلوده است اما تحقیق حاضر نشان داد استقرار این باکتری در سطح بذر حداقل تا زمان استقرار کامل در گیاه و توسعه جمعیت باکتری در بافت های ساقه و برگ، اثر مخربی بر کیفیت بذر نشان نمی‌دهد و میزان جوانه زنی، طول ریشه چه، طول گیاهچه و وزن خشک آنها تفاوت معنی‌داری با بذر سالم نداشت. برای ظهور بیماری لازم است باکتری در مرحله نخست بافت ریشه را کلنه نماید و سپس با استقرار در گیاه بتواند با توسعه سیستمیک، افزایش جمعیت و تجمع بیوفیلم در آوند و بافت های گیاهی باعث بروز علائم بیمار شود و خسارت بیماری پس از استقرار و فعالیت کامل عامل بیمارگر حاصل می شود (Guttenplan & Kearns, 2013; Harding *et al*., 2019).

نتیجه گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که باکتری بذرزاد *Pa* اثرات مثبت معنی‌داری در بهبود جوانه زنی و شاخص‌های رشد طولی و وزنی گیاهچه‌های تیمار شده لوبیا داشت. این باکتری با ویژگی‌های محرک رشدی نظیر تولید اکسین، آنزیم فیتاز و توانایی حلالیت فسفات باعث ارتقاء وضعیت کیفی بذر و گیاهچه شده است. اگرچه تیمار بذر با سویه S68 (*Pa*) برای رشد گیاهچه‌های مورد بررسی بسیار مؤثر واقع شد و هیچگونه علائمی از ایجاد بیماری نشان نداد اما به دلیل تنوع گسترده سویه‌های مفید و بیماریزا در گونه *Pa* لازم است برای استفاده از این سویه‌ها در محصولات بیولوژیک، جوانب مختلف آن از نظر بیماریزایی و محرک رشدی کاملاً بررسی شود. بر خلاف انتظار سویه SM3(*Xpp*) که به عنوان یک بیمارگر بذرزاد خسارتزا در لوبیا مطرح است در شرایط آلودگی مصنوعی با جمعیت زیاد اثر مخرب در فرایند جوانه زنی و رشد گیاهچه در مقایسه با شاهد نشان نداد و به نظر می‌رسد تا زمان استقرار کامل باکتری در بافت ساقه و برگ، خسارت در مراحل اولیه رشد گیاهچه‌ها ظاهر نمی‌شود اگرچه در مزارع با آلودگی بسیار بالا، چروکیدگی و تغییر رنگ بذر (در غلاف‌های به شدت آلوده) گزارش شده است اما به نظر می‌رسد آلودگی‌های سطحی اثر مخرب بر جوانه زنی ندارد. درک جنبه‌های مختلف تعاملات باکتری‌های بذرزاد و گیاه میزبان، می‌تواند راهگشای توسعه استراتژی‌های مدیریتی بیماریهای بذرزاد و بهبود شاخص‌های رشد گیاه شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از همکاری دانشگاه ولی عصر رفسنجان در تامین جدایه مرجع و مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال به دلیل فراهم نمودن شرایط برای اجرای این تحقیق و همکاری صمیمانه سرکار خانم دکتر صادقی (محقق آزمایشگاه مارکرهای مولکولی SPCRI کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند.

منابع

Ahmad, E., Sharma, P.K. and Khan, M.S. 2022. IAA biosynthesis in bacteria and its role in plant-microbe interaction for drought stress management. In: Vaishnav, A., Arya, S., and Choudhary, D. (Eds.) Plant stress mitigators. Singapore: Springer nature, pp: 235-258. **(Book)**

Anonymous, 2018. ISTA Handbook on Seedling Evaluation. International Seed Testing Associations. **(Book)**

Anonymous, 2024. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Associations. **(Book)**

Ansari, F.A., Ahmad, I., Pichtel, J. and Husain, F.M. 2024. *Pantoea agglomerans* FAP10: A novel biofilm-producing PGPR strain improves wheat growth and soil resilience under salinity

stress. Environmental and Experimental Botany, 222: 105759. doi:10.1016/j.envexpbot.2024.105759 **(Journal)**

Audy, P., Laroche, A., Saindon, G., Huang, H.C. and Gilbertson, R.L. 1994. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c*. pv. *phaseoli* var. fuscans, using the polymerase chain reaction. Phytopathology, 84: 1185-1192. doi: 10.1094/Phyto-84-1185. **(Journal)**

Basson, A., Flemming, L.A. and Chenia, H.Y. 2008. Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of Flavobacterium johnsoniae-like isolates. Microbial ecology, 55: 1-14. doi: 10.1007/s00248-007-9245-y. **(Journal)**

Bent, E., Tuzun, S., Chanway, C.P. and Eneback, S. 2001. Alterations in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology, 47:793-800. doi: 10.1139/w01-080. **(Journal)**

Bonini, P., Rouphael, Y., Miras-Moreno, B., Lee, B., Cardarelli, M., Erice, G., Cirino, V., Lucini, L. and Colla, G. 2020. A microbial-based biostimulant enhances sweet pepper performance by metabolic reprogramming of phytohormone profile and secondary metabolism. Frontiers in Plant Science, 11: 567388. doi:10.3389/fpls.2020.567388 .**(Journal)**

Cao, H.Y. 2010. Seed transmission of *Pantoea agglomerans*, causal agent of dry stalk rot in maize. Beijing, Chinese Academy of Agricultural Sciences. 31-36. doi:10.3724/SP.J.1011.2011.00353. **(Journal)**

Castagno, L.N., Estrella, M.J., Sannazzaro, A.I., Grassano, A.E., & Ruiz, O.A. 2011. Phosphate-olubilization mechanism and in vitro plant growth promotion activity mediated by *Pantoea eucalypti* isolated from Lotus tenuis rhizosphere in the Salado River Basin (Argentina). Journal of applied microbiology, 110(5): 1151-1165. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.04968.x. **(Journal)**

Danhorn, T. and Fuqua, C. 2007. Biofilm formation by plant-associated bacteria. Annual Review of Microbiology, 61: 401-422. doi: 10.1146/annurev.micro.61.080706.093316. **(Journal)**

Darrasse, A., Bureau, C., Samson, R., Morris, C.E. and Jacques, M.A. 2007. Contamination of bean seeds by *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with low bacterial densities in the phyllosphere under field and greenhouse conditions. European Journal of Plant Pathology, 119: 203-215. doi:10.1007/s10658-007-9164-2. **(Journal)**

Duca, D., Lorv, J., Patten, C.L., Rose, D. and Glick, B.R. 2014. Indole-3-acetic acid in plant–microbe interactions. Antonie Van Leeuwenhoek, 106: 85-125. doi: 10.1007/s10482-013-0095-y. **(Journal)**

Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M.K., Marcin, G. and Milanowski, J. 2016. *Pantoea agglomerans*: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 23(2): 206– 22. doi: 10.5604/12321966.1203879. **(Journal)**

Feng, Y.J., Shen, D.L. and Song, W. 2010. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and afects allocations of host photosynthates. Journal of Applied Microbiology, 100(5): 938–945. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.02843.x. **(Journal)**

Ghaderi-Far, F., and Soltani, A. 2014. Seed testing and control. Publications University of Mashhad. 200 pp. (in Persian) **(Book)**

Gilbertson, R.L., O'Leary, M., Agarkova, I.V., and Vidaver, A.K. 2017. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* in Common Bean Seeds. In: Fatmi, M., Walcott, R.R., and Schaad, N.W. (Eds.) Detection of Plant-Pathogenic Bacteria in Seed and Other Planting Material, Second Edition. The American Phytopathological Society, pp: 63-71. **(Book)**

Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G. and Soppe, W., 2012. Molecular mechanisms of seed dormancy. Plant Cell Environ, 35: 1769–1786. doi:10.1111/j.1365-3040.2012.02542.x**. (Journal)**

Gupta, R.C., Seth, M., and Bhaduri, A.P. 2017. Determinants of maize seed income and adoption of foundation seed production: evidence from palpa district of Nepal. Agriculture and Food Security, 6(1), 41. doi:10. 1186/s40066-017-0119-3. **(Journal)**

Guttenplan, S.B. and Kearns, D.B. 2013. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. FEMS Microbiology Reviews, 37: 849–71. doi: 10.1111/1574-6976.12018. **(Journal)**

Haque, M.M., Mosharaf, M.K., Khatun, M., Haque, M.A., Biswas, M.S., Islam, M.S. and Siddiquee, M.A. 2020. Biofilm producing rhizobacteria with multiple plant growth-promoting traits promote

growth of tomato under water-deficit stress. Frontiers in Microbiology, 11, 542053. doi: 10.3389/fmicb.2020.542053. **(Journal)**

Harding, M., Nadworny, P., Buziak, B., Omar, A., Daniels, G. and Feng, J. 2019. Improved methods for treatment of hytopathogenic biofilms: metallic compounds as anti-bacterial coatings and fungicide tank-mix partners. Molecules, 24: 2312. doi: 10.3390/molecules24122312. **(Journal)**

Hentrich, M., Boettcher, C. and Duchting, P., 2013. The jasmonic acid signaling pathway is linked to auxin homeostasis through the modulation of YUCCA8 and YUCCA9 gene expression. The Plant Journal, 74: 626–637. doi: 10.1111/tpj.12152. **(Journal)**

Jacques, M.A., Josi, K., Darrasse, A. and Samson, R. 2005. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. fuscans is aggregated in stable biofilm population sizes in the phyllosphere of field-grown beans. Applied and Environmental Microbiology, 71(4): 2008–2015. doi:10.1128/AEM.71.4.2008-2015.2005. **(Journal)**

Joosen, R.V., Kodde, J., Willems, L.A., Ligterink, W., van der Plas, L.H., and Hilhorst, H.W. 2010. Germinator: a software package for high-throughput scoring and curve fitting of Arabidopsis seed germination. The Plant Journal, 62: 148-15. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04116.x. **(Journal)**

Jorquera, M., Martínez, O.S.C.A.R., Maruyama, F., Marschner, P. and de la Luz Mora, M. 2008. Current and future biotechnological applications of bacterial phytases and phytase-producing bacteria. Microbes and environments, 23(3): 182-191. doi:10.1264/jsme2.23.182 **(Journal)**

Kefela, T., Gachomo, E.W. and Kotchoni, S.O. 2015. *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis* and *Bradyrhizobium japonicum* IRAT FA3 promote faster seed germination rate, growth and disease resistance under pathogenic pressure. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 3:1. doi:10.4172/2329-9029.10001 45 . **(Journal)**

Khodakaramian, G., Gholamalizadeh, R. and Ebadi, A.A. 2020. *Pantoea ananatis*, a rice seed germination stimulator and growth promoting bacterium. Book of Abstracts of the 22th Iranian Plant Protection Congress, 27- 30 August. (in Persian) **(Conference)**

Lane, D.J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M. (Eds.) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, New York, pp 115–175 **(Book)**

Lorenzi, A.S., Bonatelli, M.L., Chia, M.A., Peressim, L. and Quecine, M.C. 2022. Opposite sides of *Pantoea agglomerans* and its associated commercial outlook. Microorganisms, 10: 2072. doi:10.3390/microorganisms10102072. **(Journal)**

Luziatelli, F., Ficca, A.G., Cardarelli, M., Melini, F., Cavalieri, A., and Ruzzi, M. 2020. Genome sequencing of *Pantoea agglomerans* C1 provides insights into molecular and genetic mechanisms of plant growth-promotion and tolerance to heavy metals. Microorganisms, 8(2): 153. doi: 10.3390/microorganisms8020153. **(Journal)**

Malboobi, M.A., Owlia, P., Behbahani, M., Sarokhani, E., Moradi, S. and Yakhchali, B. 2009. Solubilization of organic and inorganic phosphates by three highly efficient soil bacterial isolates. World. Journal of Microbiology and Biotechnology, 25: 1471–1477. doi: 10.1007/s11274-009-0037-z. **(Journal)**

Medrano, E.G. and Bell, A.A. 2010. Role of *Pantoea agglomerans* in opportunistic bacterial seed and boll rot of cotton (*Gossypium hirsutum*) grown in the field. *Journal of Applied Microbiology*, 102(1): 134–143. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03055.x. **(Journal)**

Miransari, M. and Smith, D.L. 2014. Plant hormones and seed germination. Environmental and Experimental Botany, 99: 110-121. doi:10.1016/j.envexpbot.2013.11.005**. (Journal)**

Nadarasah, G., and Stavrinides, J. 2014. Quantitative evaluation of the host-colonizing capabilities of the enteric bacterium Pantoea using plant and insect hosts. Microbiology, 160(3): 602-615. doi:10.1099/mic.0.073452-0. **(Journal)**

Patel, K.J., Singh, A.K., Nareshkumar, G. and Archana, G. 2010. Organic-acid-producing, phytate-ineralizing rhizobacteria and their effect on growth of pigeon pea (*Cajanus cajan*). Applied Soil Ecology, 44(3): 252-261. doi:10.1016/j.apsoil.2010.01.002. **(Journal)**

Pusey, P.L., Stockwell, V.O., Reardon, C.L., Smits, T.H. and Dufy, B. 2011. Antibiosis activity of *Pantoea agglomerans* biocontrol strain E325 against *Erwinia amylovora* on apple flower stigmas. Phytopathology, 101(10):1234–1241. doi: 10.1094/PHYTO-09-10-0253. **(Journal)**

Ranal, M., and De Santana, D.G. 2006. How and why to measure the germination process? Revista Brasilian Botanique, 29(1): 1-11. doi:10.1590/S0100-84042006000100002. **(Journal)**

Saia, S., Aissa, E., Luziatelli, F., Ruzzi, M., Colla, G., Fica, A.G., et al. 2020. Growth-promoting bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi differentially benefit tomato and corn depending upon the supplied form of phosphorus. Mycorrhiza, 30: 133–147. doi: 10.1007/s00572-019-00927-w. **(Journal)**

Saadouli, I., Mosbah, A., Ferjani, R., Stathopoulou, P., Galiatsatos, I., Asimakis, E., Marasco, R., Daffonchio, D., Tsiamis, G. and Ouzari, H.I. 2021. The impact of the inoculation of phosphate-solubilizing bacteria *Pantoea agglomerans* on phosphorus availability and bacterial community dynamics of a semi-arid soil. Microorganisms, 9(8): 1661. doi: 10.3390/microorganisms9081661. **(Journal)**

Sasirekha, B., Bedashree, T. and Champa, K.L. 2012. Optimization and partial purification of extracellular phytase from *Pseudomonas aeruginosa* p6. European Journal of Experimental Biology, 2(1): 95-104. **(Journal)**

Singh, B. and Satyanarayana, T. 2011. Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. Physiology and Molecular Biology of Plants, 17: 93-103. doi: 10.1007/s12298-011-0062-x. **(Journal)**

Sorroche, F.G., Spesia, M.B., Zorreguieta, Á., and Giordano, W. 2012. A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium meliloti* isolates from Argentina. Applied and environmental microbiology, 78(12): 4092-4101. doi: 10.1128/AEM.07826-11. **(Journal)**

Spaepen, S. 2015. Plant hormones produced by microbes. In Lugtenberg, B. (Ed.) Principles of plant-microbe interactions. Springer International Publishing. pp: 247–256. **(Book)**

Spaepen, S., Vanderleyden, J. and Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiology Reviews, 31(4): 425-448. doi: 10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x. **(Journal)**

Stringlis, I.A., Zhang, H., Pieterse, C.M.J., Bolton, M.D., and de Jonge, R. 2018. Microbial small molecules - weapons of plant subversion. Natural Product Reports, 35: 410–433. doi: 10.1039/c7np00062f. **(Journal)**

Ruzzi, M., and Aroca, R. (2015). Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. Scientia Horticulturae, 196: 124–134. doi: 10.1016/ j.scienta.2015.08.042 . **(Journal)**

Völksch, B., Thon, S., Jacobsen, I.D. and Gube, M. 2009. Polyphasic study of plant- and clinic-associated *Pantoea agglomerans* strains reveals indistinguishable virulence potential. Infection, Genetics and Evolution, 9: 1381–1391. doi: 10.1016/j.meegid.2009.09.016. **(Journal)**

Wang, J., Chen, T., White, J.F., Wei, X., Li, X., and Li, C. 2022. *Pantoea agglomerans*, a seed-borne plant pathogenic bacterium, decreased seed germination, seedling growth and seed quality of oat. European Journal of Plant Pathology, 162: 1-13. doi: 10.1007/s10658-021-02430-5. **(Journal)**

Woo, S.L. and Pepe, O. 2018. Microbial consortia: Promising probiotics as plant biostimulants for sustainable agriculture. Frontiers in Plant Science, 9: 1801. doi: 10.3389/ FPLS.2018.01801/BIBTEX. **(Journal)**

Wu, H., Yang, J., Shen, P., Li, Q., Wu, W., Jiang, X., Qin, L., Huang, J., Cao, X. and Qi, F. 2021. High-level production of indole-3-acetic acid in the metabolically engineered Escherichia coli. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 69: 1916–1924. doi: 10.1021/acs.jafc.0c08141. **(Journal)**

Wu, Q.S., and Zou, Y.N. 2009. Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed citrus. Plant Soil Environ, 55: 436–442. doi: 10.17221/61/2009-PSE. **(Journal)**

Xie, J., Shu, P., Strobel, G., Chen, J., Wei, J., Xiang, Z. and Zhou, Z. 2017. *Pantoea agglomerans* SWg2 colonizes mulberry tissues, promotes disease protection and seedling growth. Biological Control, 113: 9–17. doi:10.1016/j.biocontrol.2017.06.010 **(Journal)**

Zhang, Y. and Qiu, S. 2015. Examining phylogenetic relationships of Erwinia and Pantoea species using whole genome sequence data. Antonie Van Leeuwenhoek, 108: 1037–1046. Doi:10.1007/s10482-015-0556-6, PMID. **(Journal)**

Zhang, P., Jin, T., Kumar Sahu, S., Xu, J., Shi, Q., Liu, H. and Wang, Y. 2019. The distribution of tryptophan- ependent indole-3-acetic acid synthesis pathways in bacteria unraveled by large-scale genomic analysis. Molecules, 24(7):1411. doi: 10.3390/molecules24071411. **(Journal)**

Effects of pathogenic *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and non-pathogenic *Pantoea agglomerans* as auxin and biofilm-producing bacteria on bean seeds quality

Kobra Moslemkhani*[1], Bita Oskouei[2]

Received: May 29, 2024 Accepted: August 14, 2024

Abstract

Quality seed is essential prerequisite for successful and economical production of agricultural crops. Researches exhibited that bacteria can play an essential role in seed quality as biological agents. The effect of these microorganisms has been reported as positive, neutral or harmful interactions in plants. *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* (*Xpp*) is pathogenic bacteria that established on bean seeds; despite its importance, no more research has been conducted to determine the direct effects of this bacterium on the seed quality, germination and vigor. The effect of *Pantoea agglomerans* (*Pa*) as a mysterious seed-borne microorganism with a diverse range of pathogenic and non-pathogenic strains, on bean seeds weren't investigated. In this study two strains S68(*Pa*) and SM3 (*Xpp*) were isolated from the bean seeds (Yaghout cultivar). In addition to their effects on seed quality, the potential of both bacteria in pathogenicity, production of indole acetic acid (IAA) and biofilm, phosphate solubility and phytase were studied. Unlike SM3 (*Xpp*) strain, S68(*Pa*) was non-pathogenic and can't cause disease in bean. It was determined that the abilities of S68 (*Pa*) to produce IAA and biofilm was two and three times more than the SM3(*Xpp*) strain, respectively. The S68 (*Pa*) strain also, can solubilize phosphate and produce phytase. Seed treatment with S68(*Pa*) had a significant effect on improving the growth characteristics of seedlings, increasing dry weight, root and seedling length, germination and bean seeds vigor. Contrary to our hypothesis, the seed quality index in treated seeds with pathogenic SM3 (*Xpp*) weren't significantly different from the healthy seeds. It seems disease damage after full establishment of pathogen in the stem and leaf tissue can be appeared.

Keywords: Bacteria; Growth promoter; Pathogen; Seed borne

How to cite this article

Moslemkhani, C. and Oskouei, B. 2024. Effects of pathogenic *Xanthomonas phaseoli* pv. *phaseoli* and non-pathogenic *Pantoea agglomerans* as auxin and biofilm-producing bacteria on bean seeds quality. Iranian Journal of Seed Science and Research, 11(2): 17-28. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms.2024.8661

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. Research Associate Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. moslemkhany@yahoo.com
2. Research Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. b_oskouei@yahoo.com

*Corresponding author: moslemkhany@yahoo.com