Journal of Vegetables Sciences, Autumn & Winter 2023, Vol 6, No 12 (2), Pages 29-42

doi: 10.22034/iuvs.2022.553999.1206 Article Type: Research Online ISSN: 2676-4822

Effect of Endophyte *Rhizobium* sp. on Disease Control, Seed Germination and Growth of Basil Microgreens

Mohammad Reza Alymanesh[1*], Fardin Ghanbari[2] and Ahmad Seydi nezhad[3]

1- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Fuculty of Agriculture, Ilam University, Ilam,Iran.
2- Assistant Professor, Department of horticulture, Fuculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.
3-Tutor, Department of Plant Protection, Fuculty of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran.

[*]**Corresponding author:** m.alimanesh@ilam.ac.ir

(**Received:** 18 May 2022 **Revised:** 19 July 2022 **Accepted:** 20 July 2022)

Extended Abstract

1. Introduction: Microgreens are immature vegetables with green leaves that can be harvested and consumed shortly after the appearance of the first true leaves. Basically, the part that appears above the root is used as a fresh vegetable for salads. They are more nutritious than their adult plants. In this study, basil (*Ocimum basilicum*) seeds were used to produce microgreens. *Pythium* spp. such as *Pythium ultimum* is one of the diseases that limits the cultivation of many microgreens.

2. Materials and Methods: Ten endophytic bacteria were isolated from the roots of some adult plants of the Lamiaceae family (including basil, *Phlomis aucheri* and rosemary). Basil seeds were disinfected with 1% sodium hypochlorite for two minutes and then washed five times with distilled water and dried at room temperature. For each treatment, 20 seeds with three replications were placed in two layers of sterile filter paper inside petri dishes and transferred to an incubator with a temperature of 21 ° C and a humidity of 65 to 70%. In the initial pretest to select the best bacteria in terms of growth stimulus characteristics, three traits of germinated seeds percentage, seedling height and wet weight at a common bacterial concentration (5×10^7 cfu/ml) were evaluated. Antifungal activity against *P. ultimum* was performed in mix of PDA and NA medium. Bacterium was detected using 16S rRNA region primers: 27F and 1492r. Several growth factors and biochemical changes including total phenol, peroxidase and catalase were investigated.

3. Results and Discussion: None of the bacteria showed a direct antifungal effect against *P. ultimum* in the laboratory. Among the bacteria, isolate GF1 showed more effects of growth stimulation than other bacteria. All growth traits showed a significant increase in the level of 5% probability in both bacterial isolate GF1 concentrations compared to the control, so that the least observed changes in the increase of each growth factor was above 50%. The highest increase in both concentrations was related to seed length vigor and germination vigor. In some cases, a significant difference was observed between the two concentrations of GF1 isolate. None of the bacteria showed a direct antifungal effect against *P. ultimum* in the laboratory. Sequencing of 16S region of ribosomal genes showed that the bacterium is *Rhizobium* sp. This bacterium (in two concentrations of 5×10^7 and 5×10^6) had a significant effect of improving the weight loss of microgreens, the disease severity and disease incidence caused by *P. ultimum* in comparison with the control. Biochemical analysis showed that total phenol, catalase and peroxidase were significantly increased in microgreens inoculated with this bacterium. The results related to changes in total phenol, catalase and peroxidase after 14 days and at the same time with microgreen harvest showed that the bacteria in both concentrations were able to increase the amount of total phenol and defense enzymes in the microgreens. The concentrations used by the bacteria showed a significant difference in all cases, but the low concentration was also able to increase the amount of total phenol and enzymes compared to the control. Changes in total phenol, catalase and peroxidase in almost all cases from highest to lowest included the following treatments: high concentration of bacteria and fungus, low concentration of bacteria and fungus, high concentration of bacteria, low concentration of bacteria, fungus alone and the control which did not contain any microbial treatment. However, in the case of catalase, the changes resulting from inoculation of the pathogenic fungus alone and the changes resulting from the use of bacteria at lower concentrations were almost equal and did not show a significant difference.

4. Conclusion: In this study, unlike many similar studies that aim at biological control. The initial screening of bacteria with useful potential in agriculture was not based on antifungal properties. Rather, the primary goal was to increase germination and microgreen growth factors. Since the goal of biological control is ultimately to increase efficiency of crop yield by disease control, it makes sense to prioritize growth-promoting characteristics that directly affect the efficiency. This study showed that the endophytic bacterium, *Rhizobium* sp. GF1, without direct antifungal effect using inducing resistance mechanism and increasing the plant's defense compounds is able to significantly control the disease. In this study, bacterium was obtained that have a dual useful ability in the fields of plant protection and vegetable growing.

Keywords: *Pythium ultimum*, Inducing resistance, Catalase, Total phenol.

Citation: Alymanesh, M. R., Ghanbari, F. & Seydi nezhad, A. (2023). Effect of endophyte *Rhizobium* sp. on disease control, seed germination and growth of basil microgreens. Journal of Vegetables Sciences, 6(2), 29-42. doi: 10.22034/iuvs.2022.553999.1206.

Copyrights:
Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted to Journal of Vegetables Sciences. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/ by/4.0).

دوفصلنامه علمی علوم سبزی‌ها، سال ۶، دوره ۱۲، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱، صفحات ۴۲-۲۹

دانشگاه ایلام شاپا الکترونیکی: ۴۸۲۲-۲۶۷۶ نوع مقاله: پژوهشی doi: 10.22034/iuvs.2022.553999.1206

تأثیر باکتری اندوفیت *Rhizobium* sp. روی کنترل بیماری، جوانه‌زنی بذور و رشد میکروگرین‌های ریحان

محمدرضا عالی‌منش[1*]، فردین قنبری[2] و احمد صیدی‌نژاد[3]

۱- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
۲- استادیار، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.
۳- مربی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران.

***نویسنده مسئول:** m.alimanesh@ilam.ac.ir

(**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۱/۰۲/۲۸ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۱/۰۴/۲۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۱/۰۴/۲۹)

چکیده

میکروگرین‌ها حاصل رشد کوتاه‌مدت بذور سبزیجات هستند و معمولاً از نظر ارزش غذایی از گیاهان بالغ خود مغذی‌تر می‌باشند. قارچ *Pythium ultimum* یکی از بیمارگرهای محدودکننده کشت بسیاری از میکروگرین‌ها از جمله ریحان است. در این تحقیق ابتدا ده جدایه باکتری اندوفیت از ریشه برخی گیاهان بالغ خانواده لامیاسه شامل ریحان، گوش‌برهزرد و رزماری جداسازی گردید. جدایه GF1 اثرات محرک رشدی بیشتری روی گیاه ریحان نسبت به بقیه باکتری‌ها نشان داد. همه عوامل رشدی بررسی شده در دو غلظت $10^7 \times 5$ و $10^6 \times 5$ جدایه GF1 بیش از ۵۰ درصد افزایش داشتند. توالی‌یابی ژن آر ان ای ریبوزمی 16S نشان داد که باکتری مذکور *Rhizobium* sp. می‌باشد. این باکتری در مقایسه با شاهد تأثیر قابل توجهی در بهبود وزن میکروگرین‌ها، کاهش شدت و وقوع بیماری ناشی از قارچ *P. ultimum* داشت. آزمون‌های بیوشیمیایی نشان داد که میزان فنول کل، کاتالاز و پراکسیداز در میکروگرین‌هایی که توسط این باکتری تلقیح شده بودند؛ افزایش چشمگیری داشتند. این جدایه اثر مستقیم ضد قارچی علیه *P. ultimum* در آزمایشگاه نشان نداد. نتایج این پژوهش نشان داد که باکتری اندوفیت *Rhizobium* sp. GF1 بدون اثر مستقیم ضد قارچی با سازوکار القاء مقاومت و افزایش ترکیبات دفاعی گیاه قادر به کنترل قابل توجه بیماری است. این جدایه باکتری قابلیت مفید دوگانه در حوزه‌های گیاهپزشکی و سبزی‌کاری دارد.

واژه‌های کلیدی: ***Pythium ultimum***، **القاء مقاومت، کاتالاز، فنول کل**

استناد: عالی‌منش، م.، قنبری، ف. و صیدی نژاد، ا. (۱۴۰۱). تأثیر باکتری اندوفیت *Rhizobium* sp. روی کنترل بیماری، جوانه‌زنی بذور و رشد میکروگرین‌های ریحان. *علوم سبزی ها*، ۶ (۲)، ۴۲-۲۹.

حق چاپ:

حق چاپ برای نویسنده (گان) این مقاله محفوظ است. بر اساس قوانین انتشارات با دسترسی آزاد، تمام مطالعات چاپ شده در این مجله به‌صورت آزاد در وب سایت مجله برای عموم بدون پرداخت هزینه قابل‌دسترس است.

مقدمه

ریحان با نام علمی (*Ocimum basilicum*) نوعی سبزی یک‌ساله از خانواده نعناعیان است. اخیراً در دنیا میکروگرین‌های این سبزی به مقدار زیاد تولید و استفاده می‌گردد (Puccinelli *et al.*, 2019). میکروگرین‌ها محصولاتی نابالغ با برگ‌های سبز بوده که در مدت کوتاهی بعد از ظهور اولین برگ‌های حقیقی، قابل برداشت و مصرف هستند، در اصل قسمت ظاهر شده در بالای ریشه به‌عنوان سبزی تازه استفاده می‌شود (Kou *et al.*, 2013).

میکروگرین‌ها در مقایسه با گیاهان بالغ، مواد مغذی بیشتری دارند. در مجموع بسیاری از عوامل مانند محدود بودن منابع طبیعی و زمین‌های کشاورزی در کره زمین و همچنین گرایش به عادات غذایی سالم منجر به افزایش علاقه به تولید در مقیاس خرد سبزیجات برای بازار آماده مصرف شده است (Sharma *et al.*, 2022). یکی از مشکلات بخش تولید میکروگرین‌ها بیمارگرهای قارچی نظیر پیتیوم هستند که مرگ گیاهچه را سبب می‌شوند؛ گونه‌های مختلف این قارچ نظیر *Pythium ultimum* به‌عنوان عامل بیماری در ریحان گزارش شده است (Garibaldi *et al.*, 1997). از آن‌جا که در سبزیجات با طول دوره رشد کوتاه و ماندگاری کم، امکان استفاده از سموم شیمیایی برای کنترل بیماری وجود ندارد، کاربرد باکتری‌های بیوکنترلی بسیار مفید خواهد بود. در این زمینه در دنیا تحقیقات کمی روی میکروگرین‌ها صورت گرفته است (McGehee *et al.*, 2019). سازوکار مقاومت القایی از مکانیسم‌های بسیار مؤثر در کنترل بیمارگرهای گیاهی بوده و تحقیقات بسیاری از دانشمندان نشان داده است که با افزایش ترکیبات دفاعی گیاه نظیر فنول کل، پراکسیداز، کاتالاز و غیره میزان بیماری کاهش می‌یابد (Köhl *et al.*, 2019; Hata *et al.*, 2021).

باکتری‌های اندوفیت یک گروه از باکتری‌ها می‌باشند که قادر به ایجاد مقاومت القایی در گیاهان هستند. تحقیقات نشان داده است که این گروه از باکتری‌ها در گیاهان مختلف، قادر به القاء مقاومت علیه بیمارگرهای گیاهی می‌باشند. برای مثال باکتری اندوفیت *Bacillus altitudinis* GTS-16 جدا شده از گیاه ریحان قادر به کنترل بیماری *Rhizoctonia solani* در برنج است و یکی از مکانیسم‌های مهم کنترل این بیماری، ایجاد مقاومت القایی با افزایش میزان برخی آنزیم‌های دفاعی در گیاه می‌باشد (Sahu *et al.*, 2020). هدف از این تحقیق جداسازی باکتری‌های بیوکنترلی بود که بهترین اثر محرک رشدی روی بذور و میکروگرین‌های ریحان داشته باشند و در عین حال با مکانیسم‌های مقاومت القایی؛ با اثر و یا بدون اثر مستقیم ضد قارچی، گونه مهم بیمارگر *P. ultimum* را کنترل کنند. در این تحقیق برخلاف خیلی از تحقیقات رایج در حوزه گیاه‌پزشکی، غربال‌گری اولیه بر اساس محرک رشد بودن صورت گرفت و آن دسته از عوامل بیوکنترلی مدنظر بودند که در درجه اول در فاکتورهای رشدی گیاه مؤثر باشند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌های اندوفیت

از ریشه گیاهان خانواده لامیاسه در استان فارس شامل گیاهان گوش‌بره‌زرد (*Phlomis aucheri*)، ریحان (*Ocimum basilicum*) و رزماری (*Rosmarinus officinalis*) نمونه‌برداری انجام شد و نمونه‌ها تا زمان استفاده در چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. جهت جداسازی باکتری‌های اندوفیت، ریشه‌ها پس از شستشو، توسط اسکالپل استریل برش داده شدند. قطعات خردشده به‌مدت یک دقیقه در الکل اتیلیک ۷۰ درصد و بعد به مدت پنج دقیقه در هیپوکلریت سدیم دو درصد غوطه‌ور شدند. سپس نمونه‌ها پنج بار با آب مقطر سترون شستشو داده شده و له گردیدند (یک گرم بافت در یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل). بعد از کشت روی محیط کشت نوترینت آگار، تشتک‌های پتری به مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و پرگنه‌های متفاوتی که بر روی محیط کشت پدیدار گشتند، خالص‌سازی شدند (Sturz *et al.*, 1997). نگهداری طولانی‌مدت باکتری‌ها در گلیسرول ۲۵٪ و دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. آزمایش‌ها در سال ۱۴۰۰ در دانشگاه ایلام انجام شد.

تهیه و کشت قارچ بیمارگر

طی کشت میکروگرین‌های ریحان، مرگ میکروگرین در اثر عوامل قارچی مشاهده شد. بیمارگر غالب پس از جداسازی و بررسی مورفولوژیک، *P. ultimum* تشخیص داده شد. علاوه بر نمونه جدا شده، چند جدایه مختلف دیگر *Pythium* spp. و *P. ultimum* جدا شده از سبزیجات و جالیز از مراکز تحقیقات کشاورزی استان فارس و شهرستان شاهرود تهیه گردید. در پیش آزمون‌های صورت گرفته (نتایج نشان داده نشده) جدایه‌ای از *P. ultimum* قدرت بیماری‌زایی بالاتری نشان داد؛ لذا از این جدایه برای سایر آزمون‌های اصلی بیماری‌زایی استفاده گردید. از محیط کشت‌های CMA و PDA برای کشت، جداسازی و خالص‌سازی استفاده شد.

آزمون بررسی اثر ضد قارچی روی محیط‌کشت

جدایه‌های باکتریایی به صورت لکه‌ای به فواصل مساوی از مرکز تشتک‌ها و به فاصله یک سانتی‌متر از حاشیه آن‌ها در چهار طرف تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت NA+PDA به نسبت یک به یک، مایه‌زنی شدند. یک حلقه به قطر پنج میلی‌متر از کشت پنج روزه *P. ultimum* در مرکز آن‌ها قرار داده شد. در تشتک‌های پتری شاهد، فقط از آب مقطر سترون استفاده گردید. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از هفت روز که حاشیه پرگنه قارچ در تشتک پتری شاهد به دیواره تشتک پتری برخورد نموده بود، میزان بازدارندگی رشد قارچ با اندازه‌گیری قطر رشد ریسه، انجام پذیرفت. این آزمون در چهارچوب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت.

پیش‌آزمون بررسی اثر غلظت‌های مختلف باکتری روی جوانه‌زنی و رشد بذور داخل پتری

بذرهای ریحان توسط هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت دو دقیقه ضدعفونی گردیدند و سپس پنج بار با آب مقطر سترون شستشو داده و در دمای اتاق خشک شدند. برای هر تیمار ۲۰ عدد بذر با سه تکرار در داخل هر پتری‌دیش، روی دو لایه کاغذ صافی سترون قرار داده شد و به ژرمیناتور با دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۵ تا ۷۰ درصد منتقل گردید. در پیش‌آزمون اولیه به منظور انتخاب بهترین باکتری از نظر ویژگی‌های محرک رشدی سه صفت درصد جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه و وزن تر در یک غلظت متعارف باکتری‌ها ۵×۱۰^{۷} cfu/ml (۰/۱ الی۰/۰۷= OD600) مورد ارزیابی قرار گرفت. در ادامه بعد از انتخاب بهترین باکتری، تمام ویژگی‌های ذیل در مقایسه با شاهد در دو غلظت ۵×۱۰^{۷} cfu/ml و غلظت ده برابر رقیق‌تر ۵×۱۰^{۶} cfu/ml (۰/۰۴ الی ۰/۰۵ = OD600) ارزیابی شد. شمارش بذرهای جوانه‌زده به‌صورت روزانه در ساعات معین انجام گرفت. شمارش تا زمانی‌که تعداد بذور جوانه‌زده در سه شمارش متوالی تغییر نکرد، ادامه یافت (Roberts & Koenraadt, 2006) و در پایان ویژگی‌های مختلفی مانند متوسط مدت‌زمان جوانه‌زنی، سرعت و درصد جوانه‌زنی محاسبه گردید. درصد جوانه‌زنی از طریق شمارش تعداد بذرهای جوانه‌زده شده در روز آخر به تعداد کل بذور محاسبه شد. شاخص بنیه طولی بذر از حاصل‌ضرب درصد جوانه‌زنی نهایی در ارتفاع گیاهچه و شاخص بنیه وزنی بذر از حاصل‌ضرب درصد جوانه‌زنی نهایی در وزن خشک گیاهچه به دست آمد:

ارتفاع گیاهچه × درصد جوانه‌زنی نهایی = شاخص بنیه طولی بذر

وزن خشک گیاهچه × درصد جوانه‌زنی نهایی = شاخص بنیه وزنی بذر

سرعت جوانه‌زنی بذرها (Germination rate =GR) با استفاده از روش ماگوئر (Maguire) محاسبه شد، سرعت جوانه‌زنی برابر با مجموع نسبت$\frac{Ni}{Ti}$ است، که Ni تعداد بذرهای جوانه‌زده در هر روز و Ti تعداد روزهای پس از کاشت می‌باشد (Mohssen *et al.*, 2010):

$$\text{سرعت جوانه‌زنی} = \Sigma GR = \frac{Ni}{Ti}$$

میانگین زمان جوانه‌زنی از فرمول ذیل به دست آمد:

$$\text{میانگین زمان جوانه‌زنی} = \frac{\text{بذر جوانه‌زده در روز} * \text{تعداد روزها از شروع جوانه‌زنی}}{\text{کل تعداد بذور جوانه زده}}$$

متوسط جوانه‌زنی روزانه (Mean daily germination (MDG که شاخصی از سرعت جوانه‌زنی روزانه می‌باشد؛ از رابطه زیر تعیین گردید (Zhang & Ervin, 2004):

D /MDG = FGP

در این رابطه Final germination percentage (FGP) درصد جوانه‌زنی نهایی و D تعداد روز تا رسیدن به حداکثر جوانه‌زنی نهایی (طول دوره آزمایش) می‌باشد. طول ریشه‌چه و ارتفاع گیاهچه با کولیس با دقت ۰/۰۲ میلی‌متر و وزن‌تر و خشک گیاهچه با ترازوی با دقت ۰/۰۰۱ گرم اندازه‌گیری شدند.

آزمون‌های مرتبط با میکروگرین‌ها

تعیین شاخص‌های بیماری‌زایی و رشد میکروگرین‌ها

برای کشت میکروگرین‌های ریحان ضدعفونی بذور توسط هیپوکلریت سدیم یک درصد (به مدت دو دقیقه) و سپس پنج بار شستشوی بذور با آب سترون و خشک کردن صورت گرفت. تعداد ۱۵۰ عدد بذر به‌صورت متراکم در ظروف کوچک پلاستیکی بدون چاهک (عمق ۲/۵ سانتی‌متر و حاوی کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۲:۱) کشت گردیدند. آبیاری به‌صورت محلول‌پاشی روزانه و برای تمام ظروف به‌صورت کاملاً یک اندازه صورت گرفت. قبل از جوانه‌زنی، گیاهان در تاریکی نگهداری شده و پس از آن در معرض تابش نور خورشید (در گلخانه شیشه‌ای) قرار گرفتند. طول دوره رشد ۱۴ روز در نظر گرفته شد (Lobiuc *et al.*, 2017). تیمارها شامل ظروف تلقیح شده با باکتری در غلظت cfu/ml ۵×۱۰^{۷} (۰/۱ الی ۰/۰۷ = OD600)، ظروف تلقیح شده با باکتری در غلظت cfu/ml ۵×۱۰^{۶} (۰/۰۴ الی ۰/۰۵ = OD600)، ظروف تلقیح شده با قارچ و باکتری در غلظت ۵×۱۰^{۷}، ظروف تلقیح شده با قارچ و باکتری در غلظت ۵×۱۰^{۶}، ظروف تلقیح شده با قارچ تنها (غلظت برای تمام تیمارهای حاوی قارچ معادل زئوسپور ۳×۱۰^{۵} در میلی‌لیتر) و شاهد بدون هیچ تلقیح میکروبی بودند. مؤلفه‌های وزن تر و خشک نیز بعد از ۱۴ روز مورد بررسی قرار گرفت. برای هر ظرف یک تکرار در نظر گرفته شد و هر تیمار شامل شش تکرار بود. سه تکرار برای آنالیزهای وزن تر و خشک، شدت بیماری و وقوع بیماری مورد بررسی قرار گرفت و سه تکرار دیگر برای بررسی فنول کل ،کاتالاز و پراکسیداز استفاده شد. تلقیح باکتری و قارچ به‌صورت آب کود در حجم ۱۰ میلی‌لیتر و برای باکتری، همزمان با کشت و برای قارچ، دو روز بعد از کشت صورت گرفت. تهیه باکتری در غلظت‌های مورد نظر با ایجاد سری رقت و خوانش اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر و سپس رسم خط رگرسیون محاسبه گردید. در مورد قارچ، تهیه زئوسپور در غلظت مورد نظر، بعد از کشت ابتدایی روی محیط کشت Corn Meal Agar (CMA) و طبق روش McGehee و همکاران (۲۰۱۹) با اندکی تغییرات صورت گرفت و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون زئوسپور برای هر ظرف به کار رفت. شاهدها با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل آبیاری گردید. وقوع بیماری (Disease incidence) از طریق محاسبه درصد مرگ گیاهچه (قابل مشاهده) یا درصد پژمردگی، داخل هر ظرف به‌دست آمد. شدت بیماری (Disease severity) بر اساس درجه‌بندی زیر محاسبه گردید: ۱= بدون علائم، ۲= جوانه زده اما خشک شده، ۳= مرگ پس از ظهور گیاهچه، ۴= مرگ پیش از ظهور گیاهچه (McGehee *et al.*, 2019).

آزمون اثر باکتری روی تغییرات ترکیبات دفاعی گیاه

محتوای فنول کل

اندازه‌گیری ترکیبات فنولی بر اساس روش فولین انجام گردید. در ابتدا ۰/۱ گرم از برگ تر گیاه را در پنج میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد ساییده و به مدت ۲۴ ساعت در تاریکی در دمای اتاق نگهداری شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی به یک ریزلوله دیگر منتقل شد و به آن یک میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد اضافه گردید و حجم محلول با آب مقطر دو بار تقطیر به پنج میلی‌لیتر رسانده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین سیوکالتیو (Folin & Ciocalteu's phenol) ۵۰ درصد و یک میلی‌لیتر کربنات سدیم پنج درصد به آن اضافه شد. محلول حاصل به‌مدت یک ساعت در تاریکی

و دمای اتاق نگهداری گردید. جذب هر نمونه در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر قرائت گردید و تبدیل داده‌ها با رسم منحنی استاندارد گالیک اسید انجام شد. غلظت فنول کل برحسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر محاسبه گردید (Seevers *et al.*, 1971).

سنجش فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز

جهت تهیه عصاره آنزیمی ابتدا بافت تازه گیاهی به میزان ۰/۵ گرم در هاون چینی با استفاده از پنج میلی‌لیتر بافر پتاسیم فسفات ۵۰ میلی‌مولار (pH=7.5) حاوی اتیل دی آمین تترا استیک اسید (Ethylene diamine tetra acetic acid) یک میلی‌مولار، پلی ونیل پایرولیدون (Poly vinyl pyrrolidone) یک درصد و فنیل متیل سولفونید فلوراید (Phenyl methyl sulfonyl fluoride) یک میلی‌مولار، ساییده شد. عمل استخراج قبل از اینکه حالت فریز بافت گیاهی از بین رود؛ انجام گرفت (همه مراحل در یخ انجام شد). پس از انتقال عصاره‌ها به تیوب‌ها، سانتریفیوژ به‌مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. فاز رویی به ریزلوله‌های ۵۰۰ میکرولیتری تقسیم شده و تا زمان سنجش فعالیت آنزیم‌ها در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. از عصاره حاصل برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز استفاده گردید. برای اندازه‌گیری مقدار پروتئین محلول در برگ از روش Bradford (۱۹۷۶) استفاده شد. یک میلی‌لیتر از معرف برادفورد به همراه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی پس از اختلاط کامل در دستگاه اسپکتروفتومتر (UNICO مدل UV/Vis 2100) قرار داده شد و جذب آن در طول‌موج ۵۹۵ نانومتر ثبت گردید. غلظت پروتئین بر حسب میلی‌گرم بر گرم بافت تازه با استفاده از منحنی استاندارد در غلظت‌های ۲۰ تا ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر که توسط سرم آلبومین گاوی تهیه شده بود محاسبه گردید.

آنزیم کاتالاز

فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT, EC 1.11.1.6) با استفاده از روش Dhindsa و همکاران (۱۹۸۱) به‌دست آمد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار با pH=7 به میزان ۲/۵ میلی‌لیتر، پراکسید هیدروژن ۱۵ میلی‌مولار به میزان ۳۰ میکرولیتر و عصاره آنزیمی به حجم ۱۰۰ میکرولیتر بود. در طی سنجش با اسپکتروفتومتر، مخلوط واکنش فاقد عصاره آنزیمی به‌عنوان شاهد استفاده گردید. میزان تجزیه شدن پراکسیدهیدروژن در طول‌موج ۲۴۰ نانومتر و با استفاده از ضریب خاموشی ۳۹/۴ $mM^{-1}cm^{-1}$ تحت عنوان فعالیت آنزیم کاتالاز تعیین گردید. نهایتاً فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس رابطه ذیل و بر حسب واحد آنزیمی در میلی‌گرم پروتئین محاسبه گردید.

$$Enzyme\ activity\ \left(\frac{U}{ml}\right) = \frac{\Delta A \times 0.5 \times V \times d}{\varepsilon \times l \times t \times vs}$$

U واحد آنزیمی، ΔA تفاوت جذب در ابتدا و انتهای زمان خوانش آنزیم، V حجم مخلوط واکنش، d فاکتور رقت، t مدت زمان واکنش (در این آزمایش دو دقیقه بود)، Vs حجم نمونه، ε ضریب خاموشی آنزیم، l طول مسیر عبور نور از مخلوط واکنش (که برابر یک است).

آنزیم پراکسیداز

فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD, EC 1.11.1.7) بر اساس روش Plewa و همکاران (۱۹۹۱) اندازه‌گیری شد. مخلوط واکنش شامل بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی‌مولار pH=7 (۲/۵ میلی‌لیتر)، پراکسیدهیدروژن یک درصد (۱۰۰ میکرولیتر)، گوایکول (Guaicol) چهار درصد (۱۰۰ میکرولیتر) و عصاره آنزیمی (۵۰ میکرولیتر) بود. از مخلوط واکنش بدون عصاره آنزیمی به‌عنوان شاهد اسپکتروفتومتر استفاده شد. با شروع واکنش آنزیمی میزان تتراگوایکول در مخلوط واکنش اضافه می‌شود و میزان جذب محلول در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر محاسبه می‌شود. فعالیت آنزیم پراکسیداز بر اساس رابطه ذکر شده در مرحله سنجش کاتالاز و ضریب خاموشی ۲۶/۶ $mM^{-1}cm^{-1}$ تعیین گردید و در نهایت بر اساس واحد آنزیمی در میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Plewa *et al.*, 1991).

آزمون تشخیص و عدم بیماری‌زایی باکتری اندوفیت

آزمون‌های اولیه باکتری‌شناسی نظیر آزمون‌های گرم، هوازی و بی‌هوازی بودن، تولید فلورسنت روی محیط‌کشت King B، تولید/عدم تولید رنگ زرد روی محیط‌کشت YDC، کاتالاز، اکسیداز، تولید گال/عدم تولید گال، عدم بیماری‌زایی روی گوجه‌فرنگی و غیره انجام گردید (Brenner *et al.*, 2005). برای شناسایی مولکولی باکتری، ابتدا استخراج DNA از سلول‌های باکتریایی به روش Cheng و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد. سپس، آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی ناحیه 16S ریبوزومی باکتری‌ها شامل 27F: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′ و 1492R: 5′-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3′ انجام گردید (Weisburg *et al.*, 1991). پس از الکتروفورز و مشاهده باند مورد نظر روی ژل آگارز یک درصد، محصول PCR به‌طور مستقیم برای تعیین توالی به شرکت کدون ژنتیک ارسال شد. نتایج حاصل، در پایگاه داده‌های NCBI بعد از جستجوی بلاست (Blast)، مورد بررسی قرار گرفتند؛ تا گونه یا جنس باکتری مشخص گردد. چرخه‌های حرارتی جهت انجام فرآیند PCR در دستگاه ترموسایکلر شامل ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد جهت واسرشتگی اولیه، به‌دنبال آن، ۳۰ چرخه که هر چرخه شامل؛ ۳۰ ثانیه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای واسرشتگی، ۳۰ ثانیه دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد برای اتصال و ۶۰ ثانیه دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت تکثیر و در نهایت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد جهت تکثیر نهایی بود.

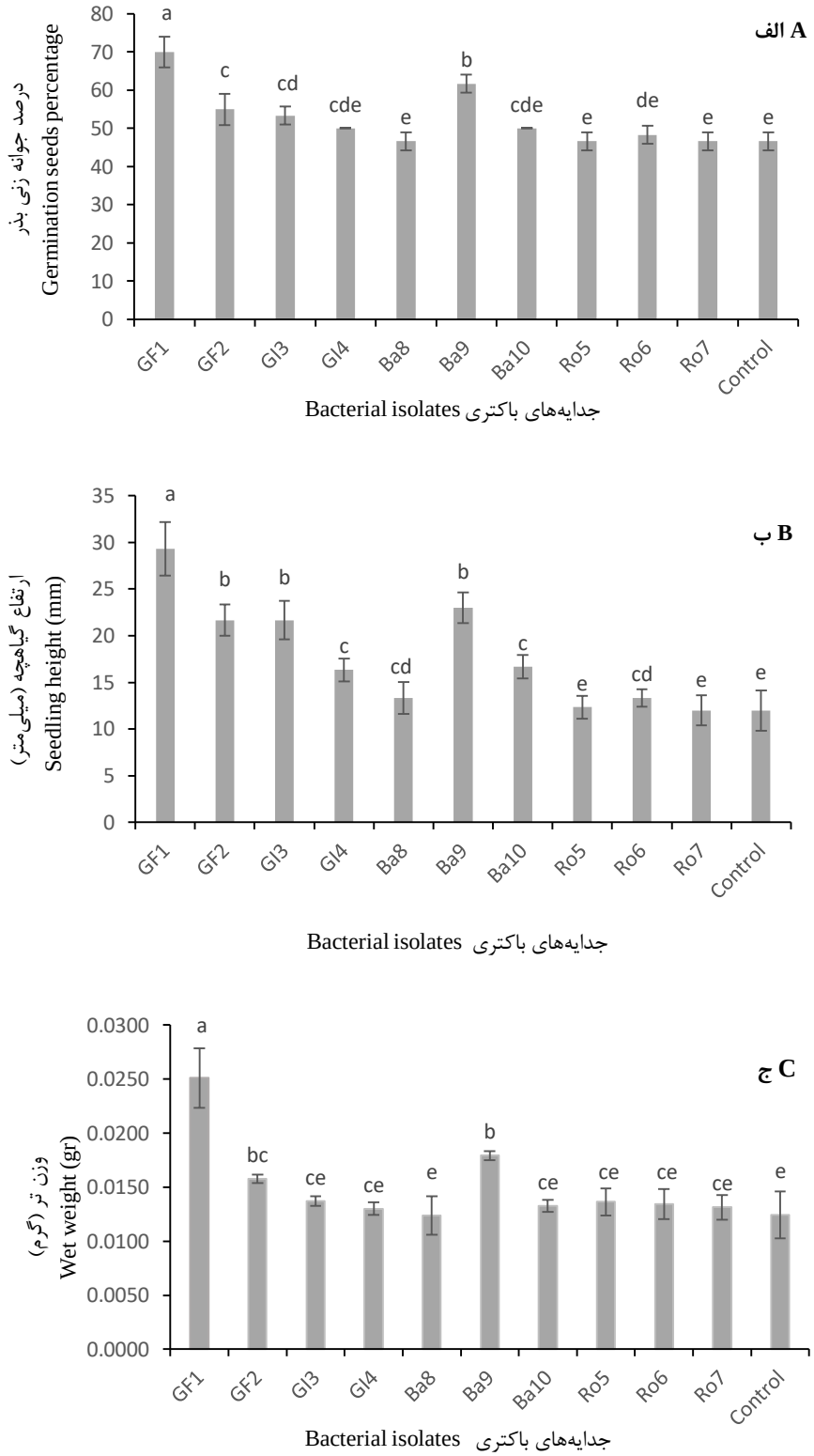
آنالیز آماری

آنالیز در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از نرم‌افزار SPSS ورژن V.18.0 انجام گرفت. مقایسه میانگین‌ها با روش حداقل تفاوت معنی‌دار Least significant difference (LSD) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح معنی‌داری ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

جداسازی باکتری‌ها، آزمون‌های ضدقارچی و پیش‌آزمون‌های مربوط به جوانه‌زنی بذور و صفات مرتبط

جمعاً ۱۰ باکتری اندوفیت جداسازی گردید. چنانچه از هر گیاه بیشتر از یک نوع پرگنه جداسازی می‌گردید؛ فقط یک پرگنه که تیپ غالب و جمعیت اصلی را (در بین پرگنه‌های رشد کرده) داشت، برداشته می‌شد. هیچ‌کدام از باکتری‌ها خاصیت ضدقارچی مستقیم شامل هاله بازدارنده روی محیط کشت علیه قارچ *P. ultimum* نشان ندادند. از صفات مورد بررسی ذکر شده در جدول ۱ تعدادی از صفات (بذور جوانه زده، ارتفاع گیاهچه و وزن تر) در یک آزمون اولیه با ۲۰ بذر برای ۱۰ باکتری بررسی گردید که جدایه GF1 (مربوط به گوش‌بره‌زرد حومه شیراز) اختلاف قابل توجهی با بقیه باکتری‌ها و شاهد نشان داد (نتایج در شکل ۱ الف، ب و ج قابل مشاهده است)؛ لذا برای آزمون‌های تکمیلی که در جدول یک آورده شده و سایر آزمایش‌ها، از این جدایه استفاده گردید. تمام صفات رشدی مورد بررسی در سطح احتمال پنج درصد در هر دو غلظت باکتری، افزایش معنی‌دار و گاهی چشمگیری در مقایسه با شاهد نشان دادند، به نحوی که کمترین تغییرات مشاهده شده در افزایش هر فاکتور رشدی، بالای ۵۰ درصد بود. میزان درصد افزایش هر صفت در جدول ۱ آمده است. بالاترین میزان افزایش در هر دو غلظت، مربوط به شاخص بنیه طولی و قدرت جوانه‌زنی بود. بین دو غلظت باکتری مورد آزمون نیز در برخی موارد اختلاف معنی‌دار مشاهد گردید؛ اما فقط در مورد شاخص بنیه وزنی و وزن خشک این اختلاف در غلظت بالاتر به طور معنی‌دار بیشتر بود. این پژوهش برای اولین بار تأثیر تحریک رشدی باکتری اندوفیت روی میکروگرین‌های ریحان را ثابت نمود. در تحقیقی مشابه مشخص گردید که تیمار خاک و بذر توسط باکتری اندوفیت *Herbaspirillum* sp. ST-B2 باعث تحریک رشد میگروگرین‌ها و جوانه‌های گندم سیاه می‌گردد (Briatia *et al.*, 2017). همچنین توانایی باکتری اندوفیت *Streptomyces* sp. strain JSA11 در تحریک رشد و تجمع متابولیت‌های زیست‌فعال (Bioactive Metabolites) در سه گونه از جوانه‌های *Chenopodium* اثبات گردیده است (Almuhayawi *et al.*, 2021).



شکل ۱- پیش آزمون های تحریک رشد در جدایه‌های باکتری: درصد جوانه‌زنی(الف)، ارتفاع گیاهچه (ب) و وزن تر (ج)

Figure 1- Growth stimulation pretests in bacterial isolates: germinated seeds percentage (A), seedling height (B) and wet weight (C)

جدول ۱- میانگین درصد افزایش میزان فاکتورهای مختلف رشدی مرتبط با جوانه‌زنی بذور، بعد از تلقیح بذور ریحان با دو غلظت باکتری در مقایسه با شاهد

Table 1- Mean percentage increase of different growth factors related to seed germination, after inoculation of basil seeds with two bacterial concentrations compared to control

فاکتورهای جوانه زنی بذور و رشد گیاه Seed germination and growth factors	بذور جوانه زده Germinated seeds	ارتفاع گیاهچه Seedling height	طول ریشه‌چه Root length	وزن تر Wet weight	وزن خشک Dry weight	شاخص بنیه طولی Seed length vigor	شاخص بنیه وزنی Seed weight vigor	سرعت جوانه زنی Germination rate	متوسط جوانه زنی روزانه Mean daily germination	قدرت جوانه زنی Germination vigor
درصد افزایش هر فاکتور بعد تلقیح باکتری در غلظت (۵×۱۰^{۶} cfu/ml) Percentage increase of each factor after inoculation bacteria at 5×10^{6} cfu/ml concentration	50.60[a]	143.18[a]	86.67[a]	109.17[a]	47.59[b]	261.54[a]	110.57[b]	50.60[a]	50.60[a]	261.54[a]
درصد افزایش هر فاکتور بعد تلقیح باکتری در غلظت (۵×۱۰^{۷} cfu/ml) Percentage increase of each factor after inoculation bacteria at 5×10^{7} cfu/ml concentration	50.37[a]	149.96[a]	83.33[a]	114.98[a]	103.83[a]	272.12[a]	206.48[a]	50.37[a]	50.37[a]	272.12[a]

حروف متفاوت در هر ردیف، اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بین دو غلظت باکتری در فاکتور مورد نظر را نشان می‌دهد.

The different letters in each row show a significant difference at the level of five percent between the two concentrations of bacteria in the considered factor.

کاهش بیماری در میکروگرین‌ها

باکتری جدایه GF1 ویژگی‌های محرک رشدی قابل توجهی از خود نشان داد، از این رو در ادامه تحقیقات این موضوع دنبال گردید که آیا باکتری محرک رشد فاقد تأثیر ضد قارچی مستقیم، قادر به کنترل بیماری خواهد بود. نتایج بعد از ۱۴ روز و همزمان با برداشت میکروگرین‌ها نشان داد که درصد وقوع بیماری و شدت بیماری در میکروگرین‌ها بر اثر تلقیح باکتری کاهش یافت. در مورد وقوع بیماری، هر دو غلظت باکتری بیماری را کم کرد و غلظت بالاتر به طور معنی‌داری از غلظت کمتر، بیماری را بیشتر کاهش داد. وزن‌تر و خشک روند کاملاً منطقی نشان دادند؛ به نحوی که به ترتیب بالاترین وزن‌تر و خشک مربوط به کاربرد باکتری در غلظت بالاتر، کاربرد باکتری در غلظت پائین‌تر، شاهد فاقد تلقیح میکروبی، کاربرد باکتری در غلظت بالا به همراه قارچ، کاربرد باکتری در غلظت پائین به همراه قارچ و در نهایت کمترین وزن مربوط به تلقیح قارچ به تنهایی بود. ترتیب افزایش در درصد وزن تر و خشک، کاهش وقوع و شدت بیماری با افزایش مشاهده شده در فنول کل و آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز بر اثر تلقیح باکتری اندوفیت هماهنگی و ارتباط منطقی داشت. این نتایج هر چند روی ریحان برای اولین بار بود اما با نتایج برخی تحقیقات دیگر روی برخی گیاهان، همخوانی داشت و در مواردی هم تفاوت‌هایی را نشان داد. مثلاً باکتری اندوفیت *Bacillus tequilensis* در ترکیب با فوزاریوم عامل پژمردگی روی گوجه‌فرنگی، بیشترین افزایش میزان فنول کل را در مقایسه با سایر تیمارها نظیر بیمارگر تنها و شاهد نشان داد (Sahu *et al.*, 2019).

جدول ۲- مقایسه میانگین‌های تأثیر باکتری‌های اندوفیت بر صفات رویشی و وضعیت بیماری *پیتیومی* در میکروگرین‌های ریحان

Table 2- Comparison of the average effects of endophytic bacteria on vegetative traits and *Pythium* disease status in basil microgreens

تیمار Treatment	میانگین وزن تر (گرم) Wet weight (gr)	میانگین وزن خشک (گرم) Dry weight (gr)	افزایش/کاهش وزن‌تر (٪) Increase/ decrease in wet weight (%)	افزایش/کاهش وزن خشک (٪) Increase/ decrease in dry weight (%)	میانگین وقوع بیماری (٪) Mean disease incidence (%)	میانگین شدت بیماری (٪) Mean disease severity (%)
شاهد Control	0.873^{c}	0.054^{c}	0.00	0.00	0.00^{d}	1.00^{b}
باکتری اندوفیت در غلظت ۵×۱۰^۷ cfu/ml Endophytic bacterium at 5×10^{7} cfu/ml concentration	1.517^{a}	0.092^{a}	42.45	69.27	0.00^{d}	1.00^{b}
باکتری اندوفیت در غلظت ۵×۱۰^۶ cfu/ml Endophytic bacterium at 5×10^{6} cfu/ml concentration	1.23^{b}	0.064^{b}	17.91	23.53	0.00^{d}	1.00^{b}
باکتری اندوفیت در غلظت بالا و پتیوم Endophytic bacterium at high concentration and *Pythium ultimum*	0.741^{d}	0.027^{d}	-8.70	-51.15	39.05^{c}	1.33^{b}
باکتری اندوفیت در غلظت پائین و پتیوم Endophytic bacterium at low concentration and *Pythium ultimum*	0.639^{e}	0.023^{e}	-57.86	-15.40	45^{b}	1.67^{ab}
پیتیوم *Pythium ultimum*	0.447^{f}	0.016^{f}	-28.06	-70.51	70.00^{a}	2.67^{a}

- : علامت منفی نشان دهنده درصد کاهش و حروف کوچک: اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بین حالات مختلف در هر ستون را نشان می‌دهد.

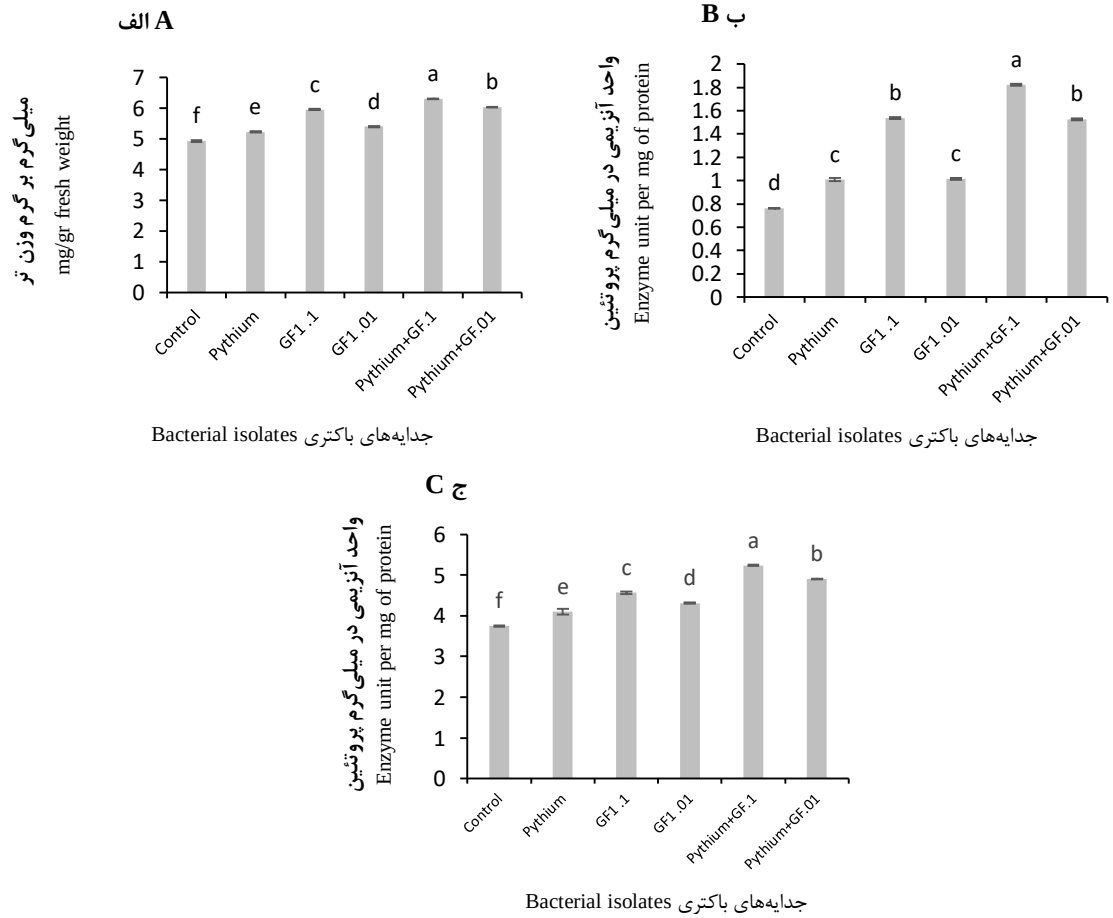
-: Negative sign indicates the percentage of reduction and lowercase letters: indicates significant difference at the five per cent level between different states in each column.

تغییرات فیزیولوژیکی مرتبط با دفاع گیاه

نتایج مرتبط با تغییرات فنول کل، کاتالاز و پراکسیداز بعد از ۱۴ روز و همزمان با برداشت میکروگرین‌ها نشان داد که باکتری در هر دو غلظت، قادر به افزایش میزان فنول کل و آنزیم‌های دفاعی در میکروگرین‌ها بوده است. غلظت‌های به کار رفته باکتری‌ها در تمام موارد با هم اختلاف معنی‌دار نشان دادند ولی غلظت پائین نیز در مقایسه با شاهد قادر به افزایش میزان فنول کل و آنزیم‌ها بود. تغییرات میزان فنول کل، کاتالاز و پراکسیداز تقریباً در تمام موارد از بیشترین به کمترین به ترتیب شامل تیمارهای ترکیب غلظت بالای باکتری و قارچ، ترکیب غلظت پائین باکتری و قارچ، غلظت بالای باکتری، غلظت پائین باکتری، تیمار قارچ تنها و شاهد فاقد هر نوع تیمار میکروبی بود. هر چند در مورد کاتالاز تغییرات حاصل از تلقیح قارچ بیمارگر تنها و تغییرات

حاصل کاربرد باکتری در غلظت کمتر تقریباً برابر بود و اختلاف معنی‌داری نشان نداد (شکل۲).

در این تحقیق برای اولین بار تأثیر کاهش بیماری از طریق مکانیسم احتمالی مقاومت القایی روی میکروگرین‌های ریحان مورد بررسی قرار گرفت و تأیید گردید. البته این بدان معنی نیست که سایر عوامل مؤثر در بیوکنترل نظیر رقابت یا وجود ترکیبات ضد میکروبی در مقادیر کم که با روش‌های معمول قابل ردیابی نیست، هیچ نقشی نداشته است ولی حداقل نقش مقاومت‌القایی را به‌عنوان یکی از فاکتورهای دخیل در بیوکنترل این بیماری در میکروگرین ریحان نشان می‌دهد. تحقیقات مختلف ایجاد مقاومت القایی و ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی مفید توسط باکتری‌های اندوفیت در گیاهان متنوع و در مراحل مختلف رشدی را نشان داده است؛ هر چند عمده این مطالعات روی مراحل رشدی دیگر گیاهان صورت گرفته و کمتر در مورد میکروگرین‌ها تحقیقات جامعی انجام شده است. با این وجود مراحل گیاهچه (اولیه رشد گیاه) نیز گاهی هدف این تحقیقات بوده‌اند. برای نمونه باکتری‌های اندوفیت *Achromobacter xylosoxidans* و *Bacillus pumilus* جداشده از آفتابگردان، میزان رشد و میزان سالیسیلیک اسید (مرتبط با مقاومت القایی) را در گیاهچه‌های آفتابگردان افزایش و میزان بیماری چند بیمارگر قارچی را در این گیاه کاهش دادند (Forchetti *et al.*, 2010).



شکل ۲- تغییرات فیزیولوژیک: فنول کل (الف)، کاتالاز (ب) و پراکسیداز (ج)
غلظت پائین باکتری= GF1.01 و غلظت بالای باکتری=GF1.1

Figure 2- Physiological changes: total phenol (A), catalase (B) and peroxidase (C)
Low bacterial concentration= GF1.01 and high bacterial concentration= GF1.1

تشخیص باکتری عامل کنترل بیولوژیک و محرک رشد

در آزمون‌های کلاسیک، جدایه GF1 باکتری، به صورت گرم منفی، هوازی اجباری، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت، عدم توانایی تولید رنگ فلورسنت روی محیط King B و عدم ایجاد رنگ زرد روی محیط YDC، عدم تولید گال و بیماری‌زایی روی گوجه‌فرنگی، ریحان و برخی گیاهان تیره لامیاسه مشخص گردید. در ادامه بعد از انجام آزمون‌های تشخیصی فنوتیپی و بیوشیمیایی و جستجوی بلاست در ژن‌بانک با استفاده از قطعه تعیین توالی شده از ژن 16S rRNA و داشتن بیشترین تشابه نوکلئوتیدی (۹۸ تا ۱۰۰ درصد) با گونه-های *ریزوبیوم*، جنس باکتری *Rhizobium* تشخیص داده شد. توالی در پایگاه داده‌های NCBI با کد دسترسی ON426360 ثبت گردید (درخت فیلوژنی نشان داده نشده است). گزارش‌های زیادی از جنس *Rhizobium* spp. به‌عنوان عامل بیوکنترل و محرک رشد در گیاهان مختلف و علیه بیمارگرهای مختلف موجود است. در مورد کاربرد *ریزوبیوم* علیه گونه‌های *پیتیوم* گزارشی از کاربرد تیمار بذری گونه *Rhizobium leguminosarum* علیه مرگ گیاهچه ناشی از *Pythium* spp. در عدس و نخود وجود دارد (Huang & Erickson, 2007). هر چند در مورد کنترل این بیماری در ریحان تحقیقات چندانی صورت نگرفته است. در عین حال این اولین گزارش از معرفی جدایه‌ای اندوفیت از جنس *ریزوبیوم* به عنوان عامل بیوکنترل علیه *پیتیوم* با مکانیسم احتمالی ایجاد مقاومت القایی در ریحان و همچنین تحریک رشد این گیاه می‌باشد. این تحقیق نیز تأیید کرد که گونه‌های باکتریایی جدا شده از یک گیاه گاهی قادر به کنترل بیماری و تحریک رشد روی گونه‌های گیاهی متفاوت، می‌باشند. در این تحقیق باکتری *ریزوبیوم* جدا شده از گوش‌بره‌زرد که از خانواده لامیاسه می‌باشد؛ قادر به کنترل بیماری و تحریک رشد روی میکروگرین ریحان (گیاه دیگری از این خانواده) بود. در مورد کاربرد باکتری‌های اندوفیت جدا شده از گیاهان غیر از ریحان و کاربرد آن در تحریک رشد ریحان و برخی گیاهان دیگر مایر و همکاران (۲۰۱۹) نشان دادند باکتری‌های جدا شده از ساقه گیاهان علفی (*Achillea millefolium*، *Solidago canadensis*، *Trifolium aureum* و *Dactylis glomerata*) رشد کرده در خاک آغشته به نفت، قادر به تحریک رشد برخی گیاهان از جمله ریحان هستند. به طور کلی، بسیاری از باکتری‌های با پتانسیل تجاری جهت کاربرد به‌عنوان سموم یا کودهای بیولوژیک، پتانسیل کاربرد روی میزبان‌های گیاهی مختلف و علیه بیماری‌های مختلف را دارند؛ از جمله استرین‌های باکتری‌های *Bacillus subtilis* که روی غلات، سبزیجات و سایر گیاهان متنوع، اثرات مفید مرتبط با رشد و کنترل بیماری را دارا هستند (Sagar *et al.*, 2022). از آن‌جایی‌که برخی گونه‌های *ریزوبیوم* قادر به ایجاد گال و بیماری‌زایی هستند، آزمون‌های بیماری‌زایی روی برخی گونه‌های گیاهی نظیر گوجه‌فرنگی، غلات، برخی گیاهان تیره نعناعیان و ریحان (در مراحل رشدی مختلف) نیز انجام گردید تا از عدم بیماری‌زا بودن و عدم تشکیل گال توسط باکتری اندوفیت، اطمینان حاصل گردد. این باکتری روی عمده این گیاهان محرک رشد بود و تأثیر منفی در رشد، علائم بیماری، گال و غیره مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش برخلاف بسیاری از تحقیقات مشابه که هدف کنترل بیولوژیک را نیز مدنظر دارد؛ غربال اولیه باکتری‌های دارای پتانسیل احتمالی مفید در کشاورزی بر اساس خاصیت ضد قارچی صورت نگرفت؛ بلکه هدف اولیه افزایش فاکتورهای رشدی میکروگرین در نظر گرفته شد. نهایتاً از بین باکتری‌ها، جدایه‌ای که تحریک رشد خوبی از خود نشان داد به‌عنوان باکتری دارای پتانسیل احتمالی در کنترل بیولوژیک بررسی گردید. چون هدف کنترل بیولوژیک نهایتاً افزایش راندمان در اثر کنترل بیماری می‌باشد. منطقی است که اولویت با ویژگی‌های محرک رشد که مستقیماً در راندمان تأثیر دارند، باشد. همان‌طور که در نتایج تحقیق هم تعیین گردید؛ مثلاً در مورد میزان وزن‌تر و خشک که معیار

اقتصادی مهمی محسوب می‌گردد؛ میکروگرین‌هایی که باکتری به آن‌ها تلقیح شده بود، حتی در حضور قارچ هم افزایش وزن در مقایسه با شاهد داشتند. یکی از دلایل انجام این پژوهش، یافتن باکتری بیوکنترلی بود که بدون تأثیر مستقیم ضد قارچی، بیماری‌زایی را با مکانیسم احتمالی مقاومت القایی کاهش دهد. این هدف، جنبه‌ای جدید در پژوهش است که حداقل در مورد میکروگرین‌ها برای اولین بار انجام گردید. همچنین این جنس باکتری نسبت به بسیاری از عوامل بیوکنترل معمول، کمتر به‌عنوان باکتری پرخطر از نظر سلامت انسان گزارش شده است، خصوصاً این نکته از این جهت حائز اهمیت می‌باشد که میکروگرین‌ها مصرف تازه‌خوری داشته و عدم آلودگی میکروبی و شیمیایی آن‌ها، از سایر گیاهان خوراکی دیگر مهم‌تر است. باکتری جدا شده در پژوهش اخیر روی میزبان متفاوت، قادر به ایجاد اثرات مفید القاء مقاومت و تحریک رشد بود؛ به‌نحوی‌که تأثیر برخی ویژگی‌های مرتبط با محرک رشدی در گیاه ریحان در اثر تلقیح *ریزوبیوم* GF1 جدا شده از گوش‌برەزرد، از تأثیر باکتری‌های جدا شده از خود ریحان نیز بیشتر بود. این موضوع امیدی را ایجاد می‌کند که در صورت انجام تحقیقات گسترده‌تر و اثبات اثرات مفید این باکتری روی سایر گیاهان بتوان این باکتری را به‌عنوان یک جدایه دارای قابلیت تجاری معرفی کرد. پژوهش اخیر اولین گزارش از معرفی باکتری اندوفیت جهت کنترل بیمارگر *P. ultimum* و تحریک رشد در میکروگرین‌های ریحان می‌باشد.

سپاسگزاری

از آن‌جا که انجام موفقیت آمیز این مقاله در قالب طرح تحقیقاتی با حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه ایلام میسر گردید؛ بدین وسیله از تمام مسئولین و اساتید ارجمند دانشگاه ایلام کمال تقدیر و تشکر داریم.

Refrences

- Almuhayawi, M. S., Abdel-Mawgoud, M., Al Jaouni, S. K., Almuhayawi, S. M., Alruhaili M. H., Selim, S. & AbdElgawad, H. (2021). Bacterial endophytes as a promising approach to enhance the growth and accumulation of bioactive metabolites of three species of Chenopodium Sprouts. *Plants*, 10(12), 2745.
- Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. & Garrity, G. (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria*. Springer.
- Briatia, X., Jomduang, S., Park, C. H., Lumyong, S., Kanpiengjai, A. & Khanongnuch, C. (2017). Enhancing Growth of Buckwheat Sprouts and Microgreens by Endophytic Bacterium Inoculation. *International Journal of Agriculture & Biology*, 19(2).
- Cheng, H. R. & Jiang, N. (2006). Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts. *Biotechnology letters*, 28(1), 55-59.
- Dhindsa, R. S., Plumb-Dhindsa, P. & Thorpe, T. A. (1981). Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *Journal of Experimental botany*, 32(1), 93-101.
- Forchetti, G., Masciarelli, O., Izaguirre, M. J., Alemano, S., Alvarez, D. & Abdala, G. (2010). Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress, produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi. *Current microbiology*, 61(6), 485-493.
- Garibaldi, A., Gullino, M. L. & Minuto, G. (1997). Diseases of basil and their management. *Plant disease*, 81(2), 124-132.
- Hata, E. M., Yusof, M. T. & Zulperi, D. (2021). Induction of systemic resistance against bacterial leaf streak disease and growth promotion in rice plant by *Streptomyces shenzhenesis* TKSC3 and Streptomyces sp. SS8. *The plant pathology journal*, 37(2), 173.
- Huang, H. & Erickson, R. (2007). Effect of seed treatment with *Rhizobium leguminosarum* on Pythium damping-off, seedling height, root nodulation, root biomass, shoot biomass, and seed yield of pea and lentil. *Journal of Phytopathology*, 155(1), 31-37.
- Köhl, J., Kolnaar, R. & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant

diseases: relevance beyond efficacy. *Frontiers in plant science*, 845.
- Kou, L., Luo, Y., Yang, T., Xiao, Z., Turner, E. R., Lester, G. E., Wang, Q. & Camp, M. J. (2013). Postharvest biology, quality and shelf life of buckwheat microgreens. *LWT-Food Science and Technology*, 51(1), 73-78.
- Lobiuc, A., Vasilache, V., Pintilie, O., Stoleru, T., Burducea, M., Oroian, M. & Zamfirache, M.-M. (2017). Blue and red LED illumination improves growth and bioactive compounds contents in acyanic and cyanic *Ocimum basilicum* L. *microgreens. Molecules*, 22(12), 2111.
- Mayer, E., Dörr de Quadros, P. & Fulthorpe, R. (2019). *Plantibacter flavus*, *Curtobacterium herbarum*, *Paenibacillus taichungensis*, and *Rhizobium selenitireducens* endophytes provide host-specific growth promotion of Arabidopsis thaliana, basil, lettuce, and bok choy plants. *Applied and environmental microbiology*, 85(19), e00383-00319.
- McGehee, C. S., Raudales, R. E., Elmer, W. H. & McAvoy, R. J. (2019). Efficacy of biofungicides against root rot and damping-off of microgreens caused by Pythium spp. *Crop Protection*, 121, 96-102.
- Mohssen, N. F., SHARAFI, Z. M. & Siadat, A. (2010). Study the effect of aging acceleration test on germination and seedling growth of wheat cultivars in controlled conditions (in vitro). *Crop Physiology*, 2, 59 -71.(In Farsi).
- Pasandideh, H., Seyed Sharifi, R., Hamidi, A., Mobasser, S. & Sedghi, M. (2014). Relationship of seed germination and vigour indices of commercial soybean [Glycine max (L.) Merr.] cultivars with seedling emergence in field. *Iranian Journal of Seed Sciences and Research*, 1(1), 29-50.
- Plewa, M. J., Smith, S. R. & Wagner, E. D. (1991). Diethyldithiocarbamate suppresses the plant activation of aromatic amines into mutagens by inhibiting tobacco cell peroxidase. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 247(1), 57-64.
- Puccinelli, M., Malorgio, F., Rosellini, I. & Pezzarossa, B. (2019). Production of selenium-biofortified microgreens from selenium-enriched seeds of basil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(12), 5601-5605.
- Roberts, S. & Koenraadt, H. (2006). International Rules for Seed Testing. *ISTA (The International Seed Testing Association)*, 1-276.
- Sagar, A., Yadav, S., Sayyed, R., Sharma, S. & Ramteke, P. (2022). *Bacillus subtilis*: A Multifarious Plant Growth Promoter, Biocontrol Agent, and Bioalleviator of Abiotic Stress. In *Bacilli in Agrobiotechnology*, 561-580.
- Sahu, P. K., Singh, S., Gupta, A., Singh, U. B., Brahmaprakash, G. & Saxena, A. K. (2019). Antagonistic potential of bacterial endophytes and induction of systemic resistance against collar rot pathogen *Sclerotium rolfsii* in tomato. *Biological control*, 137, 104014.
- Sahu, P. K., Singh, S., Gupta, A. R., Gupta, A., Singh, U. B., Manzar, N., Bhowmik, A., Singh, H. V. & Saxena, A. K. (2020). Endophytic bacilli from medicinal-aromatic perennial Holy basil (*Ocimum tenuiflorum* L.) modulate plant growth promotion and induced systemic resistance against *Rhizoctonia solani* in rice (*Oryza sativa* L.). *Biological control*, 150, 104353.
- Seevers, P., Daly, J. & Catedral, F. (1971). The role of peroxidase isozymes in resistance to wheat stem rust disease. *Plant physiology*, 48(3), 353-360.
- Sharma, S., Shree, B., Sharma, D., Kumar, S., Kumar, V., Sharma, R. & Saini, R. (2022). Vegetable microgreens: The gleam of next generation super foods, their genetic enhancement, health benefits and processing approaches. *Food Research International*, 111038.
- Sturz, A., Christie, B., Matheson, B. & Nowak, J. (1997). Biodiversity of endophytic bacteria which colonize red clover nodules, roots, stems and foliage and their influence on host growth. *Biology and Fertility of Soils*, 25(1), 13-19.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Zhang, X. & Ervin, E. (2004). Cytokinin-containing seaweed and humic acid extracts associated with creeping bentgrass leaf cytokinins and drought resistance. *Crop science*, 44(5), 1737-17.