



علوم و تحقیقات بذر ایران

سال دهم / شماره دوم / ۱۴۰۲ (۳۲ - ۲۱)

مقاله پژوهشی

DOI: 10.22124/jms.2023.7672



بهبود صفات جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه در گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) توسط *Pseudomonas* spp.

پدرام علی‌موسی‌زاده^۱، سیدجواد صانعی*^۲، عبدالحسین طاهری^۳

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۷

چکیده

باکتری‌های محرک رشد با استقرار روی ریشه، رشد گیاهان را تحریک می‌کنند. این آزمایش جهت بررسی چهار استرین از *Pseudomonas fluorescens* Migula (PF1-4) و شش استرین از *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula (PP1-PP6) بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر شامل درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول و وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه، شاخص بنیه بذر و گیاهچه و فعالیت آنزیم آلفا-آمیلاز گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) صورت گرفت. تولید سیدروفور و اسید ایندول استیک (IAA) باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاه بررسی گردید. در این مطالعه، از سوسپانسیون باکتری با غلظت 1×10^9 سلول/میلی‌لیتر برای مایه‌زنی بذر در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. نتایج نشان داد که غلظت متابولیت‌ها بین استرین‌های باکتری‌ها به‌طور معنی‌داری متفاوت بود. استرین‌های مختلف باکتری‌های مورد مطالعه هم‌چنین اثرهای متفاوتی بر شاخص‌های جوانه‌زنی داشتند و برهمکنش گیاه-باکتری بر شاخص‌های جوانه‌زنی مثبت یا بدون اثر بود. بیشینه اثر استرین‌های باکتری‌های مورد بررسی به باکتری‌های PP-1، PP-2، PP-5، PF-1 و PF-2 مربوط بود. تاثیر استرین‌های باکتری بر صفات مورد بررسی همبستگی معنی‌داری با میزان تولید IAA توسط باکتری داشت. به‌طور کلی، تاثیر پیش‌تیمار زیستی با باکتری‌های محرک رشد بر شاخص‌های جوانه‌زنی به‌گونه‌ای استرین باکتری بستگی داشت. نتایج هم‌چنین نقش کلیدی میزان IAA تولید شده توسط باکتری را بر جوانه‌زنی بذر و تحریک ویژگی‌های جوانه‌زنی نشان داد.

واژه‌های کلیدی: اسید ایندول استیک، جوانه‌زدن بذر، سودوموناس، گل همیشه‌بهار

۱- پدرام علی‌موسی‌زاده: pedram.alim@gmail.com

۲- سیدجواد صانعی: sa_nei@yahoo.com

۳- عبدالحسین طاهری: a.taheri@gau.ac.ir

۱- دانشجوی کارشناسی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

*نویسنده مسئول: sa_nei@yahoo.com

مقدمه

محیطها شامل خاک، ریزوسفر و فیلوسفر گیاه یا آب جدا شده‌اند (He *et al.*, 2016; Kahli *et al.*, 2022; Saijo *et al.*, 2022). بسیاری از باکتری‌های ریزوسفر قادرند به‌طور مستقیم با تولید هورمون‌های گیاهی، به‌ویژه اسید ایندول استیک (IAA) کمیت و کیفیت رشد گیاه را بهبود بخشند (Patten and Glick, 2002; Tsavkelova *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2011; Chen and Arora, 2013; Alqarawi *et al.*, 2014; Akram *et al.*, 2016). این باکتری‌ها هم‌چنین قابلیت حمله عوامل بیماری‌زا را به‌طور مستقیم با تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیک، سیدروفورها، سیانیدهیدروژن و آنزیم پروتئاز یا با آثار غیرمستقیم با تحریک مقاومت سیستمیک تحت‌تاثیر قرار دهند (Javid *et al.*, 2011; Mirmazloum *et al.*, 2022; Vishnupradeep *et al.*, 2020). تاثیر مثبت گونه‌های مختلف جنس *Pseudomonas* روی فعالیت قارچ‌های میکوریزا و تولید IAA از سازوکارهای موثر در افزایش رشد گیاه گزارش شده است (Ghorbanpour and Hatami, 2014).

گیاه همیشه‌بهار (*Calendula officinalis* L.) گیاهی بوته‌ای از تیره میناسانان (Asteraceae) است. این گیاه علاوه بر ویژگی‌های درمانی مهم در درمان بیماری‌های معده و روده، درمان زخم‌های پوستی و ضدالتهاب، در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی (تهیه کرم‌های مختلف) و مواد غذایی (رنگ غذا) کاربرد فراوانی دارد (Kudoyarova *et al.*, 2019; Kozłowska *et al.*, 2011). پیش‌تیمارهای فیزیکی و هیدروپرایمینگ برای این گیاه به‌منظور کوتاه شدن زمان کاشت تا سبز شدن، یکنواختی رشد و حفاظت بذر از عوامل زنده و غیرزنده در مرحله بحرانی استقرار گیاهچه پیشنهاد شده است (Kouchebagh *et al.*, 2014). با توجه به اهمیت جوانه‌زنی بذر در تعیین تراکم نهایی بوته در واحد سطح و تاثیر باکتری‌های مولد IAA بر صفات جوانه‌زنی و رشد گیاهچه، تاثیر استرین‌های مختلفی از باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* Migula و *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula (از باکتری‌های تولیدکننده IAA) بر صفات جوانه‌زنی و رشد گیاه همیشه‌بهار مورد بررسی قرار گرفت.

جوانه‌زنی و رشد اولیه گیاهچه دو مرحله بحرانی و مهم در زندگی گیاهان بوده که تحت‌تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند (Ak *et al.*, 2020). مرحله جوانه‌زنی بذر در تعیین تراکم نهایی بوته در واحد سطح اهمیت دارد و این تراکم مناسب زمانی به‌دست می‌آید که بذرهای کاشته شده دارای درصد و سرعت جوانه‌زنی مناسبی باشند (Ng *et al.*, 2022; Chin *et al.*, 2012). تنش‌های محیطی در بسیاری از گیاهان زراعی در مراحل ابتدایی رشد، با تغییر تراکم نهایی بوته بیشترین خسارت را به گیاه وارد می‌کنند (Ramalingam and In-Jung, 2013). به همین دلیل پژوهش‌های مختلفی در مورد تاثیر تنش‌های محیطی بر فرایند جوانه‌زنی صورت گرفته است (Petti *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2021).

پیش‌تیمار یکی از روش‌های بهبود جوانه‌زدن بذر می‌باشد که می‌تواند سبب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی، سبز شدن و افزایش دامنه جوانه‌زدن بذر در شرایط محیطی تنش‌زا مانند شوری، دما، خشکی و بیماری‌های قارچی و باکتریایی شود (Ramalingam and In-Jung, 2020; Bashir *et al.*, 2013). از بین روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی پیشنهاد شده برای پیش‌تیمار بذر، پیش‌تیمار زیستی بذر به‌عنوان یک روش مکمل برای بهبود شرایط جوانه‌زنی و بنیه بذر و گیاهچه در شرایط محیطی مختلف پیشنهاد شده است (Cavusoglu and Kabar, 2010; Chitra and Jijeesh, 2021).

در دو دهه اخیر، پیش‌تیمار بذر توسط باکتری‌ها و قارچ‌های ریزوسفر مورد توجه قرار گرفته است (Chen and Arora, 2013). در بین عوامل زیستی، باکتری‌های محرک رشد، گروه بسیار مهمی از میکروفلور عمومی ریزوسفر را تشکیل می‌دهند که با سازوکارهای مختلف، از جمله تحریک جوانه‌زنی بذر، موجب افزایش رشد گیاهان می‌شوند (Schwantes *et al.*, 2016; Bakaeva *et al.*, 2020). کاربرد این باکتری‌ها به‌طور پیوسته در کشاورزی در حال افزایش است و به‌عنوان جایگزینی برای کودهای شیمیایی و سموم برای جلوگیری از آلودگی محیط زیست مورد توجه می‌باشند (Ardakani *et al.*, 2010).

باکتری‌های جنس *Pseudomonas* بخش مهمی از جمعیت باکتری‌های ریزوسفری را تشکیل می‌دهند که به‌طور وسیعی در طبیعت گسترش پیدا کرده و از بیشتر

مواد و روش‌ها

استرین‌های باکتری و قارچ

استرین‌های باکتری *P. fluorescens* (استرین‌های ۱ الی ۴)، *P. putida* (استرین‌های ۱ الی ۶) از بخش کلکسیون گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد. منشا باکتری‌ها از ناحیه ریزوسفر گیاهان زراعی از منطقه کرج و گرگان بوده است. نگهداری باکتری‌ها روی محیط کشت نوترینت آگار (Nutrient agar=NA) در دمای ۵-۷ درجه سلسیوس بود (Bakaeva et al., 2020).

تهیه سوسپانسیون باکتری

سوسپانسیون باکتری در ارلن‌های حاوی محیط کشت مایع نوترینت (Nutrient broth) به مدت ۴۸ ساعت روی تکان‌دهنده با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق تهیه گردید. سپس سوسپانسیون مذکور به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۴۵۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ گردید و باکتری‌های ته‌نشین شده در لوله سانتریفیوژ با آب مقطر سترون شست-و شو داده شدند. برای تهیه سوسپانسیون باکتری با غلظت مورد نظر در این مطالعه (10^9 CFU/ml) از طول موج ۵۹۰ نانومتر و OD=0.06 استفاده شد (Sharma et al., 2013).

تاثیر باکتری‌ها بر صفات جوانه‌زنی و رشد گیاهچه

بذرهای گل همیشه‌بهار به مدت دو دقیقه در هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی و شش بار با آب مقطر به خوبی شسته شدند. بذرها به تناوب (پنج بار) در سوسپانسیون باکتری قرار گرفتند و زیر هود لامینار خشک شدند. برای قرار گرفتن بهتر باکتری‌ها روی بذر از کربوکسی‌متیل سلولز (۰/۵ درصد) در سوسپانسیون باکتری استفاده شد. برای تیمار شاهد، از محلول کربوکسی‌متیل سلولز ۰/۵ درصد به تنهایی استفاده گردید (Bakaeva et al., 2020). درصد جوانه‌زنی بذر با استفاده از چهار تکرار ۵۰ تایی بذر در ظروف پتری روی کاغذ صافی واتمن مرطوب شده با آب مقطر طی ۱۰ روز در شرایط دمایی 25 ± 2 درجه سلسیوس و تاریکی صورت گرفت و درصد و سرعت جوانه‌زنی به ترتیب از رابطه (۱) و (۲) به دست آمد (Chen and Arora, 2013):

$$\text{Germination Percent} = \frac{\sum n}{N} \times 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$

$$\text{Germination Rate} = \sum \left(\frac{G_t}{D_t} \right) \quad (\text{رابطه ۲})$$

که در آن n ، تعداد بذر جوانه‌زده در هر روز؛ N ، مجموع بذرهای در هر تیمار؛ G_t ، تعداد بذر جوانه‌زده در t روز و D_t ، تعداد روزهای پس از شروع جوانه‌زدن است. طول گیاهچه (طول ریشه‌چه و ساقه‌چه) در پایان روز دهم اندازه‌گیری شد و سپس به منظور تعیین وزن خشک، گیاهچه‌های هر تشتک به طور جداگانه به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سلسیوس آون قرار داده شد (۳). شاخص‌های طولی و وزنی بنیه گیاهچه از رابطه‌های (۳) و (۴) محاسبه شدند (Chen and Arora, 2013):

$$\text{Vigor Index I} = (\text{RL} + \text{SL}) \times \text{GP} \quad (\text{رابطه ۳})$$

$$\text{Vigor Index II} = (\text{RW} + \text{SW}) \times \text{GP} \quad (\text{رابطه ۴})$$

در این رابطه‌ها RL ، طول ریشه‌چه (سانتی‌متر)؛ SL ، طول ساقه‌چه (سانتی‌متر)؛ GP ، درصد جوانه‌زدن؛ RW ، وزن خشک ریشه‌چه (میلی‌گرم)؛ SW ، وزن خشک ساقه‌چه (میلی‌گرم) است.

تولید متابولیت‌های میکروبی

میزان تولید سیدروفور و هورمون اکسین توسط استرین‌های باکتری در شرایط درون‌شیشه‌ای اندازه‌گیری گردید. برای بررسی تولید سیدروفور، از روش اسپکتروفتومتری بر اساس میزان تولید پایوردین استفاده شد (Ludwig-Müller, 2011). برای ارزیابی تولید هورمون اکسین، کشت ۷۲ ساعت باکتری در محیط کشت مایع تریپتوفان سویا (Tryptone Soybean Broth) با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با چهار میلی‌لیتر از معرف سالکوسکی (Salkowski reagent) (شامل ۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ ۹۸ درصد، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن نیم‌مولار $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) مخلوط گردید. این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه نگهداری شد و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر، میزان جذب نور در طول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت گردید. مقدار تولید هومون با منحنی استاندارد IAA محاسبه شد (Patade et al., 2009).

اندازه‌گیری فعالیت آلفا-آمیلاز

یک گرم از بذرهای جوانه‌زده در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ($\text{pH}=6/8$) عصاره‌گیری شد. سپس از روش‌ها حاصل از انجام سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه برای تعیین فعالیت آلفا آمیلاز

نتایج

تولید متابولیت‌های میکروبی

نتایج حاصل از ارزیابی میزان تولید هورمون اکسین توسط باکتری‌های مورد بررسی نشان داد که استرین‌های باکتری مورد مطالعه قادر به تولید IAA بودند، اما میزان تولید IAA توسط استرین‌ها تفاوت داشت (جدول ۱) و از نظر آماری در چهار گروه مختلف قرار گرفتند (شکل ۱). در این رابطه کمترین میزان تولید IAA به استرین PF-4 (۱/۰۱ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و بیشترین تولید IAA به استرین PP-2 (۱۲/۰۶ میکروگرم/ میلی‌لیتر) مربوط بود (شکل ۱).

به روش رنگ‌سنجی توسط یُد و در طول موج ۶۳۰ نانومتر استفاده گردید (Xiao et al., 2006).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

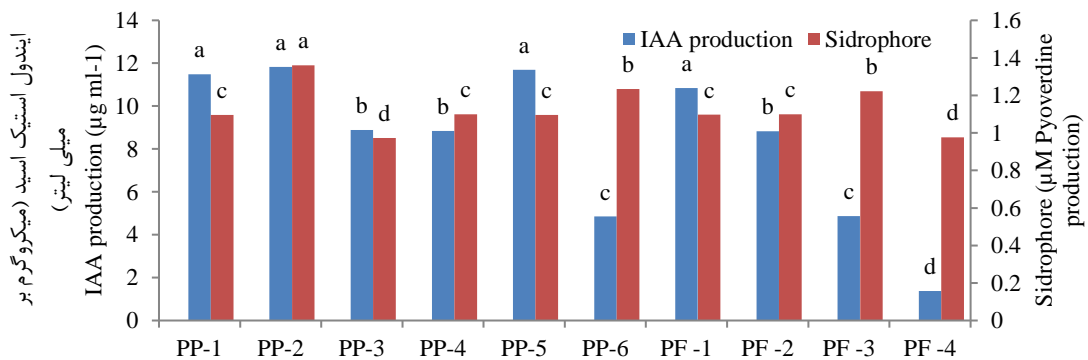
این آزمایش بر پایه طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. با در نظر گرفتن سطح اطمینان $P \leq 0.05$ در تجزیه واریانس یک عاملی (One way ANOVA)، از آزمون دانکن برای مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و ترسیم شکل‌ها با استفاده از نرم‌افزار R 4.1.1 صورت گرفت. ارتباط بین استرین‌های باکتری بر اساس اطلاعات به دست آمده با استفاده از خوشه-بندی داده‌ها به روش UPGMA انجام شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس فعالیت متابولیکی گونه‌های *Pseudomonas* مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاه

Table 1. Analysis of variance of *in vitro* screening of metabolic activity of *Pseudomonas* species

منبع تغییر S.O.V	درجه آزادی (df)	Mean of Squares	
		تولید IAA IAA production ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	سیدروفور Sidrophore (μM Pyoverdine production)
Treatment	9	37.93 **	0.04170 **
Error	20	0.90	0.00407
CV (%)		11.36	5.66

a **, $P \leq 0.01$; * $P \leq 0.05$



شکل ۱- فعالیت متابولیکی گونه‌های *Pseudomonas* (PP=*Pseudomonas putida* و PS=*Pseudomonas fluorescens*) مورد مطالعه در شرایط آزمایشگاه. ستون‌ها با حرف مشترک بدون اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۰.۰۵٪ با آزمون دانکن می‌باشند

Figure 2. *In vitro* screening of metabolic activity of *Pseudomonas* species (PP= *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*). Columns having at least one similar letter do not show a significant difference at $P \leq 0.05$ using Duncan's test

الی ۱/۳۴ میکرومول پایورودین در بین استرین‌ها متفاوت بود که بیشترین مقدار به PP-2 مربوط بود (شکل ۱).

نتایج به دست آمده از آزمون تولید سیدروفور، نشان داد که باکتری‌های مورد استفاده در این بررسی توانایی تولید سیدروفور خوبی داشتند. میزان تولید سیدروفور از ۱/۰۳

اثر پیش‌تیمار زیستی بذر بر صفات جوانه‌زنی

اثر تیمار زیستی بذر با باکتری‌ها بر صفات جوانه‌زنی به غیر از شاخص طولی بنیه گیاهی، در سطح آماری یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تاثیر باکتری‌های مورد بررسی بر صفات جوانه‌زنی با توجه به گونه و استرین باکتری به طور معنی‌داری متفاوت می‌باشد. در این رابطه، تاثیر سه استرین از *P. putida* (PP-1, PP-2, PP-5) و ۲ استرین از *P. fluorescens* (PF-1 و PF-2) نسبت به شاهد معنی‌دار بود (جدول ۳). طول ساقچه و ریشه‌چه در حضور این استرین‌ها به ترتیب ۴۴/۹۶ و ۵۳/۱۳ درصد افزایش داشت. میزان افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی در حضور استرین‌های مذکور نسبت به شاهد به ترتیب ۲۱/۴۶ و ۱۵/۲۴ درصد محاسبه شد. سه استرین از *P. putida* (PP-1, PP-2, PP-5) و دو استرین از *P. fluorescens* (PF-1 و PF-2) هم‌چنین در افزایش ۰/۶ تا ۳ برابری صفات وزن خشک ریشه‌چه و ساقچه و شاخص‌های طولی و وزنی بنیه گیاهی موثر بودند. در هیچ‌یک از تیمارها کاهش صفات مورد مطالعه نسبت به شاهد مشاهده نشد (جدول ۳). بررسی تغییرات درصد جوانه‌زنی بذر و طول و وزن خشک گیاهیچه تحت تاثیر میزان تولید IAA باکتری نشان داد که ارتباط بین میزان تولید IAA توسط باکتری و درصد جوانه‌زنی بذر هم‌چنین تغییر صفات طول و وزن خشک ریشه‌چه و ساقچه به صورت معادله درجه دو بود (شکل‌های ۲ و ۳). ارتباط تغییرات درصد جوانه‌زنی بذر و طول و وزن خشک گیاهیچه با تولید سیدروفور در باکتری‌های مورد مطالعه معنی‌دار نبود ($P \leq 0.05$).

پیش‌تیمار زیستی به کار برده شده در این آزمایش تاثیر معنی‌داری بر میزان فعالیت آنزیم آلفا-امیلاز داشت (جدول ۲). این تاثیر در رابطه با گونه و استرین باکتری‌های مورد بررسی متفاوت بود (جدول ۳). چهار استرین از *P. fluorescens* تاثیر معنی‌داری بر افزایش فعالیت آنزیم داشتند، اگرچه میزان این افزایش در بین استرین‌ها متفاوت بود. تاثیر برخی از استرین‌های *P. putida* بر تغییر فعالیت آلفا-امیلاز با شاهد تفاوت معنی‌دار نشان نداد ($P \leq 0.05$). جدول ۳. میزان فعالیت آنزیم آلفا-امیلاز تحت تاثیر تولید IAA بوده و ارتباط بین دو متغیر به صورت معادله درجه دو با ضریب همبستگی ۰/۷۰۲ به دست آمد (شکل ۴). با توجه به اطلاعات مربوط به صفات مورد مطالعه به روش

UPGMA، باکتری‌های مورد مطالعه در سه گروه معنی‌دار قرار گرفتند. در این رابطه، زیرگروه‌های مختلفی برای خوشه دوم مشخص گردید (شکل ۵).

بحث

پیش‌تیمار یکی از روش‌های بهبود جوانه‌زنی بذر می‌باشد که می‌تواند سبب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی، سبز شدن و افزایش دامنه جوانه‌زدن بذرها در شرایط محیطی تنش‌زا مانند شوری، دما، خشکی و بیماری‌های قارچی و باکتریایی شود (Ramalingam and In-Jung, 2013). از بین روش‌های مختلف پیش‌تیمار، پیش‌تیمار زیستی بذر، با توجه به عدم آثار منفی بر محیط زیست، به عنوان یک روش مکمل برای بهبود شرایط جوانه‌زنی و بنیه بذر و گیاهیچه در شرایط محیطی مختلف پیشنهاد شده است (Bakaeva et al., 2020; Chitra and Jijeesh, 2021).

نتایج به دست آمده از این بررسی توان تولید IAA را در استرین‌های مختلف *P. putida* و *P. fluorescens* نشان داد. اگرچه استرین‌های دو گونه مورد بررسی از نظر میزان تولید هورمون متفاوت بوده و میزان تولید IAA آن‌ها در محیط درون‌شیشه‌ای از ۱/۳۷ تا ۱۱/۸۳ متغی بود (شکل ۱). تفاوت در میزان تولید IAA توسط گونه‌های مختلف *Pseudomonas* و استرین‌های مختلف آن در گزارش‌های مختلف در دامنه ۱/۰۱ الی ۱۲/۰۶ میکروگرم/ میلی‌لیتر اشاره شده است (Bano et al., 2013; Egamberdieva et al., 2015; Timofeeva et al., 2023).

نتایج این بررسی تاثیر برخی از استرین‌های باکتری‌های مورد بررسی را بر طول و وزن خشک گیاهیچه حاصل را نشان داد. این نتایج با رشد بهتر گیاهیچه‌های ذرت تلقیح‌شده با استرین‌های *Azospirillum lipoferum* (Ashrafuzzaman et al., 2009)، افزایش جوانه‌زنی بذرها، طول ریشه و استقرار اولیه گیاهیچه در برنج با مایه‌زنی بذر با باکتری‌های مولد IAA (Etesami et al., 2015)، تحریک رشد ریشه در گیاهان نخود در حضور استرین‌های تولیدکننده IAA (Ak et al., 2020) *Bradyrhizobium japonicum* هم‌چنین جوانه‌زنی بذر برخی از ارکیدها نیز تنها در حضور برخی از باکتری‌های مولد IAA (Thompson et al., 1996) مطابقت دارد. تاخیر در جوانه‌زنی بذر در حضور

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر پیش تیمار زیستی بذر بر صفات جوانه زنی

Table 2. Analysis of variance of seed biopriming on germination characteristics

منبع تغییر S.O.V	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات								
		درصد جوانه زنی Germination percentage	سرعت جوانه زنی Germination rate	طول ریشه چه Radicle length	طول ساقه چه Plumule length	وزن خشک ریشه چه Radicle dry weight	وزن خشک ساقه چه Plumule dry weight	شاخص طولی بنیه گیاهچه Seed vigor Index	شاخص وزنی بنیه گیاهچه Seedling vigor Index	فعالیت آلفا- آمیلاز α -amylase activity
Treatment	10	174.80**a	0.23053**	5.996**	1.1920**	1.401e-6**	2.176e-5**	186305*	0.3077**	0.008104**
Error	33	23.58	0.01586	0.434	0.3077	4.440e-8	3.560e-7	10998	0.0049	0.000013
CV (%)		5.92	5.14	9.06	10.33	11.61	9.39	10.03	10.25	5.79

a **, $P \leq 0.01$; *, $P \leq 0.05$
* = سطح احتمال یک درصد؛ ** = سطح احتمال پنج درصد

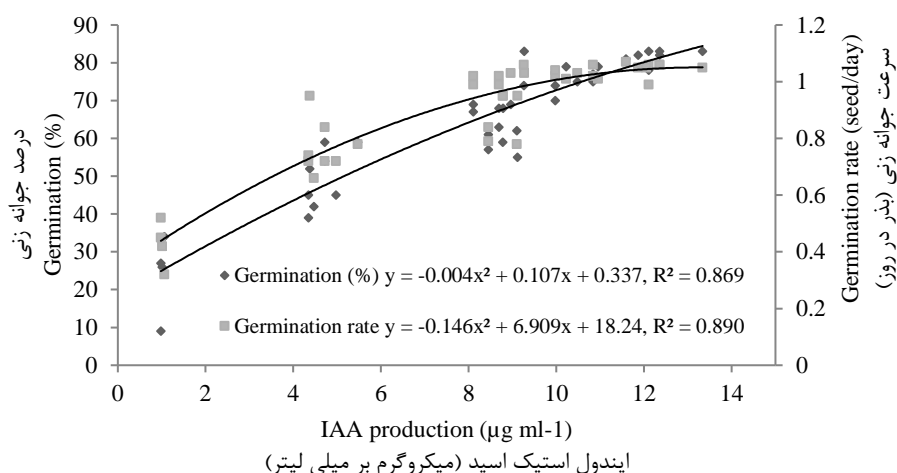
جدول ۳- مقایسه میانگین اثر پیش تیمار زیستی بذر بر صفات جوانه زنی

Table 3. Means comparison of seed biopriming on germination characteristics

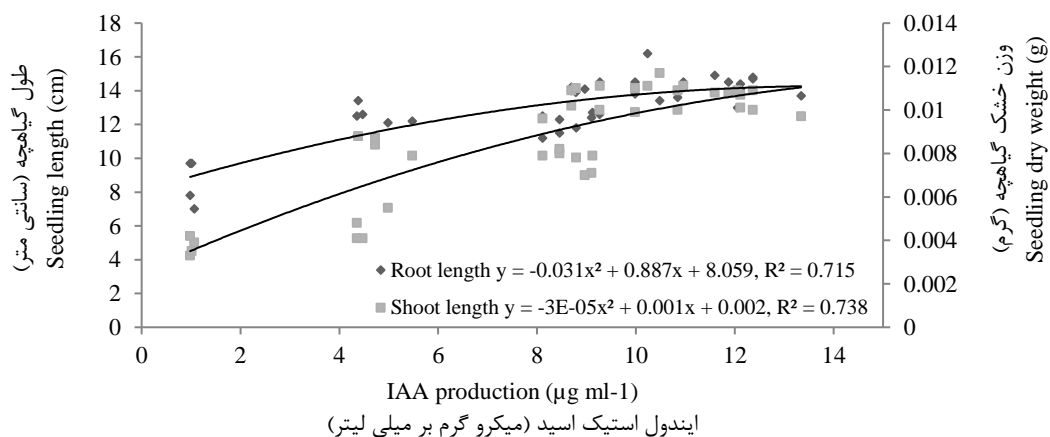
استرین باکتری Bacterial strain	شاخص های جوانه زنی								
	درصد جوانه زنی Germination percentage (%)	سرعت جوانه زنی Germination Rate (seed/day)	طول ریشه چه Radicle length (cm)	طول ساقه چه Plumule Length (cm)	وزن خشک ریشه چه Radicle dry weight (g)	وزن خشک ساقه چه Plumule dry weight (g)	شاخص طولی بنیه گیاهچه Seed vigor Index	شاخص وزنی بنیه گیاهچه Seedling vigor Index	فعالیت آلفا- آمیلاز α -amylase activity (Mmol/ml)
Control	77.50 bc	2.19 c	5.42 c	4.07 b	0.0012 bc	0.0026 c	787.07 bc	0.301 c	0.0190 cd
<i>Pseudomonas putida</i>									
PP-1	91.50 a	2.66 a	8.40 a	5.97 a	0.0023 a	0.0084 a	1315.62 a	0.976 a	0.1070 a
PP-2	90.75 a	2.68 a	8.32 a	5.82 a	0.0025 a	0.0080 a	1285.45 a	0.957 a	0.1087 a
PP-3	76.75 bc	2.47 ab	7.05 bc	5.17 ab	0.0013 bc	0.0064 b	938.02 b	0.598 b	0.0252 bc
PP-4	75.00 c	2.13 c	7.05 bc	5.34 ab	0.0013 bc	0.0067 b	929.65 b	0.605 b	0.0180 d
PP-5	88.00 a	2.67 a	8.30 ab	5.92 a	0.0023 a	0.0084 a	1252.92 a	0.942 a	0.1085 a
PP-6	76.00 c	2.45 ab	6.87 c	5.12 ab	0.0016 b	0.0068 b	910.42 bc	0.641 b	0.0172 d
<i>Pseudomonas fluorescens</i>									
PF-1	87.25 a	2.66 a	8.27 ab	6.10 a	0.0025 a	0.0082 a	1250.45 a	0.936 a	0.1110 a
PF-2	86.00 ab	2.63 a	8.42 a	5.25 ab	0.0024 a	0.0081 a	1180.92 a	0.908 a	0.1080 a
PF-3	76.50 c	2.28 bc	6.87 c	5.25 ab	0.0011 c	0.0034 c	927.57 b	0.354 c	0.0285 b
PF-4	76.75 bc	2.05 c	4.95 c	4.37 b	0.0011 c	0.0026 c	716.95 c	0.285 c	0.0272 b

* پیش تیمارهای هر ستون با حداقل یک حرف مشترک بدون اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۰.۵٪ با آزمون دانکن می باشند.

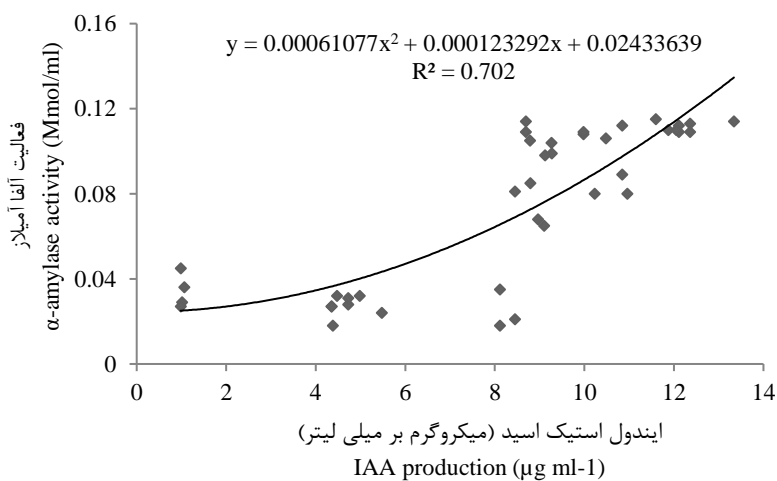
* Treatments at each column having at least one similar letter do not show a significant difference at $P \leq 0.05$ using Duncan's test.



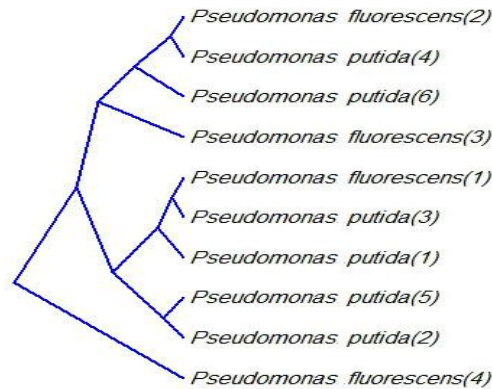
شکل ۲- تاثیر IAA تولید شده توسط استرین‌های *Pseudomonas* بر درصد و نرخ جوانه‌زدن بذر
 Figure 2. The effect of IAA production by *Pseudomonas* strains on the percentage and rate of seed germination



شکل ۳- تاثیر IAA تولید شده توسط استرین‌های *Pseudomonas* بر طول و وزن خشک گیاهچه
 Figure 3. The effect of IAA production by *Pseudomonas* strains on the seedling length and dry weight



شکل ۴- تاثیر IAA تولید شده توسط استرین‌های *Pseudomonas* بر فعالیت آلفا-آمیلاز
 Figure 4. The effect of IAA production by *Pseudomonas* strains on the α -amylase activity



شکل ۵- گروه‌بندی استرین‌های مختلف باکتری‌های مورد بررسی بر اساس صفات مورد مطالعه به روش UPGMA
 Fig 5. Clustering using UPGMA algorithms for tested bacterial strains based on studied characteristics.

به‌عنوان مقابله با تنش‌های محیطی توسط محققان مختلف Sasirekha *et al.*, 2016; Bashir (*et al.*, 2020).

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که حضور استرین‌هایی از باکتری‌های سودوموناس با افزایش جوانه‌زنی بذر و رشد ریشه امکان استقرار بهتر گیاهچه‌های گل همیشه‌بهار و یکنواختی رشد را فراهم می‌کند. تاثیر متفاوت گونه و استرین باکتری‌های مورد مطالعه بر بهبود جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه با میزان تولید IAA توسط باکتری در ارتباط بوده است. این نتایج، پیش‌بینی میزان تاثیر باکتری‌های محرک رشد بر جوانه‌زنی بذر و رشد اولیه گیاهچه را از طریق آزمایش‌های درون شیشه‌ای (به‌ویژه بررسی تولید IAA) پیشنهاد می‌کند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان برای پشتیبانی مالی این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

برخی از استرین‌های باکتری‌های محرک رشد نیز با تولید کم IAA توسط آن‌ها همراه بوده است (Wahyudi *et al.*, 2011). تحریک رشد ریشه و افزایش جذب مواد معدنی را می‌توان به ترشح IAA توسط باکتری‌های محرک رشد به منطقه ریزوسفر نسبت داد (Sharma *et al.*, 2013). کاربرد خارجی IAA نیز علاوه بر دریافت بهینه مواد غذایی از خاک و افزایش سیستم ریشه، با افزایش قابلیت تحمل گیاه به تنش‌های محیطی همراه است (Mazzoni-Putman *et al.*, 2021). با توجه به تاثیر IAA در افزایش رشد ریشه‌چه و ساقه‌چه، عملکرد ماده خشک نیز تحت تاثیر قرار می‌گیرد. از طرفی، بنیه و قابلیت زیست دو عامل مهم تاثیرگذار بر استقرار گیاهچه، رشد و عملکرد گیاه به‌شمار می‌روند (Zapata *et al.*, 2004). پژوهش‌ها نشان داده است که جابه‌جایی هیدرات کربن در بذر در حال جوانه‌زنی از منابع عمده انرژی است که سوبسترای مناسب برای مسیرهای دیگر مورد نیاز برای تکمیل جوانه‌زنی بذر را تامین می‌کنند (Egamberdieva *et al.*, 2015). افزایش فعالیت آلفاآمیلاز منجر به تحرک بیشتر کربوهیدرات می‌شود و در نتیجه اثربخشی مثبتی در طی فرایند جوانه‌زنی خواهد داشت.

برخلاف تاثیر IAA، تغییرات درصد جوانه‌زنی بذر و طول و وزن خشک گیاهچه با تولید سیدروفور در باکتری‌های مورد مطالعه در ارتباط نبوده است. تولید این ترکیبات

منابع

Ashrafuzzaman, M., Farid Akhtar, H.M., Razi Ismail, M., Anamul Hoque, M., Zahurul Islam, S., Shahidullah, M. and Sariah, M. 2009. Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *African Journal of Biotechnology*, 8: 1247-1252. (Journal)

- Ak, G., Zengin, G., Sinan, K.I., Mahomoodally, M.F., Picot-Allain, M.C.N., Cakır, O., Bensari, S., Yılmaz, M.A., Gallo, M. and Montesano, D. 2020. A comparative bio-evaluation and chemical profiles of *Calendula officinalis* L. extracts prepared via different extraction techniques. *Applied Sciences*, 10(17): 5920. **(Journal)**
- Akram, W., Anjum, T. and Ali, B. 2016. Phenylacetic acid is ISR determinant produced by *Bacillus fortis* IAGS162, which involves extensive re-modulation in metabolomics of tomato to protect against *Fusarium* wilt. *Frontiers in Plant Science*, 19: 1-12. **(Journal)**
- Alqarawi, A.A., Abd Allah, E.F., Hashem, A., Al HuqailAsma, A., Abdulaziz, A. and Al Sahli, A.A. 2014. Impact of abiotic salt stress on some metabolic activities of *Ephedra alata* decne. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 12: 620-625. **(Journal)**
- Ardakani, S., Heidary, A., Tayebi, L. and Mohammadi, M. 2010. Promotion of cotton seedling growth characteristics by the development and use of new bioformulations. *International Journal of Botany*, 6: 95-100. **(Journal)**
- Bakaeva, M., Kuzina, E., Vysotskaya, L., Kudoyarova, G., Arkhipova, T., Rafikova, G., Chetverikov, S., Korshunova, T., Chetverikova, D. and Loginov, L. 2020. Capacity of *Pseudomonas* strains to degrade hydrocarbons, produce auxins and maintain plant growth under normal conditions and in the presence of petroleum contaminants. *Plants*, 9: 379. **(Journal)**
- Bano, Q., Ilyas, N., Bano, A., Zafar, N., Akram, A. and Hassan, F. 2013. Effect of *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays* L.) under drought stress. *Pak. J. Botany*, 45(1): 13-20. **(Journal)**
- Bashir, A., Tian, T., Yu, X., Meng, C., Ali, M. and Li, L. 2020. Pyoverdine-mediated killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas syringae* MB03 and the role of iron in its pathogenicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 21: 2198. **(Journal)**
- Cavusoglu, K. and Kabar, K. 2010. Effects of hydrogen peroxide on the germination and early seedling growth of barley under NaCl and high temperature stresses. *EurAsian Journal of BioSciences*, 4: 70-79. **(Journal)**
- Chen, K. and Arora, R. 2013. Priming memory invokes seed stress-tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 94: 33-45. **(Journal)**
- Chin, J.M., Lim, Y.Y. and Yien Ting, A.S. 2022. Biopriming *Pseudomonas fluorescens* to vegetable seeds with biopolymers to promote coating efficacy, seed germination and disease suppression. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 21: 493-505. **(Journal)**
- Chitra, P. and Jijeesh, C.M. 2021. Biopriming of seeds with plant growth promoting bacteria *Pseudomonas fluorescens* for better germination and seedling vigour of the East Indian sandalwood. *New Forests*, 52: 829-841. **(Journal)**
- Egamberdieva, D., Jabborova, D. and Hashem, A. 2015. *Pseudomonas* induces salinity tolerance in cotton (*Gossypium hirsutum*) and resistance to *Fusarium* root through the modulation of indole-3-acetic acid. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22: 773-779. **(Journal)**
- Etesami, H., Alikhani, H.A. and Hosseini, H.M. 2015. Indole-3-acetic acid (IAA) production trait, a useful screening to select endophytic and rhizosphere competent bacteria for rice growth promoting agents. *MethodsX*, 20: 72-78. **(Journal)**
- Ghorbanpour, M. and Hatami, M. 2014. Biopriming of *Salvia officinalis* seed with growth promoting rhizobacteria affect invigoration and germination indices. *Journal of Environmental Biology*, 8:29-36. **(Journal)**
- He, X., Zhu, L., Xu, L., Guo, W. and Zhang, X. 2016. *GhATAF1*, a NAC transcription factor, confers abiotic and biotic stress responses by regulating phytohormonal signaling networks. *Plant Cell Reports*, 35: 2167-2179. **(Journal)**
- Javid, M.G., Sorooshzadeh, A., Moradi, F. and Allahdadi, I. 2011. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. *Australian Journal of Crop Science*, 5: 726-734. **(Journal)**
- Kahli, H., Béven, L., Grauby-Heywang, C., Debez, N., Gammoudi, I., Moroté, F., Sbartaï, H. and Cohen-Bouhacina, T. 2022. Impact of growth conditions on *Pseudomonas fluorescens* morphology characterized by atomic force microscopy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23: 9579. **(Journal)**
- Baser Kouchebagh, S., Farahvash, F., Mirshekari, B., Rahimzadeh Khoei, F. and Kazemi Arbat, H. 2014. Effects of physical seed priming and hydropriming on physiological and morphological characteristics, yield and harvest index in marigold (*Calendula officinalis* L.). *Journal of Crop Ecophysiology*, 7: 421-430. **(Journal)**

- Kozłowska, J., Stachowiak, N. and Prus, W. 2019. Stability studies of collagen-based microspheres with *Calendula officinalis* flower extract. *Polymer Degradation and Stability*, 163: 214-219. **(Journal)**
- Kudoyarova, G., Arkhipova, T., Korshunova, T., Bakaeva, M., Loginov, O. and Dodd, I.C. 2019. Phytohormone mediation of interactions between plants and non-symbiotic growth promoting bacteria under edaphic stresses. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1368. **(Journal)**
- Kumar, S., Shrut, A., Kumar, V.S. and Kumar, S.S. 2011. Characterization of plant growth promoting bacteria from soil of central and upper Himalayan region. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 2(1): 363-369. **(Journal)**
- Ludwig-Müller J. 2011. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62: 1757-1773. **(Journal)**
- Mazzoni-Putman, S.M., Brumos, J., Zhao, C., Alonso, J.M. and Stepanova, A.N. 2021. Auxin interactions with other hormones in plant development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(10): a039990. **(Journal)**
- Mirmazloum, I., Kiss, A., Erdélyi, É., Ladányi, M., Németh, É.Z. and Radácsi, P. 2020. The effect of osmopriming on seed germination and early seedling characteristics of *Carum carvi* L. agriculture, 10: 94. **(Journal)**
- Ng, L.C., Sariha, M., Sarim, O., Radziah, O. and Zinalabidin, M.A. 2012. Rice seed bacterization for promoting germination and seedling growth under aerobic condition system. *Australian Journal of Crop Science*, 6(1): 170-175. **(Journal)**
- Patade, V.Y., Bhargava, S. and Suprasanna, P. 2009. Halopriming imparts tolerance to salt and PEG induced drought stress in Sugarcane. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 134: 24-28. **(Journal)**
- Patten, C.L. and Glick, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3795-3801. **(Journal)**
- Petti, C., Reiber, K., Ali, S.S., Berney, M. and Doohan, F.M. 2012. Auxin as a player in the biocontrol of Fusarium head blight disease of barley and its potential as a disease control agent. *BMC Plant Biotechnology*, 12: 224. **(Journal)**
- Ramalingam, R. and In-Jung, L. 2013. Ameliorative effects of spermine against osmotic stress through antioxidants and abscisic acid changes in soybean pods and seeds. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35: 263-269. **(Journal)**
- Saijo, Y., Betsuyaku, S., Toyota, M. and Tsuda, K. 2022. A continuous extension of plant biotic interactions research. *Plant and Cell Physiology*, 63: 1321-1323. **(Journal)**
- Sasirekha, B. and Srividya, S. 2016. Siderophore production by *Pseudomonas aeruginosa* FP6, a biocontrol strain for *Rhizoctonia solani* and *Colletotrichum gloeosporioides* causing diseases in chilli. *Agriculture and Natural Resources*, 50: 250-256. **(Journal)**
- Schwantes, A.M., Swenson, J.J. and Jackson, R.B. 2016. Quantifying drought-induced tree mortality in the open canopy woodlands of central Texas. *Remote Sensing of Environment*, 181: 54-64. **(Journal)**
- Sharma, A.D., Rathore, S.V.S., Srinivasan, K. and Tayagi, R. 2013. Comparison of various seed priming method for seed germination, seedling vigour and fruit yield in okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). *Scientia Horticulturae*, 165: 75-81. **(Journal)**
- Thompson, D.C., Clarke, B.B. and Kobayashi, D.Y. 1996. Evaluation of bacterial antagonists for reduction of summer patch symptoms in Kentucky bluegrass. *Plant Dis*, 80:856-862. **(Journal)**
- Timofeeva, A.M., Galyamova, M.R. and Sedykh, S.E. 2022. Bacterial siderophores: Classification, biosynthesis, perspectives of use in agriculture. *Plants*, 11(22): 3065. **(Journal)**
- Tsavkelova, E.A., Cherdvntseva, T.A., Botina, S.G. and Netrusov, A.I. 2007. Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiological Research*, 162: 69-76. **(Journal)**
- Vishnupradeep, R., Bruno, L.B., Taj, Z., Karthik, C., Challabathula, D., Kumar, A., Freitas, H. and Rajkumar, M. 2022. Plant growth promoting bacteria improve growth and phytostabilization potential of *Zea mays* under chromium and drought stress by altering photosynthetic and antioxidant responses. *Environmental Technology and Innovation*, 25: 102154. **(Journal)**
- Wahyudi, A.T., Astuti, R.I. and Giyanto, E. 2011. Screening of *Pseudomonas* sp. isolated from rhizosphere of soybean plant as plant growth promoter and biocontrol agent. *Agricultural and Biological Sciences*, 6: 134-141. **(Journal)**

- Xiao, Z., Storms, R. and Tsang, A. 2006. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochem*, 351(1): 146-148. **(Journal)**
- Zapata, P.J., Serrano, M., Pretel, M.T., Amoros, A. and Botella, M.A. 2004. Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Science*, 167(4): 781-788. **(Journal)**
- Zhu, Z.H., Sami, A., Xu, Q.Q., Wu, L.L., Zheng, W.Y. and Chen, Z.P. 2021. Effects of seed priming treatments on the germination and development of two rapeseed (*Brassica napus* L.) varieties under the co-influence of low temperature and drought. *PloS One* 16: e0257236. **(Journal)**



Promotion of seed germination traits and seedling growth of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) by *Pseudomonas* spp.

Pedram Alimosazadeh¹, Seyed Javad Sanei^{*2}, Abdol Hossein Taheri³

Received: April 25, 2023

Accepted: August 29, 2023

Abstract

Plant growth promoting rhizobacteria are a group of bacteria that can actively colonize plant roots and can stimulate plant growth. This study was executed to evaluate of four strains of *Pseudomonas fluorescens* Migula (PF1-4) and six strains of *Pseudomonas putida* (Trevisan) Migula (PP 1-6) on seed germination characteristics including germination percentage, germination rate, root and shoot length and dry weight, seed and seedling vigor index and α -amylase activity of pot marigold (*Calendula officinalis* L.). *In vitro* production of siderophore, hydrogen cyanide, indole-acetic acid (IAA) and volatile and non-volatile metabolites of bacteria were also determined. The bacterial suspension (10^9 CFU/ml) was used to inoculate the seeds under aseptic conditions. Results revealed that the metabolites concentrations were significantly different between bacterial strains. Different strains of rhizobacteria had also variable effects on germination parameters and the effect of plant-rhizobacteria interactions on germination characteristics could be positive or neutral. Maximum effects of bacterial strains were recorded for PP-1, PP-2, PP-5, PF-1 and PF-2 strains. The effects of bacterial strains on studied characteristics were significantly correlated with IAA production by bacteria. As a conclusion, the role of biopriming with growth promoting rhizobacteria on germination characteristics and seedling growth were dependent on bacterial species and strains. These results also suggest that the amount of bacterial IAA produced plays a major role in seed germination and may stimulate germination features.

Keywords: IAA; Pot marigold flower; *Pseudomonas*; Seed germination

How to cite this article

Alimosazadeh, P., Sanaei, S.J. and Taheri, A.H. 2023. Promotion of seed germination traits and seedling growth of pot marigold (*Calendula officinalis* L.) by *Pseudomonas* spp. Iranian Journal of Seed Science and Research, 10(3): 21-32. (In Persian)(**Journal**)
DOI: [10.22124/jms.2023.7672](https://doi.org/10.22124/jms.2023.7672)

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. Bsc student, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. pedram.alim@gmail.com
 2. Assistant professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. sa_nei@yahoo.com
 3. Associate professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, a.taheri@gau.ac.ir
- *Corresponding author: sa_nei@yahoo.com