اثر پرایمینگ بذر با باکتری‌های محرک رشد بر خصوصیات مورفولوژیک گیاه دارویی گل همیشه‌بهار (*Calendula officinalis*)

فاطمه شیخی[۱]، عبدالرزاق دانش‌شهرکی[۲]، محمد رفیعی‌الحسینی[۲] و محسن مبینی دهکردی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و تکنولوژی بذر، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد، fatemehsheikhi10@yahoo.com

۲- استادیار گروه مهندسی زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۳- استادیار گروه ژنتیک دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد

پژوهشکده بیوتکنولوژی دانشگاه شهرکرد

این پژوهش به منظور مطالعه اثر پرایمینگ بذر با باکتری‌های محرک رشد بر خصوصیات مورفولوژیک گیاه دارویی گل همیشه بهار، در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تکرار، در شرایط گلخانه‌ای اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل پرایمینگ بذر با باکتری های محرک رشد گیاه شامل ردوکوکوس (*Rhodococus* sp.)، کورینه باکتریوم (*Corynebacterium* sp.)، مایکوباکتریوم (*Mycobacterium* sp.)، باسیلوس (*Bacillus* sp.)، ازتوباکتر (*Azotobacter* sp.)، سودموناس پوتیدا (*Pseudomonas putida*)، سودموناس فلورسنس (*Pseudomonas florescence*)، مخلوطی از همه باکتری‌ها و عدم تلقیح با باکتری به عنوان شاهد بودند. نتایج نشان داد تلقیح بذور گیاه همیشه بهار با باکتری سودموناس پوتیدا سبب افزایش معنی دار ارتفاع بوته، تعداد ساقه فرعی، تعداد برگ، وزن خشک اندام هوایی و تعداد گل گردید. تلقیح بذور با ازتوباکتر نیز ارتفاع ساقه اصلی، وزن خشک برگ، وزن خشک ریشه و طول ریشه را به طور معنی‌داری افزایش داد.

واژه‌های کلیدی : باکتری‌های محرک رشد (PGPR)، گل همیشه بهار، بیوپرایمینگ، تعداد گل، وزن خشک ریشه و طول ریشه

مقدمه

همیشه بهار (*Calendula officinalis*)، با گل‌های زرد و نارنجی، گیاهی یک ساله و معطر است که خواص دارویی فراوانی شامل آنتی اکسیدانی، ضد التهاب، ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی برای آن گزارش شده است (برناتونین و همکاران، ۲۰۱۱). گل آن علاوه بر مصرف خوراکی (طعم دهنده و رنگ دهنده غذاهای مختلف از جمله پنیر و کره) دارای مواد مؤثره و ترکیباتی است که در صنعت (تهیه رنگ‌های نقاشی و نایلون صنعتی) و داروسازی (تهیه انواع کرم‌ها و لوسیون‌ها) کاربرد دارد (گلدانی و مرادی مرجانه، ۱۳۹۰). پرایمینگ از جمله روش‌های افزایش کیفیت بذر است و بنیه بذر را می‌توان به کمک انواع روش‌های پرایمینگ بذر که سبب افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی تحت شرایط متنوع محیطی و بهبود رشد و عملکرد گیاهچه می‌گردد، بهبود بخشید (مک دونالد، ۲۰۰۰). یکی از انواع پرایم، استفاده از میکرواورگانیسم های مفید یا عوامل کنترل بیولوژیکی در ریشه یا بذر است که بهبود رشد گیاه یا کنترل بیماری‌ها را از طریق مکانیسم‌های مختلف شامل تولید هورمون_های گیاهی، آنتی‌بیوتیک‌ها یا آنزیم‌ها، فراهم می‌کند (بنت و ویپس، ۲۰۰۸). هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرات تلقیح برخی از باکتری‌های محرک رشد با بذر گیاه دارویی گل همیشه بهار بر خصوصیات مورفولوژیک این گیاه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با ۴ تکرار در تیر ماه ۱۳۹۲ در گلخانه‌های پژوهشی دانشگاه شهرکرد اجرا شد. تیمارهای آزمایشی به صورت کاشت بذور تلقیح شده گیاه دارویی همیشه بهار با باکتری‌های محرک رشد شامل ردوکوکوس(*Rhodococus* sp.)، کورینه باکتریوم (*Corynebacterium* sp.)، مایکوباکتریوم (*Mycobacterium* sp.)، باسیلوس (*Bacillus* sp.)، ازتوباکتر (*Azotobacter* sp.)، سودموناس پوتیدا (*Pseudomonas putida*)، سودموناس فلورسنس

(*Pseudomonas florescence*)، مخلوطی از همه باکتری‌ها و عدم تلقیح با باکتری به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند. جهت ابتدا بذور به بذور به مدت ۱۰ ثانیه در الکل اتانول ۷۰٪ و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۲ درصد هیپو کلرید کلسیم ضد عفونی شدند. سپس مطابق نیازهای جوانه‌زنی گیاه (ایستا، ۲۰۱۱) بذرهای ضد عفونی شده به مدت ۴۸ ساعت در محلول KNO_3 ۲٪ در انکوباتور با دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه خشک شدند.

از هر باکتری سوسپانسیونی با میزان جذب ۰/۵ درطول موج ۶۰۰ نانومتر تهیه شده و بذور مربوط به هر تیمار به مدت یک ساعت در سوسپانسیون باکتری مربوطه قرار داده شدند. هر گلدان با ۵ کیلوگرم خاک مزرعه پر شده و بذور در عمق ۲ سانتی‌متری، با تراکم ۳ بوته در هر گلدان کشت شدند. آبیاری به صورت منظم و بدون تنش خشکی انجام گرفت. با توجه به نیاز کودی گیاه و خاک، که طی آنالیز نمونه خاک مورد استفاده تخمین زده شد، کود دهی انجام شد. طی دوران رشد گل‌های کاملا" رشد کرده مربوط به هر گلدان چیده شده، تعداد آنها شمارش شده، قطر آنها اندازه گیری شده و در تاریکی خشک گردید. پس از اتمام دوره رشدی گیاه، برداشت انجام شده و خصوصیات مورفولوژیک شامل ارتفاع گیاه، ارتفاع ساقه اصلی، تعداد ساقه فرعی، تعداد برگ، وزن خشک برگ، وزن خشک اندام هوایی، تعداد گل، قطر گل، وزن خشک گل، طول ریشه، حجم ریشه و وزن خشک ریشه اندازه گیری شد. جهت اندازه گیری وزن خشک، اندام مربوطه از هر تیمار به صورت جداگانه در پاکت‌های اتیکت دار ریخته شدند و به آزمایشگاه منتقل شدند و به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۵ درجه سانتیگراد خشک گردیدند و سپس با استفاده از ترازو با دقت ۰/۰۰۱ توزین شدند. داده های حاصل با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت.

نتایج و بحث

مقایسه میانگین صفات اندازه گیری شده نشان داد که کاربرد باکتری‌ها بر روی بذرها سبب افزایش معنی‌دار صفات اندازه‌گیری شده در سطح ۵٪ گردید (جدول ۱ و ۲). مطابق جدول ۱ بیشترین ارتفاع گیاه مربوط به تیمار باکتریایی سودموناس پوتیدا و بیشترین ارتفاع ساقه اصلی مربوط به تیمار ازتوباکتر بود. بیشترین تعداد ساقه فرعی مربوط به تیمار باکتریایی سودموناس پوتیدا و پس از آن باکتری های ردوکوکوس، باسیلوس و سودموناس فلورسنس می‌باشد (جدول ۱). بیشترین تعداد برگ مربوط به تیمار سودموناس پوتیدا و پس از آن تیمارهای ازتوباکتر، ردوکوکوس، باسیلوس و سودموناس فلورسنس است (جدول ۱). بیشترین وزن خشک اندام هوایی مربوط به تیمار سودموناس پوتیدا بوده و بیشترین وزن خشک برگ مربوط به تیمار ازتوباکتر و پس از آن سودموناس پوتیدا می‌باشد (جدول ۱).

جدول ۱: مقایسه میانگین تعدادی از صفات اندازه‌گیری شده تحت تأثیر تیمارهای باکتریایی

میانگین	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر)	ارتفاع ساقه اصلی (سانتی‌متر)	تعداد ساقه فرعی	تعداد برگ	وزن خشک اندام هوایی (میلی‌گرم)	وزن خشک برگ (میلی‌گرم)
Control	۶۲/۰۰۰bc	۴۳/۵۵۳bced	۴/۷۳۹cd	۱۰۸/۷۳۴ d	۱۵/۵۱۱b	۴/۷۵۳cd
Rhodococus sp.	۶۲/۲۷۸bc	۴۵/۵۵۳b	۵/۸۸۹b	۱۲۵/۵۰۰bc	۱۶/۸۳۳ab	۵/۰۹۶bc
Corynebacterium sp.	۵۳/۷۸۰d	۴۰/۰۰۰ef	۴/۸۹۰c	۱۱۲/۱۱۰d	۱۵/۴۵۳b	۳/۴۲۳e
Mycobacterium sp.	۵۸/۲۷۸c	۴۴/۳۳۳bcd	۴/۴۰۴cd	۱۲۱/۳۳۳cd	۱۲/۶۷۰c	۳/۴۰۰e
Bacillus sp.	۶۲/۱۱۳bc	۴۱/۴۳۳cde	۵/۶۳۲b	۱۳۰/۵۵۳bc	۱۷/۱۷۹ab	۴/۳۴۰d
Azotobacter sp.	۶۵/۳۹۰ab	۵۰/۱۱۰a	۴/۸۹۰c	۱۳۸/۲۲۳b	۱۵/۸۷۷b	۶/۲۰۱ a
Pseudomonas putida	۶۶/۹۴۳a	۴۵/۴۴۳bc	۶/۷۷۸a	۱۵۹/۵۵۳a	۱۸/۰۸۴a	۵/۶۲۸b
Pseudomonas florescence	۶۲/۱۶۸bc	۴۰/۶۱۳de	۵/۴۴۴b	۱۲۵/۷۷۷bc	۱۵/۷۲۹b	۵/۰۸۲c
All bacteria	۶۷/۲۲۳a	۳۶/۰۰۰f	۴/۲۹۸d	۹۳/۴۴۳e	۱۱/۸۴۰c	۳/۱۴۷e

بیشترین تعداد گل مربوط به باکتری سودموناس پوتیدا و پس از آن ردوکوکوس بوده است (جدول ۲) و به تبع آن بیشترین قطر گل مربوط به تیمار باسیلوس و ازتوباکتر بوده و پس از آن ردوکوکوس، کورینه باکتریوم، مایکوباکتریوم و سودموناس پوتیدا قرار دارند (جدول ۲). بیشترین حجم ریشه مربوط به باسیلوس، ازتوباکتر، سودموناس پوتیدا و سودموناس فلورسنس می‌باشد (جدول ۲). بیشترین وزن خشک ریشه مربوط به تیمار باکتریایی ازتوباکتر بوده و پس از آن تیمارهای سودموناس پوتیدا، ردوکوکوس، سودموناس فلورسنس و باسیلوس قرار دارند (جدول ۲). بیشترین طول ریشه نیز مربوط به تیمار باکتریایی ازتوباکتر و پس از آن سودموناس پوتیدا، سودموناس فلورسنس، باسیلوس، کورینه باکتریوم و مایکوباکتریوم بود (جدول ۲).

جدول ۲: مقایسه میانگین تعدادی از صفات اندازه‌گیری شده تحت تأثیر تیمارهای باکتریایی

میانگین	تعدادگل	قطر گل (سانتی‌متر)	حجم ریشه (سانتی‌متر مکعب)	وزن خشک ریشه (میلی‌گرم)	طول ریشه (سانتی‌متر)
Control	۱۷/۴۴۶cd	۵/۲۲۷d	۲۵/۹۲۶b	۱/۴۷۴e	۲۶۶۲۳/۳۹e
Rhodococus sp.	۱۹/۷۴۲b	۵/۵۳۳ab	۲۷/۳۶۹b	۱/۸۷۴bc	۳۲۲۱۰/۵۳d
Corynebacterium sp.	۱۱/۱۱۰f	۵/۵۳۰ab	۲۶/۹۲۸b	۲/۴۴۷e	۳۰۰۷۲/۹۷bc
Mycobacterium sp.	۱۶/۱۰۸d	۵/۵۵۰ab	۲۶/۶۷۰b	۲/۲۱۸e	۳۱۶۸۸/۷۴c
Bacillus sp.	۱۲/۷۷۸e	۵/۶۸۷a	۳۲/۹۶۰a	۲/۴۵۸d	۳۶۹۹۷/۳۸bc
Azotobacter sp.	۱۶/۲۶۱d	۵/۶۷۷a	۳۰/۹۲۹a	۴/۰۷۷a	۸۰۸۴۲/۶۸a
Pseudomonas putida	۲۲/۵۹۱a	۵/۴۱۷bc	۳۱/۴۸۰a	۲/۶۹۶b	۷۳۳۸۷/۴۸b
Pseudomonas florescence	۱۸/۳۳۳bc	۵/۳۱۳cd	۳۰/۷۴۲a	۲/۴۵۵c	۳۳۳۸۶/۴۸bc
All bacteria	۱۱/۵۹۰ef	۵/۶۰۷a	۱۶/۱۰۸c	۱/۶۷۹e	۲۷۲۳۶/۳۹ed

به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که تلقیح بذور گیاه گل همیشه بهار با باکتری‌های محرک رشد به خصوص سودموناس پوتیدا و پس از سودموناس فلورسنس، ازتوباکتر و باسیلوس، به جهت توانایی آنها در تولید سیدروفور و انحلال فسفات و بهبود جذب مواد غذایی و همچنین تولید آنزیم‌های محرک رشد توسط آنها، سبب بهبود خصوصیات مورفولوژیکی آن می‌گردد. با توجه به اهمیت گیاهان دارویی و تأکید بر افزایش زیست توده آنها با تکیه بر رعایت مسائل زیست محیطی و کاهش استفاده از کودهای شیمیایی تحقیقات بیشتر در زمینه شناسایی گونه‌های باکتریایی محرک رشد مناسب پیشنهاد می‌گردد.

منابع

1. **Bennett A** and **Whipps J**. **2008**. Beneficial microorganism survival on seed, roots and in rhizosphere soil following application to seed during drum priming. Biological Control 44:349–361.
2. **Bernatoniene J**. **Ruta Masteikova R**. **Davalgiene J. Peciura R. Gauryliene R. Bernatoniene R**. **Majiene D. Lazauskas R. Civinskiene G. Velziene S. Muselik J** and **Chalupova Z**. **2011**. Topical application of *Calendula officinalis* (L.): Formulation and evaluation of hydrophilic cream with antioxidant activity. Journal of Medicinal Plants Research Vol. 5(6), pp. 868-877.
3. **Gholdani M** and **Moradi marjaneh A** . **1390**. Assessment of levels of salicylic acid on some plant growth parameters of *Callendula officinalis* L. under deficit irrigation. Enviromental Stresses in Crop Sciences. 4: 33-45.
4. **ISTA** (International Seed Testing Association). **2011**. International Rules for Seed Testing. International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
5. **Mc Donald M**. **2000**. Seed primping. pp: 287-325. In: Black, M. and J.D. Bewley. (Eds). Seed technology and its biological basis. Sheffield Academic Press. Florida.

Effect of seed priming with growth-promoting bacteria (PGPR) on morphological characteristics of *Calendula officinalis*

F. Sheikhi[1], A. Danesh-Shahraki[2], M. Rafieiolhossaini[2] and M. Mobini-Dehkordi[3]
[1]Graduate Student, Faculty of Agricultural, Shahrekord University
[2]Assistant Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agricultural, Shahrekord University
[3]Assistant Professor of Genetic Department of Shahrekord University
Biotechnology Research Institute, University of Shahrekord

Abstract
This study was conducted to study the effect of seed priming with growth-promoting bacteria on morphological properties of marigold, using a randomized complete block design with four replications, under greenhouse condition. Treatments were include: *Rhodococus* sp., *Corynebacterium* sp., *Mycobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Azotobacter* sp, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas florescence*,a mixture of all of bacteria and without bacteria as control. The results showed that seed inoculated with *Pseudomonas putida* significantly increased plant height, number of lateral stem, number of leaf, dry weight of shoot and number of flowers and inoculation with *Azotobacter* sp. significantly increased main stem height, leaf dry weight, root dry weight and root length.

Key Words: plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), Marigold, biopriming, number of flowers, root dry weight and root length