Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 52, No 1, Spring 2021 (11-21)
DOI: 10.22059/ijhs.2019.280484.1638

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۲، شمارهٔ ۱، بهار ۱۴۰۰ (ص ۲۱-۱۱)

تأثیر باکتری‌های محرک رشد گیاه و هیدروپرایمینگ بر برخی شاخص‌های فیزیولوژیکی گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis*)

مهرناز حاتمی[1*]، پریسا خانی‌زاده[2]، فائزه السادات ابطحی[3] و پیمان عباس‌زاده دهجی[4]
۱، ۲ و ۳. دانشیار، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اراک، اراک، ایران
٤. استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولیعصر(عج) رفسنجان، رفسنجان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۵/۱٤)

چکیده

کاربرد باکتری‌های محرک رشد موجب تحریک متابولیسم و فرایندهای متابولیکی در جهت افزایش کارایی گیاهان می‌شوند. این مطالعه با هدف بررسی اثر هیدروپرایمینگ بذر و تلقیح باکتری‌های محرک رشد *سودوموناس فلورسنس و سودوموناس پوتیدا* به خاک به‌عنوان محرک زیستی بر برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه دارویی بادرنجبویه (*Melissa officinalis*) انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه و آزمایشگاه گروه گیاهان دارویی دانشگاه اراک انجام شد. فاکتور اول هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف (۱۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت) و فاکتور دوم دو گونه باکتری (*سودوموناس فلورسنس و سودوموناس پوتیدا*)، شاهد (بدون تلقیح) بود. نتایج نشان داد هیدروپرایمینگ بذر در زمان‌های مختلف و باکتری‌های محرک رشد موجب افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی، فنل، فلاونوئیدکل، درصد و عملکرد اسانس شد. همچنین هیدروپرایمینگ به‌مدت ٤۸ ساعت به‌همراه باکتری *سودوموناس پوتیدا*، منجر به افزایش چشم‌گیر میزان فلاونوئید شد و در مدت ۱۲ ساعت به‌همراه باکتری *سودوموناس فلورسنس* اثر معنی‌داری بر مقدار فنل داشت. با توجه به نتایج مثبت و افزایشی باکتری‌ها بر شاخص‌های مورد بررسی گیاه دارویی بادرنجبویه، می‌توان گفت باکتری‌های به‌کار رفته در این تحقیق می‌توانند به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای کود شیمیایی ضمن کاهش مصرف کودهای شیمیایی، تضمین‌کننده تولید گیاهان دارویی عاری از مواد شیمیایی باشند.

واژه‌های کلیدی: آماده‌سازی بذر، باکتری‌های ریزوسفری، درصد اسانس، رنگیزه‌های فتوسنتزی، فلاونوئید.

Influence of plant growth promoting rhizobacteria and hydro-priming on some physiological indices of lemon balm (*Melissa officinalis*)

Mehrnaz Hatami[1*], Parisa Khanizadeh[3], Faezeh Alsadat Abtahi[2] and Peyman Abaszadeh Dehgi[4]
1, 2, 3. Associate Professor, Former M.Sc. Student and Assistant Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Arak University, Arak, Iran
4. Assistant Professor, Faculty of Agriculture, University of Vali-e-Asr, Rafsanjan, Rafsanjan, Iran
(Received: May, 5, 2019- Accepted: Aug. 5, 2019)

ABSTRACTS

Application of plant growth promoting rhizobacteria metabolism and metabolic processes to increase plant efficacy. The aim of this study was to investigate the effect of seeds hydropriming and inoculation of plant growth promoting rhizobacteria (*Pseudomonas fluoresense*, *Pseudomonas putida*) to soil as biological stimulative on some physiological traits of *Melissa officinalis*. The experiment was conducted as a factorial based on a completely randomized design in greenhouse conditions and laboratory of Medicinal Plants Department of Arak University. The first factor was hydropriming at different times (12, 24, 48 and 72 hours), and the second factor was two bacterial species (*Pseudomonas fluoresense*, *Pseudomonas putida*), control (without inoculation). The results showed that seed hydropriming at different times and growth promoters increased the photosynthetic pigments, phenol, flavonoids, percentage and essential oil yield. Also, hydropriming for 48 hours with *Pseudomonas putida* bacteria resulted in a significant increase in flavonoid content and a significant effect on phenol content during 12 hours with *Pseudomonas fluoresense* bacteria. According to the positive and additive effects of plant growth promoting rhizobacteria on *Melissa officinalis*, the plant growth promoting rhizobacteria could be recommended as an alternative to chemical fertilizers to reduce the consumption of chemical fertilizers and guaranty the production of medicinal plants, free of chemicals.

Keywords: Essential oil, flavonoid, photosynthetic pigments, priming, rhizobacteria.

* Corresponding author E-mail: m-hatami@araku.ac.ir

مقدمه

بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* گیاهی دارویی متعلق به تیره نعناعیان است (Guginski *et al*., 2009). منشأ اصلی این گیاه نواحی مدیترانه، کشورهای اروپایی و آسیای مرکزی (Birdane *et al*., 2007) بوده و در ایران در استان‌های تهران، گلستان، آذربایجان، لرستان و کرمانشاه رشد می‌کند (Ebrahimi, 2011; Emamghoreishi & Talebianpour, 2011). اسانس آن در صنایع داروسازی، غذایی و صنایع آرایشی بهداشتی کاربرد زیادی دارد. از مواد مؤثره این گیاه دارویی برای درمان ناراحتی‌های عصبی و همچنین به عنوان آرام‌بخش استفاده می‌شود (Omid Beigi, 2000). در فارماکوپه‌های معتبر از برگ و پیکر رویشی آن به عنوان دارو استفاده می‌کنند. پیکر رویشی آن بویی شبیه به لیمو دارد (Omidbaigi, 2005). سرشاخه‌های گلدار این گیاه به خصوص برگ‌ها محتوی حداقل ۰/۰۵ درصد اسانس است (Cosge *et al*., 2009).

به منظور افزایش تولید محصولات کشاورزی در واحد سطح و همچنین حفظ و یا بهبود باروری خاک و کاهش مصرف کودهای شیمیایی، نیازمند روش‌ها و رویکردهای نوین و مؤثر در این زمینه می‌باشیم (Souri & Hatamian, 2019). کودهای بیولوژیکی از مواد نگهدارنده‌ای با جمعیت متراکم یک یا چند موجود زنده مفید خاکزی تشکیل شده که قادر به افزایش حاصلخیزی خاک، افزایش رشد گیاه و عملکرد محصول می‌شوند (Yasari *et al*., 2007). استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید در عملیات کشاورزی از ۶۰ سال پیش تاکنون آغاز شده است. افزایش این جمعیت‌های مفید می‌تواند همچنین مقاومت گیاه به تنش‌های مختلف محیطی مانند کمبود آب، عناصر غذایی و سمیت عناصر سنگین را افزایش می‌دهد (Wu *et al*., 2005). باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPR) مانند ازتوباکتر، سودوموناس، آزسپریلوم نمونه‌های از این میکروارگانیسم‌ها هستند که اثر مثبت آنها بر بهبود رشد گیاه گزارش شده است (Das *et al*., 2008; Rouzbeh *et al*., 2009). باکتری‌های ریزوسفری از طریق افزایش قابلیت عناصر غذایی در ناحیه ریزوسفر، افزایش سطح تماس ریشه، تولید تنظیم‌کننده‌های رشد و هم‌زیستی مفید با گیاه میزبان در مراحل مختلف رشد موجب افزایش در رشد و عملکرد گیاه می‌شود (Naiji & Souri, 2018; Glick, 1995).

جوانه‌زنی بذر، مرحله پیچیده و پویایی از رشد گیاه است و از طریق اثراتی که روی استقرار گیاهچه می‌گذارد عملکرد را بهبود می‌بخشد (Baluchi, *et al*., 2015). هیدروپرایمینگ یکی از روش‌های پرایمینگ بذر است که در آن بذور با آب خالص و بدون استفاده از هیچ‌گونه ماده شیمیایی تیمار می‌شوند. این نوع پرایمینگ بسیار ساده و ارزان بوده و مقدار جذب آب در آن از طریق مدت زمانی که بذور در تماس با آب هستند، کنترل می‌شود. با اعمال این تیمار فعالیت‌های متابولیکی جوانه‌زنی تحریک می‌شود و موجب تسریع و یکنواختی در جوانه‌زنی می‌شود (Omidi *et al*., 2005). گزارش‌ها نشان می‌دهد که پرایمینگ اجازه رونویسی DNA، افزایش RNA، و پروتئین سنتاز را به بذرها می‌دهد و موجب افزایش رشد رویان، ترمیم بخش‌های آسیب دیده و کاهش ترشحات متابولیت می‌شود (Demir & Oztakat, 2003). این تحقیق به منظور بررسی تأثیر هیدروپرایمینگ بذر در زمان‌های مختلف و تلقیح باکتری‌های محرک رشد به خاک گلدان بر برخی صفات فیزیولوژیکی گیاه دارویی بادرنجبویه انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در آزمایشگاه و گلخانه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اراک بصورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار در سال ۱۳۹۶ انجام شد. . بذرهای بادرنجبویه از شرکت اکسیر کوهسار طبیعت تهیه گردید. مایه تلقیح باکتری‌ها از آزمایشگاه میکروبیولوژی بخش خاکشناسی دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان تهیه شد (جدول ۱ خصوصیات باکتری های محرک رشد). به‌منظور ضد عفونی بذرها قبل از کشت، بذور به‌مدت پنج دقیقه در محلول سه درصد هیپوکلرید سدیم قرار گرفتند و بلافاصله چندین بار با آب مقطر شسته شدند. برای اجرای تیمار هیدروپرایمینگ، بذرهای

بادرنجبویه در زمان‌های مختلف ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت در آب مقطر، در دمای ۱±۱۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از طی این مدت، بذرها از آب خارج و تا رسیدن به وزن اولیه در دمای اتاق و شرایط تاریکی خشک شدند. بعد از اعمال هیدروپرایمینگ، بذرها خشک شده و همانند بذرهای تیمارنشده شاهد کشت می‌شوند. برای تلقیح باکتری‌ها به خاک گلدان از مقدار ۷ گرم مایع تلقیح که هرگرم آن دارای 10^7 عدد باکتری زنده و فعال می باشد، استفاده گردید. محیط کشت گلدان‌ها به قطر ۲۵ سانتی‌متر و ارتفاع ۳۰ سانتی‌متر حاوی خاک رس و کود حیوانی پوسیده شده به نسبت ۲ به ۱ بود. قبل از عملیات کشت، گلدان‌ها یکبار آبیاری شدند. تمام مراحل داشت از قبیل حذف علف‌های هرز، آبیاری و مبارزه با آفات در این مدت به طور مرتب و یکنواخت انجام شد. دو هفته پس از تلقیح باکتری‌ها به خاک در مرحله قبل از گلدهی، آزمایش‌های مورد نیاز پس از برداشت انجام شد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل و کاروتنویید)

برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل و کاروتنوئید از روش Lichtenthaler (1984) استفاده شد. مطابق این روش یک گرم برگ تازه در داخل هاون چینی با ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد ساییده شد. عصاره حاصل برای ۱۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ با دور ۳۰۰۰rpm قرار گرفت. از محلول رویی مقدار سه میلی‌لیتر به داخل کووت اسپکتروفتومتر ریخته شد و مقدار جذب در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر قرائت گردید. از فرمول‌های زیر برای غلظت کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید استفاده شد.

کلروفیل a =۱۹/۳ (× $A_{۶۶۳}$-۰/۸۶×A) $_{۶۴۵}$

کلروفیل b =۱۹/۳(×$A_{۶۴۵}$- ۳/۶×A $_{۶۶۳}$)

کاروتنوئید =۴/۶۹ (×$A_{۴۷۰}$-۰/۲۶۸×۲۰/ ۲ (× A $_{۶۴۵}$) +۸/۰۲× A) $_{۶۳۳}$

کلروفیل کل =کلروفیل a + کلروفیل b

A= طول موج جذب به‌دست آمده از دستگاه اسپکتروفتومتر

تعیین مقدار فلاونوئید کل

از روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم برای تعیین مقدار فلاونوئیدها استفاده شد (Hang *et al*., 2002). دو میلی‌لیتر از عصاره‌های رقیق شده گیاهی با دو میلی‌لیتر کلرید آلومینیوم ۲ درصد در لوله آزمایش ترکیب شد. بعد از ورتکس کردن محلول‌ها در دمای اتاق به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. جذب هر ترکیب واکنشی در ۴۱۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتراندازه گیری شد. به منظور رسم منحنی استاندارد از محلول‌های کوئرستین (Quercetin, Sigma Chemical Co.) استفاده شد

$y = (0.023x + 0.4323, R^2 = 0.9)$

اندازه گیری میزان فنل کل

مقدار ترکیبات فنولیک کل با معرف فولین‌سیکالتو تعیین شد. به ۴۰۰ میکرولیتر از عصاره رقیق شده گیاهی ۲ میلی‌لیتر معرف فولین‌سیکالتو (۱:۱۰) اضافه شد، و سپس کربنات سدیم (Na_2CO_3) آبی(۷۵ گرم بر لیتر) به آن اضافه شده و نمونه‌ها به‌مدت نیم ساعت در دمای آزمایشگاه باقی ماند و جذب آن در ۷۶۵nm با دستگاه اسپکتروفتومتر در مقابل بلانک قرائت شد منحنی استاندارد توسط غلظت‌های مختلفی از اسید گالیک در متانول به‌کار رفت ($R^2 = 0.99$ $y= 0.0064x + 0.0984$). نتایج برحسب میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک بیان شد (Singleton & Rossi, 1965).

جدول ۱. خصوصیات محرک رشد دو گونه سودوموناس *فلورسنس و پوتیدا*.

Table 1. Characteristics of two- species stimulus of *Pseudomonas fluoresense* and *Pseudomonas putida*.

	Dissolving phosphorus			Siderophore	Auxin	ACC- deaminase
Species	Halo to colony	Liquid medium (mg.L^{-1})	Ph	Halo to colony	Liquid medium (mg.L^{-1})	
Pseudomonas fluoresense	1.61	498	4.01	3.21	5.15	–
Pseudomonas putida	2.11	474	3.90	2.21	10.1	+

درصد و عملکرد اسانس

برای تعیین درصد اسانس، ۴۰ گرم از بخش هوایی خشک شده گیاه کاملاً خرد شده و در بالن ۱۰۰۰ سی‌سی ریخته و به آن میزان ۶۰۰ سی‌سی آب مقطر اضافه گردید. اسانس‌گیری بوسیله تقطیر با آب توسط دستگاه کلونجر انجام پذیرفت. مدت زمان اسانس‌گیری نیز ۳ ساعت بود. عملکرد اسانس نیز از حاصلضرب درصد اسانس در عملکرد بیولوژیک تقسیم بر ۱۰۰ حاصل گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

محاسبات آماری حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ انجام گرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده شد. همچنین برای رسم نمودار از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ استفاده گردید.

نتایج و بحث

رنگیزه‌های فتوسنتزی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد که استفاده از هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف، باکتری‌های محرک رشد و اثر متقابل بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد در کلروفیل a، کلروفیل b، کلروفیل کل و کاروتنوئید داشته است (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که زمان ۷۲ ساعت بیشترین مقدار کلروفیل a (۲۰۱/۲۷ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کلروفیل کل (۲۶۵/۸۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را نشان داده و زمان ۲۴ ساعت بیشترین مقدار کلروفیل b (۶۰/۳۵ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کاروتنوئید (۱۹/ ۱۸۹میلی‌گرم بر گرم وزن تر) را به خود اختصاص داده است و زمان ۴۸ ساعت کمترین مقدار کلروفیل a، کلروفیل و کلروفیل کل را نشان داده است همچنین کمترین مقدار کاروتنوئید مربوط به زمان ۱۲ ساعت است. از طرفی دیگر تلقیح باکتری‌ها کمترین مقدار را نسبت به شاهد نشان دادند، به‌طوری‌که بیشترین مقدار در کاروتنویید، کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل و به ترتیب (۱۹۱/۶۳، ۲۰۱/۲۰، ۵۸/۱۸ و ۲۶۳/۰۴ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در شاهد مشاده شد (جدول ۳). نتایج حاصل از اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌ها در شکل ۳ نشان داد بیشترین مقدار کلروفیل a در زمان ۲۴ ساعت و عدم تلقیح و کمترین مقدار توسط باکتری فلورسنس در زمان ۱۲ ساعت به‌دست آمد که از لحاظ آماری کمترین مقدار در این ساعت با باکتری پوتیدا و در ۴۸ ساعت با باکتری فلورسنس از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداده است. اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف با باکتری محرک رشد نشان داد که بیشترین مقدار کلروفیل b در زمان ۲۴ ساعت و عدم تلقیح باکتری به‌دست آمد که با باکتری فلورسنس و زمان ۷۲ ساعت از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشته است، این در حالی است که با باکتری فلورسنس در زمان ۴۸ ساعت کمترین مقدار این صفت را به خود اختصاص داده است (شکل ۴).

بیشترین مقدار کلروفیل کل در اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌محرک رشد تحت تأثیر زمان ۲۴ ساعت و عدم تلقیح باکتری بوده و کمترین مقدار از تلقیح باکتری فلورسنس در زمان ۴۸ ساعت به‌وجود آمده است و با اثر متقابل زمان ۱۲ ساعت و باکتری فلورسنس از لحاظ آماری تفاوت معنی-داری نداشته است (شکل ۲). همچنین در رابطه با اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری محرک رشد بر کاروتنوئید گیاه دارویی بادرنجبویه مشخص شد که بیشترین اثر در زمان ۲۴ ساعت و عدم تلقیح باکتری‌های محرک رشد به‌دست آمده که با زمان ۲۴ ساعت و باکتری پوتیدا از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نشان نداده است. همچنین کمترین مقدار مربوط به همین باکتری در زمان ۱۲ ساعت بوده و از لحاظ آماری با ۴۸ ساعت و باکتری فلورسنس تفاوت معنی‌داری نشان نداده است (شکل۱).

میزان ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی

نتایج نشان داد که تلقیح باکتری و هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف بر میزان فنل و فلاونوئید کل از نظر آماری در سطح یک درصد اثر معنی‌داری داشته است.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس اثر هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر صفات فیزیولوژیکی بادرنجبویه

Table 2. Results of variance analysis effect of hydropriming at different times and plant growth promoting rhizobacteria on physiological traits of lemon balm.

Sources of variation	df	Mean of squares					
		Carotenoid	Chlorophyll a	Chlorophyll b	Total chlorophyll	Phenol	Flavonoids
Hydropriming at different times	3	12054.41**	19715.45**	1424.97**	39316.06**	494.15**	3.20**
PGPR	2	13509.88**	29662.62**	1022.12**	43481.90**	538.04**	8.42**
Hydropriming at different times×PGPR	6	6268.15**	32097.24**	1145.70**	41349.88**	221.42*	3.09**
Test error		411.87	1017.24	139.10	1694.20	95.26	0.23
Coefficient of variation (%)		13.14	20.65	24.34	20.15	25.89	27.61

ns، ** و *: به ترتیب نبود تفاوت معنی‌دار و تفاوت معنی‌داری در سطح ۱ و ۵ درصد.

ns, **, *: Non-significantly difference and significantly difference at 1 and 5% of probability levels, respectively.
PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.

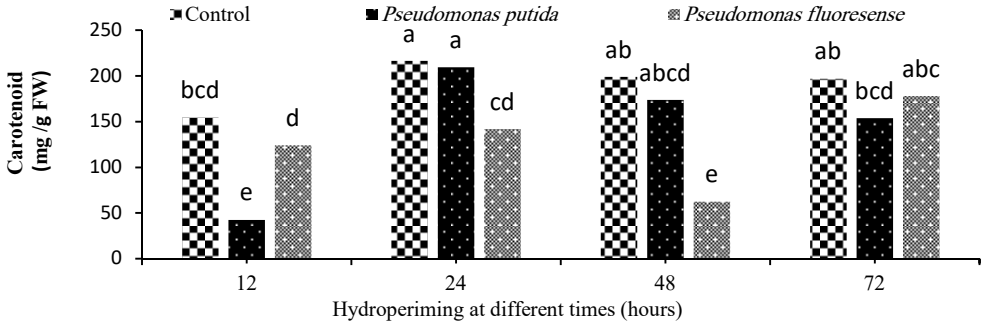
جدول ۳. مقایسه میانگین اثر هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر صفات فیزیولوژیکی بادرنجبویه

Table 3. Means comparison effect of hydropriming treatment at different times and inoculation of plant growth promoting rhizobactria on physiological traits of lemon balm.

Treatment		Carotenoid (mg/g FW)	Chlorophyll a (mg/g FW)	Chlorophyll b (mg/g FW)	Total chlorophyll (mg/g FW)
Hydropriming at different times	12	107.05^{c}	119.09^{a}	39.18^{b}	163.33^{b}
	24	189.19^{a}	187.71^{a}	60.35^{a}	255.72^{a}
	48	144.93^{b}	109.47^{b}	36.07^{b}	132.20^{b}
	72	176.22^{a}	201.27^{a}	58.15^{a}	265.81^{a}
PGPR	Control	191.63^{a}	201.20^{a}	58.18^{a}	263.04^{a}
	S. putida	144.83^{b}	159.75^{b}	47.32^{b}	207.01^{b}
	S. fluoresense	126.58^{c}	102.20^{c}	39.82^{b}	142.74^{c}

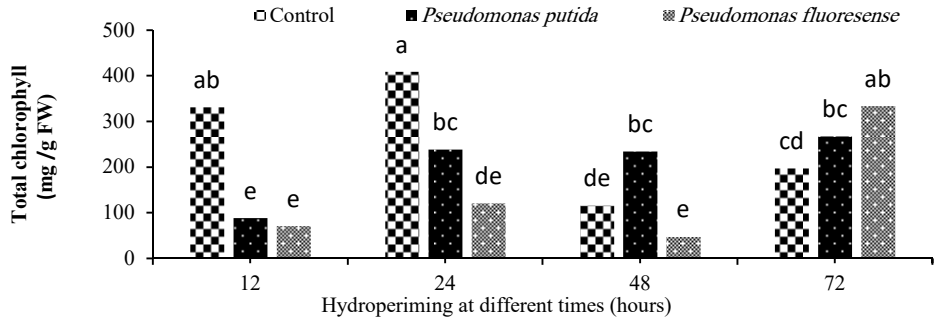
در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند.

In each column, the meanings with different letters have a significant difference.
PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.



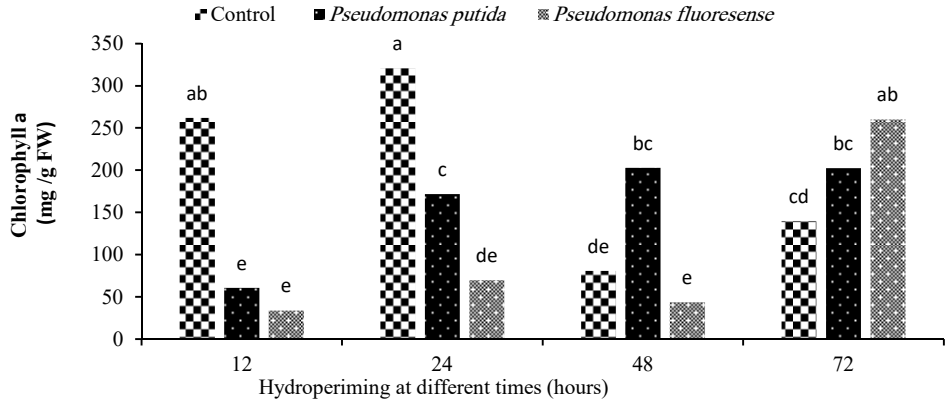
شکل ۱. مقایسه اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر میزان کاروتنوئید بادرنجبویه.

Figure 1. Mean comparison interaction effect of hydropriming at different times and plant growth promoting rhizobactria on carotenoid in lemon balm



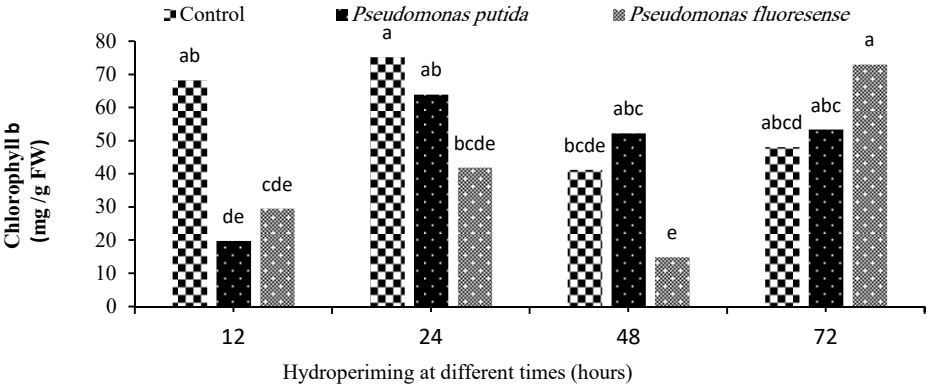
شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر میزان کلروفیل کل بادرنجبویه

Figure 2. Mean comparison interaction effect of hydropriming at different times and plant growth promoting rhizobactria on total chlorophyll in lemon balm.



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر میزان کلروفیل a بادرنجبویه.

Figure 3. Mean comparison interaction effect of hydropriming at different times and plant growth promoting rhizobactria on chlorophyll a in lemon balm.



شکل ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر میزان کلروفیل b بادرنجبویه.

Figure 4. Mean comparison interaction effect of hydropriming at different times and plant growth promoting rhizobactria on chlorophyll b in lemon balm.

همچنین اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌محرک رشد بر میزان فنل کل در سطح پنج درصد و بر مقدار فلاونوئید کل در سطح یک درصد اثر معنی‌داری از نظر آماری داشته است (جدول ۲). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین مقدار فنل (۴۵/۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در زمان ۱۲ ساعت و کمترین مقدار آن (۳۱/۱۰ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در زمان ۷۲ ساعت است. بیشترین مقدار ترکیبات فنلی در تلقیح باکتری فلورسنس (۴۲/۷۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک) دیده شد که از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با باکتری پوتیدا نداشت. آنچه از اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری محرک رشد در شکل ۶ مشاهده شد گویای آن است که هیدروپرایمینگ در ۷۲ ساعت و تلقیح با باکتری فلورسنس بیشترین مقدار فنل را داشته است که از لحاظ آماری با باکتری پوتیدا در همان زمان تفاوت معنی‌داری نشان نداده است و کمترین مقدار در ۲۴ ساعت و عدم تلقیح باکتری مشاهده شد. ترکیبات فنلی، گروه مهمی از ترکیبات گیاهی به عنوان متابولیت ثانویه هستند که در پاسخ به تنش‌های زیستی و غیر زیستی ایجاد می‌شود. این ترکیبات به دلیل داشتن گروه‌های هیدروکسیل، می‌توانند به‌عنوان دهنده الکترون و هیدروژن موجب خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد شوند (Fukumoto & Mazza, 2000). در این پژوهش باکتری‌های محرک رشد

موجب افزایش میزان فنل در مقایسه با شاهد شده است. نتایج حاضر با تحقیق Cappellari *et al.* (2013) مطابقت داشته است. آن‌ها اثرات تک تلقیح و تلقیح مشترک با دو گونه باکتری *P. fluorescens* و *Azospirillum brasilense* در محتوای فنلی گیاه جعفری مکزیکی مورد بررسی قرار دادند. نتایج افزایش محتوای فنلی را در مقایسه با گیاهان شاهد نشان داد. همچنین Banchio *et al.* (2010) اثر دو نوع باکتری برازیلنس و فلورسنس را بر روی گیاه جعفری مکزیکی مورد بررسی قرار دادند یافته ها نشان دادند که مقدار فنل کل بیش از دو برابر به نسبت شاهد بود. همچنین نتایج نشان داد که بیشترین مقدار فلاونوئید در زمان ۴۸ ساعت پرایم (۲/۵۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و کمترین مقدار آن در زمان ۱۲ ساعت (۱۲/ ۱میلی گرم بر گرم وزن خشک) بود. علاوه بر این، اثر باکتری‌ها بر مقدار فلاونوئید نشان می‌دهد که باکتری فلورسنس دارای بیشترین مقدار فلاونوئید (۲/۳۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک) و عدم تلقیح باکتری (شاهد) دارای کمترین مقدار فلاونوئید (۰/۸۱ میلی گرم بر گرم وزن خشک) است (جدول ۴). بیشترین مقدار فلاونوئید از اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری محرک رشد در زمان ۴۸ ساعت توسط باکتری پوتیدا و کمترین مقدار آن در زمان ۱۲ ساعت توسط همین باکتری به‌دست آمد که از لحاظ آماری با عدم تلقیح در زمان ۱۲ ساعت معنی‌دار نبود (شکل ۵). دو آنزیم کلیدی در مسیر بیوسنتز ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی آنزیم فنیل آلانین آمونیالیاز (PAL) و چالکون سینتاز (CHS) هستند که الیسیتورها می‌توانند با تأثیر بر این مسیر موجب افزایش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی شوند (Wu *et al.*, 2005). باتوجه به نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین داده‌ها بیشترین میزان فلاونوئید (۲/۵۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک) در زمان ۴۸ ساعت پرایمینگ مشاهده شد. همچنین تلقیح باکتری‌ها تفاوت معنی‌داری با شاهد را نشان دادند، به‌طوری‌که در تلقیح باکتری فلورسنس مقدار فلاونوئید ۲/۳۵ میلی گرم بر گرم وزن خشک بود ولی اثر معنی-داری از لحاظ آماری بین دو باکتری مشاهده نشد.

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر صفات فیزیولوژیکی بادرنجبویه

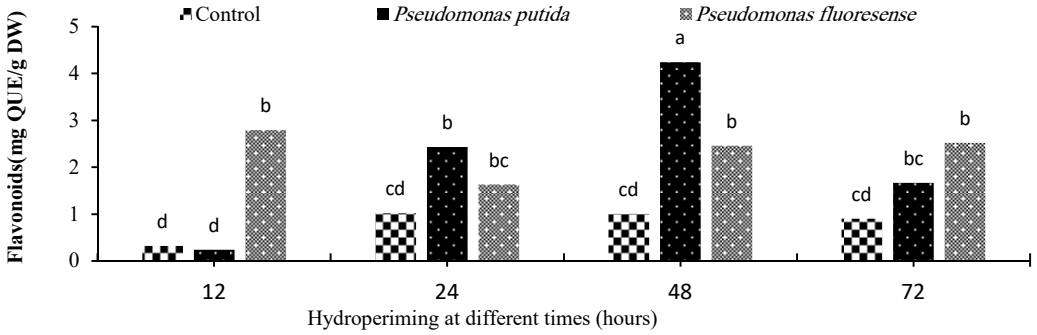
Table 4. Means comparison effect of hydropriming at different times and inoculation of plant growth promoting rhizobactria of physiological traits of lemon balm

Treatment		Phenol (mg GAE/g DW)	Flavonoids (mg QUE/g DW)
Hydropriming at different times	12	45.11[a]	1.12[c]
	24	31.53[b]	1.69[b]
	48	43.01[a]	2.57[a]
	72	31.10[b]	1.70[b]
PGPR	Control	30.10[b]	0.81[b]
	S. putida	40.18[a]	2.14[a]
	S. fluoresense	42.78[a]	2.35[a]

در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف متفاوت با یکدیگر تفاوت معنی-داری دارند.

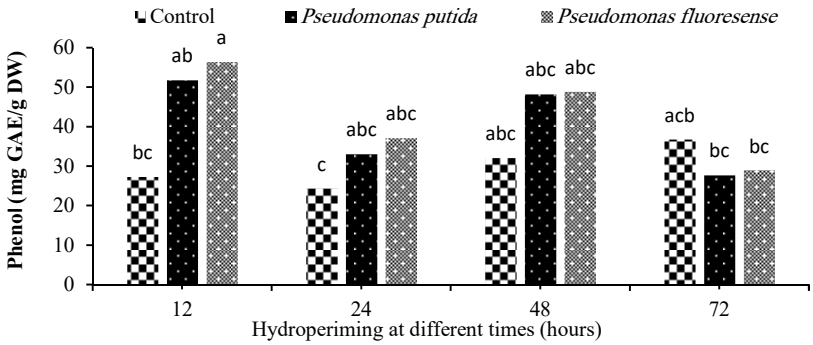
In each column, the meanings with different letters have a significant difference.

PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobacteria.



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر میزان فلاونوئید بادرنجبویه.

Figure 5. Mean comparison interaction effect of hydropriming at different times and plant growth promoting rhizobactria on flavonoids in lemon balm.

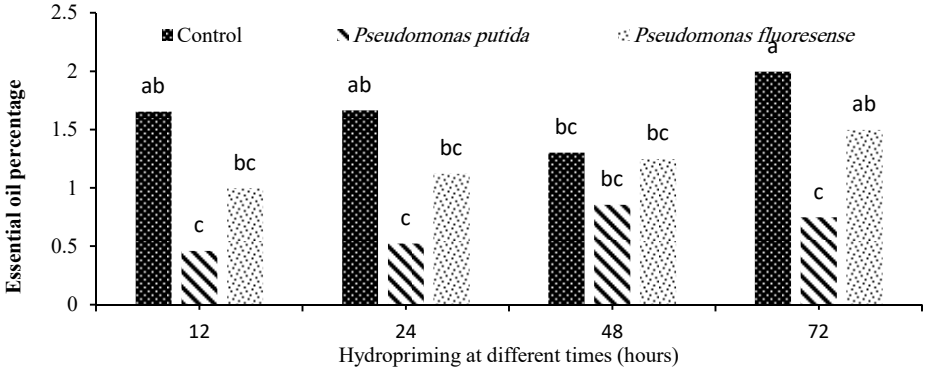


شکل ۶. مقایسه میانگین اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر میزان فنل کل بادرنجبویه

Figure 6. Mean comparison interaction effect of hydropriming at different times and plant growth promoting rhizobactria on phenol in lemon balm.

براساس تحقیقات انجام شده کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه موجب افزایش فنل و فلاونوئید در گیاه *Solanum viarum* و *Begonia malabarica Lam* شد (Selvaraj *et al*., 2008; Hemashenpagam & Selvaraj, 2011). همچنین طی پژوهشی نشان داده شد که کاربرد کود های زیستی باعث اقزایش عملکرد اسانس بادرشبو (Yousefzadeh *et al*., 2016) و سبب بهبود تغذیه و افزایش عملکرد محصول گوجه‌فرنگی با حفظ جنبه‌های زیست‌محیطی شده است (Sheikhalipour *et al*., 2019).

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از شکل ۷ تفاوت معنی‌داری بین شاهد در زمان‌های مختلف و اثر متقابل پرایمینگ به‌همراه تلقیح باکتری‌ها مشاده می‌شود. بیشترین مقدار درصد اسانس در هیدروپرایمینگ بذر به‌مدت ۷۲ ساعت بدون اعمال باکتری و کمترین مقدار از اثر متقابل ۱۲ ساعت پرایمینگ به همراه تلقیح باکتری پوتیدا به دست آمد. در بین باکتری‌ها فلورسنس نسبت به پوتیدا بهتر عمل کرده و اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده می‌شود. متابولیت های ثانویه گیاهی در گیاه نقش مهمی ایفا می کنند و منبع فیتو شیمیایی برای سلامت و تغذیه انسان هستند. هر عامل زیستی و غیرزیستی که رشد و نمو را تحت تأثیر قرار دهد، متابولیت‌های ثانویه را دستخوش تغییر قرار می‌دهد. Ghorbanpour *et al*. (2013) گزارش کردند که کاربرد باکتری پوتیدا-۱۵۹ و پوتیدا-۴۱ موجب افزایش چشمگیری بر درصد اسانس گیاه دارویی مریم گلی شده بود. Cappellari *et al*. (2013) نیز گزارش کردند که دو گونه باکتری (*P. fluorescens* and *Azospirillum brasilense*) موجب افزایش ۷۰ درصد در عملکرد اسانس بدون تغییر در ترکیب آن در مقایسه با گیاهان شاهد شده بودند. Banchio *et al*. (2008) نیز افزایش ۲/۵ درصدی بر عملکرد گیاهان مرزنجوش تلقیح شده نسبت به گیاهان شاهد گزارش کردند. Mishra *et al*. (2010) تأثیر دو نوع باکتری *Pseudomonas fluorescens* و *Bacillus subtilis* را بر عملکرد اسانس *Pelargonium graveolens* مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که کاربرد این باکتری‌ها به عنوان محرک زیستی موجب افزایش این صفت شد. محققین مکانیسم‌های احتمالی باکتری‌های محرک رشد گیاه برای افزایش جذب عناصر غذایی را شامل تولید اسیدهای آلی توسط باکتری‌ها در ریزوسفر و در نتیجه کاهش pH (Erturk *et al*., 2011)، افزایش فعالیت پمپ پروتون ATPase و هم چنین افزایش ترشحات ریشه ای از قبیل مواد احیایی و کلات‌کننده مانند سیدروفور (Naderi, 2012)، توسعه سیستم ریشه‌ای، محدود کردن جذب کلر و سدیم و در نهایت تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه مانند اکسین ذکر کرده‌اند (Tsavkelova *et al*., 2005). بنابراین می توان احتمال داد تیمار باکتریایی سودوموناس پوتیدا و فلورسنس با تولید IAA و سیدروفور می تواند باعث افزایش جذب آهن، فسفر و در نتیجه آن افزایش تقسیم و رشد سلولی و در نتیجه افزایش عملکرد بیولوژیک گردد.



شکل ۷. مقایسه میانگین اثر متقابل هیدروپرایمینگ در زمان‌های مختلف و باکتری‌های محرک رشد گیاه بر درصد اسانس بادرنجبویه

Figure 7. Mean comparison interaction effect of hydropriming at different times and plant growth promoting rhizobactria on essential oil percentage in lemon balm.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که کاربرد توأم هیدروپرایمینگ بذر در زمان‌های مختلف و تلقیح باکتری‌های محرک رشد به خاک موجب افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی، فنل و فلاونوئید، درصد و عملکرد اسانس شد. از آنجاکه هدف از تولید اغلب گیاهان دارویی استحصال بالاترین درصد اسانس و عملکرد بیولوژیک می باشد، با توجه به نتایج این پژوهش، استفاده از هیدروپرایمینگ بذر بادرنجبویه به‌مدت ۱۲ ساعت و همچنین تلقیح باکتریایی *سودوموناس فلورسنس* جهت افزایش عملکرد کمی و کیفی گیاه دارویی بادرنجبویه می‌تواند سودمند باشد. همچنین آنها می‌توانند به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای کود شیمیایی ضمن کاهش مصرف کودهای شیمیایی، تضمین‌کننده تولید گیاهان دارویی عاری از مواد شیمیایی باشند.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه اراک به‌دلیل حمایت مالی در اجرای این تحقیق (در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد)، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Banchio, E., Bogino, P.C., Santoro, M., Torres, L., Zygadlo, J. & Giordano, W. (2010). Systemic induction of monoterpene biosynthesis in origanummajoricum by soil bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 13, 650-654.
2. Banchio, E., Bogino, P.C., Zygadlo, J., & Giordano, W. (2008). Plant growth promoting rhizobacteria improve growth and essential oil yield in *Origanum majorana* L. *Biochemical Systematics and Ecology*, *36*(10), 766-771.
3. Birdane, Y. O., Buyukokuroglu, M. E., Birdane, F. M., Cemek, M., & Yavuz, H. (2007). Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Melissa officinalis* L. in rodents. *Revue de Medecine Veterinaire* , *158*(02), 75-81.
4. Baluchi, H.R., Narg Mousse, M. & Attarzadeh, M. (2015). Effect of seed pre-treatment on some of the components of germination and seedling growth of safflower under drought stress. *Iranian Journal of Seed Research*, 2 (4), 1-9. (in Farsi)
5. del Rosario Cappellari, L., Santoro, M. V., Nievas, F., Giordano, W. & Banchio, E. (2013). Increase of secondary metabolite content in marigold by inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology*, *70*, 16-22.
6. Cosge B., Ipek A. & Gurbuz, B. (2009). GC/MS analysis of herbage essential oil from lemon balms (*Melissa officinalis* L.) grown in Turkey. *Journal of Applied Biological Sciences*, 3(2), 136-139.
7. Das, K., Dang, R. & Shivananda, T.N. (2008). Influence of bio-fertilizers on the availability of nutrients (N, P and K) in soil in relation to growth and yield of *stevia rebaudiana* grown in south india. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 1 (1), 20-4.

8. Demir, I. & Oztakat, C. (2003). Effect of salt priming on germination and seedling growth at low temperatures in watermelon seeds during development. *Seed Science and Technology*, 31(3), 765- 770.
9. Emamghoreishi, M. & Talebianpour, M.S. (2009). Antidepressant effect of melissa officinalis in the forced swimming test. *Daru*, 17(1), 42-7.
10. Ebrahimi Hariry, R. (2011). Anticonvulsant effects of hydroalcoholic extract of melissa officinalis on pentylenetetrazole (ptz) model of convulsion in mice. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(16), 3803-9.
11. Erturk, Y., Cakmakci, R., Duyar, O. & Turan, M. (2011). The effects of plant growth promoting rhizibacteria on vegetative growth and leaf nutrient contents of hazelnut seedling (*Turkish hazelnut* CV. Tombul and Sivir). *International Journal of Soil Science*, 6 (3), 188-198.
12. Fukumoto, L.R. & Mazza, G. (2000). Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 48(8), 3597-604.
13. Ferrat, I.L. & Lova, C.J. (1999). Relation between relative water content, nitrogen pools and growth of *phaseolus vulgaris* l. and *Phaseolus acutifolius*, a. gray during water deficit. *Crop Science*, 39, 467-74.
14. Guginski, G., Luiz, A.P., Silva, M.D., Massaro, M., Martins, D.F., Chaves, J., Mattos, R.W., Silveira, D., Ferreira, V.M.M., Calixto, J.B. & Santos, A.R.S. (2009). Mechanisms involved in the antinociceptioncaused by ethanolic extract obtained from the leaves of *Melissa officinalis* (lemon balm) in mice. *Pharmaco Biochem& Behavior*, 93, 10-16.
15. Glick, B. R. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, *41*(2), 109-117.
16. Ghorbanpour, M. & Hatami, M. (2014). Biopriming of salvia officinalis seed with growth promoting rhizobacteria affects invigoration and germination indices. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, *8*(22), 29-36.
17. Hang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. & Chern, J.C. (2002). Estimation of total flavonoid content in proplis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10, 178-182.
18. Hemashenpagam, N. & Selvaraj, T. (2011). Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungus and plant growth promoting rhizomicroorganisms (PGPR's) on medicinal plant Solanum viarum seedlings. *Journal of Environmental Biology*, *32*(5), 579.
19. Karlidag, H., Yildirim, E. & Turan, M. (2009). Salicylic acid ameliorates the adverse effect of salt stress on strawberry. *Science Agriculture*, 66 (2), 180-7.
20. Lichtenthaler, H.K. (1987). Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology*, 148, 350-382.
21. Omidi, H.A., Sorushzadeh, A., Salehi, A. & Ghezeli, F. (2005). Evaluation of priming pretreatments on germination rapeseed. *Agricultural Science and Technology*, 19(2), 1-10. (in Farsi)
22. Omid Beigi, R. (1997). *Production and processing of medicinal plants*. (Vol. 3). Astan Quds Razavi Publication. 438 p. (in Farsi)
23. Naiji, M. & Souri, M.K. (2018). Nutritional value and mineral concentrations of sweet basil under organic compared to chemical fertilization. *Acta Scientiarum Polonorum: Hortorum Cultus* (Ogrodnictwo), 17(2), 167-175.
24. Naderi, m.r. (2012). The effect of plant growth promoting rhizobacteria on phytoremediation of lead by sunflower in a pb-bearing soil for long term. M.Sc. Thesis in Agroecology, Shahrekord University, 119 pp. (in Farsi)
25. Parvazi Shandi, S., Pazoki, A. R., Asgharzadeh, A., Azadi, A. & Paknejad, F. (2013). Effect of irrigation interval, humic acid and plant growth promoting rhizobacteria on physiological characteristics of Kavir cultivar wheat in. *Crop Physiology Journal*, *5*(18), 19-33.
26. Rouzbeh, R., Daneshian, J. & Farahani, H. A. (2009). Super nitro plus influence on yield and yield components of two wheat cultivars under NPK fertilizer application. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, *1*(8), 293-297. (in Farsi)
27. Shady, M.A., Ibrahim, I. & Afify, A.H. (1984). Mobilization of elements and their effects on certain plant growth characteristics as influenced by some silicate bacteria. *Egyptian Journal of Botany*, 27(1-7), 17-30.
28. Sheikhalipour, M., Bolandndnazar, S.A., Sarikhani M.R & Panahandeh, J. (2019). Effect of application of biofertilizers on yield, quality and antioxidant capacity of tomato fruit. *Iranian Journal of Horticultural Science,* 50 (3), 621-632. (in Farsi).
29. Singleton, V. L. & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American journal of Enology and Viticulture*, *16*(3), 144-158.
30. Selvaraj, T., Rajeshkumar, S., Nisha, M. C., Wondimu, L. & Tesso, M. (2008). Effect of *Glomus mosseae* and plant growth promoting rhizomicroorganisms (PGPR's) on growth, nutrients and content of secondary metabolites in *Begonia malabarica* Lam. *Maejo International Journal of Science and Technology*, *2*(3), 516-525.

31. Souri, M.K., Arab, M.S., Tohidloo, G. & Kashi, A. (2016). Effects of some priming treatments on germination quality of artishock (*Cynara scolymus*). *Iranian Journal of Seed Science and Technology*, 5(2), 85-94. (in Farsi)
32. Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A. & Netrusoe, A.I. (2005). Auxin production by bacteria associated with orchod roots. *Microbiology*, 74, 233-273.
33. Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G. & Cheung, K.C. (2005). Effect of biofertilizer containing n-fixer, pand k solubilizers and am fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma*, 125, 155-166.
34. Yasari, E., Patwardhan, A.M., Ghole, V.S., Ghasemi Chapi, O. & Asgarzadeh, A. (2007). Biofertilizers impact on canola (*Brassica napus* L.) seed yield and quality. *Asian Journal of Microbiology, Biotechnology and Environment Science*, *9*(3), 701-707.
35. Yousefzadeh, S., Modarres-Sanavy, S.A., Sefidkon, F. & Ghiasy Oskuee, M. (2016). Effect of biofertilizer, azocompost and nitrogen on oil yield and essential oil content of *Dracocephalum moldavica* L. *Iranian Journal of Horticultural Science*, 46 (4), 601-611. (in Farsi)