Iranian Journal of Horticultural Science
Vol 53, No 1, Spring 2022 (15-30)
DOI: 10.22059/ijhs.2021.319185.1898

علوم باغبانی ایران
دورهٔ ۵۳، شمارهٔ ۱، بهار ۱۴۰۱ (ص ۳۰-۱۵)

نشریه پژوهشی:

بررسی صفات مورفوفیزیولوژیکی دو اکوتیپ زعفران تحت تاثیر باکتری باسیلوس سوبتیلیس در شرایط اقلیمی زنجان

فهیمه صالحی[۱]، میترا اعلایی[۲*]، سید نجم الدین مرتضوی[۲]، سید علیرضا سلامی[۳] و حسن رضادوست چهارده[٤]
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، کد پستی ٤٥٣٧١-٣٨٧٩١، زنجان، ایران
۳. دانشیار، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران
٤. استادیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۵ - تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/٤/۱۵)

چکیده

اثر باکتری باسیلوس سوبتیلیس با غلظت‌های صفر و cfu/ml ۱۰^۲، ۱۰^۵، ۱۰^٦، ۱۰^۸ روی دو اکوتیپ زعفران زراعی (نطنز، زنجان) طی سال های زراعی ۱۳۹۷ - ۱۳۹۸ در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی به صورت فاکتوریل با سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. تعداد برگ در هر بنه، متوسط طول برگ ها، گل ها، گلبرگ ها و کاسبرگ ها، وزن تر و وزن خشک کلاله، عملکرد تر و خشک گل، تعداد گل در هر کرت، میزان فنل و آنتوسیانین گلبرگ و میزان نیتروژن، فسفر و پتاسیم اندازه‌گیری شد. کلیه صفات مورفولوژیک به طور معنی‌داری تحت تاثیر کاربرد باکتری قرار گرفتند. بیشترین مقدار وزن تر و خشک کلاله در هر بوته در غلظت cfu/ml ۱۰^۸ (به ترتیب ٤۱/٤٤ میلی‌گرم و ۷/۱۳ میلی‌گرم) و کمترین در تیمار شاهد (به ترتیب ۳۲/۹۱ میلی‌گرم و ٦/۱٤ میلی‌گرم) مشاهده شد. اکوتیپ نطنز بیشترین میزان وزن تر و خشک کلاله را داشت. بیشترین میزان نیتروژن، فسفر و پتاسیم در غلظت cfu/ml ۱۰^۸ (به ترتیب ۵/۵۵ درصد، ppm۲۰٦۱/٦٦ و ppm۷٥٤۰/۸) و کمترین در شاهد (به ترتیب ۳/۲۵ درصد، ppm۱۳۱٤/٤۲ و ppm٤۳۹۱/۸) گزارش شد. بیشترین میزان نیتروژن و فسفر در اکوتیپ زنجان مشاهده شد. با توجه به نتایج، می‌توان استفاده از باکتری باسیلوس در غلظت مناسب را به عنوان کود زیستی در راستای دستیابی به شاخص‌های رشدی مطلوب در زعفران سودمند دانست.

واژه‌های کلیدی: باکتری باسیلوس، زعفران، عملکرد کلاله، کود زیستی.

Study of morphophysiological attributes of two saffron ecotypes treated with *Bacillus subtilis* under Zanjan climatic conditions

Fahimeh Salehi[1], Mitra Aelaei[2*], Seyed Najmeddin Mortazavi[2], Seyed Alireza Salami[3] and Hassan Rezadoost Chahardeh[4]
1, 2. Ph. D. Student and Associate Professor, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, P. O. 45371-38791, Zanjan, Iran
3. Associate Professor, Department of Horticultural Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, P.O. 77871-31587, Karaj, Iran
4. Assistant Professor, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
(Receive: Feb. 23, 2021 - Accepted: July 06, 2021)

ABSTRACT

Effect of *Bacillus subtilis* (0, 10^2, 10^5, 10^6, 10^8 cfu/ml) was studied on saffron (*Crocus sativus* L.) ecotypes Natanz and Zanjan during 2017-2019 via a factorial experiment based on randomized complete blocks design in three replicates. Number of leaves per corm, average length of leaves, flowers, petals and sepals, stigma fresh and dry weights, fresh and dry flower yield, number of flowers per plot, total phenol and anthocyanin in petals and the amount of nitrogen, phosphorus and potassium were measured. All morphophysiological were significantly affected due to *B. subtilis* treatment. The highest and the lowest fresh and dry weight of stigma was observed in 10^8 cfu/ml (41.44 mg and 7.13 mg) and no treated samples (32.91 mg and 6.14 mg), respectively. The maximum stigma fresh and dry weight was observed in Natanz ecotype. The highest amount of nitrogen, phosphorus and potassium was recorded in 10^8 cfu / ml (5.55 %, 2061ppm 66.75 and 7540.8 ppm, respectively) and the lowest in control (3.25 %, 1314.42 ppm and 4339.8 ppm, respectively). The highest amount of nitrogen and phosphorus was observed in Zanjan ecotype. According to the results, utilizing the *B. bacteria* in a proper concentration as a bio fertilizer can be considered beneficial towards optimal growth indices in saffron.

Keywords: Bacillus bacteria, bio-fertilizer, saffron, stigma yield.

* Corresponding author E-mail: maelaei@znu.ac.ir

مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. متعلق به خانواده زنبق (Iridaceae) می‌باشد (Molina *et al*., 2004). این گیاه از با ارزش‌ترین گیاهان زراعی و ادویه‌ای در دنیا است (Melnyk *et al*., 2010)، که جایگاه ویژه‌ای در بین محصولات صادراتی ایران دارد (Koocheki, 2013). این گیاه از زمان‌های قدیم به عنوان یک چاشنی و رنگ در غذاها، هم‌چنین در درمان آکنه، جوش، بیماری‌های پوستی، خونریزی مغزی، آسم، سرفه، نفخ شکم، اختلالات معده، بی‌خوابی، خونریزی مزمن رحم، تب سرخ و حتی سرطان مورد استفاده بوده است (Bathaei & Mousavi, 2010). ویژگی‌های خاص این محصول از جمله بهره‌برداری چند ساله در یک نوبت کاشت، نیاز به آب کم، آبیاری در زمان‌های غیربحرانی، نیاز آبی سایر گیاهان و نیز بازار فروش داخلی و خارجی مناسب، آن را به عنوان انتخاب نخست کشاورزان استان خراسان مطرح کرده است (Kakhki & Farahmand, 2012). مدت‌ها کشاورزان بر این باور بودند که زعفران فقط در مناطق خاصی می‌روید، بعدها معلوم شد که این محدودیت اشتباه بوده و این گیاه توان سازش‌پذیری بالایی داشته که امروزه در استان زنجان نیز به عنوان یک محصول اقتصادی در حال توسعه و کشت می‌باشد به طوری که میزان متوسط عملکرد زعفران در استان را ۵ کیلوگرم در هکتار اعلام نموده‌اند (Anbarani, 1990; Falahi *et al*., 2016). ایران سالانه بیش از ۳۰۰ تن کلاله خشک زعفران تولید می‌کند (Behdani *et al*., 2010) و سطح زیر کشت سالیانه آن به‌طور دائم رو به افزایش است (Anonymous, 2010). البته علاوه بر ایران در کشورهای دیگر مثل افغانستان، هندوستان، اسپانیا، ایتالیا، مراکش، ترکیه و یونان نیز کشت می‌گردد. حال با وجود این که ایران در بین کشورهای تولیدکننده زعفران مقام نخست را از نظر سطح زیر کشت و میزان تولید سالیانه دارد، ولی میانگین عملکرد آن در مقایسه با متوسط عملکرد جهانی این محصول اندک می‌باشد. به نظر می‌رسد که این تفاوت معنی‌دار، به دلیل نامناسب بودن روش‌های تغذیه‌ی و تفاوت در ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مناطق تحت کشت باشد (Kumar *et al*., 2009). به منظور افزایش تولید محصول در واحد سطح، عملیات زراعی متعددی نظیر مصرف کودهای شیمیایی صورت می‌گیرد، ولی یکی از نتایج منفی آن بحران آلودگی‌های زیست محیطی، به ویژه آلودگی منابع خاک و آب بوده است که به صورت زنجیره‌ای به منابع غذایی انسان‌ها راه یافته و سلامت جامعه بشری را مورد تهدید قرار داده است (Armak *et al*., 2018; Singh & Kapoor, 1998). همچنین، این کودها در درازمدت خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک را تخریب کرده و نفوذ ریشه گیاهان را دچار مشکل می‌سازد که در نهایت کاهش عملکرد را به دنبال خواهند داشت (Wu *et al*., 2004). کاهش این مخاطرات زیست محیطی همگام با افزایش عملکرد گیاهان زراعی نیازمند استفاده از تکنیک‌های نوین زراعی است. از جمله این تکنیک‌ها، استفاده از جامعه زنده و فعال ریز جانداران خاکزی می‌باشد (Zhang *et al*., 2013; Pierre Anoshi *et al*., 2010). که قادر به بالا بردن حاصلخیزی خاک، افزایش رشد و عملکرد محصول می‌باشند (Mikovacki *et al*., 2010). از جمله این میکروارگانیسم‌ها، باکتری‌های محرک رشد می‌باشند که تلقیح گیاهان با آن‌ها در مراحل اولیه نمو، تولید زیست توده را از طریق اثر مستقیم بر رشد ریشه و شاخه‌ها بهبود می‌بخشد (Antoun & Kloepper, 2001). در بین باکتری‌های محرک رشد گیاه، باکتری‌های جنس *Bacillus* به دلیل توزیع گسترده آن‌ها در خاک، توانایی کلونیزه کردن ریزوسفر بسیاری از گیاهان و تولید طیف متنوعی از متابولیت‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند (Bashan & Holguin, 1997). باکتری *Bacillus subtilis* از نظر رده‌بندی در شاخه Firmicutes و رده Bacilli، راسته Bacillales و تیره Bacillaceae قرار دارد (Euzéby, 2008). برخی از گونه‌های این باکتری تا دمای ۴۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد را به همراه خشکی محیط می‌تواند تحمل کند و در همه جا اعم از هوا، خاک و در بدن انسان، بیشتر در پوست و پیچ و خم روده یافت می‌شود و کاربردهای پروبیوتیک بسیاری دارند و همچنین به عنوان رایزوباکتری‌های محرک

رشد گیاه (PGPR) امروزه در کشاورزی کاربرد گسترده‌ای دارند (Grosch *et al*., 1999). تلقیح گیاهان با ترکیبی از کود گیاهی و *Bacillus polymyxa* و *Pseudomonas striata* باعث افزایش عملکرد گندم و سیب زمینی شد (Kumar *et al*., 2017). همچنین طی مطالعاتی، استفاده از این باکتری‌ها سبب بهبود جذب عنصر فسفر روی محصولاتی همچون گندم، سیب‌زمینی، چغندرقند، نیشکر، ذرت و کاهو شده است (Dokoral *et al*., 2002). در پژوهشی باکتری‌های محرک رشد *Pseudomona fluorescence*، باعث افزایش معنی‌داری در وزن خشک برگ‌های ختمی شدند (Lashkari *et al*., 2021). Ratti *et al*. (2001) در تحقیق خود بر روی علف لیمو مشاهده کردند که کاربرد باکتری‌های حل‌کننده فسفات، ارتفاع بوته و زیست توده گیاهی را در مقایسه با شاهد افزایش داد. همچنین در پژوهشی دیگر، مشخص گردید که کاربرد این باکتری‌ها در مقایسه با شاهد، موجب افزایش معنی‌دار ارتفاع بوته در گیاه چای می‌گردد (Hazarika *et al*., 2000). نتایج مطالعات نشان داد که تیمار باکتریایی سبب افزایش میزان متابولیت‌های ثانویه در گیاهان یک ساله ریحان و گیاه چند ساله مرزنجوش می‌شود (Maricel *et al*., 2011). تحقیقات انجام شده توسط Ehteshami *et al*. (2013) نیز افزایش رشد و میزان جذب عناصر غذایی در گیاه جو تحت تیمار باکتری را نشان داد. همچنین طی بررسی تاثیر باکتری *Pantoea agglomerans* بر روی چمن مشاهده شد که میزان نیتروژن در برگ‌ها نسبت به شاهد افزایش یافت (Emami *et al*., 2021). با توجه به محدود بودن اطلاعات لازم در جهت استفاده از غلظت‌های مختلف باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر روی گیاه زعفران، در راستای انتخاب غلظت مناسب این باکتری برای افزایش کمیت و کیفیت محصول این گیاه، مطالعه حاضر با هدف بررسی نقش این محرک‌ها بر صفات مورفوفیزیولوژیکی و فیتوشیمیایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق با هدف بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus subtilis* روی صفات مورفوفیزیولوژیکی دو اکوتیپ زعفران، در سال‌های زراعی ۱۳۹۷-۱۳۹۶ و ۱۳۹۸-۱۳۹۷ به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان (عرض جغرافیایی ۳۵ درجه و ۲۵ دقیقه تا ۳۷ درجه و ۱۵ دقیقه شمالی و در طول ۴۷ درجه و ۱ دقیقه تا ۴۹ درجه و ۵۲ دقیقه شرقی با ارتفاع ۱۶۶۳ متر از سطح دریا) به اجرا درآمد.

تیمارهای آزمایشی شامل ۱- دو اکوتیپ زعفران (نطنز، زنجان)، ۲- باکتری *Bacillus subtilis* در ۴ غلظت (10^{6}، 10^{8}، 10^{5}، 10^{2} cfu/ml) (Colony-forming unit/*milliliter*) و شاهد (بدون مصرف باکتری) در نظر گرفته شدند. هر کرت آزمایشی دارای ابعادی معادل ۳× ۱/۵ m بود. فواصل بین ردیف‌های کاشت ۲۵ سانتی‌متر، فواصل بین بوته‌ها روی ردیف ۹ سانتی‌متر و عمق کاشت بنه‌ها ۲۰ سانتی‌متر بود. قبل از کاشت زعفران، از عمق ۳۰ سانتی‌متری خاک مزرعه جهت انجام تجزیه‌های فیزیکی و شیمیایی نمونه‌برداری شد (جدول ۱) جهت رشد و نمو مناسب گیاه و تولید مرغوب و مطلوب، مزرعه در پاییز سال قبل از کاشت، شخم عمیق زده شد و در اواسط بهار نیز مزرعه دوبار در جهات عمود بر هم شخم زده شد.

از آنجایی که انتخاب کورم مرغوب جهت کاشت در ایجاد عملکرد بالا حائز اهمیت است لذا کورم مناسب و یکنواخت (با وزن متوسط ۸-۱۰گرم برای هر کورم، سالم و بدون زخم و خراشیدگی و عاری از هر نوع بیماری) برای کاشت از پشتیبان‌های زعفران جهاد کشاورزی منطقه تهیه شد و توسط قارچ‌کش مانکوزپ و کنه‌کش فن پروکسی‌میت کاملاً ضدعفونی گردید و در شهریور ماه سال ۱۳۹۶ کشت گردید. در سال‌های زراعی ۹۷-۱۳۹۶ و ۹۸-۱۳۹۷ با شروع فصل رشد جدید، برای سله شکنی از کج‌بیل و چهار شاخ فلزی با عمق کم استفاده شد تا جوانه‌های گل با سهولت بیشتری از خاک بیرون آمده و رشد مطلوبی داشته باشند. در مهر ماه با توجه به تغییرات آب و هوایی (جدول ۲) آبیاری اول با نام بسار آب (به صورت سیستم آبیاری قطره‌ای) به همراه تزریق غلظت‌های مختلف باکتری که از دانشکده داروسازی دانشگاه تهران تهیه شد در کنار هر بنه صورت گرفت.

جدول ۱. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مزرعه تحقیقاتی تا عمق ۳۰ سانتی متر.

Table 1. Physical and chemical properties of research farm soil to a depth of 30 cm.

Soil texture	Percentage of components			TNV (%)	Available K (ppm)	Available P (ppm)	Available N (%)	OC (%)	Soil pH	EC (ds m^{-1})
	Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)							
Clay loam	32.9	49.5	17.46	14.34	326	14.37	0.09	1.42	8.15	5.96

جدول ۲. میانگین دما و میزان بارندگی در فصول مختلف شهر زنجان (۱۳۹۸-۱۳۹۶).

Table 2. Mean of temperature and rainfall in different seasons of Zanjan (2017-2019).

Year	Season	Mean temperature (°C)	Max temperature (°C)	Min temperature (°C)	Rainfall (mm)	Abs. max temperature (°C)	Abs. min temperature (°C)
2017-2018	Autumn	10.2	17.7	2.6	10.7	25.5	-4.2
	Winter	4.9	11.3	-1.4	38.2	18.7	-9.7
	Spring	14.7	22.1	7.2	37.5	28.0	1.0
	Summer	24.3	34.4	14.2	0.5	38.3	9.7
2018-2019	Autumn	10.5	16.5	4.4	30.8	24.0	0.2
	Winter	2.4	8.4	-3.7	37.2	14.8	-10.3
	Spring	13.4	20.8	6.1	51.4	27.2	-1.5
	Summer	23.1	33.1	13.2	0.0	38.0	8.2

حدود ۱۵ تا ۲۰ روز پس از آبیاری اول، اولین گل‌های زعفران ظاهر شدند. اولین وجین مزرعه زعفران بعد از برداشت گل‌ها (پس از آبیاری دوم) و دومین وجین در موارد لزوم به فاصله حدود یک ماه قبل از آبیاری سوم (اواخر اسفند ماه) انجام شد. همزمان با شروع گلدهی، گل‌ها به صورت روزانه در ساعات اول روز جمع‌آوری شدند.

صفات مورفوفیزیولوژیکی شامل تعداد برگ در هر بنه، متوسط طول برگ، طول گل، طول گلبرگ و کاسبرگ، وزن تر و وزن خشک کلاله سه شاخه، عملکرد تر و خشک گل، تعداد گل در هر کرت، میزان فنل و آنتوسیانین گلبرگ و میزان عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم اندازه‌گیری شد.

پس از شمارش گل‌ها کلاله‌ها از گل‌ها جدا و به وسیله ترازوی میلی‌گرمی به صورت جداگانه توزین شد سپس در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد و به دور از نور مستقیم خورشید در محیط سایه به طور کامل خشک شدند و وزن آن‌ها نیز ثبت گردید. تعداد برگ در هر بنه به طور جداگانه شمارش شد. میانگین طول برگ و طول گل به وسیله خط کش و طول گلبرگ و طول کاسبرگ به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد. عملکرد تر گل، عملکرد خشک گل برای هر دو سال متوالی محاسبه شد. میزان فنل و آنتوسیانین گلبرگ و میزان عناصر نیتروژن، پتاسیم و فسفر نیز در هر دو سال متمادی اندازه‌گیری گردید.

تعیین محتوای فنل گلبرگ

جهت تهیه عصاره‌ها ابتدا ۱۰۰ گرم پودر گیاه تهیه و سپس از روش خیساندن در حلال متانول استفاده شد و عصاره‌های حاصل با استفاده از دستگاه تقطیر در خلا تغلیظ شد. اندازه‌گیری فنل کل براساس روش فولین سیوکالتیو انجام شد. طبق این روش ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ۵۰۰ میکرولیتر از معرف فولین اضافه و پس از گذشت ۱ دقیقه، ۱/۵ میلی‌لیتر از سدیم بیکربنات ۲۰٪ به هر لوله اضافه گشته و سپس ورتکس نموده و به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید. جذب نمونه در ۷۶۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. منحنی استاندارد توسط محلول‌های ۵۰ تا ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر از گالیک اسید در متانول تهیه شد. محتوای فنل کل به صورت معادل اکی والان گالیک اسید بیان شد (میلی‌گرم گالیک اسید/ گرم وزن عصاره) که یک ترکیب مرجع جهت تعیین محتوای فنل می‌باشد (Nile & Park, 2013).

اندازه‌گیری آنتوسیانین گلبرگ

اندازه‌گیری آنتوسیانین به روش متانول اسیدی انجام شد. در این روش به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر داده‌ها قرائت و در رابطه (۱) جایگزین شد (Wagner, 1979).

$$A= \varepsilon bc \qquad (۱)$$

ε: ضریب خاموشی معادل ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول
b: عرض کوت برابر ۱ سانتی‌متر
c: مقدار آنتوسیانین بر حسب مول بر گرم
A: مقدار جذب

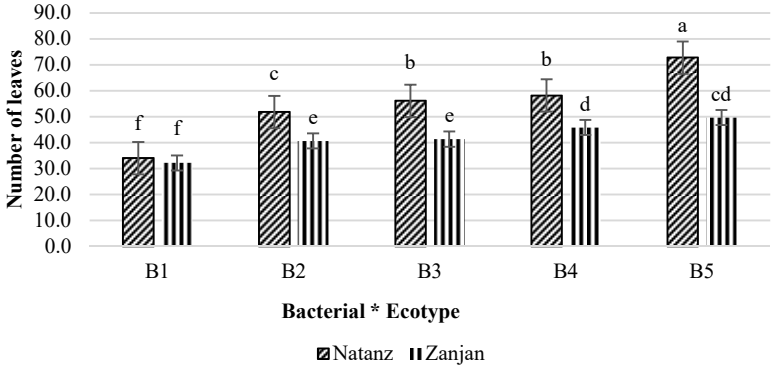
برای اندازه‌گیری میزان درصد نیتروژن با استفاده از روش تیتراسیون بعد از تقطیر و به کمک دستگاه کجلدال (Page *et al*., 1982)، مقدار فسفر با استفاده از روش رنگ‌سنجی و با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل U-1800 HITACHI در طول موج ۸۸۰-۸۷۰ نانومتر (Hodgson, 2004) و میزان پتاسیم با استفاده از روش نشر شعله‌ای و به کمک دستگاه فلیم فتومتر اندازه‌گیری شدند (Emami, 1997). داده‌های این مطالعه توسط نرم‌افزار آماری SAS به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی تجزیه و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

تاثیر باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر ویژگی‌های مورفولوژیکی

تعداد برگ در هر بنه

براساس نتایج تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری بین دو سال کشت، اکوتیپ‌های زعفران، غلظت‌های مختلف تیمار باکتری و همین‌طور اثر متقابل اکوتیپ زعفران و غلظت‌های متفاوت باکتری در سطح احتمال ۱ درصد مشاهده شد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین (جدول ۴) نشان داد که تیمار غلظت‌های مختلف باکتری باسیلوس سوبتیلیس موجب افزایش تعداد برگ در هر بنه در تمام سطوح نسبت به شاهد شده است. بالاترین تعداد برگ در بنه در غلظت 10^8cfu/ml (۶۱/۲۵) و کمترین میزان در شاهد (۳۳/۰۸) مشاهده شد. طبق نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف باکتری و اکوتیپ‌های زعفران بیشترین میزان تعداد برگ در غلظت 10^8cfu/ml و در اکوتیپ نطنز (۷۲/۸) و کمترین در تیمار شاهد و در اکوتیپ زنجان (۳۲/۲) مشاهده شد (شکل ۱). همین‌طور نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ در غلظت‌های مختلف باکتری نشان داد که تعداد برگ در اکوتیپ نطنز در تمام غلظت‌های مختلف باکتری بیشتر از اکوتیپ زنجان می‌باشد (شکل۱). طبق بررسی‌های انجام شده مشاهده شد که باکتری‌ها معمولاً در اطراف ریشه مستقر شده و از طریق کاهش pH، گیاه را در جذب عناصر همیاری می‌کنند و با تولید بیشتر مواد فتوسنتزی در افزایش تولید موثر واقع شده‌اند (Glick, 1995; Han & Lee, 2005). علاوه بر تاثیر غیرمستقیم باکتری‌ها بر جذب مواد غذایی، انواعی از میکروارگانیسم‌ها قادر هستند سیتوکینین را از پیش ماده آدنین تولید نمایند (Nieto & Frankenberger, 1989). Omidi *et al*. (2009) و Naghdibadi *et al*. (2015) در نتایج تحقیقات خود بیان کردند که تعداد برگ زعفران با کاربرد کود زیستی فسفره (بیو فسفر) افزایش یافت.



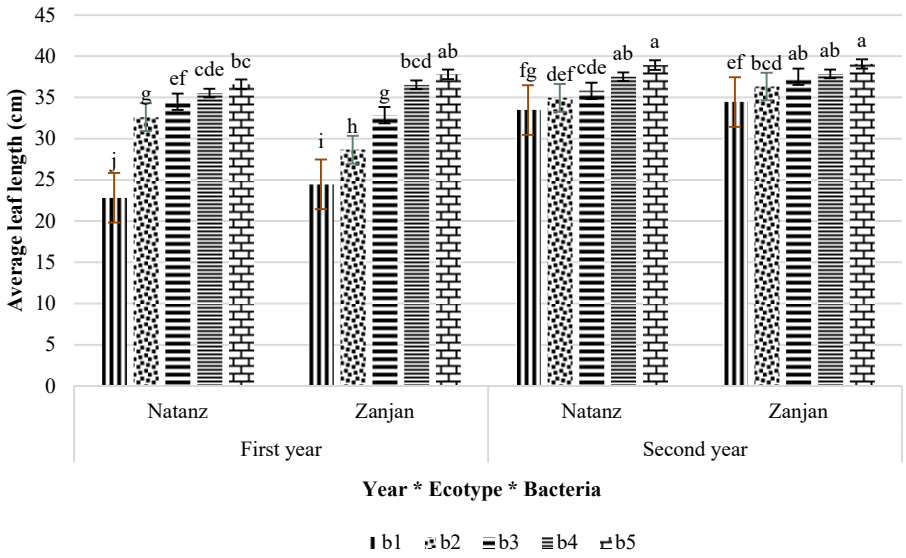
شکل ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل غلظت‌های مختلف باکتری و اکوتیپ بر تعداد برگ زعفران (غلظت‌های مختلف باکتری، B1=0, B2= 10^2, B3= 10^5, B4= 10^6, B5= 10^8)

Figure 1. Mean Comparison interaction effect of different bacterial concentrations and ecotype on the number of leaves saffron (Different concentrations of bacteria B1=0, B2= 10^2, B3= 10^5, B4= 10^6, B5= 10^8)

میانگین طول برگ

طبق نتایج تجزیه واریانس تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری باسیلوس بر میانگین طول برگ اختلاف معنی‌داری را در سطح احتمال ۱درصد نشان داد (جدول ۳) همچنین اثرات متقابل سال× باکتری، سال× باکتری × اکوتیپ‌های زعفران تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۱درصد و اثر متقابل سال کشت × اکوتیپ‌ها و همین‌طور غلظت‌های مختلف باکتری × اکوتیپ‌ها تاثیر معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بر میانگین طول برگ داشتند (جدول ۳). مقایسه میانگین این صفت نشان داد که با افزایش غلظت باکتری باسیلوس میانگین طول برگ افزوده شد به طوری که در غلظت 10^8 cfu/ml بیشترین میزان (۳۸/۰۹ سانتی‌متر) و در شاهد کمترین (۲۸/۸۰ سانتی‌متر) را نشان داد (جدول ۴). همین طور میانگین طول برگ در سال اول ۳۲/۲۲ سانتی‌متر و در سال دوم ۳۶/۵۸ سانتی‌متر شد که طبق این نتایج افزایش رشد در سال دوم مشاهده شد (جدول ۴)، ولی به طور کلی طبق اثر متقابل سه گانه اکوتیپ، غلظت‌های مختلف باکتری و سال مشاهده می‌شود که در هر دو سال با افزایش غلظت باکتری میزان طول برگ افزایش یافت و در سال دوم میزان میانگین طول برگ بیشتر از سال اول شد ولی تفاوت معنی‌داری در بین دو اکوتیپ مشاهده نشد (شکل ۲).

با توجه به توانایی باکتری‌ها در تولید انواع اسیدهای آلی و معدنی و ترشح آنزیم فسفاتاز سبب می‌شود که گیاه بتواند از ذخایر فسفر موجود در خاک به راحتی استفاده کند که در نتیجه جذب این عنصر در رشد و تکثیر گیاه موثر واقع می‌گردد (Alipour Miandehi *et al.*, 2014). Eldin *et al.* (2008) طی تحقیقی با کاربرد باکتری *Bacillus subtilis* در زعفران اعلام کردند که استفاده از این باکتری طول برگ را افزایش داد. Naghdibadi *et al.* (2011) نیز طی آزمایشی اظهار نمودند که استفاده از کودهای زیستی باعث افزایش معنی‌دار طول برگ زعفران شد. احتمالاً باکتری‌ها علاوه بر تثبیت نیتروژن هوا و متعادل کردن جذب عناصر اصلی پر مصرف و ریز مغذی مورد نیاز گیاه، با سنتز و ترشح مواد محرک رشد گیاه نظیر انواع هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد مانند اکسین (IAA) و ترشح اسیدهای آمینه مختلف، موجب رشد و توسعه قسمت‌های هوایی زعفران شدند (Alipour Miandehi *et al.*, 2014).



شکل ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل سال، اکوتیپ و غلظت‌های مختلف باکتری بر روی میانگین طول برگ زعفران (غلظت‌های مختلف باکتری، B1=0, B2= 10^2, B3= 10^5, B4= 10^6, B5= 10^8)

Figure 2. Mean comparison interaction effect of year, different bacterial concentrations and ecotype on the saffron average leaf length (Different concentrations of bacteria B1=0, B2= 10^2, B3= 10^5, B4= 10^6, B5= 10^8)

طبق گزارش Parray *et al.* (2013)، *Bacillus subtilis* بیشترین میزان تولید ایندول استیک اسید را (۳۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نسبت به سایر باکتری‌های ریزوسفری منجر می‌گردد. همین طور طبق مطالعات انجام شده بر روی زیره سبز مشاهده شد که باکتری‌های محرک رشد *Pseudomona fluorescence*، *Bacillus subtilis* و *Azotobacter chroocccum* در شرایط تنش شوری طول گیاهچه را افزایش دادند (Piri *et al*., 2016). یکی دیگر از دلایل آن احتمالاً به دلیل تحریک تولید جیبرلین توسط باکتری‌ها در گیاه است که این هورمون بر تسریع ظهور و رشد و نمو برگ موثر بوده است (de Souza & Mac Adam, 2002).

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی زعفران.
Table 3. Results of variance analysis effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on some traits of morphophysiological of *Crocus sativus* L.

Source of variations	df	Mean of squares							
		Number of leave	Average leaf length	Flower length	Petal length	Sepal length	Stigma fresh weight	Stigma dry weight	Number of flower
Replication	2	42.51*	6.47^{ns}	0.68^{ns}	1.20^{ns}	0.03^{ns}	0.16^{ns}	0.06^{ns}	673.40^{ns}
Year	1	1233.06**	285.14**	639.35**	177.46**	507.50**	4192.70**	3.45^{ns}	1809259.35**
Year× Rep	2	1.51^{ns}	1.78^{ns}	3.39^{-}	0.91^{ns}	0.27^{ns}	1.88^{ns}	0.51^{-}	1080.80^{ns}
Ecotypes	1	2406.66**	1.15^{ns}	141.92**	0.03^{ns}	0.10^{ns}	7.94^{ns}	3.61**	87020.41**
Bacteria	4	1252/01**	159.57**	153.11**	58.94**	2.92^{-}	134.85**	1.60**	41072.35**
Year×Ecotypes	1	0.26^{ns}	5.89*	60.72**	0.13^{ns}	2.73^{ns}	97.84**	0.58*	64323.75**
Year×Bacteria	4	7.15^{ns}	38.81**	1.15^{ns}	8.13**	1.04^{ns}	7.95*	1.44**	34788.55**
Ecotypes × Bacteria	4	176.00**	2.89^{-}	1.81^{ns}	0.62^{ns}	2.26^{-}	12.41**	1.08**	1916.79^{ns}
Year×Bacteria×Ecotypes	4	2.76^{ns}	6.32**	14.35**	2.38^{ns}	2.80^{ns}	7.23*	0.51*	2060.45^{ns}
Error	36	11.16	0.93	0.92	1.91	0.87	2.43	0.14	2333.17
CV. (%)	-	6.92	2.80	1.55	3.82	2.98	4.17	5.79	22.25

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

ns, *, **: non-significantly difference and significantly difference at 5% and 1% of probability level, respectively.

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی زعفران.
Table 3. Results of variance analysis effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on some traits of morphophysiological of *Crocus sativus* L.

Source of variation	df	Mean of squares						
		Yield of fresh flower	Yield of dry flower	Petals phenol	Petals anthocyanin	N	P	K
Replication	2	0.35^{ns}	0.29^{ns}	9.94^{ns}	0.0008^{ns}	0.28^{ns}	4100.002^{ns}	996843.17*
Year	1	19102.00**	155.55**	3330.89**	3.79*	131.42**	726000.00**	29400322.00**
Year× Rep	2	0.14^{ns}	0.32^{ns}	7.69^{-}	0.20^{ns}	0.06^{ns}	6000.00^{ns}	49980.50^{ns}
Ecotypes	1	3030.99**	17.09**	3857.45**	9.60**	0.20^{ns}	253014.03**	8953700.03**
Bacteria	4	128.15**	0.39^{ns}	182.26**	7.41**	9.69**	954096.75**	19560675.53**
Year×Ecotypes	1	2893.56**	13.75**	2937.62**	1.76**	0.77**	80666.66**	66651.33^{ns}
Year×Bacteria	4	77.16**	0.19^{ns}	20.72**	0.14^{ns}	1.07**	8916.66^{ns}	1983300.75**
Ecotypes × Bacteria	4	10.43**	0.52^{-}	2.48^{ns}	0.39**	0.08^{ns}	89729.84**	605767.34^{ns}
Year×Bacteria×Ecotypes	4	11.60**	0.33^{ns}	7.48*	0.13^{ns}	0.16^{ns}	31083.33**	316680.08^{ns}
Error	36	2.42	0.16	2.51	0.08	0.10	7481.09	321386.7
CV. (%)	-	7.30	19.52	5.09	7.34	7.27	5.18	9.38

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

ns, *, **: non-significantly difference and significantly difference at 5% and 1% of probability level, respectively.

جدول ۴. مقایسه میانگین اثر سال، اکوتیپ و غلظت‌های مختلف باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی زعفران.
Table 4. Mean comparison effect of year, ecotype and different concentrations of *Bacillus subtilis* on some traits of morphophysiological of *Crocus sativus* L.

Treatment	Leaf number	Average leaf length (cm)	Flower length (cm)	Petal length (mm)	Sepal length (mm)	Stigma fresh weight (mg)	Stigma dry weight (mg)
Year							
First year	43.73^{b}	32.22^{b}	58.81^{b}	34.46^{b}	28.43^{b}	29.03^{b}	6.36^{a}
Second year	52.80^{a}	36.58^{a}	65.34^{a}	37.90^{a}	34.25^{a}	45.75^{a}	6.84^{a}
Ecotypes							
Natanz	54.60^{a}	34.27^{a}	60.54^{b}	36.16^{a}	31.30^{a}	37.75^{a}	6.85^{a}
Zanjan	41.93^{b}	34.54^{a}	63.61^{a}	36.20^{a}	31.38^{a}	37.02^{a}	6.36^{b}
Bacteria							
0 cfu/ml	33.08^{d}	28.80^{c}	56.65^{c}	33.16^{d}	30.70^{b}	32.91^{c}	6.14^{c}
10^{7} cfu/ml	46.25^{c}	33.13^{a}	61.01^{a}	35.37^{c}	31.11^{ab}	35.30^{a}	6.48^{b}
10^{8} cfu/ml	48.75^{c}	35.15^{c}	62.54^{c}	35.96^{c}	31.22^{ab}	37.93^{c}	6.51^{b}
10^{9} cfu/ml	52.00^{b}	36.85^{b}	64.07^{b}	37.30^{b}	31.82^{a}	39.36^{b}	6.76^{b}
10^{8} cfu/ml	61.25^{a}	38.09^{a}	66.12^{a}	39.11^{a}	31.86^{a}	41.44^{a}	7.13^{a}

در هر ستون میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

* In each column, means with similar letters are not significantly different at 5% probability level.

ادامه جدول ۴. مقایسه میانگین اثر سال، اکوتیپ و غلظت‌های مختلف باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی زعفران.

Continued table 4. Mean comparison effect of year, ecotype and different concentrations of *Bacillus subtilis* on some traits of morphophysiological of *Crocus sativus* L.

Treatment	Yield of fresh flower (g/m^2)	Yield of dry flower (g/m^2)	Number of flower	Petals phenol (mg/g FW)	Petals anthocyanin (mol/gFw)	N (%)	P (ppm)	K (ppm)
Year								
First year	3.50[b]	0.46[b]	43.40[b]	38.58[a]	3.79[a]	2.87[b]	1557.97[b]	5339.83[b]
Second year	39.19[a]	3.68[a]	390.70[a]	23.68[b]	4.29[a]	5/83[a]	1777.97[a]	6739.83[a]
Ecotypes								
Natanz	28.45[a]	2.60[a]	255.13[a]	23.11[b]	3.64[b]	4.29[a]	1603.04[b]	6426.1[a]
Zanjan	14.23[b]	1.53[b]	178.97[b]	39.15[a]	4.44[a]	4.41[a]	1732.91[a]	5653.5[b]
Bacteria								
0 cfu/ml	17.13[d]	1.79[b]	148.42[c]	25.09[e]	2.95[e]	3.25[c]	1314.42[e]	4391.8[e]
10^2 cfu/ml	20.08[c]	2.02[ab]	179.42[c]	30.09[d]	3.75[d]	3.76[d]	1533.47[d]	5225.8[d]
10^5 cfu/ml	21.17[bc]	2.12[ab]	225.33[b]	31.76[c]	4.01[c]	4.36[c]	1627.15[c]	6058.4[c]
10^6 cfu/ml	22.24[b]	2.14[a]	229.33[b]	33.30[b]	4.45[b]	4.86[c]	1803.18[b]	6982.4[b]
10^8 cfu/ml	26.09[a]	2.27[a]	302.75[a]	35.39[a]	5.05[a]	5.55[a]	2061.66[a]	7510.8[a]

در هر ستون میانگین‌های با حداقل یک حرف مشترک، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد ندارند.

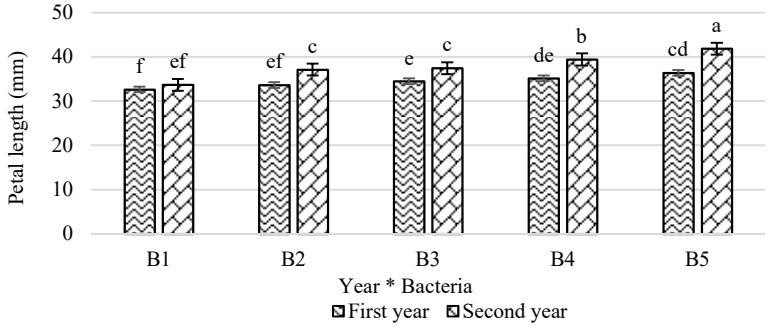
* In each column, means with similar letters are not significantly difference at 5% probability level.

طول گل، طول گلبرگ و طول کاسبرگ

تاثیر تیمار باکتری بر طول گل و طول گلبرگ در سطح یک درصد و بر روی طول کاسبرگ در سطح ۵ درصد معنی‌دار گردید (جدول ۳). همین‌طور در سال دوم افزایش طول گل و کاسبرگ و گلبرگ مشاهده شد، به عبارتی تفاوت معنی‌دار یک درصد در دو سال کشت حاصل گردید (جدول ۳). اثرات متقابل سال × اکوتیپ و سال× اکوتیپ× باکتری بر روی صفت طول گل در سطح یک درصد ($p<۰/۰۱$) و اثر متقابل سال× باکتری روی صفت طول گلبرگ ($p<۰/۰۱$) و اثر اکوتیپ× باکتری بر روی طول کاسبرگ ($p<۰/۰۵$) معنی‌دار شدند (جدول ۳). به طوری که بیشترین طول گل و طول گلبرگ و طول کاسبرگ در غلظت $۱۰^۸$ cfu/ml (به ترتیب ۶۶/۱۲ سانتی‌متر، ۳۹/۱۱ و ۳۱/۸۶ میلی‌متر) و کمترین در تیمار شاهد (به‌ترتیب ۵۶/۶۵ سانتی‌متر، ۳۳/۱۶ و ۳۰/۷۰ میلی‌متر) مشاهده شد (جدول ۴). بر اساس اثر متقابل سال کشت و غلظت‌های مختلف باکتری نیز بیشترین طول گلبرگ در غلظت $۱۰^۸$ cfu/ml و در سال دوم (۴۱/۸۵۱۷ میلی‌متر) و کمترین در شاهد و در سال اول (۳۲/۶۵ میلی‌متر) مشاهده شد (شکل ۳). اختلاف در اندازه‌ی طول گل در زعفران زنجان بیشتر از زعفران نطنز قابل رویت بود. به طوری که میانگین طول گل در زعفران زنجان ۶۳/۶۱ سانتی‌متر و در زعفران نطنز ۶۰/۵۴ سانتی‌متر مشاهده شد. طول گلبرگ و طول کاسبرگ نیز در زعفران زنجان بیشتر از زعفران نطنز مشاهده شد (جدول ۴). طبق بررسی‌های صورت گرفته مشاهده شد که جیبرلین‌ها در رشد طولی سلول‌ها و همین‌طور اکسین و سیتوکنین در تقسیم سلولی نقش دارند، لذا به نظر می‌رسد که باکتری‌ها مورد استفاده، با تولید هورمون‌های مزبور (Gutierrez-Manero *et al*., 2001) سبب افزایش طول گل و گلبرگ شده‌اند به عبارتی می‌توان اثر باکتری بر افزایش رشد را به تولید اکسین و جیبرلین تعمیم داد. نتایج Naveed *et al*. (2008) نیز حاکی از اثر افزاینده این میکروارگانیسم‌ها بر ارتفاع گیاه ذرت می‌باشد. هم‌چنین، مشخص شد که *Pseudomona fluorescence* سبب افزایش ارتفاع گیاهانی چون گوجه‌فرنگی و برنج شده است (Minorsky, 2008). اکثر باکتری‌های جنس *Bacillus* جزء باکتری‌های تحریک‌کننده رشد گیاه می‌باشند که از طریق ترشح مواد محرک رشد در محیط ریشه باعث افزایش جذب و حلالیت پتاسیم و به دنبال آن باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند (Shi *et al*., 2004).

وزن تر و وزن خشک کلاله سه شاخه

در طی دو سال بهره‌برداری از مزرعه، وزن تر و وزن خشک کلاله تولید شده تحت تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری قرار گرفتند ($p<۰/۰۱$) و تفاوت معنی‌داری را نشان داد (جدول ۳).



شکل ۳. مقایسه میانگین اثر متقابل سال و غلظت‌های مختلف باکتری بر طول گلبرگ زعفران (غلظت‌های مختلف باکتری، B1=0, B2= 10^2, B3= 10^5, B4= 10^6, B5= 10^8)

Figure 3. Mean Comparison interaction effect of year and different bacterial concentrations on the petal length saffron (Different concentrations of bacteria B1=0, B2= 10^2, B3= 10^5, B4= 10^6, B5= 10^8)

اثرات متقابل دوگانه اکوتیپ‌های زعفران× غلظت‌های مختلف باکتری و سال کشت× غلظت‌های مختلف باکتری و اثر سه‌گانه این عامل‌ها تاثیر معنی‌داری را روی صفت وزن تازه کلاله نشان داد. بر روی وزن خشک کلاله نیز اثر متقابل اکوتیپ‌ها و سال، سال کشت و غلظت‌های مختلف باکتری و همچنین اکوتیپ‌های زعفران و غلظت‌های مختلف باکتری تاثیرگذار بودند (جدول ۳).

همان‌گونه که در جدول ۴ نشان داده شده است، بیشترین مقدار وزن تر و خشک کلاله در غلظت 10^8 cfu/ml (به ترتیب ۴۱/۴۴ میلی‌گرم و ۷/۱۳ میلی‌گرم) و کمترین در شاهد (به ترتیب ۳۲/۹۱ میلی‌گرم و ۶/۱۴ میلی‌گرم) به دست آمد. همین‌طور بیشترین وزن خشک کلاله (۶/۸۵ میلی‌گرم) مربوط به زعفران نطنز می‌باشد (جدول ۴). فعالیت میکروارگانیسم‌ها سبب تولید هورمون‌ها به ویژه جیبرلین می‌شوند که در افزایش رشد کلاله و خامه نمود پیدا کرده است (Rademacher, 1994). در برخی مطالعات مشاهده شده است که میکروارگانیسم‌های تولیدکننده این هورمون، قادر به تحریک رشد گیاه میزبان خود از طریق سنتز GA_S فعال آزاد شده، هستند. Gutierrez-Manero *et al.* (2001) انواعی از GA را شناسایی نمودند که توسط Bacillus sp. تولید شده‌اند و تاثیر مثبتی بر بیشتر شدن رشد اندام‌های هوایی *Alnus glutinosa* داشته‌اند. افزایش وزن خشک بیشتر گیاه نیز مربوط به تولید و ترشح همین ترکیبات تحریک کننده رشد و برخی هورمون می‌باشد که توسط ریز موجودات در خاک تولید و رشد گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Koocheki *et al.*, 2011). Hamidi *et al.* (2007) نیز اثر مثبت باکتری‌های محرک رشد بر عملکرد ساقه ذرت را ارائه کرده‌اند. به طور کلی تحریک رشد گیاهان توسط باکتری‌های ریزوسفری از طریق تثبیت اتمسفر، افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی در ناحیه ریزوسفر، افزایش سطح تماس ریشه و بهبود هم‌زیستی مفید با گیاه میزبان در مراحل مختلف رشد انجام می‌گیرد (Glick, 1995). Eldin *et al.* (2008) در نتایج تحقیقات خود اظهار داشتند که تلقیح بنه زعفران با باکتری *Bacillus subtilis* باعث افزایش وزن کلاله شد. Fiori *et al.* (2007) و Sharaf-Eldin *et al.* (2008) تاثیر مثبت تیمار باکتری‌های *Bacillus subtilis* را بر کلیه صفات رویشی و زایشی زعفران گزارش نموده‌اند.

عملکرد تر و عملکرد خشک گل

نتایج تجزیه واریانس صفات اندازه‌گیری شده در طی دو سال آزمایش (جدول ۳) نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف باکتری در هر دو سال، عملکرد تر گل را در هر متر مربع تحت تاثیر قرار داد ($p<۰/۰۱$). اثر متقابل سال کشت× اکوتیپ‌های زعفران، سال کشت× غلظت‌های مختلف باکتری، اکوتیپ‌های زعفران× غلظت‌های مختلف باکتری و اثر متقابل سه گانه این عوامل تاثیر معنی‌داری ($p<۰/۰۱$) بر روی صفت عملکرد تر گل دارد. همچنین اثر متقابل سال کشت و اکوتیپ‌ها به همراه غلظت‌های مختلف باکتری و اکوتیپ‌های زعفران روی صفت عملکرد

خشک گل تاثیر معنی‌داری را نشان داد (جدول ۳) بیشترین عملکر تر گل در غلظت 10^8 cfu/ml (۲۲/۰۹ گرم در متر مربع) و کمترین آن در شاهد (۱۷/۱۳ گرم در متر مربع) به دست آمد (جدول ۴). طبق جدول مقایسه میانگین نیز مشاهده شد که زعفران نطنز دارای عملکرد تر و خشک بالاتری نسبت به زعفران زنجان می‌باشد (به ترتیب ۲۸/۴۵ و ۲/۶۰ گرم در متر مربع) (جدول ۴). علاوه بر تاثیر غیر مستقیم باکتری‌ها بر جذب عناصر غذایی، انواعی از میکروارگانیسم‌ها قادرند سیتوکنین را از پیش ماده آدنین تولید نمایند (Nieto & Frankenberger, 1989a) و تولید سیتوکنین از آدنین و الکل ایزوپنتیل (IA) در حضور *Azotobacter* و *Pseudomonas* در محیط کشت به اثبات رسیده است (Nieto & Frankenberger, 1989b). هم چنین محققین گزارش کردند که ازتو باکتر، آزوسپیریلوم و سویه‌های ریزوبیوم قادر به سنتز ویتامین‌های گروه B محلول در آب شامل نیاسین، اسید پنتوتنیک، تیامین (B_1)، ریبوفلاوین (B_2)، سیانوکوبالامین (B_{12})، پیریدوکسین (B_6) و بیوتین در محیط کشت می‌شوند. از طرفی اتصال سیدروفور تولید شده توسط باکتری‌ها به یون آهن و تشکیل کلات آهن، این عنصر غذایی را از دسترس انواع عوامل بیماری‌زای گیاهی خارج کرده و به این ترتیب رشد گیاه را مورد حمایت قرار می‌دهند (Kloepper *et al*., 1988). برای نمونه، *P. fluorescens* می‌تواند با تولید چنین ترکیباتی به عنوان عامل کنترل‌کننده *Pythium uttimum* عمل کند (Kumar *et al*., 2002). بنابراین باکتری‌ها می‌توانند با سایر میکروارگانیسم‌های ریزوسفر اثر هم افزایی (سینرژیست) مفیدی بر گیاهان داشته باشند (Omidi *et al*., 2010). همین‌طور به دلیل تاثیر بر افزایش جذب عناصر غذایی به ویژه فسفر، می‌توانند منجر به افزایش وزن خشک گردند (Ehteshami *et al*., 2014).

Rai *et al.* (2004) در تحقیق خود بر روی گونه‌ای کهور مشاهده کردند که کاربرد باکتری‌ها سبب افزایش میزان زیست توده گیاهی در مقایسه با شاهد شد. تحریک رشد گیاه توسط باکتری‌های جنس *Flavobacterium*، *Azotobacter*، *Enterobacter*، *Bacillus*، *Arthrobace*، *Clostridium*، *Pseudomonas* که منجر به افزایش قابل توجه رشد و عملکرد گیاهان شده، گزارش شده است (Bowen & Rovira, 1999). نتایج پژوهش‌های Sheng (2005) نشان داد که تلقیح باکتری *Bacillus edaphicus* به گیاهان پنبه و کلزا در شرایط گلخانه‌ای وزن خشک اندام هوایی این گیاهان را به ترتیب ۲۴ و ۲۱ درصد نسبت به گیاهان شاهد فاقد تلقیح باکتری افزایش داد.

تعداد گل در هر کرت

نتایج تجزیه واریانس طی دو سال آزمایش نشان می‌دهد (جدول ۳) که با افزایش غلظت باکتری، تعداد گل افزایش یافته به طوری که بیشترین تعداد گل در کل مدت بهره‌برداری از مزرعه در غلظت 10^8 cfu/ml به دست آمد. اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد بین دو سال کشت و اکوتیپ های زعفران و اثر متقابل بین اکوتیپ و سال و همین طور بین غلظت‌های مختلف باکتری و سال مشاهده شد (جدول ۳). به طوری که بیشترین تعداد گل در زعفران نطنز (۲۵۵/۱۳) به دست آمد. تعداد گل در سال اول و دوم از یک روند مشابهی تبعیت می‌کرد و بدین ترتیب با افزایش غلظت، افزایش تعداد گل در هر دو سال رخ داد (جدول ۴). تحقیقات بسیاری در مورد تاثیر این باکتری‌ها برروی رشد گیاهان صورت گرفته است (Khosravi, 2003). طی آزمایشی با اجرای تلفیقی کودهای زیستی باکتریایی (*Azotobacter*، *Azospirillum* و *Pseudomonas*) به همراه کودهای شیمیایی منجر به افزایش رشد رویشی و بهبود رشد زایشی شده که به نوبه خود موجب افزایش رشد و نمو و عملکرد گردید (Hamidi *et al*., 2008). باکتری‌ها علاوه بر تثبیت نیتروژن هوا و متعادل کردن جذب عناصر اصلی پرمصرف و ریز مغذی مورد نیاز گیاه، با سنتز و ترشح مواد محرک رشد نظیر انواع هورمون‌های تنظیم‌کننده رشد همچنین ترشح اسیدهای آمینه مختلف و انواع آنتی بیوتیک و ... موجب رشد و توسعه قسمت‌های هوایی زعفران شده‌اند (Esitken *et al*., 2010; Norouzi & Khademi, 2010).

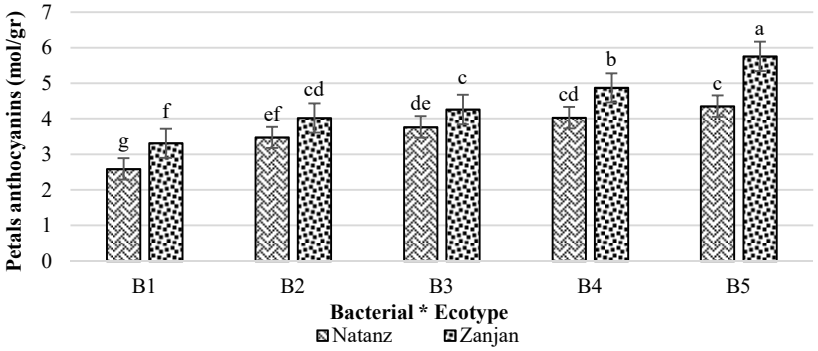
تاثیر باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر ویژگی‌های فیزیولوژیکی

محتوای فنل گلبرگ

براساس نتایج موجود در جدول ۳، فنل گلبرگ در طی هر دو سال آزمایش تحت تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری قرار گرفت (P<۰/۰۱). اثرات متقابل سال کشت× اکوتیپ‌ها و سال کشت× غلظت‌های مختلف به همراه اثرات متقابل سه گانه تاثیر معنی‌داری را در سطح اختمال ۱ و ۵ درصد بر روی صفت فنل گلبرگ نشان دادند (جدول ۳). براساس نتایج به دست آمده، زعفران زنجان نسبت به زعفران نطنز بیشترین میزان فنل در گلبرگ‌ها (۳۹/۱۵ mg/g Fwt) را تولید نموده است و با افزایش میزان غلظت باکتری روندی افزایشی در میزان فنل گلبرگ‌ها ملاحظه شد به طوری که در غلظت 10^8 cfu/ml میزان فنل ۳۵/۳۹ mg/g Fwt و در شاهد میزان فنل ۲۵/۰۹ mg/g Fwt شد (جدول۴). طبق گزارش محققان، باکتری‌ها و همچنین هورمون‌های رشد به ترتیب به عنوان محرک‌های زیستی و شیمیایی در تولید متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی شناخته شده‌اند (Ping & Boland, 2004). از آنجایی که ترکیبات فنلی (فنل کل و فلاونوئید) از طریق مسیر فنل پروپانوئید ساخته می‌شود و آنزیم فنیل آمونیالیاز، آنزیم کلیدی این مسیر متابولیکی است می‌توان تجمع این مواد را مربوط به القای این آنزیم توسط باکتری‌های محرک رشد دانست (Maxwell *et al*., 1989; Petter & Verma, 1990; Salehi *et al*., 2017).

آنتوسیانین گلبرگ

نتایج تجزیه گویای آن بود که اثرگذاری غلظت‌های مختلف باکتری بر میزان آنتوسیانین گلبرگ در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). اختلاف در میزان آنتوسیانین گلبرگ در دو سال کشت دارای تفاوت معنی‌دار در سطح ۵ درصد شدند (P<۰/۰۵) (جدول ۳). این صفت طی دو سال کشت تحت تاثیر اثر متقابل اکوتیپ‌های زعفران و غلظت‌های مختلف باکتری و همچنین سال کشت و اکوتیپ‌های زعفران قرار گرفت (P<۰/۰۱) (جدول ۳). طی افزایش غلظت باکتری، آنتوسیانین گلبرگ افزایش یافته و بیشترین میزان آن در غلظت 10^8 cfu/ml (۵/۰۵ mol/gr) و کمترین در تیمار شاهد (۲/۹۵ mol/gr) مشاهده شد. طبق نتایج مقایسه میانگین (شکل ۴) مشاهده شد که تحت تاثیر مثقابل غلظت‌های مختلف باکتری و اکوتیپ‌های زعفران، بیشترین میزان آنتوسیانین در زعفران زنجان و در غلظت 10^8 cfu/ml (۵/۷۵۶۷ mol/gr) و کمترین آن در زعفران نطنز و در شاهد (۲/۵۹ mol/gr) به‌دست آمد. نتایج این مشاهده با یافته‌های Hassan (2009) و Abbas & Ali (2011) که بر روی چای ترش کار کردند سازگار است. ساخته شدن آنتوسیانین و تجمع آن در بافت‌های گیاهی تحت تاثیر عامل‌های مختلفی از جمله میزان هیدرات‌های کربن (گلوکز، آرابینوز و گالاکتور) موجود در بافت‌ها قرار می‌گیرد (Taiz & Zeiger,2006). به عبارت دیگر توسعه رنگدانه‌های یاخته و ساخت آنتوسیانین با بالا رفتن میزان کربوهیدرات‌ها نسبت مستقیم داشته و هر عاملی که بتواند روی افزایش، جذب یا ساخته شدن قندها موثر باشد، باعث افزایش میزان آنتوسیانین کل در گیاه می‌شود که باکتری‌ها یکی از عوامل موثر در افزایش تولید و جذب کربوهیدرات‌ها می‌باشند (Vitrac *et al*., 2000). از آنجایی که واحدهای سازنده‌ی فلاونوئیدها نیاز مبرم به ATP و NADPH دارند و با توجه به این موضوع که حضور عناصری مانند نیتروژن و فسفر برای تشکیل ترکیب‌های یاد شده ضروری خواهد بود، بنابراین باکتری‌های حل-کننده فسفات و تثبیت‌کننده نیتروژن با جذب کارآمد نیتروژن و فسفر توسط ریشه زعفران، موجب افزایش محتوای آنتوسیانین این گیاه شده‌اند. افزون بر این استفاده از باکتری‌ها سبب افزایش توانایی ساخت و ترشح مواد زیستی فعال مانند ویتامین‌های گروه B، اسید نیکوتنیک، اسید پنئوتنیک، بیوتین، اکسین‌ها و جیبرلین‌ها می‌شوند که این مواد موجب افزایش محتوای ماده آلی و هیدرات‌های کربن گیاه و در نتیجه افزایش آنتوسیانین می‌شوند (Mohammadpour Vashvaei *et al*., 2015).

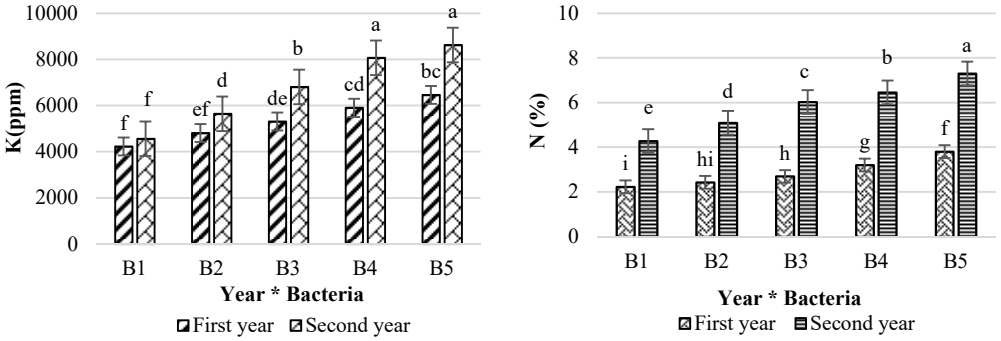


شکل ۴. مقایسه میانگین اثر متقابل اکوتیپ و غلظت‌های مختلف باکتری بر روی میزان آنتوسیانین گلبرگ زعفران (غلظت‌های مختلف باکتری، $B1=0, B2=10^2, B3=10^5, B4=10^6, B5=10^8$).

Figure 4. Mean Comparison interaction effect of ecotype and different bacterial concentrations on petal anthocyanin content saffron (Different concentrations of bacteria $B1=0, B2=10^2, B3=10^5, B4=10^6, B5=10^8$)

میزان نیتروژن، فسفر و پتاسیم برگ

با توجه به جدول تجزیه واریانس، میزان فسفر، نیتروژن و پتاسیم طی دو سال کشت اختلاف معنی‌داری دارند ($P<۰/۰۱$) (جدول ۳). اثر متقابل سال و اکوتیپ‌های زعفران در میزان نیتروژن و فسفر و همین‌طور اثر متقابل سال و غلظت مختلف باکتری در میزان نیتروژن و پتاسیم تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P<۰/۰۱$) (جدول ۳). بیشترین میزان NPK در غلظت $۱۰^۸$ cfu/ml (به‌ترتیب ۵/۵۵٪، ۲۰۶۱/۶۶ppm، ۷۵۴۰/۸ppm) و کمترین در شاهد (به ترتیب ۳/۲۵٪، ۱۳۱۴/۴۲ppm، ۴۳۹۱/۸ppm) مشاهده شد (جدول ۴). اثر متقابل سال کشت و غلظت-های مختلف باکتری نشان داد که میزان پتاسیم و نیتروژن در سال دوم بیشتر از سال اول شد و با افزایش غلظت باکتری میزان این دو عنصر افزایش یافت، به طوری که بیشترین میزان این دو عنصر در غلظت $۱۰^۸$ cfu/ml به‌ترتیب ۸۶۲۴/۱ppm پتاسیم و ۷/۳۰۳۳ درصد نیتروژن در سال دوم مشاهده شد (شکل ۵). Mehboob *et al.* (2009) گزارش کردند که *Bacillus* و *Pseudomonas* از مهم‌ترین باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌باشند. همین‌طور طبق بررسی‌های انجام‌شده توسط Rayi poor & Asgharzadeh (2008) مشخص شد که باکتری‌های حل‌کننده فسفات سبب افزایش وزن خشک، درصد فسفر و نیتروژن بخش هوایی گیاه شدند. در واقع این باکتری‌ها سبب آزاد کردن اسیدهای آلی در خاک شده که موجب کاهش اسیدیته خاک و کلاته کردن یون‌های کلسیم می‌شود و در نتیجه کمک به تثبیت فسفر در خاک و افزایش جذب این عناصر از خاک می‌گردد. نتایج آزمایش Armak *et al.* (2018) نشان داد که تلقیح *Pseudomonas* و *Azotobacter* موجب افزایش جذب نیتروژن و فسفات توسط نهال گردو و حداکثر دسترسی به فسفر و نیتروژن خاک گردید. طبق تحقیقاتی مشاهده شد که تلقیح تعداد زیادی از باکتری‌های مذکور از جمله جنس‌های *Pseudomonas* و *Acinetobacter* با ریشه گیاه زراعی موجب افزایش جذب آهن، روی، منیزیم، کلسیم، پتاسیم و فسفر می‌شود (Khan, 2005). در پژوهشی، با بررسی اثر تیمارهای زیستی بر روی شاخص‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاه ریحان در شرایط تنش شوری مشخص شد که باکتری‌های محرک رشد، باعث افزایش غلظت عناصر فسفر و پتاسیم در این گیاه شدند (Golpayegani & Gholami Tilebeni, 2011). افزایش جذب پتاسیم شاخساره در بسترهای تلقیح شده با سویه‌های باکتری جنس *Bacillus* را می‌توان به مواد تولید شده توسط این باکتری‌ها نسبت داد که باعث تحریک رشد بیش‌تر شاخساره و ریشه گیاهان می‌شوند و همین‌طور از طریق ترشح مواد محرک رشد در محیط ریشه باعث افزایش جذب و حلالیت پتاسیم برای گیاه می‌شود (Shi *et al*., 2004). این باکتری‌ها همچنین باعث بهبود جذب آب و عناصر غذایی توسط گیاه، جلوگیری از ریزش اندام هوایی، افزایش گره‌زایی و تثبیت زیستی فسفر، نیتروژن و پتاسیم می‌گردند (Nehvi *et al*., 2010).



شکل ۵. مقایسه میانگین اثر متقابل سال و غلظت‌های مختلف باکتری بر میزان نیتروژن و پتاسیم برگ زعفران (غلظت‌های مختلف باکتری، $B1=0, B2=10^2, B3=10^5, B4=10^6, B5=10^8$).

Figure 5. Mean Comparison interaction effect of year and different bacterial concentrations on N and K saffron (Different concentrations of bacteria $B1=0, B2=10^2, B3=10^5, B4=10^6, B5=10^8$)

نتیجه‌گیری کلی

یکی از نیازهای مهم در برنامه‌ریزی زراعی به منظور دستیابی به عملکرد بالا و کیفیت مطلوب زعفران، ارزیابی سیستم‌های تغذیه است که با مدیریت صحیح خاک می‌توان کارایی نهاده‌ها را افزایش داد که کودهای زیستی امروزه این نقش را ایفا می‌کنند. باکتری‌های محرک رشد قادر به بهبود رشد گیاهان از طریق تامین مواد مغذی گیاهی، ترشح هورمون‌های رشد گیاهی و اسیدهای آلی می‌باشند و سبب افزایش رشد گیاه، فعالیت زیستی، تغییرات متابولیت‌های ثانویه و حفظ سلامت محیط زیست می‌شوند. نتایج این تحقیق نشان داد که کلیه صفات مورد ارزیابی در سال دوم آزمایش به طور معنی‌داری نسبت به سال اول افزایش یافت. از نظرکاربرد باکتری، غلظت cfu/ml 10^8 باکتری باسیلوس سوبتیلیس بهترین نتیجه را در عملکرد تر و خشک گل و میزان وزن تر و خشک کلاله نشان داد. همین‌طور با توجه به وزن گل‌ها و کلاله‌ها به نظر می‌رسد که برای تولید کلاله و گل بزرگ‌تر می‌توان از باکتری‌ها به جای کودهای شیمیایی استفاده نمود که سبب افزایش دسترسی به نیتروژن و افزایش وزن کلاله و گل زعفران می‌گردد. همین طور غلظت‌های مختلف باکتری می‌تواند روی میزان عناصر نیتروژن، قسقر و پتاسیم در گیاه زعفران تاثیر گذارد و میزان جذب آن را توسط گیاه افزایش دهد. به طوری که بیشترین میزان عناصر در غلظت cfu/ml 10^8 مشاهده شد. با توجه به نتایج به دست آمده توصیه می‌شود که جهت افزایش عملکرد زعفران، از باکتری باسیلوس سوبتیلیس به عنوان کود زیستی استفاده شود.

REFERENCES

1. Abbas, M.K., & Ali, A.S. (2010). Effect of foliar application of NPK on some growth characters of two cultivars of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *American Journal of Plant Physiology*, 6(4), 22-227.
2. Armak, A., Farzi, H., & Alipanah, M. (2018). Impact of use of different sources of humic, bio and nano fertilizers and nitrogen levels on saffron (*Crocus sativus* L.) flower yield. *Saffron Agronomy and Technology*, 5(4), 329-344.
3. Alipour Miandehi, Z., Mahmoudi, S., Behdani, M., & Sayari, M. H. (2014). The effect of coriander weight and consumption of different types of fertilizer on some growth characteristics and yield of saffron (*Crocus sativus*) under dead conditions. *Journal of Saffron Research*, 2, 112-97. (In Farsi).
4. Anbarani, M. (1990). *Red Gold Saffron, first edition, Mashhad*. Astan Quds. (In Farsi).
5. Anonymous. Ministry of Agriculture Statistics. (2010). Publications Ministry of Agriculture. (In Farsi.)
6. Antoun, H., & Kloepper, J. (2001). Plant Growth Promotion Rhizobacteria. *Academic Press USA*, 353, 402-407.
7. Armak, A., Farzi, H., & Alipanah, M. (2018). Impact of use of different sources of humic, bio and nano fertilizers and nitrogen levels on saffron (*Crocus sativus* L.) flower yield. *Saffron Agronomy* and *Technology*, 5(4), 329-344

8. Bashan, Y., & Holguin, G. (1997). *Azospirillum*-plant relationships: Environmental and physiological advances. *Can*adian *Journal of Microbiology*, 43, 103-121.
9. Bathaei, S.Z., & Mousavi, S.Z. (2010). New applications and mechanism of action of saffron and its important ingredients. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50 (8), 761-786.
10. Behdani, M.A., Jami-Alahmadi, M., & Akbarpour, A. (2010). *Research Project: Category ecological approach to optimize the production of saffron in Southern Khorasan*. Birjand University, pp.107 (In Farsi).
11. Bowen, G., & Rovira, A. (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in. Agronomy*, 66, 1-102.
12. De Souzo, I. R. P., & MacAdam, J. W. (2002). Gibberellic acid and dwarfism effects on the growth dynamics of B73 maize (*Zea mays* L.) leaf blades: a transient increase in apoplastic peroxidase activity procedes cessation of cell elongation. *Journal Experimental. Botany*, 52, 1673-1682.
13. Ehteshami, S.M., Poorebrahimi, M., & Khavazi, K. (2013). The effect of *Pseudomonas fluorescens* strain 103 with phosphorus fertilizer on nutrient concentration and biological yield of two barley cultivars under greenhouse conditions, *Journal of Science and Technology of Greenhouse Cultivation*, 1(16), 56-61. (In Farsi).
14. Eldin, M.S., Elkholy, S., Fernández, J.A., Junge, H., Cheetham, R., Guardiola, J., & Weathers, P. (2008). *Bacillus subtilis* FZB24 affects flower quantity and quality of saffron (*Crocus sativus* L.). *Planta Medica*, 13(74), 16-20.
15. Emami, A. (1997). Plant decomposition methods. Volume One, Issue No. 982. *Soil and Water Research Institute*. 128. (in Farsi).
16. Emami, N., Hassani, A., Vaezi, A.R., & Baba Akbari Sari, M. (2021) The effect of application of bio-fertilizer containing Pantoea agglomerans compared to urea fertilizer on growth and quality of turfgrass. *Iranian Journal of Horticultural Science,* 25(2), 341-351. (in Farsi).
17. Esitken, A., Yildiz, H.E., Ercisli, S., Figen Donmez, M., Turan, M., & Gunes, A. (2010). Effects of plant growth promoting bacteria (PGPB) on yield, growth and nutrient contents of organically grown strawberry. *Scientia Horticulture,* 124, 62-66.
18. Euzéby, J. P. (2008). *Bacillus*. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Retrieved 2008-11-18.
19. Falahi, H.R., Elmi, S., Behdani, M.A., & Aghvahani Shajari, M. (2016). Evaluation of indigenous and modern knowledge of saffron cultivation. (Case study: Sarayan). *Journal of Saffron Research*, 8(7), 87-21. (In Farsi).
20. Fiori, M., Falchi, G., Quaglia, M., & Cappelli, C. (2007). Saffron (*crocus sativus* L.) diseases in Italy. *Plant Pathology*, 89,27-68
21. Glick, BR. (1995). The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Journal Microbiology*, 41, 109-17.
22. Golpayeghani, A., Heydari, M., Gholami, H., & Sadeghi, M. (2010). Sustainable production and improving growing herbs basil (*Ocimum basilicum* L.) in response to the inoculated bacteria growth promoting (PGPR). New Ideas Fifth National Conference on Agriculture, Islamic Azad University Branch (Isfahan), *College of Agriculture*, 28-27 February, pp 510-521.
23. Grosch, RJ., Krebs, B., & Bochow, H. (1999). Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol-agent. III. Influence of *Bacillus subtilis* on fungal root diseases and on yield in soilless culture. *Journal of Plant Diseasea and Protection*, 106 (2), 568-80.
24. Gutierrez-Manero, F.J., Ramos-Solano, B. Probanza, A. Mehouachi, J. Tadeo F.R., & Talon, M. (2001). The plantgrowth- promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Plant Physiology*, 111, 206-211.
25. Hamidi, A.R., Asgharzadeh, M., Chokan, M., Dehghan shoar, M., & Malekoti, J. (2007). The effect of application of plant growth promoting bacteria on various aspects of corn growth and development in a sustainable agricultural system with sufficient input. In: Proceedings of *the 10th Iranian Soil Science Congress*. 26 August, Karaj, pp. 119-123. (In Farsi).
26. Han, H. S., & Lee, K. D. (2005). Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Agriculture and Biological Sciences*, 1, 210-215.
27. Hassan, F.A.S. (2009). Response of *Hibiscus sabdariffa* L. plant to some biofertilization treatments. *Annals of Agricultural Science*, 54, 437-446.
28. Hazarika, D.K., Taluk Dar, N.C., Phookan, A.K., Saikia, U.N., Das, B.C., & Deka, P.C. (2000). Influence of vesicular arbascular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizng bacteria on nursery establishment and growth of tea seedlings in assam. Symposium no. 12, 14-17 Oct, Assam Agricultural University, *Jorhat- Assam*, India. 12, 253-261.

29. Hodgson, E. (2004). *The textbook of modern toxicology* (3th ed). Hoboken, New Jersey, pp. 51- 54.
30. Kakhki Daneshvar, M., & Farahmand Gelyan, K. (2012). Review of interactions between ecommerce, brand and packaging on value added of saffron: A structural equation modeling approach. Afric. *Journal of Business Management*, 6, 7924-7930.
31. Khan, A.G. (2005). Role of soil microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biol*ogy, 18, 355-364.
32. Khosravi, H. (2003). Application of biological fertilizers in cereal cultivation. Collection of articles on the production of biological fertilizers in the country. *National Soil and Water Research Institute*. Pp. 179-194. (In Farsi).
33. Kloepper, JW., Lifshitz, R., & Novacky, A. (1998). *Pseudomonas* inoculation to benefit plant production. *Animal and Plant Sciences*, 60-4.
34. Koocheki, A. (2013). Research on production of saffron in Iran: Past trend and future prospects. *Saffron Agronomy and Technology*, 1 (1), 3-21. (In Farsi).
35. Koocheki, A., Jahani, M., Tabrizi, L., & Mohammad abadi, A. (2011). Evaluate the effectiveness of biological and chemical fertilizers and plant density on yield and characteristics of saffron corm flower (*Crocus sativus* L.). *Journal of gricultural Science and Technology*, 25 (1), 196-206. (In Farsi).
36. Kumar, R. N., Thirumalai Arasu, V., & Gunasekaran, P. (2002). Genotyping of antifungal compounds producing plant growth-promoting rhizobacteria, *Pseudomonas fluorescens. Current Science,* 82, 12-25.
37. Kumar, A., Verma, H., Singh, V. K., Singh, P. P., Singh, S. K., Ansari, W. A., & Pandey, K. D. (2017). Role of *Pseudomonas* sp. in sustainable agriculture and disease management. *Agriculturally Important Microbes for Sustainable Agricultur*, 37, 195-215.
38. Kumar, R., Singh, V., Devi, K., Sharma, M., Singh, M.K., & Ahuja, P.S. (2009). State of art of saffron (*Crocus sativus* L.) agronomy: A comprehensive review. *Food Reviews International*, 25, 44-85.
39. Lashkari, M., Mahmoodi, S., Alikhani, H.A., & Sayyari Zohan, M.H. Effect of Pseudomonas fluorescence strains and humic acid on some morphological and physiological characteristics of marshmallow (*Altheae officinalis* L*.), Iranian Journal of Horticultural Science*, 52(3), 619-632. (in Farsi).
40. Maricel, V. S., Zygadlo, J., Giordano, W., & Banchio, E. (2011). Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*). *Plant Physiology and Biochemistry*, 49 (10), 1177-82.
41. Maxwell, C. A., Hartwig, U. A., Joseph, C. M., & Phillips, D.A. (1989). Chalconeand two related flavonoids from alfalfa roots induce nog genes of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology*, 91, 842-847.
42. Mehboob I., Naveed M., & Zahir Z.A. (2009). Rhizobial association with non-legumes: Mechanismsand application, *Critical Reviews in Plant Science*, 28, 432-456.
43. Melnyk, J.P., Wang, S., & Marcone, M. F. (2010). Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food Research International*, 43, 1981-1989.
44. Mikovacki, N., Marinkovic, J., Cacic, N., & Bgelic, D. (2010). Microbial abundance in rhizosphere of sugarbeet in dependence of fertilization and inoculation with *Azotobacter Chroococcum. Research Journal of Agricultural Sci*, 42 (3), 260-4.
45. Minorsky, P.V. (2008). On the inside. *Plant Physiol,* 146: 323-324.
46. Mohammadpour Vashvaei, R., Ghanbari, A., & Fakhri, B. (2015). The effect of integrated nutrition composition on the concentration of elements N, P and K, biochemical characteristics and performance of sour tea cups (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Iranian Journal of Crop Science*, 46 (3), 517-497. (In Farsi).
47. Molina, R. V., Valero, M., Navarro, Y., Garcia-Luis, A., & Guardiola, J. L. (2004). The effect of time of corm lifting and duration of incubtion at inductive temperature on flowering in the saffron plant (*Crocus sativus* L.). *Science Horticulturae*, 103, 79-91.
48. Naghdibadi, H.A., Omidi, H., Golzad, A., Torbati, H., & Fotookian, M.H. (2011). Changein crocin, safranal and picrocrocin cotent and agronomical characters of saffron (*Crocus sativus* L.) under biological and chemical of phosphorous fertilizers. *Journal of Medicinal Plant*, 40(4), 58-68.
49. Naveed, M., Khalid, M., Jones, D. L., Ahmad, R., & Zahir, Z. A. (2008). Relative efficacy of *Pseudomonas spp.* containing ACC-deaminase for improving growth and yield of maize (*Zea mays* L.) in the presence of organic fertilizer. *Pakistan Journal of Botany*, 40(3), 1243-1251.
50. Nehvi, F.A., Lone, A.A., Khan, M.A., & Maghdoomi, M.I. (2010). Comparative study on effect of nutrient management on growth and yield of saffron under temperate conditions of Keshmir. *Acta Horticulturae* 850, 165-170.
51. Nieto, K. F., & Frankenberger, W. T. (1989). Biosynthesis of cytokinins in soil. *Soil Science. Society of America. Journal,* 53, 735-40.
52. Nieto, K.F., & Frankenberger, W.T. (1989). Biosynthesis of cytokinins produced by *Azotobacter chroococcum*. *Soil. Biology and. Biochemistry*, 21, 967-72.

53. Nile, S.H., & Park, S.W. (2013). Total phenolics, antioxidant and xanthine oxidase inhibitory activity of three colored onions (*Allium cepa* L.). *Frontiers in Life Science*, 7, 224-228.
54. Norouzi, S., & Khademi, H. (2010). Ability of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to take up potassium from different micaceous minerals and consequent vermiculitization. *Plant Soil*, 328, 83-93.
55. Omidi, H., Naghdi Badi, H.A., Golzad, A., Torabi, H., & FootouKian, M.H. (2009). The effect of chemical and biofertilizer source of nitrogen on qualitative and quantitative yield of saffron. *Journal of Medicinal Plants*, 8 (30), 98-109. (In Farsi).
56. Page, A.L., Miller, R.H., & Keeney, D.R. (1982). Methods of soil analysis. Part 2. Chemical precautions and processing. *Animal Waste Management*, 6, 100-105.
57. Parray, J. A., Kamili, A. N., Reshi, Z. A., Hamid, R., & Qadri, R. A. (2013). Screening of beneficial properties of rhizobacteria isolated from saffron (*Crocus sativus* L.) rhizosphere. *African Journal of Microbiology Research*, 7 (23), 2905-2910.
58. Petter, N. K., & Varma, D. P. S. (1990). Phenolic compounds as regulators ofgene expression in plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*, 3, 4-8.
59. Pierre Anoshi, E., imam, E., & Jamali, R. (2010). Comparison of the effects of biofertilizers with chemical fertilizers on growth, yield and oil content of sunflower (*Helianthus annuss* L.) at different levels of drought stress. *Journal Agricultural Economics*, 2(3), 492- 501. (In Farsi).
60. Ping, L., & Boland, W. (2004). Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in Arabidopsis. *Trends in Plant Science,* 9 (6), 263 - 6.
61. Piri, R., Moradi. A., Maghsoudi. A., Fereydoni, M. J., & Amrolahi, M. H. (2017). Effect of seed primer on plant growth retardant bacteria on germination indices and seedling cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.) under drought stress. *The Second International Congress and 14th National Congress on Agriculture and Plant Breeding in Iran*. 9-11 September. University of Guilan. Rasht. Iran. pp 328-331. (In Farsi).
62. Pradhan, N., & Sukla, L.B. (2005). Solubilization of inorganic phosphates by fungi isolated from agriculture soil. *Journal of Biotechnology*, 5, 850-854.
63. Rademacher, W. (1994). Gibberellin formation in microorganisms. Journal of *Plant Growth Regulation,* 15, 303-14.
64. Rai, UN., Pandey, K., Sinha, S., Singh, A., Saxena, R., & Gupta, DK. (2004). Revegetating fly ash landfills with *Prosopis juliflora* L: impact of different amendments and *Rhizobium* inoculation. *Environment. International,* 30, 293-300.
65. Rayipour, L., & Asghar zadeh, N. Z. (2008). Interaction of phosphate-solubilizing bacteria and (*Bradyrhizobium japonicum*) on growth indices of food tuber in soybeans. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 40 (11), 63-53.
66. Ratti, N., Kumar, S., Verma, H.N., & Gautam, S.P. (2001). Improvement in bioavailability of tricalcium phosphate to *Cymbopogon martinii var. motia* by *rhizobacteria*, AMF and *Azospirillum* inoculation. *Microbiological Research*, 156, 145-149.
67. Salehi, K., Soloki, M., & Tanha, M. (2017). Study of the effects of growth-promoting bacteria and salicylic acid on green mint (*Mentha spicata* L.) under drought stress. *Modern Genetics Quarterly*, 12(2), 241-252. (In Farsi).
68. Sharaf-Eldin, M.A., Elkholy, S., Fernández, J.A., Junge, H., Cheetham, R.D., Guardiola, J.L., & Weathers, P.J. (2008). The effect of *Bacillus subtilis* FZB24 on flowers quantity and quality of saffron (*Crocus sativus* L.). *Planta Medica*, 74 (10), 1316-1320.
69. Sheng, X. (2005). Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1918-1922.
70. Shi, W., Wang, X., & Yan, W. (2004). Distribution patterns of available P and K in rape rhizosphere in relation to genotypic difference. *Plant Soil*, 261, 11-16.
71. Singh, S., & Kapoor, K. K. (1998). Inoculation with phosphate solubilizing microorganisms and a vesicular arbuscular mycorrhizal fungus improves dry matter yield and nutrient uptake by wheat grown in a sandy soil. *Biology and Fertility of Soils,* 28, 139-44.
72. Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Plant Physiology, (4th Edition). Sinauer Associates, Sunderland, Mass, 623p.
73. Vitrac, X., Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Deffieux, G., & Merillon, J.M. (2000). Sugar sensingand Ca^{2+} calmodulin requirementin *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry*, 53, 659-665.
74. Wagner, G.J. (1979). Content and vacuol/extra vacuole distribution of neutral sugar, free amino acid and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, 64, 88- 93.
75. Wu, S.C., Cao, Z.H., Li, Z.G., Cheung, K.C., & Wong, M.H. (2004). Effect of bio fertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth. *Geoderma*, 125, 155-166.
76. Zhang, N., Wang, D., Liu, Y., Li, S., Shen, Q., & Zhang, R. (2013). Effects of different plant root exudates and their organic acid components on chemotaxis, biofilm formation and colonization by beneficial rhizosphere-associated bacterial strains. *Plant Soil*, 374, 689-700.