تاثیر سویه‌های مختلف *Pseudomonas* بر جوانه‌زنی و شاخص‌های رشد گیاهچه لوبیا(*Phaseolus vulgaris* L.) در سطوح مختلف شوری

Effect of pseudomonas different strains on germination and growth index of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedling in different levels of salinity

سیدمحمدرضا احتشامی [۱*]، محیل پورابراهیمی‌فومنی [۲]، حسن رمضانی [۳]

۱- استادیار گروه زراعت دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد زراعت دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان
۳- دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه زیست شناسی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
*نویسنده مسئول:smrehteshami@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۵ **تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۲۶**

چکیده

به‌منظور بررسی اثر سویه‌های مختلف *Pseudomonas* بر جوانه‌زنی بذر و رشد گیاهچه لوبیا تحت شرایط تنش شوری، آزمایشی به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در دانشگاه گیلان انجام گرفت. تیمارهای آزمایش شامل سطوح شوری (۰، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی‌موس بر سانتی‌متر) و سویه‌های مختلف *Pseudomonas fluorescens* strain153, *P.fluorescens* strain169, *P.putida* strain 108، *Pseudomonas P.putida* strain 4) و تیمار شاهد بدون تلقیح) بود. با افزایش سطوح شوری، درصد جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، وزن خشک ریشه‌چه و وزن خشک ساقه‌چه کاهش یافت، اما این کاهش در تیمارهای تلقیح با باکتری به مراتب کمتر بود. نتایج نشان داد که در سطوح شوری ۵ و ۷/۵ میلی‌موس بر سانتی‌متر، بذور لوبیا جوانه‌زنی خوبی نداشتند و تنش شوری تاثیر منفی بر ظهور گیاهچه داشت. بیشترین طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، سرعت و درصد جوانه‌زنی، شاخص ویگور و ضریب آلومتریک در تیمار بدون شوری و باکتری *P.putida* strain 108 به‌دست آمد. به‌طور کلی نتایج آزمایش نشان داد که باکتری‌های محرک رشد می‌توانند باعث افزایش تحمل به تنش شوری در لوبیا در زمان جوانه‌زنی گردند.

واژه‌های کلیدی: باکتری، سرعت جوانه‌زنی، شوری، گیاهچه، لوبیا

مقدمه

لوبیا یکی از مهم‌ترین حبوبات در جهان است و بیشترین سطح زیر کشت را در بین حبوبات دارد. ۴۰ درصد سطح کشت این گیاه در آسیا می‌باشد. این گیاه به شوری حساس می‌باشد و شوری می‌تواند به طور قابل توجهی بر رشد و تولید لوبیا اثرگذار باشد (Koocheki & Banayan, 2004). شوری یکی از مهمترین تنش‌های غیرزیستی محدودکننده تولید محصولات کشاورزی در مناطق خشک و نیمه‌خشک می‌باشد که سطح نسبتاً وسیعی از اراضی زراعی را به خود اختصاص داده است (Zabihi*et al.*,2009). در شرایط شور، قابلیت جذب عناصر غذایی در محلول خاک به دلیل غلظت زیاد یون‌های کلروسدیم کاهش یافته و منجر به اختلال در امر تغذیه گیاهان می‌گردد (Hu & Shmidhalter, 2001).

توانایی ریزجانداران در تولید و رهاسازی متابولیت های مختلف موثر بر رشد گیاه به عنوان یکی از مهمترین عوامل در حاصلخیزی خاک است. این متابولیت‌ها به طور جمعی، مواد فعال زیستی نامیده می‌شوند(Sharma, 2002). لذا یکی از استراتژی‌های مقابله با شوری که چندی است مورد توجه قرار گرفته، تلقیح بذر گیاهان زراعی با انواع مختلفی از باکتری‌ها و قارچ‌های مفید خاک‌زی می‌باشد. برای اولین بار لیفشیتز و همکاران (Lifshitz *et al.*, 1987) نشان دادند که PGPR[1]ها قادرند مستقیماً رشد گیاهان را افزایش دهند.

مکانیسم‌هایی که باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌توانند از طریق آنها مستقیماً باعث بهبود و افزایش رشد و عملکرد گیاه شوند عبارتند از: تثبیت نیتروژن، حل فسفات‌های کم‌محلول، تأمین آهن از طریق تولید سیدروفور، تولید فیتوهورمون‌هایی چون اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها، جیبرلین‌ها و کاهش اتیلن (Kloepper *et al.*, 1989). در چند دهه گذشته توانایی تولید ۱-آمینوسیکلوپروپان -۱-کربوکسیلات (ACC) دآمیناز توسط باکتری‌ها، به عنوان مکانیسم جدیدی برای افزایش رشد گیاه مطرح شده است (Patten & Glick, 1996). به عقیده پنروز و گلیکوگلیک (Penrose & Glick, 2003) هر باکتری که دارای فعالیت آنزیم ACCدآمیناز بیش از ۲۰ نانومول-αکتوبوتیرات بر میلی‌گرم در ساعت باشد PGPR بوده و می‌تواند شاخص‌های رشد گیاه را افزایش دهد. تلقیح گیاه با باکتری‌هایی که قادر به تولید آنزیم ACCدآمیناز هستند، می‌تواند در کاهش سطح اتیلن تنشی در گیاه و در نتیجه کاهش اثرات منفی آن موثر باشند. باکتری‌هایی با چنین توانایی می‌توانند گیاهان را در برابر اثرات مضّر تنش‌های محیطی چون فلزات سنگین (Belimov *et al.*, 2005)، غرقاب (Grichko & Glick, 2001)، پاتوژن‌های گیاهی (Wang *et al.*, 2004)، خشکی Mayak *et al.*, (2004a) و شوری (Mayak *et al.*, 2004b) محافظت کنند. ذبیحی و همکاران (Zabihi *et al.*, 2009) ضمن بررسی نقش باکتری‌های ریزوبیومی مولد آنزیم ACC دآمیناز در گیاه گندم نشان داد که گندم تلقیح شده با سویه‌های ریزوبیومی مولد ACC دآمیناز، دارای طول ریشه، طول ساقه، وزن خشک ریشه و ساقه بیشتری نسبت به شاهد بود که این افزایش در مورد طول ریشه معنی‌دار بود.

مزایای تلقیح بذر با باکتری‌های محرک رشد شامل افزایش شاخص‌های متعددی مانند سرعت جوانه‌زنی، مقاومت به تنش‌ها و افزایش وزن ریشه‌چه می‌باشد (Kaymak *et al.*, 2009). در رابطه با نقش این باکتری‌ها بر جوانه‌زنی و مراحل اولیه رشد گیاهچه، مطالعه کمی انجام گرفته است. این باکتری‌ها به دلیل سنتز هورمون‌هایی مانند جیبرلین و همچنین تولید آنزیم آمیلاز و تجزیه نشاسته سبب بهبود جوانه‌زنی می‌شوند. همچنین سنتز هورمون اکسین نیز باعث افزایش قدرت گیاهچه‌ها می‌شود (Gholami *et al.*, 2009). با توجه به گستره وسیع خاک‌های شور و اهمیت تولید محصول در این شرایط و با عنایت به اینکه نقش *Pseudomonas fluorescens* در تحریک رشد و نمو گیاه در شرایط شور چندان مورد بررسی قرار نگرفته است و همچنین به دلیل اهمیت لوبیا در بین حبوبات، ضرورت انجام این تحقیق مشخص می‌گردد.

1-Plant Growth Promoting Rhizobacteria

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثر سویه‌های مختلف *Pseudomonas* بر قدرت رویش بذر و رشد گیاهچه لوبیا تحت شرایط تنش شوری، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در آزمایشگاه مرکزی دانشگاه گیلان انجام شد.

تیمارهای آزمایش شامل شوری (۰، ۲/۵، ۵ و ۷/۵ میلی موس بر سانتی‌متر) و سویه‌های مختلف باکتری *Pseudomonas fluorescens* strain 153, *P.fluorescens* strain 169, *P.putida* strain108 *P.putida* strain 4, و (تیمار شاهد بدون تلقیح) بود. برای ایجاد هدایت‌های الکتریکی ۲/۵ ، ۵ و ۷/۵ که به ترتیب معادل ۱/۳۸، ۲/۰۸، ۲/۷۷ مگاپاسکال پتانسیل اسمزی است از ۹/۱ ، ۱۸/۱ و ۲۷/۰۳ گرم در لیتر کلریدسدیم استفاده شد. مقدار نمک از رابطه 0.1 MPa=0.36 EC به دست آمد. در ابتدا بذور با محلول هیپوکلریت‌سدیم ۰/۵٪ به مدت ۲ دقیقه ضدعفونی و ۲ تا ۳ بار با آب مقطر شسته شدند تا اثری از هیپوکلریت‌سدیم بر بذور باقی نماند. سپس بذور با سویه‌های مختلف باکتری مربوطه تلقیح شدند.

جمعیت باکتری‌ها در هر گرم مایه تلقیح، $۱۰^{۷}$ × ۹/۸ برآورد شد (بر اساس روش شمارش کلنی و با استفاده از محیط‌های کشت مناسب) (Becking, 2006). برای کشت باکتری‌ها از محیط کشت Sperber استفاده شد (Sperber, 1958). پس از ریختن گلوکز، کلرید کلسیم، سولفات منیزیم، تری کلسیم فسفات و Yeast extract در آب مقطر و رساندن آن به حجم ۱ لیتر، pH آن به حدود ۷/۲ رسانده شد. محلول مربوطه پس از تهیه، جهت استریل کردن به مدت ۱۸ تا ۲۰ دقیقه در داخل اتوکلاو قرار گرفت. پس از خروج ظرف از اتوکلاو و خنک‌شدن آن، برای این که باکتری رشد کند و از رشد قارچ جلوگیری شود، از سیکلوهگزامید استفاده گردید. پس از کشت انفرادی باکتری‌ها، پس از ۴۸ ساعت جمعیت آنها به روش Plate Count و بر محیط‌های اختصاصی شمارش گردید و سپس حجم مساوی از آنها تهیه شده و مجدداً جمعیت در محیط کشت، شمارش شده و مایه تلقیح آماده شد. ویژگیهای سویه‌های مورد بررسی در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- فعالیت آنزیم ACC deaminase، میزان مواد شبه اکسین، توان انحلال‌سازی منابع نامحلول فسفر، تولید سیدروفور و IAA سویه‌های مورد بررسی (اندازه‌گیری شده توسط بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب کرج).

Table1. Activity of ACC deaminase enzyme, content of auxin analogue material, Dissolubility ability of phosphorus insoluble sources, sidrophore production and IAA in evaluated strains.

صفت Trait	سویه ۴ Strain 4	سویه ۱۰۸ Strain108	سویه ۱۶۹ Strain169	سویه ۱۵۳ Strain153
فعالیت آنزیم[1](ACC deaminase)	2.305	5.030	3.508	-
مواد شبه اکسین Auxin-like substances (mg/l)	9.6	8.9	5.8	-
فسفر حل شده Dissolved P(mg/l)	38.75	57.32	53.50	-
توان تولید سیدروفور (Siderophore production)	+	+	+	+
توان تولید IAA (Production IAA)	+	+	+	+

[1]میکرومول آلفاکتوبوتیرات در میلی‌گرم پروتئین در ساعت

µmlα-Ketobutyrate protein mgh^{-1}

سه سویه از چهار سویه مورد بررسی دارای توان تولید آنزیم ACCدآمیناز بودند و فعالیت این آنزیم از ۲/۳۰۵ تا ۵/۰۳۰ میکرومول آلفاکتوبوتیرات در میلی‌گرم پروتئین در ساعت متغیر بود (Saleem *et al*., 2007). بیشترین اثر بر حل‌کنندگی فسفر مربوط به *P.putida* strain 108 بود. کلیه سویه‌های مورد آزمایش دارای توان تولید سیدروفور و IAA بودند (محاسبه شده توسط بخش بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب کرج) (جدول۱). برای چسبیدن بذور به مایه تلقیح از صمغ عربی استفاده شد. سپس

۱۰۰ عدد بذر لوبیا در ظرف‌های پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار گرفتند. ظرف‌های پتری در درون ژرمیناتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. آبیاری ظرف‌های پتری هر روزه و به مقداری که کاغذ صافی مرطوب باشد، انجام شد. اولین شمارش در روز سوم و آخرین شمارش در روز هفتم به ثبت رسید. در طول دوره شمارش، هر روزه تعداد بذور جوانه‌زده برای محاسبه سرعت جوانه‌زنی بذر شمارش شد. در روز هفتم پس از محاسبه درصد جوانه‌زنی، تعداد ۱۰ گیاهچه به طور تصادفی از هر ظرف پتری انتخاب شد و ساقه‌چه و ریشه‌چه از بذر جدا گشت (مرحله‌ای که هیپوکوتیل بزرگ شده بود) و وزن تر آن‌ها توسط ترازوی دیجیتالی محاسبه شد.

طول ریشه‌چه و ساقه‌چه با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری شد. برای محاسبه وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۷۵ درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفتند و سپس با ترازو توزین شدند. سایر صفات مورد اندازه‌گیری عبارت بودند از (Scott *et al.*, 1984):

۱) قابلیت جوانه زنی:

$$FGP= (G/n)*100$$

که در این رابطه، G تعداد بذور جوانه زده در طول اجرای آزمون و n تعداد بذر کشت شده است.

۲) سرعت جوانه زنی:

$$Sg = \frac{\Sigma ni}{\Sigma di}$$

که در این رابطه n_i تعداد بذر جوانه زده و d_i تعداد روز است.

۳) شاخص ویگور طولی:

$$VI= [FGP\times (L_s+L_r)]/100$$

که در این رابطه FGP قابلیت جوانه‌زنی، L_s میانگین طول ساقه‌چه و L_r میانگین طول ریشه‌چه است.

۴)ضریب آلومتریک:

$$\text{ضریب آلومتریک} = \frac{\text{میانگین وزن خشک ریشه چه}}{\text{میانگین وزن خشک ساقه چه}}$$

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت. همچنین برای مقایسه میانگین تیمارها نیز از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر باکتری‌ها، شوری و برهم‌کنش شوری در باکتری بر وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول۲). بیشترین میزان وزن خشک ریشه‌چه در سطوح مختلف شوری در سطح بدون شوری (۰/۰۲ گرم) و کمترین میزان آن در سطح شوری ۷/۵ میلی موس بر سانتی‌متر مشاهده شد (جدول ۳). در بین سطوح مختلف باکتری در *P.putida* strain108 (۰/۰۱۵ گرم) و کمترین میزان آن در تیمار بدو تلقیح (۰/۰۰۳ گرم) مشاهده شد (جدول ۴).

با توجه به جدول ۵ می‌توان گفت که تیمار شوری صفر و *P.putida* strain 108 (۰/۰۵۳ گرم)، سطح شوری صفر و *P.fluorescens* strain 169 (۰/۰۵۷ گرم) و سطح شوری ۲/۵ میلی‌موس بر سانتی‌متر و *P.fluorescens* strain 169 (۰/۰۵۷ گرم) در یک گروه آماری قرار گرفتند و بیشترین میزان وزن خشک ساقه‌چه را نشان دادند.

مایاک و همکاران (Mayak *et al.*, 2004a) نیز طی مطالعه روی گوجه‌فرنگی در شرایط شور به این نتیجه رسیدند که سویه‌های باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد اثرات نامطلوب شوری را کاهش داده و وزن تر و خشک گیاه را نسبت به شاهد افزایش داده‌اند. آنها اثر این سویه‌ها را به توانایی آنها در تولید ACCدآمیناز و در نتیجه کاهش تولید اتیلن نسبت دادند. گزارش شده است که وزن خشک اندام هوایی گیاهچه‌های ذرت با استفاده از باکتری‌های *Pseudomonas*، افزایش معنی‌داری داشته است (Gholami *et al.*, 2009).

جدول ۲- تجزیه واریانس ویژگی‌های جوانه‌زنی لوبیا تحت تاثیر شوری و سویه‌های مختلف*Pseudomonas*.

Table 2- Analysis of variance of germination characteristics of bean under salinity stress and different strains of Pseudomonas sp.

منابع تغییر Source of Variation	درجه آزادی df	وزن خشک ساقه‌چه Shoot dry weight	وزن خشک ریشه‌چه Root dry weight	طول ساقه‌چه Shoot length	طول ریشه‌چه Root length	درصد جوانه‌زنی Percent germination	سرعت جوانه‌زنی Speed germination	شاخص ویگور Vigor index	ضریب آلومتریک Allometric coefficient
شوری (Salinity)	3	0.007**	0.002**	1840.89**	3175.38**	27341.3**	147.63**	85.12**	6.48**
باکتری (Bacteria)	4	0.0006**	0.0002**	0.67ns	45.38**	282.64**	0.71*	49.35**	0.24**
شوری×باکتری Bacteria×salinity	12	0.0003ns	0.0001**	0.68ns	28.96**	148.44**	0.40ns	2.62ns	0.17**
خطا(Error)	40	0.00001	0.000002	1.18	0.84	2.3	0.22	1.69	0.001
ضریب تغییرات CV (%)	—	21.87	15.67	11.36	7.30	4.28	17.62	10.43	12.28

n.s *و ** به ترتیب معنی‌دار در سطوح احتمال پنج و یک درصد

n.s,*, **: Significant at 5% and 1% probability levels, respectively

جدول ۳-مقایسه میانگین صفات مورد بررسی لوبیا تحت تاثیر شوری.

Table 3- Means comparison of evaluated characteristics of bean under salinity stress.

شوری (میلی موس بر سانتی متر) Salinity ($Mmos/cm^{-1}$)	وزن خشک ساقه‌چه (گرم) Shoot dry weight (g)	وزن خشک ریشه‌چه (گرم) Root dry weight (g)	طول ساقه‌چه (میلی‌متر) Shoot length (mm)	طول ریشه‌چه (میلی‌متر) Root length (mm)	درصد جوانه‌زنی Percent germination	سرعت جوانه‌زنی Speed germination	شاخص ویگور Vigor index	ضریب آلومتریک Allometric coefficient
0	0.04a	0.02a	19.68a	26.3a	85.74a	6.05a	3.07b	0.63b
2.5	0.03b	0.01b	18.66b	23.99b	56.08b	4.62b	4.82a	0.68a
5	0c	0c	0c	0c	0c	0c	0c	0c
7.5	0c	0c	0c	0c	0c	0c	0c	0c

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means in each column followed by similar letter (s) are not significantly different at 5 % probability level, using Duncan's Test

جدول ۴- مقایسه میانگین صفات مورد بررسی لوبیا تحت تاثیر سویه های مختلف*Pseudomonas*

Table 4- Means comparison of evaluated characteristics of bean under different strains of Pseudomonas sp.

باکتری Bacteria	وزن خشک ساقه‌چه (گرم) Shoot dry weight (g)	وزن خشک ریشه‌چه (گرم) Root dry weight (g)	طول ریشه‌چه (میلی‌متر) Root length (mm)	درصد جوانه‌زنی Percent germination	سرعت جوانه‌زنی Speed germination	شاخص ویگور Vigor index	ضریب آلومتریک Allometric coefficient
*P. putida*strain 108	0.028a	0.015a	15.49a	40.45a	2.85a	4.82a	0.45a
*P. putida*strain 169	0.022b	0.012b	12.38c	37.7b	2.89a	4.41a	0.48a
*P. putida*strain 153	0/015c	0.012b	13.3b	37.77b	2.76b	3.28b	0.22c
*P. putida*strain 4	0.019c	0.01c	10.83d	33.22c	2.35c	3.03b	0.31b
بدون تلقیح Uninoculation	0.008d	0.003d	10.85d	28.12d	2.46c	1.27c	0.16d

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5 % probability level, using Duncan's Test.

همچنین باکتری‌های حل‌کننده فسفات همراه با سنگ فسفات توانایی گیاه را برای جذب بیشتر مواد غذایی افزایش می‌دهند و از این طریق بر رشد گیاه تاثیر می‌گذارند (Goenadi *et al.*, 2000). در آزمایشی دیگر گزارش شد که باکتری‌های حل‌کننده فسفات سبب افزایش تعداد، طول و سطح تارهای کشنده ریشه گندم شده است (Gahoonia *et al.*, 1997).

طول ریشه‌چه و ساقه‌چه

اثر باکتری، شوری و برهم‌کنش شوری در باکتری بر طول ریشه‌چه در سطح یک درصد معنی‌دار بود، اما طول ساقه‌چه تنها تحت تاثیر

شوری در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳).

بیشترین میزان طول ریشه‌چه (۲۶/۳۰ میلی-متر) و ساقه‌چه (۱۹/۶۸ میلی‌متر) در سطح شوری صفر مشاهده شد (جدول ۳). برهمکنش بین شوری در باکتری نشان دادکه تیمار شوری صفر و *P .putida* strain 108 (۳۱/۱۰ میلی‌متر) و سطح شوری ۲/۵ میلی موس بر سانتی‌متر و *P.putida* strain 108 (۳۰/۸۹ میلی‌متر) بیشترین میزان طول ریشه‌چه را به خود اختصاص دادند (جدول ۵). زیدی (Zaidi, 2003) گزارش کرد تلقیح بذور سویا با *Pseudomonas* و برادی ریزوبیوم ژاپونیکوم، جوانه‌زنی بذور و استقرار گیاهچه را بهبود بخشید و باعث افزایش طول و تجمع ماده خشک در اندام هوایی و ریشه، ماده خشک و جذب عناصر غذایی نسبت به شرایط بدون تلقیح گردید (Hampton & Tekrony, 1995).

کلی و همکاران (Klee *et al.*, 1991) گزارش کردند که باکتری *Pseudomonas* آنزیم آمینو سیکلوپروپان -۱-کربوکسیلات دی‌آمیناز تولید می‌کند که بلافاصله آمینو سیکلوپروپان -۱-کربوکسیلات را به پیش‌ماده اتیلن برای ساخت آمونیاک و آلفاکتوبوتیرات تجزیه می‌کند.

جدول ۵ - مقایسه میانگین اثر متقابل صفات مورد بررسی لوبیا تحت تاثیر شوری و سویه‌های مختلف باکتری *Pseudomonas*.

Table 5- Means comparison of interaction effect in evaluated characteristics of bean under salinity stress and different strains of Pseudomonas sp.

شوری (میلی موس بر سانتی‌متر) Salinity (Mmos/cm)	باکتری Bacteria	وزن خشک ساقه‌چه (گرم) Shoot dry weight	وزن خشک ریشه‌چه (گرم) Root dry weight (g)	طول ریشه‌چه (میلی‌متر) Radicle (mm) length	درصد جوانه‌زنی Percent germination	ضریب آلومتریک Allometric coefficient
0	*P. putida*strain 108	0.053a	0.034a	31.1a	89.19a	1.37a
0	*P. putida*strain 169	0.057a	0.026b	24.33b	88.85a	1.06b
0	*P. putida*strain 153	0.037c	0.028b	21.66c	89.52a	0.57d
0	*P. putida*strain 4	0.043b	0.016d	21.76c	89.14a	0.47ef
0	بدون تلقیح Uninoculation	0.017d	0.008e	19.96d	72b	0.34g
2.5	*P. putida*strain 108	0.043b	0.033a	30.89a	72.63b	0.78c
2.5	*P. putida*strain 169	0.057a	0.025bc	25.22b	61.69c	0.72c
2.5	*P. putida*strain 153	0.033c	0.026bc	20.77c	61.59c	0.53de
2.5	*P. putida*strain 4	0.017d	0.015d	19.44d	43.73d	1.37a
2.5	بدون تلقیح Uninoculation	0.017d	0.015d	21.44c	40.48d	0.41g
5	*P. putida*strain 108	0e	0.007e	0d	0e	0.32g
5	*P. putida*strain 169	0e	0f	0d	0e	0h
5	*P. putida*strain 153	0e	0f	0d	0e	0h
5	*P. putida*strain 4	0e	0f	0d	0e	0h
5	بدون تلقیح Uninoculation	0e	0f	0d	0e	0h
7.5	*P. putida*strain 108	0e	0f	0d	0e	0h
7.5	*P. putida*strain 169	0e	0f	0d	0e	0h
7.5	*P. putida*strain 153	0e	0f	0d	0e	0h
7.5	*P. putida*strain 4	0e	0f	0d	0e	0h
7.5	بدون تلقیح Uninoculation	0e	0f	0d	0e	0h

در هر ستون، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک هستند، بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.

Means in each column followed by similar letter(s) are not significantly different at 5 % probability level, using Duncan's Test.

کاهش غلظت آمینو سیکلوپروپان -۱-کربوکسیلات درون گیاه باعث کاهش مقدار اتیلن شده در گیاه و به دنبال آن سبب کاهش اثر بازدارندگی اتیلن بر طوبل شدن ریشه و هدایت به سمت طویل شدن می‌گردد (Patten & Glick, 1996). باکتری‌های مصرف‌کننده آمینوسیکلو پروپان -۱- کربوکسیلات

از طریق کاهش غلظت اتیلن درون گیاه و تبدیل آن به منابع نیتروژن، باعث طویل شدن ریشه‌ها می‌گردند (Carteaux *et al.*,2003).

دلیپ‌کومار و همکاران (Dileep Kumar *et al.*, 2001) نشان دادند که تلقیح بذور نخود با *P.fluorescens* منجر به افزایش طول ساقه نسبت به تیمار شاهد شد. اخگر و همکاران (Akhgar *et al.*, 2011) نشان دادند که بذور کلزای تلقیح شده با *P.fluorescens* طول ساقه و ریشه را نسبت به شاهد ۲۱/۷ و ۲۶/۸ درصد افزایش داد. گزارش شده است که *P.fluorescens* باعث افزایش طول ساقه‌چه و ریشه‌چه در کلزا، کاهو و گوجه‌فرنگی شده است (Hall *et al.*, 1996). افزایش طول ساقه‌چه را می‌توان به تولید فیتوهورمون‌ها نسبت داد (Gholami*et al.*, 2009)، زیرا این باکتری‌ها با آزاد کردن هورمون-هایی مثل جیبرلین و اکسین و با تولید یک سری آنزیم‌ها، سنتز آنتی‌بیوتیک‌ها (Ahmad & Khan, 2006) و مقاومت به شرایط نامساعد، باعث رشد و استقرار بهتر گیاهچه می‌شوند.

در آزمایشی دیگر بیان شد که کاربرد *P.fluorescens* باعث افزایش طول ریشه‌چه و ساقه‌چه شد که این افزایش رشد را به دلیل آزاد شدن تنظیم کننده‌های رشد توسط باکتری حل کننده فسفات و در اختیار گرفتن بهتر مواد غذایی توسط گیاه تشخیص دادند (Saravanakumar & Samiyappan, 2007).

درصد و سرعت جوانه‌زنی

تاثیر شوری، باکتری و برهم‌کنش شوری در باکتری بر سرعت جوانه‌زنی در سطح یک درصد و تاثیر شوری و برهم‌کنش شوری در باکتری بر درصد جوانه‌زنی در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول۲).

با توجه به جدول ۳ می‌توان بیان کرد که در سطوح شوری ۵ و ۷/۵میلی‌موس بر سانتی‌متر، جوانه-زنی صفر بوده است. بیشترین میزان درصد و سرعت جوانه‌زنی به ترتیب به میزان ۴۰/۴۵ درصد و ۲/۸۵ درصد در تیمار *P.putida* strain 108 و کمترین میزان ۲۸/۱۲ درصد در تیمار بدون تلقیح و ۲/۴۶ درصد در تیمار *P.putida* strain 4 مشاهده شد (جدول ۴). هرناندز و همکاران (Hernandez *et al.*,1995) مشاهده کردند که تلقیح بذور با *P.fluorescens* سبب افزایش درصد جوانه‌زنی گردید. توانایی ظهور گیاهچه، جنبه مهمی از کیفیت بذر است که بستگی به جوانه‌زنی بالا دارد (Piteta-filho & Ellis, 1991). باراتی و همکاران (Barathi *et al.*,2004) معتقدند که افزایش تولید هورمون جیبرلین سبب آزاد شدن آنزیم‌هایی مانند آلفا آمیلاز شده و در نتیجه جوانه‌زنی تسریع می‌گردد.

بیاری و همکاران (Bayari *et al.*, 2009) بیان کردند که بین سرعت جوانه‌زنی و درصد جوانه‌زنی بذور ذرت رابطه مثبت و معنی‌داری وجود دارد و تاثیر باکتری‌ها بر جوانه‌زنی بیشتر ناشی از اثر آنها بر طول ریشه در مقایسه با طول ساقه بوده است. گراسیادیسالامون(Gracia de Salamone, 2000) گزارش کرد که تأثیر *P.Fluorescens* بر تحریک رشد گیاه به دلیل تولید فیتوهورمون‌های سیتوکنین بود. احمدزاده و همکاران (Ahmadzadeh *et al.*, 2004) نیز با بررسی تأثیر *P.fluorescens* روی قارچ عامل پوسیدگی بذر لوبیا به این نتیجه رسیدند که ۳۱ سویه از ۴۱ سویه *P.fluorescens* مورد بررسی قادر به ممانعت از رشد قارچ بیمارگر و حفاظت از بذر بودند و بدینطریق موجب کاهش پوسیدگی و افزایش جوانه-زنی شدند.

شاخص ویگور طولی

اثر شوری و باکتری بر شاخص ویگور در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). با توجه به جدول ۳ می‌توان بیان کرد که در سطوح شوری ۵ و ۷/۵ میلی موس بر سانتی‌متر، شاخص ویگور صفر بوده است. بیشترین شاخص ویگور در تیمار *P.putida* strain 108 و کمترین میزان در تیمار بدون تلقیح مشاهده شد (جدول ۴). شانموگایا و همکاران (Shanmugaiah *et al.*, 2009) بیان کردند که تلقیح بذر پنبه با *P.fluorescens* سبب افزایش ۲۰ درصدی شاخص ویگور نسبت به تیمار شاهد شد و

آن‌ها علت این امر را تولید هورمون‌های گیاهی و متابولیت‌های ثانویه دانستند.

ضریب آلومتریک

تاثیر شوری، باکتری و برهم‌کنش آنها بر ضریب آلومتریک در سطح یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). برهم‌کنش شوری در باکتری نشان داد که تیمار سطح شوری ۲/۵ میلی‌موس بر سانتی‌متر و *P.putida* strain 108 (۱/۳۷) بیشترین و سطح شوری صفر و *P.fluorescens* strain 169 (۱/۰۶) در رتبه بعدی قرار گرفت (جدول ۵).

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتایج نشان داد که باکتری‌های *Pseudomonas* (بخصوص *P.putida* strain 108) از طریق همزیستی با بذر و احتمالاً به دلیل ترشح موادی چونACC دآمیناز و هورمون‌هائی چون اتیلن می‌توانند باعث تحریک جوانه‌زنی و نیز مقاومت در برابر تنش شوری شوند که نتایج ما با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (Kaymak*et al.*, 2009; Mayak, 2004). البته همان‌گونه که در برخی از منابع نیز ذکر شده است، این ریزجانداران از طریق فیلترکردن عناصر، از ورود بیش از حد یون‌های سمی به داخل بذر نیز عمل کرده و احتمال می‌رود که از این طریق نیز می‌توانند باعث افزایش تحمل گیاه در مراحل اولیه رشد رویشی شوند.

References

Ahmad, F. and Khan, M.S. 2006. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. **Microbial Res.** 36: 1-9.

Ahmadzadeh, M., Sharifi Tehrani, A. and Talebi Jahromi, K. 2004. Study on production of some antimicrobial metabolites by *fluorescent pseudomonads*. **Iranian J. Agri. Sci.** 35(3): 731-739. (In Farsi)

Akhgar, A., Khavazi, K. and Khakipoor, N. 2011. Isolation, identification and effectiveness of ACC deaminase producing rhizobacteria on the alleviation of salinity stress effects on canola growth. **J. Water Soil Sci. Agric. Indust.** 25 (1): 29-41.

Barathi, R., Vivekananthan, R., Harish, S., Ramanathan, A. and Samiyappan, R. 2004. Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. **Crop Protection,** 23: 835–843.

Bayari, A., Nezarat, S. and Gholami, A. 2009. Relationship between germination index of seed corn with inoculation of PGPR (*Pseudomonas*, *Azospirillium* and *Azotobacter*).11thSoil Science Congress of Iran, Gorgan.

Becking, J.H. 2006.**Prokaryotes.** 6: 759-783.

Cartieaux, F. P., Nussaume, L. and Robaglia, C. 2003. Tales from the underground: molecular plant rhizobacteria interactions. **Plant Cell Environ.** 26: 189-199.

Dileep Kumar, S.B., Berggren, I., and Martensson, A.M. 2001. Potential for improving pea production by coinoculation with *Fluorescent Pseudomonas* and Rhizobium. **Plant Soil,** 229: 25-34.

Gahoonia, T.S., Care, D. and Nielsen, N.E. 1997. Root hairs and phosphorus acquisition of wheat and barley cultivars. **Plant Soil.** 191: 181–188.

Gholami, A., Shahsavani, S. and Nezarat, S. 2009. The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination, Seedling Growth and Yield of Maize. **World Academy of Science, Engineering and Technology.** Pp. 19-24.

Goenadi, D.H., Siswanto, Y. and Sugiarto, Y. 2000. **Soil Sci. Society America J.** 64: 927-932.

Gracia de Salamone, I. E. G. 2000. Direct beneficial effects of cytokinin producing rhizobacteria on plant growth. **Ph.D. Thesis,** University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.

Grichko, V. P. and Glick, B. R. 2001. Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth promoting bacteria. **Plant Physiol. Biochem.** 39: 11-17.

Hall, J. A., Pierson, D., Ghosh, S. and Glick, B. R. 1996. Root elongation in various agronomic crops by the plant growth promoting rhizobacterium *Pseudomonasputida* GR12-2. **J. Plant Sci.** 44: 37–42.

Hampton, J. G. and Tekrony, D. M. 1995. Handbook of vigour test methods. International Seed Testing Association (ISTA). Zurich, Swirztland, 730p.

Hernandez, A. N., Hernandez, A. and Heydrich, M. 1995. Selection of rhizobacteria for use in maize cultivation. **Cultivate Tropicales.** 6: 5-8.

Hu, Y. and Shmidhalter, U. 2001. Effects of salinity and macronutrient levels in wheat. **J. Plant Nutri.** 24: 273-281.

Kaymak, H. A., Guvenc, I., Yarali, F., Denmez, M. F. 2009; the effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanussativus* L.) seeds under saline conditions. **Turkish J. Agric.** 33: 173-179.

Klee, H. J., Hayford, M. B., Kretzmer, K. A., Barry, G. F. and Krishore, G. M. 1991.Control of ethylene sysnthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants. **Plant Cell.** 3: 1187-1193.

Kloepper, J. W., Lifshittz, R. and Zablotowicz, R. M. 1989. Free-living bacterial inocula for enchancing crop productivity. **Trends Biotech.** 7: 39-43.

Koocheki, A. and Banayan, M. 2004. **Cultivation of legumes.** Jahad Daneshgahi Mashhad Press, 236p.

Lifshitz, R., Kloepper, J. W., Kozlowski, M., Simonson, C., Carlson, J., Tipping, E. M. and Zaleska, I. 1987. Growth promotion of canola (rapeseed) seedling by a strain of *Pseudomonas putida* undernote biotic conditions. **Canadian Journal of Microbiology,** 33: 390-395.

Mayak, S. 2004. Plant growth promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. **Plant Physiol. Biochem.** 42: 565-572.

Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B. R. 2004a. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. **Plant Sci.** 66: 525-530.

Mayak, S., Tirosh, T. and Glick, B.R. 2004b.Plant growth-promoting bacteria that confer resistance in tomato plant to salt stress. **Plant Physiol. Biochem.** 42: 565-572.

Patten, C. and Glick, B. R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian J. Microbiol.** 42: 207-220.

Penrose D.M. and Glick B. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. **Plant Physiol.** 118: 10-15.

Pieta-Filho, C. and Ellis, R. H. 1991. The development of seed quality in spring barley in four environments: A. Germination and longevity. **Seed Sci. Res.** 1: 163-177.

Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. and Bhatti, A. S. 2007. Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. **J. Indean Microb. Biotech.** 34: 635-648.

Saravanakumar, D. and Samiyappan, R. 2007. Accdeaminas from Pseudomonas fluorescens mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) Plants. **J. Applied Microb.** 102 (5): 1283-1292.

Scott, S. J., Jones, R. A. and Williams, W. A. 1984. Review of data analysis methods for seed germination. **Crop Sci.** 24: 1192-1199.

Shanmugaiah, V., Balasubramanian, N., Gomathinayagam, S., Manoharan P. T. C. and Rajendran, A. 2009. Effect of single application of *Trichodermaviride*and*Pseudomonas fluorescens*on growth promotion in cotton plants. **African J. Agric. Res.** 4 (11): 1220-1225.

Sharma, A. K. 2002. **Biofertilizers for sustainable agriculture.**1st edition. Agrobios, India, 456p.

Sperber, J. I. 1958. The incidence of apatite-solbilizing organisms in the rizhosphere and soil. **Australian J. Agric. Res.** 9: 778-781.

Wang, C., Wang, D. and Zhou, Q. 2004. Colonization and persistence of a plant growth promoting bacterium *Pseudomonas fluorescens*strain CS85, on roots of cotton seedlings.**Canadian J. Microb.** 50: 475-481.

Zabihi, H.R., Savaghebi, G.R., Khavazi, K. and Ganjali, A. 2009.Effect of application of *Pseudomonas fluorescens* on yield and yield components of wheat under different soil salinity levels. **J. Water Soil Sci. Agricultural Industries,** 23 (1): 199-208.

Zaidi, S.F.A. 2003.Inoculation with Bradyrhizobiumjaponicum and *Fluorescent pseudomonas* to control *Rhizoctoniasolani* in soybean (*Glycine max* (L.) Merr). **Ann. Agric. Res.** 24: 151-153.

Effect of pseudomonas different strains on germination and growth index of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedling in different levels of salinity

Seyed Mohammad reza Ehteshami[1]*, Mohil Pour ebrahimi Fumani[2], Hassan Ramezani[3]

1-Assistant Professor, Department of Agronomy, University of Guilan, Iran.
2- M.Sc former student, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Iran.
3-M. Sc. of Biology, Department of Biology University of Abu-Ali Sina, Hamedan, Iran.
*Corresponding author:smrehteshami@yahoo.com

Received: 2013.09.16 **Accepted: 2014.01.16**

Abstract

In order to evaluate the effect of *Pseudomonas* different strains on germination and seedling growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under salinity stress, an experiment was conducted as factorial based on completely randomized design with three replications. Treatments included salinity levels (0, 2.5, 5, 7.5 mmhos/cm) and seed inoculation with *Pseudomonas* different strains (Uninoculation, *P.fluorescens*strain 153, *P.fluorescens*strain 169, *P.putida*strain 108, *P.putida*strain 4). As increased salinity, decreased germination percentage, germination speed, radicle length, shoot length, radicle dry weight and shoot dry weight, but this reduction was significantly lower in the treatments inoculated with bacteria. Results showed that bean seeds hadn't good germination in salinity levels of 5 and 7.5 mmhos/cm and salinity stress had negative effect on seedling appearance. The highest of radicle and shoot length, speed and percentage of germination, vigor index and Alometric coefficient obtained in without salinity and *P. putida*strain 108. In general, the results of experiment showed growth promoting bacteria can increase tolerance to salinity stress in bean in germination time.

Key words: Bean, Germination speed, *Pseudomonas*, Salinity, Seedling