

Effect of different Concentrations of *Bacillus subtilis* on Flower and corm features in two saffron ecotypes

Fahimeh Salehi¹, Mitra Aelaei^{2*}, Seyed Najmeddin Mortazavi², Seyed Alireza Salami³,
Hassan Rezadoost chahardeh⁴

Received: 03 December 2021 Accepted: 22 September 2022

1-Ph.D. Graduate, Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

2- Assoc. Prof., Dept. of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Iran.

3- Prof., Dept. of Horticultural Sciences, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.

4- Assist. Prof., Medicinal Plants and Drugs Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

Corresponding Author Email: maelaei@znu.ac.ir

Abstract

Background and Objects: In order to determine the appropriate concentration of *Bacillus subtilis* under Zanjan's climate zone, the present study was conducted to study the effect of different concentrations of bacteria on morphophysiological features of flowers and corm in two saffron ecotypes.

Materials and Methods: Experiments were conducted with three replicates in two consecutive years 2017-2018 and 2018-2019 in research farm of Zanjan University. Five different concentrations of *B. subtilis* (zero, 10^2 , 10^5 , 10^6 , 10^8 cfu / ml) were examined on two ecotypes (Natanz, Zanjan).

Results: Different concentrations of bacteria showed significant effects on all morphophysiological traits were measured. The ecotype showed a significant effect on all traits (1 and 5%) except of fresh weight traits of stigma, chlorophyll and leaf antioxidants that were not significantly affected by the ecotype. Based on analysis of variance, bilateral interaction (year \times ecotype, ecotype \times bacterium) and tripartite interaction (bacterium \times year \times ecotype) on flower yield and phosphorus content of saffron leaves were significant. The interaction of ecotype \times bacterium on stigma dry weight, leaf antioxidant, peroxidase and leaf phosphorus was not significantly difference. Mother corms of Natanz ecotype showed more fresh and dry weight and also corm diameter (16.29, 10.99 g and 19.71 mm, respectively).

Conclusion: Considering the effects of *B. subtilis* on saffron ecotypes, it can be concluded that saffron ecotypes show different response to bio fertilizer due to their growth differences. According to the results, the most effective concentration of *B. subtilis* on morphophysiological traits was obtained with 10^8 cfu/ml.

Keywords: Bio-fertilizer, Corm, Ecotype, Phosphorus, Yield

تأثیر غلظت‌های مختلف باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر خصوصیات گل و بنه در دو اکوتیپ زعفران

فهیمة صالحی^۱، میترا اعلائی*^۲، سید نجم‌الدین مرتضوی^۱، سید علیرضا سلامی^۳، حسن رضا دوست چهارده^۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۶/۳۱

۱- دانش آموخته دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران.

۳- استاد، گروه علوم باغبانی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران.

۴- استادیار، پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

*مسئول مکاتبه: Email: maelaei@znu.ac.ir

چکیده

اهداف: پژوهش حاضر به منظور مطالعه اثر غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus subtilis* بر صفات مورفوفیزیولوژیکی گل و بنه در دو اکوتیپ زعفران به منظور تعیین غلظت مناسب باکتری، در شرایط آب و هوایی زنجان انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: آزمایش در سه تکرار در دو سال متوالی ۱۳۹۶-۱۳۹۷ و ۱۳۹۷-۱۳۹۸ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل پنج غلظت مختلف باکتری *Bacillus subtilis* (صفر، ۱۰^۲، ۱۰^۵، ۱۰^۶ و ۱۰^۸ cfu/ml) و دو اکوتیپ زعفران (نطنز و زنجان) بود.

یافته‌ها: غلظت‌های مختلف باکتری روی تمامی صفات مورفوفیزیولوژیکی اندازه‌گیری شده اثر معنی‌داری را نشان داد. اثر اصلی اکوتیپ تأثیر معنی‌داری بر روی صفات در سطح یک و پنج درصد از خود نشان داد به جز صفات وزن تر کلاله، کلروفیل و آنتی اکسیدان برگ که تحت تأثیر اکوتیپ معنی‌دار نشدند. براساس نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل دو جانبه (سال × اکوتیپ و اکوتیپ × باکتری) و اثر متقابل سه جانبه (باکتری × سال × اکوتیپ) بر روی عملکرد گل و میزان فسفر برگ گیاه زعفران معنی‌دار شد. اثر متقابل دوگانه اکوتیپ × غلظت‌های مختلف باکتری در صفات وزن خشک کلاله، آنتی-اکسیدان برگ، آنزیم پراکسیداز و فسفر برگ معنی‌دار نشد. وزن تر و خشک و قطر بنه مادری در اکوتیپ نطنز (به ترتیب ۱۶/۲۹، ۱۰/۹۹ گرم و ۱۹/۷۱ میلی‌متر) بیشتر از اکوتیپ زنجان بود.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات باکتری باسیلوس سوبتیلیس روی اکوتیپ‌های زعفران می‌توان نتیجه گرفت که اکوتیپ‌های زعفران با توجه به تفاوت‌ها و خصوصیات رشدی مختلفی که دارند واکنش‌های متفاوتی نیز به کود زیستی نشان می‌دهند. با توجه به نتایج، بیشترین تأثیر باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر روی صفات مورفوفیزیولوژیکی، در غلظت ۱۰^۸ cfu/ml نمود پیدا کرد.

واژه‌های کلیدی: اکوتیپ، بنه، عملکرد، فسفر، کود زیستی

مقدمه

است. این گیاه یک گونه تریپلوئید و عقیم می‌باشد که به صورت رویشی از طریق بنه تکثیر می‌گردد (کاردونه و همکاران ۲۰۲۱). در مزارع زعفران معمولاً چهار تا پنج

زعفران (*Crocus sativus* L.) متعلق به خانواده زنبقیان، گیاهی نیمه گرمسیری، چند ساله و روز کوتاه

بنه دختری از هر بنه مادری در هر سال تولید می‌شود که در طی سه تا چهار سال به اندازه مطلوب برای گلدهی می‌رسند (شارما و پیکراس، ۲۰۱۰). زعفران علاوه بر ایران در کشورهای حاشیه دریای مدیترانه از اسپانیا، فرانسه، یونان، ایتالیا، ترکیه تا چین و هند کاشته می‌شود (ال میدائویی ۲۰۲۲). کل تولید سالیانه زعفران در جهان حدود ۲۰۵ تن است که بیش از ۸۰ درصد آن در ایران برداشت می‌شود (رولو و همکاران ۲۰۲۲). با توجه به کشت زعفران در نقاط مختلف و سازگار شدن محصول با شرایط خاص آب و هوایی، اکوتیپ‌های مختلفی از این گیاه در نقاط متفاوت وجود دارند که پارامترهای مختلفی مانند طول و وزن خشک کلاله‌ها، عملکرد کلاله، تعداد گل، تعداد و وزن بنه‌های دختری تحت تأثیر منشا جغرافیایی بنه قرار گرفته‌اند (سوکرات و همکاران ۲۰۱۹). عملکرد اکوتیپ‌ها از منطقه‌ای به منطقه‌ای دیگر تغییر می‌کند و این نشان دهنده‌ی اثر متقابل اکوتیپ با مناطق و محیط می‌باشد (امید بیگی ۲۰۰۰). ویژگی‌های خاص زعفران از جمله نیاز آبی کم، آبیاری در زمان‌های غیر بحرانی نیاز آبی سایر گیاهان، امکان بهره‌برداری از مزارع چند ساله با یک نوبت کاشت، امکان اشتغال‌زایی بالا، امکان کشت در مناطقی که فاقد استعدادهای صنعتی و دارای محدودیت آب کشاورزی می‌باشند، دارا بودن خواص دارویی زیاد و نیز بازار فروش داخلی و خارجی مناسب، عدم نیاز زراعت آن به ماشین‌آلات و تکنولوژی پیچیده این گیاه را از ارزش بالایی برای کشت و کار برخوردار نموده است (رستمی و محمدی، ۲۰۱۲). علی‌رغم قدمت کشت زعفران در مقایسه با بسیاری از محصولات رایج، این گیاه از فناوری‌های نوین سهم کمتری داشته و تولید آن بیشتر متکی بر دانش بومی می‌باشد (کوچکی ۲۰۰۴). از طرفی زعفران همچون گیاهان زراعی دیگر برای استفاده حداکثر از پتانسیل محیط، علاوه بر شرایط آب و هوایی و خاک مناسب نیازمند مدیریت زراعی بهینه جهت دستیابی به حداکثر عملکرد و افزایش طول دوره بهره‌برداری دارد که در این راستا یکی از موارد مورد توجه به منظور دسترسی به مواد مغذی کاربرد کودهای شیمیایی و زیستی می‌باشد (رضوانی مقدم و همکاران ۲۰۱۳). ولی یکی از نتایج منفی استفاده از کودهای

شیمیایی، 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 (آرماک و همکاران ۲۰۱۸). همچنین، این کودها در دراز مدت خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک را تخریب کرده و نفوذ ریشه گیاهان را دچار مشکل می‌سازند که در نهایت کاهش عملکرد را به دنبال خواهند داشت (وو و همکاران ۲۰۰۴). کاهش این مخاطرات زیست محیطی همگام با افزایش عملکرد گیاهان نیازمند استفاده از تکنیک‌های نوین زراعی است. از جمله این تکنیک‌ها، استفاده از جامعه زنده و فعال ریز جانداران خاکزی می‌باشد که قادر به بالا بردن حاصلخیزی خاک، افزایش رشد و عملکرد محصول می‌باشند (زنگ و همکاران ۲۰۱۳). یکی از این ریزجانداران خاکزی، باکتری محرک رشد *Bacillus subtilis* می‌باشد که از نظر رده‌بندی در شاخه‌ی Firmicutes و رده‌ی Bacilli، راسته‌ی Bacillales و تیره‌ی Bacillaceae قرار دارد. این باکتری تا دمای ۴۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد را به همراه خشکی محیط می‌تواند تحمل کند در نتیجه امروزه در کشاورزی کاربرد گسترده‌ای دارد (اوزیبی ۲۰۰۸). بررسی‌های انجام شده نشان داد که کودهای زیستی سبب افزایش وزن تازه گل‌ها در گیاه زعفران شده‌اند و بیش از ۲۵ درصد از نیاز خود به ازت را از طریق این کودها به دست می‌آورند (جامی و همکاران ۲۰۲۰). با توجه به گزارشی که توسط گوتیرز-مانرو (۲۰۰۱) ارائه شد، باکتری‌ها با تولید هورمون جیبرلین سبب افزایش طول گل و کلاله و در نهایت وزن آن‌ها شده‌اند. در آزمایشی تلفیح گیاه مرزنگوش با سودوموناس و برادی ریزوبیوم، وزن تر اندام هوایی را ۲/۲ برابر افزایش داد (زنگ و همکاران ۲۰۰۷). کریمی و همکاران (۲۰۱۳) نشان داده‌اند که کودهای زیستی حاوی باکتری‌های حل‌کننده فسفات و تثبیت‌کننده نیتروژن باعث افزایش تعداد شاخه‌های جانبی و برگ گیاه لوبیا سبز شده‌اند. در نتیجه 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

سال زراعی ۱۳۹۷-۱۳۹۶ و ۱۳۹۸-۱۳۹۷ انجام شد. فاکتورها شامل پنج سطح باکتری باسیلوس سوبتیلیس (صفر، ۱۰^۲، ۱۰^۵، ۱۰^۶ و ۱۰^۸ cfu/ml) و دو اکوتیپ (نظنز و زنجان) بودند.

به منظور انجام آزمایش، از بنه‌هایی با وزن بین ۱۰-۸ گرم استفاده شد. بنه‌ها در عمق ۲۰ سانتی‌متری خاک (جهت جلوگیری از سرمای شدید زمستان) در شهریور ماه در کرت‌هایی با ابعاد ۱/۵×۳ متر کاشته شدند. قبل از اجرای آزمایش از خاک محل اجرای طرح، نمونه خاک تهیه و برای تعیین خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک به آزمایشگاه منتقل شد. نتایج آنالیز خاک در جدول ۱ ارائه شده است.

باکتری برای افزایش کمیت و کیفیت محصول این گیاه، مطالعه حاضر با هدف بررسی نقش این محرک‌ها بر صفات مورفوفیزیولوژیکی انجام شد.

مواد و روش‌ها

این آزمایش با هدف بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری (*Bacillus subtilis*) روی خصوصیات مورفوفیزیولوژیکی دو اکوتیپ زعفران، به صورت قاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان (عرض جغرافیایی ۲۵ 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) در دو

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش تا عمق ۳۰ سانتی متری

رس	سیلت	شن	پتاسیم	فسفر	نیتروژن	درصد مواد خنثی	کربن آلی	شاخص واکنش	هدایت الکتریکی	بافت خاک
Clay (%)	Silt (%)	Sand (%)	K (ppm)	P (ppm)	N (%)	TNV(%)	OC (%)	pH	EC (ds.m ⁻¹)	Soil texture
۳۲/۹	۴۹/۵	۱۷/۴۶	۳۲۶	۱۴/۳۷	۰/۰۹	۱۴/۳۴	۱/۴۲	۸/۱۵	۲/۹۶	Silty-Loam

خشک آن‌ها به همراه خامه نیز تعیین شدند. در خرداد سال بعد با خشک شدن کامل اندام هوایی، عملیات برداشت بنه صورت گرفت. صفات مورفولوژیکی نظیر: وزن تر بنه مادری، وزن خشک بنه مادری، میانگین وزن تر بنه‌های دختری، میانگین وزن خشک بنه‌های دختری، قطر بنه مادری و قطر بنه‌های دختری اندازه‌گیری شد. قطر بنه‌ها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری و ثبت شد. وزن تر بنه مادری و میانگین وزن تر بنه‌های دختری نیز به کمک ترازو اندازه‌گیری شد و سپس در آون در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد و بعد از خشک شدن توسط ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری و ثبت گردید. برای اندازه‌گیری صفات فیزیولوژی نیز شامل: کلروفیل کل برگ به روش آرنون (۱۹۶۷)، آنتی اکسیدان برگ به روش براند-ویلیامز و همکاران (۱۹۹۵) و اندازه‌گیری آنزیم پراکسیداز به روش دهیندسا و همکاران (۱۹۸۱) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری آنتوسیانین گلبرگ: اندازه‌گیری آنتوسیانین به روش متانول اسیدی انجام شد. در این

آبیاری اول در مهر ماه انجام شد و همراه با آبیاری تزریق غلظت‌های مختلف باکتری در کنار هر بنه انجام گرفت. آبیاری‌های بعدی با توجه به بارندگی و براساس نیاز گیاه صورت گرفت. عملیات سله شکنی و وجین علف‌های هرز نیز در طی فصل رشد انجام شد. نمونه-برداری همزمان با شروع گلدهی زعفران در آبان ماه آغاز گردید، بدین صورت که گل‌های ظاهر شده در هر کرت به صورت روزانه اندازه‌گیری شده و شاخص‌هایی نظیر (عملکرد گل، وزن تر و خشک کلاله همراه خامه، کلروفیل برگ، آنتی‌اکسیدان برگ، فعالیت آنزیم پروکسیداز، آنتوسیانین گلبرگ و میزان فسفر برگ) تعیین شدند. جهت تعیین وزن تر و خشک کلاله و خامه گل‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند و وزن تر گل‌ها به کمک ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری و عملکرد گل در طی دوره‌ی گلدهی مشخص شد. سپس کلاله‌ها از گل‌ها جدا شده و وزن تر آن‌ها توسط ترازوی دیجیتالی (با دقت ۰/۰۰۱ گرم) اندازه‌گیری شد و بعد از خشک کردن کلاله‌ها در محیط اتاق و در سایه، وزن

همین‌طور ترشح آدنین از ریشه، تولید مواد هورمونی طی واکنش نیتريت ACC به وسیله آنزیم ACC دامیناز که در اثر نقش نیتراتی با اسید اسکوربیک تولید می‌گردد، مهم‌ترین سازوکار تأثیر این باکتری‌ها می‌باشد (حمیدی و همکاران ۲۰۲۱). تلقیح گیاه با باکتری‌های حل‌کننده‌ی فسفات (مانند *Bacillus subtilis*) اثر مثبتی بر جذب عناصر غذایی و عملکرد گیاه دارد (احتشامی و همکاران ۲۰۱۳). می‌توان اینگونه بیان کرد که تلقیح گیاهان با باکتری‌ها باعث افزایش رشد و نمو گیاهان شده است که در این صورت احتمال وجود مکانیسم‌های دیگری به غیر از تثبیت نیتروژن، از جمله تولید مواد تنظیم‌کننده رشد مانند اکسین علت افزایش رشد گیاه بوده است (کادر و همکاران ۲۰۰۲). 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 (کلپر و همکاران ۱۹۸۸). بنابراین باکتری‌ها می‌توانند با سایر میکروارگانیسم‌های ریزوسفر اثر هم‌افزایی (سینرژیست) مفیدی بر گیاهان داشته باشند (امیدی و همکاران ۲۰۱۰). نتایج پژوهش‌های شنگ (۲۰۰۵) نشان داد که تلقیح باکتری *Bacillus edaphicus* با 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. از طرفی اندازه بانه می‌تواند تأثیر معنی‌داری بر روی میزان گلدهی این گیاه داشته باشد در نتیجه بخصوص در سال دوم که بانه‌ها تحت تأثیر تیمار باکتری افزایش وزن و قطر داده‌اند عملکرد بالاتری را شاهد هستیم که با گفته‌های دیماسترو و راتا (۱۹۹۳) هم‌خوانی دارد. صادقی (۲۰۰۳) در یک آزمایش سه ساله اظهار داشت که بانه‌های درشت نه تنها محصول سال اول مزرعه را افزایش می‌دهند بلکه از طریق تولید بانه‌های دختری بزرگ تر محصول سال‌های بعد را نیز افزایش می‌دهند. تحقیق دیگری نشان داد که باکتری‌های حل‌کننده فسفات در گیاه *Phyllanthus amarus* از خانواده فرفیون، سبب افزایش معنی‌داری در عملکرد بیولوژیک گیاه می‌شوند (چژیان و همکاران ۲۰۰۳).

روش به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر داده‌ها قرائت و در فرمول زیر جایگزین شد (واگنر ۱۹۷۹).

$$A = \epsilon bc$$

ϵ : ضریب خاموشی معادل ۳۳۰۰۰ سانتی‌متر بر مول

b : عرض کوط برابر ۱ سانتی‌متر

c : مقدار آنتوسیانین بر حسب مول بر گرم

A : مقدار جذب

میزان فسفر با استفاده از روش رنگ‌سنجی و با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل U-1800 HITACHI در طول موج ۸۷۰-۸۸۰ نانومتر انجام شد (هودگسون ۲۰۰۴).

تجزیه و تحلیل داده‌های آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال آماری یک و پنج درصد مقایسه شدند.

نتایج و بحث

عملکرد گل

نتایج تجزیه واریانس صفت اندازه‌گیری شده در طی دو سال آزمایش نشان می‌دهد که غلظت‌های مختلف باکتری در هر دو سال، عملکرد گل را در هر متر مربع تحت تأثیر قرار دادند ($p < 0/01$) (جدول ۲). اثر متقابل سال کشت \times اکوتیپ‌های زعفران، سال کشت \times غلظت‌های مختلف باکتری، اکوتیپ‌های زعفران \times غلظت‌های مختلف باکتری و اثر متقابل سه گانه این عوامل تأثیر معنی‌داری ($p < 0/01$) بر روی صفت عملکرد گل داشتند. بیشترین عملکرد 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 بالاتری نسبت به زعفران زنگان می‌باشد (به ترتیب ۲۸/۴۵ و ۲/۶۰ گرم در متر مربع) (شکل ۱). کودهای زیستی با ایجاد تعادل بین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه، ضمن افزایش رشد رویشی و انتقال آسمیلات‌های تولیدی حاصل از رشد رویشی، رشد زایشی را نیز افزایش داده‌اند. به نظر می‌رسد که تولید ایندول استیک اسید و سیتوکینین با استفاده از اسیدهای آمینه تربیتوفان و

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus subtilis* بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی زعفران

میانگین مربعات							
منابع تغییر	df	عملکرد گل	وزن تر کلاله به همراه خامه	وزن خشک کلاله به همراه خامه	وزن تر بنه مادری	وزن خشک بنه مادری	وزن تر خشک بنه مادری
تکرار	۲	۰/۳۵ ^{ns}	۰/۱۶ ^{ns}	۰/۲۹ ^{ns}	۰/۰۵ ^{ns}	۰/۰۵ ^{ns}	۰/۵۶ ^{ns}
سال	۱	۱۹۱۰۲/۰۰ ^{**}	۴۱۹۲/۷۰ ^{**}	۲۸۱/۳۲ ^{**}	۲۲۷/۰۴ ^{**}	۲۲۷/۰۴ ^{**}	۲/۱۱ [*]
سال × تکرار	۲	۰/۱۴ ^{ns}	۱/۸۸ ^{ns}	۰/۶۶ ^{ns}	۰/۲۸ ^{ns}	۰/۲۸ ^{ns}	۰/۵۱ ^{ns}
اکوتیپ	۱	۳۰۳۰/۹۹ ^{**}	۷/۹۴ ^{ns}	۱۱/۱۱ ^{**}	۱/۹۶ [*]	۱/۹۶ [*]	۶۳/۹۸ ^{**}
باکتری	۴	۱۲۸/۱۵ ^{**}	۱۳۴/۸۵ ^{**}	۱۰/۷۸ ^{**}	۲۸۵/۵۲ ^{**}	۲۸۵/۵۲ ^{**}	۴۸/۷۶ ^{**}
سال × اکوتیپ	۱	۲۸۹۳/۵۶ ^{**}	۹۷/۸۲ ^{**}	۱۰/۵۰ ^{**}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۳۵ ^{ns}
سال × باکتری	۴	۷۷/۱۶ ^{**}	۷/۹۵ [*]	۱/۳۰ ^{ns}	۱/۲۲ ^{ns}	۱/۲۲ ^{ns}	۰/۰۷ ^{ns}
اکوتیپ × باکتری	۴	۱۰/۴۳ ^{**}	۱۲/۴۱ ^{**}	۱/۱۰ ^{ns}	۱۲/۶۱ ^{**}	۱۲/۶۱ ^{**}	۶/۶۱ ^{**}
سال × باکتری × اکوتیپ	۴	۱۱/۶۰ ^{**}	۷/۲۲ [*]	۰/۲۶ ^{ns}	۰/۱۱ ^{ns}	۰/۱۱ ^{ns}	۰/۱۴ ^{ns}
خطا	۳۶	۲/۴۲	۲/۴۳	۰/۸۳	۰/۵۰	۰/۵۰	۰/۴۳
ضریب تغییرات (%)	-	۷/۳۰	۴/۱۷	۷/۵۰	۴/۴۰	۶/۵۵	۱۷/۹۶

ns عدم معنی‌داری، ** معنی‌داری در سطح ۱٪، * معنی‌داری در سطح ۵٪ است.

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus subtilis* بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی زعفران

میانگین مربعات							
منابع تغییر	df	قطر بنه مادری	قطر بنه دختری	کلروفیل	آنتی‌اکسیدان برگ	آنزیم پروکسیداز	آنتوسیانین گلبرگ
تکرار	۲	۰/۵۰ ^{ns}	۰/۸۰ ^{ns}	۰/۰۰۰۷ ^{ns}	۳/۳۴ ^{ns}	۰/۸۸ [*]	۴۱۰۰/۰۰۲ ^{ns}
سال	۱	۴۸/۰۴ ^{**}	۲/۳۸ ^{ns}	۰/۲۱ ^{**}	۲۵۰۸/۵۴ ^{**}	۱۹/۰۵ ^{**}	۷۲۶۰۰۰/۰۰ ^{**}
سال × تکرار	۲	۰/۰۴ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۰۲ ^{ns}	۲۱/۸۳ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۶۰۰۰/۰۰ ^{ns}
اکوتیپ	۱	۷/۱۳ ^{**}	۱۱۳/۶۳ ^{**}	۰/۰۰۰۰۰۰۰۶ ^{ns}	۲۷/۶۶ ^{ns}	۴/۱۸ ^{**}	۲۵۳۰۱۴/۰۳ ^{**}
باکتری	۴	۱۳۵/۱۶ ^{**}	۱۳۰/۱۷ ^{**}	۰/۰۲ ^{**}	۲۶۷۵/۲۰ ^{**}	۷/۹۵ ^{**}	۹۵۴۰۹۶/۷۵ ^{**}
سال × اکوتیپ	۱	۰/۲۲ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۱ ^{**}	۸۷۱/۸۸ ^{**}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۸۰۶۶۶/۶۶ ^{**}
سال × باکتری	۴	۰/۱۵ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۳ ^{**}	۳۰۸/۰۹ ^{**}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۸۹۱۶/۶۶ ^{**}
اکوتیپ × باکتری	۴	۳۱/۲۵ ^{**}	۱۷/۷۴ ^{**}	۰/۰۰۳ ^{**}	۷۶/۲۶ ^{ns}	۰/۱۸ ^{ns}	۸۹۷۲۹/۸۴ ^{ns}
سال × باکتری × اکوتیپ	۴	۰/۰۹ ^{ns}	۰/۰۱ ^{ns}	۰/۰۰۴ ^{**}	۴۱/۸۵ ^{ns}	۰/۰۰۱ ^{ns}	۳۱۰۸۳/۳۳ ^{**}
خطا	۳۶	۰/۴۸	۰/۶۷	۰/۰۰۰۳	۳۸/۴۶	۰/۲۱	۷۴۸۱/۰۹
ضریب تغییرات	-	۳/۵۸	۴/۹۵	۵/۴۴	۱۶/۶۹	۱۳/۱۵	۵/۱۸

ns عدم معنی‌داری، ** معنی‌داری در سطح ۱٪، * معنی‌داری در سطح ۵٪ است.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus subtilis* بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی زعفران

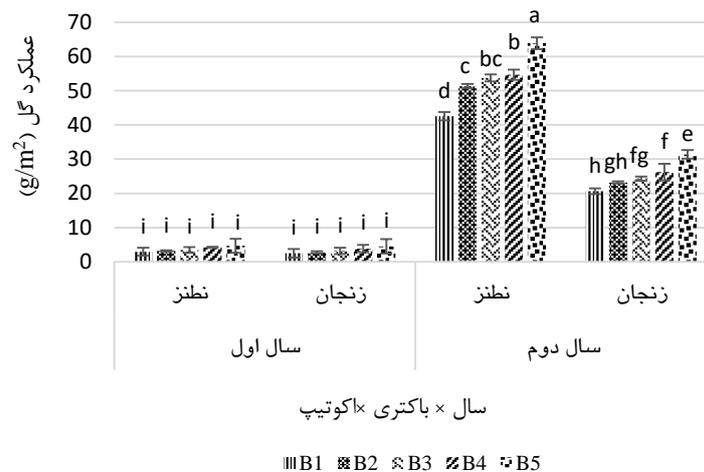
وزن خشک	وزن تر بانه	وزن خشک	وزن تر بانه	وزن خشک کلاله	وزن تر کلاله به	عملکرد گل	سال
بانه دختری	دختری	بانه مادری	مادری	به همراه خامه	همراه خامه	(g.m ⁻²)	
(g)	(g)	(g)	(g)	(mg)	(mg)		
۳/۴۹ ^a	۶/۵۳ ^b	۸/۸۷ ^b	۱۴/۱۴ ^b	۶/۳۶ ^a	۲۹/۰۳ ^b	۳/۵۰ ^b	سال اول
۳/۸۸ ^a	۵/۵۶ ^a	۱۲/۷۶ ^a	۱۸/۰۳ ^a	۶/۸۴ ^a	۴۵/۷۵ ^a	۳۹/۱۹ ^a	سال دوم
							اکوتیپ
۲/۶۴ ^b	۵/۰۱ ^b	۱۰/۹۹ ^a	۱۶/۲۹ ^a	۶/۸۵ ^a	۳۷/۷۵ ^a	۲۸/۴۵ ^a	نطنز
۴/۷۳ ^a	۷/۰۸ ^a	۱۰/۶۳ ^a	۱۵/۹۰ ^a	۶/۳۶ ^b	۳۷/۰۳ ^a	۱۴/۲۳ ^b	زنجان
							باکتری
۱/۲۱ ^e	۳/۴۲ ^e	۴/۷۱ ^e	۹/۹۸ ^e	۶/۱۴ ^c	۳۲/۹۱ ^e	۱۷/۱۳ ^d	۰ cfu/ml
۲/۴۵ ^d	۴/۷۵ ^d	۷/۴۶ ^d	۱۲/۷۳ ^d	۶/۴۸ ^b	۳۵/۳۰ ^d	۲۰/۰۸ ^c	۱۰ ^۲ cfu/ml
۳/۵۸ ^c	۶/۰۱ ^c	۱۰/۶۹ ^c	۱۵/۹۶ ^c	۶/۵۱ ^b	۳۷/۹۳ ^c	۲۱/۱۷ ^{bc}	۱۰ ^۵ cfu/ml
۴/۸۲ ^b	۷/۲۵ ^b	۱۴/۸۰ ^b	۲۰/۰۷ ^b	۶/۷۶ ^b	۳۹/۳۶ ^b	۲۲/۲۴ ^b	۱۰ ^۶ cfu/ml
۶/۳۸ ^a	۸/۸۰ ^a	۱۶/۳۹ ^a	۲۱/۶۶ ^a	۷/۱۳ ^a	۴۱/۴۴ ^a	۲۶/۰۹ ^a	۱۰ ^۸ cfu/ml

میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.

جدول ۵- مقایسه میانگین اثر غلظت‌های مختلف باکتری *Bacillus subtilis* بر برخی صفات مورفوفیزیولوژیکی زعفران

فسفر برگ	آنتوسیانین	آنزیم پروکسیداز	آنتی اکسیدان	کلروفیل	قطر بانه	قطر بانه	سال
(ppm)	گلبرگ	(واحد در گرم	برگ	(mg.g ⁻¹ FW)	دختری	مادری	
	(mol.g ⁻¹)	وزن تر در دقیقه)	(mg.g ⁻¹ FW)		(mm)	(mm)	
۱۵۵۷/۹۷ ^b	۳/۷۹ ^a	۲/۹۷ ^b	۳۰/۶۷ ^b	۰/۳۸ ^a	۱۶/۳۳ ^b	۱۸/۴۶ ^b	سال اول
۱۷۷۷/۹۷ ^a	۴/۲۹ ^a	۴/۱۰ ^a	۴۳/۶۰ ^a	۰/۲۶ ^b	۱۶/۷۳ ^a	۲۰/۲۶ ^a	سال دوم
							اکوتیپ
۱۶۰۳/۰۴ ^b	۳/۶۴ ^b	۳/۸۱ ^a	۳۷/۸۱ ^a	۰/۳۳ ^a	۱۵/۱۶ ^b	۱۹/۷۱ ^a	نطنز
۱۷۳۲/۹۱ ^a	۴/۴۴ ^a	۳/۲۶ ^b	۳۶/۴۵ ^a	۰/۳۳ ^a	۱۷/۸۹ ^a	۱۹/۰۲ ^b	زنجان
							باکتری
۱۳۱۴/۴۳ ^e	۲/۹۵ ^e	۲/۴۰ ^e	۱۹/۰۸ ^e	۰/۲۶ ^c	۱۲/۵۸ ^e	۱۴/۸۵ ^e	۰ cfu/ml
۱۵۲۳/۴۷ ^d	۳/۷۵ ^d	۳/۰۹ ^d	۲۸/۵۶ ^d	۰/۳۰ ^b	۱۴/۳۷ ^d	۱۷/۵۶ ^d	۱۰ ^۲ cfu/ml
۱۶۲۷/۱۵ ^c	۴/۰۹ ^c	۳/۶۴ ^c	۳۵/۰۶ ^c	۰/۳۱ ^b	۱۶/۵۴ ^c	۱۹/۶۷ ^c	۱۰ ^۵ cfu/ml
۱۸۰۳/۱۸ ^b	۴/۴۵ ^b	۴/۰۲ ^b	۴۵/۳۲ ^b	۰/۳۶ ^a	۱۸/۰۱ ^b	۲۱/۰۵ ^b	۱۰ ^۶ cfu/ml
۲۰۶۱/۶۶ ^a	۵/۰۵ ^a	۴/۵۱ ^a	۵۷/۶۵ ^a	۰/۳۷ ^a	۲۱/۱۵ ^a	۲۳/۶۹ ^a	۱۰ ^۸ cfu/ml

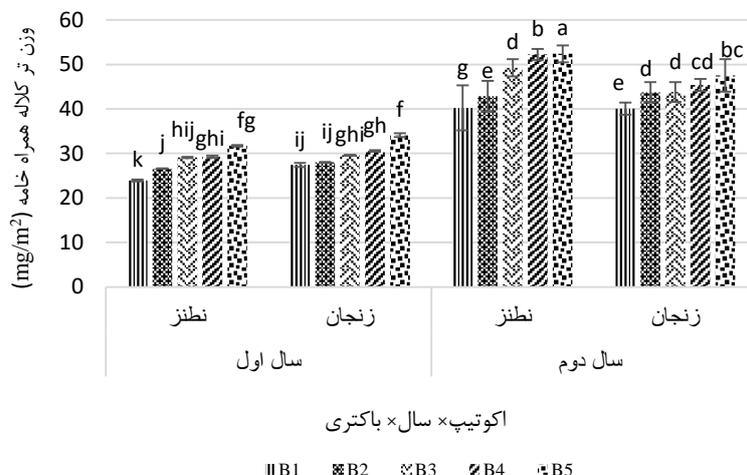
میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آزمون دانکن تفاوت معنی‌داری ندارند.



شکل ۱- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری اکوتیپ و سال و غلظت‌های مختلف باکتری برای عملکرد گل در زعفران (cfu/ml B₅: 10⁸, B₄:10⁶, B₃: 10⁵, B₂: 10², B₁: 0)

بسیاری در افزایش رشد کلاله و خامه دارد (ردماچر ۱۹۹۴). گیوتیرز- مانرو (۲۰۰۱) انواعی از جیبرلین‌ها را شناسایی نمودند که توسط *Bacillus sp.* تولید شده‌اند و تاثیر مثبتی بر بیشتر شدن رشد اندام‌های هوایی توسکای سیاه (*Alnus glutinosa*) داشته‌اند. افزایش بیشتر وزن خشک گیاهان تحت تاثیر ریزموجودات، مربوط به تولید و ترشح همین ترکیبات تحریک‌کننده رشد و برخی هورمون‌ها می‌باشد که در خاک تولید و رشد گیاه را تحت تاثیر قرار می‌دهد (کوچکی و همکاران ۲۰۱۱). با افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی در ناحیه ریزوسفر، افزایش سطح تماس ریشه و بهبود هم‌زیستی مفید با گیاه میزبان در مراحل مختلف رشد باکتری‌ها اثرات مثبت فراوانی بر روی گیاهان خواهند داشت (گلیک ۱۹۹۵). شرف‌الدین و همکاران (۲۰۰۸) در نتایج تحقیقات خود اظهار داشتند که تلقیح بانه زعفران با باکتری *Bacillus subtilis* باعث افزایش وزن کلاله شد. فایوری و همکاران (۲۰۰۷) تاثیر مثبت تیمار باکتری‌های *Bacillus subtilis* را بر کلیه صفات رویشی و زایشی زعفران گزارش نموده‌اند.

وزن تر و وزن خشک کلاله به همراه خامه در طی دو سال بهره‌برداری از مزرعه، وزن تر و وزن خشک کلاله تولید شده تحت تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری قرار گرفته و تفاوت معنی‌داری ($p < 0.01$) را نشان داد (جدول ۲). اثرات متقابل دو گانه اکوتیپ‌های زعفران × غلظت‌های مختلف باکتری و سال کشت × غلظت‌های مختلف باکتری و اثر سه گانه این عامل‌ها تاثیر معنی‌داری، روی صفت وزن تر کلاله داشت. بر روی وزن خشک کلاله نیز اثر متقابل دوگانه اکوتیپ‌های زعفران × سال کشت، سال کشت × غلظت‌های مختلف باکتری و همچنین اکوتیپ‌های زعفران × غلظت‌های مختلف باکتری تاثیر گذار بودند (جدول ۴). همان‌گونه که در جدول ۳ نشان داده شده است، بیشترین مقدار وزن خشک کلاله در غلظت ۱۰^۸ cfu/ml (۷/۱۳ میلی‌گرم در متر مربع) و کمترین در شاهد (۶/۱۴ میلی‌گرم در متر مربع) به دست آمد. بیشترین وزن تر کلاله در اثر متقابل سه گانه در سال دوم در اکوتیپ نطنز و در غلظت ۱۰^۸ cfu/ml (۵۲/۳۸ میلی‌گرم در متر مربع) و کمترین نیز، سال اول در همین اکوتیپ و در شاهد (عدم کاربرد باکتری) (۲۳/۹۴ میلی‌گرم در متر مربع) مشاهده شد (شکل ۲). همین‌طور بیشترین وزن خشک کلاله (۶/۸۵ میلی‌گرم در متر مربع) مربوط به زعفران نطنز می‌باشد (جدول ۲). تیمار باکتری بر روی گیاهان سبب تولید هورمون‌های مختلف از جمله جیبرلین می‌شود که این هورمون نقش



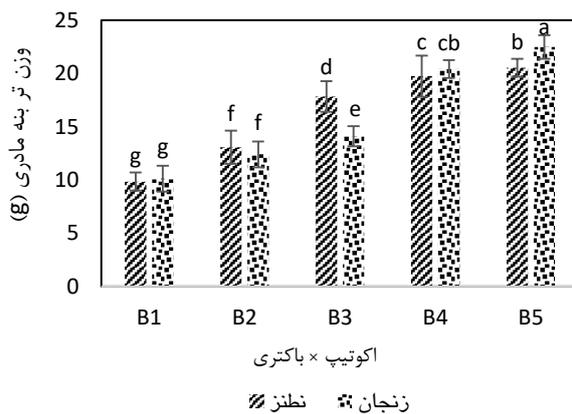
شکل ۲- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری اکوتیپ و سال و غلظت‌های مختلف باکتری بر وزن تر کلاله همراه خامه در زعفران. (cfu/ml B5: 108 .B4:106 .B3: 105 .B2: 102 .B1: 0)

شدن عناصری چون فسفر، منیزیم، کلسیم و پتاسیم و باعث در دسترس قرار گرفتن این عناصر برای ریشه گیاه، جذب آب و مواد غذایی و در نهایت افزایش رشد اندام‌هوایی و زیر زمینی گیاه می‌شوند (اسلامی و همکاران ۲۰۱۴). اصغری و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که تلقیح بذور خردل هندی (*Brassica juncea* L.) با باکتری‌های محرک رشد گیاه، رشد این گیاه را به طور معنی‌داری افزایش داد. سوافی هند و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند تیمار گیاه نعناع فلفلی (*Mentha piperita* L.) با ازتوباکتر کروکوکوم باعث افزایش وزن تر و خشک گیاه شد. طی آزمایشی که روی گیاه دارویی مریم گلی (*Salvia officinalis* L.) تحت تأثیر کودهای زیستی حاوی آزوسپریلیوم و ازتوباکتر صورت گرفت افزایش ارتفاع بوته و وزن تر و خشک اندام‌های هوایی در گیاه مشاهده شد (یوسف و همکاران ۲۰۰۴). در محیط ریشه گیاه، باکتری‌های محرک رشد با ساخت و ترشح برخی مواد بیولوژیکی فعال مانند اکسین‌ها، جیبرلین‌ها، ویتامین‌های گروه B، اسید نیکوتینیک، اسید پنتوتنیک، بیوتین و غیره در افزایش رشد اندام‌های گیاهی نقش موثری ایفا نموده‌اند (کاردیکیان و همکاران ۲۰۰۸).

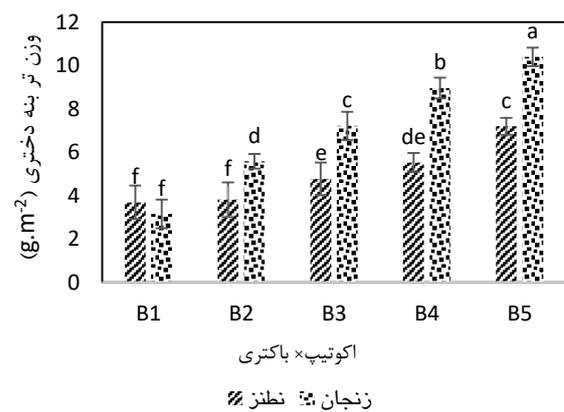
وزن تر و خشک بانه مادری و میانگین وزن تر و خشک بانه دختری

وزن تر و خشک بانه مادری و بانه‌های دختری طبق جدول تجزیه واریانس، تحت تأثیر اثر متقابل سه گانه، اختلاف‌های معنی‌داری را در سطح پنج ($p < 0.05$) و یک درصد ($p < 0.01$) نشان داد (جدول ۲). اثر متقابل اکوتیپ-های زعفران \times غلظت‌های مختلف باکتری برای این صفات در سطح یک درصد ($p < 0.01$) معنی‌دار شد (جدول ۲). بیشترین وزن تر بانه مادری در اکوتیپ زنجان با تیمار باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml (۲۲/۴۸ گرم) و کمترین در اکوتیپ نطنز و در شاهد (عدم کاربرد باکتری) (۹/۸۴ گرم) مشاهده شد (شکل ۳). در صفت میانگین وزن تر بانه دختری نیز بیشترین وزن تر در اکوتیپ زنجان با تیمار باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml (۱۰/۴ گرم) و کمترین در اکوتیپ زنجان و در شاهد (۳/۱۵ گرم) مشاهده شد (شکل ۳). تلقیح گیاه با باکتری‌های محرک رشد شامل افزایش شاخص‌های متعددی مانند افزایش سرعت رشد اندام زیرزمینی، میزان تولید در واحد سطح، افزایش وزن ریشه و اندام هوایی می‌باشد. همچنین باکتری‌ها با ترشح هورمون‌های رشدی موجب گسترش ریشه گیاه، محلول

زراعی مختلف اشاره کرده‌اند و آن را به ترشح هورمون-های گیاهی و آزادسازی انواع اسیدهای آلی در خاک، تثبیت نیتروژن و در نهایت، برهمکنش مثبت بین آن‌ها و سایر ریزموجودات خاک نسبت داده‌اند (یادگاری و همکاران ۲۰۱۰).



فراهمی عناصر غذایی توسط باکتری‌های محرک رشد، نظیر فسفر، آهن، مس، روی و به ویژه نیتروژن سبب افزایش فتوسنتز، تحریک رشد گیاه و بهبود ماده خشک گیاهی گردیده است که این مسئله در نهایت باعث افزایش عملکرد گیاه می‌گردد. بسیاری از محققان به نقش مثبت ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه، بر عملکرد محصولات



شکل ۳- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری اکوتیپ و غلظت‌های مختلف باکتری بر وزن تر بنه مادری در زعفران. (B₂: B₁: 0) (cfu/ml B₅: 10⁸, B₄: 10⁶, B₃: 10⁵, 10²)

عملکرد خوب این گیاه را استفاده از کودهای زیستی دانستند. از آن جایی که زعفران یک محصول چند ساله می‌باشد، لذا سازگاری خوبی نسبت به کودهای زیستی نشان می‌دهد و استفاده از آن در زراعت زعفران موجب افزایش وزن تازه و خشک و درصد ماده خشک بنه‌ها شده و میزان ریشه‌های بنه را افزایش می‌دهد که این اثرات ممکن است در نتیجه افزایش دسترسی به عناصر مورد نیاز گیاه و در نهایت سبب رشد بهتر گیاه گردد (بهدانی و همکاران ۲۰۰۵). فیضی و همکاران (۲۰۱۴) اظهار داشتند روند تشکیل بنه‌های دختری زعفران اساساً وابسته به اندازه بنه مادری است. در نتیجه با توجه به اثر باکتری‌ها بر اندازه و عملکرد بنه‌های مادری، به دنبال آن افزایش تعداد و قطر بنه‌های دختری را نیز خواهیم داشت. غلامی و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که کاربرد باکتری‌ها موجب افزایش قطر در گیاهان می‌گردد. کودهای زیستی با افزایش جذب نیتروژن و افزایش کارایی این عنصر در فرآیند فتوسنتز و تولید سطح سبز، موجب افزایش رشد در سایر اندام‌های گیاهی خواهند

قطر بنه مادری و میانگین قطر بنه‌های دختری

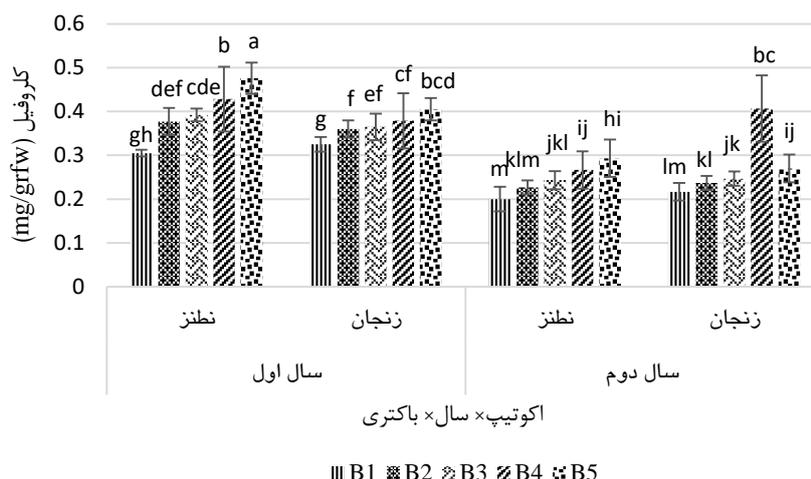
طبق نتایج حاصل از قطر بنه مادری و میانگین قطر بنه‌های دختری، اختلاف معنی‌داری بین تیمار غلظت‌های مختلف باکتری و اکوتیپ‌های مختلف مشاهده شد. همچنین اثر متقابل اکوتیپ × باکتری در هر دو صفت تفاوت معنی‌داری ($p < 0.01$) را نشان داد (جدول ۳). بیشترین قطر بنه مادری تحت تیمار غلظت‌های مختلف باکتری مربوط به غلظت 10^8 cfu/ml (۲۳/۶۹ میلی‌متر) و کمترین در شاهد (۱۴/۸۵ میلی‌متر) مشاهده شد (جدول ۵). در صفت میانگین قطر بنه‌های دختری نیز بیشترین قطر در غلظت 10^8 cfu/ml (۲۱/۱۵ میلی‌متر) و کمترین در شاهد (۱۲/۵۸ میلی‌گرم) مشاهده شد (جدول ۵). براساس نتایج حاصل از آزمایش حاضر تاثیر معنی‌داری بین دو اکوتیپ نظنز و زنجان در خصوصیات اندازه‌گیری شده مشاهده شد. وجود تفاوت معنی‌دار در نتایج حاصل بین دو اکوتیپ نشانگر تاثیر شرایط محیطی در این زمینه بود. جامی‌الاحمدی و همکاران (۲۰۰۹) در مطالعه بر روی اکوسیستم‌های زراعی زعفران خراسان، یکی از علل

گرم وزن تر) مشاهده شد. نتایج تحقیق نعمتی و همکاران (۲۰۱۵) بیانگر آن بود که استفاده از کود زیستی افزایش غلظت کلروفیل را در برگ چای ترش به همراه دارد که با نتایج آزمایش ما هم‌خوانی داشت. همین‌طور کندی و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که در گندم تلقیح شده با باکتری غلظت کلروفیل و میزان فتوسنتز افزایش یافت. گیاهان تحت تاثیر باکتری‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای میزان جذب عناصر فسفر، پتاسیم و ازت را در استرومای برگ و تیلاکوئید بالا برده که به دنبال آن عملکرد محوری در بیوسنتز رنگیزه‌های فتوسنتزی بیشتر می‌گردد (هونگ و همکاران ۲۰۱۰). شارما (۲۰۰۲) در پژوهش خود نشان داد که تلقیح ماش (*Vigna radiate* L. با باکتری‌های حل‌کننده فسفات برتری بارزی از نظر محتوای کلروفیل برگ نسبت به تیمار شاهد داشت. علیزاده و همکاران (۲۰۲۰) نیز مشاهده کردند که در باقلا و کتان کاربرد ترکیبی قارچ میکوریزا و کود زیستی باکتریایی نسبت به عدم مصرف، بیشترین تاثیر را در افزایش جذب عناصر غذایی پرمصرف (نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم) و افزایش غلظت کلروفیل برگ داشت.

شد. در واقع باکتری‌های محرک رشد با در دسترس قرار دادن آب و عناصر غذایی کافی برای گیاهان از طریق تاثیر بر روی تقسیم و بزرگ شدن سلول‌ها در افزایش اجزای رویشی گیاه بسیار موثر می‌باشند (ابوباکر و جهان ۲۰۱۱).

کلروفیل برگ

بر اساس جدول تجزیه واریانس کلروفیل برگ تحت تاثیر غلظت‌های مختلف باکتری در سطح یک درصد معنی‌دار ($p < 0.01$) شد (جدول ۳). اثر متقابل سال \times غلظت‌های مختلف باکتری، سال \times اکوتیپ‌های زعفران، اکوتیپ \times غلظت‌های مختلف باکتری و اثر متقابل سه گانه در این صفت در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). بیشترین میزان کلروفیل در اثر متقابل سه گانه در سال اول، در اکوتیپ نطنز و در غلظت 10^8 cfu/ml (0.476 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین آن در شاهد (عدم کاربرد باکتری) (0.205 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد. در سال دوم نیز بیشترین کلروفیل در اکوتیپ زنجان و تیمار باکتری با غلظت 10^8 cfu/ml (0.41 میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین آن در اکوتیپ نطنز و در شاهد (عدم کاربرد باکتری) (0.2 میلی‌گرم بر



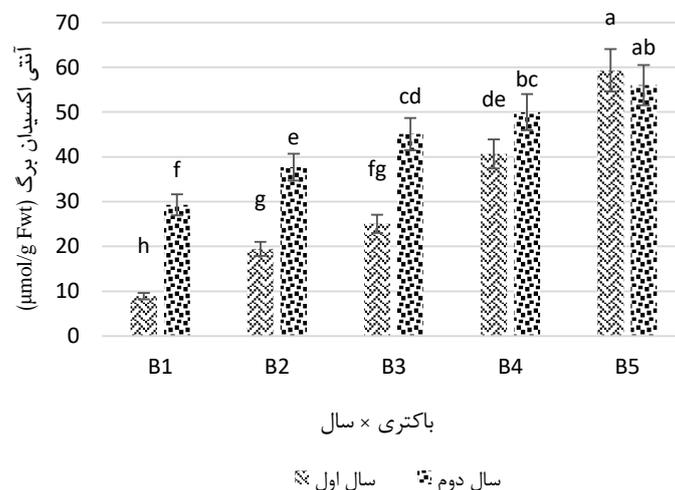
شکل ۴- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری اکوتیپ و سال و غلظت‌های مختلف باکتری بر میزان کلروفیل در زعفران.
(cfu/ml B₅: 10^8 , B₄: 10^6 , B₃: 10^5 , B₂: 10^2 , B₁: 0)

در طول دو سال آزمایش بین غلظت‌های مختلف باکتری و سال برای هر دو صفت و همین‌طور بین

میزان آن‌تی اکسیدان و فعالیت آنزیم پراکسیداز برگ

آنتی‌اکسیدان برگ نیز بیشترین آن در سال اول و در غلظت 10^8 cfu/ml (۵۹/۳۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) و کمترین آن در سال اول و در عدم کاربرد باکتری (۸/۹۱ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) مشاهده شد (شکل ۵). میزان آنتی‌اکسیدان‌ها ارتباط مستقیمی با غلظت عناصر کم مصرف دارند. لذا به نظر می‌رسد که کودهای زیستی با تولید اسیدهای آلی و تغییرات pH در اطراف ریشه گیاه و به دنبال آن افزایش حلالیت عناصر کم مصرف و جذب بالاتر آن توسط گیاهان موجب بیشتر شدن قدرت آنتی‌اکسیدانی در گیاهان می‌شوند (زارع و همکاران ۲۰۱۹).

اکوتیپ‌ها برای صفت فعالیت آنزیم پروکسیداز اختلاف معنی‌داری ($p < 0.01$) مشاهده گردید. اثرات متقابل سال کشت × اکوتیپ‌های زعفران و سال کشت × غلظت‌های مختلف باکتری برای صفت آنتی‌اکسیدان برگ در سطح یک درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). بیشترین میزان فعالیت آنزیم پروکسیداز در غلظت 10^8 cfu/ml باکتری باسیلوس سوبتیلیس (۴/۵۱ واحد در میلی‌گرم پروتئین) و کمترین در شاهد (عدم مصرف باکتری) (۲/۴۰ واحد در میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد. در بین اکوتیپ‌ها نیز بیشترین فعالیت آنزیم پروکسیداز در اکوتیپ نطنز (۳/۸۱ واحد در میلی‌گرم پروتئین) مشاهده شد. در صفت میزان



شکل ۵- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری سال و غلظت‌های مختلف باکتری بر آنتی‌اکسیدان برگ در زعفران. (cfu/ml B₅: 10^8 , B₄: 10^6 , B₃: 10^5 , B₂: 10^2 , B₁: 0)

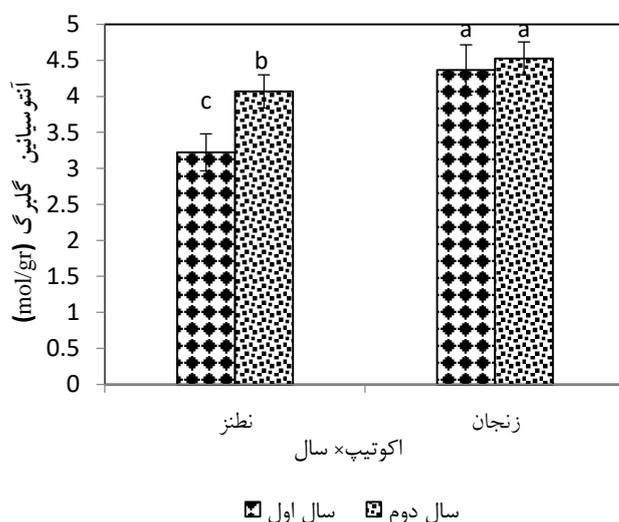
مشاهده شد که تحت اثر متقابل غلظت‌های مختلف باکتری × اکوتیپ‌های زعفران، بیشترین میزان آنتوسیانین در زعفران زنجان و در غلظت 10^8 cfu/ml (۵/۷۵) میلی‌گرم بر گرم) و کمترین آن در زعفران نطنز و در شاهد (عدم کاربرد باکتری) (۲/۵۹) میلی‌گرم بر گرم) به دست آمد. نتایج این مشاهده با یافته‌های عباس و علی (۲۰۱۱) بر روی چای ترش سازگار بود. 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. به عبارت دیگر توسعه‌ی رنگدانه‌های یاخته و ساخت آنتوسیانین، با بالا

آنتوسیانین گلبرگ

نتایج تجزیه گویای آن بود که اثرگذاری غلظت‌های مختلف باکتری بر میزان آنتوسیانین گلبرگ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول ۳). در طی دو سال کشت اثر متقابل اکوتیپ‌های زعفران × غلظت‌های مختلف باکتری و همچنین سال کشت × اکوتیپ‌های زعفران اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($P < 0.01$) (جدول ۳). طی افزایش غلظت باکتری، آنتوسیانین گلبرگ افزایش یافته و بیشترین میزان آن در غلظت 10^8 cfu/ml (۵/۰۵) میلی‌گرم بر گرم) و کمترین در تیمار شاهد (۲/۹۵) میلی‌گرم بر گرم) مشاهده شد. طبق نتایج مقایسه میانگین (شکل ۶)

بود، بنابراین باکتری‌های حل‌کننده فسفات و تثبیت‌کننده-ی نیتروژن با جذب کارآمد این عناصر 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 ویتامین-های گروه B، اسید نیکوتینیک، اسید پنوتونیک، بیوتین، اکسین‌ها و جیبرلین‌ها می‌شوند که این مواد موجب افزایش محتوای ماده‌ی آلی و هیدرات‌های کربن گیاه و در نتیجه افزایش آنتوسیانین می‌شوند (محمدپور و شویابی و همکاران ۲۰۱۵).

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 (ویترک و همکاران ۲۰۰۰). 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



شکل ۶- مقایسه میانگین ترکیبات تیماری اکوتیپ و سال بر آنتوسیانین گلبرگ در زعفران

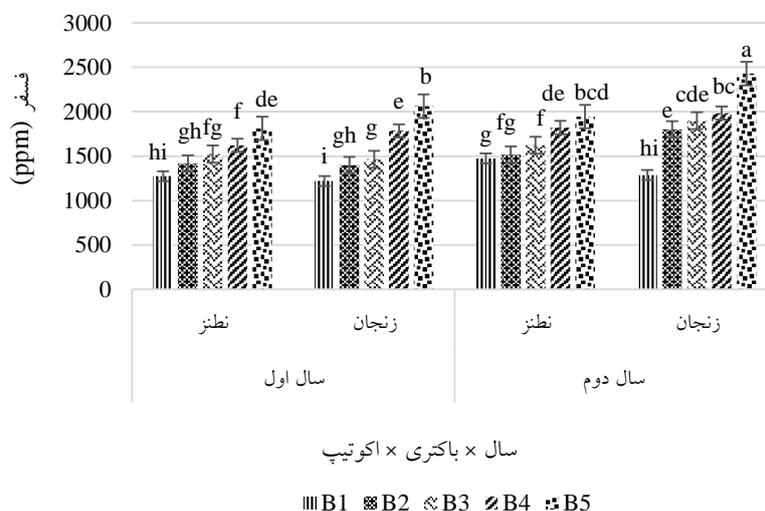
بذرها با باکتری‌های آنزوسپریلیوم (تثبیت‌کننده نیتروژن) و باسیلوس (تثبیت‌کننده فسفات) میزان فسفر و پتاسیم را در گیاه افزایش می‌دهند. باکتری‌ها با آزاد کردن اسیدهای آلی و کاهش pH خاک و یا کلاته کردن یون‌های کلسیم باعث تثبیت فسفر در خاک و افزایش جذب این عنصر می‌گردند. در این راستا طبق بررسی‌های انجام شده توسط محبوب و همکاران (۲۰۰۹) گزارش شد که باسیلوس از مهم‌ترین باکتری‌های حل‌کننده فسفات می‌باشد. در مطالعه‌ی نایدھی و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی اثر باکتری‌های محرک رشد بر گیاه دارویی نعنای وحشی در شرایط تنش شوری، گزارش شد که باکتری‌های محرک رشد باعث کاهش غلظت سدیم و افزایش غلظت عنصر فسفر و پتاسیم شدند. با توجه به نقش ویژه فسفر

فسفر برگ

بر اساس نتایج تجزیه واریانس اثر متقابل دو گانه (سال کشت × اکوتیپ‌های زعفران، اکوتیپ‌های زعفران × غلظت‌های مختلف باکتری) و اثر متقابل سه گانه (غلظت-های مختلف باکتری × سال کشت × اکوتیپ‌های زعفران) بر روی میزان فسفر برگ گیاه زعفران اثر معنی‌داری داشت (جدول ۳) بیشترین میزان فسفر تحت تاثیر غلظت 10^8 cfu/ml (پی‌پی‌ام) مشاهده شد. در بین اکوتیپ‌ها نیز، اکوتیپ زعفران (۱۷۳۲/۹۱ پی‌پی‌ام) فسفر بیشتری نسبت به اکوتیپ نطنز داشت. تلقیح کودهای زیستی منجر به افزایش میزان فسفر در چای ترش شد (نعمتی و همکاران ۲۰۱۵). ابوباکر و جهان (۲۰۱۱) در بررسی‌های خود روی چای ترش دریافتند که تلقیح

افزایش سهم فسفر جذب شده توسط بنه‌های دختری، در تحریک فرآیند گل‌انگیزی زعفران در فصل بعد نقش داشته باشند (نقدی بادی و همکاران ۲۰۱۱).

در مکانیسم رشد زایشی و عملکرد زعفران به نظر می‌رسد کاربرد کودهای زیستی بتواند از طریق فراهمی بیشتر فسفر برای بوته‌ی مادری در حال رشد و در نهایت



شکل ۷- مقایسه ترکیبات تیماری اکوتیپ و سال و غلظت‌های مختلف باکتری بر میزان فسفر در زعفران.
(cfu/ml B₅: 10⁸, B₄:10⁶, B₃: 10⁵, B₂: 10², B₁: 0)

تفاوت‌ها و خصوصیات رشدی مختلفی که دارند واکنش‌های متفاوتی نیز به کود زیستی نشان دادند. با توجه به نتایج، مشخص شد که بیشترین تاثیر باکتری باسیلوس سوبتیلیس بر روی صفات مورفوفیزیولوژیکی بخصوص عملکرد گل، وزن تر و خشک کلاله و وزن تر و خشک بنه، در غلظت ۱۰^۸ cfu/ml نمود پیدا کرده و در نتیجه با توجه به ضرورت تولید گیاه زعفران و بحث اقتصادی آن، استفاده از باکتری‌های محرک رشد جهت بهبود رشد گیاه و افزایش عملکرد آن توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

از مسئول و کارکنان محترم مزرعه تحقیقاتی دانشگاه زنجان که در اجرای این رساله نهایت همکاری را با ما داشتند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

نتیجه گیری کلی

اگرچه زعفران گیاهی ارزشمند و نسبتاً کم توقع نسبت به محتوی حاصلخیزی و میزان عناصر غذایی خاک می‌باشد، ولی کاربرد کودهای زیستی از جمله باکتری‌های محرک رشد به عنوان نهاده‌های زیستی می‌تواند به دلیل بهبود شرایط برای رشد و فتوسنتز، تحت تاثیر افزایش فراهمی عناصر غذایی به ویژه نیتروژن و فسفر و همچنین بهبود خصوصیات فیزیکی و بیولوژیکی خاک، افزایش عملکرد ریشی و به تبع آن افزایش تعداد بنه دختری و بهبود عملکرد کلاله را به دنبال داشته باشد. بنابراین، مصرف باکتری *Bacillus subtilis* را می‌توان به عنوان راهکاری مناسب برای بهبود تولید زعفران در راستای نیل به اهداف کشاورزی پایدار مدنظر قرار داد. با توجه به اثرات این باکتری بر روی اکوتیپ‌های زعفران می‌توان نتیجه گرفت که اکوتیپ‌های زعفران با توجه به

منابع مورد استفاده

- Abbas MK and Ali AS. 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. (In Persian).
- Abo-Baker AA and Gehan GM. 2011. Effect of bio-and chemical fertilizers on growth, sepals yield and chemical composition of *Hibiscus sabdariffa* at new reclaimed soil of South Valley area. Asian Journal of Crop Science, 3: 16-25.
- Alizadeh K, Rezaei-chiyaneh E, Amirnia R and Barin M. 2020. Combined Application of PGPR and Mycorrhizal Fungi on Seed yield, Macronutrients Uptake and Soil Biological Index in Intercropping Linseed (*Linum usitatissimum* L.) with Faba bean (*Vicia faba* L.). Journal of Agricultural Science and Sustainable Production, 30(1): 19-40. (In Persian).
- Armak A, Farzi H and 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 Technology, 5(4): 329-344.
- Arnon AN. 1967. Method of extraction of chlorophyll in the plants. Agronomy Journal, 23: 112-121.
- Asghar HN, Zahir ZA, Arshad M and Khaliq A. 2002. Relationship between in vitro production of auxins by rhizobacteria and their growth promoting activities in *Brassica juncea* L. Journal of Biology and Fertility of Soils, 35: 231-237.
- Behdani MA, Kouchaki AR, Nasiri Mahallati M and Rezvani Moghadam P. 2005. Evaluation of Quantitative Relationships between Yield and Consumption of Nutrients in Saffron, A Study in On-farm Farms. Iranian Journal of Crop Research, 3(1): 1-14. (In Persian)
- Brand-Williams W, Cuvelier ME and Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 28: 25-30.
- Cabello M, Irrazabal G, Bucsinzky M, Saparrat M and Schalamuk S. 2005. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi, *Glimus mosseae*, and a rock-phosphate- solubilizing fungus, *Penicillium thomii*, on *Mentha piperita* growth in a soilless medium. J. Basic Microbiology, 45: 182-189.
- Gutierrez-Manero F.J, Ramos-Solano B, Probanza A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R. and Talon, M. 2001. The plantgrowth- promoting Rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. Plant Physiology, 111: 206-211.
- Canbolat MY, Bilen S, Çakmakçi R, Sahin F and Aydin A. 2006. Effect of plant growth-promoting bacteria and soil compaction on barley seedling growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora. Biology and Fertility of Soils, 42(4): 350-357.
- Cardone L, Castronuovo D, Perniola M, Cicco N, Molina R.A, Renau-Morata B, Nebauer S.G and Candido V. 2021. *Crocus sativus* L. Ecotypes from Mediterranean Countries: Phenological, Morpho-Productive, Qualitative and Genetic Traits. Agronomy, 11(2): 551. <https://doi.org/10.3390/agronomy11030551>
- Casson SA and Lindsey K. 2003. Genes and signalling in root development. New Phytologist, 158: 11-38.
- Chezhiyan N Saraswathy S and Vasumathi R. 2003. Studies on organic manures, biofertilizers and plant density on growth, yield and alkaloid content of bhumyamalaki (*Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn.). South Indian Horticulture, 51: 96-101.
- De Mastro G and C Ruta. 1993. Relation between corm size and saffron (*Crocus sativus* L.) flowering. Acta Hort, 344: 512-517.
- Demir S. 2004. Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. Turkish Journal of Biology, 28: 85-90.
- Dhindsa RS, Plumb-Dhindsa P and Thorpe TA. 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of member permeability and peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. Journal of Experimental Botany, 32(1): 93-101.

- Ehteshami SM, Poorebrahimi M and 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. *Science and Technology of Greenhouse Cultivation*, 4(16): 122-125. (In Persian).
- El-Gizawy NKHB and Mehasen, SAS. 2009. Response of Faba bean to bio, mineral phosphorus fertilizers and foliar application with zinc. *World Applied Sciences Journal*, 6(10): 1359-1365.
- El Midaoui A, Ghzaiei I, Vervandier-Fasseur D, Ksila M, Zarrouk A, Nury T, Khallouki F, El Hessni A, Ouazzani Ibrahimi S, Latruffe N, Couture R, Kharoubi O, Brahmi F, Hammami S, Masmoudi-Kouki O, Hammami M, Ghrairi T, Vejux A and Lizard G. 2022. Saffron (*Crocus sativus* L.): A Source of Nutrients for Health and for the Treatment of Neuropsychiatric and Age-Related Diseases. *Nutrients*, 14, 597. <https://doi.org/10.3390/nu14030597>
- Euzéby, J. P. (2008). "*Bacillus*". List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Retrieved 2008-11-18.
- Fiori M Falchi G Quaglia M and Cappelli, C. 2007. Saffron (*crocus sativus* L.) diseases in Italy. *Plant Pathology*, 89: 27-68.
- Gholami AS, Shahsavani B and Nezarat S. 2009. The effect of plant growth promoting rhizobacteria on germination, seedling growth and yield of maize. *International Journal of Biological and Life Science*, 2: 1-10.
- Glick BR, Karaturovic DM and Newell PC. 1995. A novel procedure for rapid isolation of plant growth promoting *Pseudomanads*. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 533-536.
- Gutierrez-Manero FJ, Ramos-Solano B, Probanza A, Mehouchi J, Tadeo FR and Talon M. 2001. The plantgrowth- promoting Rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Plant Physiol*, 111: 206-211.
- Hamidi A, Asgharzadeh Kholouti A, Akbari Vala S and Choukan R. The effect of plant growth promoting bacteria (PGPB) and mycorrhizal fungi on some seed germination characteristics and seedling vigor of three hybrids of maize. *Journal of Agricultural Knowledge and Sustainable Production*, 31(3): 149-167.
- Hodgson E. 2004. The textbook of modern toxicology. 3th ed. John Wiley & Sons Inc. Hoboken, New Jersey, 275: 51-54.
- Hong L, Li M, Luo J, Cao X, Qu L, Gai Y, Jiang X, Liu T, Janz H, Bai D, Polle A, Peng C and Luo ZB. 2012. fertilization has different effects on the growth, carbon and nitrogen physiology, and wood properties of slow- and fastgrowing *Populus* species. *Journal of experimental botany*, 63: 6173-6185.
- Islami A, Sadrabadi Haghighi R and Zafarian M. 2014. Yield response, yield components and some morphophysiological traits of wheat cultivars to the use of Fulzime biofertilizer. *Scientific-Research Journal of Crop Ecophysiology*, 3(31): 243-256.
- Jami N, Rahimi A, Naghizadeh M and Sedaghati E. 2020. Investigating the use of different levels of Mycorrhiza and Vermicompost on quantitative and qualitative yield of saffron (*Crocus sativus* L.). *Scientia Horticulturae* 262 GH 109027. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.109027>.
- Kader MA, Mahn MH and Haque MS. 2002. Effects of azotobacter inoculant on the yield and nitrogen uptake by wheat. *Online Journal of Biological Science*, 2: 259-261.
- Karimi, K., Bolandnazar, S and Ashoori, S. 2013. Effect of bio-fertilizer and arbuscular mycorrhizal fungi on yield, growth, characteristics and quality of green bean (*Phaseolous vulgaris* L.). *Journal of Agriculture and Sustainable Production*, 23 (3): 157-167.
- Karthikeyan B, Abdul Jaleel C and Changxing Z. 2008. The effect of AM fungi and phosphorous level on the biomass yield and ajmalicine production in *Catharanthus roseus*. *Eurasian Journal of Biosciences*, 2: 26- 33.
- Kennedy IR, Choudhury AT and Kecskes ML. 2004. Non- symbiotic bacterial diazotrophs in crop-farming systems: can their potential for plant growth promotion be better exploited. *Soil Biology & Biochemistry*, 36(8): 1229-1244.

- Khalighi JA and Khara J. 2008. The effect of arbuscular mycorrhizal fungus *glomus intraradices* on some growth and physiological parameters in wheat (CV. Azar2) plants under cadmium toxicity. Iranian Journal of Biology, 23: 216-230. (In Persian)
- Kloepper JW, Lifshitz R and Novacky A. 1998. *Pseudomonas* inoculation to benefit plant production. Anim. Plant. Sci, 5: 60-64.
- Koide R. 1993. Physiology of the mycorrhiza plant. Advance Plant Pathology, 9: 33-54.
- Koocheki A, Jahani M, Tabrizi L and 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 soil and water. Agricultural Science and Technology, 25(1): 196-206. (In Persian).
- Koocheki A. 2004. Indigenous knowledge in agriculture with particular reference production in Iran. Acta Horticulturæ, 650: 175-182.
- Mehboob I, Naveed M and Zahir ZA. 2009. Rhizobial association with non-legumes: Mechanisms and application. Critical Reviews in Plant Science, 28: 432-456.
- Mikovacki N, Marinkovic J, Cacic N and Bgelic D. 2010. Microbial abundance in rhizosphere of Sugarbeet in dependence of fertilization and inoculation with *Azotobacter Chroococcum*. Research Journal of Agricultural Science, 42 (3): 260 -4.
- Mohammadpour Vashvaei R, Ghanbari A and 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 Persian).
- Naghdibadi HA, Omid H, Golzad A, Torbati H and Fotoookian MH. 2011. Change in crocin, safranal and picrocrocin content and agronomical characters of saffron (*Crocus sativus* L.) under biological and chemical of phosphorous fertilizers. Journal Med. Plant, 40(4): 58-68
- Nemati M, Dehmardeh M, Khumri A and Nejati Yazdi Nejad M. 2015. The effect of biofertilizer and animal manure application on economic performance and quality characteristics of sour tea (*Hibiscus sabdariffa* L.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 31(4): 625-610. (In Persian)
- Nidhi B, Barnawal D, Awasthi A, Yadav A and Kalra A. 2014. Plant growth promoting rhizobacteria alleviate salinity induced negative effects on growth, oil content and physiological status in *Mentha arvensis*. Acta Physiologiae Plantarum, 36: 45-60.
- Omid Beigi H. 2000. Effects of cultivation area on saffron quality, Iranian Journal of Science and Technology, 3 (3 and 4): 178-167
- Omid Beigi R, Ramezani A, Sadeghi B and Ziaratonia M. 2003. The effect of onion weight on saffron yield in Neishabour climate. the third national conference on Iranian saffron. 11-12 Azar. Mashhad.
- Rademacher W. 1994. Gibberellin formation in microorganisms. Plant Growth Regul. 15: 303-14.
- Rao MSS and Mendal NJ. 1991. Comparison of chinoli (*Brassica campestris*) and *Brassica napus* oil seed rape using different growth regulators, plant population densities and irrigation treatments. Journal of Agricultural Science, 117: 177-187.
- Revelou P.K, Mouzoula S, Xagoraris M, Evangelaras H, Papadopoulos G.K, Pappas C.S and Tarantilis P.A. 2022. Optimized Isolation of Safranal from Saffron by Solid-Phase Microextraction (SPME) and Rotatable Central Composite Design-Response Surface Methodology (RCCD-RSM). Separations, 9: 48-51.
- Rezvani Moghaddam P, Koocheki A, Molafilabi A and Seyyedi M. 2013. Effect of biological and chemical fertilizers on replacement corm and flower yield of saffron (*Crocus sativus* L.). Iranian Journal of Crop Science, 15 (3): 234-46.
- Rostami M and Mohammadi H. 2012. Effects of planting date and plant density on the growth and yield of saffron corms (*Crocus sativus* L.) in climatic conditions Malayer. Journal of Agroecology, 5(1): 27-38 (In Persian)

- Sadeghi B. 2003. Saffron is a cultural heritage a national concern. Proceedings of the Third National Saffron Conference. 11-12 Azar. Mashhad.
- Salies Pour M and Kiyani Rad M. 2001. Farm evaluation of phosphate fertilizer and replacement with chemically fertilizer in cotton agronomy. Necessity of Production. (A Compilation of Papers) .1st Publication Center Agriculture Education. Karaj, Pp 401-410. (In Persian)
- Sharaf-Eldin MA, Elkholy S, Fernández JA, Junge H, Cheetham RD, Guardiola JL and Weathers PJ. 2008. The effect of *Bacillus subtilis* FZB24 on flowers quantity and quality of saffron (*Crocus sativus* L.). *Planta Medica*, 74 (10): 1316-1320.
- Sharma K.D and Piqueras A. 2010. Saffron (*Crocus sativus* L.) tissue culture: Micropropagation and secondary metabolite production. *Funct. Plant Science Biotechnology*, 4: 15-24
- Sharma AK. 2002. Biofertilizers for sustainable agriculture. *Agrobios. India*, Pp 407-409.
- 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.
- Soukrat S; Metougui M.L; Gabone F; Nehvi F; Abousalim S and Benlahabib O. 2019. Study of diversity in some Moroccan population of saffron (*Crocus sativus* L.). *African Journal of Agricultural Research*, 14: 759-769.
- Swaefy Hend MF, Sake Weaam RA, Sabh AZ and Ragab AA. 2007. Effect of some chemical and bio-fertilizers on peppermint plants grown in sandy soil. *Annals of Agricultural Science*, 52(2): 451-463.
- Violent HGM and Portugal VO. 2007. Alternation of tomato fruit quality by root inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): *Bacillus subtilis* BEB-13bs. *Scientific Horticulture*, 113: 103-106.
- Vitrac X, Larronde F, Krisa S, Decendit A, Deffieux G and Merillon JM. 2000. Sugar sensing and Ca^{2+} calmodulin requirement in *Vitis vinifera* cells producing anthocyanins. *Phytochemistry*, 53: 659-665.
- Wagner GJ. 1979. Content and vacuole/extra vacuole distribution of neutral sugar, free amino acid and anthocyanins in protoplast. *Plant Physiology*, 64: 88-93.
- Wu S.C, Cao Z.H, Li Z.G, Cheung K.C and 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.
- Yadav J, Yadav S and Singh S. 2011. Plant Growth Promotion in Wheat Crop under Environmental Condition by PSB as Bio-fertilizer. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 2(1): 76-78.
- Yadegari M, Asadirahmani H, Noormohammadi G and Ayneband A. 2010. Plant growth promoting Rhizobacteria increase growth, yield and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Plant Nutrition*, 33: 1733-1743.
- Youssef AA, Edris AE and Gomaa AM. 2004. A comparative study between some plant growth regulators and certain growth hormones producing microorganisms on growth and essential oil composition of *Salvia officinalis* L. *Plant Annals of Agricultural Science*, 49: 299-311.
- Zare AA, Malakouti MJ, Bahrami JA and bleach f. 2019. The effect of biofertilizer application on quantitative and qualitative characteristics of lemon (*Lippia citriodora*). *Nutrition of Garden Plants*, 1(1): 29-40.
- Zhang N, Wang D, Liu Y, Li S, Shen Q and 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.