نشریه بوم شناسی کشاورزی
جلد ۱۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷، ص. ۹۱۱-۸۹۷

Journal of Agroecology
Vol. 10, No.3, Fall 2018, p. 897-911

کیفیت بذرهای حاصل از گیاهان کتان (*Linum usitatissimum* L.) تلقیح شده با میکروارگانیسم‌های خاکزی در شرایط کم آبی

سعیده رحیم‌زاده[۱] و علیرضا پیرزاد*[۲]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۱۷
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۴/۱۰

رحیم زاده، س.، و پیرزاد، ع. ۱۳۹۷. کیفیت بذرهای حاصل از گیاهان کتان (*Linum usitatissimum* L.) تلقیح شده با میکروارگانیسم‌های خاکزی در شرایط کم آبی. بوم‌شناسی کشاورزی، ۱۰(۳): ۹۱۱-۸۹۷.

چکیده

رابطه بین قارچ مایکورایزا و باکتری‌های مرتبط با آنها، بدلیل جایگزینی با کودهای شیمیایی اهمیت زیادی در کشاورزی پایدار دارد. به‌منظور بررسی اثرات احتمالی قارچ‌های مایکورایزا در ارتباط با باکتری حل‌کننده فسفر روی کیفیت بذر حاصل از گیاهان کتان (*Linum usitatissimum* L.)، آزمایشی بصورت فاکتوریل بر پایه بلوک کامل تصادفی با سه تکرار در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه ارومیه بصورت دو ساله انجام شد. تیمارهای آزمایش شامل گونه‌های قارچ مایکورایزا (*Rhizophagus intraradices*، *Funneliformis mosseae* و عدم تلقیح)، باکتری حل‌کننده فسفر (تلقیح بذر با *Pseudomonas putida* P_{13} و عدم تلقیح) و سه رژیم آبیاری (آبیاری پس از ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر) بودند. نتایج نشان داد با افزایش فاصله آبیاری از ۶۰ تا ۱۲۰ میلی‌متر، در گیاهان شاهد (بدون تلقیح)، درصد فسفر، پتاسیم، موسیلاژ، و فاکتور تورم و تورم برای هر گرم موسیلاژ بذر، همچنین پتاسیم تراوشی بذر (شاخص صدمه به غشای سلولی) افزایش و با بیشتر شدن تنش در ۱۸۰ میلی‌متر کاهش یافتند. در کلیه سطوح آبیاری، هم‌افزایی ناشی از تلقیح توأم قارچ و باکتری باعث بیشترین درصد فسفر، پتاسیم، موسیلاژ و تورم موسیلاژی بذر شد. درصد و سرعت جوانه‌زنی در بذور حاصل از تلقیح، با توجه به افزایش حجم موسیلاژ بذر، روند نزولی داشت. البته در تنش شدید بیشترین سرعت و درصد جوانه‌زنی از تلقیح توأم بدست آمد. بنابراین از نظر موسیلاژ و جوانه‌زنی، می‌توان بسته به هدف تولید، دو نوع کیفیت برای بذر کتان تعریف کرد. به‌طور کلی بیشترین افزایش در بهبود کیفیت بذر از نظر عناصر غذایی، پروتئین بذر و تولید موسیلاژ، در تلقیح توأم گیاهان با قارچ و باکتری مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: تنش خشکی، جوانه‌زنی بذر، *سودوموناس*، قارچ مایکورایزا، موسیلاژ

مقدمه

یکی از نیازهای اساسی جمعیت رو به رشد در زمینه محصولات کشاورزی، تأمین روغن‌های گیاهی از دانه‌های روغنی است که تولیدات آن‌ها به مصارف مختلف صنعتی، خوراکی، دارویی و لوازم بهداشتی و آرایشی می‌رسند. بذر کتان روغنی (*Linum usitatissimum* L. Linaceae) با حدود ۴۰٪ روغن، تنها روغن گیاهی است که میزان امگا ۳ در آن از امگا ۶ بیشتر است (Bayrak et al., 2010). همچنین بذر کتان روغنی حاوی مواد موسیلاژی، ویتامین E و ویتامین‌های گروه B است (Omidbaygi, 1997). موسیلاژها ترکیبات پلی‌ساکاریدی هستند که ۶ تا ۸ درصد بذر را تشکیل می‌دهند و نقش مهمی در کاهش کلسترول، و افزایش اثرات ضدسرطانی دارند (Cui & Mazza, 1996). کشت کتان روغنی با عملکرد قابل قبول، بسته به شرایط اقلیمی مناسب و بدون تنش می باشد. حال آنکه در ایران تنش خشکی مهم‌ترین عامل محدود کننده

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و استاد گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه
(* نویسنده مسئول: Email: a.pirzad@urmia.ac.ir)
DOI: 10.22067/jag.v10i3.63102

تولیدات زراعی است، بنابراین باید به دنبال راهکاری برای کاهش خسارت و افزایش قدرت رویش بذر آن در شرایط تنش بود (Seyed Sharifi, 2014). قارچ مایکورایزا (رابطه همزیستی بین قارچ و ریشه گیاه) در تعادل آب برای گیاهان میزبان، هم در شرایط وفور آب و هم خشکی (کمبود آب) مؤثر است. این قارچ ریشه‌ها را از طریق اضافه کردن شبکه گسترده‌ای از رشته‌های جذبی به منظور استخراج و کاوش عمقی خاک برای آب و مواد معدنی محلول گسترش می‌دهد (Auge, 2001). نتایج حاصل از تحقیق سیمور (Seymour, 2003) وابستگی بسیار بالای بذر کتان را به قارچ مایکورایزا تأیید می‌کند. نتایج تلقیح با قارچ‌های مایکورایزا در شرایط تنش خشکی، در گیاه کتان به‌طور قابل توجهی باعث بهبود رشد، سرعت بخشیدن به جذب آب و مواد غذایی توسط ریشه‌ها در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح شد (Thingstrup et al., 1998).

بررسی رژیم‌های مصرف آب، یکی از راه‌های به‌زراعی و مدیریت صحیح آبیاری در مزارع می‌باشد که اهمیت و ضرورت موضوع پژوهشی را آشکار می‌کند، ولی تلقیح با قارچ مایکورایزا به تنهایی برای اطمینان از ایجاد پوشش گیاهی کافی نیست. بنابراین جهت موفقیت لازم است کیفیت خاک و توانایی گیاه بهبود یابد.

برخی از باکتری‌های خاکزی به عنوان جزو سوم مجموعه قارچ– ریشه، شناخته شده‌اند که باعث بهبود عملکرد این رابطه همزیستی می‌شوند و به عنوان باکتری‌های کمکی قارچ– ریشه نامیده شده‌اند (Baradar et al., 2015). در بین باکتری‌های محرک رشد گیاه، باکتری‌های جنس *سودوموناس*[1] بدلیل توزیع گسترده در خاک، توانایی کلونیزه کردن ریزوسفر بسیاری از گیاهان و تولید طیف متنوعی از متابولیت‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. از میان گونه‌های مختلف این جنس، گونه‌های *P. putida* و *P. flurescent* نقش بسیار مهمی در افزایش رشد و جذب عناصر غذایی مثل فسفر دارند. اثرات مفید روابط مایکورایزایی می‌تواند به علت فعل و انفعالات مثبت بین مایکورایزا و این میکروارگانیسم‌ها در محیط باشد (Yousefi et al., 2011). با کاربرد این باکتری‌ها حفظ عملکرد و تحمل گیاه میزبان به خشکی، توسط سطح جذب بیشتر ریشه و افزایش رشد و تراکم آن یا اختلاف هیدرولیکی بین سیستم‌های ریشه‌ای امکان پذیر است (Ansary et al., 2012). تحقیقات نشان می‌دهد که شرایط محیط رشد گیاه، از قبیل قابلیت دسترسی به مواد غذایی رشد گیاه و رسیدگی دانه، کیفیت بذرهای حاصل از این گیاهان و قدرت جوانه‌زنی آن را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Bai et al., 2003). قارچ‌های مایکورایزا از جمله عوامل مؤثر بر ترکیب عناصر غذایی بذر در گیاهان همزیست هستند. تلقیح مایکورایزایی در گیاه کتان به ویژه زمانی که در ترکیب با باکتری *سودوموناس* استفاده شد، به طور قابل توجهی افزایش در جذب عناصر غذایی، افزایش در رشد گیاه و تعداد اسپور قارچ در خاک را به‌دنبال داشت (Neetu et al., 2012). همچنین کاهش در جذب عناصر غذایی ناشی از تنش خشکی در گیاه کتان، به طور معنی‌داری با کاربرد گونه‌های مایکورایزا جبران شد (Soltanian & Tadayyon, 2015).

اندازه‌گیری پتاسیم تراوشی و میزان هدایت الکتریکی مواد خارج شده از بذرها می‌تواند به عنوان راهکاری جهت جداسازی توده‌های بذری قوی از توده‌های ضعیف باشد، زیرا در خیلی از موارد بذوری با درصد۰جوانه‌زنی یکسان در آزمایشگاه، ممکن است مقدار ظهور گیاهچه آنها در مزرعه متفاوت باشد (Marcos-Filho, 1998). از طرفی در شرایط خشکی، موسیلاژ بذر با استفاده از حفظ رطوبت و همچنین افزایش سطح تماس بذر با خاک، موجب افزایش رطوبت در دسترس و کاهش تلفات رطوبت شده و بذر را از خشک شدن در زمان جوانه‌زنی حفظ می‌کند. در حالی‌که در شرایط آب اضافی، کاهش موسیلاژ بذر با افزایش ظرفیت جوانه‌زنی همبستگی دارد (Witztum et al., 1969). ترکیبات موسیلاژی به عنوان یکی از متابولیت‌های ثانویه (مولکول‌های زنجیره‌ای و توسعه یافته قندی) می‌تواند بسته به تغییر در فراهمی آب و عناصر غذایی ناشی از تیمار با قارچ مایکورایزا و باکتری (Auge, 2001; Yousefi et al., 2011) تحت تأثیر قرار گرفته و از کمیت و کیفیت متغیری برخوردار باشد.

با توجه به ریز بودن اندازه بذر کتان، داشتن ترکیبات موسیلاژی و ضعیف بودن قدرت رویش بذر آن، تعیین قدرت و کیفیت بذر (مرتبط با موسیلاژ، عناصر معدنی و پروتئین) قبل از کاشت اهمیت قابل ملاحظه‌ای خواهد داشت. هدف از اجرای این تحقیق، بررسی تأثیر گونه‌های قارچ مایکورایزا آربسکولار[2] و باکتری *Pseudomonas putida* روی کیفیت و قدرت بذر حاصل از گیاهان مادری تحت شرایط تنش می‌باشد. با توجه به اینکه تولید موسیلاژ در گیاه کتان اهمیت خاصی دارد و از طرفی درصد موسیلاژ بذر با ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر همبستگی منفی نشان می‌دهد، بنابراین افزایش

1- *Pseudomonas*

2- Arbuscular mycorrhiza

موسیلاژ می‌تواند درصد و سرعت جوانه‌زنی بذر کتان را کاهش دهد. در این مورد می‌توان جهت تولید بذر از نظر فواصل آبیاری و تلقیح مایکورایزایی، بسته به نوع هدف از تولید بذر تیمارهای متفاوت را در نظر گرفت.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در مزرعه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه به صورت فاکتوریل بر پایه طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار و در دو سال زراعی (۱۳۹۳ و ۱۳۹۴) انجام شد. این منطقه با متوسط بارندگی سالانه ۳۵۰ میلی‌متر، از آب و هوای نیمه‌خشک برخوردار است. خواص فیزیک و شیمیایی خاک مزرعه در جدول ۱ ارایه شده است. تعداد اسپور مایکورایزا و جمعیت باکتریایی (*Pseudomonas putida* گونه P_{13}) در هر ۱ گرم از خاک اولیه مزرعه (قبل از کاشت) به ترتیب ۳ اسپور و ۲×۱۰۲ باکتری بود. بذور (تهیه شده از مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجان غربی) به صورت خطی و در عمق ۲ سانتی‌متری در ردیف‌هایی به فاصله ۲۰ سانتی‌متر در هر کرت (واحد آزمایشی) با ابعاد ۲ در ۱/۵ متر کاشته شد. به منظور جلوگیری از هر گونه خطا بین کرت‌های آزمایشی ۲ متر فاصله در نظر گرفته شد. تیمارهای مورد بررسی شامل رژیم‌های آبیاری (آبیاری پس از ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی-متر تبخیر از تشت تبخیر کلاس A، به ترتیب نشان‌دهنده آبیاری مطلوب (I_1)، تنش ملایم (I_2) و تنش شدید (I_3))، گونه‌های مایکورایزایی (تلقیح با گونه‌های *Rhizophagus intraradices* و *Funneliformis mosseae* و شرایط بدون قارچ) و گونه باکتری (تلقیح بذر با باکتری *Pseudomonas putida* P_{13} و عدم تلقیح با باکتری) بودند. پس از آبیاری یکسان، در مرحله چهار برگه شدن گیاه، تیمارهای آبیاری گیاهان پس از رسیدن تبخیر تجمعی به مقادیر مورد نظر، اعمال شدند. مقدار آب مورد نیاز برای آبیاری هر کرت با توجه به رطوبت خاک در زمان آبیاری و رساندن آن به ظرفیت زراعی بر اساس معادله ۱ محاسبه و به وسیله کنتور اعمال شد (Benami & Ofen, 1984).

$$V= (FC-\theta)*(pb*A*h) \quad \text{معادله (۱)}$$

در این معادله، V: میزان آب مورد نیاز، FC: ظرفیت زراعی خاک محل آزمایش، θ: رطوبت خاک در زمان آبیاری، pb: وزن مخصوص ظاهری خاک، A: مساحت کرت و h: عمق نفوذ ریشه می‌باشد. مایه تلقیح قارچی (مخلوطی از شن و ماسه استریل، هیف قارچی و اسپور (۲۰ اسپور در گرم مایه تلقیح و قطعات مایکورایزایی ریشه)) مورد نظر از گروه گیاهپزشکی دانشگاه ارومیه (دکتر رضایی‌دانش)، تهیه شد. برای کلونیزاسیون ریشه گیاه در تیمارهای میکوریزایی، مایه تلقیح در شیارهای کاشت و در عمق کاشت بذر ریخته شد و بذور کتان بلافاصله در روی آن قرار داده شد. بذرها پس از کاشت با لایه‌ای از خاک پوشانده شد. بذور مربوط به تیمارهای باکتریایی قبل از کشت، با سوسپانسیون باکتری *Pseudomonas putid* سویه P13 (10^7 باکتری در هر میلی‌لیتر) تهیه شده از شرکت زیست فناور سبز (دکتر ملبوبی) آغشته گردید. برای برداشت دانه با قهوه‌ای شدن نیمی از کپسول‌ها آبیاری قطع شد. در انتهای فصل رشد و رسیدگی کامل (در ۱۵ مرداد، ۳۰ مرداد و ۶ شهریور به ترتیب برای آبیاری پس از ۱۸۰، ۱۲۰ و ۶۰ میلی‌متر تبخیر)، بوته‌ها برداشت شده و پس از خشک شدن بوجاری و بذور به طور دقیق تمیز شدند.

درصد نهایی و سرعت جوانه‌زنی

در آزمون جوانه‌زنی استاندارد تعداد چهار تکرار 100تایی بذر از هر واحد آزمایشی (کرت) را در داخل ظروف پتری به قطر ۹ سانتی‌متر حاوی یک عدد کاغذ صافی واتمن شماره یک، در ۳ تکرار قرار داده شدند. میزان ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر به هر ظرف افزوده شد و در داخل ژرمیناتور در دمای ۲۵°C قرار داده شد. شمارش بذرهای جوانه‌زده به صورت روزانه و در ساعات معینی از روز، تا زمانی‌که در دو شمارش متوالی، افزایشی در تعداد بذر جوانه‌زده مشاهده نگردد، ادامه یافت. هنگام شمارش، بذرهایی که ریشه‌چه‌ای به اندازه دو میلی‌متر داشتند، به‌عنوان بذر جوانه زده یادداشت شدند. جهت اندازه‌گیری درصد نهایی جوانه‌زنی از معادله (۲) استفاده شد (Agrawal, 1999):

معادله (۲)

درصد نهایی جوانه‌زنی =(تعداد بذور جوانه زده تا روز n/ تعداد بذر)×۱۰۰

که در این معادله، n: تعداد روزهای بعد از آزمایش (۷ روز) می-باشد.

سرعت جوانه‌زنی از تقسیم تعداد بذور جوانه‌زده تا روز nام بر n، شمار روزهای مورد نظر پس از شروع آزمایش بدست آمدند (Agrawal, 1999).

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک محل مورد بررسی

Table 1- Physico-chemical properties of soil

بافت Texture	پتاسیم قابل جذب (میلی گرم در کیلوگرم م) K Assimilable form ($mg.kg^{-1}$)	فسفر قابل جذب (میلی گرم در کیلوگرم) P Assimilable form ($mg.kg^{-1}$)	نیتروژن کل (درصد) Total N (%)	مواد خنثی شونده (درصد) Total neutralizing value (%)	کربن آلی (درصد) Organiccarbon (%)	اسیدیته pH	هدایت الکتریکی (دسی‌زیمنس بر متر) Electrical conductivity ($dS.m^{-1}$)	ظرفیت زراعی (درصد) Field capacity (%)	وزن مخصوص ظاهری (گرم بر سانتی‌متر مکعب) Bulk density ($g.cm^{-3}$)	نقطه پژمردگی (درصد) Wilting point (%)
لومی Loam	166	25	0.09	10.3	0.78	8.1	0.9	24	1.2	15

درصد روغن

برای بدست آوردن روغن بذر، به روش استخراج با حلال، بذر کتان خرد شده با اتر نفت (۶۰-۴۰°C) در دستگاه سوکسله استخراج و باقیمانده حلال توسط دستگاه تقطیر در خلا (روتاری) حذف شد. پس از استخراج، نمونه‌ها فیلتر شدند (Popa et al., 2012).

استخراج موسیلاژ

با توجه به اهمیت موسیلاژ بذر کتان، سه شاخص کیفی مقدار موسیلاژ، فاکتور تورم و میزان تورم در هر گرم موسیلاژ مورد بررسی قرار گرفتند. جداسازی موسیلاژ بر اساس روش استخراج با آب جوش انجام شد. بذور به مدت ۴ ساعت در آب جوش^{oC} ۱۰۰ روی همزن مغناطیسی قرار گرفتند. ماده استخراجی بعد از خنک شدن با استفاده از پشم شیشه فیلتر شد و تصفیه بیشتر در دستگاه روتاری انجام شد. سپس به محلول صاف شده حاوی موسیلاژ، اتانول ۸۰٪ افزوده و خوب تکان داده شد و برای مدت ۱ ساعت در یخچال در دمای ۵°C قرار گرفت. نهایتاً رسوب حاصله توسط سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ دور به مدت ۲۰ دقیقه) جدا گردید. مقدار موسیلاژ بر حسب گرم در هر گرم بذر تعیین و به صورت درصد وزنی ثبت گردید و درصد موسیلاژ بدست آمد (Bhatty, 1993).

برای تعیین فاکتور تورم مقدار یک گرم بذر خشک در استوانه مدرج ۲۵ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس به آن ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. بعد از ۲۴ ساعت، افزایش حجم بذرهای متورم که همان عدد فاکتور تورم می‌باشد، بر حسب میلی‌لیتر قرائت و یادداشت شد. مقدار تورم برای هر گرم موسیلاژ به عنوان فاکتور کیفیت بذر نیز از معادله (۳) بدست آمد (Kalyansundaram et al., 1980):

معادله (۳)

میزان موسیلاژ/(فاکتور تورم ×۱۰۰) =میزان تورم برای هر گرم موسیلاژ

آزمون‌های هدایت الکتریکی و تراوش پتاسیم

به منظور تعیین قدرت رویش بذر و گیاهچه با استفاده از آزمون هدایت الکتریکی و تراوش پتاسیم به روش توده‌ای تعداد ۵۰ عدد بذر از هر واحد آزمایشی تهیه، و وزن آنها با دقت یک صدم گرم اندازه-گیری شد. مقدار ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر درون بشرهای با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر ریخته شد. بعد از آن بذرها در آب مقطر درون بشرهای مجزا قرار گرفتند و روی هر یک از بشرها توسط فویل‌های پلاستیکی پوشانده شد. بشرهای حاوی بذرها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد درون ژرمیناتور قرار گرفتند. سپس محلول‌های تهیه شده برای اندازه‌گیری هدایت الکتریکی (با استفاده از دستگاه هدایت سنج الکتریکی) و پتاسیم تراوشی (با استفاده از دستگاه فلیم‌فتومتر) (Hampton & Tekrony, 1995; Marcos-Filho, 1998) مورد استفاده قرار گرفتند.

جدول ۲- نتایج تجزیه مرکب (دوساله) پاسخ کیفی بذر کتان به رژیم‌های آبیاری تحت تأثیر تلقیح با باکتری حل‌کننده فسفر و قارچ مایکورایزا

Table 2- Combined (2-yr data) analysis of variance for flax seed quality responses to irrigation under phosphate solubilizer and mycorrhizal infection

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات Mean Squares										
		جوانه زنی Germination	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	موسیلاژ Mucilage	فاکتور تورم Swelling factor	میزان تورم برای هر گرم موسیلاژ Swelling/g mucilage	نیتروژن N	فسفر P	پتاسیم K	پروتئین Protein	هدایت الکتریکی EC	پتاسیم تراوشی K leakage
سال Year (Y)	1	0.03 ns	0.0006 ns	0.021 ns	0.081 **	7.96 *	34.13 **	190932.2 **	24540.6 **	1333.0 **	124.33 ns	6.502 **
تکرار در سال Replicate/Y	4	5.62	0.1153	0.016	0.012	2.77	0.20	443.4	1362.8	7.9	23.81	2.060
آبیاری (A) Irrigation	2	177.44 **	3.6035 **	64.136 **	0.498 **	3.64 ns	42.83 **	415126.2 **	384138.7 **	1673.0 **	1628.5 **	44.005 **
Y×A	2	17.14 ns	0.3525 ns	0.009 ns	0.105 **	12.70 **	1.23 **	104754.0 **	6318.2 **	48.2 **	386.26 **	0.239 ns
باکتری (B) Bacteria	1	92.59 **	1.8960 **	15.398 **	0.066 *	ns0.54	26.76 **	80305.8 **	87951.1 **	1045.3 **	31.709 ns	0.004 ns
Y×B	1	0.33 ns	0.0067 ns	0.0001 ns	0.0003 ns	0.13 ns	0.59 *	3411.6 **	924.6 *	23.2 *	39.240 ns	0.068 ns
مایکورایزا Mycorrhiza (C)	2	114.08 **	2.3292 **	8.792 **	0.007 ns	8.01 **	1.87 **	12941.9 **	29937.5 **	73.2 **	1578.93 **	30.136 **
Y×C	2	4.73 ns	0.0960 ns	0.013 ns	0.013 ns	1.61 ns	0.20 ns	6626.7 **	426.0 ns	8.0 ns	ns66.54	1.631 *
A×B	2	53.48 *	1.0892 *	1.027 **	0.203 **	54.19 **	1.89 **	639.1 ns	1163.3 **	74.2 **	ns64.58	5.753 **
Y×A×B	2	0.11 ns	0.0022 ns	0.007 ns	0.010 ns	1.13 ns	0.12 ns	7871.2 **	105.9 ns	4.7 ns	ns102.30	0.855 ns
A×C	4	110.44 **	2.2474 **	0.266 **	0.393 **	55.36 **	1.70 **	499.7 ns	1274.8 **	66.4 **	763.84 **	8.606 **
Y×A×C	4	0.42 ns	0.0083 ns	0.008 ns	0.022 ns	5.24 *	0.10 ns	880.0 ns	1412.9 **	4.2 ns	98.42 *	0.737 ns
B×C	2	375.67 **	7.6651 **	0.141 **	0.030 *	7.16 *	0.57 *	ns898.8	244.0 ns	22.3 *	1.77 ns	0.736 ns
Y×B×C	2	5.25 ns	0.1077 ns	0.005 ns	0.016 ns	2.13 ns	0.03 ns	945.0 ns	305.3 ns	1.2 ns	ns14.22	1.429 *
A×B×C	4	71.98 **	1.4633 **	0.239 **	0.027 *	9.41 **	1.47 **	983.1 *	883.8 **	57.6 **	ns17.88	**7.263** **
Y×A×B×C	4	1.77 ns	0.0359 ns	0.006 ns	ns0.015	2.39 ns	0.16 ns	2806.4 **	324.5 ns	6.2 ns	ns3.95	0.449 ns
خطای آزمایشی Error	68	12.86	0.2627	0.012	0.009	1.58	0.120	394.7	202.47	4.7	35.45	0.373
ضریب تغییرات CV (%)		4.02	4.03	1.37	11.48	11.56	6.8	5.6	6.05	6.8	2.67	3.09

ns ** * : به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد و عدم وجود اختلاف معنی‌دار

*, ** and ns: Significant at 1 and 5% of probability and non-significant, respectively

معادله (۴)

قابلیت هدایت الکتریکی برای هر بشر/وزن نمونه بذر (برحسب گرم)=(میکروزیمنس بر سانتی‌متر بر گرم) هدایت الکتریکی

میزان تراوش پتاسیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم) برای هر بشر/ وزن نمونه

معادله (۵)

بذر (برحسب گرم)= تراوش پتاسیم (میلی‌گرم بر کیلوگرم بر گرم بذر)

درصد عناصر غذایی

جهت تعیین غلظت عناصر غذایی موجود در بذر کتان، نمونه‌ها بعد از شستشو و خشک کردن در آون (دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت)، به وسیله آسیاب پودر شدند. عصاره تهیه شده به روش هضم توسط اسیدسولفوریک، اسیدسالیسیلیک، آب اکسیژنه و سلنیم، برای اندازه‌گیری نیتروژن استفاده شد. میزان نیتروژن به روش تیتراسیون بعد از تقطیر توسط دستگاه کجلتکاتو آنالایزر (مدل V40، ساخت ایران) اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فسفر و پتاسیم عصاره نمونه‌ها توسط هضم به روش سوزاندن خشک و ترکیب با اسیدکلریدریک تهیه گردید. فسفر به روش رنگ‌سنجی با وانادات مولیبدات و توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر و میزان پتاسیم با استفاده از روش نشر شعله‌ای و به کمک دستگاه فلیم‌فتومتر اندازه‌گیری شدند (Chapman & Pratt, 1961).

درصد پروتئین

درصد پروتئین پس از اندازه‌گیری میزان نیتروژن با دستگاه کجلدال با استفاده از ضریب تبدیل نیتروژن به پروتئین (۵/۷) محاسبه شد (Owusu-Apenten, 2002).

معادله (۶) درصد پروتئین =درصد نیتروژن × ۵/۷

تجزیه و تحلیل آماری

برای تعیین اثرات ساده و متقابل داده‌های حاصل از دو سال، تجزیه واریانس داده‌ها بصورت مرکب با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری SAS 9.1 و مدل خطی GLM انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون آماری SNK در سطح احتمال ۵ درصد صورت گرفت. قبل از تجزیه و تحلیل داده‌ها، تست نرمالیته انجام و بعد از اطمینان از توزیع نرمال داده‌ها، نسبت به تجزیه و تحلیل آنها اقدام گردید.

نتایج و بحث

بر اساس تجزیه واریانس مرکب (داده‌های دوساله)، اثر متقابل آبیاری× مایکورایزا× باکتری بر روی صفات درصد نهایی جوانه‌زنی، سرعت جوانه‌زنی، درصد موسیلاژ بذر، میزان تورم برای هر گرم موسیلاژ، درصد نیتروژن، درصد پتاسیم، درصد پروتئین و پتاسیم تراوشی بذر در سطح احتمال ۱ درصد و بر روی فاکتور تورم بذر در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد. همچنین در هدایت الکتریکی بذر اثر متقابل سال× آبیاری× مایکورایزا در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲).

درصد پروتئین

پروتئین بذر یک روند کاهشی به دنبال افزایش فواصل آبیاری از I_1 (آبیاری پس از ۶۰ میلی‌متر تبخیر) تا I_3 (آبیاری پس از ۱۸۰ میلی‌متر تبخیر) نشان داد، طوری‌که کمترین پروتئین بذر (۱۷/۷ درصد) از گیاهان شاهد (عدم تلقیح) و در رژیم آبیاری I_3 بدست آمد. در تیمارهای آبیاری I_1 و I_2، تلقیح با باکتری *P. putida* به تنهایی تأثیر بیشتری در افزایش پروتئین بذر نسبت به تلقیح با هر دو گونه مایکورایزا نشان داد، ولی تلقیح توأم باکتری و قارچ بیشترین افزایش را در میزان پروتئین بذر داشت. بنابراین، بیشترین درصد پروتئین، مربوط به تلقیح توأم باکتری و قارچ در I_1 بود. در شرایط تیمار آبیاری I_3، تلقیح با باکتری *P. putida* سودمندتر از تلقیح با گونه‌های مایکورایزا (به صورت جداگانه و یا توأم) بوده است (جدول ۳). کاهش معنی‌دار درصد پروتئین بذر همزمان با افزایش شدت تنش، به ویژه در تنش شدید، قبلا در بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) (Pirzad et al., 2012) و در گیاه بالنگو (*Lallemantia iberica* L.) (Abdolahi & Farahani, 2015) گزارش شده است. یکی از عوامل کاهش میزان پروتئین در گیاه تحت تنش خشکی را می‌توان به اُفت شدید فتوسنتز و کاهش پیش ماده‌های تولید کننده پروتئین (محدودیت منبع) نسبت داد (Mohammadkhani & Heidari, 2008). به نظر می‌رسد که کاهش محتوای پروتئین بذر تحت تنش خشکی با کاهش فتوسنتز و افزایش فعالیت‌های آنزیم‌های تجزیه-

کننده پروتئین مرتبط باشد (Feller, 2004). از طرفی، افزایش درصد پروتئین بذر گیاهان مایکورایزایی کتان روغنی در مقایسه با شاهد (جدول ۳) را می‌توان به انتشار میسیلیوم‌های خارجی قارچ همزیست در منافذ ریز خاک که امکان ورود ریشه‌های موئین وجود ندارد، برای جذب آب و عناصر غذایی و انتقال به گیاه میزبان نسبت داد (Habibzadeh et al., 2013). به نظر می‌رسد اثر هم‌افزایی قارچ همزیست و باکتری حل کننده فسفات (Minaxi et al., 2013) منجر به تولید بیشترین درصد پروتئین (۴۰/۴ درصد) از تلقیح توأم گونه‌های میکوریزی و باکتری در شرایط آبیاری مطلوب شده است (جدول ۳).

درصد فسفر

با اعمال تنش ملایم (آبیاری پس از ۱۲۰ میلی‌متر تبخیر) فسفر بذر افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان تحت تیمار I_1 نشان داد، ولی با تشدید کمبود آب در تیمار I_3 فسفر بذر کاهش پیدا کرد طوری که حداقل فسفر بذر (۰/۱۸ درصد) در گیاهان تحت تنش شدید (I_3) بدست آمد. در هر سه رژیم آبیاری، تجمع یون فسفر در گیاهان همزیست با هر دو گونه قارچی، و همچنین گیاهان تلقیح شده با باکتری بیشتر از انباشت آن در بذر گیاهان شاهد (عدم تلقیح) بود. اثر هم‌افزایی میکروارگانیسم‌ها (قارچ و باکتری) در جذب و تجمع فسفر بذر منجر به بالاترین میزان فسفر در تلقیح توأم برای کلیه رژیم‌های آبیاری شد (جدول ۳). پاسخ‌های تجمع عناصر غذایی به تنش خشکی متفاوت است و با رژیم‌های آبیاری تغییر می‌یابد. با افزایش بیشتر فاصله آبیاری (I_3)، جذب و تجمع فسفر بدلیل انحلال کمتر و غیرمتحرک شدن این عنصر (Devau et al., 2009) کاهش یافته است. عدم تحرک فسفر در pH بالا و تثبیت آن، به ویژه در تنش‌های کمبود آب دلیل اصلی کاهش تجمع آن در بافت‌های گیاهی، حتی در سطوح بالاتر فسفر خاک تا ۲۱ میلی‌گرم فسفر قابل جذب در هر کیلوگرم خاک (بیش از نیاز گیاه) می‌باشد (Devau et al., 2009). توانایی گیاهان برای مقاومت به تنش ملایم آب در مقادیر بالای فسفر خاک افزایش می‌یابد (Kafi et al., 2010) جذب بیشتر فسفر در گیاهان با تلقیح دوگانه قارچ مایکورایزایی و باکتری حل‌کننده فسفر (Sabannavar & Lakshman, 2008)، نشان‌دهنده انتقال فسفر حل شده توسط باکتری، از طریق سیستم همزیستی قارچ–ریشه است (Minaxi et al., 2013). این افزایش انتقال، می‌تواند ناشی از افزایش حجم ریشه و دسترسی بیشتر به ریزوسفر به‌منظور تسهیل درفرآیند جذب و حلالیت فسفر نامحلول باشد (Hassani et al., 2015).

درصد پتاسیم

در گیاهان شاهد (بدون تلقیح)، بیشترین میزان پتاسیم بذر (۰/۲۵ درصد) از گیاهان تحت تنش ملایم بدست آمد که با شدیدتر شدن تنش در I_3 به ۰/۰۹ درصد کاهش یافت. در هر سه رژیم آبیاری، بیشترین میزان پتاسیم بذر در تلقیح توأم گیاه با باکتری و قارچ بدست آمد که نشان‌دهنده اثرات هم‌افزایی بین قارچ و باکتری بود (جدول ۳). سطوح پایین رطوبت خاک در تنش شدید، سرعت انتقال پتاسیم از خاک به سطح ریشه و سرعت جریان آن را در واحد طول ریشه کاه شداد (Kuchenbuch et al., 1986). با این‌حال، در تنش متوسط (I_2)، میزان تجمع پتاسیم در گیاه، حتی در مقایسه با تیمار I_1 افزایش می‌یابد (جدول ۳) که این افزایش را می‌توان به تجمع انتخابی پتاسیم در گیاهان نسبت داد (Hopkins & Huner, 2009). در مواردی مشاهده شده که کاهش درصد پتاسیم گیاهان تحت تنش، به دلیل محدودیت دسترسی به پتاسیم بوده است که در این تحقیق در شرایط تنش شدید (I_3) مشاهده شد. بر اثر وجود آب بیشتر، یون‌های یک ظرفیتی مانند پتاسیم در محلول خاک به طور نسبی بیشتر از یون‌های دو ظرفیتی مانند کلسیم و منیزیم افزایش می‌یابد، اما به تدریج که خاک خشک می‌شود، کلوئیدهای رس با قدرت بیشتری پتاسیم را جذب کرده و مانع از جدا شدن این یون‌ها می‌شوند. بر اثر تنش، رشد کلی گیاه از جمله فعالیت جذبی ریشه‌ها کاهش می‌یابد، در نتیجه توانایی جذب پتاسیم از سطح کلوئیدهای رس را نخواهند داشت و میزان جذب این عناصر کاهش می‌یابد (Kafi et al., 2007). مطالعات قبلی نشان داده است که هیف‌های خارجی قارچ‌های میکوریز قادر به تأمین بیش از ۱۰ درصد از نیاز گیاه همزیست خود به پتاسیم هستند. این مقادیر در گیاهان و گونه‌های قارچی متفاوت است (Samaei et al., 2015; Rejali et al., 2010).

هدایت الکتریکی (EC) و پتاسیم تراوشی بذر

افزایش میزان هدایت الکتریکی بذر در سطوح بالاتر تنش (آبیاری پس از ۶۰ تا ۱۸۰ میلی‌متر تبخیر)، نشان‌دهنده صدمات خشکی می‌باشد. در رژیم‌های آبیاری I_1 و I_2 کاربرد و عدم کاربرد گونه‌های مایکورایزا تأثیری بر تغییر میزان EC بذر نداشت، ولی در شرایط تنش شدید (I_3) هدایت الکتریکی بذر در گیاهان مایکورایزایی به‌طور معنی داری کاهش یافت.

جدول ۳- مقایسه میانگین‌های (دو ساله) اثر متقابل رژیم‌های مختلف آبیاری، باکتری و قارچ مایکورایزا بر روی صفات کیفی بذر کتان روغنی

Table 3- Two-year means comparison interaction effects of irrigation regimes×bacteria×mycorrhiza on flax seed quality

رژیم‌های آبیاری† Irrigation regimes	باکتری Bacteria	مایکورایزا Mycorrhiza	جوانه‌زنی (درصد) Germination (%)	سرعت جوانه‌زنی (درصد در روز) Germination rate (Percentage per day)	موسیلاژ (درصد) Mucilage (%)	فاکتور تورم (میلی‌لیتر) Swelling factor (ml)	میزان تورم برای هر گرم موسیلاژ Swelling/g) (mucilage	پروتئین (درصد) Protein (%)	نیتروژن (درصد) N (%)	فسفر (درصد) P (%)	پتاسیم (درصد) K (%)	پتاسیم تراوشی (میلی‌گرم در کیلوگرم در گرم بذر) K leakage (mg. kg^{-1}. g^{-1}seed)
60	بدون باکتری No-bacterial	شاهد No-inoculated	96^{a}*	13.73^{a}	7.04^{h}	^{efg}0.70	$^{c-f}$9.94	29.5^{e}	5.2^{e}	0.36^{d}	0.17^{f}	^{def}19.67
		F. mosseae	78^{f}	11.23^{f}	7.97^{e}	0.97^{bc}	12.13^{bc}	30.7^{de}	5.4^{de}	0.40^{bc}	0.23^{e}	18.50^{f}
		R. intraradices	85de	12.24^{de}	7.96^{e}	0.95^{bcd}	11.92^{bcd}	34.8^{bc}	6.1^{bc}	0.39^{cd}	0.23^{e}	18.69^{f}
	باکتری (Bacterial)	شاهد No-inoculated	$^{b-e}$87	12.50^{cd}	7.79^{f}	0.58^{g}	7.48^{g}	36.7^{b}	6.5^{b}	0.40^{bc}	0.24^{e}	18.81^{ef}
		F. mosseae	$^{a-d}$91	13.12^{a-d}	8.50^{d}	0.93^{bcd}	10.97^{b-e}	40.4^{a}	7.1^{a}	0.43^{b}	0.26^{d}	18.89^{ef}
		R. intraradices	^{abc}92	13.21^{a-d}	8.83^{c}	1.03^{b}	^{bcd}11.70	40.2^{a}	7.1^{a}	0.46^{a}	0.29^{c}	19.02^{ef}
120	بدون باکتری No-bacterial	شاهد No-inoculated	^{abc}93	13.31^{abc}	8.09^{e}	^{a}۱،۱۷	14.39^{a}	24.2^{hi}	4.3^{hi}	0.39^{cd}	0.25^{d}	22.02^{a}
		F. mosseae	81^{ef}	11.57^{ef}	9.07^{b}	1.02^{b}	$^{b-e}$11.21	28.6^{ef}	5.0^{ef}	0.39^{cd}	0.33^{b}	19.98^{cde}
		R. intraradices	88^{bcd}	12.64^{bcd}	9.18^{b}	0.85^{b-e}	^{efg}9.25	28.1^{efg}	4.9^{efg}	0.39^{cd}	0.32^{b}	19.93^{cde}
	باکتری Bacterial	شاهد No-inoculated	85de	12.21^{de}	9.17^{b}	1.16^{a}	12.67^{b}	25.9^{fgh}	4.6^{fgh}	0.43^{b}	0.33^{b}	22.25^{a}
		F. mosseae	86^{cde}	12.35^{cde}	10.26^{a}	0.92^{bcd}	8.93^{efg}	32.9^{cd}	5.8^{cd}	0.47^{a}	0.38^{a}	20.74^{bcd}
		R. intraradices	88^{bcd}	12.57^{bcd}	10.23^{a}	0.80^{c-f}	^{fg}7.82	29.9^{de}	5.3^{de}	0.46^{a}	0.40^{a}	20.64^{bcd}
180	بدون باکتری (No-bacterial)	No-inoculated شاهد	87^{b-e}	12.52^{cd}	6.28^{j}	0.58^{g}	^{efg}9.29	17.7^{j}	3.1^{j}	0.18^{g}	0.09^{gh}	^{ab}21.50
		F. mosseae	89^{bcd}	12.83^{a-d}	6.32^{j}	0.68^{fg}	$^{b-e}$10.79	21.9^{i}	3.9^{i}	0.21^{f}	0.11^{g}	20.87^{bc}
		R. intraradices	93^{abc}	13.28^{abc}	6.74^{i}	0.65^{fg}	^{def}9.66	^{j}19.2	3.4^{j}	0.22^{f}	0.12^{g}	18.78^{ef}
	باکتری (Bacterial)	No-inoculated شاهد	89^{bcd}	12.71^{bcd}	6.28^{j}	0.92^{bcd}	14.59^{a}	30.4^{de}	5.4^{de}	0.23^{f}	0.13^{f}	21.48^{ab}
		F. mosseae	94^{ab}	13.52^{ab}	7.15^{gh}	^{def}0.77	$^{b-e}$10.72	23.5^{hi}	4.1^{hi}	0.27^{e}	0.18^{f}	18.93^{ef}
		R. intraradices	94^{ab}	13.54^{ab}	7.22^{g}	0.90^{bcd}	12.46^{b}	25.4^{gh}	4.5^{gh}	0.27^{e}	0.16^{f}	16.70^{g}

*حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای آزمون SNK در سطح پنج درصد می‌باشد.

*Means followed by the same letter in each column are not significantly different according to SNK test (p≤0.05).

† میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر

mm evaporation frompan class A

هر دو گونه قارچی به یک میزان در این کاهش تأثیرگذار بودند. از طرفی در سال اول در شرایط تنش شدید، کاربرد گونه‌های قارچی، EC بذر را بیشتر کاهش دادند (جدول ۴). میزان پتاسیم تراوشی بذر (به عنوان شاخص صدمه به غشای سلولی) با افزایش فاصله آبیاری از ۶۰ تا ۱۲۰ میلی‌متر تبخیر بیشتر شد ولی مقدار آن در تنش شدیدتر (I_3) افزایش نیافت که با توجه به درصد پایین یون پتاسیم موجود در این بذور قابل توجیه است. بدنبال کاربرد جداگانه قارچ و باکتری در آبیاری مطلوب، پتاسیم تراوشی بذر به یک میزان کاهش یافت. در شرایط تنش ملایم، کاربرد گونه‌های قارچی بر خلاف باکتری، به تنهایی و در تلقیح توأم با باکتری به یک نسبت میزان پتاسیم تراوشی را کاهش دادند. در شرایط تنش شدید، بیشترین میزان کاهش در کاربرد توام باکتری با گونه *G. intraradices* مشاهده شد. بنابراین، می‌توان گفت که کاربرد این گونه قارچی بیشترین تأثیر را در کاهش خسارت ناشی از تنش در رژیم‌های آبیاری پس از ۱۲۰ و ۱۸۰ میلی-متر تبخیر از تشتک داشته است (جدول ۳). توده‌های بذری با بنیه بالا بر اساس آزمون‌های تراوش پتاسیم و هدایت الکتریکی شناسایی می-شوند. در آزمون هدایت الکتریکی (به عنوان شاخصی از تراوش مواد بذر) بذور حاصل از گیاهان تلقیح شده که مقدار کمتری مواد الکترولیتی از آنها خارج شود، به‌عنوان توده بذر دارای بنیه قوی شناسایی می‌شود (Hampton & Tekrony, 1995). پتاسیم، یون معدنی اصلی تراوش یافته توسط بذر طی جذب آب است. تنش بر روی ساختار غشای سلولی در بذور تولیدی اثر می‌گذارد و باعث افزایش هدایت الکتریکی می‌شود. اعمال تنش در مراحل رشدی گیاه باعث تولید بذوری با کیفیت پایین می‌گردد که به‌علت افزایش نشت مواد از پوسته آسیب‌دیده بذور و افزایش نفوذپذیری غشا سلولی است (Vieira et al., 1992). تیمارهای تلقیح با قارچ‌های همزیست و باکتری‌های حل‌کننده فسفر با افزایش ظرفیت جذب و انتقال آب (Neetu et al., 2012)، و همچنین افزایش دسترسی و تأمین عناصر غذایی (Habibzadeh et al, 2013) (نیتروژن، فسفر و پتاسیم در مطالعه حاضر) از میزان خسارت به غشای سلولی و تراوش پتاسیم به طور معنی‌داری کاسته است.

درصد موسیلاژ

درصد موسیلاژ بذر (میزان موسیلاژ در یک گرم بذر)، تحت تأثیر رژیم‌های مختلف آبیاری قرار گرفت؛ طوری‌که در گیاهان شاهد (عدم تلقیح) بیشترین درصد موسیلاژ (۸/۰۹ درصد) از گیاهان تحت شرایط تنش ملایم بدست آمد که با بیشتر شدن تنش در تیمار آبیاری پس از ۱۸۰ میلی‌متر تبخیر به ۶/۲۸ درصد تقلیل یافت. از طرفی تلقیح گیاه با باکتری و قارچ، موجب افزایش موسیلاژ بذر شد که بیشترین درصد با تلقیح توأم باکتری و قارچ بدست آمد. این امر نشان‌دهنده اثرات هم‌افزایی بین قارچ و باکتری در سنتز موسیلاژ می‌باشد (جدول ۳). افزایش تولید موسیلاژ با اعمال تیمارهای تلقیح (قارچ و باکتری) در هر سه سطح آبیاری، نشان می‌دهد که دسترسی به مواد فتوسنتزی نسبت به گیاهان شاهد بیشتر بوده است. افزایش موسیلاژ بذر در گیاهان کتان مایکورایزایی و مخصوصا گیاهان غیرمایکورایزایی با اعمال تنش ملایم (I_2) نشانه سازگاری مرتبط با حفظ پتانسیل آب درون سلولی (Gholinezhad et al., 2016; Moradi et al., 2010) است، ولی کاهش در موسیلاژ بذر در تنش شدیدتر (I_3) را می‌توان به محدودیت مواد فتوسنتزی در تولید متابولیت‌های ثانویه (Gholinezhad et al., 2016) نسبت داد. تلقیح با این میکروارگانیسم‌ها با افزایش قابلیت دسترسی آب و مواد غذایی برای گیاه احتمالاً نقش تنش خشکی در کاهش فتوسنتز گیاه را تعدیل (Habibzadeh et al., 2013) و موجب برتری معنی‌دار در تولید موسیلاژ شده است. قابلیت بالای نگهداری آب این مواد نقش عمده-ای در سازگاری گیاه با شرایط خشک دارد. افزایش موسیلاژ در پوسته بذر به‌دنبال تنش کم‌آبی، ناشی از سازگاری اکولوژیکی جهت حفظ جنین بذر در برابر خشکی می‌باشد. از آنجا که یک شکل ویژه از ذخیره آب، پیوند یافتن با کربوهیدرات‌های آب‌دوست نظیر موسیلاژهای سطح بذر می‌باشد، این سازگاری منجر به توانایی در حفظ پتانسیل آب درون سلولی می‌شود (Moradi et al, 2010).

تورم موسیلاژی بذر

تورم بذر به طور مستقیم از موسیلاژ بذر تأثیر می‌پذیرد، که در اثر جذب آب، موسیلاژ موجود در بذور متورم می‌شود، و به دو صورت تورم مطلق و میزان نسبی تورم نسبت به مقدار موسیلاژ مطرح می-شود. میزان تورم یک گرم موسیلاژ از شرایط غیرتنش (۹/۹۴) یک روند افزایشی تا تنش ملایم (۱۴/۳۹) داشت، ولی با بیشتر شدن تنش در I_3 تا ۹/۲۹ کاهش یافت. در شرایط بدون تنش، تلقیح گونه‌های

قارچی به تنهایی و بصورت توأم با باکتری به یک میزان تورم را افزایش دادند. در شرایط تنش ملایم تلقیح تأثیری در افزایش میزان تورم نداشت. از طرفی، برخلاف I_1 و I_2 در شرایط تنش شدید تلقیح با باکتری بیشترین میزان تورم برای هر گرم موسیلاژ (۱۴/۵۹) را نشان داد (جدول ۳). با توجه به اینکه فاکتور تورم با یک نسبت مستقیم در محاسبه میزان تورم به ازای هر گرم موسیلاژ دخالت دارد، انتظار می-رود دارای روند مشابه با آن باشد. با این‌حال، مقدار نسبی تورم از موسیلاژ حاصل از بذر نیز تأثیر می‌پذیرد. بنابراین به نظر می‌رسد فاکتور تورم تفاوت‌هایی با میزان تورم در هر گرم موسیلاژ داشته باشد. به طور مثال، با وجود افزایش هر چند اندک در میزان نسبی تورم موسیلاژ حاصل از گیاهان مایکورایزایی با تشدید تدریجی تنش، فاکتور تورم در شدیدترین سطح تنش با کاهش مواجه شده است (جدول ۳). با توجه به ارتباط مثبت و بالای درصد موسیلاژ و فاکتور تورم می‌توان گفت که فاکتور تورم که معرف کیفیت موسیلاژ نیز می-باشد با افزایش درصد موسیلاژ بر اثر تنش خشکی، افزایش می‌یابد (Rahimi et al., 2014). روند تغییرات فاکتور تورم و میزان تورم به ازای هر گرم موسیلاژ با مقدار موسیلاژ بذر مشابه بود (جدول ۳). افزایش هر دو شاخص در گیاهان مایکورایزایی و تلقیح با باکتری حل کننده فسفر در پژوهش حاضر نشان می‌دهد که تأمین آب در روابط مایکورایزایی (Neetu et al., 2012; Rejali et al., 2011) و بهبود مقاومت به تنش در تلقیح با باکتری‌ها (Dimkpa, 2009) منجر به افزایش سطح موسیلاژ بذر شده است.

درصد نهایی و سرعت جوانه‌زنی

بیشترین درصد نهایی جوانه‌زنی (۹۶ درصد) و سرعت جوانه‌زنی (۱۳/۷۳ درصد در روز) مربوط به شرایط عدم تلقیح در رژیم آبیاری در ۶۰ میلی‌متر تبخیر بود (جدول ۳). به دنبال شرایط تنش در تیمارهای آبیاری I_2 و I_3 درصد نهایی جوانه‌زنی و سرعت جوانه‌زنی در بذور حاصل به ترتیب تا ۸۷ و ۱۲/۵۲ درصد کاهش نشان داد. در تیمارهای آبیاری پس از ۶۰ و ۱۲۰ میلی‌متر تبخیر، کاربرد گونه‌های قارچی و باکتری موجب کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی بذور تولیدی گردید ولی این درصد بدنبال کاربرد توأم آنها (قارچ+ باکتری) به اندازه بذرهای حاصل از تیمار شاهد (عدم تلقیح) افزایش یافت. در شرایط تنش شدید (I_3)، تلقیح کتان با گونه‌های قارچی و باکتری یک روند افزایشی هرچند اندک نسبت به درصد و سرعت جوانه‌زنی بذرهای گیاهان شاهد (بدون تلقیح) نشان دادند. با این‌حال، کاربرد توأم قارچ با باکتری بیشترین درصد (۹۴ درصد) و سرعت جوانه‌زنی (۱۳/۵۴ درصد در روز) را در شرایط تنش شدید بدنبال داشت (جدول ۳). با در نظر گرفتن اینکه تمام بذور برای جوانه‌زنی در شرایط یکسان از نظر دما و تأمین آب قرار داشتند، درصد جوانه‌زنی بذور بدست آمده از گیاهان مادری در شرایط تنش، کمتر از شرایط مطلوب آبیاری است. کاهش جوانه‌زنی در بذرهای تولید شده تحت تنش کمبود آب در مطالعات متعددی قبلا گزارش شده است. در این راستا کاهش سرعت و درصد نهایی جوانه‌زنی در بذرهای حاصل از گیاهان بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.) (Pirzad et al., 2012) و ارقام کلزا (*Brassica napus* L.) (Atarodi et al., 2011) که تحت شرایط کمبود آب رشد کرده و تولید بذر نموده‌اند، گزارش شده است. روند مشابه و کاهشی تغییرات درصد و سرعت جوانه‌زنی با افزایش فاصله آبیاری (شدیدتر شدن تنش کمبود آب)، وجود همبستگی مثبت و معنی‌دار بین آنها را نشان می‌دهد (Pirzad et al., 2012). از طرفی، مشاهده می‌شود که در بذور حاصل از گیاهان تلقیح شده با قارچ و باکتری، درصد جوانه‌زنی نسبت به شاهد کاهش پیدا کرده است که با توجه به همبستگی بین درصد موسیلاژ و درصد جوانه‌زنی بذر، درصد بالای موسیلاژ ناشی از تلقیح در این بذور منجر به کاهش درصد جوانه‌زنی شده است (Witztum et al., 1969).

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق، نقش مفید قارچ‌های میکوریزا و باکتری *Pseudomonas putida* را در کاهش خسارت تنش خشکی نشان داد. به نظر می‌رسد حضور باکتری با تسهیل دسترسی به فسفر غیرقابل حل، به قارچ میکوریزا که سطح دسترسی ریشه را به آب و عناصر غذایی توسعه داده است، کمک می‌کند. در نتیجه ریشه گیاه گسترش بیشتری داشته و آب و مواد غذایی لازم را جذب می‌کند. به واسطه جذب و فتوسنتز بهتر، بخشی از کاهش ناشی از تنش خشکی در میزان کربوهیدرات‌ها و عناصر غذایی جبران شده، حجم موسیلاژ، درصد پروتئین و عناصر غذایی بذر (نیتروژن، فسفر و پتاسیم) افزایش یافت. نتایج دو آزمون اندازه‌گیری هدایت الکتریکی و آزمون تراوش پتاسیم نشان داد که بیشترین میزان آنها، از بذور حاصل از شرایط تنش خشکی بدست آمد که نشان‌دهنده بنیه و کیفیت پایین غشا بذر می‌باشد. ولی تیمارهای تلقیح با قارچ‌های همزیست و باکتری حل

کننده فسفر از میزان خسارت به غشای سلولی در شرایط تنش خشکی کاسته و باعث تقویت بنیه بذور کتان شد. بذور حاصل از گیاهانی که در مزرعه با قارچ‌های مایکورایزا و باکتری حل‌کننده فسفر تیمار شدند، دارای ذخایر غذایی بیشتری بوده و احتمالا به هنگام بروز تنش خشکی نسبت به سایر بذور موفق‌تر عمل خواهند کرد. اگر هدف از تولید بدست آوردن موسیلاژ بذر باشد، تیمار تلقیح دوگانه گونه‌های قارچ و باکتری *سودوموناس* در شرایط تنش ملایم (آبیاری بعد از ۱۲۰ میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر) توصیه می‌شود، ولی اگر هدف از تولید بذر کتان برای کاشت در سال بعد باشد، نیاز به آزمون‌های بیشتر کیفی جوانه‌زنی و تولید گیاهچه است که با این حال با توجه به نتایج حاصل از جوانه‌زنی شرایط بدون تنش قابل توصیه می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از جناب آقای دکتر ملبوبی و شرکت "زیست فناور سبز" جهت در اختیار گذاشتن سویه P_{13} باکتری *Pseudomonas putida* نهایت تشکر را دارند.

جدول ٤- مقایسه میانگین اثر متقابل سال، آبیاری و قارچ مایکورایزا بر هدایت الکتریکی بذر کتان

Table 4- Two-year means comparison of seed Electrical conductivity affected by year×irrigation regime ×mycorrhiza

سال Year	آبیاری† Irrigation regimes	مایکورایزا Mycorrhiza	هدایت الکتریکی (میکروزیمنس در سانتی‌متر در گرم بذر) EC (seedμS.cm^{-1}.g^{-1})
2014	60	شاهد	214 de*
		No-inoculated	
		F. mosseae	217 de
		R. intraradices	214 de
	120	شاهد	231 b
		No-inoculated	
		F. mosseae	221 bcde
		R. intraradices	225 bcd
	180	شاهد	246 a
		No-inoculated	
		F. mosseae	212 e
		R. intraradices	211 e
2015	60	شاهد	215 de
		No-inoculated	
		F. mosseae	216 de
		R. intraradices	213 e
	120	شاهد	229 bc
		No-inoculated	
		F. mosseae	219 cde
		R. intraradices	221 bcde
	180	شاهد	245 a
		No-inoculated	
		F. mosseae	228 bc
		R. intraradices	225 bcd

*حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار بر مبنای آزمون SNK در سطح پنج درصد می‌باشد.

*Means followed by the same letter are not significantly different according to SNK test ($P\leq0.05$).

† میلی‌متر تبخیر از تشتک تبخیر (mm of evaporation frompan class A)

منابع

Abdolahi, M., and Maleki Farahani, S. 2015. Evaluation of seed yield, mucilage and protein of different species and ecotypes of balangu (*Lallemantia* spp.) under drought stress. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 31: 676-687. (In Persian with English Summary)

Agrawal, R.L. 1999. Seed Technology. Oxford and IBH Publishing Co. LTD. New Delhi. P. 829.

Ansary, M.H., Asadi Rahmani, H., Ardakani, M.R., Paknejad, F., Habibi, D., and Mafakheri, S. 2012. Effect of *Pseudomonas fluorescent* on proline and phytohormonal status of maize (*Zea mays* L.) under water deficit stress. Annals of Biological Research 3:1054-1062.

Atarodi, H., Irannejad, H., Shiranirad, A.H., Amiri, R., and Akbari, G.A. 2011. Effects of drought stress and planting dates on seedling emergence, plant growth and seed vigour of produced seeds in canola (*Brassica napus* L.) cultivars. Iranian Journal of Field Crop Science 42: 71-80. (In Persian with English Summary)

Auge, R.M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza 11: 3-42.

Bai, Y., Tischler, C.R., Booth, D.T., and Taylor, E.M. 2003. Variations in germination and grain quality within a rust resistant common wheat germplasm as affected by parental CO_2 conditions. Environmental and Experimental Botany 50: 159-168.

Baradar, A., Saberi Riseh, R., Sedaghati, E., and Akhgar, A. 2015. Mycorrhiza helper bacteria. Plant Pathology Science 4: 46-53. (In Persian with English Summary)

Bayrak, A., Kiralan, M., Ipek, A., Arslan, N., Cosge, B., and Khawar, K.M. 2010. Fatty acid compositions of linseed (*Linum usitatissimum* L.) genotypes of different origin cultivated in Turkey. Biotechnology and Biotechnological Equipment 24: 1836-1842.

Benami, A., and Ofen, A. 1984. Irrigation Engineering-Sprinkler, Trickle and Surface Irrigation: Principles, Design and Agricultural Practices. Irrigation Engineering Scientific Publications. p. 257.

Bhatty, R.S. 1993. Further compositional analyses of flax: mucilage, trypsin inhibitors and hydrocyanic acid. Journal of the American Oil Chemists' Society 70: 899-904.

Chapman, H.D., and Pratt, P.F. 1961. Methods of Analysis for Soils, Plant and Waters. University of California. P. 309.

Cui, W., and Mazza, G. 1996. Physicochemical characteristics of flaxseed gum. Food Research International 29: 397-402.

Devau, N., Le Cadre, E., Hinsinger, P., Jaillard, B., and Gérard, F. 2009. Soil pH controls the environmental availability of phosphorus: Experimental and mechanistic modeling approaches. Applied Geochemistry 24: 2163-2174.

Dimkpa, C., Weinand, T., and Ash, F. 2009. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. Plant, Cell and Environment 32: 1682-1694.

Feller, U. 2004. Proteolysis. In: Plant Cell Death Processes, Ed. Elsevier Inc. 107-123.

Gholinezhad, R., Sirousmehr, A.R., and Fakheri, B. 2016. Evaluation of irrigation regimes and use of organic fertilizers on qualitive and quantitive yield of borage (*Borago officinalis* L.). Journal of Crop Physiology 10: 683-696. (In Persian with English Summary)

Habibzadeh, Y., Pirzad, A., Zardoshti, M.R., Jalilian, J., and Eini, O. 2013. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on seed and protein yield under water-deficit stress in mung bean. Agronomy Journal 105: 79-84.

Hampton, J.G., and Tekrony, D.M. 1995. Handbook of Vigour Test Methods. 3rd Edition. Published by: International Seed Testing Assemblage (ISTA). Zurich, Switzerland.

Hassani, F., Asgharzade, A., Ardakani, M.R., Hamidi, A., and Paknejad, F. 2015. Effectiveness of phosphate solubilizing bacteria inoculation for improving phosphorus absorption and root growth indices. Biological Forum - An International Journal 7: 199-205.

Hopkins, W.G., and Huner, N.P.A. 2008. Introduction to Plant Physiology, Fourth Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, USA. P. 528.

Kafi, M., Borzoee, A., Salehi, M., Kamandi, A., Masoumi, A., and Nabati, J. 2007. Physiology of Environmental Stresses in Plants. Mashhad Jahad-e Daneshghahi. Mashhad, Iran. p. 502. (In Persian)

Kalyanasundaram, N.K., Amin, D.R., and Dalal, K.C. 1980. Quality Evaluation of Isabgol Seeds. In: Biannual report (from Oct. 1978 to Nov. 1980) of all India Coordinated Project on Medicinal and Aromatic Plants. Gujarat Agricultural University, Anand. p. 125-127.

Kuchenbuch, R., Claassen, N., and Jungk, A. 1986. Potassium availability in relation to soil moisture. I. Effect of soil moisture on K diffusion, root growth and K uptake of onion plants. Plant and Soil 95: 221-231.

Marcos-Filho, J. 1998. New approaches to seed vigor testing. Scientia Agricola 55: 27-33.

Minaxi, Saxena, J., Chandra, S., and Nain, L. 2013. Synergistic effect of phosphate solubilizing rhizobacteria and arbuscular mycorrhiza on growth and yield of wheat plants. Journal of Soil Science and Plant Nutrition 13: 511-525.

Mohammadkhani, N., and Heidari, R. 2008. Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties. Turkish

Journal of Biology 32: 23-30.

Moradi, K., Hamdi Shangari, A., Shahrajabian, M.H., Gharineh, M.H., and Madandost, M. 2010. Isabgol (*Plantago ovata* Forsk.) response to irrigation intervals and different nitrogen levels. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 26: 196-204. (In Persian with English Summary)

Neetu, N., Aggarwal, A., Tanwar, A., and Alpa, A. 2012. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and Pseudomonas fluorescens at different superphosphate levels on linseed (*Linum usitatissimum* L.) growth response. Chilean Journal of Agricultural Research 72: 237-243.

Omidbaigi, R. 1997. Approaches of the Production and Processing of Medicinal Plants.Vol 2. Tarrahan Nashr Press, Tehran, Iran. p. 424. (In Persian)

Owusu-Apenten, R.K. 2002. Food Protein Analysis: Quantitative Effects on Processing. Marcel Dekker Inc., The Pennsylvania State University, New York, USA. p. 463.

Pirzad, A.R., Tajbakhsh, M., and Darvishzadeh, R. 2012. Effect of water deficit stress on seed composition, seed germination and seedling growth in german chamomile. Sustainable Agriculture and Production Science 21: 139-156. (In Persian with English Summary)

Popa, V.M., Gruia, A., Raba, D.N., Dumbrava, D., Moldovan, C., Bordean, D., and Mateescu, C. 2012. Fatty acids composition and oil characteristics of linseed (*Linum usitatissimum* L.) from Romania. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies 18: 136-140.

Rahimi, A., Jahansoz, M.R., and Rahimian Mashhadi, H. 2014. Effect of drought stress and plant density on quantity and quality charactristics of Isabgol (*Plantago ovata* Forssk.) and French *Psyllium*. Journal of Crop Production and Processing 4: 143-156. (In Persian with English Summary)

Rejali, F., Mardoukhi, B., and Malakouti, M.J. 2011. Effects of mycorrhizal symbiosis on water use efficiency, proline accumulation, and mineral uptake of wheat (*Triticum aestivum* L.) under saline condition. Journal of Water Research in Agriculture 24: 111-122. (In Persian with English Summary)

Sabannavar, S.J., and Lakshman, H.C. 2008. Interactions between *Azotobacter*, *Pseudomonas* and *arbuscular* mycorrhizal fungi on two varieties of *Sesamum indicum* L. Journal of Agronomy and Crop Science 194: 470-478.

Samaei, F., Asghari, S.H., Aliasgharzadeh, N., and Sarikhani, M.R. 2015. Effects of two arbuscular mycorrhizae fungi on some soil hydraulic properties and nutrient uptake by spring barley in an alkaline soil under greenhouse conditions. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture 6: 169-179. (In Persian with English Summary)

Seymour, N.P. 2003. Responses of linseed to vesicular-arbuscular mycorrhizae, phosphorus and zinc in a vertisol. Ph.D Thesis, School of Land, Crop and Food Sciences, The University of Queensland, Australia. p. 263.

Seyed Sharifi, R. 2014. Industrial Plants. University of Mohaghegh Ardabili Press. Ardabil, Iran. p. 432. (In Persian)

Soltanian, M., and Tadayyon, A. 2015.Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on some agronomic characteristics on linseed (*Linum ussitatissimum* L.) under drought stress. Journal of Plant Production Research 22: 1-21. (In Persian with English Summary)

Thingstrup, I., Rubaek, G., Sibbesen, E., and Jakobsen, I. 1998. Flax (*Linum usitatissimum* L.) depends on arbuscular mycorrhizal fungi for growth and P uptake at intermediate but not high soil P levels in the field. Plant and Soil 203: 37-46.

Vieira, R.D., Tekrony, D.M., and Egli, D.B. 1992. Effect of drought and defoliation stress in the field of soybean seed germination and vigor. Crop Science 32: 471-475.

Witztum, A., Gutterman, Y., and Evenari, M. 1969. Integumentary mucilage as an oxygen barrier during germination of *Blepharis persica* (Burm.) Kuntze. Botanical Gazette 130: 238-241.

Yousefi, A.A., Khavazi, K., Moezi, A.A., Rejali, F., and Nadian, H.A. 2011. Phosphate solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi impacts on inorganic phosphorus fractions and wheat growth. World Applied Sciences Journal 15: 1310-1318.

Journal of Agroecology
Vol. 10, No.3, Fall 2018, p. 897-911

نشریه بوم شناسی کشاورزی
جلد ۱۰، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۷، ص. ۹۱۱-۸۹۷

Quality of Flax Seeds Harvested from Plants Inoculated with Soil Microorganisms Underwater Deficit Conditions

S. Rahimzadeh[1] **and A. Pirzad**[2*]
Submitted: 07-03-2017
Accepted: 01-07-2017

Rahimzadeh, S., and Pirzad, A. 2018. Quality of flax seeds harvested from plants inoculated with soil microorganisms underwater deficit conditions. Journal of Agroecology. 10(3): 897-911.

Introduction

The relationship between arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and their associated bacteria has great importance for sustainable agriculture especially in the case of highly mycorrhizal plants such as flax seed. Bio-fertilizers use in sustainable agricultural systems is important in production and enables plants to absorb more water from soil and improves plant nutrient uptake and photosynthesis. The alleviating effect of the AMF symbiosis in response to drought generally relies on the uptake and transport of water and on an improved uptake of nutrients. The cooperation of bacteria and mycorrhizal is probably due to specific attributes of micro-organisms that make the mother plants more tolerant to drought stress .The interacting effects of mycorrhizal colonization and phosphate solubilizing bacterial (PSB) inoculation on plant vegetative growth and crop yield have been studied previously. But, the impact of these above micro-organisms on the plant reproduction and the actual (quality) crop yield has received much less attention. Thus the main aim of this study was to evaluate the effects of AMF species, PSB and their interactions on the quality of harvested flax seeds.

Materials and Methods

A 2-year field experiment was conducted at the Urmia University, Urmia city, located at North-West of Iran during the years 2014 and 2015. The experimental design was factorial (three factors) based on a randomized complete block with three replications. The treatments were included two AMF species (*Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus intraradices* and non-mycorrhizal control), PSB (*Pseudomonas putida* P13 and non-inoculated control) and three irrigation regimes (irrigation after 60, 120 and 180 mm of evaporation from Class A pan). Seeds were sown into a loamy soil at a depth of 2 cm in plots. Mycorrhizal inoculum was placed in the planting rows below the seeds. For bacterial treatments, the seeds were inoculated with bacterial suspension of *Pseudomonas putida* strain P13 before being immediately planted. At the end of the growing season, when the plants had produced mature seeds, samples were taken. Seed factors included germination percentage, nutrient percentage (N, P and K), mucilage percent, swelling factor, electrical conductivity and potassium leakage (parameters as a result of damage to seed cell membranes) were measured. Finally, data was analyzed using SAS 9.1 and means were compared by Student Newman Keul's test at 5% level of probability.

Results and Discussion

Combined ANOVA of 2-yr data showed a significant interaction effect of irrigation regimes multiply by bacteria and mycorrhiza on the final germination percent, mucilage content, swelling factor, swelling rate per gram mucilage, seed nutrients (nitrogen, phosphorus and potassium), and potassium leakage, and significant interaction of year multiply by irrigation regimes and mycorrhiza on the electrical conductivity in flax seeds. Results indicated that with increasing irrigation interval from 60 to 120 mm of evaporation in control (non-inoculated) plants, phosphorus percent, potassium percent, mucilage percent, swelling factor and swelling rate per gram mucilage, and potassium leakage were in high level. These above traits decreased with increasing in severe stress up to 180 mm of evaporation. With increasing drought stress in flax plants (from irrigation after 60 to 180 mm evaporation), protein content and final germination percentage and rate of harvested seeds were decreased. Mycorrhizal and bacterial inoculation of flax plants, especially dual inoculation, compensated a part of drought-induced seed protein reduction. In all irrigation regimes, the highest percentage of phosphorus,

1 and 2- PhD. Student and Professor, Department of Agronomy, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: a.pirzad@urmia.ac.ir)
DOI: 10.22067/jag.v10i3.63102

potassium, mucilage and swelling factor were observed in dual inoculated plants due to synergistic effect of mycorrhiza and PSB. This synergistic effect led to reducing cell membrane damages that indicated the vigorous seeds. But a downward trend of seeds germination percentage harvested from inoculated plants, related to higher mucilage volume and its negative correlation with seed germination.

Conclusion

A mixture of AMF and bacteria improved the results more than they were for the non-inoculated control plants. The development of multi-functional microbial inoculants seems to be a promising method to increase the positive effects of micro-organisms. In this study, the participation of micro-organisms contributed to a higher quality and vigor of flax seeds. Assessment the effects of plant-beneficial micro-organisms (*Pseudomonas putida* and two mycorrhizal species, alone or/and in combination) on the quality of flax seeds obtained from plants grown in the field, showed the beneficiary of dual colonization.

Keywords: Drought stress, Mucilage, Mycorrhizal fungi, *Pseudomonas*, Seed germination