Archive of SID

اثر تلقیح ریشه دو رقم یونجه (*Medicago sativa*) با جدایه‌هایی از گونه‌های سینوریزوبیوم و باسیلوس بر رشد، مقدار کلروفیل و تمامیت غشای سلول در شرایط تنش شوری

ریحانه عموآقایی* و فاطمه نیک‌اندیش

شهرکرد، دانشگاه شهرکرد، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۲/۲۶

چکیده

در این پژوهش ریزوبیوم از گرهک‌های گیاهان یونجه و باسیلوس از خاک مزارع دولت‌آباد اصفهان جدا شدند. جدایه‌های متحمل به نمک با روش لکه‌گذاری در محیط YMA و PVK حاوی ۱۰۰ میلی مولار نمک شناسایی شدند. سپس بذر و گیاهچه دو رقم یونجه (یزدی و همدانی) با جدایه‌هایی از گونه‌های سینوریزوبیوم و باسیلوس بصورت منفرد یا توام تلقیح شدند و بعد در دو سطح شوری صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار (NaCl) رشد کردند. نتایج نشان داد که شوری موجب افزایش نشت الکترولیتی غشاء و کاهش مقدار کلروفیل a، b و وزن‌تر و خشک بخش هوایی و ریشه گیاهان در هر دو رقم یونجه شد. رقم همدانی نسبت به یزدی به شوری حساس‌تر بود. تلقیح با سینوریزوبیوم و باسیلوس رشد گیاه، مقدار کلروفیل و تمامیت غشای سلول را در شرایط شور و غیر شور در مقایسه با تیمار شاهد (غیر همزیست) بهبود بخشید. همچنین دو گونه باکتری اثرات هم‌افزایی بر روی یکدیگر داشتند، به‌طوری که در اکثر موارد تلقیح توام مؤثرتر از تلقیح منفرد با سینوریزوبیوم یا باسیلوس بود. نتایج پیشنهاد کرد که تلقیح گیاهان با جدایه‌های این باکتری‌ها به چیرگی گیاه بر تنش شوری کمک می‌کند.

واژه‌های کلیدی: یونجه، شوری، باسیلوس، سینوریزوبیوم، کلروفیل، نشت الکترولیتی غشاء

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۸۱-۴۴۲۴۴۱۹ ، پست الکترونیکی: rayhanehamooaghaie@yahoo.com

مقدمه

گیاهان علوفه‌ای از خانواده لگوم، سال‌هاست که به دلیل مقدار بالاتر پروتئین و همچنین اثر این گیاهان در حاصلخیزی خاک به دلیل توانایی آنها در همزیستی با ریزوبیوم در سراسر جهان مورد توجه قرار گرفته است. یونجه گیاهی چندساله است و به دلیل داشتن سیستم ریشه‌ای قوی، نفوذ در لایه‌های خاک و قدرت همزیستی با ریزوبیوم‌ها و تثبیت بیولوژیکی نیتروژن در گرهک‌های ریشه به حاصلخیزی خاک کمک می‌کند. یونجه گیاهی مقاوم به گرما، سرما و تحمل‌کننده بسیاری از تنش‌هاست (۲۶). یونجه یکی از مهمترین گیاهان علوفه‌ای بومی ایران است که کشت آن در مناطق خشک و نیمه‌خشک، یعنی مناطقی که شوری و کمبود آب از تنش‌های عمده محیطی برای کشاورزی است، انتخاب شده است و بزرگترین سهم را از سطح ۷۰ هزار هکتار زمین زیر کشت گیاهان علوفه‌ای در ایران، به خود اختصاص داده است (۵).

در ایران مساحت خاک‌هایی که به نوعی تحت تأثیر شوری قرار دارند، بالغ بر ۳۲ میلیون هکتار است که نزدیک به ۳۰٪ از سطح کل کشور و ۵۵٪ از اراضی قابل کشت را شامل می‌شود (۵). تنش شوری بر جوانه‌زنی بذرها، رشد گیاهچه‌ها، رشد گیاه و عملکرد گیاهان اثرات مضری دارد و در نهایت باعث مشکلات اقتصادی و کاهش کیفیت

www.SID.ir

Archive of SID

محصول نیز می‌شود. تنش شوری همچنین ظرفیت فتوسنتزی گیاهان را به دلیل ایجاد تنش اسمزی و بسته بودن روزنه‌ها محدود می‌سازد و موجب ناپایداری غشاها می‌شود و تعادل یون‌های ضروری و مورد نیاز گیاه را در خاک به‌هم می‌زند. کاهش عملکرد، گرهک‌زایی، مقدار کل ازت و کاهش تثبیت نیتروژن در لگوم‌ها از عوارض شوری است (۱و۲۳). هر چند یونجه از گیاهان علوفه‌ای متحمل به شوری است، ولی چنانچه شوری خاک به بیش از ۲ دسی‌زیمنس بر متر (معادل ۲۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) افزایش یابد، رشد و عملکرد آن کاهش می‌یابد. حداکثر شوری قابل تحمل یونجه ۱۶ دسی‌زیمنس بر متر (معادل ۱۶۰ میلی‌مولار کلرید سدیم) گزارش شده است (۵). البته درصد جوانه‌زنی یونجه تا ۵۰ درصد در شوری تقریبی ۹۷ میلی‌مولار کاهش می‌یابد (۲۵).

خاک‌های شور اغلب از نظر ذخیره نیتروژن فقیر هستند. شوری همچنین باعث کاهش جذب سایر عناصر غذایی به‌خصوص فسفر می‌شود، زیرا یون‌های فسفات با یون‌های کلسیم در یک خاک شور واکنش داده و فسفر رسوب می‌کند. به همین دلیل خاک‌های کشاورزی در مناطق شور دچار فقر فسفر و نیتروژن قابل دسترس برای گیاه هستند. بنابراین به نظر می‌رسد با تلقیح توام باکتری‌های حل‌کننده فسفات نامحلول و تثبیت کننده ازت، فسفر و ازت قابل دسترس برای گیاه در خاک‌های شور را می‌توان افزایش داد (۲۳).

طیف وسیعی از باکتری‌های خاک در ریزوسفر شناخته شده‌اند که قادر به تقویت رشد و افزایش محصول بسیاری از گونه‌های گیاهان زراعی مهم نظیر حبوبات هستند. این گروه که از نظر سیستماتیکی پراکنده می‌باشند ریزوباکتری‌های تحریک‌کننده رشد گیاهان و یا به اختصار PGPR (Plant Growth Promoring Rhizobacteria) خوانده می‌شوند. تحریک و افزایش رشد گیاه توسط PGPRها از راه‌های مختلفی نظیر: تثبیت ازت مولکولی، تولید انواع هورمون‌ها و ویتامین‌ها، کمک به حل شدن اشکال نامحلول فسفات و آهن خاک، کمک به جذب عناصر کم مصرف و همچنین تولید سیدروفورهای ویژه و کمک به جذب آهن امکان‌پذیر می‌شود. به‌علاوه اینکه برخی از این باکتری‌ها در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاه نقش دارند (۴ و۳۳). برخی از این باکتری‌ها در همزیستی با گیاه ساختارهای ویژه نظیر گرهک‌ها را ایجاد می‌کنند اما کنش متقابل بعضی دیگر مثل باسیلوس‌ها با ریشه گیاهان با پیدایش هیچ ساختار گرهک مانندی همراه نیست، اگرچه برخی از آنها توانایی تثبیت ازت را نیز دارند، اما اکثراً با مکانیسم‌های دیگری که در بالا ذکر گردید، به رشد گیاه کمک می‌کنند. کنش متقابل این باکتری‌ها با گیاهان از نوع سیستم‌های همیاری به‌شمار می‌رود (۴ و ۱۲). بسیاری از PGPRها، به‌عنوان باکتری‌های کمک کننده (helper bacteria) به باکتری ریزوبیوم شناخته می‌شوند و معلوم شده که می‌توانند به افزایش تعداد گرهک‌ها و تقویت توان بالقوه تثبیت ازت و سایر اثرات ناشی از همزیستی با ریزوبیوم در گیاهان لگوم کمک نمایند (۴ و ۲۲).

استفاده از کودهای ازته صرف‌نظر از هزینه‌های سنگین و ایجاد آلودگی‌های زیست محیطی، افزایش شوری خاک را درپی دارد (۲۳). با توجه به وسعت خاک‌های شور در ایران و همچنین در مسیر حرکت به سوی کشاورزی ارگانیک و پایدار، مطالعه برای توسعه کودهای بیولوژیکی و تلقیح گیاهان با ترکیب‌های توام میکروارگانیسم‌ها برای بهینه کردن تثبیت نیتروژن و جذب عناصر غذایی نظیر فسفر و جذب آب توسط گیاه به‌ویژه در شرایط شور امری ضروریست و پژوهش حاضر به بررسی این ایده با ارزش پرداخته است.

مواد و روشها

جداسازی *سینوریزوبیوم ملی‌لوتی* مقاوم بـه شـوری: در طی فصل رشد (بهار ۱۳۸۹) به صـورت تصـادفی تعـدادی بوته یونجه از مزارع مختلف واقع در منطقه شور برخوار و

www.SID.ir

Archive of SID

میمه (دولت آباد) که در آنها در طی سال مذکور از کودهای آمونیومی استفاده نشده بود، جمع‌آوری شد. در آزمایشگاه گرهک‌ها با دقت توسط پنس استریل از ریشه جدا و با آب مقطر استریل شستشو داده شده و بعد به مدت ۵- ۳ ثانیه با الکل اتیلیک ۹۶ درصد ضدعفونی شدند. پس از شستشوی مجدد گرهک‌ها با آب مقطر استریل، گرهک‌ها در لوله‌های آزمایش حاوی ۱ تا ۲ میلی‌لیتر آب مقطر استریل له شدند و این سوسپانسیون روی محیط کشت اختصاصی رشد ریزوبیوم بنام YMA انتقال داده شد (۳۴). پس از رشد باکتری‌ها، به کمک رنگ‌آمیزی گرم و آزمایش‌های بیوشیمیایی و قدرت تلقیح مجدد یونجه و ایجاد گرهک به‌عنوان *سینوریزوبیوم ملی-لوتی* شناسایی شدند. جدایه‌های خالص شده *سینوریزوبیوم ملی‌لوتی* در محیط YMA، به صورت لکه‌گذاری بر روی پلیت‌های حاوی محیط YMA همراه با غلظت ۱۰۰ میلی-مولار NaCl کشت داده شد. پس از ۳ روز گرمخانه‌گذاری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، قطر کلنی‌ها اندازه‌گیری شد (۵). سپس جدایه‌ای که قطر کلنی آن در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl بیشتر از همه بود، به‌عنوان جدایه مناسب برای تلقیح گیاه یونجه در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl برگزیده شد.

جداسازی باسیلوس مقاوم به شوری: برای جداسازی باسیلوس‌ها ۰/۱ گرم از خاک سطحی مزرعه در ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۹ درصد نمک حل گردید و پس از قرار دادن لوله محتوی نمونه روی شیکر با چرخش ۱۵۰ دور در دقیقه، شوک حرارتی داده شد. برای این منظور، لوله محتوی باکتری‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد در بن ماری و بعد فورا در آب سرد قرار گرفت تا باکتری‌ها دچار شوک حرارتی شوند. این کار به‌منظور جداسازی باسیلوس‌های خاک که مقاوم به حرارت هستند از سایر باکتری‌های حل‌کننده فسفات در خاک، که حساس به حرارت می‌باشند، انجام شد (۳۱). برای تأیید باسیلوس بودن باکتری‌ها، رنگ‌آمیزی گرم و رنگ‌آمیزی اسپور از کشت کهنه و آزمایشهای بیوشیمیایی انجام شد. باسیلوس‌ها، باکتری‌های میله‌ای شکل، گرم مثبت و اسپوردار هستند. برای بررسی توانایی حل‌کنندگی فسفات توسط باسیلوس-ها، پس از پایین آمدن دما، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون فوق، در شرایط استریل بر روی محیط کشت PVK (پیکوساکایا آگار) کشت و پس از ۷-۳ روز گرمخانه‌گذاری، کلنی‌هایی که در اطراف آنها هاله شفاف وجود داشت، انتخاب شد (۳۰). این کلنی‌ها باکتری‌هایی هستند که منبع فسفات معدنی موجود در محیط کشت را حل کرده‌اند. بزرگتر بودن هاله رشد اطراف کلنی دلیل بر بیشتر بودن قدرت حل‌کنندگی فسفات باکتری است. برای سنجش قدرت حل‌کنندگی فسفات در شرایط شور، باسیلوس‌ها در محیط کشت PVK حاوی ۱۰۰ میلی-مولار NaCl کشت داده شدند و به مدت ۷-۳ روز در دمای ۳۰-۲۸ در گرمخانه قرار داده شدند. وجود کلنی‌هایی با هاله روشن در این محیط دلیل بر حفظ قدرت حل-کنندگی فسفات در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار NaCl است (۳۰). بنابراین، کلنی که دارای بزرگترین هاله شفاف در محیط کشت شور بود، به‌عنوان کلنی حاوی باکتری مناسب انتخاب گردید.

تلقیح ریشه‌ها با جدایه‌های سینوریزوبیوم و باسیلوس: آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح کامل تصادفی با فاکتورهای تلقیح باکتری در چهار سطح (شاهد، سینوریزوبیوم، باسیلوس و تلقیح توام سینوریزوبیوم و باسیلوس)، شوری در دو سطح (صفر و ۱۰۰ میلی‌مولار سدیم کلرید) و رقم در دو سطح (یزدی و همدانی) انجام شد.

بذرهای دو رقم یونجه از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه و با محلول هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت ۱ دقیقه و ۵ بار شستشوی متوالی با آب مقطر استریل شدند. رشد باکتری‌های سینوریزوبیوم و باسیلوس به‌طور جداگانه در محیط غذایی براث (Merck) انجام شد. برای تهیه یک لیتر

www.SID.ir

Archive of SID

از این محیط، طبق دستورالعمل موجود روی قوطی حاوی محیط کشت آماده، مقدار ۸ گرم از پودر آماده آن توزین و در یک لیتر آب مقطر حل گردید و بعد در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱۵ پاسکال به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شد. از این محیط برای رشد باکتری‌های سینوریزوبیوم و باسیلوس و تلقیح بذر و گیاه استفاده شد. تعداد ۱۰ بذر در هر گلدان که حاوی ۶۰۰ گرم خاک استریل که دارای مقادیری از شن و خاک معمولی به نسبت ۱ : ۳ و به میزان بسیار مختصر خاک برگ بود، در عمق ۲ سانتی‌متری از سطح خاک گلدان‌ها کاشته شدند و گلدان‌ها در دوره نوری ۸/۱۶ ساعت روشنایی/ تاریکی، درجه حرارت ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۵۰ درصد در گلخانه نگهداری شدند. برای اطمینان از فرایند تلقیح، پس از ظهور گیاهچه‌ها در سطح خاک و در پایان هفته اول، سوسپانسیون کشت میکربی از همان باکتری‌ها با OD=۰/۲ آماده شد و با سمپلر به مقدار یک میلی‌لیتر در پای هر گیاهچه افزوده شد.

اندازه‌گیری شاخص‌های رشد: گیاهان ۳۰ روزه از گلدان-ها برداشت و اندام هوایی گیاهان هر تیمار از منطقه ریشه جدا و پس از اندازه‌گیری وزن تر، هر اندام به‌طور مجزا در پاکت‌های کاغذی مجزا قرار گرفته و در آون ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد و زمانی که وزن آنها ثابت شد وزن خشک آنها نیز اندازه‌گیری گردید.

اندازه‌گیری کلروفیل: پس از گذشت ۳۰ روز غلظت کلروفیل a، b و کلروفیل کل بر حسب میلی‌گرم در گرم بافت گیاهی تعیین شد. ابتدا ۰/۱ گرم از بافت تازه پهنک برگ‌های جوان از قسمت میانی برگ دوم گیاه وزن شدند و با استون ۸۰٪ در هاون چینی روی یخ و به دور از نور مستقیم سائیده شدند. مخلوط به‌دست آمده با کمک کاغذ صافی درون بالن ژوژه صاف گردید و حجم عصاره به‌دست آمده با استون ۸۰٪ به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس جذب عصاره حاصل با اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۴۷۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده شد و با استفاده از فرمولهای مربوطه مقدار کلروفیل a و b بر حسب میلی‌گرم در گرم بافت گیاهی محاسبه گردید (۸).

اندازه‌گیری نشت الکترولیتی غشا: ۰/۱ گرم از بافت تر برگ را از هر تکرار به دقت شسته و بعد در لوله آزمایش درپوش‌دار محتوی ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه قرار داده شدند. این لوله‌ها به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفتند. پس از ۳ ساعت، هدایت الکتریکی (میکرو زیمنس) آنها با استفاده از EC متر اندازه‌گیری شد. سپس شیشه‌های محتوی نمونه‌های برگی به مدت ۲ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفته و برای بار دوم EC آنها پس از سرد شدن اندازه‌گیری گردید. درصد هدایت الکتریکی بیانگر مقدار نشت الکتریکی مواد از غشاء می‌باشد که مطابق رابطه زیر قابل محاسبه است (۲۰).

نشت الکترولیتی غشا (٪) = (هدایت الکتریکی نمونه قبل از جوشاندن / هدایت الکتریکی نمونه بعد از جوشاندن) × ۱۰۰

نتایج

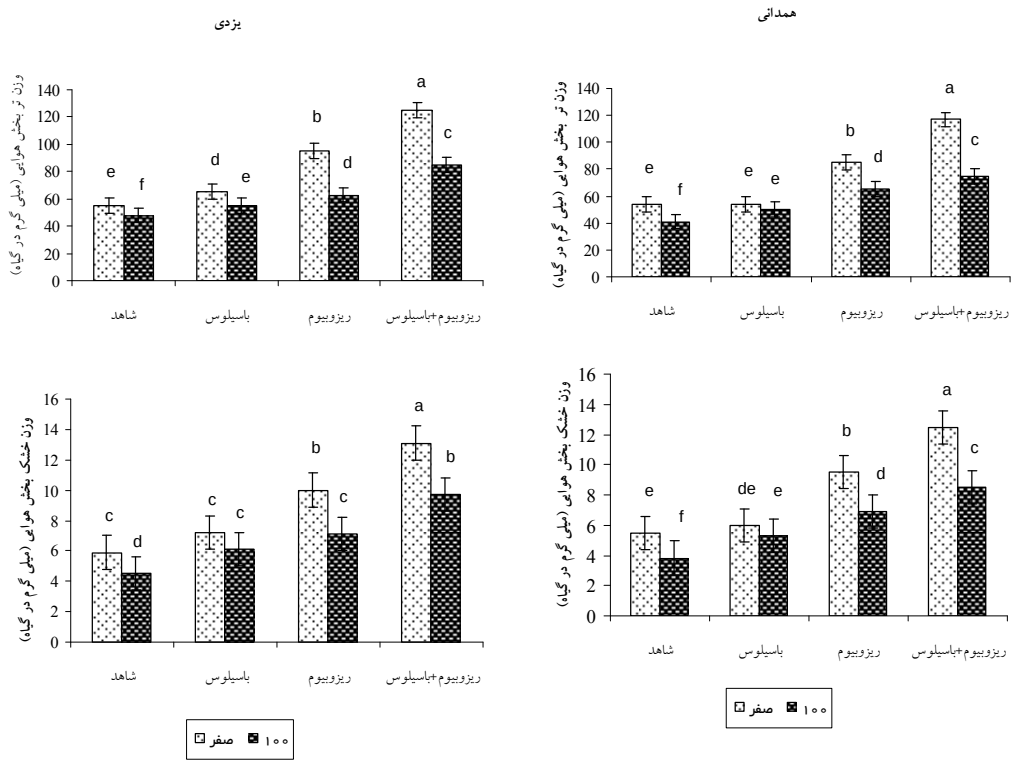
تجزیه واریانس (جدول۱) نشان داد که اثر تیمارهای رقم، شوری و همزیستی و همچنین اثرات متقابل آنها بر همه شاخص‌های رشد در سطح احتمال ۱ یا ۵ درصد معنی‌دار است. تنها اثر رقم بر وزن خشک بخش هوایی معنی‌دار نبود. همچنین اثر فاکتورهای شوری و همزیستی بر میزان کلروفیل a و b معنی‌دار بوده است. اثر رقم بر مقدار کلروفیل a معنی‌دار اما بر مقدار کلروفیل b معنی‌دار نبود. از اثرات متقابل دوگانه و سه‌گانه تنها اثر متقابل رقم و شوری بر مقدار کلروفیل a و b معنی‌دار بود. همچنین اثر سه تیمار رقم، همزیستی و شوری و همچنین اثر متقابل شوری و همزیستی برای مقادیر نشت الکترولیتی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. البته اثر متقابل سه‌گانه رقم، همزیستی و شوری و اثر متقابل رقم و همزیستی معنی‌دار نبود. در

www.SID.ir

Archive of SID

مقابل، اثر متقابل رقم و شوری در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود.

در شرایط غیر شور، وزن تر بخش هوایی یونجه یزدی (شکل۱) در تیمارهای شاهد با همه تیمارهای باکتری تفاوت معنی‌داری داشت، اما وزن تر بخش هوایی در تیمار توام باسیلوس و سینوریزوبیوم در حد معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود.



شکل ۱- اثر تیمارهای همزیستی و شوری روی وزن تر و خشک بخش هوایی کیاه یونجه ارقام یزدی و همدانی. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شده و حروف مشابه به مفهوم عدم تفاوت معنی‌دار مقادیر است.

جدول ۱- تجزیه واریانس (مقادیر مربع میانگین) داده‌های حاصل از اثر تیمارهای شوری، رقم و همزیستی بر رشد، مقدار کلروفیل و تمامیت غشای گیاهان یونجه

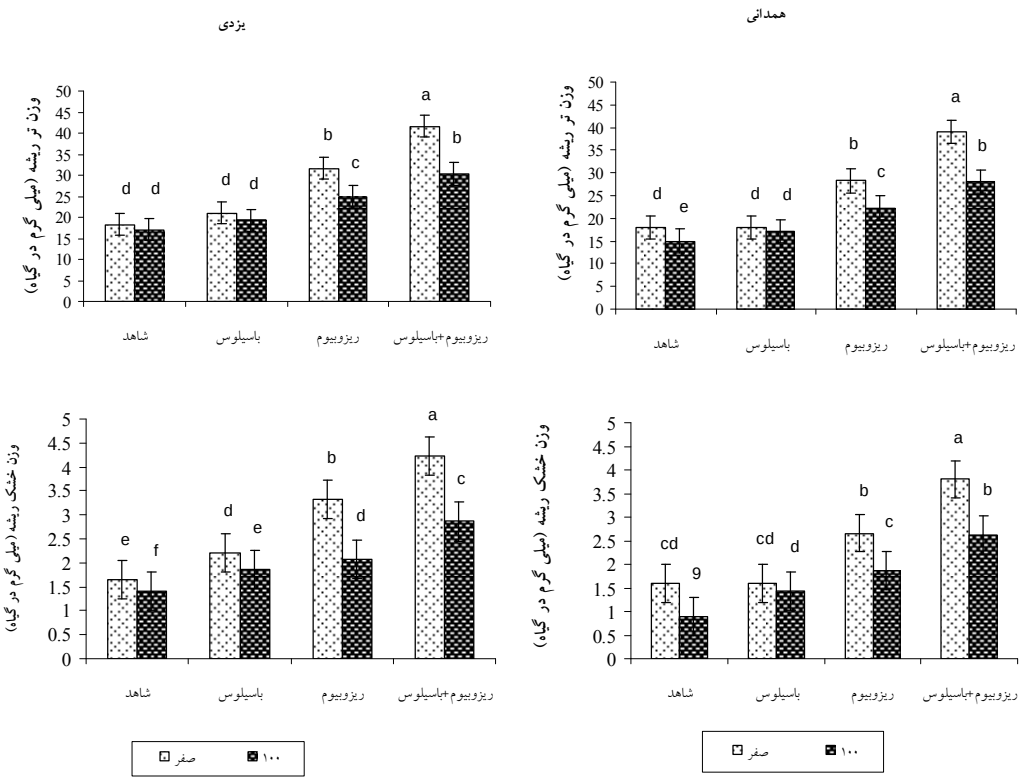
منبع تغییرات	درجه آزادی	وزن تر بخش هوایی	وزن خشک بخش هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	کلروفیل a	کلروفیل b	نشت الکترولیتی
رقم	۱	۲۱۲/۱۸۴ **	۲ ۵۲۱ ns	۲۷۲/۷۶۷ **	۱۰/۰۳۶**	۰/۱۶**	۰/۰۰۱ ns	۱۵/۳۳۴**
همزیستی	۳	۱۷۱۸/۵۵۵ **	۴۳۸/۰**	۳۰۵/۴۸۹ **	۱/۹۷۰*	۰/۰۳۳*	۰/۰۱۲ *	۳/۷۱۶**
شوری	۱	۱۲۳۸/۸۷۱ **	۲۵۲/۳**	۱۷۰/۷۴۰ **	۷/۴۴۲**	۴/۳۶**	۰/۴۳**	۱۲۰,۷۴۵**
رقم × همزیستی	۳	۵۳/۸۶۷ **	۲۰/۵۲**	۹۶/۴۲**	۴/۹۶۲**	۰/۰۱۴ ns	۳/۵۳E-۵	۰/۰۷۹ns
رقم × شوری	۱	۴۷/۸۳۸**	۳/۰۰۸ns	۷/۵۸۰**	۷/۴۴۲**	۰/۰۴۷*	۰/۰۰۵*	۰,۹۷۲۰*
شوری × همزیستی	۳	۴۴/۹۶۰ **	۱۳/۱۳**	۹۴/۲۰۷ **	۵/۲۹۰**	۰/۰۰۲ ns	۱/۳۰E-۵ ns	۱/۸۰۹**
رقم × همزیستی × شوری	۳	۱۳/۰۱*	۲/۷۸۰*	۱۲ /۳۱۶**	۴/۵۱۶**	۰/۰۱۲ns	۷/۶۱E-۵ ns	۰/۰۳۰ ns
خطای آزمایش	۳۲	۴/۴۸	۰/۹۴۵	۳/۳۱	۰/۶۲۸	۰/۰۱۰	۰/۰۰۱	۰/۱۲۹

*و**: به‌ترتیب در سطح احتمال ۵ درصد و ۱ درصد معنی‌دار است و ns معنی‌دار نیست.

www.SID.ir

Archive of SID

با اعمال شوری، میزان وزن تر بخش هوایی در همه تیمارها کاهش قابل‌توجهی داشت و بیشترین وزن تر بخش هوایی در تیمار توام باسیلوس و سینوریزوبیوم بدست آمد. در شرایط غیر شور، وزن‌تر بخش هوایی یونجه همدانی (شکل۱) در تیمارهای شاهد و باسیلوس تفاوت معنی‌داری نداشت، اما با اعمال شوری، اختلاف بین وزن تر بخش هوایی در تیمارهای شاهد و باسیلوس معنی‌دار شد. وزن تر بخش هوایی تیمارهای سینوریزوبیوم و تیمار توام باسیلوس و ریزوبیوم در هر دو حالت شور و غیر شور با شاهد تفاوت معنی‌داری داشت. در شرایط غیر شور، تفاوت وزن خشک بخش هوایی هر دو رقم یونجه در تیمارهای شاهد و باسیلوس معنی‌دار نبود، اما در تیمارهای سینوریزوبیوم تنها و یا سینوریزوبیوم همراه با باسیلوس معنی‌دار بود. البته تحت تنش شوری در هر دو رقم همه تیمارهای باکتری نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری را نشان دادند.



شکل ۲- اثر تیمارهای همزیستی و شوری روی وزن تر و خشک ریشه گیاه یونجه ارقام یزدی و همدانی. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شده و حروف مشابه به مفهوم عدم تفاوت معنی‌دار مقادیر است.

مقایسه نمودارهای شکل ۱ نشان می‌دهد که روند تغییرات وزن تر و خشک دو رقم نسبت به شوری و همزیستی تا حد زیادی مشابه بود. اگرچه در همه تیمارهای شوری و غیر شوری و همزیستی و غیرهمزیستی همواره وزن‌تر و خشک بخش هوایی در رقم یزدی بیشتر از همدانی بوده است اما درصد افزایش وزن تر و خشک بخش هوایی در اغلب تیمارهای همزیستی (به استثنای تیمار باسیلوس) برای رقم همدانی بیشتر از یزدی بود.

در بررسی اثر متقابل شوری و همزیستی بر وزن تر و خشک ریشه در یونجه یزدی (شکل ۲) مشاهده می‌شود که در شرایط غیر شور وزن خشک ریشه یونجه یزدی (شکل ۲) بین تیمارهای شاهد و باسیلوس تفاوت معنی‌داری

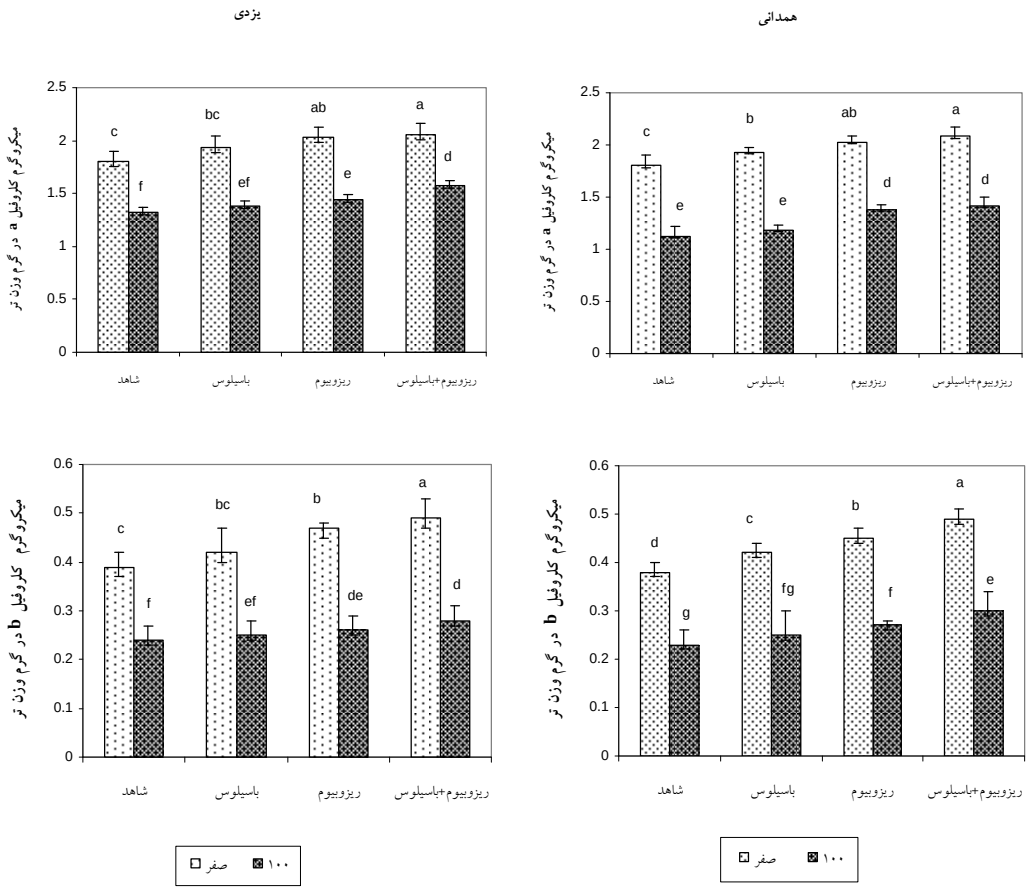
www.SID.ir

Archive of SID

داشت، اما وزن تر این دو تیمار تفاوت معنی‌داری نداشت. به هر حال وزن تر و خشک ریشه در تیمار ریزوبیوم به تنهایی و یا در تیمار توام باسیلوس و ریزوبیوم در شرایط غیر شور در حد معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود. به‌طوری‌که با اعمال شوری، میزان وزن تر و خشک ریشه در همه تیمارها کاهش قابل‌توجهی داشت و بیشترین وزن تر ریشه در تیمار توام باسیلوس و ریزوبیوم بدست آمد. در شرایط غیر شور در یونجه همدانی (شکل ۲)، وزن تر و خشک ریشه در بین تیمارهای شاهد و باسیلوس تفاوت معنی‌داری نداشت، اما با اعمال شوری، اختلاف بین وزن تر و خشک ریشه در تیمارهای شاهد و باسیلوس معنی‌دار شد.

نمودارهای شکل ۲ نشان می‌دهد که روند عملکرد ریشه هر دو رقم نسبت به شوری و همزیستی تا حد زیادی مشابه بوده است، در همه تیمارهای شوری و غیر شوری و همزیستی و غیرهمزیستی همواره وزن تر و خشک ریشه در رقم یزدی بیشتر از همدانی بوده است. اما درصد افزایش وزن تر و خشک ریشه در اغلب تیمارهای همزیستی (به استثنای تیمار باسیلوس) برای رقم همدانی بیشتر از یزدی بود.

در تیمار بدون شوری مقادیر کلروفیل a و b در رقم همدانی و رقم یزدی تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۳)، در تیمارهای شوری مقادیر کلروفیل a و b در رقم یزدی در حد معنی‌داری بیش از رقم همدانی بود. البته شوری مقادیر کلروفیل a و b را در حد معنی‌داری در هر دو رقم کاهش داد.



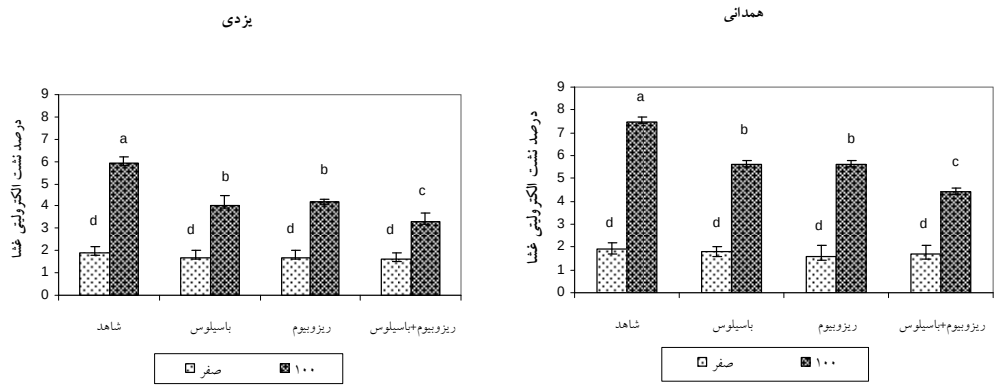
شکل ۳- اثر تیمارهای همزیستی و شوری روی مقدار کلروفیل a و b گیاه یونجه ارقام یزدی و همدانی. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شده و حروف مشابه به مفهوم عدم تفاوت معنی‌دار مقادیر است.

www.SID.ir

Archive of SID

در بین تیمارهای همزیستی، اثر ریزوبیوم به تنهایی بر مقادیر کلروفیل a و b معنی‌دار بود، اما اثر باسیلوس به تنهایی معنی‌دار نبود. مقادیر کلروفیل a و b در تیمار توام باسیلوس و ریزوبیوم در همه موارد معنی‌دار و بیشتر از سایر تیمارها بود.

درصد نشت الکترولیتی بین دو رقم در شرایط غیر شور تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۴)، اما با اعمال تیمار شوری میزان نشت الکترولیتی در حد معنی‌داری در هر دو رقم افزایش یافت ولی درصد نشت الکترولیتی در رقم همدانی نسبت به یزدی ۳۰٪ بیشتر افزایش یافت. در شرایط بدون شوری، همزیستی اثر معنی‌داری روی نشت الکترولیتی غشا نداشت ولی تحت تنش شوری، اعمال همزیستی مقدار نشت الکترولیتی را نسبت به شاهد شوری دیده و بدون همزیستی در حد معنی‌داری کاهش داد. اگرچه همه تیمارهای باسیلوس، سینوریزوبیوم و همزیستی توام باسیلوس و سینوریزوبیوم در شرایط شور افزایش نشت الکترولیتی را در هر دو رقم یزدی و همدانی تعدیل کردند، ولی اثر همزیستی توام باسیلوس و سینوریزوبیوم از همه قوی‌تر بود. از آنجا که اثر متقابل رقم و همزیستی معنی‌دار نبوده است (جدول ۱) می‌توان چنین نتیجه گرفت که همزیستی برای هر دو رقم در یک سطح اثر مثبت داشته است.



شکل ۴- اثر تیمارهای همزیستی و شوری روی مقدار نشت الکترولیتی غشاء گیاه یونجه ارقام یزدی و همدانی. داده‌ها میانگین ۳ تکرار ± انحراف معیار است. مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شده و حروف مشابه به مفهوم عدم تفاوت معنی‌دار مقادیر است.

بحث

تنش شوری با ایجاد تنش اسمزی جذب آب توسط گیاه را کاهش داده و موجب کاهش وزن تر گیاه می‌شود. کاهش دسترسی به آب و همچنین سمیت یونی ایجاد شده بوسیله تنش شوری و بر هم خوردن تعادل عناصر غذایی در خاک و گیاه متابولیسم گیاه را نیز تغییر می‌دهد و همین امر موجب کاهش وزن خشک گیاه می‌شود. در این پژوهش شوری موجب کاهش وزن تر و خشک گیاهان یونجه شد. اما کاهش وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی در رقم یزدی همواره کمتر از رقم همدانی بود. رقم یزدی بومی مناطق کویری و شور ایران مثل یزد است، در حالی‌که رقم همدانی رقم بومی مناطق سردسیر و غیرشور ایران است. سازگاری اکولوژیکی و گزینش جهت‌دار هر یک از این ارقام تفاوت‌های ذاتی این دو رقم را در پاسخ به شوری توجیه می‌کند. سایر محققان نیز اثر منفی شوری بر رشد گیاه و تفاوت در پاسخ اکوتیپ‌های یونجه (۷، ۱۴، ۲۴ و ۲۹) و سایر گیاهان (۱ و ۳) را گزارش کرده‌اند. همچنین در طی تنش شوری، گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شوند که موجب پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء و نشت

www.SID.ir

Archive of SID

الکترولیت‌ها از آن می‌شوند (۲۳). از سوی دیگر گونه‌های فعال اکسیژن که در تنش شوری ایجاد می‌شوند باعث ناپایداری غشای تیلاکوئیدها و در نتیجه آسیب به کلروفیل می‌گردند (۱۱). Turan و همکارانش (۲۰۰۷) گزارش کردند که کاهش مقدار کلروفیل در برگ‌های لوبیا تحت تنش شوری احتمالاً به دلیل آسیب به کمپلکس کلروفیل- پیگمان- لیپید یا افزایش فعالیت آنزیم کلروفیلاز در اثر شوری می‌باشد. در نتایج ما نیز شوری باعث افزایش نشت الکترولیتی غشا و کاهش کلروفیل a و b در هر دو رقم گیاه یونجه شد و احتمالاً کاهش فتوسنتز در اثر کمبود کلروفیل منجر به کاهش رشد و وزن خشک گیاهان ۳۰ روزه شده است. البته افزایش نشت الکترولیت‌ها از غشاء (۳) و کاهش محتوای کلروفیل (۳ و ۱۱) و افت کارایی فتوسنتز (۱۸) تحت تنش شوری در سایر گیاهان نیز گزارش شده است.

نتایج نشان داد که تیمارهای باکتری نسبت به شاهد (بدون همزیستی)، وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی را در اکثر موارد افزایش دادند. همچنین تیمار همزیستی اغلب باعث کاهش اثرات تنش شوری بر رشد هر دو رقم یونجه (شکل ۱ و ۲) شد. گزارش‌های دیگر نیز نشان می‌دهد همزیستی با باکتری‌های PGPR باعث افزایش رشد گیاه در شرایط نرمال و بالا رفتن توان گیاه در تحمل تنش‌های غیرزیستی می‌شود (۱۰ و ۱۷). همزیستی ممکن است جذب عناصرغذایی مفید مثل فسفر، ازت و پتاسیم را در گیاه افزایش دهد و پارامترهای رشد را تقویت کند. همچنین باکتری‌ها ممکن است با تولید هورمون‌ها و تحریک رشد ریشه نسبت ریشه به ساقه را افزایش داده و در نتیجه جذب آب و املاح را متعادل کنند (۲۲). Ashraf و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که بعضی از باکتری‌های PGPR تولید اگزوپلی‌ساکاریدهایی را می‌کنند که با کاتیون‌ها ازجمله Na^+ پیوند برقرار کرده و این موضوع موجب کاهش تجمع سدیم و اثرات منفی ناشی از آن در سلول شده، در نتیجه اثرات منفی شوری را کاهش می‌دهد و منجر به بهبود جراحت غشا و افزایش رشد گیاه در مقایسه با شاهد در شرایط تنش شوری می‌شود. از این رو بنظر می‌رسد همزیستی موجب کاهش آسیب‌های اکسیداتیو ایجاد شده توسط شوری و در نتیجه کاهش نشت الکترولیتی می‌شود. جلوگیری از تخریب اکسیداتیو غشا و نشت الکترولیتی از آن توسط تیمارهای همزیستی به پایداری سلول‌ها و غشاهای کلروپلاستی کمک کرده و با حفاظت از کلروفیل از کاهش عملکرد فتوسنتزی تحت تنش شوری جلوگیری می‌کند و این امر باعث می‌شود گیاهان تیمار شده با باکتری‌ها رشد و مقاومت بهتری در مقایسه با گیاهان شاهد نشان داشته باشند.

این تحقیق نشان داد که در مواردی باسیلوس بر وزن خشک بخش هوایی و وزن‌تر و خشک ریشه رقم همدانی در شرایط غیر شور اثر معنی‌داری نداشت. Erkovan و همکارانش (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که باکتری حل‌کننده فسفات *Bacillus megaterium* واریته فسفاتیکوم اثری بر میزان وزن خشک بخش هوایی و ریشه شبدر نسبت به گیاهان شاهد نداشت. میزان مؤثر بودن همزیستی بین باسیلوس‌ها و گیاهان به ساختار ژنتیکی باکتری، گیاه و کنش‌های متقابل بین گیاه و باکتری و عوامل محیطی بستگی دارد. فاکتورهای داخلی گیاه در میزان کلونیزه شدن ریشه گیاه توسط باسیلوس‌ها نقش مهمی دارند (۱۵). به هر حال اگرچه در شرایط غیر شور اثر باسیلوس بر شاخص‌های رشد معنی‌دار نبود، اما در شرایط شور اثر باکتری معنی‌دار شد. اثر مثبت باسیلوس‌ها در تحمل تنش شوری در گوجه‌فرنگی (۳۵)، کنگرفرنگی (۲۹) و برنج (۲۱) نیز گزارش شده است. تحت تنش شوری تعادل یونی و میزان pH خاک به‌هم می‌خورد و جذب فسفات در pH قلیایی مشکل می‌شود. باکتری‌هایی همانند باسیلوس‌ها که قدرت حل‌کنندگی فسفات دارند با بالا بردن میزان دسترسی گیاه به فسفر خاک در حفظ تعادل انرژی و تولید متابولیت‌های ضروری مثل ATP و مولکول‌های مهم حیاتی مانند DNA در سلول‌های گیاه کمک می‌کنند (۱۲).

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج نشان داد که تیمار سینوریزوبیوم‌های متحمل به نمک به تنهایی در حد معنی‌داری شاخص‌های رشد را در هر دو شرایط شور و غیر شور افزایش داده است. ریزوبیوم‌ها قدرت تثبیت نیتروژن مولکولی را دارند و بعضی جدایه-های ریزوبیوم دارای قدرت حل‌کنندگی فسفات، تولید هورمون‌های گیاهی و ترشح سیدروفورها نیز هستند و از این طریق به رشد گیاه کمک می‌کنند (۶ و ۲۲). همچنین برخی از ریزوبیوم‌ها ازجمله سینوریزوبیوم ملی‌لوتی با داشتن آنزیم ACC- دآمیناز قادرند سطح تولید اتیلن در شرایط تنش را کاهش دهند و به این ترتیب موجب تعدیل اثرات تنش‌هایی مثل شوری بر گیاهان شوند (۲).

اگرچه هر دو گروه تیمارهای همزیستی منفرد و توام باعث بهبود تحمل گیاه به تنش شوری شدند، اما در بیشتر موارد اثر همزیستی توام بیشتر از همزیستی منفرد بود. Asghari و Mussarat (۲۰۰۹) نیز گزارش کردند که در تلقیح منفرد ریزوبیوم یا سودوموناس به گیاه ذرت تحت تنش شوری، نشت الکترولیتی کاهش نیافت، اما تلقیح توام دو باکتری باعث کاهش نشت الکترولیتی در تنش شوری شد. Han و Lee (۲۰۰۵) نیز گزارش کردند که تلقیح توأم کاهو با *Bradyrhizobium japonicum* و گونه‌هایی از باسیلوس‌ها و سراشیا موجب بهبود شاخص‌های رشد، فعالیت آنتی‌اکسیدانتی و بهبود محتوای یونی گیاه و کاهش جراحت غشا در شرایط شوری شد. آنها معتقدند احتمالاً ریزوبیوم و باسیلوس موجب تغییراتی در ریشه‌های در معرض شوری شده‌اند که منجر به حفاظت غشاها شده و در نتیجه نشت الکترولیتی غشا و پراکسیداسیون لیپیدی کاهش یافته است. Mishra و همکارانش (۲۰۰۹) نیز نشان دادند که تلقیح *توام Bacillus thuringeinsis-KR1* همراه با *Rhizobium leguminosarum* به عدس رشد، گرهک‌زایی و تثبیت نیتروژن را نسبت به تلقیح منفرد با ریزوبیوم افزایش داد. به عقیده آنان باسیلوس‌ها با ایجاد سیگنال‌هایی ورود ریزوبیوم را به ریشه آسان می‌کنند. در مجموع بعضی باسیلوس‌ها و از آن جمله *Bacillus thuringeinsis-KR1* قادر به تولید IAA (ایندول استیک اسید) می‌باشند و از این طریق به تحریک رشد ریشه و افزایش تلقیح آن بوسیله ریزوبیوم کمک می‌کنند (۱۳ و ۲۴). از سوی دیگر نیاز به منابع فسفات در گیاهان همزیست با ریزوبیوم افزایش می‌یابد. باسیلوس‌ها و سودوموناس‌های حل‌کننده فسفات هم با تأمین فسفات و هم به‌عنوان باکتری‌های کمک‌کننده و سازگار با ریزوبیوم‌ها، باعث بهبود گرهک‌زایی و تثبیت نیتروژن توسط ریزوبیوم می‌شوند و به‌همین دلیل اعمال تیمار همزیستی توام مؤثرتر از همزیستی منفرد می‌شود (۱۷ و ۲۷).

در مقایسه اثر تنش شوری بین ارقام یزدی و همدانی اگرچه همواره مقدار عددی شاخص‌های رشد و کلروفیل در یونجه یزدی بالاتر بود اما اثر همزیستی در افزایش مقاومت به شوری در یونجه همدانی قوی‌تر از یونجه یزدی بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که همزیستی توانایی پاسخ گیاه به تنش شوری را بهبود می‌بخشد و این اثر مخصوصاً در ارقام حساس‌تر به شوری بیشتر مشهود است و می‌توان از آن برای ارتقای تحمل به تنش شوری در ارقام حساس‌تر استفاده کرد. بر اساس نتایج این تحقیق توصیه می‌شود در تهیه کودهای بیولوژیک از ترکیب دوگانه یا چندتایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات و تثبیت‌کننده ازت استفاده شود تا بازدهی اثر این کودها در بهبود عملکرد گیاه افزایش یابد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهرکرد برای حمایت مالی از این پژوهش تشکر نموده و از همکاری دکتر اکبر مستاجران ودکتر گیتی امتیازی در تهیه جدایه ها تشکر و قدردانی می نماییم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱. خدابخش، ف. عموآقایی، ر. مستاجران ،ا. امتیازی. گ. ۱۳۸۹. بررسی اثر هیدرو و اسموپرایمینگ دانه‌های نخود بر روی جوانه‌زنی، فاکتورهای رشد و تعداد گرهک‌های ریشه در شرایط تنش شوری. مجله ریست گیاهی ایران. شماره ششم.صفحات ۸۶-۷۱

۲. خسروی، ه . یحچالی، ب. علیجانی، ح. ۱۳۸۸. تعیین پتانسیل تعدادی از ریزوبیوم‌های بومی به عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاه و نقش آنها در کاهش اتیلن تنشی. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۲، شماره ۴. صفحات ۶۶۱-۶۷۰

۳. عموآقایی،ر ، قربان‌نژاد نی‌ریزی،ه.، مستاجران.ا.. ۱۳۹۱. بررسی اثر شوری بر رشد گیاهچه، میزان کلروفیل، محتوای نسبی آب و پایداری غشا در دو رقم کلزا. مجله زیست شناسی ایران. پذیرش شده.

۴. عموآقایی،ر. مستاجران. ا. ۱۳۸۶. سیستم‌های همیاری گیاه و باکتری. انتشارات دانشگاه اصفهان. ۲۳۷ صفحه

۵. قاسم ف.، پوستینی ک.، بشارتی ح و محمدی و. ۱۳۸۹. بررسی کارایی همزیستی و مقاومت به شوری جدایه‌های ریزوبیومی همزیست با یونجه‌های بومی خاک‌های استان تهران و زنجان. مجله علوم گیاهان زراعی ایران، ۴۱: ۱۵۳-۱۴۱.

6. Alikhani H. A., Ranstin N. and Antoun H. 2006. Phosphate solubilization activity of rhizobia native to Iranian soils. Plant and Soil. 287: 35-41.

7. Amooaghaie R. 2011. The Effect of hydro and osmoprimng of on alfalfa seed germination and antioxidant defenses under high salt concentration stress. African Journal Biotechnology. 10: 6269-6275

8. Arnon D. I. 1946. Copper enzyme in isolated chloroplasts 1- Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiology, 24: 1-15.

9. Ashraf M., Berge S. H. and Mahmood O. T. 2004. Inoculating wheat seedling with exopolysaccharide producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. Biology and Fertility of Soils, 40: 157-162.

10. Asghari B. and Musarrt J. 2009. Salt tolerance in *Zea mays (L).* following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas.* Biology and Fertility of Soils, 45: 405-413.

11. Beinsan C., Camen D., Sumalan R. and Babou M. 2007. Study concerning salt stress effect on leaf area dynamics and chlorophyll content in four bean local landraces from Banat area, International symposium on Agriculture. Romania.-09.

12. Banerjee M. R., Yesmin L. and Vessey J. K. 2006. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers and biopesticides. In: Rai M. K. (ed), Handbook of Microbial Biofertilizers. Food Products Press, New York, pp. 137-181.

13. Bianco C. and Defez R. 2010. A *Sinorhizobium meliloti* IAA-overproducing strain improves phosphate solubilization and *Medicago* plant yield. Applied and Environmental Microbiology, 28: 2756-09.

14. Darvishi B., Poostini K. and Tavakol Afshar R. 2009. Ion distribution pattern in various alfalfa (*Medicago sativa L.*) organs respect to phytomass under saline conditions. Iranian Journal of Field Crop Science, 40: 31-43.

15. Emmert E. A. B., Milner J. L., Lee J. C., Pulvermacher K. L., Olivares H. A., Clardy J. and Handelsman J. 1998. Effect of canavanine from alfalfa seeds on the population biology of *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology, 64: 4683-4688.

16. Erkovan H. E., Gullap M. K., Dasci M. and Koc A. 2010. Effect of phosphorus fertilizer and phosphorus solubilizing bacteria applicationon clover dominant meadow: I. hay yield and botanical composition. Turkish Journal of Field Crops, 15: 12-17.

17. Guinazo B. L., Andres J. A., Delpapa M. F., Pistorio M. and Rosa B. S. 2010. Response of alfalfa (*Medicago sativa* L.) to single and mixed inoculation with phosphate-solubilizing bacteria and *Sinorhizobium meliloti*. Biology and Fertility of Soils, 46: 185-190.

18. Han H. S. and Lee K. D. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of Lettuce under soil salinity. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 1: 210-215.

19. Hasaneen M. N. A., Younis M. E. and Tourky S. M. N. 2009. Plant growth metabolism and adaptation in relation to stress conditions XXIII. Salinity biofertility interactive effects on growth,

www.SID.ir

Archive of SID

carbohydrates and photosynthetic efficiency of *Lactuca sativa*. Plant Omics Journal, 2: 60- 69.

20. Heat R. L. and Packer L. 1968. Photoproxidation in isolated chloroplasts. I- kinetics and stochimerty of faty acid peroxidation. Arch Biochemistry and Biophysics, 125: 89-198.
21. Jha Y., Subramanian R. B. and Patel S. 2011. Combination of endophytic and rhizospheric plant growth promoting rhizobacteria in *Oryza sativa* shows higher accumulation of osmoprotectant against saline stress. Acta Physiologia Plantarum 33:797–802.
22. Lugtenberg B. and Kamilova F. 2009. Plant growth promoting rhizobacteria. Annual Review of Microbiology, 63: 541-556.
23. Manchanda G. and Garg N. 2008. Salinity and its effects on the functional biology of legumes. Acta Physiologia Plantarum, 30: 595-618.
24. Mishra P. K., Mishra S. Selvakumar G. Bisht J. K. Kundu S. and Gupta H. S. 2009. Coinoculation of *Bacillus thuringeinsis-KR1* with *Rhizobium leguminosarum* enhances plant growth and nodulation of pea (*Pisum sativum L.*) and lentil (*Lens culinaris L.*). World Journal Microbiology and Biotechnology, 25:753–761.
25. Monirifar H. and Barghi M. 2009. Identification and selection for salt tolerance in alfalfa (*Medicago sativa L.)* ecotypes via physiological triats. Notulae Science Biologicae, 1: 63-66.
26. Peng Y., Gao Z., Gao Y., Liu G., Sheng L. and Wang D. 2008. Ecophysiological characteristics of alfalfa seedlings in response to various mixed salt alkaline stresses. Journal of Integrative Plant Biology, 50: 29-39.
27. Rosas S. B., Javier A. Andre S., Rovera M. and Nestor S. 2006. Phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* can influence the rhizobia legume symbiosis. Soil Biology and Biochemistry, 38: 3502-3505.
28. Saleh, S.A., H. Heuberger and Schnitzler, W. H. 2005. Alleviation of salinity effect on artichoke productivity by *Bacillus subtilis* FZB24, supplemental Ca and micronutrients. Journal Applied Botany and Food Quality. 79: 24-32
29. Salehi M., Salehi F., Poustini K. and Heidari-Sharifabad H. 2008. The effect of salinity on the nitrogen fixation in 4 cultivars of *Medicago sativa L.* in the seedling emergence stage. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 4: 413-415.
30. Sapsirisopa S., Chookietwattana K., Maneewan K. and Khaengkhan P. 2011. Effect of salt tolerant *Bacillus* inoculum on rice KDML 105 cultivated in saline soil. Asian Journal of Food and Agro-Industry, Special Issue: S69-S74.
31. Thiel, T. 1999. Isolating Bacillus from soil. www.umsl.edu/≈ microbes/pdf /bacillus.pdf
32. Turan M. A., Kathat V. and Taban S. 2007. Salinity induced stomatal resistance, proline, chlorophyll and ion concentration of bean. International Journal of Agriculture Research, 5: 483-488.
33. Van Loon L. C. 2007. Plant responses to plant growth promoting rhizobacteria. European Journal Plant Pathology, 119: 243-254.
34. Vincent J. M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. I.B.P. Handbook 15. Blackwell, Oxford, PP. 120-130.
35. Woitke, M., Junge, H. and Schintzler, W. H. 2004. *Bacillus subtilis* as growth promotor in hydroponically grown tomatoes under saline conditions. Acta Horticulturae. 659: 363-369

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of root inoculation of two alfalfa cultivars with strains of *Bacillus* and *Sinorhizobium* species on growth, chlorophyll content and cell membrane stability under salinity stress

Amooaghaie R. and Nikandish F.

Biology Dept., Faculty of Science, Shahrekord University, Shahrekord, I.R. of Iran

Abstract

In this research, *Rhizobium* strains from nodules of alfalfa plants and *Bacillus* strains were isolated from field soils in Dowlatabad, Isafahan. Salt tolerant strains were detected by drop plate method on YMA and PVK culture media containing 100 mM NaCl. Then, the seeds and seedlings of two alfalfa cultivars (*Yazdi* and *Hamedani*) were inoculated singly or both simultaneously with strains of *Sinorhizobium* and *Bacillus* species and then were grown in 2 levels of salinity (0 and 100 mM NaCl). Results showed that salinity increased the electrolyte leakage and reduced chlorophyll a and b contents as well as dry and fresh weights of roots and shoots of the plants in both cultivars. *Hamedani* cultivar was more sensitive to salinity compared with *Yazdi*. Inoculation with *Sinorhizobium* and *Bacillus* improved plant growth, chlorophylls content and membrane stability both in saline and none-saline conditions compared with the non-inoculated control. The two bacterial strains were synergistic to each other so that co-inoculation was often more effective than single inoculation with *Rhizobium* or *Bacillus*. The results suggest that inoculation of the plants with strains of these two bacterial species could help them overcome the salt stress.

Key words: alfalfa *(Medicago sativa*), *Bacillus*, chlorophyll, membrane electrolyte leakage, *Sinorhizobium*, Salinity

www.SID.ir