

نقش باکتری‌های محرک رشد گیاهی بر برخی صفات جوانه‌زنی و ظهور گیاهچه در آزمایشگاه، صفات مورفولوژیکی و میزان رنگدانه‌های یونجه اکوتیپ همدانی (*Medicago sativa* L.) در شرایط گلخانه

مرضیه سلطانی آلکویی^۱، علی عباسی سورکی^۲، شهرام کیانی^۳ و محسن مبینی دهکردی^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و تکنولوژی بذر دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد

۲. استادیار گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد

۳. دانشیار گروه خاکشناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد

۴. دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده علوم پایه دانشگاه شهرکرد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۴/۱۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۱۶)

چکیده

به منظور مقایسه تاثیر باکتری‌های محرک رشد بر جوانه‌زنی بذر یونجه همدانی آزمایشی در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۴ تکرار و ۸ تیمار تلقیح باکتریایی (شامل عدم تلقیح، کاربرد باکتری *Bacillus megaterium* PTCC 1250، *Acinetrobacter calcoaceticus* PTCC 1318، *Enterobacter aerogenes* PTCC 1221 بصورت منفرد و کاربرد توأم دو گانه و سه گانه آن‌ها) انجام گرفت. آزمایش دیگری در گلخانه بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی با ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای باکتریایی ذکر شده بعنوان عامل اول و تزریق و عدم تزریق باکتری به خاک گلدان‌ها بعنوان عامل دوم در نظر گرفته شدند. نتایج نشان داد کاربرد باکتری شاخص وزنی بینه گیاهچه، درصد و سرعت جوانه‌زنی را افزایش داد اما بر دیگر صفات یونجه در آزمایشگاه اثری نداشت. تلقیح بذرها با باکتری در گلخانه اثرات مثبت بر رشد گیاه یونجه گذاشت و درصد و سرعت سبز شدن، وزن خشک گیاه، حجم و طول ریشه، میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل برگ را افزایش داد. تزریق باکتری پای گیاهچه نیز برخی صفات را تحت تاثیر قرار داد که می‌تواند به دلیل استقرار بهتر و جمعیت بیشتر باکتری در ریزوسفر باشد. در مجموع کاربرد منفرد باکتری نتایج بهتری نسبت به کاربرد دو و سه باکتری با هم داشت لذا به نظر می‌رسد اثرات ضدیت باکتری‌ها بر یکدیگر ممکن است اثرات مثبت آن‌ها را کاهش دهد.

کلمات کلیدی: آسینتروباکتر، باسیلوس، سرعت سبز شدن، کلروفیل، یونجه

Effect of plant growth promoting bacteria on Seed germination and seedling emergence of alfalfa (*Medicago sativa* L.) hamedani ecotype in the laboratory, morphological characteristics and pigment contents in greenhouse conditions

M. Soltani Alikooyi¹, A. Abbasi Sourki², Sh. Kiyani³ and M. Mobini Dehkordi⁴

1. M.Sc. Student of Seed Science and Technology, Faculty of Agriculture, the University of Shahrekord.

2. Assistant Professor, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.

3. Associated Professor of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahrekord University.

4. Associated Professor of Microbiology Department, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord University.

(Received: Jul. 03, 2018 – Accepted: Dec. 07, 2018)

Abstracts

In order to comparison the effects of growth promoting bacteria on germination of hamadani alfalfa seeds, a randomized complete block design was conducted with 4 replications and 8 levels of bacterial inoculation (include non-inoculation, application of *Acinetrobacter calcoaceticus* PTCC 1318, *Bacillus megaterium* PTCC 1250, *Enterobacter aerogenes* PTCC 1221 lonely and their pairwise and triple combination of them). Another CRD factorial experiment was also conducted with 3 replications in greenhouse conditions. Mentioned bacterial treatments were as the first factor and injection of bacteria into the soil of pots as the second factor. The results showed that application of bacteria increased the vigor index of seedling, percentage and germination rate, but did not affect other alfalfa traits in the laboratory. Inoculation of seeds with bacteria in the pots had positive effects on alfalfa growth, percentage and rate of emergence, dry weight, root volume and length, chlorophyll a, b and total chlorophyll content. Injection of bacteria to the soil also affected some traits, which could be due to better placement and/or a larger population of bacteria in the rhizosphere. Application of bacteria lonely had better results than their combinations. It may be due to antagonistic effects of bacteria on each other, which may reduce positive effects.

Keywords: *Acinetrobacter*, *Bacillus*, Emergence rate, Chlorophyll, *Medicago*

* Email: aabasi59@yahoo.com

مقدمه

گیاهان همواره در معرض شرایط محیطی نامطلوب قرار دارند و این تنش‌ها بر رشد و عملکرد گیاه اثر می‌گذارد. امروزه از استراتژی‌های مختلف برای تولید گیاهان مقاوم به تنش استفاده می‌شود که می‌توان به تکنیک پرایمینگ اشاره کرد. پرایمینگ بذر القای یک وضعیت فیزیولوژیکی خاص در گیاه بوسیله تیمار بذر با ترکیبات طبیعی و مصنوعی قبل از جوانه‌زنی است که گیاه را در برابر تنش‌ها آماده می‌کند. گیاهان رشد کرده از بذور پرایم شده پاسخ دفاعی قوی و سریعی در برابر تنش نشان می‌دهند. بیوپرایمینگ بذر با باکتری‌های محرک رشد مکانیسم‌های دفاعی بذر را در برابر تنش فعال (Ibrahim, 2015) و سبب تحریک رشد تارهای کشنده، جذب بهتر مواد غذایی، تثبیت نیتروژن (Van Loon, 2007)، بهره‌وری آب، سبز شدن یکنواخت، ایجاد ریشه‌های عمیق در گستره وسیعی از درجه حرارت‌ها، مقاومت در برابر بیماری (Mustafa *et al.*, 2017) و معدنی شدن مواد آلی می‌شود (Pii *et al.*, 2015). در این روش میکروب‌های سودمند از طریق بافت گیاهی، خاک یا تلقیح با بذر اعمال می‌گردند. میکروارگانیزم‌های خاک نقش مهمی در مدیریت مواد مغذی و تنوع زیستی خاک داشته و با تأثیر بر فیزیولوژی و توسعه گیاه عملکرد را افزایش می‌دهند (Choudhary *et al.*, 2016). این باکتری‌ها عناصر مهم تغذیه‌ای که از دسترس گیاه خارج است را از طریق فرآیندهای بیولوژیکی به فرم قابل دسترس تبدیل می‌کنند (Vessey, 2003). باکتری‌ها فراوان‌ترین میکروارگانیزم‌های ریزوسفر هستند. آن‌ها از طریق آزاد کردن ترکیبات آلی محیط را به سمت تنوع کمتر پاتوژن‌ها پیش می‌برند و به نظر می‌رسد از طریق قابلیت رقابتی که در تثبیت باعث می‌شوند، فیزیولوژی گیاه را نیز تحت تأثیر قرار دهند (Sivasakthi *et al.*, 2013). گروهی از میکروارگانیزم‌ها نیز حل‌کننده فسفر هستند و گروهی

از طریق تولید سیدروفور و کلاته کردن آهن سبب افزایش انحلال مواد غذایی می‌گردند. تلقیح گیاهان با باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPR) می‌تواند اثرات قابل توجهی بر گیاه در دو سطح فیزیولوژیکی و مولکولی (به عنوان مثال القای حالت اسیدی در ریزوسفر، تنظیم بالادستی و فرودستی ژن‌های درگیر در جذب و انتقال) داشته باشد که سبب افزایش کارایی گیاهان در جذب مواد و مقابله با تنش‌های غیر زیستی می‌شود (Pii *et al.*, 2015). PGPRها توانایی تولید ایندول استیک اسید، آمونیاک، سیانید هیدروژن، سیدروفور و انحلال فسفات را داشته و می‌توانند فعالیت ضد قارچی نیز نشان دهند (Ahmad *et al.*, 2008) و در شرایط تنش مواد غذایی با تولید اتیلن داخلی از طریق آنزیم ۱-مونوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلیک اسید باعث افزایش انحلال مواد غذایی و تقویت سیستم ریشه‌ای می‌شوند (Glick, 2012). بعلاوه سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی را افزایش داده و سبب یکنواختی و بالابردن میزان محصول و افزایش کیفیت و عملکرد می‌شود. باکتری‌ها به صورت مستقیم از طریق ارائه مواد مغذی یا تولید تنظیم‌کننده‌های رشدی و یا غیر مستقیم از طریق محافظت گیاه در برابر آلودگی‌ها سبب بهبود رشد گیاه می‌گردند (Goswami *et al.*, 2016). مکانیسم‌های مستقیم شامل تثبیت نیتروژن، افزایش دسترسی به مواد غذایی در ریزوسفر مثل انحلال فسفات نامحلول، تأثیر مثبت در مورفولوژی و رشد ریشه، رابطه همزیستی بین گیاه و میکروب (Vessey, 2003) و ترشح هورمون‌هاست. از مکانیسم‌های غیرمستقیم تولید سیدروفور (مولکول‌های کوچک متصل به فلز)، کنترل بیولوژیکی پاتوژن‌های گیاهی خاکزاد، تولید آنتی‌بیوتیک، تولید سیانید هیدروژن، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی قارچ‌ها مانند کیتیناز و β -1,3 گلوکاناز (Choudhary *et al.*, 2016)، القای مقاومت سیستمیک، آنتی‌بیوسیس و رقابت برای مواد مغذی است که به رشد گیاه کمک می‌کنند (Kumar Jha and Saraf, 2015). PGPRها تأثیر مثبت بر اکوسیستم دارند، ثبات و بهره‌وری

را برای تقویت رشد محصولات قوت بخشیده است. از سوی دیگر بیوپرایمینگ سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی را افزایش داده و سبب یکنواختی و بالابردن میزان محصول و افزایش کیفیت و عملکرد می‌شود و می‌تواند در تمام طول دوره رشد گیاه همراه آن باشد (Choudhary et al., 2016). در این پژوهش از باکتری‌های محرک رشد گیاهی در تلقیح با بذر یونجه استفاده شد تا تاثیر آن‌ها بر شاخص‌های جوانه‌زنی، رشد و بنیه گیاهچه و میزان رنگدانه‌های برگ یونجه در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

الف) اثر تیمارهای باکتریایی بر شاخص‌های

جوانه‌زنی، رشد و بنیه بذر یونجه

۱- طرح آزمایش و تیمارها: این پژوهش در آزمایشگاه علوم و تکنولوژی بذر گروه زراعت دانشکده کشاورزی دانشگاه شهرکرد در سال ۱۳۹۶ اجرا گردید. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با ۴ تکرار انجام شد. تیمارها شامل ۸ سطح تلقیح باکتریایی (شامل عدم تلقیح بذر با باکتری به عنوان شاهد، استفاده از باکتری *Acinetobacter calcoaceticus* PTCC 1318، *Bacillus megaterium* PTCC 1250، *Enterobacter aerogenes* PTCC 1221 به صورت منفرد و کاربرد توام دو باکتری *E. aerogenes* + *B. megaterium*، *A. calcoaceticus*، *A. calcoaceticus* + *B. megaterium* + *E. aerogenes* و کاربرد توام سه باکتری *B. megaterium* + *E. aerogenes* + *A. calcoaceticus* بود که بر روی توده بذری یونجه همدانی انجام گرفت. باکتری‌های بکار رفته در این پژوهش از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران در سال ۱۳۹۶ خریداری شدند.

۲- آماده‌سازی محیط کشت: به منظور کشت

باکتری‌ها از دو محیط TSA و TSB استفاده شد. که طبق دستورالعمل آماده و به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو با دمای

از اکوسیستم‌های کشاورزی را تضمین کرده و کمک می‌کنند تا به سیستم کشاورزی ایده‌آل و پایدار دست یابیم (Vejan et al., 2016). استفاده از باکتری‌های *Bacillus sp* و *Pseudomonas sp* وزن خشک ساقه، محتوای نیتروژن و فسفر گیاه لویا (*Phaseolus vulgaris* L.) را افزایش داد (Stajkovic et al., 2011). همین‌طور باکتری *Acinetobacter rhizosphaerae* BIHB 723 در تلقیح با بذر سنجد تلخ (*Hippophae rhamnoides*) باعث افزایش طول ریشه، طول ساقه و ماده خشک شد و ویژگی‌هایی چون معدنی کردن فسفر آلی، تولید اکسین، فعالیت ACC دآمینازی، تولید آمونیاک و تولید سیدروفور از خود نشان داد (Gulati et al., 2009). توانایی انحلال فسفات، تولید ABA و ترشح جیبرلین (GA4، GA8، GA9، GA19 و GA20) توسط باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* H-2-5 سبب کاهش اثرات منفی تنش شوری و بهبود رشد گیاه سویا شد (Kim et al., 2017). باکتری‌های *Rhizobium nepotum* و *Bacillus methylotrophicus* PtB01 و PtB24 توانایی تولید ایندول استیک اسید و ACC دآمینازی داشته و به طور موثر سبب افزایش دو برابری طول گیاهچه، سطح برگ و وزن تر و افزایش سه برابری طول ریشه در گندم شدند (Panpan et al., 2017). استقرار گیاهچه یکی از مراحل حساس تولید محصولات زراعی است. یکنواختی و درصد سبز شدن بذرها در کشت مستقیم تاثیر زیادی بر عملکرد و کیفیت تولید دارد (Rahimian et al., 1991). جوانه‌زنی و سبز شدن بهینه بذر از عوامل مهم در مقاومت و استقرار گیاه است در نتیجه استقرار مطلوب گیاهچه منجر به افزایش مقاومت به کم آبی، شوری و دما می‌شود و افزایش عملکرد را به همراه دارد (Makkizadeh Tafti et al., 2012). از سوی دیگر امروزه بیش از هر زمان دیگر از کودهای شیمیایی برای نیل به حداکثر تولید در واحد سطح استفاده می‌شود ولی مشکلات اقتصادی ناشی از افزایش قیمت کودهای شیمیایی و مسائل زیست محیطی مرتبط با مصرف غیر اصولی از کودها، استفاده از روش‌های زیستی

مدت ۳۰ دقیقه تیمار شدند. مدت زمان تلقیح ۳۰ دقیقه بود. ۴ تکرار ۲۵ تایی بذر داخل پتری هایی با قطر ۸ سانتی متر و در ژرمیناتور با دمای ثابت ۲۰ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (ISTA, 2011). شمارش بذرها روزانه انجام شد و پس از گذشت ۱۰ روز پارامترهای درصد و سرعت جوانه زنی، طول ساقه چه و ریشه چه، وزن خشک ساقه چه و ریشه چه (میانگین ۱۰ بوته)، شاخص بنیه I و II، کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید بر اساس روابط زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند.

رابطه (۱) درصد جوانه زنی (Afrahkhteh et al., 2013):

$$GP = 100 \times (\text{تعداد کل بذرها} / \text{تعداد بذر جوانه زده})$$

رابطه (۲) سرعت جوانه زنی (Kalsa and Abebie, 2012):

$$GR = \sum (G_i / D_i)$$

G_i : تعداد بذور جوانه زده در روز t_m و D_i : تعداد روزها پس از کاشت.

رابطه (۳) شاخص بنیه I (Abdul-baki and Anderson, 1973):

$$VII = GP \times (\text{میانگین طول گیاهچه (cm)})$$

رابطه (۴) شاخص بنیه II (Abdul-baki and Anderson, 1973):

$$VI II = GP \times (\text{میانگین وزن گیاهچه (mg)})$$

کلروفیل و کاروتنوئید برگ: ۱۰۰ میلی گرم از بافت تازه‌ی برگ وزن و به قطعات کوچک تر خرد شد سپس با استون ۸۰ درصد در هاون چینی ساییده شده و محلول حاصل با کاغذ صافی صاف شد و حجم آن همراه با استون به ۱۰ میلی لیتر رسانده و شدت جذب عصاره برگ با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر قرائت شد و غلظت کلروفیل و کاروتنوئید با استفاده از فرمول های زیر محاسبه شدند:

رابطه (۵) کلروفیل a (Arnon, 1949):

$$Chl_a = [12.7 (OD_{663}) - 2.59 (OD_{645})] \times [V / (1000 W)]$$

۱۲۱ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (Sadiq et al., 2013).

۳-فعال سازی و کشت باکتری ها: به منظور

فعال سازی باکتری ها و اطمینان از خلوص آن ها از محیط TSA استفاده شد. باکتری ها در زیر هود توسط سمپلر به محیط کشت داخل پتری انتقال یافتند. پتری ها به درون انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد منتقل شدند. کلونی ها روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. تولید کلونی های هم شکل و هم رنگ و اندازه نشان دهنده خلوص باکتری است (Tamiliarasi et al., 2008).

۴- تهیه مایع تلقیح باکتریایی: پس از حصول

اطمینان از خلوص باکتری ها با بررسی میکروسکوپی و رنگ آمیزی گرم، کشت خطی باکتری ها انجام و پتری ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. سپس کلونی های خالص جدا و به محیط TSB منتقل و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۴ درجه سانتی گراد و دور ۱۵۰ rpm قرار گرفتند. میزان OD در طول موج ۶۰۰ نانومتر مرتب قرائت شد. زمانی که به تراکم مورد نظر رسید (OD_{۶۰۰} = ۰/۵) از انکوباتور خارج و جمعیت مورد نظر (۵ × ۱۰^۸ CFU/ml) بدست آمد. برای قرائت OD از اسپکتروفتومتر مدل AE-UV1606 استفاده شد (Burd et al., 1998).

۵- آماده کردن باکتری برای تلقیح با بذر: جهت

آماده کردن باکتری برای تلقیح با بذر، پس از رسیدن OD_{۶۰۰} به ۰/۵، محیط TSB حاوی باکتری درون فالكون استریل شده ریخته شد و داخل سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه و دور ۶۰۰۰ بر دقیقه قرار داده شد. محلول رویی دور ریخته شد. سپس از سرم فیزیولوژیک ۰/۹ درصد استریل شده جهت شستشو و رقیق کردن تا رسیدن به OD_{۶۰۰} = ۰/۵ استفاده شد.

۶-آماده سازی بذرها: به منظور تلقیح به ازای هر

۲۰۰ عدد توده بذری یونجه همدانی (خریداری شده در سال ۱۳۹۵ از شرکت پاکان بذر اصفهان) میزان ۷ میلی لیتر مایه تلقیح باکتریایی استفاده و جهت تماس باکتری به بذر، از صمغ عربی ۱۰ درصد استفاده شد که بذرها به

زیرگلدانی استفاده شد. بذرها همان گونه که در بخش آزمایشگاهی ذکر شد با باکتری تلقیح شدند. سپس بذرها در عمق ۱-۰/۵ سانتی متری در گلدان کشت شدند. گلدان‌ها از اول آبان تا اول دی سال ۱۳۹۶ در دمای ۱۹-۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۵۰ درصد به مدت ۶۰ روز در گلخانه نگهداری شدند. برای نیمی از گلدان‌ها بعد از گذشت ۷ روز میزان ۰/۵ میلی لیتر مایع تلقیح باکتریایی با OD=۰/۲ پای هر گیاهچه سبز شده در خاک گلدان تزریق شد (Amooaghaie and Nikandish, 2015).

نتایج و بحث

۱- اثر تیمارهای تلقیح باکتریایی بر جوانه‌زنی

بذر یونجه در شرایط آزمایشگاه

درصد جوانه‌زنی: درصد جوانه‌زنی بذرها یونجه در سطح احتمال ۵ درصد تحت تاثیر حضور باکتری قرار گرفت (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد بذرها یونجه تلقیح شده با *آتروباکتر* و تیمار تلفیقی *آسینتروباکتر* + *باسیلوس* بیشترین درصد جوانه‌زنی را به خود اختصاص دادند و نسبت به شاهد ۴/۱۶ درصد جوانه‌زنی را افزایش دادند (جدول ۲). جوانه‌زنی اولین مرحله رشد و نمو گیاه بوده و از اهمیت زیادی برخوردار است. تولید ایندول استیک اسید، جیبرلین (GA4، GA7 و GA12)، سائیتوکنین و اسید آبسزیزیک توسط باکتری *Bacillus aryabhattai* strain SR02 (Park et al., 2017) می‌تواند دلیل افزایش جوانه‌زنی بذرها یونجه باشد. نحرا و همکاران (Nehra et al., 2016) بیان داشتند افزایش درصد و سرعت جوانه‌زنی در گیاه پنبه (*Gossypium hirsutum*) در تلقیح با باکتری *Brevibacillus brevis* مربوط به تولید جیبرلین است، زیرا جیبرلین در جنین بذر سیگنال‌هایی جهت ستر آنزیم α -آمیلاز تولید کرده و سبب هیدرولیز نشاسته به گلوکز می‌شود و باعث تولید انرژی برای تنفس سلولی جنین می‌شود. باکتری *Acinetrobacter calcoaceticus* SE370 هم با ترشح هورمون جیبرلین سبب افزایش رشد گیاه خیار، کلم چینی و گل سرخ شده و فسفر غیر محلول

رابطه (۶) کلروفیل b (Arnon, 1949):

$$Chl_b = [22.9 (OD_{645}) - 4.69 (OD_{663})] \times [V / (1000 W)]$$

رابطه (۷) کلروفیل کل (Arnon, 1949):

$$Chl_t = [20.2 (OD_{645}) + 8.02(OD_{663})] \times [V / (1000 W)]$$

رابطه (۸) کاروتنوئید (Lichtenthaler, 1987):

$$C_{x+c}(\text{mg/g LW}) = [(1000 OD_{470} - 1.82 Chl_a - 85.02 Chl_b) / 198] \times [V / (1000 W)]$$

در روابط فوق Chl_a ، Chl_b ، Chl_t و C_{x+c} به ترتیب میزان کلروفیل a، b، کل کلروفیل برگ و کاروتنوئید می‌باشند. OD_{645} ، OD_{663} و OD_{470} به ترتیب شدت جذب در طول موج‌های ۶۴۵، ۶۶۳ و ۴۷۰ نانومتر، V حجم نهایی عصاره در استون ۸۰ درصد و W وزن نمونه بر حسب گرم است. حجم ریشه: پس از برداشت گیاه بلافاصله خاک گلدان‌ها با دقت تمام شسته شده و ریشه‌ها به طور کامل خارج شدند. به منظور اندازه‌گیری حجم ریشه پس از شستشوی دقیق آن و برطرف کردن گل و لای باقی مانده، رطوبت سطحی ریشه‌ها توسط پارچه گرفته شد. سپس ریشه‌ها در استوانه مدرج قرار داده شدند. اختلاف حجم به دست آمده برابر با حجم ریشه در نظر گرفته شد (Alizadeh, 2010).

ب) اثر تیمار تلقیح باکتریایی و تزریق باکتری در

ریزوسفر بر سبز شدن و رشد گیاه یونجه

طرح آزمایش و تیمارها: آزمایش به صورت

فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت. ۸ سطح تیمار تلقیح باکتریایی مورد استفاده در آزمایش قبل به عنوان عامل اول و تزریق و عدم تزریق باکتری به خاک گلدان‌ها به عنوان عامل دوم بودند. خاک و ماسه به نسبت ۳ به ۱ با هم مخلوط و از الک ۰/۵ سانتی متری عبور داده و با گاز متیل بروماید ضد عفونی شد. از گلدان‌هایی با ارتفاع و قطر ۲۰ سانتی متر و ظرفیت خاک ۵ کیلوگرم استفاده شد. کف گلدان‌ها مقدار کمی شن استریل شده جهت تهویه ریخته شد و ماسه و خاک به میزان ۵ کیلوگرم درون گلدان ریخته شد و برای گلدان‌ها نیز از

خاک را به فرم قابل دسترس برای گیاه تبدیل می‌کند (Kang et al., 2009). استفاده از باکتری‌های *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas fluorescens* Pf1 نیز باعث افزایش جوانه‌زنی و بنیه در بذره‌های فلفل سبز (*Capsicum annum* L.) شدند (Bharathi et al., 2004).

جدول ۱- جدول تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر پیش تیمار باکتریایی بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر یونجه در آزمایشگاه

Table 1- Analysis of variance (mean square) effect of bacterial pre-treatment on alfalfa seed germination indices in laboratory

منابع تغییر S.O.V	درجه آزادی df	درصد جوانه‌زنی Germination percentage	سرعت جوانه‌زنی Germination rate	طول ساقچه Plumule length	طول ریشه‌چه Radicle length	وزن خشک ساقچه Plumule dry weight	وزن خشک ریشه‌چه Radicle dry weight	شاخص بنیه I Vigour index I	شاخص بنیه II Vigour index II	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل T Chlorophyll total	کاروتنوئید Carotenoid
تکرار Replication	3	3.33 ^{ns}	0.05 ^{ns}	0.2 ^{ns}	0.96 ^{ns}	0.011 ^{ns}	0.042 ^{**}	1.95 ^{ns}	0.05 [*]	0.019 ^{ns}	0.002 ^{ns}	0.024 ^{ns}	0.002 ^{ns}
تلفیح باکتریایی Bacterial inoculation	7	35.14 [*]	2.66 ^{**}	0.11 ^{ns}	0.65 ^{ns}	0.026 ^{ns}	0.005 ^{ns}	1.13 ^{ns}	0.05 ^{**}	0.022 ^{ns}	0.011 ^{ns}	0.06 ^{ns}	0.004 ^{ns}
خطا Error	21	12.09	0.42	0.08	0.6	0.017	0.005	0.85	0.015	0.027	0.005	0.053	0.004
ضریب تغییرات CV (%)		3.61	3.16	12.89	21.34	9.97	16.5	16.12	7.21	13.39	15.07	13.41	14.12

^{ns}، * و ** به ترتیب عدم معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

^{ns}, * and ** Insignificance, significant at 5% and 1% respectively

جدول ۲- مقایسه میانگین بخش آزمایشگاهی اثر پیش تیمار باکتری بر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر یونجه

Table 2- Comparison of the mean of the laboratory section of the pre-bacterial effect on alfalfa seed germination indices

باکتری Bacteria	جوانه‌زنی Germination (%)	سرعت جوانه‌زنی Germination Rate (1/day)	شاخص بنیه II Vigour Index II (mg/g)
شاهد Control	96 ^{abc}	20.51 ^b	1.6 ^{cd}
<i>Acinetrobacter</i>	98 ^{ab}	20.01 ^b	1.817 ^{ab}
<i>Bacillus</i>	96 ^{abc}	21.53 ^a	1.675 ^{bcd}
<i>Enterobacter</i>	100 ^a	21.52 ^a	1.688 ^{abc}
<i>Acinetrobacter</i> + <i>Bacillus</i>	100 ^a	21.86 ^a	1.868 ^a
<i>Acinetrobacter</i> + <i>Enterobacter</i>	93 ^{bc}	20 ^b	1.505 ^d
<i>Bacillus</i> + <i>Enterobacter</i>	92 ^c	20 ^b	1.65 ^{bcd}
<i>Acinetrobacter</i> + <i>Bacillus</i> + <i>Enterobacter</i>	95 ^{abc}	20.03 ^b	1.597 ^{cd}

در هر ستون میانگین‌ها با حروف مشابه، بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی داری در سطح احتمال خطای آماری ۵٪ ندارند.

Means with same letter in each columns are not significantly different at the 5% probability level according LSD.

معنی دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد بالاترین میزان سرعت مربوط به کاربرد منفرد باسیلوس و

سرعت جوانه‌زنی: اثر تیمار باکتریایی بر سرعت جوانه‌زنی بذره‌های یونجه در سطح احتمال ۱ درصد

صفات دیگر مثل طول و وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه، شاخص بنیه I گیاهچه، میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید تحت تاثیر تیمارهای تلقیح باکتریایی قرار نگرفتند (جدول ۱).

۲- اثر تیمار تلقیح باکتریایی و تزریق باکتری در ریزوسفر بر سبز شدن و رشد گیاه یونجه در شرایط گلخانه

درصد سبز شدن: نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر تیمار تلقیح باکتریایی در سطح احتمال ۱ درصد بر میزان سبز شدن بذرها یونجه معنی دار شد اما تزریق باکتری پای گیاهچه اثر بهتری را نسبت به تلقیح نشان نداد و اثر متقابل نیز معنی دار نشد (جدول ۳). طبق نتایج مقایسه میانگین کاربرد باکتری آسیتروباکتر در تلقیح با بذرها یونجه سبب افزایش ۱۱/۲۱ درصدی سبز شدن بذرها در گلدان گردید. کاربرد باسیلوس و کاربرد تلفیقی آسیتروباکتر + انتروباکتر نیز افزایش ۶/۵۸ درصدی ظهور گیاهچه را سبب شدند اما دیگر تیمارهای باکتریایی تفاوت معنی داری با شاهد نداشتند (جدول ۴). افزایش درصد سبز شدن ممکن است مربوط به توانایی تولید ایندول استیک اسید توسط باکتری‌ها باشد. برای مثال تساو کلووا و همکاران (Tsavkelova et al., 2007) گزارش کردند IAA با منشأ میکروبی نقش مهمی در افزایش جوانه‌زنی بذر ارکیده (*Dendrobium moschatum*) دارد و سویه‌هایی که مقادیر کمی IAA تولید می‌کنند، سبب بهبود رشد گیاه می‌شوند. باکتری *Acinetrobacter calcoaceticus* SE370 با ترشح هورمون جیبرلین (GA1، GA3، GA4) می‌تواند سبب افزایش رشد گیاه شده و فسفر غیر محلول خاک را به فرم قابل دسترس برای گیاه تبدیل کند (Kang et al., 2009). کاربرد باکتری *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 توانایی تولید اسید جیبرلیک و اسید سالیسیلیک را داشته که در تلقیح با گیاهچه‌های برنج (*Oryza sativa* L. Jin so mi) منجر به افزایش رشد می‌گردد (Shahzad et al., 2016). ضمین و همکاران (Zamin et al., 2011) نیز توانایی

انتروباکتر و کاربرد دوتایی آسیتروباکتر + باسیلوس بودند که به ترتیب ۴/۹۷، ۴/۹۲ و ۶/۵۸ درصد افزایش نسبت به شاهد نشان دادند. دیگر تیمارهای باکتریایی تفاوتی با شاهد نداشتند (جدول ۲). بیوپرایمینگ سرعت جوانه‌زنی را افزایش داد و سبب بهبود یکنواختی گیاهچه در بسیاری از محصولات گردید (Choudhary et al., 2016). سیواکومار و همکاران (Sivakumar et al., 2017) نشان دادند تلقیح بذر برنج با باکتری *Phosphobacteria* درصد و سرعت جوانه‌زنی، ماده خشک تولیدی و شاخص بنیه را افزایش داد. باکتری‌های محرک رشد اطراف ریشه برنج (*Oryza sativa* L. cv. BINA Dhan5) با تولید IAA سبب افزایش سرعت جوانه‌زنی بذر، ارتفاع گیاه، طول ریشه، وزن خشک ساقه و ریشه گیاه شدند (Ashrafuzzaman et al., 2009). حافظ و همکاران (Hafeez et al., 2004) در پنبه (*Gossypium hirsutum* L) ظهور سریع گیاهچه بر اثر تلقیح بذر با باکتری *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii E11 را به ترشح ایندول ۳- استیک اسید نسبت دادند.

شاخص بنیه II: این شاخص در سطح احتمال ۱ درصد تحت تاثیر تیمارهای باکتریایی قرار گرفت (جدول ۱). نتایج مقایسه میانگین حاکی از کاربرد موثر تیمار دوتایی آسیتروباکتر + باسیلوس و کاربرد منفرد آسیتروباکتر به ترتیب با افزایش ۱۶/۷۵ و ۱۳/۵۶ درصدی نسبت به شاهد بود. سایر تیمارها اختلاف معنی داری با شاهد نداشتند (جدول ۲). در ذرت نیز استفاده از باکتری‌های *Bacillus megaterium* و *Bacillus mucilaginosus* باعث افزایش رشد ریشه و بهبود جذب مواد مغذی شدند (Wu et al., 2005). استفاده از باکتری *Bacillus safensis* سبب افزایش وزن خشک ریشه و ساقه و محتوای کلروفیل در گندم (*Triticum aestivum*) شد (Chakraborty et al., 2013). استفاده از باکتری‌های جنس *Acinetrobacter* سبب افزایش وزن خشک ریشه در گیاه گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) (Wanza 15) شد (Zhang et al., 2017).

می‌شود (Choudhary et al., 2016).

وزن خشک ساقه: وزن خشک ساقه تحت تاثیر تیمار تلقیح باکتریایی در سطح احتمال ۱ درصد و تزریق باکتری پای گیاهچه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شد ولی اثر متقابل تزریق × تلقیح باکتری معنی‌دار نشد (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد کلیه تیمارهای باکتریایی اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان دادند که در بین آن‌ها بیش‌ترین وزن خشک ساقه مربوط به کاربرد منفرد باسیلوس و انتروباکتر و کاربرد تلفیقی آسینتروباکتر + انتروباکتر بود که افزایش ۸/۳۳ درصدی نسبت به شاهد نشان دادند. تزریق باکتری پای گیاهچه سبب افزایش ۵/۵ درصدی وزن خشک ساقه نسبت به عدم تزریق شد که بیانگر فعالیت موثر باکتری‌های تزریق شده در محیط ریشه است (جدول ۴). باکتری‌های *Bacillus pumilus* TE07، *Bacillus cerus* TE12-TE14 در گیاه *Vigna mungo* سبب افزایش طول ریشه و اندام هوایی گیاهچه و وزن خشک در شرایط خاک آلوده به سرب شد و تنش سرب کاهش یافت (Meryem and Yasmin, 2013).

تولید ایندول استیک اسید را توسط باکتری‌های *A. baumannii* و *Acinetobacter* sp. PUCM1007 و PUCM1029 گزارش دادند.

سرعت سبز شدن: پرایمینگ بذر با باکتری و نیز تزریق باکتری پای گیاهچه در سطح احتمال ۱ درصد سرعت سبز شدن گیاهچه‌های یونجه در گلدان را تحت تاثیر قرار دادند ولی اثر متقابل آن‌ها معنی‌دار نشد (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد، کاربرد آسینتروباکتر سبب افزایش سرعت جوانه‌زنی به میزان ۱۵/۸۴ درصد نسبت به شاهد شد. پس از آن تیمار تلفیقی آسینتروباکتر + انتروباکتر (۸/۳۱ درصد) و تیمار باکتریایی باسیلوس (۷/۲۷ درصد) سرعت سبز شدن را نسبت به شاهد افزایش دادند. دیگر تیمارهای باکتریایی نیز سرعت سبز شدن را افزایش دادند ولی اختلافشان با شاهد معنی‌دار نشد. تزریق باکتری پای گیاهچه نیز افزایش ۴/۷۹ درصدی نسبت به عدم تزریق نشان داد (جدول ۴). ریزوباکترهای محرک رشد گیاهی همراه بذر سرعت و یکنواختی جوانه‌زنی را افزایش داده و سبب یکنواختی و بالابردن میزان محصول

جدول ۳- جدول تجزیه واریانس (میانگین مربعات) بخش گلخانه‌ای اثر فاکتور تلقیح بذر با تیمارهای باکتریایی و فاکتور تزریق یا عدم تزریق باکتری پای گیاهچه

Table 3- Analysis of variance (mean square) of the greenhouse section of the effect of seed inoculation with bacterial treatments and inoculum or inoculation factor of seedlings

منابع تغییر S.O.V	df	درصد سبز شدن Emergence Percentage	سرعت سبز شدن Emergence Rate	وزن خشک ساقه Shoot Dry Weight	وزن خشک ریشه Root Dry Weight	حجم ریشه Root Volume	طول ساقه Shoot Length	طول ریشه Root Length	کلروفیل a Chlorophyll a	کلروفیل b Chlorophyll b	کلروفیل T Chlorophyll Total	کلروتینید Carotenoid
تزریق باکتری Bacterial injection	1	36.188 ^{ns}	1.61 ^{**}	0.004 [*]	0.001 [*]	0.088 ^{ns}	2.089 ^{ns}	0.015 ^{ns}	1.52 ^{**}	0.157 ^{**}	2.647 ^{**}	0.352 ^{**}
تلقیح باکتریایی Bacterial inoculation	7	59.194 ^{ns}	1.97 ^{**}	0.005 ^{**}	0.006 ^{**}	0.074 [*]	1.868 ^{ns}	13.52 [*]	0.15 ^{**}	0.077 ^{**}	0.416 ^{**}	0.012 ^{ns}
تزریق باکتری × تلقیح باکتریایی Bacterial injection × Bacterial inoculation	7	16.33 ^{ns}	0.34 ^{ns}	0.001 ^{ns}	0.001 ^{**}	0.038 ^{ns}	5.04 ^{**}	5.19 ^{ns}	0.081 ^{ns}	0.012 ^{ns}	0.147 ^{ns}	0.005 ^{ns}
خطا Error	32	12.21	0.15	0.001	0.0001	0.03	1.50	5.43	0.043	0.005	0.069	0.007
ضریب تغییرات (CV%)		3.75	4.96	6.44	5.05	8.08	5.38	10.29	12.70	10.86	11.40	14.36

^{ns}، * و ^{**} به ترتیب عدم معنی‌داری، معنی‌داری در سطح احتمال ۵ و ۱ درصد

^{ns}، * and ^{**} Insignificance, significant at 5% and 1% respectively

جدول ۴- مقایسه میانگین بخش گلخانه‌ای اثر تلقیح بذر با تیمارهای باکتریایی بر شاخص‌های رشدی گیاهچه یونجه
Table 4- Comparison of the average of greenhouse sections of seedling inoculation with bacterial treatments on alfalfa seedling growth indices

باکتری Bacteria	درصد سبز شدن Emergence (%)	سرعت سبز شدن Emergence Rate(1/day)	وزن خشک ساقه Shoot Dry Weight(g)	طول ریشه Root Length(cm)	حجم ریشه Root Volume(cm ³)	کلروفیل a(mg/g)	کلروفیل b(mg/g)	کلروفیل T Chlorophyll Total(mg/g)	کاروتنوئید Carotenoid(mg/g)
عدم تزریق Non injection	92.22 ^a	7.71 ^b	0.36 ^b	22.65 ^a	2.09 ^a	1.45 ^b	0.62 ^b	2.06 ^b	0.48 ^b
تزریق Injection	93.95 ^a	8.08 ^a	0.38 ^a	22.61 ^a	2.18 ^a	1.8 ^a	0.73 ^a	2.53 ^a	0.65 ^a
شاهد Control	89.17 ^c	7.7 ^c	0.31 ^b	24.62 ^a	1.94 ^c	1.33 ^c	0.4 ^c	1.74 ^c	0.53 ^{bc}
<i>Acinetobacter</i>	99.17 ^a	8.92 ^a	0.37 ^a	22.41 ^{a-c}	2.12 ^{a-c}	1.65 ^{ab}	0.71 ^{ab}	2.35 ^{ab}	0.56 ^{a-c}
<i>Bacillus</i>	95 ^b	8.26 ^b	0.39 ^a	24.64 ^a	2.31 ^a	1.79 ^a	0.74 ^a	2.53 ^a	0.62 ^{ab}
<i>Enterobacter</i>	91.39 ^{bc}	7.73 ^c	0.39 ^a	23.45 ^{ab}	2.13 ^{a-c}	1.79 ^a	0.74 ^a	2.53 ^a	0.63 ^a
<i>Acinetobacter</i> + <i>Bacillus</i>	91.39 ^{bc}	7.16 ^d	0.38 ^a	21.15 ^{bc}	2.23 ^{ab}	1.72 ^a	0.73 ^{ab}	2.45 ^a	0.6 ^{a-c}
<i>Acinetobacter</i> + <i>Enterobacter</i>	95 ^b	8.34 ^b	0.39 ^a	20.55 ^c	2.18 ^{ab}	1.59 ^{ab}	0.70 ^{ab}	2.30 ^{ab}	0.54 ^{a-c}
<i>Bacillus</i> + <i>Enterobacter</i>	91.39 ^{bc}	7.4 ^{cd}	0.36 ^a	22.07 ^{a-c}	2.13 ^{a-c}	1.48 ^{bc}	0.65 ^b	2.13 ^b	0.5 ^c
<i>Acinetobacter</i> + <i>Bacillus</i> + <i>Enterobacter</i>	92.22 ^{bc}	7.6 ^c	0.38 ^a	22.21 ^{a-c}	2.05 ^{bc}	1.64 ^{ab}	0.73 ^{ab}	2.37 ^{ab}	0.56 ^{a-c}

در هر ستون میانگین‌ها با حروف مشابه، بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال خطای آماری ۵٪ ندارند.

Means with same letter in each columns are not significantly different at the 5% probability level according LSD.

تولید ایندول استیک اسید و انحلال فسفات سبب ارتقا رشد گیاه می‌شود (Kumar et al., 2009). کاربرد این باکتری در تلقیح با نیشکر سبب افزایش تعداد برگ، طول ریشه و ماده خشک شد (Sadiq et al., 2013).

وزن خشک ریشه: تلقیح بذر با باکتری در سطح احتمال ۱ درصد، تزریق باکتری پای گیاهچه در سطح احتمال ۵ درصد و اثر متقابل این دو بر وزن خشک ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). طبق نتایج مقایسه میانگین، وزن خشک ریشه تحت تاثیر تلقیح بذر با باکتری نسبت به شاهد افزایش یافت ولی این افزایش با تزریق باکتری پای گیاهچه تشدید شد. برای

کاربرد باکتری 24 *Bacillus* PSB در تلقیح با بذر گوجه‌فرنگی سبب افزایش جذب فسفر توسط گیاه شد و وزن خشک و تر ساقه و ریشه را افزایش داد (Sarsan, 2016). باکتری *Acinetobacter rhizosphaerae* BIHB 723 در شرایط گلخانه به ترتیب سبب افزایش ۲۸، ۳۵ و ۳۴ درصدی ماده خشک، طول ریشه و طول ساقه در ذرت شد. این افزایش برای نخود به ترتیب ۲۳، ۳۴ و ۳۲ درصد و برای جو ۲۴، ۱۹ و ۲۷ درصد بود (Gulati et al., 2009). باکتری *Enterobacter aerogenes* NBRI K24 توانایی تولید سیدروفور داشته و سبب تحریک تولید بیوماس گیاه می‌گردد. علاوه بر این به دلیل فعالیت ACC دآمینازی،

تولید IAA، تولید سیدروفور، تولید HCN سبب افزایش درصد سبز شدن، شاخص بنیه I، پارامترهای مورفولوژیکی ریشه (طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه) و پارامترهای مورفولوژیکی ساقه (طول ساقه، وزن تر و خشک ساقه) و محتوای کلروفیل در گیاه برنج شد (Sarkar et al., 2018). کاربرد باکتری *Bacillus polymyxa* BcP26 در تلقیح با بذر ذرت در خاک آهکی وزن خشک ریشه و وزن خشک ساقه را به ترتیب ۳۰ و ۵۲ درصد افزایش داد (Egamberdiyeva, 2007).

مثال می‌توان به تزریق باسیلوس و تزریق تلفیقی آسیتروباکتر + انتروباکتر بعنوان بهترین تیمار باکتریایی برای این صفت نام برد (جدول ۵). باکتری *Bacillus* sp. CIK-516 در تلقیح با بذرهای ترب (*Raphanus sativus*) وزن خشک ریشه (۳۲ درصد)، طول ریشه (۲۷ درصد)، طول ساقه (۲۷ درصد)، وزن خشک ساقه (۵۱ درصد) و کلروفیل کل (۳۸ درصد) را افزایش داد (Akhtar et al., 2017). باکتری *Enterobacter* sp P23 به دلیل محلول سازی فسفات،

جدول ۵- مقایسه میانگین بخش گلخانه‌ای اثر متقابل پرایمینگ بذر با باکتری و تزریق یا عدم تزریق باکتری پای گیاهچه یونجه

Table 5- Comparison of the average of the greenhouse sections of the interaction of seed priming with bacteria and injection or non-injection of bacteria in alfalfa seedlings

	باکتری Bacteria	وزن خشک ریشه Root Dry Weight (g)	طول ساقه Shoot Length (cm)
تلقیح بذر یونجه با باکتری Inoculation of alfalfa seed with bacteria	شاهد Control	0.205 ^g	23.33 ^{ab}
	<i>Acinetrobacter</i>	0.278 ^{c-e}	24 ^a
	<i>Bacillus</i>	0.295 ^{bc}	23.36 ^{ab}
	<i>Enterobacter</i>	0.287 ^{c-e}	23.43 ^{ab}
	<i>Acinetrobacter</i> + <i>Bacillus</i>	0.267 ^{ef}	23.1 ^{a-c}
	<i>Acinetrobacter</i> + <i>Enterobacter</i>	0.272 ^{d-f}	22.66 ^{a-c}
	<i>Bacillus</i> + <i>Enterobacter</i>	0.25 ^f	20.33 ^d
	<i>Acinetrobacter</i> + <i>Bacillus</i> + <i>Enterobacter</i>	0.28 ^{c-e}	23.61 ^{ab}
تلقیح بذر یونجه با باکتری و بعد از آن افزودن باکتری پای گیاهچه Inoculation of alfalfa seeds with bacteria and then adding bacteria to seedlings	شاهد Control	0.203 ^g	23.5 ^{ab}
	<i>Acinetrobacter</i>	0.269 ^{ef}	21.6 ^{b-d}
	<i>Bacillus</i>	0.327 ^a	22.1 ^{a-d}
	<i>Enterobacter</i>	0.266 ^{ef}	23.06 ^{a-c}
	<i>Acinetrobacter</i> + <i>Bacillus</i>	0.267 ^{ef}	21.75 ^{b-d}
	<i>Acinetrobacter</i> + <i>Enterobacter</i>	0.309 ^{ab}	21.28 ^{cd}
	<i>Bacillus</i> + <i>Enterobacter</i>	0.294 ^{b-d}	24 ^a
	<i>Acinetrobacter</i> + <i>Bacillus</i> + <i>Enterobacter</i>	0.281 ^{c-e}	23.21 ^{a-c}

در هر ستون میانگین‌ها با حروف مشابه، بر اساس آزمون LSD اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال خطای آماری ۵٪ ندارند.

Means with same letter in each columns are not significantly different at the 5% probability level according LSD.

گلدان و اثر متقابل تلقیح با باکتری و تزریق پای گیاهچه نتوانست حجم ریشه را به طور موثر افزایش دهد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد بیش‌ترین میزان حجم

حجم ریشه: طبق نتایج تجزیه واریانس اثر پرایمینگ بذر با باکتری در سطح احتمال ۵ درصد بر حجم ریشه معنی‌دار شد اما تزریق باکتری پای گیاهچه‌ی سبز شده در

ریشه گیاه یونجه مربوط به کاربرد باکتری *باسیلوس* بود که افزایش ۱۹/۰۷ درصدی نسبت به شاهد نشان داد. پس از آن کاربرد باکتری *آسیتروباکتر + باسیلوس* و *آسیتروباکتر + انتروباکتر* به ترتیب افزایش ۱۴/۹۴ و ۱۲/۳۷ درصدی داشتند. سایر تیمارهای باکتریایی اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان ندادند (جدول ۴). باکتری *Bacillus methylophilus M4-96* ترکیبات زیستی فعال مانند کتون، الکل و آلدئید تولید کرده که محتوای اکسین گیاه را افزایش و سبب تحریک رشد، تولید اندام جدید و مورفوزن دوباره‌ی ریشه می‌شوند (Flores et al., 2017). باکتری *Bacillus altitudinis WR10* جدا شده از ریشه گندم (*Triticum aestivum L*) توانایی تولید ایندول استیک اسید را داشته و سبب رشد ریشه در گندم شد و کاهش مسمومیت گندم به آهن را در پی داشت (Sun et al., 2017). باکتری *Acinetobacter sp. PSGB04* فعالیت ACC دآمینازی نشان داد و به طور قابل توجهی باعث افزایش طول ریشه (۴۱ تا ۳۵ درصد) و وزن خشک (۳۰ درصد) در گیاه کانولا شد (Indiragandhi et al., 2008).

طول ساقه: اثرات تلقیح باکتریایی و تزریق باکتری پای گیاهچه بر صفت طول ساقه معنی‌دار نشد ولی اثر متقابل تلقیح و تزریق باکتریایی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین نشان داد تلقیح بذر یونجه با باکتری باعث افزایش طول ساقه شد. همچنین تاثیر کاربرد باکتری‌ها روی بذر یونجه از روش تزریق نیز تاثیر پذیرفته بطوری که تزریق باکتری‌های *باسیلوس + انتروباکتر* به طور موثر سبب افزایش این صفت شدند (جدول ۵). از آنجایی که در محاسبه صفت وزن خشک ساقه، کم‌ترین میزان مربوط به شاهد بود ولی از نظر صفت طول ساقه اختلاف زیادی بین شاهد و تیمارهای باکتریایی مشاهده نشد لذا می‌توان گفت افزودن باکتری سبب افزایش شاخه‌های فرعی یا ضخامت ساقه شده است.

کلروفیل: کلروفیل a، b و کلروفیل کل تحت تاثیر تیمار تلقیح باکتریایی و تزریق باکتری پای گیاهچه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شدند اما اثر متقابل تزریق و تلقیح معنی‌دار نشد (جدول ۳). نتایج مقایسه میانگین‌ها گویای تاثیر مثبت باکتری‌ها در افزایش میزان کلروفیل برگ یونجه بود. بیش‌ترین میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل مربوط به کاربرد منفرد *باسیلوس + انتروباکتر* بود که به ترتیب افزایش ۳۴/۵۸، ۸۵ و ۴۵/۴۰ درصدی نسبت به شاهد داشتند. کلیه سطوح باکتری سبب افزایش میزان کلروفیل برگ شده و با شاهد اختلاف معنی‌داری نشان دادند. تزریق باکتری پای گیاهچه نیز سبب افزایش میزان کلروفیل a، b و کلروفیل کل به ترتیب به میزان ۲۴/۱۳،

طول ریشه: کاربرد تیمارهای تلقیح باکتریایی در سطح احتمال ۵ درصد بر صفت طول ریشه معنی‌دار شد اما تزریق

۵ درصد بر صفت طول ریشه معنی‌دار شد اما تزریق

۵ درصد بر صفت طول ریشه معنی‌دار شد اما تزریق

نتیجه گیری

با مقایسه نتایج آزمایشگاهی و گلخانه‌ای حاصل از این پژوهش، کاربرد باکتری‌ها در خاک و محیط اطراف ریشه یونجه در گلخانه اثر مثبت بر رشد گیاه گذاشت و درصد و سرعت سبز شدن، وزن خشک گیاه، حجم ریشه، میزان کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کاروتنوئید را افزایش داد. این در حالی بود که کاربرد باکتری‌ها (بخصوص تیمار تلفیقی آسینتروباکتر + باسیلوس) در آزمایشگاه فقط درصد و سرعت جوانه‌زنی و شاخص بنیه II گیاهچه را افزایش داد و تاثیری بر دیگر صفات نداشت. به نظر می‌رسد کاربرد منفرد باکتری نتایج بهتری نسبت به کاربرد دو باکتری با هم و بخصوص کاربرد سه باکتری با هم داشته باشد لذا اثرات ضدیت باکتری‌ها بر یکدیگر ممکن است اثرات مثبت آن‌ها را کاهش دهد. از سوی دیگر تلقیح بذر با باکتری و سپس تزریق باکتری پای گیاهچه موجود در گلدان توانست سبب افزایش سرعت سبز شدن (۴/۷۹ درصد) توسط آسینتروباکتر و وزن خشک ساقه (۵/۵۵ درصد)، کلروفیل a (حدود ۲۴ درصد)، کلروفیل b (حدود ۱۷ درصد)، کلروفیل کل (حدود ۲۲ درصد) و کاروتنوئید (حدود ۳۵ درصد) توسط باسیلوس و اتروباکتر نسبت به تیمار تلقیح باکتریایی به تنهایی شود که دلیل این امر می‌تواند استقرار بهتر و جمعیت بیشتر باکتری‌ها در ریزوسفر گیاه باشد. نتایج حاضر نشان داد باکتری‌ها موجب افزایش میزان و سرعت سبز شدن، افزایش شاخص‌های بنیه و افزایش طول گیاهچه می‌شوند. در ادامه حضور باکتری‌ها سبب افزایش میزان رنگیزه‌های دریافت کننده نور می‌گردد که میزان تثبیت CO₂ و در نهایت رشد گیاه را تحت تاثیر قرار خواهد داد.

۱۷/۷۴ و ۲۲/۸۱ درصد شد (جدول ۴). کاربرد باکتری *Acinetrobacter calcoaceticus* در تلقیح با نهال برنج سبب افزایش وزن تر ساقه، طول ساقه، ماده خشک و محتوای کلروفیل شد (Kang et al., 2012). باکتری *Bacillus sp.* PSB10 به طور قابل توجهی سبب بهبود رشد، کلروفیل، لگاموگلوبین، عملکرد دانه و پروتئین در نخود (*Cicer arietinum* L) شد (Wani and Khan, 2010). کاربرد باکتری *Bacillus megaterium* mj1212 توانایی انحلال فسفات بالایی از خود نشان داد و در گیاه خردل سبب افزایش کلروفیل، گلوکز، فروکتور، ساکارز و اسید آمینه شد و به رشد گیاه کمک قابل ملاحظه‌ای کرد (Kang et al., 2014). باکتری *Enterobacter cloacae* CAL2 نیز سبب افزایش محتوای کلروفیل در گیاه گوجه فرنگی وحشی (*Lycopersicon esculentum* cv. Heinz 902) شد (Grichko and Glick, 2001).

کاروتنوئید: تزریق باکتری پای گیاهچه بر میزان کاروتنوئید برگ یونجه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد اما اثر تلقیح باکتریایی و اثر متقابل تزریق و تلقیح معنی‌دار نشد (جدول ۳). مقایسه میانگین گویای افزایش ۳۵/۴۱ درصدی کاروتنوئید برگ یونجه در تزریق باکتری پای گیاهچه نسبت به عدم تزریق آن بود (جدول ۴). تولید کاروتنوئید توسط گونه *Acinetrobacter* توسط آسکر و همکاران (Asker et al., 2007) گزارش شد. میزان کلروفیل a، b و کاروتنوئید تحت تنش سرب در آفتابگردان به میزان ۷۵، ۷۸ و ۷۶ درصد کاهش یافت اما استفاده از باکتری *Pseudomonas gessardii* strain BLP141 سبب بهبود میزان این پیگمانت‌ها تحت تنش شد (Saleem et al., 2018).

Reference

Abdul-baki, A.A., and J.D. Anderson. 1973. Vigor determination in soyabean by multiple criteria. Crop Sci. 10: 31-34.

منابع

- Afrakhteh, S., E. Frahmandfar, A. Hamidi, and H.D. Ramandi. 2013.** Evaluation of growth characteristics and seedling vigor in two cultivars of soybean dried under different temperature and fluidized bed dryer. *Int. J. Agric. Crop Sci.* 5(21): 2537-2544.
- Ahmad, F., I. Ahmad, and M.S. Khan, 2008.** Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiol. Res.* 163:173-181.
- Akhtar, M.J., S. Ullah, I. Ahmad, A. Rauf, S.M. Nadeem, M.Y. Khan, S. Hussain, and L. Bulgariu. 2017.** Nickel phytoextraction through bacterial inoculation in *Raphanus sativus*. *J. Res. Gate.* 190: 234-242.
- Alizadeh, A. 2010.** Water, soil and plant relationships, Imam Reza University Press. Mashhad. pp 616. (In Persian)
- Amooaghaie, R., and F. Nikandish. 2015.** 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. *J. Plant Res.* 28(1): 140-152. (In Persian)
- Arnon, D.I. 1949.** Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24:1-15.
- Ashrafuzzaman, M., F.A. Hossen, M.R. Ismail, M.A. Hoque, M.Z. Islam, S.M. Shahidullah, and S. Meon. 2009.** Efficiency of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) for the enhancement of rice growth. *Afr. J. Biotechnol.* 8(7): 1247-1252.
- Asker, D., T. Beppu, and K. Ueda. 2007.** Unique diversity of carotenoid-producing bacteria isolated from Misasa, a radioactive site in Japan. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77: 383-392.
- Bharathi, R., R. Vivekananthan, S. Harish, A. Ramanathan, and R. Samiyappan. 2004.** Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies. *Crop Prot.* 23: 835-843.
- Burd, G.I., D.G. Dixon, and B.R. Glick. 1998.** A plant growth-promoting bacterium that decreases nickel toxicity in seedlings. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3663-3668.
- Chakraborty, U., B.N. Chakraborty, A.P. Chakraborty, and P.L. Dey. 2013.** Water stress amelioration and plant growth promotion in wheat plants by osmotic stress tolerant bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 29: 789-803.
- Chinnaswamy, A., T.C. Pena, A. Stoll, D.P. Rojo, J. Bravo, A. Rincon, M.M Lucas, and J.J. Pueyo. 2018.** A nodule endophytic *Bacillus megaterium* strain isolated from *Medicago polymorpha* enhances growth, promotes nodulation by *Ensifer medicae* and alleviates salt stress in alfalfa plants. *Ann. Appl. Biol.* 172(3): 295-308.
- Choudhary, S.K., S.K. Gupta, M.K. Singh, and S. Sheraz Mahdi. 2016.** Role and its utilization of beneficial micro-organisms for sustainable crop production. *International J Plant Growth Regul.* 12(2): 370-378.
- Egamberdiyeva, D. 2007.** The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils. *Appl. Soil. Ecol.* 36: 184-189.
- Flores, P.P., E.V. Cantero, J.A. Hernandez, R.P. Flores, J.L. Bucio, P.G. Juarez, and L.M. Rodriguez. 2017.** *Bacillus methylotrophicus* M4-96 isolated from maize (*Zea mays*) rhizosphere increases growth and auxin content in *Arabidopsis thaliana* via emission of volatiles. *J. Protoplasma.* 254: 2201-2213.
- Glick, B.R. 2012.** Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation Scientifica. 1-15.
- Goswami, D., J.N. Thakker, and P.C. Dhandhukia. 2016.** Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR). *Cogent. Food Agric.* 2: 1-19.
- Grichko, V.P., and B.R. Glick. 2001.** Amelioration of flooding stress by ACC deaminase-containing plant growth-promoting bacteria. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 11-17.
- Gulati, A., P. Vyas, P. Rahi, and R.C. Kasana. 2009.** Plant Growth-Promoting and Rhizosphere-Competent *Acinetobacter* rhizosphaerae Strain BIHB 723 from the Cold Deserts of the Himalayas. *Curr Microbiol.* 58: 371-377.
- Hafeez, F.Y., M.E. Safdar, A.U. Chaudhary, and K.A. Malik. 2004.** Rhizobial inoculation improves seedling emergence nutrient uptake and growth of cotton. *Austr. J. Exp. Agric.* 44(6): 617-622.
- Ibrahim, E.A. 2015.** Seed priming to alleviate salinity stress in germinating seeds. *J. Plant Physiol.* 192: 38-46.

- Indiragandhi, P., R. Anandham, M. Madhaiyan, and T.M. Sa. 2008.** Characterization of Plant Growth-Promoting Traits of Bacteria Isolated from Larval Guts of Diamondback Moth *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Curr. Microbiol.* 56: 327-333.
- Kalsa, K.K., and B. Abebie. 2012.** Influence of seed priming on seed germination and vigor traits of *Vicia villosa* ssp. *dasycarpa* (Ten.). *Afr. J. Agric. Res.* 7(21): 3202-3208.
- Kang, S., A.L. Khan, M. Hamayun, Z.H. Shinwari, Y.H. Kim, G.J. Joo, and I.J. Lee. 2012.** *Acinetobacter calcoaceticus* ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemical. *Pak. J. Bot.* 44(1): 365-372.
- Kang, S.M., G.J. Joo, M. Hamayun, C.I. Na, D.H. Shin, H.Y. Kim, J.K. Hong, and I.J. Lee. 2009.** Gibberellin production and phosphate solubilization by newly isolated strain of *Acinetobacter calcoaceticus* and its effect on plant growth. *Biotechnol. Lett.* 31: 277-281.
- Kang, S.M., R. Radhakrishnan, Y.H. You, G.J. Joo, I.J. Lee, K.E. Lee, and J.H. Kim. 2014.** Phosphate Solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 Regulates Endogenous Plant Carbohydrates and Amino Acids Contents to Promote Mustard Plant Growth. *Indian J Microbiol.* 54(4): 427-433.
- Kim, M.J., R. Radhakrishnan, S.M. Kang, Y.H. You, E.J. Jeong, J.G. Kim, and I.J. Lee. 2017.** Plant growth promoting effect of *Bacillus amyloliquefaciens* H-2-5 on crop plants and influence on physiological changes in soybean under soil salinity. *Physiol Mol Biol Plants.* 23(3): 571-580.
- Kumar Jha, C., and M. Saraf. 2015.** Plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR). *J. Agric. Res. Develop.* 5(2): 108-119.
- Kumar, K.V., SH. Srivastava, N. Singh, and H.M. Behl. 2009.** Role of metal resistant plant growth promoting bacteria in ameliorating fly ash to the growth of *Brassica juncea*. *J. Hazard. Mater.* 170: 51-57.
- Lichtenthaler H.K. 1987.** Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods. Enzymol.* 148:350-382.
- Makkizadeh Tafti, M., R. Farhoudi, and M. Rastifar. 2012.** Effect of osmopriming on seed germination of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) under salinity stresses. *Iranian J. Med.d Aromatic Plants.* 27(4): 573-586. (In Persian)
- Meryem, S.SH., and A. Yasmin. 2013.** Effect of lead resistant bacteria on the early growth of *Vigna mungo* L. (hepper) under lead stress. *Pak. J. Bot.* 45(S1): 481-485.
- Mustafa, H.S.B., T. Mahmood, A.Ullah, A. Sharif, A.N. Bhatti, M. Nadeem, and R. Ali. 2017.** Role of seed priming to enhance growth and development of crop plants against biotic and abiotic stresses. *Bull. Biol. Allied. Sci. Res.* 2: 1-11.
- Nehra, V., B.S. Saharan, and M. Choudhary. 2016.** Evaluation of *Brevibacillus brevis* as a potential plant growth promoting rhizobacteria for cotton (*Gossypium hirsutum*) Crop. *SpringerPlus.* 5: 2584-2588.
- Panpan, Z., Y. Bo, X. Mengke, C. Xiaoying, X. Lingwei, and J. Jihong. 2017.** Evaluation of the effect of plant growth promoting endophytic bacteria from pinellia ternate using an efficient organic silica hybrid monolithic column. *J. Biobased. Mater. Bio.* 11(4): 282-290.
- Park, Y.G., B.G. Mun, S.M. Kang, A. Hussain, R. Shahzad, C.W. Seo, A.Y. Kim, S.U. Lee, K.Y. Oh, D.Y. Lee, I.J. Lee, and B.W. Yun. 2017.** *Bacillus aryabhatai* SRB02 tolerates oxidative and nitrosative stress and promotes the growth of soybean by modulating the production of phytohormones. *J. Pone.* 1-28.
- Pii, Y., T. Mimmo, N. Tomasi, R. Terzano, S. Cesco, C. Creccchio. 2015.** Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. *Biol Fertil Soils.* 51: 403-415.
- Rahimi, M., and A. Athari. 2008.** Medical microbiology. Ayizh Publishing. pp 1050. (In Persian)
- Rahimian Mashhadi, H., A. Bagheri Kazemabad, and A. Paryab. 1991.** Effects of PEG and NaCl induced water potential at different temperatures on germination and seedling vigor of several wheat (*Triticum* spp.) populations. *J. Agric. Sci. Technol.* 5(1): 37-47.
- Sadiq, H.M., G.Z. Jahangir, I.A. Nasir, M. Iqtidar, and M. Iqbal. 2013.** Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere soil. *Biotechnol. Biotec. Eq.* 27(6): 4248-4255.

- Saleem, M., H.N. Asghar, Z.A. Zahir, and M. Shahid. 2018.** Impact of lead tolerant plant growth promoting rhizobacteria on growth, physiology, antioxidant activities, yield and lead content in sunflower in lead contaminated soil. *J. Chemosphere.* 195: 606-614.
- Sarkar, A., P.K. Ghosh, K. Pramanik, S. Mitra, T. Soren, S. Pandey, M.H. Mondel, and T.K. Maiti. 2018.** A halotolerant *Enterobacter* sp. displaying ACC deaminase activity promotes rice seedling growth under salt stress. *Res. Microbiol.* 169: 20-32.
- Sarsan, S. 2016.** Effect of phosphate solubilizing bacteria *Bacillus* PSB24 on growth of tomato plants. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* 5(7): 311-320.
- Shah, S., J. Li, B.A. Moffatt, and B.R. Glick. 1998.** Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. *Can. J. Microbiol.* 44(9): 833-843.
- Shahzad, R., M. Waqas, A.L. Khan, S. Asaf, M.A. Khan, S. Kang, B. Yun, and I. Lee. 2016.** Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiol. Biochem.* 106: 236-243.
- Sivakumar, T., S. Ambika, and K. Balakrishnan. 2017.** Biopriming of rice seed with Phosphobacteria for enhanced germination and vigour. *Springerplus.* 54(3): 346-349.
- Sivasakthi, S., G. Usharani, and P. Saranraj. 2013.** Biocontrol potentiality of plant growth promoting bacteria (PGPR) – *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Afr. J. Agric. Res.* 9(16): 1265-1277.
- Stajkovic, O., D. Delic, D. Josic, D. Kuzmanovic, N. Rasulic, and J.K. Vukcevic. 2011.** Improvement of common bean growth by co-inoculation with *Rhizobium* and plant growth-promoting bacteria. *Rom. Biotech. Lett.* 16(1): 5919-5926.
- Sun, Z., K. Liu, J. Zhang, Y. Zhang, K. Xu, D. Yu, J. Wang, L. Hu, L. Chen, and C. Li. 2017.** IAA producing *Bacillus alitudinis* alleviates iron stress in *Triticum aestivum* L. seedling by both bioleaching of iron and up-regulation of genes encoding ferritins. *Plant Soil.* 419: 1-11.
- Tamilarasi, S., K. Nanthakumar, K. Karthikeyan, and P. Lakshmanaperumalsamy. 2008.** Diversity of root associated microorganisms of selected medicinal plants and influence of rhizomicroorganisms on the antimicrobial property of *Coriandrum sativum*. *J. Environ. Biol.* 29(1): 127-134.
- Tsavklova, E., T.A. Cherdyntseva, S.Y. Klimova, A.I. Shestakov, S.G. Botina, and A.I. Netrusov. 2007.** Orchid-associated bacteria produce indole-3-acetic acid, promote seed germination, and increase their microbial yield in response to exogenous auxin. *Arch. Microbiol.* 188: 655-664.
- Van Loon, L.C. 2007.** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 119: 243-254.
- Vejan, P., R. Abdullah, T. Khadiran, S. Ismail, and A.N. Boyce. 2016.** Role of Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Agricultural Sustainability. *J. Molecules.* 1-17.
- Vessey, J.K. 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil.* 255:571-586.
- Wani, P.A., and M.S. Khan. 2010.** *Bacillus* species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. *J. Food Chem. Toxicol.* 48(11): 3262-3267.
- Wu, S.C., Z.H. Cao, Z.G. Li, K.C. Cheung, and M.H. Wong. 2005.** Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *J. Geoderma.* 125: 155-166.
- Zamin, F.R., D. Sachdev, N. KazemiPour, A. Engineer, K.R. Pardesi, S. Zinjarde, P.K. Dhakephalkar, and B.A. Chopade. 2011.** Characterization of Plant-Growth-Promoting Traits of *Acinetobacter* Species Isolated from Rhizosphere of Pennisetum glaucum. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21(6): 556-566.
- Zhang, J., P. Wang, L. Fang, Q. Zhang, C. Yan, and J. Chen. 2017.** Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from mushroom residues and their effect on tomato plant growth promotion. *Pol. J. Microbiol.* 66(1): 57-65.
- Zhao, L., Y. Xu, and X. Lai. 2018.** Antagonistic endophytic bacteria associated with nodules of soybean (*Glycine max* L.) and plant growth-promoting properties. *Braz. J. Microbiol.* 49: 269-278.

