تنش‌های محیطی در علوم زراعی
Environmental Stresses in Crop Sciences
جلد سیزدهم، شماره اول، بهار ۱۳۹۹
۲۲۵-۲۳۵
http://dx.doi.org/10.22077/escs.2019.1809.1419

مقاله پژوهشی

امکان‌سنجی استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه جداسازی شده از گره به‌منظور افزایش مقاومت گیاه یونجه (*Medicago sativa* L.) به تنش شوری

فاطمه نوری[1*]، حسن اعتصامی[2]، حمید نجفی زرینی[3]، نیراعظم خوش‌خلق سیما[4]، غلامعلی رنجبر[3]

۱. دانشجوی دکتری اصلاح نباتات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۲. استادیار گروه علوم خاک پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳. دانشیار گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴. دانشیار پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۵/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۷/۲۹

چکیده

با توجه به اهمیت اثرات تنش شوری در کاهش رشد گیاهان، این مطالعه با هدف بررسی اثر باکتری‌های محرک رشد گیاه (جداشده از گره‌های گیاه یونجه) بر کاهش اثرات تنش شوری در گیاه یونجه انجام شد. بدین منظور ۶۳ جدایه باکتریایی از گره‌های ۱۳ نمونه گیاه یونجه کشت‌شده در مزارع استان قم جداسازی شد. میزان مقاومت به شوری و برخی ویژگی‌های محرک رشد این جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. درنهایت، سه جدایه برتر شامل دو جدایه غیر ریزوبیومی A36 و A37 و یک جدایه ریزوبیومی ARh29 برای آزمایش گلخانه‌ای انتخاب شدند. آزمایش گلخانه‌ای به‌صورت یک طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل در سه تکرار انجام شد. سطوح شوری شامل صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم و سطوح باکتری شامل گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های A37 + A36، ARh29، A36 + A37 + ARh29، شاهد منفی (گیاهان بدون تلقیح باکتریایی و تغذیه‌شده با هوگلند فاقد نیتروژن) و شاهد مثبت (گیاهان بدون تلقیح باکتریایی و تغذیه‌شده با هوگلند حاوی نیتروژن) بودند. نتایج نشان داد سویه‌های باکتریایی در تمام سطوح شوری، توانستند وزن خشک گیاه و پرولین را در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح باکتریایی افزایش دهند. همچنین سویه‌های باکتری جذب یون‌های پتاسیم را افزایش و جذب یون‌های سدیم را در گیاهان یونجه تحت تنش شوری کاهش دادند به‌طوری‌که در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار، وزن خشک و میزان پرولین گیاهانی که با هر سه جدایه برتر به‌طور هم‌زمان تلقیح شده بودند، ۲۹٪ و ۳۵٪ بیشتر از شاهد مثبت و همچنین نسبت پتاسیم به سدیم آن‌ها به میزان ۳۶٪ بیشتر از شاهد مثبت بود. به‌طورکلی، نتایج این مطالعه نشان داد که گره‌های ریشه یونجه می‌تواند حاوی باکتری‌های غیر ریزوبیومی محرک رشد گیاه و مقاوم به شوری باشد که استفاده از آن‌ها به همراه باکتری‌های ریزوبیومی می‌تواند منجر به بهبود رشد گیاه یونجه تحت تنش شوری گردد.

واژه‌های کلیدی: **باکتری‌های ریزوبیومی، باکتری‌های غیر ریزوبیومی، تثبیت نیتروژن، *Klebsiella sp.*، *Kosakonia cowanii***

مقدمه

تنش شوری از مهم‌ترین عوامل بازدارنده در تولید محصولات کشاورزی است. بیش از ۲۰ درصد از زمین‌های زیر کشت در سراسر جهان تحت تأثیر تنش شوری بوده و میزان آن روزبه‌روز در حال افزایش است (Munns et al., 2008). یونجه زراعی (*Medicago sativa*. L) در بین نباتات علوفه‌ای به دلیل کیفیت خوش‌خوراکی و غنی بودن از مواد پروتئینی و معدنی به‌عنوان مهم‌ترین گیاه علوفه‌ای دنیا محسوب می‌شود (Yarnia et al., 2005)؛ که ازنظر مقاومت به شوری در گروه گیاهان نیمه متحمل قرار دارد، به‌طوری‌که شوری بیش از دو دسی زیمنس بر متر موجب کاهش رشد و عملکرد آن می‌گردد (Mass et al.,1977). ریشه‌های یونجه یک محیط مناسب برای رشد سریع میکروارگانیسم‌هایی که

* نگارنده پاسخگو: فاطمه نوری. پست الکترونیک: f.noori64@gmail.com

در اطراف ریشه جای دارند است. این حجم بالای فعالیت زیستی درنتیجه ترشحات شیمیایی طبیعی ریشه این گیاه است (Putman et al., 2001). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه به‌صورت مستقیم و از طرق مختلف مانند تولید فیتوهورمون‌ها، ویتامین‌ها، اسیدهای آمینه، تثبیت نیتروژن و افزایش شکل‌های قابل‌جذب عناصر غذایی می‌توانند بر رشد گیاه اثر بگذارند (Glick et al., 1998).

شوری خاک نه‌تنها مانع رشد و توسعه گیاه می‌شود، بلکه منجر به اثرات منفی در ترکیب و فعالیت باکتری‌های ریزوسفر نیز می‌شود (Ofek et al., 2006)؛ اما دراین‌بین، باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) متحمل به شوری یا ST-PGPR به‌صورت معنی‌داری رشد و عملکرد گیاهان زراعی ازجمله یونجه را تحت شرایط تنش شوری افزایش می‌دهند (Younesi et al., 2012; Fesaeali and Besharati, 2011; Upadhyay et al., 2015). باکتری‌های مقاوم به شوری و محرک رشد گیاه، از طریق مکانیسم‌های گوناگون مانند افزایش نسبت یون پتاسیم به سدیم، تجمع پرولین، افزایش سیستم ریشه‌ای گیاه و بهبود روابط آبی گیاه، رشد گیاه را تسهیل می‌کند (Bhattacharyya et al., 2012). به‌عنوان‌مثال، در گیاهانی که با باکتری‌های محرک رشد گیاه تلقیح شدند، طی تنش خشکی و شوری افزایش سطح پرولین مشاهده شد (Damodaran et al., 2014). در مطالعه‌ای تحت شرایط شوری، گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های ریزوبیومی مقاوم به شوری از رشد بهتر، درصد نیتروژن و پروتئین کل بیشتری نسبت به گیاهان شاهد برخوردار بودند (Fesaeali and Besharati, 2011). همچنین گزارش‌شده است که استفاده از رایزوباکترها، تحمل به شوری را در لوبیا چشم‌بلبلی به دلیل افزایش تجمع متابولیت‌ها از قبیل قندها، پرولین، گلایسین بتائین بهبود بخشید (Tawfik, 2008). باکتری‌های ساکن در مناطقی که در معرض تنش مکرر هستند، به‌احتمال‌زیاد سازگاری بیشتر یا تحمل بیشتری به تنش دارند و می‌تواند تحت شرایط تنش شوری باعث رشد بهتر گیاه شوند (Shrivastava et al., 2015). استفاده از باکتری‌های مرتبط با ریشه گیاهان که باعث کاهش تنش می‌شود، فنّاوری جدیدی در مسیر مدیریت شوری است. مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از میکروب‌های مفید می‌تواند مقاومت گیاه را به تنش‌های محیطی، ازجمله خشکی و شوری افزایش دهد (Glick et al., 2007).

به‌خوبی شناخته شده است که باکتری‌های ریزوبیومی تنها ساکنان گره‌ها نیستند و باکتری‌های غیر ریزوبیومی نیز در این گره‌ها ساکن می‌باشند (Stajković et al., 2009). این باکتری‌ها در تماس نزدیک با گیاه هستند و متابولیت‌های تولیدشده توسط آن‌ها بهتر در اختیار گیاه میزبان قرار می‌گیرد (Berg et al., 2013). در سال‌های اخیر به تلقیح تلفیقی باکتری‌های ریزوبیومی با باکتری‌های غیر ریزوبیومی محرک رشد گیاه به‌منظور افزایش پتانسیل گره زایی و نهایتاً رشد گیاه توجه بیشتری شده است (Rajendran et al., 2008)؛ اما تاکنون هیچ گزارشی مبنی بر جداسازی باکتری‌های غیر ریزوبیومی مقاوم به شوری که از گره جداسازی شده باشد وجود ندارد.

با توجه به مطالب ذکرشده، هدف از این مطالعه تعیین ویژگی‌های محرک رشد گیاه و مقاومت به شوری باکتری‌های ریزوبیومی و غیر ریزوبیومی جداسازی شده از گره‌های گیاهان یونجه کشت‌شده در خاک‌های شور استان قم بود. علاوه بر این، تأثیر جدایه‌های برتر غیر ریزوبیومی و ریزوبیومی بر وزن خشک گیاه و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیکی گیاهان یونجه تحت تنش شوری نیز مطالعه شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های ریزوبیومی و غیر ریزوبیومی گره با استفاده از محیط کشت مخمر- مانیتول آگار (YMA) انجام شد (Vincent, 1970). برای تعیین میزان تحمل به شوری جدایه‌ها، رشد کیفی جدایه‌ها در محیط کشت آگار مغذی (NA) حاوی مقادیر صفر، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میلی‌مولار نمک کلرید سدیم بررسی شد (Khalifa et al., 2016). سنجش کمی ایندول-۳-استیک اسید (IAA) توسط روش رنگ‌سنجی انجام شد (Gordon and Weber, 1951). جدایه‌های باکتریایی در محیط نوترینت براث حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ال- تریپتوفان در دمای ۳۰ درجه به مدت ۷۲ ساعت رشد داده شد و سوسپانسیون حاصل با دور ۸۰۰۰ سانتریفیوژ گردید و محلول رویی با معرف سالکوفسکی (یک میلی‌لیتر از محلول نیم مولار $FeCl_3$ در ۵۰ میلی‌لیتر از محلول ۳۵٪ $HClO_4$) با نسبت ۱:۱ ترکیب شد و تولید IAA بر اساس رنگ صورتی تولیدشده توسط دستگاه اسپکتوفتومتر در طول‌موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. در ادامه با استفاده از محیط کشت اسپربر و محاسبه نسبت قطر هاله به کلنی میزان

توانایی انحلال فسفات معدنی جدایه‌ها محاسبه شد. ارزیابی توان انحلال فسفات آلی نیز با استفاده از محیط ISP (Inositol hexaphosphate-Sperber) که محیط کشت اصلاح‌شده اسپربر بود، انجام شد (Sperber et al., 1958).

به‌منظور تعیین توانایی این باکتری‌ها در تثبیت نیتروژن از محیط کشت نیمه جامد Nfb بدون نیتروژن بر طبق روش دوبرینر (Dobereiner et al., 1989) استفاده شد. با توجه به نبود نیتروژن در محیط کشت وجود هاله‌ای از رشد باکتری‌ها درون این محیط به‌عنوان شاخصی از تثبیت نیتروژن در نظر گرفته شد. هاله رشد باکتریایی درون این محیط در مقایسه با یک کنترل مثبت (*Azosprillum brasilense*، جدایه تثبیت‌کننده نیتروژن) بررسی گردید. به‌منظور تشخیص باکتری‌های ریزوبیومی از باکتری‌های غیر ریزوبیومی، توان گره‌زایی باکتری‌ها بر روی ریشه‌های یونجه بررسی شد و باکتری‌هایی که توان تشکیل گره داشتند به‌عنوان باکتری ریزوبیومی همزیست گیاه یونجه در نظر گرفته شد. این ارزیابی بر طبق روش بک و همکاران (Beck et al., 1993) انجام شد.

بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی‌های انجام‌شده، دو جدایه غیر ریزوبیومی A36 و A37 و یک جدایه ریزوبیومی ARh29 به‌عنوان جدایه‌های برتر برای استفاده در کشت گلخانه‌ای و شناسایی مولکولی انتخاب شدند.

به‌منظور شناسایی جدایه‌های برتر DNA ژنومی جدایه‌های برتر با استفاده از کیت جداسازی (Promega, Madison, WI, USA) استخراج شد؛ و ژن S rRNA۱۶ به‌وسیله فرایند PCR و پرایمرهای F ۲۷ با توالی ('۵-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-'3) و R۱۴۹۲ با توالی ('۳-GGTTACCTTGTTACGACTT-'5) تکثیر شد (Edwards et al., 1989). توالی ژن‌های S rRNA۱۶ بعد از خالص‌سازی محصولات PCR با کیت خالص‌سازی (Promega, Madison, WI, USA) توسط دستگاه توالی یاب شرکت ماکروژن کره جنوبی قرائت شد.

در ادامه طی آزمایش گلخانه‌ای اثر جدایه‌های برتر بر رشد گیاهان یونجه تحت تنش شوری بررسی شد. این آزمایش به‌صورت یک طرح کاملاً تصادفی به‌صورت فاکتوریل در سه تکرار اجرا شد. فاکتور شوری در پنج سطح و با علامت اختصاری S در نظر گرفته شد و تیمارها برحسب سطوح شوری از S1 تا S5 علامت‌گذاری شدند که شامل غلظت‌های صفر (S1)، ۵۰ (S2)، ۱۰۰ (S3)، ۱۵۰ (S4) و ۲۰۰ (S5) میلی‌مولار کلرید سدیم بودند. فاکتور باکتری نیز در پنج سطح و با علامت اختصاری M در نظر گرفته شد و تیمارها برحسب سطوح باکتری از M1 تا M5 علامت‌گذاری شدند که شامل گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های غیر ریزوبیومی A36 + A37 (M1)، جدایه ریزوبیومی ARh29 (M2) و ترکیب جدایه‌های غیر ریزوبیومی و ریزوبیومی A36 + A37 + ARh29 (M3) و گیاهان بدون تلقیح باکتریایی و تغذیه‌شده با محلول هوگلند فاقد نیتروژن به عنوان شاهد منفی (M4) و گیاهان بدون تلقیح باکتریایی و تغذیه‌شده با محلول هوگلند حاوی نیتروژن به عنوان شاهد مثبت (M5) بودند. پس از ۷۰ روز دوره رشد، نمونه‌ها برداشت شد و اثر تیمارهای مختلف بر وزن خشک گیاه، مقدار سدیم، پتاسیم و پرولین اندام هوایی گیاه اندازه‌گیری و ثبت شد. هضم قسمت‌های هوایی گیاه به‌منظور اندازه‌گیری غلظت عناصر ذکرشده با استفاده از روش خاکستر خشک انجام شد و غلظت‌های این عناصر در عصاره حاصله با استفاده از دستگاه فلیم فوتومتر (ELE) بر اساس روش (Okalebo et al., 2002) قرائت شدند. علاوه بر این، برای اندازه‌گیری محتوای پرولین از روش بیتس و همکاران (Bates et al., 1973) استفاده شد.

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. همچنین مقایسه میانگین داده‌ها، به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح پنج درصد محاسبه و نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel ترسیم شد.

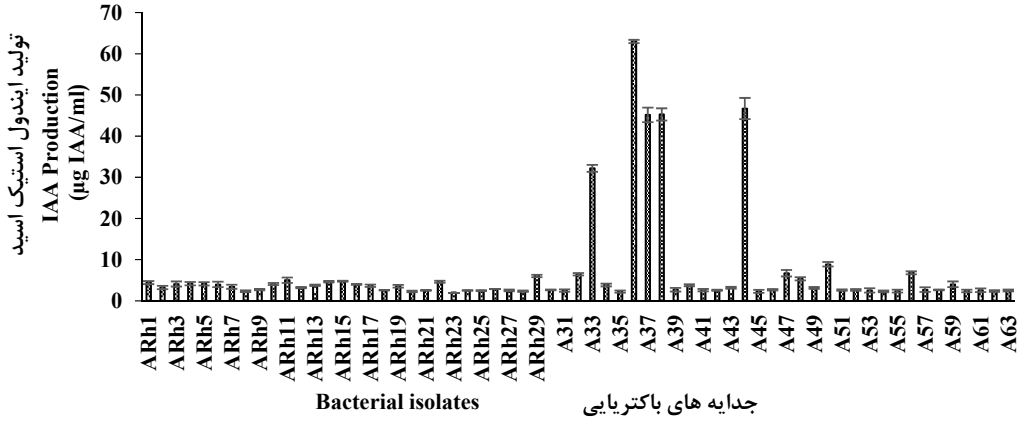
نتایج و بحث

در این مطالعه، ۶۳ جدایه ریزوبیومی و غیر ریزوبیومی جداسازی شد. نتایج تفکیک جدایه‌ها ازلحاظ همزیستی نشان داد که ۳۰ جدایه توانایی ایجاد همزیستی و ایجاد گره در گیاه یونجه را داشتند؛ که با کدهای ARh1 تا ARh30 مشخص شدند و ۳۳ جدایه دیگر همزیست یونجه نبوده و با کدهای A31 تا A63 مشخص شدند. جداسازی باکتری‌های غیر همزیست از گره‌های ریشه یونجه (Lai et al., 2015) و سایر لگوم‌ها (Korir et al., 2017) در مطالعات قبلی گزارش‌شده است.

نتایج حاصل از ارزیابی توان تحمل جدایه‌ها به شوری نشان داد که تمام جدایه‌ها قادر به رشد تا شوری ۴۰۰ میلی‌مولار بودند درصورتی‌که فقط چهار جدایه غیر همزیست (A36، A37، A38 و A44) توانستند در شوری ۱۲۰۰ میلی‌مولار رشد کنند. مطالعات نشان داده‌اند که باکتری‌های

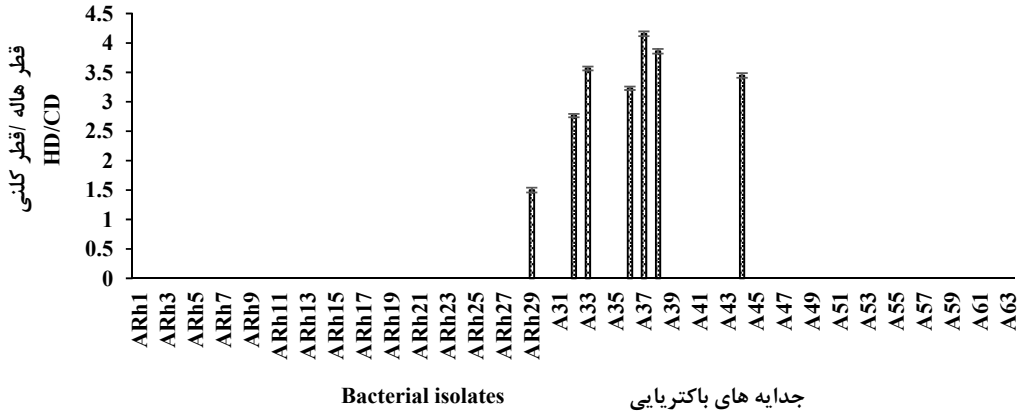
PGPR جداشده از محیط‌های شور در مقایسه با باکتری‌های جداشده از محیط‌های غیر شور در بهبود تحمل گیاه به تنش شوری از کارایی بیشتری برخوردارند (Paul et al., 2008). باکتری‌های موردبررسی در این مطالعه از گره‌های ریشه گیاهان یونجه کشت‌شده در خاک‌های شور (EC=10.94 dS/m) جداسازی شدند. بررسی‌ها نشان داد، توانایی تولید صفات محرک رشدی گیاه در بین جدایه‌ها متفاوت بود. تمام جدایه‌ها ازنظر توان تولید IAA مثبت بودند. مقدار IAA تولیدشده توسط این جدایه‌ها از ۲/۰۰ تا ۶۳/۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. بیشترین میزان تولید این هورمون در میان باکتری‌های غیر همزیست دیده شد (شکل ۱).

بر طبق گزارش‌های قبلی، ۹۰٪ باکتری‌های همراه با گیاهان قابلیت تولید هورمون IAA رادارند (Dilfuza et al., 2011). در مطالعه‌ای، ۱۵ سویه غیر ریزوبیومی از گره‌های گیاه یونجه جداسازی شد که همگی ازلحاظ توانایی تولید IAA مثبت بودند (Stajković et al., 2009). در این تحقیق، از میان ۶۳ جدایه موردبررسی فقط هفت جدایه توانایی انحلال فسفات معدنی را دارا بودند که از بین آن‌ها یک جدایه همزیست و شش جدایه دیگر غیر همزیست بودند. از میان این هفت باکتری توانمند، بیشترین میزان انحلال فسفات معدنی به جدایه غیر همزیست A37 با نسبت قطر هاله به کلنی ۴/۱۵ تعلق داشت و کمترین میزان انحلال هم به جدایه همزیست ARh29 با نسبت قطر هاله به کلنی ۱/۵ تعلق داشت (شکل ۲).



شکل ۱. توانایی تولید هورمون IAA توسط جدایه‌های موردمطالعه

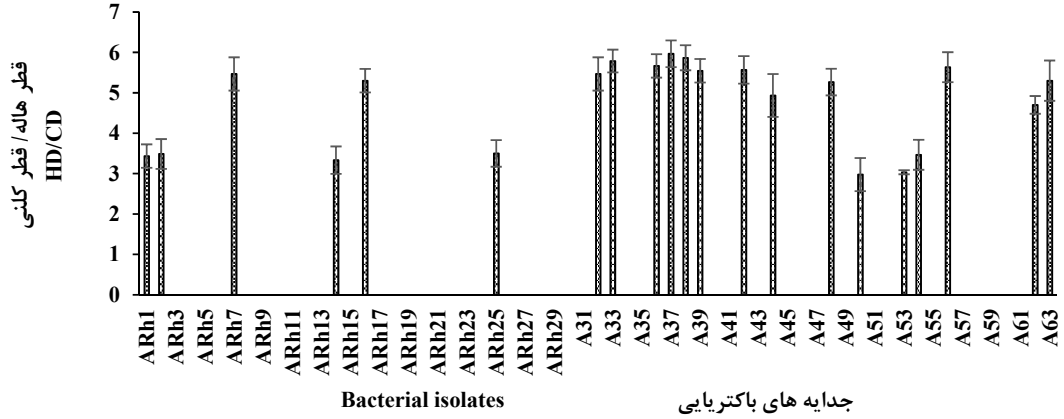
Fig. 1. Ability of IAA production by bacterial isolates used in this study



شکل ۲. توانایی انحلال فسفات معدنی جدایه‌های موردمطالعه بر اساس نسبت قطر هاله به قطر کلنی

Fig. 2. Inorganic phosphate solubilization ability by bacterial isolates: HD, halo diameter and CD, colony diameter

درمجموع ۲۱ جدایه توان انحلال فسفات آلی را داشتند که شش جدایه همزیست و ۱۵ جدایه غیر همزیست بودند و از میان این ۲۱ باکتری توانمند، بیشترین توانایی متعلق به جدایه A37 با نسبت قطر هاله به کلنی ۵/۹ بود و کمترین توانایی مربوط به جدایه A50 با نسبت قطر هاله به کلنی ۲/۹ بود (شکل ۳).



شکل ۳. توانایی انحلال فسفات آلی جدایه‌های موردمطالعه بر اساس نسبت قطر هاله به قطر کلنی.

Fig. 3. Organic phosphate solubilization ability by bacterial isolates: HD, halo diameter and CD, colony diameter

توانایی حل‌کنندگی فسفات در باکتری‌های اندوفیت در مطالعات قبلی گزارش‌شده است (Etesami and Alikhani, 2016). بسیاری از باکتری‌های ریزوسفر مانند Rhizobium، Bacillus، Pseudomonas، Agrobacterium و Achromobacere با تولید اسیدهای آلی قادر به انحلال فسفات معدنی نامحلول موجود در خاک هستند (Rodríguez and Fraga, 1999).

سنجش کیفی توانایی تثبیت نیتروژن جدایه‌ها بر مبنای رشد در محیط نیمه‌جامد Nfb انجام شد که نتایج نشان داد تمامی ۳۰ جدایه همزیست توانایی رشد در این محیط کشت و تثبیت نیتروژن را دارا بودند و از میان ۳۳ جدایه غیر همزیست، تنها هشت جدایه توانایی تثبیت نیتروژن را داشتند. در مطالعه‌ای ۲۰ جدایه مقاوم به شوری از ریشه گیاه شورپسند سالیکورنیا جداسازی شد که همگی تثبیت‌کننده نیتروژن بودند (Mapelli et al., 2013). باکتری‌های اندوفیتی مثل Pantoea، Azosprillum، Rhizobium و Klebsiella از درون گیاه برنج جداسازی شده است که همگی تثبیت‌کننده نیتروژن بوده‌اند (Ladha, J. K. et al., 1997).

تطبیق توالی ژن S rRNA۱۶ جدایه‌های ARh29، A36 و A37 با توالی‌های پایگاه داده‌ها به ترتیب *Sinorhizobium meliloti*، *Klebsiella* sp و *Kosakonia cowanii* بود. همچنین شماره دسترسی‌های MH201368، MH201369 و MG586242 به ترتیب برای جدایه‌های A36، A37 و ARh29 در بانک ژن ثبت شد. در مطالعات قبلی نیز باکتری‌هایی از جنس *Kosakonia* sp. از درون ریشه گیاهان لوبیا و سویا جداسازی و به‌عنوان باکتری محرک رشد گیاه معرفی‌شده‌اند (Chimwamurombe et al., 2016; Almeida Lopes et al., 2016). همچنین باکتری‌هایی با ویژگی‌های محرک رشد گیاه از جنس *Klebsiella* sp. از درون ریشه گیاهان باقلا و سویا جداسازی شده است (Martínez-Hidalgo and Hirsch, 2017).

تجزیه واریانس اثر متقابل بین سطوح شوری و تیمارهای باکتریایی روی وزن خشک اندام هوایی در سطح ۱٪ معنی‌دار شد (جدول ۱). در تمام سطوح شوری، سویه‌های باکتریایی توانستند وزن خشک گیاه را در مقایسه با تیمارهای شاهد مثبت افزایش دهند (جدول ۲)، به‌طوری‌که بیشترین میزان وزن خشک اندام هوایی در تمام سطوح شوری به گیاهانی که هم‌زمان با سویه‌های غیر ریزوبیومی A36 و A37 و سویه ریزوبیومی ARh29 تلقیح شده بودند (تیمار M3) تعلق گرفت؛ که این مقادیر به ترتیب در سطوح شوری صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم برابر با ۱۵۲، ۱۳۶، ۱۲۴، ۱۰۴ و ۹۷ میلی‌گرم در گیاه بود. درصورتی‌که میزان وزن خشک برای گیاهان شاهد مثبت به ترتیب سطوح شوری

ذکرشده در بالا برابر با ۱۲۷، ۱۲۴، ۱۰۷، ۸۶ و ۷۴ میلی‌گرم در گیاه بود. درواقع تلقیح هم‌زمان یونجه با سویه‌های برتر A36 و A37 و ARh29 وزن خشک گیاه را در تمام سطوح شوری در مقایسه با تلقیح این جدایه‌ها به‌طور جداگانه افزایش داد.

جدایه‌های غیر ریزوبیومی A36 و A37 نیز در غیاب جدایه ریزوبیومی ARh29 به‌طور معنی‌داری رشد گیاهان را افزایش دادند. این باکتری‌ها حتی در غیاب جدایه ریزوبیومی توانستند نیتروژن گیاه را تأمین کنند که همین امر از نتایج جالب این تحقیق بود. در مطالعه‌ای اثر کاربرد ترکیبی جدایه‌های ریزوبیومی و غیر ریزوبیومی بر رشد و تحمل گیاهان تحت تنش شوری بررسی شد و در پایان پس از شش هفته میزان محتوای نسبی آب، رنگ‌دانه‌های فتوسنتزی و محتوای مواد آلی و معدنی برگ اندازه‌گیری شد. نتایج این تحقیق نشان داد که گیاهانی که به‌صورت تلفیقی با هر دو نوع باکتری ریزوبیومی و غیر ریزوبیومی تیمار شده بودند در شرایط تنش شوری به‌صورت معنی‌داری رشد بیشتری نسبت به گیاهان تلقیح نشده داشتند (Baha and Bekki, 2015). همچنین گزارش‌شده است که کارایی تثبیت نیتروژن و شاخص‌های رشد گیاهان لگوم توسط باکتری‌های ریزوبیومی در حضور PGPRهای غیر همزیست افزایش می‌یابد (Elkoca et al., 2008). ازآنجاکه باکتری‌های غیر ریزوبیومی استفاده‌شده در این تحقیق توان تولید هورمون IAA را داشتند به نظر می‌رسد که این باکتری‌ها از طریق افزایش سیستم ریشه‌ای توانسته‌اند منجر به جذب بیشتر آب و عناصر غذایی گردند و متعاقباً باعث افزایش زیست‌توده گیاه یونجه شوند. در مطالعه‌ای بیان شد که باکتری‌های محرک رشد گیاه باقابلیت تولید IAA و انحلال فسفات، باعث افزایش عملکرد و رشد گندم تحت تنش شوری شدند (Rajput et al., 2013). تولید IAA در گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های PGPR سبب افزایش جذب آب و زیست‌توده گیاه می‌شود که این امر باعث زنده‌مانی گیاه در طول تنش خشکی و شوری می‌شود (Marulanda et al., 2009). در مطالعه‌ای دیگر، تلقیح گندم با سویه‌های باکتریایی *P. aureantiaca* که تولیدکننده اکسین بودند به‌طور قابل‌توجهی رشد ریشه گیاهچه را تا ۴۰٪ و رشد ساقه را تا ۵۲٪ در شوری ۱۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم نسبت به گیاهان کنترل افزایش دادند (Egamberdieva et al., 2009).

اثر متقابل شوری و تیمار باکتریایی روی غلظت سدیم و پتاسیم اندام هوایی در سطح ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۱). بر اساس نتایج مقایسه میانگین از میان ۲۵ تیمار موجود، بیشترین میزان سدیم به گیاهان شاهد منفی (بدون تلقیح باکتریایی و تغذیه با هوگلند فاقد نیتروژن) در غلظت شوری ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم یعنی تیمار S5M4 به میزان ۲/۷۷٪ و بیشترین میزان پتاسیم نیز به گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های غیر ریزوبیومی در سطح شوری صفر میلی‌مولار کلرید سدیم یعنی تیمار S1M1 به میزان ۵/۳۷٪ تعلق گرفت (جدول ۲). گیاهان تلقیح شده با سویه‌های باکتریایی در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده مقدار کمتری سدیم جذب کردند. همچنین در تمام سطوح شوری، سویه‌های باکتریایی

جدول ۱. تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر سطوح شوری و سطوح باکتری بر میزان وزن خشک، غلظت پرولین، سدیم و پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم اندام هوایی در گیاه یونجه.

Table 1. ANOVA for the effect of salinity levels and bacterial levels on shoot dry weight and concentration of proline, Na, and K and K/Na ratio of alfalfa plant shoot

منابع تغییرات Sources of variation		درجه آزادی df	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight (mg/plant)	پرولین Prolin (µg/g fresh leaves)	غلظت سدیم Na (mg/g DW)	غلظت پتاسیم K (mg/g DW)	پتاسیم به سدیم K/Na
Salinity (S)	شوری	4	5791**	442**	1054**	212**	1747**
Bacterial (B)	باکتری	4	5923**	56.1**	61.1**	243**	76.9**
S × B	شوری × باکتری	16	90.1**	7.17**	4.42**	3.93**	44.0**
Error	خطا	50	9.24	0.204	0.142	0.610	5.49

*و ** به ترتیب تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد را نشان می‌دهد

* and ** show significant difference at probability level of 1 and 5%, respectively (DW: Dry Weight)

جدول ۲. مقایسه میانگین اثر متقابل سطوح شوری و باکتریایی بر میزان وزن خشک و غلظت پرولین، سدیم و پتاسیم و نسبت پتاسیم به سدیم اندام هوایی در گیاه یونجه.

Table 2. Means Comparison of the interaction effect of the salinity and bacterial levels on shoot dry weight and concentration of proline, Na, and K and K/Na ratio of alfalfa plant shoot

Treatment	وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight (mg/plant)	پرولین Prolin (µg/g fresh leaves)	پتاسیم K (%)	سدیم Na (%)	نسبت پتاسیم به سدیم K/Na
S_1M_1§	138^{bc} ±3.2 †	3.13^{mno} ±0.21	5.37^{a} ± 0.79	0.246^{op} ±0.22	21.97^{c} ±1.72
S_1M_2	142^{b} ±5.8	2.67^{n-q} ±0.21	5.23^{b} ±0.88	0.131^{q} ± 0.25	41.2^{a} ±7.02
S_1M_3	152^{a} ±2.9	3.40^{lmn} ±0.22	5.23^{b} ±0.41	0.183^{pq} ±0.33	29.6^{b} ±5.7
S_1M_4	89.8^{lm} ± 2.5	1.94^{q} ±0.12	4.70^{fg} ±1.00	0.271^{o} ±0.20	17.4^{d} ±1.04
S_1M_5	127^{ef} ±2.6	2.27^{pq} ±0.21	4.93^{cd} ±0.78	0.196^{pq} ±0.16	25.4^{c} ±2.25
S_2M_1	132^{de} ±1.7	3.93^{klm} ±0.21	4.99^{c} ±0.43	0.850^{m} ±0.26	5.87^{efg} ±0.19
S_2M_2	135^{cd} ±1.0	3.83^{klm} ±0.21	4.85^{de} ± 1.04	0.745^{n} ±0.05	6.50^{ef} ±0.12
S_2M_3	136^{cd} ±1.2	4.13^{kl} ±0.33	5.0^{c} ±0.61	0.705^{n} ±0.21	7.11^{e} ±0.29
S_2M_4	80.4^{n} ±0.8	2.37^{opq} ±0.12	4.23^{k} ±0.49	1.02^{l} ±0.21	4.17^{e-h} ±0.10
S_2M_5	124^{f} ±2.3	2.93^{nop} ±0.12	4.47^{j} ± 0.30	0.955^{l} ±0.40	4.69^{e-h} ±0.17
S_3M_1	123^{fg} ±1.8	7.13^{ij} ±0.25	4.76^{ef} ±0.71	1.47^{j} ±0.31	3.24^{e-h} ±0.12
S_3M_2	119^{g} ±1.3	7.27^{i} ±0.58	4.71^{fg} ±0.73	1.34^{k} ± 0.30	3.52^{e-h} ±0.13
S_3M_3	124^{f} ±1.0	8.43^{h} ±0.46	4.86^{cde} ±0.27	1.44^{j} ±0.31	3.37^{e-h} ±0.09
S_3M_4	72.9^{o} ±2.3	4.53^{k} ±0.17	3.89^{m} ±0.78	1.90^{g} ±0.42	2.05^{fgh} ± 0.07
S_3M_5	107^{h} ±1.6	6.37^{j} ±0.25	4.22^{k} ±1.18	1.71^{h} ± 0.50	2.47^{fgh} ±0.13
S_4M_1	101^{ij} ±2.1	12.6^{e} ±0.74	4.61^{ghi} ±0.22	1.77^{h} ±0.42	2.61^{e-h} ±0.07
S_4M_2	100^{ij} ± 2.4	11.3^{f} ±0.60	4.64^{fgh} ±0.30	1.62^{i} ±0.18	2.87^{e-h} ±0.02
S_4M_3	104^{hi} ± 2.2	14.3^{d} ±0.33	4.67^{fg} ±0.56	1.62^{i} ±0.35	2.89^{e-h} ±0.04
S_4M_4	65.9^{p} ±3.3	7.03^{ij} ±0.21	3.62^{n} ±0.20	2.33^{c} ±0.38	1.55^{gh} ±0.02
S_4M_5	86.7^{m} ±3.3	9.64^{g} ±0.45	4.08^{l} ±0.46	2.03^{f} ±0.25	2.01^{fgh} ±0.02
S_5M_1	94.3^{kl} ±2.1	18.2^{b} ± 0.69	4.40^{j} ±0.35	2.21^{d} ±0.20	1.99^{fgh} ±0.01
S_5M_2	90.3^{lm} ±1.6	17.3^{c} ±0.26	4.50^{ij} ±0.53	2.00^{f} ±0.42	2.25^{fgh} ±0.06
S_5M_3	97.2^{jk} ±2.3	19.7^{a} ±0.44	4.52^{hij} ±0.26	2.12^{e} ±0.27	2.14^{fgh} ±0.04
S_5M_4	61.3^{p} ±2.5	9.20^{g} ±0.45	3.31^{o} ±0.66	2.77^{a} ±0.48	1.20^{h} ±0.04
S_5M_5	74.8^{o} ±2.9	13.9^{d} ±0.25	3.83^{m} ±0.55	2.49^{b} ±0.08	$1.53g^{h}$ ±0.02

§ S: علامت اختصاری سطوح شوری که S_1، S_2، S_3، S_4 و S_5 به ترتیب حاوی غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌مولار کلرید سدیم بود.
M: علامت اختصاری سطوح باکتری و M_1 شامل گیاهان تلقیح شده با جدایه‌های A37 + A36 (*Klebsiella* sp. + *Kosakonia cowanii*)، M_2 شامل گیاهان تلقیح شده با جدایه ARh29 (*Sinorhizobium meliloti*)، M_3 شامل گیاهان تلقیح شده با A36 + A37 +ARh29 (*Sinorhizobium meliloti* + *Kosakonia cowanii* +*Klebsiella* sp.)، M_4 شاهد منفی که شامل گیاهان بدون تلقیح باکتریایی و تغذیه با هوگلند فاقد نیتروژن، M_5 شاهد مثبت که شامل گیاهان بدون تلقیح باکتریایی و تغذیه با هوگلند حاوی نیتروژن بود.
† اعداد میانگین صفات ± انحراف معیار هستند.

§ S stands for salinity levels as S1, S2, S3, S4, and S5 are 0, 50, 100, 150, and 200 mM NaCl, respectively. M stands for bacterial levels as M1, M2, M3, M4, and M5 are plants inoculated with A37 + A36 (*Klebsiella* sp. + *Kosakonia cowanii*), plants inoculated with ARh29 (*Sinorhizobium meliloti*), plants inoculated with A37 + A36 + ARh29 (*Sinorhizobium meliloti* *Klebsiella* sp.+ *Kosakonia cowanii*), plants non-inoculated and treated with N-free Hoagland solution (negative control), and plants non-inoculated and treated with N containing Hoagland solution (positive control), respectively.
† The values are means ± standard deviation (SD).

جذب یون‌های پتاسیم در گیاهان را افزایش دادند. بیشترین میزان نسبت پتاسیم به سدیم در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار به تیمار S5M2 به میزان ۲/۲۵ تعلق گرفت. همچنین در این سطح شوری میانگین نسبت پتاسیم به سدیم گیاهان تلقیح شده با باکتری به میزان ۰/۶ از گیاهان شاهد مثبت بیشتر بود. در مطالعه‌ای گزارش شد که در شرایط تنش شوری تلقیح

گیاه ذرت با باکتری محرک رشد گیاه باعث افزایش جذب پتاسیم و درنتیجه افزایش نسبت پتاسیم به سدیم در این گیاهان شده است که این امر سبب افزایش رشد این گیاهان شد (Nadeem et al., 2009). گزارش‌شده است که گیاهان گلایول تلقیح شده با *Bacillus* sp. در تنش شوری جذب بیشتر یون‌های پتاسیم نسبت به یون‌های سدیم را نشان دادند که همین امر موجب افزایش نسبت پتاسیم به سدیم در این گیاهان نسبت به گیاهان شاهد شده است (Damodaran et al., 2014).

تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر متقابل سطوح شوری و تیمارهای باکتری‌ها بر غلظت پرولین در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول ۱). در تمام سطوح شوری، گیاهانی که با سویه‌های باکتریایی تلقیح شده بودند غلظت پرولین بیشتری نسبت به گیاهان تلقیح نشده داشتند. در تمام سطوح شوری بالاترین غلظت پرولین متعلق به گیاهانی که هم‌زمان با هر سه سویه A36 و A37 و ARh29 (تیمار M3) تلقیح شدند اختصاص یافت که این میزان در شوری ۲۰۰ میلی‌مولار و برابر با ۱۹/۷ میکروگرم در گرم برگ تازه بود و در مرتبه بعد گیاهانی که فقط با سویه‌های A36 و A37 تلقیح شدند (تیمار M2) قرار داشتند. در گیاهان تحت تنش شوری تجمع پرولین، قند محلول و پروتئین‌های پاسخ‌دهنده تنش که به‌طور فعال در تنظیم اسمزی فعالیت می‌کنند دیده می‌شود (Szabados et al., 2010). گیاه ذرت، تلقیح شده با آزوسپرلیوم تحت تنش شوری افزایش پرولین را نشان داد که این امر در بهبود تحمل به شوری مؤثر بود (Kandowangko et al., 2009). تلقیح گیاه گوجه‌فرنگی تحت تنش خشکی با باکتری *Bacillus polymyxa* نشان داد که ترشح پرولین در این گیاه افزایش یافت که این امر به بقاء این گیاهان تحت شرایط تنش خشکی و شوری کمک می‌کند (Shintu et al., 2015).

نیتروژن یک عنصر ضروری در رشد گیاه است و کمبود آن از مهم‌ترین عوامل محدودکننده در رشد گیاه است (Dobermann et al., 2014). همزیست‌های تثبیت‌کننده نیتروژن می‌توانند به‌عنوان جایگزینی ماندگار برای کودهای شیمیایی در محیط‌های کشاورزی مورداستفاده قرار گیرند (El-Akhal et al., 2013). در مطالعه‌ای روی گیاه یونجه مشخص شد که زیست‌توده گره طی تنش شوری در تمام ژنوتیپ‌ها کاهش یافت (Tejera et al., 2006). در مطالعه دیگری نیز مشخص شد که شوری محتوای لگ هموگلوبین را در گره کاهش می‌دهد و سبز شدن درون گره را تسریع می‌کند که به‌عنوان شاخصی از پیری محسوب می‌گردد (Zahran, 1999)؛ با توجه به مطالب ذکرشده مشخص شد که شوری می‌تواند بر روی کارایی همزیستی باکتری ریزوبیومی اثر منفی داشته باشد؛ اما در این تحقیق دیده شد که استفاده از باکتری‌های غیر ریزوبیومی ساکن گره که مقاوم به شوری هستند، می‌تواند در کاهش تنش وارده به یونجه مؤثر باشد. به‌طورکلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که گره‌های یونجه رشد کرده در خاک شور می‌تواند یک منبع مفیدی برای جداسازی باکتری‌های غیر ریزوبیومی مقاوم به شوری و محرک رشد گیاه باشد که استفاده از چنین باکتری‌هایی می‌تواند در بهره‌وری بهتر مزارع دارای خاک شور به جهت کشت گیاهان یونجه مفید باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

گره‌های گیاهان یونجه کشت‌شده در خاک‌های شور منبع مناسبی از باکتری‌های همزیست و غیر همزیست مقاوم به شوری و محرک رشد گیاه است. این باکتری‌ها از طریق توسعه ریشه گیاهان، تثبیت نیتروژن، انحلال فسفات‌های آلی و معدنی می‌توانند باعث بهبود رشد گیاهان یونجه تحت تنش شوری شوند. همچنین نتایج این مطالعه نشان داد که PGPRهای متحمل به شوری جداشده از گره‌های ریشه گیاهان یونجه کشت‌شده در خاک شور، می‌توانند نقش مهم و معنی‌داری در افزایش وزن خشک و بهبود تحمل یونجه به تنش شوری در حضور و عدم حضور باکتری‌های ریزوبیومی همزیست با گیاه یونجه (*S. meliloti*) داشته باشند.

منابع

Almeida Lopes, K. B., Carpentieri-Pipolo, V., Oro, T. H., Stefani Pagliosa, E., Degrassi, G., 2016. Culturable endophytic bacterial communities associated with field-grown soybean. Journal of Applied Microbiology, 120(3), 740-755.

Baha, N., Bekki, A., 2015. An approach of improving plant salt tolerance of Lucerne

(*Medicago sativa*) grown under salt stress: use of Bio-inoculants. Journal of Plant Growth Regulation. 34(1), 169-182.

Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D., 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil. 39(1), 205-207.

Beck, D.P., Materon, L.A., Afandi, F., 1993. Practical Rhizobium-legume technology manual. Technical Manual. International Center for Agricultural Research in the Dry Areas ICARDA), No.19, 389p.

Berg, G., Alavi, M., Schmidt, C.S., Zachow, C., Egamberdieva, D., Kamilova, F., Lugtenberg, B. J., 2013. Biocontrol and osmoprotection for plants under salinated conditions. Molecular Microbial Ecology of the Rhizosphere. 1, 561-573.

Bhattacharyya, P.N., Jha, D.K., 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 28(4), 1327-1350.

Chimwamurombe, P.M., Grönemeyer, J.L., Reinhold-Hurek, B., 2016. Isolation and characterization of culturable seed-associated bacterial endophytes from gnotobiotically grown Marama bean seedlings. FEMS Microbiology Ecology. 92(6), fiw083

Damodaran, T., Rai, R.B., Jha, S.K., Kannan, R., Pandey, B.K., Sah, V., Sharma, D.K., 2014. Rhizosphere and endophytic bacteria for induction of salt tolerance in gladiolus grown in sodic soils. Journal of Plant Interactions. 9(1), 577-584.

Dilfuza, E., 2011. Indole-acetic acid production by root associated bacteria and its role in plant growth and development. In: Keller, A.H., Fallon, M.D. (eds.), Auxins: Structure, Biosynthesis and Functions. Nova Science Publishers, Inc., USA.

Döbereiner, J., 1989. Isolation and identification of root associated diazotrophs. In: Skinner, F.A., Boddey, R.M., Fendrik, I. (eds.), Nitrogen Fixation with Non-Legumes. Developments in Plant and Soil Sciences, vol 35. Springer, Dordrecht

Dobermann, A., 2007. Nutrient use efficiency. Measurement and management. In: Kraus, A., Isherwood, K. and Heffer, P. (eds.), Fertilizers Best Management Practices. Proceeding of International fertilizer Industry Association, Brussels, Belgium, 7-9 March 2007, 1-22.

Edwards, U., Rogall, T., Blöcker, H., Emde, M., Böttger, E. C., 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Aacids Research, 17(19), 7843-7853.

Egamberdieva, D., Kucharova, Z., 2009. Selection for root colonising bacteria stimulating wheat growth in saline soils. Biology and Fertility of Soils. 45(6), 563-571.

El-Akhal, M.R., Rincón, A., Coba de la Peña, T., Lucas, M.M., El Mourabit, N., Barrijal, S., Pueyo, J.J., 2013. Effects of salt stress and rhizobial inoculation on growth and nitrogen fixation of three peanut cultivars. Plant Biology. 15(2), 415-421.

Elkoca, E., Kantar, F., Sahin, F., 2007. Influence of nitrogen fixing and phosphorus solubilizing bacteria on the nodulation, plant growth, and yield of chickpea. Journal of Plant Nutrition. 31(1), 157-171.

Etesami, H., Alikhani, H.A., 2016. Rhizosphere and endorhiza of oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant harbor bacteria with multifaceted beneficial effects. Biological Control. 94, 11-24.

Fazaeli, A., Besharati, H., 2012. Effect of salinity on some growth indices and total protein content of alfalfa genotypes inoculated with Sinorhizobium meliloti strains under greenhouse conditions. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture. 3(9), 25-38. [In Persian with English summary].

Glick, B.R., Penrose, D.M., Li, J., 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. Journal of Theoretical Biology. 190(1), 63-68.

Glick, B.R., Todorovic, B., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., McConkey, B., 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. Critical Reviews in Plant Sciences. 26(5-6), 227-242.

Gordon, S.A., Weber, R.P., 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. Plant Physiology. 26(1), 192.

Kandowangko, N.Y., Suryatmana, G., Nurlaeny, N., Simanungkalit, R.D.M., 2009. Proline and abscisic acid content in droughted corn plant inoculated with Azospirillum sp. and Arbuscular mycorrhizae fungi. HAYATI Journal of Biosciences. 16(1), 15-20.

Khalifa, A.Y., Alsyeeh, A.M., Almalki, M.A., Saleh, F.A., 2016. Characterization of the plant growth promoting bacterium, Enterobacter cloacae MSR1, isolated from roots of non-nodulating *Medicago sativa*. Saudi Journal of Biological Sciences. 23(1), 79-86.

Khan, M. S., Zaidi, A., Wani, P. A., 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture—a review. Agronomy for Sustainable Development. 27(1), 29-43.

Korir, H., Mungai, N.W., Thuita, M., Hamba, Y., Masso, C., 2017. Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. Frontiers in Plant Science. 8, 141.

Ladha J.K., Barraquio W.L., Revilla L. (1997) Isolation of endophytic diazotrophic bacteria from wetland rice. In: Ladha, J.K., de Bruijn, F.J., Malik, K.A. (eds.), Opportunities for Biological Nitrogen Fixation in Rice and Other Non-Legumes. Developments in Plant and Soil Sciences, vol 75. Springer, Dordrecht

Lai, W.A., Hameed, A., Lin, S.Y., Hung, M.H., Hsu, Y.H., Liu, Y.C., Young, C.C., 2015. Paenibacillus medicaginis sp. nov. a chitinolytic endophyte isolated from a root nodule of alfalfa (*Medicago sativa* L.). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 65(11), 3853-3860.

Maas, E. V., Hoffman, G. J., 1977. Crop salt tolerance–current assessment. Journal of the Irrigation and Drainage Division. 103(2), 115-134.

Mapelli, F., Marasco, R., Rolli, E., Barbato, M., Cherif, H., Guesmi, A., Borin, S., 2013. Potential for plant growth promotion of rhizobacteria associated with Salicornia growing in Tunisian hypersaline soils. BioMed Research International. Article ID 248078.

Martínez-Hidalgo, P., Hirsch, A.M., 2017. The nodule microbiome: N2-fixing rhizobia do not live alone. Phytobiomes. 1(2), 70-82.

Marulanda, A., Barea, J.M., Azcón, R., 2009. Stimulation of plant growth and drought tolerance by native microorganisms (AM fungi and bacteria) from dry environments: mechanisms related to bacterial effectiveness. Journal of Plant Growth Regulation. 28(2), 115-124.

Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology. 59, 651-681.

Nadeem, S.M., Zahir, Z.A., Naveed, M., Arshad, M., 2009. Rhizobacteria containing ACC-deaminase confer salt tolerance in maize grown on salt-affected fields. Canadian Journal of Microbiology. 55(11), 1302-1309.

Ofek, M., Ruppel, S., Waisel, Y., 2006. Effects of salinity on rhizosphere bacterial communities associated with different root types of *Vicia faba* L.. In: Öztürk, M., Waisel, Y., Khan, M.A., Görk, G. (eds), Biosaline Agriculture and Salinity Tolerance in Plants. Birkhäuser Basel.

Okalebo, J. R., Gathua, K. W., Woomer, P. L., 2002. Laboratory methods of soil and plant analysis: a working manual second edition. TSBFCIAT and SACRED Africa. Nairobi, Kenya.

Paul, D., Nair, S., 2008. Stress adaptations in a plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) with increasing salinity in the coastal agricultural soils. Journal of Basic Microbiology. 48(5), 378-384.

Putnam, D., Russelle, M., Orloff, S., Kuhn, J., Fitzhugh, L., Godfrey, L., Long, R., 2001. Alfalfa, wildlife and the environment. California Alfalfa and Forage Association, Novato, CA. Available at Web site: http://www.calhay.org/environmental.html (verified 3 January 2007).

Rajendran, G., Sing, F., Desai, A.J., Archana, G., 2008. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. Bioresource Technology. 99(11), 4544-4550.

Rajput, L. U. B. N. A., Imran, A., Mubeen, F. A. T. H. I. A., Hafeez, F. Y., 2013. Salt-tolerant PGPR strain Planococcus rifietoensis promotes the growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in saline soil. Pakistan Journal of Botany. 45(6), 1955-1962.

Rodríguez, H., Fraga, R., 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances. 17(4-5), 319-339.

Shintu, P.V., Jayaram, K.M., 2015. Phosphate solubilising bacteria (*Bacillus polymyxa*)-An effective approach to mitigate drought in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Tropical Plant Research. 2, 17-22.

Shrivastava, P., Kumar, R., 2015. Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. Saudi Journal of Biological Sciences. 22(2), 123-131.

Sivaramaiah, N., Malik, D.K., Sindhu, S.S., 2007. Improvement in symbiotic efficiency of chickpea (*Cicer arietinum*) by coinoculation of Bacillus strains with Mesorhizobium sp. Cicer. Indian Journal of Microbiology. 47(1), 51-56.

Sperber, J.I., 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Australian Journal of Agricultural Research. 9(6), 782-787.

Sridevi, M., Mallaiah, K.V., Arnow, L.E., Atkin, C.L., Neilands, J.B., Phaff, H.J., Fletcher, G., 1937. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. International Journal of Soil Science. 3(1), 531-535.

Stajković, O., De Meyer, S., Miličić, B., Willems, A., 2009. Isolation and characterization of endophytic non-rhizobial bacteria from root nodules of alfalfa (*Medicago sativa* L.). Botanica Serbica. 33(1), 107-114.

Szabados, L., Savoure, A., 2010. Proline: a multifunctional amino acid. Trends in Plant Science. 15(2), 89-97.

Tawfik, K.M., 2008. Evaluating the use of rhizobacterin on cowpea plants grown under salt stress. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 4(1), 26-33.

Tejera, N.A., Soussi, M., Lluch, C., 2006. Physiological and nutritional indicators of tolerance to salinity in chickpea plants growing under symbiotic conditions. Environmental and Experimental Botany. 58(1-3), 17-24.

Upadhyay, S.K., Singh, D.P., 2015. Effect of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria on wheat plants and soil health in a saline environment. Plant Biology. 17(1), 288-293.

Vincent, J.M., 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. Oxford, Blackwell, 164p.

Yarnia, M., Heydari, H., Sharif Abad, F., Rahim Zadeh Khui, 2005. Effect of carbonat calcium on tolerance to salinity in alfalfa figures. Agroecological Journal (Journal in Agriculture Knowledge). 2, 9-21. [In Persian with English summary].

Younesi, O., Poustini, K., Chaichi, M.R., Pourbabaie, A.A., 2012. Effect of Growth Promoting Rhizobacteria on germination and early growth of two alfalfa cultivars under salinity stress condition. Jornal of Crops Improvement. 14, 83-97. [In Persian with English summary].

Zahran, H.H., 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 63(4), 968-989.