"نشریه علوم و فناوری بذر ایران"
جلد هشتم، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۸
(ص ۱۸۷-۱۷۳)
مقاله پژوهشی

Iranian Journal of
Seed Science and Technology
Vol.: 8, No.: 2, Autumn and Winter 2020
(pp: 173-187)
DOI: 10.22034/ijsst.2019.122512.1214
Research Article

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[1]، علی عباسی سورکی[2]*، شهرام کیانی[3] و محسن مبینی دهکردی[4]

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 *Acinetrobacter calcoaceticus* PTCC 1318، *Bacillus megaterium* PTCC 1250، *Enterobacter aerogenes* PTCC 1221 بصورت منفرد و کاربرد توام دوگانه 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 بنیه 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 Alikooyi[1], A. Abbasi Sourki[2], Sh. Kiyani[3], M. Mobini Dehkordi[4]

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. میکروارگانیسم‌های خاک نقش مهمی در مدیریت مواد مغذی و تنوع زیستی خاک داشته و با تأثیر بر فیزیولوژی و توسعه‌ی 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 میکروارگانیسم‌های 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 تاثیر قرار دهند (Sivasakthi *et al.*, 2013). گروهی از میگروارگانیسم‌ها نیز حل کننده 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 تنظیم کننده‌های 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، تاثیر 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 تجزیه کننده دیواره سلولی قارچ‌ها مانند کیتیناز و β-3,1 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). PGPR ها تاثیر مثبت بر اکوسیستم دارند، ثبات و بهره‌وری

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 لوبیا (*Phaseolus vulgaris* L.) را افزایش داد (Stajkovic *et al.*, 2011). همین طور 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 دآمیناز، 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* PtB01 و *Bacillus methylotrophicus* PtB24 توانایی تولید ایندول استیک اسید و ACC دآمیناز 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 استقرارمطلوب 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 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 *Acinetrobacter 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* + *B. megaterium*، *A. calcoaceticus* + *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

۱۲۱ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Sadiq *et al.*, 2013).

۳-فعال‌سازی و کشت باکتری‌ها: به منظور فعال‌سازی باکتری‌ها و اطمینان از خلوص آن‌ها از محیط TSA استفاده شد. باکتری‌ها در زیر هود توسط سمپلر به محیط کشت داخل پتری انتقال یافتند. پتری‌ها به درون انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. کلونی‌ها روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. تولید کلونی‌های هم‌شکل و هم‌رنگ و اندازه نشان دهنده خلوص باکتری است (Tamilarasi *et al.*, 2008).

٤- تهیه مایع تلقیح باکتریایی: پس از حصول اطمینان از خلوص باکتری‌ها با بررسی میکروسکوپی و رنگ‌آمیزی گرم، کشت خطی باکتری‌ها انجام و پتری‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. سپس کلونی‌های خالص جدا و به محیط TSB منتقل و در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و دور rpm ۱۵۰ 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 اسپکتروفوتومتر 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 فالکون 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.

٦-آماده‌سازی 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 میلی‌لیتر مایه تلقیح باکتریایی استفاده و جهت تماس باکتری به بذر، از صمغ عربی ۱۰ درصد استفاده شد که بذرها به مدت ۳۰ دقیقه تیمار شدند. مدت زمان تلقیح ۳۰ دقیقه بود. ۴ تکرار ۲۵ تایی بذر داخل پتری هایی با قطر ۸ سانتی‌متر و در ژرمیناتور با دمای ثابت ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (ISTA, 2011). شمارش بذرها روزانه انجام شد و پس از گذشت ۱۰ روز پارامترهای درصد و سرعت جوانه‌زنی، طول ساقه‌چه و ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه و ریشه‌چه (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 جوانه‌زنی (Afrakhteh *et al.*, 2013):

GP=(تعداد کل بذرها / تعداد بذر جوانه زده) × ۱۰۰

رابطه (۲) سرعت جوانه‌زنی (Kalsa and Abebie, 2012):

$$GR= \sum (G_t / D_t)$$

G_t: تعداد بذور جوانه‌زده در روز tام و D_t: تعداد روزها پس از کاشت.

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

VI I = GP × (میانگین طول گیاهچه (cm

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

VI II = GP × (میانگین وزن گیاهچه (mg

کلروفیل و کاروتنوئید برگ: ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت تازه‌ی برگ وزن و به قطعات کوچک‌تر 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 میلی‌لیتر رسانده و شدت جذب عصاره برگ با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج‌های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر قرائت شد و غلظت کلروفیل و کاروتنوئید با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه شدند:

رابطه (۵) کلروفیل a (Arnon, 1949):

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

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):

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

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 کاملا 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 سانتی‌متری عبور داده و با گاز متیل بروماید ضدعفونی شد. از گلدان‌هایی با ارتفاع و قطر ۲۰ سانتی‌متر 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 زیرگلدانی استفاده شد. بذرها همان گونه که در بخش آزمایشگاهی ذکر شد با باکتری تلقیح شدند. سپس بذرها در عمق ۱-۰/۵ سانتی‌متری در گلدان کشت شدند. گلدان‌ها از اول آبان تا اول دی سال ۱۳۹۶ در دمای ۲۵-۱۹ 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 میلی‌لیتر 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 بذرهای یونجه در سطح احتمال ۵ درصد تحت تاثیر حضور باکتری قرار گرفت (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد بذرهای یونجه تلقیح شده با *انتروباکتر* 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)، سایتوکنین و اسید آبسیزیک توسط باکتری *Bacillus aryabhattai* strain SR02 (Park *et al.*, 2017) می‌تواند دلیل افزایش جوانه‌زنی بذرهای 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 سنتز 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

خاک را به فرم قابل دسترس برای گیاه تبدیل می‌کند (Kang *et al.*, 2009). استفاده از باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* Pf1 و *Bacillus subtilis* نیز باعث افزایش جوانه‌زنی و بنیه در بذرهای 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 ساقه‌چه Plumule length	طول ریشه‌چه Radicle length	وزن خشک ساقه‌چه Plumule dry weight	وزن خشک ریشه‌چه Radicle dry weight	شاخص بنیهI Vigour index I	شاخص بنیهII 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}
تلقیح 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 پیش‌تیمار 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 بنیهII Vigour Index II (mg/g)
شاهد Control	96^{abc}	20.51^{b}	1.6^{cd}
Acinetrobacter	98^{ab}	20.01^{b}	1.817^{ab}
Bacillus	96^{abc}	21.53^{a}	1.675^{bcd}
Enterobacter	100^{a}	21.52^{a}	1.688^{abc}
Acinetrobacter+ Bacillus	100^{a}	21.86^{a}	1.868^{a}
Acinetrobacter+ Enterobacter	93^{bc}	20^{b}	1.505^{d}
Bacillus+ Enterobacter	92^{c}	20^{b}	1.65^{bcd}
Acinetrobacter+ Bacillus+ Enterobacter	95^{abc}	20.03^{b}	1.597^{cd}

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.

سرعت جوانه‌زنی: اثر تیمار باکتریایی بر سرعت جوانه‌زنی بذرهای یونجه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۱). مقایسه میانگین‌ها نشان داد بالاترین میزان سرعت مربوط به کاربرد منفرد *باسیلوس* و *انتروباکتر* و کاربرد دوتایی *آسینتروباکتر* + *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 *آسینتروباکتر* + *باسیلوس* و کاربرد منفرد *آسینتروباکتر* به ترتیب با افزایش ۱۶/۷۵ و ۱۳/۵۶ درصدی نسبت به شاهد بود. سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری با شاهد نداشتند (جدول ۲). در ذرت نیز استفاده از باکتری‌های *Bacillus megaterium* و *Bacillus mucilaginous* 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 درگیاه گوجه فرنگی (*Solanum lycopersicum* L. Wanza 15) شد (Zhang *et al.*, 2017).

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).

۲-۱اثر 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 بذرهای یونجه معنی‌دار شد اما تزریق باکتری پای گیاهچه اثر بهتری را نسبت به تلقیح نشان نداد و اثر متقابل نیز معنی‌دار نشد (جدول ۳). طبق نتایج مقایسه میانگین کاربرد باکتری *آسینتروباکتر* در تلقیح با بذرهای یونجه سبب افزایش ۱۱/۲۱ درصدی سبز شدن بذرها در گلدان گردید. کاربرد *باسیلوس* و کاربرد تلفیقی *آسینتروباکتر* + *انتروباکتر* نیز افزایش ۶/۵۸ درصدی ظهور گیاهچه را سبب شدند اما دیگر تیمارهای باکتریایی تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشتند (جدول ۴). افزایش درصد سبز شدن ممکن است مربوط به توانایی تولید ایندول استیک اسید توسط باکتری‌ها باشد. برای مثال تساوکلووا و همکاران (Tsavkelova *et al.*, 2007) گزارش کردند IAA با منشا 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 و 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 تولید ایندول استیک اسید را توسط باکتری‌های

Acinetobacter sp. PUCM1007 و *A. baumannii* 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 سبزشدن 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 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 معنی‌دارشد 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).

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	درجه آزادی df	درصد سبزشدن Emergence Percentage	سرعت سبزشدن 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	کاروتنویید 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**	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 معنی داری، معنی داری 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 سبزشدن Emergence (%)	سرعت سبزشدن Emergence Rate(1/day)	وزن خشک ساقه Shoot Dry Weight(g)	طول ریشه Root Length(cm)	حجم ریشه Root Volume(cm^3)	کلروفیل a Chlorophyll a(mg/g)	کلروفیل b Chlorophyll 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}
Acinetrobacter	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}
Bacillus	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}
Enterobacter	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}
Acinetrobacter+ Bacillus	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}
Acinetrobacter+ Enterobacter	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}
Bacillus+ Enterobacter	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}
Acinetrobacter+ Bacillus+ Enterobacter	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.

کاربرد باکتری *Bacillus* PSB 24 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 دآمیناز، 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

مثال می‌توان به تزریق *باسیلوس* و تزریق تلفیقی *آسینتروباکتر +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، 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).

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}
	Acinetrobacter	0.278^{c-e}	24^{a}
	Bacillus	0.295^{bc}	23.36^{ab}
	Enterobacter	0.287^{c-e}	23.43^{ab}
	Acinetrobacter+ Bacillus	0.267^{ef}	23.1^{a-c}
	Acinetrobacter+ Enterobacter	0.272^{d-f}	22.66^{a-c}
	Bacillus+ Enterobacter	0.25^{f}	20.33^{d}
	Acinetrobacter+ Bacillus+ Enterobacter	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}
	Acinetrobacter	0.269^{ef}	21.6^{b-d}
	Bacillus	0.327^{a}	22.1^{a-d}
	Enterobacter	0.266^{ef}	23.06^{a-c}
	Acinetrobacter+ Bacillus	0.267^{ef}	21.75^{b-d}
	Acinetrobacter+ Enterobacter	0.309^{ab}	21.28^{cd}
	Bacillus+ Enterobacter	0.294^{b-d}	24^{a}
	Acinetrobacter+ Bacillus+ Enterobacter	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.

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 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

ریشه گیاه یونجه مربوط به کاربرد باکتری *باسیلوس* بود که افزایش ۱۹/۰۷ درصدی نسبت به شاهد نشان داد. پس از آن کاربرد باکتری *آسینتروباکتر + باسیلوس* و *آسینتروباکتر + انتروباکتر* به ترتیب افزایش ۱۴/۹۴ و ۱۲/۳۷ درصدی داشتند. سایر تیمارهای باکتریایی اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان ندادند (جدول ۴). باکتری *Bacillus methylotrophicus* M4-96 ترکیبات زیستی فعال مانند کتون، الکل و آلدهید تولید کرده که محتوای اکسین گیاه را افزایش و سبب تحریک رشد، تولید اندام جدید و مورفوژنز 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 دآمیناز 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.

طول ریشه: کاربرد تیمارهای تلقیح باکتریایی در سطح احتمال ۵ درصد بر صفت طول ریشه معنی‌دار شد اما تزریق باکتری پای گیاهچه و اثر متقابل این دو معنی‌دار نشد (جدول ۳). مقایسه میانگین‌ها نشان داد تیمار شاهد طول ریشه بالایی داشته و با دیگر تیمارهای باکتریایی بجز *آسینتروباکتر + باسیلوس* و تیمار *آسینتروباکتر + انتروباکتر* اختلاف نداشت (جدول ۴). از آن جایی که حجم ریشه و وزن خشک ریشه در شاهد کم‌تر از سایر تیمارها بود اما طول ریشه در شاهد بیشتر از بقیه شد می‌توان این‌گونه استدلال کرد که باکتری‌ها با تولید ایندول استیک اسید سبب گسترش ریشه‌های جانبی و احتمالا سبب بهبود جذب عناصر شده‌اند. تولید ایندول استیک اسید و فعالیت ۱-آمینوسیکلوپروپان کربوکسیلات دآمیناز توسط باکتری *Bacillus megaterium* گزارش شد (Chinnaswamy *et al.*, 2018). باکتری *Acinetobacter calcoaceticus* DD161 با توانایی تولید ایندول استیک اسید و سیدروفور سبب بهبود رشد گیاهچه‌های سویا (*Glycine max* L.) شد (Zhao *et al.*, 2018). بر اساس مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد *Enterobacter cloacae* CAL2 سبب تحریک رشد گیاه از طریق فعالیت آنزیم ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات (ACC) دآمیناز می‌شود که باعث کاهش سطوح اتیلن و تولید ریشه‌های بلند می‌گردد (Shah *et al.*, 1998).

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* و *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،

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).

نتیجه‌گیری

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 *انتروباکتر* 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 CO_2 و در نهایت رشد گیاه را تحت تاثیر قرار خواهد داد.

منابع

Reference

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

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*) rhizoplane 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. *Acinetrobacter 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 bahm (*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 aryabhattai* 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. Crecchio. 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 altitudinis* 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.