نشریه فیزیولوژی محیطی گیاهی، سال یازدهم، شماره ۴۱، بهار ۱۳۹۵ / صفحات: ۴۰-۲۶

ارزیابی کارایی باکتری *Azospirillum* در تلقیح جداگانه و در ترکیب با باکتری حل کننده فسفات *Bacillus megaterium* بر کاهش اثر تنش شوری در گیاه ماش (*Vigna radiata* L.)

نصرت‌اله عباسی[۲]، جلال جلیلیان[۲]، محمدجواد زارع*[۱]

[۱] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه ایلام، ایران

[۲] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ایران

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۲/۷

چکیده

امروزه یکی از بزرگترین نگرانی‌های زراعت در مناطق خشک افزایش وسعت و میزان شوری اراضی کشاورزی است. در تحقیق حاضر تاثیر کاربرد باکتری جنس *Azospirillum* در تلقیح به تنهایی و نیز در ترکیب با باکتریهای حل کننده فسفات بر کاهش تنش شوری بر گیاه ماش رقم گوهر تحت شرایط مزرعه طی دو سال مورد بررسی قرار گرفت. طرح آزمایشی فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار بود. عامل‌های اصلی شامل تیمارهای کاربرد سویه‌های مختلف *Azospirillu*، باکتری‌های حل کننده فسفات (*Bacillus megaterium*) در تلقیح جداگانه و توامان با یکدیگر و نیز عدم تلقیح به‌عنوان شاهد و اعمال شوری آب آبیاری در دو سطح عدم اعمال شوری و شوری آب آبیاری به میزان ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر بود. نتایج نهایی تجزیه مرکب در مورد اثر اعمال شوری و نیز کاربرد کودهای زیستی نشان‌دهنده تاثیر معنی‌دار آنها بر عملکرد دانه ماش بود. شوری موجب کاهش ۸۸ درصدی عملکرد نهایی دانه ماش گردید. تحت تنش شوری و نیز عدم اعمال شوری، بالاترین عملکرد دانه، تعداد دانه و وزن دانه را گیاهانی داشتند که بذر آنها با باکتری *Azospirillu* به تنهایی تلقیح گردیده بودند. کمترین محتوای سدیم و پتاسیم و بالاترین محتوای فسفر دانه در گیاهان تلقیح شده با باکتری *Azospirillu* مشاهده شد. نتایج تحقیق نشان داد تلقیح دوگانه *Azospirillu* با *Bacillus megaterium* منجر به افزایش کارایی باکتری *Azospirillu* در بهبود رشد گیاه ماش تحت شرایط شور و غیر شور نگردید. نتایج کلی این آزمایش نشان‌دهنده قابلیت به کارگیری *Azospirillu* در زراعت تحت شوری ماش بود هر چند تلفیق آن با باکتری *Bacillus megaterium* منجر به سودمندی بیشتری در این خصوص نگردید.

واژه‌های کلیدی: جذب عناصر، شوری، عملکرد، کود زیستی، ماش

مقدمه

از بزرگترین نگرانی‌های حال و آینده زراعت در مناطق خشک، شوری است که در پی کاهش بارندگی اخیر چند ساله موجب شده غلظت میزان نمک و نیز وسعت اراضی شور افزوده گردد. بیش از ۹۰۰ میلیون هکتار از اراضی جهان تحت تأثیر شوری قرار دارد که تقریباً معادل ۲۰ درصد خاک‌های تحت کشت است (Zarea et al., 2015). براساس گزارش فائو (۲۰۰۰) در مناطقی که مشکل شوری آب و خاک زراعی مطرح است شوری موجب کاهش ۱۰ تا ٦۰ درصد در عملکرد محصولات گیاهان زراعی می‌گردد (Karimi, 2012). عدم جذب برخی از عناصر مانند فسفر و

*مسئول مکاتبه: mj.zarea@ilam.ac.ir

نیتروژن به میزان کافی و جذب زیاد برخی عناصر مانند سدیم و کلر از عواقب سوء شوری بر گیاه است (Zarea et al., 2013 a,b). شوری موجب زوال محتوای کلروفیل شده و به سبب تولید انواع اکسیژن فعال تخریب اجزاء سلولی را تخریب می‌کند (Zarea et al., 2015).

استفاده از زیست فن‌آوری‌های نوین مانند کاربرد میکروارگانیسم‌ها در تولید گیاهان زراعی تحت شرایط شور از راه‌کارهای نوین جهت مقابله با تنش شوری است (Zarea and Karimi, 2014). کودهای زیستی به عنوان جایگزین و در اکثر موارد به‌عنوان مکمل کودهای شیمیایی می‌توانند سبب بهبود رشد و فرایندهای فیزیولوژیکی گیاهان گردند (Siahmargue et al., 2014). باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه گروهی از باکتری‌های ریزوسفری مفید می‌باشند که می‌توانند به طور مستقیم (تثبیت نیتروژن، تولید مواد تنظیم کنندهٔ رشد گیاه، افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی مختلف برای گیاه، تولید ویتامین‌ها و دیگر مواد محرک رشد گیاه) و یا غیر مستقیم (تولید آنتی بیوتیک، تخلیه ریزوسفر از آهن، رقابت با گونه-های مضر برای اشغال ریشه، تولید آنزیم‌های لیز کننده دیواره سلولی قارچهای بیماریزای گیاهی، ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاه و افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های غیرزنده) موجب افزایش رشد گیاه شوند (Bashan et al., 2004).

دو جنس از مهمترین ریزوباکترهای القاء کننده رشد گیاهان باکتری‌های متعلق به جنس *Azospirillum* و *Azotobacter* است که مایه تلقیح آن‌ها به صورت گسترده‌تری و نیز در مورد گیاهان مهم زراعی و نیز غلات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Bashan and Levanony, 1990; Bashan and Holguin, 1997). گزارش شده است که تلقیح گیاه نخود با *Azospirillum* موجب رشد بهتر آن تحت آبیاری با آب شور گردید (Hamaoui et al., 2001). همچنین در خصوص گیاه باقلا نیز چنین روند بهبودی در رشد تحت آبیاری با آب شور به دنبال تلقیح با *Azospirillum* مشاهد شد (Hamaoui et al., 2001). تحمل بهتر گندم به شوری آب آبیاری درنتیجه تلقیح آن با *Azospirillum* نیز گزارش شده است (Zarea et al., 2012). عنوان شده است حفظ محتوای کلروفیل و افزایش محتوای پرولین علت رشد بهتر گندم تلقیح شده با *Azospirillum* تحت شوری است (Zarea et al., 2012). مطالعات نشان داده است *Azospirillum* از طریق افزایش معنی‌دار محتوای کلروفیل، پتاسیم، کلسیم، قندهای محلول و نیز محتوای پروتئین موجب رشد بهتر ذرت تحت شوری ناشی از کلریدکلسیم گردید (Hamdia and El-Komy, 1997). گزارش شده است که تلقیح گیاهچه‌های گندم با *A. brasilens* موجب کاهش اثر سوء شوری و نیز تنش اسمزی گردید و گیاهچه‌های تلقیح شده از ارتفاع بخش هوایی بیشتری در مقایسه با گیاهان کنترل برخوردار بودند (Creus et al., 1997). تحقیقات نشان داده است گیاهان تحت شوری تحت دو اثر تنش اسمزی ناشی از غلظت بالای عناصر و نیز تحت اثر ویژه یونی قرار می‌گیرند (Tarakcioglu and Inal, 2002). اثر متقابل شوری و دیگر عناصر، مسئول اثر بازدارنگی کلرید سدیم بر رشد و عملکرد گیاه بیان شده است (Pardossi et al., 1999). گزارش شده است باکتری *Azospirillum* موجب محدودیت در جذب سدیم به داخل ریشه می‌گردد و بنابراین از این طریق موجب تجمع سدیم در بافت‌های گیاه خواهد شد (Ashraf et al., 2004).

همچنین گزارش شده که *Azospirillum* می‌تواند موجب تجمع پرولین و گلوتامات در پاسخ به کلرید سدیم در گیاه گردد (Bashan and Holguin, 1997). نشان داده شد که *Azospirillum* تجمع پرولین در گیاه

ذرت را تحت شرایط تنش اسمزی، افزایش داد (Casanovas et al., 2003).

از دیگر باکتری‌های محرک رشد گیاه، باکتری‌های حل کننده فسفات است که می‌توانند به عنوان یک منبع قابل اعتماد و به‌عنوان یک کود زیستی در کشاورزی استفاده گردند (Kucey, 1983). بسیاری از باکتری‌های ریزوسفری، توانایی حل کنندگی فسفات را دارا هستند که از بین آنها باکتری‌های جنس *Bacillus* توانایی بیشتری در حلالیت فسفات را دارا است (Cherif-Silini et al., 2013). همچنین باکتری‌های حل کننده فسفات متعلق به جنس سودوموناس نیز از این نظر بسیار کارآمد عنوان شده‌اند (Tilak et al., 2005). اما توانایی این باکتری‌ها تحت شوری کاهش می‌یابد (Cherif-Silini et al., 2013) و این در حالی است که اغلب خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک شور هستند (Kumar and Narula, 1999) و در این خاک‌ها محدودیت جذب فسفر اتفاق می‌افتد (Grattan and Grieve, 1999). گزارش شد که باکتری‌های حل کننده فسفات از طریق تولید هورمون رشد اکسین نیز رشد گیاه را افزایش می‌دهد (Souchie et al., 2007). چنین توانایی القاء کنندگی رشد در سایر جنس‌های باکتری‌های ریزوباکتر نیز گزارش گردید (Somers et al., 2004). هر چند کاربرد *Azospirillum* و توانایی آن در افزایش رشد گیاه تحت شرایط محیطی متفاوت کاملا مشخص گردیده است اما نتایج مزرعه‌ای در ارتباط با کاربرد آن روند یکسانی را نداشته (Blaha and Schrank, 2003) و فقط ٦٠ تا ٧٠ درصد افزایش معنی‌دار در نتیجه کاربرد این باکتری در طی یک دوره بیست ساله حاصل شد (Okon and Laberandera-Gonzalez, 1994). در پی چنین گزارشاتی کاربرد این باکتری و در مخلوط با سایر جنس‌های باکتری پیشنهاد گردید (Bashan and Holguin, 1997).

کاربرد توامان دو باکتری در حقیقت کاربرد مخلوط مایه تلقیح (اینکولوم) دو باکتری است که دارای رابطه افزایندگی مثبت می‌باشند و یا روابط آنها از نوع سینرژیسمی است (Bashan et al., 2004). بنابراین با توجه به مطالب فوق در این تحقیق کاربرد جداگانه و توامان *Azospirillum* با باکتری حل کننده فسفات (*Bacillus megaterium*). مورد بررسی قرار گرفت تا تاثیر آن در کاهش اثر شوری در کاربرد جداگانه و توام برعملکرد نهایی و اجزا عملکرد دانه ماش و نیز جذب عناصر سدیم و پتاسیم مشخص گردد.

مواد و روش‌ها

طرح آزمایش: آزمایش تعیین اثر باکتری‌های *Azospirillum* و *Bacillus megaterium* بر عملکرد و جذب برخی از عناصر گیاه ماش تحت شوری در مزرعه آموزشی- تحقیقاتی دانشکده کشاورزی ایلام در تابستان سال‌های ١٣٩١ و ١٣٩٢ با طول جغرافیایی ٢٨ درجه و ٤٦ دقیقه و عرض جغرافیایی ٢٧ درجه و ٣٣ دقیقه و ارتفاع ١١٧٤ متر از سطح دریا و میانگین بارندگی سالیانه ٦٦١ میلی‌متر اجرا گردید. بافت خاک مکان آزمایش لومی رسی، با محتوای نیتروژن کل ٠/١٧ درصد، فسفر ٧/٥ پی‌پی‌ام، اسیدیته ٧/٢ و ماده آلی ١/٧٧ درصد بود. بذر ماش (*Vigna radiata* L.) رقم گوهر از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید. آزمایش در دو سال متوالی در فصل تابستان تحت آبیاری با آب شور و غیر شور مورد بررسی قرار گرفت. شروع آزمایش در اوایل مرداد ماه و برداشت ماش در هر دو سال آزمایش در اوایل مهرماه بود. آزمایش ترکیبی از دو فاکتور اصلی کود زیستی و شوری آب آبیاری بود. جدول ١ تیمارهای آزمایش را نشان می‌دهد. در سال دوم آزمایش همان تیمارهای قبلی در پلات‌ها اعمال گردیدند. هر پلات آزمایشی از ٦ ردیف کشت با طول ٣ متر بود. فاصله بین ردیف-

های کشت ۵۰ سانتی‌متر و تراکم کشت ۳۳ بوته در مترمربع بود. فاصله دور آبیاری ۵ روز و میزان آبی که وارد هر پلات می شد در حدود ۲/۶۳ مترمکعب در هر بار آبیاری بود. در این آزمایش از آب آبیاری با دو سطح شوری ۰/۲ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر استفاده گردید. آبیاری با آب شور در طول دوره رشد اعمال گردید. از آب معمولی با شوری ۰/۲ دسی‌زیمنس بر متر به‌عنوان شاهد و برای سایر تیمارها از کلرید سدیم جهت اعمال شوری استفاده گردید. در مزرعه با استفاده از یکسری تانک‌های مخصوص نسبت به تهیه محلول نمک با شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر اقدام و سپس کنترل شده و به طور یکسان پلات های تحت شوری با این آب آبیاری شدند. پلات‌های شاهد نیز به صورت هم حجم در طول دوره رشد با آب معمولی آبیاری شدند.

جدول ۱: تیمارهای آزمایش

میکروارگانیسم	سطح شوری
Az: تلقیح با باکتری *Azospirillum*	۱۲ دسی زیمنس بر متر
PSB: تلقیح با Phosphate solobilizing bacteria	۰/۲ دسی زیمنس بر متر (کنترل)
Az+PSP: تلقیح دوگانه با *Azospirillum* و Phosphate solobilizing bacteria	
Control: عدم تلقیح (شاهد)	

تهیه مایه‌های تلقیح باکتری‌ها: جداسازی باکتری‌های مورد نظر قبلا در دانشگاه ایلام انجام گرفت. این سویه‌ها متحمل به شوری و از خاک مناطق شور استخراج شدند (Zarea et al., 2012). آزمایش مقدماتی انجام گرفته، نشان دهنده توانایی این سویه‌ها در کاهش تنش شوری در گندم بود. کلونی‌های حاصل از تکثیر سویه‌های باکتری *Azospirillum* spp که در محیط جامد کنگورد تولید شده بود به محیط نیمه‌جامد تعدیل شده فاقد نیتروژن منتقل گردیدند و به مدت ۳-۲ روز در انکوباسیون در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و بعد از رشد، آماده جهت تهیه مایع تلقیح گردیدند. تعداد سلول باکتری در هر میلی‌لیتر مایه تلقیح ۱×۱۰^{۸} تنظیم گردید.

مایه‌های تلقیح دو باکتری حل کننده فسفات *Bacillus megaterium* و *Azospirillum* جداگانه تهیه شدند. یک میلی‌لیتر از مایه اولیه باکتری حاوی ۱×۱۰^{۸} سلول باکتری (CFU) از هر کدام از دو جنس باکتری در ۹ میلی‌لیتر مایع محیط کشت حداقل با کمی تغییر مطابق روش توصیف شده Sambrook و همکاران (۱۹۸۹) معرفی شدند. محیط‌های کشت به‌مدت ۵ روز و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد رشد داده شدند. در این مدت محیط‌های کشت به‌صورت مداوم شیک گردیدند. سپس مایه‌های تلقیح حاوی ۱×۱۰^{۸} سلول باکتری (CFU) تهیه گردید. بعد از این مرحله یک میلی‌لیتر از هر کدام از مایه‌های کشت باکتری‌ها به محیط کشت حاوی ده میلی‌لیتر Co-Ag buffer افزوده و به‌مدت ۳۰ ثانیه شیک شدند. سپس به مدت ۲٤ ساعت در دمای اتاق رها و در نهایت تعداد سلول در هر میلی‌لیتر مایه تلقیح به ۱×۱۰^{۹} سلول باکتری تنظیم گردید تا ترکیب مایه‌های تلقیح دو باکتری حاصل گردد.

روش تلقیح دو گانه: جهت تلقیح دوگانه از کشت‌های مخلوط دو باکتری حاصل از مایه تلقیح حاوی دو باکتری که روش تولید آن شرح داده شده استفاده شد. ابتدا بذرهای ماش (*Vigna radiata* L.)

رقم گوهر را به‌ترتیب در الکل ۷۰ درجه به‌مدت ۳۰ ثانیه و سپس توسط هیپوکلریت سدیم ۰/۲ درصد به مدت دو دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. سپس بذرها سه مرتبه با آب مقطر استریل شستشو گردیدند تا اثر هیپوکلریت سدیم حذف شود. بذرهای استریل شده به مدت یک ساعت با مایه تلقیح شیک داده شدند تا نفوذ باکتری به داخل شیارها و پوست دانه امکان‌پذیر گردد. میزان مایه تلقیح استفاده شده به میزان یک میلی لیتر مایه تلقیح برای یک عدد دانه ماش بود. سپس بذرها هوا خشک و آماده کشت گردیدند.

تعیین اجزاء عملکرد و عملکرد نهایی دانه و تعیین محتوای عناصر دانه: در مرحله رسیدگی دانه اقدام به برداشت از دو متر خطوط مرکزی هر پلات شد. وزن تر برگ اندازه‌گیری و سپس اقدام به شمارش تعداد غلاف در بوته و تعداد دانه در غلاف گردید. پس از ثبت اجزاء عملکرد نمونه‌ها با آون در درجه حرارت ۸۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت چندین روز تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردیدند. وزن هزار دانه از متوسط وزن هزار دانه‌ها حاصل شد. سپس اقدام به آسیاب نمونه‌های بذری از هر تیمار شد و نمونه‌ها جهت اندازه‌گیری عناصر سدیم و کلر به آزمایشگاه فرستاده شدند.

اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم: برای اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم که براساس روش شعله سوزی انجام یافت از اسید نیتریک و پراکسید هیدروژن استفاده شد و اندازه گیری توسط دستگاه فلیم فتومتر انجام گردید (Isaac and Kerber, 1971). برای تهیه محلول‌های استاندارد اندازه‌گیری سدیم از کلریدسدیم و برای پتاسیم از کلریدپتاسیم استفاده شد.

اندازه‌گیری پرولین: محتوای پرولین نیز در مرجله غلاف‌دهی انجام گرفت. محتوای پرولین از نمونه‌های برگی که به صورت تصادفی از برگ‌های کاملاً توسعه یافته جمع‌آوری شده از هر پلات بود، انجام گرفت. غلظت پرولین مطابق روش Bates و همکاران (۱۹۷۳) تعیین گردید و نهایت بصورت میکرومول در هر گرم وزن تر محاسبه گردید. به طور خلاصه برای اندازه‌گیری محتوای پرولین برگ، از نمونه‌های ۰/۵ گرمی برگ استفاده گردید. نمونه‌ها داخل هاون‌های چینی ساییده شدند و در همین حال به تدریج ۱۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوسالیسیلیک اضافه گردید. نمونه‌های حاصله در لوله‌های درب‌دار به‌مدت زمان ۱۵ دقیقه و با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. یک میلی‌لیتر از نمونه‌های سانتریفیوژ شده به لوله‌های جدید انتقال و سپس معرف نین‌هیدرین و یک میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به آن افزوده و به مدت یک ساعت در بن‌ماری با درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد گذاشته شدند و با ایجاد رنگ آجری واکنش از طریق قرار دادن نمونه‌ها در یخ متوقف و ٤ میلی‌لیتر تولوئن اضافه گردید. فاز رویی (رنگی) جهت تعیین پرولین مورد استفاده و جذب در ۵۲۰ نانومتر قرائت گردید.

تجزیه آنالیز داده های آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS انجام گرفت. مقایسه میانگین بین تیمارهای با آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال آماری ۰/۰۵ $\geq P$ انجام گرفت.

نتایج

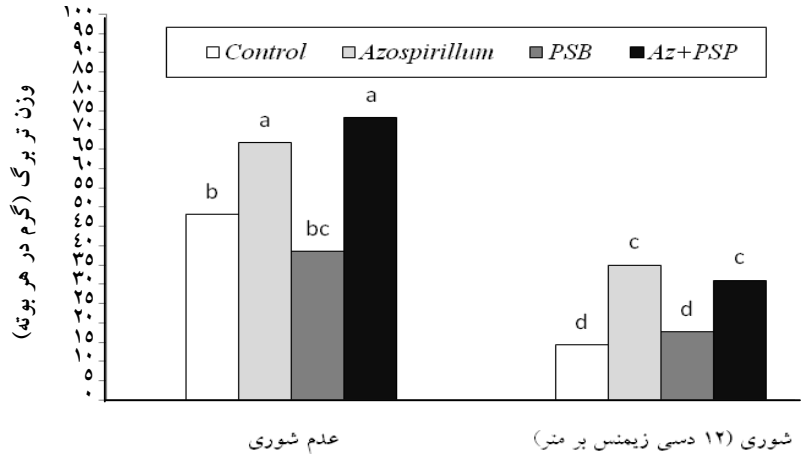
آزمون تجزیه واریانس مرکب اثر مایه‌های تلقیح مختلف باکتریایی و نیز شوری بر عملکرد و اجزاء عملکرد و نیز بر وزن خشک و تازه برگ و محتوای پرولین برگ در جدول ۲ ارائه شده است. تمام صفت‌های اندازه‌گیری شده تحت تاثیر تیمارهای مختلف شوری و تلقیح باکتری قرار گرفتند. اثر متقابل شوری × تلقیح باکتریایی برای صفات ذکر شده به جز وزن خشک برگ و محتوای پرولین معنی‌دار گردید. اثرهای تیمارهای به کاربرده شده بر شاخص‌های اندازه‌گیری شده از نظر آماری تحت تاثیر فاکتور زمان (سال) معنی‌دار نبود (جدول ۲).

جدول ۲: آنالیز واریانس اثر تیمارهای شوری و تلقیح با باکتری بر عملکرد دانه و اجزاء عملکرد، وزن تر و خشک و محتوای پرولین برگ

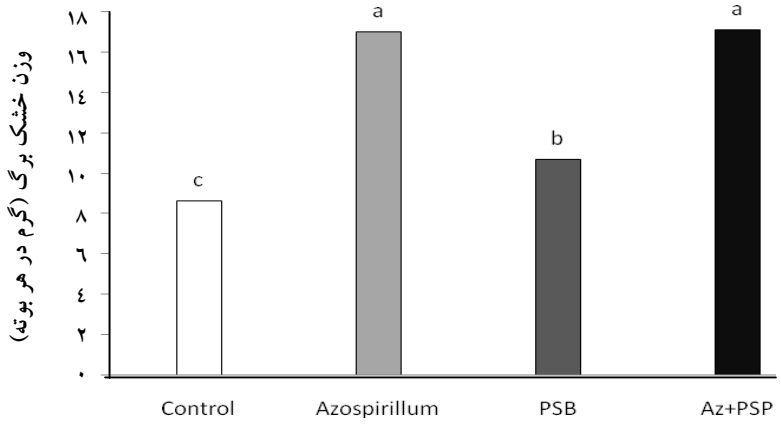
	درجه آزادی	عملکرد دانه	تعدا دانه در بوته	وزن هزار دانه دربوته	وزن تر برگ	وزن‌خشک برگ	پرولین
تکرار	۲	۱۵۰۸ ns	٦٥٧٩ ns	٤ ns	۸ ns	۲۲ ns	۷ ns
سال	۱	۲۳۰۵۵۹ ns	۳۲۰۵٦ ns	۱۵۲ ns	۲۳ ns	٦ ns	۳ ns
تکرار (سال)	۲	۲۵۵٤۸ ns	۵۲۹ ns	۲۲ ns	۱۰٤ ns	۳ ns	۱۰ ns
شوری	۱	۳۲۵۸۵۰۸	۵۱٤۲۱۷**	۱۲۵٤**	۱۱۸٤۸**	۱۹٤**	٤۹۱**
سال×شوری	۱	۹۱۲ ns	۷۵۵ ns	۱۰ ns	۲۵۸ ns	۳۲ ns	۵ ns
کود زیستی	۳	۷۵۳۲٦۵**	۱۷۰۷۷٦**	۹٦**	۱۹۲۷**	۲۱۹**	۳۳*
کود زیستی× سال	۳	۱۵۸٤۱۹ ns	۵٤۳۹ ns	۳۹ ns	۸۱ ns	۸ ns	۷ ns
شوری × کود زیستی	۳	۹۲۳۵**	۲٤٦۳٦**	۳۲ **	۲٤۳ *	۹ ns	۷ ns
شوری × کود زیستی ×سال	۳	۷۱۰۲ ns	٦۸۳۹ ns	٤۱ ns	٤٤ ns	٤ ns	٦ ns
خطای آزمایشی	۲۸	۱۸۱٤۱	۸۸٦۰	۲۵/۵	۷۷	۸/٦	٦

** و *به ترتیب معنی داری در سطح احتمال آماری ۱درصد و۵ درصد و ns نشان دهنده عدم معنی دار بودن واریانس‌ها تحت تاثیر تیمار

اثر کاربرد کودهای زیستی بر وزن خشک و تر برگ در شرایط شور و غیر شور: بالاترین وزن تر برگ تحت عدم شوری و شوری متعلق به گیاهانی بود که بذر آنها با *Azospirillum* تلقیح شده بودند (شکل ۱). تلقیح با *Azospirillum* منجر به افزایش ۳۸ درصدی وزن تازه برگ در مقایسه با شاهد گردید و تحت شوری نیز بوته‌های ماش تلقیح شده با *Azospirillum* از متوسط وزن تازه برگی به میزان ۲۳۷ درصد بیش از گیاهان شاهد برخوردار بودند. وزن خشک کل برگ تک بوته تحت تاثیر اثر متقابل شوری × تلقیح باکتریایی قرار نگرفت و اثر شوری و تلقیح بر این صفت اندازه‌گیری شده مستقل از یکدیگر موجب تغییر معنی‌دار آن شدند (جدول ۲). وزن خشک کل برگ تحت تاثیر شوری از ۱۵/۲۹ به ۱۱/۳٤ گرم در هر بوته کاهش پیدا نمود. همچنین باکتری *Azospirillum* مستقل از شوری، موجب بیشترین میزان وزن خشک برگ در بوته گردید (شکل ۲).



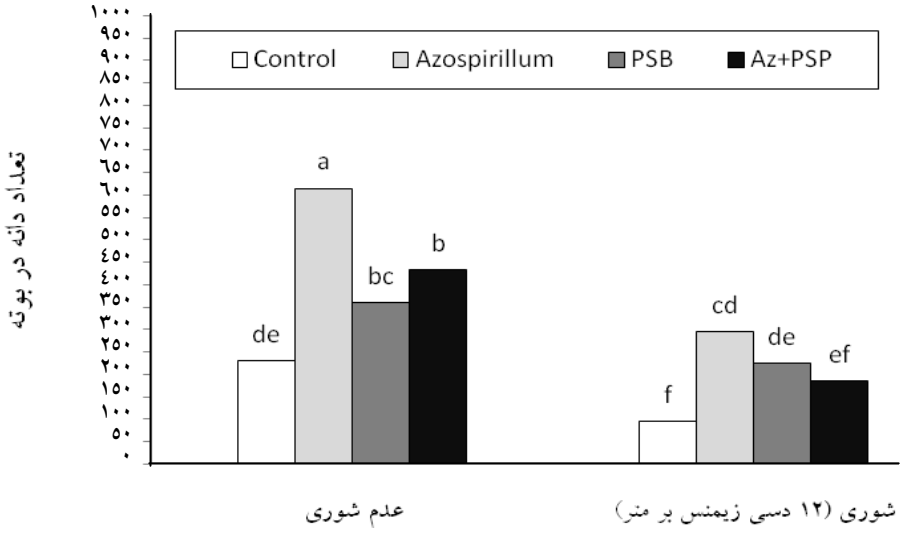
شکل ۱: اثر تاثیر شوری و تلقیح با باکتری‌های القاء کننده رشد گیاه (*Azospirillum, Az*) و باکتری حل کننده فسفات (Phosphate Solobilizing Bacteria, PSB) در تلقیح به تنهایی و در مخلوط (Az+PSB) بر وزن تر برگ در هر بوته ماش.
*حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.



شکل ۲: اثر تلقیح با باکتری‌های القاء کننده رشد گیاه (*Azospirillum, Az*) و باکتری حل کننده فسفات (Phosphate Solobilizing Bacteria, PSB) در تلقیح به تنهایی و در مخلوط (Az+PSB) بر وزن خشک برگ در هر بوته ماش

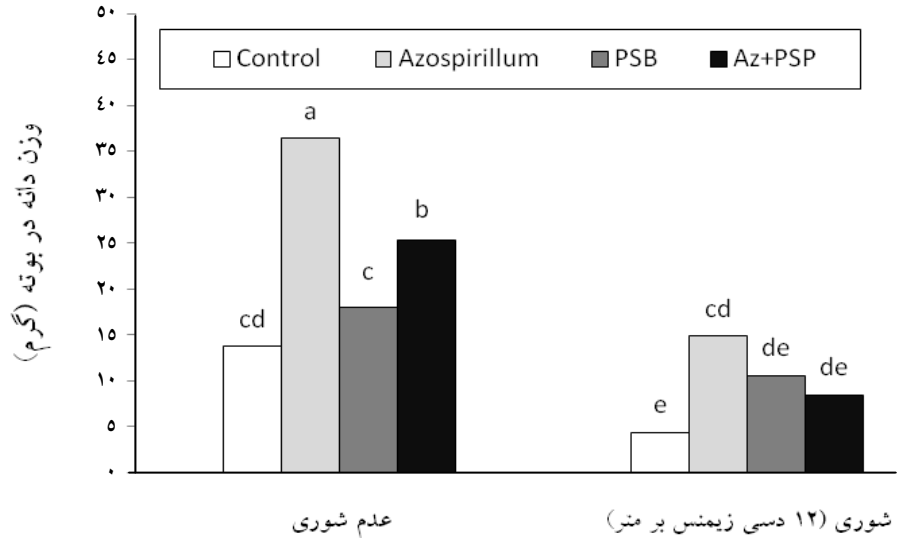
*حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ درصد است.

اثر کاربرد کودهای زیستی بر عملکرد و اجزاء عملکرد در شرایط شور و غیرشور: تلقیح با *Azospirillum* موجب افزایش ۱۶۶ و ۲۰۶ درصدی تعداد دانه در هر بوته ماش در مقایسه با شاهد و به ترتیب تحت شرایط عدم شوری و شوری گردید و سودمندی و کارایی بیشتری از کاربرد مخلوط دو باکتری حاصل نشد (شکل ۳). نتایج تاثیر شوری و به کارگیری باکتری به تنهایی و در مخلوط با باکتریهای حل کننده فسفات *Bacillus megaterium* بر وزن دانه کل تک بوته در شکل ٤ ارائه شده است. *Azospirillum* بیشترین تاثیر را در افزایش وزن دانه‌های تولیدی تحت عدم شوری داشت و تحت شوری نیز از کاهش بیشتر آن جلوگیری نمود (شکل ٤). بوته‌های تلقیح شده با *Azospirillum* به‌ترتیب تحت شرایط عدم شوری و اعمال شوری از ۱٦٤ و ۲۳۷ درصد وزن بیشتر دانه برخوردار بودند.



شکل ۳: اثر تاثیر شوری و تلقیح با باکتری‌های القاءکننده رشد گیاه (*Azospirillum, Az*) و باکتری حل کننده فسفات (Phosphate Solobilizing Bacteria, PSB) در تلقیح به تنهایی و در مخلوط (Az+PSB) بر تعداد دانه در بوته دانه ماش

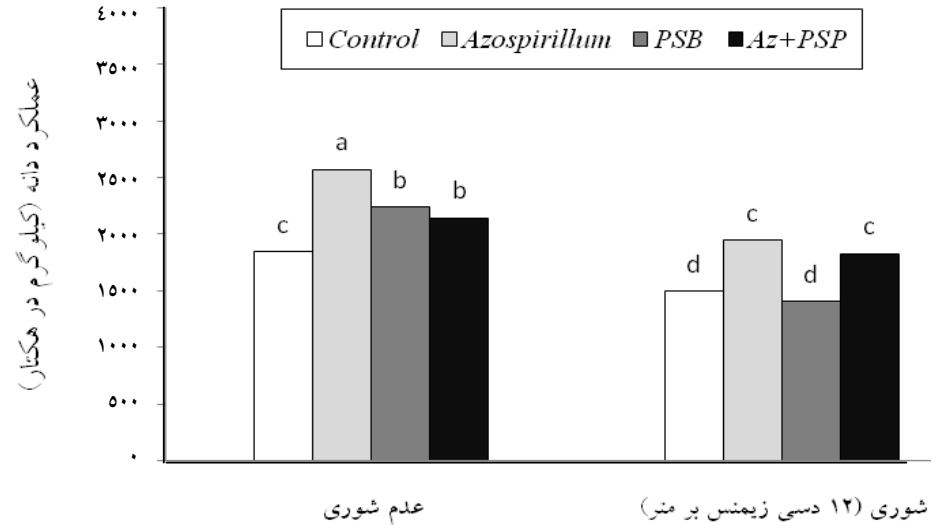
*حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.



شکل ٤: اثر تاثیر شوری و تلقیح با باکتری‌های القاء کننده رشد گیاه (*Azospirillum, Az*) و باکتری حل کننده فسفات (Phosphate Solobilizing Bacteria, PSB) در تلقیح به تنهایی و در مخلوط (Az+PSB) بر وزن دانه تولیدی در هر بوته ماش

*حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

تحت عدم شوری و اعمال شوری بیشترین میزان عملکرد دانه ماش از تلقیح به تنهایی با باکتری *Azospirillum* حاصل شد و کاربرد توامان آن با باکتری *Bacillus megaterium* منجر به افزایش سودمندی بیشتری نگردید و حتی تا حدودی روابط بین آنها از نوع بازدارندگی بود (شکل ۵). کمترین میزان عملکرد دانه را گیاهان شاهد تحت هر دو شرایط شوری و عدم شوری داشتند (شکل ۵). تلقیح به تنهایی با *Azospirillum* منجر به افزایش ۳۸ و ۲۸ درصدی عملکرد دانه ماش به‌ترتیب تحت عدم شوری و شوری در مقایسه با شاهد گردید.



شکل ۵: اثر تاثیر شوری و تلقیح با باکتری‌های القاءکننده رشد گیاه (*Azospirillum, Az*) و باکتری حل کننده فسفات (Phosphate Solobilizing Bacteria, PSB) در تلقیح به تنهایی و در مخلوط (Az+PSB) بر عملکرد نهایی دانه ماش

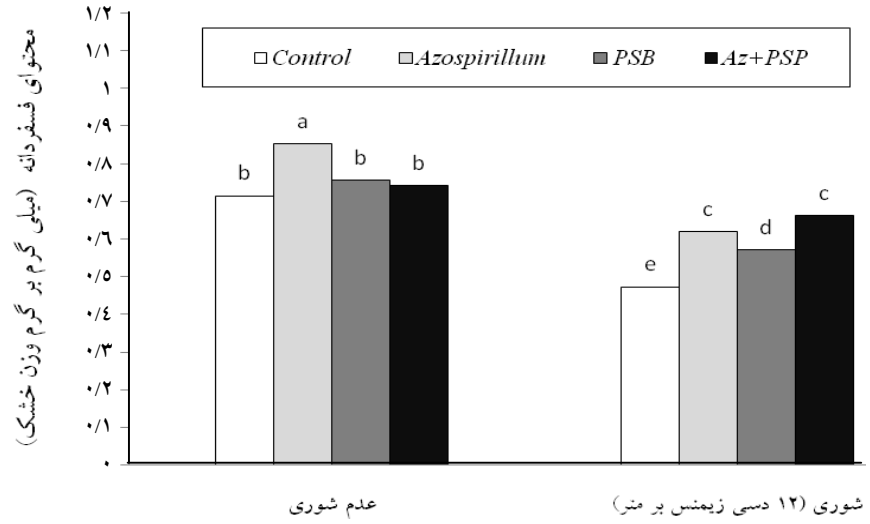
*حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

جدول ۳: آنالیز واریانس اثر تیمارهای شوری و تلقیح با باکتری بر جذب عناصر سدیم و کلر و فسفر دانه

	درجه آزادی	فسفر دانه	سدیم	کلر
تکرار		۰/۰۰۰٤ ns	۰/۰۲۳ ns	۰/۰۰۰۵ ns
سال	۱	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۲ ns	۰/۰۰۰۵ ns
تکرار (سال)	۳	۰/۰۰۱ ns	۰/۰٤ ns	۰/۰۰۰۲ ns
شوری	۱	۰/٤ **	۱۰**	۰/۲۱**
سال×شوری	۱	۰/۰۰۰۰۰۳ ns	۰/۰۰۵ ns	۰/۰۰۰۱۸ ns
کود زیستی	۳	۰/۰٤**	۱/٦**	۰/۰۰۲٦**
کود زیستی× سال	۳	۰/۰۰۲۸ ns	۰/۲۷ ns	۰/۰۰۰۱ ns
شوری × کود زیستی	۳	۰/۰۰۱٦**	۰/۷**	۰/۰۰۲٦**
شوری × کود زیستی ×سال	۳	۰/۰۰۰۵ ns	۰/۰۵ ns	۰/۰۰۰۱ ns
خطای آزمایشی	۲۸	۰/۰۰۱٦ ns	۰/۰۲	۰/۰۰۰٤
ضریب تغییرات (درصد)	-	٦	۷	۹

** و *به‌ترتیب معنی داری در سطح احتمال آماری ۱درصد و۵ درصد و ns نشان‌دهنده عدم معنی دار بودن واریانس‌ها تحت تاثیر تیمار

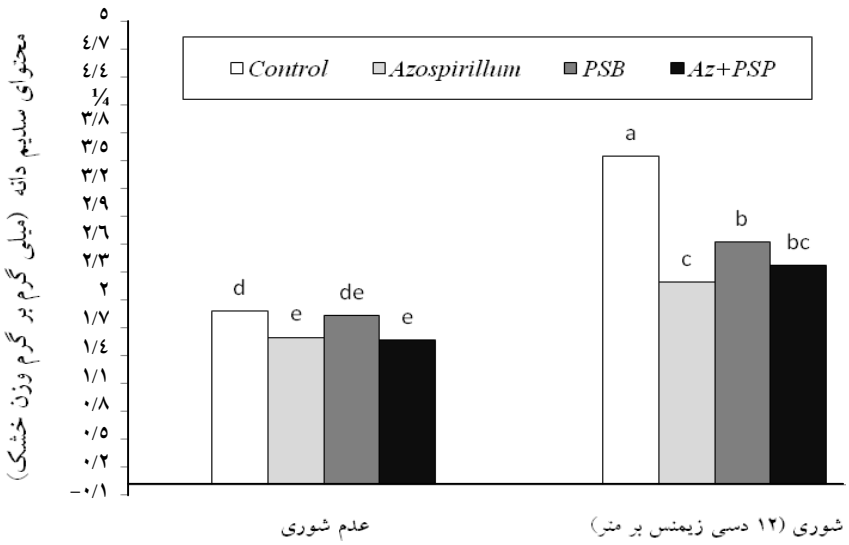
تاثیر تیمارهای شوری و تلقیح با باکتری بر جذب عناصر سدیم و کلر و فسفر: آزمون تجزیه واریانس مرکب اثر مایه‌های تلقیح مختلف باکتریایی و نیز شوری بر جذب عناصر فسفر و نیز عناصر شوری (سدیم و کلر) در جدول ۳ ارائه شده است. محتوای سدیم و کلر دانه و نیز فسفر تحت تاثیر تیمارهای مختلف شوری و تلقیح میکروبی قرار گرفت. اثر متقابل شوری× تلقیح باکتریایی برای صفات ذکر شده معنی‌دار بود (جدول ۳). بالاترین محتوای فسفر دانه از گیاهان تلقیح شده با باکتری *Azospirillum* حاصل شد و تحت شوری و عدم شوری کمترین میزان محتوای این عنصر را گیاهان شاهد داشتند (شکل ٦).



شکل ٦: اثر تلقیح با باکتری‌های القاء کننده رشد گیاه (*Azospirillum, Az*) و باکتری حل کننده فسفات (Phosphate Solobilizing Bacteria, PSB) در تلقیح به تنهایی و در مخلوط (Az+PSB) بر محتوای فسفر دانه ماش

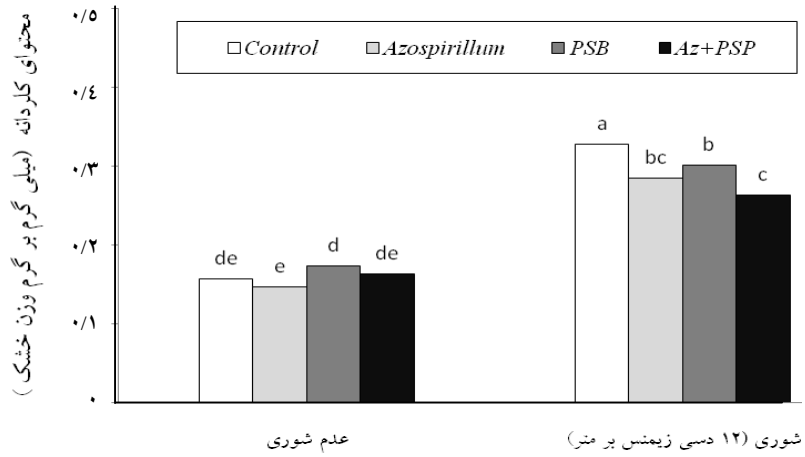
*حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

کاربرد دوگانه باکتری *Azospirillum* منجر بـه ایجـاد برتری بیشتری نگردید. تحـت شـرایط شـوری کمتـرین محتوای سدیم را گیاهان تلقـیح شـده بـا *Azospirillum* داشتند (شکل ۷) و کمترین کلر دانه متعلـق بـه گیاهـانی بـود کـه بـذر آنهـا بـا هـر دو بـاکتری *Azospirillum* و *Bacillus megaterium* تلقیح شده بودند (شکل ۸).



شکل ۷: اثر تلقیح با باکتری‌های القاء کننده رشد گیاه (*Azospirillum, Az*) و باکتری حل کننده فسفات (Phosphate Solobilizing Bacteria, PSB) در تلقیح به تنهایی و در مخلوط (Az+PSB) بر محتوای سدیم دانه ماش

*حروف غیر مشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

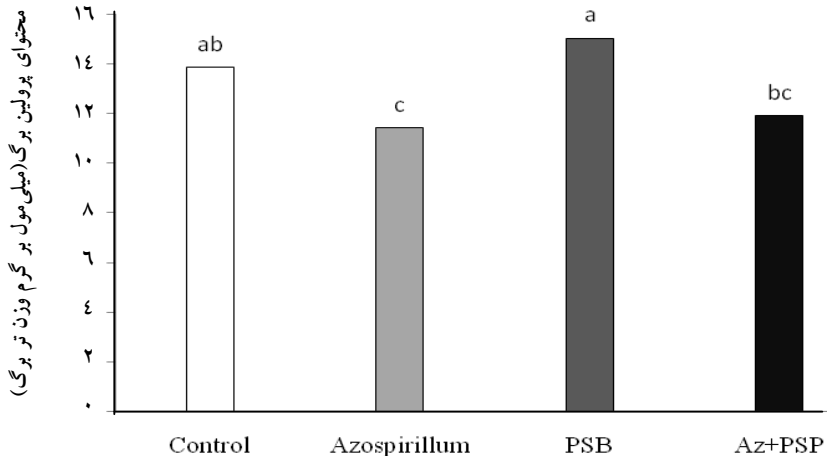


شکل ۸: اثر تلقیح با باکتری‌های القاءکننده رشد گیاه (*Azospirillum, Az*) و باکتری حل کننده فسفات (Phosphate Solobilizing Bacteria, PSB) در تلقیح به تنهایی و در مخلوط (Az+PSB) بر محتوای کلر دانه ماش

*حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است

اثر کاربرد کودهای زیستی بر میزان پرولین برگ در شرایط شور و غیر شور: اثر متقابل شـوری × تلقـیح باکتریایی بر محتوای پرولین برگ معنی‌دار نبود و تاثیر عامـل‌هـای اصـلی شـوری و تلقـیح بـر ایـن صـفت اندازه‌گیری شده مستقل از یکدیگر بـود (جـدول ۲). شوری موجب افزایش معنی‌دار پرولین برگ گردید و

میزان آن را از ۹/۸ به ۱۶/۲ میکرومول بر گرم وزن تازه برگ افزایش داد. کمترین محتوای پرولین برگ را گیاهان تلقیح شده با *Azospirillum* و بیشترین محتوای پرولین برگ، مربوط به گیاهان شاهد و گیاهان تلقیح شده با باکتری حل کننده فسفات بود (شکل ۹).



شکل ۹: اثر تلقیح با باکتری‌های القاء کننده رشد گیاه (*Azospirillum, Az*) و باکتری حل کننده فسفات (Phosphate Solobilizing Bacteria, PSB) در تلقیح به تنهایی و در مخلوط (Az+PSB)بر محتوای پرولین برگ در هر بوته ماش
*حروف غیرمشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است

بحث

نتایج این آزمایش بیانگر تاثیر کارامد *Azospirillum* بر افزایش عملکرد دانه ماش تحت هر دو شرایط شوری و عدم شوری بود. *Azospirillum* مانع از کاهش زیاد عملکرد دانه ماش تحت شوری گردید و در مقایسه با باکتری *Bacillus megaterium* از این نظر کارآمدتر بود. قبلاً گزارش گردید که باکتری *Azospirillum* در مقایسه با سایر باکتری‌ها از تحمل بالاتری نسبت به شوری برخوردار است (Bashan and Holguin, 1997) و بنابراین ممکن است با حفظ جمعیت و تدام فعالیت خود منجر به عملکرد بیشتر ماش تحت شوری در مقایسه با کاربرد *Bacillus megaterium* گردیده باشد. علت بالاتر بودن عملکرد نهایی دانه، نتیجه تولید بیشتر تعداد دانه در بوته و وزن دانه بود. همچنین تحت شوری میزان کاهش وزن هزار دانه و تعداد دانه در گیاهان تلقیح یافته با *Azospirillum* کمتر بود که نشان دهنده اثر مثبت کاربرد باکتری *Azospirillum* بر افزایش تحمل و یا رفع تنش شوری بر گیاه بوده است. عملکرد بهتر گیاهان تلقیح شده با *Azospirillum* تحت شرایط شوری می‌تواند مربوط به وضعیت بهتر محتوای آب گیاه و محتوای عناصر باشد که در این آزمایش حاصل شد. در آزمایش انجام شده گیاهان تلقیح شده با *Azospirillum* داری وزن تر برگ بیشتری بودند و در همین حال کمترین محتوای پرولین را داشتند. محتوای پرولین برگ این امکان را به گیاه می‌دهد که با حفظ توازن اسمزی قادر به تداوم جذب آب از خاک باشند (Stewart and Lee, 1974). وجود مقادیر پایین‌تر این اسید آمینه که نقش تنظیم کنندگی تحت شرایط تنش اسمزی را دارد، می‌تواند گویایی وضعیت مطلوب آب در گیاهان تلقیح شده با *Azospirillum* باشد و در نتیجه گیاه نیاز به تجمع بیشتر پرولین بیشتر نداشته است. بالاتر بودن محتوای پرولین در برگ گیاهان تلقیح شده با باکتری حل

کننده فسفات (*Bacillus megaterium*) می‌تواند نشانه‌ای از تنش اسمزی وارد شده به گیاه باشد. تجمع شوری در برگ و بافت‌های گیاه تدریجی و سرانجام به غلظتی خواهد رسید که موجب ایجاد سمیت در سیتوپلاسم سلولی، زوال کلروفیل، اختلال در فتوسنتز و نهایت از بین رفتن برگ می‌گردد (Zarea et al., 2013a,b). نتایج این آزمایش نشان داد که گیاهان تلقیح شده با *Azospirillum* از کمترین میزان تجمع سدیم و کلر در بذر برخوردار بودند. در آزمایش انجام گرفته با گیاه فلفل شیرین (*Capsicum annuum* L.) نیز گزاش گردید که گیاهان تلقیح شده با *Azospirillum* از محتوای کلر کمتر، محتوای نیترات بیشتر و نسبت بالاتر پتاسیم به سدیم برخوردار بودند (Amor and Cuadra-Crespo, 2011). تحت شوری، سدیم جایگزین پتاسیم در جذب می‌گردد، حال آنکه پتاسیم نقش‌های مختلف آنزیمی را بر عهده دارد و نیز در بسته و باز شدن روزنه‌ها و تثبیت دی‌اکسیدکربن نقش حیاتی دارد (Zarea et al., 2015). همچنین کلر تحت شوری با عنصر فسفر در جذب رقابت و جایگزین آن می‌شود که تجمع زیادی این عنصر برای گیاه سمی است (Zarea et al., 2015).

برخلاف انتظار اولیه کاربرد دوگانه باکتری‌های *Azospirillum* و *Bacillus megaterium* منجر به سودمندی بیشتری در مقایسه با کاربرد به تنهایی *Azospirillum* در کاهش کمتر عملکرد ماش تحت شوری نگردید. عملکرد نهایی دانه تحت هر دو شرایط شوری و غیر شوری از کاربرد به تنهایی *Azospirillum* حاصل گردید. هر چند در هر دو شرایط شوری و عدم شوری شاخص عملکرد نهایی دانه تحت به کارگیری انواع مختلف این کودهای زیستی بیش از گیاهان تلقیح نشده بود. گزارش شده است که روابط بین میکروارنیسم‌ها می‌تواند از نوع بازدارندگی، افزایندگی و یا بدون اثر باشد (Zarea et al., 2015). به عنوان نمونه اثر متقابل بین *Azospirillum* و *Rhizobium* هم مثبت و هم منفی گزارش گردید اما مخلوط مایه های تلقیح باکتری *Azospirillum* و قارچ‌های وزیکولار- آربسکولار میکوریزی از نوع افزایندگی و کاربرد توامان آنها منجر به برآورده شدن تمامی نیاز گیاه ذرت به فسفر و نیتروژن شد (Barea et al., 1983). نتایج این آزمایش نشان‌دهنده عدم وجود یک رابطه افزایندگی بین این دو جنس از باکتری بود، هر چند در برخی صفات تا حدودی یک افزایش جزئی در این خصوص دیده شد. نتایج این آزمایش برخلاف برخی مطالعات قبلی انجام گرفته و با سایر میکروارگانیسم‌ها است که بیان داشتند که تلقیح توامان *Bradyrhizobium* و باکتری‌های حل کننده فسفات منجر به بهبود عملکرد و اجزاء عملکرد سویا در مقایسه با کاربرد به تنهایی آنها گردید (Wasule et al., 2007; Son et al. 2007; Argaw, 2012). همچنین نتایج مثبتی از به کارگیری توام *Rhizobia* و قارچ‌های آربسکولار میکوریزا تحت کمبود فسفر و نیتروژن بر افزایش اجزاء عملکرد و عملکرد دانه سویا نیز گزارش گردید (Wang et al., 2011). رابطه افزایندگی حاصل از کاربرد جنس‌های مختلف باکتری‌های محرک رشد در بهبود عملکرد گیاهان زراعی دیگری مانند سیب زمینی (Kundu and Gaur, 1980)، برنج (Tiwari et al., 1989)، چغندرقند، جو (Çakmakç i et al., 1999) و فلفل شیرین (Amor and Cuadra-Crespo, 2011) نیز گزارش شد. براساس نتایج به‌دست آمده، به نظر می‌رسد که حداقل تحت شوری، کاربرد توامان باکتری *Bacillus megaterium* و *Azospirillum* مزیتی بر به کارگیری *Azospirillum* به تنهایی در زراعت ماش نداشت.

نتیجه‌گیری نهایی

نتایج بیانگر کارآمدی بهتر *Azospirillum* در رفع تنش شوری از گیاه ماش در مقایسه با *Bacillus megaterium* بود. در این آزمایش تلقیح دو گانه دو جنس از باکتری‌ها، یکی از نوع القاء کننده رشد (*Azospirillum*) و دیگری از نوع حل کننده فسفات (*Bacillus megaterium*)، منجر به سودمندی بیشتر در مقایسه با کاربرد *Azospirillum* به تنهایی نگردید. گیاهان تلقیح شده با *Azospirillum* از محتوای کلر، سدیم و نسبت پتاسیم به سدیم بالاتری برخوردار بودند. محتوای کمتر پرولین برگ و بیشتر بودن وزن تر برگ در گیاهان تلقیح شده با *Azospirillum*، نشان‌دهنده اثر کمتر شوری بر گیاه بود. تلقیح با *Bacillus megaterium* نیز تا حدودی موجب بهبود رشد ماش تحت شوری گردید اما در مقایسه با *Azospirillum* این میزان سودمندی، کمتر بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از راهنمایی‌های دکتر فرهاد رجالی بیان می‌دارند. از خانم مهندس نسرین کریمی جهت شناسایی ژنتیکی باکتری *Azospirillum* تشکر می‌گردد.

References

Amor, F.M. and Cuadra-Crespo, P. (2011). Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. Functional Plant Biology. 39: 82-90.

Argaw, A. (2012). Evaluation of Co-inoculation of *Bradyrhizobium japonicum* and phosphate solubilizing *Pseudomonas spp*. on Soybean (*Glycine max* L. (Merr.)) in Assossa Area. Journal of Agricultural Science and Technology. 14: 213–224.

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

Barea, J.M., Bonis, A.F. and Olivares, A. (1983). Interactions between *Azospirillum* and VA mycorrhiza and their effects on growth and nutrition of maize and ryegrass. Soil Biology Biochemistry. 15: 705–709.

Bashan, Y. and Holguin, G. (1997). *Azospirillum* - plant relationships :environmental and physiological advances (1990–1996). Canadian Journal of Microbiology. 43: 103–121.

Bashan, Y. and Levanony, H. (1990). Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Canadianan Journal of Microbiology. 30: 591–608.

Bashan, Y., Holguin, G. and de-Bashan. L.E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). Canadian Journal of Microbiology. 50: 521–577.

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

Blaha, C.A.G. and Shrank, I.S. (2003). An *Azospirillum brasilense* tn5 mutant with modified stress response and impaired in flocculation. Antonie Leeuweenhook. 83: 35–43.

Çakmakçi, R., Kantar, F. and Algur, Ö.F. (1999). Sugar beet and barley yields in relation to *Bacillus polymyxa* and *Bacillus megaterium* var. phosphaticum inoculation. Journal of Plant Nutrition. 162: 437–442.

Casanovas, E.M., Barassi, C.A., Andrade, F.H. and Sueldo, R.J. (2003). *Azospirillum*-inoculated maize plant responses to irrigation restraints imposed during flowering. Cereal Research Communication. 31: 395 – 402.

Cherif-Silini, H., Silini, A., Ghoul, M., Yahiaoui, B. and Arif, F. (2013). Solubilization of phosphate by the Bacillus under salt stress and in the presence of osmoprotectant compounds. African Journal of Microbiology Research. 7: 4562-4571.

Creus, C.M., Sueldo, R.J. and Barassi, C.A. (1997). Shoot growth and water status in Azospirillum-inoculated wheat seedlings grown under osmotic and salt stresses. Plant Physiology Biochemistry, 35: 939–944.

Grattan, S.R. and Grieve, C.M. (1992). Mineral element acquisition and growth response of plants grown in saline environments. Agricultural Ecosystem Environment. 38: 275–300

Grattan, S.R. and Grieve, C.M. (1999). Salinity-mineral nutrient relations in horticultural crops. Scientia Horticulturae. 78: 127–157.

Hamaoui, B., Abbadi, J.M., Burdman, S., Rashid, A., Sarig, S. and Okon, Y. (2001). Effects of inoculation with *Azospirillum brasilense* on chickpeas (*Cicer arietinum*) and faba beans (*Vicia faba*) under different growth conditions. Agronomie. 21:553–560.

Hamdia, M.A. and El-Komy. H.M. (1997). Effect of salinity, gibberellic acid and *Azospirillum* inoculation on growth and nitrogen uptake of *Zea mays*. Biological Plant. 40:109–120.

Isaac, R.A. and Kerber, J.D. (1971). Atomic absorption and flame photometry: Techniques and uses in soil, plant and water analysis. In: Instrumental Methods for Analysis of Soil and Plant Tissue, (Eds.): Walsh, L.M. Madison, Wis. PP. 17-37.

Karimi, N. (2012). Isolation and identification of plant symbiosis (*Azospirillum*) of saline area and investigate the interference of wheat-weed in response to endophytic fungus *P. indica* under salinity stress. Thesis. Ilam University.

Kucey, R.M.N. (1983). Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin alberta soils. Canadian Journal Soil Science. 63: 671-678.

Kumar, V. and Narula, N. (1999). Solubilization of inorganic phosphates and growth emergence of wheat as affected by *Azotobacter chroococcum* mutants. Biology and Fertility of Soils. 28:301-305.

Kundu B.S. and Gaur, A.C. (1980). Effect of phosphobacteria on the yield and phosphate uptake of potato crop. Current Science. 49: 159.

Okon, Y. and Laberandera-Gonzalez, C.A. (1994). Agronomic application of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biology Biochemistry. 26: 1591–601.

Pardossi, A., Bagnoli, G., Malorgio, F., Campiotti, C.A. and Tognoni, F. (1999). NaCl effects on celery (*Apium graveolens* L.) grown in NFT. Scientia Horticulturae. 81: 229–242.

Sambrook J., Fritisch, E.F. and Manialis, T. (1989). Molecular cloning; a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York, pp. 73–9.

Siahmargue, A., Raci Saray, M.R. and Naseri, M.Y (2014). Effect of biofertilizer on some quality traits of Pennisetum glaucum. Environmental plant physiology. 9: 72-81.

Somers, E. (2004). Vanderleyden J., Srinivasan M. Rhizosphere bacterial signalling: a love arade beneath our feet. Critical Review Microbiology. 30: 205–40.

Son, T.T.N., Diep, C.N. and Giang, T.T.M. (2006). Effect of bradyrhizobia and phosphate solubilizing bacteria application on soybean in rotational system in the mekong delta. Omonrice. 14: 48–57.

Souchie, E.L., Azcón, R. Barea, J.M., Saggin-Júnior, O.J. and da Silva. E.M.R. (2007). Indolacetic acid production by P-solubilizing microorganisms and interaction with arbuscular mycorrhizal fungi. Acta Scientiarum Biological Sciences. 29: 315-320.

Stewart, C.K. and Lee, J.A. (1974). The role of proline accumulation in halophytes. Planta, 120: 1279-289.

Strain, H.H. and Svec, W.A. (1966). Extraction, separation, estimation and isolation of chlorophylls. In: Vernon L. P., Seely G. R. (Eds The chlorophylls) 21-66. Academic Press, New York.

Tarakcioglu, C. and Inal, A. (2002). Changes induced by salinity, demarcating specific ion ratio (Na/Cl) and osmolality on ion and proline accumulation, nitrate reductase activity and growth performance of lettuce. Plant Nutrition, 25: 27–41.

Tilak K.V.B.R., Ranganayki, N., Pal, K.K., De, R., Saxena, A.K., Shekhar Nautiyal, C., Shilpi, M., Tripathi, A.K. and Johri, B.N. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Current Science. 89(1): 136–50.

Tiwari, V.N., Lehri L.K. and Pathak, A.N. (1989). Effect of inoculation crops with phospho-microbes. Experimental Agriculture. 25: 47–50

Wang, X., Pan, Q., Chen, F., Yan, X. and Liao, H. (2011). Effects of co-inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia on soybean growth as related to root architecture and availability of N and P. Mycorrhiza. 21: 173–81.

Wasule, D.L., Wadyalkar, S.R. and Buldeo, A.N.(2007). Effect of phosphate solubilizing bacteria on role of *Rhizobium* on nodulation by soybean. In: "First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization", (Eds.):Velazquez, E. and Rodriguez-Barrueco, C. PP.139–142.

Zarea, M.J. and Karimi, N. (2014). Plant physiological mechanisms of salt tolerance induced by mycorrhizal Fungi and *Piriformospora Indica.* Springer Science Business Media New York.

Zarea, M.J., Chordia, P. and Varma, A. (2013a). *Piriformospora indica* Versus Salt Stress. In: Varma A, Kost G, Oelmüller R (Eds.). *Piriformospora indica*, Soil Biology. 33 263–284.

Zarea, M.J., Hajinia, S., Karimi, N., Mohammadi Goltapeh, E., Rejali, F. and Varma, A. (2012). Effect of *Piriformospora indica* and *Azospirillum* strains from saline or non-saline soil on mitigation of the effects of NaCl. Soil Biology Biochemistry. 45: 139–146.

Zarea, M.J., Mohammadi Gol Tapeh, E., Alikhani, H.A. and Ghalavand, A. (2015). Mycorrhizal fungi for sustainable farming in saline arid and semi arid area. Jahad-e-Daneshgahi of Tehran Universit. PP. 1-50.

Zarea, M.J., Mohammadi Goltapeh, E., Karimi, N. and Varma, A. (2013b). Sustainable agriculture in saline-arid and semiarid by use potential of am fungi on mitigates NaCl effects. *In*: E.M. Mohammadi Goltapeh, Y. Rezaidanesh and A. Varama (Eds.). Fungi as Bioremediators. Soil Biology. 32: 340–370.