نشریه دانش آب و خاک / جلد23 شماره1صفحه‌های259 تا 273 / سال 1392

تأثیر جدایه‌های مختلف باکتری آزوسپریلوم بر عملکرد و جذب عناصر نیتروژن، فسفر و پتاسیم توسط کلزا

نگار قادری[1*]، محسن علمائی[2]، محمد حسین ارزانش[3]، رضا قربانی نصرآبادی[4]، مریم غزائیان[5] و مریم سبطی[5]

تاریخ دریافت: 89/11/09 تاریخ پذیرش: 91/08/03

[1-] دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی خاک، گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[2-] استادیار پژوهشی، گروه علوم خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[3-] استادیار پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان

[4-] گروه علوم خاک، دانشکده آب و خاک، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[5-] محقق، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان

[*] مسئول مکاتبه: E-mail: ghaderi.n61@gmail.com

چکیده

باکتری جنس *Azospirillum* از باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و محرک رشد گیاه می‌باشد که در ریزوسفر و فضای بین سلولی ریشه غلات و سایر گیاهان مشاهده شده است. در این مطالعه اثر تعدادی از جدایه‌های بومی روی برخی از پارامترهای رشدی و جذب عناصر بررسی گردید. در این تحقیق از 38 نمونه خاک و ریشه گیاه کلزا از مناطق مختلف استان گلستان، 58 جدایه *Azospirillum* جداسازی و ضمن مقایسه ویژگی‌های محرک رشد، 4 جدایه برتر انتخاب شدند. اثر تلقیح جدایه‌های برتر بر روی گیاه کلزا (رقم هایولا 401) در شرایط اتاقک رشد در قالب طرح بلوک کامل تصادفی به صورت فاکتوریل دو عاملی شامل باکتری (4 جدایه *Azospirillum*) و سطح کود (100 و 50 درصد توصیه شده براساس آزمون خاک) با سه تکرار و دو مرحله برداشت اجرا گردید. تلقیح 4 جدایه *Azospirillum* بر روی برخی از پارامترهای رشدی گیاه کلزا نشان داد که تیمارهای باکتری در برداشت اول باعث افزایش معنی‌دار بر روی وزن خشک اندام هوایی، میزان جذب پتاسیم و نیتروژن اندام هوایی در مقایسه با شاهد شد. ولی در برداشت دوم بر روی هیچ یک از صفات مورد مطالعه معنی‌دار نبود. بیشترین میزان پتاسیم و نیتروژن جذب شده و نیز بیشترین میزان وزن خشک اندام هوایی در برداشت اول در گیاه تلقیح شده با جدایه مولد هورمون اکسین به ترتیب با مقادیر 34/01، 31/43 و 0/627 مشاهده شد. همچنین اثر تیمارهای کود در برداشت اول بر میزان جذب عناصر و وزن خشک اندام هوایی و در برداشت دوم بر وزن خشک اندام هوایی، وزن خشک ریشه، میزان جذب پتاسیم و نیتروژن اندام هوایی معنی‌دار گردید. بالاترین میزان جذب عناصر غذایی، وزن خشک اندام هوایی و ریشه در هر دو برداشت در سطح کودی 100 درصد مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: آزوسپریلوم، جذب عناصر ، عملکرد ، کلزا

Effect of Different Isolates of *Azospirillum* on the Yield and Uptake of N, P and K in Canola

N Ghaderi[1*], M Olamaee[2], MH Arzanesh[3], R Ghorbani Nasrabadi[4], M Ghazaeean[5] and M Sebti[5]

Received: 29 January 2011 Accepted: 24 October 2012

[1]-M.Sc. student of Soil Biology, Dept. of Soil Sci., Gorgan Univ. of Agric. Sci. and Natural Resources, Golestan, Iran.
[2]- Assist. Prof., Dept. of Soil Sci., Gorgan Univ. of Agric. Sci. and Natural Resources, Golestan, Iran.
[3]- Assist. Prof., Research Center of Agric. and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran.
[4]- Dept. of Soil Sci., Faculty of Soil and Water, Gorgan Univ. of Agric. Sci. and Natural Resources, Golestan, Iran.
[5]- Researcher, Research Center of Agric. and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[*] Corresponding Author E-mail: ghaderi.n61@gmail.com

Abstract

The bacteria of genus *Azospirillum* is one of the plant growth-promoting bacteria with N2 fixation ability that has been observed in the rhizosphere and the intercellular of the cereals and other plant roots. In this research the effect of some indigenous isolates was surveyed on some of the growth parameters and nutrients uptake. In this research 58 *Azospirillum* isolates were isolated from 38 samples of soils and canola roots from the different regions of Golestan province, Iran. Then they were compared to select the superior growth promoting isolates. The effect of inoculation of superior isolates on canola (the variety of Hayola 401) was carried out under growth chamber conditions, at fertilizer level (50% and 100%, based on soil test), in randomized complete block design (RCBD) with 3 replications and 2 harvest stages. The inoculation of 4 *Azospirillum* isolates on some of the growth parameters of canola showed that the bacterial treatments significantly increased shoot dry weight, potassium and nitrogen uptake compared with the control in the first harvest, but they did not have any significant effect on all parameters in the second harvest. The maximum amounts of potassium and nitrogen uptake and the maximum amount of shoot dry weight were observed in inoculated plant by auxin-producing isolate with the amounts of 34.01, 31.43, and 0.627, respectively, in the first harvest. Also the effect of fertilizer treatments was significant on amounts of plant nutrients uptake and shoot dry weight in the first harvest , and on shoot dry weight, root dry weight, plant potassium, and nitrogen uptake in the second harvest. The highest amounts of nutrients uptake, shoot dry weight, and root dry weight in the both harvest stages were observed in 100% fertilizer treatment.

Keywords: *Azospirillum* spp., Canola (*Brassica napus* L.), Nutrients uptake, Yield

مقدمه

کلـــزا گیـــاهی از راســـته Rhoedales، تیـــره Brassicaceae، جـــــنس *Brassica* و گونـــــه *napus Brassica* بوده (آلیاری و شـکاری 1379) و در شـرایط آب و هوایی مساعد به صورت یک‌ساله رشـد مـی‌نمایـد (شهیدی و فروزان 1376). این گیاه از تلاقی‌های متعـدد بین جنس‌های *Brassica* و *Sinapis* حاصل گردیده است (احمـدی 1369، موریناگـا 1934، یـو 1935). در اسـتان گلستان کلزا با سطح زیر کشت حدود 33000 هکتار، بـه منظور استحصال روغن کشت می‌شود (بی‌نام 1387) و با توجه به بالا بودن pH غالـب خـاک‌هـای اسـتان و در نتیجه کاهش عناصر غیر متحرک از جملـه آهـن، روی و منگنز، همچنـین تثبیـت برخـی عناصـر معـدنی همچـون فسفر و پتاسیم باعث شده تا در سال‌های اخیـر تـلاش-هایی جهت حل این مشکلات تغذیه‌ای از خاک‌های کشور صورت گیرد.

در دهه‌های اخیر سیستم‌های کشاورزی پایدار، حفاظت جامعه موجودات زنده خاکزی و تلاش برای استفاده از راه حل‌های بیولوژیک جهت تغذیه گیاه و تأمین سلامتی جامعه مورد توجه قرار گرفته است. بروز مشکلات اقتصادی و زیست محیطی ناشی از مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی و نیز توجه به قابلیت‌های ذاتی متنوع موجودات خاکزی به‌ویژه میکروارگانیسم‌ها موجب گردیده که یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین زمینه‌های مورد تحقیق در مطالعات علمی روز، تلاش برای تولید کودهای زیستی باشد. کودهای زیستی به مواد حاصلخیز کننده‌ای اطلاق می‌شود که حاوی تعداد کافی از یک یا چند گونه از ارگانیسم‌های مفید خاکزی هستند که روی مواد نگهدارنده مناسبی عرضه می‌شوند. این کودها میکروارگانیسم‌هایی هستند که قادرند عناصر غذایی را از شکل غیر قابل استفاده به شکل قابل استفاده تبدیل نمایند و این تبدیل از طریق فرایند زیستی انجام می‌گیرد. با سابقه‌ترین و در حال حاضر رایج‌ترین انواع کودهای زیستی، مربوط به تثبیت کننده‌های نیتروژن است که در سطح جهانی مجموع مقدار نیتروژنی که از این طریق به خاک اضافه می‌نمایند، حدود 175 میلیون تن در سال برآورد شده است (خاوازی و ملکوتی 1380).

این دسته از موجودات خاکزی مـی‌تواننـد عـلاوه بـر کـاهش و بـه حـداقل رسـاندن آلـودگی‌هـای زیسـت محیطی، در تأمین برخی از عناصر (بالاخص نیتروژن و به طور عام در آزادسـازی عناصـر دیگـر مثـل فسـفر و آهن) نقش مهمی داشته باشند. باکتری‌های محرک رشـد گیاه (PGPR[1]) می‌تواننـد بـا مکانیسـم‌هـای مختلفـی در افزایش رانـدمان مصـرف کـود و آب و در نهایـت روی عملکـرد محصـولات زراعـی تـأثیرات مثبتـی را داشـته باشند (اوکان و لاباندرا-گونزالز 1994).

از مشهورترین باکتری‌هـای PGPR همیـار، مـی-توان به گونه‌هـای *Azospirillum* اشـاره نمـود. بـاکتری جـنس *Azospirillum* سـال‌هاسـت کـه بـه‌عنـوان عامـل محرک رشد گیاه شناخته شده است (اوکـان و لابانـدرا-گونزالز 1994). این باکتری در ریزوسفر غـلات حضـور داشـته و مـی‌تـوان آن را از ریزوسـفر اکثـر گیاهـان خـانواده گنـدمیان در منـاطق معتـدل و گرمسـیری، جداسـازی و شناسـایی نمـود (دوبرینـر و دی 1976). تاکنون براساس خصوصیات ظاهری و ژنتیکـی (قرابـت DNA)، 15 گونـه مختلـف از ایـن بـاکتری شناسـایی و جداسازی شده اسـت. (روسـتا 1375 و باتـاری و هـس 1993).

اثـرات مفیـد ایـن بـاکتری بـر روی محصـولات زراعی چه در محیط گلخانه و چـه در مزرعـه بـه اثبـات رسـیده اسـت (اوکـان و لابانـدرا-گـونزالز 1994). اکثـر گونه‌های جنس *Azospirillum* موادی را ترشح می‌کننـد که باعث تحریک رشد گیاه شده و مـانع توسـعه عوامـل بیماری‌زا می‌شوند (گلیک 1995). به علاوه افزایش جذب

[1] Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR)

فسفر، تثبیت نیتروژن مولکولی (BNF[1]) (کاپولنیک و همکاران1981، آلبرچت و همکاران 1981)، تولید هورمون‌های رشد گیاه نظیر اکسین و IBA[2] (فالیک و همکاران 1989، مارتینز-مورالز 2003) و غیره از اثرات باکتری‌های جنس *Azospirillum* می‌باشد. همچنین این جنس با همکاری سایر باکتری‌ها می‌تواند به انتشار و چرخه عناصر در خاک سرعت بخشد (راجندران و دواراج 2004).

لذا با فرض اینکه باکتری *Azospirillum* می‌تواند با اثر بر روی سیستم‌های مختلف گیاهی، سیستم ریشه‌ای را توسعه ببخشد و از طرفی با تولید اسیدهای آلی و برخی از ترکیبات کلات کننده آهن (سیدروفور[3]) در محیط رشد خود باعث کاهش pH در ناحیه ریزوسفر و به تبع آن افزایش میزان جذب عناصر غیر متحرک توسط گیاه شود، طرح حاضر با هدف بررسی اثر باکتری *Azospirillum* در میزان جذب برخی عناصر (بخصوص فسفر و پتاسیم) توسط گیاه کلزا انجام گردید.

مواد و روش‌ها

جداسازی و گروه‌بندی جدایه‌های بومی *Azospirillum*

در این تحقیق 38 نمونه خاک و ریشه گیاه کلزا از مناطق مختلف استان گلستان جهت جداسازی باکتری *Azospirillum* استفاده شد. ابتدا آزمایشات اولیه شناسایی جنس شامل توان تشکیل هاله در محیط NFb[4] نیمه جامد (K_2HPO_4, 0/5 g/L; Dl-Malic acid, 5 g/L; 0/02 g/L; NaCl, 0/1 g/L; $MgSO_4.7H_2O$, 0/2 g/L; Micro Elements solution, 2 ml/L; $CaCl_2.2H_2O$, in 0/2N KOH, 2 ml/L; Vitamin solution, 1 ml/L; ml/L; Bromthymol blue solution 0/5 % 1/75 g/L; KOH, 4/8 g/L; Fe-EDTA (1/64 %), 4 Agar-Agar,.) (دوبرینر و دی 1976)، تولید کلنی قرمز و صورتی رنگ روی محیط RC[5] (Dl-Malic 5 g/L; $MgSO_4.7H_2O$, 0/2 g/L; K_2HPO_4, 0/5 g/L; acid, 15 ml/L; $CaCl_2.2H_2O$, 0/02 g/L; NaCl, 0/1 g/L; 0/5 g/L; KOH, 4/8 g/L; Congo Red (1:400), Agar- 15-20 g/L; Yeast Extract, 0/5 g/L; NH_4Cl, Agar,) (کاسرس 1982) و تولید کلنی صورتی رنگ روی محیط PDA[6] (1 ml/L; Dl-Malic acid, 2/5 g/L; Vitamin 1 ml/L; Micro Elements solution, 0/5 % in 0/2N KOH, 2 ml/L; solution, 2/5 g/L; KOH, 2 g/L; Bromthymol blue solution Fresh potato is 200 g/L; Fructose or Sucrose, Agar-Agar, 15-20 g/L; peeled and cooked,.) (دوبرینر 1992)، تست گرم، تست اکسیداز و کاتالاز (دابی و ماهشواری 2005) و سپس آزمایشات تکمیلی شناسایی گونه شامل توانایی رشد در محیط NFb نیمه-جامد حاوی 3 درصد کلرید سدیم، نیازمندی به بیوتین و توان استفاده از قند گلوکز (تارند و همکاران 1978) و همچنین آزمایشات محرک رشد (توان انحلال فسفات معدنی نامحلول، توان تولید هورمون اکسین و توان تثبیت نیتروژن) بر روی جدایه‌های *Azospirillum* جداسازی شده انجام گردید.

آزمون کمی توان تولید اکسین

در بررسی توان تولید اکسین از روش بریک و همکاران (1991) استفاده گردید. برای این منظور توسط حلقه پلاتینی، مقداری از کلنی هر جدایه از سطح محیط NAS (Nutrient agar + 10 g/L sucrose) برداشته شده و به ارلن حاوی 20 میلی‌لیتر از محیط NFb (فاقد آگار و معرف برموتیمول بلو) به علاوه 1 گرم در لیتر NH_4Cl انتقال یافتند. طبق روش لین و همکاران (1983)،

[1] Biological Nitrogen Fixation (BNF)
[2] Indole-Butiric Acid (IBA)
[3] Siderophore
[4] Nitrogen Free Blue (NFb)
[5] Congo Red (RC)
[6] Potatoes Dextrose Agar (PDA)

جمعیت باکتری در همه ارلن‌ها یکسان در نظر گرفته شد ($3/2\times10^9$). سپس ارلن‌های تلقیح شده به مدت 48 ساعت در دمای 32 درجه سلسیوس روی شیکر با دوران 120 دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری توسط پیپت اتوماتیک به ارلن‌های حاوی 20 میلی‌لیتر از محیط NFb (فاقد آگار و معرف برموتیمول بلو) به علاوه 1 گرم در لیتر NH_4Cl منتقل گردید. نیمی از این ارلن‌ها حاوی 50 میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان[1] بود. ارلن‌های تلقیح شده به مدت 120 ساعت دردمای 32 درجه سلسیوس روی شیکر با دوران 120 دور در دقیقه قرار گرفتند. سپس 1/5 میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به مدت 10 دقیقه در دوران 10000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. یک میلی-لیتر از محلول روئی با 2 میلی‌لیتر از معرف سالکوفسکی (شامل 150 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، 250 میلی‌لیتر آب مقطر و 7/5 میلی‌لیتر $FeCl_3.6H_2O$ نیم مولار) مخلوط شد. با اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در طول موج 530 نانومتر قرائت شد. مقدار اکسین تولیدی با مقایسه شدت جذب (O.D[2]) با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های 0، 10، 20، 30، 40، 50، 60، 80 و 100 میلی‌گرم در لیتر ایندول استیک اسید (IAA) محاسبه گردید.

آزمون کمی توان حل فسفات معدنی نامحلول

جدایه‌های *Azospirillum* به ارلن‌های حاوی 20 میلی‌لیتر محیط NBS (10 g/L sucrose + Nutrient broth) تلقیح و در دوران 120 دور در دقیقه و دمای 32 درجه سلسیوس قرار داده شدند. طبق روش لین و همکاران (1983)، جمعیت باکتری در همه ارلن‌ها یکسان در نظر گرفته شد. سپس 100 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری توسط پیپت اتوماتیک به 50 میلی‌لیتر محیط کشت مایع رودریگوئز[3] (2004) (g/L; 0/5 % in 0/2N KOH, 2 ml/L; KOH, 4/8 $Ca_3(PO_4)_2$, 0/7 g/L; Bromthymol blue solution g/L; NaCl, 0/2 g/L; $FeCl_3.6H_2O$, 0/003 g/L; 0/373 g/L; $MgSO_4.7H_2O$, 0/2 g/L; KCl, 0/295 (.Glucose, 10 g/L; Fructose, 10 g/L; NH_4NO_3, منتقل گردید. ارلن‌های تلقیح شده با جدایه‌های *Azospirillum* به مدت 120 ساعت بر روی شیکر با دوران 120 دور در دقیقه و در دمای 32 درجه سلسیوس قرار داده شدند. در دوره‌های زمانی 0، 48 و 120 ساعت، pH نمونه‌ها توسط دستگاه pH متر قرائت شد. همزمان با قرائت pH، 1/5 میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به مدت 10 دقیقه در دوران 10000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با یک میلی‌لیتر معرف آمونیم مولیبدات-وانادات و 3 میلی‌لیتر محیط کشت رودریگوئز (فاقد تری‌کلسیم فسفات) مخلوط و میزان جذب نور در طول موج 470 نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. میزان انحلال فسفر با مقایسه این جذب با منحنی استاندارد تهیه شده با غلظت‌های 0، 5، 10، 15، 20، 25 و 30 میلی‌گرم در لیتر KH_2PO_4 محاسبه گردید (ارزانش 1387، رجب‌زاده 1388).

آزمون توان تثبیت بیولوژیک نیتروژن مولکولی (N_2-fixation)

در این آزمون میزان فعالیت نیتروژنازی در جدایه‌های بومی *Azospirillum* به روش احیای استیلن (ARA[4]) توسط دستگاه GC[5] مورد بررسی قرار گرفت. گرفت. لوله‌های آزمایش کوچک به حجم 13 میلی‌لیتر انتخاب و به میزان 5 میلی‌لیتر محیط NFb به علاوه نیم گرم در لیتر آگار به هر لوله منتقل گردید. پس از استریل شدن در اتوکلاو (به مدت20 دقیقه در دمای 120 درجهٔ سلسیوس)، محیط‌های NFb نیمه‌جامد توسط کلنی‌های خالص *Azospirillum* تلقیح و در دمای

[1] L-Tryptophan
[2] Optical Density (O.D)
[3] Rodriguez medium
[4] Acetylene Reduction Assay (ARA)
[5] Gas Chromatography (GC)

32 درجهٔ سلسیوس قرار گرفتند. پس از 72 ساعت درپوش‌های پنبه‌ای لوله‌ها با درپوش‌های لاستیکی استریل تعویض شدند. سپس 10 درصد حجم باقی‌مانده از لوله (0/7 میلی‌لیتر با احتساب حجم لاستیک) به‌وسیلهٔ سرنگ، خالی و به همان میزان گاز استیلن تزریق گردید. درزهای درپوش‌های لاستیکی با پارافیلم پوشانده شد و مجدداً لوله‌ها به انکوباتور انتقال یافتند.

پس از گذشت 24 ساعت مقدار 0/7 میلی‌لیتر از هوای داخل هر لوله توسط سرنگ هامیلتون کشیده شد و به دستگاه GC (دمای ستون، 120 درجه سلسیوس؛ دمای محل تزریق، 40 درجه سلسیوس؛ دمای آشکارساز، 250 درجه سلسیوس؛ سرعت گاز حامل (He)، 6/5 میلی‌لیتر در دقیقه) تزریق گردید. 5/17 تا 5/74 دقیقه پس از تزریق، پیک مربوط به گاز اتیلن و 5/28 تا 6/68 دقیقه پس از تزریق، پیک مربوط به گاز استیلن مشاهده می‌شود.

غلظت اتیلن تولید شده توسط هر جدایه با مقایسه سطح زیر پیک ایجاد شده توسط استاندارد تهیه شده از گاز اتیلن خالص با غلظت‌های 0/2، 0/4، 0/6، 0/8 و 1 میکروگرم محاسبه گردید (تارنر وگیبسون 1980).

ضدعفونی و تلقیح بذرها

ابتدا مایه تلقیح مناسب از هر جدایه (با متوسط جمعیت 2×10^8 کلنی در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون) تهیه (روش اصلاح شده وینسنت 1970) و به بذرهای کلزای ضدعفونی شده با محلول یک درصد هیپوکلریت سدیم (لیفشتیز و همکاران 1987)، تلقیح گردید. به طوریکه متوسط جمعیت باکتری بر روی بذرها معادل 2×10^7 کلنی در هر گرم بذر تلقیح شده بود.

اندازه‌گیری خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک گلدان‌ها

خاک مورد نیاز (600 کیلوگرم) برای گلدان‌ها از عمق صفر تا 30 سانتی‌متری از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه و پس از عبور از غربال 4 میلی‌متری، هوا خشک شده و با ماسه بادی به نسبت 4 به 1 مخلوط شد.

نمونه خاک مورد استفاده از نظر pH (گل اشباع)، ECe (عصاره گل اشباع)، درصد کربن آلی (به روش والکلی بلاک 1934)، بافت خاک (روش هیدرومتری)، فسفر قابل جذب (روش اولسن و قرائت با دستگاه اسپکتروفتومتر)، پتاسیم قابل جذب (روش نشر شعله‌ای و قرائت با دستگاه فلیم فتومتر) و نیتروژن کل (به روش کجلدال با دستگاه کجلتک) تجزیه شد (علی احیایی 1376).

آماده‌سازی گلدان‌ها، کاشت و کوددهی

در این آزمایش مخلوط خاک و ماسه (نسبت 4 به 1) در گلدان‌های پلاستیکی با حجم 10 کیلوگرم افزوده شد. کوددهی براساس آزمون خاک و قبل از کاشت انجام گرفت و مقادیر 29/36 میلی‌گرم در کیلوگرم کود سوپر فسفات تریپل، 46/15 میلی‌گرم در کیلوگرم کود سولفات پتاسیم و 11/15 میلی‌گرم در کیلوگرم کود اوره (برای یک مرحله از کشت) برای تیمار کودی 100 درصد استفاده شدند (مرشدی و همکاران 1379). نصف این مقادیر (14/68 میلی‌گرم در کیلوگرم کود سوپر فسفات تریپل، 23/08 میلی‌گرم در کیلوگرم کود سولفات پتاسیم و 5/57 میلی‌گرم در کیلوگرم کود اوره) برای تیمار کودی 50 درصد به‌کار رفتند. کودهای مورد نظر پس از خرد کردن و عبور از غربال 1 میلی‌متر، در مقدار آب آبیاری (تا حد ظرفیت مزرعه) حل و به محتوای هر گلدان افزوده شدند. در هر گلدان، 20 عدد بذر کلزای جوانه زده، در سطح خاک کاشته شدند. روی جوانه‌ها با 1 سانتی‌متر مخلوط خاک و ماسه پوشانده شد و سطح خاک مرطوب گردید. در مرحله سه برگی (یک هفته پس از کاشت)، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها (با متوسط جمعیت 8×10^7 کلنی در هر میلی‌لیتر سوسپانسیون) پای هر گیاهچه تزریق گردید (لین و همکاران 1983).

آزمایش در اتاقک رشد با عرض 3/5 متر، طول 4/5 متر و ارتفاع 2 متر با متوسط شدت نور 10000 لوکس انجام گرفت. دمای گلخانه بین 19/9-16/8 درجه سلسیوس و رطوبت بین 78-47 درصد در نوسان بود. طول دوره روشنایی 14/5 ساعت و طول دوره تاریکی 9/5 ساعت در نظر گرفته شد. قبل از انتقال گلدان‌ها به اتاقک رشد، سطح اتاقک توسط محلول ضدعفونی سترون گردید. گلدان‌ها 8 روز پس از کاشت، به مدت 95 روز از 8 مرداد تا 11 آبان سال 1388 تحت شرایط فوق در اتاقک رشد نگهداری شدند. آبیاری گلدان‌ها به صورت وزنی تا حد 0/8 ظرفیت مزرعه‌ای انجام گرفت.

برداشت محصول طی دو مرحله (سری اول 47 روز (مرحله 8-6 برگی) و سری دوم، 103 روز (مرحله 19-16 برگی) پس از تاریخ کاشت) انجام گرفت. تعداد گیاهچه‌ها قبل از هر مرحله از برداشت در داخل هر گلدان، به 6 عدد رسانده شدند.

در هر مرحله از برداشت، بخش هوایی گیاهچه-های موجود در هر گلدان، از سطح خاک چیده شد و ارتفاع بخش هوایی، وزن خشک بخش هوایی، وزن خشک ریشه، مقدار فسفر، پتاسیم و نیتروژن قابل جذب در اندام هوایی مربوط به هر تیمار و تکرار اندازه‌گیری شدند (امامی1375).

طرح آزمایشی و آنالیز آماری

طبق نتایج حاصله از آزمون‌های اولیه بررسی ویژگی‌های محرک رشد، 4 جدایه *Azospirillum* که از لحاظ انحلال فسفات معدنی نامحلول، توان تولید هورمون اکسین و توان تثبیت نیتروژن، بالاتر از سایر جدایه‌ها بودند انتخاب و تأثیر آنها به‌همراه شاهد (بدون تلقیح) بر روی کلزا (رقم هایولا 401) به صورت گلدانی در شرایط اتاقک رشد و در دو سطح کودی (100 و 50 درصد توصیه شده براساس آزمون خاک)، در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار و دردو مرحله برداشت مقایسه گردیدند.

نتایج و بحث

جداسازی و گروه‌بندی جدایه‌های بومی *Azospirillum*

از 38 نمونه خاک و ریشه گیاه کلزا از مناطق مختلف استان گلستان، 58 جدایه *Azospirillum* جداسازی شدند. نتایج جداسازی باکتری *Azospirillum* نشان داد که 58 جدایه مذکور توانایی تشکیل هاله در محیط NFb نیمه‌جامد، تولید کلنی قرمز و صورتی رنگ روی محیط RC و تولید کلنی صورتی رنگ روی محیط PDA را داشتند. تمامی جدایه‌ها گرم منفی، ویبروئیدی شکل، کاتالاز و اکسیداز مثبت بودند. جدایه‌های مذکور براساس آزمون‌های تکمیلی شامل توانایی رشد در محیط NFb نیمه‌جامد حاوی 3 درصد کلرید سدیم، نیازمندی به بیوتین و توان استفاده از قند گلوکز به سه گونه منسوب به *Azospirillum brasilense*، *Azospirillum lipoferum* و *Azospirillum irakense* تفکیک شدند (تارند و همکاران 1978، کریگ و دوبرینر 1986).

نتایج تجزیه خاک

نتایج تجزیه نمونه خاک مورد استفاده از نظر pH (گل اشباع)، ECe (عصاره اشباع)، درصد کربن آلی (به روش والکلی بلاک 1934)، بافت خاک (روش هیدرومتری)، فسفر قابل جذب، پتاسیم قابل جذب و نیتروژن کل مطابق جدول 1 است.

جدول 1- نتایج تجزیه برخی از خصوصیات فیزیکی وشیمیایی خاک مورد استفاده در آزمایش.

کلاس بافت	کربن آلی	نیتروژن کل	pH	ECe	فسفر	پتاسیم
	(%)		(گل اشباع)	(dS/m)	(mg/kg)	
رس سیلتی	1/1	0/11	7/5	1/27	10	167

مشخصات جدایه¬های انتخابی برای آزمون اتاقک رشد

براساس نتایج حاصله از آزمون‌های ویژگی‌های محرک رشد، 4 جدایه *Azospirillum* از لحاظ توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول (جدایه AC34-III)، تولید هورمون اکسین (جدایه‌های AC43-III و AC39-I) و تثبیت نیتروژن (جدایه AC49-VII)، به‌عنوان برترین جدایه‌ها جهت آزمون اتاقک رشد انتخاب شدند که مشخصات آنها در جدول 2 ارائه شده است.

تأثیر تلقیح 4 جدایه بومی *Azospirillum* روی شاخص-های رشدی کلزا

تجزیه واریانس تأثیر کود، باکتری و برهم‌کنش کود و باکتری در برداشت اول روی شاخص‌های رشدی کلزا (جدول 3) نشان داد که تأثیر کود بر مقدار جذب فسفر، پتاسیم و نیتروژن در سطح یک درصد و بر شاخص وزن خشک اندام هوایی در سطح 5 درصد از لحاظ آماری معنی‌دار بود. تأثیر باکتری بر شاخص-های مقدار جذب پتاسیم، نیتروژن و وزن خشک اندام هوایی در سطح 5 درصد معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل باکتری در کود بر هیچ یک از شاخص‌های رشدی معنی‌دار نبود.

نتایج تجزیه واریانس تأثیر کود، باکتری و برهم-کنش کود و باکتری در برداشت دوم روی شاخص‌های رشدی کلزا (جدول 4) نشان داد که تأثیر کود روی میزان جذب پتاسیم در سطح یک درصد و روی شاخص‌های میزان جذب نیتروژن، وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه در سطح 5 درصد از لحاظآماری معنی‌دار بود. اثر تلقیح باکتری و نیز اثر متقابل باکتری و کود روی هیچ یک از شاخص‌های رشدی اندازه‌گیری شده معنی دار نبود.

جدول 2- گونه‌های منسوب و مشخصات مربوط به نوع گیاه میزبان و مکان نمونه‌برداری 4 جدایه برتر *Azospirillum* مورد استفاده در آزمون اتاقک رشد.

شماره جدایه	گونه منسوب	گیاه میزبان	مکان نمونه‌برداری	تثبیت نیتروژن (نانومول اتیلن بر ساعت بر میلی‌لیتر)	انحلال فسفات (mg/L)	تولید اکسین (mg/L)
AC34-III (B_1)	*A. irakense*	ریزوسفر کلزا	گلستان- شمال روستای شجاع‌آباد- علی‌آباد	0	30/68	1/717
AC39-I (B_2)	*A. brasilense*	ریزوسفر کلزا	گلستان- پلیس‌راه آزادشهر	0	0	29/297
AC43-III (B_3)	*A. irakense*	ریزوسفر کلزا	گلستان- شرق دلند	0	0	39/799
AC49-VII (B_4)	*A. irakense*	ریزوسفر کلزا	گلستان- غرب دلند	60/64	19/19	9/251

جدول 3- نتایج تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های *Azospirillum* بر روی برخی پارامترهای رشدی گیاه کلزا در برداشت اول

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		میزان فسفر جذب شده	میزان پتاسیم جذب شده	میزان نیتروژن جذب شده	ارتفاع اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه
تکرار	2	0/23 *	112/59 *	142/24 **	3/85 ns	0/04 *	0/014 **
کود (F)	1	1/22 **	236/84 **	179/44 **	1/24 ns	0/06 *	0/000 ns
باکتری (B)	4	0/13 ns	93/15 *	67/63 *	2/64 ns	0/02 *	0/004 ns
B × F	4	0/08 ns	46/61 ns	23/89 ns	1/79 ns	0/01 ns	0/004 ns
خطا	18	0/06	22/36	18/6	1/12	0/01	0/002
ضریب تغییرات		14/64	15/33	14/94	6/996	14/854	29/7

*، ** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد، 1 درصد و عدم تفاوت معنی‌دار.

جدول 4- نتایج تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های *Azospirillum* بر روی برخی پارامترهای رشدی گیاه کلزا در برداشت دوم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		میزان فسفر جذب شده	میزان پتاسیم جذب شده	میزان نیتروژن جذب شده	ارتفاع اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	وزن خشک ریشه
تکرار	2	34/53 **	4081/82 *	3631/52 *	22/7 *	2/10 **	0/09 ns
کود (F)	1	15/97 ns	8212/12 **	3656/57 *	5/2 ns	1/41 *	0/16 *
باکتری (B)	4	7/86 ns	977/09 ns	867/08 ns	10/2 ns	0/37 ns	0/02 ns
B × F	4	0/42 ns	441/36 ns	551/82 ns	3/8 ns	0/33 ns	0/02 ns
خطا	18	4/58	697/77	634/18	3/9	0/3	0/03
ضریب تغییرات		16/84	14/51	14/56	6/12	14/31	23/87

*، ** و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد، 1 درصد و عدم تفاوت معنی‌دار.

آزمایشات بیاری و همکاران (2008) بر روی تحریک رشد و افزایش جذب عناصر غذایی ذرت (*Zea mays* L.) توسط کاربرد ریزوباکترهای محرک رشد گیاه (سویه‌های *Azotobacter* و *Azospirillum*) در منطقه شاهرود، نشان داد که تیمار با PGPRها به طور معنی-دار ارتفاع گیاه، وزن خشک اندام هوایی و دانه، تعداد دانه را در هر ردیف افزایش داد. همچنین جذب عناصر غذایی N، P، K، Fe، Zn، Mn و Cu به طور معنی‌دار تحت تأثیر این باکتری‌ها قرار گرفت.

اثر سویه‌های مختلف از باکتری‌های محرک رشد (*Pseudomonas putida*، *Pseudomonas fluorescens*، *Azospirillum lipoferum* و *Azospirillum. brasilense*) روی رشد و عملکرد ذرت حاکی از افزایش معنی-دار در جوانه‌زنی دانه، قدرت گیاهچه‌های ذرت، وزن خشک اندام هوایی و برگ و خوشه، مساحت سطح برگ، ارتفاع گیاه، وزن 100 دانه و تعداد دانه در هر خوشه بود (غلامی و همکاران 2009).

نتایج آزمایشات بر روی اثر دو باکتری *Azospirillum brasilense* و *Azotobacter chroococcum* روی شاخص‌های رشد گندم نشان داد که تیمارهای باکتری سبب افزایش معنی‌دار عملکرد، تعداد پنجه و میزان جذب نیتروژن و فسفر گیاه در سطح یک درصد گردید. همچنین تیمارهای تلفیقی دو باکتری تأثیرات به مراتب بهتری نسبت به تیمارهای هر یک از باکتری‌ها به تنهایی داشتند (محمدی 1388). رجب‌زاده (1388) تأثیر جدایه‌های بومی *Azospirillum* جدا شده از ریزوسفر برنج در نقاط مختلف استان گلستان روی عملکرد دو رقم برنج (ندا و هاشمی) در دو سطح کودی در شرایط گلخانه بررسی نمود. نتایج بیانگر افزایش معنی‌دار در سطح 5 درصد در عملکرد دانه، تعداد دانه در هر گلدان، وزن تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و تراکم ریشه در تیمارهای تلقیح شده نسبت به شاهد بودند.

نتایج مقایسه میانگین سطوح مختلف کودی روی شاخص‌های رشدی کلزا (رقم هایولا 401) در برداشت اول (جدول 5) نشان داد که تفاوت معنی‌داری از لحاظ جذب فسفر، پتاسیم و نیتروژن و وزن خشک اندام هوایی بین تیمار کودی 100 درصد با تیمار 50 درصد وجود دارد و با کاهش میزان کود مقدار نیتروژن، فسفر و پتاسیم کاهش و به تبع آن مقدار وزن خشک اندام هوایی کاهش یافت. نتایج مقایسه میانگین تأثیر تلقیح جدایه‌های بومی *Azospirillum* (جدول 5) نیز نشان داد که اولاً بین جدایه‌ها از لحاظ تأثیرگذاری روی شاخص-های رشدی تفاوت معنی‌داری وجود نداشت، اما این تأثیر در مقایسه با تیمار شاهد تلقیح نشده از لحاظ آماری و در اکثر موارد معنی‌دار بود.

جدول 5- مقایسه میانگین تأثیر جدایه‌های *Azospirillum* و سطوح کودی اعمال شده بر روی برخی پارامترهای رشدی گیاه کلزا در برداشت اول

تیمار	میزان فسفر جذب شده (mg/pot)	میزان پتاسیم جذب شده (mg/pot)	میزان نیتروژن جذب شده (mg/pot)	ارتفاع اندام هوایی (cm)	وزن خشک اندام هوایی (g/pot)	وزن خشک ریشه (g/pot)
سطح کودی 100% (F_1)	1/81 a	33/66 a	31/32 a	14/889 a	0/622 a	0/144 a
سطح کودی 50% (F_2)	1/41 b	28/04 b	26/42 b	15/295 a	0/533 b	0/147 a
B_0 (شاهد)	1/36 b	24/1 b	23/13 b	13/945 b	0/468 b	0/117 b
B_1 (AC34-III)	1/62 ab	30/88 a	28/79 a	15/153 ab	0/578 a	0/152 ab
B_2 (AC39-I)	1/65 a	32/41 a	30/17 a	15/305 a	0/607 a	0/185 a
B_3 (AC43-III)	1/72 a	34/01 a	31/43 a	15/612 a	0/627 a	0/152 ab
B_4 (AC49-VII)	1/69 b	32/87 a	30/84 a	15/447 a	0/608 a	0/122 b

حروف مشابه در هر ستون به معنای غیر معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح 5 درصد، به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) می‌باشد.

باشان و دوبروفسکی (1996) در آزمایشات خود عنوان نمودند که تلقیح گیاه با *Azospirillum* علاوه بر تأثیر بر روی رشد ریشه‌ها، موجب افزایش رشد اندام‌های هوایی و ارتفاع گیاه نیز می‌شود. آنها به این نتیجه رسیدند که حتی در اثر تلقیح، نسبت اندام‌های هوایی به ریشه می‌تواند افزایش یابد، به طوری که عکس‌العمل رشد اندام‌های هوایی بیش از ریشه‌ها می‌باشد. تلقیح با باکتری *Azospirillum* علاوه بر تأثیر بر روی پارامترهای مربوط به ریشه، بر روی بسیاری از پارامترهای رویشی و اندام‌های سبز گیاه نیز مؤثر است. این تغییرات مستقیماً به تأثیر مثبت *Azospirillum* در افزایش جذب یون‌هایی نظیر NO_3^-، NH_4^+، PO_4^{-3}، K^+، Rb^+، Fe^{+3} بستگی داشته و علت اصلی افزایش وزن خشک اندام‌های سبز (هوایی) می‌باشد (لین و همکاران 1983، جین و پاتریکوئین 1985، مارتی و لادها 1987). نتایج آزمایشات گلخانه‌ای عرب (1385) بر روی اثرات جدایه‌های بومی *Azospirillum* جدا شده از ریشه غلات در سطح استان‌های تهران، گلستان و خوزستان روی شاخص‌های رشد و عملکرد گیاه ذرت شیرین نشان داد که گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن، بیوسنتز کننده هورمون‌های اکسینی و حل کننده فسفات‌های معدنی و آلی نسبت به سایر تیمارهای باکتریایی به ترتیب دارای بالاترین مقدار کل جذب عناصر نیتروژن و فسفر بودند. مطالعات شکری واحد و همکاران (1388) در مورد تأثیر کود بیولوژیک حاوی *Azospirillum* بر عملکرد، جذب نیتروژن و برخی اجزای عملکرد برنج هاشمی نشان داد که تلقیح ریشه نشاء برنج با این باکتری قبل از انتقال به زمین اصلی به همراه مصرف 45 کیلوگرم نیتروژن خالص در هکتار از منبع اوره سبب افزایش 18% در عملکرد دانه و 8% در عملکرد کاه و کلش می‌شود. همچنین بر روی مقدار جذب نیتروژن، وزن 1000 دانه، تعداد پنجه و طول خوشه در مقادیر مختلف تأثیرگذار بود.

همچنین نتایج مقایسه میانگین تیمارها در برداشت دوم (جدول 6) نشان داد که در تأثیر تیمار کودی با کاهش میزان کود از 100 درصد به 50 درصد، میزان جذب فسفر، پتاسیم، نیتروژن، وزن خشک اندام هوایی و وزن خشک ریشه کاهش یافت.

جدول 6- مقایسه میانگین تأثیر جدایه‌های *Azospirillum* و سطوح کودی اعمال شده بر روی برخی پارامترهای رشدی گیاه کلزا در برداشت دوم

تیمار	میزان فسفر جذب شده (mg/pot)	میزان پتاسیم جذب شده (mg/pot)	میزان نیتروژن جذب شده (mg/pot)	ارتفاع اندام هوایی (cm)	وزن خشک اندام هوایی (g/pot)	وزن خشک ریشه (g/pot)
سطح کودی 100% (F_1)	13/44 [a]	198/55 [a]	184/05 [a]	32/688 [a]	3/982 [a]	0/773 [a]
سطح کودی 50% (F_2)	11/98 [a]	165/46 [b]	161/97 [b]	31/856 [a]	3/55 [b]	0/626 [b]
B_0 (شاهد)	11/61 [ab]	172/29 [a]	164/89 [a]	33/36 [ab]	3/642 [a]	0/638 [a]
B_1 (AC34-III)	13/26 [ab]	186/88 [a]	176/2 [a]	32/48 [abc]	3/834 [a]	0/694 [a]
B_2 (AC39-I)	11/39 [b]	165/04 [a]	156/92 [a]	30/82 [c]	3/398 [a]	0/65 [a]
B_3 (AC43-III)	13/28 [ab]	190/95 [a]	180/22 [a]	33/66 [a]	3/946 [a]	0/728 [a]
B_4 (AC49-VII)	14 [a]	194/86 [a]	186/83 [a]	31/04 [bc]	4/01 [a]	0/788 [a]

حروف مشابه در هر ستون به معنای غیر معنی‌دار بودن میانگین‌ها در سطح 5 درصد، به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) می‌باشد.

از مقایسه نتایج حاصل از برداشت اول و دوم (جداول 3 و 4) می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که تأثیر تلقیح جدایه‌های *Azospirillum* در مراحل اولیه رشدی بیشتر است، لذا در آزمایشات مربوط به تأثیر باکتری *Azospirillum* روی شاخص‌های رشدی زمان اول پیشنهاد می‌گردد.

فیتوهورمون‌های ساخته شده توسط *Azospirillum* بر روی سرعت تنفس، متابولیسم، رشد و توسعه ریشه مؤثرند، در نتیجه جذب آب و عناصر غذایی در گیاهان تلقیح شده را افزایش می‌دهند (هولگوین و همکاران 1999). باشان و همکاران (2004) بیان نمودند که افزایش کارایی جذب عناصر غذایی توسط گیاهان احتمالاً به‌دلیل افزایش سطح جذب ریشه در اثر تلقیح با باکتری‌های *Azospirillum* مولد هورمون می‌باشد. در واقع *Azospirillum* با تولید هورمون‌های گیاهی باعث تحریک منشعب شدن ریشه، افزایش زیست توده ساقه و ریشه، تحریک چرخه تولید مثلی و با افزایش نفوذ پذیری ریشه و افزایش جذب عناصر معدنی باعث افزایش زیست توده و عناصر غذایی می‌گردد (باشان و دی- باشان 2005).

بیشترین میزان جذب فسفر اندام هوایی در برداشت اول (جدول 5) مربوط به سطح کودی 100 درصد بود. شاید بتوان چنین استنباط نمود که در مراحل اولیه رشد، به‌دلیل کمبود میزان فسفر در خاک، گیاه نسبت به استفاده از کود کامل جواب مثبت داشته و پس از آن میزان سطح کود تأثیر معنی‌داری در جذب فسفر گیاه نداشته است. افزایش میزان جذب عناصر غذایی در تیمار باکتریایی حل کننده فسفات معدنی را می‌توان به افزایش فراهمی عناصر نسبت داد (مارتی و لادها 1987، لین و همکاران 1983). این افزایش احتمالاً می‌تواند به‌دلیل تأثیر باکتری‌های *Azospirillum* حل کننده فسفات معدنی بر افزایش وزن خشک ریشه و در نتیجه افزایش جذب عناصر غذایی باشد (باشان و همکاران 2004). باربر و همکاران (1976) نشان دادند که جوامع مرکب باکتری‌های ریزوسفر جذب فسفات را توسط گیاهچه‌های جوان جو افزایش می‌دهند، در حالیکه سبب کاهش جذب فسفر در گیاهان مسن‌تر می‌گردند.

بیشترین میزان جذب پتاسیم اندام هوایی در هر دو برداشت اول و دوم (جداول 5 و 6) مربوط به سطح

کودی 100 درصد در تیمار های تلقیح شده با جدایه هایی آزوسپیریلومی بود که از این لحاظ با تیمار بدون تلقیح تفاوت معنی داری داشتند. همچنین بین جدایه‌های باکتری از نظر آماری تفاوتی وجود نداشت و در یک سطح قرار داشتند. درنتیجه می‌توان چنین بیان نمود که در ماه‌های اولیه رشد کلزا، افزودن باکتری به‌همراه کود شیمیایی سبب افزایش جذب پتاسیم در گیاه می‌گردد.

بررسی اثر جوامع مختلف باکتریایی (*Azospirillum brasilense* و *Azotobacter chroococcum*) و قارچی (*Aspergilus niger* و *Trichoderma harzianum*) بر روی آزادسازی پتاسیم خاک از کانی‌های سیلیکاته نشان داد که تأثیر تلقیح خاک با تیمار باکتری و تیمار تلفیقی باکتری و قارچ در آزاد سازی پتاسیم بیشترین مقدار را داشت (فرشادی-راد و همکاران 1388). نتایج آزمایشات گلدانی و مزرعه‌ای میخایلوسکایا و همکاران (2003) نشان داد که حد متعادل پتاسیم و فسفر، شرط لازم برای تثبیت نیتروژن در باکتری *Azospirillum brasilense* همیار با ریشه‌های کتان می‌باشند. آنها عنوان نمودند که فسفر و پتاسیم نقش اصلی در ایجاد رابطه همیاری بین ریشه و باکتری تثبیت کننده نیتروژن دارند. بنابراین تلقیح باکتری مذکور به همراه استفاده از کودهای فسفر و پتاسیم باعث افزایش معنی‌دار در عملکرد کتان و همچنین بهبود کیفیت فیبر در این گیاه گردید.

بیشترین میزان جذب نیتروژن اندام هوایی در هر دو برداشت اول و دوم (جداول 5 و 6) مربوط به سطح کودی 100 درصد می‌باشد. در برداشت دوم اختلاف معنی‌داری از نظر آماری بین جدایه‌های باکتری و شاهد وجود نداشت. احتمالاً دلیل محدودیت تأمین نیتروژن تثبیت شده آن است که *Azospirillum* مانند دی-آزوتروف‌های آزادزی و بر خلاف *Rhizobium*های همزیست، نیتروژن تثبیت شده را به سلول ترشح نمی-کند. همچنین *Azospirillum* مکانیسم مؤثری برای جذب نیتروژن تثبیت شده دارد و این امر احتمال نشت آمونیوم به بیرون از سلول باکتری، به‌طوری که قابل برداشت توسط گیاه میزبان باشد را مشکل می‌کند. تثبیت نیتروژن در گیاهان تلقیح شده، فقط بخش کوچکی از نیتروژن مورد نیاز گیاه را تأمین می‌کند. به‌علاوه تثبیت نیتروژن فقط در شرایط فشار کم اکسیژن و هنگامی‌که ترکیبات نیتروژنی به میزان کم در اختیار گیاه باشد، مشاهده می‌شود (میچلز و همکاران 1989). آلاگاوادی و گار (1992) اظهار داشتند که مایه تلقیح تلفیقی *Azospirillum* و *Pseudomonas striata* به‌طور معنی‌دار سبب افزایش عملکرد، جذب N و P در گیاه سورگوم گردید. باتاری و هس (1993) مشاهده کردند که تلقیح گندم با *Azospirillum lipoferum* جدا شده از واریته‌های بومی، موجب افزایش نیتروژن کل اندام هوایی به میزان 39 درصد شده است. آنها اظهار داشتند که باکتری‌های بومی می‌توانند همیاری بهتری با واریته-های بومی گیاهان ایجاد نمایند که علت آن را سازگاری با شرایط محیطی و توانایی رقابت بیشتر این باکتری‌ها نسبت به باکتری‌های غیر بومی عنوان نمودند.

در نهایت با تفسیر نتایج حاصل از این پژوهش مشخص می شود که افزودن باکتری به‌همراه کود شیمیایی سبب افزایش جذب عناصر غذایی در گیاه گردید. همچنین باکتری زمانی می‌تواند در مراحل اولیه رشد گیاه، حداکثر تأثیر را داشته باشد که کود کامل به خاک داده شود.

سپاسگزاری

از کارکنان محترم آزمایشگاه شیمی خاک بخش تحقیقات خاک و آب مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان به‌ویژه آقای مهندس ربیع‌زاده، خانم مهندس یغمایی، خانم مسگر و خانم عبداللهی در اجرای این تحقیق کمال تشکر را دارم. همچنین از کارکنان بخش‌های اصلاح بذر و گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات بالاخص آقایان دکتر فرجی، دکتر آقاجانی و مهندس قدیری‌راد قدردانی می‌نمایم. از جناب آقای

مهندس محمدنژاد و جناب آقای دکتر بنده حق بـه‌خـاطر کمک‌هـای بـی‌دریغشـان در مسـائل آمـاری پایـان‌نامـه سپاسگزارم.

منابع مورد استفاده

آلیاری ه و شکاری ف، 1379. دانه‌های روغنی. نشر عمیدی.

ارزانش مح، 1387. بررسی پتانسیل کاربرد برخی از جدایه‌های آزوسپیریلومی محرک رشد گیاه بر عملکرد گندم (*Triticum aestivum* L.) در سطوح مختلف خشکی. رساله دکتری تخصصی. دانشکده مهندسی آب و خاک، گروه مهندسی علوم خاک، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

احمدی مر، 1369. ویژگی‌های بوتانیکی و پاره‌ای از مسائل کشت گیاه روغنی کلزا. مؤسسه اصلاح تهیه نهال و بذر. بخش تحقیقات دانه‌های روغنی.

امامی ع، 1375. روش‌های تجزیه گیاه. جلد اول. نشریه شماره 982، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران.

بی‌نام، 1387. آمارنامه کشاورزی. جلد اول. دفتر آمار و فناوری اطلاعات. معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی. وزارت کشاورزی.

رجب‌زاده ف، 1388. جداسازی، شناسایی و به‌کارگیری باکتری *Azospirillum* spp. از باکتری‌های PGPR در افزایش رشد برنج در شرایط گلخانه‌ای. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

روستا مج، 1375. بررسی فراوانی و فعالیت آزوسپیریلوم در برخی از خاک‌های ایران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه تهران.

شکری واحد ح، رحیمی مقدم ا، محمدیان م و شاهین رخسار پ، 1388. بررسی تأثیر کود بیولوژیک حاوی باکتری جنس *Azospirillum* بر عملکرد، جذب ازت و برخی اجزای عملکرد برنج هاشمی. صفحه‌های 139 تا 140. یازدهمین کنگره علوم خاک ایران (مجموعه مقالات). دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

شهیدی ا و فروزان ک، 1376. کلزا. نشر شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی. چاپ اول. تهران.

خاوازی ک و ملکوتی م ج، 1380. ضرورت تولید صنعتی کودهای بیولوژیک در کشور. نشر آموزش کشاورزی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، کرج، ایران.

عرب س‌م، 1385. بررسی مؤلفه‌های محرک رشدی جدایه‌های بومی باکتری‌های جنس *Azospirillum* و اثرات تلقیح انواع برتر آنها بر روی شاخص‌های رشد، عملکرد و اجزای عملکرد گیاه ذرت شیرین. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده تولیدات گیاهی و دامی، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه تهران.

علی احیایی م، 1376. شرح روش‌های تجزیه شیمیایی خاک. جلد اول. نشریه شماره 893، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران.

علی احیایی م، 1376. شرح روش‌های تجزیه شیمیایی خاک. جلد دوم. نشریه شماره 1024، مؤسسه تحقیقات خاک و آب، تهران.

فرشادی‌راد ا، دردی‌پور ا و ارزانش مح، 1388. بررسی اثر جوامع مختلف باکتریایی و قارچی بر روی آزادسازی پتاسیم خاک. صفحه‌های 292 تا 294. یازدهمین کنگره علوم خاک ایران (مجموعه مقالات). دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

محمدی ر، 1388. مقایسه اثرات کود اوره، مواد آلی و باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) بر عملکرد و برخی خصوصیات رشد گندم رقم الوند. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم زراعی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

مرشدی آ، رضایی ح و ملکوتی م ج، 1379. چگونگی تأمین نیاز غذایی دانه‌های روغنی. نشریه فنی شماره 115. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. مؤسسه تحقیقات خاک و آب.

Alagawadi AR and Gaur AC, 1992. Inoculation *of Azospirillum brasilense* and phosphate-solubilizing bacteria on yield of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Monench) in dry land. Tropical Agriculture 69: 347-350.

Albrecht SL, Okon Y, Lonnquist J and Burris RH, 1981. Nitrogen fixation by corn- *Azospirillum* associative in temperate climate. Crop Science 21: 301-306.

Barber DA, Bowen GD and Rovira AD, 1976. Effects of microorganisms on absorption and distribution of phosphate in barley. Australian Journal of Plant Physiology 3: 801-808.

Bashan Y and Dubrovsky JG, 1996. *Azospirillum* spp. participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. Biology and Fertility of Soils 22: 435-440.

Bashan Y and de-Bashan LE, 2005. Plant growth-promoting. Pp. 103-115. In: Hillel D (Editor-in-Chief). Encyclopedia of Soils in the Environment. Elsevier, Oxford, U.K.

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

Bhattari T and Hess D, 1993. Yeild response of Nepalese spring wheat (*T. aestivum*) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. Plant and Soil 151: 67-76.

Biari A, Gholami A and Rahmani HA, 2008. Growth promotion and enhanced nutrient uptake of maize (*Zea mays* L.) by application of plant growth promoting rhizobacteria in arid region of Iran. Journal of Biological Sciences 8: 1015-1020.

Bric JM, Bostock RM and Silverstone SE, 1991. Rapid in situ assay for indole acetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Applied and Environmental Microbiology 57: 535-538.

Caceres EAR, 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. Applied and Environmental Microbiology 44: 990-991.

Dobereiner J, 1992. The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. Pp. 2236-2253. In: Balows A, Truper HG, Dworkin M, Harger W and Schleifer KH (eds). The Prokaryotes. Springer Verlag, New York.

Dobereiner J and Day JM, 1976. Associative symbiosis and free-living systems. Pp. 518-538. Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State University Press. Pullman, Washigton.

Dubey RC and Maheshwari DK, 2005. Practical Microbiology. S. Chand and Company Ltd. New Delhi, India.

Fallik E, Okon Y, Epstein E, Goldman A and Fischer M, 1989. Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense* inoculated maize roots. Soil Biology and Biochemistry 21: 147-153.

Gholami A, Shahsavani S and Nezarat S, 2009. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. World Academy of Science, Engineering and Technology 49: 19-24.

Glick BR, 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. Canadian Journal of Microbiology 41: 109-117.

Holguin G, Patten CL and Glick BR, 1999. Genetics and molecular biology of *Azospirillum*. Biology and Fertility of Soils 29: 10-23.

Jain Dk and Patriquin DG, 1985. Characterization of substance produced by *Azospirillum* with causes branching of wheat root hairs. Canadian Journal of Microbiology 31: 206-210.

Kapulnik Y, Kigel J, Okon Y, Nur I and Henis Y, 1981. Effect of *Azospirillum* inoculums on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. Plant and Soil 61: 65-67.

Krieg NR and Dobereiner J, 1986. The genus *Azospirillum*. Vol I. Pp. 96-104. In: Krieg NR and Holt JG (eds). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.

Lifshtiz R, Kloepper JWE, Kozlowski M, Simonson C, Carlson J, Tipping EM and Zaleska I, 1987. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. Canadian Journal of Microbiology 33: 309-395.

Lin W, Okon Y and Hardy R, 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Applied and Environmental Microbiology 45: 1775-1779.

Martinez-Morales LJ, 2003. Indol-3-acetic acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett. 228: 167-173.

Marty MG and Ladha JK, 1987. Differential colonization of *Azospirillum lipoferum* on roots of two varieties of rice (*Oryzea sativa*). Biology and Fertility of Soils 4: 3-7.

Michiels K, Vanderleyden J and Van Gool A, 1989. *Azospirillum* plant root association: a review. Biology and Fertility of Soils 8: 356-368.

Mikhailouskaya N, Kurilovitch N and Djusova S, 2003. The effect of phosphorus and potassium fertilization on the efficiency of flax bacterization. Pp. 43-47. Proceedings of the Latvia University of Agriculture. Jelgava. Latvia.

Morinaga T, 1934. Interspecific hybridization in *Brassica*. The cytology of F_1 hybrids of *B. juncea* and *B. nigra*. Cytologia 6:62-67.

Okon Y and Labandera-Gonzalez CA, 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. Soil Biology and Biochemistry 26: 1591-1601.

Olsen S, Cole C, Watanabe F and Dean L, 1954. Estimation of Available Phosphorus in Soils by Extraction with Sodium Bicarbonate. USDA Circular No. 939. US Govt. Print. Office, Washington, D.C.

Rajendran K and Devaraj P, 2004. Biomass and nutrient distribution and their return of *Casuarina equisetifolia* inoculated with biofertilizers in farm land. Biomass and Bioenergy 26: 235-249.

Rodriguez H, Gonzalez T, Goire I and Bashan Y, 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. Naturwissenschaften 91: 552-555.

Tarrand JJ, Krieg NR and Dobereiner J, 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. Canadian Journal of Microbiology 24: 967-980.

Turner GL and Gibson AH, 1980. Measurements of nitrogen fixation by indirect means. Pp. 111-138. In: Bergerson FJ (ed). Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation. John Wiley and Sons. New York.

U N, 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *Brassica napus* and peculiar mode of fertilization. Japanese Journal of Botany 7:389-452.

Vincent JM, 1970. A Manual for the Practical Study of Root Nodule Bacteria. IBP Handbook No. 15. Blackwell Scientific Publications. Oxford.

Walkley A and Black IA, 1934. An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in digestion conditions and of inorganic soil constituents. Soil Science 63:251-263.