بررسی توانایی تولید اکسین توسط باکتری‌های جداسازی شده بومی جنس *آزوسپیریلوم* و ارزیابی اثرات محرک رشدی جدایهٔ برتر بر گیاه ذرت شیرین

سید مهدی عرب[۱]، غلامعباس اکبری[۲]، حسینعلی علیخانی[۳]، محمدحسین ارزانش[۴]، ایرج الهدادی[۵]

چکیده

سالهاست که باکتریهای جنس *آزوسپیریلوم* به عنوان عامل محرک رشد گیاهان خانوادهٔ غلات معرفی شده‌اند. تولید فیتوهورمونها، بویژه اکسین، به عنوان یکی از مهمترین عوامل افزایش عملکرد در گیاهان تلقیح شده شناخته شده است. بر همین اساس تعداد ۵۲ جدایه باکتری از ریشهٔ گیاهان این خانواده جداسازی، شناسایی و خالص‌سازی شدند و پس از انجام آزمون‌های کیفی و کمی تولید اکسین به روش رنگ سنجی، اثرات جدایهٔ برتر بیوسنتزکنندهٔ اکسین بر روی گیاه ذرت شیرین مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بخش جداسازی باکتری از ریزوسفر نشان دادند که احتمال دستیابی به باکتریهای این جنس پایین و در حدود ۱۷٪ بوده‌است. بعلاوه اینکه در آزمون کیفی ۳۱/۲٪ و در آزمون کمی تمامی جدایه‌ها توانایی تولید اکسین را دارا بودند. در قسمت آزمون گلخانه‌ای، تیمار باکتریایی اثر معنی‌داری برروی وزن‌تر بلال، وزن خشک ریشه و کل اندام هوایی و نیز میزان نیتروژن و فسفر گیاه برجای گذاشت. افزایش سطح و وزن خشک ریشه در مقایسه با تیمار شاهد و در نتیجه بالا رفتن سطح جذب مواد غذایی، یکی از دلایل افزایش عملکرد در گیاهان تلقیح شده در نظر گرفته شد. در مجموع، نتایج گلخانه‌ای این تحقیق در تأیید نتایج درون شیشه‌ای نشان داد که باکتری‌های *آزوسپیریلوم* برای گیاه ذرت شیرین سودمندی نسبتاً مناسبی داشته است.

واژه‌های کلیدی: آزوسپیریلوم، اکسین، آزمون کیفی و کمی، ذرت شیرین.

مقدمه

آزوسپیریلوم یکی از معروف‌ترین میکروارگانیزم‌هایی است که می‌تواند در ریزوسفر غلات و اطراف ریشهٔ آنها کلونی تشکیل دهد. بسیاری از استرینهای *آزوسپیریلوم* توانایی تولید برخی از هورمون‌های گیاهی را در محیط کشت مایع از خود نشان داده‌اند و مهم‌ترین هورمون تولیدی توسط آنها هورمون اکسین می‌باشد. سایر هورمون‌ها نیز اگرچه به مقدار کمی تولید می‌شوند، ولی دارای اثرات بیولوژیکی زیادی هستند (۱۵،۱۳،۱۱،۴و۲۳). همچنین تولید فیتوهورمونها توسط میکروارگانیزم‌ها مهمترین دلیل افزایش عملکرد در گیاهان تلقیح شده توسط باکتری *آزوسپیریلیوم* ذکر شده است (۷). امروزه مشخص شده سویه‌هایی از *آزوسپیریلوم* که تولید مقادیر بیشتری از اکسین می‌نمایند، به مراتب تأثیر بالاتری در مقایسه با برخی از انواع موتانت (جهش یافته) آزوسپیریلوم که قابلیت تولید اکسین را ندارند، بر روی مورفولوژی ریشه بر جای می‌گذارند (۴). تلقیح با *آزوسپیریلوم* علاوه بر تأثیر برروی پارامترهای مربوط به ریشه، برروی بسیاری از پارامترهای رویشی و اندام‌های سبز گیاه نیز مؤثر است. این تغییرات مستقیماً به تأثیر مثبت *آزوسپیریلوم* در جذب مواد معدنی توسط گیاه بستگی دارد. افزایش جذب یون‌هایی نظیر NO_3^-، NH_4^+، PO_4^{-3} و K^+ به واسطهٔ حضور *آزوسپیریلوم* می‌تواند علت اصلی افزایش وزن خشک اندام‌های هوایی باشد (۱۵،۱۸،۱۹).

بررسی نتایج ۲۰ سالهٔ آزمایشات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای حاکی از موفقیت ۶۰ تا ۷۰ درصدی باکتری *آزوسپیریلوم* و

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد پردیس کشاورزی دانشگاه تهران- ۲، ۳ و ۵ اعضای هیأت علمی پردیس کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران و۴ عضو هیأت علمی موسسهٔ خاک و آب، تهران.

افزایش عملکردی عمدتاً در محدودهٔ بین ۱۰ تا ۳۰ درصد است (۵). در شرایط گلخانه و در گلدان اثرات باکتری *آزوسپیریلوم لیپوفروم* بر روی رشد آفتابگردان مثبت ارزیابی شد (۱۰). در شرایط مزرعه‌ای نیز اثر *آزوسپیریلوم لیپوفروم* بر روی ذرت به صورت دو برابرشدن تعداد دانه در بلال، افزایش وزن خشک بذور تا ۵۹٪ و افزایش در توسعهٔ ریشه در زمان برداشت، مشاهده شد (۱۲).

برای اندازه‌گیری اکسین‌های گیاهی یا میکروبی تولیدشده در خاک یا محیط‌های کشت می‌توان از روش‌های رنگ‌سنجی[1] استفاده نمود. بریک و همکاران (۸) روش جدیدی را برای تعیین توانایی باکتری‌ها در تولید اکسین ابداع نمودند. روش پیشنهادی آنها نیز مبتنی بر رنگ‌سنجی می‌باشد. در این روش می‌توان تعداد نسبتاً زیادی از ایزوله‌های باکتریایی را از نظر توان تولید اکسین مورد ارزیابی قرار داد. لذا روشی بسیار مناسب، سریع و ارزان با دقت لازم برای غربالگری تعداد زیاد باکتری‌های *آزوسپیریلومی* به حساب می‌آید.

این پژوهش با تأکید و تمرکز بر اهدافی چون جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی باکتری‌های بومی جنس *آزوسپیریلوم* و بررسی توانایی آنها در بیوسنتز هورمون‌های ایندولی و همچنین ارزیابی اثرات کاربرد مایه تلقیح جدایهٔ برتر، بر عملکرد و جذب عناصر غذایی در گیاه ذرت شیرین برنامه‌ریزی شد و برای دستیابی به اهداف یاد شده، در دو مرحلهٔ آزمایشگاهی و گلخانه‌ای به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

آزمون‌های درون شیشه‌ای (in vitro)

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی باکتریهای جنس *آزوسپیریلوم*:

ابتدا تعداد ۸۰ نمونهٔ گیاهی از خانواده غلات[2] از سطح استان‌های تهران و خوزستان جمع‌آوری شدند. مهم‌ترین گونه‌های جمع‌آوری شده عبارت بودند از گندم، ذرت، جو، یولاف، چاودار. پس از جمع‌آوری، ریشه‌ها به قطعات ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری تقسیم شده و با آب مقطر استریل به خوبی شستشو داده شدند. محیط های کشت استفاده شده در این آزمایش محیط های توصیه شده توسط رودریگوئز کاسرس (Congo Red Agar medium = Rojo Congo (RC)) (۲۱) و بالدانی و دوبرینر (۲) (N-free semisolid malate = NFb medium) بودند. ریشه‌ها در محیط کاملاً استریل و در دو تکرار در لوله‌های آزمایشی حاوی محیط نیمه جامد NFb؛ در انتهای لوله، قرار داده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، محیط سبز رنگ به دو قسمت آبی (در بالا) و سبز شفاف (در پایین) تبدیل شد. تشکیل هالهٔ غلیظ، مواج و سفیدرنگ به فاصلهٔ ۱ تا ۴ میلی‌متر از سطح محیط نشان‌دهندهٔ احتمال وجود باکتری‌های جنس *آزوسپیریلوم* در نظر گرفته شد. نمونه‌هایی که در محیط نیمه جامد NFb ایجاد هاله کرده بودند (با آلوده کردن حلقه پلاتینی در قسمت تشکیل هاله) به محیط جامد RC حاوی کنگورد منتقل شده و در انکوباتور در دمای ۳۷-۳۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرارداده شدند. پس از ۱۰-۷ روز کلونی‌های مشکوک به *آزوسپیریلوم* (با مشخصات جذب کنگورد، چروکیده، خشک و زخم مانند با حواشی مضرس) شناسایی و به محیط مایع NFb منتقل شدند. با تشکیل مجدد هاله در محیط کشت، به احتمال قریب به یقین می‌توان گفت که کلونی مورد نظر *Azospirillum* است. با انجام آزمایشات تکمیلی میکروسکوپی (رنگ آمیزی گرام، اندازه، شکل و رنگ کلونی) باکتری‌های مورد نظر پس از بازکشت‌های متوالی، خالص شده و به Slant برای آزمایشات بعدی منتقل شدند.

آزمون نیمه‌کمی توان تولید IAA:

سنجش نیمه‌کمی توانایی تولید IAA توسط جدایه‌های بومی *آزوسپیریلوم* براساس روش پیشنهادی بریک و همکاران (۱۹۹۱) انجام گردید (۸). در این روش از ظروف پلیت یکبار مصرف استریل، ۹ سانتی‌متری استفاده شد. هر ظرف پلیت با رسم خطوط مناسب در زیر آن، به ۹ مربع کوچک به ابعاد حدود ۲/۰ × ۲/۰ سانتی‌متر تقسیم گردید. درون هر ظرف پلیت ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت استریل شده LB[3] ریخته شد. این محیط شامل ۱۰ گرم باکتوتریپتون، ۵ گرم عصارهٔ مخمر، ۵ گرم کلرور سدیم، ۲۰ گرم باکتو-آگار و ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر است که به آن معادل

1. Colorimetric Methods
2. Gramineae
3. Luria-Bertani

۵mM مادهٔ ال-تریپتوفان (L-TRP) نیز افزوده می‌شود (LBT). آنگاه با استفاده از چوب‌های خلال استریل شده، سطح محیط کشت LB در نقطهٔ مرکزی هر یک از مربعات فوق‌الذکر با مایه تلقیح هر جدایهٔ *آزوسپیریلوم* مایه‌زنی گردید. سپس یک برگ غشاء نیتروسلولز بر روی محیط کشت مایه‌زنی شدهٔ LB قرار داده شد. ظروف پلیت بصورت واژگون درون انکوباتور(۲۷°C) به مدت ۱ تا ۲ روز خوابانیده شدند و بصورت روزانه از نظر اندازهٔ رشد باکتری مورد مشاهده و ارزیابی قرار گرفتند. زمانی‌که قطر کلنی‌های ظاهر شده بر روی LB به حدود mm ۲ رسید، برگهای غشاء نیتروسلولز حاوی کلونی‌های باکتری درون ظروف پلیت تمیز دیگری حاوی یک برگ کاغذ صافی واتمن شمارهٔ ۲، اشباع شده توسط مقدار ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول معرف شیمیایی بنام سالکوفسکی[1] قرار داده شدند. برای تهیهٔ محلول سالکوفسکی مقدار ۹۸/۶ میلی‌لیتر از اسید پرکلریک (۷۱٪) با ۴ میلی‌لیتر از محلول ۰/۵ مولار کلرور آهن III درون یک بالن ژوژهٔ ۲۰۰ میلی‌لیتری مخلوط گردید و با استفاده از آب مقطر به حجم نهایی رسانده شد. برگهای غشاء نیتروسلولزی به مدت ۰/۵ تا ۲ ساعت با محلول سالکوفسکی تیمار شدند. در طول این زمان اطراف کلنی‌های باکتریایی که توان تولید IAA را داشتند هالهٔ قرمز رنگی تشکیل می‌شد که رنگ و اندازهٔ این هاله‌ها بسته به مقدار IAA تولید شده توسط جدایه‌ها، متفاوت بودند. در این زمان ها قطر هاله (HD)[2] و قطر کلنی (CD)[3] اندازه‌گیری و متوسط نسبت قطر هاله به قطر کلنی HD/CD برای هر ایزوله محاسبه و مبنای درجه‌بندی نیمه‌کمی توان تولید IAA قرار گرفت. از محلول‌های استاندارد IAA در غلظت‌های متفاوت (۰/۱ nM، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۰/۸، ۱، ۲، ۴، ۸) برای سهولت تشخیص نوع و شدت رنگ هاله‌های قرمز استفاده شد.

آزمون کمی توان تولید IAA:

در این آزمون تعداد ۲۴ جدایه انتخاب و مورد سنجش کمی قرار گرفتند. تمام جدایه‌هایی که در مرحلهٔ آزمون کیفی تولید هاله کرده بودند (IAA^+) بعلاوهٔ چندین جدایهٔ دیگر IAA^- در این مرحله مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌ها در محیط LBT بدون آگار، در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد، به مدت ۲۴ ساعت و بر روی شیکر دورانی با چرخشی معادل ۹۰ دور در دقیقه رشد داده شدند. سپس به مقدار ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری برداشت شد و پس از سانتریفیوژ کردن (*Microcentrifuge A.G. 78*) آن در ۵۰۰۰rpm به مدت ۲۵ دقیقه، محلول صاف‌رویی[4] هر سوسپانسیون جدا گردید. عصارهٔ صاف‌شدهٔ هر سوسپانسیون باکتری با محلول سالکوفسکی با نسبت ۲ به ۱ ترکیب و رنگ ایجاد شده پس از ۲/۵ ساعت بوسیلهٔ اسپکتروفوتومتر (*Spectrophotometer Unico 1100*) با طول موج ۵۳۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. به منظور ترسیم منحنی استاندارد، غلظت‌های مختلف IAA (۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ ppm) به روش فوق با محلول سالکوفسکی تیمار و مقادیر آنها اندازه‌گیری شدند.

آزمون‌های گلخانه‌ای

انتخاب خاک: برای انتخاب خاک مناسب، ابتدا ۵ نمونه خاک از اراضی اطراف کرج (از ابتدای اتوبان کرج-قزوین، تا نزدیکی شهر جدید هشتگرد) تهیه گردید. نمونه‌برداری از مناطق دیم‌زار جو و گندم، مناطق کشت‌آبی جو، مناطق آیش و زمین‌های بایر صورت پذیرفت. این نمونه‌ها از نظر برخی ویژگی‌های فیزیکی (بافت) و شیمیایی (pH، EC، غلظت فسفر و آهن قابل جذب، غلظت فسفرکل، درصد نیتروژن، موادآلی و...) مورد آزمایش قرار گرفتند. انتخاب خاک مورد نظر و مناسب براساس نتایج این آزمایش‌ها صورت گرفت.

آماده‌کردن گلدان‌ها: در تمام آزمون‌های گلخانه‌ای این تحقیق از گلدان‌های پلاستیکی به ارتفاع ۲۵ سانتی‌متر با قطر دهانهٔ ۲۰ سانتی‌متر استفاده شد. گلدان‌ها پس از شستشو با مایع ظرفشویی، با محلول ۲٪ هیپوکلریت سدیم بمدت ۱۵ دقیقه ضدعفونی و سپس بخوبی آبکشی شدند. به هر گلدان دقیقاً ۵۰۰۰ گرم خاک الک شده (با الک ۴ میلی‌متر) اضافه شد. گلدان‌ها فاقد زهکش بودند، لذا احتمال خروج عناصر غذایی از آنها وجود نداشت. برای جلوگیری از شرایط ماندابی ناشی از آبیاری زیاد، کلیهٔ گلدان‌ها در تمامی

1. Salkowski 2. Halo Diameter (HD) 3. Colony Diameter (CD) 4. Supernatant

آزمون‌های گلخانه‌ای بصورت وزنی و در حد ۸۰ درصد رطوبت ظرفیت زراعی بصورت روزانه آبیاری شدند.

تهیهٔ مایه تلقیح *آزوسپیریلوم*: براساس نتایج بدست آمده از آزمون‌های درون شیشه‌ای، سویهٔ *آزوسپیریلومی* برتر، در آزمون‌های گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا چند روز قبل از شروع آزمایش گلخانه‌ای سویهٔ مذکور در محیط RC بازکشت و جوان شده و سپس در محیط NFb مایع رشد داده شد. پس از طی زمان مناسب انکوباسیون، جمعیت باکتری‌ها به روش مک فارلند در حد $(cfu\ ml^{-1})$[1] ۳×۱۰^{۸} تنظیم گردید. سپس مایه تلقیح به درون یخچال منتقل شد. کلیهٔ مراحل تهیهٔ مایه تلقیح در شرایط استریل انجام پذیرفت.

آزمون گلخانه‌ای ذرت شیرین:

آزمون گلخانه‌ای ذرت شیرین با استفاده از رقم زودرس دانه طلایی انجام شد. تیمارهای آزمایشی بکاررفته در این آزمون شامل دو سطح فسفر(P_1,P_0)، دو سطح مواد آلی (کود دامی) (N,O) و دو سطح باکتری *آزوسپیریلوم* شامل B_1,B_0 بودند. تیمارهای باکتریایی آزمون‌های گلخانه‌ای را تیمارهای شاهد منفی (B_0) و باکتری حل‌کنندهٔ فسفات آلی (B_1) تشکیل می‌دادند. در این آزمون برای هر تیمار تعداد ۴ گلدان و تعداد ۴ گلدان دیگر نیز به عنوان شاهدهای مثبت[2] (P.C.)[3] در نظر گرفته شدند. برای کاشت بذور ذرت شیرین ابتدا بذور سالم و یکنواخت ذرت انتخاب و سپس با غوطه‌ور کردن آنها به ترتیب در الکل ۹۶ درجه (به مدت ۱۰ ثانیه) و محلول رقیق (۵٪) هیپوکلریت سدیم (به مدت ۱۲-۱۰ دقیقه) ضدعفونی سطحی شدند. پس از آبکشی مقدار اضافهٔ هیپوکلریت سدیم توسط آب مقطر استریل، بذور ضدعفونی شده به ظروف پلیت بزرگ cm ۱۵ منتقل و مقداری آب مقطر استریل به هر پلیت اضافه شد. ظروف پلیت تا جوانه‌دار شدن بذور ذرت درون انکوباتور در دمای $۲۵^{°C}$ نگهداری شدند. بعد از آماده کردن گلدان‌های تیمار P_1، یعنی افزودن مقدار یک گرم خاک فسفات تغلیظ شده آسفوردی و تیمار O یعنی افزودن مقدار ۱۰ گرم مواد آلی (کود دامی) به خاک هر گلدان، در گلدان‌ها تعداد ۴ عدد بذر ذرت جوانه‌دار کاشته شد. آنگاه بر روی سطح بذور و خاک اطراف آنها در هر گلدان مقدار ۲ میلی‌لیتر از مایه تلقیح *آزوسپیریلومی* اضافه گردید. سپس رطوبت هر گلدان در حدود ۸۰٪ F.C. تنظیم و تا زمان سبز شدن بذور درب گلدان‌ها گذاشته شد. پس از سبز شدن تمامی بذور ذرت و خروج آنها از سطح خاک تعداد گیاهک‌ها از طریق تنک‌کردن به ۳ عدد کاهش پیدا کردند. مقدار نیتروژن، فسفر و پتاسیم استفاده شده در این آزمون به ترتیب معادل ۱۲۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ و برای گلدان‌های P.C.؛ ۱۸۰، ۱۸۰ و ۲۲۵ کیلوگرم در هکتار بود که به فرم نیترات آمونیم و فسفات پتاسیم طی دو نوبت (پایان ماه‌های اول و سوم) بصورت محلول همراه آب آبیاری به خاک گلدان‌ها افزوده شد. این آزمون در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی، دارای ۸ تیمار (دوسطح فسفر× دو سطح موادآلی × دو سطح باکتری *آزوسپیریلوم*) با ۴ تکرار بعلاوه ۴ عدد گلدان کنترل شاهد، مجموعاً شامل ۳۶ واحد آزمایشی (گلدان) در اتاق رشد گروه مهندسی خاکشناسی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران طی مدت ۴/۵ ماه به اجرا درآمد. حداکثر دما در طول دورهٔ رشد ۳۰ و حداقل آن ۲۲ درجهٔ سانتی‌گراد تنظیم گردید.

در پایان دورهٔ رشد، بخش هوایی گیاهان ذرت از روی سطح خاک قطع و برداشت گردیدند. شاخص‌های اندازه‌گیری شامل وزن تر بلال‌ها، وزن خشک بخش هوایی (عملکرد بیولوژیک) و وزن خشک ریشه بودند. بعلاوه تمام بخش هوایی گیاه (ازجمله بلال‌ها) کاملاً خشک، آسیاب و سپس از طریق انجام آزمایش‌های شیمیایی غلظت نیتروژن و فسفر (N.P.) آنها اندازه‌گیری شدند.

پس از انجام آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها توسط نرم‌افزار Minitab، نتایج این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SAS V6.12 مورد تجزیه و تحلیل‌های آماری قرار گرفت. همچنین مقایسه میانگین داده‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن (۵٪) و نیز انجام محاسبات و ترسیم اشکال در محیط Excel انجام شد.

1. Colony Forming Unit

۲. خاک حاوی کود شیمیایی توصیه شده توسط کشاورزان

3. positive control

نتایج و بحث

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی باکتریهای جنس *آزوسپیریلوم*:

در این آزمایش مشخص گردید که فرآیند جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی باکتری‌های این جنس مستلزم صرف هزینه و زمان بالایی می‌باشد. به طوری‌که فراوانی و احتمال دستیابی به باکتری‌های جنس *آزوسپیریلوم* پایین ارزیابی گردید.

آزمون نیمه‌کمی و کمی توان تولید IAA:

بطور کلی نتایج حاصل از دو روش نیمه کمی و کمی نشان داد که توانایی تولید هورمون‌های اکسینی در بین باکتری‌های جنس *آزوسپیریلیوم* یکسان نیست. در آزمون نیمه کمی؛ مشخص شد که از مجموع ۵۲ ایزوله، تعداد ۴۸ ایزوله (۹۲/۳ ٪) توان رشد بر روی محیط کشت جامد LB-TRP را داشته‌اند.

از این تعداد، ۱۵ ایزوله (۳۱/۲ ٪) در اطراف کلنی خود بسته به نوع شدت، طیف رنگی از صورتی تا قرمز را ایجاد کرده بودند (IAA^+). با توجه به مقدار عددی نسبت قطر هاله به کلنی و همچنین شدت رنگ ایجاد شده می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که این توانایی در بین گونه‌های مختلف *آزوسپیریلومی* یکسان نیست (جدول ۱). قرار دادن نمونه‌ها در انکوباتور بیش از ۳۰ دقیقه هیچ تغییری در رنگ و اندازهٔ هاله ایجاد نکرد که این مسئله برخلاف نتایج بدست آمده توسط بریک و همکاران (۱۹۹۱) می‌باشد (۸).

در آزمون کمی؛ تمام ۲۴ جدایه در محیط مایع LB حاوی تریپتوفان رشد کرده و بین ۲۹ و ۷۶۱ (mg/L) اکسین تولید کردند (جدول ۱). شدت رنگ ایجاد شده در اثر وجود IAA در محیط پس از گذشت زمان به شدت تغییر کرد که این مسئله با توجه به بالا بودن شدت ترکیب شدن اکسین هنگامی که در معرض هوای آزاد قرار می‌گیرد،

جدول۱: نتایج حاصل از آزمون‌های کیفی و کمی تولید IAA در باکتری‌های جنس *آزوسپیریلوم*

کد جدایه باکتری	گیاه میزبان	محل جمع‌آوری	روش کیفی		روش کمی (ppm)	
			قطر هاله به کلنی	رنگ	۳۰ دقیقه	۱۲۰ دقیقه
T 4	گندم	قزوین	۱	A	۱۲۳/۷	۴۸/۲
T 6	ذرت	داراب	۲/۶۶	C	۳۸۵	۱۳۹/۷
T 8	مرغ	کرج	-	-	۲۲۱	۸۶/۵
T 10	ذرت	کرج	۱	B	۴۰۴	۱۵۷
T 11	گندم	ورامین	۱/۳۳	C	۲۴۶	۹۶
T 12	گندم	قزوین	-	-	۲۸۸	۱۱۲/۴
T 17	ذرت	کرج	-	-	۲۷۳/۷	۲۴۹
T 20	گندم	گرمسار	۱/۵	C	۵۲۰	۲۰۲
Bromus-I	*جوموشی*	کرج	-	-	۱۹۰	۷۴
Dactylis-I	*علف باغی*	کرج	۱/۶۶	B	۲۳۵	۹۲
72 L	گندم	استان گلستان	-	-	۷۵/۵	۲۹/۴
118 (I)	گرامینه	استان گلستان	۱/۶۶	C	۷۶۱	۲۹۷
Agri-II	گرامینه	استان گلستان	۱	B	۴۶۳	۱۸۱
166	گندم	استان گلستان	۱	A	۱۹۳/۹	۷۵/۵
122	گرامینه	استان گلستان	-	-	۳۳۷	۱۳۱/۵
7	گرامینه	استان گلستان	۱/۶	C	۵۱	۲۰
171-I	گرامینه	استان گلستان	۱/۵	C	۱۸۳	۷۱/۴
130-II	گندم	استان گلستان	۲	C	۱۶۹	۶۶
161-II	گندم	استان گلستان	-	-	۳۷۹	۲۶۲/۶
Kh-44	گندم	استان خوزستان	-	-	۴۹۸	۱۹۴
Kh-8	گندم	استان خوزستان	۱/۱۲۵	B	۴۴۶	۱۷۴
Kh-9-II	گندم	استان خوزستان	-	-	۳۱۳	۱۲۲
124	گرامینه	استان گلستان	۱/۴	C	۲۹	۱۱
171	گرامینه	استان گلستان	۱/۵	C	۲۹۳	۱۱۴

A:: صورتی کم رنگ C : صورتی B: صورتی پررنگ

جدول۲: خلاصه نتایج تجزیه واریانس اثر تیمارهای مختلف بر اندام هوایی و زیرزمینی ذرت شیرین

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات (MS) صفات مورد بررسی				
		وزن تر بلال	وزن خشک کل	وزن خشک ریشه	میزان نیتروژن گیاه	میزان فسفر گیاه
بلوک	۳	۰/۲۹ ns	۰/۷۱۵ ns	۰/۰۳ ns	۰/۰۰۰۴ ns	۰/۰۰۰۰۲ ns
تیمار	۸	۴/۹۳	۹/۵۲	۰/۸۴۷	۰/۰۱۱	۰/۰۰۰۸
باکتری (B)	۱	۹/۷۵ **	۱۵/۳۶ **	۴/۲۸ **	۰/۰۳۶ **	۰/۰۰۲ **
مواد آلی (O)	۱	۲/۷۵ *	۸/۷۷ **	۰/۰۴۲ ns	۰/۰۰۰۰۳ ns	۰/۰۰۱۴ **
خاک فسفات (Ps)	۱	۲/۸۷ *	۳/۵۲ **	۰/۰۱۵ ns	۰/۰۰۰۲ ns	۰/۰۰۰۰۰۰۲ ns
B×O	۱	۷/۶۰۵ **	۰/۰۳۱ ns	۰/۱۳۵ ns	۰/۰۰۰۳ ns	۰/۰۰۰۳ ns
B×Ps	۱	۱/۰۷ ns	۱/۱۴ ns	۰/۰۰۳ ns	۰/۰۰۰۰۰۳ ns	۰/۰۰۰۲ *
O×Ps	۱	۰/۶۴ ns	۰/۵۵ ns	۰/۲۲ ns	۰/۰۰۰۰۴ ns	۰/۰۰۰۰۷ ns
B×Ps×O	۱	۰/۰۹ ns	۳/۰۹۳ **	۰/۲۱۱ ns	۰/۰۰۴۹ **	۰/۰۰۱۵ **
مقایسه با P.C.	۱	۱۴/۲۱ **	۴۱/۷۲ **	۱/۷۰۱ **	۰/۰۴۸ **	۰/۰۰۰۸ **
خطا	۲۴	۰/۶۲۴	۰/۳۷	۰/۰۸۴	۰/۰۰۰۳۶	۰/۰۰۰۰۳
کل	۳۵	۵۵/۲۶۹	۸۷/۲۸	۸/۸۸	۰/۱۰۱	۰/۰۰۷

ns = غیرمعنی‌دار * = معنی‌دار در سطح ۵٪ ** = معنی‌دار در سطح ۱٪

کاملاً طبیعی به نظر می‌رسد.

مقایسهٔ نتایج حاصل از دو روش نیمه‌کمی و کمی نشان می‌دهد که باکتری‌هایی که در روش نیمه‌کمی در گروه IAA^- قرار داشتند در روش کمی تولید مقادیر نسبتاً قابل توجهی اکسین نموده بودند. بعلاوه اینکه شدت رنگ ایجاد شده در روش نیمه‌کمی هیچ تغییری نکرده بود حال آنکه این میزان در روش کمی به طور کاملاً محسوسی کاهش پیدا کرده بود. که تمام این مسائل نشان از عدم هماهنگی قابل قبول بین دو روش کیفی و کمی، دارد.

نتایج حاصل از این آزمون با نتایج بسیاری از محققین مطابقت دارد. دانشمندان بسیاری توانایی تولید هورمون‌های گیاهی را توسط سویه‌های آزوسپیریلومی در محیط کشت مایع به اثبات رسانیده‌اند (۱۳،۲۳،۱۵). آنها مهم‌ترین هورمون تولیدی را اکسین تشخیص دادند (۵).

آزمون‌های گلخانه‌ای

وزن تر بلال

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) در صفت وزن تر بلال مشاهده می‌شود که اثر بلوک معنی‌دار نشده است اما اثر تیمار در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است. بعلاوه اینکه اثر باکتری، اثر متقابل باکتری و موادآلی و مقایسه با تیمار شاهد مثبت در سطح یک درصد، و همچنین اثر موادآلی و خاک فسفات در سطح پنج درصد معنی‌دار گردیده‌اند. اثرات سه‌گانهٔ باکتری، موادآلی و خاک فسفات و نیز دیگر اثرات متقابل؛ از لحاظ آماری غیر معنی‌دار تشخیص داده شده‌اند. جدول ۳ مقایسه میانگین وزن تر بلال را در تیمارهای مختلف باکتری، خاک فسفات و مواد آلی نشان می‌دهد. بر اساس نتایج حاصل تیمار .P.C دارای حداکثر وزن تر بلال و تیمارهای B_1P_1N و B_1P_0N از لحاظ آماری با تیمار شاهد مثبت در یک گروه جای می‌گیرند. در اکثر موارد این تفاوت در بقیهٔ تیمارها از نظر آماری معنی‌دار نبوده است. نکتهٔ حائز اهمیت در این مسئله تأثیر منفی موادآلی بر کارآیی باکتری است. طبق نتایج بدست آمده باکتری بیوسنتزکنندهٔ IAA در غیاب موادآلی نتایج قابل ملاحظه‌ای بر جای گذاشته است.

وزن خشک کل

تجزیه واریانس وزن خشک کل در جدول ۲ نشان داده شده است. بنابر این جدول اثر بلوک معنی‌دار نشده است اما اثر تیمار در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است. بعلاوه اینکه اثرات باکتری، موادآلی، خاک فسفات و اثر سه‌گانهٔ باکتری، خاک فسفات و موادآلی همچنین مقایسه با تیمار

شاهد مثبت در سطح یک درصد معنی‌دار گردیده‌اند. تمامی اثرات متقابل نیز از نظر آماری غیر معنی‌دار تشخیص داده شده‌اند. مقایسه میانگین وزن خشک کل در تیمارهای مختلف باکتری، خاک فسفات و مواد آلی در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج حاصل تیمار شاهد مثبت (P.C.) اختلاف معنی‌داری با دیگر تیمارها دارد. پس از تیمار شاهد مثبت تیمارهای B_1P_1O، B_1P_1N و B_1P_oO در مقایسه با تیمارهای شاهد منفی به ترتیب دارای بیشترین مادهٔ خشک تولیدی بودند. بر اساس جدول تیمار شاهد منفی (B_oP_oN) پایین‌ترین میزان مادهٔ خشک تولیدی را داراست. عملکرد بیولوژیک یکی از بهترین شاخص‌هایی است که می تواند میزان کارآیی باکتری‌های PGPR را به نمایش بگذارد. بر اساس نتایج، باکتری بیوسنتزکنندهٔ IAA عملکرد نسبتاً خوبی بر جای گذاشته‌اند. گزارشات باشان و همکاران (۵) این نتایج را تأیید می‌کند.

مقدار کل جذب نیتروژن گیاه

تجزیه واریانس مقدار کل جذب نیتروژن گیاه در جدول شمارهٔ ۲ آمده است. بنابر جدول اثر بلوک معنی‌دار نشده است اما اثر تیمار در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است. بعلاوه اینکه اثرات باکتری، اثرات سه‌گانه و همچنین مقایسه با تیمار شاهد مثبت در سطح یک درصد معنی‌دار گردیده‌اند و بقیهٔ تیمارها از نظر آماری غیر معنی‌دار تشخیص داده شده‌اند. همانطور که در جدول شمارهٔ ۳، مقایسه میانگین مقدار کل جذب نیتروژن گیاه در تیمارهای مختلف باکتری، خاک فسفات و مواد آلی، مشاهده می‌شود تیمار شاهد مثبت در سطح بالاتری در مقایسه با دیگر تیمارها قرار دارد. پس از P.C. بقیه تیمارهای باکتری B_1 از نظر آماری در یک سطح قرار دارند. در یک برآورد کلی می‌توان گفت که تمامی تیمارهای شاهد منفی در مقایسه با تیمارهای باکتری B_1 اختلاف معنی‌داری دارند. افزایش این میزان در تیمار باکتریایی تولید کنندهٔ اکسین را می توان به افزایش کارآیی جذب عناصر نسبت داد (۱۸،۱۵ و ۱۹). این افزایش احتمالاً به دلیل افزایش سطح جذب ریشه در اثر تلقیح با باکتری‌های *آزوسپیریلومی* تولیدکنندهٔ هورمون می‌باشد (۵).

مقدار کل فسفر گیاه

بر اساس جدول تجزیه واریانس شمارهٔ ۲ در صفت مقدار کل فسفر گیاه مشاهده می‌شود که اثر بلوک غیرمعنی‌دار اما اثر تیمار در سطح ۱ درصد معنی‌دار شده است. بعلاوه اینکه اثرات باکتری، موادآلی، اثر سه‌گانهٔ و همچنین مقایسه با تیمار شاهد مثبت در سطح یک درصد معنی‌دار تشخیص داده شده‌اند. اثر متقابل خاک فسفات و باکتری نیز در سطح ۵ درصد معنی‌دار و بقیهٔ تیمارها نیز از نظر آماری غیر معنی‌دار تشخیص داده شده‌اند. مقایسه میانگین مقدار کل جذب فسفر گیاه در تیمارهای مختلف باکتری، خاک فسفات و مواد آلی در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس جدول تیمار B_1P_1O در رتبهٔ اول و تیمارهای B_1P_oO و B_1P_oN پس از آن در یک گروه قرار

جدول ۳: مقایسه میانگین صفات مورد بررسی در تیمارهای مختلف به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن.

تیمار / صفات	P.C.	B_1				B_o			
		P_oN	P_1N	P_oO	P_1O	P_oN	P_1N	P_oO	P_1O
وزن تر بلال (gr)	۵/۴۴a	۴/۶۷abc	۴/۸۲ab	۳/۴۱cde	۲/۸۷de	۳/۰۵de	۲/۲۷e	۳/۶۲bcd	۲/۴۸de
وزن خشک کل (gr)	۱۴/۴a	۱۱/۱۳cd	۱۱/۰۵cd	۱۱/۷۵bc	۱۲/۴۱b	۸/۶۸e	۱۰/۶۱d	۱۰/۶۷d	۱۰/۸cd
وزن خشک ریشه (gr)	۱/۹۹d	۳/۳۱a	۳/۰۵ab	۲/۷۸bc	۳/۱۷ab	۲/۳۱d	۲/۳۳cd	۲/۳۶cd	۲/۳۹cd
میزان‌نیتروژن‌گیاه (gr/pot)	۰/۳۷a	۰/۲۹b	۰/۲۷b	۰/۲۸b	۰/۳b	۰/۲۱cd	۰/۲۳۸c	۰/۲۳cd	۰/۲۱d
میزان فسفر گیاه (gr/pot)	۰/۰۵d	۰/۰۸ab	۰/۰۶۴c	۰/۰۸۱ab	۰/۰۸۵a	۰/۰۴۴e	۰/۰۶۵c	۰/۰۷۵b	۰/۰۶۴c

اختلاف میانگین‌های هر ستون که دارای یک حرف مشترک باشند از نظر آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

B تیمار باکتری آزوسپریلیوم B0 تیمار بدون باکتری P1 خاک عاری از فسفات P0 خاک حاوی فسفات

Oخاک حاوی مواد آلی و رس N خاک عاری از مواد آلی و رس P.C. خاک حاوی کود شیمیایی توصیه شده توسط کشاورزان

دارند. برتری تیمارهای باکتریایی در مقایسه با تیمارهای مشابه شاهد منفی خود مجدداً حاکی از افزایش کارآیی جذب عناصر در گیاهان تلقیح شده با باکتری *آزوسپیریلوم* است (۱۹،۱۸).

در مجموع، نتایج گلخانه‌ای این تحقیق در تأیید نتایج درون شیشه‌ای نشان می‌دهد که خوشبختانه می‌توان ادعا نمود که باکتری‌های *آزوسپیریلومی* می‌توانند در سطوح بسیار گسترده، برای بسیاری از گیاهان زراعی و استراتژیک خانوادهٔ غلات؛ همچون ذرت، گندم، جو و...، و حتی سایر گیاهان سودمند باشد.

منابع

۱- فریور، ر. ۱۳۷۸. تولید و فرآوری ذرت شیرین. ماهنامه علمی، تخصص کشاورزی زیتون. شماره ۱۴، خرداد و تیرماه ۱۳۷۸.

2-Baldani V. L. D., and J. Döbereiner. 1980. Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum spp*. Soil Biol. Biochem 12: 433-439.

3-Bashan, U., and J. G. Dubrovsky. 1996. *Azospirillum spp.* participation in dry matter partitioning in grasses at the whole plant level. Biol. Fertil. Soils. 22: 435-440.

4-Bashan, Y., and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36: 591-608.

5-Bashan, Y., G. Holguin, L. E. de-Bashan. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Can. J. Microbiol. 50 (8): 521-577.

6-Bashan, Y., G. Holguin. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990–1996). Can. J. Microbiol. 43: 103-121.

7-Boddey, R. M., and J. Döbereiner. 1982. Association of *Azospirillum* and other diazotrophs with tropical *gramineae*. In: International Congress of Soil Science, 12, New Delhi, India. Non-symbiotic nitrogen fixation and organic matter in the tropics, pp. 28-47.

8-Bric, J. M., R. M. Bostok, and S. A. Silverstone. 1991. Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. Appl. Environ. Microbiol. 57(2): 535-538.

9-Dobereiner, J., and J. M. Day. 1976. Associative symbioses and free-living systems. In: Newton W. E., Nyman C. J. (eds.) Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State University Press, Pullman. pp. 518-538.

10-Fages, J., and J. F. Arsac. 1991. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other PGPR. Plant Soil. 137: 87-90.

11-Fallik, E., and Y. Okon. 1996. Inoculants of *Azospirillum brasilense*: biomass production, survival and growth promotion of *Setaria italica* and *Zea mays*. Soil Biol. Biochem. 28: 123-126.

12-Fulchieri, M., and L. Frioni. 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. Soil Biol. Biochem. 26: 921-923.

13-Hartmann, A., M. Singh, and W. Klingmüller. 1983. Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. Can. J. Microbiol. 29: 916-923.

14-Hedge, D. M. H., and C. S. Saraf. 1982. Growth analysis of pigeon pea in pure and intercropped stands with different other grain legumes in relation to phosphorus fertilization. Crop Sci. 151: 49-61.

15-Jain, D. K., and D. G. Patriquin. 1985. Characterization of substance produced by *Azospirillum* with causes branching of wheat root hairs. Can. J. Microbiol. 31: 206-210.

16-Kapulnik, Y., Y. Okon, and Y. Heris. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. Can. J. Microbiol. 31: 881-887.

17-Levanony, H., and Y. Bashan. 1989. Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense Cd*. Can. J. Bot. 67: 2213-2216.

18-Lin, W., Y. Okon, and R. W. F. Hardy. 1983. Enhanced mineral uptake by *Zea mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1775-1779.

19-Marty, M. G. and J. K. Ladha. 1987. Differential colonization of *Azospirillum lipoferum* on roots of two varieties of rice *Oryzea sativa*. Biol. Fertil. Soils. 4: 3-7.

20-Mertens, T., and D. Hess. 1984. Yield increases in spring wheat (*Triticum aestivum L.*) inoculated with *Azospirillum lipoferum* under greenhouse and field conditions of a temperate region. Plant Soil. 82: 87-99.

21-Rodríguez-Cáceres, E. 1982. Improved medium for isolation of *Azospirillum spp*. Appl. Environ. Microbiol. 44:990-991.

22-Smith, R., J. Aguria, and J. Caprile. 1996. Sweet corn production California UC IPM World Wide Web site. University of California cooperative Extension form Advisors.

23-Tien, T. M., M. H. Gaskins, and O. H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. Appl. Env. Microbiol. 37: 1016-1024.

The evaluation of IAA-production ability in indigenous *Azospirillum* isolates and their growth promoting effects on sweet corn

A. Arab, Gh. Akbari, H. A. Ali Khani, M. H. Arzanesh, E. Allah-Dadi[1]

Abstract

It has been years that *Azospirillum* is known to promote plant growth. Phytohormone (especially Auxin) production has the most important role in increasing the yield of inoculated plants. According to this, 60 strains of this genus were isolated, identified, and purified. This ability was evaluated in both qualitative and quantitative assays using colorimetric method and the effects of superior isolate on sweet corn were measured. Results revealed that the abundance and probability of the bacteria isolation is low and 17%. About 31.2% and 100% of *Azospirillum* strains were capable of producing IAA in qualitative and quantitative methods respectively. In greenhouse experiment, bacteria treatments had significant effects on corn fresh weight, total dry weight, root dry weight and total nitrogen and phosphorus content of the plant. This was considered to be as the result of more lateral root formation which enhances nutrition uptake. In conclusion, the green house results in respect to in vitro achievements show that fortunately it can be claimed that bacteria of the genus *Azospirillum* can be used widely for not only strategic gramineous plants like: corn, wheat, barely etc. but also for other useful plants.

Key words: *Azospirillum*, Auxin, qualitative and quantitative methods, sweet corn.

1- Contribution from College of Agriculture, University of Tehran.