

تاثیر ریزوباکتری‌های محرک رشد بر سطح برگ و میزان کلروفیل در گندم

حامد هادی*^۱، رضا قربانی^۲، رضا ضرغامی^۳، احمد اصغرزاده^۴، داود حبیبی^۵

۱. عضو باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین
۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد زراعت، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین
۳. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین
۴. استادیار پژوهش، موسسه تحقیقات خاک و آب
۵. استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج

*مسئول مکاتبات: تهران، صندوق پستی: ۱۹۸-۱۷۱۸۵، تلفن: ۰۹۱۲۵۳۷۳۰۹۴، پست الکترونیکی: hamedhadi9@yahoo.com

مکان انجام پژوهش: ورامین، قلعه سین، مزرعه آموزشی پژوهشی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین

تاریخ دریافت: ۸۹/۱/۱۸

تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۱۳

چکیده

به منظور بررسی تاثیر ریزوباکتری‌های محرک رشد بر گندم، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل رقم‌های بهار و پیش‌تاز و باکتری‌های ازتوباکتر کروکوکوم، آزوسپریلیوم و سودوموناس فلورسنس بود. نتایج نشان داد که شاخص سطح برگ در نمونه‌برداری‌های انجام شده طی دوره رشد گیاه، تحت تاثیر ژنوتیپ، باکتری و اثر متقابل ژنوتیپ و باکتری قرار می‌گیرد. همچنین تیمار باکتری، تاثیر معنی‌داری بر میزان کلروفیل دارد. تیمارهای باکتری که اختلاط سه جنس ازتوباکتر، سودوموناس و آزوسپریلیوم بودند، سطح برگ و کلروفیل بیشتری را در مقایسه با شاهد باعث شدند.

واژه‌های کلیدی: ازتوباکتر، آزوسپریلیوم، سودوموناس

مقدمه

محیط ریشه (*Rhizobacteria*) تثبیت کننده زیستی نیتروژن مولکولی (*Biological diazotrophe*)، *nitrogen fixation* (همزیست (*Symbiotic*)، آزادی (*Free living*) و همیار (*Associative*)، باکتری و قارچ‌های حل کننده فسفات، قارچ‌ها و باکتری‌های حل کننده سیلیکات، باکتری‌ها و قارچ‌های اکسید کننده گوگرد، قارچ‌های میکوریزایی و غیره و مواد حاصل از فعالیت را شامل می‌شوند (۲). بنابراین، بطور کلی کودهای زیستی به مجموعه مواد نگهدارنده با تعداد زیاد از یک یا چند ریز جاندار مفید خاکزی و یا فرآورده‌های سوخت و سازی آن‌ها اطلاق می‌گردد که بیشتر به منظور تأمین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه و ایجاد شرایط فیزیکی و

اصطلاح کودهای آلی (*Organic fertilizers*)، به مواد حاصل از کودهای دامی، بقایای گیاهی، کود سبز و غیره اطلاق می‌شود و کودهای زیستی (*Biofertilizers*)، موادی هستند جامد، نیمه جامد یا مایع حاوی ریز جانداران زنده یا فرآورده‌های آن که در ارتباط با تثبیت زیستی نیتروژن یا فرآوری فسفر، گوگرد و سایر عناصر غذایی، به ویژه ریزمغذی‌ها در خاک فعالیت می‌کنند و در صورت مصرف از طریق تلقیح بذر، سطح گیاه یا خاک، در ناحیه اطراف ریشه یا درون گیاه، تشکیل کولونی داده و با افزایش تأمین یا فراهمی عناصر غذایی، موجب افزایش رشد و نمو گیاه میزبان می‌گردند (۱). بر این مبنا، کودهای زیستی عمدتاً باکتری‌های

موقعیت ۳۱ و ۵۱ طول شرقی و ۲۰ و ۳۵ عرض شمالی و ارتفاع ۱۰۵۰ متر از سطح دریا با مساحت ۱۷۰۰ مترمربع اجرا شد. همچنین بیشینه و کمینه مطلق دما بر اساس آمار درازمدت به ترتیب ۴۳/۵ و ۱۴- درجه سانتی‌گراد بود. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با چهار تکرار اجرا شد. تیمارهای آزمایشی شامل رقم‌های بهار و پیش‌تاز و باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه- ازتوباکتر کروکوکوم (AZ) سویه NBTCO، آزوسپیریلیوم SP با مایه تلقیح آن تلقیح دو گونه بوده و با نماد As، سودوموناس فلورسنس (Ps) سویه NBTCO که همگی باکتری‌های تجاری مورد استفاده در مایه تلقیح‌های تجاری هستند و توسط شرکت فناوری زیستی طبیعت‌گرا NBTCO جدا و خالص‌سازی شده و مایه تلقیح آن‌ها در هر میلی‌متر مکعب مایع دارای 10^8 عدد سلول زنده و فعال بودند و با فرمولاسیون مناسب از مواد نگهدارنده و محافظ به صورت بذرمال استفاده شدند. تیمارهای باکتریایی به صورت هر کدام از باکتری‌ها به تنهایی، ترکیب‌های دوتایی و ترکیب سه تایی (P_s, A_s, A_z ، A_z+P_s ، A_s+P_s ، A_z+A_s و $A_z+P_s+A_s$) استفاده گردید. عملیات آماده‌سازی زمین شامل شخم، دیسک و تسطیح در پاییز ۱۳۸۵ انجام شد و قبل از تسطیح و با در نظر گرفتن نتیجه تجزیه خاک و کود مورد نیاز پایه، دی آمونیوم فسفات ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار، اوره ۲۰۰ کیلوگرم در هکتار و سولفات روی ۵۰ کیلوگرم در هکتار به زمین اضافه شد. نیمی از کود اوره به صورت سرک در سه مرحله با توجه به مساحت کاشت و نیمی از کود دی‌آمونیم فسفات قبل از کاشت در مرحله آماده‌سازی بستر و قبل از دیسک‌زدن، پخش و با خاک مخلوط شد و پس از تسطیح، پشته‌هایی به عرض ۵۰ سانتی‌متر در زمین ایجاد شد. تاریخ کاشت بر اساس زمان مطلوب منطقه، اواسط آبان ماه تعیین شد. هر کرت آزمایشی شامل ۳ خط کاشت به طول ۶ متر و به فاصله ۵۰ سانتی‌متر از یکدیگر بود و بر روی هر پشته نیز دو ردیف با فاصله ۲۰ سانتی‌متر کشت گردید. با توجه به کاربرد باکتری و عدم اختلاط تیمارهای باکتری با هم، از دو نهر برای ورود و خروج آب به هر کرت

شیمیایی مناسب خاک برای رشد و نمو آن و به صورت مایه تلقیح زنده برای مصرف در خاک و یا همراه با بذر تولید می‌شوند (۳). گروهی از باکتری‌های مفید خاکزی که سبب افزایش رشد گیاه می‌گردند، اصطلاحاً تحت عنوان باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه (Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) نامیده می‌شوند و از جمله مهم‌ترین انواع کودهای زیستی به شمار می‌آیند (۴). این اصطلاح برای نخستین بار توسط کلوپر و اسکراث (۱۹۷۸) به کار برده شد (۵). این باکتری‌ها به طور مستقیم با تحریک رشد گیاه و یا به طور غیر مستقیم با افزایش فراهمی زیستی (Bioavailability)، عناصر غذایی و کنترل آفات و بیماری‌گرهای، گیاهی باعث افزایش رشد گیاهان می‌شوند (۶) و در حال حاضر به صورت یکی از مهم‌ترین انواع کودهای زیستی، مورد استفاده قرار می‌گیرند. باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه، مجموعه متنوع و نامتجانسی از باکتری‌های مختلف، شامل باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و همزیست، از جمله ریزوبیوم‌ها، باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن غیر همزیست (آزادزی یا همیار) محیط ریشه، محلول‌کننده فسفر، پتاسیم، گوگرد و سیلیکات را در بر می‌گیرند (۲). از جمله مهم‌ترین این باکتری‌ها می‌توان آزوسپیریلیوم (*Azospirillum*)، ازتوباکتر (*Azotobacter*)، گلوکوسون اسیتوباکتر (*Gloconacetobacter*) و نیز باکتری‌های جنس سودوموناس (*Pseudomonas*)، پورخولدریا (*Burkholderia*)، انتروباکتر (*Enterobacter*)، هرباسپیریلیوم (*Herbaspirillum*)، باسیلوس و تیوباسیلیوس، سراتیا (*Serratia*)، کلوسترییدیوم (*Clostridium*)، هایدروجنوفاگا (*Hydrogenophaga*) و نیز سایر باکتری‌های سطح ریشه را نام برد (۱). از آنجائی که این باکتری‌ها تاثیر مثبتی بر رشد گیاه دارند، لذا در این آزمایش، از حالت‌های مختلف باکتری به صورت ساده و مرکب استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

آزمایشی در سال زراعی ۸۶-۱۳۸۵ در مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین با

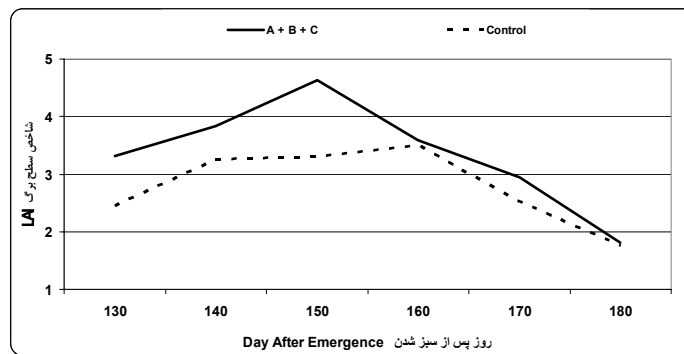
استون ۸۰ درصد اضافه گردید و با دسته هاون، سطح برگ‌ها به طور کامل ساییده شدند. محتویات، به لوله آزمایش منتقل گردید و پس از سانتریفیوژ نمودن نمونه‌ها، عصاره نمونه‌ها در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شدند و در دو طول موج ۶۶۳ و ۶۴۷ نانومتر قرائت گردیدند. یک نمونه استون ۸۰ درصد به عنوان شاهد و تنظیم صفر دستگاه، استفاده شد و با جای‌گذاری اعداد بدست آمده در رابطه‌های زیر، میزان کلروفیل a و b اندازه‌گیری شد.

$$chla = (12.15 \times a663 - 2.7 \times a647) \times d \quad (1)$$

$$chlb = (21.5 \times a647 - 5.1 \times a663) \times d \quad (2)$$

$$chla + chlb = (7.15 \times a663 + 18.71 \times a647) \times d \quad (3)$$

دارد. ظرفیت فتوسنتز و تولید مواد پرورده در گیاه، به تعداد و اندازه برگ‌های آن بستگی دارد و عوامل محیطی مختلف، بر میزان این دو عامل تأثیر می‌گذارند. تغییرات شاخص سطح برگ مشخص کرد که بر اساس نمودارهای مورد بررسی، شاخص سطح برگ در فاصله زمانی تجزیه و تحلیل رشد نسبت به زمان در حال افزایش بوده است. بیشترین شاخص سطح برگ، مربوط به تلفیق باکتری‌های سه جنس بوده است (نمودار ۱).



نمودار ۱- شاخص سطح برگ تیمار شده با مایه تلفیق باکتری‌های سه جنس و شاهد.

PGPR مورد استفاده در این پژوهش نیز از طریق ساز و کار تولید هورمون‌های افزایش‌دهنده رشد از قبیل اکسین، اسید جیبرلیک و سیتوکنین که سبب افزایش تقسیم و رشد سلول‌های برگ می‌شوند، سطح برگ را افزایش دادند.

استفاده شد. اولین آبیاری بلافاصله پس از کاشت و پس از آن به طور مرتب بر اساس نیاز گیاه انجام شد. علف‌های هرز متداول، با وجین دستی در مراحل مختلف رشد حذف گردید. از سم دلتامترین ۲/۵ درصد امولسیون به نسبت نیم در هزار در سطح مزرعه به منظور مبارزه علیه سن گندم انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان کلروفیل a و b از برگ‌های تازه جدا شده به اندازه یک گرم در هاون خرد کرده و یک گرم کربنات منیزیم به همراه ۲۰ سی سی

برای اندازه‌گیری سطح برگ، از مساحت ۵۰ سانتی‌متر مربع گیاهان موجود برداشت شد و سطح تمام برگ‌های گیاه با دستگاه سطح برگ سنج، اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

سطح برگ

سطح برگ، یکی از شاخص‌های اصلی در اندازه‌گیری رشد گیاه است، زیرا افزایش وزن خشک محصول، بستگی زیادی به توسعه سطح برگ آن

شاخص سطح برگ، توانمندی بالقوه فتوسنتز گیاه برای تولید محصول را نشان می‌دهد (۷). پاونر و سینگ (۲۰۰۰) افزایش سطح برگ بوته گندم بر اثر تلقیح بذر با باکتری آروسپیریوم (۸) و بیسواس و همکاران (۲۰۰۰) افزایش سطح برگ گیاهچه برنج را که بذرهای آن با باکتری آروسپیریوم لیپوفروم تلقیح شده بود (۹)، گزارش کردند. به احتمال زیاد

جدول ۱- میانگین مربعات شاخص برگ در نمونه برداری‌های مختلف طی رشد گیاه و میزان کلروفیل برگ.

منبع تغییرات	درجه آزادی	شاخص سطح برگ ۱	شاخص سطح برگ ۲	شاخص سطح برگ ۳	شاخص سطح برگ ۴	شاخص سطح برگ ۵	شاخص سطح برگ ۶
تکرار	۳	۰/۱۷۰	۰/۱۷۰	۰/۱۳۹	۰/۲۲۱	۰/۱۱۵	۰/۱۱۷
رقم	۱	۰/۰۳۵	۴/۴۵۲**	۲/۰۰۵**	۸/۸۸۶**	۶۷/۸۰۵**	۸/۶۶۳**
باکتری	۷	۴/۱۳۶**	۴/۰۶۹**	۱/۵۴۳**	۳/۱۶۹**	۳/۱۸۴**	۳/۵۴۴**
رقم×باکتری	۷	۱/۷۵۲**	۳/۳۶۹**	۳/۳۲۶**	۱/۰۵۵**	۲/۰۹۲**	۲/۵۱۰**
خطا	۴۵	۰/۰۷۲	۰/۰۹۵	۰/۱۰۰	۰/۱۳۲	۰/۱۳۹	۰/۱۷۶
ضریب تغییرات (/)		۴/۳۰	۴/۴۶	۴/۰۱	۵/۵۹	۷/۵۸	۱۴/۳۳

و ** : به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

ادامه جدول ۱

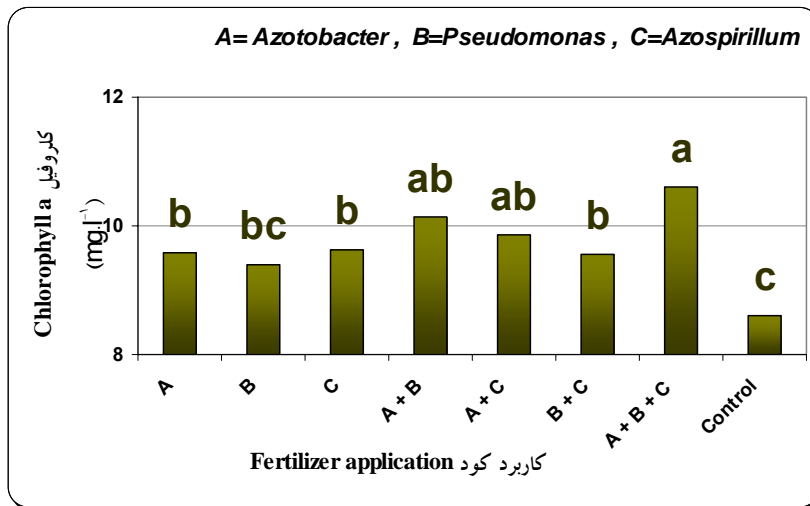
منبع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل a و b
تکرار	۳	۰/۱۱۳	۱/۰۸۴	۰/۵۲۷
رقم	۱	۰/۱۱۹	۰/۴۲۴	۱/۰۳۷
باکتری	۷	۲/۶۹۹**	۱/۸۹۲**	۹/۵۴۴**
رقم×باکتری	۷	۰/۰۵۱	۰/۰۶۷	۰/۳۱۷
خطا	۴۵	۰/۳۸۵	۰/۴۲۵	۰/۳۷۶
ضریب تغییرات (/)		۶/۴۱	۷/۹۶	۱۳/۷۶

و ** : به ترتیب بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ و ۱ درصد.

کلروفیل a

بین تیمارهای کودی در سطح احتمال ۱ درصد، اختلاف معنی‌دار مشاهده شد (جدول ۱). بالاترین مقدار کلروفیل a (۱۰/۶ میلی‌گرم در گرم) مربوط به تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های سه جنس است که ۱۸/۸۵ درصد نسبت به کمترین میزان کلروفیل a (۸/۶ میلی‌گرم در گرم) بالاتر بود. همچنین تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های ازتوباکتر سودوموناس ۱۵درصد، ازتوباکتر آروسپیریوم ۱۲/۷۶ درصد، آروسپیریوم سودوموناس ۹/۸۴ درصد و تیمارهای حاصل از تک تک باکتری‌ها، ازتوباکتر

۱۰/۲۱ درصد، سودوموناس ۸/۳۰ درصد، آروسپیریوم ۱۱/۱۴ درصد نسبت به شاهد، افزایش در مقدار کلروفیل داشتند (نمودار ۲). شارما و همکاران (۲۰۰۳) با مطالعه نقش تلقیح باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور در لوبیا نشان دادند که در شرایط تلقیح این باکتری نسبت به شرایط بدون تلقیح، غلظت کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل به ترتیب ۳۴، ۴۸، ۳۹ درصد افزایش یافت (۳). همچنین، متناسب با افزایش ساخت کلروفیل، میزان کلروز در برگ‌ها نیز کاهش یافت.

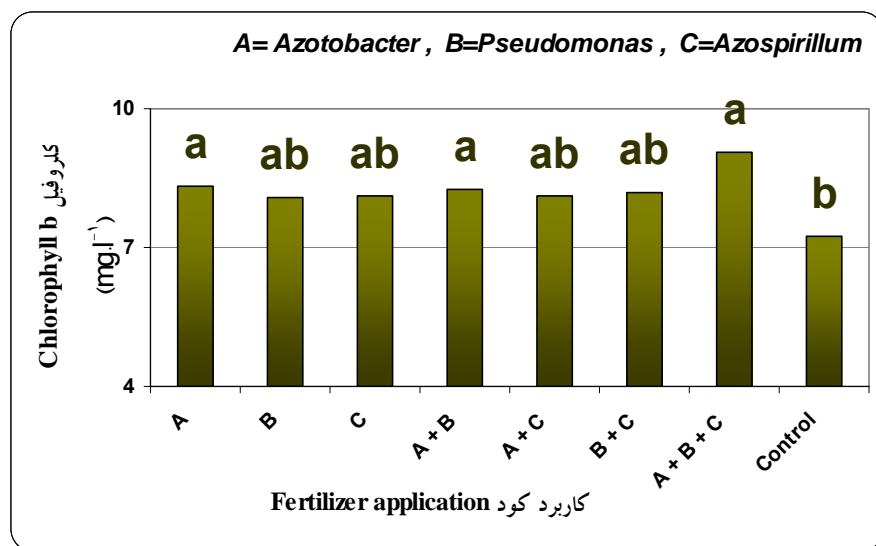


نمودار ۲- تاثیر باکتری‌ها بر کلروفیل a.

۱۲/۸۶ درصد، سودوموناس ۱۰/۲۱ درصد، آزوسپیریوم ۱۰/۷۶ درصد بالاتر از کمترین مقدار آن در شاهد بودند (نمودار ۳). اثر ساده ژنوتیپ و همچنین اثر متقابل ژنوتیپ و کود، تاثیر معنی‌دار بر میزان کلروفیل b نداشت. دهیلون و همکاران (۱۹۸۰) ضمن مشاهده افزایش عملکرد دانه ذرت بر اثر تلقیح بذر با باکتری ازتوباکتر کروئوکوکوم ملاحظه کردند که عملکرد دانه بوته‌های تلقیح شده با PGPR، از بیشترین میزان کلروفیل برگ برخوردار است (۱۰).

کلروفیل b

بین تیمارهای کودی در سطح احتمال ۱ درصد، اختلاف معنی‌دار وجود دارد (جدول ۱). بالاترین مقدار کلروفیل b (۹ میلی‌گرم در گرم) مربوط به تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های سه جنس است که ۱۹/۷۹ درصد بیشتر از کمترین مقدار شاهد (۷/۲ میلی‌گرم در گرم) است. همچنین، تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های ازتوباکتر سودوموناس ۱۲/۳۹ درصد، ازتوباکتر آزوسپیریوم ۱۰/۶۲ درصد، آزوسپیریوم سودوموناس ۱۱/۳۵ درصد، ازتوباکتر

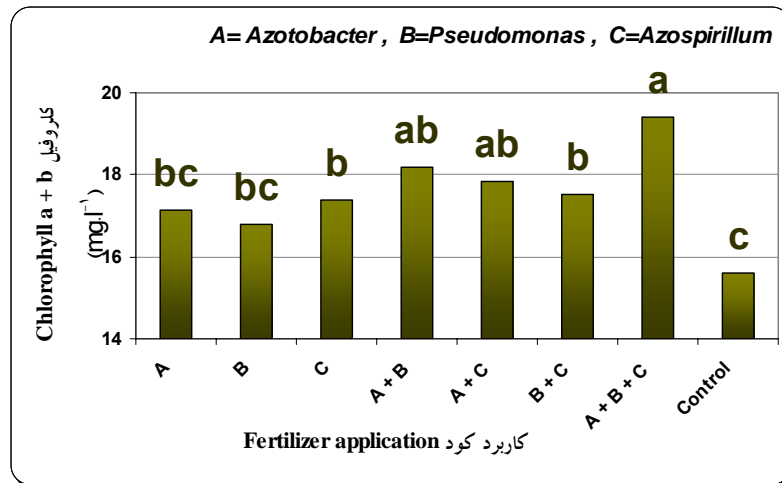


نمودار ۳- تاثیر باکتری‌ها بر کلروفیل b.

کلروفیل a و b

بین تیمارهای کودی در سطح احتمال ۱ درصد، اختلاف معنی دار وجود دارد (جدول ۱). بالاترین مقدار کلروفیل a+b مربوط به تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های سه جنس است که ۱۹/۳۹ درصد نسبت به کمترین مقدار کلروفیل a+b بالاتر بود.

همچنین، تیمارهای تلقیح شده با باکتری‌های ازتوباکتر سودوموناس ۱۴/۱۸ درصد، ازتوباکتر آزوسپیریلوم ۱۲/۳۹ درصد، آزوسپیریلوم سودوموناس ۱۰/۹۳ درصد، ازتوباکتر ۸/۹ درصد، سودوموناس ۷ درصد، آزوسپیریلوم ۱۰/۲۸ درصد بیشتر از کمترین مقدار شاهد بودند (نمودار ۴).



نمودار ۴- تاثیر باکتری‌ها بر کلروفیل a و b.

مستقیم با تأمین عنصر آهن گیاهان و بطور غیرمستقیم با حذف یا کاهش عوامل بیماری‌زا، رشد بهتر گیاه را موجب می‌شوند. به عنوان مثال، آگروباکتین (*Agrobacter*)، تولید شده توسط سویه خاصی از آگروباکتریوم (*Agrobacterium*) می‌تواند موجب تشدید جذب Fe^{+3} توسط گیاهچه نخود و لوبیا شده و در نتیجه، ساخت کلروفیل را در این گیاهان افزایش دهد (۱۱).

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقای دکتر احمد اصغرزاده مسئول محترم بخش بیولوژی خاک، موسسه تحقیقات خاک و آب و همکاران جهت در اختیار نهادن سویه‌های باکتری تولیدی این موسسه تقدیر می‌گردد.

بین ژنوتیپ‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد، یکی از دلایل بالا بودن میزان کلروفیل در تیمارهای تلقیح شده را می‌توان تولید سیدروفورهای تولید شده توسط باکتری‌ها خصوصاً سودوموناس‌ها دانست، سیدروفورهای میکروبی، مولکول‌های آلی نسبتاً درشتی با وزن مولکولی ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰۰ دالتون هستند که میل ترکیبی شدیدی برای تشکیل پیوند با Fe^{+3} دارند و نوعی کلات آهن قابل جذب برای ریزموجود تولیدکننده فراهم می‌کنند. سودوموناس‌های فلورسنت در شرایط کمبود Fe^{+3} در محیط، با تولید مقدار زیادی سیدروفورهای اختصاصی مانند سودوباکتین (*Pseudobactin*)، پیووردین (*Pyoverdin*)، پیوکلین (*Pyochelin*) و... که برای پاتوژن‌ها قابل استفاده نیستند، این موجودات را با کمبود آهن شدید مواجه ساخته و از فعالیت بازمی‌دارند. سیدروفورها به طور

منابع مورد استفاده

۱. بوم نظام‌های زراعی. مقالات کلیدی نهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات. ۷-۵ شهریورماه ۱۳۸۵، پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران

۱. قلاوند، ا.، حمیدی، آ.، دهقان شعار، م.، ملکوتی، م.، ج.، اصغرزاده، ا. و چوکان، ر. ۱۳۸۵. کاربرد کودهای زیستی (بیولوژیک)، راهبردی بومشناختی برای مدیریت پایدار

2. Vessey, J. K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. *Plant and Soil* 255: 271-286.
3. Zahir, A. Z., Arshad, M., Frankenberger W. F., 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: application and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy* 81: 97-168.
4. Sharma, A. K., 2003. Biofertilizers for sustainable agriculture. *Indian Journal of Plant Physiology* 24: 41-52.
5. Kloepper, J. W., Schroth, M. N., 1978. Plant growth promoting rhizobacteria on radish. *Proceeding of 4th International Conference of Plant Pathological Bacteriology* 879-882.
6. Glick, B. R., 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41:109-117.
7. Causton, D. R., Venus, J. C., 1981. *The biometry of plant growth*. Edward Arnold (Publishers) Ltd.
8. Panwar, J. D. S., Singh, O., 2000. Response of *Azospirillum* and *Bacillus* on growth and yield of wheat under field conditions. *Indian Journal of Plant Physiology* 5:108-110.
9. Biswas, J. C., Ladha, J. K., Dazzo, F. B., Yanni, Y. G., Rolfe, B. G., 2000. *Rhizobial* inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agronomy Journal* 92: 880-886.
10. Dhillon, G. S., Kler, D. S., Walia, A. S. Chahal, V. P. S., 1980. Effect of *Azotobacter chroococcum* and seed size on growth and yield of maize. *Indian Journal of Agronomy* 25: 244-249.
11. Lynch, J. M., 1982. Interactions between bacteria and plants in the root environment, pp:1-20. in: *Bacteria and plants*. Eds., Rhodes-Roberts, M. E., Skinner, F. A., The Society for Applied Bacteriology Symposium, No.10, Academic Press, New York.