مجله علوم کشاورزی ایران
جلد ۳۳، شماره ۲، سال ۱۳۸۱ (۲۲۲-۲۱۳)

اثر سویه و غلظت باکتری آزوسپیریلوم برازیلنس روی رشد و نمو ریشه ارقام گندم

ریحانه عموآقایی[1]، اکبر مستأجران[2] و گیتی امتیازی[3]
۱، استادیار گروه زیست شناسی دانشگاه شهرکرد ۲، ۳، دانشیاران گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان
تاریخ پذیرش مقاله ۸۰/۹/۲۱

خلاصه

باکتری آزوسپیریلوم برازیلنس یکی از باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن مولکولی است که از ریزوسفر غلات و برخی علف‌های مناطق حاره و معتدله جداسازی شده است. در سال‌های اخیر گزارش‌های متعدد و متناقضی مبنی بر اثر معنی‌دار این باکتری در تحریک رشد گیاهان، به خصوص غلات ارائه شده است. این تحقیق در سال ۱۳۷۹ در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان به منظور انتخاب سویه و غلظت بهینه مایه تلقیح باکتری و بررسی اثر آن در توسعه سیستم ریشه‌ای گندم (*T. aestivum*)، انجام گرفت. در این راستا بذور ارقام قدس، روشن و امید با دو سویه باکتری (سویه بومی دولت‌آباد Dol و سویه استاندارد Sp7) در غلظت‌های 10^1 تا 10^9 آغشته و شاخص‌های رشد ریشه نظیر طول، وزن خشک و تعداد انشعابات ریشه اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در تمامی موارد غلظت 10^6 - 10^7 سلول در میلی‌لیتر بهترین اثر را بر رشد ریشه‌های گندم دارد در حالیکه غلظت 10^8 و 10^9 سلول در میلی‌لیتر اثر منفی بر رشد ریشه نشان داد. ارقام گندم واکنش‌های متفاوتی نسبت به سوشهای باکتری نشان دادند به طوریکه سویه Dol بیشترین اثر را بر شاخص‌های رشد ریشه رقم قدس اما سویه Sp7 بهترین تأثیر را بر توسعه سیستم ریشه‌ای رقم روشن داشته است. رقم امید نسبت به هر دو سویه باکتری پاسخ کمی نشان داده است.

واژه‌های کلیدی: سویه‌های آزوسپیریلوم، غلظت مایه تلقیح، ارقام زراعی گندم، سیستم ریشه.

مقدمه

باکتری آزوسپیریلوم علاوه بر تثبیت ازت مولکولی، به دلیل اثرات متعدد در تحریک رشد گیاهان به یک گروه از باکتری‌های ریزوسفر موسوم به ریزوباکتری‌های تحریک کننده رشد گیاهان[1] (PGPR) نسبت داده می‌شود (۱۱). در طی دو هفتهٔ گذشته اثرات سودمند این باکتری روی رشد گرامینه‌های دانه‌ای و علوفه‌ای و نیز در بسیاری از غلات در شرایط مختلف محیطی به اثبات رسیده است (۱، ۲، ۵، ۶، ۹، ۱۵، ۲۱، ۲۵ و ۲۶).

گرچه قدرت تثبیت بیولوژیکی ازت توسط این باکتری به رشد گیاه و ازدیاد محصول کمک می‌کند لیکن تحقیقات اخیر نشان می‌دهند که مکانیسم‌های دیگری نیز در ایجاد این واکنش‌ها نقش دارند (۵، ۶). به طور مثال بعضی از محققین بر این اعتقاد هستند که اثرات تحریک کنندگی رشد گیاه توسط آزوسپیریلوم عمدتاً به علت تغییرات فیزیولوژیک و مرفولوژیک ریشه‌های گیاهان آغشته و در نتیجه بهبود جذب آب و املاح توسط آنهاست (۲، ۵، ۶، ۱۵، ۲۲، ۲۵). این نظر به دلیل عدم تغییر ساختار ریشه برعکس عمل ریزوبیوم مورد تردید است. در بسیاری از مطالعات دیگر نشان داده شده است که اثرات چشمگیر آزوسپیریلوم روی رشد و نمو گیاه ضرورتاً از اثر این باکتری بر رشد ریشه در مراحل اولیه جوانه‌زنی منتج می‌گردد (۴، ۱۱، ۱۲، ۱۹). جاکود و همکاران در سال ۱۹۹۸ گزارش کرده‌اند که در شرایط مزرعه‌ای علیرغم کاهش سریع در تعداد

1 . Plant growth- promoting rhizobacteria

مکاتبه کننده: ریحانه عموآقایی

سلول‌های آزوسپیریلوم موجود ریزوسفر ذرت در طی فصل رشد، اثر تحریک کنندگی باکتری آزوسپیریلوم که در مرحله جوانه‌زنی القاء شده است همچنان پایدار باقی می‌ماند (۱۱). لوانونی و باشان در سال ۱۹۸۹ گزارش نمودند که افزایش تقسیم سلولی در مریستم نوک ریشه و افزایش ناحیه رشد طولی تنها ۴۸ ساعت پس از مرحله جذب آب و ظهور ریشه چه قابل مشاهده است (۱۹). باشان در سال ۱۹۸۶ اظهار داشت که آغشته‌سازی گیاهچه‌های گندم، ۲۴ ساعت پس از مرحله جذب آب بسیار ثمربخش‌تر از آغشته‌سازی با تأخیر زمانی ۲۰ روز پس از کاشت می‌باشد (۴). کرئوس و همکاران در سال ۱۹۹۶ دریافتند که ریشه‌های گندم آغشته شده در مراحل اولیه جوانه‌زنی طویل‌تر از ریشه گیاهانی هستند که در مراحل پس از جوانه‌زنی و بعد از استقرار کامل گیاهچه‌های گندم آغشته شده‌اند (۷). جاکود و همکاران در سال ۱۹۹۹ نشان دادند که تأثیر مجاورت ۴۸ ساعته در مراحل اولیه جوانه‌زنی دانه‌های ذرت در مقایسه با تماس مداوم این گیاهان با آزوسپیریلوم لیپوفروم در توسعه سطح ریشه ذرت مشابه بوده است و بنابراین پیشنهاد کردند که آزوسپیریلوم در همان مرحله ظهور ریشه‌چه اثرات برگشت‌ناپذیر خود بر مرفولوژی و متابولیسم ریشه ذرت را القاء می‌نماید (۱۲).

بسیاری از مطالعات دیگر هم اثرات مثبت آغشته‌سازی با آزوسپیریلوم را بر روی شاخص‌های رشد ریشه به صورت افزایش طول ریشه و تعداد ریشه‌های فرعی، افزایش تعداد و تراکم تار کشنده و سطح کل ریشه، افزایش وزن خشک ریشه، ازدیاد تقسیم سلولی در مریستم ریشه و تحریک تراوشات ریشه گزارش کرده‌اند (۲، ۸، ۱۰، ۱۳، ۱۵، ۱۹، ۲۵، ۲۶). این در حالی است که تحقیقات دیگری به طور واضح کاهش در طول، بیوماس و حجم ریشه‌را علیرغم افزایش در شاخص‌های رشد ساقه گزارش کرده‌اند (۴، ۱۸).

بررسی منابع ما را به این فرضیه رهنمون ساخت که مراحل اولیه جوانه‌زنی و رشد گیاهچه یک مرحله فنولوژیک مناسب برای بررسی اثرات باکتری بر رشد گیاه است و از سوی دیگر این ایده را به وجود آورد که احتمالاً علّت تناقضات اشاره شده در منابع برای اثر باکتری بر شاخص‌های رشد ریشه، سویه باکتری، غلظت مایه تلقیح یا ژنوتیپ ارقام زراعی بوده است. لذا در این پژوهش تأثیر غلظت‌های مختلف دو سویه از باکتری آزوسپیریلوم برازیلنس[1] را بر شاخص‌های رشد ریشه گیاهچه سه رقم گندم ایرانی در مراحل اوّلیه رشد مورد بررسی قرار داده‌ایم تا فرضیه فوق مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روشها

در این پژوهش که در آزمایشگاه تحقیقاتی گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان در سال ۱۳۷۹ انجام گرفت اثر ۱۰ سطح علظت (یعنی ۰ تا 10^9 سلول در میلی‌لیتر) از دو سویه باکتری آزوسپیریلوم برازیلنس (سویه بومی و سویه استاندارد) بر روی توسعه سیستم ریشه‌ای سه رقم گندم روشن، قدس، امید در یک آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار به صورت زیر مورد ارزیابی قرار گرفت:

بذرهای گندم *(T. aestivum)* ارقام فوق‌الذکر از مرکز تحقیقات کشاورزی استان اصفهان تهیه و در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و متعاقب آن با آب استریل چندین مرتبه شستشو شدند تا اثر هیپوکلریت سدیم حذف شود. سپس بذور در شرایط کشت‌آبی[2] و تماس با آب استریل به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه درون اتاقک کشت قرار داده شدند.

کلنی‌های حاصل از تکثیر دو سویه آزوسپیریلوم برازیلنس (سویه بومی Dol جداسازی شده از گندمهای منطقه دولت‌آباد اصفهان و سویه استاندارد موسوم به Sp7 خریداری شده از کمپانی AURIS) که در محیط جامد Nfb [3] تولید شده بود به طور جداگانه به محیط Nfb مایع همراه ۱ گرم در لیتر از NH_4Cl منتقل گردید و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس باکتری‌های تکثیر شده در این محیط با کمک سانتریفوژ (۳۰۰۰×g) به مدت ۱۰ دقیقه ته نشین شدند. مایع

1 . *Azospirillum brasilense*

2 . Hydroponic

۳. محیط کشت Nfb شامل ۵ گرم اسید مالیک، ۰/۵ گرم K_2HPO_4، ۰/۲ گرم $MgSO_4$، ۰/۰۱ گرم NaCl، ۰/۰۲ گرم $CaCl_2$، ۴ گرم KOH، ۴ میلی‌گرم FeEDTA، ۱ میلی‌لیتر محلول ویتامین (۰/۰۱ گرم بیوتین و ۰/۰۲ گرم پیلوکسین در یک لیتر محلول)، ۲ میلی‌لیتر محلول عناصر کمیاب (حاوی ۰/۲ گرم Na_2MoO_4، ۰/۲۳۵ گرم $MnSO_4$ و ۰/۲۸ گرم H_3BO_3 و ۰/۰۰۸ گرم $CuSO_4$ و ۰/۰۲۴ گرم $ZnSO_4$ در یک لیتر آب) در هر لیتر آب می‌باشد که برای محیط جامد ۱۵ گرم در لیتر آگار - آگار به آن اضافه می‌شود.

فوقانی جدا شده و توده باکتری باقیمانده پس از تعلیق در بافر فسفات نمکی (۰/۴ گرم فسفات دی هیدروژن پتاسیم و ۱/۴۸ گرم فسفات هیدروژن دی‌پتاسیم و ۷/۲ گرم کلرور سدیم در یک لیتر آب با pH=۷) سوسپانسه شده و مجدداً سانتریفوژ گردید. این عمل دوبار تکرار شده و در نهایت سوسپانسیون از توده باکتری در محلول بافر تهیه گردید که جذب نوری آن ۱/۰۵ در طول موج ۵۴۰ nm بود. این غلظت معادل $۱۰^{۹}$ سلول در میلی‌لیتر[1] از باکتری می‌باشد که با توجه به سری رقتها و معیار مک فارلند، غلظت‌های $۱۰^{۱}$ تا $۱۰^{۸}$ سلول در میلی‌لیتر از باکتریها نیز از آن تهیه گردید (۱۵، ۱۷).

لوله‌های استریل حاوی گیاهچه‌های ۳ روزه گندم مطابق طرح آماری با غلظت‌های $۱۰^{۱}$ تا $۱۰^{۹}$ سلول در میلی‌لیتر از دو سویه مذکور تلقیح شدند و تعداد مساوی از گیاهچه‌های گندم نیز به عنوان تیمار شاهد و بدون تلقیح با باکتری در نظر گرفته شدند. لوله‌های حاوی گیاه مجدداً به اتاقک کشت منتقل گردیدند. پس از ۴ روز گیاهچه‌های ۷ روزه گندم از لوله‌ها خارج شده و برای هر تیمار طول ریشه، وزن خشک ریشه و نیز تعداد انشعابات ریشه‌ای[2] مورد بررسی قرار گرفت. همچنین از محلول‌های تمام لوله‌ها در شرایط استریل آزمون آلودگی‌های متفرقه به عمل آمد. یعنی یک لوپ (حلقه) از محلول هر یک از لوله‌ها برداشت شده و بر روی پلیت‌های غذائی آگار پخش گردید تا احتمال آلودگی با قارچ یا باکتری دیگری نیز مورد بررسی قرار گیرد. بررسی خصوصیات مرفولوژی کلنی‌های حاصله و صفات میکروسکوپی آنها نشان می‌داد که این صفات با صفات سوشهای اولیه آزوسپیریلوم تطابق دارد. تجزیه واریانس برای داده‌ها به کمک نرم‌افزار SAS انجام و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون دانکن صورت گرفت.

نتایج

در این آزمایش اثر غلظت‌های مختلف دو سویه باکتری آزوسپیریلوم بر روی تعداد انشعابات ریشه، طول ریشه و وزن خشک ریشه برای هر سه رقم گندم مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصله در جداول ۱ الی ۴ و شکل ۱ نشان داده شده است.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل واریانس (جدول ۱) که برای نتایج تعداد انشعابات، طول ریشه و وزن خشک آن محاسبه شده است بیانگر این است که تیمارهای مختلف (سوش، غلظت و رقم) و اثر متقابل آنها معنی‌دار می‌باشد.

نتایج مندرج در جدول شماره ۲ تعداد انشعابات ریشه‌ای در غلظت‌های مختلف از دو سویه Dol و Sp7 را نشان می‌دهد. ارقام مندرج در این جدول نشان می‌دهند که اثر سویه و غلظت باکتری بر ظهور انشعابات ریشه‌ای در ارقام گندم متفاوت بوده است. به طوریکه سویه Dol دارای بهترین اثر در غلظت $۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر بر ظهور انشعابات ریشه‌ای رقم قدس بوده است؛ اما سویه Sp7 بیشترین اثربخشی خود را در غلظت $۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر در رقم روشن داشته است. از نتایج مندرج در این جدول به خوبی مشهود است که سوشهای باکتری تا غلظت $۱۰^{۳}$ سلول در میلی‌لیتر تأثیر معنی‌داری بر ظهور انشعابات ریشه‌ای نداشته‌اند و غلظت مؤثر جهت تحریک ریشه برای تولید انشعابات ریشه‌ای نیز متفاوت و میزان شروع تأثیرپذیری در قدس با غلظت $۱۰^{۳}$ و برای امید $۱۰^{۵}$ می‌باشد. در مجموع صرف نظر از سویه ورقم زراعی بیشترین تعداد انشعابات ریشه‌ای در غلظت $۱۰^{۷}$-$۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر از باکتری به دست آمده است. غلظت‌های بالاتر از هر دو سویه باعث شده‌اند تا تعداد انشعابات ریشه‌ای از تعداد به دست آمده در غلظت $۱۰^{۷}$ سلول در میلی‌لیتر کمتر باشند.

در شکل ۱ نمودارهای a و b به ترتیب اثرات غلظت‌های مختلف دو سویه Dol و Sp7 را بر مجموع طول انشعابات ریشه ارقام گندم نشان می‌دهند. در این نمودارها به خوبی مشخص است که بیشترین اثربخشی هر دو سویه بر طول ریشه ارقام گندم در غلظت $۱۰^{۷}$ – $۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر رخ داده است. مقایسه این دو نمودار نشان می‌دهد که حداکثر افزایش طول انشعابات ریشه در غلظت $۱۰^{۷}$ – $۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر رخ داده است. همچنین این نمودارها نشان می‌دهند که حداکثر افزایش طول انشعابات ریشه در غلظت $۱۰^{۷}$ – $۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر از سویه Dol برای گندم قدس به دست آمده است که معادل ۵۷/۵ درصد نسبت به حالت شاهد (تیمار بدون باکتری) می‌باشد. در مقابل بیشترین اثربخشی سویه Sp7 در غلظت $۱۰^{۷}$

1 . CFU/ml

2 . Seminal Root

جدول ۱- مقادیر f حاصل از تجزیه واریانس برای تعداد انشعابات، طول ریشه و وزن خشک آن برای تیمارهای مختلف

منابع تغییرات	درجه آزادی	تعداد انشعابات	طول ریشه	وزن خشک ریشه
تکرار	۲	۰/۰۴ ns	۰/۶۳ ns	۰/۵۳ ns
رقم	۲	۴/۵*	۳/۷۵*	۴/۷۳*
سویه	۱	۲۱۱/۲۱**	۴۵۰/۶۷**	۱۸۵/۲**
غلظت	۹	۳۴۸/۹**	۴۳۵/۸۳**	۲۶۵/۱۱**
رقم × سویه	۲	۴/۱۳*	۲۰۵/۴**	۳/۹۲*
سویه × غلظت	۹	۲/۱۵*	۲/۳۱*	۳/۷۴**
رقم × غلظت	۱۸	۱۷۹/۴**	۳۴۷/۷**	۲/۵۱*
سویه × رقم × غلظت	۱۸	۲/۰۶	۱/۰۴ ns	۰/۹۶ ns

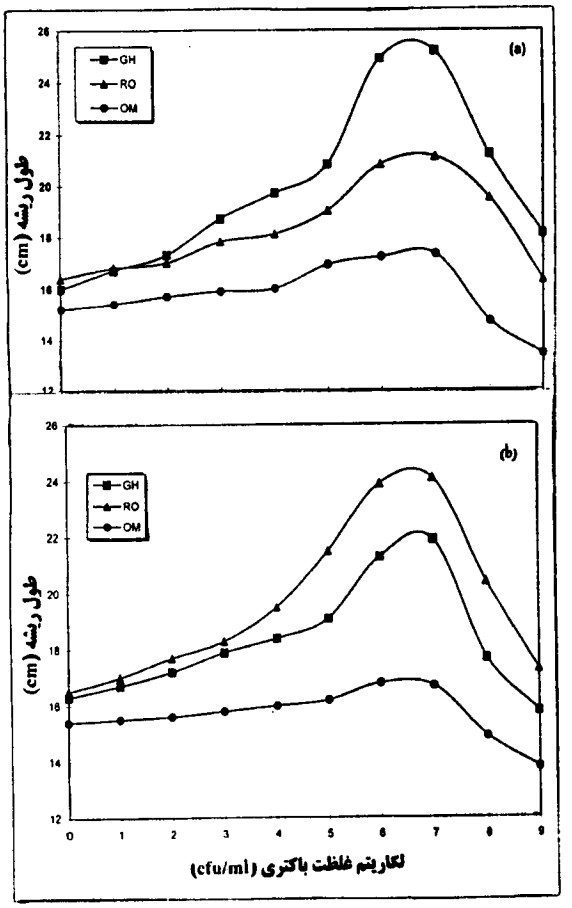
** در سطح ۱٪ معنی‌دار * در سطح ۵٪ معنی‌دار ns معنی‌دار نیست

جدول ۲- میانگین تعداد انشعابات ریشه ارقام گندم در غلظت‌های مختلف باکتری آزوسپیریلوم برازیلنس

سویه	رقم	غلظت باکتری آزوسپیریلوم‌برازیلنس (cfu ml^{-1})									
		۰	$۱۰^{۱}$	$۱۰^{۲}$	$۱۰^{۳}$	$۱۰^{۴}$	$۱۰^{۵}$	$۱۰^{۶}$	$۱۰^{۷}$	$۱۰^{۸}$	$۱۰^{۹}$
Dol	قدس	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵/۳۳^{cd}	۵/۶۶^{de}	۶/۲۳^{fg}	۷/۶۲^{i}	۸/۱۲^{j}	۵/۳۳^{cd}	۴/۶۶^{bc}
	روشن	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵/۲۰^{cd}	۵/۶۶^{de}	۶/۳۳^{fg}	۶/۶۶^{gh}	۵^{c}	۴/۳۳^{ab}
	امید	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵/۳۳^{od}	۵/۴۳^{d}	۵/۶۶^{de}	۵^{c}	۴^{a}
Sp7	قدس	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵/۳۳^{cd}	۵/۳۳^{cd}	۵/۶۶^{de}	۶/۲۱^{fg}	۵^{c}	۴^{a}
	روشن	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵/۳۳^{cd}	۵/۴۶^{d}	۶^{ef}	۶/۶۶^{gh}	۷/۱۳^{hi}	۵^{c}	۴/۳۳^{ab}
	امید	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵^{c}	۵/۳۳^{cd}	۵/۳۳^{cd}	۴/۲۳^{ab}	۴^{a}

* میانگین‌های ارقام با حروف مشترک غیر معنی‌دار ($P \leq 0.05$) به وسیله آزمون دانکن می‌باشد.

– 10^{6} سلول در میلی‌لیتر در ریشه گندم روشن به دست آمده است که معادل ۴۶/۰۶ درصد نسبت به حالت شاهد می‌باشد. کمترین اثر برای هر دو سویه در رقم امید به دست آمده است.



شکل ۱- اثر غلظت‌های مختلف سویه
Dol (a Sp7 (b بر رشد طولی ریشه ارقام گندم
GH : رقم قدس Ro: رقم روشن Om رقم امید

جدول ۳ میانگین اثر سویه و رقم و تاثیرات متقابل سویه و رقم را بر رشد طولی انشعابات ریشه‌ای ارقام گندم نشان می‌دهد. نتایج مندرج در این جدول نشان می‌دهند که طول انشعابات ریشه‌ای گیاهچه‌های ارقام گندم مورد بررسی، دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر بوده‌اند. به طوریکه رشد طولی انشعابات ریشه دو رقم قدس و روشن در مقایسه با رقم امید بیشتر بوده است.

با دقت در جدول ۳ می‌توان دریافت که اگر چه اختلاف میانگین اثر سویه بر رشد طولی ریشه برای دو سویه Dol (۱۷/۹۷ سانتی‌متر) و Sp7 (۱۷/۸۴ سانتی‌متر) معنی‌دار نیست ولی اثرات متقابل سویه و رقم کاملاً معنی‌دار است. به طوریکه رقم قدس با سویه Dol بیشترین میانگین طول ریشه را نشان داده که معادل ۱۹/۸۶ سانتی‌متر است و در مقابل، رقم روشن بیشترین میانگین طول ریشه را با سویه Sp7 نشان داده که معادل ۱۹/۶۳ سانتی‌متر است و تفاوت طول ریشه رقم روشن با این سویه در مقایسه با سویه Dol (۱۸/۲۸ سانتی‌متر) کاملاًمعنی‌دار است.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر سویه و رقم و اثر متقابل آنها بر رشد طولی ریشه گندم (cm)

رقم	سویه Dol	سویه Sp7	میانگین اثر رقم
قدس	۱۹/۸۶[a]	۱۸/۲۳[b]	۱۹/۰۴[a]
روشن	۱۸/۲۸[b]	۱۹/۶۳[a]	۱۸/۹۵[a]
امید	۱۵/۷۷[c]	۱۵/۶۷[c]	۱۵/۷۲[b]
میانگین اثر سوش	۱۷/۹۷[a]	۱۷/۸۴[a]	

* ستون و ردیف آخر مستقل از ۶ عدد دیگر مقایسه میانگین شده‌اند.

در مقابل رقم زراعی امید نسبت به هر دو سویه عکس‌العمل مشابهی را نشان داده که در مقایسه با واکنش دو رقم زراعی دیگر کمتر می‌باشد. این امر مبین اهمیت تجانس سویه باکتری با رقم زراعی است و نشان می‌دهد که ارقام زراعی مختلف نسبت به سوشهای مختلف واکنش‌های متفاوتی نشان می‌دهند.

نتایج مندرج در جدول ۴ اثر غلظت‌های مختلف دو سویه از باکتری آزوسپیریلوم را بر روی وزن خشک ریشه گیاهچه‌های گندم نشان می‌دهند. اعداد این جدول نیز گویای آن است که صرف نظر از سویه باکتری یا رقم زراعی حداکثر اثرات مثبت بر وزن خشک ریشه در غلظت‌های 10^{7} – 10^{6} سلول در میلی‌لیتر به دست آمده است. در غلظت‌های 10^{1} تا 10^{5} سلول در میلی‌لیتر گرچه یک روند افزایش وزن خشک ریشه به چشم می‌خورد امّا این تفاوتها معنی‌دار نیست. در مقابل تفاوت وزن خشک ریشه در غلظت 10^{7} – 10^{6} سلول در میلی‌لیتر نسبت به

غلظت‌های قبلی کاملاً معنی‌دار و مشهود است. غلظت‌های بالاتر از 10^7 سلول در میلی‌لیتر اثر مثبتی بر وزن خشک ریشه نداشته‌اند. نتایج به دست آمده از میانگین وزن خشک ریشه‌ها هماهنگ و همسو با نتایج به دست آمده از دو شاخص قبلی یعنی طول و تعداد انشعابات ریشه هستند. جدول ۲ و شکل ۱ نیز نشان داده‌اند که بیشترین تعداد انشعابات و طول ریشه در غلظت 10^7 – 10^6 سلول در میلی‌لیتر به دست آمده‌اند و جدول ۴ نیز نشان می‌دهد حداکثر وزن خشک ریشه هم در همین غلظت‌ها به دست آمده است.

نتایج مندرج در جدول ۴ نشان می‌دهند که اثر متقابل سویه و رقم بر وزن خشک ریشه ارقام مختلف کاملاً معنی‌دار است به طوریکه ارقام قدس و روشن بهترین عکس‌العمل را به ترتیب با سویه‌های Dol و Sp7 نشان داده‌اند. در مقابل، وزن خشک ریشه رقم امید در حالت تلقیح با باکتری تفاوت چندانی را نسبت به حالت عدم استفاده از باکتری نشان نمی‌دهد و این پاسخ در برابر هر دو سویه Dol و Sp7 مشابه می‌باشد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که رقم زراعی امید با هیچ یک از دو سویه مذکور همولوگ و متجانس نبوده است و لذا نتوانسته روابط همیاری مؤثری را برقرار کند و لذا شاخص‌های رشد ریشه نیز تحت تأثیر قرار نگرفته‌اند.

بحث

اطلاعات حاصل از این مطالعه نشان می‌دهند که ریشه‌های ارقام گندم واکنش متفاوتی رانسبت به سطوح مختلف غلظت و نوع سویه باکتری آزوسپیریلوم برازیلنس بروز می‌دهند. به عبارت دیگر یک سطح بهینه و مطلوب برای مایه تلقیح ریشه وجود دارد که با توجه به رقم گیاه و سویه باکتری تعیین می‌گردد. در این مطالعه بهترین غلظت آغشته‌سازی برای ارقام مختلف گندم 10^7 تا 10^6 سلول در میلی‌لیتر به دست آمده

جدول ۴- میانگین وزن خشک ریشه ارقام گندم (بر حسب میلی‌گرم) در غلظت‌های مختلف باکتری آزوسپیریلوم

سوش	رقم	غلظت باکتری آزوسپیریلوم‌برازیلنس ($cfu\ ml^{-1}$)									
		۰	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8	10^9
Dol	قدس	۲/۷۸^{de}	۲/۷۹^{de}	۲/۹۰^{de}	۳/۰۵^{e}	۳/۱۷^{e}	۳/۷۸^{f}	۴/۱۸^{fg}	۴/۳۶^{g}	۳/۰۲^{e}	۲/۸۰^{de}
	روشن	۲/۸۵^{de}	۲/۹۷^{de}	۲/۹۷^{de}	۳/۰۷^{e}	۳/۱۱^{e}	۳/۱۵^{e}	۳/۸۴^{f}	۴/۰۵^{fg}	۲/۹۷^{de}	۲/۷۵^{de}
	امید	۲^{b}	۲/۲۷^{b}	۲/۳۳^{bc}	۲/۳۵^{bc}	۲/۳۷^{bc}	۲/۳۹^{bc}	۲/۷۲^{cde}	۲/۸۴^{de}	۲/۲۰^{b}	۱/۶۹^{a}
Sp7	قدس	۲/۸۵^{de}	۲/۸۴^{de}	۲/۹۷^{de}	۳/۰۲^{e}	۳/۱۲^{e}	۳/۱۵^{e}	۳/۶۶^{f}	۳/۸۱^{f}	۲/۶۲^{e}	۲/۴۵^{cd}
	روشن	۲/۹^{de}	۳^{e}	۳/۰۲^{e}	۳/۲۳^{e}	۳/۲۵^{e}	۳/۳۷^{e}	۴/۱۶^{fg}	۴/۴۰^{g}	۲/۹۵^{de}	۲/۴۵^{cd}
	امید	۲/۱^{b}	۲/۳۱^{bc}	۲/۳۴^{bc}	۲/۳۵^{bc}	۲/۳۶^{bc}	۲/۳۸^{bc}	۲/۶۵^{cd}	۲/۶۸^{cd}	۲/۱۴^{b}	۲/۰۲^{b}

* میانگین‌های ارقام با حروف مشترک غیر معنی‌دار ($P \leq 0.05$) به وسیله آزمون دانکن می‌باشد.

است. این در حالی است که کاپولنیک و همکاران در سال ۱۹۸۵ مناسب‌ترین غلظت برای آغشته‌سازی گندم‌های منطقه بومی خود را 10^{6}-10^{5} سلول در میلی‌لیتر گزارش کرده‌اند(۱۷). فالیک و همکاران ۱۹۸۸ و آرساک و همکاران در سال ۱۹۹۰ بهترین غلظت برای آغشته‌سازی گیاهچه‌های ذرت را 10^{7} سلول در میلی‌لیتر معرفی نموده‌اند (۲،۸). هاداس و اوکون در ۱۹۸۷ مناسب‌ترین غلظت برای آغشته‌سازی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی را غلظت‌های بیش از 10^{8} سلول در میلی‌لیتر گزارش کرده‌اند (۱۰). بنابراین می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که غلظت بهینه برای آغشته‌سازی گیاهان زراعی هر منطقه باید با مطالعات اختصاصی تعیین شود و اطلاق یک غلظت کلی برای همه محصولات و یا حتی همه ارقام زراعی یک گونهٔ گیاهی کاری نادرست می‌باشد.

از سوی دیگر نتایج این مطالعه نشان می‌دهند که در تلقیح گیاهان با باکتریهای سودمند یک حد آستانه غلظت وجود دارد. این موضوع از آنجا تائید می‌گردد که سطوح بالای مایه تلقیح (10^{8} تا 10^{9} سلول در میلی‌لیتر) نه تنها اثر سودمندی نداشته است بلکه گاه توسعه سیستم ریشه‌ای را تا حد کمتر از نمونه‌های شاهد (بدون تلقیح) تنزل داده است. گیاهچه‌های رشد یافته در غلظت‌های بالای مایه تلقیح از نظر مرفولوژی ریشه شکل غیر طبیعی پیدا کرده به طوریکه آثار قهوه‌ای شدن بافت ریشه را نشان می‌دادند. تأثیر منفی غلظت‌های بالای مایه تلقیح را به عوامل مختلفی می‌توان نسبت داد. مثلاًبا توجه به اینکه تولید مواد رشد گیاهی (فیتوهورمونها) خصوصاً ایندول استیک اسید (IAA) توسط آزوسپیریلوم به خوبی به اثبات رسیده است (۲۰، ۲۲) و از سوی دیگر مطالعات اثر فیزیولوژیکی IAA بر رشد ریشه نشان داده‌اند که اثر هورمون اکسین بر رشد ریشه کاملاً وابسته به غلظت است، یعنی در غلظت‌های کمتر محرک رشد و در غلظت‌های خیلی زیاد بازدارنده رشد ریشه است (۲۴)، شاید بتوان چنین استدلال کرد که در غلظت‌های بالای مایه تلقیح (10^{8} تا 10^{9} سلول در میلی‌لیتر) میزان هورمونهای رشد تولید شده توسط باکتریها به سطح بازدارنده برای رشد ریشه می‌رسد و به همین دلیل موجب کاهش توسعه سیستم ریشه‌ای می‌گردد. جین و پاتری کوئین در سال ۱۹۸۵ اظهار کردند که اثر غلظت مایه تلقیح روی توسعه سیستم ریشه‌ای می‌تواند به وسیله کاربرد مواد تحریک کننده رشد گیاهی از جمله اکسین‌ها تقلید شود (۱۴). باربیری و گالی در سال ۱۹۹۳ اظهار داشتند که سویه SPM7918 که یک موتانت از آزوسپیریلوم برازیلنس با توان تولید خیلی کم IAA در مقایسه با سویه وحشی است، توانایی بسیاری کمتری برای افزایش تعداد و طول ریشه‌های فرعی و تراکم تارهای کشنده نشان می‌دهد (۳). کاپولنیک و همکاران در سال ۱۹۸۵ گزارش کردندکه غلظت مطلوب آغشته‌سازی با سویه موتانت(FT-326) که یک موتانت آزوسپیریلوم برازیلنش با توان تولید فوق‌العاده IAA است، 10^{4} سلول در میلی‌لیتر می‌باشد و این در حالی است که مناسب‌ترین غلظت برای سوش‌هایی با توان معمولی تولید IAA 10^{5}-10^{6} سلول در میلی‌لیتر است (۱۷). امّا از آنجا که اثرات سویه FT-326 بر طول ریشه در مقایسه با گیاهان شاهد غیر آغشته معنی‌دار نبود. به نظر می‌رسد برای تایید نظریه فوق در رابطه با اثر میزان IAA تولید شده توسط آزوسپیریلوم برازیلنس در تحریک یا بازدارندگی رشد ریشه شواهد و دلائل بیشتری لازم است. باید توجه داشت که اثرات منفی غلظت بالای مایه تلقیح را به عوامل دیگری هم می‌توان نسبت داد. حقیقت آن است که گرچه باکتریهای آزوسپیریلوم برازیلنس با تأمین منابع ازت اضافی یا تولید هورمونهای رشد و یا با کمک به جذب بهینه آب و املاح (۵، ۶، ۲۰، ۲۲) بر میزان رشد میزبان گیاهی می‌افزایند، امّا رشد و فعالیت نیتروژنازی باکتری انرژی خواه بوده و این انرژی از طریق فتوسنتز توسط میزبان و کربوهیدراتهای ارسال شده به ریشه تأمین می‌گردد. در غلظت‌های زیاد تلقیح، نیاز بیشتر باکتری به انرژی و مواد اولیه از تعادل با جریان فتوسنتز میزبان خارج شده و رابطه متقابل گیاه – باکتری از حالت یک همزیستی مسالمت‌آمیز به جنبه روابط انگلی گرایش پیدا می‌کند و تأثیرات منفی در رشد ریشه میزبان بر جای می‌گذارد.

مطالعه حاضر نه تنها اهمیت انتخاب غلظت مناسب مایه تلقیح را نشان می‌دهد، بلکه مؤید اهمیت تجانس نوع سویه باکتری با رقم زراعی نیز می‌باشد. زیرا در شرایط غلظت یکسان، اثر سویه و رقم بر شاخص‌های رشد ریشه کاملاً متفاوت بوده است. در غلظت 10^{7} سلول در میلی‌لیتر سویه Dol بهترین اثر بر پارامترهای رشد ریشه را در رقم قدس و سویه Sp7 بیشترین

اثر را در رقم روشن بروز داده است و هر دو سویه اثر کمی بر توسعه سیستم ریشه‌ای رقم امید داشته‌اند. جین و پاتری کوئین نیز در سال ۱۹۸۴ اظهار داشته‌اند که تفاوت در قدرت جذب سوشهای مختلف آزوسپیریلوم به ریشه ارقام زراعی مختلف بیانگر آن است که ارتباط متقابل سویه – رقم زراعی در سطح ژنوم تعریف می‌شود. آنها در مطالعه خود نشان داده‌اند که اولاً آزوسپیریلوم خیلی بهتر از ریزوبیوم، ازتوباکتر و اشرشیاکلی قادر به تغییر شکل تار کشنده گندم است و ثانیاً سوشهای مختلف آزوسپیریلوم، ارقام مختلف گندم را به میزان متفاوتی متأثر می‌سازند (۱۳).

به هر حال مطالعه حاضر نشان می‌دهد که با انتخاب سویه‌ها و غلظت مناسب برای هر رقم زراعی می‌توان انتظار داشت که آزوسپیریلوم اثر مثبتی بر توسعه ریشه داشته باشد و این احتمالاً یکی از مکانیسم‌های عمل این باکتری در بهبود شاخص‌های رشد گیاه است. گزارشات متعددی مطالب فوق را تایید می‌نماید. کاپولنیک و همکاران در ۱۹۸۵ (۱۵ و ۱۷) و باشان در ۱۹۸۶ (۴) گزارشاتی مبنی بر اثر مثبت تلقیح با باکتری آزوسپیریلوم در توسعه ریشه گندم ارائه داده‌اند. موضوع بهبود و توسعه سیستم ریشه‌ای نه تنها در گندم بلکه در سایر گیاهان نیز گزارش شده است. کاپولنیک و همکاران در ۱۹۸۱ نشان داده‌اند که تلقیح با آزوسپیریلوم برازیلنس اثر چشمگیری در توسعه سیستم ریشه‌ای *Setaria italica* دارد (۱۶). ساریج و همکاران در سال ۱۹۹۲ اظهار کردند که آغشته‌سازی با آزوسپیریلوم برازیلنس تعداد کل و طول ریشه‌های سورگوم را حدود ۳۳ تا ۴۰ درصد بیش از گیاهان کنترل افزایش داده است (۲۵). فول چیری و فریونی نیز در سال ۱۹۹۴ در یک مطالعه مزرعه‌ای در آرژانتین به این نتیجه رسیدند که آغشته‌سازی گیاهچه‌های ذرت با آزوسپیریلوم لیپوفروم دارای اثر معنی‌داری بر توسعه سیستم ریشه‌ای در زمان برداشت گیاه بوده است (۹). بنابراین می‌توان احتمال داد که گزارشات منفی درباره اثر باکتری آزوسپیریلوم بر شاخص‌های رشد ریشه که توسط کوسی (۱۸) در سال ۱۹۹۸ و یا به وسیله ریندرز و ولاساک (۲۳) در ۱۹۸۲ ارائه شده است، احتمالاً نتیجه انتخاب نامناسب غلظت باکتری یا عدم تناسب سویه باکتری با ارقام زراعی و یا نتیجه شرایط نامساعد تلقیح بوده است.

در مجموع مطالعه حاضر نشان می‌دهد قبل از هر نوع بهره‌برداری وسیع از این باکتری برای ارقام زراعی مطالعات عملی برای تعیین سویه و غلظت مایه تلقیح مناسب ضروری است. با انتخاب سویه و غلظت مناسب این باکتری یک افزایش در توسعه سیستم ریشه‌ای بلافاصله پس از جوانه‌زنی ظاهر می‌شود، که احتمالاً در مراحل بعد نتیجه آن به صورت افزایش در میزان محصول و سایر شاخص‌های رشد نمایان خواهد شد.

سپاسگزاری

این‌تحقیق با حمایت مالی دانشگاه اصفهان انجام گرفته است وبدین وسیله از مساعدتهای معاونت پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان و دانشکده علوم شهرکرد قدردانی می‌شود.

REFERENCES

مراجع مورد استفاده

۱. روستا، م.، صالح راستین، ن. و م. مظاهری اسدی. ۱۳۷۷. بررسی فراوانی و فعالیت آزوسپیریلوم در برخی از خاکهای ایران، مجله علوم کشاورزی ایران، جلد ۲۹، شماره (۲):۲۹۸-۲۸۵.

2. Arsac, J. F., C. Lamothe, D. Mulard, & J. Fages. 1990. Growth enhancement of maize through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. Agronomie. 10: 649-654.
3. Barbieri, P., & E. Galli, 1993. Effect on wheat root development of inoculation with an *Azospirillum brasilense* mutant with altered indole – 3- acetic acid production. Res Mircobiol. 144: 69-75.
4. Bashan, Y. 1986. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. Soil Biol. Biochem. 18: 297-301.
5. Bashan, Y. & G. Holguin. 1997. *Azospirillum* plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Can. J. Microbiol. 43: 103-121.
6. Bashan, Y. & H. levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospillium* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. 36: 591-607.

7. Creus, C. M., r. . Sueldo, & C. A. Barassi. 1996. *Azospirillum* inoculation in pregerminating wheat seeds. Can. J. Microbiol. 42: 83-86.
8. Fallik, E., Y. Okon, & M. Fischer. 1988. Growth response of maize roots to *Azospirillum* inoculation: effect of soil organic matter content, number of rhizosphere bacteria and timing of inoculation. Soil Biol. Biochem. 20: 45-49.
9. Fulchieri, M., & L. Frioni. 1994. Effect of *Azospirillum brasilenes* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. Biol. Fertil. Soil. 5: 241-247.
10. Hadas, R. & Y. Okon. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. Biol. Fertil. Soil. 5: 241-247.
11. Jacoud, C., D. Faure, P. Wadoux, R. Bally. 1998. Development of a strain – specific probe to follow inoculated *Azospirillum lipoferum* CRT1 under field conditions and enhancement of maize root development by inoculation. FEMs Microbiol. Ecol. 27: 43-51.
12. Jacoud, C., D. Job, P. Wadoux, & R. Bally. 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. Can. J. Microb. 45: 339-342.
13. Jain, D. K., & D. G. Patriquin. 1984. Root hair deformation, bacterial attachment and plant growth wheat *Azospirillum* association. Appl. Environ. Microbiol. 48: 1208-1213.
14. Jain, D. K., & D. G. Partiquin. 1985. Characterization of substance produced by *Azospirillum* which causes branching of wheat root hairs. Can. J. Microbiol. 31: 206-210.
15. Kapulnik, Y., R. Gafny, & Y. Okon. 1985. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO_3^- uptake in wheat in hydroponic systems. Can. J. Bot. 63: 627-631.
16. Kapulnik, Y., Y. Okon, J. Kegel, I. Nuk, & Y. Henis. 1981. Effects of temperature, nitrogen fertilization and plant age on nitrogen fixation by *setaria italica* inoculated with *Azospirillum brasilenes*. Plant Physiol. 68: 340-343.
17. Kapulnik, Y., Y. Okon & Y. Henis. 1985. Changes in root morphology of wheat caused by *Azospirillum* inoculation. Can. J. Microbiol. 31: 881-887.
18. Kucey, R. M. N. 1988. Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative nitrogen – fixing bacteria measured under field conditions. Can. J. Microb. 34: 735-739.
19. Levanony, H. & 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.
20. Omay, S. H., W. A. Schmidt, P. Martin, & F. Bangerth. 1993. Indole acetic acid production by the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* Cd under in vitro conditions. Can. J. Microbiol. 39: 187-192.
21. Pacovsky, R. S. 1990. Development and growth effects in sorghum – *Azospirillum* association. . Appl. Bacteriol. 68: 555-563.
22. Patten, C. L. & B. R. Glick. 1996. Bacterial biosynthesis of indole – 3- acetic acid. Can. J. Microbiol. 42: 207-220.
23. Reynders, L. & K. Valassak. 1982. Use of *Azospirillum brasilense* as a biofertilizer in intensive wheat cropping. Plant and Soil. 66: 217-223.
24. Salisbury, F. B., & C. W. Ross. 1992. Platn physiology. Forth Edition. Wordworth. Inc.
25. Sarig, S., Y. Okon, & A. Blum. 1992. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on growth dynamics and hydrolic conductivity of *Sorghum bicolor* roots. J. Plant Nutri. 15: 805-819.
26. Umali- Garcia, M., D. H. Hubbel, M. H. Gaskins, & F. B. Dazzo. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. Appl. Environ. Microbiol. 39: 219-229.

The Effect of Strain and Concentration of *Azospirillum brasilense* Bacterium on Growth and Development of Root in Wheat Cultivars

R. AMOOAGHAIE[1], A. MOSTAJERAN[2] AND G. EMTIAZI[3]
1, Assistant Professor, Biology Dep., Shahrekord University
2, 3, Associate Professors, Biology Dep., Isfahan University
Accepted Dec. 12, 2001

SUMMARY

Azospirillum brasilense is one of the diazotroph microorganisms which has been isolated from the rhizosphere of grasses in both tropical and temperate regions. In the last few years there have been several reports, indicating different results as regards significant increases in cereal growth when applying of this bacterium. This research was conducted in the research laboratory of Biology. Dept. in Isfahan University in 2000 to find out the suitable strain and optimum concentration of inoculum for cultivars of wheat as well as the effects on wheat root growth. In the study, wheat seeds (*T. aestivum)* of three cultivars Ghods, Roshan and Omid were inoculated with two *Azospirillum* strains (Sp7 and Dolatabad strains) with concentrations of 10^1 up to 10^9 cfu/ml, then the root length, dry weight and number of root branches, being measured and evaluated. Inoculation with 10^6-10^7 cfu/ml in all cases resulted in the largest root development. However, concentrations of 10^8 to 10^9 cfu/ml of strains, caused inhibition in root development. Inoculations with Dolatabad strain exhibited more positive effect on root in Ghods cultivar but Sp7 strains caused the most root development in Roshan cultivar. Either strain had a low effect on Omid cultivar.

Key wrods: Strain of *Azospirillum,* Inoculum concentration, Wheat cultivars, Root system.