مجله کشاورزی بوم‌شناختی (۲) ۱ (۱۳۹۰) ۹۴- ۸۴

بررسی تاثیرمحلول پاشی باکتریهای فیلوسفری محرک رشد گیاه بر رشد و جذب عناصر غذایی در ذرت

مهدیه شمشیری پور[۱]*، احمد اصغرزاده[۲]، هادی اسدی رحمانی[۲]، کاظم خاوازی[۲]، اشرف اسمعیلی زاد[۲]، ویدا همتی[۲]، کبری ثقفی[۲]

[۱] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات،

[۲] موسسه تحقیقات خاک و آب کشور، کرج، ایران

* نویسنده مسئول: mshamshiripour@yahoo.com

شمشیری پور، م.، ا. اصغرزاده، ه. اسدی رحمانی، ک. خاوری، ا. اسمعیلی زاد، و. همتی و ک. ثقفی. ۱۳۹۰. بررسی تاثیرمحلول پاشی باکتریهای فیلوسفری محرک رشد گیاه بر رشد و جذب عناصر غذایی در ذرت. مجلهٔ کشاورزی بوم‌شناختی. ۱ (۲): ۹۴- ۸۴.

چکیده

این تحقیق جهت شناسایی و بررسی تاثیر محلول پاشی باکتری های فیلوسفری بر رشد وجذب عناصر غذایی در ذرت به انجام رسید. به این منظور پس از تهیه نمونه های برگ ذرت از مزارع اطراف کرج نسبت به شمارش جمعیت کل باکتریهای ساکن سطح برگ و جداسازی انواع تثبیت کننده نیتروژن و تولید کننده هورمون های تنظیم کننده رشد اقدام شد. میزان تثبیت نیتروژن با دستگاه کروماتوگرافی گازی و تولید اکسین با روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت. شمارش جمعیت باکتری های ساکن سطح برگ نشان داد که به طور متوسط روی سطح برگ ها جمعیت 10^4 تا 10^6 سلول بر هر گرم برگ وجود دارد. از بین ۳۹ باکتری جدا شده، ۱۰ باکتری برای آزمایش گلخانه ای انتخاب شدند. در آزمایش گلخانه ای سوسپانسیون باکتریها در چهار مرحله بر روی سطوح برگها و اندام هوایی اسپری شدند. گیاهان پس از ۷۵ روز برداشت شدند و شاخص های رشد گیاه و میزان جذب عناصر غذایی در آنها اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که کاربرد ۱۰ باکتری منتخب به صورت برگ پاشی باعث افزایش ارتفاع گیاه، قطر ساقه، وزن تر اندام هوایی و وزن خشک اندام هوایی در مقایسه با تیمار شاهد گردید. تاثیر این باکتری ها بر روی ریشه، نشان دهنده افزایش طول ریشه، حجم ریشه، وزن خشک ریشه و سطح ریشه بود. کاربرد تیمارهای باکتری همچنین باعث افزایش جذب عناصر غذایی شد.

واژه‌های کلیدی: کودهای بیولوژیک،باکتریهای محرک رشد،محلولپاشی کودهای بیولوژیک،فیلوسفر

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

غلات یکی از منابع مهم تامین کننده غذای موردنیاز انسان می باشند. تولید سالانه این محصولات نیاز زیادی به مصرف کودهای شیمیایی دارد که این امر می تواند آلایندگی منابع آب و خاک را در پی داشته باشد. مصرف بی رویه کودهای شیمیایی خود می تواند منجر به آلودگی و کاهش کیفیت محصولات تولیدی نیز گردد. بدین ترتیب استفاده از کودهای زیستی بویژه در تغذیه غلات یکی از راه حل های اساسی و مفید برای تولید محصول سالم می باشد. از جمله میکروارگانیسم های مورد استفاده در تولید کودهای زیستی، باکتری های ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR) هستند. این باکتریها به گروه نامتجانسی از انواع ساکن در ریزوسفر گیاهان اطلاق می شوند که با استفاده از یک یا چند مکانیسم خاص موجب بهبود شاخص های رشد و نمو گیاه می گردند (Glick, 1995).

تثبیت نیتروژن اتمسفری، تولید تنظیم کننده های رشد گیاهی مانند اکسین، جیبرلین و سیتوکینین، افزایش حلالیت عناصر غذایی در خاک، تولید سیدروفور و آنزیم ACC deaminase از راهکارهایی هستند که توسط این باکتریها برای تحریک رشد و نمو گیاهان مورد استفاده قرار می گیرند (Bashan, 1998).

تثبیت نیتروژن اتمسفری توسط پروکاریوت هایی که دارای آنزیم نیتروژناز می باشند انجام میگیرد و انواع تثبیت کننده می توانند بر حسب نوع رابطه با گیاه میزبان مقادیر متفاوتی را تثبیت و در اختیار گیاه قرار دهند. گزارشات بسیاری مبنی بر افزایش رشد گیاهان زراعی بویژه ذرت در اثر تلقیح با انواع باکتریهای تثبیت کننده وجود دارد (Talik, 1982; Zahir, 2000; Hamidi, 2007). یکی از هورمونهای اصلی گروه اکسین، IAA می باشد که توسط بسیاری از باکتریهای ریزوسفری تولید می شود (Vessey, 2003). از لحاظ پیکربندی IAA به آمینو اسید تریپتوفان شباهت دارد و در مطالعات بیوسنتز اکسین، تریپتوفان به عنوان یکی از پیش سازهای این ماده معرفی شده است. تولید IAA توسط باکتری های محرک رشد گیاه عامل اصلی افزایش ریشه، تعداد تارهای کشنده، تعداد ریشه های فرعی و سطحی ریشه باشد (Patten and Glick, 2002; Kloepper, 2003).

واژه فیلوسفر از سال ۱۹۵۶ میلادی رایج شد (Ruinen, 1956) ولی تحقیقات سالهای اخیر نشان داده است که باکتری های محرک رشد گیاه می توانند در سطح برگها نیز ساکن شوند. جامعه میکروبی فیلوسفر شامل انواعی است که روی برگ زندگی فعال دارند و دارای اثرات متقابل با محیط زندگی خود هستند. به این میکروارگانیسم ها سطحی زی (Epiphyllic Microorganism) می گویند که اکثرا شامل باکتری های هوازی، مخمرها و قارچ های رشته ای می باشند (Andrews., 2000; Thompson., 1993).

باکتریهای موجود در سطح برگ متعلق به گروه های تاکسونومیک متنوعی هستند و بطور عمده به جنس های *Bacills, Xanthomonas, Erwinia, Pseudomonas, Corynebacterium* تعلق دارند (Morris, 1998).

جمعیت میکروارگانیسم های سطح برگ دارای نوسان زیادی است و شدیدا وابسته به شرایط محیطی می باشد. برخی از باکتریهای موجود در سطح اندام هوایی گیاهان دارای توان تحریک رشد گیاه می باشند. این باکتریها از راهکارهایی مانند تثبیت نیتروژن اتمسفری، تولید هورمونهای محرک رشد و کنترل عوامل بیماریزای گیاهان استفاده می کنند.

شمار قابل توجهی از میکروارگانیسم های تثبیت کننده نیتروژن بر روی فیلوسفر بسیاری از گیاهان گزارش شده است. وجود باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن در فیلوسفر پنبه و قهوه گزارش شده است (Ruinen, 1965). در بررسی که توسط Murty (۱۹۸۱) روی گیاه پنبه انجام گرفت، فعالیت آنزیم نیتروژناز بین ۰/۷۸-۰/۱۸ $nmol\frac{C_2H_2}{cm..h}$ روی سطح برگ واریته های مختلف پنبه تعیین شده است. کاربرد کورینه باکتریوم و فلاووباکتریوم به صورت اسپری روی برگها سبب افزایش ۳۷٪-۳۰ محصول ذرت گردید (Giri and Pati, 2004). کاربرد باکتریهای فیلوسفری سبب افزایش جوانه زنی و رشد بادام زمینی شده است (Kishore., 2005).

هدف از این تحقیق جداسازی باکتری های فیلوسفری محرک رشد از گیاه ذرت و بررسی تاثیر آنها بر رشد وجذب عناصر غذایی از طریق محلول پاشی در این گیاه میباشد.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش ها

برای مطالعه جمعیت کل باکتریها در سطح برگهای ذرت و جداسازی باکتریهای محرک رشد گیاه، نمونه برداری از برگهای ذرت از ۱۰ مزرعه اطراف کرج انجام شد و از هر مزرعه ۳ نمونه از برگ سوم هر گیاه انتخاب شد. پس از انتقال به آزمایشگاه، قطعات ۵×۵ از وسط برگ جداسازی و به میزان ۵ گرم از این قطعات توزین شد و قطعات برگ در ارلن های حاوی۹۰ میلی لیتر آب مقطر استریل ریخته شد و پس از تهیه سری های رقت، جمعیت کل باکتری های برگ به روش شمارش روی محیط کشت NA بدست آمد.

به منظور جداسازی باکتری های تثبیت کننده نیتروژن از محیط کشت فاقد نیتروژن استفاده شد (Rennie, 1981). ترکیب محیط کشت شامل ساکارز ۵ گرم در لیتر، مانیتول ۵ گرم در لیتر، سدیم لاکتات ۰/۳ گرم در لیتر، KH_2PO_4 ۰/۲ گرم در لیتر، $MgSO_4$ ،$7H_2O$ ۰/۲ گرم در لیتر، K_2HPO_4 ۰/۸ گرم در لیتر، $CaCl_2$ ۰/۰۶ گرم در لیتر، NaCl ۰/۱ گرم در لیتر، Na_2MoO_4 ،$2H_2O$ ۰/۰۲۵ گرم در لیتر، Na_2Fe EDTA ۰/۰۲۸ گرم در لیتر، Biotin ۰/۰۰۰۰۰۵ گرم در لیتر و پارا آمینو بنزوئیک اسید (PABA) به میزان ۰/۰۰۰۰۱ گرم در لیتر با pH 7.2 بود.

برای جداسازی باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن از ۳ روش مختلف استفاده شد. در روش اول از سوسپانسیون داخل ارلن به میزان ۱۰۰ میکرولیتر برداشته شد. سپس سوسپانسیون موردنظر توسط فیلترهای استریل با قطر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد. میکروارگانیسم های موجود در سطح فیلتر در لوله حاوی ۱/۵ میلی لیتر آب مقطر استریل شستشو و ورتکس شدند. سپس بوسیله میکرو پی پت از لوله حاوی میکروارگانیسم های فیلوسفری به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر در لوله های حاوی محیط نیمه جامد رنی تزریق شد. سپس لوله ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گرادو به مدت یک هفته نگهداری شدند.

در روش دوم از هر نمونه برگ، یک قطعه کوچک انتخاب شده، با پنس استریل داخل لوله های حاوی محیط نیمه جامد رنی گذاشته شد. به طوریکه به دیواره ها و ته لوله برخورد نکنند. سپس لوله ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و به مدت یک هفته نگهداری شدند.

در روش سوم از سوسپانسیون ارلن تا رقت 10^{-4} رقت گیری و از هر رقت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در داخل لوله های نیمه جامد رنی و هم روی سطح محیط جامد درون پتری تلقیح شد و با میله شیشه ای کاملا پخش گردید.

سپس لوله ها و پلیت ها در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از رشد باکتری ها و اطمینان از خلوص آنها، در لوله های حاوی محیط کشت شیبدار رنی کشت و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. در این آزمایش از دو باکتری *Azospirillum irakens* (DSM 11586) و *Azospirillum lipoferum (strain of)* به عنوان باکتری های مرجع استفاده شد. باکتری های مذکور متعلق به موسسه تحقیقات خاک و آب بودند.

به منظور اندازه گیری توان تثبیت نیتروژن اتمسفری در باکتری ها از روش کروماتوگرافی گازی (GC) استفاده شد (Turner and Gibson, 1980). در این روش باکتریها به لوله های آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت نیمه جامد رنی غنی شده با ۰/۱ گرم عصاره مخمر تلقیح شدند و تا زمان تشکیل پرده رشد (pelicle) در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد رشد داده شدند. سپس درپوش پنبه ای لوله ها با انواع لاستیکی جایگزین شده و با استفاده از سرنگ ۱۰ درصد از هوای داخل لوله ها (معادل ۱/۲ میلی لیتر) تخلیه و معادل آن گاز استیلن با خلوص ۹۹/۹۹ درصد بدرون لوله ها تزریق شد. لوله ها بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه نگهداری و سپس ۱۰ میکرو لیتر از فاز گازی درون لوله به دستگاه GC تزریق و مقدار اتیلن تولید شده اندازه گیری گردید. میزان اتیلن تولید شده توسط هر سویه به عنوان شاخص فعالیت آنزیم نیتروژناز و تثبیت نیتروژن در نظر گرفته شد. از لوله حاوی محیط کشت تلقیح نشده به عنوان شاهد منفی استفاده گردید.

به منظور اندازه گیری میزان اکسین تولید شده توسط باکتری ها از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد (Benziri., 1998). در این روش ابتدا باکتریها در محیط کشت TSB به مدت ۴۸ ساعت رشد داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به درون محیط کشت مایع TSB غنی شده با ۱۰۰ میلی گرم در لیتر تریپتوفان تلقیح و بمدت ۴۸ ساعت رشد داده شدند. سوسپانسیون باکتریها به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. یک میلی لیتر از محلول رویی با دو میلی لیتر از معرف سالکوفسکی مخلوط شد و شدت رنگ حاصله با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد. میزان اکسین تولید شده با

Archive of SID

www.SID.ir

مقایسه مقادیر قرائت شده با منحنی استاندارد حاصل از اکسین خالص محاسبه گردید.

برای انجام آزمایش گلخانه ای از بین ۳۹ باکتری جدا شده،۱۰باکتری برتر به همراه دو سویه مرجع و یک تیمار شاهد (عدم محلول پاشی) انتخاب شدند. هر یک از باکتریها در ارلن های حاوی ۲۵۰ میلی لیتر محیط کشت NB به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد تکثیر شدند. به منظور چسبندگی بیشتر سوسپانسیون باکتری از مواد چسباننده به میزان ۱۷ گرم در لیتر و به منظور کاهش کشش سطحی از چند قطره tween 20 به عنوان سورفاکتانت استفاده گردید. برای پر کردن گلدانها از شن شسته شده و استریل به همراه یک درصد پرلیت استفاده شد. بذر ذرت مورد استفاده شده ذرت علوفه ای رقم سینگل کراس 704 بود که پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۳ درصد به مدت ده دقیقه و همچنین ضدعفونی برعلیه قارچهای بیماریزا با استفاده از قارچ کش کاپتان ۲ در هزار به تعداد ۴ بذر در هر گلدان کاشته شدند که پس از دو هفته گیاهان به سه عدد تقلیل داده شدند. گلدانها در قالب طرح بلوکهای کاملا تصادفی و در سه تکرار منظم شدند و به منظور تامین مواد غذایی، از محلول غذایی هوگلند اصلاح شده (Taiz and Zeiger, 2002) استفاده گردید. گلدانها در گلخانه ای با شدت نور ۲۵۰۰۰ لوکس و طول روز ۱۴ ساعت قرار گرفتند.

پس از گذشت ۲ هفته از رشد گیاه، سوسپانسیون باکتری موجود در ظروف استریل به دقت به سطوح بالایی و پایینی برگها اسپری گردید. به منظور جلوگیری از نفوذ باکتری به داخل گلدانها سطح گلدانها بوسیله سلفون کاملا پوشانده شدند. عمل اسپری کردن باکتری ها به فواصل هر ۲ هفته یکبار و در چهار نوبت صورت گرفت. گلدانها به مدت ۷۵ روز نگهداری شدند. پس از برداشت گیاهان شاخص های وزن تر و خشک اندام هوایی، تعداد برگها، قطر ساقه(توسط کولیس)، طول اندام هوایی و حجم ریشه ها (توسط استوانه مدرج)اندازه گیری شدند.

پس از آسیاب شدن اندام هوایی، میزان نیتروژن، فسفر و پتاسیم همچنین عناصر کم مصرف شامل آهن، روی، مس و منگنز بخش هوایی با روشهای مناسب اندازه گیری شدند.(Page ,1999)

نتایج و بحث

شمارش جمعیت کل باکتری های ساکن سطح برگ نشان داد که به طور متوسط روی سطح برگ ها جمعیت 10^4 تا 10^6 سلول بر هر گرم برگ وجود دارد. جمعیت باکتری های تثبیت کننده ی نیتروژن روی برگ ذرت حدود 10^3 تا 10^4 سلول بر هر گرم برگ بدست آمد. وجود باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن در فیلوسفر گیاهان برای اولین بار توسط Ruinen (۱۹۶۵) به اثبات رسید. نتایج مشابهی توسط Giri and Patti (2001) و همچنین Sengupta et al. (1982) گزارش شده است.

با توجه به شرایط محیطی نامساعد برای ماندگاری باکتری ها از جمله بارندگی، نور شدید آفتاب، اشعه ماوراء بنفش، خشکی، حرارت یا رطوبت بیش از آستانه تحمل باکتری ها این تعداد باکتری ها رقم قابل توجهی است.

تعداد ۳۹ باکتری بر اساس قابلیت رشد بر روی محیط کشت فاقد نیتروژن و توان تثبیت نیتروژن جداسازی و به منظور اندازه گیری فعالیت آنزیم نیتروژناز با روش کروماتوگرافی گازی (GC) انتخاب شدند. تمامی این باکتری ها دارای توان تثبیت نیتروژن در محیط نیمه جامد و فاقد نیتروژن رنی بودند به طوریکه روی سطح محیط پلیکل واضح تشکیل دادند. براساس نتایج بدست آمده از آزمون احیای استیلن (ARA) میزان تولید اتیلن در باکتری ها بین ۵/۳۲تا ۱۲/۳۶ نانومول در هر لوله در ۲۴ ساعت بود. جدایه B_{10} بیشترین مقدار اتیلن معادل ۱۰/۳۲ نانومول در هر لوله در ۲۴ ساعت را در بین جدایه ها در این تحقیق تولید نمود. با این حال هر دو سویه مرجع بالاترین مقدار اتیلن را تولید کردند. تفاوت سویه های باکتریایی در توان تثبیت نیتروژن در سایر گزارشات نیز ذکر شده است(Dobbereiner, 1995). نتایج حاصل از اندازه گیری میزان تولید اکسین توسط باکتری های مورد استفاده نشان داد که به استثنای یک جدایه (B_1)، تمامی باکتریها دارای توان تولید اکسین در محدوده ۵۴/۳-۲/۲ بودند (جدول ۱). سویه مرجع *Azospirillum lipoferum (strain of)* موثرترین سویه در این قسمت بود. تنوع در تولید مقادیر مختلف اکسین توسط باکتریهای محرک رشد گیاه در مطالعات متعددی به اثبات رسیده است (Glick, 1998).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- میزان تولید اتیلن و اکسین در جدایه های مورد مطالعه در سطح برگ ذرت

باکتری	تولید اتیلن (nmol/tube/24h)	تولید اکسین (mg/L)
B1	۸/۶۰	-
B2	۸/۴۱	۴۷/۰۹
B3	۸/۳۶	۱۵/۳۱
B4	۸/۳۹	۱۰/۸۱
B5	۸/۳	۴۸/۶۰
B6	۸/۰۸	۴۶/۸۴
B7	۸/۳۲	۴۳/۲۲
B8	۹/۵۶	۴۰/۰۳
B9	۸/۲۳	۴۴/۱۵
B10	۱۰/۳۲	۴۳/۲۱
B11	۸/۱۰	۲۷/۰۷
B12	۸/۵۶	۱۳/۹۴
B13	۵/۳۲	۲۵/۸۲
B14	۸/۱۲	۲۲/۰۷
B15	۷/۹۵	۲۵/۸۲
B16	۸/۴۰	۲۵/۸۲
B17	۸/۰۸	۲۰/۱۹
B18	۷/۵۸	۲۰/۱۹
B19	۸/۱۲	۲۴/۵۷
B20	۸/۴۵	۲۷/۰۷
B21	۸/۶۵	۲۱/۴۵
B22	۸/۷۱	۲۰/۸۲
B23	۸/۰۱	۱۴/۵۶
B24	۸/۰۹	۲۰/۱۹
B25	۸/۴۵	۲۸/۹۵
B26	۸/۶۵	۴۳/۳۹
B27	۸/۷۵	۳۷/۳۴
B28	۸/۶۵	۴۱/۱۵
B29	۸/۲۳	۲۸/۲۰
B30	۹/۰۱	۳۳/۳۳
B31	۸/۴۰	۳۶/۶۵
B32	۹/۲۳	۲۴/۰۱
B33	۸/۷۸	۳۳/۹۰
B34	۸/۸۸	۴۵/۷۸
B35	۸/۹۱	۴۳/۸۴
B36	۹/۰۷	۴۰/۷۱
B37	۸/۴۵	۲۹/۰۸
B38	۸/۵۶	۳۹/۳۴
B39	۸/۱۹	۲/۲۴
Azospirillum irakens DSM 11586	۱۱/۲۵	۲۸/۹۵
A.lipoferum strain of	۱۲/۳۶	۵۴/۲۶

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج کاربرد ۱۰ باکتری منتخب به همراه دو سویه مرجع به صورت محلول پاشی در کنار تیمار شاهد نشان داد که تیمارهای مورد استفاده تاثیر معنی داری را بر ارتفاع گیاه، قطر ساقه، وزن تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی در سطح یک درصد و همچنین تاثیر معنی داری بر تعداد برگها در سطح ۵ درصد داشتند (جدول ۲). افزایش عملکرد گندم در اثر محلول پاشی با باکتریهای فیلوسفری در گذشته گزارش شده است.(Iswaran., 1978).

جدول۲- مقایسه میانگین دانکن جدایه های مختلف بر شاخص های رشد در اندام هوایی ذرت

باکتری	ارتفاع گیاه (سانتی متر)	تعداد برگ در بوته	وزن تر اندام هوایی (گرم/بوته)	وزن خشک اندام هوایی (گرم/بوته)	قطر ساقه (میلی متر)
B1	۹۰/۴۱cd	۱۰/۳۳ab	۵۲/۲۸ab	۹/۶c	۱۱/۹۶a
B2	۱۱۳,۸۵a	۹,۶۶abc	۶۰,۱۶abc	۱۰,۳۳abc	۱۲/۱۶a
B3	۹۶,۸۳bcd	۱۰/۰۰ abc	۶۱/۳۹ ab	۱۰/ ۲۵abc	۱۱/۷۵a
B4	۹۷,۱۶bcd	۱۰/۳۳ab	۶۳/۰۸ab	۱۰,۴۲abc	۱۲/۱۲a
B5	۹۸,۹۱bcd	۱۰/۳۳ab	۶۲/۷۴ab	۱۰,۳۰abc	۱۱/۰۷a
B6	۹۳,۰۳cd	۹,۶۶abc	۵۹,۴۸bc	۹/۸۵۱ bc	۱۱/۱۹a
B7	۹۰,۵۰cd	۱۰/۳۳ab	۶۱/۷۲ab	۱۰/۵۶abc	۱۱/۱۴a
B8	۱۰۴/۷۵cd	۹/۳۳bc	۶۴/۲۶ab	۱۰/۸۳ abc	۱۱/۵۲a
B9	۱۰۲/۹۳ab	۹,۶۶abc	۶۸/۸۹a	۱۱/۴۴a	۱۱/۳۸a
B10	۹۰/ ۳cd	۱۰/ ۳۳ab	۶۰/ ۶۵ab	۹/۸۳bc	۱۱/۲۶a
Azospirillum lipoferum strain of A. irakens DSM 11586	۱۰۰/ ۹۵cd	۱۰/ ۶۶a	۶۵/ ۷۹ab	۱۰/۸۷ab	۱۰/۸۳a
	۱۰۲/۴۱cd	۱۰/ ۶۶a	۶۷/ ۴۶ab	۱۱/۰۹ab	۱۱/۴۱a
Control	۸۷/ ۸۶cd	۹/ ۰۰c	۵۰/ ۹۴d	۸/۲۳d	۷/۲۱b

برگپاشی تیمارهای باکتری به کار برده شده باعث افزایش ارتفاع گیاه (تا ۲۲/۸ درصد)، ضخامت ساقه (تا ۴۰/۷ درصد)، وزن تر اندام هوایی (تا ۲۶/۴ درصد) و وزن خشک اندام هوایی (تا ۲۸/۰۵ درصد) در مقایسه با تیمار شاهد شدند.

باکتری B_9 دارای بیشترین تاثیر در وزن تر و وزن خشک اندام هوایی و قطر ساقه بود و در مورد ارتفاع گیاه و تعداد برگها نیز تفاوت معنی دار با تیمار شاهد در سطح یک درصد وجود داشت.

تیمارهای مورد استفاده تاثیر معنی داری را بر طول ریشه، حجم ریشه، وزن خشک ریشه و سطح ریشه داشتند. سویه مرجع *Azospirillum lipoferum (strain of)* موثرترین سویه در این قسمت بود و دارای بیشترین تاثیر بر طول ریشه، وزن خشک ریشه و سطح ریشه بود و از نظر آماری در سطح یک درصد تفاوت معنی دار با بقیه تیمارها داشت ولی بین دیگر تیمارها تفاوت معنی داری مشاهده نشد (جدول۳).

جذب نیتروژن، پتاسیم، آهن، منگنز، روی و مس بطور معنی داری تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند (جدول ۴). جدایه B_4 در مجموع برترین باکتری بود که سبب افزایش جذب نیتروژن (۸۰ درصد)، پتاسیم (۴/۵ درصد)، آهن (۵۰ درصد)، روی (۱۰۸ درصد)، مس (۱۷ درصد) و منگنز (۱۹ درصد) نسبت به تیمار شاهد گردید.

در مطالعاتی که Esitken (2006) در طول سال های 2003 تا 2005 در ترکیه انجام داد تاثیر باکتری های PGPR از جمله سودوموناس و باسیلوس را بر روی ریشه درخت و محصول آن و تغذیه گیلاس شیرین مطالعه نمود. نتایج این تحقیق افزایش محصول تا ٪۲۱/۷، افزایش وزن میوه تا ٪۱/۲۴، طول ساقه تا ٪۲۹/۶، N، P، K تا ٪۰/۵۴ و محتوای Fe و Zn برگی را تا بالای ٪۳۵/۵ و همچنین محتوای منگنز برگ را تا ٪۲۶/۶ نشان داد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول-۳ مقایسه میانگین دانکن جدایه های مختلف بر شاخص های رشد در ریشه ذرت

باکتری	طول ریشه بوته/ (cm)		حجم ریشه بوته/(cm^3)		وزن خشک اندام هوایی (بوته/g)		سطح ریشه (cm^2/بوته)	
B1	۴۸۷/۷۲	cdef	۵۱/۱۰	ef	۵/۴۸	cdef	۵۵۸/۶۴	cde
B2	۴۰۴/۶۵	Fg	۵۲/۷۷	def	۴/۵۴	fg	۵۱۷/۶۷	de
B3	۴۲۲/۱۶	Efg	۴۷/۳۰	fg	۴/۷۴	efg	۵/۰۰	e
B4	۵۵۰/۰۲	abc	۵۵/۵۳	bcde	۶/۱۸	abc	۶۱۹/۳۹	abc
B5	۵۰۸/۴۹	bcde	۴۳/۳۳	g	۵/۷۱	bcde	۵۲۵/۵۵	de
B6	۵۳۹/۶۴	abcd	۳۶/۶۶	h	۶/۰۶	bcde	۴۹۸/۵۲	e
B7	۵۹۲/۴۴	Ab	۵۴/۴۲	cde	۶/۶۵	ab	۶۳۹/۲۹	abc
B8	۵۳۳/۷۰	abcd	۶۳/۳۳	a	۵/۹۹	abcd	۶۵۱/۴۹	ab
B9	۵۲۳/۶۲	abcde	۵۹/۹۷	abc	۵/۸۸	abcde	۶۲۷/۹۴	abc
B10	۴۴۴/۷	defg	۶۱/۱	ab	۴/۹۹	defg	۵۸۴/۱۷	bcd
Azospirillum lipoferum strain of A. irakens DSM 11586	۶۲۳/۸۹	A	۵۸/۸۶	abcd	۷/۰۱	a	۶۷۸/۶۹	a
	۵۲۲/۷۳	abcde	۶۴/۳	a	۵/۸۷	abcde	۶۴۸/۸۴	ab
Control	۳۵۰/۶۶	G	۳۶/۶۳	h	۳/۹۴	g	۴۰۱/۱۵	f

جدول ۴- مقایسه میانگین دانکن جدایه های مختلف بر غلظت عناصر غذایی در اندام هوایی ذرت

باکتری	نیتروژن		فسفر		پتاسیم		آهن		منگنز		روی		مس	
	%						mg L^{-1}							
B1	۲/۴۳	c	۰/۱۴۶۶	ab	۵/۰۶	cd	۵۷/۶۶	de	۵۵/۳۳	f	۴۰/۶۶	bcd	۶/۳۳	cd
B2	۲/۳۸	c	۰/۱۳۰	b	۵/۲۹	a	۵۴/۶۶	e	۶۲/۶۶	cde	۴۳/۳۳	bc	۶/۶۶	cd
B3	۲/۴۰	c	۰/۱۳۳۳	b	۵/۰۷	bcd	۵۷/۶۶	de	۵۸/۶۶	ef	۳۶/۰۰	de	۶/۳۳	cd
B4	۲/۵۳	c	۰/۱۴۶۶	ab	۵/۰۶	bcd	۸۵/۶۶	a	۷۶/۶۶	a	۵۰/۶۶	a	۶/۶۶	cd
B5	۲/۳۹	c	۰/۱۳۶۶	ab	۵/۱۱	bcd	۵۹/۶۶	cde	۵۶/۰۰	f	۳۵/۳۳	def	۷/۳۳	bc
B6	۲/۵۷	c	۰/۱۴۳۳	ab	۵/۲۱	bcd	۵۳/۰۰	e	۵۶/۶۶	f	۲۹/۰۰	fg	۸/۳۳	b
B7	۲/۵۰	c	۰/۱۳۶۶	ab	۵/۲۱	cd	۵۵/۰۰	e	۵۴/۶۶	f	۲۶/۳۳	gh	۸/۳۳	ba
B8	۳/۵۴	a	۰/۱۴۰	ab	۴/۴۶	ab	۸۳/۳۳	a	۶۶/۰۰	bc	۳۳/۳۳	ef	۸/۳۳	a
B9	۲/۳۶	c	۰/۱۳۰	b	۵/۰۸	ab	۶۲/۶۶	cd	۵۵/۶۶	f	۲۱/۰۰	h	۸/۳۳	b
B10	۲/۵۵	c	۰/۱۵۳۳	ab	۵/۱۴	cd	۸۱/۰۰	a	۷۶/۳۳	a	۴۵/۶۶	ab	۶/۳۳	cd
Azospirillum lipoferum strain of A. irakens DSM 11586	۳/۲۶	ab	۰/۱۴۰	ab	۵/۱۴	bc	۵۶/۶۶	bc	۶۷/۶۶	b	۴۳/۰۰	bc	۸/۳۳	b
	۳/۱۳	b	۰/۱۳۳۳	b	۴/۹۴	abc	۷۱/۶۶	b	۶۱/۳۳	df	۳۷/۰۰	cde	۸/۳۳	b
Control	۱/۴	d	۰/۱۶۳۳	a	۴/۸۴	d	۵۷/۰۰	de	۶۴/۳۳	bcd	۲۴/۳۳	gh	۵/۶۶	d

Archive of SID

www.SID.ir

روش استفاده از کودهای بیولوژیک در نتایج حاصل از تلقیح تاثیر زیادی دارد.به طوری که میتواند اثربخشی کودها را تحت تاثیر خود قرار دهد. از آنجا که مصرف بذرمال کودهای زیستی ،زمان و تعداد دفعات تلقیح را محدود می سازد و از طرفی این نوع روش تلقیح تنها در زمان کشت امکان پذیر است،از این رو در این تحقیق سعی گردید که روشهای جایگزین و تکمیلی نیز مورد آزمایش قرار گیرد تا کارایی مصرف کودهای بیولوژیک افزایش و امکان مصرف آن در کشاورزی گسترش یابد. استفاده از روش محلولپاشی برگی روشی نوین است که با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق و تاثیر مثبتی که در افزایش طول ساقه و حجم ریشه و همچنین جذب عناصر غذایی داشته می تواند جایگزینی مناسب با روشهای مرسوم قبل باشد.

سپاسگزاری

نگارنده بر خود لازم می داند از همکاران و محققین بخش تحقیقات بیولوژی که در راهنمایی و انجام تحقیق مساعدت نموده ودر تأمین بودجه، امکانات و لوازم کار نقش مؤثری داشته اند، سپاسگزاری نماید.

منابع

Andrews, J. H. and Robin, F., 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. Annual Reviews in Phytopathology. 38, 145-156.

Bashan, Y., 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. Biotechnology Advances. 16, 729-770.

Benziri, E., Courtade, A., Picard, C. and Guckert, A., 1998. Role of maize root exudates in production of auxin by Ps. fluorescens M.3.1. Soil Biology and Biochemistry. 30, 1481-1484.

Dobereiner, J., 1995. Isolation and identification of aerobic nitrogen-fixing bacteria from soil and plants. In: Dobereiner, J. (Org.). Methods in Applied Soil Microbiology and Biotechnology. 1st. ed. London: Academic Press. pp. 134-141.

Esitken, A., Pirlak, L., Turan, M. and Sahin, F. 2006. Effects of floral and foliar application of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on yield, growth and nutrition of sweet cherry. Scientia Horticulturae. 110, 324-327.

Giri, S. and Pati, B. R. 2001. A comparative study on phyllosphere nitrojen fixation by newly isolated *Coryne bacterium* sp. and *Flavo bacterium* sp. and their potentialities as biofertilizer, pp:47-56. Vidyasagar University, West Bengal, India.

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

Glick, B. R., Penrose, M. and Jpining, L. I., 1995. A model for the lowering of plant ethylene concentration by plant growth promoting rhizobacteria. Journal of Theoretical Biology. 190, 63-68.

Hamidi, I., Asgharzadeh, A., Chokan, R., Dehghan Shoar, M., Ghalavand, A. and Malakouti, M.J., 2007. Study on lant growth promoting rhizobacteria (PGPR) biofertilizers application in maize (*Zea mays* L.) cultivation by adequate input. Environmental Sciences (Iran). 4, 1-20.

Hirando, P., Susan, S. and Christen, D., 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on pseudomonas syringea-a pathogen, Ice-Nucleus, and Epiphyte. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64, 624-653.

Iswaran, V., Patil, V. D. and Sen, A., 1978. Effect of spray of the culture of a bacterium from the phyllosphere of water hyacinth (Eichornia crassipes mort solms) on the yield of paddy and wheat. Plant and Soil. 50, 253-255.

Kishore, G. K., Pande, S. and Podile, A.R., 2005. Phylloplane bacteria increase seedling emergence, growth and yield of field-grown groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Letters in Applied Microbiology. 40, 260–268.

Klopper, J. M., 2003. A review of mechanisms for plant growth promoting by PGPR. Auburn University, Aurburn, Alabama, 36849. USA.

Murty, M. G., 1981. Phyllosphere of cotton as a habitat for diazotrophic microorganisms. Applied and Environmental Microbiology. 48, 713-718.

Morris C. E., Monier J.M. and Jacques M.A., 1998. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bactera in the phyllosphere. Applied Environmental Microbiology. 64, 4789-4795.

Page, J. , Polli, R. and Landgon, W. B. 1999. Smooth uniform crossover with smooth point mutation in genetic programming:A preliminary study. Pages 39-49, Goteborg Sweden. Springer-Verlag.

Archive of SID

www.SID.ir

Patten, C. L. and Glick, B.R., 2002. Role of pseudomonas putida indole acetic acide in development of host plant root system. Applied Environmental Microbiology. 68, 3795-3801.

Rennie, R.J., 1981. A single medium for the isolation of acetylene reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. Canadian Journal of Microbiology. 27, 8-14.

Ruinen, J., 1956. Oceurrence of Beijerinckia in the "phyllosphere". Nature. 177, 220.

Ruinen, J., 1965. The Phyllosphere: III, Nitrogen fixation in the Phyllosphere. 22, 375-394.

Sen Gupta, B. and Sen, S.P., 1982. Utility of phyllosphere N2-fixing micro-organisms in the improvement of crop growth. Plant and Soil. 68, 69-74.

Taiz, L. and Zeiger, E., 2002. Plant Physiology, Third edition.

Talik, K. V. B. R., Singh, C.S., Roy, V.K. and Rao, N.S.S., 1982. Azospirillum brasilens and Azotobacter chroococcum inoculum: Effect on yield of maize (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor*). Soil Biology and Biochemistry. 14, 417-418.

Thompson, L. P. and Fenlon, M. J. S., 1993. Quantitative and quantitative seasonal change in the miicrobial community from the phyllosphere of sugar beet (*Beta vulgaris*). Plant and Soil. 150, 177-191.

Turner, G. L. and Gibson, A. H., 1980. Measurements of nitrogen fixation by indirect means. In: Methods for Evaluating Biological Nitrogen Fixation, F.J. Bergerson (Ed.), John Wiley & Sons, New York pp. 111–138.

Zahir, A. Z., Abbas, S. A., Khalid, A. and Arshad, M., 2000. Substrate dependent microbially derived plant hormones for improving growth of the maize seedlings. Pakistan Journal of Biological Sciences. 3, 289-291.

Vessy, J. K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. Plant and Soil. 255, 271-286.

Archive of SID

www.SID.ir

Effect of plant growth promoting phyllospheric bacteria by foliar application on growth and nutrient uptake of corn

Mahdiyeh Shamshiripour[1,*], Ahmad Asgharzadeh[2], Hadi Asadi Rahmani[2], Kazem Khavazi[2], Ashraf Esmaiilizad[2], Vida Hematiand[2], Kobra Saghafi[2]

[1] M.Sc. Graduate in Soil Science, Soil Science Department, Islamic Azad University- Science and Research Branch, Tehran, Iran.

[2] Biology Department, Soil and Water Research Institue, Karaj, Iran

* Corresponding author e-mail: mshamshiripour@yahoo.com (M. Shamshiripour)

Abstract

According to identify and survaying the effect of plant Growth Promoting phyllospheric Bacteria Foliar Application on nutrient uptake of corn, this experiment was done. Therfore, leaf samples were taken from corn plants growing around karaj ,Iran and total bacteria inhabiting plant surfaces were determined. Nitrogen-fixing and auxine producing bacteria were isolated from the leaves. Amount of N_2-fixation and auxin production were determined by gas chromatography and spectrophotometry methods, respectively. Results showed that there were 10^4 to 10^6 bacteria on the leaves. Among 39 isolates, 10 were selected for greenhouse experiment. Bacteria suspensions were sprayed on the leaves four times in two-week intervals. Plants were harvested after 75 days and morphological indices and nutrient uptake were measured. Results showed that application of bacteria increased plant height, fresh and dry matter and stem diameter compared to control plants. Spraying of bacteria affected length, volume, dry matter and surface area of the roots. Nutrient uptake was also increased due to foliar application of the bacteria.

Key words: Biologic Fertilizers, plant Growth promoting Bacteria, Biologic Fertilizer Foliar application , Phyllosphere

Archive of SID

www.SID.ir