

تأثیر دو گونه باکتری *Pseudomonas* و سطوح نیتروژن بر ماده خشک، شاخص کلروفیل و جذب نیتروژن و روی در گیاه اسفناج

افسانه کلانتری^{۱*}، ناصر علی اصغرزاد^۲، نصرت اله نجفی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۲/۲۳)

چکیده

اغلب گونه‌های سودوموناس بعنوان باکتری‌های محرک رشد گیاه شناخته شده‌اند که در ترکیب با کود نیتروژن (N) می‌توانند در رشد و جذب عناصر غذایی توسط گیاهان اثرهای مفیدی داشته باشند. تصور می‌رود بتوان با کاربرد تلفیقی باکترهای سودوموناس و کود نیتروژن، تولید اسفناج (*Spinacia oleracea L.*) به‌عنوان یک سبزی پرمصرف در رژیم غذایی انسان را از لحاظ کمی و کیفی افزایش داد. برای دستیابی به این هدف، در یک آزمایش فاکتوریل با طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو فاکتور و سه تکرار، گیاه اسفناج با باکتری‌های سودوموناس (*Pseudomonas putida*، *Pseudomonas fluorescens*) و شاهد بدون باکتری تلقیح شده و با سه سطح نیتروژن صفر، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک از منبع اوره، تیمار گردید. نتایج تجزیه آماری نشان داد که با افزایش سطح نیتروژن از صفر به ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، جذب روی، شاخص کلروفیل برگ‌ها و وزن خشک گیاه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. با تلقیح باکتری، وزن خشک بخش هوایی و ریشه اسفناج افزایش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد بدون باکتری نشان داد به‌طوری که بیشترین درصد افزایش وزن خشک در تیمار *P. fluorescens* با حدود ۲۰/۰ درصد برای بخش هوایی و ۲۸/۱ درصد برای ریشه در مقایسه با شاهد به‌دست آمد. شاخص کلروفیل برگ‌ها در تیمارهای *P. putida* و *P. fluorescens* نسبت به گیاهان شاهد به‌ترتیب حدود ۲۲/۲ و ۱۳/۸ درصد افزایش داشت. میزان جذب نیتروژن گیاهان در تیمار *P. fluorescens* ۲۸/۲ درصد در بخش هوایی و ۵۵/۳ درصد در ریشه نسبت به شاهد بدون باکتری افزایش داشت، اما جذب روی بخش هوایی در تیمار *P. putida* کاهش معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد بدون باکتری نشان داد. بر اساس نتایج به دست آمده در این تحقیق، باکتری *P. fluorescens* به‌طور مؤثر با توسعه سیستم ریشه‌ای و افزایش کارایی جذب آب و عناصر غذایی، میزان رشد و جذب N را افزایش می‌دهد. همچنین ممکن است به‌واسطه تولید سیدروفور جذب Zn در اسفناج بهبود یابد.

واژه‌های کلیدی: اسفناج، سودوموناس، شاخص کلروفیل، روی، نیتروژن

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- دانشیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

* پست الکترونیک: afsanekalantary@yahoo.com

مقدمه

نیتروژن مهم‌ترین عنصری است که گیاهان به آن نیاز دارند. نیتروژن در ساختار مولکول کلروفیل، اسیدهای نوکلئیک، برخی ویتامین‌ها، هورمون‌ها، اجزای تشکیل دهنده غشاء و کوآنزیم‌ها شرکت دارد (Fageria, 2001). نیتروژن نقش کلیدی در رشد و عملکرد محصولات دارد. این عنصر یک تا پنج درصد وزن خشک بافت‌های گیاهی را تشکیل می‌دهد و مهم‌ترین عامل محدود کننده رشد گیاهان در کشاورزی، کمبود نیتروژن می‌باشد (Alizadeh *et al.*, 1998). امروزه با توجه به رشد روزافزون جمعیت، تقاضا برای مواد غذایی روز به روز افزایش می‌یابد. فراهمی مواد غذایی برای مردم به میزان تولید آن‌ها در نظام‌های کشاورزی بستگی دارد. در حال حاضر در کشورهای در حال توسعه غذاهای گیاهی به طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرند (Assimakopoulou, 2006). از طرف دیگر، کشاورزان بدون در نظر گرفتن پاسخ گونه‌های مختلف به مقدار و اشکال نیتروژن، سال به سال استفاده از کودهای نیتروژنه را افزایش می‌دهند (Wang *et al.*, 2000). عرضه کافی نیتروژن می‌تواند موجب توسعه رشد گیاه و افزایش تولید محصولات شود. اما استفاده بیش از حد و نابجا از کودهای شیمیایی نیتروژنی در خاک سبب افزایش جذب نیترات توسط ریشه می‌شود. در حالی که احیا و همونگون سازی آن در داخل گیاه به همان نسبت انجام نمی‌شود و چون نیترات توانایی بالایی برای تجمع در گیاه دارد، به صورت بالقوه تجمع می‌یابد (et al., 2008). اسفناج با نام علمی (*Spinacia oleracea*) یکی از سبزیجات مهم خانواده چغندریان است. اسفناج ارزش غذایی زیادی داشته و برگ‌ها و ساقه‌های آن مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه به دلیل دارا بودن ۱۰ نوع از ویتامین‌ها و مواد معدنی رتبه دوم را در بین ۴۲ میوه و سبزی به خود اختصاص می‌دهد و بالاترین امتیاز را از نظر مواد معدنی، پروتئین‌ها و به‌ویژه آسکوربیک اسید دارد (Hatamjafari & Tazarv, 2013). اسفناج یک سبزی برگی است که برگ‌ها و ساقه‌های ظریف آن به صورت خام یا فرآوری شده مصرف می‌شود و به علت دارا بودن املاح معدنی، پروتئین، ویتامین‌های A، B، C و آنتی‌اکسیدان‌ها و بیشترین پتانسیل جذب رادیکال‌های آزاد اکسیژن در بین سبزی‌ها اهمیت زیادی دارد (Bunea *et al.*, 2008). کشت این گیاه عموماً در اراضی پایین دست شهرها و در

محیط‌های سرشار از نیتروژن صورت می‌گیرد. اسفناج به دلیل سیستم جذب بسیار کارآمد و سیستم احیاکنندگی ناکارآمد، یکی از بالاترین تجمع‌دهندگان نیترات است (Maynard *et al.*, 1976). یکی از معیارهای سلامت سبزی‌ها، عدم تجمع نیترات در آن‌ها می‌باشد. بالا بودن غلظت نیترات در اندام‌های قابل مصرف سبزی‌ها انواع مسمومیت در حد مرگ، ایجاد بیماری کم‌خونی در کودکان و تولید ماده سرطان‌زای نیتروزآمین را در بزرگسالان به دنبال دارد (Ishiwata *et al.*, 2002).

روی (Zn) نیز از جمله عناصر غذایی کم‌مصرف ضروری برای تغذیه و رشد گیاهان، حیوانات و انسان بوده و وجود غلظت‌های مناسبی از این عنصر در بافت‌های گیاهان، نه تنها برای رشد و عملکرد مطلوب گیاهان، بلکه در زنجیره غذایی برای رشد و سلامتی حیوانات و انسان ضروری است (Havlin *et al.*, 2004). با این حال فراهمی عناصر غذایی کم‌مصرف برای گیاهان در محیط‌های با غلظت بالای نیترات و بی‌کربنات در خاک‌های آهکی محدود شده است (Mengel, 1995). بنابراین بخش کشاورزی باید راهبردهایی را اتخاذ کند که در نهایت به تولید کافی و با کیفیت بالای مواد غذایی، همراه با حفظ محیط زیست و امنیت غذایی جامعه و زندگی سالم در کیفیت قابل قبول منتهی شود. در حال حاضر بیوتکنولوژی خاک با هدف استفاده از پتانسیل جانداران مفید خاکزی به منظور تولید حداکثر محصول همراه با بهبود کیفیت خاک و رعایت بهداشت محصولات غذایی و ایمنی محیط زیست مورد توجه قرار گرفته است (Hajjilu *et al.*, 2011). تعداد زیادی از ریزجانداران موجود در خاک قادر به اعمال تأثیرات مفید در رشد گیاه می‌باشند و کیفیت آن را ارتقا می‌دهند (Vessey, 2003). باکتری‌های جنس *سودوموناس* از جمله این ریزجانداران هستند که اثرات سودمندی به دلیل ساخت آنتی‌بیوتیک‌ها، هورمون‌های گیاهی و سیدروفورها روی رشد گیاه دارند (Nezarat & Gholami, 2010).

مصرف اسفناج در غذاهای ایرانی زیاد است. بنابراین با توجه به نقش مؤثر نیتروژن در افزایش عملکرد اسفناج و نظر به اینکه اسفناج یک انباشتگر نیترات است و همچنین تأثیر باکتری‌های *سودوموناس* در افزایش رشد و کیفیت این گیاه، این مطالعه با هدف بررسی تأثیر کوددهی شیمیایی (نیتروژن) و باکتری *سودوموناس* و تلفیقی از این دو بر

شاهد بدون باکتری) با سه تکرار انجام شد. ابتدا مقادیر لازم کودها به همراه آب آبیاری به گلدانها اضافه شد. سپس باکتریها به صورت زادمايه به گلدانهای مربوطه تلقیح شدند. در این آزمایش از دو گونه باکتری سودوموناس که از کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی خاک دانشگاه تبریز دریافت شد، استفاده گردید. برخی صفات محرک رشدی این باکتریها در (جدول ۱) نشان داده شده است.

شاخص کلروفیل برگها، وزن خشک، جذب نیتروژن و Zn ریشه و بخش هوایی اسفناج در شرایط گلخانه انجام شد.

مواد و روشها

این تحقیق در گلخانه تحقیقاتی آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام گرفت. آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک-های کامل تصادفی با دو فاکتور شامل کود نیتروژنی در سه سطح (صفر، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی گرم بر کیلوگرم خاک) و گونه باکتری در سه سطح (*P. putida*, *P. fluorescens*) و

جدول ۱- برخی آزمایشهای بیوشیمیایی انجام گرفته بر روی گونههای باکتریایی مورد استفاده در این آزمایش

Table 1. Some biochemical tests conducted on the bacterial species used in this experiment

Bacterial species	Tricalcium phosphate dissolution test (Halo zone to colony zon)	Acid production test Halo zone to colony) (zone)	Siderophore production test (Halo zone to colony zone)
<i>P. fluorescens</i>	4.2-4.5	2.1-2.3	2-2.3
<i>P. putida</i>	4-4.5	2-2.25	1.8-2

۶۰۰ nm تعیین شد و آماده مایه‌زنی در ریشه گیاه شد. ویژگیهای خاک شامل بافت خاک به روش هیدرومتر، pH گل اشباع، قابلیت هدایت الکتریکی عصاره اشباع (EC_e)، کربن آلی به روش والکلی-بلک اصلاح شده، پتاسیم قابل جذب با عصاره‌گیر استات آمونیم، مقدار فسفر قابل جذب با بی‌کربنات سدیم و رطوبت ظرفیت مزرعه با دستگاه صفحه‌های فشار تعیین گردید (جدول ۲).

جهت آماده‌سازی زادمايه باکتریایی از محیط کشت مایع کینگ ب استفاده شد. بدین منظور از هر دو گونه باکتریایی موجود در محیط کشت جامد، باکتری با استفاده از لوب برداشته شد و به ارلن‌های حاوی محیط مایع تلقیح گردید. ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت داخل شیکر انکوباتور قرار گرفتند. بعد از پایان این مدت جمعیت باکتری در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج

جدول ۲- برخی ویژگیهای فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در این آزمایش

Table 2. Some physical and chemical properties of soil used in this experiment

Soil texture	pH	EC _e (dS m ⁻¹)	FC	OC (%)	K (mg kg ⁻¹)	P
Loamy sand	7.81	1.4	12	0.22	182.6	4.4

۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از منبع منوکلسیم فسفات) و (پتاسیم به مقدار ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک از منبع سولفات پتاسیم) به‌طور یکنواخت به همه گلدانها اضافه شد. سطوح نیتروژن با مقادیر صفر، ۱۲۵ و ۲۵۰ میلی‌گرم نیتروژن بر کیلوگرم خاک از منبع اوره در سه مرحله به گلدانها افزوده شد. برای هر گلدان حدود هشت میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتری با جمعیت $10^8 \times 1/1$ با حدود ۱۱ گرم پرلیت ریز و استریل مخلوط شد تا یک پودر مرطوب به‌دست آید و این زادمايه به‌صورت یک لایه نازک در عمق دو

در نهایت خاک مورد نظر پس از عبور از غربال چهار میلی‌متری در گونی‌های کنفی پر شد و به مدت دو ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱ بار استریل شد. بذر گیاه اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) از رقم بومی تبریز انتخاب شد. بذرها به مدت دو ساعت در آب مقطر خیس خورده و به مدت ۱۵ ثانیه در الکل ۹۶٪ قرار گرفتند و سپس به مدت ۳ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی سطحی شدند. به هر گلدان دو کیلوگرم خاک استریل اضافه شد و بر اساس آزمون خاک (فسفر به مقدار

آسیاب و به روش هضم تر با اسید نیتریک عصاره‌گیری شد (Waling *et al.*, 1989). غلظت روی در نمونه‌های عصاره-گیری شده با استفاده از دستگاه جذب اتمی قرائت شد. نیتروژن کل نیز به روش کج‌جدال اندازه‌گیری شد. تحلیل آماری داده‌ها از قبیل آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها، تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌ها با نرم‌افزار MSTATC انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام و نمودارها با نرم‌افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

شاخص کلروفیل برگ‌ها

بر اساس نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) اثرهای متقابل نیتروژن×گونه‌های باکتری و نیتروژن×زمان بر شاخص کلروفیل برگ‌ها در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بودند.

سانتی‌متری از سطح خاک پخش شد. سپس بذور اسفناج به تعداد ۱۵ بذر در عمق یک سانتی‌متری خاک قرار گرفتند و برای تیمارهای بدون باکتری همان مقدار پرلیت به همراه محیط کشت بدون باکتری اضافه گردید. در هنگام کاشت بذور از طریق توزین رطوبت تمامی گلدان‌ها در سطح ۰/۸-۰/۹ ظرفیت مزرع‌ای تنظیم شد. گلدان‌ها ۱۶ ساعت دوره روشنایی با نور تکمیلی فلورسنت در اتاق کشت قرار داده شدند. در دو مرحله از رشد گیاه حدود ۴۰ و ۷۵ روز بعد از کشت گیاه، شاخص کلروفیل برگ‌ها برای بررسی تأثیر باکتری‌ها توسط دستگاه کلروفیل‌سنج دستی (Hanstech U.K) قرائت شد. برداشت گیاهان حدود ۱۲ هفته پس از کاشت انجام گرفت. وزن خشک ریشه و بخش هوایی گیاه بعد از خشک شدن در آون در دمای ۵۰ درجه سلسیوس (به مدت ۴۸ ساعت) به کمک ترازوی ۰/۰۰۱± گرم توزین شد. آنگاه نمونه‌های بخش هوایی و ریشه گیاه

جدول ۳- تجزیه واریانس تأثیر سطوح نیتروژن، گونه‌های باکتری و زمان بر شاخص کلروفیل برگ

Table 3. Variance analysis of nitrogen levels, bacterial species and time effects on leaf chlorophyll index

Source of variation	Degree of freedom	Mean square
Block	2	4.01 ^{ns}
Nitrogen	2	1560 ^{**}
Bacteria	2	49 [*]
Nitrogen× Bacteria	4	38 [*]
Time	1	667 ^{**}
Nitrogen× Time	2	596 [*]
Bacteria× Time	2	5.72 [*]
Nitrogen× Bacteria× Time	4	32.0 [*]
Error	30	10.7
Coefficient of variation		19.9

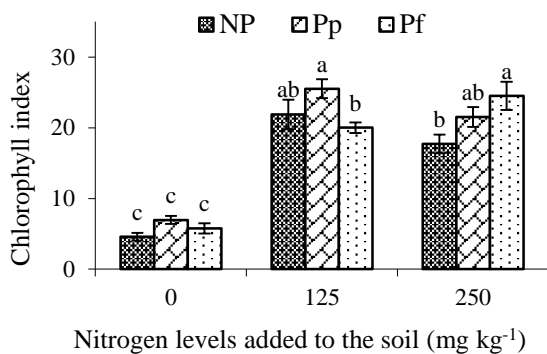
** , * , ns: به ترتیب اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار

** , * and ns: significant at %1, %5 probability level and non-significant respectively

(Najafi) گزارش کردند که با افزایش NH_4^+ محلول غذایی تا ۲۵ درصد شاخص کلروفیل برگ‌های اسفناج افزایش یافت و این عامل منجر به افزایش شدت فتوسنتز و رشد گیاه شد. آنان بین شدت فتوسنتز خالص گیاه اسفناج و وزن تر آن رابطه لگاریتمی مستقیمی مشاهده کردند. در این تحقیق با گذشت زمان کلروفیل در تیمارهایی که نیتروژن دریافت کردند افزایش یافت در حالی که محتوای کلروفیل در سطح شاهد بدون نیتروژن در زمان اول به طور معنی-داری بیشتر از زمان دوم بود (شکل ۱). به نظر می‌رسد در مراحل اولیه رشد به دلیل کوچکی گیاه، غلظت کلروفیل در

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که شاخص کلروفیل برگ‌ها با افزایش سطوح نیتروژن افزایش یافت (شکل ۱). اثر افزایشی کود نیتروژنه بر مقدار کلروفیل به نقش نیتروژن در ساختار کلروفیل مربوط می‌شود. هر مولکول کلروفیل دارای چهار اتم نیتروژن است و نیتروژن سازنده اصلی همه اسیدهای آمینه، پروتئین و لیپیدهاست که به صورت یک ترکیب ساختاری در کلروپلاست عمل می‌کند (Ouda & Mahadeen, 2008). افزایش شاخص کلروفیل برگ گیاهان بر اثر مصرف کود نیتروژن به وسیله سایر پژوهشگران از جمله احمدی‌نژاد و همکاران (Ahmadinejad *et al.*, 2013) نیز گزارش شده است. نجفی و همکاران (*et al.*, 2011)

باکتری افزایش یافت که با گزارش سالاردینی و مجتهدی (Salardini & Mojtahedi, 1978) مطابقت داشت. آنان گزارش کردند که در گیاهان سبز اغلب میان سطح آهن و مقدار کلروفیل همبستگی مثبتی وجود دارد و گیاهانی که به خوبی از آهن برخوردارند، دارای کلروفیل بیشتری هستند. کاوینو و همکاران (Kavino *et al.*, 2010) گزارش کردند بر اثر مایه‌زنی باکتری‌های افزاینده رشد گیاه، جذب آهن افزایش یافته و این منجر به ساخت کلروفیل شده است. علی‌پور و سبحانی‌پور (Alipour & Sobhanipour, 2012) در نتایجی مشابه بیان کردند که مایه‌زنی سودوموناس فلورسنس در گیاه ذرت موجب افزایش وزن خشک، جذب آهن و مقدار کلروفیل می‌شود.



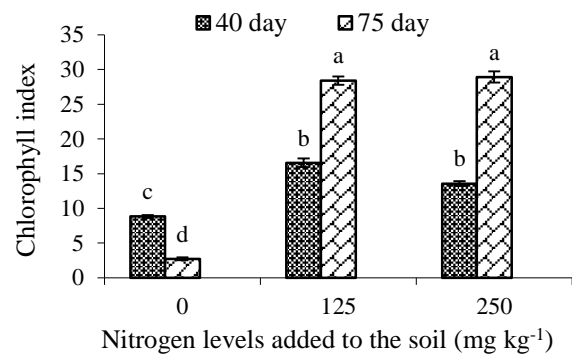
شکل ۳- اثر متقابل سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر شاخص کلروفیل برگ

Figure 3. Interaction of nitrogen levels and bacterial species on leaf chlorophyll index

وزن خشک

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان می‌دهد که اثر اصلی باکتری در سطح احتمال ۵٪ و اثر اصلی نیتروژن در سطح احتمال ۱٪ بر وزن خشک بخش هوایی معنی‌دار بوده است. در ریشه نیز اثر اصلی سطوح نیتروژن در سطح احتمال ۱٪ بر وزن خشک آن معنی‌دار می‌باشد.

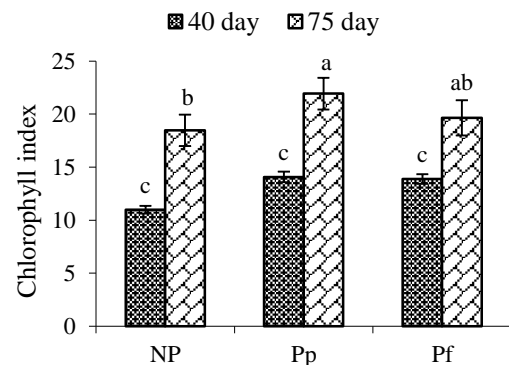
واحد وزن بیشتر باشد و با ادامه رشد و افزایش حجم گیاه رقیق شدن کلروفیل اتفاق می‌افتد.



شکل ۱- اثر متقابل سطوح نیتروژن و زمان بر شاخص کلروفیل برگ

Figure 1. Interaction of nitrogen levels and time on leaf chlorophyll index

با توجه به (شکل ۲) در زمان اول شاخص کلروفیل در تیمارهای دارای باکتری و بدون باکتری تفاوت معنی‌داری نداشتند. اما در زمان دوم باکتری‌ها به طور معنی‌داری شاخص کلروفیل را افزایش دادند. در واقع ریزجانداران نیاز به زمان دارند و با گذشت زمان و رشد مناسب گیاه، تأثیر خود را به خوبی نشان می‌دهند.



شکل ۲- اثر متقابل گونه‌های باکتری (NP, Pp, Pf) به ترتیب شاهد بدون باکتری، *P. putida* و *P. fluorescens* و زمان بر شاخص کلروفیل برگ

Figure 2. Interaction of bacterial species (NP, Pp and Pf, non-bacterial control, *P. putida* and *P. fluorescens* respectively) and time on leaf chlorophyll index

شکل (۳) نشان می‌دهد شاخص کلروفیل برگ در گیاهان دارای باکتری به طور معنی‌داری نسبت به گیاهان بدون

جدول ۴- تجزیه واریانس تأثیر سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر عملکرد ماده خشک و جذب نیتروژن و روی ریشه و بخش هوایی اسفناج
Table 4. Variance analysis of nitrogen levels and bacterial species effects on dry matter and nitrogen and zinc uptake by root and shoot of spinach

Source of variation	Degree of freedom	Mean square					
		Shoot dry weight	Root dry weight	Shoot nitrogen	Root nitrogen	Shoot zinc	Root zinc
Block	2	0.14 ^{n.s}	0.02 ^{n.s}	87.38 ^{n.s}	0.92 ^{n.s}	0.01 ^{n.s}	0.001 ^{n.s}
Nitrogen	2	144.8 ^{**}	7.42 ^{**}	45534.2 ^{**}	1583.04 ^{**}	1.44 ^{**}	0.22 ^{**}
Bacteria	2	2.28 [*]	0.26 ^{n.s}	1020.2 ^{**}	103.3 ^{**}	0.27 ^{**}	0.02 ^{**}
Nitrogen×Bacteria	4	0.66 ^{n.s}	0.15 ^{n.s}	490.2 ^{**}	101.95 ^{**}	0.06 ^{**}	0.003 [*]
Error	12	0.38	0.07	9.13	2.64	0.002	0.001
Coefficient of Variation		11.5	20.8	4.04	10.33	8.54	12.12

** , * , n.s : به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪، ۵٪ و غیر معنی‌دار
** , * and ns: significant at %1, %5 probability level and non-significant respectively

طول ریشه و زیتوده می‌شود. افزایش رشد گیاه اسفناج پس از مصرف نیتروژن توسط سایر محققان نیز گزارش شده است. گولسر (Gulser, 2005) بیان کرد که افزایش غلظت نیتروژن در خاک به‌طور قابل توجهی عملکرد، طول ساقه و سطح برگ را در اسفناج افزایش می‌دهد. با توجه به نتایج مقایسات میانگین، در تیمارهای دارای باکتری *P.putida* و *P.fluorescens* نسبت به شاهد بدون باکتری به ترتیب معادل ۶/۷۶ و ۱۹/۹۷ درصد افزایش در وزن خشک بخش هوایی و ۲۳/۶۸ و ۲۸/۱ درصد افزایش در وزن خشک ریشه اسفناج مشاهده شد (جدول ۵).

مقایسه میانگین‌ها (جدول ۵) نشان می‌دهد با افزایش سطوح نیتروژن در خاک از صفر به ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، وزن خشک بخش هوایی و ریشه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این افزایش وزن ناشی از نقش کلیدی نیتروژن در تغذیه معدنی گیاهان است و از این رو میزان رشد را تعیین می‌کند. نیتروژن مهم‌ترین عنصر غذایی پرمصرف می‌باشد که در سنتز آمینواسیدها، تشکیل پروتوپلاسم، تقسیم سلولی، رشد گیاه و اعمال حیاتی مانند فتوسنتز و واکنش‌های آنزیمی نقش دارد (Barker & Pilbeam, 2006). مطالعات مختلف نشان می‌دهند که افزایش نیتروژن سبب افزایش عملکرد،

جدول ۵- اثرات اصلی سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر عملکرد ماده خشک و جذب نیتروژن و روی ریشه و بخش هوایی اسفناج
Table 5. Main effects of nitrogen levels and bacterial species on dry matter and nitrogen and zinc uptake by root and shoot of spinach

Factor	Levels	Shoot dry weight	Root dry weight	Shoot nitrogen	Root nitrogen	Shoot zinc	Root zinc
		(g pot ⁻¹)		(mg pot ⁻¹)			
Nitrogen	0	0.99 ^c	0.29 ^b	6.9 ^c	1.2 ^c	0.13 ^c	0.03 ^c
	125	6.35 ^b	1.89 ^a	68.7 ^b	18.8 ^b	0.76 ^b	0.27 ^b
	250	8.85 ^a	1.83 ^a	148.7 ^a	27.2 ^a	0.87 ^a	0.32 ^a
Bacterial inoculation	NP	4.96 ^b	1.14 ^b	67.9 ^b	12.2 ^c	0.58 ^b	0.17 ^b
	<i>P.putida</i>	5.3 ^b	1.41 ^{ab}	69.4 ^b	16 ^b	0.42 ^c	0.19 ^b
	<i>P.fluorescens</i>	5.95 ^a	1.46 ^a	87 ^a	18.98 ^a	0.76 ^a	0.25 ^a

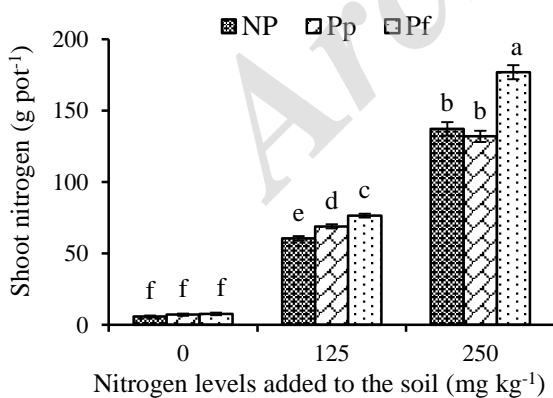
در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف یکسان، با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد معنادار نمی‌باشند.
In each column, means followed by the same letters are not significantly different at p<0.05 using Duncans's multiple range test.

افزایش بازده جذب آب و مواد غذایی می‌شود (Alipour & Sobhanipour 2012). بر اساس گزارشات داوودی‌فرد و همکاران (Davoodifard et al., 2011) تلقیح گندم با باکتری *Pseudomonas. sp* تحت شرایط تنش محیطی از طریق کاهش جذب یون‌های سمی، افزایش تولید هورمون اکسین و پروتئین‌های مخصوص منجر به تحریک رشد گیاه شد. افزایش وزن تر و خشک گیاهان با تلقیح بذری و خاکی گونه‌های *Sودوموناس* در شرایط مختلف توسط سایر

همچنین با توجه به شکل‌های ۴ و ۵، در سطوح بالاتر نیتروژن وزن خشک بخش هوایی و ریشه در گیاهان دارای باکتری بیش از گیاهان بدون باکتری می‌باشد. بالا بودن وزن خشک گیاهان دارای باکتری *سودوموناس* در مقایسه با گیاهان بدون باکتری عمدتاً ممکن است به دلیل تولید مواد تحریک کننده رشد گیاه مانند اکسین و سایتوکینین باشد که موجب توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه شده و گیاه می‌تواند از حجم بیشتری از خاک استفاده کند و به نوعی موجب

جذب نیتروژن

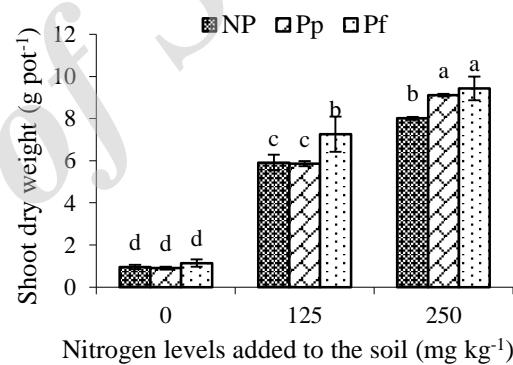
با توجه به (جدول ۴)، اثر متقابل سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر جذب نیتروژن بخش هوایی و ریشه در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بدست آمد. نتایج مقایسات میانگین (جدول ۵) نشان می‌دهد با افزایش کود اوره در محیط رشد، مقدار نیتروژن بخش هوایی و ریشه به‌طور معناداری افزایش یافت که با نتایج هرزوق و گوتز (Herzog & Gotz, 2004) مطابقت دارد. آنان بیان کردند کود اوره با تأثیر بر خصوصیات ریشه، میزان جذب را تحت تأثیر قرار داده و کارایی جذب آب و عناصر غذایی به ویژه نیتروژن، را در کل اندام هوایی گیاه افزایش می‌دهد. همچنین با توجه به (شکل ۶ و ۷) با افزایش سطح کود اوره، مقدار نیتروژن بخش هوایی و ریشه در گیاهان دارای باکتری افزایش یافت به‌ویژه باکتری *سودوموناس فلورسنس* بیشترین تأثیر را در افزایش مقدار نیتروژن داشت. این افزایش مقدار نیتروژن در گیاهان دارای باکتری را می‌توان به افزایش ماده خشک نسبت داد. به نظر می‌رسد باکتری به دلیل افزایش وزن خشک ریشه و فراهم کردن سطح جذب بیشتر، سبب بهبود جذب عناصر معدنی نظیر نیتروژن شده است. یوراشیما و همکاران (Urashima *et al.*, 2005) در نتایج مشابه بیان کردند تلقیح ریشه اسفناج با *سودوموناس فلورسنس* در حضور یک منبع کربن مناسب، رشد گیاه را بهبود بخشید در صورتی که ماده آلی به تنهایی رشد گیاه را افزایش نداد چون *سودوموناس* باعث بهبود رشد و توسعه ریشه شد و دسترسی گیاه به ماده آلی افزایش یافت.



شکل ۶- برهمکنش نیتروژن و گونه‌های باکتری بر جذب نیتروژن بخش هوایی

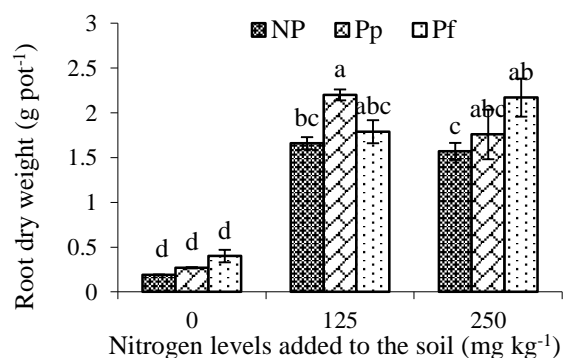
Figure 6. Interaction of nitrogen levels and bacterial species on nitrogen uptake by shoot

محققان نیز گزارش شده است. در این تحقیق تأثیر معنی‌دار دو گونه *P. fluorescens* و *P. putida* در سطوح بالاتر نیتروژن بر افزایش وزن خشک بخش هوایی و ریشه ممکن است به دلیل تولید IAA باشد در واقع باکتری با تولید این ماده موجب توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه شده و به دلیل وجود نیتروژن کافی در این دو سطح، و در نتیجه با سیستم ریشه‌ای بهتر، جذب بیشتری انجام داده و موجب افزایش وزن تر و خشک گیاه می‌شود. از سازوکارهای دیگری که در افزایش رشد گیاه مؤثر می‌باشند، انحلال منابع نامحلول فسفات و توانایی گونه‌ها در تولید سیدروفور و تأمین آهن مورد نیاز گیاه را می‌توان نام برد. با توجه به (جدول ۱) این باکتری‌ها جزء بهترین حل‌کننده‌های فسفات و تولیدکنندگان سیدروفور هستند. در نتیجه فرض بر این است که باکتری‌ها با تأمین عناصر مورد نیاز گیاه موجب بهبود رشد گیاه اسفناج شده‌اند.



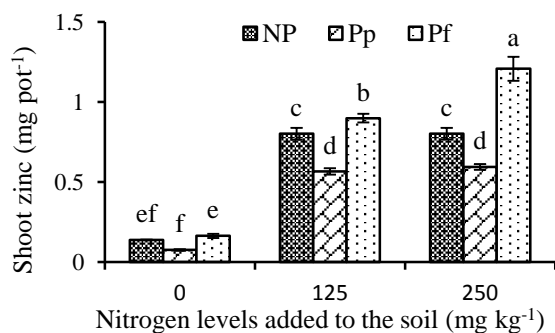
شکل ۴- اثر متقابل سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر وزن خشک بخش هوایی

Figure 4. Interaction of nitrogen levels and bacterial species on shoot dry matter



شکل ۵- اثر متقابل سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر وزن خشک ریشه

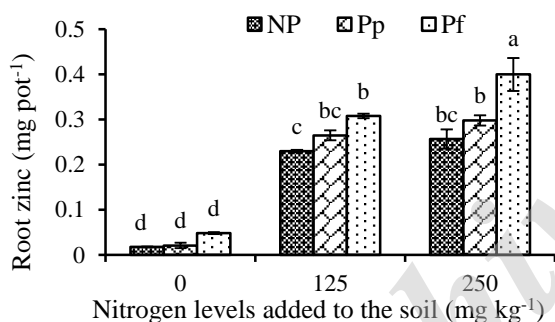
Figure 5. Interaction of nitrogen levels and bacterial species on root dry matter



شکل ۸- برهمکنش سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر جذب روی بخش هوایی

Figure 8. Interaction of nitrogen levels and bacterial species on zinc uptake by shoot

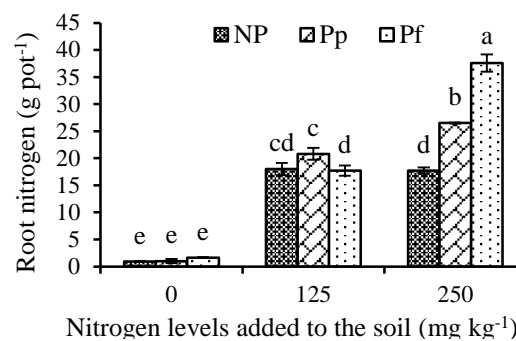
در ریشه نیز میزان روی در تیمارهای حاوی *P. putida* تفاوت معنی‌داری با گیاهان شاهد نداشت (شکل ۹) که این عامل می‌تواند به دلیل برهمکنش آنتاگونیستی بین آهن و روی اتفاق افتاده باشد.



شکل ۹- برهمکنش سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر جذب نیتروژن ریشه

Figure 9. Interaction of nitrogen levels and bacterial species on zinc uptake by root

به‌طور کلی بر همکنش بین آهن و روی می‌تواند به دلیل موارد زیر باشد: ۱- عناصر غذایی احتمالاً برای اشغال مکان مشابه بر روی حامل‌های مشابه با هم رقابت می‌کنند. ۲- عناصر غذایی از جمله آهن و روی احتمالاً در فرآیندهای جذب و انتقال از ریشه به بخش هوایی با هم رقابت می‌کنند. ۳- ممکن است مقدار نیاز اسفناج به آهن در مقایسه با روی بیشتر باشد. باکتری‌ها برای جذب عناصر غذایی، سیدروفور تولید می‌کنند ولی احتمالاً سیدروفور تولید شده در افزایش جذب Zn تأثیر زیادی نداشته است. با توجه به اینکه عناصر غذایی احتمالاً برای اشغال مکان مناسب بر روی ناقل‌های مشابه با هم رقابت می‌کنند و تمایل Fe به ترکیب با



شکل ۷- برهمکنش سطوح نیتروژن و گونه‌های باکتری بر جذب نیتروژن ریشه

Figure 7. Interaction of nitrogen levels and bacterial species on nitrogen uptake by root

جذب روی

اثر متقابل نیتروژن و باکتری در سطح احتمال ۱٪ بر جذب روی بخش هوایی معنی‌دار بود. همچنین اثر متقابل نیتروژن×باکتری در سطح احتمال ۵٪ بر جذب روی ریشه معنی‌دار بدست آمد (جدول ۴). نتایج مقایسات میانگین نشان داد با افزایش نیتروژن خاک از صفر به ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک، مقدار روی بخش هوایی و ریشه به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد (جدول ۵). با توجه به اینکه منبع نیتروژن اوره می‌باشد این افزایش می‌تواند ناشی از کاهش pH خاک باشد. اوره پس از مصرف در خاک هیدرولیز شده و کربنات آمونیم تولید می‌کند که در کوتاه مدت سبب افزایش pH خاک می‌شود ولی با گذشت زمان بر اثر فرآیندهای نیترات‌سازی و جذب NH_4^+ به وسیله ریشه گیاه که هر دو فرآیند H^+ به رایزوسفر آزاد می‌کند، pH خاک کاهش یافته و قابلیت استفاده از Zn افزایش می‌یابد (Kazemzadeh *et al.*, 2011). در مطالعه‌ای که توسط نجفی و همکاران (Najafi *et al.*, 2011) انجام شد، مشاهده کردند که با افزایش غلظت NH_4^+ محلول غذایی غلظت و جذب Zn بخش هوایی و ریشه اسفناج افزایش می‌یابد. همچنین با توجه به (جدول ۵) در تیمارهای دارای باکتری *P. fluorescens*، مقدار روی بخش هوایی حدود ۳۱ درصد و مقدار روی ریشه ۴۷/۱ درصد نسبت به شاهد بدون باکتری افزایش داشت. اما با توجه به (شکل ۸) در کلیه سطوح نیتروژن در تیمارهای دارای باکتری *P. putida* میزان جذب روی بخش هوایی به طور معنی‌داری نسبت به شاهد بدون باکتری کاهش نشان داد.

فسفر-روی اتفاق افتاده و مقدار روی در گیاهان تیمار شده با این گونه کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری کلی

استفاده از کودهای نیتروژنی به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است. به علت تأثیر کودهای نیتروژنی در افزایش رشد رویشی گیاه به‌ویژه در سبزی‌های برگ‌ری و تجمع نیترات در اندام‌های قابل مصرف سبزی‌ها و احتمال سمیت آن برای انسان و حیوانات، کمبود عناصر غذایی کم‌مصرف در محیط‌های حاوی نیترات بالا و سایر مسائل زیست محیطی و اقتصادی، بررسی تأثیر باکتری‌های مفید خاکری به منظور تولید حداکثر محصول همراه با بهبود کیفیت خاک و حفظ ارزش غذایی محصولات اهمیت ویژه‌ای دارد. در این تحقیق کاربرد هر دو گونه باکتری *P. putida* و *P. fluorescens* باعث افزایش شاخص کلروفیل و وزن خشک گیاه نسبت به تیمار شاهد بدون باکتری شد. همچنین از دو گونه به کار رفته در این تحقیق گونه *P. fluorescens* با افزایش جذب نیتروژن و روی نسبت به *P. putida* به عنوان گونه مؤثر و کارا معرفی می‌گردد. بنابراین، توصیه می‌شود در کاشت اسفناج همراه با حد مطلوب کود نیتروژنی از پتانسیل چنین باکتری‌هایی استفاده شود تا هم عملکرد گیاه افزایش یابد و هم با افزایش عناصر غذایی مفید از جمله Zn و کاهش تجمع نیترات به واسطه مصرف استاندارد و به اندازه کود شیمیایی نیتروژنه کیفیت و ارزش غذایی این محصول ارزشمند حفظ شود.

سیدروفور بیش از سایر کاتیون‌هاست، بنابراین احتمال می‌رود باکتری‌ها با تولید سیدروفور موجب افزایش غلظت آهن در گیاه شده و این آهن اضافی مانع از جذب Zn شده است. اما در مورد اینکه گونه فلورسنس در افزایش مقدار روی تأثیر معنی‌داری گذاشته است، می‌توان گفت احتمالاً این گونه باکتری در رایزوسفر گیاه اسفناج موفق‌تر عمل نموده، سیدروفور زیادی تولید می‌کند و یا پایووردینی که تولید می‌کند، قوی‌تر است. همچنین با توجه به اینکه این مقدار از حاصلضرب غلظت در ماده خشک بدست می‌آید، این افزایش مقدار روی در گیاهان دارای باکتری *P. fluorescens* را می‌توان به افزایش ماده خشک نیز نسبت داد. عامل دیگر در رابطه با کاهش مقدار روی در گیاهان دارای باکتری *P. putida* را می‌توان به افزایش فسفر نسبت داد. فسفر مهم‌ترین عنصری است که در جذب روی توسط گیاه تداخل ایجاد می‌کند. داس و همکاران (Das et al., 2005) تعامل بین روی و فسفر را مورد مطالعه قرار دادند و همگی این مسئله را تأیید کردند که بین روی و فسفر در گیاه یک رابطه آنتاگونیستی وجود دارد و افزایش فسفر منجر به تحمیل کمبود روی در گیاه می‌شود. قادری (Qaderi, 2007) توانایی حل‌کنندگی فسفات توسط هر دو گونه مورد مطالعه در این آزمایش را مورد بررسی قرار داد و گزارش کرد گونه *P. putida* مؤثرترین گونه در انحلال فسفات می‌باشد. در نتیجه فرض بر این است که با انحلال فسفات و افزایش غلظت فسفر گیاه برهمکنش آنتاگونیستی بین

References

- Ahmadinejad R., Najafi N., Aliasgharzad N., and Oustan S.h. 2013. Effects of organic and nitrogen fertilizers on water use efficiency, yield and the growth characteristics of wheat (*Triticum aestivum* cv. Alvand). *Water and Soil Science*, 2: 177-197. (In Persian)
- Alexander J., Benford D., Cockburn A., Cravedi J.P., and Dogliotti E. 2008. Nitrate in vegetables: scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain. *European Food Safety Authority Journal*, 689: 1-79.
- Alipour Z.T., and Sobhanipour A. 2012. The Effect of *Thiobacillus* and *Pseudomonas fluorescens* inoculation on maize growth and Fe uptake. *Annals of Biological Research*, 3: 1661-1666.
- Alizadeh O., Mazaheri D., and Hashmidezfooli A. 1998. The effect of urea and urea covered with sulfur on yield and yield components of corn. *Agronomy Journal*, 3:42-45. (In Persian)
- Assimakopoulou A. 2006. Effect of iron supply and nitrogen form on growth, nutritional status and ferric reducing activity of spinach in nutrient solution culture. *Scientia Horticulturae*, 110: 21-29.
- Barker A.V., and Pilbeam D.J. 2006. Handbook of Plant Nutrition. CRC Press, 196p.
- Bunea A., Andjelkovic M., Socaciu C., Bobis O., Neacsu M., Verhe R., and Camp J.V. 2008. Total and individual carotenoids and phenolic acids content in fresh, refrigerated and processed spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Food Chemistry*, 2: 649-656.

- Das K., Dang R., Shivananda T.N., and Sur P. 2005. Interaction between phosphorus and zinc on the biomass yield and yield attributes of the medicinal plant stevia (*Stevia rebaudiana*). *Science World Journal*, 5:390–395.
- Davoodifard M., Habibi D., Paknejad F., fazeli F., and Farhanipad F. 2011. Effect of plant growth promoting rhizobacteria and foliar application of amino acids and silicic acid on antioxidant enzyme activity of wheat under drought stress. *Journal of Agriculture and Plant Breeding*, 4:11-36. (In Persian)
- Fageria N.K. 2001. Nutrient management for improving upland rice productivity and sustainability. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, 15: 2603-2629.
- Gulser F. 2005. Effect of ammonium sulphate and urea on NO_3^- and NO_2^- accumulation nutrient content and yield criteria in spinach. *Scientia Horticulturae*, 106: 330- 340.
- Hajjilu M., Salimi H., Asghari H., and Khavazi K. 2011. The use of plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers for the sustainability of agricultural ecosystems. 1st Iranian Fertilizer Challenges Congress: Half a Century of Fertilize Consumption, Tehran, Iran.
- Hatamjafari F., and Tazarv M. 2013. Study of antioxidant activity of *Spinacia oleracea* L. *Journal of Chemistry*, 2: 451-455.
- Havlin J.L., Beaton J.D., Tisdale S.L., and Nelson W.L. 2004. Soil Fertility and Fertilizers: An Introduction to Nutrient Management. 7th Ed. Prentice Hall, New Jersey, USA.
- Herzog H., and Gotz K.P. 2004. Influence of water deficit on uptake and distribution of nitrogen in soybeanmonitore by soil injected ^{15}N . *Journal of Agronomy and Crop Science*, 90: 161-167.
- Ishiwata H., Yamada T., Yoshiike N., Nishijima M., Kawamoto A., and Uyama Y. 2002. Daily intake of food additives in Japan in five age groups estimated by the market basket method. *European Food Research Technology*, 215: 367–374.
- Kavino M., Harish S., Kumar N., Saravanakumar D., and Samiyappan R. 2010. Effect of chitinolytic PGPR on growth, yield and physiological attributes of banana (*Musa spp.*) under field conditions. *Applied Soil Ecology*, 45: 71–77.
- Kazemzadeh M., Peyghambar dust S., and Najafi N. 2011. Improving nutrient concentration flour of wheat (*Triticum aestivum* cv. Alvand) with the use combined of organic and nitrogen fertilizers. *Journal of Soil and Water Research*, 4: 405-420. (In Persian)
- Maynard D.N., Barker A.V., Minotti P.L., and Peck N.H. 1976. Nitrate accumulation in vegetables. *Advances in Agronomy*, 28: 71-118.
- Mengel K. 1995. Fe availability in plant tissues–fe chlorosis on calcareous soils. In: Abadia J. (Ed.), Fe Nutrition in Soils and Plants. *Kluwer Academic Publishers*. The Netherlands, pp. 389–397.
- Najafi N., Parsazadeh M., Tabatabai S.J., and Oustan S.h. 2011. Effects of nitrogen form and pH of nutrient solution on the uptake iron, zinc, copper and manganese by spinach in hydroponic culture. *Journal of Soil and Water Research*, 2: 283-295. (In Persian)
- Nezarat S., and Gholami A. 2010. Role of doubled inoculation with *Azospirillum* and *Pseudomonas* bacteria in improving the uptake of nutrients in corn. *Agroecology*, 1:25-32. (In Persian)
- Ouda B.A., and Mahadeen A.Y. 2008. Effect of fertilizers on growth, yield, yield components, quality and certain nutrient contents in broccoli (*Brassica oleracea*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 10: 627-632.
- Qaderi A. 2007. Study of three isolates of *Pseudomonas* in releasing phosphate from mineral surfaces. Master Thesis, Faculty of Agriculture, pp. 82-84
- Salardini A., and Mojtahedi M. 1978. Principles of Plant Nutrition, Nitrogen, Zinc, Iron. 2nd Ed. Tehran University Press, 309 p. (In Persian)
- Urashima Y., Suga Y., and Hori K. 2005. Growth promotion of spinach by *fluorescent pseudomonas* strains under application of organic materials. *Soil Science Plant Nutrition*, 6:841-847.
- Vessey J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255: 571-586.
- Waling I., Vark W.V., Houba V.J.G., and Vanderlee J.J. 1989. Soil and plant analysis, a series of syllabi. Part 7. Plant analysis procedures. Wageningen Agriculture University, the Netherlands.
- Wang Z.H., Wang L., He C.Y., Wang H., Kui X.L., and Jiang Z.X. 2000. Studies on effect of over N fertilization on nitrate accumulation in different vegetables and its regulation. *Journal of Environmental Protection*, 19: 46–49.

Effects of Two Species of *Pseudomonas* and Nitrogen Levels on Dry Matter, Chlorophyll Index and N and Zn Uptake by Spinach Plant

Afsaneh Kalantari^{1*}, Nasser Aliasgharzad², Nosratollah Najafi³

(Received: April 2016 Accepted: March 2017)

Abstract

Pseudomonas species are usually considered as plant growth promoting bacteria which in combination with nitrogen fertilizers could exert beneficial effects on growth and nutrients uptake by plants. It seems that by using these bacteria and nitrogen fertilizer we will be able to improve growth and nutrient uptake by spinach plant as an important vegetative in human diet. To achieve this purpose, in a factorial experiment on the basis of randomized complete blocks design with three replications, spinach plant (*Spinacia oleracea* L.) were inoculated with *Pseudomonas fluorescens* or *P. putida* or left un-inoculated as control. Three levels of nitrogen (0, 125 and 250 mg N Kg⁻¹) as urea were applied to the pots containing 2 kg of sterile soil. Statistical analysis showed that with increasing levels of nitrogen in soil from 0 to 250 mg kg⁻¹, Zn uptake, leaf chlorophyll index and plant dry weight were significantly increased. By bacterial inoculation, shoot and root dry weights of spinach showed significant increase compared to the nonbacterial control and shoot and root dry weights were enhanced by 20% and 28.1% in plants inoculated with *P. fluorescens* compared to the non-bacterial control. Leaf chlorophyll index was increased by 22.2% and 13.8% in *P. putida* and *P. fluorescens* treated plants, respectively compared to the control. Total N content in root and shoot of spinach was significantly increased in bacterial treatments especially in *P. fluorescens* treated plants compared to the non-bacterial control. Zn content in shoot was significantly decreased in plant inoculated with *P. putida* compared to the non-bacterial control. Based on the result obtained in this study, *P. fluorescens* caused a marked increase in growth and N uptake by development of plant root system and increasing water and nutrients uptake efficiency. Moreover, Zn uptake in spinach plant may improve through siderophore production.

Keywords: Chlorophyll index, Nitrogen, *Pseudomonas*, Spinach, Zinc

1. MSc Graduate, Department of Soil Science, University of Tabriz

2. Professor, Soil Science Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

3. Associate Professor Soil Science Department, Faculty of Agriculture, University of Tabriz

* Corresponding Author Email: afsanekalantary@yahoo.com