جدا سازی، شناسایی و بررسی جمعیت گونه‌های *Azospirillum sp.* در خاک‌های اطراف تهران و ارزیابی اثرات محرک رشدی آنها بر گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه

مرجان اثباتی[1]، عباس اخوان سپهی، احمد اصغر زاده و محمود خسروشاهلی

کارشناس ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه آزاداسلامی واحد علوم وتحقیقات؛ **marjan.esbaty@gmail.com**

دانشیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال؛ **akhavansepahy@gmail.com**

استادیار موسسه تحقیقات خاک و آب کشور؛ **a_asgharzadeh_2000@yahoo.com**

استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات؛ **mkhosrowchahli@yahoo.com**

دریافت: **92/3/1** و پذیرش: **93/1/31**

چکیده

سال‌هاست که باکتری‌های جنس *آزوسپیریلوم* به عنوان محرک رشدگیاهان معرفی شده‌اند. تولید فیتوهورمون‌ها، به ویژه اکسین، به عنوان یکی ازمهمترین عوامل افزایش عملکرد در گیاهان تلقیح شده شناخته شده است. برهمین اساس به منظور بررسی تأثیر مایه تلقیح *آزوسپیریلوم* بر ویژگی‌های گیاه گوجه‌فرنگی سه گونه از باکتری جنس *آزوسپیریلوم* از خاک‌های اطراف تهران جداسازی، شناسایی و خالص سازی شدند. سپس آزمایشی در شرایط گلخانه اجرا گردید. تیمارهای آزمایش شامل تلقیح بذرهای گوجه‌فرنگی با سه گونه باکتری *آزوسپیریلوم* از خاک مناطق مختلف و عدم تلقیح باکتریایی به عنوان تیمار شاهد بودند. ویژگی‌های مورد اندازه‌گیری: طول ساقه- طول ریشه- وزن تر شاخ و برگ- وزن تر ریشه، حجم ریشه- وزن خشک شاخ و برگ-وزن خشک ریشه بودند. نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌های رشد مشخص نمود که تلقیح بذرهای گوجه‌فرنگی با باکتری *آزوسپیریلوم* بر تمامی صفات، غیر از صفت طول ریشه اثر مثبت معنی‌دار داشته است، یعنی تیمارهای کاربرد باکتری نسبت به شاهد برتری داشتند. افزایش حجم و وزن خشک ریشه در مقایسه با تیمار شاهد، دلالت بر بالارفتن سطح جذب موادغذایی، در گیاهان تلقیح شده دارد. اثر تیمار باکتری بر صفت وزن تر ریشه در سطح 5% و در بقیه صفات در سطح 1% معنی‌دار گردید. هم چنین جدول ضرایب همبستگی، همبستگی مثبت و معنی دار در سطح 1% را برای صفت طول ساقه با وزن تر و خشک شاخ و برگ نشان داد. در بخش آزمون عناصر، تیمار باکتریایی اثر معنی‌داری بر جذب عناصر نیتروژن، فسفر، آهن، منگنز و روی بر جای گذاشت. افزایش شاخص‌های رشد و جذب عناصر در مقایسه با تیمار شاهد، یکی از دلایل افزایش عملکرد در گیاهان تلقیح شده در نظر گرفته می‌شود، و در مجموع نتایج گلخانه‌ای این پژوهش نشان داد که باکتری‌های آزوسپیریلوم برای گیاه گوجه سودمندی نسبتاً مناسبی داشته اند.

واژه‌های کلیدی: *آزوسپیریلوم ایراکنس، آزوسپیریلوم برازیلنس، آزوسپیریلوم لیپوفروم، گوجه‌فرنگی*

---

[1] نویسنده مسئول، آدرس: تهران، صندوق پستی:44683 -19918

مقدمه

گوجه‌فرنگی یکی از سبزی‌های مهمی است که به علـت داشـتن انـواع ویتامین‌ها، کاروتـن، اسیدهای مفید، قند، املاح معدنی نقش مهمی در سلامت انسان ایفا می‌کند (شانگاولا، 1989) و در بسیاری از کشورهای دنیا کشت می‌شود، هم چنین در سطح وسیعی در رب سازی، تهیه سس و... مورد استفاده قرار می‌گیرد. (وین، 1997) طبق آمار بانک اطلاعات سازمان کشاورزی خوارو بار جهانی (فائو) مصرف جهانی گوجه‌فرنگی در سال 2003، 102/8 میلیون تن بود.

ایران با 3/394 هزار تن هفتمین کشور مصرف کننده گوجه فرنگی بوده است.

طبق آمار فائو در سال 2006 بزرگترین تولید کننده گوجه فرنگی جهان، چین می‌باشد و ایران با تولید 4200000 تن در مرتبه هشتم قرار دارد. گوجه فرنگی در 170 کشور دنیا با آب و هواهای مختلف کشت می‌شود و پس از سیب‌زمینی و سیب‌زمینی شیرین، گوجه فرنگی بیشترین حجم تولید تره بار جهانی را دارد.

ایران از نظر تولید گوجه فرنگی رتبه هفتم جهان را به خود اختصاص داده است این رتبه بندی بر پایه آمار تولید کشورها در سال 2008 بوده است. هم چنین فائو تولید گوجه فرنگی ایران را در سال 2009، پنج میلیون و 887 هزار و 714 تن اعلام کرد این میزان تولید ، افزایش 22 درصدی را نسبت به تولید سال 2008 نشان می‌دهد.

سطح زیر کشت گوجه فرنگی در ایران در سال 2009 نسبت به سال 2008، 23/8 درصد افزایش داشت.

افزایش روز افزون جمعیت و به دنبال آن کمبود مواد غذایی به خصوص در کشورهای در حال توسعه یکی از معضلاتی است که فکر محققین ذیربط را به خود مشغول داشته است. افزایش تولیدات کشاورزی می‌تواند یکی از راه حل‌های اصولی در حل این مشکل باشد (فائو، 2000).

برای افزایش تولید محصولات کشاورزی یا باید سطح زیر کشت را بیشتر کرد که مقرون به صرفه نیست یا میزان تولید در واحد سطح را بالا برد. برای این منظور یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین این روش‌ها، تولید کودهای زیستی می‌باشد (شارما، 2003).

طیف گسترده ای از باکتری‌های خاکزی در ریزوسفر شناخته شده‌اند که می‌توانند رشد بسیاری از گونه‌های مهم زراعی را بهبود بخشند (قلاوند و همکاران ،1382).

در نظام‌های کشاورزی پایدار کاربرد کودهای زیستی از اهمیت ویژه‌ای در افزایش تولید برخوردار است (شارما، 2003).

آزوسپیریلوم یکی از معروف‌ترین میکروارگانیسم‌هایی است که می‌تواند در ریزوسفر غلات و اطراف ریشه آنها تشکیل کلونی دهد (گری و اسمیت، 2004). و تثبیت ازت انجام داده و منجربه افزایش رشد گیاه شود (زهیر و همکاران، 2004).

این باکتری علاوه بر توانایی بهبود رشد گیاهان میزبان خود، به دلایل دیگری مانند پراکنش وسیع جغرافیایی و گسترش دامنه گیاهان میزبان و تحمل به تنش‌های محیطی بسیار مورد توجه می‌باشد (کادر و همکاران، 2003).

بسیاری از سویه‌های آزوسپیریلوم توانایی تولید هورمون‌های گیاهی را از خود نشان داده‌اند و مهمترین هورمون تولیدی توسط آنها اکسین می‌باشد (لوانونی و باشان، 1990).

نتایج حاصل از اکثر مطالعات انجام گرفته گویای آن است که آزوسپیریلوم با تثبیت زیستی نیتروژن، گسترش سطح ریشه، بهبود جذب آب و عناصر غذایی و تولید هورمون‌های رشد و برخی ویتامین‌ها، رشد کمی و کیفی را در گیاهان تقویت می‌کند (کریستی، 2003).

مطالعات بر روی اثرات *آزوسپیریلوم* بسیار زیاد انجام شده است.

باشان و همکاران اظهار نموده‌اند که عملکرد دانه و وزن خشک گیاهان گندم، ذرت، ذرت خوشه-ای، در نتیجه تلقیح با *آزوسپیریلوم* از 10% تا 30% افزایش می‌یابد. (باشان و همکاران، 2004). هم چنین در برخی گیاهان نظیر گوجه فرنگی، سویا، فلفل، پنبه، وجود آزوسپیریلوم باعث افزایش عملکرد شده است (باشان و هولگوئین، 1991).

در شرایط گلخانه و در گلدان اثرات باکتری *A.lipoferum* بر روی رشد آفتابگردان مثبت گزارش شده است (فاگز و ارساک، 1991).

در آرژانتین کلودیا و همکاران (2000) به این نتیجه دست یافتند که تلقیح ریشه گوجه فرنگی با آزوسپیریلوم، وزن تازه اندام هوایی و ریشه را به ترتیب 4% و 30% افزایش می‌دهد.

فالیک و همکاران (1989) افزایش سطح ریشه ذرت در اثر ترشح اکسین به وسیله باکتری *آزوسپیریلوم برازیلنس* را مشاهده کردند.

این پژوهش با تأکید و تمرکز بر اهدافی چون جداسازی، خالص سازی و شناسایی باکتری‌های بومی

جنس آزوسپیریلوم و هم چنین بررسی تأثیر کاربرد مایه تلقیح باکتری آزوسپیریلوم از طریق تلقیح بذر بر شاخص-های رشد و جذب عناصر در گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه به اجرا در آمد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در سال 1389 در مجتمع آزمایشگاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات به اجرا در آمد. در این آزمایش ابتدا نمونه‌برداری از خاک مناطق کرج- پاکدشت- ساوجبلاغ- هشتگرد انجام گرفت. به منظور جداسازی و خالص سازی باکتری‌های آزوسپیریلوم از سه محیط کشت استفاده شد.

محیط‌های کشت به کار رفته در این آزمایش، محیط‌های توصیه شده توسط رودریگزکاسرس (Congo Red Agar medium=RoJo Congo (RC)) و بالدانی و دوبرینر NFb (N-free semisolid malate medium) و BMS آگار بودند (رودریگز، 1982؛ بالدانی و دوبرینر، 1980).

ابتدا رقت‌های سریال برپایه 10 از نمونه‌های خاک تهیه شد (تهیه10لوله آزمایش حاوی9سی سی آب مقطر استریل و افزودن یک گرم خاک استریل و الک شده به لوله اول) ودر ویال‌های حاوی 5 mL محیط نیمه جامد NFb قرار داده شدند. پس از گذشت 48 ساعت انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتی گراد، تشکیل هاله غلیظ، مواج، سفید رنگ به فاصله 1-4 میلی‌متری از سطح محیط، نشان دهنده احتمال وجود باکتری‌های جنس آزوسپیریلوم در نظر گرفته شد. نمونه‌هایی که در محیط نیمه جامد NFb ایجاد هاله کرده بودند مجدداً به محیط نیمه جامد NFb انتقال داده می‌شوند.

و بعداز 24 ساعت با آلوده کردن حلقه پلاتینی در قسمت تشکیل هاله، نمونه‌ها برروی پلیت جامد NFb حاوی 0/02 g/Lعصاره مخمر تجدید کشت گردیدند. بعد از یک هفته کلنی‌های کوچک وسفید، انبوه، منفرد ایجاد شدکه مجدداً جهت غنی‌سازی به محیط نیمه جامد NFb انتقال داده شدند. سپس جهت خالص سازی نمونه‌ها، از محیط کشت BMS آگار استفاده گردید (برگ و همکاران، 2005). پس از کشت باکتری‌ها بر روی این محیط و گرماگذاری در دمای 37°c به مدت 24 ساعت، کلنی های صورتی رنگ و چین خورده مشکوک به آزوسپیریلوم شناسایی شدند. در مرحله دوم خالص سازی، به محیط RC با دمای 37-34 درجه سانتی گراد به مدت 10-7 روز منتقل شدند. با تشکیل کلنی‌های قرمز رنگ و خشک و چروکیده در این محیط، به احتمال قریب به یقین می‌توان گفت که کلونی مورد نظر *آزوسپیریلوم* است (موتسارا، 1995).

برای جداسازی در حد گونه از محیط‌های کشت اختصاصی با منابع کربن مختلف استفاده شد. به این منظور از محیط کشت نیمه جامد NFb حاوی گلوکز، ساکارز، مانیتول، گلیسرول که جایگزین اسید مالیک می‌شوند، استفاده شد.

با انجام آزمایشات تکمیلی میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی گرم، اندازه، شکل، رنگ کلونی) و تست‌های بیوشیمیایی (اکسیداز، کاتالاز، ژلاتیناز، اوره آز) باکتری-های مورد نظر پس از بازگشت‌های متوالی، خالص شده و به اسلنت برای آزمایشات بعدی منتقل شدند.

بررسی جمعیت گونه‌های *آزوسپیریلوم*

برای بررسی جمعیت *آزوسپیریلوم* از روش (MPN)[1] استفاده شد (بهتاکاریا، 1995).

سری‌های رقت تهیه نموده و به پلیت‌های حاوی 15mL از محیط‌های Plate count agar (برای شمارش کل باکتری‌های موجود)، NFb (5 محیط مختلف با منابع کربن اسید مالیک، گلوکز، ساکارز، مانیتول، گلیسرول) با دمای 45°c اضافه و پورپلیت گردید. نمونه‌ها در دمای 37°c و به مدت 40-48 ساعت گرما گذاری گردید و سپس تعداد کلنی‌های موجود با استفاده از فرمول " تعداد کلنی× عکس رقت=تعداد باکتری‌ها" در یک گرم خاک شمارش شد.

آزمون‌های گلخانه‌ای

تهیه مایه تلقیح آزوسپیریلوم

از سه سویه *آزوسپیریلوم* در آزمون‌های گلخانه-ای استفاده شد. چند روز قبل از شروع آزمایش سویه‌های مورد نظر در محیط RC بازکشت و جوان شدند. سپس از پلیت جوان شده هرسویه به ارلن‌های 500 میلی لیتری حاوی 300 میلی لیتر محیط کشت نوترینت براث تلقیح شدند. پس از طی زمان مناسب انکوباسیون، جمعیت باکتری‌ها به روش مک فارلند در حد (3×10^{8} (cfu ml^{-1}) تنظیم گردید سپس مایه تلقیح به درون یخچال منتقل شد.

ضدعفونی و تلقیح بذرهای گوجه‌فرنگی

آزمون‌های گلخانه‌ای گوجه‌فرنگی با استفاده از رقم Memory (تهیه شده از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر) انجام شد.

ابتدا بذرهای گوجه فرنگی را درهیپوکلریت سدیم 3% به مدت 15 دقیقه غوطه ور کرده سپس با آب مقطر استریل آبکشی شدند. بذرها داخل پتری‌های حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند. بذرهای استریل 24 ساعت خیسانده شدند. بذرهای مورد استفاده درون ظرف-

[1] Most Probable Number

های پتری قرارداده شده و مایه تلقیح به آن‌ها اضافه شد و بذرها به خوبی با مایه تلقیح آغشته شدند و به منظور تلقیح کامل به مدت 30 دقیقه درون مایه تلقیح نگهداری شدند. به ازای 10 بذر، میزان هفت میلی لیتر مایه تلقیح که هر میلی‌لیتر آن دارای 10^8 عدد باکتری زنده و فعال بود مورد استفاده قرار گرفت (فالچیری و فریونی، 1994). سپس به مدت یک هفته پلیت‌ها در دمای 24 درجه سانتی گراد (شرایط تاریکی) قرار داده شدند.

پس از گذشت یک هفته، پتری‌ها را خارج کرده، 5 روز زیر نور گذاشته شدند پس از ظهور برگ‌های لپه‌ای، بذرهای آلوده به باکتری، به گلدان انتقال یافتند در آزمایش گلخانه‌ای برای تهیه بستر کاشت از ماسه استفاده شد که ماسه‌ها جهت کاهش هدایت الکتریکی و اسیدیته با استفاده از محلول 10 درصد اسید کلرید ریک رقیق (25 درصد) اسید شویی و آبشویی شدند. در مدت اجرای آزمایش تغذیه گیاهان با محلول غذایی هوگلند بدون نیتروژن انجام شد (یک و همکاران، 1993).

آماده کردن گلدان

در این تحقیق از دو نوع گلدان با سایزهای مختلف استفاده گردید. گلدان‌ها پس از شستشو با مایه ظرفشویی، با محلول هیپوکلریت سدیم 2% به مدت 15 دقیقه ضد عفونی و سپس به خوبی آبکشی شدند. ابتدا بذرها به لیوانهای پلاستیکی (با ارتفاع 8/5cm و قطر دهانه 6/5cm) با ظرفیت 64g بستر کشت (مخلوط ماسه استریل و پرلیت اسفنجی به نسبت 50% حجمی) کشت گردید تا اینکه نشاءهای مناسب تهیه شوند (سه بذر تلقیح شده در هر گلدان).

پس از 10 روز نشاهای گوجه‌فرنگی به گلدان-های اصلی (با ارتفاع 13cm و قطر دهانه 14cm) با ظرفیت 1400 گرم بستر کشت استریل منتقل شدند.

اندازه‌گیری پارامترهای رشد

پس از اتمام دوره 65 روزه، گیاهان برداشت شده و پارامترهایی مانند ارتفاع بوته (طول ساقه)، طول ریشه، وزن تازه بوته، وزن خشک بوته، وزن تازه ریشه، وزن خشک ریشه و حجم ریشه اندازه‌گیری شدند.

به منظور بررسی ویژگی‌های ریشه ابتدا گلدان‌ها تخلیه شده و ریشه از بستر کشت به دقت جدا شده و شستشو گردید، به منظور تعیین حجم ریشه از استوانه مدرج دارای حجم مشخص آب استفاده شد. وزن خشک ریشه‌ها و بخش هوایی بوته بوسیله آون با دمای $75^{\circ}c$ به مدت 48 ساعت و توزین با ترازویی با دقت 0/001 گرم تعیین شدند. طول ساقه و ریشه گیاه با خط کش با دقت ±1 میلی متر اندازه‌گیری شد.

تمامی بخش‌های هوایی گیاهان کاملاً خشک وآسیاب شده، سپس عناصر اندازه‌گیری شدند.

برای اندازه‌گیری نیتروژن از روش کجلدال استفاده می‌شود (برمنر، 1982).

برای اندازه گیری فسفر از آمونیوم مولیبدات استفاده شد (اولسن، 1954).

برای اندازه‌گیری آهن،روی، منگنز از دستگاه جذب اتمی استفاده گردید (علی احیایی، 1373).

تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه-ای دانکن در سطح 1 و 5 درصد انجام شد و ضرایب همبستگی ساده بین ویژگی‌های مورد بررسی تعیین شد.

نتایج و بحث

جداسازی، خالص سازی، شناسایی باکتری‌های *آزوسپیریلوم*

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که از بین گونه‌های معرفی شده *آزوسپیریلوم* در جهان، در تعداد چهار نمونه خاک تهیه شده از مناطق کرج، ساوجبلاغ، پاکدشت، هشتگرد، تنها سه گونه در خاک‌های مورد مطالعه وجود داشت که این گونه‌های غالب شامل *A.brasilense* ، *A.irakense, A.lipoferum,* بودند.

با توجه به مطالعه مقایسه‌ای سه نوع محیط کشت برای جداسازی این گونه‌ها، تحقیق حاضر مشخص نمود که در صورت استفاده از محیط NFb نیمه جامد، نتایج قابل استنادتر خواهند بود، زیرا علاوه بر اینکه این محیط اختصاصی است، به دلیل تأمین شرایط نیمه هوازی توان تفکیک *آزوسپیریلوم* را از دیگر جنس-های تثبیت کننده ازت که قادر به رشد در شرایط نیمه هوازی نیستند نیز فراهم می‌آورد. از این رو استفاده از محیط NFb نیمه جامد برای جداسازی گونه‌های *آزوسپیریلوم* قابل توجیه است.

نتایج تحقیقات پدروزا و همکاران (1984) و بالدانی و همکاران (1986) نیز نشان می‌دهد که *آزوسپیریلوم* در شرایط هوازی نسبت به تثبیت ازت مبادرت می‌کند. از این رو جداسازی این جنس در شرایط نیمه جامد NFb به دلیل تأمین این شرایط، محیط مناسب-تری محسوب می‌گردد.

نتایج رنگ آمیزی گرم، این باکتری‌ها را گرم منفی، درشت، اندکی خمیده و میله‌ای شکل نشان داد.

سلول‌های *A.lipoferum* به صورت خمیده و میله‌ای شکل، سلول‌های *A.irakense* خمیده، میله‌ای شکل و S مانند، سلول‌های *A.brasilense* به شکل ویبروئیدی دیده شدند.

بر روی محیط BMS آگار بعد از 48-40 ساعت در دمای 33-35°C ،کلنی های *A.brasilense* و *A.lipoferum* به رنگ صورتی، مات، نامنظم و اغلب چروکیده و برآمده، نمایان گردید. کلنی‌ها روی محیط BMS آگار لزج نبودند. کلنی‌های *A.irakense* روی محیط BMS آگار، نیمه شفاف، محدب، با حاشیه منظم مشاهده شدند. روی محیط RC بعد از 96 ساعت در دمای 35-33 °C، کلنی‌های *A.lipoferum, A.brasilense,* *A.irakense* به صورت گرد، محدب، منظم، قرمز رنگ مشخص شدند.

آزمون‌های بیوشمیایی نشان دادند که سویه‌های *آزوسپیریلوم* از لحاظ واکنش ژلاتیناز و کاتالاز منفی، اما واکنش آنها در مقابل اوره آز و اکسید از مثبت بود.

تعیین جنس نمونه‌های جدا شده از خاک‌های مختلف، با توجه به نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی در جدول 2 آورده شده است.

جدول 1-پراکنش جدایه‌ها در محیط نیمه جامد NFb

محیط کشت / مناطق نمونه	NFb (اسید مالیک) نمونه‌های جدا شده	NFb (گلوکز) نمونه‌های جدا شده	NFb (مانیتول) نمونه‌های جدا شده	NFb (گلیسرول) نمونه‌های جدا شده	NFb (ساکارز) نمونه‌های جدا شده
پردیس کرج- دانشگاه تهران	Z1,Z2,Z4,Z5	Z1,Z2	Z1,Z4,Z5	Z2	-
تنکمان- ساوجبلاغ	J1,J2,J3,J4,J5	J1,J3,J4	J1,J4,J5	J2,J4	J1
پردیس ابوریحان پاکدشت	G1,G2,G3,G4,G5	G1,G2,G4,G5	G2,G3,G4	G1,G4,G5	G5
هشتگرد	H1,H2,H3,H4,H5	H1,H2,H3	H1,H2,H4	H1,H2,H4,H5	H3

جدول 2- تعیین جنس نمونه‌های جدا شده

جدایه ها / نمونه خاک	*A.lipoferum*	*A.irakense*	*A.brasilense*
پردیس کرج-دانشگاه تهران	Z5	Z2	Z4
تنکمان-ساوجبلاغ	J1	J2	J5
پردیس ابوریحان پاکدشت	G4	G1	G3
هشتگرد	H1	H3	H5

تعداد جمعیت کل باکتری‌ها با استفاده از محیط کشت Plate count agar مشخص گردید.

از آن جا که براساس نوع قند مصرفی، گونه‌های جنس *آزوسپیریلوم* از همدیگر تفکیک می‌شوند و همه آنها قادرند ازاسید مالیک استفاده نمایند، از این رو اسید مالیک نشان دهنده تقریبی جمعیت کل گونه‌های *آزوسپیریلوم* است. ساکارز نشان دهنده جمعیت تقریبی گونه *A.irakense* و مانیتول نشان دهنده جمعیت گونه *A.lipoferun* است. با توجه به این واقعیت تفاضل جمعیت کل از مجموع دو گونه *A.irakense* و *A.lipoferum* به عنوان جمعیت *A.brasilens* و دیگر گونه‌های *آزوسپیریلوم* در نظر گرفته شد (جدول 3).

با توجه به نتایج بدست آمده مشخص شد که با استفاده از محیط نیمه جامد NFb جمعیت *آزوسپیریلوم* را می‌توان با دقت بیشتری تعیین کرد زیرا این محیط برای جنس *آزوسپیریلوم* اختصاصی است و می‌تواند باکتری-های تثبیت کننده ازت را جدا سازی کند، از طرفی مزیت دیگر آن، این است که می‌تواند از میان باکتری-های تثبیت کننده ازت نیز، باکتری‌هایی که در شرایط میکروآئروفیلیک تثبیت کنندگی دارند را جدا کند و درصد خطا را کاهش دهد.

نتایج آنالیز داده‌های رشد گیاه گوجه‌فرنگی

براساس نتایج تجزیه واریانس صفات رشدی گوجه‌فرنگی، تلقیح بذرهای گوجه‌فرنگی با *آزوسپیریلوم* سبب افزایش معنی‌دار تمام صفات به غیر از صفت طول ریشه شده است.

وزن تر ریشه در سطح 5% و صفات دیگر در سطح یک درصد معنی‌دار شده‌اند.

جدول3- جمعیت گونه‌های *آزوسپیریلوم* در خاک مناطق مختلف (جمعیت در یک گرم خاک CFU/g)

نمونه خاک	جدایه ها	*A.lipoferum*	*A.irakense*	*A.brasilense*	گونه غالب
کرج		$4/1\times10^4$	$5/2\times10^4$	$1/27\times10^5$	*A.brasilense*
پاکدشت		$2/22\times10^4$	$3/67\times10^4$	$1/3\times10^4$	*A.irakense*
ساوجبلاغ		$3/76\times10^4$	5×10^4	$0/4\times10^4$	*A.irakense*
هشتگرد		$5/4\times10^4$	$4/7\times10^4$	$2/03\times10^4$	*A.lipoferum*

جدول 4- تجزیه واریانس ساده اثر سویه‌های مختلف باکتری *آزوسپیریلوم* در مکان‌های مختلف بر برخی صفات مورد آزمون در گوجه فرنگی

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)						
		طول ساقه	طول ریشه	وزن تر شاخ و برگ	وزن تر ریشه	حجم ریشه	وزن خشک شاخ و برگ	وزن خشک ریشه
باکتری	12	259/02 **	0/62 ns	0/93 **	0/25 *	0/41 **	0/31 **	0/05 **
خطا(Error)	39	11/92	0/58	0/11	0/12	0/08	0/07	0/01
CV (%)	_	10/03	17/01	15/63	19/26	17/48	16/68	8/25

، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال 1٪، 5٪ و غیر معنی‌دار

جدول 5- مقایسه میانگین اثر اصلی سویه‌های مختلف باکتری *آزوسپیریلوم* در مکان‌های مختلف بر برخی صفات مورد آزمون در گوجه فرنگی

مکان – باکتری		طول ساقه (cm)	طول ریشه (cm)	وزن تر شاخ و برگ (g)	وزن تر ریشه(g)	حجم ریشه (cc)	وزن خشک شاخ و برگ (g)	وزن خشک ریشه (g)
شاهد		22/17 f	15/10 a	1/94 e	1/40 c	2/00 cde	0/27 de	0/19 cd
کرج	*A.Lipoferum*	30/75 cd	20/60 a	4/24 cde	2/28 bc	3/00 abcd	0/48 cde	0/22 bcd
	A.brasilense	33/15 bc	23/65 a	4/83 bcd	1/96 c	3/25 abc	0/47 cde	0/21 cd
	A.irakense	47/72 a	18/42 a	8/48 a	2/65 abc	4/00 ab	1/16 a	0/33 bc
ساوجبلاغ	*A.Lipoferum*	23/52 ef	22/35 a	2/43 de	2/19 bc	3/00 abcd	0/25 e	0/09 d
	A.brasilense	30/47 cd	22/60 a	3/62 cde	2/04 c	3/00 abcd	0/45 de	0/30 bc
	A.irakense	45/62 a	23/50 a	7/36 ab	2/42 bc	3/00 abcd	0/90 abc	0/22 bcd
پاکدشت	*A.Lipoferum*	27/52 de	25/32 a	4/82 bcd	4/60 a	4/50 a	0/56 bcde	0/39 b
	A.brasilense	44/07 a	25/73 a	9/36 a	4/37 a	4/25 a	0/97 ab	0/36 bc
	A.irakense	36/80 b	19/45 a	5/73 bc	2/19 bc	3/25 abc	0/71 bcd	0/19 cd
هشتگرد	*A.Lipoferum*	30/92 cd	18/05 a	3/60 cde	1/68 c	1/00 e	0/42 de	0/24 bcd
	A.brasilense	37/77 b	20/50 a	5/13 bc	3/11 abc	2/50 bcd	0/90 abc	0/55 a
	A.irakense	36/72 b	15/10 a	5/42 bc	1/93 c	1/50 de	0/64 bcde	0/35 bc

ویژگی‌های موفولوژیکی گیاه گوجه‌فرنگی

طول ساقه

بررسی میانگین طول ساقه مشخص ساخت که در اثر تلقیح بذر با باکتری ارتفاع گیاه نسبت به شاهد افزایش یافت و بیشترین طول ساقه در گیاهان تلقیح شده با *A.irakense* کرج مشاهده شد که این افزایش نسبت به شاهد (عدم تلقیح) 53% بوده است.

چاندر سکار و همکاران (2005) افزایش ارتفاع گیاه ارزن در اثر تلقیح با *آزوسپیریلوم* را گزارش کردند.

زهیر و همکاران (2000) افزایش 8/5 درصدی ارتفاع بوته ذرت تلقیح شده با *آزوسپیریلوم* را مشاهده کردند.

هاداس و همکاران (1987) افزایش طول ساقه گوجه‌فرنگی‌های تلقیح شده را 90% نسبت به شاهد بیان کردند. ارتفاع بوته شاخصی از رشد رویشی محسوب می‌شود و با توجه به افزایش قابل ملاحظه این ویژگی بر اثر تلقیح بذر با *آزوسپیریلوم* مشخص می‌گردد که رشد رویشی گیاه گوجه‌فرنگی تحت تأثیر کاربرد این باکتری قرار گرفته است.

وزن ترشاخ و برگ

هم چنین وزن تر شاخ و برگ در اثر تلقیح بذر با باکتری *آزوسپیریلوم* نسبت به شاهد (عدم تلقیح) افزایش نشان داد و بیشترین میزان وزن تر برای گیاهان تلقیح شده با *A.irakense* کرج مشاهده شد.

کلودیا و همکاران (2000) افزایش وزن تر شاخ و برگ گوجه‌فرنگی در اثر کاربرد باکتری *آزوسپیریلوم* را مشاهده کردند.

وزن تر شاخ و برگ شاخصی از افزایش توانایی دستگاه فتوسنتزی است. بنابراین با توجه به افزایش وزن تر شاخ و برگ‌ها با کاربرد باکتری، افزایش رشد و نمو گیاه بر اثر استفاده از این باکتری قابل انتظار می‌باشد.

وزن خشک شاخ و برگ

تغییرات میانگین‌های وزن خشک شاخ و برگ نیز از روندی مشابه وزن تر برخوردار بوده به طوری بالاترین وزن خشک شاخ و برگ مربوط به گیاهان تلقیح شده با *A.irakense* کرج بود که این افزایش نسبت به شاهد 76% بوده است. بررسی فالیک و اکان (1988) مشخص ساخت که کاربرد مایه تلقیح *آزوسپیریلوم* موجب افزایش وزن خشک و شاخ و برگ ذرت شده است. افزایش وزن خشک شاخ و برگ بیانگر افزایش رشد رویشی است. بنابراین افزایش وزن خشک شاخ و برگ بر اثر کاربرد *آزوسپیریلوم* علاوه بر افزایش رشد رویشی می‌تواند بهبود عملکرد را به دنبال داشته باشد.

ویژگی‌های ریشه

طول ریشه

طول ریشه در گیاهان تلقیح شده و شاهد (عدم تلقیح) تفاوت معنی‌داری نشان نداد.

فالیک و همکاران (1989) افزایش طول ریشه ذرت با تلقیح بذر با باکتری *آزوسپیریلوم* را مشاهده کردند. گیل و همکاران (2000) در کلزاهای تلقیح شده با *آزوسپیریلوم* افزایش طول ریشه را گزارش کردند. هاداس و همکاران (1987) نتایج مشابهی در رابطه با گوجه‌فرنگی‌های تلقیح شده بدست آوردند.

وزن‌تر ریشه

وزن‌تر ریشه در تیمار تلقیح با باکتری *A.lipoferum* پاکدشت از بیشترین میزان برخوردار بوده به طوری که نسبت به شاهد 69 درصد افزایش نشان داد. کلودیا و همکاران (2000) نتایج مشابهی را در ارتباط با اثر *آزوسپیریلوم* بر گیاه گوجه‌فرنگی نشان دادند. افزایش وزن تر ریشه می‌تواند عامل افزایش توانایی گیاه برای جذب آب باشد، به نظر می‌رسد که کاربرد *آزوسپیریلوم* اثر قابل توجهی در توان جذب آب دارد.

حجم ریشه

افزایش میزان حجم ریشه در تیمارهای باکتری نسبت به شاهد قابل ملاحظه بوده به گونه‌ای که گیاهان تلقیح شده با *A.lipoferum* پاکدشت در مقایسه با شاهد افزایش 55 درصدی را نشان دادند.

حمیدی و همکاران (1388) افزایش حجم ریشه در ذرت‌های تلقیح شده با *آزوسپیریلوم* و *ازتوباکتر* را گزارش نمودند.

افزایش حجم ریشه بیانگر توسعه بیشتر ریشه است که افزایش توان جذب آب و عناصر غذایی بیشتر از حجم وسیع‌تری از خاک را امکان‌پذیر می‌سازد. به این ترتیب به نظر می‌رسد که با کاربرد *آزوسپیریلوم* در این آزمایش و افزایش حجم ریشه گیاهان، توان و کارایی جذب آب و عناصر غذایی در آنها بهتر شده در نتیجه رشد و نمو بهبود یافته است.

وزن خشک ریشه

این ویژگی ریشه نیز با تلقیح بذر با *آزوسپیریلوم* نسبت به شاهد افزایش نشان داد و تیمار تلقیح با *A.brasilense* هشتگرد دارای بیشترین تأثیر در افزایش وزن خشک ریشه بوده که نسبت به گیاهان شاهد 65 درصد بوده است.

بررسی‌های ریبائودو و همکاران (1998) و جاکاد و همکاران (1999) نیز افزایش وزن خشک ریشه ذرت با تلقیح بذر با باکتری *آزوسپیریلوم* را نشان دادند. نتایج پژوهش‌های وارمبرگ و فالیک و اکان (1988) نیز مشابه بود. افزایش وزن خشک ریشه نشان دهنده افزایش رشد ریشه بوده و افزایش رشد ریشه تأثیر به سزایی در جذب و تغذیه بهتر گیاه دارد. از این رو به نظر می‌رسد که با به کارگیری *آزوسپیریلوم* رشد ریشه گیاه گوجه-فرنگی افزایش داشته است که به تبع آن جذب آب و عناصر غذایی نیز بهتر شده است (جدول 5).

ضرایب همبستگی

بررسی ضرایب همبستگی ساده بین ویژگی‌های ظاهری بوته و ویژگی‌های ریشه مشخص ساخت که بین

وزن تر شاخ و برگ و وزن خشک شاخ برگ با وزن خشک ریشه، همچنین بین طول ریشه با وزن تر ریشه و حجم ریشه و نیز بین وزن تر و وزن خشک شاخ و برگ و حجم ریشه همبستگی مثبت وجود داشت (جدول 6).

جدول 6- ضرایب همبستگی ساده بین برخی صفات اندازه‌گیری شده در گوجه‌فرنگی برای آزمایش بررسی اثر سویه‌های مختلف باکتری *آزوسپیریلوم* در مکان‌های مختلف

صفات	طول ساقه	طول ریشه	وزن تر شاخ و برگ	وزن تر ریشه	حجم ریشه	وزن خشک شاخ و برگ	وزن خشک ریشه
طول ساقه	1/00						
طول ریشه	^{ns}0/03	1/00					
وزن تر شاخ و برگ	**0/84	^{ns}0/05	1/00				
وزن تر ریشه	^{ns}0/20	**0/40	^{ns}0/26	1/00			
حجم ریشه	^{ns}0/24	**0/37	**0/41	**0/59	1/00		
وزن خشک شاخ و برگ	**0/82	^{ns}0/08	**0/76	**0/38	**0/41	1/00	
وزن خشک ریشه	*0/34	^{ns}0/04	*0/31	**0/47	^{ns}0/17	**0/49	1/00

**، * و ^{ns} به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال 1٪، 5٪ و غیر معنی‌دار

به طور کلی با توجه به همبستگی ویژگی‌های ریشه با ویژگی‌های ظاهری بوته می‌توان چنین نتیجه‌گیری نمود که آزوسپیریلوم‌های مورد بررسی در این پژوهش احتمالاً با ساز و کار تولید هورمون‌های گیاهی تحریک کننده رشد سبب افزایش رشد و نمو و تجمع ماده خشک بخش هوایی بوته شده و با افزایش رشد و نمو و توسعه ریشه در اثر ترشح مواد تحریک کننده رشد بوسیله این باکتری‌ها، جذب آب و عناصر غذایی افزایش یافته و در نتیجه موجب افزایش رشد گوجه‌فرنگی‌های مورد مطالعه گردیده‌اند.

جذب عناصر در گیاه گوجه‌فرنگی

تجزیه وتحلیل واریانس داده‌های حاصل از جذب عناصر موجود در اندام هوایی گیاه مشخص ساخت جذب 5 عنصر Zn ,Mn ,Fe ,P ,N تحت تأثیر مایه تلقیح قرار گرفته‌اند و میزان عناصر موجود در اندام هوایی گوجه‌فرنگی در اثر تلقیح با *آزوسپیریلوم* افزایش یافته است.

نیتروژن

بررسی میانگین جذب نیتروژن مشخص ساخت که در اثر تلقیح بذر گیاه با *آزوسپیریلوم* درصد نیتروژن نسبت به گیاه شاهد افزایش یافته و بیشترین میزان نیتروژن در گیاهان تلقیح شده با *A.brasilense* پاکدشت (5/12%) مشاهده شد. که این افزایش از 22% تا 71% بوده است.

لین و همکاران (1983) افزایش جذب نیتروژن در ذرت تلقیح شده با *A.brasilense* را گزارش کردند و هم چنین یاهالوم و همکاران (1984)، فالیک و اوکان (1988) افزایش جذب نیتروژن توسط ریشه ذرت و سورگوم را مشاهده نمودند.

نتایج پژوهشی اکبری و همکاران (1387) افزایش جذب یون‌های NO_3^- و NO_4^+ در اثر تلقیح با *آزوسپیریلوم* در ذرت شیرین بود. افزایش جذب نیتروژن به واسطه حضور آزوسپیریلوم، می‌تواند علت افزایش وزن خشک اندام هوایی باشد و باتوجه به افزایش قابل ملاحظه این عنصر در گیاه گوجه‌فرنگی مشخص می‌گردد که جذب نیتروژن تحت تأثیر کاربرد این باکتری قرار گرفته است. این افزایش احتمالاً به دلیل افزایش سطح جذب ریشه در اثر تلقیح با باکتری‌های *آزوسپیریلوم* می‌باشد (باشان و همکاران، 2004).

فسفر

نتایج این تحقیق نشان داد که فسفر در اثر تلقیح بذر با باکتری *آزوسپیریلوم* نسبت به شاهد افزایش نشان می‌دهد. بیشترین مقدار فسفر در گیاهان تلقیح شده با *A.brasilense* پاکدشت مشاهده شد که این افزایش نسبت به گیاهان شاهد 77% بوده است. لین و همکاران (1983) افزایش جذب فسفر در ذرت، یاهالوم و همکاران (1984) و فالیک واوکان (1988) افزایش میزان فسفر در ذرت و سورگوم در اثر تلقیح با *آزوسپیریلوم* را نتیجه گرفتند. مورتی و همکاران نیز (1988) افزایش جذب فسفر در نشاهای برنج تلقیح شده با *A.lipoferum* را گزارش نمودند. افزایش جذب فسفر بواسطه حضور

آزوسپیریلوم، می‌تواند علت افزایش وزن‌تر و خشک اندام هوایی در تیمار باکتریایی در مقایسه با شاهد باشد. تأثیر مثبت تلقیح با باکتری بر مقدار فسفر می‌تواند نتیجه توانایی آزوسپیریلوم‌های مورد بررسی در این آزمایش، بر انحلال فسفات غیر محلول و افزایش تحرک آن درگیاه باشد.

جدول 7- تجزیه واریانس ساده اثر سویه‌های مختلف باکتری *آزوسپیریلوم* در مکان‌های مختلف بر عناصر موجود در اندام هوایی گوجه‌فرنگی

منابع تغییرات S.O.V	درجه آزادی df	میانگین مربعات (MS)				
		نیتروژن	فسفر	آهن	منگنز	روی
باکتری	12	2/71 **	0/08 **	5838/79 **	958/76 **	7942/92 **
خطا(Error)	26	0/02	0/003	38/27	13/84	34/23
CV (%)	_	6/54	4/06	4/29	4/50	4/20

**، * و ns به ترتیب معنی‌داری در سطح احتمال 1٪، 5٪ و غیر معنی‌دار

جدول 8- مقایسه میانگین اثر اصلی سویه‌های مختلف باکتری *آزوسپیریلوم* در مکان‌های مختلف بر عناصر موجود در اندام هوایی گوجه‌فرنگی

	باکتری	نیتروژن (%)	فسفر (%)	آهن (mg/kg)	منگنز (mg/kg)	روی (mg/kg)
	شاهد	1/44 g	0/18 g	80/00 i	80/00 d	81/00 g
کرج	*A.Lipoferum*	2/17 de	0/38 cde	146/00 e	65/00 f	130/00 e
	A.brasilense	2/32 cd	0/30 ef	97/33 h	58/00 g	101/00 f
	A.irakense	3/67 b	0/21 fg	198/00 b	90/00 c	172/00 c
ساوجبلاغ	*A.Lipoferum*	1/85 f	0/20 fg	232/00 a	104/00 b	91/00 g
	A.brasilense	2/13 def	0/50 b	127/66 f	82/00 d	167/00 c
	A.irakense	2/20 de	0/34 de	156/33 de	72/00 e	83/00 g
پاکدشت	*A.Lipoferum*	2/51 c	0/43 bcd	181/33 c	64/00 fg	145/00 d
	A.brasilense	5/12 a	0/81 a	159/50 d	122/00 a	264/00 a
	A.irakense	2/07 cde	0/47 bc	115/33 g	72/00 e	191/00 b
هشتگرد	*A.Lipoferum*	1/91 ef	0/48 b	166/00 d	99/00 b	108/00 f
	A.brasilense	2/04 def	0/32 e	94/33 h	85/00 cd	127/00 e
	A.irakense	2/33 cd	0/43 bcd	119/66 fg	81/00 d	149/00 d

میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون برای هر یک از اثرات اصلی از لحاظ آماری بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال 5٪ تفاوت معنی‌دار ندارند.

آهن

تغییرات میانگین آهن، افزایش جذب این عنصر در گیاهان تلقیح شده را نسبت به گیاهان شاهد نشان داد بالاترین مقدار را تیمارهای *A.lipoferum* ساوجبلاغ داشتند و این افزایش نسبت به گیاهان شاهد (80 میلی‌گرم در کیلوگرم) 65% بود. (جدول 8)

اردکانی و همکاران (2011) به این نتیجه رسیدند که کاربردآزوسپیریلوم، جذب آهن در گندم‌های تلقیح شده را افزایش داد. کیم و همکاران (2010) افزایش میزان آهن در فلفل قرمز، برنج، گوجه‌فرنگی در اثر کاربرد مایه تلقیح *آزوسپیریلوم* برازیلنس را نتیجه‌گیری نمودند.

محققین نشان دادند آزوسپیریلوم‌ها توانایی تولید ترکیبی به نام سید روفور را دارند. سید روفورها کلات-هایی با ترکیبات آلی با وزن ملکولی پایین با میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای کمپلکس شدن با برخی کاتیون ها از جمله آهن هستند. گیاهان می‌توانند از سیدروفورهای تولید شده توسط باکتری‌ها به عنوان عاملی برای تأمین آهن مورد نیاز خود استفاده کنند. (احمد و همکاران، 2006)

منگنز

مقایسه میانگین جذب منگنز حاکی از آن است که بیشترین غلظت منگنز در گیاهان تلقیح شده با *A.brasilense* پاکدشت (122 mg/kg) قرار دارد که

این افزایش نسبت به گیاهان شاهد 34% بوده است.کیم و همکاران (2010) افزایش جذب منگنز در گوجه فرنگی‌های تلقیح شده با *A.brasilense* را نتیجه‌گیری کردند. در این جا نیز برتری تیمارهای باکتریایی در مقایسه با تیمارهای مشابه شاهد حاکی از افزایش کارآیی جذب منگنز در گیاهان تلقیح شده با *آزوسپیریلوم* است (جدول 8).

روی

مقایسه میانگین میزان روی در گیاهان شاهد و گیاهان تلقیح شده نیز نشان داد که گیاهان شاهد پایین ترین مقدار روی (81 mg/kg) را داشته‌اند و گیاهان تلقیح شده با *A.brasilense* پاکدشت بیشترین میزان جذب روی را نشان دادند که این افزایش نسبت به گیاهان شاهد (عدم تلقیح) 69% بود. (جدول 8)

به طور کلی با توجه به جدول مقایسه میانگین اثر باکتری بر صفات رشدی گوجه‌فرنگی، در مورد طول ساقه *A.irakense* ها بیشترین مقدار را از لحاظ آماری نشان دادند و در صفت وزن خشک ریشه *A.brasilense* ها برتر از بقیه سویه‌ها بودند. هم چنین در دو صفت وزن تر شاخ و برگ و وزن خشک شاخ و برگ *A.lipoferum* ها پایین‌ترین مقدار را از نظر آماری داشتند و نیز با در نظر گرفتن اثر متقابل مکان و باکتری بر صفات گوجه فرنگی، می‌توان اظهار نمود که در مورد ویژگی طول ساقه *A.irakense* کرج، وزن تر شاخ و برگ *A.brasilense* پاکدشت، وزن خشک شاخ و برگ *A.irakense* کرج بالاترین مقدار را دارا بودند.

تأثیر مایه تلقیح باکتری بر جذب عناصرتوسط گوجه‌فرنگی، در هر مکان جداگانه بررسی گردید. نتیجه آنکه مثلاً در کرج بیشترین درصد جذب نیتروژن در *A.irakense* و ساوجبلاغ در *A.irakense*، پاکدشت*A.brasilense* در، در هشتگرد *A.irakense* مشاهده گردید.

نتایج این آزمایش نشان داد که مایه تلقیح *آزوسپیریلوم* بر غلظت Zn, Mn, Fe, P, N تأثیر معنی‌دار داشته است و کابرد مایه تلقیح این باکتری، در بهبود وضعیت تغذیه‌ای گیاه گوجه‌فرنگی (جذب بهتر عناصر) و در نتیجه غنای محصول تولیدی و افزایش رشد مثبت ارزیابی گردید. این افزایش عمدتاً به دلیل تولید تنظیم کننده‌های رشد گیاه توسط باکتری و اثر آنها بر رشد ریشه بوده که جذب آب و مواد غذایی را از خاک بهبود می‌بخشد (اگامبردیوات و همکاران، 2003) بنظر می‌رسد که افزایش در میزان جذب عناصر غذایی توسط گیاه می‌تواند منجربه افزایش تجمع ماده خشک و مواد معدنی در ساقه‌ها و برگ‌های گیاه شود.

در مجموع، نتایج گلخانه‌ای این تحقیق نشان می‌دهد که خوشبختانه می‌توان ادعا نمود که باکتری‌های *آزوسپیریلوم* می‌توانند در سطوح بسیار گسترده، برای بسیاری از گیاهان ومخصوصاً، گوجه‌فرنگی سودمند باشند و می‌توان تلقیح این نوع باکتری را به عنوان کود بیولوژیک در تولید گوجه‌فرنگی توصیه نمود و بر اثرات مثبت آن اطمینان داشت.

فهرست منابع:

1. اکبری، غ.ع.، علیخانی، ح.ع.، ارزانش،م.ح.، واله دادی،1. 1387. بررسی توانایی تولید اکسین توسط باکتری‌های جدا سازی شده بومی جنس *آزوسپیریلوم* و ارزیابی اثرات محرک رشدی جدایه برتر بر گیاه ذرت شیرین. مجله پژوهش‌های زراعی ایران، جلد6، شماره ۲،۲۱۷-224.
2. حمیدی، آ.، قلاوند، ا.، دهقان شعار، م، و، ا. اصغرزاده. 1385. اثرات کاربرد باکتری‌های محرک رشد گیاه بر عملکرد ذرت علوفه‌ای. پژوهش وسازندگی در زراعت و باغبانی. شماره 70، ص 16-22.
3. علی احیایی،م. 1373.شرح روش‌های تجزیه شیمیایی خاک. نشریه فنی شماره 893، موسسه تحقیقات خاک وآب. تهران، ایران.
4. قلاوند، ا.، حمیدی، آ.، دهقان شعار، م.، ملکوتی، م.، ج.، اصغر زاده، ا. و چوکان، ر. 1382. کاربرد کودهای زیستی، راهبردی بوم شناختی برای مدیریت پایدار بوم نظام‌های زراعتی. مقالات کلیدی نهمین کنگره علوم زراعت و اصلاح نباتات. 5-7 شهریور ماه 1385، پردیس ابوریحان- دانشگاه تهران.
5. Ahmad, F.,Ahmad, I. and khan, M.S. 2006.Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiole plant growth promoting activities. Microbial Research 36:1-9.

6. Baldani, V.L.D. and Dobereiner, J. 1980.Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. Soil Biology and Biochemistry 12:433-439.
7. Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. and Dobereiner, J. 1986. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. Canadian Journal of Microbiology 29:924-929.
8. Bashan, Y., Holguin, G. and de-Bashan, L. E. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Canadian Journal of Microbiology 50(8): 521-577.
9. Bashan, Y. and Holguin G.1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). Canadian Journal of Microbiology 43: 103-121.
10. Beck, D.P., Materon, L.A. and Afandi, F.1993. Practical Rhizobium-Legume Technology Manual. Technical Manual.No.19.ICARDA.Syria.
11. Berge, A.C.P., Tarrand, K., Dobbereiner., Lindeque, D., Bashan, Y., levenonv, H. and Bloembeg, G.V. 2005. *Azospirillum.* 2:7-28.
12. Bremner, J.M. and Mulvaney, C.S.1982. Nitrogen-Total.p. 595-624.In: Page A.l. et al (eds.) Methods of soil analysis .Part2.2 nd ed.Agron.Monogr.9.ASA and SSSA ,Madison,WI.
13. Claudia, C., Martin,G. and Emanuel و M. 2000.Genome Structure of Genus *Azospirillum.* Journal of Bacteriology 182(14):4113-4116.
14. Egamberdiyevaa, D. and Hoflich, G. 2003.Influence of growth-promoting bacteria on the growth of wheat in different Solis and temperatures. Soil Biology and Biochemistry 35:973-978.
15. Fages, J. and Arsac, J.F. 1991. Sunflower inoculation with *Azospirillum* and other plant growth promoting rhizobacterria. Plant and Soil 137: 87-90.
16. Falik, E., Okon, Y., Epstin, E., Goldman, A. and Fischer, M.1989.Identification and quantification of Iaa and IBA in *Azospirillum brasilens* maize roots. Soil Biology and Biochemistry 21:147-153.
17. FAO.2000 Global Network on Integrated Soil Management for Sustainable) Use of Sall-affected Soils. Country Specifre Salinity Issuse-Iran.Rome, Italy: FAO.htt. http://www.fao.org)
18. Fulchieri, M.and Frioni, L.1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*zea mays L.*):effect on yield in a field experiment in central Argentina. Soil Biology and Biochemistry 26:921-923.
19. Gray, E.J. and Smith, D.L. 2004. Intracellular and Extracellular PGPR. Soil Biology and Biochemistry 5:1-18.
20. Hadas, R. and Okon .Y.1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings.Biology and Fertility of soil 5(3):241-247.
21. Jacoud, C. D., Favre, P. Wadoux, and bally R.1999.Initiation of root growth simulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. Canadian Journal of Microbiology 45:339-342.
22. Kader, M.A. Mian, M.H. and Hoque, M.S. 2002.Effects of azotobacter inoculants on the yield and nitrogen uptake by wheat.Online Journal of Biological Sciences 2(4):250-261.
23. Kim, K. Deka, P.and shagol, C.2010.Isolation and evaluation of inoculation effect of *Azospirillum.sp* on growth, colonization and nutrient uptake of crops under *green* house condition.
24. Leva nony, H. and Bashan, Y.1989.Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense Cd.* Canadian Journal of Botany 67:2213-2216.

25. Lin, W., Okon,Y. and Hardy, R.W.1983.Enhanced mineral uptake by Zea *mays* and *Sorghum bicolor* roots inoculated with *Azospirillum brasilense*. Applied and Environmental Microbiology 45:1775-1779.
26. Manafee, W.F. and Klopper, J.W.1994.Application of plant growth promoting
27. Motsara, M.R., Bhattacharyya, P. and Srivastava, B. 1995. Biofertilizer, Technology, marketing and Usage 118-123.
28. Murty, M.G.and Ladha, J.K.1987. Differential Colonization of *Azospirillum Lipoferum* on roots of two varieties of rice (Oryzea Sativa). Biology and Fertility of Soils 4:3-7.
29. Olsen, S. R. ,Cole, C.V., Watanabe, F.S. and Dean, L.A. 1954.Estimation of Available phosphorous in soils by extraction with sodium bicarbonate;U.S.Department of agriculture : Washington,D.C.,USDA Circ.939.
30. Pedrosa, .F.O. and Yates, M.G. 1984.Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of *Azospirillum brasilense* by nif A and ntrC (glnG) type genes. FEMS Microbiol Letters 55:95-101.
31. Ribaudo, C.M., Paccuss, A.N., Rondanini, D.P., Curu, J.A. and Fraschina, A.A. 1998 *Azospirillum*-maize association:effects on dry matter yield and nitre reductuse activity. Agricultura Tropica et Subripica 31:61-70.
32. Rodriquez-Caceres , E.1982. Improved medium for isolation of Azospirillum spp. App1ied Environmental Microbiology44 : 990-991.
33. Shanmvgavela, K.G. 1989. Tomato. Production technology of vegetable crop. IBH. Publishing, Co,Oxford 229-268.
34. Sharma, A. K. 2003. Biofertilizers for sustainable agriculture. Agrobios. India. 407.
35. Wien, H.C.1997.The physiology of vegetable crops.CAB.International.
36. Yahalom, E.K. and Okon, y.1984.Response of seraria italic to inoculation with *Azospirillum brasilense* as compared to azotobacter ehroccoum. Plant and Soil 82:77-85.
37. Zahir, A.Z., Abbas, S.A., Khalid, A. and Arshad, M.2000.Suobstrate dependence microbially derived plant hormones for improving growth of maize seed lings Pakistan Journal of Biological Science 3:289-291.
38. Zahir, A. Z., M. Arshad, M. and Frankeenbereger (Jr.)., W. F. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: Application and persepectives in agriculture. Advances in agronomy 81:97-168.