

بررسی اکولوژیکی ازتوباکتر در دو منطقه مرتعی آذربایجان و اثر تلقیح آن روی رشد و تغذیه معدنی گیاه گندم

رقیه حاجی‌بلند^۱، ناصر علی‌اصغرزاده^۲ و زهرا مهرفر^۳

چکیده

اطلاعات نسبتاً کاملی در مورد نقش ازتوباکتر کروکوکوم - یک تثبیت کننده آزاد ازت - در خاک‌های کشاورزی وجود دارد، با این حال آگاهی ما در مورد اهمیت اکولوژیک این باکتری‌ها در مناطق مرتعی به‌ویژه در ایران ناچیز است. این بررسی به منظور بررسی ارتباط بین عوامل اکولوژیک و عوامل مربوط به خاک با جمعیت باکتری‌ها انجام گرفته است. نمونه‌های خاک از دو منطقه مرتعی میشوداغ و خواجه که از نظر اکولوژیکی، نوع خاک و پوشش گیاهی از یکدیگر کاملاً متفاوت بودند، انتخاب شدند. نتایج به دست آمده نشان داد که جمعیت ازتوباکتر با مقدار کربن آلی و pH خاک به ترتیب هم‌بستگی معنی‌دار مثبت و منفی دارد. پوشش گیاهی نیز روی جمعیت باکتری‌ها به شدت موثر بوده و علاوه بر کاهش جمعیت در خاک‌های فاقد پوشش، ریزوسفر گیاهان تیره گندم بیشترین جمعیت و ریزوسفر گیاهان تیره نخود کمترین جمعیت ازتوباکترها را داشت. هم‌چنین اثر تلقیح باکتری‌های جدا شده از خاک‌های مورد مطالعه، روی رشد و تغذیه معدنی در گندم به عنوان گیاه مدل مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد که رشد اندام هوایی و ریشه به ترتیب از تیمار کود ازتی (+N) به سمت تیمار تلقیح با ازتوباکتر (+A) و تیمار توأم (+A+N) نسبت به شاهد (-A-N) افزایش یافت. تیمارهای سه‌گانه فوق هم‌چنین باعث افزایش جذب و انتقال پتاسیم به اندام هوایی شدند، با این حال تأثیر تیمار +A بر روی این پارامترها بیش از تأثیر تیمارهای +A+N و +N بوده است. این موضوع در مورد جذب ازت نیز صادق بود. بالاتر بودن مقدار جذب و خصوصاً انتقال پتاسیم در تیمار تلقیح با ازتوباکتر به اثر احتمالی ترکیبات آلی تولید شده در ریشه که پتاسیم را با خود به اندام هوایی انتقال می‌دهند نسبت داده شد. نتایج نشان داد که ازتوباکترها نه تنها روی افزایش رشد و مقدار کلروفیل در گندم موثرند، بلکه به‌طور اختصاصی روی جذب و خصوصاً انتقال عناصر نیز تأثیر مثبتی دارند. به نظر می‌رسد این اثر اختصاصی نبوده و می‌تواند برای عناصر کم مصرف نیز از اهمیت برخوردار باشد.

واژه‌های کلیدی: جمعیت ازتوباکتر، تلقیح با ازتوباکتر، گندم، جذب و انتقال عناصر غذایی، خاک مرتعی

۱. استادیار فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

۲. استادیار خاک‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد علوم گیاهی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز

مقدمه

باکتری‌های ديازوتروف با زندگی آزاد توزیع گسترده‌ای در خاک‌ها دارند. این باکتری‌ها بی‌هوازی، بی‌هوازی اختیاری و یا هوازی می‌باشند. از مهم‌ترین جنس‌هایی که عمدتاً در مجاورت ریشه گونه‌های گرامینه یافت می‌شوند می‌توان به ازتوباکتر (*Azotobacter*)، آزوسپریلوم (*Azospirillum*)، کلبسیلا (*Klebsiella*)، انتروباکتر (*Enterobacter*) و پseudوموناس (*Pseudomonas*) اشاره کرد. از این میان، ازتوباکترها به دلیل فراوانی و وسعت انتشار بیش از سایر انواع تثبیت کننده‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند و در خاک‌های مناطق معتدله نیز بیشترین اهمیت را دارند. گفته می‌شود در خاک‌های زراعی با زهکشی خوب بیشترین مقدار تثبیت ازت به صورت آزاد توسط این باکتری‌ها انجام می‌گیرد (۱۳). ازتوباکترها در زیستگاه‌هایی مانند خاک، سطح برگ، آب‌های شیرین و در مناطق مختلف شامل حاره‌ای و قطبی رشد می‌کنند. فراوانی ازتوباکترها در خاک‌های مختلف متفاوت بوده و عمدتاً در خاک‌های قلیایی تا خنثی دیده می‌شوند و در خاک‌های فقیر و اسیدی کمیاب‌اند (۲۴). ازتوباکترها توانایی ساختن ویتامین‌های B_1 ، B_2 ، B_6 ، B_{12} ، پانتوتینیک اسید و نیکوتینیک اسید (۳۱) را دارا بوده و تولید این ویتامین‌ها تحت شرایط دی‌آزوتروفیک و تغذیه کافی کربن افزایش می‌یابد (۱۶). هم‌چنین ازتوباکترها قادر به ساختن اسیدهای آمینه مانند آرژنین، لیزین، تریپتوفان، هیستیدین، سیستئین، پالمتیک اسید (۱۶) و انواع عوامل رشد مانند اکسین، جیبرلین و سیتوکینین هستند (۱۷، ۲۸، ۳۰).

در خاک‌هایی که محدودیت منبع کربن وجود دارد، سهم ازتوباکترها در تثبیت ازت چندان قابل توجه نیست. با این حال با افزایش عرضه کربن و ایجاد نسبت بالای C/N در خاک سهم آنها در تثبیت ازت افزایش می‌یابد. نه تنها مانده‌های گیاهی باعث افزایش نسبت کربن آلی در خاک می‌باشند، ریشه گیاهان در حال رشد نیز عامل افزایش کربن آلی خاک است. گفته می‌شود نسبت قابل توجهی از کربن تثبیت شده در طی فتوسنتز در گیاهان عالی به شکل ترشحات ریشه و یا سلول‌های ریشه

در حال تخریب به ریزوسفر آزاد می‌شود (۲۰). به همین دلیل جمعیت میکروارگانیسم‌های خاک از جمله باکتری‌های ديازوتروف در ریزوسفر چندین بار بیشتر از کل خاک است (۳۹). به‌طوری‌که به‌عنوان مثال بین فراوانی ازتوباکترها و رشد ریشه در گیاه ذرت ارتباط مستقیمی وجود دارد (۳۷)، هم‌چنین تولید اکسین، جیبرلین و سیتوکینین توسط این باکتری‌ها در این شرایط دو برابر می‌شود (۱۷).

چندین آزمایش مزرعه‌ای برای بررسی اثر تلقیح با آزوسپریلوم و ازتوباکتر روی رشد و عملکرد گونه‌های زراعی حاره و معتدله انجام شده است (۲۲). پس از تلقیح با این باکتری‌ها افزایش در عملکرد دانه تا ۴۰٪ در گندم و جو گزارش شده است (۲۳). این‌که آیا این افزایش در عملکرد تنها به تثبیت ازت مربوط است و یا آثار هورمونی و سایر آثار روی رشد و نمو گیاه عامل این افزایش می‌باشد، مشخص نشده است (۲۳). تأثیر تلقیح ازتوباکتر به‌ویژه همراه با کود دامی روی عملکرد محصولاتی مانند ذرت (۳۰) و ارزن نیز مثبت بوده است (۴۷). تأثیر تلقیح ازتوباکتر کروکوکوم و آزوسپریلوم برازیلنز همراه با کود دامی، رشد، تجمع ماده خشک، تولید دانه و پروتئین را در سورگهوم افزایش داده است (۴۱).

هرچند جمعیت ازتوباکترها و شدت تثبیت ازت توسط آنها در خاک‌های زراعی تا کنون بررسی‌های زیادی را به‌خود اختصاص داده است (۷، ۲۱)، در اکوسیستم‌های طبیعی که کشت و زرع در آنها انجام نمی‌شود و خاک تنها با عوامل طبیعی با منشأ گیاهی یا جانوری غنی می‌گردد، در زمینه ازتوباکترها اطلاعات زیادی در دسترس نیست. از سوی دیگر هرچند در مورد افزایش جمعیت باکتری‌ها تحت تأثیر ترشحات ریشه گیاهان اطلاعاتی وجود دارد (۳۸)، ولی گزارش‌هایی نیز نشان داده است که بعضی از مواد آلی مانند ترکیبات فنلی و محلول در آب که از ریشه برخی از گونه‌ها ترشح و وارد خاک می‌شوند برای باکتری‌های مختلف ریزوسفر سمی بوده و مانع رشد و فعالیت آنها می‌شوند (۱۸، ۲۵).

تخلیص شده از یکی از نمونه‌های برداشت شده از منطقه میشوداغ، برای تلقیح به گیاه گندم استفاده شد.

نمونه برداری

در فصل بهار از خاک دو منطقه مرتعی میشوداغ و خواجه از عمق ۳ تا ۳۰ سانتی‌متر، در ریزوسفر گیاهان و یا منطقه فاقد پوشش به صورت تصادفی نمونه برداری انجام شد. البته به دلیل تصادفی بودن نمونه‌برداری و پایین بودن تنوع پوشش گیاهی خصوصاً در منطقه خواجه، تعداد نمونه‌های مربوط به ریزوسفر گونه‌های مختلف متفاوت بود. نمونه‌های خاک پس از انتقال به آزمایشگاه، بلافاصله از نظر وجود ازتوباکترها مورد آزمایش قرار گرفته و بقیه آن برای سایر سنجش‌ها در یخچال نگهداری شد.

جداسازی باکتری‌ها و تعیین جمعیت آنها

جداسازی باکتری به روش خمیر اشباع خاک انجام گرفت (۱۴). در این روش نیم گرم پیروات سدیم با ۵۰ گرم خاک مخلوط و با آب مقطر اشباع شد. گل اشباع به پتری دیش‌های استریل منتقل شده و در درون ظروف پتری استریل بزرگ‌تر که کف آنها با آب مقطر استریل به منظور جلوگیری از خشک شدن گل اشباع پوشیده شده بود، قرار گرفته و در پوش آن بسته شد. پس از دو هفته، از نقاط قهوه‌ای در سطح گل اشباع، که کلنی ناخالص باکتری بود با سیم کشت استریل برداشت شده و به محیط کشت جنسون ($\text{pH} = 7/1$) انتقال داده شد و با تکرار کشت، کلنی خالص تهیه گردید. برای مشاهده واکنش باکتری در رنگ‌آمیزی گرم از کلنی تازه و برای مشاهده کیست از کشت‌های دو هفته‌ای استفاده شد. برای نگهداری باکتری‌ها و سرانجام تلقیح آن به گیاه، کلنی‌های تازه رشد یافته با سیم کشت استریل بر روی محیط کشت جنسون (۴۰) به اضافه آگار که به صورت مورب در لوله آزمایش آماده شده بود، قرار داده شد و در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از نمایان شدن نخستین آثار رشد باکتری، نمونه‌ها در یخچال و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان تلقیح به گیاه نگهداری شد. برای تأیید تشخیص گونه باکتری پس از

به همین دلیل یکی از اهداف پژوهش حاضر بررسی جمعیت ازتوباکترها در مناطق مرتعی و ارتباط آن با عوامل اکولوژیکی، عوامل مربوط به خاک و نوع پوشش گیاهی بوده است. از سوی دیگر هرچند تأثیر تلقیح مصنوعی خاک با ازتوباکترها روی رشد و عملکرد گندم در شرایط مزرعه‌ای تاکنون بررسی‌هایی را به خود اختصاص داده است (۲۳)، ولی نقش این تلقیح در جذب و خصوصاً انتقال عناصر معدنی به اندام هوایی در شرایط آزمایشگاهی تاکنون مطالعه نشده است.

با توجه به این‌که عمدتاً در مطالعات مربوط به بررسی آثار تلقیح با ازتوباکتر روی رشد و عملکرد از گیاه گندم به عنوان یک مدل مناسب استفاده شده است (۲۷)، در پژوهش حاضر نیز به این منظور ازتوباکتر جدا شده از یکی از خاک‌های مناطق مرتعی مورد بررسی، به گیاه گندم تلقیح شده، رشد و تغذیه معدنی این گیاه مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

منطقه میشوداغ با ارتفاع ۳۱۲۵ متر از سطح دریا در ۵۹ کیلومتری غرب تبریز واقع شده است و بخصوص دامنه شمالی آن پوشش گیاهی بسیار غنی دارد. از آنجا که یکی از اهداف این بررسی مطالعه رابطه بین نوع پوشش گیاهی با جمعیت ازتوباکترها بوده است، این منطقه برای بررسی انتخاب شد. منطقه خواجه در ۳۰ کیلومتری شمال شرق تبریز واقع شده و ارتفاع آن از سطح دریا ۱۵۰۰ متر است. این منطقه در بخش وسیعی به صورت ایستگاه تحقیقاتی و قرق شده در آمده است. پوشش گیاهی آن ضعیف و خاک آن از نوع مارنی - گچی می‌باشد. به دلیل تفاوت قابل توجهی که از نظر پارامترهای خاک و نوع پوشش گیاهی بین دو منطقه وجود دارد، جهت بررسی انتخاب شدند.

نمونه‌های خاک از دو منطقه مورد نظر برداشت شده و جمعیت باکتری در نمونه‌ها تعیین شد و هم‌زمان پارامترهای مختلف خاک نیز مورد سنجش قرار گرفت. سپس باکتری‌های

خالص سازی و انتقال روی آگار مورب، رنگ آمیزی گرم، آزمون تحرک، تولید رنگدانه قهوه‌ای رنگ، آزمون کاتالاز و تولید سولفید هیدروژن انجام شد.

برای تعیین جمعیت باکتری از روش شمارش کلنی استفاده شد (۹). ده گرم خاک تازه برداشت شده از الک ۲ میلی متری عبور داده شده و به ارلن ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۹۵ میلی لیتر آب مقطر استریل برده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در هم‌زن قرار گرفت. سوسپانسیون خاک به مدت ۱۵ ثانیه به حالت سکون قرار گرفته و سپس از محلول روشن‌آور یک میلی لیتر برداشت و به لوله آزمایش حاوی ۹ میلی لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. با برداشت‌های متوالی و رساندن آن با آب مقطر استریل به حجم ۱۰ میلی لیتر، تا رقت 10^{-5} از آن تهیه شد. از هر رقت تهیه شده، در سه تکرار با پیت استریل نمونه‌هایی هر کدام به حجم ۰/۱ میلی لیتر برداشت و روی ظروف پتری حاوی محیط کشت Ashby (۴۰) منتقل و با میله شیشه‌ای L شکل به صورت یکنواخت روی سطح محیط توزیع شد. ظروف پتری به مدت یک هفته در انکوباتور و در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته و سپس کلنی‌ها شمارش شده و عدد به دست آمده در ۱۰ و نیز عکس رقت مربوطه ضرب شد و تعداد باکتری‌ها در هر گرم خاک محاسبه گردید (۹).

اندازه‌گیری پارامترهای خاک

اندازه‌گیری pH و EC در عصاره گل اشباع خاک و سنجش کربن آلی خاک به روش والکلی بلک انجام گرفت (۳۳). ازت خاک به روش کجلدال با استفاده از دستگاه میکروکجلدال مدل 2300 Kjeltac Analyzer اندازه‌گیری شد. مقدار پتاسیم و سدیم خاک در عصاره تهیه شده با استات آمونیوم نرمال در pH = ۷ با استفاده از فلیم فتومتر (مدل JEANWAY PEP7) سنجش گردید.

کشت گیاه و تلقیح آن با ازتوباکترها

در این بررسی از گندم رقم امید (*Triticum aestivum* L. var. Omid) استفاده شد. در هر گلدان

به اندازه ۱/۵ کیلوگرم خاک (گذرانده شده از الک ۴ میلی متری) و ۱٪ وزن خاک کود گاوی پوسیده، ریخته شد. برخی مشخصات خاک مورد استفاده (مربوط به ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان) در این آزمایش در جدول ۱ آمده است. مقدار آب به اندازه ۵۰٪ ظرفیت مزرعه به خاک‌ها اضافه شد و هر روز با توزین گلدان‌ها کنترل گردید. طرح کاملاً تصادفی در چهار تیمار شامل نیترات آمونیوم (+N)، تلقیح با ازتوباکتر (+A)، تلقیح با ازتوباکتر توأم با افزودن نیترات آمونیوم (+A+N) و شاهد (-A-N) هر کدام با چهار تکرار اعمال شد. گلدان‌ها در شرایط گل‌خانه‌ای و در دمای ۲۰ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد، طول دوره روشنی ۱۶ ساعت و شدت روشنی ۷۰۰۰ تا ۸۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. در هفته اول به همه تیمارها محلول عناصر غذایی کم مصرف و به تیمارهای کود ازتی ۳۵ میلی گرم ازت به شکل نیترات آمونیوم به ازای هر کیلوگرم خاک اضافه شد. البته مقدار کود ازتی مورد نیاز گیاه در این خاک با توجه به مقدار کربن آلی آن که به روش Biswas (۵) محاسبه گردید ۵۲ میلی گرم در کیلوگرم خاک بود.

برای تلقیح باکتری به گیاه، مقداری از کلنی خالص باکتری از لوله آزمایش حاوی محیط کشت جامد جنسون با سیم کشت استریل برداشت شده و به محیط کشت مایع جنسون مانیتول دار اضافه و در شیکر انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از افزایش جمعیت باکتری‌ها و شیری رنگ شدن محیط، با استفاده از اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جمعیت باکتری‌ها 10^9 در یک میلی لیتر تعیین شد. محلول‌های استاندارد بر اساس روش Mc Farland (۹) با حجم‌های مختلفی از اسید سولفوریک ۱٪ و باریم کلرید ۱٪ تهیه شد و خط استاندارد ترسیم گردید.

برای تلقیح گیاهان با باکتری از ورمیکولیت به عنوان حامل استفاده شد. به ۱۰۰ گرم ورمیکولیت پودر شده و استریل، ۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری اضافه شده و ۱ گرم از آن در داخل خاک قرار گرفت و سطح آن پوشانده شده و سپس روی آن بذور ضدعفونی شده قرار گرفت. بدین ترتیب جمعیت

جدول ۱. برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک به کار رفته در این پژوهش

رس	سیلت	ماسه	Mn	Fe	K	P	O.C	EC	pH	
			Mg/kg				%	ds/m		
%										
۱۰/۵	۱۵/۲	۷۴/۳	۳/۵۴	۳/۷۳	۲۰۰	۴/۴	۰/۳۹	۱/۸	۷/۲	خاک

جدول ۲. برخی مشخصات باکتری ازتوباکتر کروکوکوم که در این بررسی مورد آزمایش قرار گرفت

مورفولوژی	رنگ آمیزی گرم	تحرك	تشكيل كيسه	كاتالاز	توليد H_2S	توليد رنگدانه قهوه‌ای نا محلول در آب
ديپلوباسيل کوتاه	-	+	+	+	-	+

نشان می‌داد. کلنی‌های رشد یافته در محیط کشت جنسون، بعد از یک هفته رنگدانه‌های قهوه‌ای رنگی تولید کردند.

ارتباط بین ویژگی‌های شیمیایی خاک و جمعیت باکتری

برخی مشخصات شیمیایی خاک در دو منطقه میشوداغ و خواجه به ترتیب در جدول ۳ و ۴ آمده است. نتایج ارتباط بین پارامترهای خاک و نوع پوشش گیاهی با جمعیت ازتوباکتر کروکوکوم به شرح زیر است.

الف) ارتباط بین نوع پوشش گیاهی با جمعیت باکتری

هم‌بستگی معنی‌داری به ترتیب در سطح ۱٪ و ۵٪ بین نوع پوشش گیاهی و جمعیت باکتری در منطقه میشوداغ و خواجه وجود داشت و جمعیت باکتری تحت تأثیر نوع پوشش گیاهی قرار گرفت. جمعیت باکتری در ریزوسفر گیاهان تیره گندم به‌طور متوسط در منطقه میشو داغ ۱۰۰ و در منطقه خواجه ۳۴ (هزار در گرم خاک خشک) بود، در حالی‌که مثلاً در منطقه میشوداغ در ریزوسفر گیاهان تیره نعنای این مقدار به‌طور متوسط ۲۵ و در ریزوسفر گیاهان تیره نخود ۱۰ (هزار در گرم خاک خشک) بود.

ب) ارتباط بین pH و EC خاک با جمعیت باکتری

هر چند با افزایش pH خاک جمعیت باکتری در هر دو منطقه کاهش یافت ولی نتایج به‌دست آمده از جدول هم‌بستگی (جدول ۵) نشان می‌دهد که این هم‌بستگی بین pH خاک با جمعیت باکتری فقط در منطقه خواجه معنی‌دار بود. در هیچ‌کدام از دو منطقه هم‌بستگی معنی‌داری بین EC و جمعیت باکتری وجود نداشت (جدول ۵).

در مورد داده‌های منطقه خواجه، معادله رگرسیون چند متغیره به‌صورت زیر حاصل شد که در آن Y جمعیت باکتری

در خاک است. بنابراین عامل تعیین کننده جمعیت باکتری‌ها در این منطقه pH خاک است.

$$Y = 312.66 - 36.52 \text{ pH}$$

ج) ارتباط بین ازت و کربن آلی خاک با جمعیت باکتری

هم‌بستگی معنی‌داری بین ازت کل و جمعیت باکتری منطقه خواجه و میشوداغ وجود نداشت ولی هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری بین کربن آلی خاک و جمعیت باکتری در هر دو منطقه وجود داشت ($P < 0.01$)، به‌طوری‌که با افزایش کربن آلی خاک جمعیت باکتری‌ها در هر گرم خاک خشک افزایش یافت. برای داده‌های منطقه میشوداغ، نتایج محاسبات رگرسیون چند متغیره به روش گام به گام نشان داد که تنها متغیرهای کربن آلی و ازت کل خاک دارای ضریب تبیین معنی‌دار هستند. بدین ترتیب سایر متغیرها حذف شده و معادله به‌صورت زیر به‌دست آمد:

$$Y = -53.5 + 23.1 \text{ OC} - 192/9 \text{ TN} \quad R^2 = 0.0874 \quad (p < 0.05)$$

که در آن OC کربن آلی خاک و TN ازت کل خاک می‌باشد. با توجه به معادله فوق می‌توان گفت که مقدار کربن آلی رابطه مستقیم و معنی‌داری با جمعیت باکتری و مقدار ازت کل خاک رابطه معنی‌دار و منفی با آن دارد.

د) ارتباط بین قابلیت جذب سدیم و پتاسیم خاک با

جمعیت ازتوباکتر

هر چند ارتباط ضعیفی بین فراهمی سدیم و پتاسیم با جمعیت باکتری در هر دو منطقه دیده شد، بدین معنی که با افزایش فراهمی سدیم و پتاسیم تمایلی به سمت افزایش جمعیت باکتری‌ها در منطقه میشوداغ و کاهش در این پارامتر در منطقه خواجه آشکار بود، ولی این ارتباط از نظر آماری معنی‌دار نبوده است (جدول ۵).

جدول ۳. جمعیت ازتوباکتر کروکوکوم و ارتباط آن با برخی ویژگی‌های شیمیایی خاک و محل نمونه برداری در منطقه مرتعی میشوداغ

نوع پوشش گیاهی	pH	EC (μs/cm)	ازت کل %	کربن آلی %	فراهمی سدیم (mg/Kg)	فراهمی پتاسیم (mg/Kg)	جمعیت باکتری (هزار در گرم خاک خشک)
تیره گندمیان	۷/۵	۱۳۰	۰/۴۶	۱۲/۵۸	۸۰۷/۶	۱۳/۲	۱۵۰
تیره گندمیان	۷/۶	۸۰	۰/۲۶	۷/۲۶	۴۳۹/۵	۱۰/۹	۸۰
تیره گندمیان	۷/۸	۲۱۰	۰/۲۰	۶/۴۵	۷۸۰/۷	۱۳/۲	۷۰
تیره نعناع	۷/۸	۱۳۰	۰/۳۹	۵/۸۱	۱۰۷۶/۶	۱۳/۲	۲۰
تیره نعناع	۷/۳	۸۰	۰/۲۲	۵/۵۶	۷۵۳/۸	۱۰/۹	۳۰
تیره نخود	۷/۸	۱۰۰	۰/۴۷	۶/۸۷	۱۰۲۲/۸	۱۰/۹	۱۰
تیره نخود	۷/۸	۱۱۰	۰/۲۲	۵/۳۲	۴۴۴/۴	۱۰/۹	۱۰
تیره نخود	۷/۷	۴۰	۰/۰۹	۲/۸۹	۲۱۱/۲	۱۰/۹	۱۱
فاقد پوشش	۷/۶	۶۰	۰/۲۲	۵/۸۱	۲۹۶/۴	۱۰/۹	۳/۴

جدول ۴. جمعیت ازتوباکتر کروکوکوم و ارتباط آن با برخی ویژگی‌های شیمیایی خاک و محل نمونه برداری در منطقه مرتعی خواجه

نوع پوشش گیاهی	pH	EC (μs/cm)	ازت کل %	کربن آلی %	فراهمی سدیم (mg/Kg)	فراهمی پتاسیم (mg/Kg)	جمعیت باکتری (هزار در گرم خاک خشک)
تیره گندمیان	۷/۸	۶۶۰	۰/۲۳	۴/۸۳	۳۴۱/۳	۱۰/۹	۴۰
تیره گندمیان	۷/۵	۹۹۰	۰/۲۲	۴/۴۵	۳۹۹/۶	۲۹/۱	۳۰
تیره گندمیان	۷/۷	۳۸۰	۰/۱۷	۲/۹۹	۳۸۶/۱	۱۳/۲	۴۰
تیره گندمیان	۷/۶	۶۰۰	۰/۰۴	۲/۸۹	۱۵۷/۴	۸/۶	۴۰
تیره گندمیان	۸/۵	۲۰۰۰	۰/۰۳	۱/۴۵	۳۸۶/۱	۱۴۰/۳	۲۰
تیره نخود	۸/۱	۴۲۰	۰/۰۷	۱/۴۵	۳۹۰/۶	۲۲/۳	۲
فاقد پوشش	۸/۲	۱۰۷۰	۰/۰۵	۱/۹۴	۲۸۲/۹	۹۵/۰	۱/۵
فاقد پوشش	۸/۳	۹۵۰	۰/۰۵	۱/۹۴	۴۶۶/۸	۳۳/۶	۱/۳

جدول ۵. تجزیه آماری هم‌بستگی بین جمعیت ازتوباکتر کروکوکوم با پارامترهای خاک در دو منطقه مرتعی آذربایجان شرقی

	pH	EC	% ازت کل	% کربن آلی	پتاسیم	سدیم
منطقه میشوداغ	(-۰/۳۲۸)	(+۰/۴۲۲)	(+۰/۳۷۲)	(+۰/۸۶۵)	(+۰/۱۹۷)	(+۰/۵۷۴)
	ns	ns	ns	**	ns	ns
منطقه خواجه	(-۰/۷۳۲)	(-۰/۲۳۵)	(+۰/۵۸۷)	(+۰/۷۲۴)	(-۰/۳۷۸)	(-۰/۴۱۳)
	*	ns	ns	*	ns	ns

ns : غیر معنی‌دار

* : معنی‌دار در سطح ۵٪

** : معنی‌دار در سطح ۱٪

اثر تلقیح گیاه گندم با ازتوباکترهای جدا شده از خاک روی رشد و تغذیه معدنی گیاه

وزن خشک اندام هوایی گیاهان در تیمارهای $A+N$ ، A و N به طور معنی داری بیشتر از شاهد ($-A-N$) بود ولی بین تیمارها تفاوت معنی داری وجود نداشت (جدول ۶). تعداد برگ‌ها تحت تأثیر تیمارهای سه گانه فوق افزایش یافت ولی اثر آنها از یکدیگر متفاوت نبود. تیمارهای کود ازتی، تلقیح با باکتری و یا توأم، باعث افزایش معنی داری در غلظت کلروفیل برگ‌ها شد. اثر تیمار ازتوباکتر بیش از تیمار نیترا آمونیوم بود، هرچند با تیمار توأم تفاوت معنی داری نشان نداد (جدول ۶). هر سه تیمار کود ازتی، تلقیح و کود توأم با تلقیح، وزن خشک ریشه و طول آن را نسبت به شاهد افزایش دادند. تأثیر این تیمارها یکسان نبوده و اثر تیمار توأم تلقیح و کود بیش از اثر هر کدام به تنهایی بود (جدول ۶).

غلظت پتاسیم ریشه در اثر تیمارهای سه گانه $A+N$ ، A و N نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت (شکل ۱). تأثیر این سه تیمار یکسان نبوده و در تیمار تلقیح بیش از تیمار نیترا آمونیوم بوده است، هر چند با تیمار توأم تفاوت معنی داری نداشت. پارامترهای جذب و انتقال نیز تفاوت بین اثر تلقیح را با کود نشان داد. تأثیر تلقیح با ازتوباکتر روی جذب پتاسیم بیش از دو تیمار کود و توأم بود (شکل ۲).

غلظت ازت در ریشه‌ها در اثر تیمار تلقیح با ازتوباکتر بیش از تیمار کود ازتی نسبت به شاهد افزایش یافت (شکل ۳). تیمار $A+N$ بیشترین تأثیر معنی دار را در افزایش جذب ازت داشت. افزایش انتقال ازت نیز به اندام هوایی تحت تأثیر تلقیح با ازتوباکتر نسبت به اثر کود بیشتر بود، هر چند با تیمار توأم تفاوت معنی داری نشان نداد (شکل ۴).

بحث

بالا ترین جمعیت ازتوباکتر کروکوکوم مربوط به نمونه‌های برداشت شده از ریزوسفر گیاهان در مقایسه با نمونه‌های مربوط به مناطق فاقد پوشش بوده است. با توجه به شیمیوارگانوتروف بودن

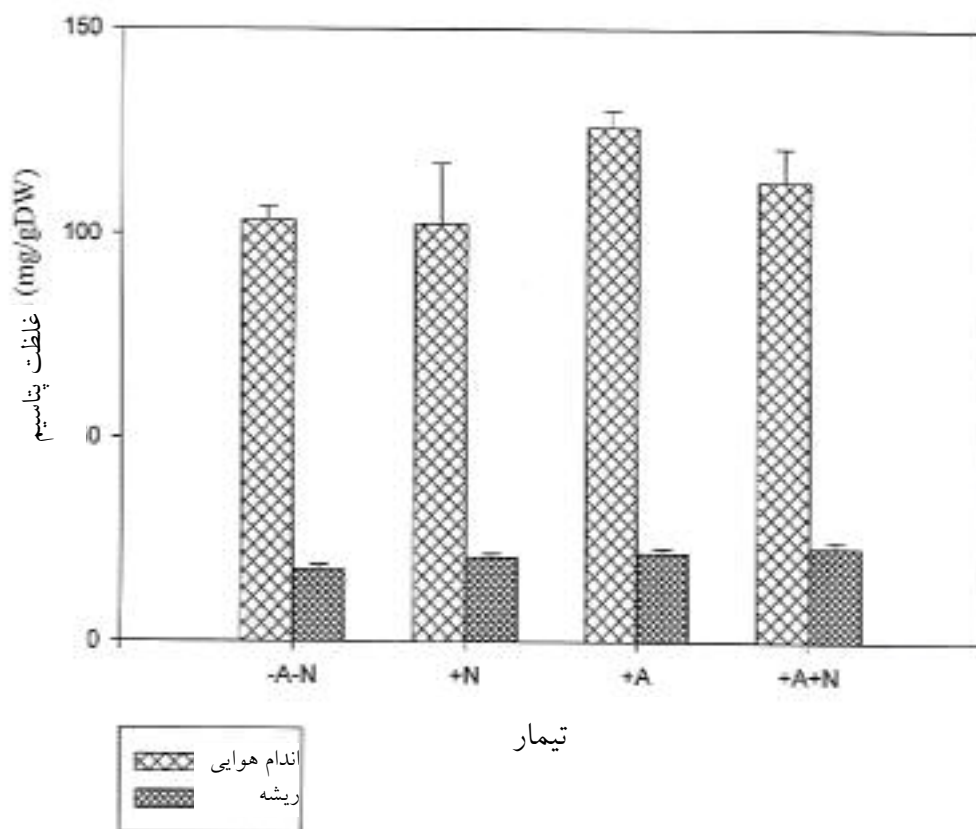
ازتوباکترها، بالابودن جمعیت در ریزوسفر گیاهان که منبع تولید و ترشح مواد آلی مختلف به خاک می‌باشند، قابل انتظار است (۲۷).

از سوی دیگر، جمعیت در هر دو منطقه مرتعی میشوداغ و خواجه با نوع پوشش گیاهی نیز هم‌بستگی مثبت معنی داری داشت. بیشترین جمعیت در ریزوسفر گیاهان تیره گندم و کمترین جمعیت در ریزوسفر گیاهان تیره نخود یافت شد. دلیل پایین بودن قابل توجه جمعیت ازتوباکتر در ریزوسفر گونه‌های متعلق به تیره نخود و نیز تیره نعنای در مقایسه با تیره گندمیان را می‌توان به کم بودن ترشحات کربنی ریشه نسبت داد. نشان داده شده است که در گیاه سورگهوم بیکلر، تفاوت‌های بین رقمی در تثبیت ازت در ریزوسفر، مربوط به تفاوت در شدت آزادسازی و ترشح ترکیبات کربن دار به ریزوسفر است (۲۶). علاوه بر کم بودن ترشحات کربنی، مواد فنلی موجود در ترشحات ریشه نیز می‌تواند عامل تفاوت در جمعیت باکتری‌ها در ریزوسفر این گیاهان باشد. مشاهده شده است که مواد فنلی دفع شده از ریشه گیاهان مانع تکثیر و افزایش جمعیت باکتری‌ها در محیط اطراف ریشه می‌شوند (۲۵). ترشح ترکیبات فنلی از ریشه‌های گیاهان تیره نخود پدیده‌ای شناخته شده می‌باشد (۱۲) که در افزایش جذب آهن نقش دارد (۲۷).

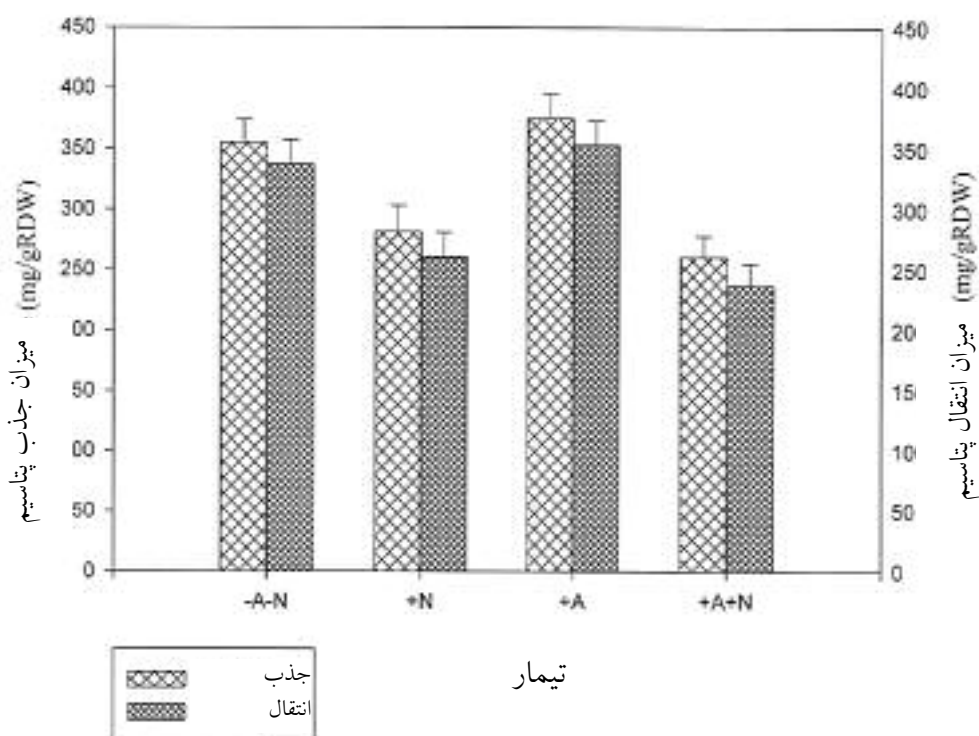
pH معیار مهمی برای پیش بینی توانایی خاک برای حمایت از واکنش‌های میکروبی است (۲۷). جمعیت باکتری در نمونه‌های برداشت شده از منطقه خواجه با pH نمونه‌ها هم‌بستگی منفی و معنی داری داشت در حالی که pH در منطقه میشوداغ با جمعیت باکتری هم‌بستگی نشان نداد. با توجه به این که تفاوت بین pH نمونه‌های خاک در منطقه میشوداغ جزئی بوده و در محدوده ۷/۳ تا ۷/۸ بوده است (جدول ۳)، علی‌رغم کاهش جمعیت در پاسخ به افزایش pH این کاهش معنی دار نبوده است. بر عکس با توجه به این که pH خاک در نمونه‌های خواجه بین ۷/۵ تا ۸/۵ بوده است (جدول ۴)، نوسانات این عامل، تأثیر خود را روی جمعیت باکتری این منطقه در حد معنی دار نشان داده است. مناسب‌ترین دامنه pH خاک برای رشد و تکثیر ازتوباکترها معادل ۸-۶/۵ گزارش شده و خارج از این

جدول ۶. اثر تیمارهای کود ازتی (+N)، تلقیح با ازتوباکتر (+A) و تلقیح توام با کود ازتی (+A+N) درمقایسه با شاهد (-A-N) روی پارامترهای رشد و مقدار کلروفیل در گیاه گندم که به مدت ۵۶ روز در خاک و در شرایط گلخانه‌ای رشد کرده است. تفاوت بین تیمارها در صورت داشتن حداقل یک حرف مشترک معنی‌دار نبوده است ($p < 0.05$).

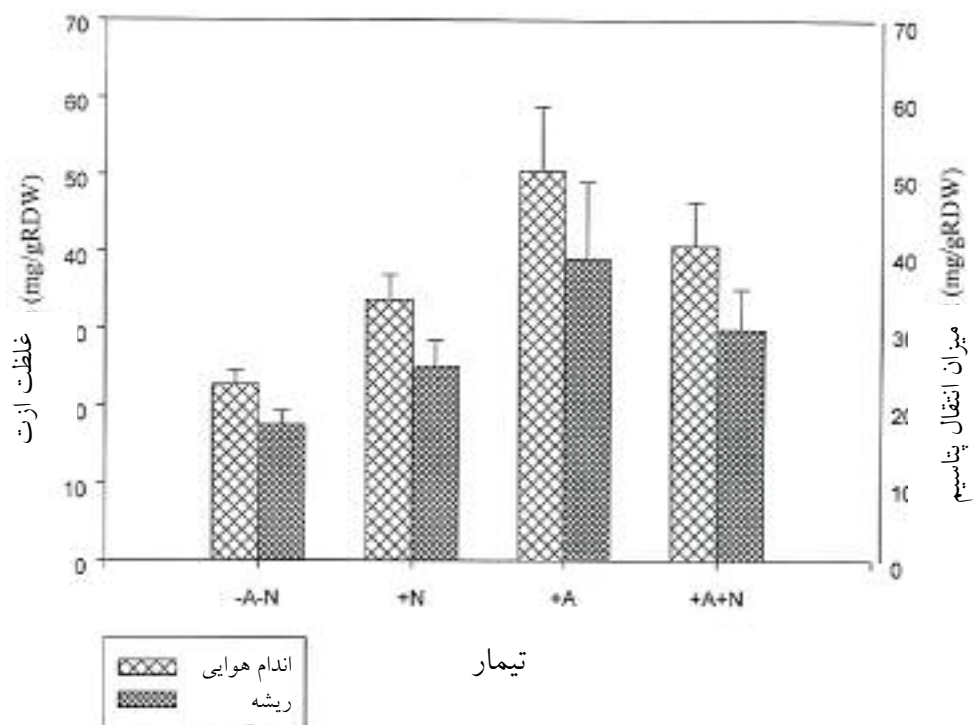
تیمار	اندام هوایی		ریشه	
	وزن خشک (میلی گرم / گیاه)	تعداد برگ (هر گیاه)	وزن خشک (میلی گرم / گیاه)	طول (سانتی متر / گیاه)
-A-N	۱۲۳/۵±۱۳/۳ ^b	۴/۲۵±۰/۳۱ ^b	۰/۳۹۹±۰/۰۴ ^c	۳۸/۰±۶/۶ ^c
+N	۱۵۶/۰±۶/۶ ^a	۵/۴۳±۰/۲۸ ^a	۰/۵۹۴±۰/۰۳ ^b	۳۵۴/۸±۲۳/۷ ^b
+A	۱۶۶/۳±۳/۳ ^a	۵/۴۳±۰/۲۸ ^a	۰/۶۸۶±۰/۰۴ ^a	۳۷۷/۴±۱۸/۲ ^b
+A+N	۱۶۹/۷±۱۳/۳ ^a	۵/۸۱±۰/۲۱ ^a	۰/۶۳۱±۰/۰۶ ^{ab}	۴۶۹/۳±۳۸/۰ ^a



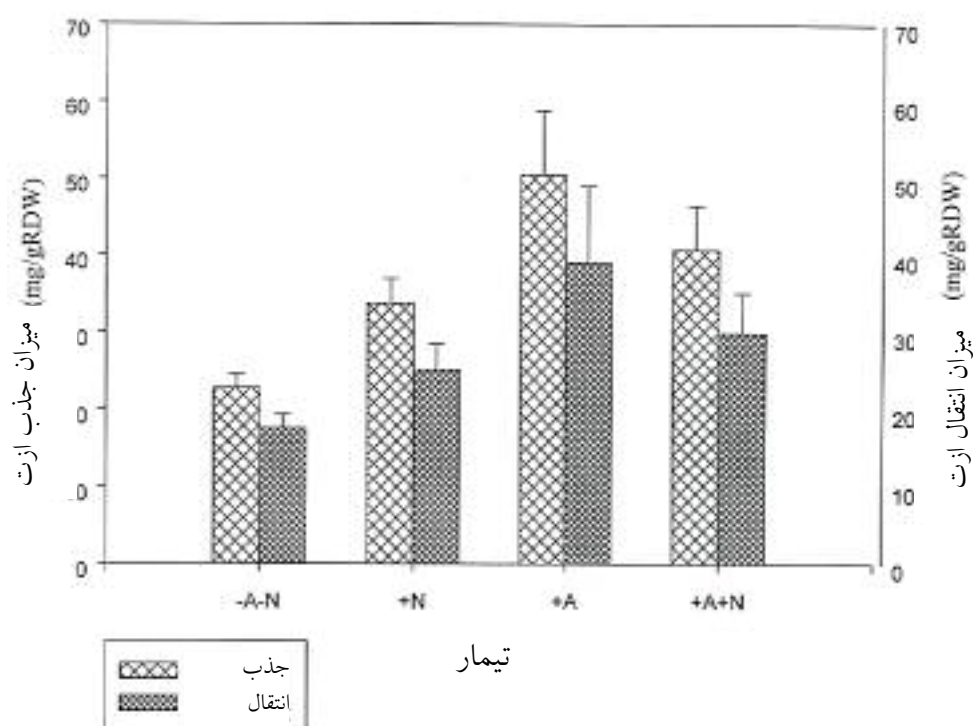
شکل ۱. اثر تیمارهای کود ازتی (+N)، تلقیح با ازتوباکتر (+A) و تلقیح توام با کود ازتی (+A+N) درمقایسه با شاهد (-A-N) روی غلظت پتاسیم در اندام هوایی و ریشه گیاه گندم که به مدت ۵۶ روز در خاک و در شرایط گلخانه‌ای رشد کرده است.



شکل ۲. اثر تیمارهای کود ازتی (+N)، تلقیح با ازتوباکتر (+A) و تلقیح توأم با کود ازتی (+A+N) درمقایسه با شاهد (-A-N) روی جذب و انتقال پتاسیم به اندام هوایی گیاه گندم که به مدت ۵۶ روز در خاک و در شرایط گلخانه‌ای رشد کرده است.



شکل ۳. اثر تیمارهای کود ازتی (+N)، تلقیح با ازتوباکتر (+A) و تلقیح توأم با کود ازتی (+A+N) درمقایسه با شاهد (-A-N) روی غلظت ازت در اندام هوایی و ریشه گیاه گندم که به مدت ۵۶ روز در خاک و در شرایط گلخانه‌ای رشد کرده است.



شکل ۴. اثر تیمارهای کود ازتی (+N)، تلقیح با ازتوباکتر (+A) و تلقیح توأم با کود ازتی (+A+N) در مقایسه با شاهد (-A-N) روی جذب و انتقال ازت به اندام هوایی گیاه گندم که به مدت ۵۶ روز در خاک و در شرایط گلخانه‌ای رشد کرده است.

جمعیت ازتوباکتر کروکوکوم در منطقه میشوداغ در صد بالای کربن آلی خاک در منطقه میشوداغ است.

رشد اندام هوایی از جمله وزن خشک و تعداد کل برگ در گیاه گندم در اثر تیمارهای +A+N، +A و +N به‌طور معنی‌داری بیشتر از -A-N بوده است. افزایش عرضه ازت در هر سه تیمار دلیل چنین افزایشی در رشد اندام هوایی است. هم‌چنین هر سه تیمار نسبت به گیاهان شاهد طول ریشه و وزن خشک آن را افزایش دادند. تحریک رشد ریشه در گیاه ذرت (۳۲) و تغییر مورفولوژی ریشه در گیاه گندم (۲۸) و ذرت تلقیح شده با ازتوباکتر و آزوسپریلوم گزارش شده است (۴).

بیشتر بودن تأثیر تیمار توأم (+A+N) روی رشد ریشه در مقایسه با اثر هر یک از دو تیمار به تنهایی می‌تواند مربوط به محدود کننده بودن عنصر ازت در تیمارهای اخیر باشد. با توجه به این‌که کود ازتی به کار رفته در این بررسی برای تیمار +N (۳۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) کمتر از نیاز واقعی گیاه بود، ازت در

دامنه جمعیت باکتری‌ها کاهش می‌یابد (۱). برخی محققین علت تأثیر pH را به قابلیت جذب فسفر که به مقدار زیاد برای رشد و تثبیت ازت لازم است، نسبت داده‌اند (۳۴). از آنجایی‌که با افزایش pH، فسفر محلول خاک به دلیل تشکیل فسفات کلسیم کاهش می‌یابد، جمعیت باکتری نیز در خاک تحت تأثیر قرار می‌گیرد. ارتباطی بین EC خاک و جمعیت ازتوباکتر مشاهده نشد (جدول ۵). این موضوع را می‌توان مانند pH به نوسانات غیر قابل توجه EC خاک در هر دو منطقه نسبت داد.

جمعیت ازتوباکتر کروکوکوم در هر دو منطقه مرتعی میشوداغ و خواجه با مقدار کربن آلی خاک هم‌بستگی مثبت و معنی‌داری نشان داد. از سوی دیگر، میانگین جمعیت باکتری در هر گرم خاک خشک در منطقه میشوداغ (۳۹۴۴۰) بیش از منطقه خواجه (۲۲۷۷۵) بود. با توجه به این‌که مقدار متوسط کربن آلی خاک در منطقه میشوداغ (۶/۳۶) نیز بالاتر از منطقه خواجه (۷/۶) بوده است، می‌توان نتیجه گرفت که یکی از دلایل بالا بودن

همه تیمارها در مقایسه با تیمار توأم عنصر محدود کننده رشد بوده و رشد بیشتر ریشه گیاهان در تیمار توأم، به دلیل نقش منبع دوم ازت در تأمین نیاز ازتی است.

علاوه بر رشد، غلظت کلروفیل نیز در تیمارهای +N، +A و +A+N نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان داد. این نتیجه قابل انتظار بود زیرا از علائم شایع کمبود ازت پیری برگ‌هاست که با کلروز آغاز می‌شود و غلظت کلروفیل بستگی به مقدار ازت در بافت دارد (۲۷). افزایش مقدار کلروفیل (جدول ۶) در این بررسی که به موازات افزایش غلظت ازت در برگ‌ها (شکل ۳) بوده است را نیز می‌توان به تأمین بهتر این عنصر نسبت داد.

غلظت پتاسیم اندام هوایی در تیمارهای +A و +A+N نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان داد، در حالی که در گیاهان تیمار شده با کود، غلظت پتاسیم مانند شاهد بوده است. از سوی دیگر کود ازتی و تیمار توأم نه تنها جذب پتاسیم را افزایش ندادند بلکه نسبت به شاهد جذب پتاسیم در این تیمارها کاهش یافت. از سوی دیگر، علی‌رغم داشتن بیشترین غلظت پتاسیم در اندام هوایی، در گیاهان تلقیح شده‌ای که کود ازت دریافت نکرده بودند، جذب پتاسیم تنها اندکی بیش از گیاهان شاهد بوده است. این موضوع مربوط به افزایش وزن خشک ریشه بود که در محاسبه پارامتر جذب به کار می‌رود. افزایش غلظت پتاسیم به دلیل گسترش قابل توجه سیستم ریشه‌ای است (جدول ۶). گسترش سیستم ریشه‌ای در گیاهانی که در خاک رشد کرده‌اند باعث افزایش سطح جذبی و بنابراین افزایش جذب عناصر می‌شود. گزارش شده است که ترشح پروتون از ریشه‌های گندم تلقیح شده با باکتری‌های دیازوتروف افزایش می‌یابد (۳)، این پروتون‌ها نقش مهمی در افزایش حلالیت عناصر در خاک داشته و می‌توانند عامل ثانوی تحریک جذب عناصر از جمله پتاسیم در بررسی حاضر قلمداد شوند. در مورد عنصر پتاسیم خصوصاً به دلیل اهمیت تشکیل منطقه تخلیه، ارتباط مستقیمی بین میزان جذب پتاسیم و چگالی ریشه‌ها در خاک (طول ریشه در واحد حجم خاک) وجود دارد (۱۵).

افزایش مقدار پتاسیم ریشه با تیمار ازتوباکتر در گیاه ارزن نیز گزارش شده است (۴۷).

انتقال پتاسیم به اندام هوایی در تیمار +A به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار +A+N و +N بود (شکل ۲). انتقال کمتر پتاسیم از ریشه به اندام هوایی در گیاهانی که نیاز ازتی آنها با کود ازتی و یا با تیمار توأم تأمین شده است، نسبت به گیاهان تلقیح شده با ازتوباکتر، احتمالاً به دلیل رقابت یون‌های NH_4^+ با K^+ در مرحله جذب و انتقال (بارگیری چوب) بوده است. اثر آنتاگونیستی NH_4^+ روی جذب کاتیون به وسیله ریشه (۶) و بارگیری چوب گزارش شده است (۴۴).

در تثبیت هم‌زیستی ازت، افزایش اسیدهای آمینه خاصی از جمله گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید در شیر چوب گزارش شده است (۲)، می‌توان فرض نمود که در گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های دیازوتروف نیز مقدار این اسیدهای آمینه افزایش می‌یابد، به دنبال این افزایش، انتقال این اسیدها نیز به اندام هوایی بیشتر می‌شود که همراه خود یون‌هایی مانند پتاسیم را حمل می‌نمایند. اساسا گروه‌های کربوکسیلی می‌توانند با کاتیون‌های فلزی تشکیل کمپلکس داده و علاوه بر انحلال آنها در خاک و افزایش جذب، باعث افزایش انتقال آنها به اندام هوایی نیز شوند (۲۷). افزایش انتقال پتاسیم (۴)، روی (۱۹) و آهن (۴۵) توسط اسیدهای آلی که از ریشه به اندام هوایی منتقل می‌شوند، گزارش شده است. نقش مثبت اسیدهای آلی و آمینه در نقل و انتقال یون‌های غیر غذایی مانند نیکل و کادمیوم نیز به اندام هوایی گزارش شده است (۱۰).

غلظت ازت ریشه و اندام هوایی در تیمار با +N، +A تا +A+N به طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان شاهد بود. بیشترین مقدار جذب ازت مربوط به گیاهان تلقیح شده بود که بیش از دو برابر نسبت به گیاهان شاهد بوده است (شکل ۴). بالاتر بودن مقدار جذب ازت در گیاهان تلقیح شده در مقایسه با تیمار توأم، مربوط به اثر بازدارندگی کود ازت روی تثبیت ازت است (۱۱). مشابه یون پتاسیم، ازتوباکتر در هر دو تیمار +A و +A+N در انتقال ازت به اندام هوایی نیز بیشترین تأثیر را

(۸، ۲۸، ۲۹). امروزه افزایش رشد گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های دیازوتروف را خصوصاً در مناطق معتدله (۲۸) علاوه بر تأمین ازت، عمدتاً به آثار هورمونی نسبت می‌دهند (۲۳). افزایش در عملکرد دانه به‌دنبال تلقیح برگ‌گی گیاه گندم با آزوسپریلوم مستقل از کود ازتی به‌کار رفته (۳۵) دلیل قاطعی بر این ادعاست. افزایش رشد ریشه در گیاهان تلقیح شده نیز عمدتاً به آثار هورمونی نسبت داده می‌شود (۲۸). در این بررسی نیز افزایش مقدار کلروفیل و انتقال بیشتر K^+ به اندام هوایی در گیاهان تلقیح شده با ازتوباکتر را به اثر احتمالی هورمونی مانند سیتوکینین نیز می‌توان نسبت داد که ضمن تحریک رشد ریشه، پس از انتقال به اندام هوایی عامل افزایش کلروفیل و نیز هدایت یون‌های ضروری به اندام هوایی می‌شود. نقش سیتوکینین در انتقال مواد غذایی به اندام هوایی و مراکز رشد موضوعی شناخته شده است (۴۲). بین سیتوکینین‌ها و تغذیه ازتی و پتاسیم در گیاه ارتباط تنگاتنگی وجود دارد، به‌طوری که کمبود ازت و پتاسیم در گیاه عامل کاهش سیتوکینین ریشه و کاهش صادرات آن به اندام هوایی است (۳۶).

داشت. احتمالاً ترکیبات ازتی که به‌دنبال آثار متقابل بین ریشه و ازتوباکتر ساخته می‌شوند، نسبت به شکل عادی انتقالی ازت (در گیاهان تلقیح نشده) با سرعت و کارایی بیشتری (مثلاً در مرحله بارگیری چوب) به اندام هوایی انتقال می‌یابند. اساساً ازت حاصل از تثبیت زیستی می‌تواند به اشکال مختلف به اندام هوایی انتقال یابد و یکی از روش‌هایی که به نفع اقتصاد کربن گیاه می‌باشد، استفاده از ترکیبات غنی از ازت با نسبت N/C بیش از ۰/۴ است. در گرامینه‌ها این ترکیبات شامل گلوتامین و آسپاراژین می‌باشد (۲۷).

در صورتی‌که اثر تلقیح با ازتوباکترها روی انتقال عناصر عمومیت داشته باشد، می‌توان انتظار داشت که این تلقیح عامل افزایش انتقال عناصر کم مصرف از ریشه به اندام هوایی نیز باشد. بدین ترتیب می‌توان ازتوباکترها را نه تنها به‌عنوان تأمین‌کننده ازت بلکه عناصر پرمصرف دیگر مانند پتاسیم و عناصر کم مصرف برای اندام هوایی قلمداد نمود. برای اثبات فرض اخیر نیاز به مطالعات بیشتری وجود دارد.

بسیاری از باکتری‌های دیازوتروف هورمون‌های گیاهی مانند اکسین‌ها، جیبرلین‌ها و سیتوکینین‌ها را تولید و ترشح می‌نمایند

منابع مورد استفاده

1. Alef, K. 1995. Enrichment, isolation and counting of soil microorganisms. PP. 124-191. In: K. Alef and P. Nannipieri (Eds.), Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press.
2. Atkins, C. A. 1987. Metabolism and translocation of fixed nitrogen in the nodulated legume. Plant Soil. 100: 157-169.
3. Bashan, Y. 1990. Short exposure to *Azospirillum brasilense* inoculation enhanced proton efflux of intact wheat roots. Can. J. Microbiol. 36: 419-425.
4. Bialczyk, J. and Z. Lechowski. 1995. Chemical composition of xylem sap of tomato grown on bicarbonate containing medium. J. Plant Nutr. 18: 2005-2021.
5. Biswas, T. D. and S. K. Mukherjef. 1992. Text Book of Soil Science. P. 191. Tata McGraw Hill Publishing Co. Limited, New Dehli.
6. Blair, G. J., M. H. Miller. 1970. Nitrate and ammonium as sources of nitrogen for corn and their influence on the intake of other ions. Agron. J. 62: 530-532.
7. Boddey, R. M., S. Urquiaga, V. Reis and J. Doebereiner. 1991. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. Plant Soil. 137: 111-117.
8. Cacciari, I., D. Lippi, T. Pietrosanti and W. Pietrosanti. 1989. Phytohormone-like substances produced by single and mixed diazotrophic cultures of *Azospirillum* and *Enterobacter*. Plant Soil. 115: 151-153.
9. Cappuccino, J. G. and N. Sherman. 1987. Microbiology: A Laboratory Manual. The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc.
10. Cataldo, D. A., K. M. Mc Fadden, T. M. Garland and R. E. Wildung. 1988. Organic constituents and complexation of Nickel (II), Iron (III), Cadmium(II) and Plutonium (IV) in soybean xylem exudates. Plant Physiol. 86: 734-739.
11. Cohen, E., Y. Okon, J. Kigel, I. Nur and Y. Henis. 1980. Increase in dry weight and total nitrogen content in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen fixing *Azospirillum* spp. Plant Physiol. 66: 746-749.

12. D'Arcy-Lameta, A. 1982. Etude des exudats racinaires de soja et de lentille. I. Cinetique d'exsudation composés phenoliques, des amino acides et des sucres, au cours de premiers jours de la vie des plantules. *Plant Soil* 68: 399-403.
13. Dart, P. J. and J. M. Day. 1975. Nitrogen fixation in the field other than by nodules. In: N. Walker (Ed.), *Soil Microbiology*. Butter Worth Sci. Publication, London.
14. Dobereiner, J. 1974. Nitrogen fixing bacteria in the rhizosphere. In: A. Quispel (Ed.), *The Biology of Nitrogen Fixation*. North Holland Publishing Co. Amsterdam.
15. Fussender A. and M. Kraus. 1986. Individuelle Wurzelkonkurrenz und Ausnutzung der immobilisierbaren Makronährstoffe im Wurzelraum von Maiz. *Flora* 178: 11-18.
16. Gonzalez-lopess, J., V. Salmeron and J. Moreno. 1983. Amino acid and vitamins produced by *Azotobacter vinelandii* in chemically – defined media and dialysed soil media. *Soil Biol. Biochem.* 6: 711-713.
17. Gonzalez-lopess, J., M. V. Martinez-Toledo, S. Reina and V. Salmeron. 1991. Root exudates of maize and production of auxins, gibberellins, cytokinins, amino acids and vitamins by *Azotobacter chroococcum* in chemically-defined media and dialysed-soil media. *Technol. and Environ. Chem.* 33: 69-78.
18. Graham, M. Y. and T. L. Graham. 1991. Rapid accumulation of anionic peroxidase and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* wall glucan. *Plant Physiol.* 97: 1445-1455.
19. Hajiboland, R. 2000. Zinc Efficiency in Rice (*Oryza sativa* L.) Plants. Ph.D. Thesis. University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.
20. Haller, Th. and H. Stolp. 1985. Quantitative estimation of root exudation of maize plants. *Plant Soil.* 86: 207-216.
21. Idris, M., F. P. Vinther and V. Jensen. 1981. Biological nitrogen fixation associated with roots of field-grown barley (*Hordeum vulgare* L.). *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 144: 385-394.
22. Jagnow, G. 1987. Inoculation of cereal crops and forage grasses with nitrogen-fixing rhizosphere bacteria: possible causes of success and failure with regard to yield response – a review. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 150: 361-368.
23. Jagnow, G., G. Hoefflich and K. H. Hoffmann. 1991. Inoculation of non-symbiotic rhizosphere bacteria: possibilities of increasing and stabilizing yields. *Angew. Botanik.* 65: 97-126.
24. Kanungo, P. K., B. Ramakrishnan and V. Rajaramamohan Rao. 1997. Placement effect of organic sources on nitrogenase activity and nitrogen-fixing bacteria in flooded rice soils. *Biol. Fertil. Soil.* 25: 103-108.
25. Kiraly, Z. 1964. Effect of nitrogen fertilization on phenol metabolism and stem rust susceptibility of wheat. *Phytopathol. Z.* 51: 252-261.
26. Krotzky, A., R. Berggold and D. Werner. 1986. Analysis of factors limiting associative N₂-fixation (C₂H₂ reduction) with two cultivars of *Sorghum nutans*. *Soil Biol. Biochem.* 18: 201-207.
27. Marschner, H. 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. 2nd ed., Academic Press, London, U.K.
28. Martin, P. A. Glatzle, W. Kolb, H. Omay and W. Schmidt. 1989. N₂-fixing bacteria in the rhizosphere: Quantification and hormonal effects on root development. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 152: 237-245.
29. Martinez-Toledo, M.W., J. Moreno and J. Gonzalez-Lopez. 1988. Root exudates of *Zea mays* and production of auxins, gibberellins and cytokinins by *A. chroococcum*. *Plant Soil.* 110: 149-152.
30. Martinez-Toledo, M. V., J. Gonzalez-Lopez, T. De La Rubia and J. Moreno. 1988. Effect of inoculation with *A. chroococcum* on nitrogenase activity of *Zea mays* roots grown in agricultural soil under aseptic and non-sterile conditions. *Biol. Fertil. Soil* 6: 170-173.
31. Martinez-Toledo, M. V., B. Rofelas, V. Salmeron, C. Pozo and J. Gonzalez-Lopez. 1996. Production of pantothenic acid and thiamine by *Azotobacter vinelandii* in a chemically defined medium and a dialyzed soil medium. *Biol. Fertil. Soil* 22: 131-135.
32. Nieto, K. F. and W.T. Frankenberger. 1991. Influence of adenine, isopentyl alcohol and *Azotobacter chroococcum* on the vegetative growth of *Zea mays*. *Plant Soil* 135: 213-221.
33. Page, A.L. 1982. Methods of Soil Analysis. Part 2, Chemical Microbiology Properties. 2nd ed., Agronomy Number 9 Published, Soil of American. ASA, Soil Sci. Soc. America Pub., U.S.A.
34. Rosin, M. B. 1981. Microbe survive in the soil assayed by the thread method. *Mikro. Biologiya* 33: 1074-1077.
35. Rynders, L. and K. Vlassak. 1982. Use of *Azospirillum brasilense* as biofertilizer in intensive wheat cropping. *Plant Soil* 66: 217-223.
36. Sattelmacher, B. and H. Marschner. 1978. Nitrogen nutrition and cytokinin activity in *Solanum tuberosum*. *Physiol. Plant.* 44: 65-68.
37. Schoenwitz, R. and H. Ziegler. 1986. Influence of rhizosphere bacteria on morphological characteristics of maize seedlings (*Zea mays* L.). *Z. Pflanzenernähr. Bodenk.* 149: 614-622.
38. Schoenwitz, R. and H. Ziegler. 1986. Quantitative and qualitative aspects of a developing rhizosphere microflora and hydroponically grown maize seedlings. *Z. Pflanzenernähr. Bodenk* 149: 623-634.

39. Schoenwitz, R. and H. Ziegler. 1989. Interaction of maize roots and rhizosphere microorganisms. Z. Pflanzenernaehr. Bodenk 152: 217-222.
40. Subba Rao, N. S. 1981. Biofertilizer in Agriculture. 2nd ed., oxford & IBH Publishing Co., New Dehli.
41. Subba Rao, N. S. 1989. Soil Microorganisms and Plant Growth. Oxford & IBH Publishing Co, New Delhi.
42. Taiz, L. and E. Zeiger. 1998. Plant Physiology. 2nd ed., Sinaur Publisher, U.S.A.
43. Tennant, D. 1975. A test of modified line intersect method of estimating root length. J. Ecol. 63: 995-1001.
44. Theodore, K. R. and T. Norman. 1995. Carbon, nitrogen and nutrient interaction in *Beta vulgaris* as influenced by nitrogen source. Plant Physiol. 107: 575-584.
45. Tiffin, L. O. 1966. Iron translocation II. Citrate/iron ratios in plant stem exudates. Plant Physiol. 41: 515-518.
46. Weather-Brun, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. Anal. Chem. 39: 971-974.
47. Yahlom, E., Y. Kapulnik and Y. Okon. 1984. Response of *Setaria italica* to inoculation with *Azospirillum brasilense* as compared to *A. chroococcum*. Plant Soil 82: 77-85.