

تأثیر باکتری آزوسپیریلوم بر برخی شاخص‌های رشد و عملکرد سه رقم گندم

ریحانه عمواقایی^۱، اکبر مستأجران^۲ و گیتی امتیازی^۱

چکیده

آزوسپیریلوم برازیلینس یکی از میکروارگانیسم‌های تثبیت‌کننده نیتروژن مولکولی است که در هم‌یاری با ریشه غلات و گرامینه‌های دیگر، رشد و نمو آنها را تقویت می‌کند. در این پژوهش دانه‌های گندم از سه رقم قدس، امید و روشن، با دو سویه از باکتری آزوسپیریلوم برازیلینس (Do1 و Sp7) تلقیح شدند.

آلوده‌سازی، میزان محصول و رشد و نمو ارقام گندم را افزایش داد، ولی این پاسخ کاملاً وابسته به نوع سوش باکتری و رقم زراعی بود. بیشترین عملکرد، وزن هزار دانه، شمار دانه در سنبله و وزن خشک ریشه و ساقه در تلقیح با سویه Sp7 در رقم روشن به دست آمد. این در حالی است که سویه Do1 بهترین اثر بر این شاخص‌های رشد را در رقم قدس ایجاد کرده است. پاسخ رقم امید در همه حال کمتر از دو رقم زراعی دیگر بود. بنابراین، انتخاب سوش‌های سازگار و متناسب با هر رقم زراعی برای تحریک افزایش عملکرد و تقویت رشد و نمو ارقام گندم ضروری است. بررسی اثر سوش‌ها بر محتوای نیتروژن دانه نیز نتایج مشابهی داشت. مشاهده فعالیت نیتروژنازی سوش‌های آزوسپیریلوم در آزمایش‌های *In vitro* و افزایش معنی‌دار محتوای نیتروژن در برخی از ارقام آغشته به باکتری، این فرضیه را که "تثبیت زیستی نیتروژن به وسیله آزوسپیریلوم ممکن است در مورد آثار سودمند مشاهده شده در شاخص‌های رشد گیاه پاسخ‌گو باشد" تأیید کرد. در مقایسه فعالیت نیتروژنازی در دو سویه، میزان احیای استیلنی سویه Do1، ۱/۵ برابر سویه Sp7 بود. هم‌چنین، اثر سویه Do1 بر شاخص‌های رشد، عملکرد و محتوای نیتروژن دانه نیز چشم‌گیرتر از سویه Sp7 بود. از آن جا که سویه Do1 یک سویه بومی، ولی سویه Sp7 یک سوش ایزوله از برزیل است، می‌توان نتیجه گرفت که ایزوله‌های محلی باکتری باید نسبت به سویه‌های بیگانه و غیر بومی ترجیح داده شوند، چون سازگاری بیشتری نسبت به گیاهان محیط و شرایط خاک آن منطقه نشان می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: آزوسپیریلوم، گندم، عملکرد، شاخص‌های رشد، هم‌یاری، تثبیت نیتروژن

۱. به ترتیب دانشجوی سابق دکتری و دانشیار میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۲. دانشیار آبیاری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

مقدمه

پاسخ‌های گیاهان به آلودگی با آزوسپیریوم، بیشتر به صورت افزایش وزن خشک گیاه، ازدیاد میزان نیتروژن دانه، فزونی پنجه‌ها و گل‌آذین‌های بارور و شمار سنبله‌ها، افزایش شمار دانه‌های هر سنبله و وزن هزار دانه، ازدیاد ارتفاع گیاه و طول برگ، و تسریع در مراحل جوانه‌زنی و گل‌دهی گزارش شده است (۱، ۲، ۵، ۷، ۹، ۱۰، ۱۵، ۱۶ و ۱۷).

جزئیات مکانیسم عمل آزوسپیریوم برای تقویت رشد گیاهان هنوز کاملاً شناخته نشده و مورد بحث است. ولی نتایج بیشتر پژوهش‌ها گویای آن است که آزوسپیریوم با توان تثبیت زیستی نیتروژن، گسترش سطح ریشه، کمک به جذب بهینه آب و عناصر غذایی و تولید هورمون‌های رشد و برخی ویتامین‌ها، رشد کیفی و کمی غلاتی چون گندم و ذرت را تقویت می‌کند، که نتیجه آن به صورت افزایش عملکرد نمایان می‌گردد (۳، ۶، ۹، ۱۳، ۲۰، ۲۲، ۲۴ و ۲۵).

به دلیل فعالیت‌های مفید آزوسپیریوم و نتایج مثبتی که از تلقیح آن به گیاهان مختلف خانواده گندمیان در کشورهای مختلف جهان به دست آمده، بررسی تأثیر این باکتری بر ارقام گندم ایران ضرورت دارد. از این رو، پژوهش حاضر با هدف بررسی آثار تلقیح سویه بومی این باکتری، در مقایسه با سویه‌های غیر بومی و استاندارد آن، بر برخی شاخص‌های رشد و عملکرد سه رقم گندم ایرانی به مرحله اجرا در آمده است. بدان امید که با ارائه این گونه پژوهش‌ها امکان بهره‌گیری از این باکتری به عنوان کود بیولوژیک، به منظور افزایش بازده محصولاتی مانند گندم، و نیز کاهش مصرف کودهای شیمیایی و حفظ محیط زیست برآورده گردد.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش سه رقم گندم متداول برای کشت در استان اصفهان، یعنی ارقام قدس، روشن و امید در آلودگی با سوش Sp7 (سوش استاندارد خریداری شده از کمپانی NCIMB) و سوش Do1 (سوش بومی جداسازی شده از ناحیه دولت‌آباد اصفهان) از نظر شاخص‌های رشد و تولید محصول ارزیابی شدند.

از زمان جنگ جهانی دوم، کاربرد کودهای شیمیایی انقلابی در تولید محصولات زراعی به وجود آورد. افزایش تولید کودهای تجاری با قیمت کم، مصرف روزافزون آنها را به ویژه در کشورهای در حال توسعه تشویق کرد. از آن زمان تا کنون کودهای شیمیایی به عنوان ابزاری برای رسیدن به حداکثر تولید در واحد سطح استفاده می‌شود، و کشاورزان به طور مداوم در تلاش‌اند تا با رفع کمبود عناصر غذایی خاک و استفاده از مدیریت صحیح تولید، محصول را به حد بالقوه ژنتیکی نزدیک کنند. ولی مشکلات اقتصادی ناشی از افزایش رو به رشد هزینه کودهای شیمیایی از یک سو، و مسائل زیست‌محیطی مرتبط با مصرف غیر اصولی این کودها از سوی دیگر، تفکر استفاده از شیوه‌های زیستی تثبیت نیتروژن برای تقویت رشد محصولات طی چون غلات را قوت بخشیده است (۸). در دو دهه گذشته طیف گسترده‌ای از باکتری‌های خاک در ریزوسفر شناخته شده‌اند، که می‌توانند رشد بسیاری از گونه‌های گیاهی مهم از نظر زراعی را بهبود بخشند. این گروه پراکنده از نظر سیستماتیک، ریزوباکترهای تحریک کننده رشد گیاهان خوانده می‌شوند (۴).

در میان این باکتری‌ها، آزوسپیریوم به دلیل پراکنش وسیع جغرافیایی، گستردگی دامنه گیاهان میزبان، و به ویژه توان برقراری ارتباط هم‌پاری با گیاهان مهم زراعی مانند گندم، برنج، ذرت، سورگوم و نیشکر توجه بیشتری را به خود جلب کرده و به عنوان یک پتانسیل در تهیه کودهای بیولوژیک شناخته شده است (۴، ۹، ۱۰، ۲۰ و ۲۱). اگرچه هم‌پاری این باکتری با ریشه غلات و برخی دیگر از گرامینه‌ها با پیدایش هیچ ساختار گرهک مانند همراه نیست، ولی پژوهش‌های بسیاری (۴، ۵ و ۲۱) نشان می‌دهد که حضور باکتری در ریزوسفر و اندوریزوسفر گیاهان میزبان آثار معنی‌داری را در بهبود شاخص‌های رشد گیاه، و در نتیجه ازدیاد محصول پدید می‌آورد، به گونه‌ای که رابطه متقابل غلات-آزوسپیریوم را از حیث آثار مفید باکتری بر رشد گیاه، قابل قیاس با هم‌زیستی گوم-ریزوبیوم می‌داند.

وسیله یک پمپ کوچک قرار گرفتند تا نفوذ باکتری به داخل شیارها و پوست دانه امکان‌پذیر گردد. دانه‌ها به مدت چهار ساعت در سوسپانسیون باکتری باقی مانده، سپس با کمک پنس و با دقت به گلدان‌های آماده شده منتقل شدند. برای تیمارهای شاهد غیر آلوده، کلیه عملیات فوق اجرا گردید، و تنها از بافر فسفات استریل به جای سوسپانسیون باکتری استفاده شد.

کاشت، داشت و برداشت ارقام گندم

در این آزمایش دانه‌های سه رقم گندم قدس، امید و روشن آلوده به دو سوش از باکتری آروسپیریوم برازیلنس (سویه بومی Do1 و سویه استاندارد Sp7) و نیز دانه‌های غیر آلوده آنها در یک آزمایش فاکتوریل در چارچوب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار کشت گردیدند. به این منظور، نخست ۲۷ گلدان به قطر و ارتفاع ۴۰ سانتی‌متر انتخاب و با خاک پر شده، با اتوکلاو در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج ساعت استریل شدند. خاک مورد نظر ترکیبی از خاک لومی، شن و کود آلی (مخلوط پیت و رس به نسبت ۷۰ و ۳۰ درصد) به نسبت ۳:۱:۱ بود. در تاریخ ۱۳۷۹/۱۱/۷، ۲۰ دانه سرمادهی شده از هر یک از تیمارها در هر گلدان در عمق دو سانتی‌متری کاشته شد و گلدان‌ها به فاصله ۰/۵ متر از یکدیگر مطابق طرح آماری در گلخانه پژوهشی دانشگاه اصفهان قرار گرفتند. پس از ۱۰ روز شمار گیاهان هر گلدان به ۱۵ رسانیده شد. دمای گلخانه در ۱/۵ ماه اولیه ۴-۱۰ درجه سانتی‌گراد، در طی دوره رشد ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد و با طول روز ۹-۱۳ ساعت بود.

آبیاری با آب استریل انجام شد، و میزان آب آبیاری و دیگر شرایط برای همه گلدان‌ها یکسان بود. فاصله بین آبیاری‌ها بر اساس مکش خاک و با کمک تانسیموتر تنظیم شد. در طول دوره رشد ویژگی‌های مورفولوژیک و زراعی تیمارها همچون ارتفاع گیاهان و وضعیت خوشه‌زنی ارقام گندم همواره بررسی می‌شد. پس از ۱۷ هفته گیاهان برداشت شدند. بوته‌های گندم در هر گلدان از محل یقه با دقت قطع شده و مجموعه بوته‌های هر گلدان با ذکر مشخصات در پاکت‌های ویژه قرار گرفتند.

تهیه غلظت 10^7 cfu/ml از سوش‌های باکتری برای آلوده‌سازی دانه‌های گندم

برای اعمال تیمار باکتری در بذور گندم، نخست باید غلظت 10^7 cfu/ml از باکتری آروسپیریوم، که بنا بر گزارش باشان و همکاران (۶) و دیگر بررسی‌های نگارندگان بهترین غلظت برای آلوده‌سازی دانه‌های گندم است، تهیه می‌شد. برای این منظور، باکتری‌ها از یک کلنی منفرد از روی محیط اختصاصی Nfb جامد (۱۹) برداشت شده و در یک محیط کشت مایع Nfb غنی شده با یک گرم در لیتر کلرور آمونیوم، در انکوباتور شیکردار (۳۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۸۰ rpm) رشد داده شدند. پس از ۴۸ ساعت، سلول‌های باکتری به وسیله سانتریفوژ ($5000 \times g$) به مدت ۲۰ دقیقه برداشت شدند. محلول رویی حذف و توده باکتری با بافر فسفات نمکی (شامل ۰/۲ گرم KH_2PO_4 ، ۱/۱۵ گرم K_2HPO_4 و ۷/۵ گرم NaCl در یک لیتر آب با $pH=7.2$) دو بار شست‌شو داده شد و مجدداً توده باکتری با سانتریفوژ برداشت شد. سپس با افزودن بافر فسفات به توده باکتری، جذب نوری محلول در طول موج ۵۴۰ nm برابر ۱/۰۵ تنظیم گردید. در این حال غلظت 10^9 cfu/ml است، که با رقیق کردن پی در پی این محیط و مطابقت با معیار مک‌فارلند، غلظت 10^7 cfu/ml دست‌یافتنی است. برای اطمینان، رقت‌هایی از غلظت‌های فوق تهیه شد و روی محیط کشت Nfb، که اختصاصی رشد باکتری است، کشت داده شد. شمارش کلنی و ضرب تعداد آن در ضریب رقت، غلظت‌های 10^7 cfu/ml و 10^9 را تأیید می‌کرد.

تلقیح بذر گندم

دانه‌های گندم سه رقم روشن، قدس و امید به طور جداگانه به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ استریل، و چندین بار با آب مقطر استریل شست‌شو داده شدند. سپس به مدت دو ساعت در آب مقطر استریل خیسانده شده، مطابق طرح آماری به محلول بافر فسفات حاوی 10^7 cfu/ml از باکتری منتقل، و به مدت یک ساعت در خلأ ایجاد شده به

در سنبله، وزن هزار دانه و وزن خشک ریشه و ساقه برای هر تیمار محاسبه و در جدول ۱ آورده شده است.

تجزیه واریانس (جدول ۲) و مقایسه میانگین‌های حاصل از اثر سوش (جدول ۳) نشان می‌دهد که سوش اثر مثبت و معنی‌داری بر عملکرد و اجزای آن داشته است، به طوری که بدون توجه به نوع سوش، میانگین عملکرد گیاهان آلوده (۱/۵۹ گرم در هر بوته) نسبت به میانگین عملکرد گیاهان غیر آلوده (۱/۲۹ گرم در بوته)، ۱۴/۳ درصد افزایش دارد. باشان و هولگوین (۴) گزارش کرده‌اند یک ارزیابی ۲۰ ساله آزمایش مزرعه‌ای و گلخانه‌ای در سراسر دنیا نشان می‌دهد که در ۶۰-۷۰ درصد آزمایش‌ها، اثر تلقیح گیاهان با آزوسپیریولوم مثبت و با ازدیاد محصول همراه بوده است. اگرچه برخی از گزارش‌ها گویای آن است که تلقیح با این باکتری ممکن است حتی تا ۵۰-۲۷۰ درصد میزان عملکرد گیاهان آلوده را در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش بدهد، ولی این تخمین اغراق‌آمیز بوده و در بیشتر موارد افزایش عملکرد گیاهان آلوده در محدوده ۵-۳۰ درصد قرار می‌گیرد (۴ و ۵). افزایش عملکرد حاصل از اثر سوش بر ارقام گندم مورد استفاده در این پژوهش نیز در همین دامنه قرار دارد. به هر حال، باید توجه کرد که حتی اگر میانگین افزایش محصول برابر با ۱۵-۲۰ درصد ولی به طور همیشگی و ثابت قابل حصول باشد، این یک پیشرفت مهم در جهت کاهش مصرف کودهای شیمیایی و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی در کشاورزی مدرن محسوب می‌گردد.

میانگین عملکرد ارقام مختلف در آلوده‌سازی با سوش Sp7 ۱۲/۲ درصد، و با سوش Do1 ۱۵/۸ درصد، در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش نشان می‌دهد (جدول ۳). پس اثر سوش Do1 بر افزایش عملکرد ارقام گندم بیشتر از سوش Sp7 بوده است. چنین روندی در مورد اجزای عملکرد نیز دیده می‌شود. بنابراین، به نظر می‌رسد سویه‌های بومی توانایی بیشتری در تحریک رشد و ازدیاد محصول ارقام زراعی محلی نشان می‌دهند. بهاتارای و هس (۷) نیز دریافتند که اثر سویه‌های بومی در ازدیاد محصول ارقام محلی گندم نپال به مراتب بهتر

هم‌چنین، ریشه‌های موجود در هر گلدان پس از الک‌شویی خاک گلدان‌ها جمع‌آوری شد. پاکت‌های حاوی گیاهان به آن ۷۰ درجه منتقل، و محتویات آنها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت (تا زمانی که وزن نمونه‌ها ثابت شود) خشک شد. سپس وزن خشک بخش هوایی، ریشه و دانه‌های حاصل از هر گلدان، و وزن هزار دانه و شمار دانه در هر سنبله به دقت محاسبه گردید. هم‌چنین، میزان نیتروژن دانه در هر یک از تیمارها به روش کدال اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری میزان فعالیت نیتروژناز سوش‌ها

میزان فعالیت نیتروژناز سوش‌های Do1 و Sp7 به صورت خالص ارزیابی گردید. بدین منظور، بطری‌های ۳۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰ میلی‌لیتر از محیط نیمه جامد Nfb تهیه، و پس از تلقیح با کشت خالص هر یک از سویه‌ها در انکوباتور با دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت درپوش‌های پنبه‌ای لوله‌ها با درپوش‌های لاستیکی ویژه و استریل عوض شد و دو میلی‌لیتر استیلن به هر لوله تزریق شد. لوله‌ها دوباره به انکوباتور منتقل گردیدند.

پس از دو ساعت، ۰/۵ میلی‌لیتر از هوای داخل هر بطری با سرنگ کشیده شد و به دستگاه GC تزریق گردید. در این دستگاه، ماده پرکننده ستون شیشه‌ای سیلیکاژل، و آشکارساز آن F.I.D بود. دمای ستون ۱۰۰، دمای محل تزریق ۱۱۰، و دمای آشکارساز ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد بود. سرعت گاز حامل (N₂) ۵۰ میلی‌لیتر در دقیقه، فشار هوا ۰/۴ اتمسفر، و فشار گاز هیدروژن ۰/۹ اتمسفر تنظیم شد، و نقطه فراز اتیلن ۳/۴ تا ۳/۶ دقیقه پس از تزریق آشکار گردید.

در پایان، با استفاده از منحنی استاندارد دستگاه و معادله رگرسیون مربوط به آنها، مقدار اتیلن تولید شده در هر یک از لوله‌ها محاسبه گردید.

نتایج و بحث

میانگین نتایج حاصل از سه تکرار برای عملکرد دانه، شمار دانه

جدول ۱. میانگین صفات زراعی برای ارقام مختلف گندم در حالت‌های آلوده و غیر آلوده به باکتری

رقم	سوش	عملکرد دانه (گرم در بوته)	وزن هزار دانه (گرم)	شمار دانه در سنبله	وزن خشک ریشه (گرم در بوته)	وزن خشک ساقه (گرم در بوته)	نسبت وزن خشک ریشه به ساقه	محتوای نیتروژن دانه (میلی گرم در گرم وزن خشک)
	شاهد	۱/۴۷ ^{cd}	۳۵/۵ ^c	۳۰ ^d	۱/۳۱ ^{cd}	۲/۴۲ ^e	۰/۵۴ ^d	۱۸/۴ ^d
قدس	.Sp7	۱/۶۵ ^{bc}	۳۷/۷ ^b	۳۲ ^{cd}	۱/۵۵ ^b	۲/۶۹ ^{de}	۰/۵۷ ^{bc}	۲۰/۷ ^c
	.Dol	۱/۹۲ ^a	۴۲/۹۶ ^a	۳۹ ^a	۱/۸۴ ^a	۲/۹۳ ^{bc}	۰/۶۲ ^a	۲۴/۸۴ ^b
	شاهد	۱/۵ ^{bc}	۳۷/۲۰ ^b	۳۱ ^d	۱/۴۰ ^{bc}	۲/۶۱ ^{de}	۰/۵۳ ^d	۲۱/۸۸ ^c
روشن	.Sp7	۱/۷۷ ^b	۴۱/۸۵ ^a	۳۸ ^a	۱/۷۸ ^a	۳/۰۱ ^{abc}	۰/۵۹ ^b	۲۶/۸ ^a
	.Dol	۱/۵۴ ^{bc}	۳۸/۹۲ ^b	۳۳ ^{bcd}	۱/۵۶ ^b	۲/۸۳ ^{cd}	۰/۵۵ ^{cd}	۲۳/۹۵ ^b
	شاهد	۱/۲۲ ^d	۳۴/۵۲ ^c	۳۳ ^{bcd}	۱/۲۳ ^d	۲/۹۱ ^{bc}	۰/۴۲ ^e	۱۹/۲۹ ^{cd}
امید	.Sp7	۱/۳۸ ^d	۳۵/۱۳ ^c	۳۴ ^{bc}	۱/۲۷ ^d	۳/۱۴ ^{ab}	۰/۴۰ ^e	۱۹/۴۸ ^{cd}
	.Dol	۱/۳۷ ^d	۳۵/۵۳ ^c	۳۵ ^b	۱/۳۲ ^{cd}	۳/۲۲ ^a	۰/۴۰ ^e	۲۰/۹۲ ^c

حروف یکسان نشانه عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰.۵٪ در آزمون دانکن می‌باشد. میانگین اعداد هر ستون نسبت به هم و مستقل از اعداد سایر ستون‌ها مقایسه شده‌اند.

جدول ۲. تجزیه واریانس داده‌ها برای صفات زراعی مورد مطالعه

فاکتور	عملکرد دانه	وزن هزار دانه	شمار دانه در سنبله	وزن خشک ریشه	وزن خشک ساقه	نسبت وزن خشک ریشه به ساقه	محتوای نیتروژن دانه
رقم	**	*	ns	*	*	*	*
سوش	**	**	**	**	*	*	**
سوش × رقم	**	**	*	**	**	**	*

*, **, ns: به ترتیب معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد و غیر معنی‌دار

جدول ۳. میانگین اثر سوش بر صفات زراعی مختلف

سوش باکتری	عملکرد (گرم در بوته)	وزن هزار دانه (گرم)	شمار دانه در سنبله	وزن خشک ریشه (گرم در بوته)	وزن خشک ساقه (گرم در بوته)	نسبت وزن خشک ریشه به ساقه	محتوای نیتروژن دانه (میلی گرم در گرم وزن خشک)
شاهد	۱/۳۹ ^c	۳۵/۷۴ ^c	۳۱/۳۳ ^c	۱/۳۱ ^b	۲/۶۴ ^b	۰/۴۹ ^b	۱۹/۸۵ ^c
Sp7	۱/۵۶ ^b	۳۸/۲۲ ^b	۳۴/۶۶ ^b	۱/۵۳ ^a	۲/۹۴ ^a	۰/۵۲ ^a	۲۲/۳۲ ^b
Dol	۱/۶۱ ^a	۳۹/۰۷ ^a	۳۵/۶۰ ^a	۱/۵۷ ^a	۲/۹۹ ^a	۰/۵۲ ^a	۲۳/۲۳ ^a

حروف یکسان در هر ستون نشانه عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۰.۵٪ با آزمون دانکن می‌باشد.

بوده است. از سوی دیگر، با توجه به این که سوش Do1 یک سویه جداسازی شده از گندم‌های محلی ناحیه دولت‌آباد اصفهان، ولی Sp7 یک سویه استاندارد جداسازی شده از گیاه *Digitaria decumbens* در برزیل است، می‌توان فرض کرد که سویه‌های جدا شده از هر نوع گیاه زراعی، نسبت به سایر سویه‌ها، تجانس بیشتری برای هم‌یاری با آن گیاه و تحریک رشد و نمو آن نشان می‌دهند.

بررسی داده‌ها در جدول ۳ نیز بیانگر آن است که آلوده‌سازی با باکتری آزوسپیریوم با افزایش معنی‌دار شمار دانه در هر سنبله و وزن هزار دانه همراه بوده است. با توجه به افزایش وزن هزار دانه و شمار دانه در هر سنبله، ازدیاد عملکرد دانه قابل قبول و مورد انتظار بود. کاپونیک و همکاران (۱۵) در بررسی تأثیر باکتری بر گیاهان در یک سیستم آب‌کشت، عقیده دارند که افزایش معنی‌دار عملکرد گندم، حاصل افزایش شمار پنجه‌های بارور و نیز ازدیاد معنی‌دار وزن هزار دانه بوده است. این در حالی است که بهاتارای و هس (۷) ازدیاد محصول در اثر تلقیح با آزوسپیریوم را نتیجهٔ ازدیاد شمار دانه در هر سنبله دانسته‌اند. در آزمایش‌های مزرعه‌ای در آرژانتین نیز نشان داده شد که شمار دانه‌های هر بلال در گیاهان ذرت آلوده شده با آزوسپیریوم دو برابر شده است، و یک افزایش حدود ۵۹ درصد در وزن خشک دانه‌ها به دست آمد (۱۰). ساریچ و همکاران (۲۳) گزارش کردند که آلوده‌سازی با آزوسپیریوم ۲۵-۲۸ درصد محصول سورگوم را افزایش داد، که این نتیجه مرهون شمار بیشتر دانه در هر پانیکول بود.

بررسی تأثیر رقم بر عملکرد و اجزای آن نشان می‌دهد که اثر رقم بر عملکرد و وزن هزار دانه معنی‌دار، ولی بر شمار دانه در سنبله غیر معنی‌دار بوده است (جدول ۴). این نتیجه گویای آن است که اختلاف در میانگین عملکرد ارقام، بیشتر به علت تغییر در وزن دانه‌ها در سنبله بوده تا شمار دانه در هر سنبله. این امر به ویژه از آن جا مشهود می‌گردد که میانگین شمار دانه در سنبله رقم قدس، که عملکرد آن از همه بیشتر است، کمتر از دو رقم دیگر (جدول ۴) به دست آمده، گرچه این تفاوت از

لحاظ آماری معنی‌دار نبوده است.

آنالیز واریانس و نیز نتایج مندرج در جدول ۱ هم‌چنین نشان می‌دهند که اثر متقابل سوش و رقم بر عملکرد دانه، وزن هزار دانه و شمار دانه در سنبله معنی‌دار بوده است، به طوری که سوش Sp7 بیشترین ازدیاد عملکرد دانه (۱۸ درصد نسبت به شاهد) و اجزای آن را در رقم روشن سبب شده است. ولی سوش Do1، عملکرد دانه (۳۰/۶ درصد نسبت به شاهد) و اجزای آن را در رقم قدس بیشتر افزایش داده است. این در حالی است که گندم امید کمترین موفقیت را در بهره‌مندی از آثار سودمند سیستم هم‌یاری نشان داده است.

برتری گندم قدس در تلقیح با سوش Do1 و گندم روشن با سوش Sp7 را می‌توان به سازگاری سوش با رقم زراعی نسبت داد. در آزمایش‌های گارسیا و دوبرینر (۱۱) نیز اثر مثبت و معنی‌داری که از یک سوش خاص باکتری بر رشد و عملکرد رقم ویژه‌ای از ذرت به دست می‌آمد، در ترکیب‌های دیگر رقم گیاه و سوش باکتری قابل حصول نبود. به عقیده آنها این امر احتمالاً یک رابطه متقابل ناشناخته بین سوش باکتری و ژنوتیپ گیاهی (یا شاید اختصاصی بودن) را معرفی می‌کند. نتایج مشابهی نیز در مورد اثر رابطه متقابل سوش و باکتری در آلوده‌سازی ارقام محلی گندم نیپال با سوش‌های مختلف آزوسپیریوم گزارش شده است (۷). یک پاسخ وابسته به ژنوتیپ نیز در آلوده‌سازی گیاهان خردل با آزوسپیریوم نشان داده شده است (۱۸). آرساک و همکاران (۲) هم دریافتند که اثر مثبت تلقیح با آزوسپیریوم بر رشد ذرت، به ژنوتیپ گیاه و نوع و غلظت باکتری بستگی دارد.

نتایج حاصل از تأثیر سوش (جدول ۳) و رقم (جدول ۴) بر وزن خشک ریشه و ساقه و نسبت ریشه به ساقه در ارقام گندم نیز بیانگر آن است که آلوده‌سازی ارقام گندم با آزوسپیریوم تأثیر معنی‌داری بر این شاخص‌ها داشته است.

تلقیح باکتری به طور متوسط ۱۸/۳ درصد وزن خشک ریشه گیاهان آلوده را نسبت به گیاهان شاهد افزایش داده است. به نظر می‌رسد باکتری با تأثیر بر رشد ریشه و افزایش سطح آن

جدول ۴. میانگین اثر رقم بر صفات زراعی مورد مطالعه

رقم زراعی	عملکرد (گرم در بوته)	وزن هزار دانه (گرم)	شمار دانه در سنبله	وزن خشک ریشه (گرم در بوته)	وزن خشک ساقه (گرم در بوته)	نسبت وزن خشک ریشه به ساقه	محتوای نیتروژن دانه (میلی‌گرم در گرم وزن خشک)
قدس	۱/۶۸ ^a	۳۸/۷۲ ^a	۳۳/۶۶ ^a	۱/۵۶ ^a	۲/۲۸ ^c	۰/۵۷ ^a	۲۱/۳۱ ^b
روشن	۱/۶۰ ^a	۳۹/۲۵ ^a	۳۴/۰۰ ^a	۱/۵۸ ^a	۲/۸۱ ^b	۰/۵۵ ^a	۲۴/۲۱ ^a
امید	۱/۲۹ ^b	۳۴/۹۹ ^b	۳۴/۰۰ ^a	۱/۲۷ ^b	۳/۰۹ ^a	۰/۴۱ ^b	۱۹/۸۹ ^c

حروف یکسان در هر ستون نشانه عدم تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ با آزمون دانکن می‌باشد.

معتقدند تأثیر هورمونی القا شده در گیاه به وسیله آزوسپیریوم، مستقیماً باعث تغییرات مشخص در مورفولوژی ساقه، نظیر افزایش قطر ساقه، و نیز افزایش پنجه‌زنی و شمار خوشه‌ها در گندم می‌گردد (۲۱). برخی دیگر نیز عقیده دارند ازدیاد رشد ریشه زمینه دست‌رسی به آب و عناصر غذایی را بیشتر کرده، در نتیجه رشد بخش هوایی را افزایش می‌دهد (۲۰، ۲۲ و ۲۴). کوهن و همکاران (۹) و حجازی و مونیب (۱۲) نتایج مشابهی را در مورد افزایش وزن خشک بخش هوایی ذرت در اثر تلقیح با آزوسپیریوم گزارش داده‌اند.

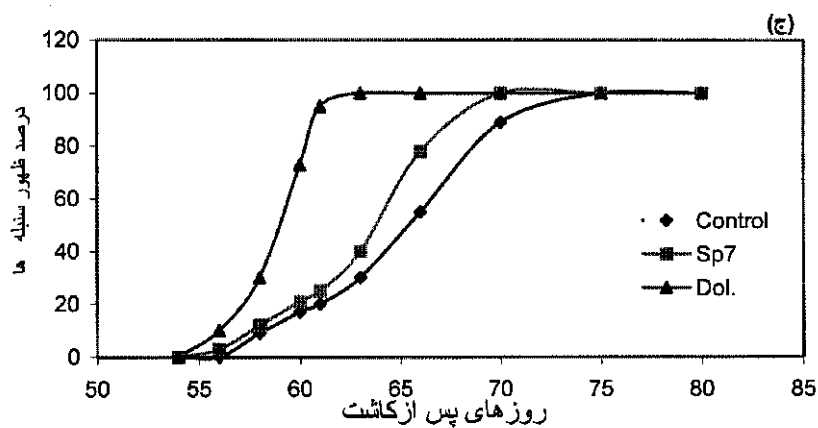
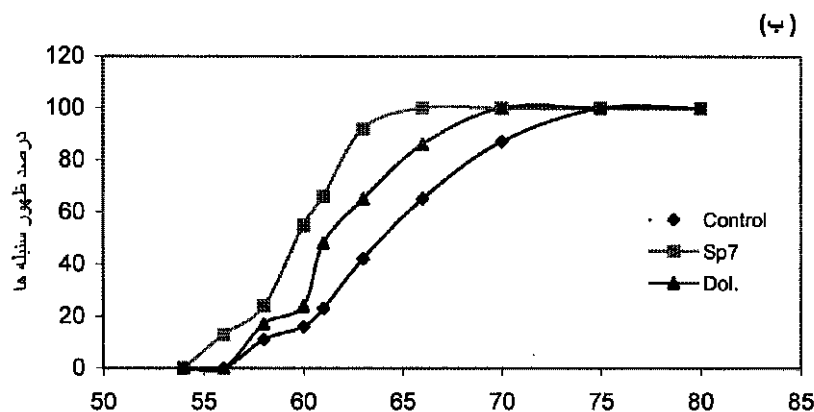
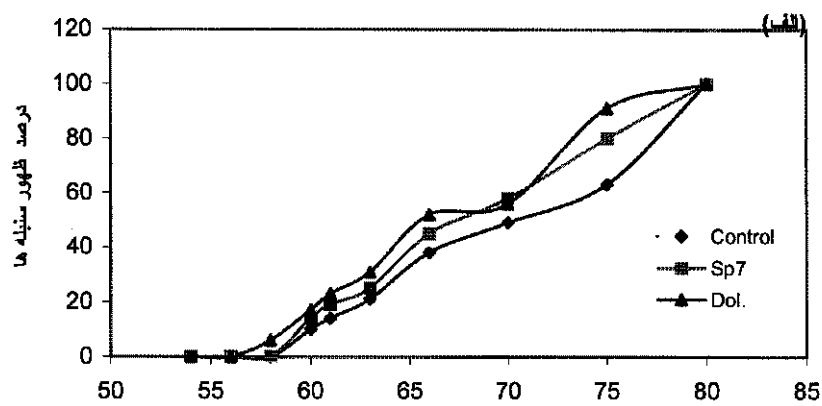
بررسی‌های زراعی در طی دوره رشد گندم نشان داد که تلقیح با باکتری، هماهنگی ظهور سنبله‌ها (مدت زمان لازم برای رسیدن به ۱۰۰٪ خوشه‌زنی در هر گلدان) را در پنجه‌های گندم افزایش می‌دهد (نمودار ۱). به عنوان مثال، ۶۳ روز پس از جوانه‌زنی، همه سنبله‌ها در رقم قدس آلوده به سوش Do1 ظاهر شده بود. حال آن که این مقدار در گیاهان غیر آلوده فقط ۴۰٪ بوده است (نمودار ۱-ج). در نمودار ۱-ب دیده می‌شود که سوش Sp7 الگوی ظهور سنبله‌های رقم روشن را به مراتب بهتر از سوش Do1 سرعت بخشیده است، ولی نمودار ۱-الف گویای آن است که آلوده‌سازی رقم امید با هر دو سوش اثر معنی‌داری بر زمان لازم برای رسیدن به ۱۰۰٪ ظهور سنبله‌ها نداشته است.

هم‌سویی نتایج حاصل از اثر سوش‌ها بر هماهنگی ظهور سنبله‌های ارقام، با نتایج به دست آمده از عملکرد و وزن خشک ساقه، گویای آن است که آلوده‌سازی با این باکتری نمو ساقه را

برای جذب آب و عناصر غذایی، سبب رشد بهتر بخش‌های هوایی و نهایتاً ازدیاد عملکرد گردیده است. تأثیر باکتری آزوسپیریوم بر گسترش ریشه در بسیاری از منابع گزارش شده است. کاپولنیک و همکاران (۱۵ و ۱۶) تأثیر مثبت آلوده‌سازی باکتری آزوسپیریوم در توسعه ریشه گندم را گزارش داده‌اند. ساریج و همکاران (۲۴) نشان داده‌اند که آلوده‌سازی با آزوسپیریوم برازیلنس، تعداد کل و طول ریشه‌های سورگوم را تا حد ۳۴-۴۰ درصد نسبت به شاهد افزایش داده است. فول‌چیری و فریونی (۱۰) نیز در یک آزمایش مزرعه‌ای در آرژانتین به این نتیجه رسیدند که آلوده‌سازی نهال‌های ذرت با آزوسپیریوم لیپوفروم اثر معنی‌داری در توسعه سیستم ریشه‌ای و عملکرد ذرت داشته است. جاکود و همکاران (۱۳) دریافتند که آزوسپیریوم در همان مراحل اولیه رشد گیاه، اثر برگشت‌ناپذیر خود بر مورفولوژی و متابولیسم ریشه را می‌گذارد.

چگونگی و نحوه گسترش ریشه به وسیله آزوسپیریوم هنوز مورد بحث است. ولی بیشتر شواهد مؤید آن است که این باکتری می‌تواند هورمون‌های رشد مانند اکسین‌ها را ترشح کند، که محرک رشد ریشه هستند. باربیری و گالی (۳) گزارش کردند که سوش‌های موتان آزوسپیریوم، که دارای توان تولید بسیار کم هورمون‌ها هستند، قادر به القای اثر معنی‌دار در رشد ریشه و نهایتاً رشد کل گیاه نمی‌باشند.

نتایج این پژوهش هم‌چنین نشان داد که آلوده‌سازی با آزوسپیریوم وزن خشک ساقه را به طور متوسط ۱۲/۳ درصد، در مقایسه با شاهد افزایش داده است. برخی پژوهندگان



نمودار ۱. تأثیر سوش‌های آزوسپیریلوم در الگوی ظهور سنبله‌ها (الف) رقم امید، (ب) رقم روشن و (ج) رقم قدس

سورگوم با آزوسپیریلوم موجب افزایش ماده خشک ساقه و گسترش سطح برگ، و در مراحل بعدی به تأخیر افتادن پیری برگ می‌شود، که این امر به تجمع بیشتر ماده خشک و در نتیجه پر شدن بهتر دانه‌ها کمک می‌کند (۴). کاپولنیک و همکاران

تقویت می‌کند، که پیامد آن ظهور هماهنگ‌تر سنبله‌ها است. در نتیجه این امر زمان بیشتری را برای پر شدن دانه در همه سنبله‌ها در اختیار گیاه قرار داده که سرانجام باعث ازدیاد محصول می‌شود. برخی گزارش کرده‌اند که آلوده‌سازی

خاک مستقر شده، به منابع محدود آب و عناصر غذایی ضروری دست‌رسی بیشتری پیدا کند. کاپولنیک و همکاران (۱۵) نیز ملاحظه کرده‌اند که در یک سیستم آب‌کشت، نسبت ریشه به ساقه گیاهان آلوده بیشتر از گیاهان شاهد بوده است. تغییر نسبت ریشه به ساقه نشان می‌دهد که نفوذ باکتری به ریشه جریان تسهیم ترکیبات کربنی بین ریشه و ساقه را تحت تأثیر قرار داده است (۴).

بررسی اثر سوش بر محتوای نیتروژن دانه (جدول ۱) نشان داد که تلقیح با آزوسپیریوم به طور معنی‌داری میزان نیتروژن دانه را در ارقام گندم افزایش داده است. ارقام این جدول به خوبی نشان می‌دهد که محتوای نیتروژن دانه در تلقیح با سوش Do1 بیشتر در رقم قدس، ولی با سویه Sp7 بیشتر در رقم روشن افزایش یافته، و اثر این دو سویه بر محتوای نیتروژن دانه در رقم امید معنی‌دار نبوده است. همسویی این نتایج با نتایج به دست آمده از شاخص‌های رشد و عملکرد، نشان می‌دهد که احتمالاً قدرت تثبیت زیستی نیتروژن به وسیله این باکتری، جریان رشد، میزان عملکرد، و سرانجام میزان نیتروژن دانه را افزایش می‌دهد. البته برخی از پژوهندگان معتقدند که افزایش محتوای نیتروژن دانه با گسترش ریشه و افزایش عمومی سطح جذب یونها مرتبط است (۶، ۱۴، ۲۰، ۲۱ و ۲۲).

نکته شایان توجه آن است که مقادیر احیای استیلنی اندازه‌گیری شده برای سوش‌ها، نسبت به مقادیر گزارش شده برای ریزوبیوم بسیار کمتر است. ولی تغییرات ایجاد شده در شاخص‌های رشد و محتوای نیتروژن دانه بسیار چشم‌گیر است. بنابراین، باید پذیرفت که اگرچه قدرت تثبیت نیتروژن باکتری به جریان رشد و انباشته شدن نیتروژن در گیاهان آغشته به باکتری کمک می‌کند، ولی فعالیت نیتروژناز باکتری به تنهایی نمی‌تواند آثار گسترده باکتری را بر رشد و عملکرد و میزان نیتروژن دانه گیاه توجیه کند. برخی پژوهندگان بر این باورند که تولید هورمون‌ها، کمک به جذب بهینه آب و عناصر غذایی، تغییر فیزیولوژی سلول‌های ریشه و گسترش ریشه نیز از جمله عواملی هستند که در میزان اثر این باکتری بر رشد ارقام گندم

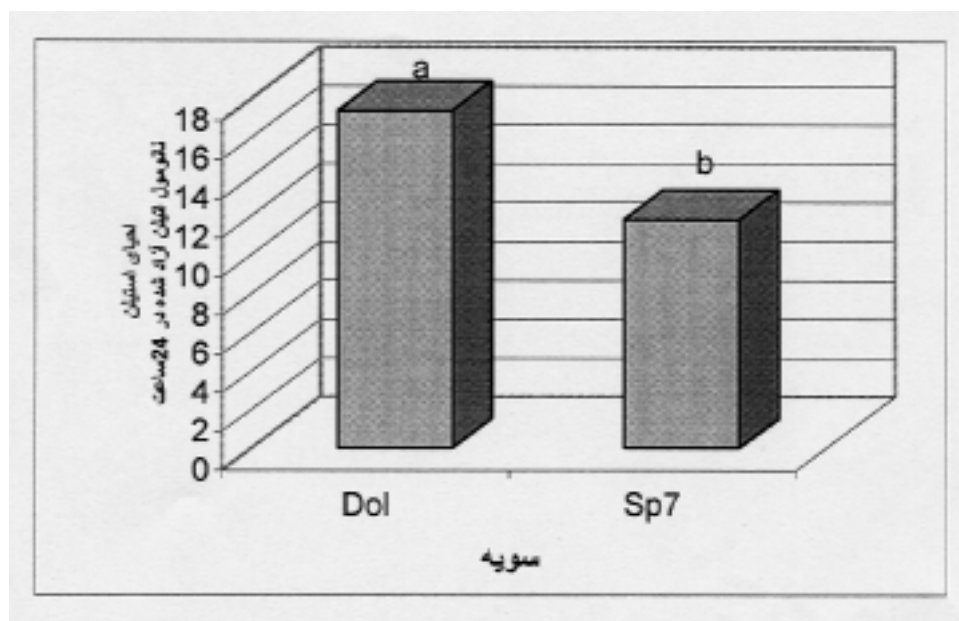
(۱۵) نشان دادند که آزوسپیریوم الگوی ظهور سنبله‌های گندم‌های رشد یافته در یک سیستم آب‌کشت را تسریع کرده است.

گزارش‌های بسیار (۱۶، ۱۷، ۲۳ و ۲۵) دیگری نیز نشان داده‌اند که در ذرت، سورگوم، گندم و *Setaria* آلوده به آزوسپیریوم، افزایش محصول با ظهور هماهنگ‌تر سنبله‌ها و یا افزایش در شمار پنجه‌های بارور مرتبط است.

جدول ۴ نشان می‌دهد که سوش Sp7 بیشترین تأثیر را بر وزن خشک ریشه (۲۷/۱ درصد) و ساقه (۱۵/۷ درصد) رقم روشن، و سوش Do1 بیشترین تأثیر را بر ریشه (۴۰ درصد) و ساقه (۲۱ درصد) رقم قدس داشته است. ولی هیچ یک از دو سوش مذکور تأثیر معنی‌داری بر وزن خشک ریشه و ساقه امید نشان نداده‌اند. این امر بار دیگر اهمیت تجانس و تناسب سوش باکتری با رقم زراعی را یادآوری می‌کند.

جین و پاتری‌کویین (۱۴) گزارش کردند که سوش‌های مختلف آزوسپیریوم شاخص‌های رشد گندم را به میزان متفاوتی متأثر می‌سازند. آنان معتقدند تفاوت در قدرت جذب سوش‌های مختلف این باکتری به ریشه ارقام زراعی مختلف، بیانگر این حقیقت است که برهمکنش سوش-رقم زراعی در سطح ژنوم تعریف می‌شود، و تعبیر سوش و رقم همولوگ را برای بیان این رابطه به کار برده‌اند. بنابراین، در پژوهش حاضر هیچ یک از دو سوش Sp7 و Do1 با رقم امید همولوگ نبوده‌اند. رای (۲۲) نیز دریافت که سوش‌های آزوسپیریوم با افزایش جذب عناصر غذایی، سبب ازدیاد وزن خشک ریشه، دانه و کاه در ارقام Cheena می‌شوند، ولی این تأثیر در ژنوتیپ‌های مختلف Cheena متفاوت است.

جدول ۱ نشان می‌دهد که تلقیح گیاهان با آزوسپیریوم، نسبت وزن خشک ریشه به ساقه را در مقایسه با گیاهان شاهد افزایش داده است. این بدان مفهوم است که اگرچه آزوسپیریوم تأثیر مثبتی بر وزن خشک ریشه و ساقه داشته، ولی اثر بر گسترش ریشه بیشتر از بخش هوایی بوده، و نسبت ریشه به ساقه افزایش یافته است. این امر موجب می‌شود گیاه بهتر در



نمودار ۲. مقایسه میزان احیای استیلنی کشت‌های خالص باکتری از دوسویه Dol و Sp7

نقش دارند (۳، ۶، ۲۲، ۲۳، ۲۴ و ۲۵).

سوش و رقم زراعی برمی‌گردد، و این به خصوص از آن جا مشهود است که میزان افزایش نیتروژن دانه و دیگر شاخص‌های رشد در رقم روشن، در هنگام آلوده‌سازی با سویه Sp7 بهتر بوده است.

بنابراین، در مجموع، پژوهش حاضر نشان می‌دهد که پیش از هر نوع بهره‌برداری وسیع از این باکتری برای تحریک رشد و ازدیاد محصول ارقام زراعی هر منطقه، آزمایش‌های عملی برای تعیین سوش همولوگ و مناسب ضروری است. با انتخاب سوش متجانس با هر رقم زراعی بلافاصله پس از جوانه‌زنی، یک افزایش در گسترش سیستم ریشه‌ای راه‌اندازی می‌شود، که در مراحل بعد نتیجه آن به صورت افزایش رشد بخش هوایی و بالاخره ازدیاد عملکرد نمایان خواهد شد. پس می‌توان احتمال داد که گزارش‌های مبنی بر منفی یا بی‌اثر بودن آلوده‌سازی با آزوسپیریلوم بر رشد گیاهان (۱، ۴ و ۲۱) نتیجه ناسازگاری ژنوتیپی سوش باکتری با رقم زراعی مورد بررسی، یا شرایط نامساعد تلقیح بوده است. در ضمن، این آزمایش ثابت کرد که در آلوده‌سازی گیاهان هر منطقه، جدایه‌های محلی باکتری باید نسبت به سویه‌های بیگانه و غیر بومی ترجیح داده شوند. چون علاوه بر سازگاری با ژنوتیپ این گیاهان در طی تکامل،

جدول ۳ نشان می‌دهد که در مجموع، اثر سویه Dol بر محتوای نیتروژن دانه گندم چشم‌گیرتر از اثر سویه Sp7 بوده است. از سوی دیگر، اندازه‌گیری میزان احیای استیلنی برای کشت‌های خالص باکتری از دو سوش مذکور (نمودار ۲) هم نشان داد که میزان فعالیت نیتروژن‌سازی سویه Dol حدود ۱/۵ برابر بیشتر از سویه Sp7 است. هم‌چنین، جدول ۳ نشان می‌دهد که در مجموع، اثر سویه Dol بر عملکرد و دیگر شاخص‌های رشد چشم‌گیرتر از سویه Sp7 بوده است.

از آن جا که سویه Dol یک سویه بومی، ولی سویه Sp7 یک سویه غیر بومی و جدا شده از خاک‌های برزیل است، می‌توان نتیجه گرفت که با کاربرد سویه‌های محلی می‌توان بازده بیشتری از آغشته‌سازی ارقام گندم با این باکتری به دست آورد، چون توانایی تثبیت نیتروژن سویه‌های بومی در شرایط محلی بهتر از سویه‌های غیر بومی است.

به طور کلی، هر چه توان تثبیت نیتروژن سویه‌ها بیشتر باشد (مانند سویه Dol)، سودرسانی آنها به جریان رشد گیاه بیشتر است. ولی باید در نظر داشت که میزان تأثیر باکتری بر جریان رشد و افزایش محتوای نیتروژن دانه در درجه اول به ترکیب

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه اصفهان انجام گرفته است. بدین وسیله از مساعدت‌های معاونت پژوهشی دانشگاه اصفهان و دانشکده علوم سپاسگزاری می‌شود. از همکاری‌های بی‌دریغ مسئولان گلخانه تحقیقاتی دانشگاه اصفهان و همکاران دانشگاه شهرکرد نیز تقدیر می‌گردد.

سازگاری بیشتری نیز نسبت به محیط و شرایط خاک محل نشان می‌دهند، و در نتیجه رقابت‌کننده‌های بهتری هستند. شایسته است در آینده سوش‌های بیشتری از مناطق مختلف جداسازی شده و اثر آنها بر ارقام محلی بیشتری از گندم و غلات دیگر بررسی گردد. هم‌چنین، با توجه به این که تنش شوری و کم‌آبی دو مورد عمده در کشاورزی ایران است، نیکوست که در آینده پژوهش‌های بیشتری در مورد اثر این باکتری در چنین شرایطی صورت گیرد.

منابع مورد استفاده

1. روستا، م. ج.، ن. صالح راستین و م. مظاهری اسدی. ۱۳۷۷. بررسی فراوانی و فعالیت آزوسپیریوم در برخی از خاک‌های ایران. علوم کشاورزی ایران ۲۹(۲): ۲۸۵-۲۹۸.
2. Arsac, J. F., C. Lamothe, D. Mulard and J. Fages. 1990. Growth enhancement of maize through *Azospirillum lipoferum* inoculation: effect of plant genotype and bacterial concentration. *Agronomie* 10: 649-654.
3. Barbieri, P. and E. Galli. 1993. Effect on wheat root development of inoculation with *A. brasilense* mutant with altered indole-3-acetic acid production. *Res. Microbiol.* 144: 69-75.
4. Bashan, Y. and G. Holguin. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* 43: 103-121.
5. Bashan, Y. and H. Levanony. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can. J. Microbiol.* 36: 591-607.
6. Bashan, Y., H. Levanony and G. Mitiju. 1989. Changes in proton efflux of intact wheat root induced by *A. brasilense* Cd. *Can. J. Microbiol.* 35: 691-697.
7. Bhattarai, T. and D. Hess. 1993. Yield responses of Nepalese spring wheat (*T. aestivum*) cultivars to inoculation with *Azospirillum* spp. of Nepalese origin. *Plant Soil* 151: 67-76.
8. Bockman, O. C. 1997. Fertilizers and biological nitrogen fixation as sources of plant nutrients: perspectives for future agriculture. *Plant Soil* 194: 303-334.
9. 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*. *Plant Physiol.* 66: 746-749.
10. Fulchieri, M. and L. Frioni. 1994. *Azospirillum* inoculation on maize: effect on yield in a field experiment in central Argentina. *Soil Biol. Biochem.* 26: 921-923.
11. Garcia de Salmone, I. and J. Dobereiner. 1996. Maize genotype effects on the response to *Azospirillum* inoculation. *Biol. Fertil. Soils* 21: 193-196.
12. Hegazi, N. A. and M. Monib. 1983. Response of maize plants to inoculation with *Azospirillum* and straw amendment in Egypt. *Can. J. Microbiol.* 29: 888-894.
13. Jacoud, C., D. Job, P. Wadoux and R. Bally. 1999. Initiation of root growth stimulation by *Azospirillum lipoferum* CRT1 during maize seed germination. *Can. J. Microbiol.* 45: 339-342.
14. Jain, D. K. and D. G. Patriquin. 1984. Root hair deformation, bacterial attachment and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Appl. Environ. Microb.* 48: 1208-1213.

15. Kapulnik, Y., R. Gafny and Y. Okon. 1985. Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃-uptake in wheat in hydroponic systems. Can. J. Bot. 63: 627-631.
16. Kapulnik, Y., J. Kigel, Y. Okon, I. Nur and Y. Henis. 1981. Effect of *Azospirillum* inoculation on some growth parameters and N-content of wheat, sorghum and panicum. Plant Soil 61: 65-70.
17. Kapulnik, Y., S. Sarige, I. Nur., Y. Okon, J. Kigel and Y. Henis. 1981. Yield increases in summer cereal crops in Israeli fields inoculated with *Azospirillum*. Exp. Agric. 17: 179-187.
18. Kesava-Rao, P. S., V. Arnuchalam and K. V. Tilak. 1990. Genotype-dependent response to *Azospirillum* treatment in yield and nitrogenase activity in *Brassica juncea*. Curr. Sci. 59: 605-609.
19. Krieg, N. R. and J. G. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 1, Williams and Willkins, Baltimore.
20. Pacovsky, R. S. 1990. Development and growth effects in the sorghum-*Azospirillum* association. J. Appl. Bacteriol. 68: 555-563.
21. Patriquin, D. G., J. Dobereiner and D. K. Jain. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. Can. J. Microbiol. 29: 900-915.
22. Rai, R. 1988. High-temperature-adapted *A. brasilense* strains: growth and interaction response on associative nitrogen fixation, mineral uptake and yield of cheena (*Panicum miliaceum* L.) genotypes in calcareous soil. J. Agric. Sci. 110: 321-329.
23. Sarige, S., A. Blum and Y. Okon. 1988. Improvement of the water status and yield of field-grown grain sorghum by inoculation with *Azospirillum brasilense*. J. Agric. Sci. 110: 271-277.
24. Sarige, S., Y. Okon and A. Blum. 1992. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on growth dynamics and hydraulic conductivity of *Sorghum bicolor* roots. J. Plant Nutr. 15: 805-819.
25. Tien, T. M., M. H. Gaskins and D. H. Hubbell. 1979. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. Appl. Environ. Microb. 37: 1016-1024.