

تأثير اللقاح البكتيري *Azospirillum spp.* ومستويات النتروجين في وزن المادة الجافة ومحتوى النتروجين الكلي لنبات الحنطة

ندى سلوم محمد منى قدوري علي خلف يوسف شمخي

الملخص

أجريت دراسة لمعرفة تأثير لقاح بكتيريا *Azospirillum spp.* مع اربع مستويات نتروجين وهما 0 و 15 و 30 و 45 جزء بالمليون نتروجين لمعرفة مدى تأثيرها في وزن المادة الجافة ومحتوى النتروجين الممتص لنبات الحنطة. اذ تمت الزراعة في محلول غذائي (محلول هوكلاند الخالي من النتروجين) ويحتوي تراكيز من العناصر الأساس المحسوبة وفي ظروف معقمة. نفذت التجربة باستخدام التصميم التام التعشبية (CRD) وشملت على 8 معاملات نتجت من التداخل بين لقاح *Azospirillum* (لقاح وبدون لقاح) واربعة مستويات نتروجين المذكورة آنفاً وبثلاثة مكررات. ولمدة التفوق المعنوي او غير المعنوي اظهرت النتائج تفوق المعاملات الملقحة على غير الملقحة بوزن المادة الجافة ومحتوى النتروجين الممتص بنسبة 8.84 و 26.19% على التوالي.

كذلك اوضحت النتائج ان اضافة السماد النتروجيني (نترات الامونيوم) ادى الى حصول زيادة معنوية في وزن المادة الجافة ومحتوى النتروجين الممتص داخل النباتات الملقحة وغير الملقحة إلا ان المستويات العالية من السماد النتروجيني تقلل من نشاط البكتيريا المحفز.

المقدمة

التسميد الحيوي مفتاح لثورة النباتات الدائمة الخضرة اذ يزيد من نمو وانتاجية العديد من المحاصيل والخضراوات من خلال تثبيت الحيوي للنتروجين **Biological nitrogen fixation** ودعم النمو من خلال افراز الهرمونات ومنظمات النمو او زيادة قابلية الجذور على امتصاص العناصر الغذائية من التربة Kennedy و **Cocking (11)** تلقح المحاصيل غير البقولية (**Non - Legumes**) ببكتيريا التثبيت النتروجيني **rhizobial Non - diazotrophic** واستعمار هذه البكتيريا للمنطقة الجذرية وتتركزها ما بين الخلايا وبالتالي تثبيت النتروجين الحر في داخل انسجة النبات (19) ان استفادة النبات من خلال زيادة قابليته على امتصاص المغذيات من التربة افضل من تثبيت النتروجين الحر (7)، عزلت العديد من بكتيريا التثبيت النتروجيني من ضمنها *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Derxia*, *Enterobacter*, *Erwinia* (21، 2).

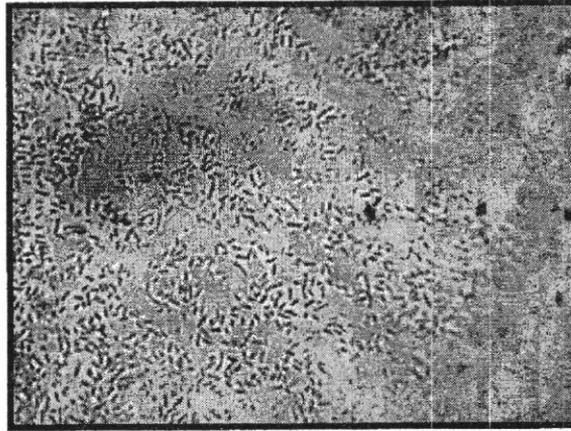
وقد وجد ان بكتيريا *Azospirillum* من اهم الاحياء المجهرية المحفزة لنمو النبات **Plant growth promoting microorganism (PGPMS)** تستعمر العديد من اجناس النباتات وفي مدى واسع من الترب ولها تأثيرات مفيدة في النبات سواء في الانبات ام البزوغ والنمو تحت الظروف الطبيعية والقاسية في الترب (4). ان تلقح العديد من المحاصيل والحشائش ببكتيريا *Azospirillum* ادى الى زيادة معنوية في المادة الجافة وتجمع النتروجين في النبات الملقح (15، 18) كما ان التلقيح بـ *Azospirillum* غالباً ما يسبب زيادة في وزن المادة الجافة مع تناقص او زيادة في تركيز النتروجين (6). وجد **Patriquin و Jain (9)** ان تأثير سلالتين من بكتيريا *A. brasilense* كان تأثير احدهما اكثر معنوياً في الاخرى في محتوى النبات من الفسفور والبوتاسيوم والنتروجين. كما انه استخدم لقاح *A. brasilense* مع فطر المايكوريزا (VAM) سبب زيادة في حاصل الحنطة ومحتواه من الكلوروفيل ومعدل نشاط التركيب الضوئي وتركيب الكلوتامين (17).

ادى استخدام السماد النتروجيني بمقدار 40 kg N. ha^{-1} مع لقاحين من *Azospirillum brasilense* و *Azotobacter chroococcum* الى زيادة معنوية في حاصلي الذرة البيضاء والصفراء مقارنة بالمعاملة غير الملقحة (22).

الهدف من البحث هو عزل بكتيريا *Azospirillum spp.* ودراسة مدى قدرتها في التأثير في محصول الحنطة لكونه يعد من المحاصيل الاقتصادية المهمة.

المواد وطرائق البحث

تم الحصول على عزلة محلية من بكتيريا *Azospirillum spp.* من الشعيرات الجذرية لنبات الشعير العراقي (سمير 1) باستخدام الوسط الغذائي شبه الصلب الخالي من النتروجين **Semi Solid - NFB medium** والخاص ببكتيريا *Azospirillum* وحسب طريقة **Dobereiner** و **Baldani** (2)، فحصت هذه البكتيريا بالمجهر الالكتروني بعد التصبغ بصبغة **Gram stain** اذ كانت سالبة لصبغة كرام وذات شكل عصوي هلالي (ضمية الشكل) (شكل 1)، بعد اخذ مسحة حية منها في شريحة الفحص كانت تمتلك حركة لولبية اهتزازية. وقد تم التأكد من الصفات المورفولوجية والكيموحياتية للبكتيريا وحسب ما موصوف في **(Bergy's Manual of Determinative Bacteriology)**. استخدمت هذه العزلة في تنفيذ تجربة مختبرية باستخدام التصميم العشوائي الكامل **Completely Randomized Design (CRD)** لدراسة تأثير بكتيريا *Azospirillum* واربعة مستويات من النتروجين وهي 0 و 15 و 30 و 45 جزء بالمليون نتروجين وكررت كل معاملة ثلاث مرات وبذلك اصبح عدد الوحدات التجريبية (24) وحدة.

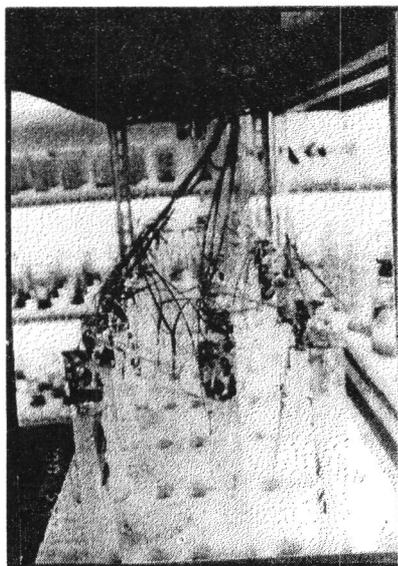


شكل 1: يوضح صور بكتيريا *Azospirillum* المعزولة على الوسط الزراعي **Semi Solid - NFB medium** حضر المحلول الغذائي الخاص بالنبات باستخدام محلول هوكلاندا الخالي من النتروجين (والحاوي على تراكيز من العناصر الاساس المحسوبة مع اضافة 1 سم^3 من محلول العناصر الصغرى **Trace element** (8)). وتم استخدام نترات الامونيوم NH_4NO_3 مصدراً للنتروجين وجدول (1) يوضح أوزان المركب السمادي المستخدم في التجربة مع استخدام بكتيريا *Azospirillum spp.* وفي نظام مغلق (نبات + محلول + لقاح).

جدول 1: الأوزان للمركب السمادي النتروجيني المستخدم في التجربة

الأوزان			المعاملة	المركب
g/0.25L	g/0.5L	g/L		
0.01	0.02114	0.04228	N1	NH ₄ NO ₃
0.02114	0.04228	0.08456	N2	
0.03171	0.06342	0.12684	N3	

اجريت التجربة في ظروف معقمة بالكامل. اذ استخدمت بذور الحنطة صنف قموز-2- وعقمت البذور باستخدام الكحول (95% v/v) لمدة 30 ثانية ثم استخدم القاصر التجاري بتركيز 25% في الماء المقطر المعقم لمدة 15 دقيقة ثم تغسل بالماء المقطر المعقم اربع مرات، وبعدها تترك بالماء المقطر المعقم لمدة 4 ساعات (9). زرعت البذور في داخل انابيب معقمة وحاوية على ماء مقطر معقم وورق ترشيح موضوع بشكل مطوي داخل الانابيب وفي تلامس مع الماء المقطر المعقم لغرض السقي وحسب طريقة الجبوري (1) وجماعته، تمت الزراعة في ظروف معقمة ووضعت الانابيب المزروعة في غرفة خاصة لغرض الانبات لمدة يومين. نقلت بعدها البادرات بعد البزوغ لغرض الزراعة في انابيب معقمة تسمى (Boiling tube) وذات حجم 80 سم³ حاوي نصفها على المحلول الغذائي المعقم (محلول هوكلاند) واخضر حسب المستويات السمادية المذكورة آنفاً بالإضافة الى المادة الصلبة Agar. لغرض تنميسة البادرات تغمر الجذور داخل الوسط يحوي نصفه على Agar ، والنصف الآخر الحاوي على محلول غذائي معقم من محلول هوكلاند المخفف الى 4/1 تركيزه لغرض السقي المستمر بهذا المحلول مع ملاحظة ان محلول هوكلاند الحاوي على المادة الصلبة Agar حضر مسبقاً قبل المحلول الغذائي المخفف وفي ظروف معقمة. اذ تغلق الأنبوبة بواسطة سدادة في رقائق الالمنيوم المعقم وبشكل محكم وتوضع الأنبوبة بشكل أفقي لكي يتصلب الوسط وعلى طول الأنبوبة (شكل 2).



شكل 2: طريقة الزراعة بالـ Boiling tube باستخدام المحلول الغذائي المعقم (محلول هوكلاند)

تم عمل فتحتين في السداد واحد لغرض الزراعة والأخرى لغرض السقي بالمحلول المخفف وإضافة (1/سم³) من لقاح *Azospirillum spp.* بتركيز 10×2^9 CFU/ ، ثم أغلقت الفتحات بواسطة قطع صغيرة جداً من القطن المعقم وحسب طريقة Vincent (24) وعقمت الأنابيب Boiling tube بالكامل باستخدام جهاز الموعدة

Autoclave وعلى درجة حرارة 121م وضغط 15 باوند/انج² لمدة ساعة واحدة ، وتم نقلت الأنابيب إلى غرفة نموذجية خاصة Growth Room وعلى درجة حرارة 25م ومدة اضاءة 12 ساعة و12 ساعة ظلام. تمت مراقبة النمو واخذ الملاحظات مع الاستمرار بالري اثناء التجربة وبظروف معقمة باخلائيل المحضرة على أساس المستويات السمادية وباستخدام ماصات معقمة. استمرت التجربة لمدة شهر وفي نهاية المدة أخذت القياسات التالية:

1- الوزن الجاف للجزء الخضري

2- النتروجين الكلي

النتائج والمناقشة

لوحظ بأن اضافة لقاح *Azospirillum* ادى الى زيادة معنوية في وزن المادة الجافة للنباتات الملقحة على غير الملقحة مقدارها 8.84% وكانت اعلى نسبة زيادة في وزن المادة الجافة عند المستوى النتروجيني N0 (0 ppm) كان مقدارها 16.64% تليها المستوى N2 (30ppm) وكانت نسبة الزيادة 11.11% ، واقل نسبة زيادة عند المستوى النتروجيني N3 (45ppm) وكانت بمقدار 4.5% (جدول 2) ويعود هذا الى ان التراكيز الواطئة من النتروجين تحفز النشاط البكتيري ، كما وجد Kannaiyan (10) ان افضل مستوى للنتروجين مع اللقاح هو 15-30 كيلو غرام نتروجين لكل هكتار. اذ وجد المستوى المنخفض من النتروجين يحفز نشاط البكتيريا (20).

جدول 2: تأثير لقاح *Azospirillum spp.* ومستويات النتروجين في وزن المادة الجافة (ملغم/نبات).

نسبة الزيادة % بتأثير اللقاح (A)	A1 ملغم	A0 غير ملغم	مستوى النتروجين (N)
16.67	30.00	25.00	N0
6.66	45.00	42.00	N1
11.11	54.00	48.00	N2
4.5	59.33	56.66	N3
8.84	47.08	42.92	المتوسط
		L.S.D للمعاملات (P<0.05)	
		1.617	A
		2.275	N

A:مستويات اللقاح؛ N:مستويات النتروجين (جزء بالمليون نتروجين)؛ N0: 0 / N1: 15 / N2: 30 / N3: 45

اوضحت النتائج أيضا إن اضافة نترات الامونيوم ادى الى حصول زيادة معنوية في وزن الجافة بمقدار 40.48 و12.5 و1.76% للنباتات غير الملقحة. اما نسبة الزيادة في وزن المادة الجافة للنباتات الملقحة كانت بمقدار 33.33 و16.66 و8.98%. وهذا يعود لزيادة وزن المادة الجافة للنباتات الملقحة على غير الملقحة لأن بكتيريا *Azospirillum* تعد من انواع البكتيريا المحفزة للنمو Plant growth promoting microorganism (PGPMs) اذ تعمل على احداث تغيرات فسيولوجية ومورفولوجية للجذر مما يؤدي الى تحسين في نمو النبات في المادة الجافة (4) كما ان هذه البكتيريا تتواجد بين خلايا الطبقة الخارجية للنحاء وتعمل على افراز هرمونات تؤدي الى زيادة استطالة الخلايا النامية وزيادة المساحة السطحية لخلايا الجذر مما يؤدي الى زيادة امتصاص الماء والعناصر الغذائية وبالتالي تحسين نمو النبات وزيادة المادة الجافة (13 ، 14) وفي هذا الصدد وجد ان لقاح *Azospirillum* يسبب زيادة في الحاصل من 15-30% (23).

تشير نتائج جدول (3) بأن اضافة لقاح *Azospirillum* ادى الى حصول زيادة معنوية في محتوى النتروجين مقدارها 26.19% للنباتات الملقحة على غير الملقحة. كما تشير النتائج الى ان اعلى زيادة في محتوى النتروجين كانت عند مستوى التركيز N0 (0ppm)، ونسبة 66.66% وتليها نسبة الزيادة 23.81% عند المستوى N2

(30ppm) وكانت أقل نسبة زيادة عند المستوى N3 (45ppm). وهذا يعود الى زيادة محتوى النبات من النتروجين نتيجة التلقيح اذ ان بكتيريا *Azospirillum* تزيد نسبة النتروجين في النبات بطريقتين اولهما هي تثبيت النتروجين الحر وتحويله الى نتروجين مركب داخل النبات بعملية تثبيت النتروجين (16 ، 12) او بسبب وجود البكتيريا بين خلايا اللحاء وافرزاها للهرمونات قد يسبب زيادة المساحة السطحية للجذر وبالتالي زيادة قدرته الامتصاصية للماء والعناصر الغذائية من فسفور وبوتاسيوم وكذلك النتروجين كما اشار الى ذلك Baldani وجماعته (3)، Bashun وجماعته (5).

اشارت عدد من الدراسات ان زيادة امتصاص النتروجين والعناصر الأخرى من فسفور وبوتاسيوم وغيرها من قبل الجذور أفضل من تثبيت النتروجين الحر داخل النبات من قبل البكتيريا نفسها (7). هذه الحالة تقلل من تركيز العناصر غير الجاهزة في التربة وامتصاصها من قبل النبات وبالتالي التقليل من التلوث البيئي وفي الوقت نفسه حدوث زيادة بالانتاجية نتيجة التلقيح.

أوضحت نتائج الجدول (3) ان اضافة نترات الامونيوم أدى الى زيادة بالنتروجين الممتص في النباتات غير الملقحة بنسبة 64.28 و 12.5 و 38.46% وكانت نسبة الزيادة معنوية في النتروجين الممتص في النباتات الملقحة وبنسبة 11.76 و 19.05 و 32.26%.

جدول 3: تأثير لقاح *Azospirillum spp.* ومستويات النتروجين على محتوى النتروجين الممتص في النبات (ملغم

/ نبات)

نسبة الزيادة % بتأثير اللقاح (A)	A1 ملقح	A0 غير ملقح	مستوى النتروجين (N)
66.66	0.3	0.1	N0
17.64	0.34	0.28	N1
23.81	0.42	0.32	N2
16.13	0.62	0.52	N3
26.19	0.42	0.31	المتوسط
			L.S.D للمعاملات (P<0.05)
		1.617	A
		2.275	N

A: مستويات اللقاح؛ N: مستويات النتروجين (جزء بالمليون نتروجين)؛ N0: 0 / N1: 15 / N2: 30 / N3: 45

المصادر

1- الجبوري، عبد الجاسم محسن ومحمد خزعل حميد وعلي عبد الامير مهدي الصالحي وظاهر عباس البياتي وزينب عبد الجبار. 1997 "اكتثار اصول الكمثري باستخدام تقنية زراعة الانسجة . مجلة العلوم الزراعية العراقية، 2 (2): 68-82 .

- Baldani, V.L.D. and J. Dobereiner (1980). Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biology and Biochemistry*, 12: 433-439.
- Baldani, V.L.D.; Alvarez, M.A.de.; B. Baldani, and J. Doberiner, (1986). Establishment of inoculated *Azospirillum* SPP. In the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant and Soil*. 90: 35-46.
- Barassi, C.A.; R.J. Sueldo; C.M. Ccreus; L.E. Carrozzi; E.M. Casanovas and M.A. Pereyra (2007). *Azospirillum* spp. Dynamic Soil Bacterium avorable to Vegetable Crop production, *Dynamic Soil, Dynamic Plant*. Global Science Books.

- 5- Bashan, Y.; S.K. Harrison and R.E. Whitmoyer (1990). Enhanced growth of wheat and soybean plants inoculated with *Azospirillum brasilense* is not necessarily due to general enhancement of mineral uptake. *Appl. Environ. Microbiol*, 56:764-775.
- 6- Bouton, J.H. and D.A. Zoberer (1979). Response of panicum maximum jacq. To inoculation with *Azospirillum brasilense*. *Plant and soil*, 52:585-590.
- 7- Cocking, E.C. (2003). Endophytic Colonization of Plant roots by nitrogen-fixing bacteria, *Plant and Soil*, 252:169-175.
- 8- Hoagland, D.R. and D.I. Arnon (1950). The water culture method for growing plants without soil. *Calif-Agric. EXPT. Sta. Circ.*, 347.
- 9- Jain, D.K. and D.G. patriquin (1984). Root hair deformation bacterial attachment and plant growth in wheat – *Azospirillum* association. *Appl. Environ. Microbial*, 48: 1208-1213.
- 10- Kannaiyan, S. (2003). Inoculants production in developing countries problems, potentials and success. G. Hardarson and W. J. Broughton (eds.), *Maximizing the use of biological nitrogen fixation in agriculture*, 187-198. FAO. Published by Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.
- 11- Kennedy, I.R. and E.C. Cocking (1997). *Biological Nitrogen Fixation: The Global Challenge & Future Needs Position Paper*, The Rock feller Foundation Bellagio Conference Center, Italy.
- 12- Kucey, R.M.N. (1988). Alteration of size of wheat root system and nitrogen fixation by associative nitrogen fixing bacteria measured under field conditions. *Can. J. Microbiol*, 34:735-739
- 13- Michiels, K.; J. Vanderleyden and G.A. Van (1989). *Azospirillum*-plant root associations: Areview *Biol. Fertil. Soil*, 8:356-368.
- 14- Okon, y. (1985). *Azospirillum* as apotential inoculant for agriculture – *Trends in Biotech*, 3: 223-228.
- 15- Pal, U.R. and H.S. Malik (1981). Contribution of *Azospirillum brasilense* on photosynthesis nitrogen metabolism and grain yield in wheat. *Indian. J. Plant physio*, 4:357-361.
- 16- Pal, U.R. and H.S. Malik (1989). Contribution of *Azospirillum brasilense* to the nitrogen needs of Sorghum (*Sorghum bicolor*) L.moench. in humid sub-tropics *plant and soil*, 63: 501-504
- 17- Panwar, J.D.S. (1991). Effect of VAM and *Azospirillum brasilense* on photosynthesis nitrogen metabolism and grain yield in wheat. *Indian J. plant physio*, 4: 357-361.
- 18- Rai, S.A. and A.C. Gaur (1982). Nitrogen fixation by *Azospirillum* spp.and effect of *Azospirillum lipoferum* on the yield and N-V ptane of wheat crop. *Plant and Soil* .69:233-238.
- 19- Rennie, R.J.; J.R.D. Freitas; A.P. Ruschel; and P.B. vose (1982). Isolation and identification of N₂-fixing bacteria associated with sugarcane (*Saccharum* spp.).*Can.J.Microbial*,28:462-467.
- 20- Sarig, S.; Y. Kapulink; I. Nur and Y. Okon (1984). Response of non-irrigated sorghum bicolor to *Azospirillum* inoculation. *Expl. Agric.*, 20: 59-66.
- 20- Seldin, L.; J.D. Van Elsas and E.G.C. Penido (1984). *Bacillus azoto fixans* sp. Nov.,anitrogen- fixing species from Brazilian soil and grass roots. *Int. J.syst. Bacterial*, 34.451-456.

- 21- Tilak, K.V.B.R.; C.S. Singh; N.K. Roy and N.S. Subba Rao (1982). *Azospirillum brasilense* and *azotobacter chroococcum* inoculum: effect on yield of maize (*Zea mays*) and Sorghum (*sorghum bicolor*). Soil. Biol. Biochem, 14: 417-418.
- 22- Vasuvath, Y.; B. Fongeham; S. Siripin; D. Fusang and P. Chan-a-ram (1986). Yield maximization of food grain by associative N₂ fixing bacteria. In proc of an International Seminar on Yield Maximization of food Grains through Soil and fertilizer management, Bangkok, Thailand.
- 23- Vincent, J.M. (1970). A manual for the practical study of root-nodule-bacteria. IBP hand book. No. 15. Black wall scientific publication. Oxford and Edinburgh pp. 123.

EFFECT *Azospirillum* spp. INOCULATE WITH LEVELS OF NITROGEN ON DRY MATTER WEIGHT AND TOTAL NITROGEN CONTENT FOR WHEAT PLANT

N. S. Mohammed M. Q. Ali K. Y. Shamkhi

ABSTRACT

This study was conducted to know the effect of *Azospirillum* inoculation with four levels of nitrogen (0, 15, 30, 45) ppm as ammonium nitrate for known efficiency in dry matter weight and absorbed nitrogen for wheat plant. Seedlings of wheat plant were planted and growth in Hoagland solution lacking nitrogen that contains the essential concentration of elements. Experiment was carried out under sterilized conditions and (CRD) Completely Randomized Design which consisted of 8 treatments in two sets. One of them was inoculated with *Azospirillum*, the other was left as uninoculated control with interaction four levels N as showed above. Each treatment contains three replications. After one month propagation of the plants were harvested then dry weight and nitrogen contents of the plant were measured and recorded. The inoculation treatment showed significant increase in dry matter weight and absorbed nitrogen of 8.84 and 26.19 percent, respectively. The results showed in addition levels of N fertilization led to significant increase in dry matter weight and absorbed nitrogen in (inoculated and non inoculated) wheat plant but the high level N diminishing of stimulation of bacteria activity.