بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

عنوان:

# جداسازی، شناسائی و بکارگیری باکتری *Azospirillum* spp. از باکتریهای PGPR در افزایش رشد برنج در شرایط گلخانه ای

پژوهش و نگارش:

فاطمه رجب زاده

استاید راهنما:

دکتر محسن علمائی - دکتر محمد حسین ارزانش

استادمشاور:

مهندس رضا قربانی نصرآبادی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.Sc.) در رشته مهندسی علوم خاک

بهار ۱۳۸۸

این پایان‌نامه با استفاده از اعتبارات پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شده است.

نظر به این که چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی – پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می شود. بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان‌نامه یا رساله خود مراتب را قبلا به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع و کسب اجازه نمایند.
۲) در انتشار پایان‌نامه یا رساله در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامیست.
۳) انتشار نتایج پایان‌نامه یا رساله باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب فاطمه رجب‌زاده دانشجوی رشته خاکشناسی در مقطع کارشناسی ارشد تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملزم می شوم.

## تقدیر و سپاسگزاری

پروردگارا!!

سپاس بی منتها سزاوار توست که به مصلحت از نعمات به ما می‌بخشی و به حکمت از ما می‌ستانی. خدایا آنچه داشته‌ام تو داده‌ای و آنچه کرده‌ام تو میسر نموده‌ای. همه استعدادهای من، همه وجود من زاده اراده توست. من از خود چیزی ندارم و از خود کاری نکرده‌ام، پس تو را سپاس می‌گویم که بر من منت نهادی تا بتوانم با توکل بر یاری بی‌دریغ و لطف بی‌پایانت این تحقیق را به اتمام برسانم.

آنچه در این مجموعه گرد آمده است حاصل نمی‌شد مگر به یاری عزیزانی که در مراحل این تحقیق مرا یاری رساندند که در اینجا به رسم ادب لازم می‌دانم مراتب سپاس و قدردانی خود را تقدیمشان نمایم.

از اساتید راهنمای محترم جناب آقای دکتر محسن علمائی که امکانات اجرای پایان‌نامه را در اختیار اینجانب قرار داده و مرا در مراحل مختلف این پایان‌نامه راهنمایی نمودند و از جناب آقای دکتر محمد حسین ارزانش که فراتر از یک استاد راهنما در پیش بردن بهتر این پایان نامه مرا یاری نمودند کمال تشکر را دارم.

از استاد مشاور جناب آقای مهندس رضا قربانی نصرآبادی به خاطر مشاوره و کمکهای ارزنده‌یشان در این تحقیق تشکر

می‌نمایم.

از جناب آقای دکتر بارانی و جناب آقای دکتر دردی‌پور به خاطر تقبل زحمت داوری این تحقیق و از جناب آقای دکتر خمیری که مدیریت برگزاری جلسه دفاعیه به عنوان نماینده تحصیلات تکمیلی را بر عهده داشتند سپاس-گزاری می‌نمایم.

از مسئولین و کارکنان مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان بویژه بخش خاک و آب و پرسنل محترم آزمایشگاه بیولوژی این بخش، خانم‌های مهندس مریم غزائیان و مریم سبطی کمال تشکر را دارم.

از پرسنل محترم آزمایشگاه‌های علوم خاک آقایان مهندس علاءالدین و عجمی و خانم مهندس طاهری به خاطر کمکهای

بی‌دریغشان تشکر می‌نمایم.

از مادر مهربانم و همسر صبورم و دو خواهر دلسوزم و آقایان حسن احیایی و مجید جنگی به علت کمکهای فراوان در تمامی مراحل این تحقیق که همواره حامی و پشتیبان من بودند کمال تشکر و قدردانی را دارم و همچنین از خانواده محترم همسرم به خاطر کمکهای آنها، که همواره به من دلگرمی می داد صمیمانه تشکر می-نمایم.

از دوستان خوبم خانم‌های مهندس نگار قادری و لیلا خسروی و عاطفه ضیائی به خاطر مهر و محبتهایشان و کمکهای

ارزنده‌یشان تشکر می‌نمایم. از همکلاسی‌های خوبم خانم‌ها ضیائی، طالبی زاده، عباس منش،شیرانی، شمسی و آقایان بحرینی و شهریاری و هم اتاقی‌های خوبم خانم‌ها گل میمی،دردیانی، قربانی، بخشنده، ارجمند و سایر دوستان که نامی از آنها برده نشد که در طی دوران تحصیل با من همراه بودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تقدیم به:

مادر مهربانم

همسر صبورم

خواهران عزیزم

## چکیده

در بین میکروارگانیسم‌های تثبیت کننده نیتروژن باکتریهای جنس*Azospirillum* دارای جمعیت فراوانی در ریزوسفر و فضای بین سلولی ریشه غلات و دیگر گیاهان است. از ویژگی‌های مفید باکتری می توان به تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه، در نتیجه بهبود جذب آب و عناصر غذایی، افزایش حلالیت فسفاتهای نامحلول آلی و معدنی، تولید سیدروفور، تولید انواع ویتامین، کنترل عوامل بیماریزا، رابطه سینرژیستی با سایر باکتریهای مفید خاکزی، تولید نیتریت، تولید محصولات صنعتی، زیست پالایی فاضلاب و تجزیه بقایای سمی اشاره کرد. در این تحقیق۷۶ جدایه *Azospirillum* از ۲۸ نقطه از نواحی مختلف استان جداسازی شدند. چند ویژگی محرکی رشد جدایه‌ها مقایسه و بهترین جدایه‌ها انتخاب شدند. در ادامه تأثیر ۱۰ جدایه *Azosprrillium*انتخابی در دو سطح کودی (۱۰۰ و ۵۰ درصد) بر اساس آزمون خاک در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار اجرا گردید. نتایج جداسازی باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه نشان داد که ۶۱ جدایه توانایی تشکیل هاله در محیط نیمه جامد NFB، تولید کلنی قرمز رنگ روی محیط RC و صورتی رنگ روی محیط PDA را داشتند. تمامی جدایه‌ها گرم منفی، کاتالاز و اکسیداز مثبت بودند. آزمون تکمیلی شامل توانایی رشد در محیط نیمه جامد حاوی۳ درصد کلرید سدیم، نیازمندی به بیوتین و توان استفاده از قندهای مختلف (گلوکز، ساکارز، فروکتوز، گلیسرول و مانیتول) و توانایی رشد در دمای ۴۱ درجه سلسیوس نیز نشان داد که جدایه‌های مذکور در شش گروه متفاوت قرار داشتند. بیشترین تعداد جدایه‌ها منسوب به گونه *A.largimobile* بود. نتایج آزمایش‌های مربوط به ویژگی‌های محرکی رشد این ۶۱ جدایه نشان داد که بعد از ۲۴ ساعت ۶ جدایه در محیط NFB هاله تشکیل دادند. افزایش تریپتوفان و زمان انکوباسیون باعث افزایش تعداد جدایه‌ها و میزان اکسین تولیدی گردید. توانایی حل فسفر نامحلول معدنی توسط ۶۱ جدایه نشان داد که جدایه‌های آزوسپیریلومی از توانایی خوبی در حل فسفر نامحلول معدنی و آلی برخوردار بودند. تاثیر تلقیح ۹ جدایه *Azospirillum* روی عملکرد دو رقم برنج (ندا و هاشمی) در دو سطح کودی در شرایط گلخانه با یک تیمار شاهد (بدون تلقیح) بررسی شد. در حضور جمعیت میکروبی بومی خاک نتایج حاصل از این آزمایش روی عملکرد و برخی از شاخص‌های رشدی شامل: عملکرد دانه، تعدا دانه در هر گلدان و وزن تر اندام هوایی، وزن خشک اندام هوایی، وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه و تراکم ریشه در تیمارهای تلقیح شده با جدایه‌های بومی نسبت به شاهد تلقیح نشده افزایش یافت که این افزایش از لحاظ آماری در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود.



**واژه‌های کلیدی**: **باکتری آزوسپیریلوم، مواد محرک رشد گیاه، برنج**

**فهرست**

**چکیده (فارسی)**

**فصل اول: مقدمه**

مقدمه..... ۲

**فصل دوم: کلیات و پیشینه تحقیق**

۲-۱- باکتریهای ریزوسفری محرک رشد گیاه (PGPR)..... ۱۰

۲-۲- تاریخچه کشف جنس و گونه‌های مختلف*Azospirillum*..... ۱۲

۲-۳- گیاهان میزبان و پراکنش جغرافیایی *Azospirillum*..... ۱۴

۲-۴- خصوصیات اکولوژیکی *Azospirillum* ..... ۱۵

۲-۴-۱- رطوبت خاک..... ۱۵

۲-۴-۲- درجه حرارت..... ۱۶

۲-۴-۳- اسیدیته خاک (pH)..... ۱۶

۲-۴-۴- اکسیژن..... ۱۶

۲-۴-۵- تاثیر سموم کشاورزی..... ۱۶

۲-۴-۶- ترکیبات نیتروژن..... ۱۸

۲-۴-۷- تنش‌های شوری و خشکی..... ۱۸

۲-۵- مکانیزم‌های جذب *Azospirillum* به طرف ریشه..... ۱۸

۲-۶- اثرات و نتایج تلقیح گیاهان با *Azospirillum* ..... ۲۰

۲-۶-۱- توانایی تولید هورمون‌های گیاهی..... ۲۱

۲-۶-۲- افزایش حلالیت فسفاتهای نامحلول معدنی..... ۲۸

۲-۶-۳- افزایش حلالیت فسفاتهای نامحلول آلی..... ۳۵

۴-۶-۲- تثبیت نیتروژن ..... ۳۷
۵-۶-۲- تاثیر بر روی رشد و توسعه ریشه ..... ۳۹
۶-۶-۲- تاثیر بر جذب مواد معدنی و روابط آبی گیاه ..... ۴۰
۷-۶-۲- تاثیر در افزایش عملکرد گیاهان ..... ۴۱
۸-۶-۲- اثرات جانبی آزوسپیریلوم ..... ۴۶
۱-۸-۶-۲- تولید ویتامینها ..... ۴۶
۲-۸-۶-۲- تجزیه بقایای مواد سمی ..... ۴۶
۳-۸-۶-۲- تولید ترموپلاستیک‌های زیستی ..... ۴۶
۴-۸-۶-۲- اصلاح فاضلاب‌ها ..... ۴۷
۷-۲- توصیف کلی برنج (Oryza sativa L.) ..... ۴۷
۱-۷-۲- سابقه و پیشینه کشت برنج در ایران ..... ۴۸
۲-۷-۲- مناطق و سطح زیرکشت برنج در جهان و ایران ..... ۴۹
۳-۷-۲- مصرف سرانه برنج در جهان و ایران ..... ۵۱
۴-۷-۲- طبقه‌بندی ارقام مختلف برنج ..... ۵۲
۵-۷-۲- خصوصیات دو رقم انتخاب شده در این تحقیق ..... ۵۳
۱-۵-۷-۲- خصوصیات رقم هاشمی ..... ۵۳
۲-۵-۷-۲- خصوصیات رقم ندا ..... ۵۳
۶-۷-۲- نهاده‌های مورد نیاز گیاه برنج ..... ۵۴
۱-۶-۷-۲- نیاز به رطوبت ..... ۵۴
۲-۶-۷-۲- احتیاجات حرارتی و نوری ..... ۵۴
۳-۶-۷-۲- مقاومت به شوری ..... ۵۵
۴-۶-۷-۲- خاک‌های مناسب برای کاشت برنج ..... ۵۵
۵-۶-۷-۲- کودهای مورد نیاز برنج ..... ۵۶
۱-۵-۶-۷-۲- کودهای نیتروژنی (N) ..... ۵۶
۲-۵-۶-۷-۲- کودهای فسفره (P) ..... ۵۷
۳-۵-۶-۷-۲- کودهای پتاسه (K) ..... ۵۷
۷-۷-۲- غرقاب کردن خاک ..... ۵۸

۸-۷-۲- کشت برنج ..... ۵۹
۹-۷-۲- علفهای هرز برنج ..... ۵۹
۱۰-۷-۲- مهمترین آفات و بیماریهای برنج در ایران ..... ۵۹
۱۱-۷-۲- فرآیند تبدیل برنج ..... ۶۰

**فصل سوم: مواد و روش ها**

**۳-۱- جداسازی و خالص‌سازی و شناسایی مقدماتی باکتریهای جنس *Azospirillum* ..... ۶۲**
۳-۱-۱- نمونه‌برداری از خاک و ریشه ..... ۶۲
۳-۱-۲- جداسازی و شناسایی مقدماتی باکتریهای جنس آزوسپیریلوم ..... ۶۲
**۳-۲- تست‌های مقدماتی شناسایی باکتری جنس آزوسپیریلوم ..... ۶۵**
۳-۲-۱- تست گرم ..... ۶۵
۳-۲-۲-تست کاتالاز ..... ۶۶
۳-۲-۳-تست اکسیداز ..... ۶۶
**۳-۳- ویژگی‌های فنوتیپی و مرفولوژیکی جدایه‌های *Azospirillum* ..... ۶۶**
۳-۳-۱- رشد در محیط ۳ درصد کلرور سدیم ..... ۶۷
۳-۳-۲- توان استفاده از گلوکز بعنوان منبع کربن ..... ۶۷
۳-۳-۳- نیازمندی به بیوتین ..... ۶۸
۳-۳-۴- آزمون رشد در دمای ۴۱ $^{\circ}C$ ..... ۶۸
**۳-۴- اندازه‌گیری ویژگی‌های PGPR ..... ۶۸**
۳-۴-۱- اندازه‌گیری کمی توان تولید ایندول استیک اسید (IAA) ..... ۶۹
۳-۴-۲- حلالیت فسفر ..... ۶۹
۳-۴-۲-۱- اندازه‌گیری کیفی توان حل فسفات معدنی نامحلول ..... ۷۰
۳-۴-۲-۲- اندازه‌گیری کمی توان حل فسفات معدنی نامحلول ..... ۷۱

۳-۲-۴-۳- اندازه‌گیری کیفی توان حل فسفات آلی نامحلول ..... ۷۲
۴-۲-۴-۳- اندازه‌گیری کمی توان حل فسفات آلی نامحلول ..... ۷۳
۵-۳- بررسی تاثیر تلقیح آزوسپیریلوم بر روی بعضی از پارامترهای رشدی دو رقم (ندا و هاشمی) برنج در دو سطح کودی در شرایط گلخانه‌ای ..... **۷۳**
۱-۵-۳- تهیه اینوکولوم باکتری (تهیه مایه تلقیح) و تلقیح بذرها ..... ۷۳
۲-۵-۳- ضدعفونی کردن بذرها و آماده کردن نشاء ..... ۷۴
۳-۵-۳- آماده‌سازی گلدان‌ها و آزمون گلخانه ای ..... ۷۴
۶-۳- اندازه‌گیری عملکرد و دیگرپارامترهای رشدی ..... **۷۶**
۷-۳- طرح آزمایشی ..... **۷۶**
۸-۳- تجزیه و تحلیل داده‌ها ..... **۷۷**

**فصل چهارم : نتایج و بحث**

۱-۴- جداسازی، خالص سازی و شناسایی جدایه های *Azospirillum* ..... **۷۹**
۱-۱-۴- نمونه برداری خاک و ریشه ..... ۷۹
۲-۱-۴- جداسازی، خالص سازی و شناسایی مقدماتی جدایه های *Azospirillum* ..... ۸۰
۲-۴- بررسی مولفه های محرک رشد گیاه در جدایه های *Azospirillum* ..... **۸۷**
۱-۲- ۴- آزمون تثبیت نیتروژن ملکولی ($N_2$ Fixation) ..... ۸۷
۲-۲-۴- آزمون کمی توان تولید ایندول استیک اسید (IAA) ..... ۸۸
۳-۲-۴- آزمون توان حل فسفاتهای نامحلول ..... ۹۲
۱-۳-۲-۴- آزمون کیفی توان حل فسفاتهای معدنی ..... ۹۲
۲-۳-۲-۴- آزمون کیفی توان حل فسفاتهای آلی ..... ۹۷
۳-۳-۲-۴- آزمون کمی حل‌کنندگی فسفاتهای نامحلول معدنی ..... ۱۰۲
۴-۳-۲-۴- آزمون کمی حل‌کنندگی فسفاتهای نامحلول آلی ..... ۱۰۵
۳-۴- انتخاب بهترین جدایه‌ها بر اساس ویژگیهای PGPR از بین جدایه‌های *Azospirillum* ..... **۱۰۸**
۴-۴- نتایج تاثیر تلقیح جدایه‌های *Azospirillum* روی اجزای عملکرد در آزمونهای گلخانه‌ای ..... **۱۰۸**

۱-۴-۴- تاثیر تلقیح *Azospirillum* روی طول خوشه..... ۱۰۸
۲-۴-۴- تاثیر تلقیح *Azospirillum* بر روی تعداد خوشه در هر گلدان ..... ۱۰۹
۳-۴-۴- تاثیر تلقیح *Azospirillum* بر روی وزن هزار دانه ..... ۱۱۰
۴-۴-۴- تاثیر تلقیح *Azospirillum* بر روی تعداد دانه در هر گلدان..... ۱۱۰
۵-۴-۴- تاثیرتلقیح *Azospirillum* برروی تعداد پنجه..... ۱۱۱
۶-۴-۴- تاثیرتلقیح *Azospirillum* برروی ارتفاع گیاه..... ۱۱۱
۷-۴-۴- تاثیرتلقیح *Azospirillum* برروی وزن تر اندام هوایی ..... ۱۱۲
۸-۴-۴- تاثیرتلقیح *Azospirillum* برروی وزن خشک اندام هوایی ..... ۱۱۲
۹-۴-۴- تاثیرتلقیح *Azospirillum* برروی وزن تر ریشه ..... ۱۱۳
۱۰-۴-۴- اثرتلقیح *Azospirillum* برروی وزن خشک ریشه ..... ۱۱۳
۱۱-۴-۴- تاثیرتلقیح *Azospirillum* بر روی حجم ریشه ..... ۱۱۵
۵-۴- بررسی سه پارامتر مهم رشدی و عملکرد دانه..... ۱۱۵
**نتیجه‌گیری کلی و پیشنهادات..... ۱۲۲**
**فهرست منابع ..... ۱۲۵**
ضمایم
**چکیده (انگلیسی)**

## فهرست جداول

جدول ۲-۲ سطح زیر کشت شلتوک کشور در سال ۸۴..... ۵۰
جدول ۲-۲ سطح زیر کشت شلتوک در جهان، ایران و ده کشور عمده تولید کننده در سال ۲۰۰۳..... ۵۱
جدول ۳-۲ احتیاجات برنج نسبت به گرما ..... ۵۵
جدول ۱-۳ ترکیبات محیط کشت NFB و RC و PDA..... ۶۴
جدول ۲-۳ فرمولاسیون تست توان استفاده از گلوکز..... ۶۷
جدول ۳-۳ فرمولاسیون تست نیاز به بیوتین..... ۶۸

جدول ۴-۳ محیط کشت پیشنهادی رودریگوئز و همکاران (۲۰۰۴)..... ۷۰
جدول۵-۳ محیط کشت اسپربر اصلاح شده (۱۹۵۶)..... ۷۲
جدول ۶-۳ خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک گلدان استفاده شده در آزمایش گلخانه ..... ۷۵
جدول ۷-۳ نام ۱۰ جدایه آزوسپیریلومی، دو سطح کودی و دو رقم برنج..... ۷۶
جدول۱-۴ مکان های نمونه برداری جدایه های *Azospirillum*..... ۸۱
جدول ۲-۴ ویژگی های فنوتیپی و مورفولوژیکی جدایه های *Azospirillum* جدا شده از شالیزارها..... ۸۵
جدول ۳-۴ آزمون های تکمیلی برای شناسایی گونه های جنس *Azospirillum*..... ۸۶
جدول ۴-۴ دسته بندی ایزوله های جدا شده بر حسب گونه..... ۸۷
جدول ۵-۴ آزمون تثبیت کننده نیتروژن..... ۸۸
جدول ۶-۴ تجزیه واریانس قابلیت حل فسفات روی محیط رود ریگرئز..... ۹۳
جدول۷-۴ مقایسه میانگین حل فسفات روی محیط کشت پیشنهادی رودریگرئز (۲۰۰۴)..... ۹۶
جدول ۸-۴ قابلیت حل فسفات آلی روی محیط کشت اسپربر تغییر یافته..... ۹۸
جدول ۹-۴ تجزیه واریانس قابلیت حل فسفات روی محیط آلی فسفات..... ۹۸
جدول ۱۰-۴ مقایسه میانگین حل فسفات روی محیط آلی فسفات..... ۹۹
جدول ۱۱-۴ مقایسه میانگین حل فسفات روی محیط آلی فسفات..... ۱۰۰
جدول ۱۲-۴ توانایی حل کنندگی فسفات نامحلول معدنی در محیط اصلاح شده اسپربر..... ۱۰۳
جدول ۱۳-۴ توانایی حل کنندگی فسفات نامحلول آلی به صورت کمی در محیط اصلاح شده اسپربر..... ۱۰۷
جدول ۱۴-۴ تجزیه واریانس شاخص های رشدی دو رقم برنج در دو سطح کودی تلقیح شده با جدایه های *Azospirillum*..... ۱۲۰

## فهرست اشکال

**شکل ۱-۲ مکانیسم جذب *Azospirillum* به ریشه..... ۱۶**
**شکل ۲-۲ تاثیر *Azospirillum* بر روی ریشه در دو حالت تلقیح شده و نشده..... ۴۰**
**شکل ۱-۴ کلنی های *Azospirillum* بعد از ۹۶ ساعت رشد روی محیط RC..... ۸۲**
**شکل ۲-۴ گرفته شده از باکتریهای رشد کرده بر روی PDA..... ۸۳**
**شکل ۳-۴ جدایه های گرم منفی و متحرک در زیر میکروسکوپ معمولی با بزرگنمایی ۴۰..... ۸۴**

شکل ۴-۴ جدایه های منسوب به جنس ***Azospirillum*** در محیط **NFB** جامد بعد از ۳ روز.....۸۴

شکل ۵-۴ نمودار میزان تولید اکسین توسط جدایه ها در محیط فاقد تریپتوفان.....۸۹

شکل ۶-۴ نمودار میزان تولید اکسین توسط جدایه ها در محیط دارای تریپتوفان.....۹۰

شکل ۷-۴ نمودار تاثیر افزایش تریپتوفان و زمان انکوباسیون روی میزان اکسین سنتز شده توسط جدایه‌ها.....۹۱

شکل ۸-۴ ایجاد ناحیه شفاف اطراف کلنی در محیط رود ریگرئز (۲۰۰۴) توسط جدایه **R۳۰** بعد از ۴ روز.....۹۳

شکل۹ -۴ نمودار مقایسه میانگین قطر هاله به قطر کلنی حاصل از انحلال فسفات معدنی.....۹۴

شکل ۱۰-۴ نمودار نسبت قطر هاله به قطر کلنی حاصل از انحلال فسفات آلی.....۱۰۱

شکل ۱۱-۴ نمودار میزان انحلال فسفات نامحلول معدنی توسط بعضی ازجدایه ها در محیط اسپربر.....۱۰۲

شکل ۱۲-۴ نمودار میزان کاهش **pH** در محیط کشت مایع اسپربر توسط جدایه های ***Azospirillum***.....۱۰۴

شکل ۱۴-۴ نمودار میزان کاهش **pH** در محیط کشت مایع اسپربر.....۱۰۵

شکل ۱۵-۴ نمودار میزان انحلال فسفات آلی توسط بعضی از جدایه ها در محیط اسپربر.....۱۱۴

شکل ۱۶-۴ نمودار تاثیر باکتری بر روی وزن خشک ریشه در رقم ندا.....۱۱۴

شکل ۱۷-۴ نمودار مقایسه دو سطح کودی در سه پارامتر وزن خشک ریشه و اندام هوائی و عملکرد دانه...۱۶

شکل ۱۸-۴ نمودار مقایسه دو سطح کودی در سه پارامتر وزن خشک ریشه و اندام هوائی و عملکرد دانه.....۱۱۶

# فصل اول

# مقدمه

## مقدمه

با افزایش روز افزون جمعیت و ترقی سطح درآمد تقاضا برای خرید مواد غذایی روز به روز افزایش می‌یابد. از اینرو ضروری است که تولید مواد غذایی چندین برابر شود. تا زمانی که بشر با شکار و جمع‌آوری غذا ارتزاق می‌کرد نیازی به تفکر درباره طبیعت و ارزش خاکی که زیر پایش بود نداشت ولی همین که به جای جمع‌آوری غذا اقدام به کاشتن آن کرد و طبیعت خاک اثر زیادی در زندگیش پیدا کرد مجبور شد درباره خاک نیز تفکر کند. در آن موقع بشر فکر کرد که خاک زیر پایش بستری است برای رشد و نمو گیاه جائی است که می‌توان درآن بذری را نهاد که از آن گیاهی حاصل شود تا غذای او را تامین کند. این مفهوم خاک برای بشر وقتی پیدا شد که او وارد عصر انقلاب کشاورزی شد.

امروزه، درآغاز هزاره سوم، علی‌رغم بالا رفتن سطح دانش و فن‌آوری هنوز مسئله مهم جهان غذا می‌باشد. انسان کماکان با مشکلاتی چون گسترش قحطی، گرسنگی، سوء تغذیه و همچنین عدم اطمینان از دسترسی به غذای کافی روبرو است. در سالهای اخیر مفهوم توسعه پایدار در رابطه با حفظ و نگهداری منابع رایج شده است. پس از روبرو شدن جهان با بحرانهای آلودگی محیط زیست، تخریب لایه ازن، تغییرات آب و هوا و به دنبال آن افزایش گرمای اتمسفر، به طور روز افزونی این نظریه مورد تاکید و تائید جهانی قرار گرفت که توسعه پایدار را راهکاری است که می‌تواند نیازهای نسل‌های کنونی را تامین کند بدون آنکه نسل‌های آینده را از منابع و امکانات زیستی جهان محروم نماید *(حق‌نیا و همکاران، ۱۳۷۵)*. در هر حال، نیاز شدید به تامین مواد غذایی برای جمعیت رو به افزایش جهان از یک طرف و لزوم نیل به خودکفایی در امر تولیدات کشاورزی و بی‌نیازی از واردات و ایجاد امنیت غذایی از طرف دیگر ایجاب می‌کند تا در حد امکان میزان تولیدات کشاورزی در کشور و تولید بیشتر در واحد سطح افزایش داده شود. این امر نیز به جز از طریق تولید مقادیر بیشتر کود محقق نمی‌گردد *(ترشی و همکاران، ۱۳۷۶)*. در اکثر نقاط دنیا از جمله کشور ما با مصرف افراطی مواد شیمیائی برای دستیابی به عملکرد بالا در محصولات زراعی و جبران کمبود منابع باعث افزایش هزینه‌های تولید همراه با تخریب منابع خاکی و آبی و زیستی شده است.

امروزه از کود همچون ابزاری برای نیل به حداکثر تولید در واحد سطح استناد می‌شود منتها کود باید بتواند علاوه بر افزایش تولید و کیفیت محصولات کشاورزی را ارتقاء داده و ضمن آلوده نکردن محیط زیست مخصوصاً آبهای زیرزمینی، تجمع مواد آلاینده نظیر نیترات را نیز در اندام‌های مصرفی محصولات زراعی به حداقل ممکن کاهش و ضمن افزایش راندمان کودی

سلامتی انسان و دام را نیز تامین نماید. به کارگیری کودهای شیمیائی در بهبود حاصلخیزی خاک و افزایش بازده محصولات کشاورزی امری ضروری شناخته شده است. با وجودی که کود شیمیائی تنها منبع تامین کننده نیاز بخش کشاورزی به عناصر مغذی نیست و بخشی از این از طریق ذخایر طبیعی موجود خاک، مواد آلی، حیوانی و گیاهی برگردانیده شده به خاک و تثبیت ازت اتمسفری تامین می‌شود *(ملکوتی و همکاران، ۱۳۸۰)*.

مقدار کل نیاز به این نهاده برای تولید انواع محصولات زراعی و باغی بیشتر از چهار میلیون تن در سال به ارزش واقعی حدود چهار هزار میلیارد ریال برآورد شده است. در حال حاضر تولیدات داخلی انواع کودهای شیمیایی بالغ بر ۲/۵ میلیون تن درسال می‌باشد، به علاوه سالانه مجبور به وارد کردن بیشتر از ۱/۵ میلیارد تن کود شیمیایی به ارزش ۲۲۵ میلیون دلار از خارج کشور هستیم. از بین انواع کودهای شیمیایی میزان نیاز به کودهای نیتروژنه و فسفاته به ترتیب برابر ۲/۷ میلیون تن و ۱/۷ میلیون تن تخمین زده شده که مقام‌های اول و دوم را به خود اختصاص داده‌اند *(طرح جامع تولید، صادرات و واردات کودهای بیولوژیکی در دهه هشتاد، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور،۱۳۸۲)*.

مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی به خصوص ازته و فسفاته طی چند ساله اخیر و رعایت نکردن اصول ابتدایی دانش کشاورزی که در آن حفظ تعادل عناصرغذایی گیاه در خاک الزامی می‌باشد. خساراتی جبران ناپذیر را به ساختار تغذیه خاک و در نتیجه به کشاورزی کشور وارد نموده است. آلودگی آبهای سطحی و زیرزمینی، فشردگی و کاهش باروری و همچنین خصوصیات فیزیکی مثبت خاکها، کاهش کیفیت محصولات کشاورزی به ویژه محصولات باغی، جدی بودن تخریب محیط زیست در اثر استفاده نامتعادل از نهاده‌های کشاروزی به خصوص کود شیمیایی و نیز کاربرد روشهای غلط، همگی باعث شدند تا در بیانیه جهانی غذا (۱۹۹۶) از حاصلخیزی خاک به عنوان کلید تحقق امنیت جهانی غذا نام برده شود *(مانیون ، ۱۹۹۸)*. *واژه* انقلاب سبز[۱] در دهه ۱۹۶۰ به وجود آمد و نظام‌های کشاورزی[۲] از دهه ۱۹۷۰ سرچشمه گرفتند. لیکن دهه‌های ۱۹۸۰ و ۱۹۹۰ به عنوان دوران کشاورزی پایدار[۳] در نتیجه فشارهای اقتصادی و حساسیت نسبت به محیط زیست جلوگیری از تخریب زمین‌های زراعی یاد شده است *(حق‌نیا وکوچکی، ۱۳۷۵)*.

---

۱. Green revolution
۲. Farmhng system
۳. Agriculture Sustainable

امروزه در اکثر محافل علمی از نظام‌های زراعی سالم و بادوام از نظر اکولوژیکی و توسعه سیستم‌های پایدار کشاورزی به میان آمده است. تاکید بر کشاورزی پایدار از اینجا ناشی می‌شود که آگاهی ما نسبت به مشکلات روز به روز افزایش می‌یابد. محدودیتهای زمینهای قابل کشت دنیا، تخریب رو به افزایش خاک، کاهش سریع کیفیت محیط زیست، اثر گلخانه‌ای، وابستگی شدید به منابع غیرقابل تجدید و نیاز به حفظ منابع خاک برای استفاده دراز مدت در مقابل بهره‌کشی از خاک برای منعفت کوتاه مدت، همه این موارد باعث توجه بیشتر محققان در زمینه تولید محصولات زراعی شده است. آنچه مسلم است کشاورزی پایدار را نباید تنها به عنوان مجموعه‌ای از ارزش‌ها به حساب آورد بلکه باید آنرا نوعی بینش قلمداد نمود که در آن جنبه‌های مختلف اقتصادی، اجتماعی و حتی فلسفی نهفته است و ابعاد فرهنگی آن کمتر از جنبه‌های فنی و تکنیک مربوط نیست. کشاورزی پایدار یک فلسفه هدفدار در جهت ایجاد یک مسیر یا روش اکولوژیکی برای مدیریت منابع می‌باشد. هدفش برقراری تعادل بین ذخایر طبیعی خاک و نیازهای گیاهان زراعی در نظام‌های نوین مدیریت می‌باشد. در این نوع کشاورزی، تاکید بر تولید حداکثر هدف نبوده، بلکه استفاده بهینه از منابع و پایداری تولید در یک دوره طولانی مد نظر می‌باشد *(حق نیا و کوچکی، ۱۳۷۵)*.

انجمن علوم زراعی آمریکا نیز در سال ۱۹۸۸ تعریفی را برای کشاورزی پایدار ارائه کرد که کاربرد زیادی دارد. طبق این تعریف کشاورزی پایدار در دراز مدت باعث افزایش کیفیت محیط و منابع طبیعی می‌شود. غذا و پوشاک انسان را تامین می‌کند، از نظر اقتصادی پویاست و همچنین کیفیت زندگی کشاورز و کل جامعه را افزایش می‌دهد. سیستم پایدار کشاورزی در واقع باید از نظر اکولوژیکی مطلوب، از نظر اقتصادی سودمند و از نظر اجتماعی مورد قبول باشد. مهمترین عملیات و راهکارهایی برای ایجاد پایداری در کشاورزی شامل کم کردن حداقل عملیات خاکورزی از طریق اعمال شخم حداقل[۱] یا سیستم‌های بدون شخم[۲]، کشت مخلوط[۳]، استفاده از مالچ‌های به خصوص مالچ‌های گیاهی و زنده، تناوب زراعی، تلفیق دام با زراعت، مبارزه بیولوژیکی با مدیریت تلفیقی آفات[۴] با بیماریها و علف هرز، استفاده از کودهای آلی، استفاده ازکودهای بیولوژیکی است.

خاک از پیچیده‌ترین اکوسیستم‌های جهان خلقت می‌باشد. به طوری که علی رغم پیشرفت‌های بسیار چشمگیر بشر در زمینه علوم و فن‌آوری مختلف، به جرات می‌توان گفت که

---

۴. Minimum tillage
۵. No tillage
۶ Multiple cropping
۱. Pest Management integrated

هنوز برخورد دانشمندان و محققین سراسر دنیا با خاک به صورت جعبه سیاه[1] می‌باشد. قسمت عمده‌ای از این پیچیدگی را می‌توان به دلیل بخش زنده خاک دانست که دنیای اسرارآمیز و پیچیده‌ای از روابط بین موجودات و گیاه را در خود جای داده است. گنجینه‌های متنوع و عظیمی از رشته‌های گرانبهای DNA را برای نسل‌های آتی به ارمغان می‌برد. از پیچیدگی بخش زنده خاک همین بس که مطالعه فقط چند میلی‌متر از خاک اطراف ریشه، موضوع تحقیق صدها دانشمند در سراسر جهان می‌باشد. موجودات زنده بالاخص ریزجانداران خاکزی که به نحوی در افزایش قابلیت استفاده گیاه از عناصر غذایی، بهبود خواص فیزیکی و شیمیائی خاک و به طور کلی افزایش عملکرد گیاه نقش دارند، انتخاب شود و به صورت کود بیولوژیک[2] یا انواع مایه تلقیح[3] در اختیار زارعین قرار گیرد *(خاوازی وملکوتی، ۱۳۸۰)*.

یکی از عوامل موثر در برقراری پایداری در سیستم‌های زراعی که در جایگاه ویژه‌ای برخوردار گشته همین کودهای بیولوژیک می‌باشد. کودهای بیولوژیک منحصر به مواد آلی حاصل از کودهای دامی بقایای گیاهی و غیره اطلاق نمی‌شود، بلکه تولیدات حاصل از فعالیت ریزموجودات که در ارتباط با تثبیت نیتروژن یا فراهمی فسفر و یا عناصرغذایی در خاک فعالیت می‌کنند را نیز شامل می‌شود *(کوچکی، ۱۳۷۶؛ صالح راستین، ۱۳۷۷)*. این کودها درست در نقطه مقابل کودهای شیمیائی قرار دارند. در حالی که استفاده از کودهای بیولوژیکی بدون نگرانی از اثرات سوء زیست محیطی غالباً موجب بهبود شرایط فیزیکی ـ شیمیائی و بیولوژیک خاک شده، افزایش حاصلخیزی و باروری اراضی را به دنبال دارند. استفاده از کودهای بیولوژیک در کشاورزی از قدمت بسیار زیادی برخوردار است و در گذشته نه چندان دور تمام مواد غذایی مورد مصرف انسان با استفاده از چنین منابع ارزشمندی تولید می‌شده است، ولی بهره‌برداری علمی از این گونه منابع سابقه چندانی ندارد. علی‌رغم کاهش کاربرد کودهای بیولوژیک به علل مختلف طی چند دهه گذشته، به نظر می‌رسد جایگزینی تدریجی کودهای شیمیایی خصوصاً کودهای نیتروژنه و فسفاته با کودهای بیولوژیک به دلیل مزایای نسبی کودهای بیولوژیک و به علاوه ارزانی آن امری کاملاً اجتناب‌ناپذیر باشد. لذا یکی از مسائل مهمی که می‌تواند موضوع تحقیقی بسیاری از مراکز پژوهشی و دانشگاهی باشد. استفاده از این گونه ریزموجودات مفید به منظور نیاز غذایی و تحریک رشد گیاهان زراعی است.

---

۲ Black Box

۳. Biofertilizers

٤. Inoculum

گروهی از باکتریها که موجب افزایش رشد گیاه و عملکرد محصولات مهم زراعی می‌شوند اصطلاحاً ریزوباکتریهای محرک رشد گیاه PGPR[1] نامیده شده‌اند. این باکتریها قادرند از طریق مکانیسم‌های مختلف اثرات مثبتی را برای گیاهان اعمال نمایند. در میان این باکتریها، برخی به طور مستقیم موجب تحریک رشد گیاه می‌شوند. آنها این عمل را از طریق تولید و ترشح تنظیم‌کننده‌های رشد PGPRS[2] مثل اکسین‌ها، جیبرلین‌ها و سیتوکینین‌ها و یا از طریق فراهم نمودن عناصرغذایی مورد نیاز گیاه از جمله فسفر و یا نیتروژن انجام می‌دهند. برخی دیگر از انواع PGPR به طور ضمنی و با مکانیسم‌های غیرمستقیم سبب بازدارندگی از رشد باکتریها، قارچ و نماتدهای پاتوژن می شوند که اصطلاحاً به عنوان عامل بیوکنترل شناخته شده‌اند *(اسکروس و کلاپر، ۱۹۸۷)*. همچنین اثرات مفیدی که از سوی باکتریهای ریزوسفری به طور مستقیم بر رشد گیاه، اعمال می‌شوند مانند تولید فیتوهورمون‌ها، یونوفورها (سیدروفورها و...)، اسیدهای آلی، آنزیم‌های موثر در افزایش قابلیت جذب عناصر غذایی و ویتامین‌ها، گسترش گروه PGPR را وسعت بخشیدند *(کاپولنیک، ۱۹۹۱)*.

باکتریهای جنس آزوسپیریلوم به عنوان عامل محرک رشد گیاه PGPR شناخته شده است *(اوکان، ۱۹۹۴)*. همچنین این باکتریها جزء گروه باکتریهای تثبیت کننده نیتروژن مولکولی از انواع کودهای بیولوژیک است. این باکتریها علاوه بر توان قابل توجهی که برای بهبود رشد گیاهان میزبان خود نشان داده‌اند. به دلایل دیگری مانند وسعت انتشار جغرافیایی، طیف وسیع گیاهان میزبان، تنوع گونه‌ای و عمل بعضی از گونه‌ها به تنش‌های محیطی، بیش از سایر انواع مورد توجه و بررسی بوده‌اند و مایه تلقیح آنها به مرحله تولید تجاری رسیده است. استفاده از آزوسپیریلوم، علاوه بر کاهش مصرف کود نیتروژنی در حد ۳۵ ـ ۳۰ درصد، دارای اثرات مفید دیگری است که در مقایسه با مقدار مشابه کود نیتروژنی، می‌تواند سبب رشد بهتر گیاه تلقیح شده و افزایش مقدار محصول آن گردد *(بالدانی و دوبرینیر، ۱۹۸۸؛ کاپولنیک، ۱۹۹۱؛ کاپولنیک و اوکان، ۱۹۸۶)*. مثلاً تلقیح گیاهان گندم و سورگوم و ذرت با آزوسپیریلوم، باعث افزایش ۱۰ تا ۳۰ درصد گردید *(کاپولنیک، ۱۹۹۱)*. این تأثیر مفید عملکرد بیشتر به تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه مانند اکسین‌ها نسبت داده‌اند *(بوتو و زایم، ۱۹۸۹)*.

باکتریهای جنس آزوسپریلوم مواد مختلفی را ترشح می‌کنند که باعث تحریک رشد گیاه شده *(سولر و همکاران، ۲۰۰۳)* و از گسترش عوامل بیماریزا جلوگیری به عمل می‌آورد *(گلیک،*

---

۱..Plant Growth Promotring Rhizobacteria

۲. Plant Growth promoting Regulators.

*۱۹۹۵)*، بعلاوه افزایش جذب فسفر *(تورو و همکاران، ۱۹۹۸)*، تثبیت ملکولی نیتروژن (BNF[۱]) *(کاپولینک وهمکاران، ۱۹۸۱؛ مورانر و همکاران، ۲۰۰۳)* و اثرات متنوع باکتری‌های جنس آزوسپیریلوم می‌باشد. همچنین این جنس با همکاری دیگر باکتریها می‌تواند به انتشار و چرخه عناصر در خاک سرعت ببخشد *(راجندران و همکاران، ۲۰۰۴)*. در گیاه تلقیح شده با باکتری جنس آزوسپیریلوم معمولاً تغییراتی در مورفولوژی سیستم ریشه‌ای ایجاد می‌شود. طول ریشه‌های فرعی و تعداد انشعابات آنها و نیز تعداد و طول تارهای کشنده و انشعابات آنها افزایش پیدا می‌کند. افزایش سطح جذب ریشه‌ها موجب افزایش جذب آب و عناصر غذایی توسط گیاه می‌گردد *(اوکان و کاپرلنیک، ۱۹۸۶ )*.

برنج حدود دو سوم کالری مورد نیاز بیش از دو میلیارد نفر از جمعیت قاره آسیا را تامین می‌نماید. برنج بعد از گندم از لحاظ مقدار کل تولید دومین محصول استراتژیک کشور می‌باشد. در ایران نیز برنج برای تامین کالری مورد نیاز افراد کشت می شود *(قره یاضی و بهزاد ۱۳۶۸)*.

براساس آمار سال ۱۳۸۱، سطح زیر کشت برنج در کشور بالغ بر۶۱۱ هزار هکتار با متوسط عملکرد شلتوک ۴۷۲۴ کیلوگرم در هکتار بوده است و با متوسط عملکرد ۴/۸ تن در هکتار که در مقایسه با میانگین عملکرد کشورهای مختلف نظیر مصر نیز پائین‌تر می‌باشد. طبق آمار منتشره از سوی موسسه تحقیقات بین المللی برنج (IRRI) جمعیت ایران در سال ۱۴۰۰ به ۱۰۰ میلیون نفر خواهد رسید که تقریباً مصرف سرانه هر نفر حدود ۳۰ کیلوگرم برنج خواهد شد، نیاز کشور حدود ۳ میلیون تن در سال خواهد بود اما با اصلاح ساختار مدیریتی و جلوگیری از تغییر کاربری و یکپارچه‌سازی مزارع برنج، می توان عملکرد هکتاری برنج را تا حد کشور مصر (۸ تن شلتوک در هر هکتار) افزایش داد، که در اینصورت قسمت عمده‌ای از مشکلات تغذیه ای آن حل خواهد شد.

با توجه به اینکه چهار استان مازندران، گیلان، فارس و خوزستان بیش از ۸۷ درصد از برنج کشور را تولید می‌کنند. اگر بتوان عملکرد را از ۴/۸ تن در هکتار به ۶/۵ تن در هکتار رساند برای جمعیت فعلی دیگر نیازی به واردات برنج در کشور نخواهیم داشت. این روش در واقع همان افزایش تولید در واحد سطح است که با اصلاح و نظارت بر بعضی از عوامل مثل کوددهی قابل حصول است.

توقع بالای برنج در مصرف کودهای شیمیایی بویژه کودهای نیتروژنه و فسفانه و از طرفی اثرات سوء کاربرد غیراصولی این کودها که آلودگی‌های زیست محیطی و کاهش ارزش کیفی

---

۱. Biological Nitrogen Fixation