



<https://ijpb.ui.ac.ir/?lang=en>
Journal of Plant Biological Sciences
E-ISSN: 3041-9603
Vol. 17, Issue 3, No. 65, 2025
Document Type: Research Paper
Received: 30/09/2025 Accepted: 25/11/2025

The impact of nitrogen concentration on the physiological responses of rice seedlings after inoculation with *Azospirillum brasilense*

Mohammad Noori¹, Mahnaz Aghdasi¹ , Mohammad Hossein Arzanesh²

¹Department of Biology-Plant Physiology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Iran

²Department of Soil and Water Research, Golestan's Agricultural and Natural Resources Research Center, Gorgan, Iran

Abstract

Azospirillum is one of the most important plant growth-promoting bacteria, with the ability to fix nitrogen. The current study aimed to investigate the physiological responses of rice plants with different nitrogen concentrations when inoculated with *Azospirillum brasilense*. In this experiment, the growth and physiological responses of 21-day-old rice seedlings (*Oryza sativa* L., cv. Hashemi) were investigated after 4 weeks of treatment with different nitrogen levels, including complete nitrogen (N), half (N/2), fourth (N/4), and zero nitrogen (control) concentrations under two inoculated (AB) and non-inoculated (NI) conditions. The experiment was conducted in a completely randomized design with 4 replications. The current data showed that nitrogen concentration significantly affects all measured parameters in both AB and NI plants. The highest values of growth traits, biomass accumulation, photosynthetic pigments, soluble sugars, and antioxidant enzyme activities (catalase and peroxidase) were observed in plants treated with full nitrogen and inoculated with *A. brasilense*. These findings highlight the potential of *A. brasilense* to enhance nitrogen efficiency in agricultural crops. Meanwhile, our data showed that inoculation with *A. brasilense* can improve rice plant productivity, especially under optimal nitrogen conditions.

Keywords: *Azospirillum*, Bacteria, Inoculation, Nitrogen, Rice.

*Corresponding Author: m.ghdasi@gu.ac.ir



Introduction

Rice (*Oryza sativa*) is a monocotyledonous plant that belongs to the Poaceae family. Rice is a strategic crop and the primary food source for more than half of the world's population. The increase in rice cultivation areas in our country and the widespread use of chemical fertilizers have led to the emergence of various diseases. Today, the use of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) is considered an alternative to chemical fertilizers. These bacteria are present in the rhizosphere of plants and enhance plant growth in various ways, including increasing nutrient absorption, producing plant hormones, and protecting plants against pathogens. These bacteria enhance mineral nutrient uptake by stimulating root system development. A group of PGPRs is called endophytes. Endophytes are non-pathogenic bacteria that spend part of their life cycle within plant tissues. So far, various types of nitrogen-fixing endophytes have been identified and reported in the stems, roots, and seeds of rice.

Azospirillum is one of the most important plant growth-promoting bacteria, capable of fixing nitrogen. Recently, this bacterium has been used as a biofertilizer, especially in areas facing nitrogen deficiency. By fixing atmospheric nitrogen and converting it into a usable form, *Azospirillum brasilense* improves nitrogen efficiency and reduces demand for chemical fertilizers. The current study aimed to investigate the physiological responses of rice seedlings to different nitrogen concentrations when inoculated with *Azospirillum brasilense*.

Methods and Materials

In this experiment, *Azospirillum brasilense* was prepared from the Soil Biology Laboratory of the Agricultural Research and Education Center of Golestan province. Then, the bacteria were cultured and identified on a specific RC medium. After selecting a single colony of the desired bacteria, the bacteria were cultured on NFB liquid medium at 30 °C for 48 hours. Rice seeds of the Hashemi cultivar were obtained from the National Rice Research Institute (AML). After surface sterilization, the seeds were placed on moist filter paper at 29 °C for germination. Then, the 7-day-old seedlings were transferred to Yoshida culture medium under a photoperiod of 18 h day (33 °C) and 6 h night (22 °C), with a relative humidity of 71%. In the next step, 21-day-old rice seedlings were treated with Yoshida medium containing nitrogen levels: complete nitrogen (N), half nitrogen (N/2), quarter nitrogen (N/4), and zero nitrogen (control) under two inoculation conditions: inoculated (AB) and non-inoculated (NI). After 4 weeks of treatment, the roots of rice seedlings were collected, and various growth parameters and several biochemical factors were examined. The experiment was conducted in a completely randomized design with four replications.

Results and Discussion

Microscopic observations revealed that the bacteria first settled on the root epidermis and then entered the root cells. After passing through the epidermis, the bacteria penetrated the parenchyma layer and formed colonies. The results showed that small and large colonies, with single or scattered bacteria, were observed in the root cells. On the other hand, the current data showed that nitrogen concentration significantly affects all measured parameters in both AB and NI plants. The highest amount of root and shoot length, root fresh and dry weight, shoot dry weight, total dry and fresh weight, relative growth, soluble and total shoot sugar, chlorophyll b, and total chlorophyll were observed in the treatment with both full nitrogen concentration and inoculation with *A. brasilense*. Also, the present data revealed that seedlings inoculated with *Azospirillum* performed better than the non-inoculated samples.

Meanwhile, current data showed that catalase enzyme activity increased with increased nitrogen concentration (in both inoculated and non-inoculated conditions). However, catalase enzyme activity was higher in inoculated seedlings at all nitrogen levels, compared to non-inoculated seedlings. These data indicate that inoculation with *A. brasilense* increases oxidative stress tolerance in rice seedlings. This evidence suggests that this bacterium improves plant resilience to treatment with different nitrogen concentrations and enhances their ability to scavenge reactive oxygen species (ROS) produced during nitrogen metabolism. The present data showed that peroxidase enzyme activity increased with higher nitrogen concentrations, in both inoculated and non-inoculated conditions.

Conclusion

The present results showed that inoculating rice seedlings with *A. brasilense* can significantly enhance their physiological responses. At all nitrogen concentrations, treatment improved the growth of inoculated plants, which showed higher protein content and enzyme activity compared to non-inoculated seedlings. These findings highlight the potential of *A. brasilense* to enhance nitrogen efficiency in crops. Meanwhile, our data showed that inoculation with *A. brasilense* can improve rice seedling productivity, especially under optimal nitrogen conditions.

بررسی اثر غلظت نیتروژن بر پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاه برنج تلقیح شده با آزوسپریلوم برازیلینس (*Azospirillum brasilense*)

محمد نوری^۱، مهناز اقدسی^{۱*} , محمد حسین ارزانش^۲

^۱گروه زیست‌شناسی- فیزیولوژی گیاهی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران

^۲گروه تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، گرگان، ایران

چکیده

باکتری آزوسپریلوم (*Azospirillum*) یکی از مهم‌ترین باکتری‌های محرک رشد گیاهان است که توانایی تثبیت نیتروژن را دارد. هدف از پژوهش حاضر بررسی پاسخ‌های فیزیولوژیک گیاهان برنج در تیمار همزمان با غلظت‌های مختلف نیتروژن و تلقیح با *Azospirillum brasilense* است. در این آزمایش پاسخ‌های رشدی و فیزیولوژیک گیاهچه‌های ۲۱ روزه برنج (*Oryza sativa* L.) رقم هاشمی پس از چهار هفته تیمار با سطوح مختلف نیتروژن کامل (N)، نصف (N/2)، یک چهارم (N/4)، و نیتروژن صفر (شاهد) تحت دو شرایط تلقیح شده (AB) و تلقیح نشده (NI) با *Azospirillum brasilense* مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی و در ۴ تکرار انجام شد. داده‌های حاضر نشان دادند غلظت نیتروژن به طور قابل توجهی بر همه فاکتورهای اندازه‌گیری شده در هر دو گروه AB و NI تأثیر دارد. بالاترین مقدار طول ریشه و بخش هوایی، وزن تر و خشک ریشه، وزن خشک بخش هوایی، وزن خشک و تر کل، رشد نسبی، قند محلول و کل بخش هوایی، کلروفیل b، کلروفیل کل و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز در تیمار با غلظت کامل نیتروژن و در نمونه‌های تلقیح شده با آزوسپریلوم مشاهده شد. این نتایج نشان داد گیاهچه‌های تلقیح شده AB عملکرد نسبتاً بهتری در مقایسه با گروه NI نشان دادند. پژوهش حاضر پتانسیل *A. brasilense* را در افزایش کارایی نیتروژن در محصولات کشاورزی برجسته می‌سازد.

واژه‌های کلیدی: آزوسپریلوم، برنج، باکتری، تلقیح، نیتروژن

*Corresponding Author: m.aghdasi@gu.ac.ir



مقدمه

امروزه میکروارگانیزم‌ها نقش مهمی را در کشاورزی پایدار ایفا می‌کنند. میکروارگانیزم‌ها با افزایش جذب مواد مغذی، مقاومت در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، بهبود سلامت خاک و حمایت از تنوع زیستی به عملکرد اکوسیستم کمک می‌کنند (Elsheikh et al., 2021).

اندوفیت‌ها میکروارگانیزم‌هایی هستند که بدون ایجاد بیماری در بافت‌های گیاهی زندگی می‌کنند. این موجودات با افزایش جذب مواد مغذی، تولید هورمون‌های گیاهی و محافظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا، رشد گیاه را افزایش می‌دهند (Prasad, 2023). باکتری‌های اندوفیت به کمک سازوکارهای مختلف رشد گیاه را افزایش می‌دهند. این باکتری‌ها فیتوهورمون‌هایی مانند اکسین، جبرلین و سیتوکینین تولید می‌کنند که رشد ریشه را تحریک کرده و جذب مواد مغذی را بهبود می‌بخشند. این هورمون‌ها با توسعه سیستم ریشه، گیاهان را قادر می‌سازند تا به آب و مواد مغذی بیشتری از خاک دسترسی پیدا کنند. علاوه بر این، اندوفیت‌ها می‌توانند فسفر را حل کرده و این ماده مغذی حیاتی را در دسترس گیاهان قرار دهند. آنها همچنین نیتروژن اتمسفر را که برای رشد گیاه ضروری است، تثبیت می‌کنند (Adeleke et al., 2021). باکتری‌های اندوفیت همچنین سبب ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاهان شده و در دفع پاتوژن‌ها و آفات نقش دارند که این امر نیاز به آفت‌کش‌های شیمیایی را کاهش داده و به کشاورزی پایدار کمک می‌کنند (Elsheikh et al., 2021; Prasad, 2023).

باکتری *Azospirillum brasilense* یک باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن شاخص است که به طور گسترده به علت نقش آن در تقویت رشد گیاهان، به ویژه در غلاتی مانند برنج، ذرت و گندم شناخته شده است. این باکتری به عنوان یک ریزوباکتری محرک رشد گیاه یا Plant (PGPR) Growth promoting hizobacteria طبقه‌بندی می‌شود که بر همکنش‌های مفیدی را با ریشه گیاهان جهت رشد و

افزایش جذب مواد مغذی و مقاومت در برابر تنش ایجاد می‌کند. به تازگی از این باکتری به عنوان کود زیستی، به ویژه در مناطقی که با کمبود نیتروژن مواجه هستند، استفاده می‌شود. توسط تثبیت نیتروژن اتمسفر و تبدیل آن به شکل قابل استفاده توسط *A. brasilense*، کارایی مصرف نیتروژن در گیاهان بهبود یافته و نیاز به کودهای شیمیایی کاهش می‌یابد (Zeffa et al., 2019).

نیتروژن (N) یکی از حیاتی‌ترین مواد مغذی برای برنج است که فرآیندهای کلیدی مانند سنتز پروتئین، تجمع زیست‌توده و رشد کلی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهد. از نظر فیزیولوژیکی، نیتروژن مستقیماً بر روی رشد ریشه و اندام هوایی و همچنین توانایی گیاه در جذب سایر مواد مغذی تأثیر می‌گذارد (Xin et al., 2019). تثبیت زیستی نیتروژن یا Biological Nitrogen Fixation (BNF) فرآیندی است که در آن باکتری‌هایی مانند *A. brasilense* نیتروژن اتمسفر (N_2) را به آمونیاک (NH_3) تبدیل می‌کنند. این فرآیند برای گیاهان مختلف از جمله برنج از اهمیت خاصی برخوردار است. پژوهش‌ها نشان داده است که *A. brasilense* می‌تواند جذب نیتروژن را به طور قابل توجهی در برنج افزایش دهد و در نتیجه منجر به عملکرد بالاتر و بهبود کارایی مصرف نیتروژن شود (Thomas et al., 2019).

پژوهشگران نشان داده‌اند تلقیح گیاه برنج با *A. brasilense* سبب افزایش زیست‌توده بخش هوایی در مراحل حیاتی رشد مانند تولید برگ و پرکردن دانه شود (García et al., 2010). همچنین نتایج برخی دیگر از پژوهشگران نشان داده که تلقیح همزمان گیاهانی مانند برنج، گوجه فرنگی و فلفل قرمز با باکتری‌هایی مانند *Methylobacterium oryzae* و *A. brasilense* سبب افزایش غلظت نیتروژن و فسفر در این گیاهان شده و همچنین فعالیت آنزیم‌های نیتروژناز و فسفاتاز را افزایش می‌دهد (Madhaiyan et al., 2010). پژوهش‌های انجام شده بر روی گیاه ذرت نشان داده که

(White & Brown, 2010). هدف از پژوهش حاضر بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیتروژن بر پاسخ‌های فیزیولوژیکی گیاهان برنج تلقیح شده با باکتری اندوفیت *A. brasilense* است. این پژوهش به بررسی چگونگی تأثیر سطوح مختلف نیتروژن بر رشد، فعالیت‌های آنزیمی و فاکتورهای بیوشیمیایی در گیاهان برنج، با تمرکز بر نقش بالقوه *A. brasilense* در تخفیف اثرات ناشی از کمبود نیتروژن می‌پردازد.

مواد و روش‌ها

خالص‌سازی و آماده‌سازی کشت باکتری: به این منظور، باکتری‌ها به شکل یک کلنی منفرد از روی محیط کشت اختصاصی RC جامد شناسایی شده و برای خالص‌سازی در محیط کشت مایع Nfb غنی شده با مقدار یک گرم در لیتر کلرور آمونیوم، در انکوباتور (۳۰ درجه سانتی‌گراد) رشد داده شدند. پس از ۴۸ ساعت، باکتری‌ها بر اساس تولید هاله سفید-رنگ (که نشان دهنده رشد آنها است) شناسایی و به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی حذف شده و سپس توده باکتری توسط محلول بافر فسفات نمکی (شامل ۰/۲ گرم KH_2PO_4 ، ۱/۱۵ گرم K_2HPO_4 و ۷/۵ گرم NaCl در ۱۰۰۰ سی‌سی آب با $\text{pH}=7/2$) دو بار شستشو شدند. سپس با افزودن بافر فسفات نمکی به توده باکتری جذب نوری محلول در طول موج ۵۴۰ نانومتر برابر ۱/۰۵ تنظیم شد. در این وضعیت غلظت باکتری 10^9 CFU/ml است، که با رقیق کردن مداوم این محیط و مطابقت با معیار مک فارلند، غلظت 10^6 CFU/ml بدست آمد. برای اطمینان، رقت‌هایی از غلظت‌های فوق تهیه شده و بر روی محیط کشت RC کشت شدند. شمارش کلنی و ضرب تعداد آن در ضریب رقت، غلظت 10^6 CFU/ml را تأیید کرد.

کشت بذر و تولید گیاهچه: بذر برنج (*Oryza sativa* L. رقم هاشمی از موسسه تحقیقات برنج کشور (آمل) تهیه

تیمار توام کود نیتروژن به همراه تلقیح با *A. brasilense* سبب افزایش رشد، محتوای کلروفیل و فعالیت آنزیم‌های کلیدی می‌شود. این پژوهش نشان داد تلقیح گیاهان با *A. brasilense* زمانی که با تیمار کود نیتروژن همراه شود، رشد گیاه و سلامت خاک را افزایش می‌دهد (Morais et al., 2021). نتایج پژوهش‌های انجام شده بر روی گیاه گندم تلقیح شده با *A. brasilense* که به طور همزمان با سه سطح مختلف کود نیتروژن نیز تیمار شده بودند نشان داد که تلقیح سبب افزایش جذب نیتروژن، فعالیت آنزیم نترات ردوکتاز و گلوتامین سنتتاز و محتوای کلروفیل شده است. همچنین این پژوهشگران نشان دادند که حتی در گیاهانی که با سطوح پائین نیتروژن تیمار شده بودند، تلقیح باکتری سبب افزایش رشد در این گیاهان می‌شود (Silveria et al., 2016). سایر پژوهش‌ها نیز نشان دادند تیمار توام غلظت‌های مختلف نیتروژن و تلقیح با *A. brasilense* بر رشد گیاه و تبادل گاز در گیاه ذرت تأثیر دارد. نتایج این پژوهش نشان داد غلظت‌های بالاتر نیتروژن در ترکیب با تلقیح باکتریایی، فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای و شاخص‌های رشد گیاه مانند قطر ساقه و سطح برگ را به طور قابل توجهی بهبود می‌بخشد (Palheta, 2021). از سوی دیگر، نتایج پژوهش‌های دیگر پژوهشگران نیز نشان داد که تلقیح توام گیاهچه‌های برنج با باکتری *A. brasilense* به همراه تیمار هورمونی سبب افزایش شاخص‌های رشدی در گیاه برنج می‌شود (Sharifalsadat et al., 2023).

برنج یکی از مهمترین محصولات کشاورزی در سراسر جهان است که بیش از نیمی از جمعیت جهان از آن تغذیه می‌کنند. قاره آسیا بیش از ۹۰ درصد از تولید جهانی برنج را به خود اختصاص داده است (Fukagawa & Ziska, 2019). برنج مانند همه محصولات زراعی برای رشد، نمو و عملکرد مناسب نیاز به تأمین متعادل از عناصر درشت مغذی و ریز مغذی دارد. نیتروژن یک ماده مغذی حیاتی برای رشد و عملکرد برنج است. این عنصر برای رشد برگ و تشکیل کلروفیل ضروری بوده و در فتوسنتز نقش دارد

نمونه‌ها نمونه‌ها با میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتال (BH₂, Olympus, Japan) با بزرگنمایی ۱۰۰× مورد بررسی و عکس‌برداری شدند.

اندازه‌گیری وزن خشک و تر نمونه‌ها: پس از نمونه‌برداری، وزن خشک و تر ریشه و اندام هوایی در کلیه تیمارها به طور جداگانه اندازه‌گیری شد. برای تعیین وزن تر نمونه‌ها با ترازو توزین شدند و برای تعیین وزن خشک نمونه‌ها در دستگاه آون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت سه روز خشک شده و مجدداً با ترازو توزین شدند.

اندازه‌گیری سرعت رشد نسبی: سرعت رشد نسبی گیاه بر اساس وزن خشک کل در روز و با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$PGR = (\ln W_2 - \ln W_1) / (T_2 - T_1)$$

که در آن PGR سرعت رشد نسبی، W_2 وزن خشک نهایی بعد از تیمار، W وزن خشک گیاه یک روز بعد از تیمار و T نشان‌دهنده روزهای تیمار در روزهای ۱ و ۲۸ است.

سنجش قندهای محلول: سنجش قندهای محلول به روش (McCready et al. 1950) صورت گرفت. در ابتدا به ۰/۰۵ گرم از پودر خشک نمونه‌ها پنج میلی لیتر اتانول ۷۰٪ اضافه و به مدت یک هفته در یخچال نگهداری شد. سپس عصاره موردنظر به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. از سوپرناتانت (محلول بالایی) برای سنجش قندهای محلول استفاده شد. در نهایت طول موج نمونه‌ها در ۴۸۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شده و مقدار قند محلول نمونه‌ها توسط منحنی استاندارد گلوکز و براساس میلی گرم بر گرم وزن خشک گیاه محاسبه شد.

پروتئین محلول: ابتدا مقدار ۰/۱ گرم از بافت تر ریشه در هاون چینی با دو میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار با ۶/۸ = pH هموژن شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور

شد. سپس بذرها با آب ژاول ۳٪ به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن با اتانول ۹۶٪ به مدت ۳۰ ثانیه به خوبی ضدعفونی شدند. پس از ۳ بار شستشو با آب مقطر استریل، بذرها بر روی کاغذ صافی مرطوب در دمای ۲۹ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند تا جوانه زنی صورت گیرد. پس از انتقال گیاهچه‌های ۷ روزه به محیط کشت یوشیدا (Yoshida & Coronel, 1975)، در اتاق کشت با درجه حرارت حداقل و حداکثر در شب و روز به ترتیب ۲۲ و ۳۳ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۷۰ درصد و $umolm^{-2}s^{-1} 720$ Photosynthetic photon folx با طول موج بین ۴۰۰-۷۰۰ نانومتر نگهداری شدند. به طور روزانه pH محلول غذایی یوشیدا بر روی ۰/۲ ± ۶ تنظیم و در پایان هر هفته محلول‌های غذایی تعویض شدند. گیاهچه‌ها پس از دو هفته آماده تلقیح با باکتری *A. brasilense* شدند.

تلقیح باکتری: در ادامه گیاهچه‌های (۲۱ روزه) از محیط کشت یوشیدا خارج و در سوسپانسیون حاوی *A. brasilense* با غلظت ۱۰۰ باکتری در هر میلی لیتر قرار داده شدند. پس از ۲۴ ساعت مجدداً گیاهچه‌ها به محیط کشت یوشیدا حاوی غلظت‌های مختلف نیتروژن (کامل، یک دوم، یک چهارم و فاقد نیتروژن یا شاهد) منتقل شدند. منبع اصلی نیتروژن در محیط کشت یوشیدا نیترات آمونیوم است که در این آزمایش جهت بررسی اثر غلظت‌های مختلف نیتروژن از غلظت‌های مختلف نیترات آمونیوم به صورت کامل، یک دوم، یک چهارم و بدون نیترات آمونیوم (شاهد یا کنترل) در محیط کشت استفاده شد. پس از چهار هفته رشد در شرایط اتاقک کشت، گیاهچه‌ها برداشت شده و فاکتورهای مختلف رشد و بیوشیمیایی مورد بررسی قرار گرفتند.

مشاهدات میکروسکوپی: برای اطمینان از ورود باکتری به ریشه، رنگ آمیزی ساده آنیلین بلو انجام شد. جهت انجام آن ریشه گیاهچه‌ها به مدت ۵ دقیقه در آب مقطر قرار داده شده و سپس با آنیلین بلو ۰/۰۵ به مدت ۳ الی ۵ دقیقه رنگ آمیزی شدند. پس از سه بار شستشو با آب مقطر،

مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با ۶/۸ pH، آب اکسیژنه ۱۵ میلی مولار اضافه شد.

فعالیت آنزیم پراکسیداز محلول نیز در مد سینتیک و در طول موج ۴۷۱ نانومتر اندازه گیری شد. در این آزمایش معرف مورد نیاز گایاکول است. جهت انجام کار، به ۵۱ میکرولیتر عصاره آنزیمی مقدار ۳ میلی لیتر مخلوط واکنش شامل بافر فسفات ۲۵ میلی مولار (pH= ۶/۸)، گایاکول ۲۱ میلی مولار، آب اکسیژنه ۴۱ میلی مولار اضافه شد. در نهایت فعالیت آنزیمی (پراکسیداز و کاتالاز) براساس معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{Activity (U/mL)} = (\Delta A / (\varepsilon \times d)) \times V$$

که در این معادله ΔA برابر با تغییر جذب نور در دقیقه، ε برابر با ضریب خاموشی مولی گایاکول، d برابر با طول مسیر نور (معمولاً ۱ سانتی متر) و V برابر با حجم نهایی مخلوط واکنش (بر حسب میلی لیتر) است.

اندازه گیری فسفر و نیتروژن

عصاره گیری: ابتدا مقدار ۱ گرم از نمونه های پودر شده را در بوته های چینی ریخته و سپس به مدت ۴-۱۲ ساعت در کوره ی الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی گراد سوزانده شده تا به خاکستر تبدیل شوند. پس از سرد شدن کامل نمونه ها، آب مقطر به همراه ۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال به خاکستر به آن اضافه شد. نمونه ها به مدت نیم ساعت در حمام آبی در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شدند و سپس محتویات بوته به بالن ژوژه ۵۰ میلی لیتری منتقل و با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شدند. در انتها نمونه ها توسط کاغذ واتمن ۴۲ صاف شده و در ظروف پلاستیکی کوچک درب دار در یخچال تا زمان مصرف نگهداری شدند (Ugulu, 2015).

برای اندازه گیری فسفر، ۵ میلی لیتر عصاره گیاهی به یک فلاسک ۲۵ میلی لیتری منتقل و به آن پنج میلی لیتر محلول آمونیوم وانادات اضافه شد. مقدار جذب نمونه ها توسط

در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتیفریوژ شد. از فاز بالایی عصاره به دست آمده برای اندازه گیری پروتئین محلول به روش Bradford (1976) و توسط رنگ کوماسی برلیانت بلو انجام شد. در این آزمایش مقدار جذب نمونه ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه گیری شد. در ادامه مقدار پروتئین محلول نمونه ها توسط منحنی استاندارد آلومین محاسبه شد.

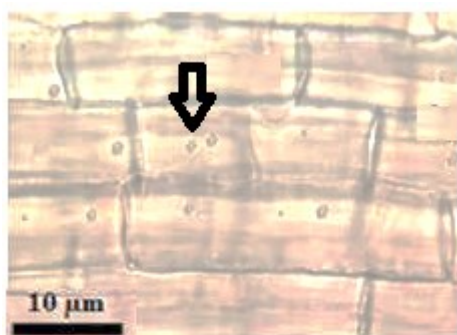
پروتئین کل: استخراج پروتئین کل توسط روش مارک-ول انجام شد (Markwell et al., 1981). در این روش مقدار ۰/۰۵ گرم بافت تر ریشه با ۱ میلی لیتر بافر تریس ۱۰۰ میلی مولار با pH=۹ حاوی ۱ EDTA ۱ میلی مولار، ۱ PMSF ۱ میلی مولار، Triton ۰/۱ درصد و PVPP ۰/۰۶ درصد در هاون چینی سرد سائیده شد و در ۱۵۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره پروتئینی استخراج شده با ۳ میلی لیتر معرف مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در درجه حرارت اتاق قرار داده شد. در ادامه مقدار ۳۰۰ میکرولیتر از معرف فولین رقیق شده به آن اضافه و به شدت ورتکس شد. پس از ۴۵ دقیقه جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر خوانده شد. در این آزمایش منحنی استاندارد توسط سرم آلومین رسم شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز

تهیه عصاره آنزیمی: مقدار ۰/۰۵ گرم از بافت ریشه در یک هاون چینی سرد (که بر روی ظرف یخ قرار داده شده بود) با دو میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ مولار (pH= ۶/۸) سائیده شده و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتیفریوژ شد. از فاز رویی برای اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز استفاده شد (Kar & Mishra, 1976).

اندازه گیری فعالیت کاتالاز در مد سینتیک و در طول موج ۲۴۰ نانومتر انجام شد (Maehly & Chance, 1954). جهت این کار، به ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی، سه میلی لیتر

تشکیل دادند. در نهایت کلنی‌های کوچک و بزرگ و با آرایش منفرد و پراکنده از باکتری‌ها در سلول‌های ریشه مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- تشکیل کلنی باکتریایی در ریشه گیاه برنج تلقیح یافته با باکتری *A. brasiliensis* بعد از ۲۴ ساعت

Figure 1- Colony formation in rice root inoculated with *Azospirillum brasiliensis* after 24 hours

فاکتورهای رشد

بررسی و تحلیل داده‌های به دست آمده نشان داد که اثر تیمار غلظت‌های مختلف نیتروژن بر صفات رشدی مورد بررسی معنی‌دار است. علاوه بر این، با افزایش غلظت نیتروژن در محیط کشت، صفات مورد بررسی افزایش معنی‌داری را در مقایسه با نمونه شاهد نشان دادند. بالاترین مقدار صفات رشدی اندازه‌گیری شده در تیمار با نیتروژن کامل (N) مشاهده شد. همچنین کمترین مقدار فاکتورهای رشد در نمونه شاهد (محیط کشت فاقد نیتروژن) مشاهده شد. از سوی دیگر، این نتایج نشان داد در تیمار شاهد تلقیح گیاهچه‌ها تحت آزوسپریلوم (AB)، سبب افزایش معنی‌دار در فاکتورهای رشد نشده است. همچنین بررسی داده‌ها در سایر نمونه‌ها نیز نشان داد که تفاوت معنی‌داری در مقدار فاکتورهای رشد در نمونه‌های تلقیح شده با آزوسپریلوم در مقایسه با نمونه تیمار نشده در همان غلظت نیتروژن تیمار شده وجود ندارد. بهترین مقدار فاکتورهای رشد در تیمار غلظت کامل نیتروژن و در نمونه‌های تلقیح شده با آزوسپریلوم مشاهده شد (جدول ۱).

دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. همچنین مقدار فسفر توسط منحنی استاندارد فسفات پتاسیم محاسبه شد (Olsen & Wateanabe, 1963).

نیتروژن کل: در این توسط اسید سولفوسالسیلیک غلیظ، کل ترکیبات حاوی نیتروژن موجود در بافت‌های گیاهی، در اثر حرارت و مجاورت با کاتالیزور به سولفات آمونیوم تبدیل شده و سپس با تقطیر مخلوط حاوی سولفات آمونیوم و در مجاورت سود ۱۰ نرمال، گاز آمونیاک متصاعد می‌شود که بعد از سرد شدن توسط اسید بوریک جمع‌آوری شده و با استفاده از یک اسید رقیق‌تیر شد. حجم اسید مصرفی متناسب با مقدار نیتروژن موجود در نمونه‌های گیاهی است (Kjeldahl, 1983).

رنگیزه‌های فتوسنتزی: ابتدا پنج گرم بافت تازه گیاهی در هاون با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰٪ هموژن و سپس مخلوط به دست آمده به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانتیفریوژ شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۴۸۰، ۵۱۰، ۶۴۵ و ۶۶۳ نانومتر خوانده و مقدار رنگیزه‌ها محاسبه شد (Arnon, 1949).

تحلیل آماری: در این پژوهش کلیه سنجش‌ها در ۴ تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم افزار SPSS 16 با آزمون ANOVA دو طرفه (کمترین تفاوت معنی‌دار LSD) با سطح معنی‌داری $P > 0.05$ انجام شد. علاوه بر این، از نرم افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده شده است.

نتایج

مشاهدات میکروسکوپی

نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپی نشان داد که ابتدا باکتری‌ها در سطح لایه‌ی اپیدرم ریشه مستقر شده و پس از آن باکتری‌ها به درون سلول‌های ریشه راه یافتند. پس از عبور از لایه اپیدرم، باکتری‌ها به لایه پارانشیم نفوذ کرده و کلنی

فاکتورهای بیوشیمیایی

نتایج حاصل از اندازه گیری مقدار قند محلول در اندام هوایی گیاهچه‌های برنج هاشمی تلقیح شده و تلقیح نشده با *A. brasilense* در تیمار با غلظت‌های مختلف نیتروژن (نیتروژن کامل، یک دوم نیتروژن و یک چهارم نیتروژن) نشان داد که سطوح قند با افزایش غلظت نیتروژن در هر دو تیمار تلقیح یافته و تلقیح نشده افزایش یافته است (شکل ۲). همچنین نتایج نشان داد گیاهچه‌های در شرایط تلقیح یافته محتوای قند بالاتری نسبت به گیاهچه‌های تلقیح نشده داشتند. از سوی دیگر، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که در تیمار با غلظت یک چهارم نیتروژن ($N/4$) مقدار قند محلول در هر دو نمونه تلقیح شده و تلقیح نشده اختلاف معنی داری را با یکدیگر نشان نمی‌دهند. بالاترین مقدار قند محلول ($6/53$ میلی گرم در هر گرم وزن تر) در گیاهچه‌های تیمار شده با نیتروژن کل و در تلقیح با باکتری مشاهده شد (شکل ۲A).

نتایج حاصل از بررسی مقدار قند محلول در ریشه در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف نیتروژن در شرایط تلقیح شده و تلقیح نشده نشان داد که مقدار قند محلول در ریشه گیاهچه‌ها با افزایش غلظت نیتروژن در هر دو گروه افزایش می‌یابد. همچنین نتایج حاضر نشان داد که اختلاف معنی داری در غلظت‌های تیمار شده در ریشه گیاهچه‌های تلقیح شده نسبت به گیاهچه‌های تلقیح نشده وجود دارد. همچنین با افزایش غلظت نیتروژن، مقدار قند محلول در نمونه‌ها افزایش نشان داد. از سوی دیگر، در بالاترین غلظت نیتروژن به کار رفته (N) در بین دو گروه تلقیح شده و تلقیح نشده تفاوت معنی داری دیده نمی‌شود. آنالیز بیشتر نتایج نشان داد که در گروه کنترل، مقدار قند محلول در ریشه‌ی گیاهچه‌های تلقیح شده بالاتر از نمونه

تلقیح نشده بوده و تفاوت معنی داری را نسبت به یکدیگر نشان می‌دهند. داده‌های حاضر نشان داد که بالاترین مقدار قند محلول ($8/98$ میلی گرم در هر گرم وزن تر) در گیاهچه‌های تیمار شده با نیتروژن کل و در تلقیح با باکتری مشاهده شد. پائین‌ترین مقدار قند محلول ($0/85$ میلی گرم در هر گرم وزن تر) نیز در تیمار شاهد و در نمونه‌های تلقیح نشده مشاهده شد (شکل ۲B).

بررسی مقدار قند کل در اندام هوایی گیاهچه‌هایی که در تیمار با غلظت‌های مختلف نیتروژن قرار گرفته بودند، نشان داد که با افزایش غلظت نیتروژن در محیط کشت مقدار قند کل در اندام هوایی گیاهچه‌ها افزایش یافت. از سوی دیگر، در تیمار شاهد و نیز نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های یک چهارم ($N/4$) و نصف ($N/2$) تفاوت معنی داری بین نمونه‌های تلقیح شده با گیاهچه‌های تلقیح نشده با باکتری وجود ندارد. بالاترین مقدار قند کل در نمونه‌هایی که به طور همزمان با نیتروژن کامل (N) و باکتری تلقیح شده‌اند مشاهده شد. در این آزمایش بالاترین مقدار قند کل ($17/65$ میلی گرم در هر گرم وزن تر) در گیاهچه‌های تیمار شده با نیتروژن کل و در تلقیح با باکتری مشاهده شد (شکل ۲C). اندازه گیری و بررسی مقدار قند کل ریشه در گیاهچه‌های برنج هاشمی تیمار شده با غلظت‌های مختلف نیتروژن نشان داد که با افزایش غلظت نیتروژن مقدار قند کل در ریشه گیاهچه‌ها نیز افزایش پیدا می‌کند (شکل ۲D). همچنین نتایج نشان دادند ریشه گیاهچه‌های تلقیح شده در مقایسه با ریشه گیاهچه‌های تلقیح نشده دارای مقدار قند کل بیشتری هستند. بر اساس نتایج حاضر، تفاوت معنی داری بین نمونه‌های تلقیح شده و تلقیح نشده در هر غلظت از نیتروژن تیمار شده وجود ندارد (شکل ۲D).

جدول ۱- مقایسه اختلاف میانگین صفات رشد در گیاهچه‌های برنج رقم هاشمی (*Oryza sativa*) در تیمار با غلظت‌های مختلف نیتروژن و تلقیح با باکتری آزوسپریلیوم برازیلنس (*Azospirillum brasilense*). نتایج میانگین ۴ تکرار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ توسط آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار (LSD) نشان نمی‌دهند. Ctrl: کنترل؛ N/4: یک چهارم غلظت نیتروژن؛ N/2: نیمی از غلظت نیتروژن؛ N: غلظت نیتروژن کامل؛ AB: در شرایط تلقیح یافته؛ NI: در شرایط تلقیح نشده.

Table 1- Mean comparison of the growth parameters in rice seedlings (Hashemi cultivar) in treatment with different concentrations of Nitrogen and inoculation with *Azospirillum brasilense*. The results are the average of 4 replicates. Different letters show significant differences according to LSD test at $P \leq 0.05$. Ctrl: Control, N/4: ¼ Nitrogen concentrations, N/2: ½ Nitrogen concentrations, N: Full Nitrogen concentration, AB: Inoculated with *Azospirillum brasilense*, NI: Without Inoculation.

Growth parameters	AB/NI	N	N/2	N/4	Ctrl
Root length	AB	12/92±0/01 ^a	11/43±0/66 ^{bc}	9/64±0/67 ^c	6/05±0/40 ^{de}
	NI	10/48±0/06 ^{ab}	9/46±0/67 ^{bc}	7/5±0/01 ^{cd}	4/87±0/83 ^{de}
Aerial part length	AB	28/61±0/18 ^a	26/47±0/78 ^{bc}	19/98±0/19 ^{cd}	16/76±0/59 ^{de}
	NI	24/09±0/05 ^{ab}	22/72±1/51 ^{bc}	18/83±0/16 ^{cd}	14/4±0/95 ^{de}
Fresh Root weight	AB	78/48±0/12 ^a	73/47±1/19 ^b	69/63±0/66 ^c	64/44±0/34 ^c
	NI	72/4±0/14 ^{ab}	67/13±1/08 ^{bc}	64/27±0/85 ^{cd}	59/59±1/21 ^{de}
Aerial part fresh weight	AB	16/62±1/15 ^{ab}	15/34±1/18 ^{bc}	14/04±1/46 ^{cd}	13/47±0/65 ^{de}
	NI	14/95±0/47 ^{ab}	13/24±0/30 ^{bc}	11/21±0/25 ^{cd}	10/23±0/95 ^{de}
Root dry weight	AB	0/57±0/012 ^a	0/53±0/015 ^b	0/5±0/008 ^c	0/44±0/01 ^{de}
	NI	0/44±0/006 ^{ab}	0/42±0/012 ^{bc}	0/4±0/008 ^{cd}	0/36±0/008 ^{de}
Aerial part dry weight	AB	1/71±0/027 ^a	1/63±0/028 ^b	1/55±0/012 ^c	1/38±0/07 ^e
	NI	1/49±0/026 ^{ab}	1/42±0/023 ^{bc}	1/41±0/012 ^{cd}	0/99±0/07 ^{de}
Total dry weight	AB	19/42±0/064 ^a	18/2±0/20 ^b	17/19±0/23 ^c	15/79±0/6 ^e
	NI	17/28±0/095 ^{ab}	16/33±0/46 ^{bc}	14/32±0/20 ^{cd}	13/52±0/58 ^{de}
Total fresh weight	AB	95/39±0/10 ^a	88/77±0/57 ^b	84/56±0/68 ^c	76/53±2/34 ^{de}
	NI	86/49±0/26 ^{ab}	80/47±0/43 ^{bc}	76/66±0/39 ^{cd}	72/83±1/82 ^{de}
Relative growth	AB	0.60±0.02 ^a	0.55±0.04 ^c	0.52±0.07 ^c	0.45±0.03 ^e
	NI	0.53±0.072 ^{ab}	0.51±0.048 ^{cd}	0.46±0.051 ^{cd}	0.39±0.023 ^{de}

تلقیح نشده با باکتری وجود ندارد. در این آزمایش بالاترین مقدار پروتئین کل (۷/۵ میلی گرم در هر گرم وزن تر) در گیاهچه‌های تیمار شده با نیتروژن کل و در تلقیح با باکتری مشاهده شد. همچنین پائین ترین مقدار پروتئین کل (۳/۵ میلی گرم در هر گرم وزن تر) نیز در تیمار شاهد و در نمونه‌های تلقیح نشده مشاهده شد (شکل ۳B).

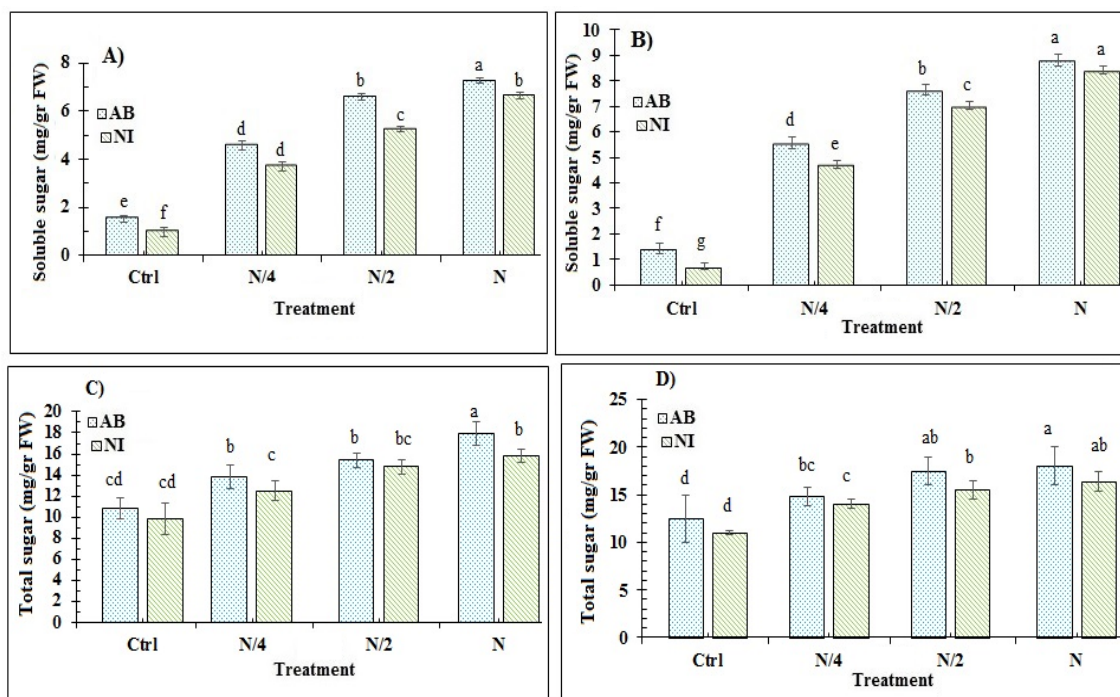
آنزیم‌های آنتی اکسیدانت

بررسی فعالیت آنزیم کاتالاز در تیمارهای مختلف نشان داد که با افزایش غلظت نیتروژن فعالیت آنزیم افزایش می‌یابد. همچنین این نتایج نشان داد که تلقیح گیاهچه‌ها با باکتری آزوسپریلیوم سبب افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم کاتالاز در مقایسه با نمونه‌های تلقیح نشده می‌شود. علاوه بر این، بالاترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۲/۸ میکرومول در دقیقه در هر گرم وزن تر) در گیاهچه‌های تیمار شده با

نتایج حاصل از سنجش مقدار پروتئین محلول در ریشه گیاهچه‌های مورد بررسی نشان داد که در هر دو گروه گیاهچه‌های تلقیح شده و تلقیح نشده، با افزایش غلظت نیتروژن مقدار پروتئین محلول در ریشه افزایش می‌یابد. همچنین نتایج حاضر نشان دادند، اگر چه مقدار پروتئین محلول ریشه در تمام غلظت‌ها در گیاهچه‌های تلقیح شده در مقایسه با گیاهچه‌های تلقیح نشده بالاتر هستند، اما تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه وجود ندارد. بالاترین مقدار پروتئین محلول در گیاهچه‌های تلقیح شده با باکتری که با غلظت کامل نیتروژن تیمار شده‌اند به مقدار ۰/۷۲ میلی گرم در هر گرم وزن تر مشاهده شد (شکل ۳A). از سوی دیگر نتایج حاصل نشان داد که با افزایش غلظت نیتروژن در محیط کشت، مقدار پروتئین کل افزایش می‌یابد، اما تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های تلقیح شده و

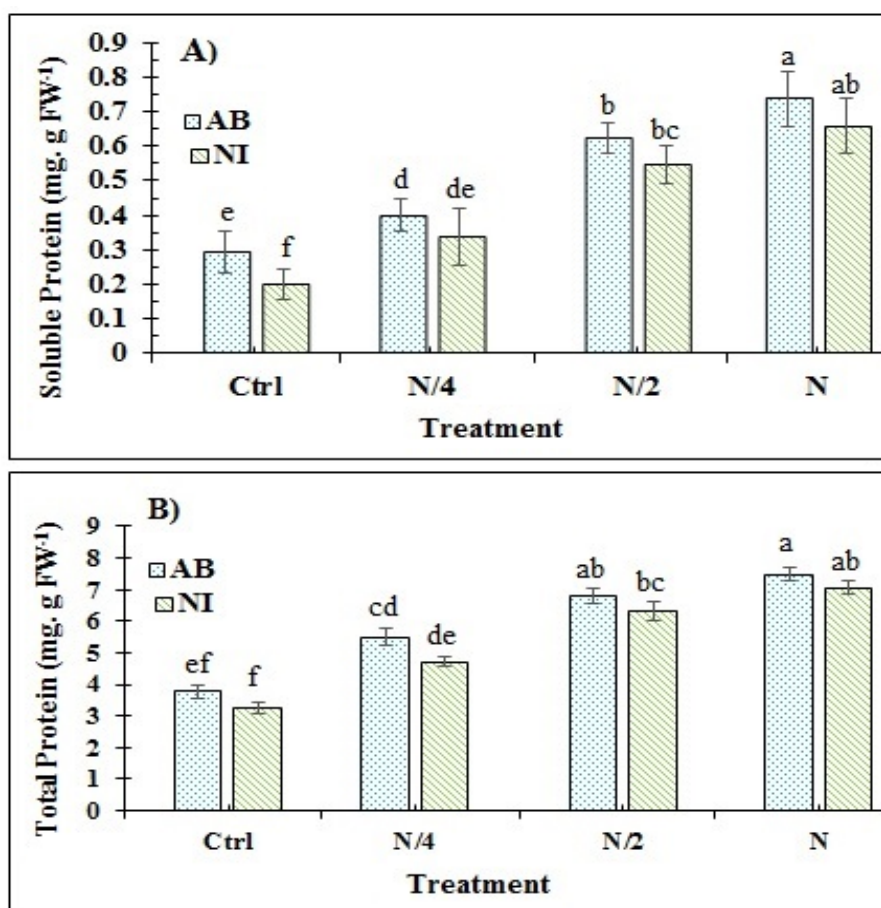
نمونه‌های مختلف وجود دارد. نتایج حاضر نشان داد که بالاترین میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (۲۰/۷۵ میکرومول در دقیقه در هر گرم وزن تر) در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت کامل نیتروژن و در تلقیح با باکتری دیده شده است. از سوی دیگر، پائین‌ترین میزان فعالیت این آنزیم (۹/۶۰ میکرومول در دقیقه در هر گرم وزن تر) گیاهچه‌های شاهد تلقیح نشده دیده شده است (شکل ۴B).

غلظت کامل نیتروژن و در تلقیح با باکتری دیده شده است. با این وجود، پائین‌ترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (۱/۳۲ میکرومول در دقیقه در هر گرم وزن تر) در گیاهچه‌های شاهد تلقیح نشده دیده شده است (شکل ۴A). بررسی فعالیت آنزیم پراکسیداز در گیاهچه‌های برنج هاشمی تلقیح شده و تلقیح نشده با *A. brasilense* در غلظت‌های مختلف نیتروژن نشان داد با افزایش غلظت نیتروژن میزان فعالیت آنزیم نیز افزایش یافته و تفاوت معنی‌داری بین



شکل ۲- مقدار قند محلول در اندام هوایی، قند محلول در ریشه، قند کل در اندام هوایی و قند کل در ریشه در گیاهچه‌های برنج (*Oryza sativa*) رقم هاشمی در تیمار با غلظت‌های مختلف نیتروژن و تلقیح با باکتری آزوسپریلوم برازیلینس (*Azospirillum brasilense*). نتایج میانگین ۴ تکرار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ توسط آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار (LSD) نشان نمی‌دهند. Ctrl: کنترل؛ N/4: یک چهارم غلظت نیتروژن؛ N/2: نیمی از غلظت نیتروژن؛ N: غلظت نیتروژن کامل؛ AB: در شرایط تلقیح یافته؛ NI: در شرایط تلقیح نشده.

Figure 2- The amount of Aerial soluble sugar, Root soluble sugar, Aerial part total sugar and Root total sugar in rice seedlings Hashemi Cultivar inoculated or uninoculated with *A. brasilensis* in treatment with different concentrations of Nitrogen. The results are the average of 4 replicates. Different letters show significant differences according to LSD test at $P \leq 0.05$. Ctrl: Control, N/4: ¼ Nitrogen concentrations, N/2: ½ Nitrogen concentrations, N: Full Nitrogen concentration, AB: Inoculated with *Azospirillum brasilense*, NI: Without Inoculation.



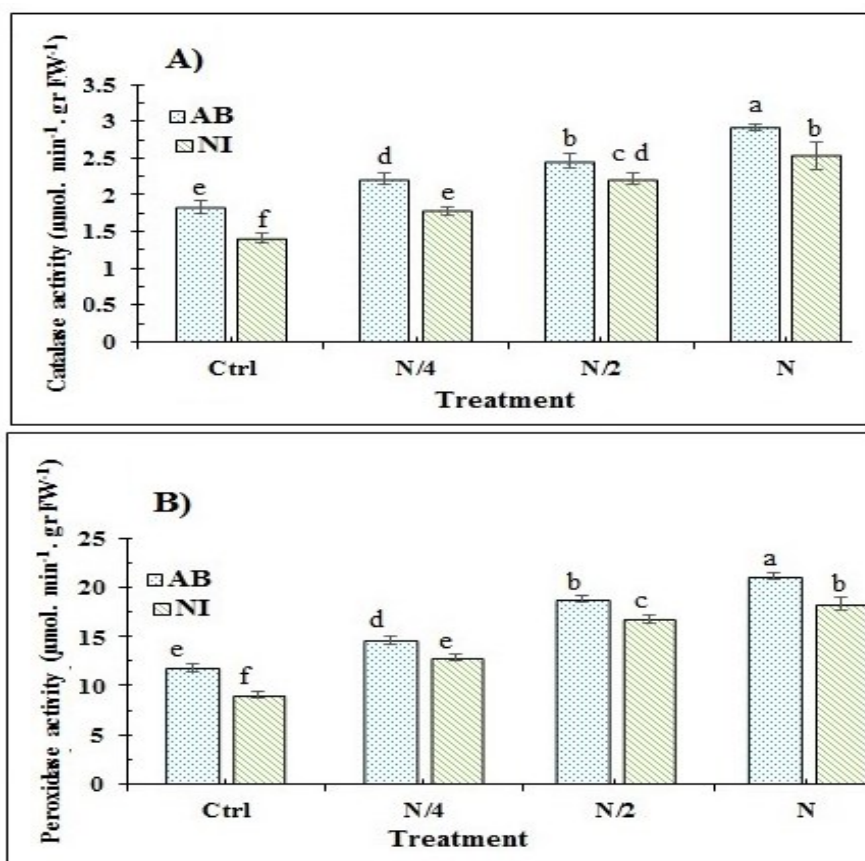
شکل ۳- مقدار پروتئین محلول و پروتئین کل در گیاهچه‌های برنج (*Oryza sativa*) رقم هاشمی در تیمار با غلظت‌های مختلف نیتروژن و تلقیح با باکتری آزوسپریلوم برازیلنس (*Azospirillum brasilense*). نتایج میانگین ۴ تکرار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ توسط آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار (LSD) نشان نمی‌دهند. Ctrl: کنترل؛ N/4: یک چهارم غلظت نیتروژن؛ N/2: نیمی از غلظت نیتروژن؛ N: غلظت نیتروژن کامل؛ AB: در شرایط تلقیح یافته؛ NI: در شرایط تلقیح نشده.

Figure 2- The amount of Soluble Protein and Total Protein in rice seedlings Hashemi Cultivar inoculated or uninoculated with *A. brasiliensis* in treatment with different concentrations of Nitrogen. The results are the average of 4 replicates. Different letters show significant differences according to LSD test at $P \leq 0.05$. Ctrl: Control, N/4: ¼ Nitrogen concentrations, N/2: ½ Nitrogen concentrations, N: Full Nitrogen concentration, AB: Inoculated with *Azospirillum brasilense*, NI: Without Inoculation.

اثر تیمار نیتروژن بر مقدار فسفر و نیتروژن

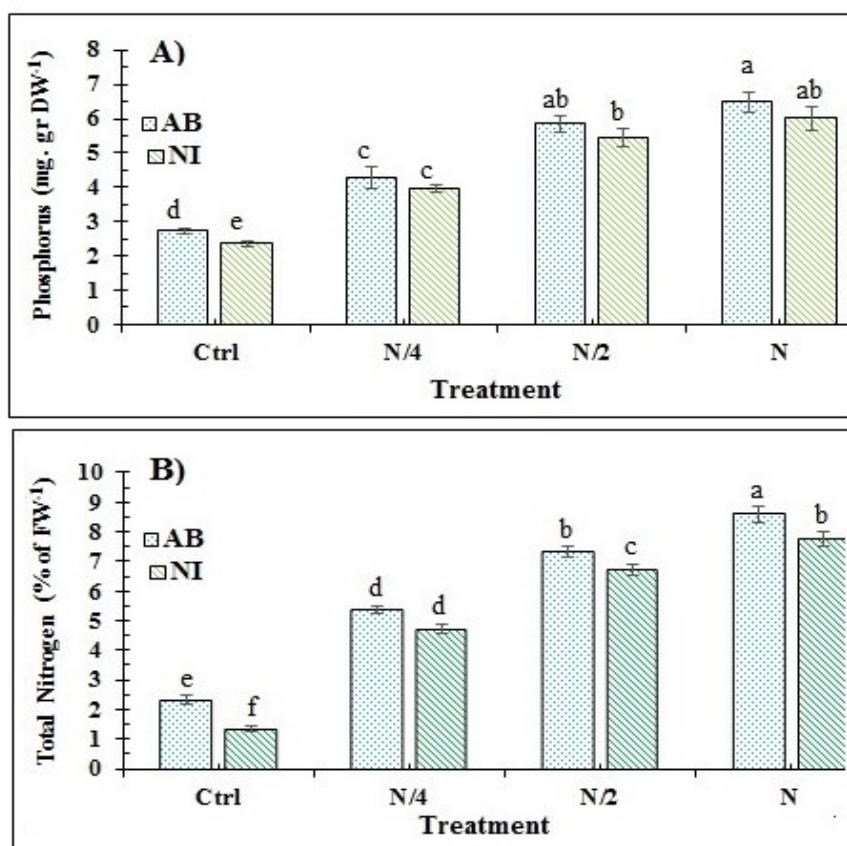
بررسی اثر تیمارهای مختلف بر مقدار فسفر گیاهچه‌های برنج هاشمی تلقیح شده و تلقیح نشده با باکتری نشان داد که با افزایش غلظت نیتروژن مقدار فسفر گیاهچه‌ها افزایش می‌یابد، اما اختلاف معنی‌داری بین گیاهچه‌های تلقیح شده و گیاهچه‌های تلقیح نشده وجود ندارد. بالاترین مقدار فسفر در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت کامل نیتروژن و در تلقیح با باکتری (۶/۸۹ میلی گرم بر گرم وزن خشک) دیده شد (شکل ۵A). بررسی اثر تیمارهای مختلف نشان داد که افزایش غلظت نیتروژن در محیط کشت سبب

افزایش معنی‌داری در مقدار نیتروژن گیاهچه‌ها در تمامی غلظت‌ها نسبت به کنترل می‌شود. نتایج بیشتر نشان داد که در تیمار شاهد و تیمار با غلظت‌های N/2 و نیتروژن کامل بین گیاهچه‌های تلقیح شده و گیاهچه‌های تلقیح نشده اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بالاترین مقدار نیتروژن (۸/۹ درصد وزن خشک) در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت کامل نیتروژن و در تلقیح با باکتری دیده شد. پایین‌ترین مقدار نیتروژن (۱/۲۲ درصد وزن خشک) در گیاهچه‌های شاهد تلقیح نشده مشاهده شد (شکل ۵B).



شکل ۴- فعالیت آنزیم کاتالاز و پراکسیداز در گیاهچه‌های برنج (*Oryza sativa*) رقم هاشمی در تیمار با غلظت‌های مختلف نیتروژن و تلقیح با باکتری آزوسپریلوم برازیلینس (*Azospirillum brasilense*). نتایج میانگین ۴ تکرار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ توسط آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار (LSD) نشان نمی‌دهند. Ctrl: کنترل؛ N/4: یک چهارم غلظت نیتروژن؛ N/2: نیمی از غلظت نیتروژن؛ N: غلظت نیتروژن کامل؛ AB: در شرایط تلقیح یافته؛ NI: در شرایط تلقیح نشده.

Figure 4- The enzyme activity of Catalase and Peroxidase in rice seedlings Hashemi Cultivar inoculated or uninoculated with *A. brasiliensis* in treatment with different concentrations of Nitrogen. The results are the average of 4 replicates. Different letters show significant differences according to LSD test at $P \leq 0.05$. Ctrl: Control, N/4: $\frac{1}{4}$ Nitrogen concentrations, N/2: $\frac{1}{2}$ Nitrogen concentrations, N: Full Nitrogen concentration, AB: Inoculated with *Azospirillum brasiliense*, NI: Without Inoculation.



شکل ۵- مقدار فسفر و نیتروژن در گیاهچه‌های برنج (*Oryza sativa*) رقم هاشمی در تیمار با غلظت‌های مختلف نیتروژن و تلقیح با باکتری آزوسپریلوم برازیلنس (*Azospirillum brasilense*). نتایج میانگین ۴ تکرار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵٪ توسط آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار (LSD) نشان نمی‌دهند. Ctrl: کنترل؛ N/4: یک چهارم غلظت نیتروژن؛ N/2: نیمی از غلظت نیتروژن؛ N: غلظت نیتروژن کامل؛ AB: در شرایط تلقیح یافته؛ NI: در شرایط تلقیح نشده.

Figure 5- The amount of Phosphorus and Nitrogen in rice seedlings Hashemi Cultivar inoculated or uninoculated with *A. brasiliensis* in treatment with different concentrations of Nitrogen. The results are the average of 4 replicates. Different letters show significant differences according to LSD test at $P \leq 0.05$. Ctrl: Control, N/4: ¼ Nitrogen concentrations, N/2: ½ Nitrogen concentrations, N: Full Nitrogen concentration, AB: Inoculated with *Azospirillum brasilense*, NI: Without Inoculation.

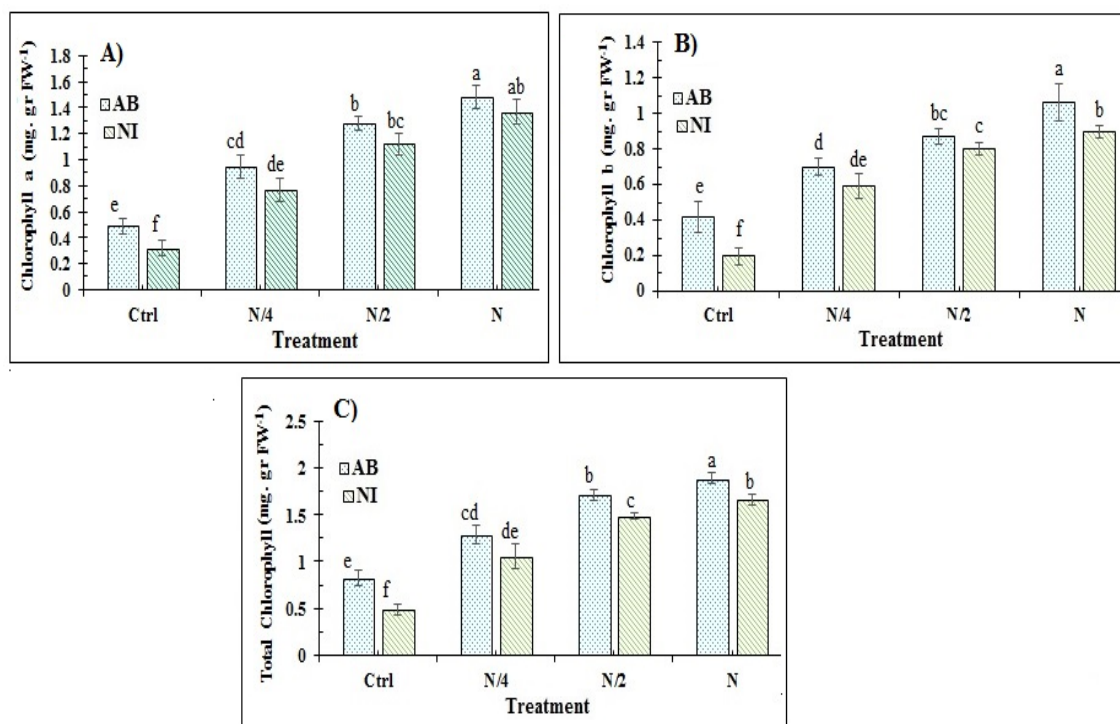
رنگیزه‌های فتوسنتزی

بررسی اثر تیمارهای مختلف بر گیاهچه‌های برنج هاشمی تلقیح شده و تلقیح نشده با *A. brasiliensis* نشان داد که با افزایش غلظت نیتروژن مقدار کلروفیل a در گیاهچه‌ها افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، این افزایش در همه غلظت‌ها در گیاهچه‌های تلقیح شده اختلاف معنی‌داری را با نمونه کنترل نشان می‌دهد، اما در ارتباط با گیاهچه‌های تلقیح نشده این اختلاف تنها در غلظت‌های کامل و یک دوم نیتروژن معنی‌دار است. بررسی‌های بیشتر نشان داد، اگرچه اختلاف معنی‌دار در مقدار کلروفیل a بین گیاهچه‌های تلقیح شده و گیاهچه‌های تلقیح نشده در گروه کنترل وجود دارد ولی با

افزایش غلظت نیتروژن در محیط کشت، در هیچ یک از غلظت‌های به کار رفته تفاوت معنی‌داری بین گیاهچه‌های تلقیح شده و گیاهچه‌های تلقیح نشده وجود ندارد (شکل ۶A). همچنین پژوهش حاضر نشان داد که با افزایش غلظت نیتروژن مقدار کلروفیل b افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، در همه غلظت‌های به کار رفته اختلاف معنی‌داری در گروه گیاهچه‌های تلقیح شده در مقایسه با کنترل مشاهده می‌شود، اما در ارتباط با گیاهچه‌های تلقیح نشده این اختلاف تنها در غلظت‌های کامل و یک دوم نیتروژن معنی‌دار می‌باشد. همچنین با افزایش غلظت نیتروژن تنها در غلظت نیتروژن کامل بین گیاهچه‌های تلقیح شده و گیاهچه‌های تلقیح نشده

اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. همچنین نتایج حاضر نشان داد که بالاترین مقدار کلروفیل b ($1/35$ میلی گرم بر گرم وزن تر) در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت کامل نیتروژن و در تلقیح با باکتری دیده شد. از سوی دیگر، کمترین مقدار کلروفیل b ($0/16$ میلی گرم بر گرم وزن تر) در گیاهچه‌های شاهد تلقیح نشده مشاهده شد (شکل ۶B). نتایج حاصل از سنجش کلروفیل کل گیاهچه‌های برنج هاشمی تلقیح شده و تلقیح نشده با *A. brasiliensis* نشان داد که با افزایش غلظت نیتروژن مقدار کلروفیل کل گیاهچه‌ها نیز افزایش می‌یابد. همچنین نتایج حاضر نشان داد که اختلاف معنی‌داری در مقدار کلروفیل کل بین گیاهچه‌های تلقیح شده و گیاهچه‌های تلقیح نشده در گروه کنترل وجود دارد، اما در تیمار

N/4 تفاوت معنی‌داری بین دو گروه تلقیح شده و تلقیح نشده وجود ندارد. با افزایش بیشتر غلظت نیتروژن (تیمار N/2 و N/4) مجدداً تفاوت معنی‌داری در مقدار کلروفیل کل بین دو گروه تلقیح شده و تلقیح نشده با باکتری وجود دارد. در این تیمارها مقدار کلروفیل کل به طور معنی‌داری در نمونه‌های تلقیح شده بالاتر از گیاهچه‌های تلقیح نشده بوده است. بالاترین مقدار کلروفیل کل ($1/65$ میلی گرم بر گرم وزن تر) در گیاهچه‌های تیمار شده با غلظت کامل نیتروژن و در تلقیح با باکتری و پائین‌ترین مقدار کلروفیل کل ($0/43$ میلی گرم بر گرم وزن تر) در گیاهچه‌های شاهد تلقیح نشده مشاهده شد (شکل ۶C).



شکل ۶- مقدار کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل گیاهچه‌های برنج (*Oryza sativa*) رقم هاشمی در تیمار با غلظت‌های مختلف نیتروژن و تلقیح با باکتری آزوسپریلوم برازیلینس (*Azospirillum brasilense*). نتایج میانگین ۴ تکرار است. ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ توسط آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار (LSD) نشان نمی‌دهند. Ctrl: کنترل؛ N/4: یک چهارم غلظت نیتروژن؛ N/2: نیمی از غلظت نیتروژن؛ N: غلظت نیتروژن کامل؛ AB: در شرایط تلقیح یافته؛ NI: در شرایط تلقیح نشده.

Figure 6- The amount of Chlorophyll a, Chlorophyll b and Total chlorophyll in rice seedlings Hashemi Cultivar inoculated or uninoculated with *A. brasiliensis* in treatment with different concentrations of Nitrogen. The results are the average of 4 replicates. Different letters show significant differences according to LSD test at $P \leq 0.05$. Ctrl: Control, N/4: $1/4$ Nitrogen concentrations, N/2: $1/2$ Nitrogen concentrations, N: Full Nitrogen concentration, AB: Inoculated with *Azospirillum brasilense*, NI: Without Inoculation.

بحث

در پژوهش حاضر، اثر غلظت‌های مختلف نیتروژن بر برخی فاکتورهای بیوشیمیایی و رشد گیاهچه‌های برنج تلقیح شده با باکتری *A. brasiliensis* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاضر نشان داد که گیاهچه‌های تلقیح شده از رشد بهتری در مقایسه با نمونه تلقیح نشده برخوردار بوده و غلظت‌های بالاتر نیتروژن نتایج بهتری را به همراه داشتند. نتایج حاضر نشان داد که تلقیح با *A. brasiliensis* کارایی استفاده از نیتروژن را به ویژه در غلظت‌های بالاتر افزایش می‌دهد. نتایج پژوهشگران مختلف بر روی غلات و به ویژه برنج نشان دادند گیاهان تلقیح شده با *A. brasiliensis*، زیست توده و محتوای نیتروژن بالاتری را در تیمار با غلظت‌های مختلف نیتروژن نشان می‌دهند (Saubidet et al., 2002; Garcia et al., 2010). همچنین پژوهش حاضر نشان داد تلقیح گیاهچه‌ها با *A. brasiliensis* بر نرخ رشد نسبی اثر مثبت دارد. نتایج دیگر پژوهشگران نشان دادند این امر ممکن است به علت تولید هورمون‌های گیاهی مانند اسید ایندول استیک (IAA) باشد (Tien et al., 1976).

پژوهش حاضر نشان داد که اگر چه اختلاف معنی‌داری بین فاکتورهای رشد در تیمار شاهد (نیتروژن صفر) بین دو گروه تلقیح شده و تلقیح نشده وجود ندارد، اما گیاهان تلقیح شده همچنان عملکرد نسبتاً بهتری (دارای فاکتور رشد بیشتری) نسبت به گیاهان تلقیح نشده داشتند که این امر با یافته‌های سایر پژوهشگران همخوانی دارد. آنها نشان دادند که تلقیح با *A. brasiliensis* محتوای نیتروژن و عملکرد را حتی در شرایط محدود نیتروژن بهبود می‌بخشد (Pedraza et al., 2009). همچنین نتایج Skonieski et al. (2019) نشان دادند تلقیح *A. brasiliensis* کارایی استفاده از نیتروژن (NUE) و عملکرد ذرت را در تیمار با کودهای حاوی نیتروژن کم افزایش می‌دهد که این امر می‌تواند در ترویج کشاورزی پایدار مفید باشد. یافته‌های حاضر نشان دادند با افزایش غلظت نیتروژن، محتوای قند به طور نسبی

افزایش یافته است. علاوه بر این، گیاهان تلقیح شده مقدار قند بالاتری نسبت به گیاهان تلقیح نشده نشان دادند. در این راستا بعضی پژوهشگران نشان دادند تلقیح تحت *A. brasiliensis*، سبب بهبود جذب نیتروژن و متابولیسم کربوهیدرات در برنج شده و در نهایت به افزایش عملکرد دانه و محتوای نیتروژن بالاتر می‌شود. نتایج این پژوهشگران نشان دادند در دسترس قرار گرفتن مقادیر بالاتر نیتروژن به همراه تلقیح باکتریایی تجمع قند را در بافت‌های هوایی و ریشه افزایش می‌دهد. احتمالاً تلقیح باکتریایی جذب نیتروژن، کارایی فتوسنتز و سنتز قند را افزایش می‌دهد (Pedraza et al., 2009). همچنین نتایج برخی از پژوهشگران نشان دادند تلقیح به طور قابل توجهی فعالیت آنزیم نیتروژناز و تبدیل نیتروژن خاک را بهبود بخشیده که منجر به افزایش زیست توده و محتوای قند در بافت‌های گیاهی می‌شود (Pedrosa et al., 2020; Zhang et al., 2018).

نتایج پژوهش حاضر نشان داد افزایش غلظت نیتروژن به طور معنی‌داری سبب افزایش پروتئین محلول و کل در ریشه گیاهچه‌های برنج نسبت به شاهد می‌شود که با یافته‌های سایر پژوهشگران مطابقت دارد. از سوی دیگر، مقایسه گیاهچه‌های تلقیح شده و تلقیح نشده با *A. brasiliensis* نشان داد که تلقیح باکتری، علیرغم افزایش اندک مقدار پروتئین محلول و کل (در هر غلظت از نیتروژن) از نظر آماری تفاوت معنی‌داری را ایجاد نمی‌کند. این نتایج نشان‌دهنده آن است که اثر تلقیح باکتری ممکن است در شرایطی با غلظت‌های بالاتر نیتروژن به طور مؤثرتری نمایان شود یا آنکه نیازمند تعامل‌های بیشتری با سایر عوامل محیطی باشد (Wang et al., 2019). به عبارت دیگر، این امر یک تناقض رایج در کشاورزی و فیزیولوژی گیاهی است و الزاماً افزایش مقدار نیتروژن در گیاه به معنی افزایش مقدار پروتئین نیست. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده وجود یک یا چند عامل محدود کننده باشد که مانع استفاده کامل گیاه از نیتروژن برای

ساخت پروتئین باشد. به عنوان مثال می‌توان به کمبود برخی عناصر معدنی مانند مولیبدن و یا مرحله رشد گیاه اشاره کرد. به این معنی که در مراحل اولیه رشد، گیاه ممکن است نیتروژن را جذب و به شکل نیترات یا اسید آمینه ذخیره کند و سپس در مرحله رشد زایشی آن را به سرعت به پروتئین تبدیل نماید (Hernandez et al., 2009).

نتایج حاضر نشان داد که فعالیت آنزیم کاتالاز با افزایش غلظت نیتروژن (در هر دو شرایط تلقیح شده و تلقیح نشده) افزایش یافته است. اما در نمونه‌های تلقیح شده توسط باکتری، فعالیت بالاتری را نسبت به گیاهچه‌های تلقیح نشده در تمام سطوح نیتروژن نشان داد که این نتایج با سایر گزارش‌های منتشر شده مطابقت دارد. این یافته‌ها نشان دادند که تلقیح با *A. brasiliensis* سبب افزایش تحمل تنش اکسیداتیو در برنج می‌شود. این شواهد نشان‌دهنده آن است که این باکتری انعطاف‌پذیری گیاه را در تیمار با غلظت‌های مختلف نیتروژن بهبود بخشیده و توانایی آنها را برای حذف گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) تولید شده در طول متابولیسم نیتروژن افزایش می‌دهد (Garcia et al., 2010).

همچنین داده‌های حاضر نشان دادند فعالیت آنزیم پراکسیداز در تیمار با غلظت‌های بالاتر نیتروژن و در هر دو شرایط تلقیح شده و تلقیح نشده افزایش می‌یابد. داده‌های Zhang و همکارانش نیز نشان دادند تلقیح *A. brasiliensis* سبب افزایش فعالیت پراکسیداز در برنج شده که در نهایت منجر به رشد بهتر و جذب نیتروژن می‌شود. افزایش فعالیت پراکسیداز در گیاهان تلقیح شده، نقش این باکتری را در بهبود توانایی گیاه در سم زدایی پراکسید هیدروژن به عنوان محصول جانبی تنش اکسیداتیو، به ویژه در شرایطی که مقدار نیتروژن قابل دسترس محدود می‌باشد را برجسته می‌کند (Zhang et al., 2018).

نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که تیمار نیتروژن و نیز تلقیح باکتریایی تأثیر مثبتی بر سطوح فسفر و نیتروژن داشتند. در این راستا گزارش‌ها نشان دادند برهم‌کنش بین تیمار نیتروژن و تلقیح *A. brasiliensis* جذب عناصر معدنی و رشد را در سبب زمینی بهبود بخشیده است. همچنین نتایج آن‌ها نشان دادند گیاهان تلقیح شده می‌توانند با بهبود کارایی جذب مواد مغذی، کمبود نیتروژن را نیز جبران کنند (Fernandes et al., 2023).

داده‌های حاضر نشان دادند محتوای فسفر به ویژه در نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های پائین نیتروژن افزایش یافته است. این امر نشان می‌دهد که *A. brasiliensis* نقش کلیدی در بهبود حلالیت فسفر ایفا می‌کند که با یافته‌های سایر پژوهشگران تطابق دارد (Almari & Mostafa, 2009; Madhaiyan et al., 2010).

نتایج حاصل از پژوهش جذب نیتروژن و فسفر در گیاه ذرت تلقیح شده با *A. brasiliensis* در تیمار با سطوح مختلف نیتروژن نشان داد که مقدار نیتروژن و فسفر به ویژه در غلظت‌های بالاتر نیتروژن افزایش می‌یابد. این امر نشان‌دهنده آن است که تیمار نیتروژن تأثیر مثبتی بر جذب مواد مغذی حتی در سطوح بالای نیتروژن دارد. الگوهای مشابه مشاهده شده در هر دو پژوهش نشان دادند این باکتری نقش مهمی در بهبود کارایی مصرف مواد مغذی ایفا کرده و آن را به یک روش ارزشمند برای افزایش جذب فسفر و نیتروژن در برنج و سایر محصولات غلات تبدیل می‌کند (Palheta, 2021).

داده‌های حاضر نشان داد که تیمار توام نیتروژن و تلقیح باکتریایی می‌توانند محتوای کلروفیل را در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده افزایش دهند. همچنین در این راستا نتایج برخی از پژوهشگران نشان دادند تلقیح باکتریایی کارایی استفاده از نیتروژن و زیست توده را در برنج افزایش داده و منجر به تولید بیشتر کلروفیل می‌شود (Zhang et al., 2018).

افزایش دهد. در تمام غلظت‌های نیتروژن به کار رفته، رشد گیاهان تلقیح‌شده با باکتری بهبود یافته و محتوای پروتئین بالاتر و فعالیت آنزیمی بالایی را در مقایسه با گیاهان تلقیح نشده نشان دادند. این امر پتانسیل باکتری برای بهبود جذب مواد مغذی و تحمل تنش را برجسته می‌کند. این یافته‌ها نشان دادند *A. brasiliensis* می‌تواند در محیط‌هایی با دسترسی محدود نیتروژن کود زیستی مؤثری باشد و سبب ترویج شیوه‌های کشاورزی پایدار و کاهش اتکا به کودهای شیمیایی نیتروژن‌دار شود.

سپاسگزاری

پژوهش حاضر با حمایت مالی حوزه تحصیلات تکمیلی دانشگاه گلستان انجام شده است.

References

- Adeleke, B. S., Babalola, O. O., & Glick, B. R. (2021). Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes. *Rhizosphere*, 20, 100433. <https://doi.org/10.1016/j.rhisph.2021.100433>.
- Alamri, S. A., & Mostafa, Y. S. (2009). Effect of nitrogen supply and *Azospirillum brasilense* sp- 248 on the response of wheat to seawater irrigation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 16(2), 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2009.10.009>
- Arnon, D. I. (1949). Copper Enzyme in isolated chloroplasts. *Plant physiology*, 24(1), 1–15.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Elsheikh, E. A. E., El-Keblawy, A., Mosa, K. A., Okoh, A. I., & Saadoun, I. (2021). Role of endophytes and rhizosphere microbes in promoting the invasion of exotic plants in arid and semi-arid areas: A Review. *Sustainability*, 13(23), 13081. <https://doi.org/10.3390/su132313081>.
- Fernandes, A. M., da Silva, J. A., Eburneo, J. A. M., Leonel, M., Garreto, F. G. de S., & Nunes, J. G. da S. (2023). Growth and nitrogen uptake by potato and Cassava crops can be improved by *Azospirillum brasilense* inoculation and nitrogen fertilization. *Horticulturae*, 9(3), 301. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9030301>
- Fukagawa, N. K., & Ziska, L. H. (2019). Rice: importance for global nutrition. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 65(Supplement), S2–S3. <https://doi.org/10.3177/jnsv.65.S2>
- Galindo, F., S., Pagliari, P. H., da Silva, E. C., Silva, V. M., Fernandes, G. C., Rodrigues, W. L., Céu, E. G. O., de Lima, B. H., Jalal, A., Muraoka, T., Buzetti, S., Lavres, J., & Teixeira Filho, M. C. M. (2022). Co-Inoculation with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* sp. enhances nitrogen uptake and yield in field-grown cowpea and did not change N-fertilizer recovery. *Plants*, 11(14), 1847. <https://doi.org/10.3390/plants11141847>
- Galindo et al., 2022).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاضر نشان داد تلقیح گیاهچه‌های برنج با *A. brasiliensis* می‌تواند به طور محسوس پاسخ‌های فیزیولوژیکی آن را، به‌ویژه در شرایط کمبود نیتروژن،

- García, I. E., Di Salvo, L. P., Escobar Ortega, J. S., Boa Sorte, P. M. F., Urquiaga, S., & Teixeira, K. R. S. (2010). Field response of rice paddy crop to *Azospirillum* inoculation: physiology of rhizosphere bacterial communities and the genetic diversity of endophytic bacteria in different parts of the plants. *Plant and Soil*, 336(1–2), 351–362. <https://doi.org/10.1007/s11104-010-0487-y>.
- Hernandez, J. A., George, S. J., & Rubio, L. M. (2009). Molybdenum trafficking for nitrogen fixation. *Biochemistry*, 48(41), 9711–21. <https://doi.org/10.1021/bi901217p>
- Kar, M., & Mishra, D. (1976). Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiology*, 57(2), 315–319. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>
- Kjeldahl, J. (1883). Neue methode zur bestimmung des stickstoffs in organischen Körpern. *Zeitschrift Für Analytische Chemie*, 22, 366–382. <https://doi.org/10.1007/BF01338151>
- Madhaiyan, M., Poonguzhali, S., Kang, B. G., Le, Y. J., Chung, J. B., & Sa, T. M. (2010). Effect of co-inoculation of methylotrophic methylobacterium oryzae with *Azospirillum brasilense* and *Burkholderia pyrrocinia* on the growth and nutrient uptake of tomato, red pepper and rice. *Plant and Soil*, 328(1–2), 71–82. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-0083-1>
- Maehly A. C. & Chance, B. (1954). Assay of catalases and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis*, 1, 357–424.
- Markwell, M. A. K., Hass, S. M., Tollbert, N. E., & Bieber, L. L. (1981). Protein determination in membrane and lipoprotein sample: manual and automated procedure. *Methods Enzymology*, 72, 296–303. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(81\)72018-4](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(81)72018-4)
- McCready, R., Guggloz, J., Silviera, V., & Owens, H. (1950). Determination of starch and amylose in vegetables, application to peas. *Analytical Chemistry*, 22(9), 1156–1158. <https://doi.org/10.1021/ac60045a016>
- Morais, P. G., Teixeira, R. F. M., Lauk, C., Theurl, M. C., Winiwarter, W., Mayer, A., Kaufmann, L., Haberl, H., Domingos, T., & Erb, K. H. (2021). Agroecological measures and circular economy strategies to ensure sufficient nitrogen for sustainable farming. *Global Environmental Change*, 69, 102313. <https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2021.102313>.
- Olsen, S. R., & Watanabe, F. S. (1963). Diffusion of phosphorus as related to soil texture and plant uptake. *Soil Science Society of America Journal*, 27(6), 648–653. <https://doi.org/10.2136/sssaj1963.03615995002700060024x>
- Palheta J. G. (2021). Sources and doses of nitrogen associated with inoculation with *Azospirillum brasilense* modulate growth and gas exchange of corn in the Brazilian Amazon. *International Journal of Agriculture and Biology*, 26(2), 349–358. <https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1843>
- Pedraza, R. O., Bellone, C. H., Carrizo de Bellone, S., Boa Sorte, P. M. F., Teixeira, K. R., & dos, S. (2009). *Azospirillum* inoculation and nitrogen fertilization effect on grain yield and on the diversity of endophytic bacteria in the phyllosphere of rice rainfed crop. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2008.09.007>
- Pedrosa, F. O., Oliveira, A. L. M., Guimarães, V. F., Etto, R. M., Souza, E. M., Furmam, F. G., Gonçalves, D. R. P., Santos, O. J. A. P., Gonçalves, L. S. A., Battistus, A. G., & Galvão, C. W. (2020). The ammonium excreting *Azospirillum brasilense* strain HM053: a new alternative inoculant for maize. *Plant and Soil*, 451(2), 45–56. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04124-8>
- Prasad, K. (2023). Symbiotic endophytes of glomalin AM Fungi, rhizobium, and PGPR potential bio stimulants to intensive global food production for sustainable agriculture system. *Journal of Microbes and Research*, 2(1), 2836–2187. <https://doi.org/10.58489/2836-2187/012>
- Saubidet, M., I., Fatta, N., & Barneix, A. J. (2002). The effect of inoculation with *Azospirillum brasilense* on growth and nitrogen

- utilization by wheat plants. *Plant and Soil*, 245(2), 215–222.
<https://doi.org/10.1023/A:1020469603941>
- Sharifalsadat, Z., Aghdasi, M., Ghanati, F., & Arzanesh, M. (2023). Harmonized biochemical modification of cell walls to get permission for entrance of *Azospirillum* sp. to rice roots. *Plant Science*, 335(3), 111823.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111823>
- Silveira, A. P. D., Sala, V. M. R., Cardoso, E. J. B. N., Labanca, E. G., & Cipriano, M. A. P. (2016). Nitrogen metabolism and growth of wheat plant under diazotrophic endophytic bacteria inoculation. *Applied Soil Ecology*, 107, 313–319.
<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.07.005>
- Skonieski, F. R., Viégas, J., Martin, T. N., Mingotti, C. C. A., Naetzold, S., Tonin, T. J., Dotto, L. R., & Meinerz, G. R. (2019). Effect of nitrogen topdressing fertilization and inoculation of seeds with *Azospirillum brasilense* on corn yield and agronomic characteristics. *Agronomy*, 9(12), 812. <https://doi.org/10.3390/agronomy9120812>
- Thomas, J., Kim, H. R., Rahmatallah, Y., Wiggins, G., Yang, Q., Singh, R., Glazko, G., & Mukherjee, A. (2019). RNA-seq reveals differentially expressed genes in rice (*Oryza sativa*) roots during interactions with plant-growth promoting bacteria, *Azospirillum brasilense*. *Plos One*, 14(5), e0217309.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217309>
- Tien, T. M., Gaskins, M. H., & Hubbell, D. H. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and Environmental Microbiology*, 37(5), 1016–1024.
<https://doi.org/10.1128/aem.37.5.1016-1024.1979>
- Ugulu, I. (2015). Determination of heavy metal accumulation in plant samples by spectrometric techniques in Turkey. *Applied Spectroscopy Reviews*, 50(2), 113–151.
<https://doi.org/10.1080/05704928.2014.935981>
- Wang, X., Liu, H., Yu, F., Hu, B., Jia, Y., Sha, H., & Zhao, H. (2019). Differential activity of the antioxidant defence system and alterations in the accumulation of osmolyte and reactive oxygen species under drought stress and recovery in rice (*Oryza sativa* L.) tillering. *Scientific Reports*, 9(1), 8543.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-44958-x>
- White, P. J. & Brown, P. H. (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, 105(7), 1073–1080.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcq085>
- Xin, W., Zhang, L., Zhang, W., Gao, J., Yi, J., Zhen, X., Du, M., Zhao, Y., & Chen, L. (2019). An integrated analysis of the rice transcriptome and metabolome reveals root growth regulation mechanisms in response to nitrogen availability. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 5893. <https://doi.org/10.3390/ijms20235893>
- Yoshida, S., & Coronel, V. (1975). Nitrogen nutrition, leaf resistance and leaf photosynthetic rate of the rice plant. *Soil Science and Plant Nutrition*, 22(2), 207–211.
<https://doi.org/10.1080/00380768.1976.10432983>
- Zeffa, D. M., Perini, L. J., Silva, M. B., de Sousa, N. V., Scapim, C. A., Oliveira, A. L. M. de, Amaral Júnior, A. T. do., & Azeredo Gonçalves, L. S. (2019). *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. *Plos One*, 14(4), e0215332.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215332>
- Zhang, J., Hussain, S., Zhao, F., Zhu, L., Cao, X., Yu, S., & Jin, Q. (2018). Effects of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* on nitrogen transformation and enzyme activity in the rice rhizosphere. *Journal of Soils and Sediments*, 18(4), 1453–1465.
<https://doi.org/10.1007/s11368-017-1861-7>

