نشریه علمی ـ پژوهشی اکوفیزیولوژی گیاهان زراعی، جلد یازدهم، شماره 1(41)، بهار 1396، صفحه 68-51

بررسی کمیت و کیفیت علوفه شبدر برسیم (.Trifolium alexandrinum L) با کاربرد سویه‌های باکتری Pseudomonas putida و کود فسفره در کشت دوم

محمدحسین انصاری[1*] و مهدی قدیمی[2]

تاریخ دریافت: 1395/4/18 **تاریخ بازنگری**: 1395/7/20 **تاریخ پذیرش**: 1396/2/13

چکیده

اثر برخی از سویه‌های باکتری سودوموناس پوتیدا همراه با سطوح مختلف کود شیمیایی فسفر بر خصوصیات کمّی و کیفی علوفه شبدر برسیم طی آزمایشی به‌صورت فاکتوریل با طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار در منطقه فومن استان گیلان به‌صورت کشت دوم، پس از برداشت برنج، بررسی شد. سطوح کودی شامل سه سطح فسفر (صفر، 75 و 150 کیلوگرم سوپرفسفات تریپل در هکتار) و سویه‌های باکتری در چهار سطح (سویه‌های M_{21}، M_{168} و M_5 و بدون تلقیح با باکتری) بودند. نتایج نشان داد که کاربرد کود فسفر منجر به افزایش pH خاک در طول دوره رشد گیاه شد، در حالی که سویه‌های باکتری pH خاک را تعدیل نمودند. همچنین، تلقیح باکتریایی مقدار پروتئین خام، پروتئین قابل هضم علوفه، فعالیت فسفاتاز اسیدی و قلیایی خاک پیرامون ریشه را در مقایسه با تیمار عدم تلقیح افزایش ولی مقدار الیاف خام علوفه را کاهش داد. عملکرد علوفه تر شبدر، عملکرد پروتئین و مقدار فسفر شاخ و برگ نیز تحت تاثیر برهمکنش سویه‌های باکتری و کود شمیایی فسفر قرار گرفتند. بیشترین عملکردهای علوفه تر و پروتئین به‌ترتیب با میانگین‌های 16136 و 2746 کیلوگرم در هکتار از سویه M_5 در سطح 150 کیلوگرم کود فسفات به‌دست آمدند که نسبت به تیمار عدم تلقیح، عملکردهای علوفه و پروتئین را به‌ترتیب 49/16 و 1/8 درصد افزایش داد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، کاربرد 150 کیلوگرم کود شیمیایی فسفر در هکتار و تلقیح شبدر با باکتری سویه M_5 سودوموناس پوتیدا برای دست‌یابی به حداکثر عملکرد و کیفیت علوفه آن در نظام کشت دوم در منطقه فومن می‌تواند مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: آنزیم فسفاتاز، اسیدیته خاک، الیاف خام، پروتئین، فسفر.

1- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران (* نگارنده‌ی مسئول) Ansary330@yahoo.com
2- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد زراعت، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران.

مقدمه

شبدر برسیم (Trifolium alexandrinum L.) از تیره بقولات یا لگومینوز می‌باشد. شبدر برسیم یکی از با ارزش‌ترین علوفه‌های موجود برای تغذیه دام می‌باشد. درصد پروتئین شبدر برسیم را تا 20/96% گزارش داده‌اند و چنانچه تولید 30 تن علوفه تر در هکتار مبنای محاسبه قرار گیرد و فقط پروتئین حاصل از آن محاسبه گردد در هر دوره تولید حدود 650 کیلوگرم پروتئین خالص از کشت یک هکتار شبدر برسیم به‌دست می‌آید (Gaafar et al., 2011). فسفر یکی از عناصر ضروری و با اهمیتی است که گیاهان در مراحل رشد و تولید مثل خود به آن احتیاج دارند (Veneklaas et al., 2012; Ahemad and Khan, 2012). فسفر اهمیت زیادی در رشد گیاهان و تولید بسیاری از ترکیبات مهم سلول‌های گیاهی، از جمله اسیدهای نوکلئیک، فسفولیپیدهای غشاء و نوکلئوتیدهایی دارد که در متابولیسم انرژی گیاه شرکت دارند (Wang et al., 2009). اغلب خاک‌های زراعی که در ایران برای کشت شبدر استفاده می‌شوند فاقد مقادیر کافی فسفر می‌باشند (Chaichi et al., 2015). کودهای بیولوژیکی فسفر و کودهای شیمیایی فسفره را می‌توان برای تامین فسفر مورد نیاز گیاه شبدر پیشنهاد کرد. روش معمول تأمین عناصر غذایی استفاده از کودهای شیمیایی است. مصرف بی‌رویه کودهای شیمیایی علاوه بر بالا بردن هزینه‌های تولید، منجر به آلودگی اکوسیستم‌های کشاورزی می‌گردد. پس این نوع مصرف نه تنها منطبق بر سیاست‌های توسعه پایدار نیست بلکه از نظر مصرف انرژی در اکوسیستم‌های کشاورزی نیز باعث هدر رفت انرژی می‌گردد (Viruel et al., 2011). همچنین، مقدار زیادی از فسفر موجود در کود شیمیایی بعد از ورود به خاک نامحلول می‌شود، به‌طوری‌که، در خاک‌های آهکی به ترکیبات نامحلول کلسیم و منیزیم و در خاک‌های اسیدی به فسفات آهن و آلومینیوم تبدیل و از دسترس گیاهان خارج می‌شود (Khan et al., 2013; Sharma et al., 2013). گروهی از میکروارگانیسم‌های خاک قادر به تبدیل فسفر نامحلول به اشکال فسفر محلول و قابل دسترس گیاه می‌باشند که به میکروارگانیسم‌های حل کننده فسفات[1] موسوم بوده و به‌عنوان بهترین گزینه برای ارایه ارزان فسفر به گیاه هستند (Khan et al., 2013). مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات شامل جنس‌های سودوموناس، باسیلوس، ریزوبیوم، آکروموباکتر، آگروباکتریوم، میکروکوکوس و ائروباکتر می‌باشند (Wani et al., 2007; Kumar et al., 2015; Poonguzhali et al., 2008). این میکروارگانیسم‌ها علاوه بر تامین فسفر محلول برای گیاهان از طریق چندین مکانیسم دیگر نیز رشد گیاهان را تسهیل می‌کنند، به‌عنوان مثال، بهبود جذب مواد عناصر غذایی، تولید آنزیم ACC دی‌آمیناز و تولید برخی هورمون‌های گیاهی (Yadav and Verma, 2012). استان گیلان از جمله مناطقی است که بخش زیادی از مزارع آن بعد از برداشت برنج زیر کشت شبدر برسیم قرار می‌گیرد و عملکرد شبدر نیز به شدت دستخوش شرایط تغذیه‌ای قرار داشته و کشاورزان همواره به دنبال راهکارهایی برای پایداری و افزایش تولید می‌باشند. بنابراین، تحت شرایط اقلیمی استان گیلان استفاده از این باکتری‌ها از طریق فعالیت‌های یاد شده ممکن است باعث افزایش

1 -phosphate-solubilizing microorganisms (PSM)

جذب فسفر شده و در نهایت ضمن افزایش عملکرد علوفه، کیفیت علوفه را نیز ارتقاء دهند. به همین منظور آزمایش حاضر برای ارزیابی تاثیر باکترهای حل‌کننده فسفر و سطوح مختلف کود شیمیایی فسفر بر خصوصیات کمّی و کیفی شبدر برسیم تحت شرایط کشت دوم انجام گردید.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در سال زراعی 1394 در اراضی پیرامون شهر فومن با طول جغرافیایی ′20 °48 و عرض جغرافیایی ′19 °38، 151 متر از سطح دریا جرا شد. قبل از شروع آزمایش از خاک مزرعه جهت تعیین برخی از خصوصیات خاک نمونه‌برداری به‌عمل آمد که نتایج آزمون خاک در جدول 1 ارایه شده است. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام گردید. تیمارهای آزمایشی عبارت بودند از کاربرد کود شیمیایی فسفر (صفر، 75 و 150 کیلوگرم سوپرفسفات تریپل که به‌ترتیب 5/34 و 69 کیلوگرم فسفات خالص در هکتار) و سویه‌های باکتری سودموناس (سویه‌های M_{21}، M_5 و M_{168} باکتری Pseudomonas putida و بدون تلقیح با باکتری). خصوصیات سویه‌های باکتری سودموناس پوتیدا در جدول 2 ارایه شده است. بعد از برداشت برنج، عملیات شخم با روتاری انجام و بعد از تسطیح زمین، کاشت در اواسط مهر ماه انجام شد. بعد از عملیات آماده‌سازی زمین، کرت‌هایی ایجاد شد که هر کرت شامل 6 ردیف کاشت به طول 5 متر و فاصله ردیف کشت 40 سانتی‌متر گرفته شد. بذر شبدر برسیم مورد استفاده رقم ساکرومونت بود که از بخش گیاهان علوفه‌ای موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید. جهت تلقیح بذرها، ابتدا بذرها به وسیله صمغ عربی آغشته و باکتری‌های مورد نظر به توده بذر اضافه گردید. همگی این باکتری‌ها بومی خاک‌های کشور بوده و توسط بخش تحقیقات بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب جدا و خالص سازی شده و مایه تلقیح آنها تهیه شده است. برای تلقیح بذرها میزان هفت گرم مایه تلقیح که در هرگرم آن 10^7 عدد باکتری زنده و فعال وجود دارد، مورد استفاده قرار گرفت. میزان مصرف براساس دستورالعمل موسسه تحقیقات آب و خاک بود. پس از تلقیح بذور و خشک کردن در سایه، عملیات کاشت با توصیه‌های صورت گرفته انجام شد. کشت به صورت دستی و با کشت 2 بذر در هر نقطه کاشته شد (کود شیمیایی فسفر نیز زیر بذر قرار داده شد)، در طول دوره رشد به‌منظور کنترل علف‌های هرز وجین دستی اعمال گردید. پس از سبز شدن از پیرامون محیط خاک ریشه یک محلول هر هفته تهیه شد و pH محلول خاک بعد از کالیبراسیون pH متر (JENCO pH meter, 671 P model) اندازه‌گیری شد. برای پرهیز از اثرات حاشیه‌ای، یادداشت برداری‌ها و نمونه‌برداری‌ها از 4 ردیف داخلی (2 ردیف از 6 ردیف کاشت کناری به عنوان حاشیه در نظر گرفته شدند) و نیز با حذف حدود نیم متر از ابتدا و انتهای هر ردیف انجام شد. جهت تعیین عملکرد علوفه از دو خط وسط با حذف 0/5 متر از ابتدا و انتهای خطوط در زمانی که ارتفاع بوته‌ها به 50 سانتی‌متر رسید، چین برداری انجام شد که بلافاصله علوفه برداشتی توزین و عملکرد علوفه تر تعیین گردید. جهت تعیین عملکرد علوفه خشک نمونه مورد نظر در آزمایشگاه در دمای 75 درجه سلسیوس به مدت 72 ساعت خشک و سپس توزین و به دنبال آن عملکرد علوفه خشک هر واحد آزمایشی محاسبه

شد، ضمن آن‌که مقدار رطوبت موجود در گیاهـان برداشتی نیز تعیین گردید.

برای تعیین خصوصیات کیفی علوفه، از علوفه خشک یک نمونه 200 گرمی انتخاب و پودر و سپس در آزمایشگاه غلظت نیتروژن به روش کجلدال و غلظت فسفر با استفاده از روش خاکستر خشک و با دستگاه غلظت اتمی مدل GBC932 ساخت استرالیا اندازه‌گیری شد. برای محاسبه درصد پروتئین، بعد از به‌دست آوردن درصد نیتروژن موجود در برگ و ساقه (روش کجلدال) به عدد ثابت 6/25 ضرب و درصد پروتئین خام به‌دست آمد (Linn and Martin, 1999). در ادامه میزان پروتئین خام را در ضریب 0/93 ضرب و حاصل آن را از عدد 3/48 کم نموده و پروتئین قابل هضم به‌دست آمد (Jafari et al., 2003)، که مقادیر در عملکرد علوفه خشک ضرب و مقدار وزنی آنها در هکتار به‌دست آمد. مقدار 100 گرم از نمونه خشک هر واحد آزمایشی در داخل پاکت‌های جداگانه ریخته شد و به موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج ارسال گرددید و در آنجا با استفاده از دستگاه نیر[1] مقدار الیاف خام هر نمونه محاسبه گردید. در هنگام برداشت به مقدار لازم از خاک اطراف سیستم ریشه‌ای برداشته شد و حدود یک گرم از آن خاک برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های فسفاتاز قلیایی و اسیدی مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت فسفاتازهای اسیدی و قلیایی پس از اضافه کردن یک میلی‌لیتر محلول پارا نیترو فنیل سدیم فسفات به‌عنوان سوبسترا در حضور تامپون MUB (بافر اسیدی با pH =5/6 جهت اندازه‌گیری فسفاتاز اسیدی و بافر قلیایی با pH =5/10 جهت اندازه‌گیری فسفاتاز قلیایی) با استفاده از روش عیوضی و طباطبایی (Eivazi and Tabatabai, 1977) اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار $SAS_{9.2}$ و رسم شکل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد. مقایسه میانگین‌های اثرات متقابل با استفاده از روش برش‌دهی معمولی و روش L.S.Means و با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال پنج درصد انجام گرفت.

نتایج و بحث

عملکرد علوفه تر: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد اثر متقابل باکتری و کود شیمیایی فسفر بر عملکرد علوفه تر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3). مقایسه میانگین اثر متقابل باکتری و کود فسفات (برش‌دهی سویه‌های باکتری در سطوح مختلف کود شیمیایی فسفر) نشان داد در سطح عدم مصرف کود فسفر بیشترین عملکرد علوفه تر مربوط به سویه M_5 با میانگین 12424 کیلوگرم در هکتار بود. در سطح 75 کیلوگرم در هکتار کود فسفر نیز هر سه سویه نسبت به تیمار غیرتلقیحی برتری معنی‌دار داشتند و سویه M_{168} با میانگین 14916 کیلوگرم در هکتار بیشترین علوفه تر را تولید کرد و نسبت به دو سویه دیگر برتر بود. اما در سطح 150 کیلوگرم در هکتار کود فسفات بین سویه‌های M_{168} و M_{21} با تیمار عدم تلقیح، اختلاف معنی‌دار وجود نداشت و فقط سویه M_5 با میانگین 16136 کیلوگرم در هکتار نسبت به تیمار عدم تلقیح از برتری معنی‌دار برخوردار بود. در مجموع بیشترین عملکرد علوفه از سطح 150 کیلوگرم کود شیمیایی فسفر و سویه M_5 به‌دست آمد (جدول 6 و 7). با توجه به این نتایج، چنین می‌توان استنباط کرد که در سطوح بالای کود

[1] -Near Infrared Reflectance Spectroscopy (NIR)

شیمیایی فسفر، کارآیی سویه‌های باکتری به‌جز سویه M_5 کاهش یافت. چایچی و همکاران (Chaichi et al., 2015) کاهش کارآیی برخی از سویه‌های باکتری در سطوح بالاتر مصرف کود شیمیایی را ناشی از کاهش فعالیت باکتری برای جذب و انتقال عناصر گزارش کرد. فسفر اغلب به صورت فسفات‌های معدنی کم محلول و یا نامحلول و یا به صورت فسفر آلی در خاک وجود دارد که به سهولت برای گیاهان قابل استفاده نیستند. به عبارت دیگر کمبود غلظت فسفات‌های قابل جذب خاک‌های زراعی باعث شده است که از سال‌ها پیش تاکنون برای رفع کمبود فسفر مورد نیاز گیاهان، این عنصر را به‌صورت کودهای شیمیایی فسفردار به خاک اضافه شود (Pant and Reddy, 2003). سطح سلولی نیز آنچه اهمیت فسفر را نشان می‌دهد ناقل‌های انرژی مانند آدنوزین تری فسفات است که حاوی فسفات مولکولی است که با آزاد کردن هر فسفات، مقدار مشخصی انرژی آزاد می‌کند و فعالیت‌های سلولی را از نظر انرژی تامین می‌نماید. رشد و نمو طبیعی در شبدر به منبع کافی و کامل فسفر مورد نیاز سلول نیازمند است (Kumar et al., 2015). به رغم فراوانی مقدار فسفر کل در بسیاری از خاک‌ها اما فسفر قابل جذب برای گیاهان زراعی کافی نیست. بنابراین، به غیر از کودهای شیمیایی می‌توان از کودهای بیولوژیکی که در واقع مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌ها هستند، نیز استفاده کرد. یوگائو و همکاران (Yu-guo et al., 2006) در بررسی اثرات کاربرد مقادیر مختلف کود فسفر بر عملکرد علوفه شبدر گزارش نمودند اثر کود فسفر بر عملکرد علوفه‌تر معنی‌دار بوده و بیشترین عملکرد علوفه تر به مقدار 43/5 تن در هکتار از مصرف 160 کیلوگرم فسفر در هکتار به‌دست آمد که با نتایج این آزمایش مطابقت دارد. تاثیر کاربرد باکتری‌های سودوموناس در افزایش عملکرد علوفه تر شبدر در نتایج شاهوردی و همکاران (Shahverdi et al., 2014) و جوادی و همکاران (Javadi et al., 2010) نیز گزارش شده است.

عملکرد علوفه خشک: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد اثر ساده سطوح مختلف کود شیمیایی فسفر و باکتری‌های حل کننده فسفات بر عملکرد علوفه‌خشک شبدر در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3). مقایسه میانگین اثر سطوح مختلف کود شیمیایی فسفر بر عملکرد علوفه خشک شبدر نشان داد با افزایش مصرف کود از سطح صفر به 75 کیلوگرم، عملکرد علوفه خشک از 2425 کیلوگرم در هکتار به 2603 کیلوگرم در هکتار افزایش یافت، اما این افزایش معنی‌دار نبود. اما از سطح 75 به 150 کیلوگرم فسفر در هکتار عملکرد علوفه خشک به 3031 کیلوگرم در هکتار رسید اختلاف معنی‌دار با دو سطح دیگر داشت (جدول 5). اصولاً گیاهان قادر هستند فسفات غیرآلی محلول را جذب نمایند که به‌طور عادی میزان آن در خاک به مراتب کمتر از نیاز گیاه است. کمبود فسفر به شدت روی میزان رشد گیاهان اثر منفی می‌گذارد و تشکیل گل، میوه، بذر و کیفیت آنها را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد. مصرف بیوفسفر، سبب افزایش مقاومت گیاهان در شرایط تنش‌های محیطی مثل شوری و خشکی می‌شود (Veneklaas et al., 2012). مقایسه میانگین اثر سویه‌های باکتری بر عملکرد علوفه خشک شبدر نشان داد که سویه M_5 و M_{168} به‌ترتیب با میانگین 3073 و 2937 کیلوگرم در هکتار نسبت به تیمار عدم تلقیح با میانگین 2326 کیلوگرم در هکتار برتری معنی‌دار

داشتند و سویه M_{21} با میانگین 2409 کیلوگرم در هکتار تفاوت معنی‌دار با تیمار عدم تلقیح نشان ندادند (جدول 5). افزایش جذب فسفر، بهبود تغذیه‌ی گیاه و احتمالاً گسترش بیشتر ریشه در خاک، دلیل تولید بیشتر ساقه در شبدر برسیم است. آنگلاد و همکاران (Anglade et al., 2015) نتایج مشابهی را برای گیاهان زراعی مختلف گزارش نموده‌اند. واسیلوا و همکاران (Vassileva et al., 2010) نیز افزایش ماده خشک توسط باکتری سودوموناس فلورسنت و قارچ میکرریزا را نسبت به گیاهان تلقیح نشده را ناشی از تامین عناصر غذایی توسط این دسته از باکتری‌ها گزارش کردند.

پروتئین خام: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد اثر باکتری‌های حل کننده فسفات بر پروتئین خام در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود (جدول 3). مقایسه میانگین اثر باکتری‌های حل کننده فسفر بر پروتئین خام شبدر نشان داد سویه M_{168} و M_5 با میانگین 20/42 و 19/43 درصد در مقایسه با تیمار عدم تلقیح با باکتری با میانگین 16/20 درصد برتری معنی‌دار داشتند و سویه M_{21} با میانگین 16/53 تفاوت معنی‌دار با تیمار عدم تلقیح نشان ندادند (جدول 5). عموماً گیاهان تلقیح شده با باکتری‌های محرک رشد (PGPR) دارای محتوای نیتروژن بالاتری نسبت به گیاهان غیرتلقیحی هستند (Viruel et al., 2011). گزارش شده است که تلقیح با سودوموناس جذب PO_4^{-3} و NH_4^+ را به‌وسیله گیاه شبدر بالا برده و مقدار پروتئین در گیاه را افزایش می‌دهد (Maougal et al., 2014)، که مبین نتایج به‌دست آمده در این آزمایش می‌باشد. هارواز و همکاران (Harvas et al., 2008) گزارش کردند سودوموناس پوتیدا سویه NtrC می‌تواند نیتروژن خاک را برای ریشه تنظیم کرده و ترکیبات آمینواسیدی در اختیار ریشه قرار دهد. بونا و همکاران (Bona et al., 2017) نیز گزارش کردند که باکتری سودوموناس فلورسنت می‌تواند نیترات را جذب و تبدیل به آمونیوم کند و به‌طور فعال انتقال دهد. بنابر نتایج گزارش شده توسط کلارک (Clark, 2007) شبدر برسیم دارای 14-24 درصد پروتئین خام می‌باشد.

عملکرد پروتئین: تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد اثر متقابل کود شیمیایی فسفر و باکتری بر عملکرد پروتئین در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود (جدول 4). مقایسه میانگین اثر متقابل کود شیمیایی فسفر و باکتری بر عملکرد پروتئین نشان داد در دو سطح صفر و 75 کیلوگرم در هکتار کود شیمیایی فسفر سویه‌های باکتری عملکرد پروتئین بیشتری نسبت به تیمار عدم تلقیح نشان دادند و سویه M_{168} در سطح صفر و M_5 در سطح 75 کیلوگرم در هکتار به‌ترتیب با میانگین 2498 و 2730 کیلورم در هکتار نسبت به سایر سویه‌ها از برتری معنی‌دار برخوردار بودند. اما، در سطح 150 کیلوگرم در هکتار کود شیمیایی فسفر سویه M_5 با تولید 2746 کیلوگرم در هکتار بیشترین عملکرد پروتئین را تولید کرد ولی به لحاظ آماری اختلاف معنی‌دار با سویه M_{168} (با میانگین 2586) نداشت، این در حالی است که بین سویه M_5 و تیمار عدم تلقیح اختلاف معنی‌دار وجود نداشت (جدول 6 و 7). عملکرد پروتئین که تابع درصد پروتئین و عملکرد علوفه تر می‌باشد، نشان‌دهنده میزان پروتئین خام برداشتی از علوفه برداشت شده است. هارواز و همکاران (Harvas et al., 2008) نشان دادند کل نیتروژن برگ با شدت آسیمیلاسیون CO_2 و فعالیت آنزیم‌های سوخت و سازی ریبولوز 1 و 5-

بیس فسفات کربوکسیلاز/ اکسیژناز (روبیسکو) و فسفوانول پیرووات کربوکسیلاز (PEP) در ارتباط است. کومبس و همکاران (Coombs et al., 2017) بیان داشتند 40-50 درصد نیتروژن محلول در برگ‌های گیاهان C_4 را می توان در ساختار این دو آنزیم به علاوه پیرووات اورتوفسفات دی‌کیناز یافت. از آن‌جایی که فسفر در بسیاری از ترکیبات سلول‌های گیاهی از قبیل اسیدهای آمینه و اسیدهای نوکلئیک و فسفولیپیدها وجود دارد، بنابراین به نظر می رسد یکی از علایم کمبود آن در گیاه، کند شدن رشد و کاهش پروتئین باشد. در واقع با کمبود فسفر در گیاه به‌دلیل اختلال در فتوسنتز، رشد اندام های رویشی با مشکل مواجه خواهد شد. هچنین، زیادبود فسفر نیز منجر به بروز برخی مسایل مانند عدم تناسب رشدی بین ساقه و برگ‌ها در گیاه می شود. بنابراین، وجود فسفر قابل دسترس مناسب منجر به افزایش رشد و افزایش پروتئین و در نهایت عملکرد پروتئین می‌شود (Wang et al., 2006). چادری و همکاران (Chaudhry et al., 2016) ضمن به‌دست آوردن نتایج مشابه گزارش کردند باکتری‌های محرک رشد گیاه مانند سودوموناس از طریق افزایش تعداد گره ریشه شبدر برسیم می‌تواند به نحو مطلوبی نیتروژن گیاه را افزایش داده و از این طریق پروتئین علوفه را افزایش دهد و در تناوب با برنج، بخشی از نیتروژن مورد نیاز گیاه برنج را نیز تأمین نماید.

پروتئین قابل هضم: نتایج تجزیه واریانس نشان داد اثر باکتری بر پروتئین قابل هضم در سطح احتمال 1% معنی‌دار بود (جدول 4). مقایسه میانگین اثر باکتری‌های حل کننده فسفر بر پروتئین قابل هضم نشان داد که سویه M_{168} و M_5 با میانگین 15/51 و 14/59% نسبت به تیمار عدم تلقیح با باکتری با میانگین 11/58% برتری معنی‌دار داشتند و سویه M_{21} با میانگین 11/89% تفاوت معنی‌دار با تیمار عدم تلقیح نشان ندادند (جدول 5). پروتئین قابل هضم که بیشتر تابع مقدار پروتئین گیاه است، به شدت تحت تاثیر شرایط تغذیه‌ای به‌ویژه نیتروژن و فسفر است (Gaafar et al., 2011). ابراهیم و همکاران (Ibrahim et al., 2010) ضمن اشاره به نقش مثبت باکتری‌های محرک رشد گیاه بر افزایش پروتئین قابل هضم در گیاه شبدر برسیم، کودهای شیمیایی فسفاته و نیتروژنه را در افزایش عملکرد علوفه مفیدتر گزارش کردند، هر چند در آزمایش آنها کارآیی تلقیح باکتریایی در سطوح بالای مصرف کود شیمیایی به شدت کاهش یافت. چایچی و همکاران (Chaichi et al., 2015) نیز افزایش پروتئین قابل هضم شبدر برسیم توسط برخی از سویه‌های باکتری سودوموناس را ناشی از بهبود شرایط برای فعالیت تثبیت بیولوژیک نیتروژن توسط شبدر از طریق فراهم کردن هیدروکربن‌ها و سیدروفورها در محیط ریشه گزارش کردند. تاثیر باکتری‌های محرک رشد در افزایش پروتئین قابل هضم توسط وارگاس و همکاران (Vargas et al., 2009) و مائوگال و همکاران (Maougal et al., 2014) و گزارش شده است.

مقدار الیاف خام: نتایج حاصل از تجزیه واریانس نشان داد اثر ساده کود شیمیایی فسفر و باکتری بر مقدار الیاف خام به‌ترتیب در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد معنی‌دار بود (جدول 4). مقایسه میانگین تاثیر کود فسفر بر مقدار الیاف خام شبدر نشان داد هر دو سطح کود فسفر نسبت به عدم مصرف کود فسفر الیاف خام بیشتری نشان دادند، اما بین سطح 75 و 150

کیلوگرم کود فسفر به لحاظ آماری تفاوت معنی‌دار وجود نداشت. مقایسه میانگین اثر سویه‌های باکتری بر مقدار الیاف خام نشان داد که تیمار عدم تلقیح و سویه M_{21} با میانگین 25/04% و 24/45% تفاوت معنی‌دار نداشت اما نسبت به سویه‌های M_{168} و M_5 به‌ترتیب با میانگین 21/43و 21/70% برتری معنی‌دار داشتند (جدول 5). کومبس و همکاران (Coombs et al., 2017) گزارش کردند با کمبود فسفر دیواره سلولی تحریک به ساختن فیبر شده (افزایش فیبر) و تولید پروتئین و قابلیت هضم گیاه کاهش می‌یابد. در ادامه آنها نقش باکتری‌ها را در تامین به موقع فسفر و افزایش پروتئین و کاهش فیبر برگ‌های شبدر برسیم مفید دانستند. بر اساس گزارش باخوم و همکاران (Bakhoum et al., 2016) مقدار پروتئین خام در شبدر مصری به‌طور متوسط 22 درصد و میزان فیبر آن 24 درصد می‌باشد.

چایچی و همکاران (Chaichi et al., 2015) گزارش کردند باکتری‌ها با نقشی که در تعدیل مصرف عناصر غذایی دارند مقدار الیاف خام را کاهش می‌دهند. آرونسون و همکاران (Aronsson et al., 2016) افزایش مقدار الیاف خام را با افزایش مصرف کود شیمیایی فسفر و تعویق در برداشت را مشاهده کردند. در این آزمایش نیز سویه‌های M_{168} و M_5 در مقایسه با تیمار عدم تلقیح مقدار فیبر خام علوفه را کاهش دادند.

مقدار فسفر علوفه: نتایج نشان داد اثر متقابل شیمیایی فسفر و باکتری بر مقدار فسفر دانه معنی‌دار بود (جدول 4). نتایج نشان داد در سطح عدم مصرف کود شیمیایی فسفر بین سویه‌ها اختلاف معنی‌دار وجود نداشت اما نسبت به تیمار عدم تلقیح برتری معنی‌دار نشان دادند. در سطح 75 کیلوگرم کود شیمیایی فسفر نیز سویه‌های باکتری نسبت به تیمار عدم تلقیح مقدار فسفر بیشتری جذب کردند و سویه M_5 در مقایسه با دو سویه دیگر برتری معنی‌دار داشت. اما در سطح 150 کیلوگرم کود شیمیایی فسفر سویه M_{21} و M_5 نسبت به تیمار عدم تلقیح به‌ترتیب 31/4 و 27/9 درصد جذب فسفر را افزایش دادند (جدول 6 و 7). طبق نتایج به‌دست آمده از این تحقیق به نظر می‌رسد با افزایش فسفر در بستر خاک و همچنین استفاده از میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات، این ریزجانداران با ترشح اسیدهای آلی مانند اگزالیک اسید و سیتریک اسید، از طریق کلاته‌کردن و تشکیل کمپلکس‌های پایدار با کاتیون‌های آهن و آلومنیوم و کلسیم سبب آزاد شدن فسفات به داخل محلول خاک می‌شوند و همچنین گلوکونیک اسید و اسید 2-کتواگزالیک با آزادسازی پروتون سبب کاهش pH محیـط و انحـــلال فسفات‌های نامحلول خاک می‌گردند (Salimpour et al., 2010)، در نتیجه آزاد شدن فسفر در خاک قابلیت دسترسی ریشه به این عنصر زیاد شده و راندمان جذب فسفر در برگ هم بالا می‌رود. البته نوع و مقدار اسیدهای آلی در هر محیط به نوع میکروارگانیسم‌های تولید کننده آنها مربوط می‌باشد (Ghaderi et al., 2008). این نتایج با نتایج تحقیقات چایچی و همکاران (Chaichi et al., 2015) بر روی شبدر مطابقت دارد. همچنین جوادی و همکاران (Javadi et al., 2010) افزایش عملکرد علوفه و فسفر برگ شبدر را توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفر (PGPB) گزارش کردند. امین‌دلدار و همکاران (Amin deldar et al., 2012) بیشترین میزان فسفر گیاه برنج را در رابطه با تلقیح ریشه با باکتری یافتند. محققان افزایش جذب فسفر توسط گیاهان همیار با ریزجانداران حل‌کننده فسفات را

به‌واسطه تولید کربن به‌وسیله این ریزجانداران و اثر آن بر افزایش قابلیت جذب فسفر گزارش کردند (Khan et al., 2013).

فسفاتاز اسیدی و قلیایی: برخی از سویه‌های باکتری سودوموناس پوتیدا سبب افزایش مقدار عناصر نیتروژن و فسفر و انتقال آنها از ریشه به بخش هوایی گیاه می‌شوند (Afzal et al., 2010). یکی از دلایل آن می‌تواند پتانسیل توانایی تولید اسید (H^+)، فسفاتاز اسیدی و قلیایی و اثر حل‌کنندگی فسفات معدنی توسط باکتری باشد (Alikhani et al., 2017)، که در این تحقیق به‌صورت مزرعه‌ای ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی تحت تاثیر مصرف کود قرار نگرفت (جدول 4). اثر سویه‌های باکتری سودوموناس پوتیدا بر آنزیم فسفاتاز اسیدی و قلیایی نشان داد که تفاوت معنی‌داری بین سویه‌ها با تیمار عدم تلقیح وجود داشت و سویه M_5 در مقایسه با دو سویه دیگر از برتری معنی‌داری برخوردار بود (جدول 5). آزمایش‌های اولیه روی سویه‌های باکتری به کار برده شده در این آزمایش نشان داده است که این باکتری‌ها قادر به انحلال فسفر معدنی نامحلول از طریق کاهش pH بوده و نیز قادر به تولید و ترشح آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی و کسب فسفر از منابع آلی می‌باشند. طبق گزارش رحیمی و همکاران (Rahimi et al., 2012) کودهای معدنی فاقد فسفر نظیر اوره، نیترات آمونیوم با پتاسیم یا بدون آن، فعالیت فسفاتاز را زیاد می‌کند. از طرفی با توجه به اینکه آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی توسط گیاه و نیز باکتری تولید و ترشح می‌شود، لذا توزیع مطلوبی از این آنزیم در خاک کرت‌ها وجود داشته است. یکی دیگر از نظریه‌ها برای تفسیر تجمع فسفر به دنبال تلقیح گیاه با باکتری، فعالیت نیترات فسفاتاز باکتریایی است. این تئوری تا حدودی افزایش تجمع فسفر در برگ و ساقه را بر مبنای ازدیاد سرعت تحول و احیای فسفر به کمک باکتری توجیه می‌نماید (Lazali et al., 2016). مکانیسم مؤثر برای این امر به توسعه سیستم ریشه‌ای در اثر تولید هورمون توسط این باکتری‌ها نسبت داده شده است که منجر به افزایش جذب ترکیبات فسفره می‌شود (Pereg et al., 2016). آزمایش‌های اولیه بر سویه‌های باکتری به کار برده شده در این آزمایش نشان داده است این باکتری‌ها قادر به انحلال فسفات معدنی نامحلول از طریق کاهش pH بوده و نیز قادر به تولید و ترشح آنزیم‌های فسفاتاز اسیدی و قلیایی و کسب فسفر از منابع آلی می‌باشند.

کارآیی سویه M_5 در مقایسه با دو سویه دیگر در این ویژگی‌ها بالاتر می‌باشد. بنابراین، بدیهی است که مقدار جذب و انتقال فسفر در سویه M_5 بالاتر باشد و تیمارهای تلقیح شده نسبت به شاهد مقدار فسفر بالاتری داشته باشند. همچنین، بیشترین عملکرد علوفه تر و خشک نیز توسط همین سویه تولید شد. برخی معتقدند که این افزایش محتوای یونی مربوط به توسعه سیستم ریشه‌ای و افزایش عمومی سطح جذب یون‌ها بوده و با مکانسیم خاصی همراه نیست (Singh and Sharma, 2016). اما داولاتزای و همکاران (Dawlatzai et al., 2015) نشان دادند که تلقیح باکتریایی بر عملکرد ATPase و پمپ الکتروژنیک در غشای سلول‌های ریشه اثر کرده و با ازدیاد تراوش پروتون از ریشه، نیروی محرکه‌ی لازم برای جذب سایر یون‌ها برای گیاه را فراهم می‌نماید.

pH خاک: نتایج اندازه‌گیری pH خاک در طول دوره رشد گیاه نشان داد در تیمارهایی که فقط کود شیمیایی فسفر دریافت کرده‌اند با گذشت زمان pH در حال افزایش است که بعد از 60 روز ثابت می‌شود. در تیمارهایی تلقیحی بدون کاربرد کود نیز، pH خاک با گذشت زمان کاهش یافت تا اینکه بعد از تقریباً 40 روز ثابت شد. اما زمانی که به تیمارهای کودی، باکتری نیز اضافه شد pH خاک کاهش یافت و کمترین pH نیز از سویه M_5 مشاهده شد به‌طوری‌که، pH خاک را تا 29/6 درصد را کاهش داد (شکل 1).

شکل‌های مختلف فسفر در خاک به‌وسیله خصوصیات طبیعی خاک شامل pH ،کاتیون‌های محلول و تبادلی (Mg^{+2}, Ca^{+2}, Fe^{+2})، نوع ذرات خاک و سطح آنها کنترل می‌شود. مقدار زیادی از فسفر موجود در کودهای شیمیایی بعد از ورود به خاک نامحلول می‌شود، به‌طوری‌که در خاک‌های آهکی به ترکیبات نامحلول کلسیم و منیزیم و در خاک‌های اسیدی به فسفات آهن و آلومینیوم تبدیل شده و از دسترس گیاهان خارج می‌شود. اشکال مختلف فسفر در یک محلول ساده عبارتند از Po_4^{3-}, Hpo_4^{2-}, $H_2po_4^{-2}$, H_3Po_4 و توزیع فراوانی این گونه‌ها بستگی به pH دارد. اگر یون‌های آهن، آلومینیوم، کلسیم و منیزیم در محیط واکنش وجود داشته باشند، در شرایط اسیدی فسفات‌های نامحلول آهن و آلومینیوم و در pH بالا فسفات‌های نامحلول کلسیم و منیزیم (به خصوص فسفات کلسیم) رسوب می‌نماید (Rashid et al., 2004). بالا رفتن مقدار کود فسفر در خاک خود نیز یکی از عوامل بالا بردن pH در شرایط نرمال خاک می‌باشد (Bhattacharyya and Jha, 2012).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج نشان داد کاربرد کود شیمیایی فسفر منجر به افزایش pH خاک به‌دلیل داشتن خاصیت قلیایی در طول دوره رشد گیاه شد، در حالی که تلقیح باکتریایی منجر به تعدیل pH خاک شده و زمانی که همراه با کود شیمیایی استفاده شد نیز pH خاک را کاهش داد. عملکرد علوفه تر شبدر، عملکرد پروتئین و مقدار فسفر شاخ و برگ نیز تحت تاثیر برهمکنش سویه‌های باکتری و کود شیمیایی فسفر افزایش یافت.

به‌طوری‌که، بیشترین عملکرد علوفه تر و عملکرد پروتئین به ترتیب با میانگین 16136 و 2746 کیلوگرم در هکتار از سویه M_5 در سطح 150 کیلوگرم کود شیمیایی فسفر به‌دست آمد که در مقایسه با تیمار عدم تلقیح عملکرد علوفه را 49/16 و 1/8 درصد عملکرد پروتئین را افزایش داد. با توجه به نتایج به دست آمده، کاربرد 150 کیلوگرم کود شیمیایی فسفر در هکتار تحت تلقیح با باکتری سودوموناس پوتیدا سویه M_5 ضمن بالا بردن کارآیی جذب کود مصرفی، برای دست‌یابی به حداکثر عملکرد و کیفیت علوفه شبدر برسیم در نظام کشت دوم در منطقه فومن مورد توجه می‌تواند باشد.

جدول 1- ویژگی‌های سویه‌های باکتری سودموناس پوتیدا

Table 1- Characteristics of Pseudomonas putida strains

سویه‌های سودوموناس پوتیدا Pseudomonas putida strains	تولید ACC دی‌آمیناز ACCdeaminase production	قابلیت حل کنندگی فسفات P-solubilizing ability	تولید ایندول استیک اسید IAA production (mg/lit)	تولید سیدروفور Siderophore production (halo diameter/colony diameter)
P. putida strain M168	+	+	5.8	0.50
P. putida strain M21	+	+	8.9	0.66
P. putida strain M5	+	+	9.6	0.73

جدول 2- خواص فیزیکی و شیمیایی خاک محل آزمایش

Table 2- Selected physical and chemical characteristics of the at the research location

عمق (سانتی متر) Depth (cm)	بافت خاک texture	هدایت الکتریکی Ec (ds/m)	اسیدیته pH	کربن آلی OC (%)	نیتروژن کل Total N (%)	فسفر قابل جذب P	پتاسیم قابل جذب K	آهن Fe	روی Zn	منگنز Mn
						(mg/kg)				
0-30	clay-loam	1.23	7.7	2.28	0.21	7.1	193	1.16	2.04	1.88

جدول 3- تجزیه واریانس اثر کود شیمیایی فسفر و باکتری سودوموناس بر عملکرد پروتئین، پروتئین خام، عملکرد علوفه تر و خشک

Table 3- Analysis of variance of phosphor fertilizer and Pseudomonas strains on protein yield, crude protein, dry and fresh forage yield

منابع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی df	میانگین مربعات (Mean Square)			
		عملکرد علوفه تر Fresh forage yield	عملکرد علوفه خشک Dry forage yield	پروتئین خام Crude protein	عملکرد پروتئین Protein yield
تکرار Repeat	2	322618^{ns}	1176778**	2.841^{ns}	20201ns
باکتری Bacteria (B)	3	22695596**	1257322**	39.73**	1231892**
کود فسفر Phosphor (P)	2	24875182**	1164141.**	0.211^{ns}	501008**
P×B	6	8911741**	39633^{ns}	2.514^{ns}	174953*
خطا Error	22	696064	182840	1.386	58295
ضریب تغییرات CV (%)	-	6.72	15.91	6.48	10.72

ns، * و ** به‌ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

ns,* and **: not significant, significant at 1% and 5% probability levels, respectively.

جدول 4- تجزیه واریانس اثر کود شیمیایی فسفر و باکتری سودوموناس بر پروتئین قابل هضم، مقدار الیاف خام، عملکرد پروتئین، فسفر اندام‌های هوایی، فسفاتاز اسیدی و قلیایی

Table 4- Analysis of variance of phosphor fertilizer and Pseudomonas strains on digestible protein, crude fiber, shoot P, acid and alkaline phosphatase

(S.O.V) منابع تغییرات	درجه‌آزادی df	میانگین مربعات Mean Square				
		الیاف خام Crude fiber	پروتئین قابل هضم Digestible protein	فسفاتاز اسیدی Acid phosphatase	فسفاتاز قلیایی Alkaline phosphatase	فسفر اندام هوایی Shoot P
تکرار Repeat	2	2.502^{ns}	2.457^{ns}	1.47**	30.78^{ns}	0.0514^{ns}
باکتری Bacteria (B)	3	31.00**	34.36**	9.11**	141.3*	0.131**
کود فسفر Phosphor (P)	2	6.29*	0.182^{ns}	0.015^{ns}	21.34^{ns}	0.123**
P×B	6	1.972^{ns}	2.17^{ns}	0.08^{ns}	43.64^{ns}	0.243**
خطا Error	22	1.83	1.198	0.042	23.65	0.025
ضریب تغییرات CV (%)	-	5.84	8.17	21.73	28.17	2.76

ns، * و ** به‌ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

ns,* and **: not significant, significant at 1% and 5% probability levels, respectively.

جدول 5- مقایسه میانگین اثر اصلی کود شیمیایی فسفر و باکتری سودوموناس بر صفات اندازه‌گیری شده شبدر

Table 4- Mean comparison of Phosphate fertilizer and Pseudomonas strains main effect on Berseem clover traits

Pseudomonas putida strains	عملکرد علوفه خشک dry forage yield	مقدار الیاف خام Crude fiber	پروتئین خام Crude protein	پروتئین قابل هضم Digestible protein	فسفاتاز اسیدی Acid phosphatase	فسفاتاز قلیایی Alkaline phosphatase
	کیلوگرم در هکتار	درصد			میکروگرم پارا-نیتروفنل آزاد شده از یک گرم خاک در مدت یک ساعت	
عدم تلقیح	2326b	25.04a	16.20b	11.58b	0.332d	12.09b
M21	2409b	24.45a	16.53b	11.89b	0.684c	18.54ab
M168	2937a	21.43b	20.42a	15.51a	1.135b	16.85ab
M5	3073a	21.70b	19.43a	14.59a	1.624a	21.57a
سطوح مختلف کود شیمیایی فسفر Phosphate fertilizer (kg/ha)						
P0	2425b	22.32b	18.22a	13.46a	0.823a	17.05a
P1	2603b	23.48a	18.22a	13.47a	0.943a	17.26a
P2	3031.a	23.66a	17.99a	13.25a	1.064a	17.48a

میانگین‌هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می‌باشند فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5 درصد به روش آزمون LSD می‌باشند.

In each column, means with similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level according to LSD tests (P0= control, P1= 75 kg P ha^{-1} and P2= 150 kg P ha^{-1})

جدول6 –تجزیه واریانس برش‌دهی سویه‌های باکتری سودموناس در سطوح مختلف کود شیمیایی فسفر

Table 6- Slice analysis of variance of Pseudomonas strains in Phosphate fertilizer different levels

کود شیمیایی فسفر Phosphate fertilizer	درجه آزادی df	عملکرد علوفه تر Fresh forage yield	عملکرد پروتئین Protein yield	فسفر اندام هوایی Shoot P
P0	3	12433290**	230302**	0.184*
P1	3	17233668**	1003484**	0.206*
P2	3	5192134*	56570*	0.236*

ns، * و ** به‌ترتیب عدم وجود اختلاف معنی‌دار، وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

ns,* and **: not significant, significant at 1% and 5% probability levels, respectively.

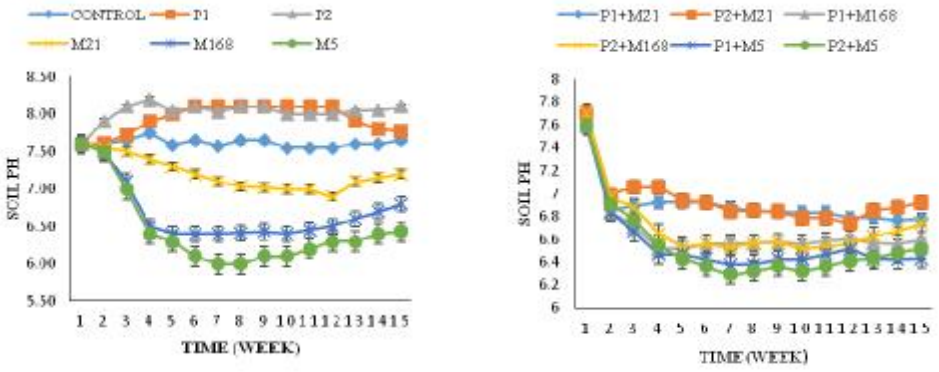
جدول7 – مقایسه میانگین اثر سویه‌های باکتری سودموناس در سطوح مختلف کود شیمیایی فسفر

Table 7- Mean comparison of Pseudomonas strains in Phosphate fertilizer different levels

کود شیمیایی فسفر Phosphate fertilizer	سویه‌های باکتری سودوموناس Pseudomonas strains	عملکرد علوفه تر Fresh forage yield (kg/ha)	عملکرد پروتئین Protein yield (kg/ha)	فسفر اندام هوایی Shoot P (mg/kg)
P0	**عدم تلقیح**	8161b	1839c	5.39b
	M21	10630ab	2034b	5.80a
	M168	11550ab	2498a	5.84a
	M5	12424a	2162ab	5.96a
P1	**عدم تلقیح**	9305c	1334d	5.45c
	M21	11797b	1945c	5.79b
	M168	14916a	2182b	5.82b
	M5	13163b	2730a	6.09a
P2	**عدم تلقیح**	13391b	2526b	5.48c
	M21	13315b	2417b	5.84b
	M168	14095b	2586a	5.47c
	M5	16136a	2746a	6.04a

میانگین هایی که در هر ستون دارای حروف مشترک می باشند فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال 5 درصد به روش آزمون LSD می‌باشند

In each column, means with similar letter(s) are not significantly different at 5% probability level according to LSD tests. (P0= control, P1= 75 kg P ha^{-1} and P2= 150 kg P ha^{-1})



شکل 1- مقدار pH خاک در تیمارهای مختلف در طول دوره رشد گیاه

Figure 1- Soil pH value in different treatments during growth period (P1= 75 kg P ha^{-1} and P2= 150 kg P ha^{-1})

References منابع مورد استفاده

· Afzal, A., M. Ashraf, S.A. Asad, and M. Farooq. 2010. Effect of phosphate solubilizing microorganisms on phosphorus uptake, yield and yield traits of wheat (Triticum aestivum) in rainfed area. Journal of Agriculture and Biology. 7(2): 207–209.

· Ahemad M., and M.S. Khan. 2012. Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing Pseudomonas putida isolated from mustard (Brassica campestris L.) rhizosphere. Chemosphere. 86: 945–950.

· Alikhani, H.A., A. Hemati, M. Rashtbari, S.D. Tiegs, and H. Etesami. 2017. Enriching Vermicompost Using P-solubilizing and N-fixing Bacteria under Different Temperature Conditions. Communications in Soil Science and Plant Analysis. 48(2): 139-147.

· Amin-Deldar, Z., M.R. Ehteshami, A. Shahdi Komleh, and K. Khavazi. 2012. Effect of Pseudomonas fluorescens strains on morphophysiologic traits and nutrients uptake in some of rice cultivars. Electronic Journal of Crop Production. 5(1): 141-149. (In Persian).

· Anglade, J., G. Billen, and J. Garnier. 2015. Relationships for estimating N2 fixation in legumes: Incidence for N balance of legume-based cropping systems in Europe. Ecosphere. 6(3): 1-24.

· Aronsson, H., E.M. Hansen, I.K. Thomsen, J. Liu, A.F. Øgaard, H. Känkänen, and B. Ulén. 2016. The ability of cover crops to reduce nitrogen and phosphorus losses from arable land in southern Scandinavia and Finland. Journal of Soil and water Conservation. 71(1): 41-55.

· Bakhoum, G. H., M.O. Kabesh, M.F. El-Kramany, T. Thalooth, and M.M. Tawfik. 2016. Utilization of BioFertilizers in Field Crop Production 17-Effect of organic manuring, mineral and bio fertilizers on forage yield and nutritive value of Egyptian clover (berseem) grown in new reclaimed sandy soil. International Journal of Chemical Technology Research. 9: 34-41.

· Bhattacharyya, P.N., and D.K. Jha. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 28(4): 1327-1350.

· Bona, E., S. Cantamessa, N. Massa, P. Manassero, F. Marsano, A. Copetta, G. Lingua, G. D'Agostino, E. Gamalero, and G. Berta. 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi and plant growth-promoting pseudomonads improve yield, quality and nutritional value of tomato: a field study. Mycorrhiza. 27(1): 1-11.

· Chaichi, M.R., G. Shabani, and F. Noori. 2015. Response of berseem clover to chemical, biological and integrated use of fertilizers. Cercetari Agronomice in Moldova. 48(1): 77-87.

· Chaudhry, M.Z., A.U. Naz, A. Nawaz, H. Mukhtar, and M. Irfan-Ul-Haq. 2016. Colonization of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on two different root systems. Pakistan Journal of Botany. 48(4):1691-1696.

· Clark, A. 2007. Managing cover crops profitability, (3rd ed.). Sustainable Agriculture Network, Beltsville, MD.118-224.

· Coombs, C., J.D. Lauzon, B. Deen, and L.L. Van Eerd. 2017. Legume cover crop management on nitrogen dynamics and yield in grain corn systems. Field Crops Research. 201: 75-85.

· Dawlatzai, A. J., D. Kumar, N. Singh, A. Anand, and R. Prasanna. 2015. Yield and nutrients uptake of wheat (Triticum aestivum) and soil microbial parameters as influenced by plant growth promoting rhizobacteria. Indian Journal of Agronomy. 61(3): 396-400.

· Eivazi, F., and M. Tabatabai. 1977. Phosphates in soils. Soil Biology and Biochemistry. 9: 167-172.

· Gaafar, H.M.A., A.I.A.A. El-Lateif, and S.B.A. 2011. Effect of replacement of berseem (Trifolium alexandrinum L.) hay by berseem silage on performance of growing rabbits. Archiva Zootechnica. 14 (4): 59-69.

· Ghaderi, A., N. Aliasgharzad, S. Oustan, and P.A. Olsson, 2008. Efficiency of three Pseudomonas isolates in releasing phosphate from an artificial variable charge mineral (iron III hydroxide). Soil Environment. 27: 71-76.

· Harvas, A.B., I. Canosa, and E. Santero. 2008. Transcriptome analysis of Pseudomonas putida in response to nitrogen availability. Journal of Bacteriology. 190: 416–420.

· Ibrahim, M.E., A.M. Masila, and Abdel-Aal, S.M. 2010. Effect of fertilizer with nitrogen, phosphorus and some nutrients compounds on growth, yield and chemical composition of Egyptian clover. Journal of Agricultural Research. 18(4): 689-702.

· Jafari, A., V. Connolly, A. Frolich, and E.K. Walsh. 2003. A note on estimation of quality in perennial ryegrass by near infrared spectroscopy. Irish Journal of Agriculture and Food Research. 42: 293-299.

· Javadi, H., M.H. Saberi, A. Azari Nasr Abad, and S. Khosravi. 2010. Effect PGPR and phosphor fertilizer on qualitative and quantitative characteristics of clover. Iranian Journal of Field Crops Research. 8(3): 384-392. (In Persian).

· Khan, M.S., E. Ahmad Zaidi, and M. Oves. 2013. Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production. In: Maheshwari. D.K. et al (eds) Bacteria in agrobiology: crop productivity. Springer, Berlin, 237–265 pp.

· Kumar, V., P. Singh, M.A. Jorquera, P. Sangwan, P, Kumar, A.K. Verma, and A. Sanjeev. 2015. Isolation of phytase-producing bacteria from Himalayan soils and their effect on growth and phosphorus uptake of Indian mustard and Egyptian clover. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 29: 1361–1369.

· Lazali, M., A. Bargaz, S. Brahimi, L. Amenc, J. Abadie, and J.J. Drevon. 2016. Expression of a phosphate-starvation inducible fructose-1, 6-bisphosphatase gene in common bean nodules correlates with phosphorus use efficiency. Journal of Plant Physiology. 205: 48-56.

· Linn, J.G., and N.P. Martin. 1999. Forage quality tests and interpretation. The College of Agricultural, Food and Environmental Sciences, University of Minnesota Press, USA.

· Maougal, R.T., A. Brauman, C. Plassard, J. Abadie, A. Djekoun, and J.J. Drevon. 2014. Bacterial capacities to mineralize phytate increase in the rhizosphere of nodulated clover under P deficiency. European Journal of Soil Biology. 62: 8–14.

· Pant, H.K., and K.R. Reddy. 2003. Potential internal loading of phosphorus in a wetlands constructed in agricultural land. Water Research. 37: 965-972.

· Pereg, L., L.E. de-Bashan, and Y. Bashan. 2016. Assessment of affinity and specificity of Azospirillum for plants. Plant and Soil. 399(1-2): 389-414.

· Poonguzhali, S., M. Madhaiya, and T. Sat. 2008. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from Chinese cabbage and their effect on growth and phosphorus utilization of plants. Journal of Microbiology and Biotechnology. 18: 773–777.

· Rahimi, L., N. Aliasgharzad, and S.H. Oustan. 2012. Effect of native Azotobacter Chroococcum strains on growth and uptake of nitrogen and phosphorus by wheat plant in greenhouse conditions. Isfahan University of Technology. 15(58): 159-171. (In Persian).

· Rashid, M., S. Khalil, N. Ayub, S. Alam, and Latif, F. 2004. Organic acids productions solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. Pakistan Journal of Biological Science. 7:187-196.

· Salimpour, S., K. Khavazi, H. Nadian, H. Besharati, and M. Miransari. 2010. Enhancing phosphorous availability to canola (Brassica napus L.) using P solubilizing and sulfur oxidizing bacteria. Australian Journal of Crop Science. 4(5): 330-334.

· Shahverdi, M., B. Mirshekari, H.A. Rahmani, V. Rashidi, and M.R. Ardakani. 2014. Response of forage quality in Persian clover upon co-inoculation with native Rhizobium leguminosarum symbiovar (sv.) trifoli RTB3 and plant-growth promoting Pseudomonas florescence 11168 under different levels of chemical fertilizers. African Journal of Microbiology Research. 8(2): 155-161.

· Sharma, S.B., R.Z. Sayyed, M.H. Trivedi, and T.A. Gobi. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. Springerplus. 2:587.

· Singh, B., and R.A. Sharma. 2016. Yield enhancement of phytochemicals by Azotobacter chroococcum biotization in hairy roots of Arnebia hispidissima. Industrial Crops and Products. 81: 169-175.

· Vargas, W.A., J.C. Mandawe, and C.M. Kenerley. 2009. Plant-derived sucrose is a key element in the symbiotic association between Trichoderma virens and maize plants. Plant Physiology.151: 792–808.

· Vassileva, M., M. Serrano, V. Bravo, E. Jurado, I. Nikolaeva, V. Martos, and N. Vassilev. 2010. Multifunctional properties of phosphate-solubilizing microorganisms grown on agro-industrial wastes in fermentation and soil conditions. Applied in Microbiology and Biotechnology. 85:1287–1299.

· Veneklaas, E.J., H. Lambers, J. Bragg, P.M. Finnegan, C.E. Lovelock, and C. William. 2012. Opportunities for improving phosphorus use efficiency in crop plants. New Phytologist. 195(2): 306-320.

· Viruel, E., M.E. Lucca, and F. Sin˜eriz. 2011. Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna. Argentina Archive Microbiology. 193: 489–496.

· Wang, L.L., E.T. Wang, J. Liu, Y. Li, and W.X. Chen. 2006. Endophytic occupation of root nodules and roots of Melilotus dentatus by Agrobacterium tumefaciens. Microbial Ecology. 52(3): 436–443.

· Wang, X., Y. Wang. J. Tian, B.L. Lim, X. Yan, and H. Liao. 2009. Overexpressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean. Plant Physiology. 151: 233–240.

· Wani, P.A., M.S. Khan, and A. Zaidi. 2007. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field grown chickpea. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 170: 283–287.

· Yadav, B.K., and A. Verma. 2012. Phosphate solubilization and mobilization in soil through soil microorganisms under arid ecosystems, the functioning of ecosystems. Plant and Soil. 132(4): 234-245.

· Yu-guo, Z., D. Zaho-rong, C. Li Xia-Ling, and S. He. 2006. Effects of phosphor application on growth and forage yield of clover under inoculation. Journal of Anhui Agriculture University. 3: 35-39.

Forage Quantity and Quality of Berseem Clover (Trifolium alexandrinum L.) as Affected by Uses of Pseudomonas putida Strains and Phophorus Fertilizer in the Second Crop

Mohammad Hossein Ansari[1]*, and Mehdi Ghadimi[2]

Received:July 2016, Revised:12 October 2016, Accepted:3 May 2017

Abstract

Effects of phosphate fertilizer and pseudomonas putida strains on the quantity and quality of forage of berseem clover as a second crop was studied in a factorial field experiment using randomized complete block design with three replications at Fooman, Guilan province, Iran. Treatments consisted of phosphate fertilizer with three levels (0, 75 and 150 kg/ha as triple super phosphate) and Pseudomonas putida strains with four levels (M21, M5, M168 and control). The results showed that use of phosphate fertilizers increased the soil pH during growing season while bacterial inoculation adjusted soil pH. The bacterial inoculation increased amount of crude protein, digestible protein, acidic and alkaline phosphatase activity compared to non-inoculated treatment, but it decreased crude fiber of the forage. Clover forage yield, protein yield and phosphorus content of foliage also were influenced by the interaction of bacterial strains and phosphate fertilizer. The highest forage and protein yield were obtained by using strain M5+150 kg P ha^{-1}. Significant increases in forage and protein yield were found to be 16.49% and 8.01%, respectively, as compared with non-inoculated treatment. Based on the result of this experiment, application of 150 kg P ha^{-1} and Pseudomonas putida strain M5 inoculation can be used to obtain highest forage yield and quality of berseem clover as second crop in the experimental site.

Key words: Crude fiber, Phosphatase enzyme, Phosphorus, Protein, Soil pH.

1- Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
2- M.Sc. Department of Agronomy and Plant Breeding, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran.
*** Corresponding Author:**: Ansary330@yahoo.com