

تأثیر کاربرد توأم باکتری‌های سینوریزوبیوم و فسفر بر رشد، تثبیت نیتروژن و جذب برخی عناصر غذایی در شنبلیله (*Trigonella foenum-graecum* L.)

* عبدالرضا اخگر^۱، سارا الکی^۱، وحید مظفری^۱ و احمد تاج‌آبادی پور^۱

^۱دانشیار گروه علوم خاک، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه ولی عصر رفسنجان
تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۲/۳

چکیده

سابقه و هدف: نیتروژن یکی از مهم‌ترین عناصر غذایی در گیاه بوده که کمبود آن در خاک از عوامل اصلی محدودکننده رشد گیاه می‌باشد. نیتروژن ملکولی حدود ۸۰ درصد از گازهای اتمسفر را تشکیل می‌دهد ولی به‌صورت مستقیم برای گیاهان قابل جذب نمی‌باشد. تثبیت بیولوژیک نیتروژن از طریق همزیستی با گیاهان لگومینوز یکی از مهم‌ترین راه‌های ورود نیتروژن معدنی به خاک است. همچنین تلقیح گیاهان لگوم با باکتری‌های ریزوبیومی فرآیندی مهم در افزایش ظرفیت تثبیت بیولوژیک نیتروژن به‌شمار می‌رود. علاوه بر این فسفر نیز یکی از عناصر ضروری برای تبدیل بیولوژیک نیتروژن اتمسفری به آمونیوم دز فرایند تثبیت بیولوژیک نیتروژن می‌باشد. بنابراین در این پژوهش تأثیر کاربرد توأم باکتری‌های سینوریزوبیوم و فسفر بر رشد، تثبیت نیتروژن و جذب عناصر غذایی شنبلیله مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: به‌منظور بررسی تأثیر کاربرد توأم باکتری‌های سینوریزوبیوم و سطوح فسفر بر رشد، مقدار نیتروژن و جذب سایر عناصر غذایی شنبلیله، تعداد ۵ جدایه سینوریزوبیوم جدا شده از گره‌های ریشه شنبلیله که از کارایی همزیستی بالایی برخوردار بودند؛ از بانک باکتری گروه علوم خاک، دانشگاه ولی عصر رفسنجان انتخاب و در یک آزمون گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. آزمون گلخانه‌ای به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار با دو فاکتور شامل (۱) باکتری با ۵ سطح (چهار جدایه سینوریزوبیوم (SR₄، SR₅، SR₁₂ و SR₁₆) و شاهد (بدون باکتری)، (۲) فسفر با ۴ سطح (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک از منبع منوکلسیم فسفات (مرک)) در سال ۱۳۹۳ در دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی عصر رفسنجان انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که کاربرد هم‌زمان جدایه‌های سینوریزوبیوم و سطوح فسفر باعث افزایش معنادار تعداد گره و وزن خشک شاخساره شد. همچنین کاربرد توأم جدایه‌های سینوریزوبیوم و سطوح فسفر باعث افزایش معنادار مقدار نیتروژن، فسفر، آهن و منگنز در شاخساره شنبلیله گردید. کاربرد توأم این جدایه‌ها و سطوح فسفر اثر معنی‌داری (در سطح ۵ درصد) بر وزن خشک ریشه و جذب عناصر روی و مس شاخساره نداشت؛ ولی وزن خشک ریشه و مقدار روی و مس شاخساره در نتیجه تلقیح شنبلیله با جدایه‌های سینوریزوبیوم و نیز کاربرد سطوح مختلف فسفر هر یک به تنهایی به‌طور معناداری افزایش یافت.

* مسئول مکاتبه: arakhgar@yahoo.com

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان داد که کاربرد توأم جدایه SR4 و ۶۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم خاک کارآمدترین تیمار در افزایش رشد و مقادیر نیتروژن و سایر عناصر غذایی در شنبليله بود. این تیمار وزن خشک شاخسار را از ۰/۲۵ گرم بر گلدان در تیمار شاهد به ۲/۲۵، تعداد گره را از ۷۰ عدد بر گلدان در تیمار شاهد به ۵۷۰ و همچنین جذب نیتروژن و فسفر را به ترتیب از ۶/۹۵ و ۰/۲۸ میلی‌گرم بر گلدان در تیمار شاهد به ۱۰۰ و ۳/۵۴ و جذب آهن و منگنز را از ۰/۰۲ و ۰/۰۳ میکروگرم بر گلدان در تیمار شاهد به ۰/۱۹ و ۰/۲۸ افزایش داد.

واژه‌های کلیدی: تثبیت نیتروژن، رشد، سینوریزوبیوم، شنبليله، فسفر

مقدمه

شنبليله (*Trigonella foenum-graecum* L.) در ایران به صورت خودرو در استان‌هایی مانند اصفهان، اردبیل، لرستان، فارس، کرمان، سیستان و بلوچستان، خراسان، سمنان، آذربایجان شرقی و غربی یافت می‌شود. ولی مدت‌هاست که این گیاه به عنوان سبزی و یک گیاه ادویه‌ای کشت می‌شود (۳۱). شنبليله، همانند دیگر لگوها منبع مناسبی از پروتئین برای مصرف انسان و دام است و به عنوان یک مکمل پروتئین به کار می‌رود. بذر شنبليله با اهداف دارویی و آرایشی مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین این گیاه به عنوان کود سبز و برای اصلاح خاک کاربرد گسترده‌ای دارد. پاسخ شنبليله به کودهای بیولوژیک با توجه به رقم، کود و نوع خاک متفاوت است. تلقیح شنبليله با ریزوبیوم منجر به افزایش میزان پروتئین دانه می‌گردد. این گیاه در حدود ۴۸ درصد از نیتروژن کل را در طول دوره رشد تثبیت می‌کند (۸).

فسفر در کنار نیتروژن یکی از عناصر ضروری برای رشد گیاهان لگوم می‌باشد. نیاز گیاهان میزبان به فسفر برای رشد مطلوب و فرآیندهای همزیستی تثبیت نیتروژن از طریق کنترل توسعه گره و عملکرد آن مورد سنجش قرار گرفته است و تأثیر آن در تثبیت همزیستی نیتروژن در گیاهان خانواده لگومینوز قابل توجه می‌باشد (۳۷). فسفر عنصری ضروری برای استقرار، رشد و عملکرد گره‌ها، رشد گونه‌های

ریزوبیومی و رشد گیاه میزبان می‌باشد (۱۶). ون‌اوتمن و همکاران (۱۹۹۱) گزارش کردند که در خاک‌هایی با میزان پایین فسفر، گره‌زایی گیاه لوبیا محدود گردید (۴۰). بک و مانس (۱۹۸۴) نیز مشاهده کردند که میزان رشد اکثر ریزوبیوم‌ها در سطوح پایین فسفر کاهش یافت (۳). کاسمن و همکاران (۱۹۹۳) نشان دادند که کاربرد فسفر گره‌زایی سویا را در خاک‌های اسیدی با بافت سنگین افزایش داد (۶). به گزارش والویو و همکاران (۲۰۰۴) کاربرد کلسیم و فسفر در خاک با pH خشتی، تعداد گره در گلدان، تعداد گره در واحد طول ریشه و همچنین تعداد گره‌های تشکیل شده در مراحل اولیه در سویا را افزایش داد. در کنار افزایش تعداد گره‌های اولیه، فسفر همچنین تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر رشد و عملکرد گره‌ها داشت (۳۹). اندرو و جانسون (۱۹۷۶) گزارش کردند که کودهای فسفوری رشد گره‌ها، فعالیت نیتروژناز و فعالیت آنزیم‌های تقویت‌کننده نیتروژناز (آنزیم‌های سنتزکننده گلوتامات) در گیاه ماشک را به طور معناداری افزایش داد و از این رو باعث افزایش تثبیت نیتروژن و در نتیجه رشد ماشک شد (۱). والویو و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که رابطه مثبت بین تجمع نیتروژن و میزان استفاده از کود فسفوری در گیاه سویا وجود داشت (۳۸). نتایج بسیاری از پژوهش‌گران نشان داد که کاربرد فسفر به همراه تلقیح باکتری ریزوبیوم باعث افزایش وزن خشک و عملکرد

افزایش ۲۸/۸ درصدی عملکرد دانه شبلیله شد (۳۴). زیدان (۲۰۰۷) نیز در آزمایشی بر روی گیاه عدس مشاهده کرد که کود فسفوری باعث افزایش میزان پروتئین، فسفر، پتاسیم، منگنز و روی در بذر عدس گردید (۴۱).

با توجه به اهمیت گیاه شبلیله و ارتباط آن با باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن و نیز نقش فسفر در افزایش کارایی همزیستی و عملکرد گیاه، بررسی تأثیر توأم باکتری‌های سینوریزوبیوم و فسفر بر تثبیت نیتروژن، گره‌زایی، رشد و جذب عناصر غذایی در شبلیله هدف این پژوهش بود.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی تأثیر کاربرد توأم باکتری‌های سینوریزوبیوم و سطوح فسفر بر تولید گره، تثبیت نیتروژن و نیز رشد شبلیله، یک آزمون گلخانه‌ای به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو فاکتور شامل باکتری با ۵ سطح (چهار جدایه سینوریزوبیوم (SR₄، SR₅، SR₁₂ و SR₁₆) و شاهد بدون باکتری) و فسفر با ۴ سطح (صفر، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک از منبع منوکلسیم فسفات (مرک)) در ۳ تکرار در سال ۱۳۹۳ در دانشکده کشاورزی دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان انجام شد.

تهیه مایه تلقیح جدایه‌های سینوریزوبیوم: در این مطالعه تعداد ۵ باکتری سینوریزوبیوم جدا شده از گره‌های ریشه شبلیله که از کارایی همزیستی بالایی با این گیاه برخوردار بودند؛ از بانک باکتری گروه خاک‌شناسی دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان انتخاب و با چند بازکشت بر روی محیط کشت YMA دارای کنگورد خالص شدند. آن‌گاه جدایه‌های سینوریزوبیوم خالص‌سازی شده

گیاهان لگوم گردید. از جمله روبسن و همکاران (۱۹۸۱) گزارش کردند که کاربرد فسفر، تثبیت بیولوژیک نیتروژن در شبدر شیرین (*Trifolium subterraneanum* L. را افزایش داد (۲۹). نتایج مربوط به تأثیر کاربرد توأم کود فسفوری و باکتری‌های ریزوبیومی بر وزن خشک گره در گیاه ماش نشان داد که با افزایش سطوح فسفر در گیاهان تلقیح‌شده با باکتری‌های ریزوبیومی، گره‌زایی افزایش معناداری یافت (۱۲). هم‌چنین در این پژوهش نشان داده شد که سطح ۱۵۰ کیلوگرم فسفر بر هکتار بیش‌ترین تأثیر را بر وزن خشک گره در ماش داشت که این افزایش نسبت به شاهد در حدود ۱۴۴ درصد گزارش شد. نتایج جینندر (۲۰۱۱) نشان داد که کاربرد ۵۱/۵ کیلوگرم در هکتار فسفر به‌همراه تلقیح باکتری ریزوبیوم به‌طور معناداری باعث افزایش ارتفاع، تعداد برگ، تعداد گره‌ها و وزن خشک گره نخود باغی (*Pisum sativum* L.) شد (۱۴). لیند و همکاران (۱۹۸۴) نیز گزارش کردند با افزایش فسفر تا ۴۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، فعالیت آنزیم نیتروژناز دو برابر شد (۱۷). مشاهدات مشابهی نیز در هند به‌دست آمده است که در آن با افزایش سطح فسفر (بیش‌تر از ۲۵/۸ کیلوگرم بر هکتار فسفر) میزان تولید بذر و وزن خشک شاخساره گیاه شبلیله افزایش یافت (۱۵). بونیا (۲۰۰۶) گزارش کرد که کاربرد بیش از ۸/۶ کیلوگرم فسفر در هکتار عملکرد گیاه شبلیله را به‌میزان ۸/۰۸ کیلوگرم بر هکتار افزایش داد و کاربرد ۴۰ کیلوگرم فسفر در هکتار به‌طور قابل‌توجهی ویژگی‌های عملکرد گیاه شبلیله نظیر تعداد شاخه در بوته، تعداد غلاف در بوته، طول غلاف، تعداد دانه در غلاف و وزن خشک شاخساره را افزایش داد (۴). شئوران و همکاران (۲۰۰۰) مشاهده کردند که کاربرد فسفر به‌میزان بیش‌تر از ۶۰ کیلوگرم در هکتار، باعث

اندازه مشابه بودند نگه‌داشته شدند و بقیه از گلدان‌ها خارج گردیدند. گلدان‌ها به مدت دو ماه و نیم در شرایط گلخانه نگه‌داری شدند. در طول دوره رشد، آبیاری گلدان‌ها با آب مقطر و تا حد ظرفیت مزرعه (به روش وزنی) انجام شد.

برداشت: پس از گذشت دو ماه و نیم و رسیدن گیاهان به مرحله گلدهی، گیاهان از قسمت طوقه جدا شدند. به منظور خارج کردن ریشه‌ها، گلدان‌ها در تشت آب قرار داده و با دوش آب کاملاً شسته شدند. گره‌ها نیز با دقت کامل از ریشه‌ها جدا و تعداد آن‌ها شمارش گردید. بخش هوایی و ریشه به‌طور جداگانه داخل پاکت‌های مخصوص گذاشته و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۵ درجه سلسیوس درون آون قرار داده شد. آن‌گاه هر یک از اجزاء به‌طور جداگانه توزین و وزن خشک آن‌ها تعیین گردید. پس از تعیین وزن خشک شاخساره، نمونه‌ها آسیاب و عصاره‌گیری انجام گردید. برای تهیه عصاره، نیم گرم از نمونه پودر شده در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس به روش خاکستر سوزی خشک و با استفاده از اسید کلریدریک ۲ نرمال به‌صورت محلول در آورده شدند. غلظت عناصر شامل نیتروژن به‌وسیله دستگاه کلدال مدل WD40، فسفر به روش رنگ‌سنجی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل T80UV/VIS، کلسیم، منیزیم، آهن، روی، مس و منگنز به‌وسیله دستگاه جذب اتمی Awanta مدل GBC-932 اندازه‌گیری شدند (۷).

تجزیه‌های آماری: تجزیه واریانس همه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. همچنین نمودارها با استفاده از برنامه Excel رسم گردید.

به‌طور جداگانه در محیط کشت YMB به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۶ درجه سلسیوس در ۱۵۰ دور در دقیقه تکان داده شدند و سوسپانسیون‌های به‌دست آمده پس از یکسان‌سازی جمعیت (۲۲)، به‌عنوان مایه تلقیح مورد استفاده قرار گرفتند.

آماده‌سازی بذرها جهت کشت: به‌منظور آماده‌سازی بذرها جهت کشت، ابتدا بذرها هم‌اندازه گیاه شنبلیله انتخاب و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در الکل اتیلیک ۹۶ درصد و ۵ دقیقه در محلول وایتکس ۱۰ درصد قرار داده شدند. جهت حذف هیپوکلرید سدیم اضافی، بذرها برای چندین مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند. جهت جوانه‌دار کردن، بذرها به ظروف پتری حاوی آب-آگار ۱/۵ درصد منتقل و تا زمان جوانه‌دار شدن درون گرم‌خانه با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

کشت در گلدان‌ها: در این آزمون از گلدان‌های پلاستیکی دو کیلوگرمی استفاده شد. جهت تهیه بستر کشت از یک خاک با بافت متوسط، غیرشور و با میزان فسفر قابل‌استفاده کم استفاده گردید. سطوح فسفر به‌صورت محلول و قبل از کشت با خاک مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت درون نایلون‌هایی نگه‌داری و سپس به گلدان‌ها انتقال داده شدند. بر اساس آزمون خاک ۲۰ میلی‌گرم پتاسیم در کیلوگرم خاک از منبع سولفات پتاسیم و پنج میلی‌گرم نیتروژن در کیلوگرم خاک از منبع اوره نیز به‌عنوان استارتر به تمام گلدان‌ها داده شد. در هر گلدان تعداد ۱۵ بذر جوانه‌دار شده کشت گردید. هنگام کشت، هر بذر با ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون جدایه‌های سینوریزویوم با جمعیت 10^8 cfu/ml تلقیح شد. برای گلدان‌های شاهد از ۵۰۰ میکرولیتر محیط کشت بدون باکتری استفاده گردید. پس از گذشت ۲ هفته از کشت و استقرار نهال‌ها، در هر گلدان تعداد ۱۰ نهال که از نظر

جدول ۱- برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد مطالعه.

Table 1. Some physical and chemical properties of tested soil.

ویژگی Trait	پارامتر Parameter
لوم شنی Sandy loam	کلاس بافت Soil texture
70	شن (%) Sand
16	سیلت (%) Silt
14	رس (%) Clay
0.02	نیترژن کل (%) Total nitrogen
6.4	فسفر قابل جذب (mg kg^{-1}) Available phosphorus
155	پتاسیم تبادلی (mg kg^{-1}) Exchangeable potassium
7.6	pH خاک Soil pH
3.2	قابلیت هدایت الکتریکی (dS/m) EC
0.4	ماده آلی (%) Organic mater
9.3	آهک (%) Lime
16	رطوبت ظرفیت مزرعه (%) FC

نتایج و بحث

بر وزن خشک شاخساره، تعداد گره و وزن خشک ریشه در سطح یک درصد داشتند. هم‌چنین برهمکنش باکتری‌های سینوریزوبیوم و فسفر تأثیر معناداری در سطح یک درصد بر تعداد گره و وزن خشک شاخساره داشت.

تأثیر جدایه‌های سینوریزوبیوم و فسفر بر شاخص‌های رشد و تعداد گره در شنبلیله: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان داد کاربرد باکتری‌های سینوریزوبیوم و سطوح فسفر اثر معناداری

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های سینوریزوبیوم، فسفر و برهمکنش آن‌ها بر شاخص‌های رشد و تعداد گره شنبليله.

Table 2. Analysis of variance for the effects of *Sinorhizobium* isolates, Phosphorous and their intraction on growth parameters and number of nodule in fenugreek.

میانگین مربعات Mean square			درجه آزادی DF	منابع تغییر Source of variations
وزن خشک ریشه Root dry weight	تعداد گره Number of nodule	وزن خشک شاخساره Shoot dry weight		
0.08**	392362**	2.54**	4	جدایه Isolate
0.06**	127486**	5.19**	3	فسفر Phosphorus
0.007 ^{ns}	17571**	0.20**	12	جدایه × فسفر Isolate × Phosphorus
0.004	4108	0.03	40	خطا Error
15.9	24.8	13.5	-	ضریب تغییرات CV%

** معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد و ^{ns} غیر معنی‌دار بودن.

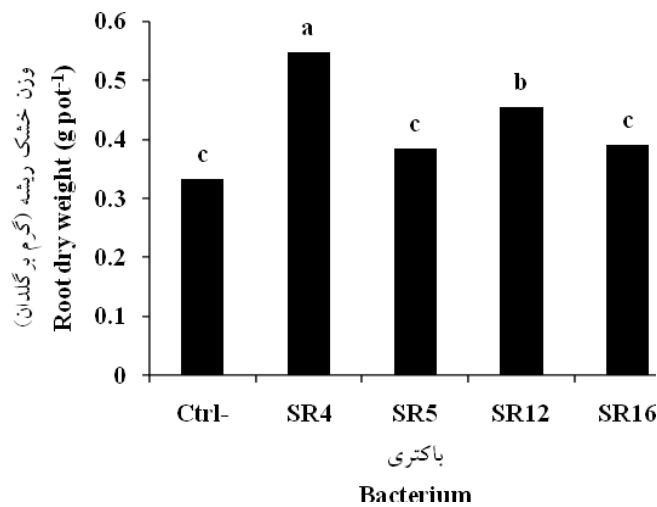
** Significant at 1% level of probability and ns: no Significant.

برادی ریزوبیوم منجر به افزایش معناداری وزن خشک ریشه سویا شد (۹).

تأثیر کاربرد فسفر بر وزن خشک ریشه: مقایسه میانگین‌ها (شکل ۲) نشان داد که کاربرد فسفر تأثیر معناداری بر وزن خشک ریشه داشت؛ ولی بین سطوح مختلف فسفر از نظر آماری اختلاف معناداری مشاهده نشد. سطوح ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک، وزن خشک ریشه را در مقایسه با شاهد به ترتیب به میزان ۴۰/۵، ۳۸/۳ و ۴۳/۲ درصد افزایش دادند. نتایج فاتیما و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که کاربرد فسفر، مقدار ماده خشک ریشه سویا را به طور معنادار ($P < 0.05$) و به میزان ۱۱۵ درصد نسبت به شاهد افزایش داد (۹).

تأثیر جدایه‌های سینوریزوبیوم بر وزن خشک ریشه: مقایسه میانگین تأثیر کاربرد جدایه‌های سینوریزوبیوم بر وزن خشک ریشه گیاه شنبليله (شکل ۱) نشان داد تمامی جدایه‌ها وزن خشک ریشه را در مقایسه با شاهد افزایش دادند؛ ولی این افزایش تنها برای جدایه‌های SR₄ و SR₁₂ معنادار بود. جدایه‌های SR₄ و SR₁₂ به ترتیب ۶۵ و ۳۶/۷ درصد وزن خشک ریشه را نسبت به شاهد افزایش دادند. جدایه SR₄ بیش‌ترین و جدایه‌های SR₅ کم‌ترین میزان وزن خشک ریشه را نسبت به شاهد تولید کردند.

به گزارش نیشیتا و جاشی (۲۰۱۰) تلقیح نخود با باکتری ریزوبیوم باعث افزایش طول ریشه و وزن خشک ریشه به ترتیب به میزان ۱۵ و ۱۱/۴ درصد نسبت به شاهد شد (۲۵). نتایج فاتیما و همکاران (۲۰۰۶) نیز نشان دادند که کاربرد باکتری

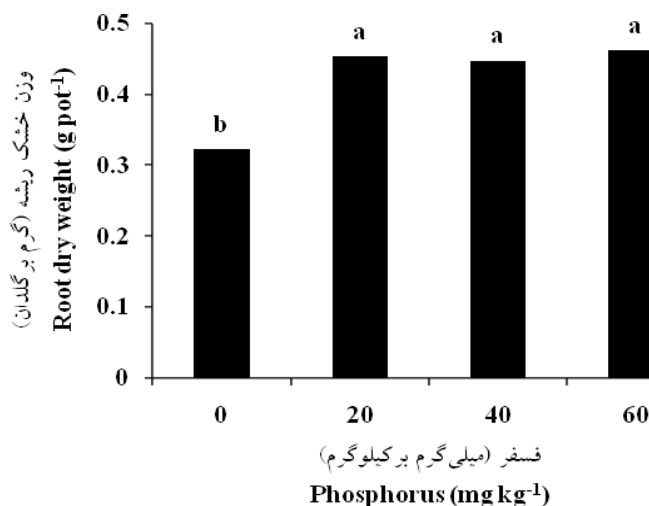


شکل ۱- تأثیر جدایه‌ها بر وزن خشک ریشه شنبلیله.

Figure 1. Effect of isolates on root dry weight in fenugreek.

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنادار در سطح پنج درصد به روش دانکن می‌باشند.

The means with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$) by Duncen test.



شکل ۲- تأثیر سطوح فسفر بر وزن خشک ریشه شنبلیله.

Figure 2. Effect of phosphorus levels on root dry weight in fenugreek.

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنادار در سطح پنج درصد به روش دانکن می‌باشند.

The means with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$) by Duncen test.

می‌شود، در سطح صفر فسفر، تمامی جدایه‌های سینوریزوبیوم، وزن خشک شاخساره را نسبت به شاهد افزایش دادند؛ ولی این افزایش تنها برای جدایه SR16 از نظر آماری معنادار بود. کاربرد تمامی جدایه‌های سینوریزوبیومی در سطوح ۲۰، ۴۰ و ۶۰

اثرات متقابل جدایه‌های سینوریزوبیوم و فسفر بر وزن خشک شاخساره و تعداد گره: جدول ۳ مقایسه میانگین وزن خشک شاخساره گیاهان شنبلیله تلقیح شده با باکتری‌های سینوریزوبیوم تحت سطوح مختلف فسفر را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده

همچنین مقایسه میانگین اثر تلقیح باکتری‌های سینوریزوبیوم و سطوح مختلف فسفر بر تعداد گره در ریشه گیاهان شنبلیله (جدول ۳) نشان داد که در سطح شاهد فسفر، جدایه‌های SR₄ و SR₁₂ به ترتیب با افزایش تعداد گره به میزان ۲۳۵ و ۱۸۸ درصد توانستند اختلاف معناداری با شاهد ایجاد کنند. در سطح ۲۰ میلی‌گرم فسفر، تمامی جدایه‌ها سبب افزایش معنادار تعداد گره نسبت به شاهد شدند و جدایه SR₁₂ با ۲۴۸ درصد افزایش توانست بیش‌ترین تعداد گره را به خود اختصاص دهد. در سطح ۴۰ میلی‌گرم فسفر، باز هم جدایه SR₁₂ با بیش‌ترین میزان تعداد گره (۲۱۹ درصد) توانست از نظر آماری اختلاف معنی‌داری را با شاهد و سایر جدایه‌ها ایجاد نماید. در سطح ۶۰ میلی‌گرم فسفر نیز جدایه‌های SR₄ و SR₁₂ با بیش‌ترین افزایش تولید گره به ترتیب به میزان ۲۰۳ و ۱۸۵ درصد، بیش‌ترین مقادیر را به خود اختصاص دادند. به‌طور کلی کاربرد دو جدایه SR₄ و SR₁₂ در تمامی سطوح فسفر (به‌استثنای عدم کاربرد فسفر) افزایش معناداری در تولید گره نسبت به شاهد نشان دادند.

کمبود فسفر در خاک باعث ایجاد محدودیت در روابط هم‌زیستی و تثبیت نیتروژن می‌شود. گزارش شده است وجود مقادیر کافی فسفر در خاک باعث افزایش تراکم ریزوبیوم‌ها در ریزوسفر گیاهان لگوم می‌شود (۹). از طرف دیگر گره‌زایی و تثبیت نیتروژن به‌شدت تحت تأثیر فسفر قابل دسترس می‌باشد (۳۳). در گیاهان تثبیت‌کننده نیتروژن میزان فسفر ذخیره شده در گره‌ها بیش از میزان آن در شاخساره و ریشه می‌باشد (۲۷). گره‌ها منبعی غنی از نظر ذخیره فسفر هستند به‌طوری‌که در شرایط کمبود فسفر، به‌طور معمول مقدار فسفر در واحد وزن خشک گره‌ها بیش از ریشه و شاخساره می‌باشد (۲). به عقیده جکوبسن

میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک منجر به افزایش معنادار وزن خشک شاخساره نسبت به شاهد گردید. در کاربرد جدایه SR₅ به‌همراه سطوح فسفر، بین سطوح ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم فسفر در تولید وزن خشک شاخساره تفاوت معناداری مشاهده نشد ولی با افزایش فسفر تا ۶۰ میلی‌گرم این افزایش معنادار شد. کاربرد سطح ۲۰ میلی‌گرم فسفر در تلقیح با باکتری SR₁₆ تأثیر معناداری در وزن خشک شاخساره نسبت به عدم کاربرد فسفر داشت؛ ولی با کاربرد سطوح بالاتر فسفر این افزایش معنادار نشد.

در سطح ۲۰ میلی‌گرم فسفر، جدایه SR₄ با ۲۵۹ درصد، در سطح ۴۰ میلی‌گرم فسفر، جدایه SR₅ با ۳۰۴ درصد و در سطح ۶۰ میلی‌گرم فسفر، جدایه SR₄ با ۳۰۷ درصد بیش‌ترین افزایش وزن خشک را نسبت به شاهد ایجاد کردند.

نتایج آزمایش‌های حسین و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که با افزایش سطوح فسفر، وزن خشک شاخساره گیاه ماش افزایش یافت و زمانی که فسفر همراه با باکتری ریزوبیوم به‌کار رفت این افزایش بیش‌تر شد (۱۲). فاتیما و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که رشد گیاهان سویا با کاربرد توأم ریزوبیوم و فسفر، باعث افزایش وزن خشک و تر بخش هوایی شد (۹). بنابراین به‌نظر می‌رسد کاربرد مقدار کافی فسفر به‌همراه تلقیح باکتری‌های ریزوبیومی نقش مهمی در فرآیندهای فیزیولوژیک و توسعه‌ای گیاهان داشته و تأثیر مطلوب این عنصر مهم غذایی منجر به فرآیندهای رشد و در نهایت افزایش رشد محصولات کشاورزی می‌گردد. سایرام و همکاران (۱۹۸۴) گزارش کردند که کاربرد فسفر به‌همراه تلقیح با باکتری ریزوبیوم وزن خشک شاخساره لوبیا را افزایش داد (۳۲).

چشم‌بلیلی با ریزوبیوم به‌همراه کاربرد فسفر اثر معناداری بر تعداد گره داشت (۳۵). نتایج الیوارا و همکاران (۲۰۰۴) نیز نشان داد که کاربرد سویه‌های ریزوبیومی به‌همراه فسفر باعث افزایش وزن خشک گره، فعالیت آنزیم نیتروژناز و حجم بافت صورتی گره گردید (۲۶). همچنین محمد (۲۰۱۰) گزارش کرد کاربرد هم‌زمان باکتری ریزوبیوم و فسفر، رشد و عملکرد سویا را نسبت به شاهد افزایش داد (۲۱).

(۱۹۸۵) گیاهان تثبیت‌کننده نیتروژن نسبت به سایر گیاهان فسفر بیشتری جذب می‌کنند چون این گیاهان برای گسترش گره‌زایی، تبادلات سیگنالی و تشکیل فسفولیپید نیاز زیادی به فسفر دارد (۱۳). به‌گزارش وال و همکاران (۲۰۰۰) کاربرد سطوح بالای فسفر (یک میلی‌مولار) در گیاه شبدر قرمز تلقیح شده با باکتری ریزوبیوم، باعث افزایش تعداد گره، وزن خشک گره و وزن خشک شاخساره گردید (۳۸). به‌گزارش سای و سیامال (۲۰۱۱) تلقیح لوبیا

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیرات سینوریزوبیوم و سطوح فسفر بر شاخص‌های رشد شنبليله.

Table 3. Mean comparison for effects of *Sinorhizobium* and phosphorus levels on growth parameters in fenugreek.

گره Nodule (number per pot)	وزن خشک شاخساره Shoot dry weight (g pot ⁻¹)	باکتری Bacterium	فسفر Phosphorus (mg kg ⁻¹)
70 ^{ij}	0.25 ^f	Ctrl	0
234 ^{d-g}	0.55 ^{ef}	SR ₄	0
112 ^{hi}	0.50 ^{ef}	SR ₅	0
291 ^{e-h}	0.56 ^{ef}	SR ₁₂	0
116 ^{hi}	0.59 ^e	SR ₁₆	0
108 ⁱ	0.60 ^e	Ctrl	29
373 ^{bc}	1.10 ^{abc}	SR ₄	29
172 ^{figh}	1.73 ^{dc}	SR ₅	20
415 ^b	1.70 ^{dc}	SR ₁₂	20
258 ^{c-f}	1.90 ^{bc}	SR ₁₆	20
180 ^{figh}	0.80 ^c	Ctrl	40
425 ^b	1.93 ^{abc}	SR ₄	40
199 ^{figh}	2.02 ^{abc}	SR ₅	40
575 ^a	1.70 ^{dc}	SR ₁₂	40
319 ^{b-e}	1.90 ^{abc}	SR ₁₆	40
200 ^{e-h}	0.67 ^e	Ctrl	60
570 ^a	2.25 ^a	SR ₄	60
215 ^{e-h}	2.12 ^{ab}	SR ₅	60
607 ^a	1.42 ^d	SR ₁₂	60
335 ^{bcd}	2.19 ^{ab}	SR ₁₆	60

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنادار در سطح پنج درصد به‌روش دانکن می‌باشند.

The means with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$) by Duncen test.

همچنین کاربرد فسفر نیز تأثیر معناداری را در سطح یک درصد بر جذب تمامی عناصر داشت. اثر برهم کنش باکتری‌های سینوریزوبیوم و فسفر بر جذب نیتروژن، فسفر، آهن و منگنز در سطح یک درصد معنادار بود.

تأثیر کاربرد جدایه‌های سینوریزوبیوم و فسفر بر جذب عناصر غذایی شنبليله: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان داد تأثیر باکتری‌های سینوریزوبیوم بر جذب نیتروژن، فسفر و تمامی عناصر کم‌مصرف اندازه‌گیری شده در سطح یک درصد معناداری بود.

جدول ۴- تجزیه واریانس تأثیر جدایه‌های سینوریزوبیوم، فسفر و برهم‌کنش آن‌ها بر جذب عناصر غذایی.

Table 4. Analysis of variance for the effects of *Sinorhizobium* isolates, Phosphorous and their intraction on nutrients uptake by fenugreek.

میانگین مربعات Mean square						درجه آزادی DF	منابع تغییر Source of variations
Zn	Cu	Mn	Fe	P	N		
2849**	171**	33633**	6312**	5.72**	6396**	4	جدایه Isolate
2175**	323**	85529**	32736**	13.2**	9558**	3	فسفر Phosphorus
209 ^{ns}	18.4 ^{ns}	3638**	1377**	0.85**	817**	12	جدایه × فسفر Isolate × Phosphorus
126	13.06	657	388	0.09	91	40	خطا Error
26	25	14.9	18	17.7	19	-	ضریب تغییرات CV%

** معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱ درصد و ^{ns} غیر معنی‌دار بودن.

** Significant at 1% level of probability and ns: no Significant.

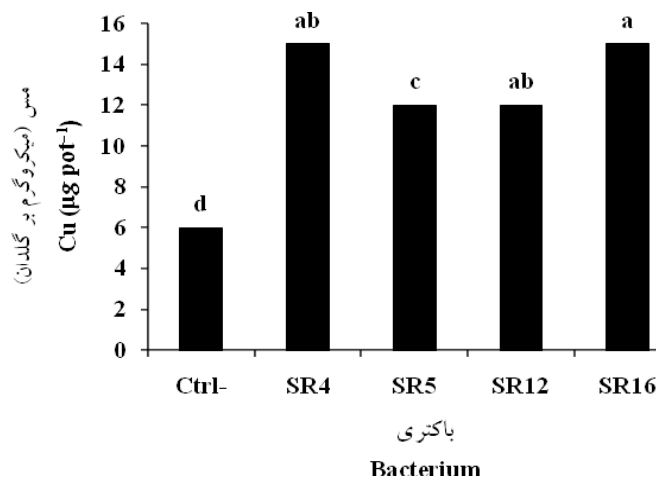
به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین مقدار جذب روی شاخساره را به خود اختصاص دادند. جدایه SR₄ توانست با ۲۲۲ درصد افزایش نسبت به شاهد بیشترین میزان جذب روی شاخساره را به خود اختصاص دهد.

رودلاس و همکاران (۱۹۹۹) با کاربرد باکتری‌های ریزوبیوم، افزایش توسعه ریشه و افزایش جذب آب و عناصر غذایی را در ریشه لوبیا مشاهده نمودند (۳۰). بیسواس و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند که تلقیح گیاهان لگوم با باکتری‌های ریزوبیومی ممکن است رشد تارهای کشنده و ریشه‌های جانبی را تحریک کرده منجر به جذب بیش‌تر عناصر غذایی از خاک

شکل‌های ۳ و ۴ مقایسه میانگین اثر کاربرد جدایه‌های سینوریزوبیوم بر جذب مس و روی شاخساره شنبليله را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود کاربرد جدایه‌های سینوریزوبیوم، جذب مس شاخساره شنبليله را نسبت به شاهد به‌طور معناداری افزایش داد. بیش‌ترین میزان جذب مس شاخساره مربوط به کاربرد جدایه SR₁₆ بود که توانست جذب مس شاخساره را نسبت به شاهد ۱۵۰ درصد افزایش دهد. جذب روی شاخساره شنبليله نیز در نتیجه کاربرد جدایه‌های سینوریزوبیوم تفاوت معناداری را در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند. از میان جدایه‌های به‌کار رفته، جدایه SR₄ و SR₁₂

غلاف لوبیا را به‌طور معناداری افزایش دادند (۲۳). مهدی‌پور و همکاران (۲۰۱۰) گزارش دادند که تلقیح سویا با باکتری‌های برادی ریزوبیوم میزان عناصر آهن، مس، روی و منگنز موجود در برگ‌ها را به‌طور معناداری افزایش داد (۲۰).

شود (۵). در مطالعه‌ای که توسط ناکیدمی و همکاران (۲۰۱۱) انجام گرفت نشان داده شد که تلقیح لوبیا با باکتری‌های ریزوبیوم به‌طور معناداری جذب آهن، روی و مس را هم در شرایط مزرعه‌ای و هم در گلخانه افزایش داد. آنان هم‌چنین مشاهده کردند که باکتری‌های ریزوبیوم جذب عناصر مذکور در ریشه و

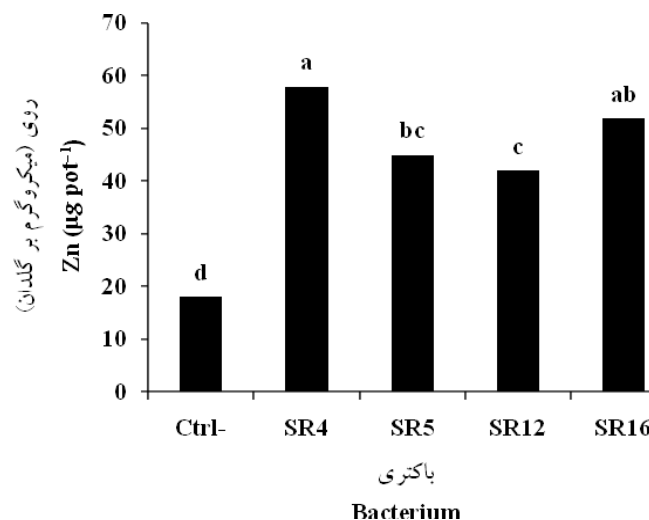


شکل ۳- تأثیر جدایه‌ها بر جذب مس شاخساره شنبلیله.

Figure 3. Effect of isolates on shoot Cu uptake in fenugreek.

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنادار در سطح پنج درصد به‌روش دانکن می‌باشند.

The means with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$) by Duncen test.



شکل ۴- تأثیر جدایه‌ها بر جذب روی شاخساره شنبلیله.

Figure 4. Effect of isolates on shoot Zn uptake in fenugreek.

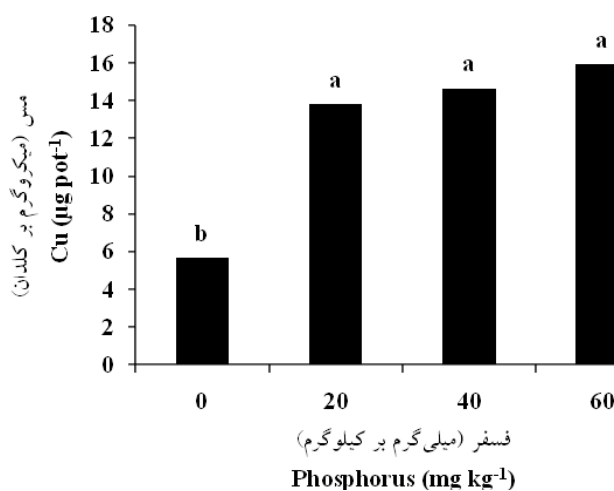
میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنادار در سطح پنج درصد به‌روش دانکن می‌باشند.

The means with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$) by Duncen test.

استفاده نماید که در چنین شرایطی جذب و کارایی استفاده از بیش تر عناصر غذایی افزایش می یابد (۱۰). توگوی و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که کاربرد سطوح مختلف فسفر در دو سال متوالی از نظر آماری تأثیر معناداری را در جذب روی و مس در دانه های لوبیا چشم بلبلی داشت. آن ها مشاهده کردند که بیش ترین میزان جذب عناصر غذایی در کاربرد ۸۰ کیلوگرم فسفر بر هکتار به دست آمد (۳۶). نیک مهر و همکاران (۲۰۱۴) نیز نشان دادند که کاربرد ۱۰۰ و ۴۰۰ کیلوگرم در هکتار سوپر فسفات تریپل باعث افزایش معنادار جذب مس نسبت به شاهد شد (۲۴).

سطوح فسفر تأثیر معناداری بر جذب مس و روی شاخساره شنبلله داشتند (شکل های ۵ و ۶). بین کاربرد سطوح فسفر از نظر جذب مس و روی شاخساره اختلاف معناداری مشاهده نشد، سطوح ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی گرم فسفر در کیلوگرم خاک توانستند جذب مس و روی شاخساره را به ترتیب به میزان ۱۴۵، ۱۵۹، ۱۸۰/۹، ۷۷/۹، ۸۹/۱ و ۱۰۴ درصد افزایش دهند.

اغلب پژوهشگران بر این باورند که فسفر کافی سبب ازدیاد رشد گیاه و توسعه و گسترش ریشه می شود. بدین ترتیب گیاه می تواند از حجم بیشتری از خاک به منظور جذب عناصر غذایی و رطوبت

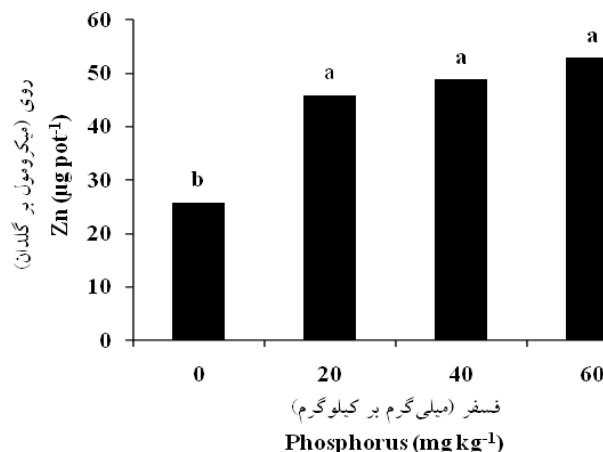


شکل ۵- تأثیر سطوح فسفر بر جذب مس شاخساره شنبلله.

Figure 5. Effect of phosphorus levels on shoot Cu uptake in fenugreek.

میانگین های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنادار در سطح پنج درصد به روش دانکن می باشند.

The means with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$) by Duncen test.



شکل ۶- تأثیر سطوح فسفر بر جذب روی شاخساره شنبلیله.

Figure 6. Effect of phosphorus levels on shoot Zn uptake in fenugreek.

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنادار در سطح پنج درصد به‌روش دانکن می‌باشند.

The means with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$) by Duncen test.

مقدار نیتروژن شاخساره را از ۱۵/۴ به ۱۰۱، ۷۷/۷ و ۱۰۸ میلی‌گرم در گلدان افزایش دهد.

حسین (۲۰۱۲) در پژوهش خود مشاهده کرد که بیش‌ترین جذب نیتروژن (۱۹۶ درصد) از تیمار تلقیح ماش با باکتری ریزوبیوم و کاربرد در ۶۴/۴ کیلوگرم فسفر در هکتار به‌دست آمد (۱۱). سایرمان و همکاران (۱۹۸۴) نیز گزارش کردند که جذب نیتروژن در لوبیا تلقیح‌شده با باکتری ریزوبیوم با کاربرد فسفر افزایش یافت (۳۲). همچنین راثو (۱۹۹۳) گزارش کرد که غلظت نیتروژن در ریشه ماش تلقیح شده با باکتری ریزوبیوم به‌واسطه کاربرد فسفر به‌طور معناداری افزایش یافت (۲۸). محمودی (۲۰۱۰) نشان داد که مصرف کود فسفوری همراه با تلقیح باکتری ریزوبیوم موجب افزایش غلظت نیتروژن نخود شد (۱۸).

بررسی اثرات متقابل (جدول ۵) نشان داد در سطح صفر فسفر کاربرد باکتری‌های سینوریزوبیوم تأثیر معناداری بر جذب فسفر شاخساره نسبت به یکدیگر و شاهد نداشتند. بین تیمار تلقیح با باکتری SR₄ به همراه ۲۰ میلی‌گرم فسفر با تیمار همان باکتری و ۴۰ میلی‌گرم فسفر از نظر جذب فسفر

مقایسه میانگین اثرات متقابل باکتری‌های سینوریزوبیوم و سطوح مختلف فسفر بر جذب نیتروژن شاخساره شنبلیله (جدول ۵) نشان داد در سطح صفر فسفر، جدایه‌های سینوریزوبیوم اختلاف معناداری از نظر جذب نیتروژن با یکدیگر و نیز با شاهد نداشتند. در سطح ۲۰ میلی‌گرم فسفر، تمامی جدایه‌ها افزایش معناداری در جذب نیتروژن نسبت به سطح صفر نشان دادند. کاربرد فسفر تا ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، باعث افزایش جذب نیتروژن شد. کاربرد ۲۰ میلی‌گرم فسفر در حضور جدایه‌های SR₅ و SR₁₂ باعث افزایش معنادار جذب نیتروژن شاخساره شد؛ ولی بین سطوح ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر تفاوت معناداری مشاهده نگردید. تلقیح شنبلیله با باکتری SR₁₆ در سطح ۲۰ میلی‌گرم فسفر نسبت به ۶۰ میلی‌گرم فسفر تفاوت معناداری نداشت. بیش‌ترین میزان جذب نیتروژن متعلق به تیمارهای تلقیح با باکتری SR₁₆ و سطح ۲۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک بود. کاربرد باکتری SR₁₆ در سطوح ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک به‌ترتیب توانست

خاک ۸۴ درصد در مقایسه با شاهد افزایش یافت. به عقیده آن‌ها این افزایش ممکن است به علت عرضه فسفر باشد و چون فسفر عنصری مهم در تثبیت نیتروژن به‌شمار می‌رود در نتیجه رشد گیاه بهبود و نیتروژن ریشه و شاخساره افزایش یافته است (۹).

بررسی اثرات متقابل (جدول ۵) نشان داد در سطح صفر فسفر، کاربرد باکتری‌های سینوریزوبیومی تأثیر معناداری بر جذب آهن شاخساره نسبت به یکدیگر و شاهد نداشتند. در سطح ۲۰ میلی‌گرم فسفر، جدایه‌های سینوریزوبیوم جذب آهن شاخساره را به‌طور معناداری افزایش دادند. در تلقیح شنبلیله با جدایه SR₄ و SR₁₆ بین سطوح ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم فسفر از نظر آماری اختلافی مشاهده نشد ولی در سطح ۶۰ میلی‌گرم فسفر، این افزایش معنادار بود. بین سطوح ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر در تلقیح با جدایه SR₅ نیز از نظر آماری تفاوت معناداری مشاهده نشد. جدایه SR₄ در سطح ۲۰ میلی‌گرم فسفر، بیش‌ترین جذب آهن شاخساره را نسبت به شاهد (۱۶۳ درصد) داشت. در سطح ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر نیز جدایه‌های SR₄ و SR₁₂ به‌ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین میزان جذب آهن شاخساره را به خود اختصاص دادند. جدایه SR₄ توانست جذب آهن شاخساره شنبلیله را در سطح ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر ۶۱/۲ و ۴۵/۳ درصد نسبت به شاهد افزایش دهد.

مقایسه میانگین اثرات متقابل باکتری‌های سینوریزوبیوم و سطوح مختلف فسفر بر جذب منگنز شاخساره (جدول ۵) نیز نشان داد که در سطح صفر فسفر، کاربرد باکتری‌های سینوریزوبیومی تأثیر معناداری بر جذب این عنصر نسبت به یکدیگر و شاهد نداشتند. در سطح ۲۰ میلی‌گرم فسفر، تمامی جدایه‌ها جذب منگنز شاخساره را نسبت به شاهد افزایش دادند و این افزایش از نظر آماری در سطح احتمال ۵ درصد معنادار بود. در سطح ۴۰ میلی‌گرم فسفر، بیش‌ترین جذب منگنز شاخساره شنبلیله با ۱۲۶ درصد افزایش

شاخساره تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ولی با افزایش فسفر تا ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم خاک، این افزایش معنی‌دار شد. کاربرد ۲۰ میلی‌گرم فسفر در تلقیح باکتری SR₅ جذب فسفر شاخساره را نسبت به عدم کاربرد فسفر افزایش داد. با افزایش سطح فسفر تا ۴۰ میلی‌گرم در کیلوگرم نیز این افزایش معنادار بود ولی بین کاربرد ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر در تلقیح با این باکتری تفاوت معناداری مشاهده نشد. کاربرد فسفر در تلقیح باکتری SR₁₂ افزایش معنی‌داری را نسبت به عدم کاربرد فسفر و در تلقیح با این باکتری نشان داد. بین کاربرد ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک در تلقیح با باکتری SR₁₂ تفاوت معناداری مشاهده نشد و با افزایش فسفر در سطح ۶۰ میلی‌گرم در کیلوگرم، میزان جذب فسفر در این باکتری کاهش پیدا کرد. کاربرد باکتری SR₁₆ در تیمار با فسفر نیز نشان داد با افزایش سطح فسفر، جذب فسفر افزایش یافت و در حالی که بین سطوح ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم در تلقیح با این باکتری تفاوت معناداری مشاهده نشد، سطح ۶۰ میلی‌گرم فسفر در تلقیح با این باکتری افزایش معناداری را نسبت به سطوح ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم فسفر در جذب فسفر شاخساره نشان داد. بیش‌ترین میزان جذب فسفر در سطح ۲۰ میلی‌گرم مربوط به جدایه SR₄ با ۱۹۹ درصد افزایش و در سطح ۴۰ میلی‌گرم فسفر مربوط به جدایه SR₅ با ۲۴۲ درصد افزایش نسبت به شاهد مشاهده شد. در سطح ۶۰ میلی‌گرم فسفر در کیلوگرم خاک نیز بیش‌ترین میزان جذب فسفر مربوط به جدایه SR₄ بود که مقدار فسفر شاخساره را از ۰/۲۸ به ۳/۵۴ میلی‌گرم در گلدان افزایش داد.

فاتیما و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که تلقیح سویا با باکتری ریزوبیوم به همراه کاربرد فسفر، جذب نیتروژن، فسفر و پتاسیم را به‌طور معنادار و به‌ترتیب به‌میزان ۲/۸۶، ۳۹ و ۲۰ درصد افزایش داد. در گلدان‌های تلقیح‌شده با ریزوبیوم و استفاده از فسفر، جذب نیتروژن

توگای و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که کاربرد سطوح مختلف فسفر در دو سال متوالی از نظر آماری تأثیر معناداری را در جذب آهن و منگنز دانه‌های لوبیا چشم‌پللی داشت (۳۶). همچنین گزارش شده گیاهان سویا در هم‌زیستی با باکتری‌های ریزوبیوم، میزان بالاتری از آهن و منگنز را نسبت به گیاهان تغذیه شده با نیترا داشتند و علایم کمبود آهن را نشان ندادند (۱۹).

نسبت به شاهد مربوط به جدایه SR₄ بود. در سطح ۶۰ میلی‌گرم فسفر نیز جدایه SR₁₆ با بیش‌ترین میزان توانست جذب منگنز شاخساره را ۱۹۶ درصد نسبت به شاهد افزایش دهد. بین سطوح ۲۰، ۴۰ و ۶۰ میلی‌گرم فسفر در تلقیح با جدایه‌های SR₄ و SR₅ از نظر آماری اختلافی مشاهده نشد. همچنین بین سطوح ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم فسفر در تلقیح با جدایه SR₁₆ تفاوت معناداری از نظر جذب منگنز مشاهده نگردید ولی با افزایش فسفر در سطح ۶۰ میلی‌گرم جذب منگنز شاخساره به‌طور معناداری افزایش یافت.

جدول ۵- مقایسه میانگین تأثیرات سینوریزوبیوم و سطوح فسفر بر جذب عناصر غذایی توسط شنبلیله.

Table 5. Mean comparison for effects of *Sinorhizobium* and phosphorus levels on nutrients uptake by fenugreek.

Mn	Fe	P	N	باکتری Bacterium	فسفر Phosphorus
($\mu\text{g pot}^{-1}$)		(mg pot^{-1})			(mg kg^{-1})
0.03 ^g	0.02 ⁱ	0.28 ^h	6.95 ^f	Ctrl	0
0.06 ^{fg}	0.04 ^{hi}	0.36 ^h	14.1 ^f	SR ₄	0
0.06 ^{fg}	0.05 ^{hi}	0.38 ^h	14.5 ^f	SR ₅	0
0.07 ^{fg}	0.05 ^{hi}	0.50 ^h	14.5 ^f	SR ₁₂	0
0.07 ^{fg}	0.05 ^{hi}	0.40 ^h	15.4 ^f	SR ₁₆	0
0.09 ^{ef}	0.06 ^{gh}	0.82 ^h	14.3 ^f	Ctrl	20
0.26 ^{ab}	0.16 ^b	2.45 ^{c-f}	63.5 ^{b-e}	SR ₄	20
0.21 ^c	0.14 ^{bcd}	2.26 ^{efg}	57.5 ^{de}	SR ₅	20
0.20 ^c	0.12 ^{c-f}	2.07 ^{fg}	56.6 ^{de}	SR ₁₂	20
0.21 ^c	0.11 ^{def}	2.20 ^{efg}	101 ^a	SR ₁₆	20
0.12 ^{de}	0.10 ^{ef}	0.84 ^h	19 ^f	Ctrl	40
0.27 ^{ab}	0.16 ^b	2.88 ^{bcd}	77.1 ^b	SR ₄	40
0.25 ^{bc}	0.14 ^{bcd}	2.89 ^{cd}	58.9 ^{cde}	SR ₅	40
0.21 ^c	0.13 ^{b-e}	2.40 ^{def}	63.4 ^{b-e}	SR ₁₂	40
0.24 ^{bc}	0.14 ^{bcd}	2.74 ^{def}	77.7 ^{bc}	SR ₁₆	40
0.12 ^{de}	0.13 ^{b-e}	0.48 ^h	16.3 ^f	Ctrl	60
0.28 ^{ab}	0.19 ^a	3.54 ^a	100 ^a	SR ₄	60
0.24 ^{bc}	0.15 ^{bc}	3.02 ^{abc}	73 ^{bcd}	SR ₅	60
0.16 ^d	0.09 ^{fg}	1.72 ^g	50.7 ^e	SR ₁₂	60
0.30 ^a	0.15 ^{bc}	3.09 ^{ab}	108 ^a	SR ₁₆	60

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف لاتین مشترک فاقد اختلاف معنادار در سطح پنج درصد به روش دانکن می‌باشند.

The means with a same letter are not significantly different ($P < 0.05$) by Duncen test.

نتیجه گیری کلی

در مجموع از میان تیمارهای آزمایش، تلقیح شنبليله با جدایه سینوریزوبیوم SR4 به همراه کاربرد ۶۰ میلی گرم فسفر بر کیلوگرم خاک به دلیل افزایش معنادار وزن خشک شاخسار از ۰/۲۵ گرم بر گلدان در تیمار شاهد به ۲/۲۵ و تعداد گره از ۷۰ عدد بر گلدان در تیمار شاهد به ۵۷۰ و همچنین افزایش

معنادار جذب نیتروژن و فسفر به ترتیب از ۶/۹۵ و ۰/۲۸ میلی گرم بر گلدان در تیمار شاهد به ۱۰۰ و ۳/۵۴ و نیز جذب آهن و منگنز از ۰/۰۲ و ۰/۰۳ میکروگرم بر گلدان در تیمار شاهد به ۰/۱۹ و ۰/۲۸ به عنوان مؤثرترین تیمار کاربردی در این پژوهش معرفی می گردد.

منابع

1. Andrew, C.S., and Johnson, A.D. 1976. Effect of calcium, pH and nitrogen on the growth and chemical composition of some tropical and temperate pasture legumes II. Chemical composition (calcium, nitrogen, potassium, magnesium, sodium and phosphorus). Austr. J. Agric. Res. 27: 625-636.
2. Adu-Gyamfi, J.J., Fujika, K., and Ogata, S. 1989. Phosphorus absorption and utilization efficiency of pigeon pea (*Cajanus cajan* (L) Millsp.) in relation to dry matter production and dinitrogen fixation. Plant and Soil, 119: 315-324.
3. Beck, D.P., and Munns, D.N. 1984. Phosphate nutrition of *Rhizobium* spp. Applied and Environmental Microbiology, 47: 278-282.
4. Bhunia, S.R., Chauhan, R.P.S., Yadav, B.S., and Bhati, A.S. 2006. Effect of phosphorus, irrigation and *Rhizobium* on productivity, water use and nutrient uptake in fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*). Ind. J. Agron. 51: 239-241.
5. Biswas, J.C., Ladha, J.K., and Dazzo, F.B. 2000. Rhizobial inoculation improves nutritional uptake and growth of lowland rice. Soil Sci. Soc. Amer. J. 64: 1644-1650.
6. Cassman, K.G., Singleton, P.W., and Linguist, B.A. 1993. Input/output analysis of the cumulative soybean response to phosphorus on an Ultisol. Field Crop Science, 34: 23-36.
7. Cottenie, A. 1980. Methods of plant analysis. In: soil and plant testing. FAO Soils Bulletin, 38: 64-100.
8. Desperrier, N., Baccou, J.C., and Sauvaire, Y. 1986. Nitrogen fixation and nitrate assimilation in field grown fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.). Plant and Soil, 92: 189-199.
9. Fatima, Z., Zia, M., and Chaudhary, M.F. 2006. Effect of *Rhizobium* strains and phosphorus on growth of soybean (*glycine max*) and survival of *Rhizobium* and P solubilizing bacteria. Pak. J. Bot. 38: 459-464.
10. Gourley, C.J.P., Allan, D.L., and Russell, M.P. 1993. Defining phosphorus efficiency in plants. Plant and Soil, 156: 289-292.
11. Hussain, A., Amjed, A., and Noorka, I.R. 2012. Effect of phosphorus with and without rhizobium inoculation on nitrogen and phosphorus concentration and uptake by mungbean (*Vigna radiata* L.). J. Agric. Res. 50: 49-57.
12. Hussain, A., Amjed, A., Akhtar, J., and Yasin, M. 2010. Effects of phosphorus in combination with rhizobium inoculation on growth and yield parameters of mungbean. Crop and environment, 1: 53-56.
13. Jakobsen, I. 1985. The role of phosphorus in nitrogen fixation by young pea plants (*Pisum sativum*). Physiologia Plantarum, 64: 190-196.
14. Jitender, K. 2011. Effect of phosphorus and rhizobium inoculation on the growth, nodulation and yield of garden pea (*Pisum sativum* L.) CV. "Mattar Ageta-6". Legume Research-An Inter. J. 34: 20-25.
15. Khiriya, K.D., and Singh, B.P. 2003. Effect of phosphorus and farmyard manure on yield, yield attributes and nitrogen, phosphorus and potassium uptake of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*). Ind. J. Agron. 48: 62-65.

16. Leung, K., and Bottomley, P.J. 1987. Influence of phosphate on the growth and nodulation characteristics of *Rhizobium trifolii*. Applied and Environmental Microbiology, 53: 2098-2105.
17. Lynd, J.Q., Hanlon, E.A., and Odell, G.V. 1984. Nodulation and nitrogen fixation by arrow leaf clover: effects of phosphorus and potassium. Soil Biology and Biochemistry, 16: 589-594.
18. Mahmoodi, H. 2010. Effect of *Rhizobium* inoculation, nitrogen and phosphorus fertilizers application on growth of chickpea under rainfed condition. In "Proceeding of the 1st National Congress of Cereal" Mashad, Pp: 346-348.
19. Marschner, H. 1995. Mineral nutrition of higher plants (2^{ed} ed.). Academic Press, Sydney, 674p.
20. Mehdipoor, A., Rezaei, M.A., Asgharzadeh, A., and Cherati, A. 2010. Effect of different strains of *Bradyrhizobium japonicum* on micronutrients uptake in shoots and yield of seeds in soybean (*Glycine max* L.). J. Plant Sci. Res. 16: 29-30.
21. Muhammad, A. 2010. Response of a promiscuous soybean cultivar to rhizobial inoculation and phosphorus in Nigeria's Southern Guinea Savanna Alfisol. Niger. J. Bas. Appl. Sci. 18: 79-82.
22. Myers, J.A., Curtis, B.S., and Curtis, W.R. 2013. Improving accuracy of cell and chromophore concentration measurements using optical density. BMC Biophysics, 6: 1-15.
23. Ndakidemi, P.A., Bambara, S., and Makoi, J.H.J.R. 2011. Micronutrient uptake in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by Rhizobium inoculation, and the supply of molybdenum and lime. Faculty of Applied Science, 4: 40-52.
24. Nikmehr, S., Akhgar, A., Madah Hoseini, S., and Mozafari, V. 2014. Effect of Phosphate solubilizing Fluorescent Pseudomonad and phosphorus fertilizer on growth and nutrient uptake of Sesame. J. Soil Manage. Sust. Prod. 4: 61-86.
25. Nishita, G., and Joshi, N.C. 2010. Growth and yield response of chick pea (*Cicer arietinum*) to seed inoculation with *Rhizobium* sp. Nature and Science, 8: 232-236.
26. Olivera, M., Tejera, N., Iribarne, C., Ocana, A., and Liuch, C. 2004. Growth, nitrogen fixation and ammonium assimilation in common bean (*Phaseolus vulgaris*): Effect of phosphorus. Physiologia Plantarum, 121: 498-505.
27. Pereira, P.A.A., and Bliss, F.A. 1989. Selection of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for N₂ fixation at different levels of available phosphorus under field and environmentally-controlled conditions. Plant and Soil, 115: 75-82.
28. Rao, V.U., and Rao, A.S. 1993. Dual inoculation of VAM and rhizobium in black gram and green gram. Legumes Research, 16: 119-126.
29. Robson, A.D., Ohara, G.W., and L.K. Abbott. 1981. Involvement of phosphorus in nitrogen fixation by Subterranean Clover (*Trifolium subterraneum* L.). Austr. J. Plant Physiol. 8: 427-436.
30. Rodelas, B., and Gonzalez-Lopez, J. 1999. Influence of *Rhizobium/Azotobacter* and *Rhizobium/ Azospirillum* combine inoculation on mineral composition of Faba bean (*Vicia faba* L.). Biology and Fertility of Soils, 29: 165-169.
31. Sadeghzadeh-Ahari, D., Hassandokht, M.R., Kashi, A.K., Amri, A., and Alizadeh, K.H. 2010. Genetic variability of some agronomic traits in the Iranian Fenugreek landraces under drought stress and non-stress conditions. Afric. J. Plant Sci. 4: 12-20.
32. Sairam, R.K., Tomer, P.S., and Gauguly, T.K. 1984. Growth, nitrogen uptake and forage yield of cowpea as affected by phosphorus application and inoculation. Agricultural Science Digest, 4: 83-86.
33. Saxena, A.K., and Rewari, R.B. 1991. The influence of phosphate and zinc on growth, nodulation and mineral composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under salt stress. World J. Microbiol. Biotechnol. 7: 202-205.
34. Sheoran, R.S., Sharma, H.C., Panuu, P.K., and Niwas, R. 2000. Influence of sowing time and phosphorus on phenology, thermal requirement and yield of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) genotypes. J. Spice Arom. Crop. 9: 43-46.

35. Singh, A.K., and Syamal, M.M. 2011. Nodules as influenced by *Rhizobium* inoculation, phosphorus application and their interactions in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. *Vegetable Science*, 38: 82-84.
36. Togay, N., Togay, Y., Cimrin, K.M., and Turan, M. 2008. Effects of *Rhizobium* inoculation, sulfur and phosphorus applications on yield, yield components and nutrient uptakes in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Afric. J. Biotechnol.* 7: 776-782.
37. Tsvetkova, G.E., and Georgiev, G.I. 2003. Effect of phosphorus nutrition on the nodulation, nitrogen fixation and nutrient use efficiency of *Bradyrhizobium japonicum*- soybean (*Glycine Max* L. Merr) symbiosis. *Bulgar. J. Plant Physiol.* 6: 331-335.
38. Wall, L.G., Hellsten, A., and Huss-Danell, K. 2000. Nitrogen, phosphorus and the ratio between them affect nodulation in *Alnus incana* and *Trifolium pratense*. *Symbiosis*, 29: 91-105.
39. Waluyo, S.H., Lie, T.A., and 't-Mannetje, L. 2004. Effect of phosphat on nodulate primordial of soybean (*Glycin max* Merrill) in acid soils in rhizotron experiments. *Indones. J. Crop Sci.* 5: 37-44.
40. Wan Othman, W.M., Lie, T.A., 't-Mannetje, L., and Wassink, G.Y. 1991. Low level phosphorus supply affecting nodulation, N₂ fixation and growth of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Plant and Soil*, 135: 67-74.
41. Zeidan., M.S. 2007. Effect of organic manure and phosphorus fertilizers on growth, yield and quality of lentil plants in sandy soil. *Res. J. Agric. Biol. Sci.* 3: 748-752.



**Effect of combined application of *Sinorhizobium* and phosphorus
on growth, nitrogen fixation and some nutrients uptake in Fenugreek
(*Trigonella foenum-graecum* L.)**

***A.R. Akhgar¹, S. Larki², V. Mozafari¹ and A. Tajabadipour¹**

¹Associate Prof., Dept. of Soil Science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan,

²M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, Vali-e-Asr University of Rafsanjan

Received: 04/27/2015; Accepted: 02/22/2016

Abstract

Background and Objectives: Nitrogen is one of the most important nutrients in plants which its shortage in soil is the main factor limiting plant growth. Molecular nitrogen comprises about 80% of the atmospheric gases whereas it is not directly absorbable in plants. Biological nitrogen fixation (BNF) through symbiosis with leguminous plants is one of the most important ways of entrance of inorganic nitrogen into soils. Inoculation of legumes with rhizobia is also an important process to maximize biological N₂ fixation capacity in these crops. Moreover, phosphorus is an essential element to convert atmospheric N (N₂) into ammonium (NH₄) in nitrogen fixation process. Hence in this study, the effects of simultaneous application of *Sinorhizobium* and phosphorus on the growth, nitrogen fixation and nutrients uptake of Fenugreek were evaluated.

Material and Methods: To evaluate the effect of combined application of *Sinorhizobium* and phosphorus levels on growth, nitrogen content and other nutrients uptake of Fenugreek, five isolates of *Sinorhizobium* were selected from bacterial bank of soil science department, University of Rafsanjan and used in a greenhouse experiment. These bacteria were isolated from Fenugreek root nodules and had the highest symbiotic effectiveness. The greenhouse experiment was conducted in factorial based on completely randomized design with three replications including two factors i) five levels of bacteria (inoculation with four *Sinorhizobium* isolates (SR4, SR5, SR12, SR16) and non-inoculated as control) ii) four levels of phosphorous (0, 20, 40 and 60 mg kg⁻¹ soil).

Results: Results showed that simultaneous application of *Sinorhizobium* and phosphorus levels significantly increased the number of nodule and shoot dry weight. Also combined application of *Sinorhizobium* and phosphorus levels significantly enhanced amounts of nitrogen, phosphorus, iron and magnesium in shoot of Fenugreek. Interaction of the isolates and phosphorus levels didn't have any significant effect (P<0.05) on root dry weight and uptake of zinc and copper, while root dry weight and amounts of zinc and copper in the Fenugreek were significantly increased by application of *Sinorhizobium* isolates and phosphorus levels each one alone.

Conclusion: This study revealed that simultaneous application of isolate SR4 and 60 mg phosphorus per kg soil was the most efficient treatment in improving growth nitrogen content and other nutrients uptake of Fenugreek. In comparison with control, this treatment enhanced shoot dry weight from 0.25 to 2.25 g pot⁻¹, nodule number from 70 to 570, nitrogen and phosphorus contents from 6.95 and 0.28 to 100 and 2.54 mg pot⁻¹ and also iron and manganese uptake from 0.02 and 0.03 to 0.19 and 0.28 μg pot⁻¹ respectively.

Keywords: Nitrogen fixation, Growth, *Sinorhizobium*, Fenugreek, Phosphorus

* Corresponding Authors; Email: arakhgar@yahoo.com

