Journal of Horticultural Plants Nutrition
Vol.4, No.1, Spring & Summer 2021
Research Paper

DOI: 10.22070/HPN.2021.14632.1141

Improvement of yield and photosynthetic indices of 'Lollo Rosso' lettuce by bacterial biofertilizer at different concentrations of phosphorus under hydroponic culture

Edris Shabani*[*1]

1- Corresponding Authors and Assistant Professor of Horticulture science, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
edris.shabani@scu.ac.ir

Received Date: 2021/05/21 Accepted Date: 2021/07/14

Abstract

Introduction: Phosphorus is the second limiting element of plant yield after nitrogen. Rock phosphate is a non-renewable resource. Global data shows that by 2050 the requirement for P fertilizers will increase by 50-100% and universal phosphate rock resources will be evacuated within the next 50-100 years (Cordell et al. 2009). Phosphate-solubilizing microorganisms such as bacteria are one of the most important tools for researchers in reducing of phosphorus fertilizers consumption in agriculture. Despite many studies on the effect of bacteria on physiological reactions and plant performance in soil culture, there are few reports on the effect of bacteria on these reactions in hydroponic culture. The aim of this study was to investigate the role of *Bacillus subtilis* on yield, photosynthetic properties and reducing of phosphorus fertilizers consumption in hydroponic culture.

Material and methods: The experiment was factorial based on a completely randomized design with three replicates. A greenhouse experiment was performed to evaluate the effect of *Bacillus subtilis* UTB96 and different concentrations of nutrient phosphorus (12.5, 25, 37.5, 50 and 62.5 mg L^{-1}) on the yield, pigments and photosynthetic index, root-to-shoot phosphorus ratio and bacterial population. 'Lollo Rosso' lettuce seedlings were prepared under greenhouse conditions. Probio 96® biological fertilizer was used to inoculate the 'Lollo Rosso' lettuce seedlings at time of transplant by utilization a root dip method (with submergence for 5 min); then a repeated inoculation was conducted at 20 days after transplanting by watering 25 mL of the inoculums $plant^{-1}$. Lettuce plants were grown in soilless culture with the Resh nutrient solution (Resh, 2012). P was added as KH_2PO_4 at the following concentrations of 12.5, 25, 37.5, 50, and 62.5 mg L^{-1}. Photosynthetic indices were measured during growth and traits such as yield and physiological characteristics were measured at harvest time (50 days after transplanting). All data were statistically analyzed by analysis of variance (ANOVA) using the SAS 9.1 software (SAS Inc., Cary NC). Duncan's multiple-range test was performed at $p = 0.05$ on each of the significant variables measured.

Results and discussion: The mean comparisons showed that plants inoculated with bacteria had higher yields than uninoculated plants at all levels of phosphorus (Figure 3). Interaction data of bacteria and different concentrations of phosphorus in the nutrient solution showed that, like the 50 mg L^{-1} treatment, a 25% reduction in phosphorus consumption (37.5 mg/L) caused the highest photosynthesis rates in BS_1P_3 (Bacterial inoculated and 37.5 mg/L of phosphorus) and BS_1P_4 (bacterial inoculation and 50 mg/L phosphorus). The findings of this study clearly showed that as in the treatment of 50 mg/L, a reduction of 50% (25 mg L^{-1}) and 25% of phosphorus consumption (concentration of 37.5 mg/L) in treatments with bacterial inoculation caused the highest values of phosphorus concentration in plant tissues and bacterial accumulation in the substrate, respectively (Table3).Today, the positive effects of these bacteria on plant yield to their effect on improving root growth (Rahi, 2016), increasing the absorption of nutrients such as phosphorus (Turom et al., 2007), the production of growth hormones such as auxin and gibberellin (Ruzzi and Aroca, 2015), attributed to the increase of photosynthetic pigments (Rahi, 2016) and the maintenance of photosynthetic efficiency (Wang et al., 2012). Therefore, according to the results of this study, the positive effects of this bacterium on photosynthetic indices may be due to their ability to increase phosphorus uptake in 'Lollo Rosso' lettuce, which indirectly affects root growth and photosynthetic efficiency and finally improved the above characteristics.

Conclusions: The results of this study showed that the use of *Bacillus subtilis* UTB96 biofertilizer improves nutrient uptake, increases the growth of greenhouse plants in hydroponic condition and reduces the phosphorus fertilizers consumption.

Keywords: Bacillus subtilis, Plant growth-promoting rhizobacteria, Soilless culture, Phosphorus concentration, Phosphate-solubilizing microorganisms and Bacterial population.

نشریه علمی تغذیه گیاهان باغی
دوره ۴، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۰، (ص ۱۵۸- ۱۴۳)
مقاله پژوهشی

DOI: 10.22070/HPN.2021.14632.1141

بهبود عملکرد و شاخص‌های فتوسنتزی کاهو لولوروسا با کود زیستی باکتریایی در غلـظت‌های مختلف فسفر در شرایط کشت هیدروپونیک

ادریس شعبانی [۱]

۱- نویسنده مسئول و استادیار گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
edris.shabani@scu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۳۱ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۳**

چکیده

امروزه استفاده از میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات به منظور کاهش مصرف کودهای فسفره مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. در این راستا آزمایشی گلخانه‌ای (به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی) به منظور ارزیابی اثر باکتری *Bacillus subtilis* UTB96 و غلظت‌های مختلف فسفر محلول غذایی (۱۲/۵، ۲۵، ۳۷/۵، ۵۰ و ۶۲/۵ میلی گرم بر لیتر) بر عملکرد، رنگیزه‌ها و شاخص‌های فتوسنتزی، نسبت فسفر ریشه به ساقه کاهو لولوروسا و جمعیت باکتری (CFU) بستر در ۳ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از باکتری در بسترهای کشت به‌تنهایی سبب افزایش ۲۰/۸۸ درصدی عملکرد در مقایسه با تیمار بدون تلقیح باکتری شد. همچنین استفاده مجزای تیمارهای فسفره نشان داد که تیمار استاندارد فسفر در مقایسه با پایین‌ترین سطح فسفر (۱۲/۵ میلی گرم بر لیتر) به‌ترتیب سبب افزایش ۹۳/۹۷٪، ۶۱/۲۷٪و ۴۸/۲۷٪ عملکرد، نرخ فتوسنتز و کلروفیل کل گردید. اثر متقابل *B. subtilis* UTB96 و غلظت‌های مختلف فسفر محلول غذایی نشان داد که همانند تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر، کاهش ۲۵ درصدی مصرف فسفر (غلظت ۳۷/۵ میلی گرم بر لیتر) نیز در تیمارهای با تلقیح باکتریایی سبب بروز بالاترین مقادیر نرخ فتوسنتز،CFU و کاهش ۵۰ درصدی فسفر (غلظت ۲۵ میلی گرم بر لیتر) سبب افزایش جذب فسفر بافت‌های ریشه و ساقه کاهو لولوروسا گردید. عملکرد گیاهان با تیمار ۳۷/۵ میلی گرم بر لیتر فسفر و تلقیح باکتریایی (BS_1P_3) بیشتر از تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر فسفر و بدون تلقیح باکتریایی (BS_0P_4) بوده است. بنابراین نتایج این مطالعه نشان داد که با بهره‌گیری از باکتری *B. subtilis* UTB96 نه تنها می توان سبب افزایش عملکرد محصولات گلخانه‌ای در شرایط کشت بدون خاک شد، بلکه می توان با کاهش ۲۵ درصدی مصرف کودهای فسفره نتایج مشابه با تیمارهای استاندارد را هم انتظار داشت. بنابراین این یافته ها گام موثری در کاهش مصرف کودهای گران قیمت فسفره و کاهش آلودگی‌های زیست محیطی می‌باشد.

کلمات کلیدی: باکتری *Bacillus subtilis*، ریزوباکترهای محرک رشد گیاه، کشت بدون‌خاک، غلظت فسفر، میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات و جمعیت باکتری.

مقدمه

فسفر بعد از نیتروژن دومین عنصر محدودکننده عملکرد گیاهان در جهان می‌باشد (Molaie et al., 2020). این عنصر بین ۰/۸-۰/۲ درصد وزن خشک گیاهان را تشکیل می‌دهد. فسفر در ساخت نشاسته و انتقال کربوهیدرات‌ها نقش دارد. خروج مواد تولیدشده از کلروپلاست توسط ناقلین فسفات صورت گرفته و با فسفات معدنی تحریک می‌شود (Tabatabaei, 2013). فسفر در هر جنبه ای از رشد و نمو گیاهان از سطح ملکولی تا فعالیت‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی مانند کیفیت محصول، فتوسنتز، تشکیل گل و بذر، بلوغ محصول، رشد و توسعه ریشه، واکنش‌های تولید، ذخیره و انتقال انرژی، مقاومت به بیمارهای گیاهی و انتقال صفات ژنتیکی نقش بسزایی را ایفا می‌کند (Kalayu, 2019). فسفر یکی از اجزای مهم آنزیم‌ها، پروتئین‌ها، ATP، RNA، DNA و فیتین می‌باشد. فسفر از معادن سنگ فسفات به دست می‌آید و همانند نفت از منابع تجدیدناپذیر است. گزارش پژوهشگران نشان می‌دهد که ذخایر سنگ فسفات می‌تواند طی ۱۰۰-۵۰ سال آینده به اتمام برسد. نزدیک به ۹۰ درصد تقاضای جهانی فسفر برای تولید مواد غذایی است که شامل ۱۴۸ میلیون تن سنگ فسفات می شود (Smil, 2000). همچنین داده‌های صنایع کودی حاکی از آن است که کیفیت ذخایر فسفر در حال کاهش و هزینه‌های استخراج، فرآوری و حمل و نقل آن در حال افزایش است (Cordel et al., 2009). یافته‌های میدانی ما در بازار کود ایران نشان می دهد که تنها در فاصله مرداد تا آذر ۱۳۹۹ قیمت کود منوپتاسیم فسفات و سوپرفسفات تریپل (به ترتیب به عنوان منابع اصلی تامین فسفر محصولات گلخانه ای و مزرعه ای) رشد ۵-۴ برابری داشته است. علاوه بر محدودیت‌های ذکر شده، غلظت فسفر در محلول خاک بسیار ناچیز و در دامنه ۱-۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر لیتر و حرکت فسفر قابل‌دسترس در خاک بسیار کم (۰/۳ سانتی‌متر در سال) می‌باشد. علاوه بر این حتی تحت مدیریت بهینه، کارایی جذب فسفر به‌وسیله گیاه تنها ۳۰-۱۵ درصد در سال می‌باشد (Shabani et al., 2018). با توجه به موارد مطرح شده، انجام پژوهش‌های کاربردی در راستای کاهش مصرف کودهای فسفری امری ضروری به نظر می‌رسد.

استفاده از میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات (PSMs)[1] به عنوان کودهای زیستی برای افزایش راندمان در کشاورزی، سال‌ها مورد مطالعه بوده است (Kalayu, 2019). امروزه یکی از راهکارهای کاهش ورود کودهای شیمیایی به بسترهای کشت محصولات باغبانی استفاده از همین میکروارگانیسم‌ها می‌باشد که با افزایش کارایی استفاده آب و عناصر غذایی و افزایش ظرفیت جذب عناصر سبب حفظ بهره‌وری محصول می‌شود (Ruzzi and Aroca, 2015). PSMs ها گروهی از میکروارگانیسم‌های مفید هستند که می‌توانند ترکیبات فسفر آلی و معدنی را از ترکیبات نامحلول هیدرولیز کنند. در میان این PSMs ها، سویه‌های جنس باکتریایی (باسیلوس، سودوموناس و ریزوبیوم)، جنس‌های قارچ (پنیسیلیوم و آسپرژیلوس)، اکتینومایست‌ها و میکوریز آربوسکولار (AM) قابل‌توجه هستند (Kalayu, 2019). باکتری‌ها سبب افزایش ظهور ریشه‌چه، کلونیزه شدن ریشه و تحریک رشد گیاهان می شوند. در دهه اخیر تاثیر ریزوباکترهای محرک رشد گیاه (PGPR) بر بهبود رشد گیاه مورد پذیرش پژوهشگران قرار گرفته است (Idriss et al., 2002). PGPR ها بسته به سبک زندگی به سه دسته تقسیم می شوند: باکتری‌های زنده ای که در اطراف منطقه ریشه[2] زندگی می کنند، باکتری‌هایی که سطح ریشه را کلونیزه می‌کنند[3] و باکتری‌های اندوفیتیک که در داخل ریشه‌ها زندگی می‌کنند. با این‌حال، این تقسیم‌بندی منحصربه‌فرد نیست زیرا بسته به شرایط محیط کشت و شرایط گیاه میزبان، باکتری می‌تواند هر سه سبک زندگی را اتخاذ کند (Mitter et al., 2013). بنابراین PGPRها شامل تمام باکتری‌هایی است که در ریزوسفر و

1 . Phosphate solubilizing microorganisms
2 . Rhizosphere
3 . Rhizoplane

ریزوپلان زیست می‌کنند و سبب بهبود رشد می‌شوند. این ظرفیت بهبود و ارتقا رشد به‌راحتی می‌تواند در بسترهای کشت استریل شده مورد بررسی قرار گیرد. نحوه عملکرد PGPR به وضوح متنوع است و همه باکتری‌ها دارای مکانیسم‌های یکسانی نیستند (Dey et al., 2004). این مکانیسم‌ها از تغییر در محتوای هورمونی تا تولید ترکیبات فرار، افزایش دسترسی مواد غذایی یا افزایش تحمل تنش غیرزیستی متنوع می باشد (Choudhary et al., 2011). سایر مکانیسم‌های پیشنهادی شامل سرکوب بیماری‌های ناشی از عوامل بیماری‌زای گیاهی، رقابت با میکروارگانیسم‌های بیماری زا از طریق کلونیزه کردن ریشه، تولید مواد تنظیم کننده رشد گیاه مانند ایندول۳-استیک اسید، کاهش سطح اتیلن در سلول‌های ریشه، افزایش دسترسی به عناصر مغذی محدود گیاه مانند نیتروژن، فسفر، ویتامین‌های B و اسیدهای آمینه در ریزوسفر ناشی از باکتری‌های حل‌کننده فسفات و دیازوتروفیک (باکتری‌های تثبیت کننده نیتروژن هوا) می‌باشد (Idriss et al., 2002). بهبود رشد گیاه با استفاده از کلونیزه کردن ریشه گیاهان توسط *Bacillus subtilis* (*باسیلوس سوبتیلیس*) کاملاً شناخته‌شده است. این باکتری‌ها با تاثیر بر تولید و ترشح اسیدهای آلی از ریشه گیاهان کلونیزه شده سبب حلالیت بیشتر فسفات‌های معدنی می گردند. برخی از این اسیدها شامل مالیک اسید، ستریک اسید، آلزالیک اسید، سوکسنیک اسید و ۲-کتوگلوکونیک اسید می‌باشد. این اسیدها با آزادسازی H^+ سبب کاهش اسیدیته محلول و افزایش انحلال فسفات های معدنی نامحلول می شود. همچنین این باکتری با تولید آنزیم فسفاتاز بستر مناسبی را برای رهاسازی فسفر از ترکیب‌های فسفردار آلی فراهم می کند (Khaseh Sirjani, 2011). القا مقاومت سیستماتیک به تنش خشکی از طریق حفظ کارایی فتوسنتزی، قدرت ریشه و افزایش برخی فعالیت‌های آنتی اکسیدانی در گیاهان گلدانی و شرایط گلخانه ای توسط *باسیلوس سوبتیلیس* نشان داده شده است (Wang et al., 2012). همچنین یافته‌های Kokalis-Burelle (2003) نشان داد که استفاده از باسیلوس سوبتیلیس در توت‌فرنگی سبب تولید ریشه‌های سالم‌تر، زودتر و در نهایت عملکرد کل بیشتر می‌گردد. همچنین نتایج Rahi (2016) در ریحان نشان داد که کودهای بیولوژیک سوپرنیتروپلاس و بیوسوپرفسفات سبب افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک اندام‌هوایی، کلروفیل a، کلروفیل b و کلروفیل کل در مقایسه با شاهد گردید.

تولید کاهو (*Lactuca sativa* L.) به دلیل ارزش تغذیه‌ای، پرورش در تمام فصول و سیستم‌های مختلف کشت به ویژه گلخانه مورد توجه قرار گرفته است. کشت بدون‌خاک کاهو با بازه زمانی تولید ۸-۶ هفته‌ای به دلیل مدیریت تغذیه می‌تواند سبب افزایش خصوصیات کمی و کیفی آن گردد (Draghici et al., 2016). کاهو منبع قابل‌توجهی از مواد معدنی مانند آهن، کلسیم، منیزیم، فسفر، پتاسیم، منگنز، ویتامین‌هایی مانند A، K، C و فولات (B_9) و همچنین آنتی اکسیدان‌ها می‌باشد (Romani et al., 2002). در سال‌های گذشته، کشت ارقام مختلف کاهو لولوروسا در ایران به دلیل ظاهر زیبا و متفاوت آن و همچنین ارزش تغذیه ای بالا موردتوجه تولید کنندگان قرار گرفته است. پرورش آسان، مدت زمان کوتاه کاشت تا برداشت و قیمت بالای این ارقام سبب شده تا گلخانه‌های با کشت بدون‌خاک، کشت شناور و کشت خاکی در فواصل بین کشت‌های گوجه فرنگی و خیار و یا به عنوان کشت مستقل اقدام به تولید این محصول در سراسر کشور نمایند. تولید این محصول در استان های جنوبی ایران به ویژه در فصول پاییز و زمستان به دلیل تامین شدت نور کافی و برخورداری از دمای مناسب با اقبال ویژه ای روبرو بوده است، اما متاسفانه روند افزایشی و غیرقابل انتظار قیمت کودهای فسفره سبب بروز مشکلات مختلف در تولید این محصول خاص گردیده است. بنابراین به‌نظر می رسد انجام پژوهش‌های متکی بر کاهش مصرف کودهای شیمیایی به ویژه کودهای فسفره امری اجتناب ناپذیر است. امروزه تلفیق دانش تغذیه گیاه با کودهای زیستی به منظور

کاهش مصرف کودهای شیمیایی توجه ویژه ای را به سمت خود جلب کرده است. به عنوان اولین گزارش این پژوهش سعی دارد با معرفی روشی نوین مانند استفاده از سوسپانسیون‌های باکتریایی در کشت‌های هیدروپونیک گامی موثری را در کاهش مصرف کودهای فسفره، کاهش آلودگی‌های زیست محیطی و کمک به توسعه کشاورزی پایدار ایفا نماید.

مواد و روش ها

این آزمایش در مجتمع گلخانه‌ای گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز با موقعیت جغرافیایی ´۲۰ °۳۱ عرض شمالی و ´۴۱ °۴۸ طول شرقی، به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرارطی زمستان ۱۳۹۹ اجرا گردید. گلخانه دارای سازه فلزی، پوشش پلی کربنات و فاقد سیستم گرمایشی بود. گیاهان در طول این آزمایش تحت دمای °C ۲±۲۰ روز و °C ۲±۱۱ شب، رطوبت نسبی ۵±۶۵ و نور طبیعی خورشید رشد یافتند. جوانه زنی بذرهای کاهو لولوروسا رقم کنکورد RZ شرکت رکزوان هلند (var. Concorde RZ, Rijk Zwaan, Netherland) در شرایط اتاق انجام پذیرفت. بذرهای جوانه زده به سینی‌های نشا منتقل و فرآیند تولید نشاء تحت شرایط گلخانه صورت پذیرفت. نشاها در مرحله ۳ برگ حقیقی به گلدان‌های پلاستیکی ۹ لیتری با نسبت ۷۵:۲۵ کوکوپیت به پرلیت منتقل گردید. به منظور ارزیابی دقیق اثر باکتری مورد نظر، تمام بسترهای مورد استفاده در این آزمایش جهت حذف تمام میکروارگانیسم‌ها در دمای °C ۱۲۱ و فشار یک اتمسفر استریل گردیدند. گلدان‌ها با تراکم ۶/۶ بوته در مترمربع در فضای گلخانه چیده شدند. تیمارهای آزمایشی شامل غلظت‌های مختلف فسفر (۱۲/۵، ۲۵، ۳۷/۵، ۵۰ و ۶۲/۵ میلی گرم بر لیتر) و وجود و عدم وجود کود زیستی باکتریایی (فاقد باکتری (BS_0) و دارای باکتری (BS_1)) بود. کود زیستی باکتری *Bacillus subtilis* از فرمولاسیون پروبیو ۹۶® شرکت بایوران© تامین گردید. مطابق پیشنهاد شرکت فوق و به منظور آماده سازی این محلول زیستی جهت اعمال تیمارهای باکتریایی، ۳۰ میلی لیتر از محلول باکتریایی پروبیو ۹۶ در یک لیتر آب مقطر حل گردید. قبل از انتقال نشا، گیاهان مرتبط با تیمار کودهای زیستی در محلول حاوی باکتری *Bacillus subtilis* سویه UTB96 به مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند ($CFU=5\times10^8$ /mL, EC = 4.4 dS/m and pH (1:10) = 6.2 (1:10)). در ۲۰ روز پس از انتقال نشا نیز هر یک از گیاهان مجدداً ۲۵ میلی‌لیتر از محلول فوق را دریافت نمودند. تمام گلدان‌ها در طول فصل رشد با محلول غذایی هاوارد رش (Resh, 2012) (جدول ۱) و بر اساس غلظت فسفر مختص هر تیمار تغذیه گردیدند و اثر ۵ غلظت فسفر از کود منوپتاسیم فسفات (KH_2PO_4) (۱۲/۵، ۲۵، ۳۷/۵، ۵۰ و ۶۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر) در شرایط وجود و عدم وجود کود زیستی باکتریایی مورد ارزیابی قرار گرفت. محلول‌های غذایی دارای سطوح مختلف فسفر در ۵ بشکه ۵۰ لیتری تهیه گردید. به منظور اعمال تیمارهای حاوی فسفر هر گلدان در دو هفته اول ۲۰۰ میلی لیتر، در دو هفته میانی ۳۰۰ میلی لیتر و در دو هفته پایانی ۴۰۰ میلی لیتر از محلول غذایی خاص خود دریافت نمود.

جدول ۱- محلول غذایی هاوارد رش برای پرورش کاهو لولوروسا
Table 1. Howard Resh nutrient solution for production of 'Lollo Rosso' lettuce

Nutrient element	N	K	Ca	Mg	Fe	B	Mn	Zn	Cu	Mo
Concentration (ppm)	180	210	180	40	3	0.5	0.5	0.1	0.1	0.05

در طول فصل رشد و طی دو مرحله شاخص‌های فتوسنتزی مانند نرخ فتوسنتز خالص، نرخ تعرق و هدایت روزنه‌ای توسط دستگاه LCi-SD ساخت کشور انگلستان اندازه‌گیری گردید. سنجش میزان رنگیزه‌های فتوسنتری، به روش Carter and Knapp (2001) با استفاده از عصاره متانولی انجام شد. در تمامی بوته‌ها از برگ‌های توسعه‌یافته جهت نمونه‌برداری استفاده شد تا اندازه‌گیری در شرایط یکسانی انجام شده باشد. جذب عصاره در طول‌موج‌های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر قرائت شد و از طریق معادلات Lichtenthaler and Buschmann (2001) محاسبات انجام گردید.

$$\mathbf{Cha}\ (\mu\mathbf{g/ml}) = \mathbf{16.72}\ \boldsymbol{A665.2} - \mathbf{9.16}\ \boldsymbol{A652.4}$$

$$\boldsymbol{Chb}\ (\mu\mathbf{g/ml}) = \mathbf{34.09}\ \boldsymbol{A652.4} - \mathbf{15.28}\ \boldsymbol{A665.2}$$

$$\boldsymbol{Ch\ total} = \boldsymbol{Cha} + \boldsymbol{Chb}$$

$$\boldsymbol{C}\ (\boldsymbol{x}+\boldsymbol{c})(\mu\mathbf{g/ml}) = (\mathbf{1000}\ \boldsymbol{A470} - \mathbf{1.63}\ \boldsymbol{Cha} - \mathbf{104.96}\ \boldsymbol{Ch\ b})/\mathbf{221}$$

Ch_a= a کلروفیل Ch_b= b کلروفیل Ch_{Total}= کلروفیل $C_{(X+C)}$= کلروفیل کل کارتنوئیدها (گزانتوفیل+کاروتن)

در نهایت با اعمال حجم نهایی محلول، فاکتور رقیق‌سازی و وزن نمونه ها، مقادیر کلروفیل a، b، کلروفیل کل و کارتنوئید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن‌تر برگ گزارش گردید. مقدار عملکرد هر گلدان در زمان برداشت (۵۰ روز بعد از انتقال نشا) با ترازو دیجیتالی با دقت ۰/۰۱ گرم مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. به منظور اندازه‌گیری نسبت فسفر ریشه به ساقه ابتدا قسمت هوایی و ریشه‌های مربوط به هر تیمار در آون $70^{\circ}C$ به مدت ۴۸ ساعت خشک گردید. این نمونه های خشک شده بعد از آسیاب شدن توسط آسیاب برقی جهت اندازه گیری فسفر مورد استفاده قرار گرفت. فسفر با استفاده از روش Recena et al. (2015) با کمی تغییر اندازه‌گیری گردید. بدین منظور ابتدا ۰/۵ گرم از نمونه‌ها در بوته‌های چینی ریخته شد. سپس ۵ میلی لیتر نیترات منیزیم ۱ نرمال و ۱۰ میلی لیتر آب مقطر به آن‌ها اضافه گردید. بوته‌های چینی روی حمام بن ماری در حال جوشیدن قرار گرفت و بعد از خشک شدن محتوای درونی آن‌ها، به کوره هضم با دمای $550^{\circ}C$ به مدت حداقل ۳/۵ ساعت منتقل گردید. در مرحله بعد پس از سرد شدن نمونه‌ها، به هر بوته چینی ۵ میلی لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال اضافه گردید. به منظور ظهور رنگ زرد و کاهش حجم محلول به نصف مقدار اولیه، نمونه‌های هر بوته‌چینی دوباره روی بن‌ماری قرار گرفتند. بعد از صاف شدن شدن نمونه ها توسط کاغذ صافی، نمونه‌ها با آب مقطر به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شدند. در مرحله بعد ۵ میلی لیتر از این عصاره آماده شده در بالون ۲۵ میلی لیتری ریخته شد و بعد از اضافه کردن ۵ میلی لیتر از معرف رنگی وانادومولیبدات با آب مقطر به حجم رسانده شد. مقدار جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-1201, Shimadzu, Japan) اندازه‌گیری شد. با استفاده از داده‌های به‌دست‌آمده از محلول‌های استاندارد، منحنی کالیبراسیون استاندارد رسم گردید و غلظت فسفر در بافت گیاهی برحسب میلی‌گرم در گرم ماده خشک گیاهی گزارش گردید. برای اندازه گیری واحد تشکیل کلونی (Colony-forming unit=CFU) ابتدا از هر گلدان ۳-۲ عدد ریشه یک سانتی‌متری همراه با بسترهایی که اطراف تارهای کشنده بود جدا و در داخل ۲ میلی لیتر آب مقطر قرار گرفت (آب مقطر و لوله فالکون از قبل اتوکلاو گردید). سپس نمونه‌ها به مدت ۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. در مرحله بعد نمونه‌ها روی محیط کشت نوترینت آگار کشت

شدند. محاسبه تعداد کلونی هر تیمار مطابق روش Osdaghi et al. (2017) با کمی تغییر محاسبه گردید.

در پایان آزمایش داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و مقایسه میانگین تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گردید. نمودار نیز به کمک نرم افزار Excell رسم گردید.

نتایج و بحث

نتایج مقایسات میانگین داده‌ها نشان داد که استفاده از کود زیستی حاوی باکتری *B. subtilis* سبب افزایش معنی‌دار عملکرد، نرخ فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، کلروفیل a، b، کلروفیل کل، نسبت فسفر ریشه به ساقه و CFU در سطح احتمال ۱ درصد گردید (شکل ۱ و جدول ۲). به گونه‌ای که استفاده کود زیستی باکتریایی در بسترهای کشت به‌تنهایی سبب افزایش ۲۰/۸۸ درصدی عملکرد در مقایسه با تیمار بدون تلقیح باکتری شد. همچنین بر اساس نتایج این آزمایش بیشترین مقادیر شاخص‌ها و رنگیزه‌های فتوسنتزی و نسبت فسفر ریشه به ساقه نیز در تیمار های با تلقیح باکتریایی مشاهده گردید (جدول ۲).

نتایج این آزمایش نشان داد که افزایش غلظت فسفر محلول غذایی سبب افزایش شاخص‌های رشدی، فتوسنتزی و فیزیولوژیکی کاهو لولوروسا رقم کنکورد گردید. بر اساس داده‌های جدول مقایسات میانگین، بیشترین مقادیر نرخ فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، کلرفیل‌ها، کارتنوئید، نسبت فسفر ریشه به ساقه و CFU در تیمار استاندارد رش (۵۰ میلی گرم بر لیتر) مشاهده گردید (جدول ۲). تیمار استاندارد فسفر در مقایسه با پایین‌ترین سطح فسفر (۱۲/۵ میلی گرم بر لیتر) به ترتیب سبب افزایش ۹۳/۹۷٪، ۶۱/۲۷٪ و ۴۸/۲۷٪ عملکرد، نرخ فتوسنتز و کلروفیل کل گردید (شکل ۲ و جدول ۲). مطابق انتظار با افزایش غلظت فسفر در محلول غذایی نسبت فسفر ریشه به ساقه افزایش یافت و در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار گردید (جدول ۲).

داده‌های اثر متقابل *B. subtilis* UTB96 و غلظت‌های مختلف فسفر محلول غذایی در بسترهای کشت کاهو لولوروسا نشان داد که اگرچه رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید) تحت تاثیر مصرف همزمان این دو فاکتور قرار نگرفتند ولی مقدار عملکرد، نرخ فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، نسبت فسفر ریشه به ساقه و CFU به طرز چشمگیری تحت تاثیر تلقیح باکتری و استفاده فسفر قرار گرفت. در تمام سطوح فسفر، تلقیح گیاهان با کود زیستی حاوی باکتری *B. subtilis* در قیاس با تیمارهای بدون باکتری سبب افزایش معنی‌دار این صفات گردید (جدول ۳، شکل ۳ و ۴). یافته‌های این پژوهش به وضوح نشان داد که همانند تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر، کاهش ۲۵ درصدی مصرف فسفر (غلظت ۳۷/۵ میلی گرم بر لیتر) نیز در تیمارهای با تلقیح باکتریایی سبب بروز بالاترین مقادیر نرخ فتوسنتز و CFU در ترکیب‌های تیماری BS_1P_3 و BS_1P_4 گردید (جدول ۳ و شکل ۴). همچنین نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از تیمارهای باکتریایی با کاهش ۵۰ درصدی مصرف کودهای فسفره سبب بروز بالاترین جذب فسفر در بافت‌های ریشه و ساقه کاهو لولوروسا گردید. عملکرد گیاهان با تیمار ۳۷/۵ میلی گرم بر لیتر فسفر و تلقیح باکتریایی (BS_1P_3) بیشتر از تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر فسفر و بدون تلقیح باکتریایی (BS_0P_4) بوده است (شکل ۳). یکی دیگر از نتایج حائز اهمیت این پژوهش جذب مناسب فسفر در غلظت‌های پایین فسفر و در حضور باکتری *B. subtilis* بوده است، به گونه‌ای که بین تیمار ۲۵ و ۳۷/۵ میلی گرم بر لیتر با تیمار ۵۰ میلی گرم بر لیتر فسفر اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول ۳).

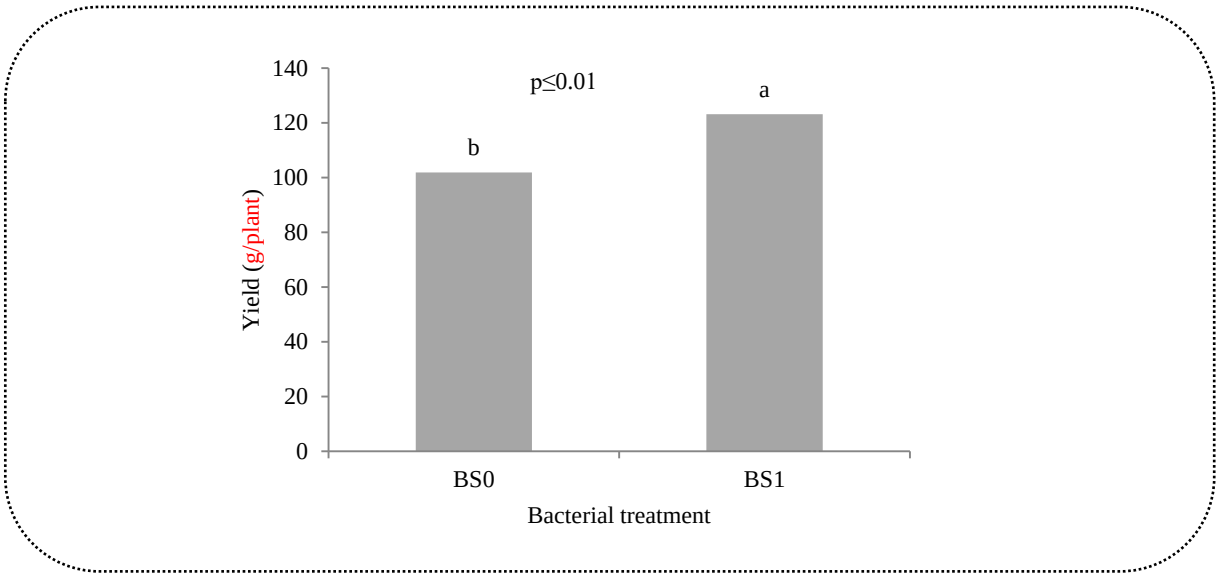
جدول ۲- اثرات اصلی باکتری ***Bacillus subtilis*** و غلظت‌های مختلف فسفر محلول غذایی بر عملکرد، رنگیزه‌ها و شاخص‌های فتوسنتزی، نسبت فسفر ریشه به ساقه و CFU کاهو لولوروسا

Table2– Main effects of *Bacillus subtilis* (BS) and different concentrations of phosphorus (P) in the nutrient solution on pigments and photosynthetic indices, root to shoot phosphorus ratio and colony forming unit (CFU) of 'Lollo Rosso' lettuce

Treatment	Ch a (mg/g)	Ch b (mg/g)	Ch a+b (mg/g)	CAR (mg/g)	Photosynthesis (µmol/m^{2}s)	Stomatal conductance (mmol/m^{2}s)	Evaporation (mmol/m^{2}s)	P_{root}/P_{shoot}	CFU
BS									
BS_0	0.063 ^{b}	0.031 ^{b}	0.095 ^{b}	0.007	2.52 ^{b}	0.08 ^{b}	1.84	1.02 ^{b}	0.00 ^{b}
BS_1	0.071 ^{a}	0.042 ^{a}	0.114 ^{a}	0.011	3.11 ^{a}	0.29 ^{a}	2.03	1.28 ^{a}	4.64×10^{4} ^{a}
Significance	*	**	*	Ns	**	**	Ns	**	**
P									
P_1	0.059 ^{c}	0.028 ^{c}	0.087 ^{c}	0.004 ^{b}	2.04 ^{c}	0.071 ^{d}	1.41 ^{b}	0.85 ^{c}	1.43×10^{4} ^{b}
P_2	0.069 ^{abc}	0.034 ^{bc}	0.103 ^{bc}	0.007 ^{b}	2.73 ^{b}	0.085 ^{d}	1.88 ^{ab}	1.18 ^{b}	1.75×10^{4} ^{ab}
P_3	0.071 ^{ab}	0.042 ^{ab}	0.114 ^{ab}	0.010 ^{ab}	3.24 ^{a}	0.160 ^{b}	2.05 ^{ab}	1.21 ^{b}	2.81×10^{4} ^{a}
P_4	0.079 ^{a}	0.049 ^{a}	0.129 ^{a}	0.016 ^{a}	3.29 ^{a}	0.513 ^{a}	2.36 ^{a}	1.34 ^{a}	2.82×10^{4} ^{a}
P_5	0.060 ^{bc}	0.029 ^{c}	0.088 ^{c}	0.007 ^{b}	2.77 ^{b}	0.120 ^{c}	1.99 ^{ab}	1.16 ^{b}	2.80×10^{4} ^{a}
Significance	**	**	**	*	**	**	Ns	**	*

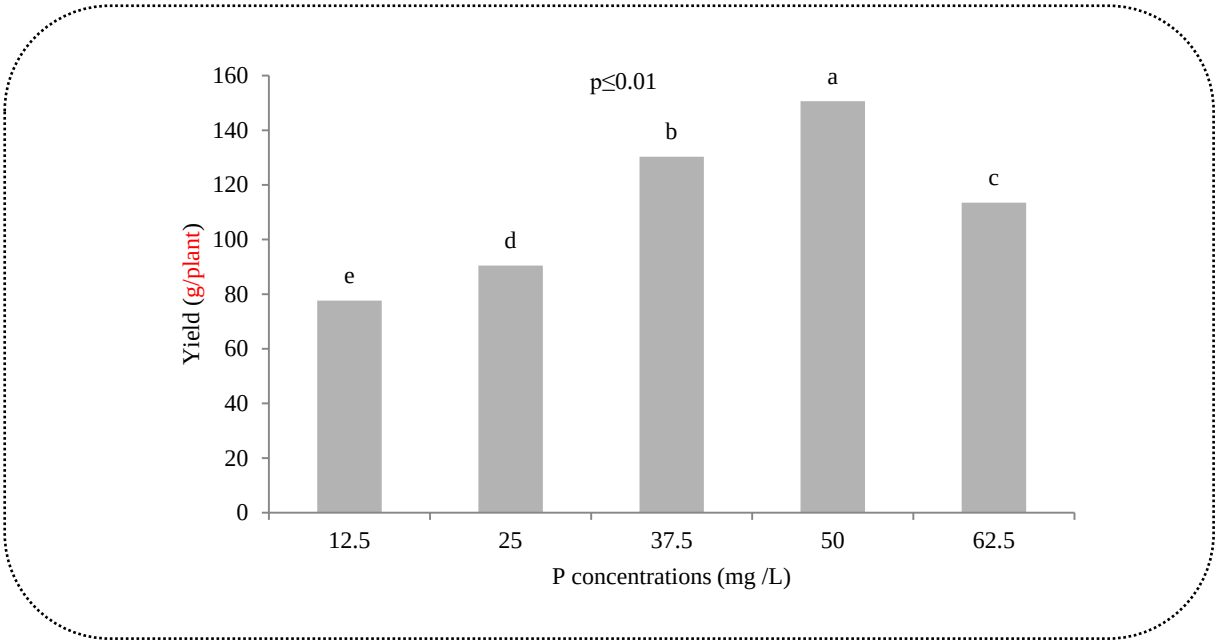
Ns، * و ** به‌ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪. ستون‌های با حروف متفاوت بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری داشتند ($p\leq0.05$)

Ns, * and **, Non-significant, significant at 0.05%, 0.01%, respectively. Means followed by a different lowercase letters in a column were significantly different according to Duncan's multiple-range test ($p\leq0.05$).



شکل ۱- اثر تلقیح باکتری ***Bacillus subtilis*** بر عملکرد کاهو لولوروسا

Figure 1- The Effect of *Bacillus subtilis* inoculation on yield of 'Lollo Rosso' lettuce



شکل ۲- اثر غلظت‌های مختلف فسفر محلول غذایی بر عملکرد کاهو لولوروسا

Figure 2 - The effect of different concentrations of P in the nutrient solution on the yield of 'Lollo Rosso' lettuce

گ

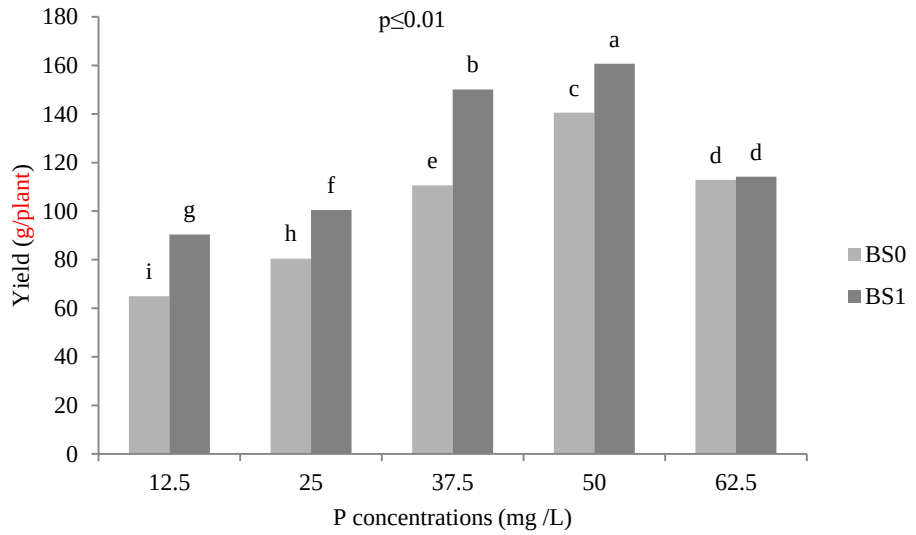
جدول ۳- اثرات متقابل باکتری *Bacillus subtilis* و غلظت‌های مختلف فسفر محلول غذایی بر عملکرد، رنگیزه‌ها و شاخص‌های فتوسنتزی، نسبت فسفر ریشه به ساقه و CFU کاهو لولوروسا

Table3–Interaction effects of *Bacillus subtilis* (BS) and different concentrations of phosphorus (P) in the nutrient solution on pigments and photosynthetic indices, root to shoot phosphorus ratio and colony forming unit (CFU) of 'Lollo Rosso' lettuce

Treatment	Ch a (mg/g)	Ch b (mg/g)	Ch a+b (mg/g)	CAR (mg/g)	Stomatal conductance ($mmol/m^2s$)	Evaporation ($mmol/m^2s$)	P_{root}/P_{shoot}	CFU
BSP								
BS_0P_1	0.053	0.020	0.073	0.002	0.043 ^{e}	1.14	0.94 ^{d}	0.00 ^{c}
BS_0P_2	0.068	0.024	0.092	0.002	0.053 ^{e}	1.86	0.89 ^{d}	0.00 ^{c}
BS_0P_3	0.069	0.041	0.11	0.008	0.093 ^{d}	2.03	0.95 ^{d}	0.00 ^{c}
BS_0P_4	0.076	0.048	0.12	0.016	0.136 ^{c}	2.21	1.27 ^{b}	0.00 ^{c}
BS_0P_5	0.051	0.022	0.073	0.006	0.096 ^{d}	1.95	1.05 ^{c}	0.00 ^{c}
BS_1P_1	0.064	0.035	0.10	0.005	0.100 ^{d}	1.67	0.76 ^{e}	5.79×10^{4} ^{b}
BS_1P_2	0.070	0.044	0.11	0.011	0.116 ^{cd}	1.90	1.47 ^{a}	6.95×10^{4} ^{b}
BS_1P_3	0.073	0.043	0.11	0.011	0.226 ^{b}	2.06	1.47 ^{a}	8.30×10^{4} ^{a}
BS_1P_4	0.081	0.051	0.13	0.016	0.890 ^{a}	2.51	1.41 ^{a}	10.08×10^{4} ^{a}
BS_1P_5	0.068	0.035	0.10	0.008	0.143 ^{c}	2.03	1.27 ^{b}	8.30×10^{4} ^{a}
Significance	Ns	Ns	Ns	Ns	**	Ns	**	*

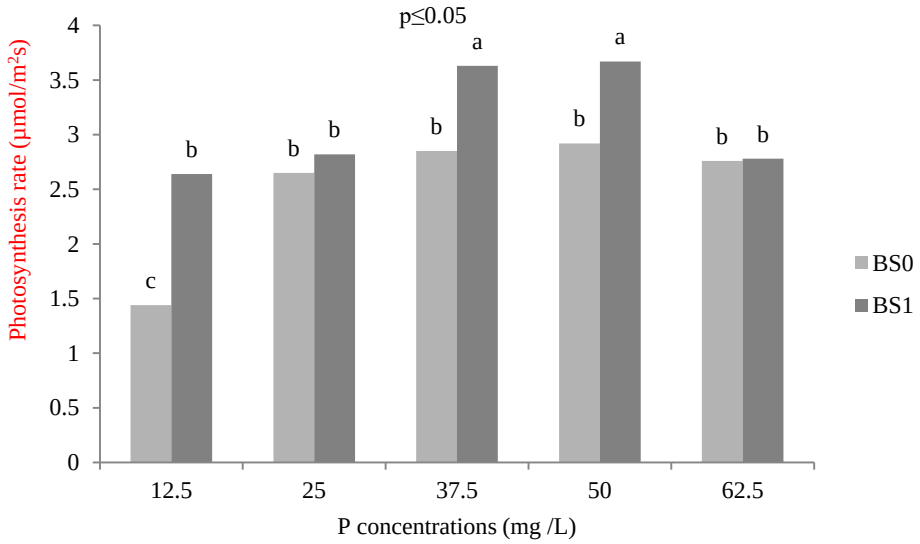
Ns، * و ** به‌ترتیب عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪. ستون‌های با حروف متفاوت بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری داشتند ($p\leq0.05$)

Ns, * and **, Non-significant, significant at 0.05%, 0.01%, respectively. Means followed by a different lowercase letters in a column were significantly different according to Duncan's multiple-range test ($p\leq0.05$).



شکل ۳- اثر متقابل تلقیح باکتری *Bacillus subtilis* و غلظت‌های مختلف فسفر بر عملکرد کاهو لولوروسا (BS_0 = فاقد تلقیح باکتریایی و BS_1= تلقیح شده با باکتری)

Figure 3- Interaction of *Bacillus subtilis* inoculation and different concentrations of phosphorus on yield of 'Lollo Rosso' lettuce (BS_0= without bacterial inoculation and BS_1= inoculated with bacteria)



شکل ۴- اثر متقابل تلقیح باکتری *Bacillus subtilis* و غلظت‌های مختلف فسفر بر نرخ فتوسنتز کاهو لولوروسا (BS_0 = فاقد تلقیح باکتریایی و BS_1= تلقیح شده با باکتری)

Figure 4- Interaction of *Bacillus subtilis* inoculation and different concentrations of phosphorus on photosynthesis rate of 'Lollo Rosso' lettuce (BS_0= without bacterial inoculation and BS_1= inoculated with bacteria)

یافته‌های این پژوهش تاثیر مثبت تلقیح باکتری *B. subtilis* UTB96 بر عملکرد، رنگیزه‌ها و شاخص‌های فتوسنتزی، غلظت فسفر ریشه به ساقه و CFU کاهو لولوروسا رقم کنکورد را نشان داد. *باسیلوس سوبتیلیس* یک باکتری گرم مثبت است که به عنوان PGPR و افزایش-دهنده رشد گیاهی شناخته شده است (Lee and Lee, 2015). یافته‌های قبلی اثرات مثبت باکتری *B. subtilis* در بهبود شرایط رشدی و فیزیولوژیکی گوجه‌فرنگی (Woitke et al., 2004)، بامیه و اسفناج آفریقایی (Adesemoye et al., 2008)، موز (Zhang et al., 2011) و خیار (Garcia-Lopez et al., 2016) را نشان دادند. امروزه *B. subtilis* به عنوان یکی از مهم‌ترین باکتری‌های حل‌کننده فسفات شناخته شده است (Satyaprakash et al., 2017) که می‌تواند سبب افزایش جذب فسفر در گیاهان گردد (Garcia-Lopez et al., 2016). نتایج Sharma (2002) نشان داد که مصرف کودهای زیستی سبب افزایش ماده خشک و زیست توده گیاهان می شود که می‌تواند متاثر از تثبیت بیولوژیک عناصر مورد نیاز گیاه از جمله فسفر و نیتروژن باشد. همچنین یافته‌های Mansoori (2013) نشان داد که کودهای زیستی فسفاته از طریق توسعه ریشه گیاه و تسهیل در جذب آب و عناصر غذایی سبب بهبود عملکرد و شاخص برداشت در گندم می‌شوند. امروزه اثرات مثبت این باکتری‌ها بر عملکرد گیاهان به تاثیر آن‌ها در بهبود رشد ریشه (Rahi, 2016)، افزایش جذب عناصر غذایی مانند فسفر (Turom et al., 2007)، تولید هورمون‌های رشد مانند اکسین و جیبرلین (Ruzzi and Aroca, 2015)، افزایش رنگیزه‌های فتوسنتزی (Rahi, 2016) و حفظ کارایی فتوسنتزی (Wang et al., 2012) نسبت داده می شود. بنابراین مطابق نتایج این پژوهش اثرات مثبت این باکتری بر عملکرد، رنگیزه ها و شاخص های فتوسنتزی می‌تواند به دلیل توانایی آن ها در افزایش جذب فسفر در کاهو لولوروسا باشد که بصورت غیرمستقیم با اثرگذاری بر رشد ریشه و افزایش کارایی فتوسنتزی سبب بهبود ویژگی‌های فوق گردید. نتایج پژوهش Khalafallah et al (1982) در تلقیح گیاهان باقلا با باکتری‌های حل‌کننده فسفات نشان داد که این گیاهان زمانی که ۵۰٪ غلظت کود فسفره قابل‌توصیه را دریافت نمودند در قیاس با غلظت معمول کود فسفره ماده خشک و جذب فسفر یکسانی داشتند. یافته های Lavakush et al (2014) در برنج نیز همین پتانسیل را در تلقیح با باکتری های حل کننده فسفات *Azotobacter chroococcum*، *Azospirillum brasilense* و ترکیب *Pseudomonas spp* مشاهده نمودند. گیاهان برنج تلقیح شده عملکرد مشابهی در ارتفاع گیاه، طول خوشه، تعداد دانه در خوشه و عملکرد دانه هنگام بارور شدن با ۳۰ و ۶۰ کیلوگرم فسفر در هکتار در آزمایش گلخانه‌ای داشتند. نتایج Dutta and Bandyopadhyay (2009) نشان داد که کاهش مصرف کودهای فسفره تا یک سوم، در گیاهان نخود تلقیح شده با باکتری سودوموناس سبب هیچ گونه کاهشی در پارامترهای رشدی گیاه نشد.

در تیمارهای مختلف فسفر و در غیاب باکتری UTB96 *B. subtilis* نیز بهبود عملکرد، رنگیزه‌ها (کلروفیل a، کلروفیل b و کارتنوئید) و شاخص‌های فتوسنتزی (نرخ فتوسنتز و هدایت روزنه ای)، افزایش نسبت فسفر ریشه به ساقه و CFU با افزایش غلظت فسفر محلول غذایی مشاهده گردید. نتایج این آزمایش با یافته‌های Molaie et al. (2020) در کشت هیدروپونیک توت فرنگی مطابقت دارد. نتایج آن‌ها نشان داد که فسفر محلول غذایی یا فسفر محلول پاشی شده با تاثیر بر میزان فشردگی دیواره تیلاکوئید، افزایش غلظت کلروفیل در سطح برگ و شکل ساختمانی برگ به جذب حداکثری نور و بالا رفتن راندمان فتوسنتزی گیاه کمک می‌کند. گزارش آن‌ها نشان داد که فسفر با اثرگذاری بر تولید و انتقال کربوهیدرات ها، افزایش تعداد و اندازه سلول و افزایش سطح برگ سهم بسزایی را در افزایش رشد، وزن تر برگ و عملکرد گیاهان توت فرنگی داشته است. رشد گونه های گیاهی متاثر از جذب عناصر و انباشتن مواد غذایی حاصل از فتوسنتز

می‌باشد که با حفظ پتانسیل آب گیاه سبب طویل‌شدن سلول‌ها می شود (Mathur, and Bhagsari, 1983). یافته‌های پژوهشگران مختلف نشان می‌دهد که تامین مقادیر کافی فسفر سبب بهبود گسترش ریشه و رشد گیاهان می شود، با افزایش رشد ریشه گیاهان قادر هستند تا حجم بیشتری از بسترهای کشت (مانند کوکوپیت، پرلیت، پومیس و غیره) را به منظور جذب رطوبت و عناصر غذایی استفاده کنند که نهایتاً منجر به افزایش کارایی جذب و استفاده عناصر غذایی می‌گردد (Molaie et al., 2020 ; Bukvić et al., 2003). همچنین یافته‌های Shabani et al. (2018) در گیاه ریحان نشان داد که دسترسی ارتوفسفات می‌تواند در تیمارهای فسفری از طریق اسیدی‌کردن ریزوسفر توسط جریان H^+ و ترشح اسیدهای آلی افزایش یابد. بنابراین به نظر می‌رسد که در پژوهش حاضر افزایش جذب فسفر تاثیر بسزایی را در افزایش کارایی فتوسنتزی و عملکرد کاهو لولوروسا داشته است.

اثر متقابل تلقیح باکتریایی و غلظت‌های مختلف فسفر محلول غذایی نشان داد که اگرچه افزایش غلظت فسفر سبب افزایش خطی عملکرد، شاخص‌های فتوسنتزی و فسفر جذب شده توسط ریشه و ساقه کاهو می‌گردد ولی تلقیح باکتری *B. subtilis* UTB96 مقادیر بالاتری از رشد، فتوسنتز و جذب فسفر را به نمایش گذاشت. تحقیقات Ratti et al (2001) نشان داد که کاربرد باکتری‌های حل-کننده فسفات ارتفاع بوته علف لیمو (*Cymbopogon martini*) را در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. گزارش های قبلی نشان داد که تلقیح گیاهان با PGPR جدید می‌تواند جذب فسفر را بهبود بخشد (Granada et al., 2018). پژوهش‌های Rudresh et al. (2005) در گیاه نخود نشان داد که گیاهان تلقیح شده با Rhizobium sp. و Bacillus sp. عملکرد دانه بالاتر (دو برابر) و محتوای فسفر بالاتر (چهار برابر) داشتند. پژوهشگران دیگر افزایش ۱۹/۸ درصدی عملکرد دانهٔ ذرت را بر اثر استفاده از کودهای زیستی مشاهده کردند (Trolore et al., 2003). آن‌ها ترشح هورمون‌های تحریک‌کنندهٔ رشد مانند اکسین و جیبرلین توسط باکتری‌های موجود در کودهای زیستی را دلیل این امر گزارش کرده اند. رهاکردن تدریجی یون فسفات توسط باکتری‌ها سبب توسعه مناسب ریشه می-گردد که نهایتاً منتج به بهبود جذب عناصر غذایی از جمله فسفر و بهبود استفاده از رطوبت قسمت‌های مختلف بستر می شود (El- Kholy et al., 2005). این باکتری‌ها از ترشحات ریشه در منطقه ریزوسفر استفاده کرده و با تغییر pHو یا ترشح آنزیم‌ها، دسترسی فسفر ریشه گیاهان را افزایش می‌دهند. یافته‌های Mansoori (2013) در کاربرد کود زیستی در گندم نشان دادکه مصرف ۶۰ کیلوگرم در هکتار کود فسفره بیشترین تعداد دانه در سنبله را به همراه داشت که به دلیل تاثیر مثبت کود زیستی در جذب مواد غذایی و فراهمی فسفر و نیتروژن در گیاه بوده است. پژوهشگران اعلام کردند که کاربرد باکتری‌های محرک رشد ضمن کاهش میزان مصرف و افزایش کارایی کودهای شیمیایی، سبب افزایش رشد گیاهان می شود (Mansoori, 2013؛ Rodriguez and Fraga, 2009). نتایج Sanhita-gupta (2004) در گوجه‌فرنگی نشان داد که تلقیح بذرها با باکتری ریزوباکتر سبب افزایش رشد و عملکرد گیاهان تیمار شده گردید. این نتایج ثابت نمود که باکتری‌ها علاوه بر افزایش فراهمی عناصر معدنی خاک، از طریق تثبیت زیستی نیتروژن و محلول کردن فسفر خاک، مهار عوامل بیماری‌زا و تولید مواد تنظیم کننده رشد، عملکرد گیاهان را تحت تاثیر قرار می‌دهند. در مطالعه حاضر در تیمارهای بدون تلقیح باکتریایی و غلظت پایین فسفر، کم‌ترین نرخ فتوسنتز و به تبع آن پایین‌ترین میزان عملکرد مشاهده گردید (شکل ۳ و۴) که احتمالاً به دلیل تنش ناشی از کمبود فسفر و بسته شدن روزنه‌ها باشد؛ به گونه ای که گیاهان فاقد تیمار باکتریایی در سطوح پایین فسفر، کمترین میزان هدایت روزنه‌ای را داشتند (جدول ۳).

نتایج این آزمایش نشان داد که تلقیح گیاهان کاهو

لولوروسا علاوه بر افزایش رشد و جذب فسفر، بر بهبود جمعیت باکتری‌های محیط ریزوسفر بسترهای مورد استفاده نیز نقش داشته است. به گونه‌ای که بالاترین میزان CFU در گیاهان تلقیح شده و غلظت ۳۷/۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر فسفر (BS_1P_3 و BS_1P_4) مشاهده گردید. با افزایش غلظت فسفر در محلول غذایی تفاوت معنی‌داری بین نرخ فتوسنتز، نسبت فسفر ریشه به ساقه و CFU سطوح ۳۷/۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر فسفر مشاهده نگردید. اگرچه تاکنون مدارک قوی مبنی بر مکانیسم اثرگذاری مستقیم باکتری‌ها بر فتوسنتز گیاهان توسط پژوهشگران ارائه نشده است، ولی می‌توان احتمال داد که افزایش عملکرد، نرخ فتوسنتز، هدایت روزنه ای، غلظت فسفر ریشه و ساقه متاثر از نقش این باکتری‌ها در افزایش جذب فسفر و تاثیر غیرمستقیم این عنصر بر مکانیسم‌های توسعه ریشه، رشد رویشی و فتوسنتز باشد. جمعیت باکتری مطابق انتظار در تیمارهای باکتریایی با افزایش غلظت فسفر افزایش یافت که می‌تواند یکی از دلایل افزایش جذب فسفر و نسبت فسفر ریشه به ساقه در گیاه کاهو لولوروسا باشد. در این راستا Gyaneshwar et al (2002) اظهار داشتند که میکرواگانیسم‌های حل‌کننده فسفات با استفاده از آنزیم فسفاتاز و ترشح اسیدهای آلی باعث افزایش حلالیت و جذب فسفر توسط گیاه می‌شوند که در نهایت سبب رشد اندام‌های گیاه می شود. نتایج مشابه با این آزمایش توسط Turom et al (2007) در گوجه فرنگی گزارش گردید. یافته‌های آن ها نشان داد که استفاده از باکتری‌های حل‌کننده فسفات همراه با کودهای فسفره سبب افزایش رشد و جذب عناصر از جمله فسفر در گوجه فرنگی می گردد. همچنین نتایج Idriss et al. (2002) نشان داد که سویه‌های مختلف باکتری *Bacillus* با فعالیت فیتازی بیرون‌سلولی سبب افزایش جذب فسفر می‌شوند. اگرچه این یافته ها در کشت‌های بدون خاک ثابت نشده است و نیاز به مطالعات بعدی دارد. مطالعه Kalayu (2019) نشان داد که باکتری‌های حل‌کننده فسفات از طریق سه مکانیسم باعث بهبود رشد ریشه، جذب فسفر، کارایی فتوسنتزی و عملکرد گیاهان می شوند. این مکانیسم‌ها شامل: ۱- کاهش pH بستر ۲- کلاته کردن (Chelation) و ۳- معدنی کردن (Mineralization) می باشد. در مکانیسم اول ریشه گیاهان تلقیح شده با ترشح اسیدهای آلی سبب افزایش اسیدیته بستر و جذب عناصر غذایی می گردد. این اسیدهای آلی محصولات متابولیسم میکروبی هستند که بیشتر با تنش اکسیداتیو یا با استفاده از تخمیر زمانی که گلوکز به عنوان منبع کربن استفاده می شود، تولید می‌گردند. اسیدهای آلی که فسفات‌ها را حل می کنند در درجه اول اسیدهای سیتریک، لاکتیک، گلوکونیک، ۲-کتوگلوکونیک، اگزالیک، گلیکونیک، استیک، مالیک، فوماریک، سوکسینیک، تارتاریک، مالونیک، گلوتاریک، پروپیونیک، بوتیریک، گلی اکسالیک و اسید آدیپیک هستند. به نظر می‌رسد اسید گلوکونیک و اسیدهای ۲-کتوگلوکونیک بیشترین عامل حل شدن مواد معدنی فسفات هستند (Kalayu, 2019). در مکانیسم دوم که بیشتر در کشت‌های خاکی دیده می شود اسیدهایی مانند کتوگلوکونیک با کلات کردن اکسیدهای آهن و آلومینیوم باعث تثبیت آن‌ها می شوند. از طرفی دیگر این گزارش نشان می‌دهد که این باکتری‌ها با تولید اسیدهای معدنی مانند نیتریک، سولفوریک و اسید کربنیک با فسفات کلسیم واکنش نشان می‌دهند و آن‌ها را به فرم‌های محلول تبدیل می‌کنند (Kalayu, 2019). در مکانیسم سوم باکتری‌ها فسفرهای آلی موجود در بقایای گیاهی و حیوانی مانند فسفر موجود در نوکلئیک اسید، فسفولیپیدها، اسید فیتیک، پلی فسفات و فسفونات‌ها را از طریق فرآیند معدنی‌سازی به شکل قابل استفاده تبدیل می‌کنند. (Kalayu, 2019). با توجه به ماهیت کشت بدون خاک، بنابراین به نظر می‌رسد که مکانیسم‌های کلاته کردن و معدنی کردن نقش کمتری را نسبت به مکانیسم کاهش pH بستر (از طریق ترشح اسیدهای آلی) در جذب فسفر کاهوهای لولوروسا داشتند. اگرچه برای پاسخ به این سوالات به پژوهش‌های جامعی درباره نقش این باکتری در

ترشحات ریشه و فعالیت‌های آنزیمی مرتبط با جذب فسفر در کشت بدون خاک، نیاز می باشد که ما را برای تحقیقات آتی تشویق می نماید. با توجه به موارد گفته شده بـه نظـر می‌رسد که بـاکتری *B. subtilis* UTB96 و فسـفر محلـول غذایی با اثر هم‌افزایی در ترشح اسیدهای آلـی ریشـه، آزاد سازی پروتون و کاهش pH بستر، بهبود رشد ریشه و تاثیر احتمالی بر ترشح آنزیم فیتاز و فسفاتاز نقش بسزایی را در افزایش عملکرد، بهبود شاخص‌های فتوسـنتزی و افـزایش جذب عناصرغذایی مانند فسفر در کاهو لولوروسا داشتند.

نتیجه گیری کلی

یافته‌های این پژوهش نشان داد که اسـتفاده از بـاکتری *B. subtilis* UTB96 در تیمارهای مختلـف فسـفری سـبب بهبود عملکرد، شاخص‌های فتوسنتزی و جـذب فسـفر در گیاه کاهو لولوروسا می‌گردد. همچنـین نتـایج ایـن مطالعـه نشان داد که با بهره گیری از ریزوباکترهـای محـرک رشـد گیاه نه‌تنها می تـوان سـبب افـزایش عملکـرد محصـولات گلخانه‌ای در شرایط کشت بدون‌خاک شد بلکه می‌توان بـا کاهش ۲۵ درصدی مصرف کودهای فسفره نتایج مشابه بـا تیمارهای استاندارد را هم انتظار داشت. بنابراین این یافته‌ها گام موثری در کاهش مصرف کودهای گران قیمت فسـفره و کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطـی و کمـک بـه توسـعه کشـاورزی پایـدار مـی باشـد. اگرچـه در ایـن پـژوهش شـاخص‌هـای رشـدی، فتوسـنتزی و فیزیولـوژیکی کـاهو لولوروسا مورد بررسی قرار گرفتـه اسـت ولـی نتـایج ایـن آزمایش موید این است که جهت درک بهتر و جامع درباره مکانیسم‌های موثر در بهبود جـذب عناصـر، ارتقـا رشـد و عملکرد به مطالعـات عمیـق در محـیط ریزوسـفر و سـطح سلولی ملکولی گیاه نیاز است.

سپاسگزاری

هزینه اجرای این طرح از محل اعتبارات پژوهانه واحد پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهـواز تـامین شـده اسـت. همچنین از شرکت بایوران به منظـور تـامین کـود زیسـتی *Bacillus subtilis* UTB96 و شـرکت سـپاهان رویـش اصفهان به منظور تامین بذر این آزمـایش تقـدیر و سـپاس به‌عمل می‌آید.

منابع

Adesemoye, A.O., M. Obini, and E. Ugoji. 2008. Comparison of plant growth-promotion with Pseudomonas aeruginosa and Bacillus subtilis in three vegetables. Brazilian Journal of Microbiology. 39(3): 423-426.

Bukvić, G., M. Antunović, S. Popović, and M. Rastija. 2003. Effect of P and Zn fertilization on biomass yield and its uptake by maize lines (*Zea mays* L.). Plant Soil Environment. 49: 505-510.

Carter G.A. and A.K. Knapp. 2001. Leaf optical properties in highest plants: linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. American Journal of Botany. 88(4): 677-684.

Choudhary, D.K., K.P. Sharma, and R.K. Gaur. 2011. Biotechnological perspectives of microbes in agro-ecosystems. Biotechnology letters. 33: 1905–1910.

Cordell, D., J.O. Drangert, and S. White. 2009. The story of phosphorus: global food security and food for thought. Global Environmental Change 19(2): 292-305.

Dey, R., K.K. Pal, D.M. Bhatt, S.M. Chauhan. 2004. Growth promotion and yield enhancement of peanut (*Arachis hypogeal* L.) by application of plant growth-promoting rhizobacteria. Microbiological Research. 159: 371–394.

Draghici, E.M., E., Dobrin, I.O. Jerca, I.M.B.S. Jurcoane, and L. Viorica. 2016. Organic fertilizer effect on Lettuce (*Lactuca sativa* L.) cultivated in nutrient film technology. Romanian Biotechnological Letters. 21(5): 11905-11913.

Dutta, D. and P. Bandyopadhyay. 2009. Performance of chickpea (*Cicer arietinum* L.) to application of phosphorus and bio-fertilizer in laterite soil. Archives Agronomy and Soil Science. 55: 147–155.

El- Kholy, M.A., S.E. Ashly, and A.M. Gomaa. 2005. Biofertilizer of maize crop and its impact on yield and grain nutrient under low rates of mineral fertilizers. Journal of Applied Science Research. 2:117-121.

Garcia-Lopez, A.M. and A. Delgado. 2016. Effect of *Bacillus subtilis* on phosphorus uptake by cucumber as affected by iron oxide and the solubility of the phosphorus source. Agricultural and Food Science 25: 216-224.

Granada, C.E., L.M.P. Passaglia, E.M. de Souza, and R.A. Sperotto. 2018. Is Phosphate Solubilization the Forgotten Child of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria? Frontiers in Microbiology. 9: 307-310.

Gyaneshwar, P., N. Kumar, L.J. Parekh and P. S. Poole. 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. Plant and Soil. 245:83-93.

Idriss, E.E., O. Makarewicz, A. Farouk, K. Rosner, R. Greiner, H. Bochow, T. Richter, and R. Borriss. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effectaaThe GenBank accession numbers for the sequences determined in this work are AY055219 to AY055226. Microbiology 148 (7): 2097-2109.

Kalayu, G. 2019. Phosphate solubilizing microorganisms: promising approach as biofertilizers. International Journal of Agronomy 1-7.

Khalafallah, M.A., M.S.M. Saber, and H.K. Abd-El-Maksoun. 1982. Influence of phosphate dissolving bacteria on the efficiency of superphosphate in a calcareous soil cultivated with *Vicia faba*. Zeitschrift fur Pflanzenernahrung und. Bodenkunde. 145 (5): 455–459.

Khaseh Sirjani, A. 2011. Evaluation of biological fertilizer containing phosphorus soluble bacteria and enriched organic fertilizers in wheat cultivation. Journal of Soil Research (Soil and Water Sciences). 25 (3): 224-217.

Kokalis-Burelle, N. 2003. Effects of transplant type, plant growth-promoting rhizobacteria, and soil treatment on growth and yield of strawberry in Florida. Plant Soil 256: 273–280.

Lavakush Y.J., J.P. Verma, D.K. Jaiswal and A. Kumar. 2014. Evaluation of PGPR and different concentration of phosphorus level on plant growth, yield and nutrient content of rice (*Oryza sativa*). Ecological Engineering. 62: 123–128.

Lee, S. and J. Lee. 2015. Beneficial bacteria and fungi in hydroponic systems: Types and characteristics of hydroponic food production methods. Scientia Horticulturae. 195: 206-215.

Lichtenthaler, H.K. and C. Buschmann. 2001. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Unit F4.3.1-F4.3.8.

Mansoori, A. 2013. Investigation of the promising line N8119 of wheat to the application of phosphate biofertilizer. Journal of Crop Improvement. 15 (1): 134-125.

Mathur, D.D. and A.S. Bhagsari. 1983. Effect of photosynthetically radiation, temperature and antitranspirants on photosynthesis and respiration of leather lefern. Horticulture Science. 18: 189-191.

Mitter, B., A. Petric, M.W. Shin, P.S.G. Chain, L. Hauberg-Lotte, B. Reinhold-Hurek, J. Nowak, A. Sessitsch. 2013. Comparative genome analysis of *Burkholderia phytofirmans* PsJN reveals a wide spectrum of endophytic lifestyles based on interaction strategies with host plants. Frontiers of Plant Science. 4: 120.

Molaie, M., S. Tabatabaei, and Y. Sharafi. 2020. Effect of spray and solution application of phosphorus on growth, yield and quality of strawberry in hydroponic cultivation. Horticultural Plants Nutrition. 3 (2): 107-116.

Osdaghi, E., S.M. Taghavi, H. Hamzehzarghani, A. Fazliarab, R.M. Harveson, S. Tegli, and J.R. Lamichhane. 2018. Epiphytic *Curtobacterium flaccumfaciens* strains isolated from symptomless solanaceous vegetables are pathogenic on leguminous but not on solanaceous plants. Plant Pathology: 67(2): 388-398.

Rahi, A. 2016. Effect of Supernitroplas and Biosuprophosphate Biofertilizers on Morphological and Physiological Traits of Basil (*Ocimum basilicum* L.). Science and Technology of Greenhouse Cultivation. 7 (26): 135-125.

Ratti, N., S. Kumar. H.N. Verma, and S.P. Gautams. 2001. Improvement in bioavailability of tricalcium phosphate to *Cymbopogon martini* by rhizobacteria, AMF and azospirillum inoculation. Microbiology Research. 156: 145-147.

Recena, R., J. Torrent, M.C. del Campillo, and A. Delgado. 2015. Accuracy of Olsen P to assess plant P uptake in relation to soil properties and P forms. Agronomy for Sustainable Development. 35 (4): 1571-1579.

Resh, H.A. 2012. *Hydroponic food production: a definitive guidebook for the advanced home gardener and the commercial hydroponic grower*. CRC Press.

Rodriguez H. and R. Fraga. 2009. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances. 17: 319-339.

Romani, A., P. Pinelli, C. Galardi, G. Sani, A. Cimato, and D. Heimler. 2002. Polyphones in Greenhouse and Open-air-grown lettuce. Food Chemistry. 79: 337–342.

Rudresh, D.L., M.K. Shivaprakash, and R.D. Prasad. 2005 Effect of combined application of Rhizobium, phosphate solubilizing bacterium and Trichoderma spp. On growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). Applied Soil Ecology. 28: 139–146.

Ruzzi, M., and R. Aroca. 2015. Plant growth-promoting rhizobacteria act as biostimulants in horticulture. Scientia Horticulturae. 196: 124-134.

Sanhita-gupta D., K. Dilp, and K. Srivasta. 2004. Growth promotion of tomato plants by rhizobacteria and imposition of energy stress on *Rhizoctonia solani*. Soil Biology Biochemistry. 27: 1051-1058.

Satyaprakash, M., T. Nikitha, E.U.B. Reddi, B. Sadhana, and S.S. Vani. 2017. A review on phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition. International Journal of Current Microbiology and Applied Scences. 6: 2133–2144.

Sharma, A.K. 2002. *Biofertilizers for Sustainable Agriculture*. Agrobios, India. 407 p

Shabani. E., S. Bolandnazar, S.J. Tabatabaei, N. Najafi, S. Alizadeh-Salteh, and Y. Rouphael. 2018. Stimulation in the movement and uptake of phosphorus in response to magnetic P solution and arbuscular mycorrhizal fungi in Ocimum basilicum. Journal of Plant Nutrition. 41 (13): 1662-1673. doi.org/10.1080/01904167.2018.1458872.

Smil, V. 2000. *Feeding the World: A Challenge for the 21st Century*. The MIT Press, Cambridge.

Tabatabaei, S.J. 2013. *Principles of mineral Nutrition Plant*. University of Tabriz press. Tabriz, Iran.

Trolore. S.N., M.J. Hedley, N. Kirk, S. Bolan, and P. Loganathan. 2003. Changes in phosphorous fractions, pH, and phosphates activity in rhizosphere of two rice genotypes. Australian Journal of Soil Research. 41: 471-499.

Turom, M., N. Ataglu, and F. Sahni. 2007. Effect of bacillus FS-3 on growth of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants and availability of phosphorus in soil. Plant, Soil and Environment. 53(2): 58-64.

Wang, C.J., W. Yang, C. Wang, C. Gu, D.D. Niu, H.X. Liu, Y.P. Wang, and J.H. Guo. 2012. Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting *Rhizobacterium* strains. PLoS One. 7: 1–10.

Woitke, M., H. Junge, and W.H. Schnitzler. 2004. *Bacillus subtilis* as growth promoter in hydroponically grown tomatoes under saline conditions. In VII International Symposium on Protected Cultivation in Mild Winter Climates: Production, Pest Management and Global Competition. 363-369.

Zhang, N., K. Wu, X. He, S. Li, Z. Zhang, B. Shen, X. Yang, R. Zhang, Q. Huang, and Q. Shen. 2011. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization with *Bacillus subtilis* N11.Plant Soil. 344: (1-2).