

ارزیابی توانایی پانزده جدایه از قارچ‌های میکوریز مانند درون‌زی در رهاسازی فسفر از کانی فسفریت در کشتگاه آبکی

نساء احدی^{۱*}، علی اکبر صفری سنجانی^۲، راحله سادات آل طه^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۲۶)

(تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۴)

چکیده

پس از نیتروژن، فسفر پرکاربردترین عنصر برای رشد زایشی و رویشی گیاه بوده و در فرآیندهای زیستی جانداران کارایی ویژه دارد. هر چند فراوانی فسفر در خاک‌ها بالا بوده ولی ریخت‌فراهم آن برای گیاه بسیار ناچیز است. بنابراین بهره‌گیری از شیوه‌های زیستی برای افزایش زیست‌فراهمی آن بسیار سودمند است. در این پژوهش از ۱۵ جدایه قارچ‌های درون‌زی میکوریزمانند، برای افزایش گشایش فسفر از کانی فسفریت (پنج گرم بر لیتر) در دو کشتگاه بهبود یافته پیکووسکایا با دو اندازه از خاستگاه کربن (گلوکز یک و هفت درصد) در چهار زمان و در سه تکرار استفاده شد. بررسی داده‌ها نشان داد که رهاسازی فسفر و کلسیم با کاهش pH کشتگاه آبکی همراه بوده و قارچ‌ها کارکرد بیش‌تری در کشتگاه دارای گلوکز هفت درصد داشته‌اند. هر ۱۵ جدایه قارچ‌ها توان رهاسازی فسفر را داشته‌اند ولی بیش‌ترین اندازه رهاسازی فسفر به‌ترتیب با گونه‌های *Aspergillus terreus*، *Aspergillus calidoustus*، *Alternaria consortialis* و *Alternaria botrytis* در غلظت هفت درصد گلوکز به‌دست آمد که به‌ترتیب در روز سی‌ام نمونه‌برداری برابر ۳۳۹/۵۶، ۳۳۴/۱۹، ۳۳۵/۶۱ و ۳۳۴/۶۷ میلی گرم بر لیتر بود. هم‌چنین بیش‌ترین اندازه کلسیم آزادشده در کشتگاه با گلوکز هفت درصد در تیمارهای *Aspergillus terreus* و *Aspergillus calidoustus* به‌ترتیب ۴۲۳/۳۶ و ۴۰۳/۳۶ میلی گرم بر لیتر به‌دست آمد. ولی بیش‌ترین رسانندگی الکتریکی در کشتگاه با هفت درصد گلوکز نیز در کشت *Alternaria botrytis* به‌دست آمد که در روز سی‌ام برابر با ۳/۰۱ دسی‌زیمنس بر متر بود. در کشت همه قارچ‌ها اندازه کلسیم محلول و رسانندگی الکتریکی کشتگاه در بازه ۳۰ روزه روند افزایشی داشت. کم‌ترین اندازه فسفر درون هیف قارچ‌ها در کشتگاه هفت درصد به‌ترتیب در تیمارهای *Alternaria consortialis* و *Giberlla thapsina* بود. این پژوهش نشان از شیوه‌های گوناگون قارچ‌های کارای میکوریزمانند و درون‌زی در گشایش کانی‌ها و افزایش زیست‌فراهمی عناصر خوراکی گیاه در خاک داشته که می‌توانند در ساخت کودهای زیستی استفاده شوند.

واژه‌های کلیدی: فسفر کانی، قارچ‌های اندوفیت، کودهای بیولوژیک، میکوریزمانند

احدی ن.، صفری سنجانی الف ع.، آل طه ر. ۱۴۰۰. ارزیابی توانایی پانزده جدایه از قارچ‌های میکوریزمانند درون‌زی در رهاسازی فسفر از کانی فسفریت در کشتگاه آبکی. تحقیقات کاربردی خاک. جلد ۹، شماره ۲. صفحه: ۸۷-۱۰۱.

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۲- استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

۳- دانش‌آموخته دکتری گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا

* پست الکترونیک: nesaahadi1993@gmail.com

مقدمه

فسفر پس از نیتروژن پرکاربردترین عنصر برای گیاه است. فسفر در فرآیندهایی مانند فتوسنتز، ساخت انرژی، ساخت قند و تجزیه آن، هم‌چنین در بخش سازنده زیست مولکول‌هایی مانند اسیدهای هسته‌ای، کوآنزیم‌ها، فسفوپروتئین‌ها و فسفولیپیدها کاربرد دارد. در ترابری ویژگی‌های ژنتیکی و فرآیند سوخت و ساز جانداران کارایی ویژه دارد (Jahandideh *et al.*, 2019). فسفر در خاک‌ها به دو ریخت آلی و کانی بوده که اندازه آن‌ها در خاک‌های گوناگون ناهم‌بند بوده (Khan *et al.*, 2007) و بستگی به کانی‌ها و دانه‌بندی خاک دارد (Sharma *et al.*, 2011). دسترسی این عنصر خوراکی برای گیاهان به‌ویژه در خاک‌های خشک و نیمه‌خشک بسته به واکنش‌های شیمیایی آن اندک است. نافرهم بودن فسفر در خاک‌ها می‌تواند وابسته به ساخت هم‌تافته‌هایی با آهن و آلومینیوم در خاک‌های اسیدی و هم‌چنین هم‌تافته‌هایی با کلسیم در خاک‌های قلیایی باشد (Hao *et al.*, 2002). از این‌رو، کشاورزان برای بهبود باروری خاک و برداشت بیشینه محصول، به گونه‌ای پیوسته کودهای شیمیایی فسفوری بکار می‌برند (Novais & Smith, 1999) که در آن‌ها فیتات و ارتوفسفات ریخت فسفر می‌باشد. راندمان بازیابی و بهره‌گیری گیاهان از کودهای فسفوری بسیار ناچیز است (Ezawa *et al.*, 2002). بنابراین در دسترس بودن این عنصر برای گیاهان چالشی بزرگ است، زیرا بازیابی فسفر داده شده به خاک‌ها کار ساده‌ای نیست. فسفر کودها به‌گونه برگشت‌ناپذیری بر رویه دانه‌های خاک واکنش داده و با گذشت زمان برای گیاهان نافرهم می‌شود (Novais & Smith, 1999). با کمبود فسفوری که در بیش‌تر زمین‌های کشاورزی دیده می‌شود، نیاز به شناخت یک شیوه کارا در بازیابی فسفر برای کاهش کمبود فسفر است. شیوه‌های زیستی در راستای کشاورزی پایدار و بهداشت آب، خاک و جانداران است. در کنار نگرش زیستی، ساخت این کودها و کاربرد آن‌ها در کشاورزی باید سودآوری نیز داشته باشد (Vassilev *et al.*, 2006). در این راستا باید کاربرد کودهای شیمیایی فسفوری در زمین‌های کشاورزی و باغی به کم‌ترین اندازه خود رسیده و در برابر آن بهره‌گیری از شیوه‌های زیستی و کودهای آلی روز به روز افزایش یابد (Gaind, 2016). در دو دهه

گذشته بهره‌گیری از ریزجانداران سودمند برای کاهش نیاز گیاه به عناصر غذایی و برای بهبود ریزوسفر نگاه پژوهشگران را به سوی خود کشانده است (Sarikhani *et al.*, 2013). از این سو بهره‌گیری از ریزجانداران خاکزی با توان بازیابی فسفر خاک امیدوارکننده است (Manske *et al.*, 2001). از میان ریزجانداران گوناگون خاک، باکتری‌ها، قارچ‌ها و اکتینومیست‌ها که توان رهاسازی فسفات^۱ را دارند (Sheng, 2005)، قارچ‌ها بسته به توانایی آن‌ها در ساخت فرآورده‌های گسترده‌ای چون مواد کلاته‌کننده، اسیدهای آلی و ساخت هیف و دسترسی بهتر به خاک و هم‌چنین پایداری بیش‌تر آن‌ها در برابر تنش‌های زیستگاه بیش‌تر نگاه پژوهشگران را به سوی خود کشیده است (Gaind, 2016). اسیدهای آلی می‌توانند فسفر خاک را با واکنش‌های تبادل لیگاندی و یا با کلاته کردن فلزها و گشودن کانی‌های فسفات‌ها رها کنند (Bolan *et al.*, 1994). کارایی یک اسید آلی برای گشودن کانی به ویژگی‌های شیمیایی آن اسید مانند فراوانی گروه‌های کربوکسیل و جایگاه گروه‌های هیدروکسیل، ثابت پایداری کمپلکس اسید آلی-فلز، غلظت اسید، غلظت و گونه فلزها در محلول و pH محلول، بستگی دارد (Whitelaw, 1999). از میان قارچ‌های گوناگون دسته‌ای از قارچ‌ها که بدون هیچ نشانه بیماری در گیاه، بافت آن را آلوده می‌کنند، اندوفیت (درون‌زی) نامگذاری شده‌اند. این قارچ‌ها همه‌جازی بوده و در همه گروه‌های گیاهی دیده می‌شود (Aletaha *et al.*, 2018). برهم‌کنش همیاری قارچ‌های درون‌زی می‌تواند مایه بهبود رشد گیاه، بردباری آن در برابر تنش‌های زیستگاه، افزایش پایداری گیاه، جلوگیری از بیماری و فراهم نمودن عناصر خوراکی برای گیاه باشد. از این توانایی‌ها برای افزایش ریخت‌های فراهم عنصرهای خوراکی هم‌چون فسفر و نیتروژن و پتاسیم در پژوهش‌های گوناگون بهره‌گیری شده است (Fadhl & Al-Barrow, 2016). در پژوهش بارو و اوسانا (Osana, 2002) پس از مایه‌زنی قارچ‌های درون‌زی به خاک دیده شد که ریشه‌های دارای قارچ توان بهره‌گیری از فسفر سنگ فسفات و تری‌کلسیم فسفات درون خاک را دارند. قارچ بکاررفته نه تنها فسفر گیاه را افزایش داد، مایه افزایش وزن اندام هوایی و ریشه گیاه نیز شد. آن‌ها هیف‌های بسیار ریز و نازک قارچ‌های درون‌زی دیواره

1. P solubilizing microorganisms, PSMs

پیکووسکایا^۱ حاوی کانی سنگ فسفات (RP, 35% P₂O₅) به اندازه‌ی پنج گرم بر لیتر، در پتری‌دیش سترون بکار رفت و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس برای هفت روز خوابانیده شد. پس از آن کلنی‌های قارچی که بهترین هاله روشن را پیرامون پرگنه خود نشان دادند، کاراترین قارچ‌ها در گشودن کانی فسفری بوده و برای آزمایش کمی گزینش شدند.

بر این پایه از میان ۳۰ جدایه قارچی، ۱۵ جدایه *Acromonium sp.*^۲، *Acromonium sp.*^۱، *Alternaria consortialis*، *Alternaria botrytis sp.*^۳، *Aspergillus calidoustus*، *Aschochyta caulina*، *Curvularia spicifera*، *Aspergillus terreus*، *Fusarium brachygibbosum*، *Curvularia spicifera*، *Gibberella*، *Fusarium sp.*، *Fusarium solani* و *Penicilium sp.* گزینش شد.

نیاز به یادآوری است که در پژوهش‌های پیشین بیماری‌زایی این قارچ‌ها بررسی شده (Aletaha et al., 2018) و هیچ یک از جدایه‌های آزمون شده بیماری‌زا نیستند.

آزمون کمی توان گشایش فسفات قارچ‌ها

برای سنجش کمی توان جدایه‌های گزینش شده از کشتگاه آبکی پیکووسکایا در دو غلظت گلوکز یک و هفت درصد بهره‌گیری شد (جدول ۱). در این پژوهش در کشتگاه بکار رفته بجای پنج گرم بر لیتر تری‌کلسیم فسفات از همان اندازه خاک فسفات خرید شده از مجتمع فسفات اسفوردی استان یزد بهره‌گیری شد. پس از سترون کردن کشتگاه در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس برای ۱۵ دقیقه، برای مایه‌زنی از میسیلیوم‌های جوان هر یک از ۱۵ جنس قارچ به‌گزین شده در گام پیشین که در کشتگاه PDA رشد یافته‌اند، به اندازه ۰/۵ در ۰/۵ سانتی‌متر در کشتگاه آبکی (پیکووسکایا) بهره‌گیری شد. هر تیمار در سه تکرار مایه‌زنی و آزمایش شد، سپس ۹۰ نمونه آزمایشی همراه با شش نمونه‌ی گواه (کشتگاه بدون مایه‌زنی قارچ) برای ۳۰ روز در تاریکی در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شد. در زمان‌های پنج، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روز نگهداری زیرنمونه‌هایی از کشتگاه پیکووسکایا برای آزمایش برداشت شد. در این گام برخی از ویژگی‌های

تاریک^۱ در خاک برای انجام این فرآیند را کارا دانستند. در پژوهش دیگری جداسازی قارچ دیواره تاریک از گیاه کارکس (*Carex*) و مایه‌زنی آن به همان گیاه، مایه افزایش فسفر شاخساره گیاه شد (Haselwandter & Read, 1982). جامپونن (Jumpponen, 2001)، نیز گزارش داد مایه‌زنی قارچ دیواره تاریک به گیاه کاج مایه افزایش فسفر آن می‌شود. قارچ‌های دیواره تاریک دسته‌ای از قارچ‌های اندوفیت هستند که دارای هیف‌های ویژه می‌باشند که در کشت درون آگار کلنی‌های تیره‌ای می‌سازند. این قارچ‌ها می‌توانند درون و برون از ریشه‌های گیاه رشد کنند و کلنی بسازند (Diene et al., 2013; Knapp et al., 2015). هیف‌های این قارچ‌ها دارای دیواره سفت کیتینی و ملانینی است که این آمیزه‌ها، بویژه ملانین‌ها زنده‌مانی و کارایی این قارچ‌ها را برابر دشواری‌های زیستگاه و به‌ویژه خشکی افزایش می‌دهد (Barrow & Aaltonen, 2001). قارچ‌های آزمون شده در این پژوهش میکوریزمانندهایی هستند که در بسیاری از فرآیندها مانند قارچ‌های میکوریزی هستند. این گونه قارچ‌ها هم توان زندگی اندوفیتی و هم توان زندگی ساپروفیتی دارند. بنابراین می‌توانند هم در خاک و هم درون گیاه سودمند باشند. در این پژوهش توان آن‌ها در رهاسازی فسفر و کلسیم از سنگ فسفات بررسی شده است تا بتوان از بهترین آن‌ها برای افزایش راندمان بازیابی کودهای فسفری در گیاه و یا ساخت کودهای زیستی از سنگ فسفات بهره‌گیری کرد.

مواد و روش‌ها

گزینش بهترین قارچ‌های گشاینده کانی‌های فسفری

در این پژوهش از ۳۰ قارچ درون‌زی جدا شده از گیاهان خانواده اسپنچ بومی زیستگاه‌های خشک و شور که در پژوهش‌های پیشین جداسازی شده بود، بهره‌گیری شد (Aletaha et al., 2018). کار کشت و تکثیر هر یک از آن‌ها در پتری‌دیش‌های دارای کشتگاه PDA^۲ برای مایه‌زنی، انجام شد. برای گزینش بهترین قارچ‌های کارا و دگرگون‌کننده کانی‌های فسفری، تکه‌ای به اندازه ۰/۵ در ۰/۵ سانتی‌متر از پرگنه جوان هر یک از قارچ‌ها از کشتگاه PDA برای مایه‌زنی در کشتگاه جامد و سترون

3Pikovskaya

1The dark septate endophytic fungus *Phialocephala fortinii*

2Potato Dextrose Agar

آبی می‌دهد، اندازه‌گیری شد (Murphy & Riley, 1962). برای اندازه‌گیری کلسیم گشوده شده در کشتگاه نیز از روش همتافته‌سنجی یا کمپلکسومتری با اتیلن دی‌آمین تترااستیک اسید (EDTA) بهره‌گیری شد (Botha & Webb, 1952). هم‌چنین مقادیر pH و EC نیز برای هر تکرار از نمونه در هر بازه زمانی با pH متر و EC متر اندازه‌گیری شد.

کشتگاه در هر زمان بررسی شد. پس از هر بار نمونه‌برداری از کشتگاه نمونه‌های هر تکرار درون ریزلوله (میکروتیوپ) ریخته و با چرخش ۵۰۰۰ دور در دقیقه برای چهار دقیقه سانتریفیوژ کرده، سپس از محلول رویی دو میلی‌لیتر برداشته و پس از ۱۰ بار و در برخی تیمارها بیش‌تر رقیق‌سازی شد و اندازه فسفر محلول در درازی موج ۸۸۰ نانومتر به روش رنگ‌سنجی در شناساگر اسکوربیک اسید با آمونیوم مولیبدات و تارتارات پتاسیم انتیمونی که رنگ

جدول ۱- برخی از ویژگی‌های خاک فسفات و کشتگاه پیکووسکایا بکاررفته برای کشت قارچ‌ها

Table 1. Some characteristics of phosphate soil and Pikovskaya medium used for growing fungi

References	Unit	Components	
Yazd Esfordi Phosphate Complex	%	P ₂ O ₅ , 35; Fe, 4; CaO, 49; F, 2; Cl, 0.18; Cd, 10 ppm	Phosphorite # soil
Pikovskaya 1948	g l ⁻¹	Glucose, 10 or 70; Ca ₃ (PO ₄) ₂ , 5; MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.1; (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.5; Yeast extract, 0.5; KCl, 0.2; NaCl, 0.2; FeSO ₄ , 0.002; MnSO ₄ .7H ₂ O, 0.002	Pikovskaya

رفته (۱ و ۷ درصد) در کشتگاه پیکووسکایا بدست آمد که هر آزمایش نمونه‌ها در زمان پنج، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ روزه به گونه جداگانه به کمک نرم افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شد. آزمون میانگین داده‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در پایه آماری پنج درصد انجام و برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel بهره‌گیری شد.

نتایج و بحث

تجزیه واریانس داده‌های هر یک از ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در کشتگاه آبکی بکاررفته در هر یک از زمان‌های نمونه‌برداری نشان داد که پیامد گونه قارچ، درصد گلوکز بکار رفته در کشتگاه و برهم کنش آن‌ها بر هر یک از ویژگی‌های اندازه‌گیری شده در پایه آماری یک درصد چشم گیر است. در این نوشتار تنها تجزیه واریانس داده‌ها برای نمونه‌های ۳۰ روزه برای پارامترهای pH، EC، کلسیم و فسفر گشوده‌شده از کانی تری کلسیم فسفات در جدول ۲ گزارش شده است. یادآور می‌شود که تجزیه واریانس ویژگی‌های بررسی شده در زمان‌های دیگر نیز مانند این زمان بود که برای فشردگی در این نوشتار آورده نشده است.

اندازه‌گیری فسفر در هیف‌های قارچ‌ها

افزون بر آن، پس از پایان دوره آزمایش و انجام فرآیند سانتریفیوژ برای آخرین زمان نمونه‌برداری، بافت‌های قارچ را از هر تیمار جداسازی کرده و برای گوارش تر به هر نمونه ۰/۲ گرمی از هیف تر قارچ‌ها دو میلی‌لیتر اسید سولفوریک سه نرمال افزوده شد و روی بخار آب در دمای ۹۰ درجه‌ی سلسیوس برای ۱۰ دقیقه گذاشته شد (Rand et al., 1997; Ghaderi et al., 2008). اگر فرآیند گوارش هیف قارچ‌ها خوب انجام نشده بود، دوباره کار بالا انجام شده و تا روشن شدن نمونه‌ها، به گونه‌ای که نشانی از بافت‌ها دیده نشود، فرآیند گوارش تکرار شد. در پایان برای خنثی نمودن اسید بکار رفته، چند قطره سدیم هیدرواکسید سه نرمال افزوده شد (Ebrahimi et al., 2019)، پس از آن نمونه گوارش شده از کاغذ پالایه گذرانده شد و شیره به‌دست آمده به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد و اندازه فسفر آن به روش اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری شد (Murphy & Riley, 1962).

آزمون‌های آماری

در این پژوهش آزمایشی فاکتوریل با طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. فاکتور نخست شاهد آزمایش و ۱۵ جدایه قارچ گزینش شده و فاکتور دوم غلظت گلوکز بکار

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) داده‌های هریک از ویژگی‌های بررسی شده در روز سی ام نمونه‌برداری

Table 2. Analysis of variance (mean squares) of the data of each of the characteristics examined on the 30th day of sampling

Sources Change	df	pH	EC	Ca	P
fungi species (F)	15	4.70 ^{**}	3.25 ^{**}	29.279.72 ^{**}	24987.50 ^{**}
Glucose (G)	1	32.12 ^{**}	2.84 ^{**}	207204.16 ^{**}	359540.76 ^{**}
F*G	15	0.228 ^{**}	0.142 ^{**}	3466.38 ^{**}	4690.68 ^{**}
Error	64	0.004	0.00068	501.04	7.820
Coefficient of variation (%)	-	1.51	1.88	8.82	1.66

* و ** به ترتیب نشان‌دهنده پیامد چشم گیر در پایه آماری پنج درصد و یک درصد است.

*and ** It shows a significant outcome in the statistical base of 5% and 1%, respectively.

بیش‌ترین کاهش pH در زمان پایانی آزمایش دیده شد که در کشتگاه دارای گلوکز هفت درصد در مای‌زنی دو قارچ یادشده برابر ۲/۹۱ بود ولی در کشتگاه دارای گلوکز یک درصد آن‌ها به ترتیب ۴/۰۲ و ۴ بود. ساخت اسیدهای آلی این جدایه‌ها مایه کاهش pH کشتگاه شد و بدین گونه گمان می‌رود که فسفر گشوده‌شده از کانی‌ها افزایش خواهد یافت.

آزمون میانگین‌ها نشان داد که دگرش و کاهش pH کشتگاه قارچ‌ها در برابر شاهد آزمایش در پایه آماری پنج درصد در همه تیمارها چشم‌گیر می‌باشد (جدول ۳). به‌گونه‌ای که در هر چهار زمان نمونه‌برداری بیش‌ترین اندازه کاهش pH در هر دو غلظت گلوکز در مایه‌زنی جدایه‌های *Aspergillus terreus* و *Aspergillus calidoustus* دیده شد. در میان زمان‌های گوناگون

جدول ۳- آزمون میانگین pH کشتگاه پیکوفسکایای دارای یک و هفت درصد گلوکز مایه‌زنی‌شده با قارچ‌ها در زمان‌های گوناگون نمونه‌برداری

Table 3. Mean pH test of Pikofskaya medium with 1 and 7% glucose inoculated with fungi at different sampling times

Species	5 day		10 day		20 day		30 day	
	1%	7%	1%	7%	1%	7%	1%	7%
<i>Acromonium sp</i> 1	5.55 ^{c-e}	4.83 ^{kl}	5.45 ^{c-e}	4.85 ^{f-j}	5.15 ^{cd}	4.93 ⁱ	4.84 ^e	3.55 ^l
<i>Acromonium sp</i> 2	5.45 ^{c-g}	4.72 ^{ml}	5.36 ^{c-e}	4.53 ^{c-e}	5.19 ^c	4.15 ^h	5.02 ^c	3.76 ^k
<i>Acromonium sp</i> 3	5.56 ^{c-e}	4.83 ^{kl}	5.45 ^{cd}	4.49 ⁱ⁻ⁿ	5.24 ^{hg}	4.02 ^k	5.00 ^c	3.60 ^l
<i>Alternaria botrytis</i>	5.52 ^{c-f}	4.84 ^{kl}	5.41 ^{c-e}	4.38 ^{i-k}	5.12 ^{c-e}	4.14 ^h	4.87 ^{ed}	3.17 ^m
<i>Alternaria consortialis</i>	5.39 ^{d-f}	4.63 ^{ml}	5.31 ^{c-e}	4.34 ^{h-k}	4.97 ^{c-e}	3.88 ⁱ	4.59 ^f	3.11 ^m
<i>Aschochyta caulina</i>	5.60 ^{cd}	5.14 ^{h-j}	5.51 ^c	5.01 ^{d-h}	5.17 ^c	4.46 ^{fg}	5.06 ^c	3.95 ^{hi}
<i>Aspergillus calidoustus</i>	4.61 ^{ml}	4.23 ^{op}	4.53 ^{g-j}	3.59 ^m	4.21 ^h	3.08 ^k	4.02 ^h	2.91 ⁿ
<i>Aspergillus terreus</i>	4.67 ^{ml}	4.07 ^p	4.52 ^{h-l}	3.66 ^{lm}	4.34 ^{hg}	3.18 ^k	4.00 ^h	2.91 ⁿ
<i>Curvularia spicifera</i>	5.26 ^{g-i}	4.51 ^{mn}	5.12 ^{c-g}	4.20 ^{j-l}	4.90 ^e	3.65 ^j	4.70 ^f	3.16 ^m
<i>Curvularia spicifera</i>	5.06 ^{ji}	4.32 ^{on}	4.67 ^{f-i}	4.04 ^{k-m}	4.65 ^f	3.60 ^j	4.27 ^g	3.14 ^m
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	5.32 ^{f-h}	5.08 ^{ji}	5.19 ^{c-g}	4.63 ^{g-j}	4.92 ^{ed}	4.25 ^{hg}	4.61 ^f	3.85 ^{i-k}
<i>Fusarium solani</i>	5.37 ^{e-h}	5.04 ^{i-k}	5.23 ^{c-f}	4.61 ^{f-i}	5.09 ^{c-e}	4.20 ^h	4.87 ^{ed}	3.82 ^{jk}
<i>Fusarium sp</i>	5.34 ^{e-h}	5.26 ^{g-h}	5.22 ^{d-f}	4.73 ^{f-i}	5.03 ^{c-e}	4.19 ^h	4.82 ^e	3.95 ^{hi}
<i>Gibberella thapsina</i>	5.76 ^c	5.05 ^{i-k}	5.55 ^c	4.95 ^{e-h}	5.06 ^c	4.26 ^{hg}	4.9 ^{cd}	3.91 ^{h-j}
<i>Penicilium sp</i>	6.32 ^b	4.96 ^{jk}	6.31 ^b	5.18 ^{c-f}	6.00 ^b	4.64 ^f	5.60 ^b	4.02 ^g
Control	7.47 ^a	7.40 ^a	7.45 ^a	7.38 ^a	7.39 ^a	7.36 ^a	7.37 ^a	7.30 ^a

برای هر روز نمونه برداری میانگین‌های با دست کم یک واژه یکسان ناهمبندی چشم گیر در پایه آماری پنج درصد ندارند.

For each sampling day, the averages with at least one identical word do not have a significant discrepancy in the statistical base of 5%.

افزایش چشم‌گیری را در پایه آماری پنج درصد از خود نشان داده است. بیش‌ترین اندازه رسانندگی الکتریکی در کشتگاه با یک درصد گلوکز در تیمار *Alternaria botrytis* اندازه‌گیری شد که به ترتیب در روزهای پنجم، دهم،

همان‌گونه که در جدول ۴ نمایش داده شده است، دگرش رسانندگی الکتریکی برای هر تیمار با گذشت زمان روندی وارونه دگرش pH داشت، به‌گونه‌ای که با گذشت زمان در تیمارهای آزمایشی اندازه این ویژگی در برابر گواه آزمایش

بیستم و سی‌ام از نمونه برداری برابر ۲/۲۸، ۲/۱، ۱۷۰/۹۲، ۲/۷۰ و دسی‌زیمنس بر متر بود. بیش‌ترین اندازه رسانندگی الکتریکی در کشتگاه با ۷٪ گلوکز نیز در کشت همین قارچ بدست آمد که برابر با ۲/۲۰، ۲/۵۹، ۲/۹۰ و ۳/۰۱ دسی‌زیمنس بر متر در روزهای یاد شده است و پس از آن بیش‌ترین اندازه از رسانندگی الکتریکی در جدایه‌های *Aspergillus* و *Alternaria consortialis* بوده است در برابر آن کم‌ترین اندازه از

رسانندگی الکتریکی در هر دو کشتگاه در تیمار *Penicillium* sp بدست آمد هر چند که در روزهای پایانی کم‌ترین اندازه در تیمار *Aschochyta caulina* است اما در بررسی کلی در تیمار *Penicillium* sp در کشتگاه با ۱٪ گلوکز در چهار زمان نمونه برداری به ترتیب برابر ۰/۳۷۰، ۰/۳۸۹، ۰/۴۱۹ و ۰/۴۶۰ دسی‌زیمنس بر متر و در کشتگاه با هفت درصد گلوکز همین قارچ برابر با ۰/۵۵۷، ۰/۵۸۱، ۰/۶۰۱ و ۰/۶۳۳ دسی‌زیمنس بر متر بود.

جدول ۴- آزمون میانگین EC (dS m⁻¹) کشتگاه پیکوفسکای دارای یک و هفت درصد گلوکز مایه‌زنی‌شده با قارچ‌ها در زمان‌های گوناگون نمونه‌برداری

Table 4. Mean test EC (dS m⁻¹) of Pikovskaya medium with 1 and 7% glucose inoculated with fungi at different sampling times

Species	5 day		10 day		20 day		30 day	
	1%	7%	1%	7%	1%	7%	1%	7%
<i>Acromonium</i> sp ₁	0.833 ^m	1.057 ^k	0.862 ⁿ	1.188 ^k	0.893 ^o	1.219 ^j	0.945 ^s	1.378 ^{lm}
<i>Acromonium</i> sp ₂	0.860 ^m	1.180 ⁱ	0.905 ⁿ	1.252 ^j	0.965 ⁿ	1.295 ⁱ	1.001 ^r	1.416 ^l
<i>Acromonium</i> sp ₃	0.066 ^m	1.178 ⁱ	0.879 ⁿ	1.239 ^j	0.908 ^o	1.278 ⁱ	0.931 ^s	1.353 ^m
<i>Alternaria botrytis</i>	1.926 ^c	2.200 ^a	2.170 ^b	2.594 ^a	2.285 ^c	2.904 ^a	2.7034 ^e	3.011 ^a
<i>Alternaria consortialis</i>	1.600 ^{de}	1.691 ^e	1.738 ^f	1.806 ^e	2.029 ^d	2.033 ^d	2.413 ^d	2.188 ^f
<i>Aschochyta caulina</i>	0.385 ^r	0.434 ^q	0.403 ^s	0.495 ^r	0.430 ^u	0.480 ^t	0.450 ^x	0.510 ^w
<i>Aspergillus calidoustus</i>	1.541 ^f	1.986 ^{bc}	1.614 ^g	2.096 ^c	1.878 ^e	2.446 ^b	2.052 ^h	2.870 ^b
<i>Aspergillus terreus</i>	0.128 ^h	1.641 ^d	1.353 ⁱ	1.850 ^d	1.520 ^g	2.008 ^d	1.758 ^j	2.105 ^g
<i>Curvularia spicifera</i>	0.951 ^l	1.241 ^h	0.975 ^m	1.482 ^h	0.988 ^h	1.636 ^{nm}	1.031 ^{qr}	1.706 ^k
<i>Curvularia spicifera</i>	1.345 ^g	1.977 ^b	1.592 ^g	2.129 ^{bc}	1.802 ^f	2.423 ^b	1.901 ⁱ	2.794 ^c
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	0.956 ^l	1.113 ^j	0.983 ^m	1.132 ^l	1.026 ^{lm}	1.163 ^k	1.162 ^o	1.258 ⁿ
<i>Fusarium solani</i>	0.950 ^l	1.103 ^j	0.972 ^m	1.136 ^l	0.992 ^{nm}	1.172 ^k	1.047 ^q	1.237 ⁿ
<i>Fusarium</i> sp	0.964 ^l	1.083 ^{jk}	0.990 ^m	1.133 ^l	1.021 ^l	1.153 ^k	1.162 ^p	1.258 ⁿ
<i>Gibberella thapsina</i>	0.586 ^o	0.630 ⁿ	0.605 ^o	0.677 ^u	0.635 ^q	0.713 ^p	0.677 ^u	0.763 ^t
<i>Penicilium</i> sp	0.370 ^r	0.557 ^o	0.389 ^s	0.581 ^p	0.419 ^u	0.601 ^r	0.460 ^x	0.633 ^v
Control	0.202 ^s	0.501 ^p	0.205 ^t	0.504 ^q	0.210 ^v	0.511 ^s	0.213 ^y	0.115 ^w

برای هر روز نمونه برداری میانگین‌های با دست کم یک واژه یکسان ناهمبندی چشم‌گیر در پایه آماری پنج درصد ندارند.

For each sampling day, the averages with at least one identical word do not have a significant discrepancy in the statistical base of 5.

یک درصد) در تیمارهای مایه‌زنی‌شده با جدایه‌های *Aspergillus terreus* و *Aspergillus calidoustus* به‌دست آمد که در کشتگاه با هفت درصد گلوکز به ترتیب برابر ۳۲۰/۰۳، ۳۰۳/۳۶ و ۲۸۰/۰۳ میلی‌گرم بر لیتر بود و کم‌ترین آن در هر دو کشتگاه یادشده در تیمار *Penicillium* sp. به‌دست آمد که در کشتگاه دارای گلوکز یک درصد برابر ۸۰/۰۳ و در کشتگاه دارای گلوکز فـت درصد برابر ۱۹۶/۷۰ میلی‌گرم بر لیتر بود. آزمون میانگین کلسیم گشوده‌شده در روز سی‌ام نیز نشان داد که اندازه کلسیم گشوده شده در هر پانزده جدایه قارچی در برابر گواه آزمایش افزایش چشم‌گیر داشته است، به گونه‌ای که بیش‌ترین اندازه کلسیم گشوده شده در کشتگاه با گلوکز هفت درصد در تیمارهای *Aspergillus terreus* و *Aspergillus calidoustus*

آزمون میانگین‌های کلسیم ره‌اشده در کشتگاه نشان داد که کشت هر یک از قارچ‌ها در برابر گواه آزمایش مایه افزایش چشم‌گیر آن شده است. به هر گونه اندازه کلسیم گشوده‌شده از کانی بکاررفته در روزهای پنجم و دهم در کشتگاه به اندازه‌ای کم بود که با روش بکاررفته به مرز سنجش‌پذیر نرسید. ولی با گذشت زمان همراه با کاهش pH و گشودگی کانی افزایش یافت که در دو زمان دیگر اندازه‌گیری شد. همان‌گونه که در جدول ۵ نمایش داده شده است، در روز بیستم در همه تیمارها گذشته از تیمار *Penicillium* sp. در برابر گواه آزمایش در کشتگاه دارای یک درصد گلوکز افزایش چشم‌گیری دیده شد که در کشتگاه با هفت درصد گلوکز در تیمار *Penicillium* sp. نیز این افزایش چشم‌گیر شد. بیش‌ترین اندازه کلسیم ره‌اشده در روز بیستم در هر دو کشتگاه (گلوکز هفت و

کافی بکاررفته با گذشت زمان بیش‌تر گشوده شده است. در این پژوهش اندازه‌گیری کلسیم محلول و رسانندگی الکتریکی کشتگاه جامد نشان داد که گونه‌های قارچ با رهاسازی اسیدهای آلی مایه گشایش کافی‌ها در کشتگاه خاک فسفات شده‌اند. یافته‌های این بخش از پژوهش با گزارش یائو و همکاران (Yao et al., 2010) و محمودزاده و همکاران (Mahmoodzadeh et al., 2015) همخوانی دارد، به گونه‌ای که این پژوهشگران گزارش کرده‌اند که قارچ‌ها و باکتری‌های افزایشدهی رشد می‌توانند پیامد چشم‌گیری در افزایش کلسیم گشوده در خاک و کشتگاه داشته باشند.

Alternaria botrytis به‌ترتیب ۴۲۳/۳۶، ۴۰۳/۳۶ و ۳۵۳/۳۷ میلی‌گرم بر لیتر بدست آمد. بیش‌ترین اندازه کلسیم رهاسازی شده در کشتگاه دارای گلوکز یک درصد در کشت همان قارچ‌ها و به‌ترتیب برابر ۳۱۰/۰۳، ۳۰۳/۳۶ و ۲۷۳/۳۶ میلی‌گرم بر لیتر بود. در برابر آن کم‌ترین اندازه رهاسازی کلسیم در هر دو کشتگاه در روز سی‌ام نیز همانند دوره گذشته در تیمار مایه‌زنی با قارچ *Penicillium sp.* به‌دست آمد که در کشتگاه دارای گلوکز یک هفت درصد برابر ۱۷۶/۷۰ و در کشتگاه دارای گلوکز یک درصد برابر ۱۲۳/۳۶ میلی‌گرم بر لیتر بود. یادآور شود که کلسیم اندازه‌گیری شده در همه تیمارها در روز بیستم کم‌تر از روز سی‌ام همان تیمار است که نشان می‌دهد

جدول ۵- آزمون میانگین کلسیم (میلی‌گرم بر لیتر) کشتگاه پیکووسکایای دارای یک و هفت درصد گلوکز مایه‌زنی شده با قارچ‌ها در

روزهای بیستم و سی‌ام نمونه برداری

Table 5. Mean calcium test (mg l⁻¹) of Pikovskaya medium with 1 and 7% glucose inoculated with fungi on the twentieth and thirtieth days of sampling

Species	20 day		30 day	
	1%	7%	1%	7%
<i>Acromonium sp</i> ₁	100.03 ^{a-r}	250.03 ^{b-f}	190.03 ^m	303.36 ^{e-g}
<i>Acromonium sp</i> ₂	103.36 ^{n-r}	273.36 ^{a-e}	196.70 ^{lm}	316.70 ^{d-f}
<i>Acromonium sp</i> ₃	106.70 ^{n-q}	243.36 ^{c-h}	206.70 ^{k-m}	323.36 ^{ed}
<i>Alternaria botrytis</i>	213.36 ^{f-k}	280.03 ^{a-e}	273.36 ^{g-i}	353.37 ^{cd}
<i>Alternaria consortialis</i>	213.36 ^{f-k}	246.70 ^{c-g}	253.36 ^{h-j}	306.70 ^{e-g}
<i>Aschochyta caulina</i>	166.7 ^{j-m}	196.70 ^{f-l}	216.70 ^{j-m}	240.03 ^{i-k}
<i>Aspergillus calidoustus</i>	230.03 ^{d-i}	320.03 ^a	303.36 ^{e-g}	403.36 ^{ab}
<i>Aspergillus terreus</i>	223.35 ^{e-j}	303.36 ^{ab}	310.03 ^{e-g}	423.36 ^a
<i>Curvularia spicifera</i>	156.70 ^{k-n}	233.36 ^{c-i}	200.03 ^{k-m}	336.70 ^{ed}
<i>Curvularia spicifera</i>	180.03 ^{i-m}	290.03 ^{a-c}	206.70 ^{k-m}	300.03 ^{e-g}
<i>Fusarium brachygibbosum</i>	190.03 ^{g-m}	286.70 ^{a-d}	200.03 ^{k-m}	380.03 ^{bc}
<i>Fusarium solani</i>	170.03 ^{j-m}	283.36 ^{a-d}	176.70 ^m	340.03 ^{ed}
<i>Fusarium sp</i>	153.37 ^{l-o}	243.37 ^{c-h}	186.70 ^m	280.03 ^{fg}
<i>Gibberella thapsina</i>	136.70 ^{m-p}	186.70 ^{h-l}	200.03 ^{k-m}	233.36 ^{j-l}
<i>Penicilium sp</i>	80.03 ^{qr}	196.70 ^{g-l}	123.36 ⁿ	176.70 ^m
Control	50.03 ^r	83.36 ^{p-r}	70.03 ^o	83.36 ^o

برای هر روز نمونه برداری میانگین‌های با دست کم یک واژه یکسان ناهمانندی چشم گیر در پایه آماری پنج درصد ندارند.

For each sampling day, the averages with at least one identical word do not have a significant discrepancy in the statistical base of 5.

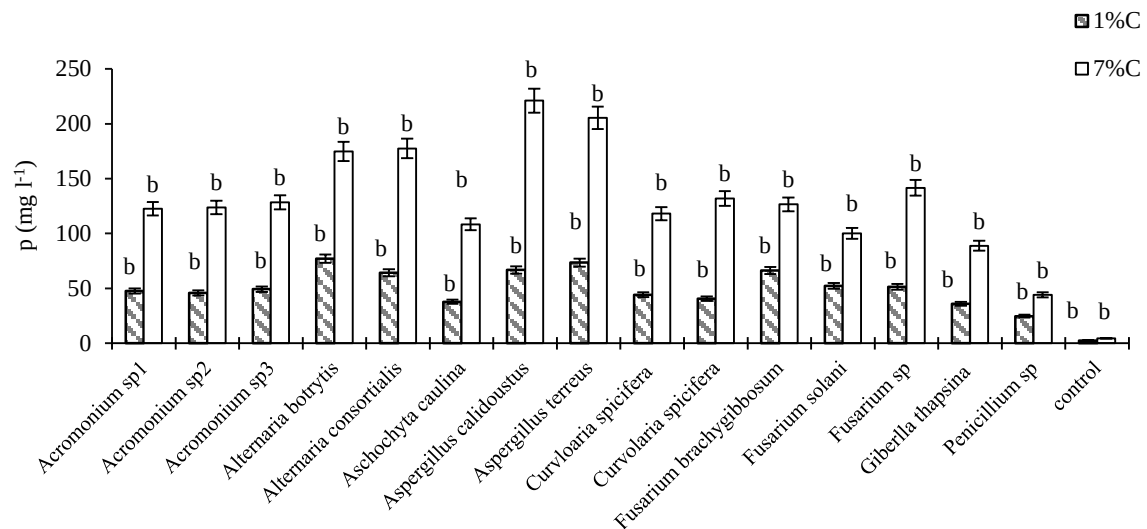
گلوکز در برابر گواه به گونه‌ای چشم‌گیری افزایش یافته است (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). از میان پانزده جدایه‌ی قارچی تیمارهای *Aspergillus Aspergillus terreus* و *Alternaria consortialis calidoustus* در برابر تیمار گواه (بدون قارچ) و دیگر جدایه‌ها توان گشایشدهی بیش‌تری داشته‌اند به گونه‌ای که بیش‌ترین فسفر گشوده در تیمار مایه‌زنی شده با *Aspergillus terreus* در کشتگاه با گلوکز هفت درصد در روزهای پنجم، دهم، بیستم و سی‌ام به‌ترتیب برابر ۲۰۵/۵۰، ۲۲۵/۹۸، ۲۷۶/۸۷ و ۳۳۹/۵۶ میلی‌گرم بر

آزمون میانگین‌ها نشان داد که هر یک از قارچ‌ها به گونه چشم‌گیری مایه افزایش فسفر گشوده در برابر گواه آزمایش شده‌اند. آزمون میانگین فسفر گشوده شده در همه تیمارها نمایش می‌دهد که توان گشایشدهی فسفر هر یک از قارچ‌ها در کشتگاه با هفت درصد گلوکز بیش‌تر از کشتگاه با یک درصد گلوکز است. به هر گونه فسفر گشوده شده در روز پنجم در تیمارهای قارچی ناهمانندی چشم‌گیری با گواه آزمایش ندارد (شکل ۱) ولی با گذشت زمان در روزهای دهم، بیستم و سی‌ام افزایش غلظت فسفر در همه تیمارها در هر دو کشتگاه با هفت و یک درصد

بکاررفته در خوراک‌دهی قارچ‌ها در دو کشتگاه یادشده می‌تواند مایه دگرش در ساخت اسیدهای آلی شود. از سوی دیگر اندازه فسفر و نیتروژن کشتگاه بر ساخت اسید آلی ریزجانداران پیامد دارد. وایتلو و همکاران (Whitelaw et al., 1999) گزارش کردند که گشایش فسفر با قارچ *Penicillium radicum* در کشتگاه دارای ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر گلوکز بیش‌تر از کشتگاه دارای ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر گلوکز است.

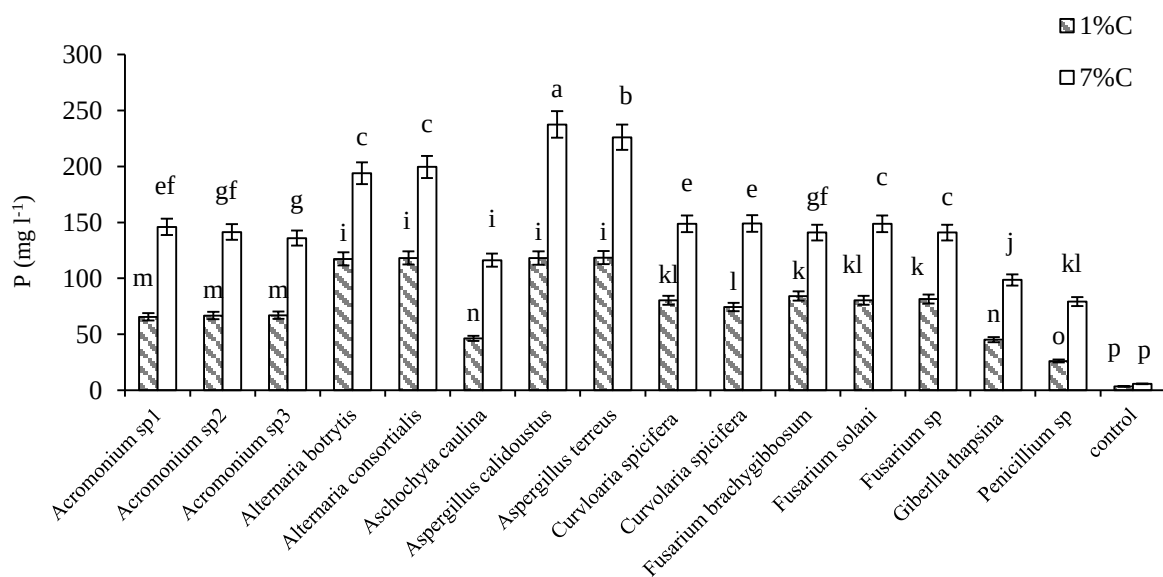
بررسی فسفر گشوده شده در زمان سی روزه نشان داد که اگر چه همه قارچ‌ها توان رها سازی فسفر را داشته‌اند ولی بیش‌ترین اندازه رها سازی فسفر به ترتیب با گونه‌های قارچ *Aspergillus calidoustus* *Aspergillus terreus* *Alternaria consortialis* و *Alternaria botrytis* رخ داده است. در بررسی‌های انجام گرفته شده بر روی این دو جنس نشان داده شده است که جنس *آسپرژیلوس* به گونه چشم‌گیری متابولیت‌های اسیدی ساخته و مایه کاهش pH کشتگاه می‌شوند. جنس *آلترناریا* که از گروه قارچ‌های دیواره تاریک است در گشودن کانی‌های فسفر توان ویژه‌ای داشته است. قارچ‌های دیواره تاریک در درون داد فسفر به گیاه سازوکار قارچ‌های میکوریزی را دارند. کارکرد این قارچ‌ها در بسیاری از فرآیندها مانند قارچ‌های میکوریزی است. از این‌رو، این قارچ‌ها را سودومایکوریز یا مایکوریزمانند نیز می‌نامند. برخی از پژوهش‌ها درباره ریخت‌شناسی ریشه‌هایی که با قارچ‌های دیواره تاریک همراه بوده‌اند از بودن شبکه‌های نازک هارتیک، مانند اکتومیکوریزا گزارش داده‌اند (Jumpponen & Trappe, 1998). در قارچ‌های دیواره تاریک همانند مایکوریزا، هیف‌هایی که روانه‌ی یاخته گیاهی شدند باریک و پر از پلی فسفات هستند (Yu & Nassuth, 2001). قارچ‌های دیواره تاریک توان گشودن کانی‌های فسفر و نافراهم را دارند. در پژوهش بارو و اوسانا (Barrow & Osana, 2001) نشان داده شد که قارچ دیواره تاریک جدا شده از گیاه سلمکی یکساله (بیش‌ترین گیاه در بیابان‌های آریزونا ی آمریکا از خانواده کنوپودیاسه) توان گشودن فسفات‌های نامحلولی هم‌چون سنگ فسفات و تری‌کلسیم فسفات را دارد. بنابراین پژوهشگران را برای ساخت کود زیستی و مایه‌زنی این قارچ‌ها به گیاه برانگیخته است (Aletaha et al., 2019).

کیلوگرم است و در کشتگاه با گلوکز یک درصد به‌ترتیب برابر ۷۳/۵۵، ۱۱۸/۴۷، ۱۴۵/۱۵ و ۱۶۱/۷۷ میلی‌گرم بر لیتر است. قارچ *Penicillium sp.* در میان قارچ‌های آزمون‌شده کم‌ترین توان گشایش فسفر در هر دو کشتگاه (گلوکز یک و هفت درصد) را در چهار زمان اندازه‌گیری داشت که به‌ترتیب در کشتگاه با گلوکز یک درصد برابر ۲۲/۷۳، ۲۶/۰۴، ۳۳/۶۹ و ۳۷/۶۲ میلی‌گرم بر لیتر بود که در کشتگاه با گلوکز هفت درصد به ۴۴/۱۵، ۷۹/۲۲، ۹۰/۲۱ و ۹۷/۳۶ میلی‌گرم بر لیتر رسید. اندازه فسفر گشوده‌شده با کاهش pH کشتگاه افزایش یافت که این به توان قارچ بکار رفته بستگی داشت. این یافته با پژوهش‌های دیگر همخوانی دارد. (Ceci et al., 2018) و در این پژوهش نشان داده شده است که قارچ‌ها با رها سازی آمیزه‌های اسیدی و کاهش pH مایه افزایش فسفر محلول در کشتگاه آبکی می‌شوند در این پژوهش به گونه آشکاری دیده شده که افزایش اسیدیته کشتگاه همراه با افزایش شوری، کلسیم و فسفر گشوده‌شده در کشتگاه است. گزارش شده است که ریزجانداران گشاینده فسفر با ساخت اسیدهای آلی و با کاهش pH مایه گشایش فسفات‌های کانی می‌شوند (Whitelaw, 1999). بنابراین ریزجاندارانی که بهتر مایه اسیدی شدن کشتگاه خود می‌شوند، توان بیش‌تری در افزایش زیست‌فراهمی فسفر را دارند. یکی دیگر از فرآیندهای رها سازی فسفر با این ریزجانداران هم‌تافته سازی و کمپلکس کردن یون‌های کلسیم، آهن و آلومینیوم کانی‌های فسفری است که مایه باز شدن کانی و آزاد شدن فسفر آن می‌شود (Siddiqui & Pichtel, 2008). اسیدهای آلی ساخته‌شده می‌توانند با فلزهای گشوده‌شده هم‌تافته‌های پایدار بسازند که به افزایش زیست‌فراهمی فسفر می‌انجامد. در بررسی توان قارچ‌ها در گشایش فسفر کانی در دو اندازه گلوکز یک و هفت درصد دیده شد که در کشتگاه با کربن آلی بیش‌تر توان گشاینده‌ی افزون‌تر است. ناهاس (Nahas, 2007) چنین گزارش کرد که ساخت اسیدهای آلی و اندازه آن‌ها به خاستگاه کربن آلی کشتگاه وابسته است. یکی از سازوکارهای گشایش فسفر با ریزجانداران ساخت اسیدهای آلی می‌باشد. از آن‌جایی که ساخت اسیدهای آلی همانند آلفا-کتو گلوئیک اسید، سیتریک اسید، مالیک اسید و اسیدهای آلی دیگر وابسته به کاتابولیسم گلوکز به‌ویژه در چرخه کربس است، بنابراین اندازه گلوکز



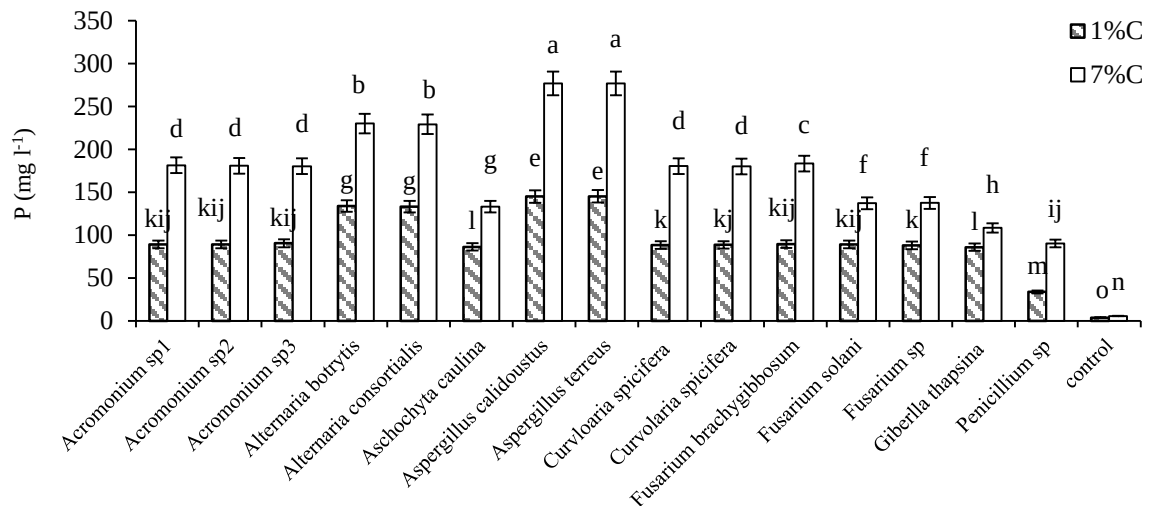
شکل ۱- اندازه فسفر رها شده در کشتگاه پیکووسکایای دارای یک و هفت درصد گلوکز مایه‌زنی شده با قارچ‌ها در روز پنجم نمونه‌برداری

Figure 1. The amount of released phosphorus in the Pikovskaya medium containing 1 and 7% glucose inoculated with fungi on the fifth day of sampling



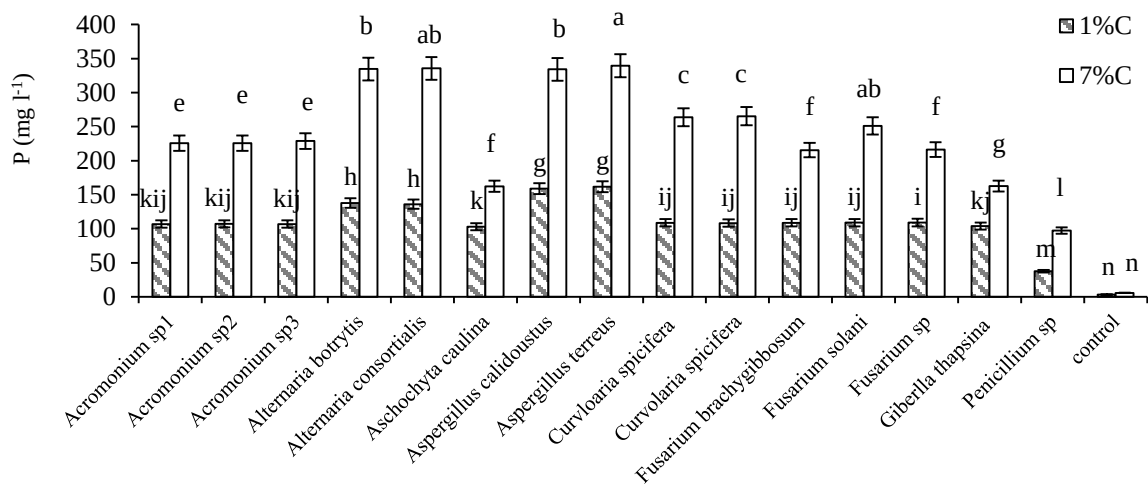
شکل ۲- اندازه فسفر رها شده در کشتگاه پیکووسکایای دارای یک و هفت درصد گلوکز مایه‌زنی شده با قارچ‌ها در روز دهم نمونه‌برداری

Figure 2. The amount of released phosphorus in the Pikovskaya medium containing 1 and 7% glucose inoculated with fungi on the tenth day of sampling



شکل ۳- اندازه فسفر رها شده در کشتگاه پیکووسکایای دارای یک و هفت درصد گلوکز مایه‌زنی شده با قارچ‌ها و گواه آزمایش در روز بیستم نمونه‌برداری

Figure 3. The amount of released phosphorus in the Pikovskaya medium containing 1 and 7% glucose inoculated with fungi on the twentieth day of sampling



شکل ۴- اندازه فسفر رها شده در کشتگاه پیکووسکایای دارای یک و هفت درصد گلوکز مایه‌زنی شده با قارچ‌ها در روز سیام نمونه‌برداری.

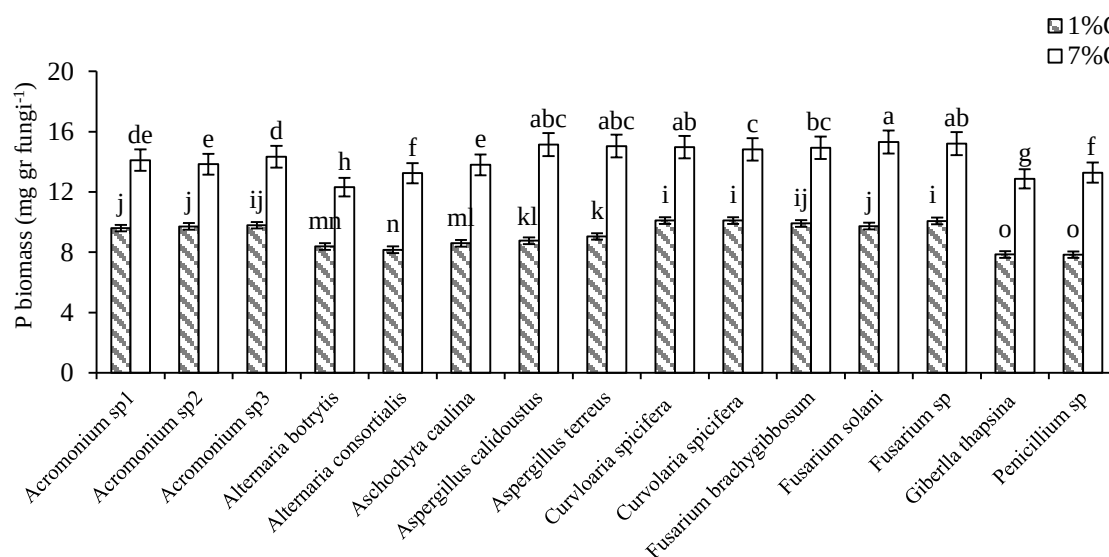
Figure 4. The amount of released phosphorus in Pikovskaya medium with 1 and 7% glucose inoculated with fungi on the 30th day of sampling

با ۱۲/۲۴، ۱۲/۸۷ و ۱۲/۳۱ میلی گرم بر گرم قارچ است و در کشتگاهی با گلوکز یک درصد کمترین میزان فسفر زیست‌توده در قارچ‌های *Penicillium sp* و *Giberlla thapsina* دیده شد که به ترتیب برابر ۷/۸۳ و ۷/۸۵ میلی گرم بر گرم وزن قارچ خشک است (شکل ۵). همان گونه که در شکل ۵ آمده است هر چند که در کشتگاه با گلوکز هفت درصد اندازه فسفر در هیف قارچ‌ها بیش‌تر از کشتگاه با گلوکز یک درصد است ولی روندی

در بررسی اندازه فسفر اندوخته شده در هیف قارچ‌ها در پایان روز سیام دیده شده که فسفر درون هیف‌های همه-ی قارچ‌های رشد کرده در کشتگاه با هفت درصد گلوکز بیش‌تر از کشتگاه با یک درصد گلوکز است، اما در میان جدایه‌های بررسی شده کمترین اندازه فسفر درون هیف-های در کشتگاه با گلوکز هفت درصد در هیف قارچ‌های *Giberlla thapsina* و *Alternaria consortialis* و *Alternaria botrytis* اندازه‌گیری شد که به ترتیب برابر

فسفر از راه آلی کردن آن با انباشت در میسلیم خود شوند. هرچند این فرآیند برای زمانی کوتاه فسفر را از زیستگاه آبکی می‌گیرد ولی می‌تواند در زیست به‌سازی زیستگاه‌های آبی سودمند باشد. اگر چنین قارچی برای ساخت کود زیستی بکار رود می‌تواند فسفر خاک را در هیف‌های خود اندوخته و آلی کند که پس از مرگ قارچ با کانی شدن آن، می‌تواند برای گیاه فراهم شود (Safari Sinegani, 2013). بنابراین هم‌راستا با یافته‌های پیشین (Ebrahimi et al., 2018) بار دیگر بر بررسی فسفر اندوخته‌شده در یاخته ریزجانداران کاندید ساخت کودهای زیستی پافشاری می‌شود.

وارونه با فسفر گشوده‌شده در کشتگاه را داشت زیرا کم‌ترین فسفر درون هیف‌ها در قارچ‌های کارا در فرآیند ره‌سازی فسفر در کشتگاه اندازه‌گیری شد. در برابر آن قارچ *Penicillium* sp. با اندازه فسفر محلول کم‌تر، جزء جدایه‌هایی با بیش‌ترین فسفر زیست‌توده بود. بنابراین کم بودن اندازه فسفر ره‌اشده در کشتگاه این قارچ در برابر دیگر تیمارها نشان از ناتوانی این قارچ در گشایش فسفر نمی‌تواند باشد. این یافته نشان می‌دهد که گاهی قارچ فسفر را به ریخت ره‌اشده درآورده و سپس آن را درون هیف‌های خود اندوخته می‌کند. بخشی از فسفر ره‌اشده با گذشت زمان جذب میسلیم‌های قارچی می‌شود. این گونه قارچ‌ها می‌توانند مایه جذب و کاهش زیست‌فراهمی



شکل ۵- اندازه فسفر اندوخته شده درون هیف قارچ‌ها پس از سی روز نگهداری آن‌ها

Figure 5. The amount of phosphorus stored in the hyphae of fungi after thirty-days incubation.

میان فسفر و کلسیم گشوده در کشتگاه دیده شد و در هر چهار زمان نمونه‌برداری همبستگی میان فسفر گشوده‌شده با هدایت الکتریکی چشم‌گیر بود (روز پنجم $r^2=0/3^*$ ، روز دهم $r^2=0/8.^{**}$ ، روز بیستم $r^2=0/8.^{**}$ و روز سی‌ام $r^2=0/65.^{**}$) که این بار دیگر نشان‌دهنده توان قارچ‌ها در گشایش کانی تری کلسیم فسفات درون کشتگاه دارد که با کاهش pH آن را گشوده و مایه افزایش همزمان فسفر، کلسیم و یون‌های درون کشتگاه آبکی شده است.

ضرایب همبستگی میان ویژگی‌های اندازه‌گیری شده برای هر چهار زمان به گونه جداگانه بررسی شد (جدول ۶). همان‌گونه که در جدول ۶ نمایش داده شده است، همبستگی میان فسفر گشوده شده در کشتگاه و pH در روز پنجم برابر $r^2=0/35.^{**}$ ، در روز دهم برابر $r^2=0/60.^{**}$ و در روز بیستم $r^2=0/50.^{**}$ و در روز پایانی برابر $r^2=0/90.^{**}$ به‌دست آمد که نشان می‌دهد گشایش کانی تری کلسیم فسفات وابسته به اسیدیته کشتگاه است که هر چه pH کم‌تر باشد اندازه فسفر گشوده شده در کشتگاه بیش‌تر است. در روز سی‌ام نیز همبستگی چشم‌گیری

جدول ۶- همبستگی میان ویژگی‌های بررسی شده در روزهای پنجم، دهم، بیستم و سیام آزمایش

Table 6. Correlation between the studied characteristics on the fifth, tenth, twentieth and thirtieth days of the experiment

Time	Properties	EC	P	Ca
5 day	pH	-0.60**	-0.35**	-
	EC	1.00	0.30*	-
	P		1.00	-
10 day	pH	-0.85**	-0.60**	-
	EC	1.00	0.80**	-
	P		1.00	-
20 day	pH	-0.70**	-0.50**	0.60**
	EC	1.00	0.80**	0.30*
	P		1.00	0.15 ^{ns}
30 day	pH	-0.60**	-0.90**	-0.85**
	EC	1.00	0.65**	0.65**
	P		1.00	0.90**

ns, * و ** به ترتیب نشان‌دهنده نبود همبستگی، و همبستگی چشم‌گیر در پایه آماری پنج درصد و یک درصد است.

ns, * and ** It shows a lack of correlation, and significant correlation in the statistical base of 5% and 1%, respectively

نتیجه‌گیری کلی

افزایش یافت. بررسی روند افزایش پیوسته رسانندگی الکتریکی، کلسیم و فسفر در آزمایش سی روزه به‌ویژه در کشتگاه با گلوکز بیش‌تر نشان از توان قارچ‌ها در اسیدزایی و سپس گشایش کانی‌های کشتگاه دارد. پژوهش نشان می‌دهد که قارچ‌های درون‌زی جدا شده از گیاهان در زندگی آزاد و ساپروفیتی خود نیز می‌توانند از راه‌های دیگری به رشد گیاهان کمک کنند. این قارچ‌های میکوریزمانند همانند قارچ‌های اکتومیکوریز با گشایش کانی‌های فسفوری و اسیدزایی و از راه رهاسازی و اندوختن فسفر در هیف‌های خود می‌توانند برای کاهش زیان کمبود فسفر در خاک‌های کشاورزی بهره‌گیری شوند و یا با افزایش راندمان جذب فسفر نیاز به کودهای فسفاته را کاهش دهد. آن‌ها با جذب فسفر و اندوختن آن به گونه آلی یا کانی در هیف‌ها از کودهای زیستی کارآمدی می‌توانند باشند که این نیاز به پژوهش میدانی و کاربردی دارند.

توان و سازوکار افزایش زیست‌فراهمی فسفر میان جدایه‌های قارچی در کشتگاه آبکی ناهم‌انند است و در میان قارچ‌های بکاررفته جدایه‌های *Aspergillus terreus*، *Aspergillus calidoustus*، *Alternaria consortialis* و *Alternaria botrytis* توانایی بیش‌تری داشتند. گشایش فسفر در جدایه‌ی *Penicillium* sp کم‌ترین اندازه به‌دست آمد. پایین بودن اندازه فسفر ره‌اشده در کشتگاه این قارچ نشان‌دهنده ناتوانی آن نبوده، چرا که بررسی اندازه فسفر زیست‌توده نشان داده است که این جدایه اندازه بیش‌تری از فسفر گشایش‌شده را در بافت‌های خود اندوخته کرده است. هر چند کاهش pH و افزایش EC در کشت آن نیز در هر چهار زمان نمونه‌برداری کم‌تر از دیگر قارچ‌ها بود ولی در برابر گواه آزمایش این دگرش pH و افزایش EC چشم‌گیر بود. اندازه کربن آلی بکاررفته در کشتگاه بر توان اسیدزایی قارچ‌ها پیامد داشته و گشایش فسفر کانی در کشتگاه با افزایش گلوکز در کشتگاه به اندازه چشم‌گیری

References

- Aletaha R., Safari Sinegani A.A., and Zafari D. 2018. A survey on the endophytic fungi in the roots of chenopodiaceae family under different environmental conditions in Iran. *Mycosphere*, 9(4): 618-634.
- Aletaha R., Safari Sinegani A.A., and Zafari D. 2019. Evaluation of growth potential in inoculated spinach plants with piriformospora indica, mycorrhizal and dark septate endophyte in drought stress. *Journal of Crop Improvement*, 20(2): 517-531.

- Barrow J., and Aaltonen, R. 2001. Evaluation of the internal colonization of *Atriplex canescens* (Pursh) Nutt. roots by dark septate fungi and the influence of host physiological activity. *Mycorrhiza*, 4: 199-205.
- Barrow J.R. and Osuna P. 2002. Phosphorus solubilization and uptake by dark septate fungi in fourwing saltbush, *Atriplex canescens* (Pursh). Nutt. *Journal of Arid Environment*, 51: 449-459.
- Bolan N.S., Naidu R., Mahimairaja S., and Baskaran S. 1994. Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates. *Journal of Biology and Fertility of Soils*, 18(4): 311-319.
- Botha C.R., and Webb M.M. 1952. The versenate method for the determination of calcium and magnesium in mineralized waters containing large concentrations of interfering ions. *Institute of Water Engineers Journal*, (6): 459.
- Ceci A., Pinzari F., Russo F., Maggi O., and Persiani A.M. 2018. Saprotrophic soil fungi to improve phosphorus solubilisation and release: *In vitro abilities of several species*, *Ambio* 471: 30-40.
- Diene, O., Wang, W., and Narisawa, K. 2013. Pseudosigmoidea ibarakiensis sp. nov., a dark septate endophytic fungus from a cedar forest in Ibaraki, Japan. *Journal of Microbes and Environments*, 13002.
- Ebrahimi M., Safari Sinegani A.A., Sarikhani M.R., and Aliasgharzad N. 2019. Assessment of soluble and biomass K in culture medium is a reliable tool for estimation of K releasing efficiency of bacteria. *Geomicrobiology Journal*, 36(10): 873-880.
- Ebrahimi M., Safari Sinegani A.A., Sarikhani M.R., and Aliasgharzadan. N. 2018. Investigation of the ability of some bacterial isolates to dissolve phosphate and determine how dissolved phosphorus dissolved in both soluble and microbial biomass *Journal of Biology of Microorganisms*, 25: 109-125.
- Ezawa T., Smith S.E., and Smith F.A. 2002. P metabolism and transport in AM fungi. *Journal of Plant and Soil* 244(1-2): 221-230.
- Fadhl H.A., and Al-Hadithi B.A. 2016. The effect of fungi inoculation solvent phosphate in increasing phosphorus availability in calcareous soil and its concentration in *Cucumis sativus* L. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(9): 750-763.
- Gaïnd S. 2016. Phosphate dissolving fungi: mechanism and application in alleviation of salt stress in wheat. *Microbiological Research* (193): 94-102.
- Ghaderi A., Aliasgharzad N., Oustan S., and Olsson P.A. 2008. Efficiency of three Pseudomonas isolates in releasing phosphate from an artificial variable-charge mineral (iron III hydroxide). *Journal of Soil Environment*, 27(1): 71-76.
- Hao X., Cho C.M., Racz G.J., and Chang C. 2002. Chemical retardation of phosphate diffusion in an acid soil as affected by liming. *Journal of Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 64(3): 213-224.
- Haselwandter K., and Read D.J. 1982. The significance of rootfungus association in two Carex species of high-alpine plant communities. *Journal of Oecologia*, 53: 352-354.
- Jahandideh A., Barani Motlagh M., Dordipoor E., Ghorbani Nasr Abadi, R., and Nazari, T. 2019. The effects of Co-application of Humic acid and phosphorous fertilizer on vegetative growth indices and phosphorous availability in Canola. *Applied Soil Research*, 8: 68-78.
- Jumpponen A.R.I., and Trappe J.M. 1998. Dark septate endophytes: a review of facultative biotrophic root-colonizing fungi. *New Phytologist Foundation*, 140(2): 295-310.
- Jumpponen A. 2001. Dark septate endophytes - are they mycorrhizal?. *Mycorrhiza*, 11: 207-211.
- Khan M.S., Zaidi A., and Wani P.A. 2007. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture a review. *Journal of Agronomy for Sustainable Development* 27(1): 29-43.
- Knapp, D.G., Kovács, G.M., Zajta, E., Groenewald, J.Z., and Crous, P.W. 2015. Dark septate endophytic pleosporalean genera from semiarid areas. *Journal of Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 35: 87.
- Manske G.G.B., Ortiz-Monasterio J.I., Van Ginkel M., Gonzalez R.M., Fischer R.A., Rajaram S., and Vlek P.L.G. 2001. Importance of P uptake efficiency versus P utilization for wheat yield in acid and calcareous soils in Mexico. *Journal of European Journal of Agronomy*, 14(4): 261-274.
- Murphy J., and Riley J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Journal of Analytica Chimica Acta Jouronal*, (27): 31-36.

- Nahas E. 2007. Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. In *First international meeting on microbial phosphate solubilization*, (1): 111-115.
- Novais R.F., and Smith T.J. 1999. Fósforo em solo e planta em condições tropicais (1st ed). Editora UFV: Viçosa.
- Pikovskaya R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Journal of Microbiologiya* 17 :362-337.
- Rand M.C., Greenberg E.A., and Taras J.M. 1997. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Washington, DC: *American Public Health Association*.
- Safari Sinegani A.A. 2013. Soil Biology and Biochemistry. 4th Ed. Academic Bu-Ali Sina University. 520p.
- Sarikhani M., Malboobi M.A., and Ebrahimi M. 2013. Phosphate-solubilizing bacteria: Isolation of phosphate-solubilizing bacteria and genes encoding phosphate-opening mechanism and genetics. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1: 77-110
- Sharma S., Kumar V., and Tripathi R.B. 2011. Isolation of phosphate solubilizing microorganism (PSMs) from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(2): 90-95.
- Sheng X.F. 2005. Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Journal of Soil Biology and Biochemistry*, 37(10):1918-1922.
- Siddiqui Z.A., and Pichtel J. 2008. Mycorrhizae: an overview. In *Mycorrhizae: Journal of Sustainable Agriculture and Forestry*, (1): 1-35.
- Vassilev N., Medina A., Azcon R., and Vassileva M. 2006. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agroindustrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Journal of Plant and Soil*, 287(1-2): 77-84.
- Whitelaw M.A. 1999. Growth promotion of plants inoculated with phosphate-solubilizing fungi. *Journal of Advances in Agronomy*, 69: 99-151.
- Whittaker R.H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science*. 163(3863):150-160.
- Yao L., Wu Z., Zheng Y., Kaleem I., and Li, C. 2010. Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. *European Journal of Soil Biology*, 46(1): 49-54.
- Yu T.A., and Nassuth R.L. 2001 Characterization of the interaction between the dark septate fungus *Phialocephala fortinii* and *Asparagus officinalis* roots. *Canadian Journal of Microbiology*, 47(8): 741-753.

Evaluation of Capability of Fifteen Isolates of Mycorrhiza-like Endophytic Fungi on Release of Phosphorous from Phosphorite Mineral in the Aquatic Culture Medium

Nesa Ahadi^{1*}, Ali Akbar Safari Singani², Rahele Sadat, Aletaha³

(Received: August, 2020 Accepted: December, 2020)

Abstract

Phosphorus is the most widely used element for plant growth and development after nitrogen. Although the phosphorus content is high in soils, its bioavailability for plants is very low. Therefore, using biological methods to increase its bioavailability is very beneficial. In this study, 15 isolates of plant endophytic mycorrhiza-like fungi were used to increase phosphorus bioavailability in two soil phosphorite (5 g.L⁻¹) modified Pikovskaya culture media with two concentrations of organic carbon (1% and 7% glucose) in three replications and sampled in four times. Analysis of the data showed that the release of phosphorus and calcium was associated with the reduction in pH of culture media. All fungi have the ability to release phosphorus and the ability of fungi was significantly higher in the 7% glucose concentration. The highest amount of solubilized phosphorus was obtained with inoculation of *Aspergillus terreus*, *Aspergillus calidoustus*, and *Alternaria botrytis* in the modified Pikovskaya culture medium with 7% glucose. The solubilized P concentration in 30th day of incubation was equal to 339.56, 334.19 and 334.64 mg L⁻¹ respectively. Also, the highest amount of the dissolved calcium in the medium with 7% glucose in *Aspergillus terreus* and *Aspergillus calidoustus* treatments was 423.36 and 403.36 mg L⁻¹ respectively. However, the highest electrical conductivity in the medium with 7% glucose was obtained in the cultivation of *Alternaria botrytis*, which was equal to 3.01 dS m⁻¹ in 30th day of incubation. The amount of the dissolved calcium and the electrical conductivity increased continuously over a period of time for thirty days. This may dependent on the pH reduction and mineral P solubilization by fungi. The analysis of biomass P in fungal hyphae showed that the fungi with lower ability in P release in solution had higher biomass P. The highest pH and biomass P was measured in the *Penicilium* sp. culture medium with the lowest EC and solubilized Ca. The lowest amount biomass P in 7% glucose in *Alternaria botrytis*, *Giberlla thapsina* and *Alternaria consortialis* treatments. This study revealed that mycorrhiza-like fungi had different methods in release of phosphorus from minerals and increase of P bioavailability in soil that can be used in the production of biofertilizers.

Keywords: Biological fertilizers, Endophytic mycorrhiza-like fungi, Phosphorus mineral

Ahadi N., Safari singani A.K., Aletaha R. 2021 .Evaluation of capability of fifteen isolates of mycorrhiza-like endophytic fungi on release of phosphorous from phosphorite mineral in the aquatic culture medium. *Applied Soil Research*. 9(2):87-101.

1.Ph.D. student, Department of Soil Science, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran

2.Professor, Department of Soil Science, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran

3.Ph.D. Graduate, Dept. of Soil Science, University of Bu-Ali Sina, Hamedan, Iran

* Corresponding Author Email: nesaahadi1993@gmail.com