[DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.19.73.219]

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 9:00 IRST on Tuesday September 26th 2017

جداسازی و شناسایی گونه‌های قارچ حل کننده فسفر از خاک‌های جنگلی اطراف کوه سپیدلار به‌روش ITS-PCR

غزاله سادات ذریه[۱]، ابراهیم ادهمی[*۱]، رضا نقی‌ها [۲]، حمیدرضا اولیایی[۱] و رضا مستوفی زاده قلمفرسا[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۲۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۴/۶)

چکیده

این مطالعه برای جداسازی و شناسایی گونه‌های قارچی حل کننده فسفر و ارزیابی توانایی آنها به‌صورت کیفی و کمی آنها انجام شد. آزمایش بر ۵ نمونه خاک‌های جنگلی اطراف کوه سپیدلار استان کهگیلویه و بویراحمد انجام شد و توانایی قارچ‌های جداسازی شده در دو محیط کشت PVK و مایع بررسی گردید. آزمون کمی با تیمارهای قارچی شاهد، چهار جدایه و *آسپرجیلوس* نیجر با سه تکرار انجام شد. جدایه‌های برتر این دو محیط کشت توسط روش ITS-PCR شناسایی شد. از میان قارچ‌ها، ۴ قارچ هالهٔ بسیار بزرگ و روشن روی محیط کشت پیکواسکای ایجاد کردند. نتایج نشان داد که ترتیب مقدار فسفر محلول در قارچ‌های مورد مطالعه‌به‌صورت شاهد< قارچ ۴< قارچ ۳< قارچ ۲< *آسپرجیلوس نیجر*< قارچ ۱ بود. جدایه‌های برتر ۱ و ۲ به‌ترتیب قارچ *کلادوسپوریوم کلادوسپوریودس* و *ایوپنی‌سیلیوم روبیدوروم* شناسایی شدند. این اولین گزارش از توانایی این قارچ‌ها در سطح گونه برای انحلال فسفر است.

واژه‌های کلیدی: جداسازی، قارچ‌های حل کننده فسفر، PVK، محیط کشت مایع

۱. گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

۲. گروه علوم دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

۳. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

*: مسئول مکاتبات: پست الکترونیکی: eadhami@gmail.com

[DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.19.73.219]

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 9:00 IRST on Tuesday September 26th 2017

مقدمه

فسفر یکی از عناصر پرمصرف گیاه است (۸). روش متداول در کشور برای تأمین نیاز فسفری گیاهان زراعی مصرف کودهای شیمیایی فسفری است (۲). مصرف کودهای شیمیایی از یک سو دارای ایرادهایی از جمله: معایب کودهای شیمیایی، مسمومیت فسفری ناشی از جذب بیش از حد فسفر معدنی، به‌هم خوردن تعادل عناصر غذایی، کاهش برخی کاتیون‌های خاک، ازدیاد بار منفی خاک، کاهش عملکرد و تنزل کیفیت محصول، هزینه‌های بالای تولید آن و صدمات زیست محیطی است (۵). به‌کارگیری جانداران مفید خاکزی به عنوان کودهای زیستی امروزه به‌عنوان مطلوب‌ترین راه حل برای زنده و فعال نگه داشتن سیستم حیاتی خاک در اراضی کشاورزی، مطرح است (۲۷). کودهای زیستی به‌دست آمده از ریزجانداران می‌تواند به‌منظور افزایش محصول جایگزین بخشی از کودهای شیمیایی شود. این کودها از نظر هزینه ارزان‌تر بوده و بسیار سازگار با محیط می‌باشد (۴). ریزجانداران حل کنندهٔ فسفات در بیشتر خاک‌ها یافت شده است ولی تعداد آنها در خاک‌های مختلف با هم متفاوت بوده و بستگی به خاک، اقلیم و تاریخچه کشت دارد. (۱۹). ریزجانداران در محلول‌سازی فسفر از کمپلکس‌های فسفات کلسیم نقش دارند و تنها بخش کوچکی از فسفر را از ترکیبات فسفات آهن و فسفات آلومینیوم آزاد می‌سازند. از این رو ریزجانداران نقش مؤثرتری در خاک‌های آهکی دارند که این گونه خاک‌ها حاوی مقادیر فراوانی فسفات کلسیم می‌باشند (۳). بیشتر ریزجانداران حل کنندهٔ فسفات با استفاده از شرایط غیر بافری جداسازی شده‌اند، درحالی که خاک‌های قلیایی غنی از ترکیبات فسفات کلسیم توانایی بالای بافری دارند. توانایی بافری خاک‌ها می‌تواند انحلال فسفات‌های نامحلول توسط ریزجانداران حل کنندهٔ فسفات را محدود کند، بنابراین جداسازی این ریزجانداران از این خاک‌ها ممکن است به انتخاب ریزجانداران مؤثرتر منجر شود (۳۱). قارچ‌های حل کنندهٔ فسفر علاوه‌بر تبدیل فسفر غیرقابل دسترس به‌شکل قابل دسترس، سبب تولید مواد محرک رشد و اثر حفاظت کننده در برابر بیماری‌زاهای خاک هستند (۱۳). یکی از اولین گام‌ها در تهیه و استفاده از کودهای زیستی بررسی پتانسیل وجود آنها و استفاده از آنها در همان ناحیه است زیرا ریزجانداران جداسازی شده از یک ناحیه به شرایط محیطی خود سازگارتر بوده و کارایی بهتری خواهند داشت. گام مهم دیگر در بهره‌گرفتن از توان زیستی خاک رسیدن به یک ریزجاندار با توان حل کنندگی فسفات بالا و در ادامه تهیه زادمایه میکروبی است (۱۵). استان کهگیلویه و بویراحمد دارای جنگل‌های بلوط مسن است. ریشه‌های درختان با آزاد کردن ترکیبات آلی به محیط ریشه گیاه، سبب رشد و افزایش جامعه میکروبی خاک شده می‌شوند. در نتیجه منطقهٔ ریزوسفری شرایط مناسب برای رشد ریزجانداران خاکی را داراست و به‌ویژه در مناطق مجاور معادن سنگ فسفات استان، مناسب بررسی و جداسازی گونه‌های قارچی حل کنندهٔ فسفات است. با توجه به اهمیت قارچ‌های حل کنندهٔ فسفر و عدم وجود گزارش جداسازی این ریزجانداران از این منطقه، این پژوهش برای جداسازی قارچ‌های حل کنندهٔ خاک فسفات از خاک‌های جنگلی اطراف معدن خاک فسفات کوه سپیدلار و ارزیابی توانایی انحلال آنها در محیط کشت PVK و مایع و شناسایی جدایه‌های برتر با استفاده از PCR انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های خاک

پنج نمونه خاک از خاک‌های جنگلی اطراف معدن خاک فسفات کوه سپیدلار کهگیلویه و بویراحمد از عمق سطحی نمونه‌برداری شد. مقداری از نمونه جهت جداسازی قارچ و مخمر در یخچال نگهداری گردید و باقیماندهٔ خاک از الک ۲ میلی‌متری عبور داده شد و برای تعیین خصوصیات خاک استفاده گردید. خصوصیات خاک شامل بافت خاک به‌روش هیدرومتر، درصد مادهٔ آلی (OM) به‌روش اکسیداسیون با اسید کرومیک و سپس تیتره کردن با فروس آمونیوم سولفات، درصد کربنات کلسیم معادل (CCE) به‌روش خنثی سازی با اسید کلریدریک، pH در خمیر

[DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.19.73.219]

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 9:00 IRST on Tuesday September 26th 2017

جدول۱. برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه

نمونه	٪ رس	٪ سیلت	٪ شن	٪کربنات کلسیم معادل	٪ مادهٔ آلی	فسفر اولسن (mg/kg)	فسفر آلی بیکربنات (mg/kg)	pH
۱	۳۹/۰	۳۵/۲	۲۵/۸	۳۶/۲	۵/۷۹	۱۴/۶	۹/۲۷	۷/۶۰
۲	۳۳/۵	۵۹/۲	۷/۳۰	۴۶/۲	۹/۹۸	۱۷/۹	۱۳/۵۶	۷/۵۹
۳	۵۵/۵	۳۸/۷	۵/۸۰	۶۴/۴	۰/۳۴	۶/۷۵	۷/۸۰	۷/۷۱
۴	۴۳/۴	۲۹/۲	۲۷/۴	۵۵/۶	۲/۷۲	۱۰/۷	۲۱/۳	۷/۶۷
۵	۴۳/۵	۳۱/۲	۲۵/۳	۱۴/۴	۱/۳۶	۷/۳۰	۸/۴۰	۷/۴۶

اشباع، ظرفیت تبادل کاتیونی (CEC) به‌روش جانشینی کاتیون‌ها با استات سدیم و مقادیر فسفر به‌روش اولسن و فسفر آلی محلول در بیکربنات سدیم ۰/۵ مولار با pH برابر ۸/۵ انجام شد (۲۲) . خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه در جدول ۱ آمده است.

جداسازی قارچ‌ها و بررسی حل فسفر در محیط کشت پیکوواسکای

برای جداسازی ریزجانداران حل کنندهٔ فسفر در پنج ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری ۹۰ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی ریخته شده و پس از سترون نمودن توسط دستگاه اتوکلاو (رایپا، اسپانیا) (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع، مدت ۲۰ دقیقه) ۱۰ گرم خاک در هر ارلن اضافه گردید. به‌منظور تهیهٔ یک سوسپانسیون یکنواخت ارلن‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۲۰۰ دور در دقیقه تکان داده شد رقت‌های سریالی از هر نمونه در حجم نهایی ۱ میلی‌لیتر تهیه گردید و در سه تکرار از هر لولهٔ آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر برداشت شده و به محیط کشت پیکوواسکای (PVK) (۲۳) انتقال و کشت سفره‌ای داده شد. ترکیبات محیط کشت پیکواسکای در یک لیتر آب مقطر شامل ۱۰ گرم دکستروز آگار، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۲ گرم کلرید سدیم، ۵ گرم تری کلسیم فسفات، ۰/۵ گرم سولفات آمونیوم، ۰/۱ گرم سولفات منیزیم. هفت آب، ۰/۰۰۰۱ گرم سولفات منگنز. آب، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و ۱۸ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر بود. نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت یک هفته گرم خانه‌گذاری (انکوباتور بیندر، آلمان) شد.قارچ‌هایی که اطراف خود تشکیل هاله روشن دادند انتخاب شدند و به‌منظور خالص‌سازی و اطمینان از توانایی در تولید هاله کشت متوالی بر روی محیط کشت پیکوواسکای انجام شد. پرگنه‌های رشدیافته روی محیط کشت پیکواسکای از نظر تولید هاله در اطراف خود به‌صورت کیفی بررسی شدند. برای این‌منظور ۲+ یا ۳+ برای حالتی که قطر هاله بزرگ بود و و ۱+ برای قارچ‌های با قطر هاله کوچک‌تر در نظر گرفته شد. قارچ‌های دارای هاله بزرگ‌تر در ارزیابی مرحله بعد محیط کشت مایع انتخاب شدند. ارزیابی انحلال فسفر در محیط کشت مایع به‌صورت طرح پایه کاملاً تصادفی با شش سطح قارچ (شاهد، چهار قارچ انتخاب شده براساس قطر هالهٔ روی محیط کشت پیکواسکای و *آسپرژیلوس نیجر*) در سه تکرار انجام شد. ترکیبات محیط کشت مایع پایه BM (Basal medium) در یک لیتر آب مقطر عبارت از: ۰/۴ گرم کلرید آمونیوم، ۰/۷۸ گرم نیترات پتاسیم، ۰/۱گرم کلرید سدیم، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم دو آبه، ۰/۵گرم سولفات منیزیم هفت آبه ، ۰/۵ میلی‌گرم سولفات آهن (II) هفت آبه، ۱/۵۶ میلی‌گرم سولفات منگنز یک آبه، ۱/۴ میلی‌گرم سولفات روی هفت آبه، ۳۰ گرم گلوکز بود (۲۵). منبع فسفر در این محیط تری کلسیم فسفات ($Ca_3(PO_4)_2$) به عنوان منبع نامحلول فسفر به‌میزان ۴ گرم در لیتر بود. یک محیط کشت نیز بدون افزودن فسفر به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. تمامی

[DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.19.73.219]
Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 9:00 IRST on Tuesday September 26th 2017

مواد به استثناء ویتامین B۱۲، وزن شدند و در ارلن‌های ۱۰۰۰ میلی‌لیتری به‌همراه آب مقطر ریخته شدند. ارلن‌ها به‌داخل اتوکلاو انتقال یافتند و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتی‌متر مربع به‌مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند. پس از پایین آمدن دمای ارلن‌ها، ویتامین B۱۲ به محیط کشت اضافه گردید. صد میلی‌لیتر از محیط کشت ساخته شده در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتر ریخته شد. بر اساس پژوهش ریس و همکاران (۲۵)، جمعیت یکسان از هر گونه که حاوی $۱۰^{۷} \times ۵$-۱ در میلی‌لیتر کنیدی قارچ باشد، می‌بایست به محیط کشت انتقال یابد. به‌همین منظور، دیسک‌هایی با قطر ۶ میلی‌متر (۵ عدد) از محیط کشت آگار دکستروز سیب زمینی حاوی $۱۰^{۷} \times ۵$-۱ کنیدی به محیط کشت مایع پایه در ظروف ارلن مایر مایه‌زنی و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۱۵۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۰ روز در انکوباتور شیکردار (بیندر، آلمان) (تا در طول این مدت هوا دهی کافی برای فعالیت قارچ تأمین شود) گرم خانه‌گذاری گردید. در فواصل زمانی ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز، ۱۰ میلی‌لیتر از محتویات هر ارلن در زیر هود و در کنار شعله برداشته شد و در لولهٔ آزمایش ریخته و در g ۵۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (سیگما، ژاپن) گشت و با کاغذ صافی واتمن ۴۲ صاف شد. مقدار فسفر محلول به‌روش وانادومولیبدات (روش آبی) و pH با pH متر اندازه‌گیری گردید.

شناسایی قارچ

از قارچ‌های جداسازی شده از محیط اولیه دو قارچ که بیشترین توانایی را در مقایسه با *آسپرژیلوس نیجر* نشان داد برای شناسایی برگزیده گشت. این دو جدایه شامل جدایه۱ (جداسازی شده از خاک شماره ۱) و جدایه۲ (جداسازی شده از خاک شماره ۴) بودند.

شناسایی میکروسکوپی قارچ‌ها

شناسایی قارچ‌ها و رنگ آمیزی آن: برای تشخیص اولیه نمونه‌های قارچی، از مشاهده مستقیم نمونه‌ها استفاده شد. در آزمایش میکروسکوپی، برای مشاهده اسلایدها در زیر میکروسکوپ از روش رنگ‌آمیزی با رنگ لاکتو فنل کاتن بلو استفاده شد.

شناسایی قارچ به‌روش ITS-PCR

آماده سازی قارچ برای استخراج DNA: قطعاتی به قطر تقریبی پنج میلی‌متر از حاشیهٔ جوان پرگنه‌های جدایه‌ها را انتخاب و به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری شامل ۵۰ میلی‌لیتر عصارهٔ سترون شدهٔ سیب‌زمینی منتقل شد. فلاسک‌ها به‌مدت ده روز در ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از ده روز محتویات هر فلاسک در تشتک‌های پتری سترون خالی و پرگنه‌ها با استفاده از آب مقطر سترون شسته شدند. میسلیوم‌ها با استفاده از سوزن‌های سترون از قطعات محیط کشت آگاردار جدا شده، داخل لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفته و پس از یخ زدن به‌کمک ازت مایع، لوله‌های اپندورف به‌مدت ۲۴ ساعت سرما خشک شدند.

تهیهٔ عصاره یاخته: به پنج میلی‌گرم از میسلیوم (سرما خشک شده) هر جدایه، ۱۸۰ میکرولیتر از بافر استخراج شامل ۵۰۰ میکرولیتر بافر سی‌تب (CTAB) (۰/۱۲۱ گرم تریس، ۰/۰۷۴ گرم ای- دی- تی- آ، ۰/۸۱۸ گرم نمک طعام، ۰/۲ گرم سی‌تب، آب مقطر تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر) شامل ۰/۲ درصد ۲- مرکاپتواتانول و ۰/۲ درصد پروتئینازِکی (فرمنتاز، بریتانیا) افزوده شده، میسلیوم‌ها با استفاده از هموژنایزر و چند دانه ماسهٔ سترون به‌خوبی ساییده شدند. عصاره به‌دست آمده به‌مدت یک ساعت در ۶۵ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس به‌مدت ده دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانترفیوژ گردید و مایع رویی برداشته شد (۲۰).

استخراج DNA قارچی

استخراج DNA از ۱۰۰ میکرولیتر عصارهٔ یاخته به‌دست آمده، با استفاده از کیت DNA™-PLUS (سیناژن، ایران) انجام گرفت. قبل از استفاده، کیت را به‌مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس ۴۰۰ میکرولیتر از آن را به عصارهٔ

[DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.19.73.219]

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 9:00 IRST on Tuesday September 26th 2017

جدول ۲. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بهینه‌سازی شده با آغازگرهای عمومی (۱۰ ؛ ۳۰)

ترکیب آغازگرها	طول قطعه تکثیری	واسرشتگی ابتدایی (ثانیه)	تعداد چرخه	واسرشتگی	هم‌جوشی	گسترش	گسترش نهایی
ITS4,1[1]	۷۵۰[2] و ۴۲۰	۹۴[3] (۱۸۰ [4])	۳۰	۹۵ (۳۰)	۵۰ (۳۰)	۷۲ (۶۰)	۷۲ (۶۰۰)

۱- ترکیب ITS4,1 ،. ۲- جفت‌باز، ۳- دما (درجه سانتی‌گراد) و ۴- زمان (ثانیه)

یاخته اضافه کرده و ۱۵ تا ۲۰ ثانیه ورتکس کرده و سپس ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول الکل اضافه شد. مجدداً محلول به‌مدت ۵ ثانیه ورتکس شد تا کیت با ایزوپروپانول به‌خوبی مخلوط شود. در این مرحله لوله‌های اپندورف را در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله بعد محتویات ریزلوله‌ها به‌مدت ده دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانترفیوژ گردید و مایع رویی خالی و سر لوله‌های اپندورف خشک گردید و ریزلوله‌ها به‌مدت ۱۰ ثانیه با درب باز روی دستمال کاغذی قرار داده شد. سپس به هر نمونه ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه گردید و ۲-۳ ثانیه تکان داده شد. در مرحله بعد محتویات لوله‌های اپندورف به‌مدت پنج دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور سانترفیوژ گردید و مایع رویی خالی و سر لوله‌های اپندورف خشک گردید و لوله‌های اپندورف به‌مدت ۲۰ دقیقه با درب باز روی دستمال کاغذی در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شد. رسوب DNA در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و به‌مدت یک ساعت در ۳۷°C قرار داده شد. دی- ان- ای حاصل در ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تعیین کیفیت و کمیت DNA استخراج شده: پس از استخراج DNA از نمونه‌ها، کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (نانودراپ تکنولوژی، آمریکا) در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی گردید.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR)

برای شناسایی گونه قارچ‌های جداسازی شده براساس پرایمرهای موجود در جدول ۲ استفاده گردید (۳۰) مواد مورد استفاده مخلوطی حاوی۵۰ نانوگرم از DNA قالب، یک میکرومول از هر آغازگر، ۱۰۰میکرومول dNTPs، ۰/۴ میکرومول Taq DNA polymerase (فرمنتاز، بریتانیا)، ۱/۵ میکرومول MgC۱، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (۲۰۰ میلی‌مول Tris-HC۱ با pH=۸ و ۵۰۰ میلی‌مول KC۱) و ۱۰۰ میکرومول BSA (bovine serum albomine) برای واکنش‌های ۲۵ میکرولیتری تهیه شد. در این آزمون برای اطمینان از عدم آلودگی مواد مصرفی و واکنش‌ها، در هر دور آزمایش نمونهٔ شاهد فاقد DNA به کار برده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای عمومی انجام شد. چرخه‌های دمایی و میزان دما طبق گزارش طراحان آغازگرهای عمومی (جدول ۲ و ۳) تنظیم گردید (۱۰، ۳۰).

ژل الکتروفورز به‌صورت ۱ درصد در بافر TAE (۶۰ میلی‌لیتر) تهیه شده و در تانک حاوی TAE قرار داده شد. سپس در اولین چاهک از مارکر (bp۱۰۰) و در چاهک‌های بعدی نمونه و کنترل منفی و شاهد ریخته شد (۹ میکرولیتر از محصولات PCR با ۲ میکرولیتر از Loading dye مخلوط می‌شد). سپس ولتاژ ۸۰ به‌مدت ۶۰ دقیقه جهت حرکت مولکول‌های DNA و جداسازی آنها اعمال و در دستگاه ترانسلومیناتور مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی توالی ژنی

برای شناسایی گونه قارچ ۱ قطعه تکثیری به‌طول تقریبی bp ۷۵۰ و گونه قارچ۲ به‌طول ۴۲۰bp تعیین توالی (Macrogen, Korea) شدند. توالی به‌دست آمده با استفاده از BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) با سایر توالی‌های ژنی موجود در بانک ژن NCBI (National Centre for

[DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.19.73.219]

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 9:00 IRST on Tuesday September 26th 2017

Biotechnology Information) مورد بررسی و ردیف‌سازی قرار گرفت. ردیف بازهای آلی آغازگر برای ITS1 و ITS4 به‌ترتیب TCCGTAGGTGAACCTGCGG و TCCTCCGCTTATTGATATGC بود.

نتایج وبحث

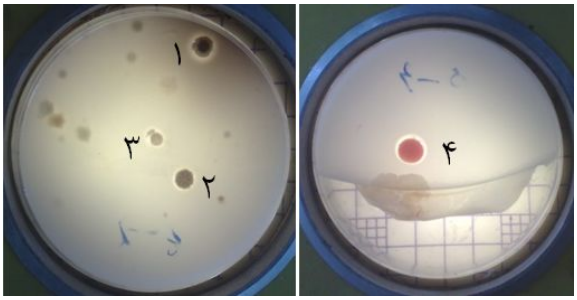
خصوصیات خاک‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. هر پنج نمونه خاک مورد مطالعه دارای بافت سنگین بودند و مقدار رس آنها از ۳۳ تا ۵۵ درصد متغیر بود. خاک ۱ دارای ۳۹ درصد رس، ۳۵/۲ درصد سیلت و ۲۵/۸ درصد شن در کلاس بافت لوم رسی قرار گرفت و خاک ۲ با ۳۳/۴ درصد رس، ۵۹/۳۲ درصد سیلت و ۷/۲۸ درصد شن در کلاس بافت لوم رسی سیلت بود. هر سه نمونه خاک‌های شماره ۳، ۴ و ۵ به‌ترتیب با درصد رس ۵۵/۴، ۴۳/۴ و ۴۳/۴، درصد سیلت ۳۸/۷۶، ۲۹/۳ و ۳۱/۳ و درصد شن ۵/۸۴، ۲۷/۳ و ۲۵/۳ در کلاس بافت رسی جای گرفتند. مقدار مادهٔ آلی در خاک‌های مورد مطالعه از ۰/۳۴ (خاک شماره ۳) تا ۹/۹۸ (خاک شماره ۲) درصد متغیر بود. ماده آلی خاک ۳ (۰/۳۴) < خاک ۵ (۱/۳۶) < خاک ۴ (۲/۷۲) < خاک ۱ (۵/۷۹) < خاک ۲ (۹/۹۸) بود. ماده آلی خاک به‌عنوان یکی از خصوصیات مهم خاک تحت تأثیر عواملی از جمله پوشش گیاهی، خصوصیات خاک و اقلیم منطقه بوده و در صورتی که میزان آن در خاک از ۲ درصد بیشتر باشد می‌تواند به‌عنوان یک عامل غالب در تعیین رفتار طیفی خاک مؤثر باشد. مقدار ماده آلی در بیشتر از ۶۰ درصد خاک‌های زیر کشت ایران کمتر از یک درصد و در بخش قابل توجهی از آنها کمتر از ۰/۵ درصد است. بنابراین خاک‌های شماره ۱ و ۲ از جمله خاک‌های غنی از ماده آلی هستند زیرا که در مقایسه با میزان ماده آلی خاک‌های مناطق خشک و نیمه خشک، خاک شماره ۱ به‌طور تقریبی در حدود ۵/۵ تا ۱۲ برابر و در مقایسه با خاک شماره ۲ نیز تقریباً ۱۰ تا ۲۰ برابر ماده آلی بیشتر است. وجود ماده آلی حتی به‌میزان کم بر ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک خاک تأثیر زیادی دارد. ماده آلی، منبع غذا و انرژی برای ریزجانداران خاک است. کمترین میزان کربنات کلسیم در خاک شماره ۵ و بیشترین در خاک شماره ۳ مشاهده شد. تغییرات pH خاک بسیار کم بود (۷/۷۱ – ۷/۴۶). بیشترین و کمترین pH به‌ترتیب مربوط به خاک شماره ۵ و ۳ بود. مقدار فسفر به‌روش اولسن در خاک‌های مورد مطالعه از ۶/۷ تا ۱۸ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک متغیر بود و مقدار فسفر آلی در بیکربنات سدیم نیز از ۷/۸ تا ۲۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک بود. این نتیجه نشان می‌دهد که خاک‌های مورد مطالعه دارای مقدار زیادی فسفر قابل جذب گیاه هستند و مجموع فسفر آلی و معدنی محلول در بیکربنات سدیم تا حدود ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک در برخی از آنها رسید. معمولا مقدار فسفر به‌روش اولسن در خاک‌های کود نخورده بسیار کم می‌باشد (۱۶). در پژوهشی که توسط خان‌میرزایی و همکاران (۱۶) در جنگل‌های گربایگان فسا انجام شده، مقدار فسفر به‌روش اولسن و فسفر آلی عصاره‌گیری شده با بیکربنات را کمتر از ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم خاک گزارش کردند. مقادیر به‌دست آمده در آزمایش حاضر، بیانگر غنی بودن خاک‌های مورد مطالعه از ترکیبات فسفر محلول و فعال بودن سازوکارهای حل فسفر در این خاک‌ها بود.

جداسازی قارچ‌ها از خاک

قارچ‌های مورد مطالعه در محیط کشت پیکوواسکای پس از گذشت ۵ روز در اطراف خود تشکیل هاله روشن دادند که در شکل ۱ قابل مشاهده است. اندازه‌گیری توانایی قارچ‌ها به‌صورت کیفی و براساس قطر هاله ایجادی به‌صورت مقایسه‌ای بین قارچ‌ها تعیین شد که جدایه $^{+++}$۱ = جدایه $^{+++}$۲ > جدایه $^{++}$۴ = جدایه $^{++}$۳ شد. قارچ‌های جداسازی شده در محیط کشت پیکوواسکای در شکل زیر قابل مشاهده است.

قارچ‌های مورد استفاده در مطالعه حاضر پس از ۵ روز هاله روشن را در اطراف خود نشان دادند که احتمالاً نشان می‌دهد قارچ‌های جداسازی شده در مطالعه حاضر توانایی بالایی برای انحلال فسفر معدنی نامحلول دارند. ایلمر و شینر نیز در پژوهشی دو گونه از ریزجانداران حل کننده فسفات را از خاک‌های جنگلی جداسازی کردند *پنی‌سیلیوم آرانتیگوریزوم* و

[DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.19.73.219]
Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 9:00 IRST on Tuesday September 26th 2017



شکل ۱. تشکیل هاله روشن در اطراف قارچ‌ها پس از پنج روز

سودوموناس داشتن توانایی‌های بالای این ۲ گونه در حل فسفات معدنی سبب گردید که برای بررسی مکانیزم انحلال نیز مورد استفاده قرار گیرند (۱۴).

در پژوهشی که توسط عمر انجام گردید، در مجموع ۳۶ گونه قارچ از خاک جدا شد که برای توانایی حل خاک فسفات (RP) در پلیت آگار مورد بررسی قرار گرفت. بسیاری از این قارچ‌ها حل کننده خاک فسفات نبودند، لیکن دو نمونه، *آسپرژیلوس نیجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینیوم* توانایی بالایی داشتند (۲۱). این دو گونه قارچ در محیط کشت پیکواسکای بعد از گذشت ۱۰ روز در اطراف خود هاله تولید کردند ردی و همکاران (۲۴)، نیز قارچ‌های جداسازی شده را برای بررسی حل تری کلسیم فسفات در محیط کشت پیکواسکای مورد آزمایش قرار دادند که از این میان بیشترین حل مربوط به ۵ جدایه قارچ *آسپرژیلوس* بود.

ارزیابی حل فسفر در محیط کشت مایع

در پژوهش حاضر در محیط کشت مایع از تری کلسیم فسفات (۴ گرم در لیتر) به‌عنوان منبع فسفر استفاده شد. نتایج حاصل از جداسازی قارچ‌های حل کننده فسفر نشان داد که دو نمونه از خاک‌ها دارای قارچ‌های حل کننده فسفر با قدرت حل زیاد بودند. از نمونه خاک‌های ۱ و ۴ هر کدام ۲ قارچ ریسه‌ای با هاله روشن بزرگ جداسازی شد. بسیاری از مطالعات در مورد حل کننده‌های فسفر از تری کلسیم فسفات (۲۴)، فلوئور آپاتیت و هیدروکسی آپاتیت (۲۵)، کلسیم هیدروژن فسفات و هیدروکسی آپاتیت تازه رسوب کرده برای بررسی توانایی ریزجانداران برای حل نمودن فسفر استفاده شده است (۶). مقادیر حاصل از بررسی کمی حل شدن تری کلسیم فسفات در محیط کشت مایع و pH اندازه‌گیری شده برای ۵ نوع قارچ تلقیح شده و نمونه شاهد، در جدول۳ آمده است.

بیشترین انحلال فسفر در روز ۵ به‌ترتیب شامل تیمار جدایه ۱ > *آسپرژیلوس نیجر* > جدایه ۲ > جدایه ۴ > جدایه ۳ > شاهد بود. این ترتیب انحلال مقادیر فسفر، در روز ۱۰، جدایه ۱ > *آسپرژیلوس نیجر* > جدایه ۲ (۳۵۶) > جدایه ۴ > جدایه ۳ > شاهد (۱۵/۳)، در روز ۱۵، جدایه ۱ > *آسپرژیلوس نیجر* > جدایه ۲ > جدایه ۳ > جدایه ۴ > شاهد و در روز ۲۰، *آسپرژیلوس نیجر* > جدایه ۱ > جدایه ۲ > جدایه ۳ > جدایه ۴ > شاهد بود (جدول۳). میزان حل شدن فسفر توسط قارچ‌های جداسازی شده نسبت به شاهد، افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد و با افزایش زمان از ۵ روز به ۲۰ روز، انحلال فسفر افزایش یافت (جدول۳)، به‌طوری که میانگین فسفر انحلال یافته در تیمار شاهد (بدون قارچ) در روزهای ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ به‌ترتیب ۸/۵۹، ۱۵/۳، ۱۷/۱ و ۲۸/۹ بود لیکن برای جدایه ۱ که بیشترین انحلال فسفر را داشت ۲۵۹، ۴۸۲، ۸۹۲ و ۵۷۶ به‌دست آمد. محدوده انحلال فسفر در تیمار فاقد قارچ (شاهد) در محدوده ۸/۵۹ تا ۲۸/۹، در قارچ *آسپرژیلوس نیجر* از ۲۲۲ تا ۷۲۲، در قارچ ۱ از ۲۵۹ تا ۸۹۲، در جدایه ۲ از ۱۱۶ تا ۴۸۳، در جدایه ۳ از ۱۴/۸ تا ۱۶۶ و در جدایه ۴ از ۲۶/۹ تا ۵۹/۹ میلی‌گرم بر لیتر بود. بیشترین مقدار انحلال فسفر در جدایه ۱ انجام شد که ۸۹۲ میلی‌گرم بر لیتر بود. این قارچ توانایی انحلال فسفر را در تمام مراحل به‌جز روز ۲۰، بیشتر از

[DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.19.73.219]

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 9:00 IRST on Tuesday September 26th 2017

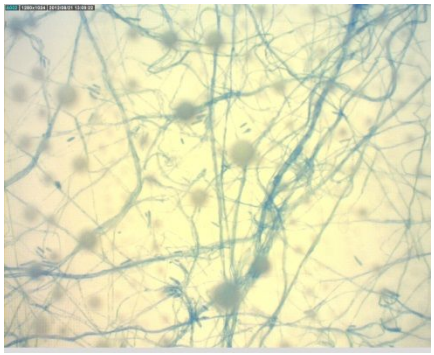
جدول۳. pH محیط کشت و مقدار فسفر حل شده در زمان‌های مختلف توسط قارچ‌های انتخاب شده

تیمار قارچ	pH				فسفر محلول (میلی‌گرم بر لیتر)			
	زمان (روز)				زمان (روز)			
	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۵	۱۰	۱۵	۲۰
شاهد	۶/۴۰	۵/۵۲	۶/۰۸	۵/۹۴	۸/۵۹	۱۵/۳	۱۷/۱	۲۸/۹
آسپرژیلوس	۴/۳۴	۳/۷۶	۵/۱۸	۴/۸۸	۲۲۲	۴۲۹	۴۱۶	۷۲۲
۱	۴/۴۶	۴/۲۱	۴/۲۵	۴/۳۶	۲۵۹	۴۸۲	۸۹۲	۵۷۶
۲	۴/۹۰	۴/۲۳	۴/۲۴	۴/۱۶	۱۱۶	۳۵۶	۳۴۸	۴۸۳
۳	۵/۶۱	۵/۶۷	۵/۷۷	۵/۴۲	۱۴/۸	۲۵/۱	۸۳/۰	۱۶۶
۴	۵/۸۶	۵/۶۱	۵/۵۰	۵/۱۷	۲۶/۹	۳۵/۵	۴۲/۸	۵۹/۹

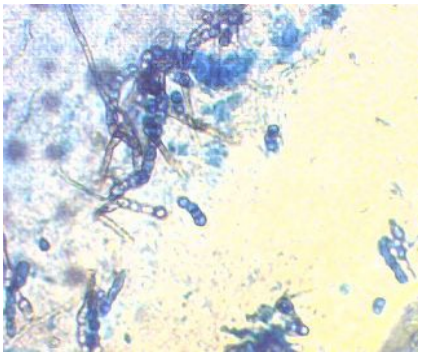
قارچ *آسپرژیلوس نیجر* نشان داد. جدایه ۱، *آسپرژیلوس نیجر* و جدایه ۲ تفاوت معنی‌داری در تمامی روزها نسبت به سایر قارچ‌ها داشتند، که می‌توان نتیجه گرفت که توانایی حل فسفات در این گونه‌های قارچ بسیار بالاتر بود. حل شدن انواع خاک فسفات توسط *آسپرژیلوس نیجر* قبلاً توسط محققان زیادی گزارش شده است (۷). انحلال فسفر به‌وسیله قارچ، به‌خصوص دربارهٔ *آسپرژیلوس* و به‌ویژه گونه‌های گروه *بلک* که شامل *آسپرژیلوس نیجر*، *آسپرژیلوس آوامری*، *آسپرژیلوس توبینجنسیس* و *آسپرژیلوس آکالاتوس* می‌باشد و برخی گونه‌های *پنی‌سیلیوم* گزارش شده است (۱۱). عمر (۲۱)، توانایی قارچ برای انحلال خاک فسفات در محیط کشت مایع در طی غربالگری قارچ برای توانایی‌شان در انحلال خاک فسفات، دو قارچ جدا شده، یعنی *آسپرژیلوس نیجر* و *پنی‌سیلیوم سیترینیوم* را به‌عنوان بهترین حل کننده خاک فسفات در بین ۳۶ قارچ معرفی کرد. جوریزی (۱) گزارش نمود که در جنس *آسپرژیلوس*، گونه نیجر در هر سه نوع منبع فسفر (تری کلسیم فسفات، خاک فسفات خام و خالص) باعث افزایش معنی‌دار در انحلال فسفر نسبت به سه گونه دیگر گردید. به‌همین دلیل از قارچ *آسپرژیلوس نیجر* برای مقایسه توانایی انحلال قارچ‌های جداسازی شده استفاده گردید. محدوده pH به‌ترتیب در محیط رشد قارچ *آسپرژیلوس نیجر*، ۳/۷۶ تا ۵/۱۸ بود. این محدوده در جدایه‌های یک تا چهار به‌ترتیب ۴/۲۱ تا ۴/۴۶ ، ۴/۱۶ تا ۴/۹۰، ۵/۴۲ تا ۵/۷۷ و ۵/۱۷ تا ۵/۸۶ به‌دست آمد. کمترین تغییرات محدوده pH برای تیمارها به‌ترتیب جدایه ۱ < جدایه ۳ < جدایه ۴ < جدایه ۲ < شاهد < *آسپرژیلوس نیجر* بود. جدایه ۱ با pH ۴/۳۲ دارای کمترین میانگین pH و بیشترین توانایی انحلال فسفر شد. در حالی که جدایه ۲ با میانگین pH کمتر از *آسپرژیلوس نیجر*، توانایی انحلال فسفر کمتری داشت. این نتیجه نشان می‌دهد کاهش pH محیط رشد به‌تنهایی مسئول حل شدن فسفر در محیط رشد قارچ نمی‌باشد. کیوسی (۱۷) نیز گزارش نمود که رابطه‌ای بین کاهش pH و افزایش حل شدن فسفر مشاهده نشد. قارچ‌های حل کننده فسفات سازوکارهای متفاوتی را برای انحلال ترکیبات فسفر استفاده می‌کنند که برای نمونه می‌توان از اسیدی کردن و کلاته کردن و یا تولید فیتو هورمون‌هایی مثل اسید ایندول استیک (IAA) نام برد (۱۸). در بین سازوکارهای انحلال فسفات، تولید اسیدهای آلی به‌عنوان مکانیسم اصلی انحلال، مورد قبول اکثر محققین قرار گرفته است (۲۷). سورنگ (۲۸)، گزارش نمود که میزان تری کلسیم فسفات حل شده توسط قارچ‌های جداسازی شده از خاک‌های جنگلی از ۰/۲۱ تا ۰/۹۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. داس (۱۲) گزارش کرد که ۱۸ جدایه جداسازی شده از خاک در محیط کشت تأمین شده با KH_2PO_4، $AlPO_4$، $FePO_4$

[DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.19.73.219]

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 9:00 IRST on Tuesday September 26th 2017



شکل ۲. جدایه ۱ (مشکوک به کلادوسپوریوم)



شکل ۳. جدایه ۲ (مشکوک به ایوپنی‌سیلیوم)

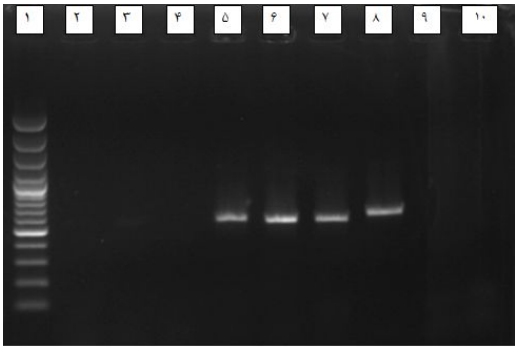
یا $Ca_3(PO_4)_2$ میزان فسفر از صفر تا ۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و پ- هاش نهایی از ۲/۵ تا ۷/۸ بود. چونکار و سوبارائو، (۹) انحلال تری کلسیم فسفات به‌وسیله قارچ‌های حاصل از غده‌های ریشهٔ لگوم را از صفر تا ۳۹ درصد از فسفر موجود در محیط گزارش نمودند

افزایش فراهمی فسفر به‌وسیلهٔ قارچ ممکن است با توجه به نوع فسفر و جدایه قارچ متفاوت باشد. ویاس و همکاران (۲۹)، گزارش کردند که نرخ فسفات حل شده توسط *ایوپنسیلیوم پاروم* در محدودهٔ ۲۱۳/۷- ۱۲۰/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به‌طور متوسط ۲۱۴-۱۲۱ درصد بیشتر از شاهد قرار داشت. مطالعات نشان می‌دهد که قارچ‌های حل کنندهٔ فسفر جایگزینی مناسب برای به حداکثر رساندن استفاده از فسفر هستند. پس از این دوره، تا روز ۱۰ مقادیر انحلال فسفر کاهش یافت. این کاهش در دسترس بودن فسفر می‌تواند به‌دلیل افزایش توسعه قارچی باشد که سبب افزایش جذب فسفات حل شده توسط قارچ برای رشد خود در هر دو مرحله رویشی و تولید مثل، می‌شود. حداکثر انحلال در روز هفتم پس از تلقیح، در پژوهشی که توسط میتال و همکاران (۱۹)، تأیید شد، که افزایش انحلال فسفر از تری کلسیم فسفات و خاک فسفات هند (به‌ترتیب ۴/۷ و ۲۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر) برای *آسپرژیلوس* را نشان داد. سابر و همکاران (۲۶) نیز گزارش نمودند که حداکثر حلالیت فسفر از خاک فسفات مصر برای *آسپرژیلوس نیجر* ۶۷ میکروگرم در میلی‌لیتر و برای *پنی‌سیلیوم* ۴۶/۲ میکروگرم در میلی‌لیتر در روز هفتم پس از آزمایش حاصل شد. حداکثر انحلال در جدایه ۱، *آسپرژیلوس نیجر* و جدایه ۲ به‌ترتیب ۸۹۲، ۷۲۲ و ۴۸۳ میلی‌گرم بر لیتر به‌دست آمد که در مقایسه با پژوهش‌های محققان ذکر شده به‌مراتب بیشتر بود. بنابراین علاوه‌بر توانایی انحلال جدایه‌ها در دو محیط کشت جامد پیکوواسکای و محیط کشت مایه پایه که این دو جدایه قابل ارزش شناسایی و استفاده برای تحقیقات بعدی درباره فسفر پیشنهاد شد، جدایه ۱ حتی توانایی بالاتری نسبت به قارچ آسپرزیلوس (که در بیشتر تحقیقات به‌عنوان قارچی با قدرت بالای انحلال فسفر معرفی شده) نشان داد از این رو با شناسایی و شناخت خصوصیات این دو جدایه می‌توان آنها را به‌عنوان قارچ‌های حل کننده فسفر و جایگزینی مناسب برای قارچ *آسپرژیلوس نیجر* معرفی نمود.

شناسایی جدایه‌ها

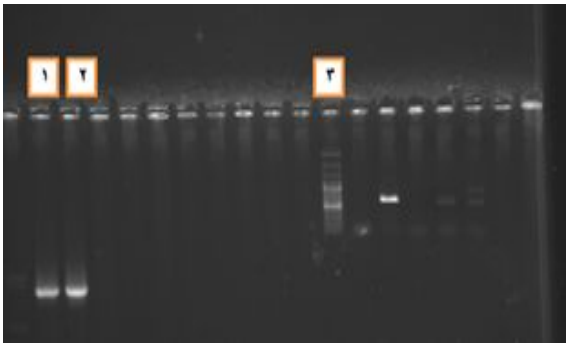
شناسایی میکروسکوپی این گونه‌ها با استفاده از رنگ آمیزی با لاکتوفنل صورت گرفت که با توجه به تصاویر میکروسکوپی (شکل ۲ و ۳) به دو جنس *کلادوسپوریوم* و *ایوپنی‌سیلیوم* نزدیک بود. در قارچ مشکوک به *ایوپنی‌سیلیوم* رنگ پرگنه‌ها سفید برفی مشاهده شد. کنیدیوفورها منشعب بوده و حباب انتهایی مشخص روی کنیدیوفورها وجود نداشت. همچنین دیوارهٔ آسکوکارپ ضخیم بود. در قارچ مشکوک به *کلادوسپوریوم* رنگ پرگنه‌ها زیتونی تیره، میسلیوم‌ها رویشی منشعب و دارای تیغهٔ میانی بودند. کنیدیوفورها مستقیم و کشیده

[DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.19.73.219]
Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 9:00 IRST on Tuesday September 26th 2017



شکل ۴ باند مربوط به جدایه ۲

(چاهک ۱، مارکر و چاهک شماره ۲ تا ۴ رقت‌های نمونه است که غلظت پایینی داشته و باند نداده است. چاهک شماره ۵ تا ۷ رقت‌های جدایه‌ی ۲ است که غلظت مطلوبی داشته و باند داده است. چاهک شماره ۸ و ۹ کنترل مثبت است که یکی از آن‌ها باند داده است و چاهک آخر هم کنترل منفی است).



شکل ۵. باند مربوط به جدایه ۱

(چاهک شماره ۱ و ۲ باند مربوط به جدایه) پس از انجام PCR و ردیف‌یابی، جدایه ۱، گونهٔ *کلادوسپوریوم کلادوسپوریودس* با احتمال ۱۰۰ درصد و در مجموع ۹۰۴ گزارش با شماره ردیابی KM246242.1 و جدایه ۲، گونهٔ *ایوپنی‌سیلیوم روبیدوروم* با احتمال ۹۹ درصد و در مجموع ۱۰۵۷ با شماره ردیابی HQ608058 مورد شناسایی شد.

و تیغهٔ میانی کاملا سیاه بود و در مجموع منظره‌ای شبیه درخت را به‌وجود آوردند. کندی‌ها بیضی شکل بودند و در رأس کندیوفورها دیده می‌شدند. کندیوم‌ها حالت زنجیره‌ای منشعب را به‌خود گرفته بودند.

باندهای دی- ان- ای حاصل از الکتروفورز

هر دو جدایه ۱ و ۲ در مرحله الکتروفورز باندهای شفاف و روشنی را نشان دادند و برای بررسی تعیین توالی DNA مناسب بودند (شکلهای ۴ و ۵).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از جداسازی قارچ‌های حل کننده فسفر نشان داد که دو نمونه از خاک‌ها دارای قارچ‌های حل کننده فسفر با قدرت حل زیاد بودند. از نمونه خاک‌های ۱ و ۴ هر کدام ۲ قارچ ریسه‌ای با هاله روشن بزرگ جداسازی شد. در محیط کشت مایع میزان حل شدن فسفر توسط قارچ‌های جداسازی شده نسبت به شاهد، افزایش قابل ملاحظه‌ای را نشان داد و با افزایش زمان از ۵ روز به ۲۰ روز، انحلال فسفر افزایش یافت. نتایج نشان داد که ترتیب مقدار فسفر محلول در قارچ‌های مورد مطالعه به‌صورت شاهد< قارچ ۴< قارچ ۳< قارچ ۲< *آسپرجیلوس نیجر*< قارچ ۱ بود. جدایه‌های برتر ۱ و ۲ به‌ترتیب قارچ *کلادوسپوریوم کلادوسپوریودس* و *ایوپنی‌سیلیوم روبیدوروم* شناسایی شدند. این اولین گزارش از توانایی این قارچ‌ها در سطح گونه برای انحلال فسفر است. پیشنهاد می‌گردد ارزیابی توانایی انحلال سنگ فسفات قارچ‌های جداسازی شده در محیط کشت طبیعی از بقایای آلی نیز بررسی گردد.

منابع مورد استفاده

۱. جوریزی، م. ۱۳۹۲. ارزیابی انحلال سنگ فسفات خام و خالص شده توسط قارچ‌های حل کننده فسفات. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج.

[DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.19.73.219]

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 9:00 IRST on Tuesday September 26th 2017

۲. حسن‌زاده، ا.، د. مظاهری، م. ر. چایی چی و ک. خاوازی. ۱۳۸٦. کارایی مصرف باکتری‌های تسهیل کننده جذب فسفر و کود شیمیایی فسفر بر عملکرد و اجزا عملکرد جو. مجله پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی ۷۷: ۱۱۸-۱۱۱.

۳. حمیدی آ.، ا. قلاوند، م. دهقان شعار ، م. ج. ملکوتی، ا. اصغرزاده، و ر. چوکان. ۱۳۸۵. اثرات کاربرد باکتری های محرک رشد گیاه (PGPR) بر عملکرد ذرت علوفه‌ای. پژوهش و سازندگی ۷۰(۱): ۲۲-۱۶.

۴. ساریخانی، م. ر. و م. ابراهیمی. ۱۳۸۹. کودهای زیستی فسفاته (باکتری‌های حل کننده فسفات – قارچ‌های میکوریزا). اولین کنگره چالش‌های کود در ایران: نیم قرن مصرف کود. ۱۰ تا ۱۲اسفند ۱۳۸۹. تهران.

۵. کریمیان، ن. ۱۳۷۷. پیامدهای زیاده روی در مصرف کودهای شیمیایی فسفری. مجله خاک و آب ۱۲(۴)۱۴-۱.

6. Barroso, C. B and E. Nahas. 2005. The status of soil phosphate fractions and the ability of fungi to dissolve hardly soluble phosphates. *Applied Soil Ecol*. 29: 73-83.
7. Bojinova, D., R. Velkova and R. Ivanova. 2008. Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. Bioresource Technol. 99: 7348-7353.
8. Bushman, L., J. Lamb, G. Randall, G. Rehm and M. Schmitt. 2009. The nature of phosphorous in soils. Phosphorous in agriculture environment. University of Minnesota.
9. Chhonkar, P. K. and N. S. Subba-Rao. 1967. Phosphate solubilization by fungi associated with legume root nodules. Can. J. Microbiol. 33: 749–753.
10. Cooke, D. E. L., A. Drenth, J. M. Duncan, G. Wagels and C. M. Brasiier. 2000. A molecular phylogeny of *phytophthora* and related Oomycetes. Fungal Genet. Biol. 30: 17-32.
11. Coutinho, F. P., W. P. Felix and A. M. Yano-Melo. 2012. Solubilization of phosphates in vitro by *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. Ecol. Eng. 42:85-89.
12. Das, A. C. 1963. Utilization of insoluble phosphate by soil fungi. J. Indian Soc. Soil Sci. 11: 195- 207.
13. Duponnois, R., M. Kisa, C. Olenchette. 2006. Phosphate solubilizing potential of the nemato fungus *Arthrobotrys oligospore*. J. Plant Nutr. Soil Sci. 169: 280-282.
14. Illmer, P. and F. Schinner. 1995. Solubilization of inorganic calcium phosphates- solubilization mechanisms. Soil Biol. Biochem. 27: 257-263.
15. Illmer P., A. Barbato and F. Schinner. 1995. Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms. Soil Biol. Biochem. 27: 265-270.
16. Khanmirzaei, A. E. Adami, S. A. Kowsar and A. M. Sameni. 2009. Organic and Inorganic Forms of phosphorus in a calcareous soil planted with four species of eucalyptus in southern Iran. Commun. Soil Sci. Plant Anal. 40: 3194-3210.
17. Kucey, R. M. N. 1983. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin alberta soils. Canadian J. Soil Sci. 63: 671-678.
18. Mehnaz, S. and G. Lazarovits. 2006. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under green house conditions. Microbial Ecol. 51: 326-335.
19. Mittal, V., O. Singh, H. Nayyar, J. Kaur and R. Tewari. 2008. Stimulatory effect of phosphate-solubilizing fungal strains (*Aspergillus awamori* and *Penicillium citrinum*) on the yield of chickpea (*Cicer arietinum* L. cv. GPF2). Soil Biol. Biochem. 40: 718-727.
20. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. and Z. Mirsoleimani. 2012. Species-specific identification and detection of *Phytophthora pistaciae*, the causal agent of pistachio gummosis. Phytopathologia Mediterranea 52: 30-45.
21. Omar, S. A. 1998. The role of rock phosphate solubilizing fungi and vesicular arbuscular mycorrhiza (VAM) in growth of wheat plants fertilized with rock phosphate. World J. Microbiol. Biotechnol. 14: 211-218.
22. Page, A. L., R. H. Miller and D.R. Keeney. 1982. Methods of soil analysis. Part 2, 2nd ed., Am Soc. Agron. Madison, WI.
23. Pikovskaya, R. I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. Mikrobiologia 17: 362-370.
24. Reddy, M. S., S. Kumar, K. Babita and M. S. Reddy. 2002. Biosolubilization of poorly soluble rock phosphates by *Aspergillus tubingensis* and *Aspergillus niger*. Bioresour. Technol. 84: 187-189.
25. Reyes, I., L. Bernier, R. R. Simard, H. Antoun. 1999. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. FEMS Microb. Ecol. 28: 281-290.
26. Saber, W. I. A., K. M. Ghanem and M. S. El-Hersh. 2009. Rock phosphate solubilization by two isolates of *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. and their promotion to mung bean plants. Res. J. Microbiol. 4: 235-250.

[DOI: 10.18869/acadpub.jstnar.19.73.219]

Downloaded from jstnar.iut.ac.ir at 9:00 IRST on Tuesday September 26th 2017

27. Sharma, A. K. 2002. Biofertilizers for sustainable agriculture. 407 PP. Agrobios (India).
28. Surange, S. M. 1985. Comparative phosphate solubilizing capacity of some soil fungi. Curr. Sci. India. 54: 1134-1135.
29. Vyas, P., P. Rahi, A. Chauhan, A. Gulati. 2007. Phosphate solubilization potential and stress tolerance of *Eupenicillium parvum* from tea soil. Mycol. Res. 111: 931-938.
30. White T. J., T. Bruns, S. Lee and J. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PP. 315-322. *In*: PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. M. A. Innis, D. (H. Gelfand, J. J. Sninsky and T. J. White, ed.), Academic Press, San Diego, CA, USA.
31. Yadav, J., J. P. Verma and K. N. Tiwari. 2011. Solubilization of tricalcium phosphate by fungus *Aspergillus niger* at different carbon source and salinity. Trends Appl. Sci. Res. 6: 606-613.