

جداسازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات از خاک‌های ایران و بررسی خصوصیات محرک رشد گیاهی در آنها

لاله فریدیان، ژیلای بهارلویی¹، علیرضا فلاح نصرت آباد و حسین کاری دولت‌آباد

دانشجوی دکتری گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان): laleh.faridian@gmail.com

استادیار گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان): jbahar5411@yahoo.com

دانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی: rezafayah@yahoo.com

استادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب؛ سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی: hossein.kari@gmail.com

ص 163 - 176

دریافت: 1400/5/31 و پذیرش: 1401/9/16

چکیده

کاربرد قارچ‌های حل‌کننده فسفات روشی بیولوژیک و دوست‌دار محیط زیست جهت افزایش فسفر قابل استفاده خاک از منابع نامحلول آن است. هدف این مطالعه دستیابی به قارچ‌های حل‌کننده فسفات است که قابلیت ارائه به عنوان مواد بیولوژیک افزاینده فسفر قابل استفاده خاک و بهبود دهنده رشد گیاه را داشته باشند. در ابتدا 144 جدایه قارچ‌های حل‌کننده فسفات از عمق صفر تا سی سانتی‌متری مزارع ذرت در استان‌های فارس، کرمانشاه و خراسان رضوی در ایران جدا شد. 27 جدایه بیشترین توانایی انحلال تری کلسیم فسفات را داشتند. براساس آنالیزهای مولکولی، جدایه‌ها متعلق به گونه‌های مختلف چهار جنس‌های قارچ *Aspergillus* (7/5 درصد)، قارچ *Talaromyces* (44/4 درصد)، قارچ *Penicillium* (44/4 درصد) و قارچ *Cladophialophora* (3/7 درصد) بودند. این اولین گزارش از توانایی انحلال فسفر معدنی در جنس قارچ *Cladophialophora* است. بیشترین توانایی انحلال فسفر در محیط جامد را قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA داشت (نسبت قطر هاله به پرگنه 4/11 میلی‌متر) در حالیکه در محیط مایع به ترتیب و بدون اختلاف معنی‌دار قارچ *Talaromyces verruculosus* جدایه PF 157-2 (8/23 میلی‌گرم در لیتر)، قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA (72/20 میلی‌گرم در لیتر)، قارچ *Aspergillus tubingensis* جدایه PF 140-2 (50/20 میلی‌گرم در لیتر) و قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه 1FB (04/20 میلی‌گرم در لیتر)، بیشترین توانایی تولید اکسین (2/9 میلی‌گرم در لیتر) و سیدروفور (نسبت قطر هاله به پرگنه 4/44 میلی‌متر) را به ترتیب قارچ *Aspergillus tubingensis* جدایه PF 140-2 و قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه 1FB نشان دادند. بیشترین مقدار سیانید هیدروژن (درجه 4) توسط قارچ *Penicillium oxalicum* جدایه PF 83-1 تولید شد. این نتایج بتانسیل قارچ‌های حل‌کننده فسفات جدا شده از خاک‌های ایران به ویژه قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA، قارچ *Talaromyces verruculosus* جدایه PF 157-2، قارچ *Aspergillus tubingensis* جدایه PF 140-2 و قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه 1FB را در کاربرد به عنوان مواد بیولوژیک افزاینده فسفر قابل استفاده خاک و بهبود دهنده رشد گیاه تأیید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: بهبود رشد گیاه، قابلیت دسترسی فسفر و مواد بیولوژیک، قارچ‌های حل‌کننده فسفات

¹ نویسنده مسئول، آدرس: گروه خاکشناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)

مقدمه

محلول خاک عملکرد کلی گیاهان را بهبود می‌بخشند. این در حالیست که این قارچ‌ها همچنین به واسطه نشان دادن ویژگی‌های دیگری مانند توانایی تولید اکسین، سیدروفور و سیانید هیدروژن که می‌تواند منجر به بهبود رشد گیاه شود نیز شناخته شده‌اند (نازیا و همکاران، 2020؛ وایرول و همکاران، 2011). اکسین یکی از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های رشد گیاه است که نقش چشم‌گیری در افزایش زیتوده ریشه و جذب عناصر تغذیه‌ای گیاه دارد (کوهاد و همکاران، 2011). توانایی تولید اکسین در قارچ‌های خاک‌زی به ویژه گونه‌های حل‌کننده فسفات قبلاً به دفعات گزارش شده است (ایناجی و همکاران، 2020؛ منتز و همکاران، 2019 و پراساد و همکاران، 2017). سیدروفورها، ترکیبات زیستی بسیار کوچکی‌اند که برخی از یون‌های فلزی موجود در خاک را به فرم کلات‌های محلول قابل جذب گیاهان تبدیل می‌کنند (ایندیراگانندی و همکاران، 2008). سیدروفورها همچنین با خارج کردن یون فلز مورد نظر از دسترس عوامل بیمارگر گیاهی و سرکوب این عوامل باعث افزایش رشد گیاه می‌شوند (کتی‌یار و همکاران، 2018). برخی قارچ‌ها از طریق تولید آنتی بیوتیک، سیانید هیدروژن و یا القای مقاومت سیستمیک از گیاهان در مقابل عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند (پوتشانام و همکاران، 2017). سیانید هیدروژن به واسطه محدود کردن سنتز ATP (Adenosine triphosphate) و تغییر سیتوکروم اکسیداز رشد و فعالیت عوامل بیماری‌زای گیاهی را کاهش داده و رشد گیاه را بهبود می‌دهد (ریجاوک و لاپانجه، 2016). توانایی تولید سیدروفور و سیانید هیدروژن در قارچ‌های حل‌کننده فسفات نیز قبلاً گزارش شده است (دباسیس و همکاران، 2020 و کاری دولت آباد و همکاران، 1398).

وجود قارچ‌های حل‌کننده فسفات در خاک‌های مناطق مختلف جهان به طور گسترده مطالعه شده است، اما تا به حال مطالعات گسترده‌ای در رابطه با وجود آنها در خاک‌های زراعی ایران صورت نگرفته است (بیگلری و

فسفر عنصر زیستی ضروری در روند رشد رویشی و زایشی گیاه است (چن و لیو، 2019). فسفر از اجزای تشکیل‌دهنده DNA (Deoxyribonucleic acid)، RNA (Ribonucleic acid) و مولکول‌های حامل انرژی در گیاهان است و در فرآیندهای بیوشیمیایی آن نقش اساسی دارد (نسمه و همکاران، 2018). مصرف مکرر کودهای شیمیایی فسفات‌ه رایج‌ترین روش تأمین فسفر مورد نیاز گیاهان در کشاورزی سنتی است. درحالی‌که بررسی‌ها نشان می‌دهد مصرف کودهای شیمیایی فسفات‌ه نه تنها منجر به افزایش هزینه تولید و آلودگی‌های محیطی شده است، بلکه راندمان استفاده از آن در خاک‌های زراعی بسیار کم (10-25 درصد) و فسفر قابل استفاده برای گیاه با این روش ناچیز است (بونونی و همکاران، 2020). کاهش راندمان مصرف کودهای شیمیایی فسفات‌ه در خاک‌های زراعی ناشی از واکنش‌پذیری زیاد فسفر با برخی عناصر خاک مانند کلسیم و آهن و تشکیل کانی‌های نامحلول فسفر است (مندز، 2014). الیاس و همکاران (2016) گزارش کردند که 95-99 درصد فسفر خاک به صورت کانی‌های نامحلول و خارج از دسترس گیاهان است.

برخی ریزجانداران خاک قادر به انحلال کانی‌های نامحلول فسفر و افزایش فسفر قابل استفاده در خاک می‌باشند (تیان و همکاران، 2021). از بین این ریزجانداران، توانایی قارچ‌های حل‌کننده فسفات به دلیل داشتن ساختار هیف مانند و گسترش در عمق بیشتری از خاک بیش از باکتری‌هاست (کوهادت و همکاران، 2011). قارچ‌های حل‌کننده فسفات از طریق تولید اسیدهای آلی، کانی‌های نامحلول فسفر در خاک را حل کرده، قابلیت دسترسی گیاهان به فسفر را بهبود می‌دهند (جین و همکاران، 2017؛ دویلوم و همکاران، 2020). برخی از این قارچ‌ها همچنین قادرند از طریق تولید آنزیم‌های فسفاتاز فسفر آلی خاک را به شکل معدنی و قابل جذب گیاه تبدیل کنند. قارچ‌های حل‌کننده فسفات با افزایش فسفر

معدنی نامحلول استفاده شد. پلیت‌ها در دمای 27 درجه سلسیوس به مدت 7 روز انکوبه شد. تشکیل هاله در اطراف پرگنه جدایه‌ها نشان دهنده توانایی انحلال تری کلسیم فسفات بود (وونگ و همکاران، 2018). نسبت قطر هاله به قطر پرگنه طی 6 روز اندازه‌گیری و محاسبه شد. جدایه‌های دارای بیشترین نسبت قطر هاله به قطر پرگنه به عنوان جدایه‌های برتر انتخاب و آزمایشات بعدی بر روی آن‌ها صورت گرفت.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای شناسایی مولکولی جدایه‌ها از کشت تازه استفاده شد. استخراج DNA جدایه‌ها به روش CTAB (Cetyltrimethyl Ammonium Bromide) انجام شد (دویلی و دویلی، 1987). آغازگرهای ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') برای تکثیر ناحیه rDNA هسته‌ای به‌کار گرفته شد (وایت و همکاران، 1990). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase chane reaction, PCR)، با استفاده از دستگاه ترموسایکر (Techne, Genius PCR FGEN02TP, USA) صورت گرفت. ترکیب واکنش شامل (میکرولیتر) بافر تکثیر: 5 DNA Taq، 1، polymerase: 5/1، dNTP: 1، $MgCl_2$: 1 آغازگرها هر کدام: 1 و آب دیونیزه سترون تا حجم 50 میکرولیتر بود. واکنش واسرشته سازی اولیه در دمای 94 درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و برنامه حرارتی شامل 30 چرخه واسرشته سازی DNA در دمای 94 درجه سلسیوس به مدت 45 ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای 50 درجه سلسیوس به مدت 45 ثانیه، توسعه DNA در دمای 72 درجه سلسیوس به مدت 60 ثانیه و توسعه نهایی در دمای 72 درجه سلسیوس به مدت 10 دقیقه انجام شد. محصول PCR از ژل آگارز یک درصد در بافر TBE (1X) (Tris-Borate-EDTA) عبور داده شد. به منظور تعیین اندازه قطعه DNA تکثیر شده، از نشانگر DNA 100bp Ladder RTU سیناژن استفاده شد. جهت خلص سازی و

همکاران، 2016). مطالعه حاضر با هدف جداسازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات از برخی خاک‌های زراعی ایران و بررسی خصوصیات محرک رشدی آن‌ها صورت گرفت. امید که بتوان به جدایه‌های کارآمدی دست یافت که قابلیت ارایه به عنوان مواد زیستی افزایش دهنده فسفر قابل استفاده خاک و بهبود دهنده رشد گیاهان را داشته باشند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک

خاک مورد آزمایش از عمق صفر تا سی سانتی-متری مزارع ذرت در استان‌های فارس، کرمانشاه و خراسان رضوی نمونه‌برداری شد. مزارع به گونه‌ای انتخاب شد که خاک آن‌ها از لحاظ فسفر زیر حد بحرانی مورد نیاز گیاه باشد. نمونه‌ها در دمای چهار درجه سلسیوس تا زمان جداسازی قارچ‌ها نگهداری گردید.

جداسازی قارچ‌ها

از نمونه‌های خاک سری رقت ده تایی (10^{-2} تا 10^{-5}) تهیه شد. یک دهم میلی‌لیتر از هر رقت (در سه تکرار) به پلیت‌های حاوی محیط کشت (Potato PDA Dextrose Agar) حاوی 0/02 درصد آنتی بیوتیک استرپتومایسین (کاری دولت آباد و همکاران، 1398) با pH 8/5 منتقل شد. پلیت‌ها هفت الی 15 روز در دمای 25 درجه سلسیوس انکوبه شدند (دورواد و همکاران 2009). قارچ‌های رشد یافته بر اساس تفاوت‌های ظاهری از یکدیگر تفکیک و به پلیت جدید منتقل شدند. به منظور دسترسی به ایزوله‌های کاملاً خالص، هر پلیت سه بار خلص سازی شد.

قابلیت انحلال فسفر معدنی در محیط جامد

یک قرص میسلیمومی پنج میلی‌متری از کشت تازه هر جدایه به پلیت‌های محیط اسپربر (اسپربر، 1985) منتقل شد. ترکیبات محیط اسپربر شامل (گرم بر لیتر): $C_6H_{12}O_6$ (10)، Yeast extrac (0/5)، $CaCl_2$ (0/1)، $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0/25) و آگار (15) بود. 5/2 گرم در لیتر تری کلسیم فسفات ($Ca_3(PO_4)_2$) به عنوان منبع فسفر

میلی‌لیتر $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ نیم مولار) مخلوط گردید. این مخلوط به مدت 20 دقیقه در دمای آزمایشگاه در محفظه تاریک نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور در 535 نانومتر قرائت شد. میزان تولید اکسین جدایه‌ها در مقایسه با منحنی استاندارد اکسین محاسبه شد (گوردون و وبر، 1951).

ارزیابی قابلیت تولید سیدروفور

توانایی قارچ‌ها در تولید سیدروفور در محیط کشت CAS (Chrome Azurol S) بررسی شد. برای تهیه محیط مورد نظر چهار محلول معرف Fe-Cas، محلول غذایی، محلول کازآمینواسید و محلول بافر به روش الکساندر و زوبرر (1991) تهیه و پس از استریل با یکدیگر مخلوط شد. یک قرص میسلومی به قطر پنج میلی‌متر از کشت تازه جدایه‌ها روی محیط کشت قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت 17 روز در دمای 28 درجه سلسیوس نگهداری شد. تشکیل هاله نارنجی در اطراف پرگنه نشان‌دهنده توانایی جدایه در تولید سیدروفور بود (راوال و دسای، 2015). نسبت قطر هاله به قطر پرگنه هر جدایه در روزهای 2، 4، 6، 9، 12 و 17 انکوباسیون اندازه‌گیری و محاسبه شد.

ارزیابی قابلیت تولید سیانید هیدروژن

توانایی جدایه‌ها در تولید سیانید هیدروژن در پلیت‌های شامل محیط TSA (Tryptic Soy Agar) غنی شده با گلايسين (4/4 گرم در لیتر) به روش دونات-کورآ و همکاران (2004) سنجش شد. به این منظور کاغذ صافی آغشته به محلول معرف پیکرات سدیم ($\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$) 0.5% و 2% Na_2CO_3 در قسمت داخلی درب پلیت قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت 120 ساعت در 28 درجه سلسیوس نگهداری شدند. توانایی تولید سیانید هیدروژن براساس تغییر رنگ کاغذ صافی از رنگ زرد اولیه (عدم تولید) به کرم (تولید بسیار کم)، نارنجی (تولید کم)، قهوه-ای روشن (تولید زیاد) و آجری (تولید بسیار زیاد) که به ترتیب از 0 تا 4 درجه بندی شدند، تعیین شد. دو سویه قارچ حل‌کننده فسفات، تهیه شده از کلکسیون میکروبی

تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت بایونیر کره جنوبی ارسال شد. توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده با استفاده از ابزار جستجو BLAST (Basic Local Alignment Search Tool، (آلتشول و همکاران، 1997) با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند. درخت تبارزایی با استفاده از روش نزدیک‌ترین همسایگی (ساتو و نای، 1987) توسط نرم افزار MEGA 6 رسم شد.

ارزیابی قابلیت انحلال فسفر معدنی در محیط مایع

برآورد کمی توانایی انحلال فسفات جدایه‌ها در 150 میلی‌لیتر محیط رشد (National Botanical NBRIP Research Institute's phosphate growth medium) در ارلن‌های تلقیح شده با دو قرص پنج میلی‌متری از هر جدایه انجام شد (ونگ و همکاران، 2018). ترکیبات محیط کشت NBRIP شامل (گرم بر لیتر): $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ (10)، $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (5/0)، NaCl (3/0)، KCl (3/0)، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3/0)، FeSO_4 (3/0)، MnSO_4 (1/0). 5 گرم در لیتر تری‌کلسیم فسفات به عنوان منبع فسفر معدنی نامحلول استفاده شد. pH محیط کشت بر روی حدود 7 تنظیم شد. محیط تلقیح نشده به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ارلن‌ها در دمای 28 درجه سلسیوس انکوبه شد. مقدار فسفر محلول نمونه‌ها 2، 3، 6، 10، 13 و 16 روز پس از شروع انکوباسیون با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-1600 در طول موج 470 نانومتر قرائت شد.

ارزیابی قابلیت تولید اکسین

به منظور بررسی توان تولید اکسین، ابتدا سه قرص میسلومی پنج میلی‌متری از کشت تازه هر جدایه به 25 میلی‌لیتر محیط TSB (Tryptic Soy Broth) حاوی صفر و 50 میکروگرم در میلی‌لیتر ال‌تریپتوفان (L-tryptophane) منتقل گردید. پس از 24 ساعت، سوسپانسیون قارچ به مدت 15 دقیقه در 10000 دور سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با 4 میلی‌لیتر معرف سالکوسکی (150 میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، 250 میلی‌لیتر آب مقطر و 7/5

به دست آمد. بر اساس بررسی شباهت توالی DNA جدایه‌ها در پایگاه‌های اطلاعاتی، جدایه‌ها به طور متوسط با 7/99 درصد شباهت متعلق به گونه‌های مختلف چهار جنس قارچ *Aspergillus* (7/5 درصد)، قارچ *Talaromyces* (44/4 درصد)، قارچ *Penicillium* (44/4 درصد) و قارچ *Cladophialophora* (3/7 درصد) بودند. توانایی انحلال فسفر در جنس‌های قارچ *Aspergillus* (ونگ و همکاران، 2018)، قارچ *Talaromyces* (دویلیم و همکاران، 2020) و قارچ *Penicillium* (کیاو و همکاران، 2019) قبلاً گزارش شده است. این اولین گزارش از توانایی انحلال فسفر معدنی در جنس *Cladophialophora* است.

حل‌کنندگی فسفر معدنی در محیط کشت

اسپربر جامد نسبت قطر هاله به پرگنه جدایه‌ها بیانگر معیار توانایی آن‌ها در انحلال تری کلسیم فسفات در محیط جامد بود (جدول 2). نسبت قطر هاله به پرگنه در اکثر جدایه‌ها با افزایش زمان انکوباسیون افزایش یافت. هفت روز پس از انکوباسیون بیشترین نسبت قطر هاله به پرگنه به ترتیب و با اختلاف معنی‌دار ($p < 0.05$) توسط قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA (4/11) و قارچ *Talaromyces verruculosus* جدایه PF 157-2 (75/1) ایجاد شد. توانایی سایر جدایه‌ها در انحلال فسفر در شرایط مشابه با اختلاف معنی‌دار تقریباً یک چهارم قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA بود. تفاوت در توانایی انحلال فسفر جدایه‌ها بر اساس فاکتور نسبت قطر هاله به پرگنه احتمالاً به دلیل تفاوت در نوع، مقدار و سرعت انتشار اسید آلی تولید شده توسط هر جدایه در محیط جامد بوده است (سلوی و همکاران، 2017).

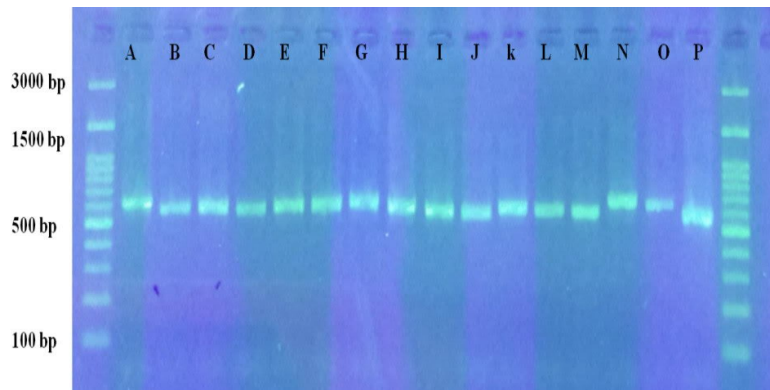
موسسه تحقیقات خاک و آب کرج، به ترتیب به عنوان شاهد مثبت (دارای توان تولید سیانید هیدروژن) و شاهد منفی (عدم توان تولید سیانید هیدروژن) در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تمامی آزمایشات در سه تکرار انجام شد. نتایج با استفاده از نرم افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل گردید. مقایسه میانگین داده‌ها از روش آزمون (Least LSD Significant Difference) در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

فسفر از عناصر زیستی ضروری برای رشد گیاهان است. قارچ‌های حل‌کننده فسفات نقش مهمی در افزایش قابلیت دسترسی گیاهان به فسفر در خاک دارند. در مطالعه حاضر، 384 جدایه قارچ از نمونه‌های خاک سه استان خراسان رضوی، کرمانشاه و فارس جداسازی شد. تشکیل هاله شفاف اطراف پرگنه اثبات کننده توانایی جدایه در انحلال تری کلسیم فسفات در محیط جامد بود که بر این اساس تنها 144 جدایه (5/37 درصد) حل‌کننده فسفر بودند. از این بین 27 جدایه بیشترین توانایی را در انحلال فسفر نشان دادند (نسبت قطر هاله به پرگنه ≤ 0.5). ارزیابی محصولات حاصل از تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و باند موجود در ژل، تکثیر بخشی از ژنوم به طول تقریبی 600 الی 700 جفت باز را در 27 جدایه برتر را نشان داد (شکل 1). جدول 1، نام، محل جداسازی، خصوصیات پرگنه، نزدیکترین شباهت فیلوژنتیکی و شماره دسترسی این جدایه‌ها را در پایگاه جهانی (NCBI National Center for Biotechnology Information) نشان می‌دهد. اکثر جدایه‌ها (15/48 درصد) از نمونه‌های خاک استان فارس

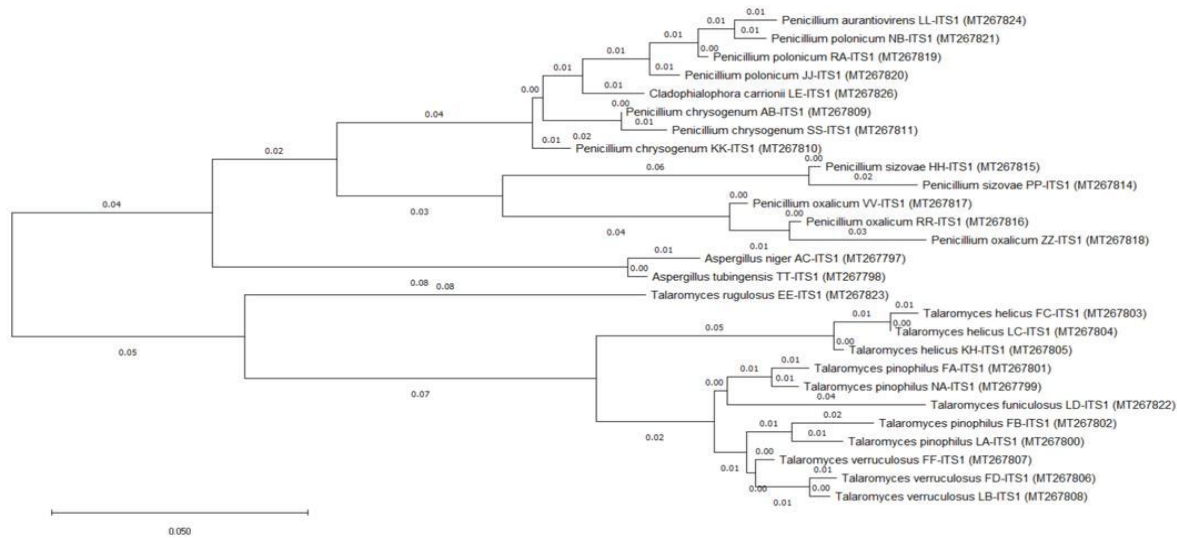


شکل 1 - باند DNA مربوط به تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای جدایه‌های قارچی به کمک آغازگر ITS1 و ITS4 در ژل آگارز یک درصد

A: *Aspergillus niger* (PF198), B: *Aspergillus tubingensis* (PF 140-2), C: *Talaromyces pinophilus* (MFA), D: *Talaromyces pinophilus* (PF174), E: *Talaromyces pinophilus* (1FB), F: *Talaromyces pinophilus* (PF 140-1), G: *Talaromyces helicus* (PF136-2), H: *Talaromyces helicus* (PF101-1), I: *Talaromyces helicus* (PF 121-2), J: *Talaromyces verruculosus* (PF 157-2), K: *Talaromyces verruculosus* (15FAI), L: *Talaromyces verruculosus* (PF105 II), M: *Talaromyces funiculosus* (PF 48), N: *Talaromyces rugulosus* (46 FA), O: *Penicillium chrysogenum* (48 FA), P: *Penicillium sizovae* (PF 40-2).

جدول 1- نام، محل جداسازی، نزدیکترین شباهت فیلوژنتیک، درصد شباهت و شماره ثبت جدایه‌ها در پایگاه جهانی NCBI

ردیف	قارچ	جدایه	شماره ثبت	درصد شباهت	استان محل جداسازی	کد
1	<i>Aspergillus niger</i>	PF198	MT267797	100	کرمانشاه	AC-ITS1
2	<i>Aspergillus tubingensis</i>	PF140-2	MT267798	100	خراسان رضوی	TT-ITS1
3	<i>Talaromyces pinophilus</i>	MFA	MT267799	99	فارس	NA-ITS1
4	<i>Talaromyces pinophilus</i>	PF174	MT267800	100	کرمانشاه	LA-ITS1
5	<i>Talaromyces pinophilus</i>	1FB	MT267801	99	فارس	FA-ITS1
6	<i>Talaromyces pinophilus</i>	PF140-1	MT267802	100	خراسان رضوی	FB-ITS1
7	<i>Talaromyces helicus</i>	PF136-2	MT267803	100	خراسان رضوی	FC-ITS1
8	<i>Talaromyces helicus</i>	PF101-1	MT267804	100	خراسان رضوی	LC-ITS1
9	<i>Talaromyces helicus</i>	PF121-2	MT267805	100	خراسان رضوی	KH-ITS1
10	<i>Talaromyces verruculosus</i>	PF157-2	MT267806	100	کرمانشاه	FD-ITS1
11	<i>Talaromyces verruculosus</i>	15FAI	MT267807	99	فارس	FF-ITS1
12	<i>Talaromyces verruculosus</i>	PF105II	MT267808	100	خراسان رضوی	LB-ITS1
13	<i>Talaromyces funiculosus</i>	PF48	MT267822	99	فارس	LD-ITS1
14	<i>Talaromyces rugulosus</i>	46FA	MT267823	100	فارس	EE-ITS1
15	<i>Penicillium chrysogenum</i>	48FA	MT267811	100	فارس	SS-ITS1
16	<i>Penicillium sizovae</i>	PF40-2	MT267814	99	فارس	PP-ITS1
17	<i>Penicillium sizovae</i>	PF37-1	MT267815	100	فارس	HH-ITS1
18	<i>Penicillium oxalicum</i>	PF104	MT267816	100	خراسان رضوی	RR-ITS1
19	<i>Penicillium oxalicum</i>	PF83-1	MT267817	100	خراسان رضوی	VV-ITS1
20	<i>Penicillium oxalicum</i>	PF81-2	MT267818	100	خراسان رضوی	ZZ-ITS1
21	<i>Penicillium polonicum</i>	PF16	MT267819	100	فارس	RA-ITS1
22	<i>Penicillium polonicum</i>	PF45-2	MT267820	99	فارس	JJ-ITS1
23	<i>Penicillium polonicum</i>	18FB	MT267821	100	فارس	NB-ITS1
24	<i>Penicillium chrysogenum</i>	PF58-1	MT267809	99	خراسان رضوی	AB-ITS1
25	<i>Penicillium chrysogenum</i>	PF44-1	MT267810	99	فارس	KK-ITS1
26	<i>Penicillium aurantiovirens</i>	48FA	MT267824	100	کرمانشاه	LL-ITS1
27	<i>Cladophialophora carrionii</i>	PF8	MT267826	100	فارس	LE-ITS1



* از نرم افزار MEGA6 جهت ترسیم درخت تبارزایی استفاده شد.
 شکل 2- درخت تبارزایی ترسیم شده با استفاده از توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 نشان دهنده موقعیت فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد مطالعه

جدول 2- مقایسه میانگین توان حل کنندگی فسفات معدنی در محیط کشت اسپربر جامد

ردیف	جدایه	زمان (بر حسب روز)					نسبت قطر هاله به پرگنه جدایه ها
		8	5	4	3	2	
1	PF 198	1 fg	1 gh	1 fg	1 ef	1 e	1
2	PF 140-2	1.17 df	1.17 dg	1.17 df	1 ef	1 e	2
3	MFA	4.11 a	4.11 a	4.11 a	4.11 a	4.11 a	3
4	PF 174	1.32 ce	1.32 bf	1.23 cf	1.23 ce	1.19 de	4
5	1FB	1 fg	1 gh	1 fg	1 ef	1 e	5
6	PF 140-1	1.4 cd	1.4 bd	1.4 bc	1.4 bc	1.4 cd	6
7	PF 136-2	0.79 g	0.62 i	0.63 h	0.34 g	1 e	7
8	PF 101-1	1.26 df	1.37 be	1.12 dg	1.2 ce	1.07 e	8
9	PF 121-2	1.07 eg	1.1 eh	1.04 fg	0 h	0 g	9
10	PF 157-2	1.75 b	1.59 b	1.52 b	1.41 bc	1.6 bc	10
11	15 FAI	1.04 fg	1.04 fg	1.04 fg	1.09 ef	1.08 e	11
12	PF 105 II	1.3 df	1.14 dh	1.09 eg	1.23 ce	1.24 de	12
13	PF 48	1.11 df	1.06 fg	1 fg	1 ef	1 e	13
14	46 FA	1.19 df	1.37 be	1.35 bd	1.19 ce	1 e	14
15	48 FA	1 fg	1 gh	1.07 eg	1.53 b	1.86 b	15
16	PF 40-2	1 fg	1 gh	1 fg	1 ef	1 e	16
17	PF 37-1	1 fg	1 gh	1 fg	1 ef	1 e	17
18	PF 104	1 fg	0.94 h	0.84 gh	0.83 f	0.5 f	18
19	PF 83-1	1.3 df	1.49 bc	1.5 bc	1.38 bd	1.12 de	19
20	PF 81-2	1 fg	1 gh	1 fg	1 ef	1 e	20
21	PF 16	1.25 df	1.25 cg	1.24 cf	1.06 ef	1 e	21
22	PF 45-2	1.25 df	1.25 cg	1 fg	1 ef	1 e	22
23	18 FB	1 fg	1 gh	0.97 fg	1 ef	1 e	23
24	PF 58-1	1.29 df	1.24 cg	1.24 cf	1.23 ce	1.08 e	24
25	PF 44-1	1.25 df	1.25 cg	1.15 df	1 ef	1 e	25
26	PF 146	1.64 bc	1.57 b	1.52 b	1.41 bc	1.1 e	26
27	PF 8	1.17 df	1.16 dg	1.16 df	1.16 de	1 e	27

* حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد ندارند.

حل‌کنندگی فسفر معدنی در محیط کشت مایع (NBRI Broth)

بیشترین مقدار فسفر محلول به ترتیب و بدون اختلاف معنی‌دار ($p < 05/0$) توسط قارچ *verruculosus* *Talaromayces* جدایه PF 157-2 (8/23 میلی‌گرم در لیتر)، قارچ *Talaromayces pinophilus* جدایه MFA (72/20) 140-2 (5/20 میلی‌گرم در لیتر) و قارچ *pinophilus* PF (9/11 میلی‌گرم در لیتر) متغییر بود ($p < 05/0$). جیان و همکاران (2017) و الیاس و همکاران (2016) این توانایی را در قارچ‌های حل‌کننده فسفات به ترتیب بین مقدارهای 1114-69 میلی‌گرم در لیتر و 728-514 میکروگرم در لیتر گزارش کردند.

بیشترین مقدار فسفر محلول به ترتیب و بدون اختلاف معنی‌دار ($p < 05/0$) توسط قارچ *verruculosus* جدایه PF 157-2 (8/23 میلی‌گرم در لیتر)، قارچ *Talaromayces pinophilus* جدایه MFA (72/20) 140-2 (5/20 میلی‌گرم در لیتر) و قارچ *pinophilus* PF (9/11 میلی‌گرم در لیتر) متغییر بود ($p < 05/0$). جیان و همکاران (2017) و الیاس و همکاران (2016) این توانایی را در قارچ‌های حل‌کننده فسفات به ترتیب بین مقدارهای 1114-69 میلی‌گرم در لیتر و 728-514 میکروگرم در لیتر گزارش کردند.

توانایی انحلال فسفر معدنی جدایه‌ها با سنجش مقدار فسفر محلول در محیط مایع غنی شده با تری کلسیم فسفات تأیید گردید (جدول 3). با افزایش زمان انکوباسیون مقدار فسفر محلول تمام جدایه‌ها افزایش یافت. شانزده روز پس از انکوباسیون توانایی جدایه‌ها در انحلال تری کلسیم فسفات در محیط مایع بین 8/23-9/11 میلی‌گرم در لیتر متغییر بود ($p < 05/0$). جیان و همکاران (2017) و الیاس و همکاران (2016) این توانایی را در قارچ‌های حل‌کننده فسفات به ترتیب بین مقدارهای 1114-69 میلی‌گرم در لیتر و 728-514 میکروگرم در لیتر گزارش کردند.

جدول 3- مقایسه میانگین توان حل‌کنندگی فسفات معدنی در محیط کشت مایع (NBRI Broth)

ردیف	جدایه	مقدار فسفر محلول (میلی‌گرم در لیتر) تولید شده توسط جدایه‌ها زمان (بر حسب روز)					
		16	13	10	6	3	2
1	PF 198	17.36 b	16.4 fi	14.91 ij	13.67 cd	13.01 cd	3.74 gi
2	PF140-2	20.50 a	20.4 b	20.03 a	14.03 b	12.79 ef	4.55 bc
3	MFA	20.72 a	16.51 fi	16.38 df	13.62 cd	13.53 c	5.28 a
4	PF 174	16.59 c	15.51 ik	14.09 jk	11.91 e	6.66 m	2.84 mn
5	1FB	20.04 a	19.74 c	18.01 c	8.24 n	6.64 mo	2.68 n
6	PF 140-1	17.02 bc	17.44 eh	16.94 d	13.93 c	7.26 lo	3.27 kl
7	PF 136-2	11.9 ij	11.89 mn	11.05 mn	9.75 j	5.7 o	4.07 ce
8	PF 101-1	18.01 b	17.97 ef	16.14 dh	14.91 a	7.24 lo	3.66 gi
9	PF 121-2	16.26 cd	15.03 jk	10.4 n	9.15 k	8.19 kn	3.97 eg
10	PF 157-2	23.8 a	21.57 a	19.16 b	14.93 a	14.83 a	3.66 gi
11	15 FAI	16.97 bc	16.55 fi	15.32 di	14.87 a	5.32 o	3.89 fg
12	PF 105 II	16.51 c	16.1 ij	14.17 ik	11.67 ef	4.17 p	3.45 il
13	PF 48	17.63 b	17.53 eh	16.64 de	15.1 a	13.91 b	3.24 kl
14	46 FA	19.03 b	19.01 d	16.91 d	14.99 a	9.32 k	5.43 a
15	48 FA	13.9 fh	13.28 lm	11.75 ln	6.18 o	4.96 op	4.65 b
16	PF 40-2	15.49 ce	14.33 kl	13.92 hl	12.61 ce	11.43 j	3.55 ik
17	PF 37-1	14.07 eh	13.27 lm	12.16 kn	10.23 h	4.08 p	2.89 mn
18	PF 104	16.94 bc	15.56 ik	12.74 jm	10.59 gh	3.92 pq	3.53 ik
19	PF 83-1	18.06 b	17.92 ef	16.23 dg	13.81 c	12.22 fi	4.24 cd

17.9 b	17.79 eg	10.26 n	6.17 o	5.73 o	4.3 cd	PF 81-2	20
17.67 b	17.54 eh	12.22 n	9.13 kl	6.57 n	4.69 b	PF 16	21
13.64 fh	12.56 m	11.3mn	10.48 gh	8.31 km	3.14 lm	PF 45-2	22
12.88 hi	12.07 m	10.8 mn	8.99 m	7.25 lo	4.64 b	18 FB	23
16.91 bc	15.01 jk	12.71 jm	10.01 hi	9.01 k	3.62 hi	PF 58-1	24
14.71 dg	13.22 lm	12.5 kl	10.55 gh	7.04 lo	2.86 mn	PF 44-1	25
16.78 bc	13.62 lm	13.61 il	12.86 d	8.4 kl	3.72 gi	PF 146	26
14.76 dg	14.52 kl	11.28 mn	10.99 g	5.6 o	3.58 hj	PF 8	27

* حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد ندارند.

تولید اکسین

یکی از روش‌های تأثیر قارچ‌ها بر بهبود رشد گیاهان تولید هورمون اکسین است. اسیدآمینو ال-تریپتوفان پیش‌نیاز تولید اکسین در اغلب ریزجانداران می‌باشد (وارالاکشیم و مالیجا، 2012). بر اساس نتایج، اضافه کردن اسیدآمینو ال-تریپتوفان به محیط توانایی تولید اکسین را در 74 درصد جدایه‌ها افزایش و در دیگر جدایه‌ها کاهش داد (جدول 4). این نتیجه با یافته‌های اصغر و همکاران (2004) و اسکوپ و بلواسکی (2013) مطابقت داشت. ایشان گزارش کردند که برخی از ریزجانداران دارای مسیرهای مستقل از ال-تریپتوفان در سنتز اکسین هستند به طوری که اضافه کردن ال-تریپتوفان به محیط کشت با تأثیر منفی بر سرعت تشکیل اکسین، مقدار این هورمون را در این موجودات کاهش می‌دهد. بیشترین مقدار اکسین (2/9 میلی‌گرم در لیتر) توسط قارچ *Aspergillus tubingensis* جدایه PF 140-2 و در محیط حاوی 50 میلی‌گرم بر لیتر ال-تریپتوفان تولید شد که 1/47 درصد بیش از متوسط اکسین تولید شده توسط سایر جدایه‌ها در این شرایط بود. این جدایه همچنین یکی از مؤثرترین جدایه‌ها در انحلال فسفر در محیط مایع بود (بدون اختلاف معنی‌دار با جدایه برتر در این ویژگی). در تأیید این نتیجه یاداو و همکاران (2011) تولید 52-85 میلی‌گرم در لیتر اکسین توسط قارچ‌های *Aspergillus* و *Penicillium* را گزارش کردند. میرخانی و همکاران

(1395) نیز توانایی تولید اکسین را در دو جدایه قارچ

Trichoderma حل‌کننده فسفات T77-3 و T48-2 به ترتیب به میزان 9/39 و 40/7 میلی‌گرم بر لیتر گزارش کردند.

تولید سیدروفور

سیدروفورها ترکیبات زیستی آلی‌ای هستند که با جذب یون‌های فلزی نامحلول به ویژه آهن آن را به فرم قابل جذب گیاهان تبدیل می‌کنند (ایندیراگاندی و همکاران، 2008). توانایی جدایه‌ها در تولید سیدروفور متفاوت و تنها 16 جدایه (59 درصد) قادر به تولید سیدروفور بودند (جدول 4). با افزایش زمان انکوباسیون توانایی جدایه‌ها در تولید سیدروفور (نسبت قطر هاله به پرگنه) افزایش یافت که با گزارش فریرا و همکاران (2019) مبنی بر افزایش توانایی تولید سیدروفور در ریزجانداران با افزایش زمان انکوباسیون و ورود آن‌ها به فاز ثابت رشد، مطابقت داشت. بیشترین نسبت قطر هاله به پرگنه (4/44) هفده روز پس از انکوباسیون توسط قارچ *Talaromayces pinophilus* جدایه IFB ایجاد گردید. این جدایه همچنین یکی از مؤثرترین جدایه‌ها در انحلال فسفر در محیط مایع بود (بدون اختلاف معنی‌دار با جدایه برتر در این ویژگی). تفاوت در نوع سیدروفور تولیدی هر جدایه و مقدار آن احتمالاً علت اصلی تفاوت در قطر هاله به پرگنه جدایه‌ها می‌باشد (سیلوا و همکاران، 2020؛ آمین و همکاران، 2019 و طهماسبی و همکاران 1393).

جدول 4- مقدار اکسین (میلی‌گرم بر لیتر در روز) و سیدروفور (قطر هاله به قطر پرگنه) جدایه‌ها

ردیف	جدایه	اکسین						ال-تریپتوفان (میلی‌گرم بر لیتر)	جدایه	ردیف	
		سیدروفور زمان (بر حسب روز)									
		17	12	9	6	4	2				
		50						صفر			
		1/38 f	1/38 gh	1/38 f	1/37 fg	1/33 e	1/3 f	6/25 df	8/94 a	PF198	1
		2/2 e	1/69 f	1/6 ef	0 i	0 g	0 g	9/2 a	2/95 hi	PF140-2	2
		3/2 b	2/78 bc	2/1 d	1/7 e	0 g	0 g	2/8 n	4/44 ed	MFA	3
		2/64 c	2/64 cd	2/58 ab	2/58 ab	2/56 a	1/66 e	4/44 lk	2/51 ij	PF174	4
		4/44 a	4/1 a	2/77 a	2/76 a	2/62 a	2/5 a	4/95 ik	0/2 l	1FB	5
		2/62 c	3/06 b	2/49 bc	2/29 b	2/22 b	2/06 b	7/69 b	3/37 gh	PF140-1	6
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	5/64 fh	4/57 d	PF136-2	7
		3/11 b	3/07 b	1/91 e	1/84 d	1/8 d	1/8 d	3/75 m	2/ 62 ij	PF101-1	8
		2/5 d	2/29 de	1/83 e	1/74 ed	1/72 d	1/72 e	6/87 c	2/24 jk	PF121-2	9
		2/26 e	2/21 e	2/2 d	2/13 c	2/04 c	1/94 c	4/56 k	0.8 l	PF157-2	10
		1 i	1/01 h	1 h	1 h	1 f	0 g	6/84 cd	8/64 a	15FAI	11
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	1/9 o	3/56 gf	PF105II	12
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	4/74 jk	1/77 k	PF48	13
		1/44 f	1/43 gh	1/41 f	1/29 g	1/27 e	1/23 f	5/94 eg	7/02 b	46FA	14
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	4/74 jk	1/77 k	48FA	15
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	8/66 a	6/3 c	PF40-2	16
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	5/25 hj	3/9 eg	PF37-1	17
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	4/47 k	2/16 jk	PF104	18
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	4/44 lk	0/74 l	PF83-1	19
		1/26 fg	1/26 gh	1/26 fg	1/26 g	1/22 e	0 g	8/82 a	3/37 gh	PF81-2	20
		1/16 gh	1 h	1 h	1 h	1 f	0 g	1/23 p	0/23 l	PF16	21
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	6/29 ce	8/9 a	PF45-2	22
		1/07 gi	1/07 h	1/07 gh	1/02 h	1 f	0 g	5/21 hj	4/05 df	18FB	23
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	5/38 hg	7/05 b	PF58-1	24
		0 j	0 i	0 i	0 i	0 g	0 g	1/2 p	2/29 jk	PF44-1	25
		1 i	1 h	0 i	0 i	0 g	0 g	0/69 p	0/23 l	PF146	26
		1/06 hi	1 h	1 h	1 h	0 g	0 g	3/84 lm	0/78 l	PF8	27

* حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌دار در سطح 5 درصد ندارند.

تولید سیانید هیدروژن

مربوط به قارچ *Penicillium oxalicum* جدایه PF83-1 بود. قابل ذکر است که توانایی قارچ *Penicillium oxalicum* جدایه PF83-1 در انحلال فسفر، تولید اکسین و به ویژه سیدروفور در مقایسه با جدایه‌های برتر در این زمینه‌ها اغلب بسیار کمتر بود چیزی که قابلیت کاربری آن را جهت بهبود رشد گیاه به شدت کاهش می‌دهد. نهایتاً مقایسه توانایی جدایه‌ها در انحلال فسفر و تولید متابولیت‌های بهبود دهنده رشد گیاه نشان داد که

توانایی تولید سیانید هیدروژن جدایه‌ها به ترتیب از 0 (عدم تولید) تا 4 (تولید بسیار زیاد) درجه بندی شد (جدول 5). 6/92 درصد جدایه‌ها توانایی تولید سیانید هیدروژن داشتند. همچنان که پراساد و همکاران (2017) و شارما و چادهاری (2020) توانایی تولید سیانید هیدروژن را در قارچ‌های حل‌کننده فسفات گزارش کرده بودند. بیشترین توانایی تولید سیانید هیدروژن (درجه 4)

توانایی زیاد در انحلال فسفر به ویژه در محیط مایع و بیشترین توانایی به ترتیب در تولید اکسین و سیدروفور مزیت‌هایی هستند برای کاربرد این جدایه‌ها به عنوان مواد زیستی افزایش دهنده فسفر قابل استفاده خاک و بهبود رشد گیاه.

ویژگی‌های قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA و قارچ *Talaromyces verruculosus* جدایه PF 157-2 شامل: بیشترین توانایی انحلال فسفر در محیط جامد و مایع ضمن تولید اکسین و سیدروفور و ویژگی‌های قارچ *Aspergillus tubingensis* جدایه PF 140-2 و قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه 1FB شامل:

جدول 5- مقدار کیفی سیانید هیدروژن تولید شده توسط جدایه‌ها در 120 ساعت

ردیف	جدایه	سیانید هیدروژن	ردیف	جدایه	سیانید هیدروژن	ردیف	جدایه	سیانید هیدروژن
1	PF 198	0	10	PF 157-2	1	19	PF 83-1	4
2	PF140-2	0	11	15 FAI	1	20	PF 81-2	0
3	MFA	1	12	PF 105 II	0	21	PF 16	1
4	PF 174	2	13	PF 48	1	22	PF 45-2	1
5	1 FB	1	14	46 FA	1	23	18 FB	1
6	PF 140-1	1	15	48 FA	1	24	PF 58-1	0
7	PF 136-2	3	16	PF 40-2	2	25	PF 44-1	0
8	PF 101-1	1	17	PF 37-1	1	26	PF 146	0
9	PF 121-2	1	18	PF 104	1	27	PF 8	1

* درجه‌های 0، 1، 2، 3 و 4 به ترتیب بیانگر: عدم تولید، تولید بسیار کم، تولید کم، تولید زیاد و تولید بسیار زیاد سیانید هیدروژن می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

بهبود رشد گیاه مانند تولید اکسین، سیدروفور و سیانید هیدروژن نیز بودند. کاربرد این جدایه‌ها به ویژه قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه MFA، قارچ *Talaromyces verruculosus* جدایه PF 157-2، قارچ *Aspergillus tubingensis* جدایه PF 140-2 و قارچ *Talaromyces pinophilus* جدایه 1FB احتمالاً گام مؤثری در جهت افزایش فسفر قابل استفاده خاک و متعاقباً بهبود رشد گیاه خواهد بود.

واکنش‌پذیری زیاد فسفر با خاک و تشکیل فرم‌های نامحلول آن راندمان مصرف کودهای شیمیایی فسفره را در اراضی کشاورزی به شدت کاهش داده است. هدف این مطالعه دستیابی به قارچ‌های حل‌کننده فسفات دارای ویژگی‌های محرک رشد گیاه جهت افزایش حلالیت فسفر در خاک و بهبود رشد گیاهان بود. این مطالعه به جدایه‌هایی از قارچ حل‌کننده فسفات دست یافت که ضمن توانایی انحلال فسفر دارای ویژگی‌های

فهرست منابع:

1. طهماسبی، ف.، لکزینان، الف.، خاوازی، گ. و پاکدین پاریزی، ع. 1393. جداسازی، شناسایی و ارزیابی تولید سیدروفور در باکتری‌های سودوموناس و تأثیر آن بر رشد ذرت در محیط آبکشت. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). جلد 7. شماره 1.
2. کاری دولت‌آباد، ح.، اسدی رحمانی، ه. و رجالی، ف. 1398. شناسایی و بررسی خصوصیات محرک رشدی و بیوکنترلی قارچهای اندوفیت جدا شده از برگ و میوه پسته.
3. میرخانی، ف.، علایی، ح.، محمدی، ا.ح. و حقدل، م. 1395. شناسایی گونه‌های غالب تریکودرما در باغات پسته‌ی استان کرمان. نشریه حفاظت گیاهان 30 (1): 82-91.
4. Alam, S., Khalil, S., Ayub, N. Rashid, M. 2002. *In vitro* solubilization of inorganic phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. *International Journal of Agriculture & Biology*, vol. 4, pp. 454–458.
5. Alexander, D. B. and Zuberer, D. A. 1991. Use of Chrome Azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12 (1):39-45.
6. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17):3389-3402.
7. Ameen, F., AlYahya, S. A., AlNadhari, S., Alasmari, H., Alhoshani, F. and Wainwright, M. 2019. Phosphate solubilizing bacteria and fungi in desert soils: species, limitations and mechanisms. *Archives of Agronomy and Soil Science* 65:1446-1459. doi.org/10.1080/03650340.2019.1566713.
8. Asghar, H. N., Zahir, Z. A. and Arshad, M. 2004. Screening rhizobacteria for improving the growth, yield, and oil content of canola (*Brassica napus* L.). *Australian Journal of Agricultural research*. 55: 187-194.
9. Biglari, N., Hassan, H. M. and Amini, J. 2016. The ability of *Streptomyces spp.* isolated from Iranian soil to solubilize rock phosphate. *Advances in Bioscience & Clinical Medicine* 4 (3).
10. Bononi, L., Chiaramonte, J. B., Pansa, C. C. and et al. 2020. Phosphorus-solubilizing *Trichoderma spp.* from Amazon soils improve soybean plant growth. *scientific reports* 10, 2858. doi.org/10.1038/s41598-020-59793-8.
11. Chowdhary, K. and Sharma, S. 2020. Plant growth promotion and biocontrol potential of fungal endophytes in the inflorescence of *Aloe vera* L. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences* 90:1045–1055. doi.org/10.1007/s40011-020-01173-3.
12. Debasis, M., Snežana, A., Panneerselvam, P., Ansuman, S., Tanja, V., Ganeshamurthy, A. N., Manisha, Ch., Navendra, U., Bhaswatimayee, M and Radha, T. K. 2020. Phosphate-Solubilizing Microbes and Biocontrol Agent for Plant Nutrition and Protection: Current Perspective. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. Volume 51, Issue 5. doi.org/10.1080/00103624.2020.1729379.
13. Doilom, M., Guo, J-W., Phookamsak, R., Mortimer, P. E., Karunarathna, S. C., Dong, W., Liao, C-F., Yan, K., Pem, D., Suwannarach, N., Promputtha, I., Lumyong, S. and Xu, J-C. 2020. Screening of phosphate-solubilizing fungi from air and soil in Yunnan, China: four novel species in *Aspergillus*, *Gongronella*, *Penicillium*, and *Talaromyces*. *Frontiers in microbiology* 11:585215. doi: 10.3389/fmicb.2020.585215.

14. Donate-Correa, J., Leon-Barrios, Mand Perez-Galdona, R. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Island. *Plant Soil* 266:261-272.
15. Doyle, J. J. and Doyle, J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry* 19:11-15.
16. Durowade, K. A., Kolawole, O. M., Uddin, R. O and Enonbun, K. I. 2009. Isolation of Ascomycetous Fungi from a Tertiary Institution Campus Soil. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, Vol. 12 (4): 57-61.
17. Elias, F., Woyessa, D. and Muleta, D. 2016. Phosphate solubilization potential of rhizosphere fungi isolated from plants in jimma zone, southwest Ethiopia. *International Journal of Microbiology*.
18. Ferreira, C. M. H., Vilas-Boas, A., Sousa, C. A, Soares, H. M. V. M. and Soares. E. V. 2019. Comparison of five bacterial strains producing siderophores with ability to chelate iron under alkaline conditions. *AMB Express* 9 (78).
19. Gordon, S. A. and Weber, R. P. 1951. Colorimetric estimation of indoleacetic acid. *Plant physiology* 26(1): 192–195.
20. Inaji, A., Okazawa, A., Taguchi, T., Nakamoto, M., Katsuyama, N., Yoshikawa, R., Ohnishi, T., Waller, F. and Ohta, D. 2020. Rhizotaxismodulation in *arabidopsis* induced by diffusible compounds produced during the cocultivation of *Arabidopsis* and the endophytic fungus *Serendipita indica*. *Plant and Cell Physiology* 61:838–850.
21. Indiragandhi, P., Anandham, R., Madhaiyan, M. and Sa, T. M. 2008. Characterization of plant growth- promoting traits of bacteria isolated from larval guts of diamondback moth *Plutellaxylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). *Current Microbiology* 56:327–333.
22. Jain, R., Saxena, J. and Sharma, V. 2017. The ability of two fungi to dissolve hardly soluble phosphates in solution. *Mycology* 8 (2) :104 – 110 <https://doi.org/10.1080/21501203.2017.1314389>.
23. Katiyar, D., Hemantaranjan, A. and Dwivedi, P. 2018. Plant growth promoting rhizobacteria and their roles as fungal biocontrol agents: An overview. *Journal of Plant Science and Research* 34:127–136.
24. Kuhad, R. C., Singh, S., Lata. and Singh, A. 2011. Phosphate-solubilizing microorganisms. In: Singh A, Parmar N, Kuhad RC, editors. *Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol*. chapter 4. Berlin, Heidelberg: Springer. 65-84.
25. Meents, A. K., Furch, A. C. U., Almeida-Trapp, M., Özyürek, S., Scholz, S. S., Kirbis, A., Lenser, T., Theißen, G., Grabe, V., Hansson, B., Mithöfer, A. and Oelmüller, R. 2019. Beneficial and pathogenic arabidopsisroot-interacting fungi differently affect auxin levels and responsive genes during early infection. *Frontiers in microbiology* 10:380. doi.org/10.3389/fmicb.2019.00380.
26. Mendez, J. 2014. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from the arid soils of a semi-desert region of north-east Mexico. *Biological Agriculture & Horticulture* 30(3):211–217.
27. Naziya, B., Murali, M. and Amruthesh, K. N. 2020. Plant growth-promoting fungi (PGPF) instigate plant growth and induce disease resistance in *Capsicum annuum* L. upon infection with *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler & Bisby. *Biomolecules* 10(41). [doi:10.3390/biom10010041](https://doi.org/10.3390/biom10010041).
28. Nesme, T., Metson, G. S. and Bennett, E. M. 2018. Global P flows through agricultural trade. *Global Environmental Change* 50:133–141. [doi: 10.1016/j.gloenvcha.2018.04.004](https://doi.org/10.1016/j.gloenvcha.2018.04.004).
29. Prasad, M. R., Sagar, B. V., Devi, G. U., Triveni, S., Rao, S. R. K. and Chari, K. D. 2017. Isolation and Screening of Bacterial and Fungal Isolates for Plant Growth Promoting Properties from Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6 (8):753-761.

30. Potshangbam, M., Dev, S. I., Sahoo, D. and Strobel, G. A. 2017. Functional characterization of endophytic fungal community associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L. *Frontiers in Microbiology* 8:325.
31. Qiao, Huan., Sun, Xiao-Rui., Wu, Xiao-Qin., Li, Gui-E., Wang, Zao. and Li, De-Wei. 2019. The phosphate-solubilizing ability of *Penicillium guanacastense* and its effects on the growth of *Pinus massoniana* in phosphate-limiting conditions. *Biology Open* 8 (11): bio046797. doi.org/10.1242/bio.046797.
32. Raval, A. and Desai, P. 2015. Screening and characterization of several siderophore producing bacteria as plant growth promoters and biocontrolling agents. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 6(10):4803-4811.
33. Rijavec, T. and Lapanje, A. 2016. Hydrogen cyanide in the rhizosphere: Not suppressing plant pathogens, but rather regulating availability of phosphate. *Frontier in Microbiology* 7:1785. doi: 10.3389/fmicb.2016.01785.
34. Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbour-joining method: a new method for reconstruction of phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
35. Selvi, K. B., Paul, J. A., Vijaya, V. and et al. 2017. Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. *Biochemistry and Molecular Biology* 3:1.
36. Silva, M. G., de Curcio, J. S., Silva-Bailão, M. J. and et al. 2020. Molecular characterization of siderophore biosynthesis in *Paracoccidioides brasiliensis*. *IMA Fungus* 11:11. doi: 10.1186/s43008-020-00035-x.
37. Sperber, J. I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research* 9:778-781.
38. Szkop, M. and Bielawski, W. 2013. A simple method for simultaneous RP-HPLC determination of indolic compounds related to bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Antonie van Leeuwenhoek*. 103:683-691.
39. Tian, J., Ge, F., Zhang, D., Deng, S. and Liu, X. 2021. Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle. *Biology* 10, 158.
40. Varalakshmi, P. and Malliga, P. 2012. Evidence for production of Indole-3-acetic acid from a fresh water cyanobacteria (*Oscillatoria annae*) on the growth of *H. annuus*. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 2(3):1-15.
41. Viruel, E., Lucca, M. E. and Siñeriz, F. 2011. Plant growth promotion traits of phosphobacteria isolated from Puna, Argentina. *Archives of Microbiology* 193:489-496.
42. Wang, X., Wang, C., Sui, J., Liu, Z., Li, Q., Ji, C. and et al. 2018. Isolation and characterization of phosphofungi, and screening of their plant growth-promoting activities. *Amb Express* 8, 63. 10.1186/s13568-018-0593-4.
43. White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T. and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* 18(1):315-322.
44. Yadav, J., Verma, J. P. and Tiwari, K. N. 2011. Plant growth promoting activities of fungi and their effect on chickpea plant growth. *Asian Journal of Biological Sciences* 4:291-299.

Isolation and evaluation of plant growth-promoting characteristics of phosphate solubilizing fungi from Iranian soils

L. Faridian, J. Baharlouei¹, A. R. Falah Nosrat Abad,
and H. Kari DolatAbad

PhD student of Soil Science Department, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch;
E-mail: laleh.faridian@gmail.com

Assistant professor, Soil Science Department, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch;
E-mail: jbahar5411@yahoo.com.

Associate professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and
Extension Organization (AREEO); E-mail: rezafayah@yahoo.com

Assistant professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and
Extension Organization (AREEO); E-mail: hossein.kari@gmail.com

Received: August, 2022 & Accepted: December, 2022

Abstract

The application of phosphate solubilizing fungi (PSF) is a biological and eco-friendly method to increase phosphorus availability from insoluble sources. The aim of this study was to obtain PSFs that can be used as biological agent in order to increase soil phosphorus and improve plant growth. Initially, 144 PSFs isolates were isolated from the soil of corn fields (0-30 cm) in Fars, Kermanshah, and Khorasan Razavi provinces, Iran. Among them, 27 isolates showed the maximum solubilizing ability of tricalcium phosphate (TCP). Based on molecular analysis, different genera were identified as *Aspergillus* (7.5%), *Talaromyces* (44.4%), *Penicillium* (44.4%) and *Cladophialophora* (3.7%). This is the first report of *Cladophialophora* as mineral phosphorus solubilizing agent. The maximum phosphate solubilizing ability in solid media was represented by *Talaromyces pinophilus* strain MFA (halo to colony diameter is 4.11 mm), whereas this ability was manifested by *Talaromyces verruculosus* strain PF 157-2 (23.8 mg/l), *Talaromyces pinophilus* strain MFA (20.7 mg/l), *Aspergillus tubingensis* strain PF 140-2 (20.50 mg/l) and *Talaromyces pinophilus* strain FB (20.04 mg/l) in liquid media respectively. *Aspergillus tubingensis* strain PF 140-2 and *Talaromyces pinophilus* strain 1FB showed the maximum auxin (9.2 mg/l) and siderophore (ratio of halo zone diameter to colony diameter: 4.44 mm) production ability respectively. The maximum amount of hydrogen cyanide (grade 4) was produced by *Penicillium oxalicum* strain PF 83-1. These results confirmed that PSF especially *Talaromyces pinophilus* strain MFA, *Talaromyces verruculosus* strain PF 157-2, *Aspergillus tubingensis* strain PF 140-2 and *Talaromyces pinophilus* strain 1FB can be introduced as biological agents which could increase soil phosphorus availability and improve plant growth.

Keywords: Plant growth promotion, Phosphorus availability, Biological agents, and Phosphate Solubilizing Fungi

¹ Corresponding author: Department of Soil Science, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch.