دو فصلنامه

نشریه علمی

زیست شناسی خاک

شاپا: ۲۵۳۶-۲۳۴۵

جلد ۱۰ شماره ۱ سال ۱۴۰۱

فهرست

عنوان	صفحه
اثر قارچ اندوفیت *سیرندیپیتا ایندیکا* بر خصوصیات رشدی و تغذیه گیاه کینوا تحت تنش شوری *سجاد علیار، ناصر علی اصغرزاد، عادل دباغ محمدی نسب و شاهین اوستان*	۱
اثرات قارچ‌های میکوریز آربسکولار و سطوح آبیاری بر عملکرد و ویژگی‌های رشد درختان لیمو (*Citrus aurantifolia*) در داراب *حسن حقیقت نیا و فرهاد رجالی*	۲۱
اثر قارچ میکوریز توأم با برخی میکروارگانیسم‌ها و ترکیبات شیمیایی بر عملکرد شاخص‌های رشدی و فتوسنتزی ذرت *معصومه احمد زاده، ابراهیم صداقتی، روح الله صابری ریسه، اصغر رحیمی، علی اکبر محمدی میریک و نرگس حاتمی*	۳۳
مقایسه روش‌های HRM و DGGE جهت بررسی ترکیب جوامع باکتریایی خاک در کاربری‌های اراضی مختلف *قباد جلالی، امیر لکزیان، علیرضا آستارایی و محبوبه مظهری*	۴۹
ارزیابی کلنیزاسیون ریشه و ترکیبات بیوشیمیایی زعفران تحت رژیم آبیاری، تلقیح قارچ میکوریز آربوسکولار کود دهی آلی *مریم حبیبی، فرهاد رجالی، فائزه زعفریان و نادعلی باقری*	۶۵
تأثیر قارچ‌کش‌های سیستمیک و تماسی بر همزیستی قارچ میکوریزی *Rhizophagus irregularis* و صفات رویشی در دو گیاه گندم و ذرت *فرهاد رجالی، حسین کاری دولت‌آباد، مرضیه صفری و فهیمه فضلی‌خانی*	۸۱
بررسی روش‌های انحلال فسفات‌های نامحلول توسط ریزجانداران حل‌کننده فسفات *علیرضا فلاح نصرت آباد*	۹۳

انجمن علوم خاک ایران **مؤسسه تحقیقات خاک و آب**

نشریه علمی
زیست‌شناسی خاک

جلد 10 شماره (1)
1401

صاحب امتیاز: موسسه تحقیقات خاک و آب

تأییدیه درجه علمی

به استناد نامه شماره 3/18/77610 مورخ 1394/4/23 اعتبار علمی نشریه زیست شناسی خاک تمدید شده است

مدیر مسؤول: **دکتر منوچهر گرجی** **رئیس انجمن علوم خاک ایران و استاد دانشگاه تهران**

سردبیر: **دکتر هادی اسدی رحمانی** **استاد مؤسسه تحقیقات خاک و آب**

اعضاء هیأت تحریریه (به ترتیب حروف الفبا):

دکتر هادی اسدی‌رحمانی	**استاد موسسه تحقیقات خاک و آب**
دکتر حسین بشارتی	**استاد موسسه تحقیقات خاک و آب**
دکتر عبدالحسین ضیائیان	**دانشیار مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس**
دکتر حسینعلی علیخانی	**استاد دانشگاه تهران**
دکتر ناصرعلی اصغرزاد	**استاد دانشگاه تبریز**
دکتر علیرضا فلاح نصرت آباد	**دانشیار موسسه تحقیقات خاک وآب**
دکتر احمد گلچین	**استاد دانشگاه زنجان**
دکتر امیر لکزیان	**استاد دانشگاه فردوسی مشهد**
دکتر حبیب اله نادیان قمشه	**استاد دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین اهواز**
دکتر فرشید نوربخش	**استاد دانشگاه صنعتی اصفهان**

مدیر داخلی ***دکتر علیرضا فلاح نصرت آباد***

ویراستار انگلیسی: ***دکتر امیر لکزیان***

تایپ و صفحه آرایی **کبری علی نژاد**

تعداد انتشار در سال **دو شماره**

پایگاه الکترونیکی نشریه علمی زیست‌شناسی خاک: **www.sbj.areeo.ir**
پایگاه الکترونیکی انجمن علوم خاک ایران: **www.soiliran.org**
پایگاه الکترونیکی موسسه تحقیقات خاک و آب: **www.swri.ir**
آدرس الکترونیکی دفتر مجله: **jsb.soilbiology@yahoo.com**

این نشریه در پایگاه‌های علمی زیر نمایه می‌شود:
پایگاه استنادی علوم جهان اسلام (**ISC**): **www.isc.gov.ir**
پایگاه اطلاعات علمی جهاد دانشگاهی: **www.sid.ir**
پایگاه سیویلیکا: **www.civilica**

آدرس: کرج - میدان استاندارد، جاده مشکین دشت، بعداز رزکان نو، بلوار امام خمینی – موسسه تحقیقات خاک و آب، کد پستی: 3177993545
تلفن و نمابر: 36208796 (026) ***آدرس پایگاه الکترونیکی مجله: www.journals.areo.ir***

عنوان | فهرست | صفحه

اثر قارچ اندوفیت *سیرندیپیتا ایندیکا* بر خصوصیات رشدی و تغذیه گیاه کینوا تحت تنش شوری 1
سجاد علیار، ناصر علی اصغرزاد، عادل دباغ محمدی نسب و شاهین اوستان

اثرات قارچ‌های میکوریز آربسکولار و سطوح آبیاری بر عملکرد و ویژگی‌های رشد درختان لیمو (*Citrus aurantifolia*) در داراب 21
حسن حقیقت نیا و فرهاد رجالی

اثر قارچ میکوریز توأم با برخی میکروارگانیسم‌ها و ترکیبات شیمیایی بر عملکرد شاخص‌های رشدی و فتوسنتزی ذرت 33
معصومه احمد زاده، ابراهیم صداقتی، روح الله صابری ریسه، اصغر رحیمی، علی اکبر محمدی میریک و نرگس حاتمی

مقایسه روش‌های HRM و DGGE جهت بررسی ترکیب جوامع باکتریایی خاک در کاربری‌های اراضی مختلف 49
قباد جلالی، امیر لکزیان، علیرضا آستارایی و محبوبه مظهری

ارزیابی کلنیزاسیون ریشه و ترکیبات بیوشیمیایی زعفران تحت رژیم آبیاری، تلقیح قارچ میکوریز آربوسکولار کود دهی آلی 65
مریم حبیبی، فرهاد رجالی، فائزه زعفریان و نادعلی باقری

تأثیر قارچ‌کش‌های سیستمیک و تماسی بر همزیستی قارچ میکوریزی *Rhizophagus irregularis* و صفات رویشی در دو گیاه گندم و ذرت 81
فرهاد رجالی، حسین کاری دولت‌آباد، مرضیه صفری و فهیمه فضلی‌خانی

بررسی روش‌های انحلال فسفات‌های نامحلول توسط ریزجانداران حل‌کننده فسفات 93
علیرضا فلاح نصرت آباد

راهنمای تهیه مقاله نشریه علمی زیست شناسی خاک

مجله زیست شناسی خاک اولین نشریهٔ تخصصی رشته علوم خاک در ایران می‌باشد که مقالات پژوهشی مرتبط با تحقیقات صورت گرفته در کلیه جنبه‌های زیست شناسی خاک را چاپ می‌نماید. هدف از انتشار این مجله ارتقاء دانش اساتید، محققان و دانشجویان علاقمند این گرایش و شناخت هر چه عمیق‌تر اززیست شناسی خاک برای حفظ و بهره‌برداری پایدار از خاک می‌باشد. از اهم زمینه‌های فعالیت این نشریه می‌توان به نقش موجودات زنده خاک در چرخه عناصر غذایی و فرآیندهای زیستی مرتبط با بهبود ویژگی‌های فیزیکی، شیمیایی و ارتقاء سطح حاصلخیزی خاک، تغذیه گیاه و افزایش عملکرد، مدل‌سازی مکانیسم‌ها و فرآیندهای زیستی مربوط به پویاسازی، معدنی شدن و آلی شدن عناصر غذایی، جایگاه موجودات زنده خاکزی در ذخیره سازی و تغییر و تبدیلات مواد آلی خاک، تنوع زیستی و عملکردی بخش زنده خاک،آنزیم های خاک، روابط موجودات زنده خاک با یکدیگر و همچنین ریشه گیاهان و تبادلات مولکولی بین آنها، تشخیص، بیان و تبادل ژن در خاک، اثرات متقابل انواع آلودگی‌ها و بخش زنده خاک منجمله زیست پالایی خاک‌های آلوده، فرآیندهای زیستی خاک و نقش آنها در تولید و مصرف گازهای گلخانه‌ای، فناوری زیستی موجودات خاکزی برای تولید انواع مایه تلقیح‌ها و کودهای زیستی، فعال کننده-های تجزیه مواد آلی و پاک کننده‌های زیستی خاک‌های آلوده، استفاده از فناوری‌های مولکولی جدید برای شناسایی و همچنین ردیابی موجودات زنده در خاک و نقش آنها در پدیده‌های مختلف خاک اشاره کرد.

نکات مهم:

1- متن مقاله نباید در هیچ نشریه‌ای چاپ و یا همزمان به نشریه دیگری ارسال شده باشد.

2- مسئولیت صحت و سقم کلیه مطالب مندرج در مقاله بر عهده نویسندگان می‌باشد.

3- مسئولیت صحت و سقم ترتیب نام نویسندگان بر عهده شخصی است که مقاله را برای نشریه ارسال می‌کند.

4- مقالات صرفاً می‌بایستی منتج از تحقیقات نویسنده یا نویسندگان و فقط در زمینه زیست شناسی خاک باشد.

مقالات باید با استفاده از word 2007 و در محیط windows xp و با استفاده از قلم نازنین 14 تایپ شده باشند. نویسنده(گان) محترم می‌بایستی مقاله از طریق سایت نشریه **www.iranjsb.ir** ارسال نمایند. ذکر نام و نام خانوادگی نویسندگان، مرتبه علمی، آدرس پستی نویسنده مسئول، آدرس پست الکترونیک کلیه نویسندگان به صورت یک مقاله کامل در قسمت فایلهای با نام و فایل بدون نام نویسندگان در فایلهای بدون نام نویسنده، تکمیل و ارسال نسخه اصل تعهدنامه با امضاء خود نویسنده(گان) در فایلهای پیشنیاز سایت الزامی است.

نحوهٔ نگارش مقاله

1- مقاله حداکثر در 15 صفحهٔ A4 با فاصلهٔ خطوط 1/5 و حاشیه‌های 3 سانتی‌متر از هر طرف و به صورت تک ستونی در نرم افزارWord 2007 تایپ شود.

2- نوع قلم فارسی و انگلیسی و اندازهٔ آنها مطابق جدول زیر استفاده شود.

3- تمامی سطور در متن مقاله دارای شماره گذاری (Line numbering) باشد.

4- پیش از نقطه (.) و کاما (،) گذاشتن فاصله لازم نیست، لیکن پس از آنها، یک فاصله لازم است.

5- اصول نگارش زبان فارسی به طور کامل رعایت شده و حتی الامکان از به کاربردن اصطلاحات انگلیسی که معادل فارسی آنها در فرهنگستان زبان فارسی تعریف شده‌اند، پرهیز گردد.

6- برای ذکر جنس و گونه گیاه، جانور و یا میکروارگانیسم ها از حالت *ایتالیک* استفاده شود.
7- در صورت استفاده از واژه (های) مخفف باید در اولین استفاده، واژه مذکور تعریف و پس از آن واژه مخفف در مقاله استفاده گردد.
8- استفاده از پاورقی برای ارائه اطلاعات تکمیلی در مقاله بلامانع است. در صورت استفاده از پاورقی، باید به ترتیب شماره گذاری انجام گیرد.

جدول 1- نوع و اندازه قلم برای تهیه بخش های مختلف مقاله

موقعیت استفاده	نام قلم	اندازه قلم
عنوان مقاله	**BNazaninپر رنگ**	14
متن مقاله	BNazanin	12
عناوین بخش های مقاله	**BNazanin پر رنگ**	12
نام مؤلفان	**BNazanin پر رنگ**	12
کلمات کلیدی(Keywords)	**BNazanin پر رنگ**	12
عناوین جداول و اشکال	**BNazanin پر رنگ**	11
متن جداول و شکل ها و منابع	BNazanin	10 و یا 11 برحسب نیاز
متن انگلیسی	Times New Roman	یک واحد کمتر از اندازهٔ فارسی در هر موقعیت

ساختار مقاله

هر مقاله باید شامل برگ مشخصات ، عنوان ، چکیده فارسی، واژه‌های کلیدی فارسی، مقدمه، مواد و روش-ها، نتایج، بحث، سپاسگزاری، منابع مورد استفاده، چکیده انگلیسی و واژه‌های کلیدی انگلیسی باشد.

برگ مشخصات مقاله: این قسمت در یک صفحه مجزا تهیه شده و شامل عنوان مقاله، نام و نام خانوادگی، مرتبه علمی، محل خدمت و آدرس پستی و پست الکترونیکی نویسنده(گان) و شماره تماس نویسنده مسئول می‌باشد.

عنوان مقاله: عنوان مقاله حداکثر در 20 کلمه و منعکس کننده محتوای مقاله باشد.در زیر عنوان نام و نام خانوادگی، مرتبه علمی، محل خدمت و آدرس پستی و پست الکترونیکی نویسنده(گان) ذکر گردد.

چکیده فارسی: چکیده مقاله در حداکثر 300 کلمه، بیانگر مسئله، هدف، روش و نتایج بدست آمده و نتیجه گیری کلی از پژوهش است. چکیده می‌بایستی ترجیحاً در یک پاراگراف تنظیم گردد.در زیر چکیده فارسی و در پاورقی آدرس پستی نویسنده مسئول ذکر گردد.

واژه‌های کلیدی:

واژه‌های کلیدی(**Keywords**) شامل حداقل 3 و حداکثر 6 کلمه مرتبط با پژوهش انجام شده باشد. این واژه‌ها می‌بایستی به گونه‌ای انتخاب گردد که در عنوان مقاله نبوده تا حداکثر استفاده از آنها برای تهیه فهرست موضوعی (index) امکان پذیر باشد. واژه های کلیدی بر اساس حروف الفبای فارسی مرتب شوند.

مقدمه

در این بخش بایستی موضوع پژوهش و فرضیه‌های موردنظر تعریف گردد. بـه مهـم‌تـرین تحقیقـات صـورت گرفته قبلی در داخل و خارج از ایران اشاره شود و سپس لزوم پژوهش موردنظر تشریح و با تأکید بر وجه تمایز ایـن پژوهش با مطالعات قبلی مشخص شود.

مواد و روش‌ها

این قسمت شامل مواد مورد استفاده و شرح روش بکار رفته مانند جامعه آمـاری، روش‌هـای نمونـه گیـری، اندازه گیری‌ها و نحوه تجزیه و تحلیل آماری می‌باشد. برای روش‌های متداول و شناخته شده نیازی به ذکر جزئیـات وجود نداشته و فقط به منبع مورد استفاده اشاره شود.

نتایج

در این بخش، نتایج بدست آمده از پژوهش به همراه جدول و شکل (اعم از تصویر یا نمودار) بیان می‌شود. از تکرار داده‌ها به صورت چندگانه (جدول، نمودار و غیره) پرهیز گردد. ارسال فایل Excel مربوط به نمودارها الزامی است. از کلماتی نظیر گراف، نقشه، تصویر و نظایر آن خودداری شده و تنها از واژه «شکل» استفاده شود. هر جدول از شماره، عنوان، سرستون ها و متن جدول تشکیل می‌شود. یک جدول باید با خطی افقی از شماره و عنوان جدول متمایز شود. همچنین سر جدول با یک خط افقی از متن جدول جدا و در زیر متن جدول نیز یک خط افقی رسم شود. عنوان جدول در بالای جدول درج و پس از کلمه جدول و شماره آن، خط تیره و سپس عنوان ذکر شود. در متن جدول تا جایی که ممکن است نباید از خطوط افقی و عمودی استفاده کرد. هر ستون جدول باید دارای عنوان و واحد مربوط به کمیّت آن ستون باشد. اگر همهٔ ارقام جدول دارای یک واحد مشترک باشند، آن واحد در عنوان اصلی جدول ذکر شود. توضیحات اضافی عنوان و متن جدول به صورت زیرنویس ارائه شوند.

در نمودارها از نشانه‌های○□Δ●■▲ به صورت توپر و توخالی استفاده شود. برای درج عنوان هر شکل، پس از کلمهٔ شکل و شمارهٔ آن، نقطه و سپس عنوان ذکر شود. اختصارات موجود در شکلها و جداول باید در زیرنویس توضیح داده شوند. تمام اعداد متن و توضیحات جداول و شکلها باید به زبان فارسی ارائه گردد. از ارسال نمودارهای رنگی جداً اجتناب نموده و از رنگهای سفید، سیاه و هاشورهای کاملاً متفاوت استفاده شود..

تمامی جداول و اشکال باید به ترتیب شماره در مقاله آورده شوند و شماره مذکور نیز باید به همان ترتیـب در مـتن مقاله مورد اشاره قرار گیرد.

بحث

در این قسمت با استفاده از سایر منابع، یافته‌های پژوهش علت‌یابی شده و دلایل قبول و رد آنها مورد بحث قرار می‌گیرد. بنابراین قسمت عمده بررسی منابع در این قسمت مورد استناد قرار می‌گیرد.

* در صورت لزوم می‌توان نتایج و بحث را توأماً تحت عنوان «**نتایج و بحث**» ارائه کرد.

نتیجه گیری

در این بخش نویسنده از پژوهش انجام یافته نتیجه گیری کرده و کاربرد عملی و یا تئوری حاصل از تحقیق را بیان می‌نماید. ارائه پیشنهادات در این بخش انتهائی نیز بلامانع است.

سپاسگزاری:

در این بخش نویسنده(گان) از اشخاص و سازمان‌هایی که در اجرای تحقیق همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌نماید. این بخش در حداکثر 50 کلمه تنظیم گردد.

منابع مورد استفاده:

فهرست منابع باید شامل منابعی باشد که در متن ذکر شده و انتشار یافته اند و نیز شامل منابعی می‌شوند که برای چاپ پذیرفته شده اند. مکاتبات شخصی و یا تحقیقات چاپ نشده فقط در متن مقاله قابل ذکر می باشند. در مورد منابعی که بصورت آنلاین چاپ شده اند و فاقد شماره جلد و یا صفحه می باشند، ذکر شناسه دیجیتال (DOI) ضروری است.

شیوهٔ ارجاع به منابع علمی در تمام متن مقاله بایستی به صورتی باشد که منبع مورد ارجاع(چه فارسی و چه انگلیسی) در پایان جمله در داخل پرانتز به فارسی ارائه شود. برای منابع دارای دو نویسنده، نام هر دو نویسنده و منابعی که بیش از دو نویسنده دارند، نخست نام نفر اول و سپس " همکاران" و تاریخ بیان شود. مثال:

..... نتایج مشابهی توسط برخی پژوهشگران نیز گزارش شده است (کریمی و احمدی، 1389).

..... نتایج مشابهی توسط سایر محققان گزارش شده است (آلوی و همکاران، 2010).

..... نتایج مشابهی توسط سایر محققان گزارش شده است (آلوی و همکاران، 2010؛ کریمی و احمدی، 1389).

برای منابعی که لزوما در داخل پرانتز ارائه نمی شود بدین صورت عمل شود.

بای بوردی و همکاران (1382) گزارش کردند...

اسمیت (2002) گزارش کرد ...

اسمیت و جونز (2002) گزارش کردند...

اسمیت و همکاران (2002) گزارش کردند...

فهرست منابع مورد استفاده در پایان متن به صورت پیوسته و به ترتیب منابع فارسی و انگلیسی ارائه شوند. منابع مورد استفاده به ترتیب حروف الفبای نام خانوادگی نگارنده، (یا اولین نگارنده برای منابعی که بیش از یک نگارنده دارند) زیر هم آورده شوند. چنانچه از یک نگارنده چندین منبع ذکر شود، ترتیب درج آن‌ها بر حسب سال انتشار، از جدید به قدیم است. اگر از نگارنده‌ای چندین منبع همسال وجود داشته باشد، با گذاشتن حروف a، b و c پس از سال انتشار منابع از یکدیگر متمایز شوند. چنانچه مقالات منفرد و مشترک در یک سال از یک نگارنده ارائه شود، نخست مقالات منفرد و سپس مقاله‌های مشترک به ترتیب حروف الفبای نام نگارندگان بعدی مرتب شوند.

برای یک مقاله یا کتاب به ترتیب نام خانوادگی نگارنده(گان)، حرف اول اسم کوچک نگارنده(گان)، تاریخ انتشار، عنوان مقاله، عنوان کامل مجله، شماره جلد، و اولین و آخرین صفحه مقاله ارائه شود. برای یک کتاب به ترتیب نام خانوادگی و سپس حرف اول نام کوچک نگارنده، تاریخ انتشار، عنوان کامل کتاب، نام ناشر، محل انتشار ارائه شود.

در مورد مرجعی که نویسنده آن مشخص نیست به جای نام نگارنده از "Anonymous" برای منابع انگلیسی و (بی نام) برای منابع فارسی استفاده شود.

چنانچه منبع ترجمه شده باشد، در فهرست منابع باید نخست نام نویسنده(گان) کتاب اصلی، عنوان مشخصات آن (به زبان انگلیسی) و سپس نام مترجم (مترجمان) ذکر شود.

مثال‌هایی برای تنظیم منابع

1- مقاله از مجله

Brennan, E.W. and Lindsay, W.L.1998. Reduction and oxidation effect on the solubility and transformation of iron oxides. Soil Science Society of America Journal 62:930–937.

2- مقاله از کارگاه آموزشی یا علمی

Hanbury, A. 2002. The taming of the hue, saturation and brightness colour Space, 7th Computer Vision Winter Workshop, February 2002, Bad Aussee, Austria.

3- مطلب از کتاب

Lindsay, W.L. 1979. Chemical equilibrium in soils. John Wiley & Sons, New York.

4- مطلب نقل شده یک نویسنده در یک مجموعه مقالات

Logsdon, S.D. and Laird, D.A. 2003. Ranges of bound water properties associated with a smectite clay. p. 101–108. In: Electromagnetic Wave Interaction with Water and Moist Substance. Proc. of Conf., Rotorua, New Zealand. 23–26 Mar. 2003. Industrial Research, Auckland, New Zealand.

5- ذکر مطلب از نویسنده ای در یک کتاب که نام ویراستاران روی جلد آن است

Olsen, S.R. and Sommers, L.E.1982. Phosphorus. p. 403–427. In: Page, A.L. (ed.) Methods of soil analysis. Part 2. 2nd ed. Agron. Monogr. No. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.

6- ذکر مطلب از اینترنت

Soil Survey Staff. 2004. NRCS soils [Online]. Available at http://soils. usda.gov [verified 23 Mar. 2005]. USDA-NRCS, Washington, DC.

چکیده انگلیسی

چکیده انگلیسی بایستی ترجمه دقیق چکیده فارسی باشد.

واژه‌های کلیدی انگلیسی: باید ترجمه دقیق واژه‌های کلیدی فارسی باشد. واژهای کلیدی بر اساس حروف الفبای انگلیسی مرتب شوند و حرف اول کلمات به صورت بزرگ (کاپیتال) نوشته شود.

کلیه مقالات پس از دریافت توسط سردبیر بررسی و پس از تایید با راهنمای تهیه مقاله تطبیق و در صورت رعایت فرمت نشریه، مقاله برای داوری ارسال خواهد شد. پس از اتخاذ رأی داوران و تأیید گروه دبیران (هیأت تحریریه)، مقاله در نوبت چاپ قرار خواهد گرفت. چنانچه مقاله ارسالی با راهنمای تهیه مقاله تطبیق نداشته باشد به نویسنده مسئول عودت داده خواهد شد و مجدداً از زمان برگشت، تاریخ رسید مقاله منظور و برای داوری ارسال خواهد شد.

فرم تعهد نامه

نشریه علمی زیست‌شناسی خاک

اینجانب ..... نویسنده مسئول مقاله زیر:

موارد زیر را به آگاهی می رسانم:

1. **کلیه تهیه کنندگان مقاله از ارسال آن به دفتر نشریه شما آگاهند**
2. **مقاله قبلاً در هیچ نشریه داخلی و خارجی منتشر نشده است**
3. **مقاله تا زمان پایان بررسی در آن نشریه به نشریه دیگری ارسال نخواهد شد.**
4. **هیچگونه تغییری در تعداد نویسندگان یا ترتیب ذکر اسامی انجام نخواهد شد.**

نام نام خانوادگی نویسنده اول: **امضاء نویسنده اول مقاله**

نام نام خانوادگی نویسنده دوم: **امضاء نویسنده دوم مقاله**

نام نام خانوادگی نویسنده سوم: **امضاء نویسنده سوم مقاله**

نام نام خانوادگی نویسنده چهارم: **امضاء نویسنده چهارم‌مقاله**

داوران مقالات واصله به دفتر نشریه علمی زیست‌شناسی خاک شش ماه اول سال 1401

دکتر مجید بصیرت	2 مقاله
دکتر هوشنگ خسروی	1 مقاله
دکتر مهدی زارعی	1 مقاله
دکتر محسن علمایی	1مقاله
دکتر ناصر علی اصغرزاد	6 مقاله
دکتر حسین کاری دولت آباد	4 مقاله
دکتر حبیب الله نادیان	3 مقاله

اثر قارچ اندوفیت *سیرندیپیتا ایندیکا* بر خصوصیات رشدی و تغذیه گیاه کینوا تحت تنش شوری

سجاد علیار[1]، ناصر علی اصغرزاد، عادل دباغ محمدی نسب و شاهین اوستان

دانشجوی کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ **aliyarsajad73@gmail.com**

استاد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ **n-aliasghar@tabrizu.ac.ir**

استاد گروه اکوفیزیولوژی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ **adeldabb@yahoo.com**

استاد شیمی خاک گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ **oustan@tabrizu.ac.ir**

دریافت: **1400/3/4** و پذیرش: **1400/10/29**

چکیده

گیاه کینوا (*Chenopodium quinoa* Willd.) یک گیاه شبه غله پر محصول از تیره چغندریان بوده و در برابر تنش شوری، تحمل خوبی از خود نشان می‌دهد. این گیاه به دلیل قرار گرفتن در تیره چغندریان، قادر به همزیستی میکوریزی نبوده ولی گزارش ها نشان می‌دهند که قارچ اندوفیت *Serendipita indica* می‌تواند وارد ریشه این گیاه شده و احتمالاً قادر است مقاومت آن را در برابر تنش شوری افزایش دهد. این پژوهش به‌صورت گلدانی آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار در خاک لوم شنی استریل انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل دو سطح قارچ *Serendipita indica* (تلقیح و عدم تلقیح) و شوری حاصل از نمک کلرید سدیم شامل سطوح 1/47(هدایت الکتریکی اولیه خاک)، 5، 10، 20 و 30 دسی‌زیمنس بر متر) بودند. نتایج آزمایش نشان داد که اثر متقابل تنش شوری و تلقیح قارچ به‌غیراز غلظت عناصر نیتروژن و فسفر در بخش ریشه در سایر صفات مورد مطالعه هم در بخش هوایی و هم ریشه معنی‌دار ($P<0.05$) بود. همچنین با افزایش سطح تنش ، غلظت عناصر شامل نیتروژن، فسفر، پتاسیم، کلسیم و منیزیم، صفات رشدی و درصد کلنیزاسیون، در گیاه کینوا به‌طور معنی‌داری ($P<0.05$) کاهش یافت. قارچ *S. indica* توانست وزن خشک‌ریشه را در شوری‌های شاهد، 5 و 10 دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب (23/45، 25/66 و 25/57 درصد) نسبت به تیمار عدم تلقیح افزایش دهد؛ اما وزن خشک بخش هوایی را تنها در شوری شاهد به میزان 9 درصد نسبت به تیمار بدون قارچ افزایش داد . مایه‌زنی قارچ *S. indica* توانست غلظت سدیم ریشه را در شوری‌های 10، 20 و 30 دسی‌زیمنس بر متر به ترتیب 30/49، 66/78 و 43/55 درصد نسبت به تیمار عدم تلقیح کاهش دهد. در بخش هوایی نیز غلظت سدیم را در همان سطوح شوری به ترتیب 20/96، 13/28 و 10/24 درصد نسبت به تیمار بدون قارچ کاهش داد. . با توجه به نتایج، قارچ *S. indica* توانست غلظت عناصر نیتروژن و پتاسیم بخش هوایی را در دو سطح شوری 20 و 30 دسی‌زیمنس بر متر نسبت به تیمار بدون قارچ به‌طور معنی‌داری افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: خصوصیات رشدی، عناصر غذایی، قارچ *S. indica*، کلنیزاسیون ریشه ، شاخص کلروفیل

---

[1]. نویسنده مسئول آدرس: گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

مقدمه

کینوا *Chenopodium quinoa* willd (Quinoa) گیاهی است بومی کوه‌های آند در بولیوی، شیلی و پرو که برای دانه کشت می‌شود ولی از برگ‌های جوان آن هم به‌صورت سبزی تازه و یا پخته استفاده می‌شود. دانه کینوا کم‌حجم و بسیار خوش‌هضم بوده و یک منبع غنی از پروتئین، آهن، منیزیم، فیبر، فسفر و ویتامین B2 می‌باشد، در مقایسه با غلات متداول از میزان پروتئین بالاتر و تعادل اسیدآمینه‌ای مطلوب‌تری برخوردار است. ارزش غذایی کینوا به‌وسیله سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (فائو) با شیر خشک مقایسه شد (جاکوبسن و همکاران، 2005). با توجه به اینکه ایران کشوری وسیع با جمعیتی رو به افزایش است تأمین نیاز غذایی مردم به اولویت اساسی در این زمینه مبدل شده است از طرفی شوری خاک ازجمله شایع‌ترین تنش‌های محیطی است که تولید موفقیت‌آمیز محصولات زراعی را در اکثر کشورها بخصوص کشورهای دارای اقلیم‌های خشک و نیمه‌خشک نظیر ایران را به مخاطره انداخته است. همانند کمبود آب، غلظت بالای املاح محلول در خاک نیز از دیگر تهدیدهای زندگی بشر است (اشرف و همکاران 2008). برای این منظور، بررسی روش‌های جدید برای رویارویی با این چالش‌ها ضروری است یکی از روش‌های مقابله با این مشکل کاشت گیاهان متحمل به شوری و به‌ویژه هالوفیت (نمک دوست) نظیر کینوا است (کویرو و همکاران، 2008).

این گیاه مقاومت زیادی در برابر طیف گسترده‌ای از تنش‌های غیر زیستی مانند سرما، شوری و خشکی از خود نشان می‌دهد و همچنین به‌خوبی قابلیت رشد در شرایط نامساعد محیطی را دارد (جاکوبسن و همکاران، 2009). جاکوبسن و همکاران (2009) در آزمایشی به منظور بررسی اثر شوری بر روی گیاه کینوا رقم Titicaca در شرایط آب و هوایی اروپا به این نتیجه رسیدند که این رقم به خوبی با شرایط تنش شوری سازگار شده است. همچنین طالب نژاد و همکاران (2015) در تحقیقی دیگر بر روی گیاه کینوا رقم (5206. Titicaca, NO) که در دانشگاه شیراز باهدف بررسی تأثیر عمق آب زیرزمینی شور (شامل 0/3، 0/5 و 0/80 متر) و شوری آب آبیاری (شامل 10، 20، 30 و 40 دسی‌زیمنس‌بر متر) بر رشد این گیاه انجام شد نتایج نشان‌دهنده حداکثر عملکرد دانه، 3/11 تن بر هکتار در شوری 10 دسی زیمنس بر متر بوده است که به مقادیر عملکرد دانه در مناطق بومی کینوا نزدیک است. آنان نشان دادند که کینوا در شوری آب 40 دسی‌زیمنس‌بر متر نیز می‌تواند مراحل رشد فنولوژیک خود را طی کرده ولی عملکرد دانه آن بطور قابل ملاحظه کاهش می‌یابد و به حدود 0/35 تن در هکتار می‌رسد که از ویژگی‌های منحصربه‌فرد این گیاه است. اما ملکی و همکاران (2018) بیان کردند کینوا گیاهی است که حد آستانه تحمل به شوری گیاه کینوا در هر یک از مراحل جوانه زنی، استقرار گیاهچه، گلدهی و پر شدن دانه ها به ترتیب 28، 8، 20 و 15 دسی زیمنس می باشد.

هاریادی و همکاران (2010) بیان کردند که کینوا دارای یک سیستم بسیار کارآمد برای تنظیم فشار اسمزی در مقابل افزایش غلظت NaCl است .در تحقیقی دیگر کویرو و همکاران (2008) گزارش کردند که گیاه کینوا قادر به تکمیل چرخه زندگی خود و تولید بذر حتی در شوری آب دریا می‌باشد. جاکوبسن (2003) بیان کرد که کینوا را می‌توان در بسیاری از محیط‌های حاشیه مبتلاً به خشک سالی و یا تنش شوری که در حال حاضر دارای بهره‌وری بسیار پایین هستند کشت کرد. ایجاد گیاهان مقاوم به شوری، از طریق مهندسی ژنتیک، یا از بین بردن شوری خاک از طریق شستن نمک اضافی، اگرچه موفقیت‌آمیز بوده است، اما برای مقاصد کشاورزی اقتصادی نمی‌باشد (کانتریل و لیندرمن، 2001) در کنار مهندسی ژنتیک، راه‌کارهای بیولوژیک مثل استفاده از انواع باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه، قارچ‌های میکوریزا و اندوفیت برای کاهش تنش شوری به‌عنوان روش‌های کمکی پیشنهاد شده است (دیکسون و

همکاران، 1993). کودهای بیولوژیک با افزایش قابلیت جذب و دسترسی عناصر غذایی گیاهان و افزایش تحمل آن‌ها به کمبود عناصر غذایی، از مؤلفه‌های مهم مدیریت حاصلخیزی خاک در جهت نیل به اهداف کشاورزی پایدار می‌باشند (معزاردلان و ثواقبی‌فیروزآبادی، 1381). قارچ‌های اندوفیت یکی از ریز جانداران مفید خاک، با ایجاد تغییرات ژنتیکی، فیزیولوژیکی و اکولوژیکی در گیاهان میزبان خود، عملکرد آن‌ها را در واحد سطح افزایش می‌دهند و امکان توسعه و کشت آن‌ها در خاک‌هایی با شرایط نامساعد محیطی و تغذیه‌ای فراهم می‌آورند (لیندال و همکاران، 2007).

قارچ *Piriformospora indica*، اندوفیت گیاهی می‌باشد که در سال 1998 توسط وارما و همکاران از ریزوسفر دو گیاه خشکی‌پسند کهور (*Zizyphus nummularia*) و گز (*Prosopis juliflora*) از صحرای تار کشور هندوستان جداسازی شد. طبق گزارش ویس و همکاران (2016) اخیراً نام این قارچ به *Serendipita indica* تغییریافته است. تاثیر این قارچ در افزایش جذب نیتروژن، فسفات، مواد معدنی و بهبود مقاومت گیاهان زراعی در شرایط نامساعد محیطی توسط یانگ و همکاران (2012) گزارش‌شده است. پژوهش‌های گوناگون حاکی از پتانسیل مطلوب این قارچ در افزایش زیست‌توده‌ی بسیاری از گیاهان از قبیل گشنیز (*Coriandrum sativum*)، جو (*Hordeum vulgare*)، ذرت (*Zea mays*)، نخود معمولی (*Cicer arietinum*) (باجد و همکاران، 2010)، لوبیا (*Phaseolus vulgaris*)، سویا (*Glycine max*) و اسفناج (*Spinacia oleracea*) (ری و وارما، 2005) است. در پژوهشی دیگر، مایه زنی گیاه کلم چینی (*Brassica compestrils* L.) با این قارچ، باعث گسترش رشد ریشه، شاخه و ازدیاد ریشه‌های جانبی گردید در حالیکه گیاهان تیره شب بو از جمله انواع کلم قادر به ایجاد همزیستی با قارچهای میکوریزی نیستند (سان و همکاران، 2010). همچنین *S. indica* در گیاه پنبه سبب افزایش مقاومت آن در برابر تنش غرقابی شد (یانگ و همکاران، 2012). اثرات مثبت ناشی از قارچ اندوفیت *S. indica* بر بقا و افزایش رشد گیاهان میزبان در مناطق خشک و نیمه‌خشک جهان که با دو معضل عمده خشکی و شوری روبرو هستند، توجه پژوهشگران را به خود جلب نموده است. گرچه ریشه برخی گیاهان غیرمیکوریزی می‌توانند با این قارچ اندوفیت رابطه برقرار نمایند ولی اثر مثبت این قارچ در همه این گیاهان هنوز مشخص نیست و حتی در برخی گیاهان حالت بیش حساسیتی (Hypersensivity) نسبت به این قارچ ایجاد می‌شود که سلول‌های ریشه با خودکشی خود از ادامه نفوذ این قارچ بیوتروف جلوگیری می‌کنند (کیانگ و همکاران، 2012). با توجه به اثرات مثبت گزارش‌شده از قارچ *S. indica* در تعدیل تنشهای شوری و خشکی در گیاهان مختلف (حتی در گیاهان غیرمیکوریزی)، و همچنین اهمیت کینوا به عنوان گیاه شبه غله در تغذیه انسان، در این پژوهش اثر قارچ *S. indica* بر وضعیت رشد و غلظت عناصر غذایی گیاه کینوا در شرایط تنش شوری مورد بررسی گرفته است.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر به‌صورت کشت گلدانی در گلخانه گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز (با فتوپریود[1] 12 ساعت روشنایی طبیعی نور خورشید و دمای 3±23 درجه‌ی سانتی‌گراد در روز و 3±18 درجه‌ی سانتی‌گراد در شب) با گیاه کینوا به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل دو سطح قارچ (تلقیح و عدم تلقیح با قارچ) و پنج سطح شوری شامل شاهد (هدایت الکتریکی اولیه خاک1/47)،5، 10، 20، 30 دسی‌زیمنس‌بر متر). بود. بذر گیاه کینوا (*Chenopodium quinoa Willd cv. Titicaca*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید و قارچ *سیرندیپیتا ایندیکا* از گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز تهیه شد. برای تکثیر قارچ از محیط کشت کفر[2] استفاده شد. قارچ‌ها در دمای 25 درجه سانتی‌گراد

1. photoperio
2. Kaefer Medium

به مدت 4 هفته انکوباسیون شدند سپس پنج میلی‌لیتر محلول توئین 20 (0/005 درصد) به سطح پتری اضافه گردید و با رابر به مدت 10 - 5 دقیقه سائیده شد و به مدت 4 دقیقه ورتکس گردید. تعداد اسپور در سوسپانسیون حاصله با کمک لام نئوبایر شمارش و تعداد $6/3\times10^6$ اسپور در هر میلی‌لیتر بدست آمد و سرانجام 80 گرم پرلیت ریز استریل با مجموع سوسپانسیون حاصل شده(155 میلی لیتر) مخلوط گردید.

کشت گیاه و اعمال تیمارها

خاک مورداستفاده از ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز از عمق 0-20 سانتی‌متری نمونه‌برداری شد بعد از هوا خشک، از الک 2 میلی‌متری عبور داده شد و ویژگی‌های مهم خاک شامل بافت (کلوت، 1986)، درصد کربن آلی (نلسون و سامرز، 1982)، فسفر قابل‌جذب (اولسن و سامرز، 1982)، کربنات کلسیم معادل (آلیسون و مودی، 1965) و پتاسیم قابل‌جذب (توماس، 1982) و رطوبت ظرفیت مزرعه و نقطه پژمردگی دائم با استفاده از دستگاه صفحات فشار تعیین گردید، که نتایج آن در جدول 1 ارائه شده است سپس در فشار یک اتمسفر و دمای 121 درجه سلسیوس به مدت یک ساعت در اتوکلاو استریل شده و به مقدار 2300 گرم در داخل گلدان‌های PVC دو و نیم کیلویی با قطر دهانه 15/1 و ارتفاع 18 سانتی‌متر توزیع شد. بذر گیاه کینوا (*Chenopodium quinoa Willd cv. Titicaca*) از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه گردید و به‌منظور استریل کردن بذرها ابتدا چندین مرتبه با آب مقطر شستشو داده شد و سپس به مدت 30 ثانیه در اتانول 70 درصد غوطه‌ور گردید در مرحله بعد به داخل محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد انتقال‌یافته و بعد از هفت دقیقه، حدود 10 بار با آب مقطر استریل کاملاً شستشو گردیدند. در داخل هر گلدان تعداد 7 عدد بذر کشت شد. به این صورت که ابتدا در گلدان‌ها 7 حفره ایجاد و زاد مایه قارچ به مقدار مشخص درون حفره‌ها ریخته شد و بذر روی آن قرار گرفت سپس دو سانتی‌متر خاک استریل روی بذرها قرار داده شد. در مورد تیمار شاهد بدون قارچ همان مقدار پرلیت استریل خیس شده با محلول 5 هزارم درصد توئین 20، در داخل حفره ریخته شد. در زمان کشت بر اساس آزمون خاک، پتاسیم در مقادیر کافی برای گیاه وجود داشت به همین دلیل استفاده نشد و کود فسفر به دلیل ترغیب کلونیزاسیون قارچ اندوفیت، استفاده نشد. ولی نیتروژن از منبع اوره به هر گلدان 68/0 گرم در سه تقسیط، یک‌سوم در ابتدای کشت و دوسوم در طول دوره‌ی رشد رویشی گیاه اضافه شد (صالحی و دهقانی، 1397).

پس از رشد و استقرار گیاه، بوته‌های ضعیف حذف‌شده و چهار بوته در هر گلدان نگه‌داشته شد. تیمارهای شوری با توجه به مطالعات انجام‌شده در رابطه با این گیاه انتخاب گردید. جهت اعمال تنش شوری، ابتدا توسط پیش‌آزمونی میزان کلرید سدیم لازم برای هر گلدان جهت رسیدن به EC موردنظر مشخص گردید و در سه تقسیط به گلدان‌ها اضافه شد. یک‌سوم نمک به‌صورت پودر در ابتدای کشت با خاک گلدان کاملاً مخلوط شد و دوسوم باقی‌مانده در دو تقسیط، در مقدار آب لازم حل‌شده و به گلدان‌ها اضافه گردید. با توجه به مراحل اولیه استقرار گیاه تا اعمال تیمارهای شوری، آبیاری هرروز و به‌طور مرتب با آب مقطر انجام می‌گرفت و رطوبت گلدان‌ها از طریق وزن کردن در FC 8/0 تنظیم شد. (علیار، 1399). گیاهان تا پایان مرحله‌ی رویشی (2 ماه) رشد یافته و به‌محض ظهور اولین گل دریکی از گلدان‌ها برداشت شدند.

اندازه‌گیری پارامترها (قبل و پس از برداشت گیاه)

قبل از برداشت گیاهان شاخص کلروفیل برگ با استفاده از دستگاه کلروفیل سنج (Hansatech, CL-01) اندازه‌گیری شد برای این منظور 8 برگ سالم از هر گلدان انتخاب شد. پس از پاک کردن برگ، پهن‌ترین بخش برگ میان انبرک دستگاه قرار گرفت سپس شاخص کلروفیل قرائت شد. میانگین اندازه‌گیری‌ها بعنوان شاخص کلروفیل برگ برای هر گلدان در نظر گرفته شد. و بعد از پایان دوره رشد بخش هوایی و ریشه گیاهان به‌طور جداگانه در هر گلدان برداشت و وزن‌تر بخش هوایی و ریشه

اندازه‌گیری و بعد از خشک شدن در دمای 70 درجه سلسیوس در آون فن دار وزن خشک آن‌ها نیز تعیین شد.. برای اندازه‌گیری عناصر، هضم نمونه‌های گیاهی به روش خشک سوزانی انجام گرفت (وسترمن 1990). برای اندازه‌گیری غلظت فسفر (کاتنی 1980) و پتاسیم و سدیم در عصاره‌های گیاهی به ترتیب از دستگاه اسپکتروفتومتر (Hack DR/2000) و فلیم فتومتر (Corning 410) استفاده شد و برای اندازه‌گیری غلظت کلسیم و منیزیم به روش (والینگ و همکاران، 1989) از دستگاه جذب اتمی مدل Shimdzu, AA-6300 استفاده گردید. نیتروژن موجود در بخش هوایی و ریشه گیاهان مورد آزمایش به‌وسیله‌ی تقطیر در سیستم کجلدال اندازه‌گیری شد (والینگ و همکاران، 1989).

برای تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه با این قارچ، عموماً از روش‌های مرسوم برای قارچ‌های میکوریزی استفاده می‌شود ولی از آنجائیکه هیف‌های این قارچ اندوفیت بسیار باریک و اسپورهای داخل ریشه‌ای آن بسیار ریز هستند لذا در مشاهدات میکروسکپی اغلب با مشکل مواجه می‌شود. بنابراین، در این تحقیق ابتدا سعی شد از طریق اندازه گیری مقدار ارگوسترول (لیپید مارکر این قارچ) با روش اسپکتروفتومتری، میزان بیومس قارچ در ریشه برآورد شود ولی موفقیت آمیز نبود، در نتیجه با روش مرسوم رنگ‌آمیزی تعیین گردید. برای این منظور بخشی از ریشه‌های ظریف و ریز از هر نمونه گیاه جداشده و پس از شستشوی کامل با آب به روش کورمانیک و مک گراو (1982) رنگ‌آمیزی شدند. جهت تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه از روش تقاطع خطوط شبکه[1] استفاده شد (نوریف و همکاران، 1992؛ شنک و پرز، 1988).

تجزیه آماری داده‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با دو فاکتور، فاکتور اول قارچ شامل دو سطح (تلقیح و عدم تلقیح) و فاکتور دوم شوری در پنج سطح در سه تکرار انجام گرفت که درمجموع 30 واحد آزمایشی وجود داشت. آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها و سپس تجزیه واریانس و مقایسه میانگین آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و رسیم نمودارها با Excel انجام شد مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون LSD در سطح احتمال یک و پنج درصد انجام شد

نتایج و بحث

خصوصیات خاک مورد آزمایش در این تحقیق در جدول 1 آمده است.

وزن خشک شاخساره و ریشه

آنالیز واریانس (جدول 2) نشان داد که اثر متقابل قارچ و سطوح شوری بر وزن خشک‌ریشه و شاخساره معنی‌دار می‌باشند ($P<0.05$). نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل تیمارها نشان داد به‌جز سطوح شوری 20 و 30 دسی‌زیمنس‌بر متر تیمارهای حاوی مایه‌زنی قارچ دارای وزن خشک‌ریشه بالاتری نسبت به تیمار بدون قارچ داشتند.

مایه‌زنی قارچ منجر به افزایش وزن خشک‌ریشه کینوا در سطوح شوری (شاهد، 5 و 10 دسی‌زیمنس‌بر متر) به ترتیب (23/45، 25/66 و 25/57 درصد) نسبت به تیمار بدون قارچ شد اما در دو سطح 20 و 30 دسی‌زیمنس‌بر متر تأثیر معنی‌داری نداشت. در بخش هوایی مایه‌زنی با قارچ فقط در شوری شاهد توانست تأثیر معنی‌داری داشته باشد و به میزان 9 درصد وزن خشک شاخساره را افزایش دهد. در سایر سطوح شوری تأثیر معنی‌داری نداشت. به طور کلی افزایش شوری از 10 دسی زیمنس به بالا سبب کاهش شدید وزن خشک ریشه و شاخصاره گردید و این روند در گیاهان تلقیح شده و نشده با قارچ تقریبا مشابه می باشد گرچه اثر مثبت تلقیح قارچ بر وزن خشک ریشه در سطوح شوری متناظر بیشتر است (شکل 1).

[1] Grid line Intersection Method (GIM)

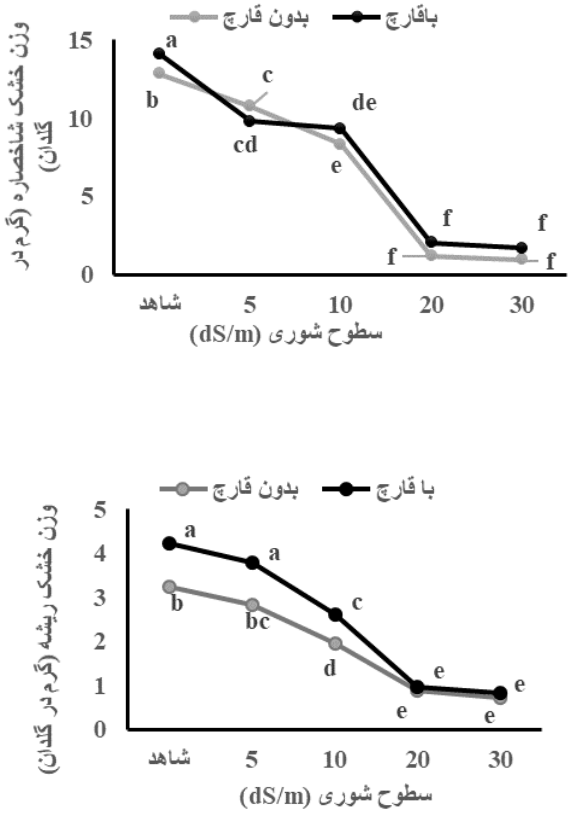
جدول 1- برخی خواص فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

بافت	کربنات کلسیم (%)	FC درصد وزنی	PWP درصد وزنی	pH	%OC	EC_e ($dS.m^{-1}$)	$K(mg.kg^{-1})$	$P(mg.kg^{-1})$
لوم شنی	5.83	20.7	9.5	7.31	0.63	1.47	333.27	10.8

جدول 2- تجزیه واریانس اثرات مایه‌زنی قارچ و تنش شوری بر وزن خشک شاخساره و ریشه، نسبت وزن خشک ریشه به خشک هوایی (R/S)، شاخص کلروفیل و درصد کلنیزاسیون

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن خشک شاخساره	وزن خشک‌ریشه	R/Sخشک	شاخص کلروفیل	درصد کلنیزاسیون
قارچ	1	2.46*	2.34**	0.25*	80.36*	1340.27*
تنش شوری	4	174.79**	10.8**	0.19**	18.14 ns	308378.95**
قارچ* تنش شوری	4	1.19*	0.30*	0.51**	33.28*	27.19**
خطا	20	0.39	0.10	0.4	8.75	4462.19
ضریب تغییرات (درصد)		8.83	14.34	15.27	5.65	20.62

**: معنی‌دار در سطح یک درصد، *: معنی‌دار در سطح پنج درصد و ns: غیر معنی‌دار

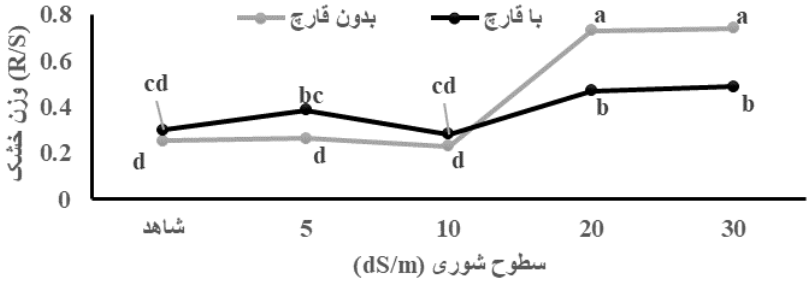


شکل 1- اثر متقابل تنش شوری و قارچ بر وزن خشک شاخساره و ریشه گیاه کینوا

یوسفی راد و همکاران (1389) بیان کردند که کاهش معنی‌دار وزن گیاه در شرایط شور ممکن است به دلیل صدمات اسمزی و ایجاد تنش خشکی، کاهش سطح برگ، کاهش هدایت روزنه‌ای، تجمع کلر و سدیم در اندام‌ها، تخریب ساختمان کلروپلاست و کاهش فتوسنتز باشد. در شرایط تنش شوری گیاه برای جلوگیری از ورود بیش‌ازحد یون سدیم به داخل ریشه مقدار زیادی انرژی مصرف می‌کند که این امر باعث کاهش رشد ریشه می‌شود (ربحی و همکاران 2007). طی بررسی‌هایی مشاهده‌شده است گیاهانی که با قارچ *S. indica* تیمار شده‌اند، میزان اکسین بیشتری نسبت به شاهد دارند. با توجه به نقش اکسین در انگیزش ریشه‌ی نابجا در گیاه سالم و قلمه‌ها افزایش ریشه‌های جانبی می‌تواند ساده‌ترین دلیل از نحوه‌ی اثر قارچ بر رشد گیاهان باشد (دروج و همکاران، 2007). تأثیر تلقیح قارچ اندوفیت *S. indica* در افزایش بیومس گیاهان ذرت، تنباکو، جعفری، آرتمیزیا و درخت سپیدار توسط وارما و همکاران (2001) موردبررسی قرار گرفت و نتایج آن‌ها حاکی از افزایش بیومس شاخساره و ریشه قارچ به میزان دو برابر نسبت به گیاهان شاهد تلقیح نشده بوده است.

نسبت وزن خشک‌ریشه به شاخساره

(جدول 2) نشان می‌دهد که اثر متقابل تیمارهای قارچ × شوری بر نسبت وزن خشک‌ریشه به شاخساره معنی‌دار شده است ($P<0.01$). مقایسه میانگین اثرات متقابل سطوح شوری و قارچ نشان داد که با افزایش تنش شوری نسبت مذکور افزایش می‌یابد. مشاهده می‌شود که گیاه مایه‌زنی شده با قارچ نسبت به بدون قارچ تا شوری 10 دسی‌زیمنس‌بر متر نسبت بالاتری دارد هرچند این اختلاف تنها در شوری 5 دسی‌زیمنس‌بر متر با اختلاف 31/57 درصد معنی‌دار می‌باشد. اما در دو سطح 20 و 30 دسی‌زیمنس‌بر متر تیمار بدون قارچ به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار با قارچ می‌باشد و در شوری‌های متناظر سبب افزایش نسبت مذکور به ترتیب (36/98 و 35/13 درصد) نسبت به تیمار مایه‌زنی با قارچ شده است (شکل 2).

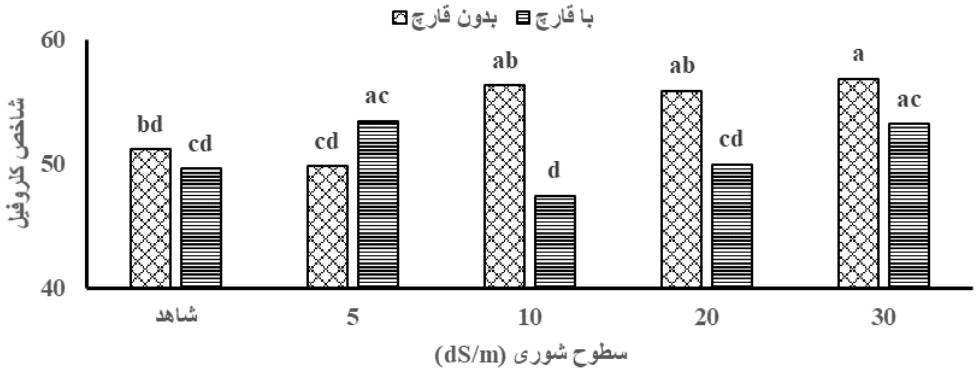


شکل 3- اثر متقابل تنش شوری و قارچ بر نسبت وزن خشک‌ریشه به شاخساره

اغلب متخصصین فیزیولوژی نسبت R/S را به‌عنوان یک معیار مناسب برای گزینش تحمل به تنش‌های شوری و خشکی معرفی می‌کنند. نسبت بالاتر ریشه به اندام هوایی توانایی گیاه را برای افزایش تحمل به خشکی و شوری بهبود می‌بخشد. کاهش نسبت R/S در اثر شوری، حاکی از اختصاص مواد فتوسنتزی کمتر به ریشه نسبت به اندام هوایی می‌باشد (برزوئی و همکاران 1390). بیشتر محققان اظهار کردند در حضور قارچ میکوریز نسبت R/S به دلیل افزایش رشد بخش هوایی و کاهش رشد ریشه، کاهش می‌یابد (برتا و همکاران، 1995؛گاویتو، 2000) که نتایج ما هم نشان می‌دهد در شوری‌های بالاتر این نسبت در تیمارهای مایه‌زنی شده با قارچ کمتر از بدون قارچ است.

شاخص کلروفیل

آنالیز واریانس (جدول 2) نشان داد که اثر متقابل تیمارهای قارچ × شوری بر میزان کلروفیل برگ معنی‌دار شده است ($P<0.05$). مقایسه میانگین اثرات متقابل شوری × قارچ نشان داد که با افزایش غلظت شوری، میزان کلروفیل برگ در همه سطوح تنش شوری افزایش‌یافته ولی این افزایش تا شوری 20 دسی زیمنس بر متر معنی‌دار نمی باشد اما اختلاف بین شوری شاهد و 30دسی زیمنس بر متر معنی دار می‌باشد همچنین مقایسه میانگین مایه زنی قارچ نشان می‌دهد که شاخص کلروفیل در تیمار بدون قارچ به طور معنی داری بیشتر از تیمار با قارچ می‌باشد بطوریکه بیشترین شاخص کلروفیل برای تیمار بدون قارچ درشوری 30 دسی‌زیمنس‌بر متر می‌باشد. با توجه به (شکل 3) مشخص می گردد که در کل شاخص کلروفیل در تیمار بدون قارچ بیشتر از تیمار حاوی مایه‌زنی شده است اما این افزایش تنها در دو سطح 10 و 20 دسی‌زیمنس‌بر متر معنی دار می‌باشد و در این دو سطح شاخص کلروفیل به ترتیب (15/75 و 10/61 درصد) بیشتر از تیمارهای حاوی قارچ می‌باشد.



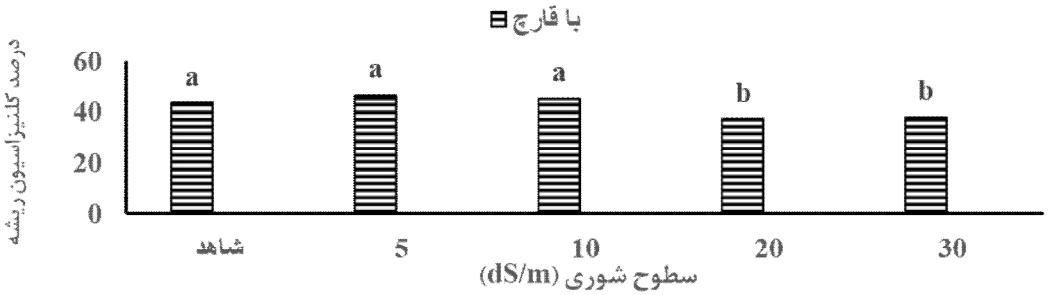
شکل 3- اثر متقابل تنش شوری و قارچ بر شاخص کلروفیل

گزارش‌شده که با افزایش سطح نمک کلرید سدیم، میزان کلروفیل برگ روند کاهشی نشان می‌دهد. این موضوع باعث ناکارآمدی برگ‌ها در انجام فتوسنتز و تشدید آسیب‌های ناشی از تنش می‌شود. این مورد در نتایج تحقیقات ناوارو و همکاران (2000) در گوجه‌فرنگی گزارش‌شده است. بعضی از محققین عقیده دارند که کاهش غلظت کلروفیل برگ‌ها در اثر تنش شوری می‌تواند در ارتباط با افزایش فعالیت آنزیم تجزیه‌کننده کلروفیل باشد (کارمر، 2002). برخلاف گزارش روند کاهش شاخص کلروفیل با افزایش تنش گزارش‌های معدودی مانند تحقیق حاضر از تأثیر افزایشی شوری بر شاخص کلروفیل در دست است (لی-دیلی و همکاران، 1993). این افزایش ممکن است نتیجه افزایش تعداد کلروپلاست در برگ‌های تحت تنش باشد (جمیل و همکاران، 2007؛ میسرا و همکاران، 1997). برخی محققان نیز تیره‌تر شدن رنگ برگ‌های گیاه در سطوح بالای شوری را نشانه‌ای از افزایش غلظت کلروفیل در برگ‌ها می‌دانند (براون و هایوارد، 1956). در گزارش دیگر، نلسون و همکاران (1995) افزایش عدد کلروفیل متر را براثر افزایش ضخامت برگ گزارش کرده‌اند.جنچکه و همکاران (1984) گزارش دادند که یکی از دلایل افزایش میزان کلروفیل در گیاهان تلقیح شده با قارچ، جذب بیش‌تر عناصر معدنی می‌باشد. بر خلاف نتایج جنکچه و همکاران مبنی بر افزایش میزان کلروفیل گیاهان تلقیح شده رحمانی ایرانشاهی و همکاران در سال (1394) در گیاه گندم رقم نیک‌نژاد کاهش غلظت کلروفیل در گیاهان تلقیح شده با قارچ *S. indica* را گزارش کردند و بیان نمودند که احتمالاً این کاهش به دلیل اثر رقت در گیاه

باشد که با نتایج تحقیق حاضر همسو میباشد و به نظر می رسد از دیگر دلایل این کاهش، افزایش سطح برگ در گیاهان تلقیح شده و کاهش ضخامت برگ نسبت به گیاهان تلقیح نشده باشد.

درصد کلنیزاسیون ریشه

جدول (2) نشان داد که اثر متقابل تیمارهای قارچ × شوری بر درصد کلنیزاسیون ریشه معنی‌دار شده است ($P<0.01$). نتایج نشان داد که افزایش شدت تنش شوری سبب کاهش کلنیزاسیون ریشه‌های گیاهان تلقیح شده با قارچ شده است و اثر تنش شوری بر روی کلنیزاسیون ریشه‌ها کاملاً مشهود است. به صورتی که درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها در شوری‌های 20 و 30 به ترتیب (14/14 و 12/58 درصد) نسبت به شاهد کاهش نشان می‌دهد. در گیاهان شاهد (تلقیح نشده) هیچ‌گونه اندام قارچی مشاهده نشد (شکل 4).



شکل 4- اثرات متقابل تنش شوری و مایه‌زنی قارچ بر درصد کلنیزاسیون ریشه

نتایج مطالعات انجام‌شده بر روی ریشه گیاهان تلقیح شده با اسپورهای قارچ، حاکی از توان این قارچ در کلنیزه نمودن ریشه گیاهان میزبان دارد همچنین پژوهش‌ها نشان داده است که پس از تلقیح قارچ، اسپور قارچ قادر است که در سطح ریشه گیاهان کنگر فرنگی جوانه‌زده و در سطح ریشه گسترش یابد و تعداد ریشه را نسبت به گیاهان غیر آلوده افزایش دهد (قاسم نژاد و بابایی زاد، 1390) کاهش میزان توسعه قارچ *S. indica* را می‌توان به اثرات منفی تنش شوری بر میزان فتوسنتز و کاهش عرضه کربن به قارچ و همچنین اثر بازدارندگی سدیم و کلر بر رشد میسلیوم‌های قارچ نسبت داد (حاج بلند و همکاران، 2010). همچنین خالوندی و همکاران در سال (1395) نتایج مشابهی بر روی گیاه نعناع فلفلی گزارش کردند.

غلظت فسفر شاخساره و ریشه

آنالیز واریانس (جدول 3) نشان داد که اثر متقابل تیمارهای قارچ × شوری بر غلظت فسفر شاخساره معنی‌دار شده است ($P<0.01$). مقایسه میانگین اثرات متقابل شوری × قارچ نشان داد که با افزایش شدت تنش، غلظت فسفر شاخساره کاهش‌یافته است با توجه به شکل مشاهده می‌شود که شدت کاهش غلظت در تیمار بدون قارچ خصوصاً در سطوح تنشی بالاتر بسیار بیشتر از تیمار مایه‌زنی شده می‌باشد. به‌غیراز شوری 20 دسی‌زیمنس‌بر متر که تیمار با قارچ با اختلاف 68/10 درصد و به‌طور معنی‌داری بیشتر از بدون قارچ است در بقیه سطوح بین تیمار با قارچ و بدون قارچ اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد. در بخش ریشه تنها اثرات اصلی قارچ و سطوح شوری بر غلظت فسفر معنی‌دار شده است ($P<0.01$). مشاهده می‌شود که بین سطوح شوری تا 20 دسی‌زیمنس‌برمتراختلاف معنی‌دار وجود دارد اما بین شوری 20 و 30 دسی‌زیمنس‌بر متر این اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد (شکل 5).

جدول 3- تجزیه واریانس اثرات مایه‌زنی قارچ و تنش شوری بر غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم، سدیم، کلسیم و منیزیم شاخساره

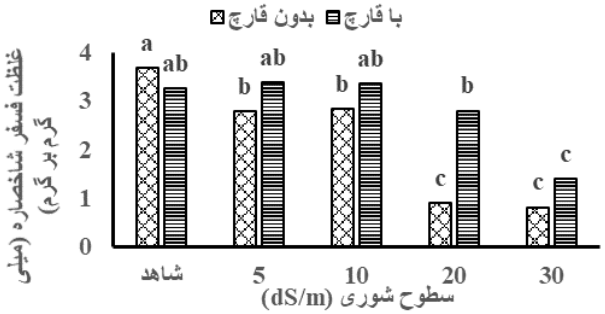
منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		k	Na	P	Ca	Mg	N
قارچ	1	77.74**	3.69**	3.07**	11.58**	4.82**	170.82**
تنش شوری	4	178.34**	127.11**	6.02**	8.02**	3.09**	16.89*
قارچ* تنش شوری	4	30.93**	0.54**	1.02**	9.38**	0.68*	11.44**
خطا	20	1.78	0.11	0.12	0.69	0.17	4.39
ضریب تغییرات (درصد)		5.22	6.28	13.99	10.27	6.48	9.11

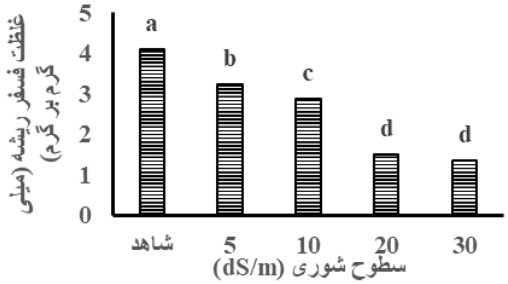
ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد

ادامه جدول 3- تجزیه واریانس اثرات مایه‌زنی قارچ و تنش شوری بر غلظت نیتروژن، فسفر، پتاسیم، سدیم، کلسیم و منیزیم ریشه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		k	Na	P	Ca	Mg	N
قارچ	1	13.64ns	146.63**	1.02**	42.66**	0.01ns	7.06*
تنش شوری	4	503.86**	101.47**	8.23**	11.07**	158.84**	8.9**
قارچ* تنش شوری	4	33.95**	48.9**	0.01ns	13.75**	4.83*	2.96ns
خطا	20	4.07	0.9	0.06	2.94	1.63	1.62
ضریب تغییرات (درصد)		14.52	10.61	9.79	12.35	11.17	9.63

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد





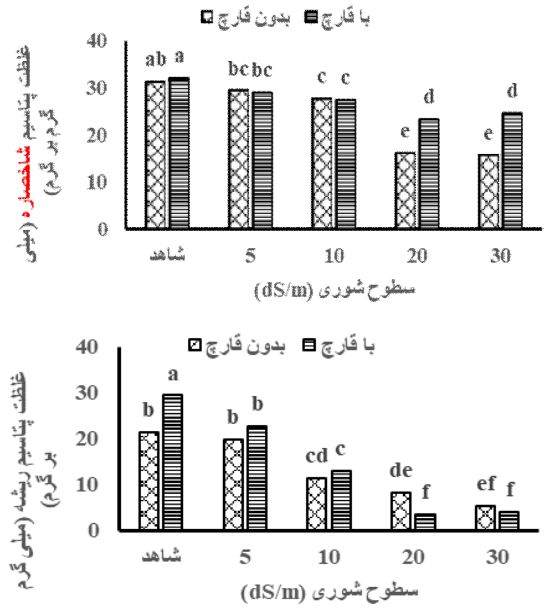
شکل 5 - اثر متقابل تنش شوری و قارچ بر غلظت فسفر شاخساره و اثر اصلی تنش شوری بر غلظت فسفر ریشه

فسفر یکی از عناصر ضروری موردنیاز گیاه است که کمبود آن باعث اختلال در رشد و متابولیسم گیاه می‌شود اما در خاک‌های شور قابلیت دسترسی فسفر به دلیل کاهش فعالیت یون فسفر و فرایندهای جذب

سطحی در خاک بسیار کم است. گراتان و گریو (1992) بیان کردند که کاهش فعالیت فسفر به دلیل افزایش قدرت یونی محلول و کاهش غلظت فسفر محلول خاک به دلیل ایجاد کانی های کلسیم فسفات از جمله دلایل کاهش جذب فسفر توسط گیاهان در شرایط شور می باشد. محققان در تحقیقات خود افزایش جذب فسفر گیاهان تلقیح شده با قارچ *S. indica* را به افزایش سطح جذب، توسعه ریشه و تولید هورمون‌های محرک رشد نسبت دادند (وارما و همکاران، 1999؛ سینگ و همکاران، 2000). قارچ *S. indica* با تولید مقادیر فراوانی اسید فسفاتاز موجب حلالیت فسفر نامحلول آلی خاک و فراهمی آن برای گیاه می‌گردد (زرین جوب و همکاران، 1390). همچنین، تولید و ترشح آنزیم فسفاتاز توسط ریسه‌های قارچ میکوریز باعث می‌شود که فسفات آلی غیرمحلول و تثبیت‌شده در خاک به شکل محلول درآید و برای ریشه قابل‌جذب گردد (سونگ، 2005).

غلظت پتاسیم شاخساره و ریشه

آنالیز واریانس (جدول 3) نشان داد که اثر متقابل تیمارهای قارچ × شوری بر غلظت پتاسیم شاخساره و ریشه معنی‌دار شده است ($P<0.01$). مقایسه میانگین اثرات متقابل شوری × قارچ نشان داد که با افزایش تنش شوری، غلظت پتاسیم شاخساره و ریشه کاهش‌یافته است. در قسمت شاخساره تا شوری 10 دسی‌زیمنس‌بر متر اختلاف معنی‌داری بین تیمار تلقیح و عدم تلقیح مشاهده نشد اما مایه‌زنی قارچ توانست در شوری‌های 20 و 30 دسی‌زیمنس‌بر متر غلظت پتاسیم شاخساره را به ترتیب (30/62 و 37/06 درصد) افزایش دهد که از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری با تیمار بدون قارچ می‌باشد. در بخش ریشه مشاهده می شود که تا شوری 10 دسی زیمنس بر متر مایه زنی قارچ غلظت پتاسیم را افزایش داده است هر چند که این افزایش تنها در شوری شاهد معنی دار می‌باشد. اما با افزایش تنش شوری به 20 و 30 دسی زیمنس بر متر مشاهده می‌شود که غلظت پتاسیم در تیمارعدم تلقیح بیشتر از تیمار تلقیح یافته می‌باشد ولی تنها در شوری 20 دسی زیمنس بر متر این اختلاف معنی‌دار می‌باشد. (شکل 6).

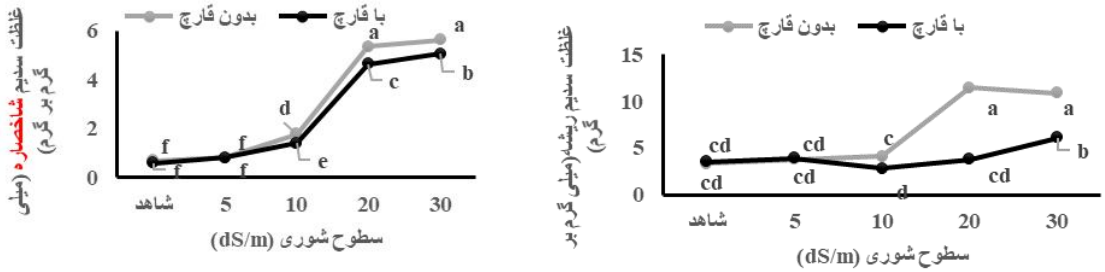


شکل 6 - اثر متقابل تنش شوری و قارچ بر غلظت پتاسیم شاخساره و ریشه گیاه کینوا

در میان عناصر غذایی، پتاسیم با بسته کردن روزنه‌ها و نیز تنظیم اسمزی درسلول‌های ریشه گیاهان نقش به سزایی دارد قابلیت گیاهان در جذب این عنصر از محیط ریشه در شرایط نامساعد محیطی همانند خشکی و شوری می‌تواند در میزان عملکرد گیاه مؤثر باشد (اگنیو و وارن 1996). رحیمی و همکاران (2014) اظهار کردند که قارچ *S. indica* در گیاهان تلقیح شده سهولت ورود پتاسیم به سیتوپلاسم گیاهان را افزایش می‌دهد و گیاه را در مقابل تنش مقاوم می‌سازد. همزیستی قارچی، با کاهش تجمع سدیم و آثار منفی ناشی از آن در سلول و تغییر نسبت سدیم به پتاسیم در سیتوپلاسم، بهبود جذب فسفر و پتاسیم و فرآیندهای بیوانرژتیک را در گیاه موجب شد. نکته حائز اهمیت این است که غلظت پتاسیم اندام هوایی در همه تیمارها بیشتر از ریشه می‌باشد. بالا بودن پتاسیم اندام هوایی نسبت به ریشه در شرایط تنش شوری نوعی پاسخ گیاه نسبت به تجمع سدیم زیاد در برگ می‌باشد (میری و همکاران، 1971). در مورد بخش ریشه و پایین بودن غلظت پتاسیم ربشه در گیاهان مایه زنی شده می توان به ارتباط پتاسیم و سدیم در این خصوص اشاره کرد به طوری که نتایج تحقیقات باکس و شاختمان (2011) نشان می دهد سدیم مازاد مانع ازجذب K^+ و Ca^{+2} دربسیاری ازگونه های گیاهی مانندگندم،پنبه وگوجه فرنگی می‌شود. کاهش مشاهده شده در غلظت K^+ هردو رقم تحت شرایط شوری را می‌توان به تضاد اثرات آنتاگونیستی بین K^+ و Na^+ درطول فرایند جذب نسبت داد(باکس و شاختمان، 2011) .اگرچه عناصر سدیم و پتاسیم ازنظرشیمیایی مشابه هستند،اما نقش آنها در متابولیسم گیاه متفاوت است. شواهدی وجود دارد که غلظت زیاد سدیم، غلظت پتاسیم را تحت اثر قرار میدهد (سونگ وهمکاران، 2013)

غلظت سدیم شاخساره و ریشه

آنالیز واریانس (جدول 3) نشان داد که اثر متقابل تیمارهای قارچ × شوری بر غلظت سدیم شاخساره و ریشه معنی‌دار شده است ($P<0.01$). مقایسه میانگین اثرات متقابل شوری × قارچ نشان داد که با افزایش تنش شوری، غلظت سدیم شاخساره و ریشه افزایش‌یافته مشاهده می‌شود که تا شوری 5 دسی‌زیمنس‌بر متر غلظت سدیم بخش هوایی و ریشه تفاوت معنی‌داری نشان نمی‌دهد و تا این سطح اختلاف بین تیمار با قارچ و بدون قارچ نیز معنی‌دار نمی‌باشد مایه‌زنی قارچ سبب کاهش غلظت سدیم شاخساره در سطوح شوری (10، 20 و 30 دسی‌زیمنس‌بر متر) به ترتیب (20/96، 13/28 و 10/24 درصد) و غلظت سدیم ریشه در سطوح شوری مذکور به ترتیب (30/49، 66/78 و 43/55 درصد) نسبت به شاهد بدون تلقیح کاهش داد (شکل 7).

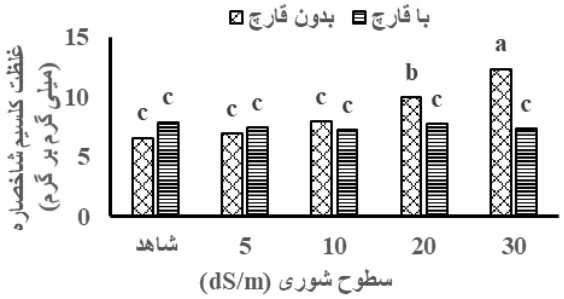


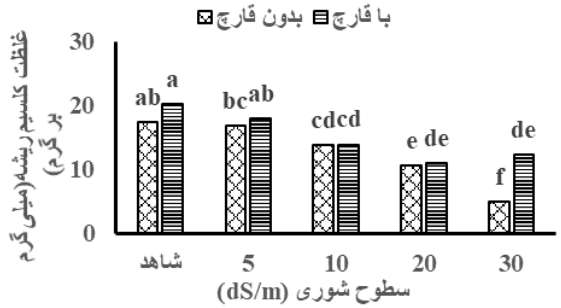
شکل 7 - اثر متقابل تنش شوری و قارچ بر غلظت سدیم شاخساره و ریشه گیاه کینوا

برین و همکاران (1385)، درتحقیقی روی اثر قارچ های میکوریز آربوسکولار بر عملکرد و جذب عناصر غذایی در گوجه فرنگی تحت شوری حاصل از NaCl و مخلوط نمک ها انجام دادند به این نتیجه رسیدند که با افزایش سطوح شوری در هر دو نوع ترکیب شوری، غلظت سدیم ریشه و شاخصاره افزایش معنی‌داری دارد. همچنین صفر نژاد و همکاران نیز در سال (1390) با تحقیق در مورد گیاه دارویی کندل افزایش غلظت سدیم ریشه و شاخساره را با افزایش شوری گزارش کردند که این گزارشات با نتایج حاصل از پژوهش حاضر در مورد گیاه کینوا مشابه است.گزارش شده است که قارچ *S. indica.* در شرایط تنش شوری باعث کاهش انتقال سدیم از ریشه به اندام هوایی گیاه می‌شود. نتیجه این فرآیند، افزایش تحمل گیاهان تلقیح شده با این قارچ در برابر تنش شوری خواهد بود (مونس و تستر، 2008). قارچ *S. indica* احتمالاً تجمع یون‌های سدیم را در ریشه باعث می‌شود و از ورود آن‌ها به بخش‌های هوایی گیاهان با فعال کردن سازوکارهای فیزیولوژیک یا مولکولی ناشناخته ممانعت می‌کند. این وقایع به کاهش آثار منفی تنش شوری بر گیاه منجر می‌شود (سپهری و همکاران، 2009). بر خلاف گزارشات سایر محققین در بخش ریشه مشاهده می‌شود که غلظت سدیم در گیاه بدون تلقیح بیشتر از گیاه مایه‌زنی شده می باشد که به نظر می رسد به دلیل اثر رقت در گیاهان تلقیح شده باشد

غلظت کلسیم شاخساره و ریشه

آنالیز واریانس (جدول 3) نشان داد که اثر متقابل تیمارهای قارچ × شوری بر غلظت کلسیم شاخساره و ریشه معنی‌دار شده است ($P<0.01$). مقایسه میانگین اثرات متقابل شوری × قارچ نشان داد که افزایش تنش شوری، تأثیر معنی‌داری در تیمار مایه‌زنی شده با قارچ ندارد ولی در تیمار بدون قارچ غلظت کلسیم شاخساره افزایش‌یافته و مشاهده می‌شود که تا شوری 10 دسی‌زیمنس‌بر متر بین تیمار تلقیح و عدم تلقیح تفاوت غیر معنی‌دار است ولی در شوری 20 و 30 دسی‌زیمنس‌بر متر تیمار بدون قارچ به ترتیب (22/64 و 40/71 درصد) غلظت کلسیم را افزایش داده است. در بخش ریشه بین سطوح شوری شاهد تا 20 دسی‌زیمنس‌بر متر غلظت کلسیم ریشه بین تیمار مایه‌زنی شده با قارچ و بدون قارچ اختلاف معنی‌داری ندارد اما در شوری 30 دسی‌زیمنس‌بر متر تیمار با قارچ غلظت کلسیم را 60/30 درصد افزایش داده است (شکل 8)



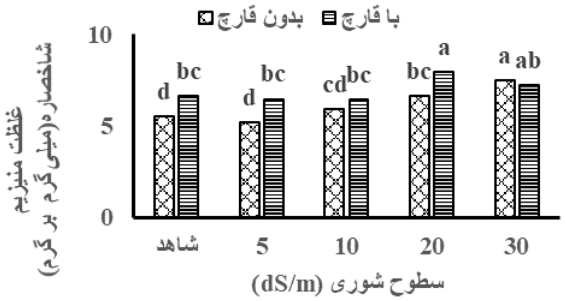


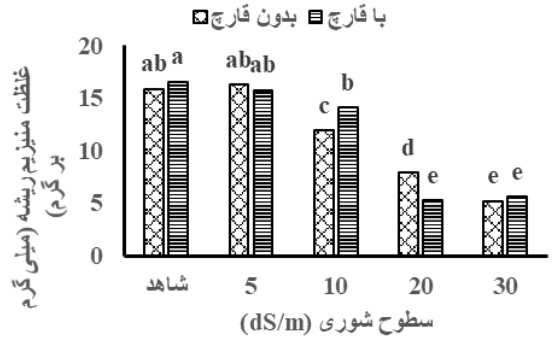
شکل 8- اثر متقابل تنش شوری و قارچ بر غلظت کلسیم شاخساره و ریشه گیاه کینوا

کمبود کلسیم می‌تواند به غشا آسیب برساند و انباشتگی غیرفعال سدیم را در بافت‌های گیاهی تسریع بخشد (مونس و ترمات، 1986). کنت و لاچلی (1985) معتقدند با افزایش غلظت سدیم و کاهش میزان کلسیم در محیط‌های شور که منجر به کاهش نسبت کلسیم به منیزیم می‌شود، رشد ریشه و عملکرد آن مختل می‌شود که پیامد آن کاهش انتقال کلسیم به اندام‌های هوایی خواهد بود. بدیهی است کاهش بیشتر غلظت پتاسیم و کلسیم در گیاهان تیمار شده با کلرید سدیم به دلیل غلظت بالاتر سدیم در این تیمارها میباشد. در پژوهش‌های دیگر نیز مشاهده‌شده که با افزایش شوری، غلظت پتاسیم و کلسیم در برنج کاهش می‌یابد (شانون و همکاران، 1998).

غلظت منیزیم شاخساره و ریشه

آنالیز واریانس (جدول 3) نشان داد که اثر متقابل تیمارهای قارچ × شوری بر غلظت منیزیم شاخساره و ریشه معنی‌دار شده است ($P<0.05$). مقایسه میانگین اثرات متقابل شوری × قارچ نشان داد که با افزایش شوری، غلظت منیزیم شاخساره افزایش‌یافته ولی غلظت منیزیم ریشه روند کاهشی با افزایش شوری دارد. در قسمت شاخساره مایه‌زنی با قارچ توانست بر غلظت منیزیم درشوری‌های شاهد، 5 و 20 دسی‌زیمنس‌بر متر تأثیر معنی‌داری داشته باشد و در همان سطوح به ترتیب (17/31، 19/78 و 16/75 درصد) افزایش دهد. در بخش ریشه مایه‌زنی با قارچ توانست غلظت منیزیم در شوری 10 دسی‌زیمنس‌بر متر به‌اندازه 15/79 درصد افزایش دهد ولی در شوری 20 به‌اندازه 33/62 درصد کاهش دهد که هردو اختلاف ازنظر آماری معنی‌دار می‌باشند (شکل 9).



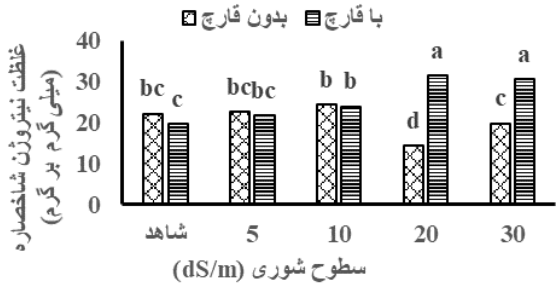


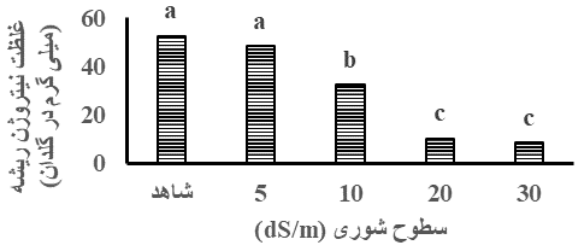
شکل 9- اثر متقابل تنش شوری و قارچ بر غلظت منیزیم شاخساره و ریشه

موسوی (1376) اثر شوری را برجذب عناصر در گیاه زیتون مورد بررسی قراردادند. آن‌ها دریافتند که افزایش شوری به‌طور بسیار معنی‌داری میزان کلسیم، منیزیم و پتاسیم را در بافت های برگ، ساقه و ریشه کاهش داده است. برخلاف نتایج پژوهش حاضر ابوطالبی و همکاران (2008) گزارش دادند که غلظت منیزیم ریشه گونه‌های مختلف مرکبات با افزایش سطوح شوری کلرید سدیم افزایش یافت ولی گزارش گارسیا سانچز و همکاران (2002)، حاکی از کاهش غلظت منیزیم در ریشه گیاهان تحت تیمار شوری می‌باشد که با نتایج ما در این تحقیق مطابقت دارد. افزایش غلظت منیزیم در ریشه تحت شرایط شوری شاید به این دلیل است که انتقال آن دچار اختلال می‌شود. گیری و همکاران (2003) که قارچ میکوریز با افزایش جذب منیزیم باعث بهبود رشد گیاه، فتوسنتز و افزایش غلظت کلروفیل می‌شود با توجه به این‌که قارچ *S. indica* از مسیر مشابه با قارچ میکوریز به گیاه کمک می‌کند به نظر می‌رسید مثل نتایج فوق قارچ *S. indica* توانسته غلظت منیزیم را نسبت به نمومه شاهد افزایش دهد.

غلظت نیتروژن شاخساره و ریشه

آنالیز واریانس (جدول 3) نشان داد که اثر متقابل تیمارهای قارچ × شوری بر غلظت نیتروژن شاخساره معنی‌دار شده است ($P<0.01$). در بررسی اثر متقابل سطوح شوری و قارچ بر غلظت نیتروژن شاخساره مشاهده می‌کنیم تا شوری 10 دسی‌زیمنس‌بر متر بین تیمار با قارچ و بدون قارچ اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود ولی در سطوح شوری 20 و 30 دسی‌زیمنس‌بر متر مایه‌زنی با قارچ به ترتیب (54/21 و 35/20 درصد) نسبت به تیمار عدم تلقیح غلظت نیتروژن را افزایش دهد... در بخش ریشه مشاهده می‌شود که اثرات اصلی قارچ و سطوح شوری بر غلظت فسفر ریشه معنی‌دار شده است ($p<0.05$). مشاهده می‌کنیم غلظت نیتروژن ریشه با افزایش شوری کاهش پیدا می‌کند به‌طوری‌که کمترین غلظت در شوری 20 دسی‌زیمنس‌بر متر می‌باشد (شکل 10)





شکل 10 - اثر متقابل تنش شوری و قارچ بر غلظت نیتروژن شاخساره و ریشه گیاه کینوا

در خاک‌های شور بنا به‌دلایلی‌چند کمبود نیتروژن تشدید می‌شود. این عوامل شامل کمبود مواد آلی، عدم رشد ناکافی ریشه، رقابت یون‌های کلر و نیترات با یکدیگر برای جذب توسط ریشه، آبشویی یون نیترات از ناحیه رشد ریشه و نبود شرایط مناسب برای تشکیل غده-های تثبیت‌کننده نیتروژن در بقولات در خاک‌های شور می‌باشد (همایی، 1381). اسچافر و همکاران (2009) بیان کردند که قارچ *S. indica* به دلیل تحریک تشکیل ریشه‌های عرضی و به دنبال آن افزایش سطح ریشه از طریق تولید هورمون‌های اکسین و جیبرلین، موجب افزایش جذب عناصر غذایی توسط گیاه می‌شود. همچنین مطابق با تحقیق فوق زارعان و همکاران نیز در سال (1396) با بررسی اثرمایه‌زنی *S. indica* بر گیاه فسیکو افزایش میزان نیتروژن را در اثر این قارچ گزارش نمودند.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش استفاده از قارچ اندوفیت *S. indica* نسبت به شاهد بدون قارچ، ازلحاظ تأثیر بر برخی شاخص‌های رشد گیاه مخصوصا در بخش ریشه و افزایش غلظت فسفر، پتاسیم و نیتروژن در شاخصاره در سطوح شوری زیاد، مثبت ارزیابی شد. قارچ مذکور در کاهش اثرات تنش شوری مخصوصا در سطوح شوری کمتر از 10 دسی‌زیمنس‌بر متر از کارایی نسبتا خوبی برخوردار بود. مشخص شد که تنش شوری یکی از عوامل تأثیرگذار منفی بر شاخص‌های رشد گیاه کینوا و نیز درصد کلنیزاسیون ریشه می‌باشد و با افزایش تنش، رشد گیاه و درصد کلنیزاسیون ریشه کاهش یافت. بطور کلی افزایش شوری از 10 دسی‌زیمنس‌بر متر به بالا سبب کاهش شدید وزن خشک ریشه و شاخصاره گردید و این روند در گیاهان تلقیح شده و نشده با قارچ نیز تقریباً مشابه می باشد گرچه اثر مثبت تلقیح قارچ بر وزن خشک ریشه در سطوح شوری متناظر بیشتر است. گرچه گزارش‌هایی مبنی بر تحمل زیاد این گیاه در برابر تنش شوری موجود است ولی نتایجی از برخی محققان نیز در دست است که نشان می‌دهند، رفتار رقم‌های مختلف کینوا در مقابل شوری یکسان نیست وحتی یک رقم خاص، در مراحل مختلف رشد خود، پاسخ متفاوت به سطوح شوری میدهد (ملکی و همکاران، 2018). یکی دیگر از دلایل که در این تحقیق، این قارچ اندوفیت نتوانست سبب افزایش رشد قابل ملاحظه گیاه نسبت به تیمار بدون قارچ مخصوصاً در سطوح شوری بالا شود، احتمالا به ماهیت کینوا مرتبط می‌باشد. این گیاه متعلق به تیره چغندریان بوده و همانگونه که ممانعت های ژنتیکی در مقابل قارچ‌های میکوریزی از خود نشان میدهد، احتمالاً واکنش دفاعی در مقابل قارچ اندوفیت هم خواهد داشت و علیرغم کلنیزاسیون ریشه، بخشی از انرژی گیاه صرف این مقابله می‌شود (کیانگ و همکاران، 2012). البته مطالعات بیشتری برای اثبات این فرضیه، مورد نیاز است. علیرغم تاثیر اندک این قارچ در تحریک رشد کینوا در شرایط تنش شوری، بهبود جذب برخی عناصر غذایی و کاهش جذب یون سدیم در مقایسه با تیمار بدون قارچ، نتایج امیدوار کننده هستند و نیاز به بررسی بیشتر دارد.

فهرست منابع:

1. Aboutalebi, A., Hassanzadeh, V., and Arabzadegan, M.S. 2008. Effect of salinity on macronutrients and sodium concentrations in five species of citrus root. Journal of Agricultural Science and Natural Resource 15 (1): 1-10. (In Persian).
2. Agnew, C and Warren, A. 1996. A framework for tackling drought land degradation. Journal of Arid Environments 33(3): 310-320.
3. Aliyar, S. 2021. The effect of endophytic fungus *Piriformospora indica* on germination and growth of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) under salinity stress conditions, MSc, Faculty of Agriculture, University of Tabriz. (In Persian).
4. Allison, L.E., Moodie, C.D. 1965. Chemical and Microbiological Properties. Pp: 1379-1396. In: Black CA (ed). Methods of Soil Analysis. Part 2, Chemical and Microbiogical Properties ASA and SSSA, Madison, WI.
5. Ashraf, M., Athar, H.R., Harris, P.J.C., and Kwon, T.R. 2008. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. Advances in Agronomy, 97: 45–110
6. Bagde, U. S., Prasad, R., and Varma, A. 2010. Interaction of mycobiont: *Piriformospora indica* with medicinal plants and plants of economic importance, African Journal of Biotechnology, 9: 9214-9226.
7. Barin, M., Ali Asgharzadeh, N., Samadi, A. 2006. Influence of mycorrhization on the mineral nutrition and yield of tomato under sodium chloride and salts mixture induced salinity levels. Iranian journal of soil and waters sciences, 20(1): 94-105. (In Persian).
8. Berta, G., Trotta, A., Fusconi, A., Hooker, J.E., Munro, M., Atkinson, D., Giovannetti, M., Morini, S., Fortuna, P., Tisserant, B., Gianinazzi-pearson, V., and Gianinazzi, s. 1995. Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant gowth and root system morphology in Prunus cerasifera. Tree Physiology, 15: 281-293.
9. Borzouei, A., Kafi, M., KHazeihr, R., Mousavi SHalmani, M.A. 2012, Effect of irrigation water salinity on root traits of two salt-sensitive and salt-tolerant wheat cultivars and its relationship wite yield in greenhouse, Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture, 2(8): 96-105.
10. Box, S., Schachtman, D.P. 2011. The effect of low concentrations of sodium on potassium uptake and growth of wheatJournal of Plant Physiology. 27: 175-182.
11. Brown, J.W., and Hayward, H.E. 1956. Salt tolerance of alfalfa varieties. Agronomy Journal, 48: 18-20.
12. Cantrell, I.C., and Linderman, R.G. 2001. Preinoculation of lettuce and onion with VA mycorrhiza fungi reduces deleterious effects of soil salinity. Plant Soil 233: 269-281.
13. Cottenie, A. 1980. Soil and plant testing, FAO soils Bulletin, 38: 94-100.
14. Cramer, G.R. 2002. Response of abscisic acid mutant of Arabidopsis to salinity. Functional Plant Biology, 29: 561-567.
15. Dixon, R.K., Garg, V.K., and Rao, M.V. 1993. Inoculation of Lecaena and prosopis seedlings with Glomus and *Rhizobium* species in saline soil: *Rhizosphere* relations and seedlings growth. Arid Soil Research and Rehabilitation, 7: 133-144.
16. Druege, U., Baltruschat, H., and Franken, P. 2007. *Piriformospora indica* promotes adventitious root formation in cuttings, Scientia Horticulturae, 112: 422-426.
17. Gavito, M.E. Curtis, P.S., Mikkelsen, T.N., and Jakobsen, I. 2000. Atmospheric CO_2 and mycorrhiza effects on biomass allocation and nutrient uptake of nodulated pea (*Pisum sativum* L.) plants, Journal Experimental Botany, 51: 1931-1938.
18. Ghasem Nejad, A., and Babayizad, V. 2011. Vegetative growth and Caffeic acid content of *Cynara scolymus* L. influenced by *Piriformospora indica*. Journal of Plant Production Research, 18(1): 133-140. (In Persian).
19. Giri, B., Kapoor, R., and Mukherji, K.G., 2003. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi and salinity on gowth, biomass, and mineral nutrition of *Acacia auriculiformis*. Biology and Fertiliety of Soils, 38: 170-175.

20. Grattan, S.R., Grieve, C.M. 1992. Mineral nutrient acquisition and response by plant growth in saline environment. Agriculture, Ecosystem Environment 38: 275-300.
21. Hajiboland, R., Aliasgharzadeh, N., Farsad Laiegh, S.H., and Poschenrieder, S.H. 2010. Colonization with arbuscular mycorrhizal fungi improves salinity tolerance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plants. Plant and Soil, 313: 313-327. (In Persian).
22. Hariadi, Y., Marandon, K., Tian, Y., Jacobsen, S.E., Shabala, S. 2011. Ionic and osmotic relations in quinoa (*Chenopodium quinoa*. Willd.) plants grown at various salinity levels. Journal of Experimental Botany, 62(1): 185-93
23. Homayi, M. 2002, Reaction of plants to salinity, 12(58): 53-60
24. Jacobsen, S.E., Liu, F., Jensen, C.R. 2009. Does root-sourced ABA play a role for regulation of stomata under drought in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd). Scientia Horticulturae, 122(2): 281-287.
25. Jacobsen, S.E., Monteros, C., Christiansen, J.L., Bravo, L.A., Corcuera, L.J., Mujica, A., 2005. Plant responses of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to frost at various phenological stages. European Journal of Agronomy, 22: 131–139.
26. Jacobsen, S.E., Mujica, A., Jensen, C.R. 2003. The resistance of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) to adverse abiotic factors. Food Reviews International, 19(1-2): 99- 109.
27. Jamil, M., Rehman, S.H., Rha, E.S. 2007. Salinity effect on plant growth, PSII photochemistry and chlorophyll content in sugar beet (*Beta Vulgaris* L.) and cabbage (*Brassica Oleracea Capitata* L.). Pakistan Journal of Botany. 39: 753-760.
28. Jeschke, W.D. 1984. K-Na exchange at cellular membranes, inter cellular campartmentation of cations, and salt tolerance. pp: 37-66. In: Salinity tolerance in plants. R. C. Staples., and Toenniessen, G.H. (eds). NewYork.
29. Kent, L.M., and Lauchi, A. 1985. Germination and seedling growth of cotton salinity-calcium interactions. Plant, Cell and Environment, 8: 155-159.
30. Klute, A., 1986. Method of Soil Analysis. Part 1, Physical and Mineralogical Methods. 2nd Ed. Agron. Monogr. Soil Science Society of American Journal. Madison, WI.
31. Kormanic, P.P., and Graw, M.C. 1982. Methods and Principles of Mycorrhizal Research. In: Schenck NC (Ed). Quantification of VA mycorrhizae in plant roots. Saint Paul Minnesota pp. 37-45. American Phytopathological Society.
32. Koyro, H.W., and Eisa, S.S., 2008. Effect of salinity on composition, viability and germination of seeds of (Chenopodium quinoa Willd.), Plant and Soil, 302(1-2): 79-90.
33. Le-Dily, F., Billard, J.P., Le-Saos, J., Huault, C. 1993. Effects of NaCl and gabaculine on chlorophyll and proline levels during growth of radish cotyledons. Plant Physiology and Biochemistry, 31: 303-310.
34. Lindalh, B.D., Ihrmark, K., Boberg, J., Trumbore, S.E., Hogberg, P., Stenlid, J., and Finlay, R.D. 2007. Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. New Phytologist, 173: 611-620.
35. Maleki P, Bahrami H.A, Saadat S, Sharifi F, Dehghany F & Salehi M. 2018. Salinity threshold value of Quinoa (*Chenopodium Quinoa* Willd.) at various growth stages and the appropriate irrigation method by saline water, Communications in Soil Science and Plant Analysis, 49(15): 1815-1825.
36. Meiri, A., Kamburoff, J. and Poljakoff-Mayber, A. 1971. Response of bean plant to sodium chloride and sodium sulphate salinization. Annals of Botany, 35: 837-847.
37. Misra, A.N., Sahu, S.M., Misra, M., Singh, P., Meera, I., Das, N., Kar, M., Sahu, P. 1997. Sodium chloride induced changes in leaf growth, and pigment and protein contents in two Rice cultivars. Biologia Plantarum, 39: 257-262.
38. Moazardalan, M., Sawaqbi Firoozabadi, Gh. 2002. Soil Fertility Management for Sustainable Agriculture (Translation). Tehran University Institute Press.

39. Mousavi, A., 1997, Effect of chloride-induced salinity stress on growth, chlorophyll content, soluble sugars, uptake and transport of elements in two native olive cultivars (yellow and oil cultivars), MSc, Faculty of Agriculture, University of Tehran. (In Persian).
40. Munns, R., Termaat, A., 1986. Whole-plant response to salinity. Australian Journal of Plant Physiology. 13, 60-140.
41. Munns, R., Tester, M., 2008. Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology, 59: 651-681.
42. Narula, N., Kumar, V., Behl, R.K., Gransee, A., Gransee, W., and Merbach, W. 2000. Effect of P-solubilizing *Azotobacter chroococcum* on N, P, K uptake in P-responsive wheat genotypes grown under grrenhouse conditions. Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 163: 393-398.
43. Nelson, D.W., Sommers, L.E., 1982. Total carbon, organic carbon, and organic matter. P. 539-579. In: Page AL (ed.) Methods of Soil Analysis. Part 2. 2nd ed. American Society of Agronomy, Madison, WI.
44. Nielson, D.C., Hogue, E.J., Neilsen, G.H. and Parchomchuck, P. 1995. Using SPAD-502 values to assess the nitrogen status of apple trees. Horticultural Science, 30: 508-512.
45. Norrif, I.R., Read, D.J., Varma, A.K., 1992. Method in Microbiology Techniques for Study of Mycorrhiza. Academic press, London.
46. Olsen, S.R., Sommers, L.E., 1982. Phosphorus.pp 413-430. In: A. Klute (ed.) Methods of Soil Analysis. Part1 chemical and biological properties. SSSA, Madison, Wisconsin, USA.
47. Papadopoulos, L. and Rendig, V.V. 1983. Interactive effects of salinity and nitrogen on growth and yield of tomato plants. Plant and Soil. 73: 47-57.
48. Qiang, X., Zechmann, B., Reitz, M.U., Kogel, K.H., Schäfer, P., 2012. The mutualistic fungus *Piriformospora indica* colonizes *Arabidopsis* roots by inducing an endoplasmic reticulum stress–triggered caspase-dependent cell death. The Plant Cell, 24(2): 794-809.
49. Rabhi, M., Barhoumi, Z., Ksouri, R., Abdelly, C., and Gharsalli, M. 2007. Interactive effects of salinity and iron deficiency in Medicago ciliaris. Comptes Rendus Biologies 330(11): 779-788.
50. Rahimi Tanha, Sh., Ghasemnezhad, A., Babaeizad, V. 2014. A study on the effect of endophyte fungus, *Piriformospora indica*, on the yield and phytochemical changes of globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaves under water stress. International journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 6(2): 1907-1921
51. Rahmani iranshahi, D., Sepehri, M., KHoshgoftarmanesh, A.H., Eshgizadeh, H.R., Jahandideh Mohen Abadi, V.A. 2015. The effect of endophytic fungus (*Piriformospora indica*) inoculation on antioxidant enzyme activity and wheat tolerance in phosphorus deficiency in hydroponic system. Journal of Soil and plant relationships, 24(3):75-86 .(In Persian).
52. Rai, M., Achaya, D., Singh, A., and Varma, A. 2001. Positive growth responses of themedicinal plants Spilanthes calva and Withania somnifera to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. Mycorrhiza, 11: 123-128.
53. Rai, M., and Varma, A. 2005. *Arbuscular mycorrhiza*-like biotechnological potentialof *Piriformospora indica*, which promotes the growth of Adhatoda vasica. Electron. Journal of Biotechnology, 8: 107-111.
54. Safarneghad, A., Mohammad Dost shiri, A., Hamidi, H. 2011. Evaluation of salt tolerance at seedling growth stage of medicinal plants candle (*Dorema ammoniacum*). Journal of Soil and plant relationships. 2(5):1-11. (In Persian).
55. Salehi, M., and Dehghani, F. 2018. Guide to Planting, Holding and Harvesting Quinoa in Sality Conditions. First Edition. Publication of Agricultural Education, 52-57.
56. Sanchez, F.J., Manzanares, M., Andres, E.F., Ternorio, J.L., Ayerbo, L., Deandles, E.F. 1998. Turgor maitenance, osmotic adjustment and soluble sugar and proline accumulation in 49 pea cultivars in response to water stress. Field Crop Research, 59: 225- 235

57. Schenck, N.C., perez, Y., 1988. Mannual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi. INVAM, 1453 Fifield Hall, University of Florid, Gainesville, Flo, USA. 241p.
58. Sepehri, M., Saleh Rastin, N., Hosseini Salekdeh, G., and Khayam Nekoe, M. 2009. Effect of endophytic fungus, *Piriformospora indica*, on growth and resistance of *Hordeum vulgare* L. to salinity stress. Journal of Rangeland 3(3): 508-518.
59. Shannon, M.C. 1997, Adaptation of plants to salinity. Advances in Agronomy 60: 75-120.
60. Singh, A., Sharma, J., Rexer, K.H., and Varma, A. 2000. Plant productivity determinants beyond minerals, water and light. *Piriformospora indica*:a revolutionary plant growth Promoting fungus. Current Science, 79: 101-106.
61. Song, H. 2005. Effects of VAM on host plant in the condition of drought stress and its Mechanisms. Electronic Journal of Biology 1: 44-48.
62. Song, J.Q., Mei, X.R., Fujiyama, H. 2013. Adequate internal water status of NaCl salinized rice shoots enhanced selective calcium and potassium absorption. Soil Science and Plant Nutrition 52: 300-304.
63. Sun, C., J., Johnson, M., Cai, D., Sherameti, I., Oelmüller, R., and Lou, B. 2010. *Piriformosporaindica* confers drought tolerance in Chinese cabbage leaves by stimulating antioxidant enzymes, the expression of drought-relatedgenes and the plastid-localized CAS protein. Journal of Plant Physiology. 167: 1009-1017
64. Talebnejad, R., Sepaskhah, A.R. 2015. Effect of different saline groundwater depths and irrigation water salinities on yield and water use of quinoa in lysimeter. Agricultural Water Management, 148,177-188. (In Persian).
65. Thomas, G.W. 1982. Exchangeable Cations. p. 159-165. In: Page AL, Miller RH and Keeney DR (eds.) Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. Agron. Monogr. 9. ASA and SSSA, Madison, WI.
66. Varma, A., and Hock, B. 1999. Mycorrhiza: Structure, Function, Molecular Biology and Biotecnology. Springer-Verlag, Berlin.
67. Varma, A., Singh, A., Sudha Sahay, N., Sharma, J., Roy, A., Kumari, M., Rana, D., Thakran, S., Deka, D., Bharti, K., Franken, P., Hurek, T., Blechert, O., Rexer, K.H., Kost, G., Hahn, A., Hock, B., Maier, W., Walter, M., Strack, D., and Kranner, I. 2001. *Piriformospora indica*: a cultivable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. Mycota IX. Springer Series, Germany. PP. 123-150.
68. Waling, I., Van Vark, W., Houba, V.J.G., and Van der Lee, J.J.1989. Soil and plant analysis, a series of syllabi, Part 7, Plant Analysis Procedures, Wageningen Agriculture University.
69. Weiss, M., Waller, F., Zuccaro, A., Selosse, M.A. 2016. Sebacinales one thousand and one interactions with land plants. New Phytologist, 211: 20-40.
70. Westerm, R.L. 1990. Soil testing and plant analysis. Soil Science Society of American. Madison Wisconisn, United States of America.
71. Yang, Y. Z., Zha, F., Zhang, J. M., Dong, S. Q., and Zhu, J. Q. 2012. Effects of *Pirformaspore indica* on cotton resistance to waterlogged stress. Adv. J. Food. Sci. Technol. 4: 413-416.
72. YousefiRad, M., Noormohammadi, G., Ardakani, M., MajidiHervan, E., Mirhadi, S. 2009. Effect of mycorrhiza on morphological characteristics and nutrients content of barley under different salinity levels. Journal of Agroecology. 5(3): 105-114.
73. Zarean, L., Mosadeghi, M.R., Sabzalian, M.R. 2017. Effect of endophytic fungus-tall fescue on organic carbon, total nitrogen and dispersible clay of rhizosphere soil, 15th Iranian Soil Science Congress, Isfahan.
74. Zarinjoob, H., Zarea, M., Mohammadi goltapeh, E., Hatami, A and Porsiabidi, M. 2012. Effect of the various sources of phosphorus on yield andnutrient uptake of sunflower under two cropping system. Journal of Crop Production, 5(3): 99-114.

اثرات قارچ‌های میکوریز آربسکولار و سطوح آبیاری بر عملکرد و ویژگی‌های رشد درختان لیمو (*Citrus aurantifolia*) در داراب

حسن حقیقت نیا[1] و فرهاد رجالی

استادیار بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، داراب، فارس، ایران؛ **hasan.haghighatnia@yahoo.com**

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ **frejali@yahoo.com**

دریافت: **1400/7/26** و پذیرش: **1400/10/29**

چکیده

لیمو بدلیل تازه خوری و استفاده در بسیاری صنایع جانبی، از جمله صنایع غذایی و نیز ارزش اقتصادی بالا، در بین مرکبات از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. به‌منظور بررسی اثرات تلقیح با قارچ میکوریز آربسکولار تحت شرایط تنش و بدون تنش بر درختان لیمو، آزمایشی بصورت اسپلیت پلات و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی و در سه تکرار، طی دو سال، در داراب اجراء شد. پلات های اصلی شامل سه سطح آبیاری (60، 80 و 100درصد نیاز آبی لیمو) و پلات-های فرعی شامل استفاده از مایه تلقیح قارچ میکوریزا آربسکولار در سه سطح صفر، 1000 و 2000 گرم به ازای هر درخت لیمو بود. مایه تلقیح قارچ میکوریزا مخلوطی از سه گونه *Funneliformis mosseae, Rhizophagus irregularis, Claroideoglomus etunicatum* بود. نتایج نشان داد که تنش رطوبتی صرفنظر از تلقیح یا عدم تلقیح قارچ میکوریزا، سبب کاهش معنی دار اکثر صفات اندازه گیری شده بجز کارایی مصرف آب که روند معکوسی را نشان داد، گردید. استفاده از قارچ میکوریزا صرفنظر از اعمال تنش رطوبتی، اکثر صفات اندازه گیری شده را افزایش داد، بطوری‌که استفاده از دو کیلوگرم قارچ میکوریز آربسکولار به ازای هر درخت سبب افزایش معنی‌دار عملکرد میوه، وزن میوه، کلروفیل برگ، غلظت فسفر برگ، رطوبت نسبی برگ، کارایی مصرف آب و کلنی سازی ریشه، بترتیب به میزان 22/1، 53/3، 42/0، 19/5، 15/3، 24/0 و 508 درصد شد. استفاده از قارچ میکوریزا تحت شرایط تنش ملایم و شدید رطوبتی، سبب بهبود برخی صفات گردید. از جمله عملکرد میوه را به‌ترتیب 20/2 و 37/6 درصد بهبود بخشید. بعنوان نتیجه گیری کلی می توان اظهار نمود که استفاده از قارچ میکوریزا علاوه بر تاثیر بر عملکرد و برخی ویژگی های رشد درختان، احتمالاً سبب افزایش مقاومت به تنش رطوبتی بواسطه بهبود غلظت فسفر و روابط آبی در گیاه، نظیر تنظیم اسمزی، هدایت هیدرولیکی آب و کنترل روزنه‌ای گردیده است.

واژه‌های کلیدی: " تنش رطوبتی "، " فسفر "، "قارچ میکوریزا"، "کارایی مصرف آب"، "لیمو"

[1] نویسنده مسئول، آدرس: بخش تحقیقات خاک و آب، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، داراب، فارس، ایران

مقدمه

خشکی یکی از جدی ترین تنش‌های محیطی است که به میزان زیادی رشد و تولید محصولات را بواسطه صدمه به مراحل فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی نظیر جذب، فتوسنتز و متابولیسم سلولی محدود و مهار می‌کند (ژانگ و همکاران، 2020). بیش از 82 درصد از مناطق ایران در ناحیه خشک و نیمه خشک با متوسط بارندگی حدود 250 میلی‌متر واقع گردیده، که کمتر از یک سوم متوسط بارندگی جهانی (860 میلی‌متر) است (امیری و اسلامیان، 2010). علاوه بر این، خشکسالی‌های پیاپی نیز به این مسئله دامن زده است. بنابراین ضرورت بهینه سازی مدیریت مصرف آب از طریق استفاده کمتر از این منبع طبیعی بیش از گذشته احساس می‌گردد.

گیاهان باغی بر خلاف گیاهان زراعی، گیاهانی ثابت و دائمی هستند و مدیریت خاص خود را در دراز مدت طلب می‌کنند. لذا بایستی با نگرشی فراتر از محصولات زراعی به آن نگریست. به‌عبارت دیگر سرمایه گذاری در این زیربخش ظرف مدت طولانی‌تری نتیجه بخش خواهد بود و هر گونه تهدیدی از جمله کم آبی می‌تواند صدمات جبران ناپذیری را به تولید کنندگان در این بخش وارد نماید. مرکبات در کشور با سطح زیر کشت 225000 هکتار و تولید 3/4 میلیون تن جایگاه دوم را در بین سایر محصولات باغبانی به خود اختصاص داده است (آمارنامه کشاورزی، 1399). لذا توجه به پایداری تولید این محصول از اهمیت بالایی برخوردار است. لیمو یکی از انواع مرکبات است که سطح زیر کشت آن در جنوب کشور زیاد بوده و بدلیل قیمت بالا، این سطح مرتباً رو به افزایش است. با توجه به همیشه سبز بودن این گیاه، نیاز آبی آن نیز بالاست و بنابراین مدیریت مصرف آب در این گیاه امری ضروری است. در راستای کاهش مصرف آب و افزایش بهره‌وری مصرف، روش‌های مختلفی وجود دارد که از جمله آنها می‌توان به اصلاح روش‌های آبیاری، مدیریت مصرف در باغ، استفاده از پایه‌های مقاوم‌تر به خشکی اشاره نمود. علاوه بر این، اثبات گردیده که تعدادی میکروارگانیسم‌های خاک، از جمله قارچ‌های میکوریزی قادرند تا علائم تنش را تخفیف دهند. گیاهانی که دارای همزیستی میکوریزی هستند، به‌دلیل اینکه عناصر غذایی و آب بیشتری از خاک جذب می‌نمایند دارای رشد بهتری خواهند بود، عملکرد بیشتری خواهند داشت و مقاومت بیشتری در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده از خود نشان می‌دهند (لاراینزار و وین کوپ، 2017). زارعی و همکاران (2016) اثرات قارچ میکوریز *Funneliformis mosseae* را تحت چهار رژیم رطوبتی روی دو پایه مرکبات طی یک آزمایش گلخانه‌ای مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه گرفتند که تلقیح میکوریزایی بطور قابل توجهی بر جذب عناصر غذایی و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانت در مرکبات مؤثر بوده و افزایش این پارامترها تنش آبی را تخفیف داده است. وو و ژیا (2006_a) تأثیر قارچ میکوریزای *گلوموس ورسیفورم* را بر رشد، تنظیم اسمزی و فتوسنتز در کشت گلدانی *Citrus tanjerin* تحت شرایط با و بدون تنش آبی مورد مطالعه قرار داده و نتیجه گرفتند که همزیستی این قارچ بطور معنی‌داری سبب تحریک رشد و بیومس گیاه، بدون توجه به مقدار آب گردید. همچنین نهال‌های تلقیح شده دارای پتانسیل آب برگ، میزان تعرق، میزان فتوسنتز، هدایت روزنه‌ای، مقدار نسبی آب برگ و کاهش دمای برگ بالاتری نسبت به تلقیح نشده‌ها بودند.

این محققین پیشنهاد کردند که افزایش مقاومت به تنش خشکی در نهال‌های تلقیح شده در نتیجه افزایش کربوهیدرات‌های غیر ساختمانی، پتاسیم، کلسیم و منیزیم بوده است. تحت همین شرایط آزمایش، محققین فوق (وو و ژیا ، 2006_b) اعلام کردند که ارتفاع گیاه، تعداد برگ در هر گیاه و قطر ساقه بطور قابل توجهی در دانهال-های تلقیح شده بالاتر بود. اصلاح تغذیه در گیاهان میکوریزایی دلیلی برای مقاومت به تنش خشکی در مرکبات عنوان گردیده است (وو و زو، 2009_a) . حقیقت نیا و همکاران (1390)، تأثیر دو گونه قارچ میکوریزا

آربوسکولار بر جذب عناصر غذایی و برخی ویژگی‌های دیگر روی پایه مرکبات *Citrus volkameriana* تحت تنش خشکی را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد، کلنی سازی میکوریزایی، به واسطه تاثیر مثبت بر جذب فسفر، کلسیم، و برخی ویژگی های فیزیولوژیک تحت شرایط تنش، سبب اصلاح مقاومت به تنش خشکی در گیاه گردید. مطالعه دو تیمار تنش آبی روی دانهال های نارنگی تحت تأثیر پنج گونه قاچ میکوریزا نشان داد که وزن خشک شاخه و ریشه در شرایط تنش خشکی بدون کاهش بود ولی وزن خشک کل گیاه کاهش معنی‌داری داشت (وو و همکاران، 2007). تحت شرایط تنش خشکی، همزیستی میکوریزایی گیاه را به‌وسیله مکانیسم-هایی نظیر ابقاء پتانسیل آب برگ و فشار تورژسانس، افزایش در سطوح بیان ژن‌های مقاوم به خشکی، کنترل تولید آبسزیک اسید و افزایش بازیابی گیاه به شرایط نرمال بعد از رهایی از تنش کمک می‌نماید (آهنگر و همکاران، 2014). بعلاوه هیف‌های میکوریزی جذب اشکال قابل دسترس عناصر غذایی توسط افزایش در حجم موثر خاک و تنظیم ویژگی‌های شیمیایی خاک را بر عهده دارند (سمبک و همکاران، 2015).

همچنین سونار و همکاران (2013) بر این نکته تأکید کردند که هیف های میکوریزایی یک مکانیسم جایگزین برای جذب آب و عناصر غذایی با تحرک پایین نظیر فسفر، روی و مس می‌باشند. گزارش گردیده که قارچ‌های میکوریز آربسکولار در بهبود جذب آب، جذب عناصر غذایی، فتوسنتز، ساختمان ریشه، سیستم های دفاعی آنتی اکسیدانی، پلی‌آمین و اسیدهای چرب همگرا، تنظیم اسمزی، ساختمان خاک، بالانس هورمونی برای مقاومت به کم آبی خاک مؤثرند (وو و همکاران، 2013 و 2019؛ فرناندز-لیزارازو و مورنو-فنسکا، 2016؛ هی و همکاران، 2020 ؛ زو و همکاران، 2020)

با توجه به اینکه ارزش عملی استفاده از قارچ‌های میکوریزی بویژه در اراضی باغی برای دستیابی به حداکثر نقش آنها در حاصلخیزی پایدار و نیز مقابله با تنش های محیطی از جمله خشکی، منوط به فهم بهتر مکانیسم های اکولوژیکی و تکاملی مسئول برای ایجاد عملکرد میکوریزی مثبت، منفی و یا خنثی تحت این شرایط است، از طرفی نظر به اینکه تاکنون تأثیر قارچ‌های میکوریزی روی درختان مرکبات، بویژه لیمو، بخصوص در خاک‌های آهکی کشور کمتر مورد بررسی قرار گرفته، تحقیق حاضر به‌منظور تعیین میزان تأثیر قارچ میکوریزا بر کاهش تنش خشکی و نیز مولفه‌های رشدی و تغذیه‌ای این گیاه تحت شرایط تنش رطوبتی، در خاک‌های قلیایی و آهکی جنوب کشور صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی اثرات سطوح مصرف آب و استفاده از مایه تلقیح قارچ میکوریزا آربسکولار بر درختان لیموی 12 ساله، آزمایشی بصورت اسپلیت پلات و در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار و هر تکرار شامل دو درخت و در مجموع تیمارهای آزمایش شامل 54 درخت بود. آزمایش طی دو سال، در یک خاک آهکی در حسن آباد داراب با طول جغرافیایی 54 درجه و 25 دقیقه شرقی و عرض جغرافیایی 28 درجه و 80 دقیقه شمالی و ارتفاع 1110 متر از سطح دریا اجراء شد. پلات های اصلی شامل سه سطح آبیاری (60، 80 و 100 درصد نیاز آبی لیمو) و پلات های فرعی در سه سطح شامل تلقیح با دو سطح 1000 و 2000 گرم از مایه تلقیح قارچ میکوریزای آربسکولار (مخلوطی از سه گونه *Funneliformis mosseae, Rhizophagus irregularis, Claroideoglomus etunicatum*) به ازای هر درخت و یک تیمار بدون تلقیح، بعنوان شاهد بود. این سه گونه با جمعیت تقریباً برابر بر مبنای 100 اندام فعال قارچ در هر گرم (اسپور و قطعات ریشه همزیست شده با قارچ) بر اساس روش MPN تهیه گردید. مبنای انتخاب سطوح مصرفی قارچ بر اساس جمعیت فعال قارچ در مایه تلقیح و در نهایت میزان اندام فعال قارچ که به هر درخت می رسد، یعنی اندام فعال ضرب در مقدار گرم مصرف شده بود. همچنین این مقادیر میانگین توصیه شرکت‌های بین-المللی مختلف تولید کننده مایه تلقیح این قارچ‌ها نیز

می‌باشد. فاصله درختان از یکدیگر بصورت 6×6 متر و بنابراین کل فضای اختصاص یافته به آزمایش حدود 2000 متر مربع بود. لازم به ذکر است که قبل از اجرای آزمایش برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی باغ با روش‌های مرسوم در آزمایشگاه اندازه‌گیری گردید که نتایج در جدول (1) آمده است. در اواخر بهمن ماه سال اول آزمایش، بر اساس نقشه طرح به ازای هر درخت میزان پیش‌بینی شده از مایه تلقیح قارچ‌های مورد نظر در پای ریشه‌ها و در سایه انداز درختان لیموی 12 ساله با روش چالکود اضافه و چاله‌ها در همه تیمارها اعم از شاهد و سایر تیمارها با کود دامی گوسفندی پوسیده شده به میزان 10 کیلوگرم بطور ثابت برای هر درخت پر شد. کمبودهای غذایی بر اساس آزمون خاک، بجز فسفر و با توجه به توصیه‌های کودی در استان (تدین و همکاران، 1384)، جبران گردید. بدین صورت که نیتروژن از منبع سولفات آمونیوم به میزان 1500 گرم برای هر درخت طی سه نوبت در اسفند، اواخر فروردین و اواخر اردیبهشت ماه، پتاسیم از منبع سولفات پتاسیم به میزان 800 گرم در اواخر بهمن ماه، آهن از منبع سکوسترون آهن 138 به میزان 40 گرم برای هر درخت طی دو نوبت در اسفند و اردیبهشت ماه و روی و منگنز به‌ترتیب از منبع سولفاته آنها و بصورت محلولپاشی با غلظت دو در هزار طی سه نوبت از اواخر فروردین هر دو هفته یکبار مصرف گردید.

میزان آب مصرفی مورد نیاز در تیمارهای مختلف پس از محاسبه، توسط کنتور حجمی تنظیم و اعمال شد.

جدول 1- برخی ویژگی های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

بافت	pH	EC ($ds.m^{-1}$)	O.C (%)	Silt (%)	Clay (%)	Sand (%)	P*	K	Fe	Zn	Mn	Cu
									($mg.kg^{-1}$)			
لوم شنی	8/0	1/05	0/71	13/4	19/3	67/3	9/3	215	4/5	0/9	6/2	1/3

* بخش قابل استفاده فسفر، پتاسیم، آهن، روی، منگنز و مس

بطوری‌که نیاز آبی پس از تعیین تبخیر و تعرق گیاه مرجع و ضرب آن در ضریب گیاهی(Kc) با استفاده از داده های ایستگاه هواشناسی حسن آباد داراب و به کمک فرمول فائو-پنمن مانتیس محاسبه شد. بدلیل تفاوت ضریب گیاهی برای ماه‌های مختلف سال، بنابراین برای تعیین این ضریب با توجه به توصیه فائو (دورنباس و پروییت، 1984) برای مناطق خشک، با وزش باد ملایم و متوسط و برای گیاه کاملاً بالغ، در شرایط کنترل علف هرز تعیین گردید. با در نظر گرفتن سطح متوسط سایه انداز درختان، میزان تعرق یا مصرف واقعی درختان محاسبه و مقدار آبیاری با در نظر گرفتن ضریب تعرق (در دوره حداکثر تعرق برابر 1/05) برای خاک با بافت متوسط و عمق ریشه حدود 80 سانتی‌متر (کلر و بلیسنر، 1990) و راندمان کاربرد مطلوب برای آبیاری با روش قطره ای (90%) برای ماه‌های مختلف سال برآورد شد. بر این اساس میزان مصرف در تیمارهای مختلف نیز تعیین شد که میانگین مصرف سالیانه برای هر درخت، در تیمار 100 درصد نیاز آبی برابر 48/6 متر مکعب، برای تیمار 80 درصد نیاز آبی برابر 38/95 متر مکعب و برای تیمار 60 درصد نیز آبی برابر 29/25 متر مکعب بود. به منظور تعیین زمان آبیاری، نمونه برداری از رطوبت خاک در سه عمق 0-20، 20-40 و 40-60 سانتیمتری خاک با روش وزنی قبل از آبیاری برای یک دوره یک ماهه در فصل گرم و سرد سال انجام شد.

در تیرماه نمونه برگ از تیمارهای مختلف تهیه و فسفر برگ تعیین شد. بدین‌صورت‌که پس از شستشوی نمونه برگ و خشک کردن در آون به مدت 48 ساعت در دمای 68 درجه سانتیگراد و سپس آسیاب نمودن، نمونه‌ای یک گرمی از هر تیمار، درون کوره الکتریکی در دمای 550 درجه سانتیگراد خاکستر شد و سپس در 5 میلی لیتر

اسیدکلریدریک دو نرمال حل و پس از عبور دادن از کاغذ صافی با اضافه نمودن آب مقطر، حجم به 50 میلی لیتر رسانده شد. سپس با دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-2100 و با استفاده از روش رنگ سنجی بروش زرد در طول موج 450 نانومتر قرائت گردید (مورفی و ریلی، 1962). در شهریور ماه علاوه بر اندازه گیری عملکرد هر درخت، میزان کلروفیل برگ با دستگاه کلروفیل سنج Spad مدل 502، اندازه میوه با کولیس ورنیه، وزن میوه با ترازوی دیجیتال، اسیدیته آبمیوه با دستگاه pH متر و مقدار رطوبت نسبی برگ با استفاده از روش وو و ژیا (2006_a) بدست آمد. بدین صورت که پنجمین برگ کامل از نوک ساقه جدا و پس از شستشو با آب مقطر، بمدت 24 ساعت تحت دمای معمولی اتاق، درون آب مقطر قرار گرفت تا اشباع گردد. همچنین این برگ‌ها قبل و بعد از اشباع توزین گردیدند. سپس برگ اشباع شده بمدت 48 ساعت در دمای 65 درجه سانتیگراد درون گرمخانه قرار گرفت و از رابطه (1) مقدار نسبی آب برگ بدست آمد:

(رابطه 1)

100× (وزن خشک برگ - وزن اشباع برگ) / (وزن خشک برگ - وزن تازه برگ) = مقدار نسبی آب برگ

کارایی مصرف آب (Water Use Efficiency) از تقسیم عملکرد میوه لیمو بر میزان مصرف آب در تیمارهای مختلف تعیین شد (حیدری، 1393). همچنین جهت تعیین درصد کلنی‌سازی ریشه از روش فیلیپس و هیمن (1970) استفاده شد. نمونه‌های تهیه شده از ریشه‌ها (ریشه‌های مویین) ابتدا در داخل محلول آماده، با نسبت حجمی 50 درصد آب مقطر و 50 درصد الکل سفید در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شد. برای رنگ آمیزی ریشه، 3 گرم از نمونه ریشه با آب شستشو و به لوله آزمایش با گنجایش 100 میلی‌لیتر انتقال داده شد. سپس حدود 30 میلی‌لیتر از محلول KOH با غلظت 10درصد به آن افزوده گردید. درب لوله آزمایش با قطعه فویلی پوشانده و در بن ماری به مدت یک ساعت در دمای 90 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس ریشه چندین مرتبه با آب شستشو داده شد. برای سفید شدن ریشه از محلول H_2O_2 قلیایی به میزان حدود 30 میلی‌لیتر به هر لوله اضافه شد و به مدت 30 دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. بعد از اتمام مرحله فوق، ریشه‌ها چندین مرتبه با آب شستشو داده شدند. بعد از تیمار ریشه‌ها با محلول‌های KOH و H_2O_2، چون بسیار قلیایی هستند بایستی قبل از مرحله رنگ‌آمیزی اسیدی شوند تا رنگ به اندام‌های میکوریز AM متصل شود. بنابراین از محلول HCl یک درصد به میزان تقریبی 30 میلی‌لیتر به هر لوله استفاده شد. بعد از اتمام مدت زمان اسیدی شدن، محلول اسیدی را به آرامی خالی کرده، پس از شستشو با آب مقطر ریشه‌ها در محلول رنگی تریپان بلو اضافه گردید. ریشه‌ها به مدت 12 ساعت در محلول رنگی در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. بعد از اتمام مرحله رنگ آمیزی، رنگ اضافی را خالی کرده و ریشه‌ها را با آب شستشو داده شد. در نهایت نمونه ریشه را به پلیت شیشه‌ای انتقال داده و با بینوکولار بررسی گردید.

در نهایت داده های دو سال آزمایش در قالب طرح آماری بلوک کامل تصادفی و با کمک نرم افزار SAS تجزیه آماری شد. سپس میانگین‌های بدست آمده از هر صفت با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد مقایسه شدند، که در بخش نتایج مورد بحث قرار خواهند گرفت.

نتایج و بحث

الف- اثرات اصلی سال، سطوح آبیاری و سطوح قارچ میکوریز آربسکولار بر صفات مورد مطالعه

نتایج تجزیه واریانس (جدول 2) نشان داد که اثرات اصلی سال تنها بر صفات عملکرد میوه، وزن میوه و کارایی مصرف آب، در سطح 1% معنی‌دار بود. تأثیر سطوح آبیاری و سطوح قارچ میکوریزا بر همه صفات در سطح 1% معنی‌دار بودند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن نشان داد که میانگین عملکرد، وزن میوه و کارایی مصرف آب در سال اول آزمایش بطور معنی‌داری بیش از سال دوم بود. برای مثال عملکرد از 94/7 کیلوگرم در هر

درخت در سال اول به 85/1 کیلوگرم در هر درخت در سال دوم آزمایش کاهش یافت. این موضوع بدلیل تغییرات اقلیمی مانند دما، نور، رطوبت هوا و غیره از سالی به سال دیگر است که تحت شرایط طبیعی باغ می‌تواند بر ویژگی‌های رشد گیاه از جمله عملکرد مؤثر باشد. مطابق جدول 3، تیمار آبیاری بدون تنش (I_3) در همه صفات اندازه‌گیری شده نسبت به تیمارهای تحت تنش (I_2 و I_1) برتری معنی داری داشت، بجز در مورد غلظت فسفر برگ که برترین تیمار 80% نیاز آبی (I_2) بود و کارایی مصرف آب، که روند معکوسی را نشان داد.

بطوری‌که کاهش عملکرد، وزن میوه و اسیدیته آبمیوه در تیمارهای تنش شدید و ملایم نسبت به شرایط بدون تنش به‌ترتیب 26/9 و 19/0، 19/3 و 13/8، 4/9 و 0/65 درصد و برعکس کارایی مصرف آب 20/7 و 12/7 درصد بیشتر از شاهد بدون تنش بود. بیش‌ترین غلظت فسفر برگ نیز به تیمار تنش ملایم (I_2) اختصاص داشت. نتایج این تحقیق با نتایج برخی محققین دیگر همخوانی دارد. برای مثال وو و ژیا (2006_a) طی آزمایشی روی پایه مرکبات نارنج سه برگ با سه سطح رطوبت خاک شامل، 20% (بدون تنش)، 16% (تنش ملایم) و 12% (تنش شدید) عنوان نمودند که با افزیش تنش خشکی ویژگی‌های رشد نهال‌های مرکبات شامل قطر ساقه، ارتفاع گیاه، سطح برگ، وزن خشک اندام هوایی، ریشه و کل گیاه کاهش یافت. تنش کمبود آب با تاثیر بر فرآیندهای فیزیولوژیکی سبب کاهش رشد و نمو بافت‌های گیاهی و در نهایت افت عملکرد گیاه می‌گردد (عرفانو و همکاران، 2019). کاهش کلنی‌سازی ریشه در اثر افزایش تنش خشکی، ممکن است پیامد کاهش کربن قابل دسترس برای قارچ همزیست از سوی گیاه میزبان، در نتیجه‌ی تنش خشکی باشد، که می‌تواند منجر به کاهش تولید اسپور و کلنی‌سازی ریشه شود (وو و زو، 2009_b).

استفاده از مخلوطی از سه قارچ میکوریزا در هر دو سطح یک و دو کیلوگرم نسبت به عدم مصرف قارچ (تیمار شاهد) افزایش معنی داری را در همه صفات اشاره شده در جدول 3 ایجاد نمود. بطوری‌که افزایش عملکرد، وزن میوه، اسیدیته آبمیوه، رطوبت نسبی برگ، غلظت فسفر برگ و کارایی مصرف آب در تیمارهای M_1 و M_2 نسبت به تیمار شاهد (M_0) بترتیب برابر 9/8 و 22/1، 21/4 و 53/4، 0/7 و 1/6، 8/9 و 15/3، 10 و 19/5، 11/5 و 24 درصد بود

(جدول 3). افزایش عملکرد و ویژگی های رشد می‌تواند به دلیل افزایش سطح جذب ریشه‌ها از طریق نفوذ میسیلیوم قارچ در خاک و بالطبع دسترسی گیاه زراعی به حجم بیشتری از خاک (سونار و همکاران، 2016)، فراهمی بیشتر عناصر غذایی معدنی بویژه فسفر و برخی عناصر کم مصرف و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی باشد (بگوم و همکاران، 2019). همچنین کلنی‌سازی ریشه در اثر مصرف قارچ میکوریزا افزایش قابل توجهی نسبت به تیمار شاهد ایجاد نمود. بعبارت دیگر کلنی سازی ریشه از 5/76 درصد در تیمار شاهد به 29/24 درصد در تیمار مصرف دو کیلوگرم قارچ به ازای هر درخت رسید.

ب- برهمکنش سال، سطوح آبیاری و سطوح قارچ میکوریز آربسکولار بر صفات مورد مطالعه

در ارتباط با برهمکنش‌ها، گرچه در جدول تجزیه واریانس تنها برهمکنش سطوح آبیاری در سطوح قارچ میکوریزا بر قطر میوه و کلنی‌سازی ریشه در سطح 1% و بر کلروفیل برگ در سطح 5% معنی‌دار بود و به همین دلیل نتایج اثرات عوامل اصلی آزمایش در رابطه با این صفات ذکر نگردید، ولی در مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در مورد سایر صفات اندازه‌گیری شده نیز اختلافات معنی‌داری ملاحظه گردید و بنابراین در جدول 4 همه صفات آورده شده اند.

جدول 2- تجزیه واریانس مرکب تأثیر سطوح آبیاری و سطوح مختلف قارچ میکوریزا بر صفات اندازه گیری شده

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات								
		عملکرد میوه	وزن تک میوه	قطر میوه	اسیدیته آبمیوه	کلروفیل برگ	رطوبت نسبی برگ	غلظت فسفر برگ	کلنی سازی ریشه	کارایی مصرف آب
سال (Y)	1	1261/50**	102/89**	6/41 ^{ns}	0/000 ^{ns}	24/16 ^{ns}	9/80 ^{ns}	0/000 ^{ns}	28/73 ^{ns}	2/13**
تکرار x سال (Y×R)	4	96/26 ^{ns}	5/15 ^{ns}	3/78 ^{ns}	0/001 ^{ns}	18/10 ^{ns}	12/04 ^{ns}	0/000 ^{ns}	7/44 ^{ns}	0/07 ^{ns}
سطوح آبیاری (I)	2	3504/96**	19/21**	71/77**	0/006 **	312/26**	75/84**	0/003**	486/08**	0/89**
برهمکنش (Y×I)	2	66/89^{ns}	6/73^{ns}	1/24 ^{ns}	0/000^{ns}	9/29^{ns}	5/52^{ns}	0/000^{ns}	1/83^{ns}	0/10^{ns}
خطا	8	48/54	5/32	3/30	0/000	14/41	7/65	0/000	7/62	0/04
سطوح قارچ میکوریزا (M)	2	1455/35**	729/43**	251/25**	0/005**	436/41**	681/32**	0/004**	2889/36**	1/16**
برهمکنش (Y×M)	2	7/39 ^{ns}	8/47 ^{ns}	0/167 ^{ns}	0/000 ^{ns}	1/90 ^{ns}	0/36 ^{ns}	0/000 ^{ns}	2/73 ^{ns}	0/01 ^{ns}
برهمکنش (I×M)	4	56/85^{ns}	12/14 ^{ns}	13/96 **	0/001^{ns}	20/01*	4/62^{ns}	0/000^{ns}	66/38**	0/12^{ns}
برهمکنش (Y×I×M)	4	6/94 ^{ns}	1/51 ^{ns}	1/16 ^{ns}	0/000 ^{ns}	5/26 ^{ns}	1/69 ^{ns}	0/000 ^{ns}	1/60 ^{ns}	0/002 ^{ns}
خطای آزمایش	24	61/22	9/99	2/23	0/000	5/50	7/20	0/000	5/93	0/04
ضریب تغییرات (درصد)		8/89	10/67	4/16	0/95	8/23	3/10	8/89	12/03	8/21

** در سطح 1% و * در سطح 5% معنی‌دار هستند. ns معنی دار نیست.

جدول 3- مقایسه میانگین عوامل اصلی سطوح آبیاری (I) و سطوح قارچ های میکوریزی (M) بر برخی صفات اندازه گیری شده با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن (α=0/05)

سطوح فاکتورها	عملکرد (کیلوگرم در هر درخت)	وزن تک میوه (گرم)	pH آبمیوه	رطوبت نسبی برگ (درصد)	غلظت فسفر برگ (درصد)	کارایی مصرف آب (کیلوگرم بر متر مکعب)
سطوح آبیاری (I)						
I_1	74/72 ^{c} *	26/86 ^{c}	2/095 ^{c}	84/17 ^{b}	0/1428 ^{c}	2/559 ^{a}
I_2	82/83 ^{b}	28/71 ^{b}	2/189 ^{b}	88/05 ^{a}	0/1678 ^{a}	2/389^{b}
I_3	102/2 ^{a}	33/29 ^{a}	2/203 ^{a}	87/26 ^{a}	0/1638 ^{b}	2/119 ^{c}
سطوح قارچ میکوریزا (M)						
M_0	81/28 ^{c}	23/71 ^{c}	2/146 ^{c}	80/03 ^{c}	0/1440 ^{c}	2/106 ^{c}
M_1	89/22 ^{b}	28/79 ^{b}	2/161 ^{b}	87/16 ^{b}	0/1584 ^{b}	2/349 ^{b}
M_2	99/22 ^{a}	36/36 ^{a}	2/181 ^{a}	92/28 ^{a}	0/1721 ^{a}	2/612 ^{a}

I_1: 60% نیاز آبی لیمو ، I_2 : 80% نیاز آبی لیمو و I_3 : 100% نیاز آبی لیمو

M_0: بدون استفاده از قارچ میکوریزی و M_1: یک کیلوگرم قارچ میکوریزا و M_2: دو کیلوگرم قارچ میکوریزا

* برای هر عامل جداگانه در هر ستون، حروف غیر مشابه بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن اختلاف آماری در سطح 5% را نشان می دهد.

همانطور که از داده‌های این جدول مشخص است، اولاً برترین تیمار تقریباً در همه صفات اندازه‌گیری شده بجز کارائئ مصرف آب که روند معکوسی را نشان داد، مربوط به مصرف دو کیلوگرم قارچ میکوریزا به ازای هر درخت، تحت شرایط بدون تنش رطوبتی (I_3M_2) و کمترین مقدار هر صفت نیز به عدم مصرف قارچ میکوریزا و تحت تنش شدید رطوبتی (I_1M_0) بود. ثانیاً تحت شرایط تنش شدید رطوبتی استفاده از قارچ

میکوریزا بویژه در سطح دو کیلوگرم در هر درخت، سبب برتری معنی‌دار، تقریباً در همه صفات گردید. بطوری‌که مصرف یک و دو کیلوگرم قارچ میکوریزا تحت شرایط تنش شدید رطوبتی سبب افزایش عملکرد، وزن میوه، قطر میوه، کلـروفیل برگ، رطوبت نسبی برگ، غلظـــت فسفر برگ و کارایی مصرف آب بترتیب به میزان 21/1 و 37/6، 37/2 و 64/3، 23/2 و 31/1، 12/4 و 27/8، 9/3 و 13/7، 7/6 و 29/9، 21/1 و 37/6 درصد گردید. همچنین استفاده از یک و دو کیلوگرم قارچ میکوریزا نسبت به تیمار عدم مصرف قارچ (شاهد) کلنی‌سازی ریشه را بترتیب 4/24 و 4/87 برابر نمود. تحت شرایط تنش رطوبتی ملایم (تیمار I_2) نیز مصرف دو کیلوگرم قارچ میکوریزا، سبب افزایش معنی‌دار همه صفات اندازه-گیری شده گردید و مصرف یک کیلوگرم قارچ میکوریزا به ازای هر درخت سبب افزایش معنی دار قطر میوه، اسیدیته آبمیوه، کلروفیل برگ، رطوبت نسبی برگ، غلظت فسفر برگ و کلنی‌سازی ریشه شد.

کلروفیل برگ یکی از ویژگی‌های زیست شیمیایی است که نقش مهمی در فتوسنتز گیاه و در نتیجه در رشد گیاه و تجمع زیست توده دارد. در این تحقیق تنش خشکی برمقدار کلروفیل برگ تاثیر منفی ولی در مقابل، تلقیح با قارچ میکوریزا سبب افزایش کلروفیل برگ شد. این نشان می دهد که تلقیح با قارچ توانسته است اثرات سوء تنش خشکی بر کلروفیل و در نتیجه بر رشد گیاه را کاسته و در واقع بدین وسیله مقاومت گیاه در برابر تنش، بیشتر نماید. تاثیر مثبت قارچ میکوریزا بر غلظت فسفر برگ توسط پوزش شیرازی و همکاران (1397) نیز گزارش گردیده است. بطور کلی خاک‌هایی که بلحاظ فسفر بومی در سطح پایین‌تری قرار دارند و فسفر محلول در خاک کم بوده یا در اثر خشکی، ضریب پخشیدگی عنصر فسفر بسیار کاهش یافته است، اثرات مثبت تلقیح میکوریزایی در آنها مشهودتر می‌باشد (ابیجبیجن و همکاران، 1996). رابطه همزیستی تشکیل شده بین گیاه و قارچ‌های میکوریز آربسکولار، به گیاه این امکان را می‌دهد که بواسطه ریسه‌های خارجی امتداد یافته در ناحیه‌ای فراتر از محل تخلیه فسفر، حجم بیشتری از خاک را در جستجوی فسفر در اختیار گیرد (سونار و همکاران، 2013). در تحقیق وو و زو (2009_b) نیز افزایش غلظت فسفر برگ در نهال‌های مرکبات *Poncirus trifoliata* در اثر تلقیح با میکوریزا گزارش گردیده است.

در این تحقیق افزایش مقدار نسبی آب برگ در راستای افزایش میزان کلنی‌سازی ریشه بوده است. از آنجایی که مقدار نسبی آب برگ یکی از مولفه های موثر در بهبود تنظیم اسمزی در گیاه تحت شرایط تنش خشکی است، لذا می توان نتیجه‌گیری کرد که احتمالاً یکی از علل افزایش رشد و عملکرد گیاهان تلقیح شده، افزایش تنظیم اسمزی بوده است. محققین زیادی اشاره کرده‌اند که تحت شرایط تنش خشکی، مقدار نسبی آب برگ کاهش می‌یابد. کریشنا و همکاران (2005) اعلام نمودند که گیاهان انگور تلقیح شده با چند گونه قارچ میکوریزا در مقایسه با گیاهان غیر میکوریزایی مقدار نسبی آب برگ بیشتری داشته و بدین طریق گیاه را در مواجهه با تنش خشکی کمک نموده است. از نتایج دیگر این تحقیق افزایش کارایی مصرف آب تحت شرایط استفاده از قارچ میکوریزی بود که با نتایج محققین دیگری نیز مشابهت دارد (پیرزاد و محمد زاده، 2018). همچنین کارایی مصرف آب با افزایش کلنی سازی ریشه ارتقاء یافته است. این نتیجه با یافته های تاسوکه و همکاران (2015) مطابقت دارد. یکی از مکانیسم‌های پیشنهادی برای بهبودی کارایی مصرف آب، افزایش بیومس ریشه‌ها در نتیجه استفاده از قارچ‌های میکوریزی است، که پیامد آن تاثیر مثبت بر رشد گیاه است و این موضوع بدلیل حلالیت بیشتر فسفر، تحت این شرایط می‌باشد (سابرامانیان، 2006).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، چنین بر می‌آید که تلقیح میکوریزایی بؤیژه به میزان دو کیلوگرم به ازای هر درخت لیمو سبب افزایش قابل

توجهی در کلنی‌سازی ریشه گردیده و این موضوع علاوه بر بهبود رشد و عملکرد گیاه سبب افزایش کارایی مصرف آب هم تحت شرایط تنش و هم بدون تنش گردیده است. بعبارت دیگر استفاده از قارچ‌های میکوریزی توانسته است ثرات سوء تنش رطوبتی، بویژه در تنش ملایم بر گیاه لیمو را تخفیف دهد. این موضوع احتمالاً به دلیل بهبود جذب فسفر و نیز بهبود روابط آبی، از جمله تنظیم اسمزی در گیاه بوده است. بنابراین استفاده از این قارچ‌ها در باغات مرکبات، بویژه در مراحل اولیه کاشت نهال در خاک‌های آهکی جنوب کشور توصیه می‌گردد و این امر می‌تواند کمک مؤثری در کاهش مصرف آب و عناصر غذایی بؤیژه فسفر، نماید.

سپاسگزاری

بدین وسیله از بخش بیولوژی خاک موسسه تحقیقات خاک و آب بخاطر در اختیار قرار دادن مایه تلقیح قارچ میکوریزا و آقای مهندس آیینه بدلیل در اختیار قرار دادن باغ لیمو جهت انجام آزمایش و نیز آقای مهندس ضیائیان دارابی برای انجام تجزیه های آزمایشگاهی صمیمانه قدردانی می‌گردد.

جدول 4- مقایسه میانگین برهمکنش سطوح آبیاری و سطوح قارچ میکوریزا بر صفات اندازه گیری شده

صفات	I_1			I_2			I3		
	M_0	M_1	M_2	M_0	M_1	M_2	M_0	M_1	M_2
عملکرد (کیلو گرم در هر درخت)	62/5 f *	75/7 e	86/0 d	85/5 d *	90/2 d	102/8 ab	95/8 bc *	101/8 ab	108/8 a
وزن تک میوه (گرم)	20/07 d	27/54 c	32/97 b	23/69 cd	26/14 c	36/29 ab	27/37 c	32/68 b	39/82 a
قطر میوه (میلی‌متر)	28/97 f	35/68 cd	37/98 b	31/68 e	34/97 d	40/00 a	36/03 cd	37/27 bc	41/12 a
اسیدیته آبمیوه	2/086 h	2/083 i	2/115 g	2/167 f	2/190 d	2/212 b	2/185 e	2/210 c	2/214 a
کلروفیل برگ	22/34 ef	25/10 de	28/55 c	21/65 f	26/77 cd	32/35 b	26/21 cd	34/63 b	38/79 a
رطوبت نسبی برگ (درصد)	78/17 c	85/45 b	88/88 b	81/07 c	88/33 b	94/75 a	80/87 c	87/70 b	93/22 a
غلظت فسفر برگ (درصد)	0/1259 h	0/1355 g	0/1635 d	0/1533 e	0/1743 b	0/1758 a	0/1492 f	0/1653 c	0/1770 a
کلنی سازی ریشه (درصد)	4/28 e	18/17 d	20/85 d	5/87 e	27/78 c	31/92 b	7/12 e	31/25 b	34/97 a
کارایی مصرف آب (کیلوگرم بر متر مکعب)	2/140 cd	2/592 b	2/945 a	2/200 cd	2/323 c	2/645 b	1/977 d	2/133 cd	2/247 c

I_1: 60% نیاز آبی لیمو ، I_2 : 80% نیاز آبی لیمو و I_3 : 100% نیاز آبی لیمو

M_0: بدون استفاده از قارچ میکوریزی و M_1 :یک کیلوگرم قارچ میکوریزا و M_2 : دو کیلوگرم قارچ میکوریزا

* برای هر عامل جداگانه در هر ردیف، حروف غیر مشابه بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن اختلاف آماری در سطح 5% را نشان می دهد.

فهرست منابع:

1. احمدی، ک.، عبادزاده، ح ر.، حاتمی، ف.، حسین پور، ر. و عبدشاه، ه. 1399. آمارنامه کشاورزی سال98. معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات، وزارت جهاد کشاورزی. جلد سوم. محصولات باغبانی.
2. تدین، م س.، خوگر ز.، معافپوریان، غ ر.، ضیائیان، ع. ح.، کشاورز، ه.، نوابی، ف.، همتی، ا.، حقیقت‌نیا، ح.، رستگار، ح.، میرزاوند، ج. ب. و ملکوتی، م. ج. 1384. توصیه بهینه کودی برای محصولات زراعی و باغی استان فارس. نشریه فنی شماره 456. انتشارات سنا، تهران، ایران.
3. پوزش شیرازی، م.، حقیقت نیا، ح.، خادمی، ر. 1397. تأثیر همزیستی میکوریزی بر جذب عناصر غذایی و کارایی مصرف آب در گوجه فرنگی تحت شرایط تنش خشکی. نشریه آب و خاک، دانشگاه فردوسی مشهد 22(4): 820-809.
4. حقیقت‌نیا، ح.، رجالی، ف.، نادیان، ح. 1390. تأثیر دو گونه قارچ میکوریزا آربسکولار بر برخی پارامترهای رشد رویشی پایه مرکبات *citrus volkameriana* تحت تنش خشکی. دوازدهمین کنگره علوم خاک ایران، تبریز، ایران.

5. حیدری، ن. 1393. ارزیابی شاخص بهره‌وری آب کشاورزی و عملکرد سیاست ها و برنامه‌های مدیریت آب کشور در این زمینه. 78 :199-177.

6. Ahanger, M.A., Hashem, A., Abd-Allah, E.F., and Ahmad P. 2014. Arbuscular mycorrhiza in crop improvement under environmental stress, pp 69-95. In: Ahmad P. (eds) Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance, Elsevier Publication.
7. Amiri, M.J., and Eslamian, S.S. 2010. Investigation of climate change in Iran. Journal of Environmental Science and Technology, 3(4): 208-216.
8. Begum, N., Qin, C., Ahanger, M.A., Raza, S., Khan M.I., Ashraf, M., Ahmed, N. and Zhang, L. 2019. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: Implications in abiotic stress tolerance. Frontiers in Plant Science, 10:1-15.
9. Doorenbos, J., and Pruitt, W.O. 1984. Crop water requirements, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Irrigation and Drainage Paper No.24, Revised, Room, Italy.
10. Fernández-Lizarazo, J.C., and Moreno-Fonseca, L.P. 2016. Mechanisms for tolerance to water-deficit stress in plants inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. A review. Agron. Colomb. 34: 179–189.
11. He, J.D., Zou, Y.N., Wu, Q.S., and Kuˇca, K. 2020. Mycorrhizas enhance drought tolerance of trifoliate orange by enhancing activities and gene expression of antioxidant enzymes. Sci. Hortic. 262:108745.
12. Ibijbijen, J., Urquiaga, S., Ismaili, M., Alves, B.J.R., and Boddey, R.M. 1996. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on growth, mineral nutrition and nitrogen fixation of three varieties of common beans. New Phytol. 134: 353-360.
13. Keller, J., and Blisner, R.D. 1990. Sprinkler and trickle irrigation, Van Nostrand Reinbold, Newyork, 10003, 642p.
14. Krishna, H., Singh, S.K., Sharma, R.R., Khawale, R.N., Grover, M., and Patel, V.B. 2005. Biochemical changes in micropropagated grape (*Vitis vinifera* L.) plantlets due to arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF) inoculation during ex vitro acclimatization. Scientia Hortic. 106:554-567.
15. Larrainzar, E., Wienkoop, S. 2017. A proteomic view on the role of legume symbiotic interactions. Frontiers in Plant Science, 8:1-13.
16. Murphy, J., and Riley, J.P. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica Chimica Acta. 27:31-36.
17. Orfanou, A., Pavlou, D., Porter, W.M. 2019. Maize yield and irrigation applied in conservation and conventional tillage at various plant densities. Water, 11: 1726-1748.
18. Pirzad, A.R, Mohammadzadeh, S. 2018. Water use efficiency of three mycorrhizal Lamiaceae species (*Lavandula officinalis*, *Rosmarinus Officinalis* and *Thymus vulgaris*). Agriculture Water Management, 204:1-10.
19. Phillips, J.M., and Hayman, D.S. 1970. Improved procedures clearing roots and staining parasitic and vesicular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55: 158-161.
20. Sembok, W.W., Abu-Kassim, N., Hamzah, Y., and Rahman, ZA. 2015. Effect of Mycorrhizal Inoculation on Growth and Quality of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Grown in Soiless Culture System. Malaysian Appl. Biol. 44(1): 57-62.
21. Sonar, B.A., Kamble, V.R., and Chavan, P.D. 2013. Native AM fungal colonization in three Hibiscus species under NaCl induced salinity. J. Pharm. Biol. Sci. 5(6): 7-13.
22. Subramanian, K.S., Santhanakrishnan, P., and Blasubramanian, P. 2006. Responses of field grown tomato plants to arbuscular mycorrhyzal fungal colonization under varying intensities of drought stress. Scientia Horticulturae, 107:245-253.

23. Tauschke, M., Behrendt, A., Monk, J., Lentzsch, P., Eulenstein, F., and Monk, S. 2015. Improving the water use efficiency of crop plants by application of mycorrhizal funji. Horticulturae, 1-8.
24. Wu, Q.S., Srivastava, A.K. and Zou, Y.N. 2013. AMF-induced tolerance to drought stress in citrus: a review. Sci. Horti. 164: 77-87.
25. Wu, Q.S., He, J.D., Srivastava, A.K., Zou, Y.N., and Kuˇca, K. 2019. Mycorrhizas enhance drought tolerance of citrus by altering root fatty acid compositions and their saturation levels. Tree Physiol. 39: 1149–1158.
26. Wu, Q.S., and Xia, R.X. 2006_a. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. J. Plant Physiol. 163(4):417-425.
27. Wu, Q.S., and Xia, R.X. 2006_b. Effects of water stress and Arbuscular mycorrhizal fungi on reactive oxygen metabolism and antioxidant production by citrus (*Citrus tanjerin*) roots. Europ. J. Soil Biol. 42(3):166-172.
28. Wu, Q.S., and Zou, Y.N. 2009_a. The effect of Dual application of arbuscular mycorrhizal fungi and polyamines upon growth and nutrient uptake on trifoliate orange (*Poncirus trifoliate*) seedlings. Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj. 37(2):95-98.
29. Wu, Q.S., and Zou, Y.N. 2009_b. Mycorrhiza has a direct effect on reactive oxygen metabolism of drought-stressed citrus. Plant Soil Environ. 55(10):436-442.
30. Wu, Q.S., Zou, Y.N., Xia, R.X., and Wang, M.Y. 2007. Five Glomus species affect water relations of citrus tanjerine during drought stress. Botanical Studies, 48:147-154.
31. Zarei, M., Paymaneh, Z., Ronaghi, A. 2016. The effects of arbuscular mycorrhizal fungus and water stress on some antioxidant enzymes activities and nutrients uptake of two citrus rootstocks. Iran Agricultural Research, 35(2): 19-26.
32. Zhang, F., Zou, Y.N., Wu, Q.S., and Kuˇca, K. 2020. Arbuscular mycorrhizas modulate root polyamine metabolism to enhance drought tolerance of trifoliate orange. Environ. Exp. Bot. 171:103962.
33. Zou, Y.N., Wu, Q.S., and Kuˇca, K. 2020. Unravelling the role of arbuscular mycorrhizal fungi in mitigating the oxidative burst of plants under drought stress. Plant Biol. doi: 10.1111/plb.13161. [Epub ahead of print].

اثر قارچ میکوریز توأم با برخی میکروارگانیسم‌ها و ترکیبات شیمیایی بر عملکرد شاخص‌های رشدی و فتوسنتزی ذرت

معصومه احمد زاده، ابراهیم صداقتی[1]، روح الله صابری ریسه، اصغر رحیمی، علی اکبر محمدی میریک و نرگس حاتمی

کارشناسی ارشد آسیب شناسی گیاهی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، ایران،؛ **Ahmadzadehmasomeh@gmail.com**

استادیار بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، ایران؛ **sedaghati @ vru.ac.ir**

استادیار بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، ایران؛ **r.saberi @ vru.ac.ir**

دانشیار زراعت، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، ایران؛ **rahimia @ vru.ac.ir**

دانشیار زراعت، دانشگاه ولی عصر رفسنجان، ایران؛ **a.mohammadi@vru.ac.ir**

عضو هیأت علمی دانشگاه پیام نور، دانشکده کشاورزی؛ **narges.hatamy123@gmail.com**

دریافت: **99/12/6** و پذیرش: **1400/10/29**

چکیده

با توجه به اهمیت برخی محصولات کشاورزی، مانند ذرت و قابلیت بالای آن‌ها در میزبانی قارچ های میکوریزا، استفاده از برخی ریزجانداران و ترکیبات شیمیایی در راستای بهبود فعالیت میکوریزایی حائز اهمیت است. به این منظور، آزمایشی در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی دانشگاه ولیعصر(عج) رفسنجان به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. در این بررسی، قارچ‌های *Funneliformis mosseae (FM)*، *Rhizophagus (RI) intraradices*، *Rhizophagus irregalaris (RIr)* به‌عنوان زادمایه میکوریزایی استفاده گردید و تأثیر برخی ریزجانداران شامل، مخمر (*Issatchenkia orientalis*) و باکتری (*Pseudomonas fluorescens VUPf5*) و همچنین ترکیبات شیمیایی از جمله، چای کمپوست، عصاره آزولا، سیدروفور باکتریایی، اسید هیومیک، کمپلکس آمینو اسید، بر فعالیت قارچی و پارامترهای رویشی و فیزیولوژیکی گیاه ذرت رقم *SC750* موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تمامی گونه‌های قارچ میکوریز توأم با تیمار باکتریایی و ترکیبات شیمیایی تأثیر معنی‌داری بر قطر و رشد طولی ساقه، افزایش سطح برگ، وزن‌تر و خشک‌ریشه و وزن‌تر خشک شاخساره داشتند. نتایج تجزیه واریانس بررسی شاخص های فیزیولوژیکی نشان داد تأثیر تیمارهای موردبررسی بر شاخص کلروفیل در یک سطح بوده و طبق مقایسه میانگین بین تیمارهای توأم با قارچ میکوریز و عدم وجود قارچ میکوریز اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. با اینحال، کاربرد گونه‌های مختلف قارچ میکوریز تأثیر معنی‌داری بر افزایش میزان محتوای کلروفیل *a* ، کلروفیل *b* ، محتوای کلروفیل کل و کارتنوئید گیاه ذرت در مقایسه با شاهد (بدون قارچ میکوریز) داشتند. کاربرد اسید هیومیک و چای کمپوست باعث القای بیشترین افزایش رشد شدند. تیمار کمپلکس آمینو اسید توأم با *RI* بیشترین تأثیر را برافزایش کلروفیل *a* کلروفیل *b* و کلروفیل کل داشت. تیمار مخمر و کمپلکس آمینو اسید به ترتیب بیشترین تأثیر را برافزایش کاروتنوئیدها داشتند.

واژه‌های کلیدی: پارامترهای رویشی، ترکیبات شیمیایی، ذرت، قارچ میکریزآربوسکولار

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: رفسنجان، دانشگاه ولیعصر- دانشکده کشاورزی، گره گیاهپزشکی

مقدمه

مواد آلی عامل اصلی حاصلخیزی و باروری خاک هستند و برای حفظ سطح حاصلخیزی و قابلیت تولید خاک، میزان این مواد باید در سطح مناسبی حفظ شود (پدرا و همکاران ،2007). این در حالی است که، امروزه کودهای شیمیایی به‌عنوان یکی از عوامل تأثیرگذار بر عملکرد گیاهان زراعی مطرح می‌باشند و استفاده زیاد از آن‌ها به‌ویژه هنگامی‌که با اقدامات مدیریتی نامناسب مثل سوزاندن بقایای گیاهی همراه باشد، مواد آلی خاک را به‌شدت کاهش می‌دهد (پیرسته انوشه و همکاران، 1389). همچنین، کاربرد زیاد کودهای شیمیایی در درازمدت باعث تخریب خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک، کاهش نفوذپذیری، افزایش وزن مخصوص ظاهری و درنهایت باعث کاهش رشد و عملکرد گیاه می‌شود (متقیان و همکاران، 1386).

در حال حاضر، استفاده از ریزجانداران مفید به‌عنوان نهاده‌های کشاورزی مؤثر در افزایش تولید به‌منظور کاهش مصرف کودهای شیمیایی در راستای رسیدن به اهداف کشاورزی پایدار موردتوجه قرارگرفته است (صالح راستین، 2001). یکی از راه‌های دست‌یابی به کشاورزی پایدار استفاده از ریزموجوداتی است که نقش مهمی در تأمین نیاز غذایی گیاهان دارند (قربانپور و همکاران،2016). همچنین، افزایش ماده آلی خاک با استفاده از کودهای آلی مانند کمپوست، ورمی‌کمپوست، اسید هیومیک و استفاده از ریزجانداران مفید، از قبیل باکتری‌ها و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، در این رابطه بسیار مؤثر است. همزیستی گیاهان با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار منجر به بهبود شرایط تغذیه‌ای و استقرار بهتر گیاه، افزایش مقاومت در برابر تنش‌های زنده (بیماری‌ها و آفات) و غیرزنده (شوری، خشکی و عناصر سنگین)، کاهش سرعت تبخیر و تعرق، افزایش بازده مصرف آب، افزایش عملکرد و افزایش سرعت فتوسنتز در گیاه می‌گردد (کالوت و همکاران ،2004؛ فیدلیباس و همکاران، 2000). از این‌رو، قارچ‌های میکوریز دارای اهمیت اکولوژیکی و اقتصادی فراوانی می‌باشند و به‌عنوان یک کود بیولوژیک مهم در سیستم خاک-گیاه محسوب می‌شوند.

چای کمپوست از قرار دادن ورمی کمپوست در آب و هوادهی آن حاصل می‌شود (سکورل و ماهاف، 2004). هوادهی چای کمپوست و افزودن مواد اصلاحی منجر به افزایش رشد ریزجانداران مفید آن می‌گردد. بنابراین، توانایی بالقوه چای کمپوست در افزایش رشد گیاه ممکن است مربوط به توانایی ریزجانداران در افزایش خواص فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک باشد که این جمعیت میکروبی فعال باعث بهبود باروری خاک و درنتیجه بهبود رشد گیاه می‌شود (لولاند و وپ، 2003).

باکتری‌ها فراوان‌ترین ریزجانداران در ناحیه ریزوسفر خاک هستند و با توجه به قدرت رقابت بالای آن‌ها در کلنیزاسیون ریشه، فیزیولوژی گیاه را به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌دهند. باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه (Plant growth promoting rhizobacteria) می‌توانند با دو روش مستقیم و غیرمستقیم بر رشد و نمو گیاه اثر مفید داشته باشند. در حالت غیرمستقیم، کاهش یا ممانعت از اثرات مضر بیمارگرهای گیاهی معمولاً از طریق رقابت برای کلنیزاسیون و اشغال فضاهای مناسب روی سیستم ریشه، تولید و ترشح برخی متابولیت‌های میکروبی مثل آنتی‌بیوتیک‌ها، سیانید هیدروژن، آنزیم‌های لیتیک و افزایش مقاومت سیستمیک گیاه صورت می‌گیرد (زهیر و همکاران، 2004). در حالت مستقیم، باکتری‌های محرک رشد گیاه از طریق تثبیت نیتروژن، حل کردن فسفات‌های نامحلول، تأمین آهن از طریق تولید سیدروفورها، تولید هورمون‌های گیاهی مانند اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و جیبرلین و کاهش اتیلن باعث بهبود و افزایش رشد و عملکرد گیاه می‌شوند (کلوپر و همکاران، 1989).

پیش‌تر مشخص‌شده است که، استفاده از عصاره جلبک دریایی و سرخس آزولا موجب بهبود مقاومت گیاه

به سرما، خشکی، آفات و بیماری‌ها، افزایش عملکرد محصولات و مصرف کارآمدتر مواد مغذی داخل خاک می‌گردد (ماتیسیاک و همکاران، 2010). تأثیر عصاره جلبک بر کشت گیاهان به نوع محصول، غلظت عصاره و شرایط محیطی بستگی دارد (کراجی، 2010). همچنین مشخص‌شده است این جلبک‌ها حاوی مواد محرک رشد و توسعه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در گیاهان هستند (کوادا و همکاران، 2006).

هیومیک‌ها ازلحاظ تغذیه منبعی از نیتروژن، فسفر و گوگرد برای گیاهان و ریزجانداران می‌باشند. مهم‌ترین تأثیرات قابل‌مشاهده مصرف مواد هیومیکی، بهبود ساختار خاک، کمک به ریشه‌زایی و توسعه ریشه، ایجاد تعادل بین دو بخش رویشی و زایشی و افزایش عملکرد و کیفیت محصول از لحاظ مقدار پروتئین می‌باشد (دهانپال و سکار،2013).

آمینواسیدها از اجزای بنیادی در مراحل آغازین سنتز پروتئین‌ها به شمار می روند واثبات شده است که آنها می‌توانند به‌طور مستقیم تأثیر مهمی در فعالیت های حیاتی و ساختارهای گیاهی داشته باشد. آمینو اسیدهایی که به صورت کود در اختیار گیاه قرار می‌گیرند در خاک استقرار می‌یابند و به بهبود ساختار خاک و به طور کلی فلور گیاهی خاک کمک می‌کنند و بدینوسیله جذب مواد غذایی خاک را توسط ریشه گیاهان آسان می‌کنند. همچنین باعث می‌شوند که مواد غذایی به‌طور یکسان از طریق خاک جذب گیاه شود. همچنین، حضور قارچ های میکوریز همزیست با ریشه گیاه باعث جذب سریعتر آمینواسیدها و در نتیجه اثربخشی بیشتر آنها می‌شود (تالبوت و تراستر، 2010).

از بین گیاهان زراعی، ذرت از اهمیت زیادی در ایران و جهان برخوردار بوده و عمدتاً به‌منظور تولید دانه کشت می‌شود. ازآنجاکه رویکرد جهانی در تولید گیاهان زراعی مهم مانند ذرت با استفاده از نظام‌های کشاورزی پایدار و به‌کارگیری روش‌های مدیریتی آن‌ها نظیر کاربرد کودهای زیستی به‌منظور ارتقاء عملکرد کیفی و کمی گیاهان زراعی می‌باشد، این پژوهش باهدف بررسی تأثیر کاربرد توأم قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با برخی تیمارهای میکروبی و ترکیبات شیمیایی بر فاکتورهای رشدی و فتوسنتزی گیاه ذرت انجام گردید.

مواد و روش‌ها

تیمارهای آزمایشی شامل سه گونه قارچ میکوریز آربوسکولار *F. mosseae (FM)*، *R. intraradices (RI)*، *R. irregularis (RIr)* و شاهد بدون قارچ بودند. گونه‌های قارچی از کلکسیون قارچ‌های میکوریز دانشگاه ولیعصر (عج) رفسنجان تهیه‌شده و جهت اطمینان از نوع گونه، شناسایی مورفولوژیکی (رنگ اسپور، شکل، تزئینات سطح، اندازه و ساختار دیواره) و شناسایی مولکولی (تعیین توالی از ناحیه S r DNA18) انجام گرفت و نتایج شناسایی مولکولی در سایت NCBI[1] ثبت گردید. تیمار میکروبی شامل: باکتری *Pseudomonas flurescens* VUPF5، مخمر *Issatchenkia orientalis*، چای کمپوست (حاوی 250 گرم چای کمپوست، 50 سی‌سی ملاس چغندرقند و 50 سی‌سی جلبک دریایی)، آزولا (C/N 10) و ترکیبات غیرزنده،شامل کمپلکس اسیدهای آمینه (آمینواسید پودری 50%، آمینواسپارک)، اسید هیومیک (Humax 95Wsj, HJ Biotech Inc.) و سیدروفور باکتریایی (پرشین بنیان آریا) نیز تهیه گردید. بذرهای ذرت رقم SC750 در محلول نیم درصد هیپوکلریت سدیم غوطه‌ور شده و پس از20 ثانیه، چند مرتبه با آب مقطر شسته شدندو 60 دقیقه در دمای 121 درجه سلسیوس اتوکلاو شد و پس از جوانه زنی بذور 200 گرم از اینوکولوم قارچ میکوریز به هر گلدان اضافه شد و گلدان‌ها در گلخانه با دمای 27-25 درجه سلسیوس قرار در گلدان پلاستیکی 4کیلویی با قطر دهانه¬ی 20سانتی¬متر و ارتفاع 20 سانتی¬متر که قبل از پر شدن با خاک، با هیپوکلریت سدیم نیم درصد شسته و با الکل 70 درصد ضدعفونی شدند و حاوی خاک به نسبت 2:1

[1] AY6358331-*F.mosseae*; HF968841-1-*R.irregularis*; EU232660-1-*R.intraradices*

از خاک و ماسه بادی شسته شده که به منظور سترون کردن و حذف میکروارگانیسمها، اتوکلاو خاک در دو روز متوالی به مدت داده شدند. بعد از گذشت سه هفته از رشد گیاه، تیمارهای میکروبی و ترکیبات شیمیایی در دو نوبت به فاصله دو هفته ضمن آبیاری به گلدان افزوده شدند. میزان 20 میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری *P. fluorescens* VUPf5 با غلظت 4×10^{11} CFU/ml و سوسپانسیون مخمر با میزان جمعیت 4×10^{11} *CFU/ml* طول (موج540 نانومتر) تهیه وبرای تلقیح به هرگلدان اضافه شد (فراکچیا و همکاران،2001).40 میلی‌لیتر عصاره چای کمپوست (حاوی 250 گرم چای کمپوست، 50 سی‌سی ملاس چغندرقند و 50 سی‌سی جلبک دریایی) (سکورل و ماهاف، 2004)، 12 میلی‌لیتر عصاره آزولا (آزولا تهیه شده از تالاب انزلی) (*C/N 10*) (کراجی، 2010) و یک گرم از کمپلکس آمینواسید (آمینواسید پودری 50%، آمینواسپارک) (تالبوت و ترسدر،2010)، اسید هیومیک (*Humax 95Wsj, HJ Biotech Inc.*) و 20 سی سی بیولوگ سیدروفور باکتریایی (ویواز و همکاران، 2003)به هر گلدان افزوده شد. آزمایش در شرایط گلخانه به‌صورت فاکتوریل با طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار به مدت 3ماه انجام شد در این آزمایش، تمام محاسبات آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. رسم نمودارها و جداول نیز توسط نرم‌افزارهای Excel و Word صورت گرفت. در مرحله نخست تجزیه واریانس جهت صفات اندازه‌گیری شده انجام و پس‌ازآن مقایسه میانگین صفات مورد مطالعه با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد. (بس، 2000).

اندازه‌گیری شاخص های رویشی

ارتفاع و قطر ساقه

در مرحله رسیدگی فیزیولوژیک، ارتفاع بوته‌ها با استفاده از خط‌کش مدرج با دقت یک‌دهم متر و قطر ساقه با استفاده از کولیس دیجیتال با دقت یک‌صدم متر اندازه‌گیری شدند.

وزن‌تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه

برای اندازه‌گیری وزن‌تر ابتدا گیاه از ناحیه طوقه جدا و به دو قسمت شاخساره و ریشه تقسیم شد و پس از شستشو و خشک‌کردن به‌طور جداگانه وزن شدند. به‌منظور اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها به مدت 48 ساعت در آون با دمای 72 درجه سلسیوس قرارگرفته و سپس وزن شدند.

سطح برگ

جهت تعیین سطح برگ، برگ‌ها از بوته جداشده و با دستگاه سنجش سطح برگ (Leaf area Measurement System Delta T, WD_3, UK) اندازه‌گیری صورت گرفت.

اندازه‌گیری شاخص کلروفیل

برای اندازه‌گیری شاخص کلروفیل از دستگاه کلروفیل‌متر (SPAD- 502) استفاده شد. بدین منظور از هر تیمار، پنج برگ انتخاب شده و میانگین پنج برگ به‌عنوان عدد SPAD یادداشت گردید.

پارامترهای فیزیولوژیکی

سنجش کلروفیل a، b، مجموع کلروفیل و کاروتنوئید

برای اندازه‌گیری کلروفیل a، b، کلروفیل کل و مجموع کارتنوئید، ابتدا 0/25 گرم برگ تازه گیاه ذرت در یک هاون چینی حاوی 10 میلی‌لیتر استون80 درصد ساییده شد تا به‌صورت یکنواخت درآید. سپس مخلوط حاصل به مدت 10 دقیقه با سرعت 3500 دور در دقیقه سانتریفوژ شد. میزان جذب نور محلول حاصل با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Spectrometer PGT80UV/VIS) در طول‌موج‌های 663، 652، 480، 510 و 645 نانومتر خوانده شد و درنهایت غلظت کلروفیل و کارتنوئید با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید (آرنون،1994).

کلروفیل a ($mg.g^{-1}fw$)= [[(12.7× OD 663)-(2.69×OD 645)]×V]÷[1000×V]

کلروفیل b ($mg.g^{-1}fw$)= [[(22.9× OD 645)-(4.68×OD663)×V]÷[1000×V]

کلروفیل کل ($mg.g^{-1}fw$)= [[(8.02× OD 663)+(20.2×OD 646)]×V]÷[1000×V]

کارتنوئید ($mg.g^{-1}fw$)= [[(7.6× OD 480-1.49× OD 510]×V]÷[1000×V]

W، وزن‌تر نمونه؛ V، حجم نهایی عصاره (10 میلی‌لیتر)؛ OD، میزان جذب

این پژوهش به شکل آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. تجزیه واریانس تمامی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد انجام شد.

نتایج و بحث

شاخص های رویشی

قطر ساقه

طبق نتایج ثبت‌شده در جدول‌های 1 و 3، تمامی گونه‌های قارچ میکوریز توأم با تیمار میکروبی و ترکیبات شیمیایی تأثیر معنی‌داری بر قطر گیاه داشتند اما اختلاف اثر در بین گونه‌های قارچی معنی‌دار نبود. دراین‌بین، تیمار اسید هیومیک توأم با *RI* ، بیشترین و تیمار آزولا توأم با *RI* کمترین تأثیر را نسبت به سایر تیمارها با اختلاف معنی‌داری بر قطر ساقه در مقایسه با شاهد نشان دادند. از بین گونه‌های قارچی، *RI* و از بین تمامی تیمارها، باکتری با اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد بیشترین تأثیر را بر قطر ساقه داشتند.

ارتفاع ساقه

بر اساس نتایج حاصل، گونه‌های مختلف قارچ میکوریزی به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش رشد طولی ساقه ذرت شدند و در بین آن‌ها، *RI* با اختلاف معنی-داری نسبت به شاهد بیشترین تأثیر را نشان داد و *FM* و *RIr* به ترتیب در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند (جدول 1). نتایج حاصل از مقایسه رشد ارتفاع ساقه نیز نشان داد اثر متقابل قارچ میکوریز و سایرتیمارها به‌صورت معنی‌داری باعث افزایش طول ساقه در سطح احتمال یک درصد گردید. کاربرد توأم اسید هیومیک با *RI* و کمپلکس آمینو اسید و *RIr* به ترتیب بیشترین و کمترین میزان افزایش ارتفاع ساقه در مقایسه با شاهد را سبب شدند. در تیمارهای فاقد قارچ میکوریز، تیمار باکتری با اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد بیشترین تاثیر را نشان داد.

شاخص سطح برگ (LAI)

طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول 1)، گونه‌های قارچ میکوریز ازلحاظ آماری تأثیر معنی‌داری بر افزایش سطح برگ نشان دادند. در بین گونه‌های مورد بررسی، *RIr* و *RI* نسبت به شاهد، بیشترین تأثیر را بر این شاخص داشتند. همچنین نتایج نشان داد اثرات متقابل قارچ میکوریز و تیمار از لحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. تیمار سیدروفور توأم با *RIr* و تیمار جلبک توأم با *FM* در مقایسه با شاهد به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر بر افزایش سطح برگ را سبب شدند. در شرایط عدم حضور قارچ میکوریز، تیمار باکتری در مقایسه با شاهد و سایر تیمارها، بیشترین تأثیر را برافزایش سطح برگ داشت. در افزایش سطح برگ سیدروفور، اسید هیومیک، چای کمپوست و باکتری اختلاف معنی‌داری درسطح یک درصد با همدیگر نداشته ولی با شاهد اختلافشان معنی‌دار بود..

وزن‌تر و خشک‌ریشه

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول 1)، گونه‌های مختلف قارچی تأثیر معنی‌داری بر وزن‌تر و خشک‌ریشه داشتند. در ارتباط با وزن‌تر ریشه، تعامل هر سه گونه قارچ میکوریز آربوسکولار با چای کمپوست نسبت به سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد با شاهد داشتند و بیشترین درصد از بین هرسه گونه قارچی مربوط به *RI* بود این در حالی است که نتایج در مورد وزن خشک ریشه متفاوت بود و تیمار سویه باکتریایی در ترکیب با *FM* و همچنین چای کمپوست توأم با گونه قارچی *RIr* باعث افزایش وزن خشک ریشه نسبت به سطح شاهد شد. ازنظر آماری این دو تیمار نسبت به هم در یک سطح قرار گرفتند.

وزن‌تر و وزن خشک شاخساره

نتایج تجزیه واریانس مقایسه وزن‌تر و خشک شاخساره (جدول 1) نشان داد ، به استثنا گونه *RIr*که تیمار باکتری و کمپلکس آمینو اسید با شاهد باکتری با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان ندادند، اثرات متقابل قارچ میکوریز و سایر تیمارها ازلحاظ آماری در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بودند. همچنین، تلفیق گونه‌های قارچ میکوریز با چای کمپوست و اسید هیومیک بیشترین تأثیر را نسبت به بقیه تیمارها بر وزن‌تر اندام هوایی نشان دادند. بدین‌صورت که بیشترین افزایش در وزن‌تر شاخساره در مایه‌زنی ترکیبات چای کمپوست با گونه‌های *RIr* و *FM* مشاهده گردید. از طرف دیگر، تیمارهای جلبک، اسید هیومیک و باکتری به‌تنهایی در مقایسه با شاهد به ترتیب وزن‌تر شاخساره را افزایش دادند. بیشترین مقدار وزن خشک اندام هوایی در گونه *FM* همراه با تیمار باکتری و بعدازآن در گونه *RI* توأم با تیمار اسید هیومیک و سیدروفور نسبت به شاهد مشاهده شد. کمترین مقدار وزن خشک شاخساره مربوط به تیمار اسید هیومیک توأم با گونه *RIr* بود.

جدول 1- نتایج تجزیه واریانس مربوط به پارامترهای رویشی گیاه ذرت تحت تأثیر تیمارهای مختلف

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات						
		قطر ساقه	ارتفاع	سطح برگ	وزن‌تر ریشه	وزن خشک‌ریشه	وزن‌تر ساقه	وزن خشک ساقه
قارچ میکوریز	3	62/60**	1095**	1126/92**	36/34**	3/13**	623/91**	10/67**
سایرتیمارها	7	3/98**	123/18**	213**	46/2**	0/28**	32/91**	0/57**
قارچ میکوریز×سایر تیمارها	21	3/32**	38/82**	170/38**	29/78**	0/37**	36/49**	0/99**
خطا		0/7	11/23	4/54	0/64	0/008	1/07	0/03
ضریب تغییرات		13/35	14/05	12/47	14/1	12/04	10/73	14/68

**تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد ($p \leq 0/01$)

مواد آلی خاک منبع چند عنصر ضروری به‌ویژه نیتروژن می‌باشند، بنابراین با افزایش ماده آلی خاک، نیتروژن بیشتری در دسترس گیاه قرار می‌گیرد که باعث افزایش رشد رویشی و ارتفاع گیاه می‌شود. قارچ‌های میکوریز با افزایش جذب عناصر غذایی موردنیاز گیاه باعث افزایش مواد کربنی و فسفری شده و در نتیجه موجب افزایش تقسیم سلولی، افزایش فتوسنتز،و افزایش تولید ماده خشک می‌شود و در نهایت سطح برگ و حجم ریشه گیاه را افزایش می‌دهد (دیمر، 2004). یکی از ترکیباتی که در اصلاح ساختار خاک نقش مهمی دارد، اسید هیومیک بوده که از تجزیه مواد آلی در خاک حاصل می‌شود. به‌طورکلی هیومیک‌ها پیش از آن‌که کود باشند، اصلاح‌کننده‌های خاک هستند. پلیمرهای اسید هیومیک شبیه یک چسب آلی عمل می‌کنند و ذرات معدنی خاک را به هم چسبانده و ضمن ایجاد گرانول‌های درشت‌تر، فضای مناسب برای فعالیت موجودات میکروسکوپی و مایکروسکوپی، نفوذ بیشتر هوا، آب و ریشه فراهم می‌کنند (ماکویاک و همکاران، 2001). در نتیجه، اسید هیومیک با افزایش ظرفیت نگهداری عناصر غذایی و افزایش تولید تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی نظیر اکسین، ژیبرلین و سیتوکینین و افزایش فعالیت ریزجانداران منجر به افزایش جذب نیتروژن توسط گیاه می‌شود و با افزایش جذب نیتروژن، رشد و ارتفاع و به‌تبع آن عملکرد گیاه افزایش می‌یابد (آرانکون و همکاران، 2005). از طرفی افزایش سیتوکینین باعث افزایش سطح تقسیم سلولی و بزرگ شدن سلول‌ها و نهایتاً باعث افزایش قطر ساقه گیاه می‌گردد (دسانفیلیپو و همکاران، 1990). همچنین با افزایش متابولیسم درون سلول‌ها، مقدار کلروفیل در

برگ‌ها افزایش‌یافته و سبب ماندگاری بیشتر برگ‌ها و در نتیجه افزایش نسبت سطح برگ می‌شود. در پژوهش حاضر، اسید هیومیک با افزایش حجم و تعداد انشعابات فرعی در سیستم ریشه‌ای، به‌صورت مستقیم شرایط را برای برقراری همزیستی میکوریزایی فراهم نموده و باعث افزایش قطر ساقه در مقایسه با شاهد گردید. در بررسی‌های انجام‌شده روی گیاه گوجه‌فرنگی (ترکمن و همکاران، 2004) و منداب (آلبایراک و کاماس، 2005) نیز کاربرد اسید هیومیک منجر به افزایش قطر ساقه گردیده که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

چای کمپوست به دلیل داشتن عواملی نظیر ریزجانداران، به‌طور مستقیم با تولید سورفاکتانت، افزایش نفوذپذیری کوتیکول، تولید و رهاسازی تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و افزایش فراهمی آب و عناصر غذایی باعث افزایش رشد گیاه شده و به‌طور غیرمستقیم با پاتوژن‌ها ازلحاظ مصرف عناصر غذایی و اشغال فضا رقابت می‌کند و درنهایت باعث بهبود رشد و ارتفاع گیاه می‌شود (فریتز و همکاران، 2012). ازآنجاکه تریپتوفان موجود در کمپلکس آمینو اسید پیش ماده سنتز اکسین است و وجود عنصر روی در ساختمان این آمینو اسید ضروری است و با توجه به این‌که چای‌کمپوست غنی از عناصر میکرو ازجمله روی می‌باشد، این ترکیب با تأثیر بر سنتز هورمون‌ها به‌ویژه اکسین، باعث افزایش ارتفاع گیاه می‌شود (بیک خورمیزی و همکاران، 1390). در این پژوهش، کاربرد چای کمپوست باعث افزایش حجم ریشه و درنتیجه افزایش ارتباط ریشه گیاه با قارچ‌های میکوریز شد که با تأثیر روی کلنیزاسیون ریشه باعث جذب بیشتر مواد مغذی توسط گیاه گردید.

افزایش ماده خشک پس از مایه‌زنی گیاهان با باکتری‌های PGPR[1]، به جذب عناصر ضروری نظیر نیتروژن و فسفر مرتبط است که منجر به افزایش توسعه ریشه و درنتیجه رشد بهتر گیاه می‌شود. از طرف دیگر، این باکتری‌ها با تولید هورمون‌های گیاهی مانند اکسین و ژیبرلین‌ها سبب افزایش رشد طولی سلول‌ها و تقسیمات سلولی شده و بدین ترتیب افزایش شاخص سطح برگ و بهبود رشد گیاه را موجب می‌شوند (گونادی و همکاران ، 2000). در حقیقت اکسین باکتریایی با تحریک ریشه‌زایی موجب افزایش وزن خشک ریشه می‌شود (ساسی و سندز، 1997). در یک بررسی که اخیراً انجام‌شده است استفاده از باکتری محرک رشد از جنس آزوسپیریلیوم موجب افزایش وزن خشک ریشه گندم شده است(دوبلار و همکاران، 2003). همچنین، مایه‌زنی پنج سویه *سودوموناس فلورسنس* به فلفل سیاه که توانایی تولید هورمون‌های محرک رشد از قبیل IAA (Indole-3-Acetic Acid) و GA (Gibberellic Acid) دارند، به‌طور معنی‌داری رشد ریشه را افزایش داده است (پاول و ساراما،2006). وزن خشک ریشه و اندام هوایی در پژوهش حاضر با حضور باکتری افزایش یافت که با بررسی‌های ذکرشده مطابقت دارد. اسپرنت و اسپرنت (1990) گزارش کردند که باکتری‌های تثبیت‌کننده نیتروژن شامل آزوسپریلیوم و ازتوباکتر از طریق همیاری با ریشه گیاهان، موجب افزایش سطح جذب‌شده و این شبکه ریشه‌ای از طریق جذب آب و املاح و انتقال آن‌ها به گیاهان میزبان، موجب افزایش سطح برگ شدند. افزایش جذب یون‌ها در اثر مایه‌زنی گیاه با باکتری‌های PGPR می‌تواند نقش مهمی در افزایش رشد برگ‌ها داشته باشد.

[1]. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR)

جدول 2- تأثیرمتقابل تیمارهای مختلف و گونه‌های قارچ برشاخص های رشدی گیاه ذرت

	تیمارها گونه‌های قارچ	ارتفاع اندام هوایی (cm)	قطرساقه (mm)	وزن تر اندام هوایی (g)	وزن خشک اندام هوایی (g)	وزن تر ریشه (g)	وزن خشک ریشه (g)
R.intraradices	آزولا	33.66 (cg)	5.9 (fi)	11.87 (de)	1.64 (ghi)	5.46 (f-i)	0.8 (gh)
	باکتری	32.91 (bf)	6.61 (c-h)	12.48 (d)	1.41 (i)	6.47 (ef)	0.95 (efg)
	کمپلکس اسید آمینه	29 (bf)	7.40 (a-f)	11.69 (de)	2.08 (de)	6.66 (ef)	0.8 (gh)
	هیومیک اسید	38 (bf)	8.89 (a)	17.74 (ab)	2.54 (ab)	8.88 (bc)	1.48 (b)
	مخمر	31.42 (cg)	6.46 (e-h)	11.98 (de)	1.54 (hi)	6.07 (e-h)	0.99 (ef)
	سیدروفور	29.11 (ghi)	8.30 (abc)	13.56 (d)	2.45 (abc)	9.88 (bc)	1.40 (b)
	چای کمپوست	27.14 (ad)	6.43 (e-h)	16 (bc)	1.96 (efg)	18.3 (a)	0.95 (efg)
	عدم تیمار	24.33 (il)	5.82 (f-i)	7.79 (ghi)	0.8 (jkl)	5.3 (fj)	0.57 (jk)
F.mossae	آزولا	26.66 (ab)	7.40 (a-f)	15.5 (c)	1.86 (c)	6.45 (ef)	0.95 (efg)
	باکتری	28.83 (abc)	5.42 (gh)	16.06 (bc)	2.68 (bc)	8.56 (cd)	1.8 (a)
	کمپلکس اسید آمینه	30.5 (bf)	7.3 (a-f)	16.78 (abc)	2.00 (abc)	6.53 (ef)	0.58 (ijk)
	هیومیک اسید	29.67 (a)	7.59 (a-e)	16.86 (abc)	1.85 (abc)	8.4 (cg)	1.22 (cd)
	مخمر	26.44 (be)	6.3 (e-h)	9.61 (fg)	1.03 (fg)	4.21 (i-k)	0.84 (efg)
	سیدروفور	20.83 (bf)	6.5 (d-h)	9.14 (fg)	0.97 (fg)	5.3 (fg)	0.60 (ijk)
	چای کمپوست	31.94 (bg)	7.6 (a-e)	17.82 (a)	2.15 (a)	8.5 (cd)	1.35 (bc)
	عدم تیمار	17 (fh)	5.42 (gh)	7.31 (hi)	0.76 (Hi)	3.9 (ik)	0.53 (jk)
R. irregularis	آزولا	24.41 (fgh)	8.69 (ab)	10.44 (efg)	1.17 (efg)	7.17 (de)	1.11 (de)
	باکتری	25.38 (dg)	7.14 (b-f)	6.4 (ij)	0.84 (ij)	5.18 (fj)	0.59 (ijk)
	کمپلکس اسید آمینه	19.16 (hj)	7.29 (a-f)	6.31 (ij)	0.81 (ij)	4.53 (hk)	0.52 (k)
	هیومیک اسید	24.11 (fgh)	6.33 (eh)	8.13 (hi)	0.7 (hi)	3.72 (jkl)	0.7 (hij)
	مخمر	25.05 (eh)	6.59 (cg)	8.24 (hi)	0.98 (hi)	4.79 (jk)	0.60 (hi)
	سیدروفور	24.22 (fgh)	8.2 (a-d)	13.55 (d)	1.65 (d)	6.29 (efg)	0.82 (gh)
	چای کمپوست	28.97 (bf)	8.1 (a-d)	18.58 (a)	2.32 (a)	10.09 (b)	1.74 (a)
	عدم تیمار	16.66 (im)	4.6 (jk)	6.23 (ij)	0.58 (ij)	3.42 (kl)	0.45 (ij)
Control	آزولا	17.66 (ijk)	4.19 (jk)	3.43 (km)	0.39 (km)	2.38 (lm)	0.27 (m)
	باکتری	23.88 (fgh)	4.29 (hk)	4.69 (jk)	0.51 (jk)	2.49 (mn)	0.29 (m)
	کمپلکس اسید آمینه	13.61 (jm)	3.38 (kl)	1.63 (mn)	0.27 (mn)	1.87 (mn)	0.2 (m)
	هیومیک اسید	17.08 (il)	4.6 (ik)	3.69 (kl)	0.4 (kl)	1.7 (mn)	0.19 (m)
	مخمر	11 (lm)	3.5 (kl)	1.47 (mn)	0.18 (mn)	1.86 (mnl)	0.19 (m)
	سیدروفور	13 (jm)	3.9 (jkl)	2.29 (lmn)	0.45 (lmn)	2.38	0.33 (lm)

چای کمپوست	11.27 (klm)	3.8 (jkl)	1.62 (mn)	0.24 (mn)	4.09 (ijk)	0.18 (m)
عدم تیمار	10.44 (m)	2.4 (l)	0.89 (n)	0.16 (n)	0.75 (n)	0.17 (m)

اعداد جدول میانگین سه تکرار هستند.

تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

شاخص های فیزیولوژیکی

عدد اسپد (شاخص فلورسانس کلروفیل)

نتایج تجزیه واریانس نشان داد تأثیر تیمارهای موردبررسی بر عدد اسپد در یک سطح بوده و طبق مقایسه میانگین بین تیمارهای توأم با قارچ میکوریز و عدم وجود قارچ میکوریز اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید. بااین‌حال، اسید هیومیک در مقایسه با تیمارهای دیگر، عدد اسپد را با اختلاف اندکی به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرارداد (جدول 2). ازنظر آماری، بیشترین میزان عدد اسپد مربوط به کمپلکس *FM* و اسید هیومیک با 0/97 برابر افزایش و کمترین میزان آن در تیمار چای کمپوست معادل با 0/11 تعیین گردید.

محتوای کلروفیل a

طبق نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول 3) مشخص شد که کاربرد گونه‌های مختلف قارچ میکوریز تأثیر معنی‌داری بر افزایش میزان محتوای کلروفیل a گیاه ذرت در مقایسه با شاهد دارد. در بین گونه‌های مورداستفاده، *FM* با 3/89 برابر افزایش بیشترین تأثیر را داشت. مقایسه میانگین محتوای کلروفیل a در تیمارهای مختلف نشان داد که در شرایط عدم کاربرد قارچ میکوریز، تیمارهای سیدروفور با 5/39، چای کمپوست با 4/83 و جلبک با 4/85 برابر افزایش اختلاف معنی‌داری با شاهد و سایر تیمارها داشتند و منجر به افزایش محتوای کلروفیل a در گیاه ذرت شدند.

محتوای کلروفیل b

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول 2) نشان داد کاربرد گونه‌های مختلف قارچ میکوریز تأثیر معنی‌داری بر افزایش میزان کلروفیل b گیاهان ذرت همزیست با قارچ میکوریز در مقایسه با شاهد (بدون قارچ میکوریز) دارد و گونه *RI* با 1/93 برابر افزایش بیشترین تأثیر را داشت. از بین تیمارهای به‌کاربرده شده، بهترین نتیجه مربوط به تیمار کمپلکس آمینو اسید و *RI*بود که در مقایسه با شاهد به میزان 14/72 برابر محتوای کلروفیل b را افزایش داد. کاربرد همه تیمارها بدون قارچ میکوریز به‌جز تیمار باکتری، به‌صورت معنی‌داری باعث افزایش محتوای کلروفیل b شدند و در بین آن‌ها، تیمار جلبک با 3/54 برابر افزایش در مقایسه با شاهد، بیشترین تأثیر را داشت.

محتوای کلروفیل کل

نتایج حاصل از تجزیه واریانس مربوط به محتوای کلروفیل کل نشان داد کاربرد گونه‌های مختلف قارچ میکوریز تأثیر معنی‌داری بر افزایش میزان این شاخص در مقایسه با شاهد دارند و در بین گونه‌های مورداستفاده، گونه *FM* با 4/16 برابر افزایش بیشترین تأثیر را داشت (جدول 3). از بین تیمارهای توأم با گونه‌های قارچی، بیشترین محتوای کلروفیل کل درنتیجه کاربرد کمپلکس آمینو اسید و *RI* با 14/26 و تیمار مخمر با *FM* با 14/16 برابر افزایش در مقایسه با شاهد به‌دست آمد. تیمار سیدروفور با *FM* و تیمار کمپلکس آمینو اسید و *RI* با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند اما در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری این شاخص را افزایش دادند.

کارتنوئید

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس مشخص شد گونه‌های قارچ میکوریز مورداستفاده به‌تنهایی و توأم با تیمارهای دیگر تأثیر معنی‌داری بر کارتنوئید داشتند (جدول 3). در ارتباط با تیمار باکتری نتایج متفاوت بود و در همه موارد اثر معنی‌داری بر افزایش میزان کارتنوئید گیاه ذرت داشت. بیشترین میزان

افزایش در این شاخص با کاربرد مخمر همراه با گونه قارچ *FM* حاصل شد (24/93 برابر افزایش در مقایسه با شاهد) و تلفیق *FM* با سیدروفور و *RIr* با آمینو اسیدها در جایگاه‌های بعدی قرار داشتند. میانگین کارتنوئید ذرت در تیمارهای مختلف نشان داد که در شرایط عدم حضور قارچ میکوریز، تیمار جلبک و سپس سیدروفور با اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد و سایر تیمارها باعث افزایش کارتنوئید گیاه ذرت شدند.

جدول 3- نتایج تجزیه واریانس مربوط به پارامترهای فیزیولوژیکی گیاه ذرت تحت تأثیر تیمارهای مختلف

		میانگین مربعات				
منابع تغییرات	درجه آزادی	عدد اسپد	کلروفیل a mg/kg	کلروفیل b mg/kg	کلروفیل کل mg/kg	کارتنوئید mg/kg
قارچ میکوریز	3	192/01**	0/17**	0/81**	119/36**	0/164**
سایر تیمارها	7	4/39ns	0/35**	1/036**	182/53**	0/291**
قارچ میکوریز×سایر تیمارها	21	17/53**	0/31**	0/88**	147/5**	0/352**
خطا		6/4	0/001	0/007	1/22	0/003
ضریب تغییرات		10/96	6/73	8/85	8/66	8/8

**تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد، ns تفاوت غیر معنی‌دار

گیاهان همزیست با قارچ میکوریز در اغلب موارد نسبت به گیاهانی که میزبان قارچ میکوریز نیستند میزان فتوسنتز بالاتری دارند. قارچ‌های میکوریز با روش‌های مختلفی ازجمله بهبود روابط آبی، افزایش هدایت روزنه‌ای گیاه میزبان (ایج، 2001) و بهبود شرایط تغذیه‌ای گیاه میزبان به‌واسطه افزایش جذب عناصر کم‌مصرف مانند آهن، روی، منگنز، پتاسیم و فسفر فتوسنتز گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند. به‌طور مثال، عنصر آهن در سنتز پروتئین‌های کلروفیل، منگنز در پایداری کلروپلاست در برابر رادیکال‌های آزاد و عناصر مس و روی در ساختن کلروپلاست از طریق سنتز پروتئین می‌توانند تأثیرگذار باشند (سابرامانیان، 1999). مکانیسم دیگری که میزان فتوسنتز در گیاهان همزیست قارچ میکوریز را تحریک می‌کند، نقش قارچ میکوریز به‌عنوان یک مصرف‌کننده مواد فتوسنتزی است. درنتیجه استفاده از کربن آلی توسط قارچ، افزایش حرکت کربن آلی از برگ به ریشه و کاهش میزان کربن در مزوفیل برگ منجر به تحریک فتوسنتز می‌گردد. نتایج به‌دست‌آمده در آزمایش حاضر نشان داد میزان کلروفیل و به‌طورکلی میزان فتوسنتز ذرت مایه‌زنی شده با قارچ میکوریز نسبت به ذرت فاقد قارچ میکوریز بیشتر است. در همین راستا نتایج مشابهی توسط ایج (2001) و رویز – لوزانو (2003) نیز گزارش‌شده است.

در ارتباط با فلورسانس کلروفیل بررسی‌ها نشان می‌دهد که اندازه‌گیری فلورسانس کلروفیل، یک پارامتر قوی در فرآیند فتوسنتزی است. اسید هیومیک با قرار دادن آب و مواد غذایی بیشتر و مناسب‌تر در اختیار گیاه، میزان ساخت رنگیزه‌ها را افزایش داده و انتقال مواد فتوسنتزی را در گیاه راحت‌تر می‌نماید (رهی و همکاران، 1391). پیش‌تر، افزایش مقدار کلروفیل در برگ‌های لوبیا تیمار شده با اسید هیومیک گزارش‌شده است (آستارایی و لوانی، 2008). کاروتنوئیدها باعث حفاظت از کلروفیل در برابر اکسیداسیون نوری و جذب و انتقال انرژی فوتون‌هایی با طول‌موج کوتاه به کلروفیل a می‌شوند. مکانیسم حفاظت نوری می‌تواند به‌عنوان یک سوپاپ اطمینان در نظر گرفته شود که قبل از بروز خسارت ناشی از جذب زیاد انرژی انرژی اضافه را خارج می‌کند (تایزو زیگر، 2002). نقش کلروفیل‌ها درواقع جذب و برقراری تعادل انرژی و همچنین جذب مولکولی در گیاه است.ال -گلیسین و ال -گلوتامیک اسید، دو عامل مهم در شکل‌گیری پروسه متابولیسم بنیادی گیاهان و بافت گیاهی بوده و به‌طور مستقیم بر سنتز کلروفیل‌ها نقش دارند. این

آمینواسیدها به توسعه سیستم کلروفیلی کمک شایانی می‌کنند و از تجمع کلروفیل‌ها در یک قسمت جلوگیری کرده وکلروفیل‌ها را به‌طور منظم و سازمان‌یافته هدایت می‌کنند. از سوی دیگر، آمینو اسیدها از عوامل مهم در سنتز کلروفیل به‌عنوان مولکول اصلی جاذب نور در گیاهان می‌باشند. گلیسین وگلوتامیک دو آمینو اسیدها بنیادی در فرآیند تشکیل کلروفیل و افزایش مقدار بافت سبز در گیاهان هستند.این اسیدآمینه‌ها باعث افزایش سنتز کلروفیل و بالا رفتن غلظت آن در گیاه شده که افزایش جذب نور و به دنبال آن افزایش فتوسنتز را در پی دارد. در شرایط پایین بودن نور و رطوبت محیط و افزایش غلظت نمک‌ها و دما روزنه‌های گیاه به‌صورت خودکار بسته می‌شوند که پیامد آن کاهش شدید فتوسنتز و تعرق گیاه است. از سوی دیگر بسته بودن روزنه‌ها افزایش تنفس در گیاه و تخریب و مصرف غیرعادی کربوهیدرات‌ها را به دنبال دارد؛ در چنین شرایطی گلوتامیک اسید با اثر بر روی سلول‌های نگهبان روزنه به باز نگه‌داشتن روزنه‌ها کمک می‌کند. مخمرها به دلیل دارا بودن قندها، آمینو اسیدها و اسیدهای نوکلئیک، ویتامین‌ها، مواد معدنی، ترکیبات مولد تنظیم‌کننده‌های رشد مانند اکسین، ژیبرلین و سیتوکنین، نقش تغذیه‌ای و حفاظتی مفیدی دارند و به‌عنوان محرک رشد برای گیاهان تلقی می‌شوند. علاوه بر این مخمر با انتشار گاز CO_2 به بهبود چرخه‌ی فتوسنتز کمک می‌کنند (فاوزی همکاران، 2012).

جدول 4- تأثیر تیمارهای مختلف برشاخص های فتوسنتزی گیاه ذرت

		کارتنوئید (mg/g)	کلروفیل a+b (mg/g)	کلروفیل b (mg/g)	کلروفیل a (mg/g)	عدد اسپد ()	سطح برگ (cm^2)
R.intradices	آزولا	0.68 (jk)	11.93 (fg)	0.88 (hi)	0.51 (hij)	21.86 (ch)	15.8 (klm)
	باکتری	0.69 (jk)	8.59 (jm)	0.83 (hk)	0.58 (gh)	22.73 (bh)	21.41 (ei)
	کمپلکس اسید آمینه	0.98 (de)	28.39 (a)	2.41 (a)	1.27 (a)	25.5 (af)	21.6 (bcd)
	هیومیک اسید	0.79 (hi)	10.65 (ghi)	0.72 (jl)	0.51 (hi)	23.33 (bg)	2589 (eh)
	مخمر	0.29 (qrs)	9.15 (im)	0.72 (il)	0.41 (klm)	23.2 (bg)	18.69 (jk)
	سیدروفور	0.54 (mn)	11.41 (gh)	0.87 (hi)	1.19 (b)	24.6 (af)	26.59 (bc)
	چای کمپوست	0.91 (dfg)	14.22 (e)	1.16 (ef)	0.64 (fg)	22.86 (bh)	27.2 (bc)
	عدم تیمار	0.20 (s)	5.96 (no)	0.44 (op)s	0.27 (op)	20.4 (bh)	14.24 (lmn)
F.mossae	آزولا	1.04 (cd)	20.63 (c)	1.64 (c)	0.94 (d)	24.53 (af)	9.09 (op)
	باکتری	0.48 (no)	9.74 (hi)	0.72 (il)	0.48 (ijk)	23.26 (bg)	17.53 (hl)
	کمپلکس اسید آمینه	0.80 (hi)	19.56 (cd)	1.28 (de)	0.93 (d)	25.16 (af)	22.4 (dg)
	هیومیک اسید	0.57 (lmn)	14.98 (e)	1.27 (de)	0.88 (d)	29.36 (a)	28.53 (b)
	مخمر	1.32 (a)	28.21 (a)	2.25 (b)	1.25 (ab)	27.56 (ab)	20.2 (fj)
	سیدروفور	1.16 (b)	25.51 (b)	1.73 (c)	0.43 (kl)	26.23 (ad)	27.44 (bc)
	چای کمپوست	0.95 (def)	13.63 (ef)	0.87 (hij)	0.66 (f)	24.83 (af)	17.84 (hl)
	عدم تیمار	0.39 (opq)	9.60 (hm)	0.55 (mno)	0.40 (lmn)	22.36 (bh)	7.19 (p)
galaris	آزولا	0.59 (klm)	14.38 (e)	1.20 (ef)	0.63 (gh)	23.23 (bg)	25.11 (cf)

CONTROL	باکتری	0.30 (qrs)	9.75 (hi)	0.74 (il)	0.44 (jkl)	25.7 (ae)	27.75 (bc)
	کمپلکس اسید آمینه	1.20 (bc)	24.18 (b)	1.79 (c)	1.10	26.33 (abc)	16.57 (jm)
	هیومیک اسید	0.65 (jkl)	14.98 (e)	1.27 (de)	0.67 (c)	26.96 (abc)	23.89 (il)
	مخمر	0.82 (ghi)	17.80 (d)	1.38 (d)	0.80 (fe)	23.93 (ae)	25.11 (be)
	سیدروفور	0.87 (fgh)	19.88 (c)	1.26 (de)	0.94 (d)	25.7 (ae)	33.6 (a)
	چای کمپوست	0.43 (op)	10.97 (ghi)	0.92 (gh)	0.34 (mno)	24.93 (af)	27.78 (bc)
	عدم تیمار	0.31 (qr)	7.46 (mn)	0.55 (mo)	0.34 (no)	22.73 (bh)	12.8 (mno)
	آزولا	0.74 (ij)	1.86 (p)	0.69 (km)	0.48 (ijk)	20.93 (ei)	1.74 (q)
	باکتری	0.08 (t)	2.67 (p)	0.21 (qr)	0.11 (q)	22.66 (fi)	16.6 (jm)
	کمپلکس اسید آمینه	0.25 (s)	5.42 (o)	0.42 (op)	0.25 (p)	18.56 (gj)	2.47 (q)
	هیومیک اسید	0.35 (pqr)	7.55 (mn)	0.52 (mno)	0.35 (mno)	20.96 (di)	6.21 (p)
	مخمر	0.25 (rs)	2.65 (p)	0.35 (pq)	0.21 (ab)	18 (hj)	0.27 (q)
	سیدروفور	0.67 (jk)	8.25 (km)	0.51 (no)	0.52 (b)	18.26 (gj)	11.82 (no)
	چای کمپوست	0.42 (op)	10.29 (ln)	0.63 (lmn)	0.48 (ijk)	16 (ij)	0.97 (q)
	عدم تیمار	0.05 (t)	1.86 (p)	0.15 (r)	0.08 (a)	14.86 (j)	0.09 (q)

اعداد جدول میانگین سه تکرار هستند.

تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند، در سطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

نتیجه‌گیری کلی

طبق نتایج به دست آمده قارچ های میکوریز آربوسکولار تحت تأثیر تیمار میکروبی و ترکیبات شیمیایی کلنیزاسیون بالایی در ریشه ذرت نشان دادند و اختلاف معنی‌داری بین گونه‌های قارچی از لحاظ درصد کلونیزاسیون ریشه مشاهده نشد و این قارچ ها با کلونیزاسیون بالای ریشه‌ها توانسته از طریق افزایش انشعابات مسلیومی خود سبب توسعه ریشه گیاه شود و از این طریق امکان استفاده ریشه گیاه از ریزوسفر را گسترده ترکند و در نتیجه رشد گیاه بهتر شود.

بررسی‌های پارامترهای رشدی نشان داد که تمامی گونه‌های قارچ میکوریز توأم با تیمار میکروبی و ترکیبات شیمیایی بر قطر ، رشد طولی ساقه، افزایش سطح برگ، وزن‌تر و خشک‌ریشه و وزن‌تر و خشک شاخساره تأثیر معنی‌داری داشتند و از بین تیمارها کاربرد اسید هیومیک و چای کمپوست باعث القای بیشترین افزایش رشد شدند و در بررسی‌های پارامترهای فیزیولوژیکی نتایج تجزیه واریانس نشان داد تأثیر تیمارهای موردبررسی بر عدد اسپد (شاخص فلورسانس کلروفیل) در یک سطح بوده و طبق مقایسه میانگین بین تیمارهای توأم با قارچ میکوریز و عدم وجود قارچ میکوریز اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ولی کاربرد گونه‌های مختلف قارچ میکوریز تأثیر معنی‌داری بر افزایش میزان محتوای کلروفیل a، کلروفیل b ، محتوای کلروفیل کل و کارتنوئید گیاه ذرت در مقایسه با شاهد (بدون قارچ میکوریز) داشتند.

تیمار کمپلکس آمینو اسید توأم با *RI* بیشترین تأثیر را برافزایش کلروفیل *a*،کلروفیل *b* و کلروفیل کل داشت. تیمار مخمر و کمپلکس آمینو اسید به ترتیب بیشترین تأثیر را برافزایش کاروتنوئیدها داشتند

فهرست منابع:

1. بیک خورمیزی، ع.، ابریشم‌چی، پ.، گنجعلی، ع. و پارسا، م. 1390. تأثیر عصاره ورمی‌کمپوست بر رشد اولیه نشا لوبیا قرمز در شرایط تنش شوری. نشریه پژوهش‌های حبوبات ایران، جلد 2 (شماره 2): 132- 121.
2. پیرسته انوشه، ه.، امام، ی. و جمالی رامین، ف. 1389. مقایسه اثر کودهای زیستی با کودهای شیمیایی بر رشد، عملکرد و درصد روغن آفتابگردان (Helianthus annuss L.) در سطوح مختلف تنش خشکی. نشریه بوم‌شناسی کشاورزی، جلد2 (شماره 3) : 501-492.
3. رهی، ع.، داوودی فرد، م.، عزیزی، ف. و حبیبی د. 1391. بررسی تأثیرات مقادیر مختلف هیومیک اسید و مطالعه روند منحنی‌های پاسخ در گونه *Dactylis glomerata* . نشریه زراعت و اصلاح نباتات ایران. دوره 8 (شماره 3) : 15 تا 28
4. متقیان، ا.، پیردشتی، ه. ا.، بهمنیار، م. ع. و عباسیان، ا. 1386 .مطالعه تأثیرکمپوست، ورمی کمپوست، لجن فاضلاب و کود شیمیایی بر خصوصیات مورفولوژیکی، عملکرد پروتئین و دانه ارقام مختلف سویا. مجموعه مقالات دومین همایش ملی کشاورزی بوم‌شناختی ایران،25تا26 مهرماه، دانشگاه گرگان،191-174.
5. Albayrak, S. and Camas, N. 2005. Effect of different levels and application times of humic acid on root and leaf yield and yield component of forage turnip (*Brassica rapa* L.). *Journal of Agronomy* 42: 130-133.
6. Arancon, N. Q., Clive, A.E., Bierman, P., Metzger, J. D. and Lucht, CH. 2005. Effects of vermicomposts produced from cattle manure, food waste and paper waste on the growth and yield of peppers in the field. Pedobiologia 49(4):297-306.
7. Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase Beta vulgaris. Journal of Plant Physiology 24: 1-15.
8. Astaraei, A. R. and Ivani, R. 2008. Effect of organic sources as foliar spray and root media on nutrition of cowpea plant. American-Eurasian. Journal of Agricultural and Environmental Science 3: 352-356.
9. Auge, R. M. 2001. Water relations, drought and vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. Mycorrhiza 11:3-42.
10. Bess, V.H. 2000. Understanding compost tea. Biocycle 41(10): 71-72.
11. Calvet, C., Estaún, V., Camprubı, A., Hernández-Dorrego, A., Pinochet, J. and Moreno, M. A. 2004. Aptitude for mycorrhizal root colonization in Prunus rootstocks. Scientia Horticulturae 100:39-49.
12. Craigie, J. 2010. Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. Journal of Applied Phycology 23: 371-393.
13. De Sanfilippo, E. C., Argüello, J., Abdala, G., and Orioli, G. 1990. Content of auxin-inhibitor-and gibberellin-like substances in humic acids. Biologia Plantarum. 32: 346-351.
14. Dhanapal, S. and Sekar, D. S. 2013. Humic acids and its role in plant tissue culture at low nutrient level. Journal of Academia and Industrial Research. 2 (6):338-340.
15. Dimer, S. 2004. Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameter of pepper. Department of Plant Protection, Van-Turkey.
16. Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., and Okon, Y. 2003 Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. Critcal Reviewes Plant Science 22: 107–149
17. Fawzy, Z. Li, Y., Ouyang, Z. and Hoda, A. 2012. Influnce of Foliar Application by EM effective microorganisms amino acids and Yeast on Growth, Yield and quality of two cultivars of onion Plants under newly reclamed soil. Journal of Agricultural Science 4:P26.
18. Fidelibus, M., Martin, C., Wright, G. and Stutz, J. 2000. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungal communities on growth of 'Volkamer'lemon in continually moist or periodically dry soil. Scientia Horticulturae 84: 127-140.

19. Fracchia, S., Menende, A., Godenas, A. and Ocampo, J. A. 2001. A method to obtain monosporic cultures of arbuscular mycorrhizal fungi. Soil Biology and Biochemistry, 33(9): 1283-1285.
20. Fritz, J. I., Franke-Whittle, I. H., Haindl, S., Insam, H. and Braun, R. 2012. Microbiological community analysis of vermicompost tea and its influence on the growth of vegetables and cereals. Canadian Journal of Microbiology. 58: 836-847 .
21. Ghorbanpour M, Hatami M, Kariman K and Abbaszadeh Dahaji P. 2016. Phytochemical Variations and Enhanced Efficiency of Antioxidant and Antimicrobial Ingredients in Salvia officinalis as Inoculated with Different Rhizobacteria. Chem. Biodiversity 13: 319 –30.
22. Goonadi, D. H., Slswanto, Y. and Sugiarto, Y. 2000. Growth promotion of plant by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. Soil Science Society of America J ournal 64:927-932.
23. Kloepper, J. W., Lifshitz, R. and Zablotowicz, R. M. 1989. Free-living bacterial inocula for enchancing crop productivity. Trends in Biotechnology7:39-43.
24. Kuwada, K., Wamocho, L. S., Utamura, M., Matsushita, I. and Ishii, T. 2006. Effect of red and green alga extracts on hyphal growth of papaya and passionfruit. Agronomy Journal 98:1340-1344.
25. Loveland, P. and Webb, J. 2003. Is there a critical level of organic matter in the agricultural soils of temperate regions: a review. Soil and Tillage Research 70: 1-18.
26. Matysiak, k., Dubas, M., Kierzek, R. and Kaczmarek, S. 2010. Influence of seaweed extract application with tebuconaz on two cultivars of winter rape. Institute of Plant Protection – National Research Institute 20: 60-310.
27. Mackowiak, C. L., Grossl, P. R. and Bugbee, B. G. 2001. Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability to wheat. Soil Science Society of America Journal 65:1744–1750.
28. Paul, D. & Sarma, Y. R. 2006. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)-mediated root proliferation in black pepper(Piper nigrum L) as evidenced through GS Root Software. Archives of phytopathology and plant Protection 39:1-4.
29. Pedra, F., Polo, A., Ribeiro, A. and Domingues, H. 2007. Effects of municipal solid waste compost and sewage sludge on mineralization of soil organic matter. Soil Biology and Biochemistry 39: 1375-1382.
30. Ruiz-Lozano, J. M. and Azcon, R. 1995. Hyphal contributin to water uptake in mycorrhizal plant as affected by the fungi speccies and water ststus. Plant Physiology: 95:427-478.
31. Saleh Rastin N. 2001. Biological fertilizers and its roll in pursuit of sustainable agriculture. Proceeding of the necessity of industrial production of biofertilizers in the country. Agricultural research, education and promotion publication. 1: 54.
32. Sasse, Jo and Sands , R. 1997. Configuration and development of root systems of cuttings and seedlings of Eucalyptus globulus. New Forests 14:85-105.
33. Scheuerell, S. J. and Mahaffee, W. F. 2004. Compost tea as a container medium drench for suppressing seedling damping-off caused by Pythium ultimum. Phytopathology 94: 1156-1163.
34. Subramanian, K.S. and Charest, C. 1999.Acqisition of external hypha of an arbuscular mycorrhizal fungi and its impact on physiological responses in maize under drought-stress and well-watered conditions, Mycorrhiza 9:69-75.
35. Sprent, J. and Sprent, P. 1990. Nitrogen Fixation Organisms. Chapman and Hall, New York 323P.
36. Talbot JM, Treseder KK (2010) Controls over mycorrhizal uptake of organic nitrogen. *Pedobiologia* 53: 169–179.

37. Taiz, L. and Zeiger, E. 2002. Plant physiology. sinauer associates, Inc. 690p.
38. Turkmen, O., Dursun, A. Turan, M. and Erdinc, C. 2004. Calcium and humic acid affect seed germination growth, and nutrient content of tomato (Lycopersicon esculentum L.) seedling under saline soil conditions. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B–Soil and Plant Science 54 (3): 168- 174.
39. Vivas, A., Marulanda, A., Manuel Ruiz-Lozano, J., Miguel Barea, J. and Azcón, R. 2003. Influence of a Bacillus sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress, Mycorrhiza 13:249–256.
40 Zahir, Z. A., Arshad, M. and Frankenberger. W. T. 2004. Plant growth promoting rhizobacteria: Application and perspectives in agriculture. Advances in Agronomy 81;97-

مقایسه روش‌های HRM و DGGE جهت بررسی ترکیب جوامع باکتریایی خاک در کاربری‌های اراضی مختلف

قباد جلالی[1]، امیر لکزیان، علیرضا آستارایی و محبوبه مظهری

استادیار گروه علوم خاک- دانشگاه جیرفت؛ gh.jalali@ujiroft.ac.ir

استاد گروه علوم خاک- دانشگاه فردوسی مشهد؛ lakzian@um.ac.ir

دانشیار گروه علوم خاک- دانشگاه فردوسی مشهد؛ astaraei@um.ac.ir

استادیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج؛ mahboobeh.mazhari@kiau.ac.ir

دریافت: 1400/1/24 و پذیرش: 1400/10/29

چکیده

تغییر کاربری اراضی یکی از مهمترین فاکتورهایی است که جوامع ریزجانداران خاک را تحت تأثیر قرار داده که نقش محوری در اکثر فرایندهای بیوژئوشیمیایی و اکولوژیکی ایفا می‌کنند. به‌منظور بررسی تأثیر تغییر کاربری اراضی (از مراتع بوته‌زار به کشاورزی) روی ترکیب جوامع باکتریایی خاک، مطالعه‌ای با استفاده از آنالیز تفکیک‌پذیری بالای ذوب (HRM) و روش ژل الکتروفورز با شیب واسرشت‌ساز (DGGE) در سه کاربری اراضی باغی، زراعی و مرتع بوته‌زار در دشت جیرفت انجام شد. برای آنالیز HRM از نرم‌افزار جانبی دستگاه Real-time PCR که مجهز به این تکنیک است، استفاده شد. DGGE با استفاده از سیستم جهانی تشخیص جهش انجام شد. نتایج تکنیک HRM و همپنین نتایج رج‌بندی با استفاده از روش مقیاس‌بندی چند بعدی غیرمتریک (NMDS) و بر پایه حضور یا عدم حضور باندهای DGGE در نمونه‌های خاک نشان دادند که تغییر کاربری اراضی از مراتع بوته‌زار به کشاورزی (باغ و زراعی) سبب تغییر معنی‌دار در ترکیب جوامع باکتریایی خاک شده است. همچنین با توجه به نتایج هر دو روش، ترکیب جوامع باکتریایی خاک در کاربری‌های اراضی کشاورزی (باغ و زراعی) نسبت به کاربری مرتع بوته‌زار دارای شباهت بیشتری بود. از آنجایی که آنالیز HRM در مقایسه با تکنیک DGGE کم هزینه‌تر، راحت‌تر و دارای انحراف کمتر می‌باشد، جهت مقایسه ترکیب جوامع باکتریایی خاک بین نمونه‌های مختلف پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: DNA ژنومی خاک، 16S rDNA باکتریایی خاک، Real-time PCR، مقیاس‌بندی چند بعدی غیرمتریک (NMDS)

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: جیرفت، دانشگاه جیرفت، گروه علوم خاک

مقدمه

اخیراً روش‌های متاژنومیک[1] مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[2] (PCR)، به‌طور فزاینده‌ای برای مطالعه جوامع ریزجانداران خاک استفاده شده‌اند (کنت و تریپلت، 2002). این روش‌ها بر پایه اسیدهای نوکلئیکی هستند که مستقیماً از اکوسیستم‌های پیچیده‌ای از قبیل خاک جدا می‌شوند. در این روش‌ها DNA کل ریزجانداران به‌طور مستقیم از نمونه‌های زیست محیطی استخراج شده و ارزیابی‌های ژنتیکی بر روی آن به انجام می‌رسد. اطلاعات حاصله از این روش‌ها تصویر بسیار دقیق‌تری از ترکیب و نقش ریزجانداران به ما نشان می‌دهد که امکان گرفتن چنین اطلاعاتی با روش‌های قدیمی کشت ریزجانداران دور از ذهن بود (طباطبایی و پورمظاهری، 1391).

یکی از روش‌های متاژنومیک مبتنی بر PCR که برای بررسی ساختار جوامع ریزجانداران از جمله باکتری‌های خاک به‌کار می‌رود، روش ژل الکتروفورز با شیب واسرشت‌ساز[3] (DGGE) است. مویزر و همکاران (1993) DGGE را برای تخمین تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ریزجانداران پیچیده تشریح کردند. به‌طور مثال در این روش قطعات ژن 16SrDNA (پروکاریوت‌ها[4]) یا قطعات ژن 18S rDNA (یوکاریوت‌ها[5]) در ژل‌های پلی‌آکریل‌آمید که دارای شیب افزایشی از غلظت ماده واسرشت‌کننده (اوره[6] و فرمامید[7]) است، مورد الکتروفورز قرار می‌گیرند. همچنین اگر ژن‌های خاص، از قبیل ژن‌های کد کننده فرایندهای متابولیکی متفاوت، در آنالیزهای DGGE استفاده شوند، می‌توان اطلاعاتی در مورد فراوانی انواع مختلف موجودات زنده که در یک جمعیت شامل این ژن‌ها هستند، به‌دست آورد (ناکاتسو، 2007). در این روش قطعه‌هایی از DNA با اندازه یکسان ولی توالی بازی متفاوت بر اساس تحرک الکتروفورتیک بخشی از مولکول ذوب شده DNA تفکیک می‌شوند. تفاوت‌ها در توالی بازها، تفاوت‌های موجود در ویژگی‌های ذوب را کنترل می‌کند. بنابراین، هریک از باندها در ژل DGGE شکل‌های متفاوتی از یک ژن مشخص را نشان می‌دهند، که این ممکن است ناشی از اختلاف خیلی جزئی درون توالی باشد (مویزر و همکاران، 1993).

نتایج پژوهش‌های زیادی نشان داده است که آنالیز مولکولی با استفاده از تجزیه و تحلیل DGGE از تکثیر قطعات 16S rDNA یک ابزار قدرتمند در مطالعه تنوع باکتریایی در محیط‌های پیچیده مانند خاک است (اسمیت و همکاران،2001؛ لانگ و همکاران، 2010). با وجود محدودیت‌های این روش، نتایج نشان می‌دهد که PCR-DGGE روش قابل اعتماد برای بررسی تفاوت‌ها و شباهت‌ها در ساختار جوامع ریزجانداران است. در نتیجه این روش به‌طور گسترده برای تجزیه و تحلیل ساختار و ترکیب جوامع ریزجانداران خاک استفاده شده است (دی لیپتای و همکاران، 2004).

یکی دیگر از روش‌های متاژنومیک، روش‌های مبتنی بر Real-time PCR می‌باشند. پژوهش‌گران بسیاری از تکنیک Real-time PCR برای کمی‌سنجی باکتری‌های خاک و ژن‌های مرتبط با کارکردهای آن‌ها استفاده نموده‌اند (کوب و همکاران، 2003؛ فوتی و همکاران، 2007؛ احمد سلیمان و همکاران، 2017). فیرر و همکاران (2005) که با استفاده از Real-time PCR فراوانی نسبی گروه‌های تاکسنومیک اصلی باکتری‌ها را در خاک بررسی کردند، بیان داشتند که این تکنیک درک جامع و ارزیابی دقیقی از ترکیب جوامع باکتریایی خاک فراهم می‌کند. یکی از روش‌های مبتنی بر Real-time PCR که می‌تواند برای بررسی ترکیب و ساختار ریزجانداران خاک استفاده شود، روش آنالیز تفکیک‌پذیری بالای ذوب[8] (HRM) می‌باشد. این روش به‌عنوان یکی از قویترین روش‌های

1. Metagenomics
2. Polymerase chain reaction (PCR)
3. Denaturing gradient gel electrophoresis
4. Procaryotes
5. Eucaryotes
6. Urea
7. Formamide
8. High Resolution Melting (HRM) analysis

توسعه یافته در تشخیص مولکولی در سال‌های اخیر مطرح شده است. HRM آنالیز تغییرات ژنتیکی (انواع موتاسیون‌ها مانند موتاسیون‌های تک نوکلئوتیدی و متیلاسیون‌ها) را مقدور می‌سازد و قابلیت آن در حدی است که تفریق تفاوت‌های ژنتیکی در حد یک تک نوکلئوتید را نیز دارا می‌باشد. این روش نمونه‌های اسید نوکلئیک را بر اساس توالی، طول و درصد گوانین به اضافه سیتوزین (G+C) متمایز می‌سازد. بنابراین با توجه به تفاوت در دمای ذوب مورد نیاز برای ذوب هر نوکلئوتید می‌توان با استفاده از تحلیل منحنی ذوب (در حد تفاوت سویه[1] هم منحنی تفاوت را نشان می‌دهد)، تفاوت‌های ژنتیکی نمونه‌ها را با بهره‌گیری از دستگاه‌های Real-time PCR که مجهز به تکنیک HRM می‌باشند، بررسی نمود. از مزیت‌های این روش می‌توان به سرعت بالا در آنالیز نمونه‌ها، دقت و حساسیت بالا در ردیابی تغییرات و تنوع ژنتیکی[2]، در دسترس بودن نمونه‌ها به‌خاطر سالم ماندن پس از پایان آنالیز، امکان استفاده دوباره یا استفاده از سایر فنون روی نمونه‌ها و ردیابی جهش‌ها[3] اشاره کرد. برهمین اساس پیش‌بینی می‌شود در آینده‌ای نه‌چندان دور، این فن به‌عنوان یک روش مرسوم و پرکاربرد در آزمایشگاه‌های علوم مولکولی و به‌ویژه ژنتیک مولکولی مورد استفاده قرار گیرد (نوری دلویی و فرجی، 1394).

از آنجایی که اطلاعات کمی در مورد ترکیب جوامع ریزجانداران خاک در مناطق خشک و نیمه‌خشک ایران وجود دارد و همچنین از طرفی پژوهش‌گران بسیاری گزارش کرده‌اند که فعالیت‌های انسانی نظیر تغییر کاربری اراضی و شیوه‌های مدیریتی می توانند اثرات قابل توجه و دراز مدت روی ویژگی‌های خاک نظیر عناصر غذایی، کربن آلی، بافت و pH (لاوبر و همکاران، 2013) و همچین روی ترکیب و تنوع جوامع ریزجانداران خاک داشته باشند (مارشنر و همکاران، 2001؛ والیس و همکاران،2010). همچنین شواهد تحقیقاتی نشان داده‌اند، فعالیت‌های کشاورزی مانند تاثیر کاربردهای طولانی مدت کودهای آلی و غیرآلی (هو و همکاران، 2017) و اثرات بلند مدت روش‌های مدیریتی (مانند شخم، تناوب زراعی و مدیریت بقایای گیاهی) (گوارتث و همکاران، 2007) ترکیب جوامع باکتریایی خاک را تحت تأثیر قرار می‌دهند. لذا با فرض اینکه کاربری اراضی روی ترکیب جوامع باکتریایی خاک تأثیرگذار می‌باشد، این پژوهش با هدف مقایسه تکنیک‌های HRM و PCR-DGGE جهت بررسی ترکیب جوامع باکتریایی خاک متأثر از تغییر کاربری اراضی (در 50 سال اخیر از مراتع بوته‌زار به کشاورزی) در منطقه خشک و نیمه خشک دشت جیرفت انجام شد.

مواد و روش‌ها

معرفی منطقه مورد مطالعه

منطقه مورد مطالعه در دشت جیرفت (650 متر ارتفاع از سطح دریا) در موقعیت جغرافیایی"40 '28 °28 تا "6 '52 °28 شمالی و "8 '30 °57 تا "27 '4 °58 شرقی واقع شده است. بر اساس نقشه 1:1000000 مؤسسه تحقیقات خاک و آب، رژیم‌های رطوبتی و حرارتی خاک این منطقه به‌ترتیب اریدیک[4] و هایپرترمیک[5] می‌باشند (بنایی، 1380). میانگین بارندگی سالیانه در این شهرستان 140 میلی‌متر، میانگین رطوبت نسبی آن حدود 55 درصد و بیشینه و کمینه دمای آن به ترتیب، 48 و یک درجه سلسیوس می‌باشند.

نمونه‌برداری خاک

در منطقه دشت جیرفت (بخش مرکزی، دهستان دولت آباد، روستای علی آباد سازمان)، یک سطح ژئومرفولوژیک غالب (دشت آبرفتی) که دارای کاربری‌های مراتع بوته‌زار (بوته‌زارهای مجاور اراضی کشاورزی که به‌دلیل محدودیت آب آبیاری تاکنون کشت نشده بودند)، زراعی (عمدتا تحت کشت سیب زمینی و پیاز) و باغی (مرکبات) بود، انتخاب شد (شکل 1). هر سه

1. Strain
2. Genetic variation
3. Mutation tracking
4. Aridic
5. Hyperthermic

کاربری مربوط به اراضی شرکت کشت و صنعت جیرفت بودند و طبق بررسی‌های صورت گرفته از عدم تغییر کاربری مورد نظر در 50 سال اخیر اطمینان حاصل شد.

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی طرح‌ریزی شد. تیمارهای این آزمایش شامل سه نوع کاربری اراضی (بوته‌زار، زراعی و باغی) و تکرارهای آن شامل سه نمونه مرکب خاک از هر کاربری اراضی، بودند. جهت نمونه‌برداری خاک، ابتدا با بازدیدهای صحرایی، مکان کاربری‌های اراضی مورد نظر انتخاب و شبکه‌بندی با فواصل 50 متر جهت تعیین موقعیت نقاط نمونه‌بردای در سیستم‌تصویر[1] UTM با استفاده از نرم‌افزار ArcGIS[2]ایجاد شد. نهایتا در دی‌ماه 1393 با استفاده از GPS و مختصات جغرافیایی نقاط نمونه‌داری، سه نمونه مرکب خاک (هر نمونه مرکب متشکل از چهار نمونه فرعی بودکه به فاصله 50 متر از هم قرار داشتند) از عمق صفر تا 10 سانتی‌متر از هر کاربری اراضی جمع‌آوری شد.

آنالیز آزمایشگاهی

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

برخی از ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک با روش‌های معمول آزمایشگاهی به شرح زیر اندازه‌گیری شدند. نیتروژن کل به روش کجلدال[3] (برمنر، 1960)، کربن آلی کل به روش والکلی و بلاک (والکلی و بلاک، 1934)، بافت خاک با روش هیدرومتری[4] (بویوس، 1962)، کربنات کلسیم معادل[5] به روش خنثی‌سازی با اسید کلریدریک و تیتر کردن با سود (لویپرت و سوارز، 1996)، pH و قابلیت هدایت الکتریکی[6] به‌ترتیب در گل اشباع (توماس، 1996) و عصاره اشباع خاک (روآدز، 1996)، فسفر قابل جذب گیاه در خاک به روش اولسن و سامر (اولسن و سامر، 1982)، پتاسیم قابل جذب گیاه در خاک به روش عصاره‌گیری با استات آمونیوم یک نرمال (هلمک و اسپارکس، 1996) و عناصر کم‌مصرف (روی، آهن، منگنز و مس) قابل جذب گیاه در خاک (استخراج با عصاره‌گیر DTPA[7]) اندازه‌گیری شدند (لیندسی و نورول، 1978).

استخراج DNA از نمونه‌های خاک

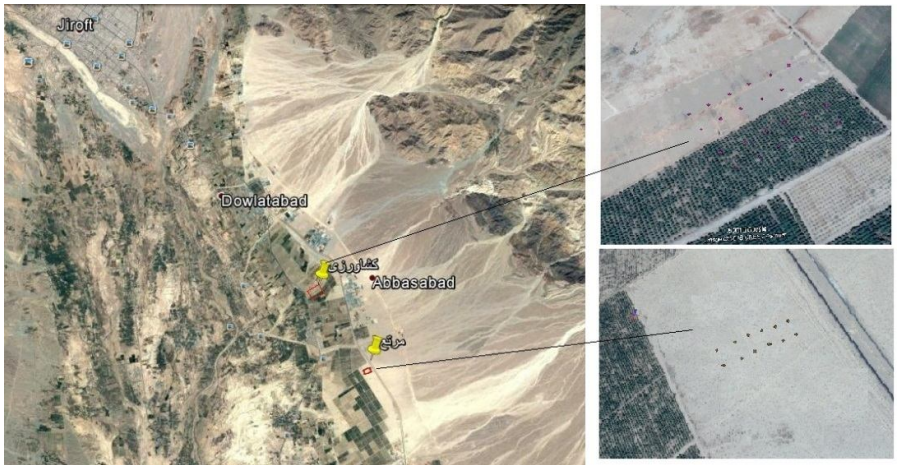
برای استخراج و خالص‌سازی DNA از نمونه‌های خاک از کیت نوکلئواسپین سویل[8] استفاده شد. غلظت DNA های استخراجی از نمونه‌های خاک، با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ[9] در طول موج 260 نانومتر، تعیین شد. همچنین جهت بررسی کیفیت DNA های استخراجی، شاخص‌های میزان خلوص DNA (نسبت‌های جذب نوری DNA در طول موج‌های 260 به 280 نانومتر و 260 به 230 نانومتر) اندازه‌گیری شدند (ناث و همکاران، 2012).

تکثیر قطعات 16S rDNA

برای تکثیر قطعات 16S rDNA باکتری‌های خاک از جفت آغازگر همگانی باکتریایی[10] (341F/534R) که منطقه متغیر[11] V3 توالی‌های 16S rDNA باکتریایی را تکثیر می‌کند، استفاده شد. برای اطمینان از تفکیک مناسب قطعات تکثیر شده در DGGE پیش‌رو، یک کلمپ (گیره) غنی از گوانین و سیتوزین[12] (توالی 40 بازی) به انتهای $5'$ آغازگر رفت[13] (341F) اضافه شد. این توالی غنی از GC به‌عنوان یک ناحیه با دمای ذوب بالا عمل کرده و از جدا شدن کامل دو رشته DNA جلوگیری می‌کند (مویزر و همکاران، 1993).

---

1. Universal Transverse Mercator (UTM) coordinate system
2. Aeronautical Reconnaissance Coverage Geographic Information System (ArcGIS)
3. Kjeldahl
4. Hydrometer
5. Calcium carbonate equivalent (CCE)
6. Electrical Conductivity of soil saturation extract (ECe)
7. Diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA)
8. NucleoSpin® Soil kit, Macherey-Nagel, Duren, Germany
9. NanoDrop spectrophotometer, Thermo Scientific, Scientific, Wilmington DE. USA
10. Universal bacterial primers
11. V3 hypervariable region
12. GC-rich clamp
13. Forward primer



شکل 1- موقعیت جغرافیایی کاربری‌های اراضی انتخاب شده در دشت جیرفت

مواد مورد استفاده جهت انجام PCR در حجم نهایی 50 میکرولیتر شامل؛ آغازگرهای رفت و برگشت (غلظت نهایی هرکدام 20 پیکومول)، کیت مستر میکس رد[1] (غلظت نهایی 1X)، DNA الگو (دو میکرولیتر) و آب دیونیزه بودند. پس از اضافه کردن هر یک از اجزای مخلوط واکنش، میکروتیوب‌ها داخل دستگاه ایجاد کننده چرخه‌های دمایی[2] قرار گرفتند و برنامه زمانی و دمایی PCR پس از مقایسه برنامه‌های مختلف به‌صورت Touchdown-PCR تنظیم شد. به‌طوریکه مرحله واسرشت اولیه به‌مدت پنج دقیقه در دمای 95 درجه سلسیوس انجام شد، سپس 35 چرخه شامل؛ مرحله واسرشت در دمای 94 درجه سلسیوس به‌مدت 30 ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها (در 20 چرخه‌ی Touchdown، مرحله اتصال در شیب دمایی 55-65 درجه سلسیوس (0/5 درجه سلسیوس در هر چرخه کاهش دما) و 15 چرخه بعدی در دمای 55 درجه سلسیوس) به‌مدت 30 ثانیه و مرحله گسترش در دمای 72 درجه سلسیوس به‌مدت 30 ثانیه انجام شدند. پس از اتمام PCR، محصولات تکثیر یافته تا زمان بارگذاری در ژل آگارز، در دمای منفی 20 درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی ترکیب جوامع باکتریایی با روش HRM

با استفاده از روش HRM، مقایسه ترکیب جوامع باکتریایی خاک در کاربری‌های اراضی مختلف با استفاده از دستگاه[3] Real-time PCR انجام شد. مشابه PCR ساده، ساده، برای تکثیر قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک از جفت آغازگر همگانی باکتریایی (341F/534R) اما بدون کلمپ GC، استفاده شد.

واکنش‌های Real time PCR در حجم نهایی 20 میکرولیتر به‌صورت دوتایی انجام شدند. مواد مورد نیاز جهت انجام واکنش شامل کیت مستر میکس اواگرین[4] (غلظت نهایی 1X)، آغازگرهای رفت و برگشت (341F/534R) در غلظت نهایی 8 پیکومول، آب دیونیزه و DNA الگو (یک میکرولیتر) بودند.

برنامه دو مرحله‌ای (تکثیر و ذوب) انجام واکنش به‌صورت ذیل تنظیم شد: مرحله واسرشت اولیه به‌مدت 15 دقیقه در دمای 95 درجه سلسیوس، سپس 40 چرخه شامل؛ مرحله واسرشت در دمای 94 درجه سلسیوس

1. Taq DNA Polymerase 2X Master Mix Red (1.5mM $MgCl_2$) (Ampliqon, Denmark)
2. Bio-Rad T100 thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
3. BioRad CFX96 Real-Time Detection System, USA
4. 5x HOT FIREPol® EvaGreen®HRM Mix, Solis BioDyne, Estonia

به‌مدت 25 ثانیه، مرحله اتصال آغازگرها در دمای 60 درجه سلسیوس به‌مدت 30 ثانیه و مرحله گسترش در دمای 72 درجه سلسیوس به‌مدت 30 ثانیه (اندازه‌گیری میزان فلورسنت در این دما انجام شد). بلافاصله پس از اتمام مرحله تکثیر، الگوی ذوب قطعات تکثیر شده در شیب دمایی 95-55 درجه سلسیوس (با اندازه‌گیری تغییرات فلورسنت نمونه‌ها در هر 0/5درجه سلسیوس و 15 ثانیه توقف در آن دما) بررسی و منحنی‌های ذوب توسط برنامه جانبی دستگاه Real-time PCR ترسیم شدند. همچنین برای انجام آنالیز HRM از نرم‌افزار[1] جانبی دستگاه که ویژه این روش است، استفاده شد.

بررسی ترکیب جوامع باکتریایی با روش DGGE

الف) روش انجام کار

DGGE با استفاده از سیستم جهانی تشخیص جهش[2] (Dcode) در ژل‌هایی با اندازه 16 در 16 سانتی‌متر و ضخامت یک میلی‌متر انجام شد. پس از کارهای مقدماتی از جمله ساخت محلول‌های مورد نیاز، ژل پلی‌آکریل‌آمید هشت درصد (نسبت آکریل‌آمید به بیس‌آکریل‌آمید: 37/5 به یک) آماده شد. این ژل شامل یک شیب شیمیایی خطی 40 تا 60 درصد از عوامل واسرشت کننده بود (واسرشت کننده 100 درصد از ترکیب اوره هفت مولار به اضافه فرمامید دیونیزه 40 درصد تهیه می‌شود). پس از قرار دادن ژل پلی‌آکریل‌آمید مربوطه در بافر TAE 1X تانک الکتروفورز سیستم Dcode، مقدار مساوی (25 میکرولیتر) از قطعات 16S rDNA تکثیر شده، بر روی ژل بارگذاری شد. همچنین 25 میکرولیتر از مخلوط محصولات PCR مربوط به باکتری‌های خالص (به‌عنوان یک لدر که متشکل از هشت گونه باکتری بود) نیز بر روی ژل بارگذاری شد. پس از آن الکتروفورز به‌مدت 17 ساعت با ولتاژ 100 ولت و در دمای 60 درجه سلسیوس اجرا شد. در نهایت پس از اتمام الکتروفورز، ژل با استفاده از روش نیترات نقره رنگ‌آمیزی شد. سپس ژل رنگ‌آمیزی شده روی سطح نورانی قرار داده شد و با دوربین عکاسی حرفه‌ای عکس‌برداری صورت گرفت (هوشینو و ماتسوموتو، 2007؛ واکلین و همکاران، 2008).

ب) تجزیه و تحلیل نتایج DGGE

برای تشخیص باند و مقدار شدت باند، از تجزیه و تحلیل تصویر ژل DGGE، با نرم‌افزار GelCompar II 6.6 استفاده شد. این نرم‌افزار پس از تفریق یا کاهش پس‌زمینه، موقعیت و تعداد کل باند و شدت نسبی باندهای منفرد را برای هر نمونه تعیین می‌کند. هر باند به نمایندگی از گروه‌های فردی از گونه‌های با دمای ذوب مشابه استنباط می‌شود و شدت باند، فراوانی نسبی گروه تحت شرایطی که PCR انجام شده است را نشان می‌دهد. همچنین پس از انجام مراحل پیش‌نیاز روی تصویر ژل DGGE توسط نرم‌افزار، آنالیز خوشه‌بندی تشابه نمونه‌ها که بر اساس ضریب تشابه دایس[3] و با الگوریتم خوشه‌بندی [4] UPGMA بود، استخراج شد (واکلین و همکاران، 2008).

علاوه‌بر آنالیز خوشه‌بندی، جهت مقایسه ترکیب جوامع باکتریایی (حضور یا عدم حضور باندهای DGGE) در خاک‌های کاربری‌های اراضی مختلف، با استفاده از نرم افزار PAST3 روش رج‌بندی[5] مقیاس‌گذاری چند بعدی غیر متریک[6] (NMDS) براساس شاخص تشابه اقلیدیسی (فاصله بین قرارگیری نمونه‌ها بیان کننده شباهت یا عدم شباهت بین الگوهای DGGE مربوطه می‌باشد)، مورد بررسی قرار گرفت (هرنسما و همکاران، 2005).

نتایج و بحث

ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

مقادیر میانگین ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک در سه کاربری اراضی مورد نظر در جدول یک ارائه شده است. بررسی دانه‌بندی خاک نشان داد که بافت لایه

[1] Precision Melt Analysis™ Software - Bio-Rad
[2] DCode™ Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

[3] Dice similarity coefficient
[4] Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean
[5] Ordination method
[6] non-metric multidimensional scaling (NMDS)

سطحی در کاربری باغی و زراعی کلاس لوم شنی[1] و در کاربری بوته‌زار کلاس شن[2] بود. به‌طور خلاصه در کاربری کشاورزی (باغی و زراعی) نسبت به مراتع بوته‌زار، مقادیر کربن آلی، سیلت، رس، قابلیت هدایت الکتریکی عصاره اشباع (ECe)، کربنات کلسیم معادل (CCE)، عناصر غذایی پرمصرف (نیتروژن کل، فسفر قابل دسترس و پتاسیم قابل دسترس) و کم‌مصرف قابل دسترس (آهن، روی، منگنز و مس)، و رطوبت وزنی اولیه خاک بیشتر و مقادیر pH و شن کمتر بودند.

استخراج DNA ژنومی خاک و تکثیر قطعات 16S DNA

جهت بررسی ترکیب جوامع باکتریایی خاک با دو تکنیک HRM و DGGE نیاز است که DNA ژنومی خاک از کمیت و کیفیت مناسبی برخوردار باشد و همچنین تکثیر قطعات 16S rDNA به خوبی انجام شده باشد. نتایج حاصل از بررسی غلظت DNA استخراج شده از نمونه‌های خاک سه کاربری اراضی به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ نشان داد که میانگین غلظت DNA در نمونه‌های خاک کاربری باغ، زراعی و بوته‌زار به‌ترتیب 30/10، 12/30 و 7/60 نانوگرم بر میکرولیتر بود. همچنین نتایج بررسی کیفیت DNA های استخراج شده با محاسبه نسبت‌های جذب نوری DNA (A260/A230 و A260/A280) نشان داد که میانگین نسبت A260/A230 برای نمونه‌های خاک کاربری باغ، زراعی و بوته‌زار به‌ترتیب 1/53، 1/56 و 1/61 بود. این نسبت برای DNA خالص باید بیشتر از 2 باشد، اما تا حدود 1/5 قابل قبول است (ناث و همکاران، 2012). مقادیر کمتر بیانگر مقادیر معنی‌داری از ناخالصی است و غلظت واقعی DNA کمتر از مقدار محاسبه شده است. همچنین به‌غیر از ناخالصی هیومیک اسید، پروتئین، ساکارویدها و دیگر ناخالصی‌ها می‌توانند در مقادیر پایین این نسبت دخیل باشند. میانگین نسبت A260/A280 برای نمونه‌های خاک کاربری باغ، زراعی و بوته‌زار به‌ترتیب 1/86، 1/88 و 1/84 بود. حد مطلوب این نسبت که بیانگر خلوص DNA است، بین 1/8-1/9 بایستی باشد. مقادیر کمتر از 1/8 بیانگر آلودگی پروتئین است و مقادیر بیشتر بیانگر آلودگی RNA می‌باشد (هوشینو و ماتسوموتو، 2007).

میانگین نسبت‌های جذبی A260/A280 و A260/A230 نمونه‌های خاک هر سه کاربری اراضی در حد مطلوب بود. لذا می‌توان نتیجه گرفت که DNA های استخراجی دارای مقدار کمی ناخالصی از جمله هیومیک اسید و پروتئین بوده‌اند.

محصولات PCR ناحیه V3 قطعات 16S rDNA باکتریایی (باند تقریباً 230 جفت بازی) نمونه‌های DNA خاک بر روی ژل آگارز دو درصد و همراه با DNA لدر 100bp[3] الکتروفورز شدند. نتایج نشان داد تکثیر قطعات 16S rDNA نمونه‌های خاک هر سه کاربری اراضی به‌خوبی انجام شده است. قطعات به‌دست آمده از عمل PCR به‌منظور جدا کردن توالی‌های نوکلئوتیدی مختلف 16S rDNA به‌وسیله تکنیک DGGE مورد استفاده قرار گرفتند.

بررسی ترکیب جوامع باکتریایی با روش HRM

پیش از انجام بررسی آنالیزهای HRM بایستی منحنی‌های تکثیر و ذوب Real-time PCR بررسی شوند تا از صحت نتایج اطمینان حاصل نمود.

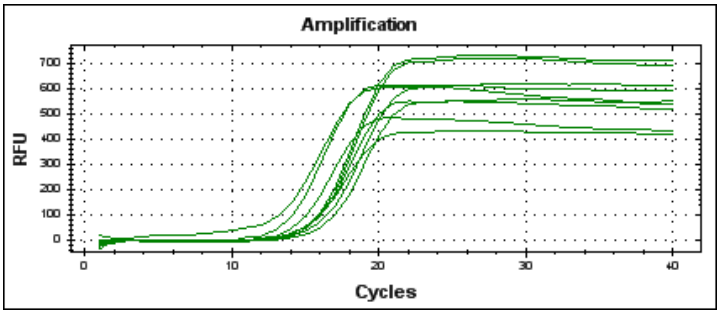
الف) منحنی‌های تکثیر

در شکل دو منحنی‌های تکثیر نمونه‌های DNA خاک سه کاربری اراضی در طی چرخه‌های تکثیر ارائه شده است. این منحنی‌ها تغییرات فِلورسانس را در طی چرخه‌های تکثیر Real-time PCR نشان می‌دهند. همان‌طور که در شکل دو مشاهده می‌شود در همه نمونه‌ها تکثیر به‌خوبی صورت گرفته است و در منحنی تکثیر هر نمونه می‌توان فازهای تکثیر را مشخص کرد.

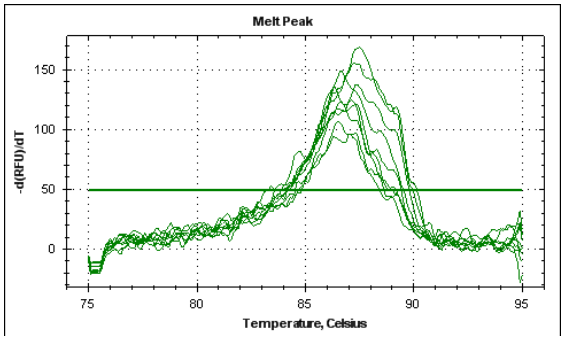
1. Sandy loam
2. Sand
3. 100 bp DNA Ladder, DENAzist Asia, Iran

جدول 1- مقادیر میانگین برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک در کاربری‌های اراضی مختلف

ویژگی Characteristic	اراضی باغی Orchard land	اراضی زراعی Farmland	اراضی بوته‌زار Shrubland
کربن آلی کل (Total organic carbon) (%)	0/17	0/07	0/04
کربنات کلسیم معادل (CCE) (%)	3/87	5/36	4/14
واکنش خاک (pH)	7/71	7/91	8/09
قابلیت هدایت الکتریکی عصاره اشباع (ECe) (dSm^{-1})	2/25	0/91	0/67
شن (Sand) (%)	54/23	70/23	97/11
رس (Clay) (%)	1/14	0/91	0/00
سیلت (Silt) (%)	44/63	28/86	2/89
مقدار رطوبت اولیه (Initial moisture content) (%)	12/24	6/78	1/85
نیتروژن کل (Total N) ($mg\ kg^{-1}$)	105/14	57/10	31/58
فسفر قابل دسترس (Available P) ($mg\ kg^{-1}$)	13/25	11/79	1/23
پتاسیم قابل دسترس (Available K) ($mg\ kg^{-1}$)	269/16	305/43	92/83
آهن قابل دسترس (Available Fe) ($mg\ kg^{-1}$)	3/97	3/62	1/21
روی قابل دسترس (Available Zn) ($mg\ kg^{-1}$)	0/72	0/66	0/14
منگنز قابل دسترس (Available Mn) ($mg\ kg^{-1}$)	2/43	2/28	1/19
مس قابل دسترس (Available Cu) ($mg\ kg^{-1}$)	0/48	0/35	0/09

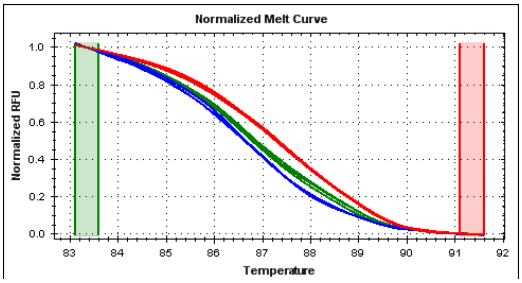


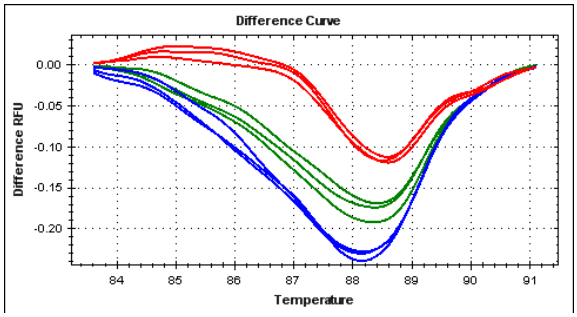
شکل 2- منحنی‌های تکثیر حاصل از Real-time PCR برای قطعات 16S rDNA باکتریایی در نمونه‌های DNA خاک سه کاربری اراضی. محورهای X و Y به‌ترتیب تعداد چرخه و واحد فلورسانس نسبی[1] (RFU) را نشان می‌دهند.



شکل 3- منحنی‌های ذوب قطعات 16S rDNA باکتریایی در نمونه‌های DNA خاک سه کاربری اراضی با Real-time PCR. محورهای X و Y به‌ترتیب دما (°C) و مشتق تغییرات فِلورسانس را نشان می‌دهند. شدت پیک در هر نمونه متناسب با مقدار قطعات تکثیر شده است.

1. Relative fluorescence unit (RFU)





Sample	Cluster	Percent Confidence
Sl1	Cluster 01	98.1
Sl2	Cluster 01	98.4
Sl3	Cluster 01	98.5
Ol1	Cluster 02	97.4
Ol2	Cluster 02	99.2
Ol3	Cluster 02	98.8
Fl1	Cluster 03	97.8
Fl2	Cluster 03	98.7
Fl3	Cluster 03	96.8

شکل 4- مقایسه منحنی‌های هم‌طراز شده (شکل بالا) و difference (شکل وسط) به‌دست آمده از آنالیز HRM قطعات 16S rDNA نمونه‌های خاک سه کاربری اراضی باغ (OL) (سبز رنگ)، زراعی (FL) (آبی رنگ) و مرتع (SL) (قرمز رنگ). شکل پایین، آنالیز خوشبه-بندی حاصل از نتایج HRM را نشان می‌دهد.

ب) منحنی‌های ذوب[1]

با تحلیل منحنی ذوب هر نمونه می‌توان وجود باندهای غیراختصاصی و دایمر پرایمر[2] را تشخیص داد. در شکل سه منحنی‌های ذوب نمونه‌های DNA خاک ارائه شده است. در منحنی‌های ذوب باید تنها یک پیک مشاهده گردد. وجود تنها یک پیک کشیده و با دامنه‌ای محدود برای منحنی ذوب هر نمونه DNA خاک دلالت بر این دارد که واکنش شرایط مناسب برای تکثیر اختصاصی ژن هدف را دار بوده و فقط قطعه اختصاصی مورد نظر (منطقه متغیر V3 توالی‌های 16S rDNA باکتریایی به طول تقریبی 193 جفت باز) تکثیر یافته است.

ج) منحنی‌های HRM

نتایج نشان داد که ترکیب جوامع باکتریایی خاک در بین هر سه کاربری اراضی تفاوت‌هایی دارد. همان‌طور که در شکل چهار مشاهده می‌شود، منحنی‌های هر سه نمونه معرف هر کاربری در کنار هم قرار گرفته‌اند. منحنی‌های نمونه‌های معرف کاربری باغ (سبز رنگ) و زراعی (آبی رنگ) نسبت به مرتع (قرمز) در فاصله نزدیکتری نسبت به هم قرار گرفته‌اند، که نشان دهنده

1. Melting curve analysis
2. Primer dimer

شباهت بیشتر ترکیب جوامع باکتریایی خاک در این دو کاربری اراضی است. آنالیز خوشه‌بندی نیز نشان می‌دهد که سه نمونه معرف هر کاربری در یک خوشه مجزا می‌باشند (شکل چهار، آنالیز خوشه‌بندی).

با توجه به نتایج بررسی ترکیب جوامع باکتریایی خاک مبتنی بر آنالیز دمای ذوب قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک با روش HRM می‌توان بیان کرد که تغییر کاربری اراضی از مراتع بوته‌زار به کشاورزی (باغ و زراعی) سبب تغییر معنی‌دار در ترکیب جوامع باکتریایی خاک شده است. به‌طورکلی با توجه به نتایج می‌توان نتیجه گرفت نمونه‌های خاک کاربری باغ و زراعی نسبت به کاربری مرتع بوته‌زار دارای باکتری‌های مشابه بیشتری می‌باشند.

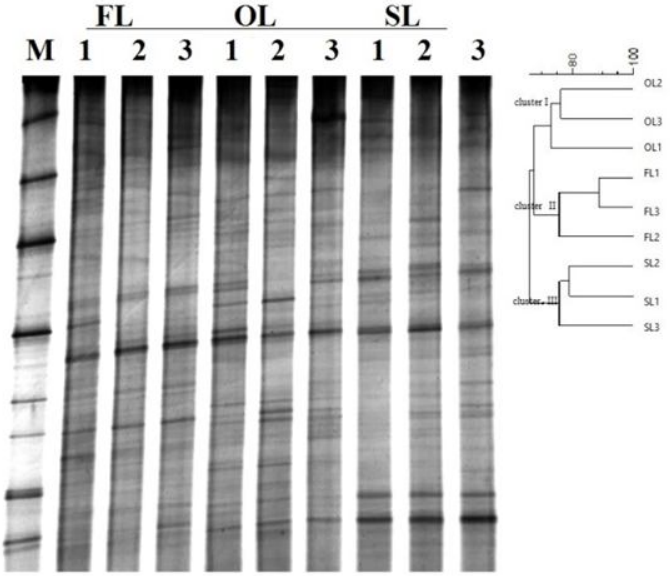
بررسی ترکیب جوامع باکتریایی با روش DGGE

عمل DGGE قطعات 16S rDNA نمونه‌های خاک به‌عنوان یک روش کیفی و نیمه کمی به‌منظور ارزیابی ترکیب جمعیت باکتریایی خاک تحت کاربری‌های مختلف استفاده شد. الگوهای باندی DGGE حاصل از تکثیر PCR ناحیه V3 توالی‌های 16S rDNA در شکل پنج ارائه شده است. عمل DGGE توالی‌های 16S rDNA به‌دست آمده از نمونه‌های خاک نشان دهنده تفاوت در تعداد باندها و فواصل مختلف قطعات منتقل شده در ژل و در نتیجه تفاوت آشکار در ترکیب جوامع باکتریایی خاک تحت همه کاربری‌های اراضی بود. همان‌طور که در شکل پنج نمایان است، نمونه‌های خاک کاربری‌های مختلف دارای بعضی باندهای یکسانی (اما شدت باند متفاوت) می‌باشند. همچنین الگوهای باندی در سه نمونه معرف هر کاربری به‌شدت تکرارپذیری دارند و مشابه با یکدیگر می‌باشند. شباهت مشاهده شده در نیمرخ‌های باندی DNA نمونه‌های تکرار به‌دست آمده از یک کاربری اراضی نشان می‌دهد که ساختار جوامع باکتریایی خاک بین کاربری‌های اراضی مختلف نسبت به درون یک کاربری اراضی یکسان تفاوت بیشتری دارد. علاوه‌بر این به‌طور مشاهده‌ای، شباهت‌های الگوهای باندی بین خاک‌های تحت کاربری زراعی و باغی با هم بیشتر است. نتایج نشان داد نیمرخ‌های DNA باکتریایی خاک حاوی تعداد زیادی باندهای با شدت کم و نزدیک به یکدیگر همراه با تعداد کمی باندهای غالب درخشان بودند. این موضوع احتمالاً به‌دلیل ناهمگنی بالای DNA هایی بود که مستقیماً از خاک استخراج شده و نشان دهنده پیچیدگی ترکیب جوامع باکتریایی خاک می‌باشد (تائو و همکاران، 2012؛ دینگ و همکاران، 2013).

نیمرخ باندهای DNA، بررسی جمعیت‌های پیچیده در نمونه‌های خاک را امکان‌پذیر می‌کند، زیرا به‌طورکلی هر یک از ژنوتیپ‌ها یا گونه‌های باکتریایی یک باند مجزا را تولید می‌کنند. علاوه‌بر این، شدت باندهای DNA همبستگی قوی با فراوانی نسبی گونه‌های باکتریایی مختلف دارند. به هرحال این واقعیت باید در نظر گرفته شود که رابطه بین باندها در یک نیمرخ و تعداد گونه‌های باکتریایی در یک نمونه به سادگی نسبت یک به یک نیست، زیرا برآورد بیش از حد یا برآورد کمتر از تعداد واقعی گونه‌های باکتریایی می‌تواند در این روش رخ دهد. همچنین، از آنجایی که 16S rDNA به‌عنوان یک الگو برای عمل تکثیر PCR استفاده می‌شود، نیمرخ‌های DGGE نشان دهنده DNA تکثیر شده مربوط به هم ریزجانداران زنده و هم مرده می‌باشند (هوشینو و ماتسوموتو ،2007).

کرچیو و همکاران (2004) و والیس و همکاران (2010) پاسخ جوامع باکتریایی خاک را نسبت به روش‌های مدیریتی مختلف مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها زمانی که DNA را مستقیماً از خاک استخراج کردند، الگوی باندهای DNA مشابه با این پژوهش را گزارش کردند. آن‌ها پیشنهاد کردند که باندهای درخشان[1] احتمالاً نشان دهنده حضور تعداد محدودی از انواع باکتری‌های از نظر اکولوژیکی به‌خوبی سازگار شده و غالب در خاک می‌باشند. از طرف دیگر، باندهای روشن[2] زیاد احتمالاً نشان دهنده جمعیت فراوان و یکسان در هر خاک است.

1. Bright
2. Light



شکل 5- الگوهای باندی DGGE حاصل از قطعات 16S rDNA به‌دست آمده از نمونه‌های خاک کاربری زراعی (FL)، کاربری باغی (OL) و کاربری مرتع (SL). شماره‌های 1، 2 و 3 نشان دهنده نمونه‌های تکرار می‌باشند. M نشانگر 16S rDNA باکتریایی می‌باشد. آنالیز مقایسه‌ای الگوهای باندی DGGE با استفاده از ضریب تشابه Dice و براساس آنالیز خوشه‌بندی UPGAMA انجام گرفت.

بر اساس نتایج به‌دست آمده، خاک‌های کاربری‌های اراضی مورد مطالعه شامل انگشت‌نگاری (نیمرخ باندهای DNA) به‌شدت پیچیده‌ای بودند و بنابراین محاسبه دقیق تعداد کل باندها تقریباً غیرممکن بود. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که انگشت‌نگاری DGGE تنها اعضای غالب جمعیت را شناسایی می‌کند و این روش پیچیدگی کل سیستم را نشان نمی‌دهد (تائو و همکاران، 2012). بنابراین در این پژوهش باندهای به‌دست آمده از ژل DGGE، به‌عنوان اعضای باکتریایی غالب در خاک‌های کاربری‌های مختلف منطقه مورد مطالعه در نظر گرفته شدند.

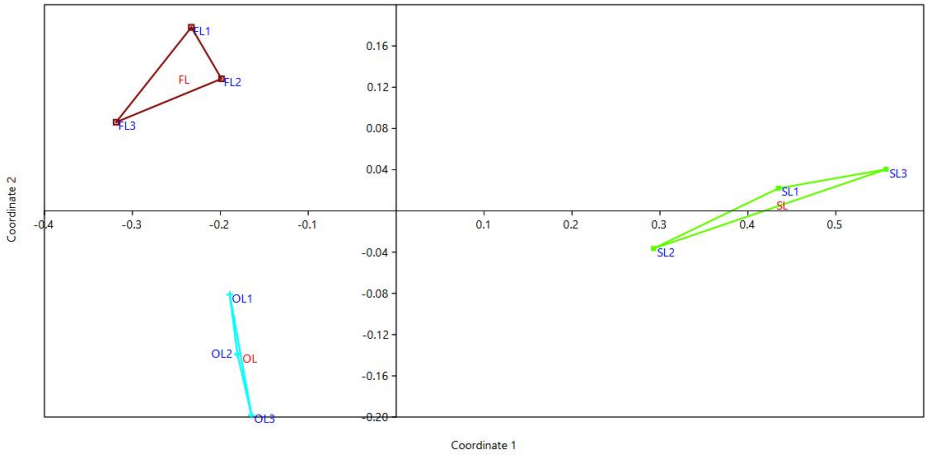
آنالیز مقایسه‌ای الگوهای باندی DGGE با استفاده از ضریب تشابه Dice و براساس آنالیز خوشه‌بندی UPGAMA در شکل پنج نیز آورده شده است. تعداد و تشابه باندهای مشاهده شده در هر پروفایل در مقایسه با پروفایل‌های دیگر اساس این روش است. بنابراین به‌منظور بررسی ساختار جوامع باکتریایی میان نمونه‌های خاک خوشه‌ها براساس شاخص تشابه یا تفاوت به‌دست می‌آیند. نتایج خوشه‌بندی نشان داد که میزان تشابه بین الگوهای باندی نه نمونه خاک 68/5 درصد بود. همچنین نتایج این آنالیز نشان داد که ترکیب جوامع باکتریایی بین کاربری‌های مختلف تفاوت‌هایی دارد، به‌طوریکه سه نمونه خاک معرف هر کاربری تشکیل یک خوشه مجزا را دادند (شکل پنج). خوشه یک شامل سه نمونه کاربری باغی بود که حداقل شاخص تشابه را داشتند (74/0 درصد). سه نمونه کاربری زراعی خوشه دو و سه نمونه کاربری مرتع خوشه سه را تشکیل دادند. نمونه‌های خاک کاربری زراعی تشابه بیشتری نسبت به‌هم داشتند (80/1) در مقایسه با نمونه‌های خاک کاربری مرتع (76/9).

مقایسه ترکیب جوامع باکتریایی (حاصل از نتایج DGGE) در کاربری‌های اراضی مختلف با روش مقیاس‌بندی چند بعدی غیرمتریک (NMDS)

علاوه‌بر آنالیز مقایسه‌ای الگوهای باندی DGGE براساس آنالیز خوشه‌بندی UPGAMA، با روش NMDS (بر اساس شاخص تشابه اقلیدیسی) ترکیب جوامع باکتریایی (حضور یا عدم حضور باندهای DGGE) در

خاک‌های کاربری‌های اراضی مختلف مورد بررسی قرار گرفت (شکل شش). فاصله بین قرارگیری نمونه‌ها بیان کننده شباهت یا عدم شباهت بین الگوهای DGGE مربوطه می‌باشد (هرنسما و همکاران، 2005). نتایج پژوهش والیس و همکاران (2010) نشان داد آنالیزهای مبتنی بر حضور یا عدم حضور باندهای DGGE یا براساس تعداد باندها به‌خوبی جمعیت‌های باکتریایی خاک‌های تحت کاربری‌های متفاوت را از هم جدا کرد. تابع زوال در روش مقیاس‌بندی چند بعدی غیرمتریک به نام استرس شناخته می‌شود. مقدار استرس نشان دهنده این است که آیا تفاوت بین داده‌ها به‌خوبی توسط بای پلات استخراجی از این روش توضیح داده شده است یا خیر. اگر مقدار استرس کمتر از 0/2 باشد نتایج این آنالیز مورد قبول است (ریتز و همکاران، 2004). در این پژوهش مقدار استرس 0/15 بود، در نتیجه روش NMDS به‌خوبی توانست تفاوت‌های موجود میان نمونه‌های خاک سه کاربری اراضی را نشان دهد.

نتایج این آنالیز به‌صورت پلات دو بعدی در شکل شش ارائه شده است. همان‌طور که نمایان است، نمونه‌های خاک معرف هر کاربری در مختصات جداگانه‌ای روی پلات حضور دارند و از نمونه‌های دو کاربری دیگر تفکیک شده‌اند. می‌توان گفت که نوع کاربری اراضی اثر معنی‌داری روی ترکیب جوامع باکتریایی خاک داشته است. از فاصله قرارگیری بین نمونه‌های کاربری‌های مختلف که در واقع نمایانگر شباهت و یا عدم شباهت بین الگوهای DGGE (این الگوها یا باندها معرف گونه‌های باکتریایی خاک می‌باشند)، می‌توان نتیجه گرفت که شباهت بین نمونه‌های معرف کاربری زراعی و باغی بیشتر (چون در فاصله نزدیک‌تری نسبت به‌هم قرار دارند) از حالتی است که این دو کاربری با کاربری مرتع مقایسه می‌شوند.



شکل 6- پلات دو بعدی روش NMDS، حاصل از مقایسه نمونه‌های خاک کاربری زراعی (FL)، کاربری باغی (OL) و کاربری مرتع (SL) براساس ترکیب جوامع باکتریایی.

مقایسه نتایج DGGE و HRM

هر دو روش توانستند تفاوت در ترکیب جوامع باکتریایی خاک بین سه کاربری اراضی مورد نظر را نشان دهند. هلمز و همکاران (2014) ترکیب جوامع باکتریایی خاک را بین شش تیمار (علف‌کش و کود) مختلف با استفاده از سه روش HRM، DGGE و توالی‌یابی[1] قطعات ژن 16S rRNA بررسی نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که هر سه روش به‌طور مشابه‌ای توانستند میزان شباهت یا تفاوت بین تیمارهای مورد نظر را نشان دهند.

[1] 454-based 16SrRNA gene amplicon sequencing

همچنین آن‌ها نتیجه‌گیری نمودند که HRM به‌دلیل سریع بودن و دقت کافی، می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین مؤثر برای روش‌های مبتنی بر الکتروفورز ژل مانند DGGE که زمان‌بر و هزینه‌بر هستند به‌کار رود. همچنین سونی و گل (2010) از سه روش HRM، DGGE و کلونینگ[1] ژن 16S rRNA برای بررسی ترکیب جوامع باکتریایی در سیستم‌های مختلف خاک در غرب هند استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که اختلاف‌های بین نمونه‌های خاک را هر سه روش به یک میزان نشان دادند.

دلایل تفاوت ترکیب جوامع باکتریایی در کاربری‌های اراضی مختلف

تفاوت ترکیب جوامع باکتریایی خاک در کاربری های اراضی مختلف تحت تأثیر عوامل بسیاری است که در تعامل با یکدیگر می‌باشند. برای مثال خاک‌ها در کاربری‌های اراضی مختلف تحت پوشش گیاهی متفاوتی می‌باشند و این موضوع کاملاً شناخته شده است که ریزوسفر گونه‌های گیاهی مختلف دارای جمعیت‌های باکتریایی با ترکیب گونه‌ای متفاوت می‌باشد (لاوبر و همکارن، 2013؛ بووینو و همکاران، 2014). نوع پوشش گیاهی، مقدار و نوع ترکیبات شیمیایی می‌توانند به‌عنوان فاکتورهای مهم، روی ترکیب جوامع باکتریایی خاک اثرگذار باشند (لیو و همکاران، 2010؛ شن و همکاران، 2010). همچنین بین کاربری‌های اراضی مختلف کیفیت و کمیت مواد آلی آزاد شده از ریشه در خاک می‌تواند متفاوت باشد، در نتیجه گونه‌های باکتریایی که با این محیط‌ها سازگار شده‌اند تفاوت‌هایی دارند (زو و همکاران، 2006). حتی پژوهش‌های بسیاری نشان داده‌اند که کاربرد عملیات‌های مدیریتی مختلف در یک کاربری می‌تواند ترکیب جوامع باکتریایی خاک را تحت تأثیر قرار دهد (لاوبر و همکاران، 2013). برای مثال نتایج تبی و اشلوتر (2007) نشان داد تغییرات قابل توجهی در ترکیب جوامع باکتریایی خاک بین مزارع تحت مدیریت مرسوم، مزارع تحت کشاورزی آلی کوتاه مدت و بلند مدت وجود داشت. همچنین بوسیو و همکاران (2005) براساس آنالیز DGGE قطعات 16S rDNA باکتریایی خاک گزارش کردند که ساختار این ریزجانداران تحت تأثیر عملیات‌های مدیریتی مختلف تغییر می‌کند. مارشنر و همکاران (2001) اثر پنج تیمار مختلف را بر ساختار جوامع باکتریایی و یوکاریوتی خاک بررسی کردند و نشان دادند که تیمارهای مختلف موجب تغییرات قابل توجهی در ساختار هر دو جوامع، به‌ویژه در خاک‌های با مقدار کم کربن آلی شدند. به‌طورکلی نتایج نشان داد ترکیب جوامع باکتریایی خاک شاخص حساسی نسبت به پایداری کاربری اراضی می‌باشد (زو و همکاران، 2006).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش جهت بررسی ترکیب جوامع باکتریایی خاک از دو روش DGGE و HRM استفاده شد، که هر دو روش توانستند تفاوت‌های موجود بین خاک‌های سه کاربری اراضی را نشان دهند. با توجه به محدودیت‌های تکنیک PCR سنتی استفاده شده در روش DGGE، آنالیز HRM به‌دلیل دقت بیشتر، کم هزینه‌تر بودن، راحتی کار و بایاس یا انحراف کمتر می‌تواند جهت مقایسه ترکیب جوامع باکتریایی خاک بین تیمارهای مختلف پیشنهاد شود. این پژوهش موجب بهبود درک ما از اثرات تغییر کاربری اراضی بر ترکیب جوامع باکتریایی خاک در مناطق خشک و نیمه خشک کشور شد. با این حال هدف‌های قابل توجهی برای کارهای بیشتر وجود دارد. عوامل محدود کننده جدی بر سر راه آنالیز کمی و کیفی ترکیب جوامع ریزجانداران خاک وجود دارد. از جمله این محدودیت‌ها می‌توان به عدم دسترسی به تجهیزات مناسب و هزینه‌های سنگین بسیاری از روش‌های آزمایشگاهی اشاره کرد. در پایان قابل ذکر است که نتایج این پژوهش قابل تعمیم به مناطق با شرایط غیرمشابه نیست. چون در اثر عوامل مختلف از جمله اقلیم، ویژگی‌های متفاوت خاک، پوشش گیاهی و درصد مواد آلی متفاوت، ممکن است نتایج دیگری حاصل شود.

[1] Cloning of 16SrRNA gene

فهرست منابع:

1. بنایی، ح.م. 1380. نقشه منابع و استعداد خاک‌های ایران. مؤسسه تحقیقات خاک و آب. تهران، ایران.

طباطبایی، م. و پورمظاهری، ه. 1391. متاژنومیکس و کاربرد آن در شناسایی تنوع ژنتیکی اکوسیستم‌های میکروبی. مجله ژنتیک نوین، دوره هفتم، شماره 4. صفحه 324-313.

2. نوری دلویی، م.ر. و فرجی، ک. 1394. فن ذوب DNA با تفکیک بالا و کاربردهای راهبردی آن به‌ویژه در ژنتیک مولکولی. فصلنامه افق دانش، دوره 22، شماره 1. صفحه 88-77.

3. Ahmad Suleiman A.K., Pylro V.S., and Wurdig Roesch L.F. 2017. Replacement of native vegetation alters the soil microbial structure in the Pampa biome. *Scientia Agricola*, 74: 77-84.

4. Bevivino A., Paganin P., Bacci G., Florio A., Pellicer M.S., Papaleo M.C., Mengoni A. Ledda L., Fani R., Benedetti A., and Dalmastri C. 2014. Soil bacterial community response to differences in agricultural management along with seasonal changes in a Mediterranean region. *PLoS ONE*, 9(8): e105515.

5. Bossio, D.A., Girvan, M.S., Verchot, L., Bullimore, J., Borelli, T., Albrecht, A., Scow, K.M., Ball, A.S., Pretty, J.N., and Osborn, A.M. 2005. Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya. *Microbial Ecology*, 49: 50-62.

6. Bouyoucos G.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analyses of soils. *Agronomy Journal*, 54: 464-465.

7. Bremner J.M. 1960. Determination of nitrogen in soil by the Kjeldahl method. *The Journal of Agricultural Science*, 55: 11-33.

8. Crecchio, C., Gelsomino, A., Ambrosoli, R., Minati, J.L. and Ruggiero, P. 2004. Functional and molecular responses of soil microbial communities under differing soil management practices. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1873-1883.

9. De Lipthay, J.R., Enzinger, C., Johnsen, K., Aamand, J., and Sorensen, S.J. 2004. Impact of DNA extraction method on bacterial community composition measured by denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Biology and Biochemistry*, 36: 1607-1614.

10. Ding, G.C., Piceno, Y.M., Heuer, H., Weinert, N., Dohrmann, A.B., Carrillo, A., Andersen, G.L., Castellanos, T., Tebbe, C.C., and Smalla, K. 2013. Changes of soil bacterial diversity as a consequence of agricultural land use in a semiarid ecosystem. *PLoS ONE*, 8(3): e59497.

11. Fierer N., Jackson J.A., Vilgalys R., and Jackson R.B. 2005. Assessment of Soil Microbial Community Structure by Use of Taxon-Specific Quantitative PCR Assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 4117-4120.

12. Foti M., Sorokin D.Y., Lomans B., Mussman M., Zacharova E.E., Pimenov N.V., Kuenen J.G., and Muyzer G. 2007. Diversity, activity, and abundance of sulfate-reducing bacteria in saline and hypersaline soda lakes. *Applied Environmental Microbiology*, 73: 2093-2100.

13. Govaerts B., Mezzalama M., Unno Y., Sayre K.D., Luna-Guido M., Vanherck K., Dendooven L., and Deckers, J. 2007. Influence of tillage, residue management, and crop rotation on soil microbial biomass and catabolic diversity. *Applied Soil Ecology*, 37: 18-30.

14. Helmke P.A., and Sparks D.L. 1996. Lithium, sodium, potassium, rubidium, and cesium. In: Sparks D.L. (Ed.), Methods of Soil Analysis-Part 3. Chemical Methods-SSSA Book Series No. 5. *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin, USA, pp. 551-574.

15. Hernesmaa, A., Björklöf, K., Kiikkilä, O., Fritze, H., Haahtela, K., and Romantschuk, M. 2005. Structure and function of microbial communities in the rhizosphere of Scots pine after tree-felling. *Soil Biology and Biochemistry*, 37: 777-785.
16. Hjelms M.H., Hansen L.H., Blum J., Feld L., Holben W.E., and Jacobsen C.S. 2014. High-Resolution Melt Analysis for Rapid Comparison of Bacterial Community Compositions. *Applied and Environmental Microbiology*, 80: 3568-3575.
17. Hoshino, Y.T., and Matsumoto, N. 2007. DNA- versus RNA-based denaturing gradient gel electrophoresis profiles of a bacterial community during replenishment after soil fumigation. *Soil Biology and Biochemistry*, 39: 434-444.
18. Hu J., Lin X., Wang J., Dai J., Chen R., Zhang J., and Wong, M.H. 2011. Microbial functional diversity, metabolic quotient, and invertase activity of a sandy loam soil as affected by long-term application of organic amendment and mineral fertilizer. *Journal of Soils and Sediments*, 11: 271-278.
19. Kent, A.D., and Triplett, E.W. 2002. Microbial communities and their interactions in soil and rhizosphere ecosystems. *Annual Review of Microbiology*, 56: 211-236.
20. Knauth S., Schmidt H., and Tippkootter R. 2012. Comparison of commercial kits for the extraction of DNA from paddy soils. *Letters in Applied Microbiology*, 56: 222-228.
21. Kolb S., Knief C., Stubner S., and Conrad R. 2003. Quantitative detection of methanotrophs in soil by novel *pmo*A-targeted real-time PCR assays. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 2423-2429.
22. Lauber C.L., Ramirez K.S., Aanderud Z., Lennon J., and Fierer N. 2013. Temporal variability in soil microbial communities across land-use types. *ISME Journal*, 7: 1641-1650.
23. Lauber C.L., Strickland M.S., Bradford M.A., and Fierer N. 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 2407-2415.
24. Lindsay W.L., and Norvell W.A. 1978. Development of a DTPA Soil Test for Zinc, Iron, Manganese, and Copper. *Soil Science Society of America Journal*, 42(3): 421-428.
25. Liu, E., Yan, C., Mei, X., He, W., Bing, S.H., Ding, L., Liu, Q., Liu, S., and Fan, T. 2010. Long term effect of chemical fertilizer, straw, and manure on soil chemical and biological properties in northwest China, *Geoderma*, 158: 173-180.
26. Loeppert R.H., and Suarez, D.L. 1996. Carbonate and gypsum. In: Sparks D.L. (Ed.), Methods of Soil Analysis-Part 3. Chemical Methods-SSSA Book Series No. 5. *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin, USA, pp. 437-474.
27. Long, L.K., Yao, Q., Guo, J., Yang, R.H., Huang, Y.H., and Zhu, H.H. 2010. Molecular community analysis of arbuscular mycorrhizal fungi associated with five selected plant species from heavy metal polluted soils. *European Journal of Soil Biology*, 46:288-294.
28. Marschner P., Yang C-H., Lieberei R., and Crowley D.E. 2001. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 33: 1437-1445.
29. Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 695-700.
30. Nakatsu, C.H. 2007. Soil microbial community analysis using denaturing gradient gel electrophoresis. *Soil Science Society of America Journal*, 71: 562-571.
31. Olsen S.R., and Sommers L.E. 1982. Phosphorus. In: Page A.L. (Ed.), Methods of Soil Analysis-Part 2. Chemical and Microbiological Properties-Agronomy Monograph 9, 2nd

Ed. *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin, USA, pp. 403-430.
32. Rhoades J.D. 1996. Salinity: Electrical conductivity and total dissolved solids. In: Sparks D.L. (Ed.), Methods of Soil Analysis-Part 3. Chemical Methods-SSSA Book Series No. 5. *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin, USA, pp. 417-435.
33. Ritz, K., Mac Nicol, J.W., Nunan, N., Grayston, S., Millard, P., Atkinson, A., Gollotte, A., Habeshaw, D., Boag, B., and Clegg, C.D. 2004. Spatial structure in soil chemical and microbiological properties in upland grassland. *FEMS Microbiology Ecology*, 49: 191-205.
34. Shen, J.P., Zhang, L.M., Guo, J.F., Ray, J.L., and He, J.Z. 2010. Impact of long-term fertilization practices on the abundance and composition of soil bacterial communities in Northeast China, *Applied Soil Ecology*, 46: 119-24.
35. Smit, E., Leeflang, P., Gommans, S., van den Broek, J., van Mil, S., and Wernars, K. 2001. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 2284-2291.
36. Soni R., and Goel R. 2010. Triphasic approach to assessment of bacterial population in different soil systems. *Ekologija*, 56: 99-104.
37. Tao, S.Q., Xia, Q., Zhu, L., Chen, J.J., Wang, Y.N., and Qin, B. 2012. Analysis of the bacterial communities in lime concretion black soil upon the incorporation of crop residues. *Open Journal of Soil Science*, 9: 312-319.
38. Tebbe C.C., and Schloter M. 2007. Discerning the diversity of soil prokaryotes (Bacteria and Archaea) and their impact on agriculture. In: Benckiser G. and Schnell S. (Ed.), Biodiversity in agricultural production systems. *CRC Press, Taylor and Francis Group*, UK, pp. 81-100.
39. Thomas G.W. 1996. Soil pH and soil acidity. In: Sparks D.L. (Ed.), Methods of Soil Analysis-Part 3. Chemical Methods-SSSA Book Series No. 5. *Soil Science Society of America and American Society of Agronomy*, Madison, Wisconsin, USA, pp. 475-490.
40. Wakelin, S.A., Macdonald, L.M., Rogers, S.L., Gregg, A.L., Bolger, T.P., and Baldock, J.A. 2008. Habitat selective factors influencing the structural composition and functional capacity of microbial communities in agricultural soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 40: 803-813.
41. Walkley A., and Black I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*, 37: 29-38.
42. Wallis, P.D., Haynes, R.J., Hunter, C.H., and Morris, C.D. 2010. Effect of land use and management on soil bacterial biodiversity as measured by PCR-DGGE. *Applied Soil Ecology*, 46: 147-150.
43. Webster G., Embley T.M., and Prosser J.I. 2002. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of ß-Proteobacterial ammonia oxidizer populations. *Applied Environment Microbiology*, 68: 20-30.
44. Xue D., Yao H., and Huang C. 2006. Microbial biomass, N mineralization and nitrification, enzyme activities, and microbial community diversity in tea orchard soils. *Plant and Soil*, 288: 319-331.

ارزیابی کلنیزاسیون ریشه و ترکیبات بیوشیمیایی زعفران تحت رژیم آبیاری، تلقیح قارچ میکوریز آربوسکولار و کود دهی آلی

مریم حبیبی، فرهاد رجالی[1]، فائزه زعفریان و نادعلی باقری

دانشجوی دکتری، گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ **Maryam.habibi462@gmail.com**

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی ، کرج ایران، **frejali@yahoo.com**

دانشیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ **fa_zaefarian@yahoo.com**

دانشیار گروه اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ **bagherinadali@yahoo.com**

دریافت: **1400/6/1** و پذیرش: **1400/10/29**

چکیده

به‌منظور ارزیابی پتانسیل گونه‌های بومی قارچ میکوریز آربوسکولار زعفران در شرایط تنش قطع آبیاری بر صفات فیزیولوژیک آن، آزمایشی به‌صورت اسپلیت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در طی سال‌های 98-1396 در مؤسسه تحقیقات خاک و آب واقع در شهرستان کرج اجرا شد. تیمارها شامل: رژیم آبیاری به‌عنوان عامل اصلی در سه سطح (آبیاری مطلوب، قطع آبیاری در ابتدای فصل رشد (محدودیت ملایم آبی) و قطع آبیاری در ابتدا و اواسط فصل رشد (محدودیت شدید آبی))، و عامل فرعی کود آلی در سه سطح (عدم مصرف کود آلی، ورمی‌کمپوست (20 تن در هکتار) و بیوچار (10 تن در هکتار)) و قارچ میکوریز آربوسکولار در سه سطح (عدم مصرف، جدایه a و جدایه b) بودند. بر اساس یافته‌های مولکولی هر دو جدایه جداسازی شده از ریزوسفر زعفران متعلق به گونه *Rhizophagus irregularis* بود. نتایج این مطالعه نشان داد برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* اثر معنی‌داری بر تمام پارامترهای اندازه‌گیری شده داشت. بالاترین درصد کلنیزاسیون ریشه برای تیمار آبیاری مطلوب به‌همراه بیوچار با جدایه b (98/7 درصد) بود. بیشترین محتوای کلروفیل a، b و کاروتنوئید (به‌ترتیب با میانگین 5/74، 4/36 و 1/52 میکروگرم در میلی‌لیتر) در تیمار آبیاری مطلوب به همراه ورمی‌کمپوست با جدایه b مشاهده شد. همچنین تیمار محدودیت شدید آبی به‌همراه بیوچار با جدایه b به‌ترتیب موجب افزایش 253، 82، 95 و 165 درصد فعالیت آنزیم کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز و پرولین در مقایسه با تیمار آبیاری مطلوب و عدم مصرف کود آلی و قارچ میکوریز شد که کمترین مقدار این صفات را به خود اختصاص داده بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده از این مطالعه چنین استدلال می‌شود که استفاده از کودهای بیوچار و ورمی‌کمپوست همراه با جدایه b می‌تواند اثرات مخرب تنش رطوبت خاک را کاهش دهد.

واژه‌های کلیدی: آبیاری، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، بیوچار، پرولین، شناسایی قارچ میکوریز آربوسکولار، کلنیزاسیون ریشه

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: مؤسسه تحقیقات خاک و آب سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج ایران

مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) یکی از قدیمی‌ترین و گران‌قیمت‌ترین ادویه‌های دنیا به‌شمار می‌رود. اگرچه ایران 94 درصد از تولید سالانه زعفران در دنیا به خود اختصاص داده است (اسمی و همکاران، 1397)، اما میانگین عملکرد آن در واحد سطح 3/96 کیلوگرم در هکتار می‌باشد که در مقایسه با کشورهایی مانند اسپانیا با 15 و پاکستان با 9 کیلوگرم در هکتار تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد (رضوانی‌مقدم و همکاران، 1393). کاهش عملکرد اقتصادی در واحد سطح علیرغم افزایش سطح زیرکشت به دلایل مختلف منجمله گرم شدن هوا و کاهش میزان بارش‌های جوی و عدم آبیاری کافی، عدم تأمین مواد آلی و عناصر غذایی مورد نیاز گیاه، عدم کاشت بنه استاندارد و تاریخ کاشت می‌باشد (رمضانی و همکاران، 1399). تنش رطوبتی یکی از مهمترین عوامل کاهش عملکرد ماده خشک به‌ویژه عملکرد اقتصادی در زعفران می‌باشد (ثابت‌تیموری و همکاران، 1389).

خشکی می‌تواند طیف وسیعی از واکنش‌های اساسی فیزیولوژیکی و متابولیکی را که در تنظیم رشد و عملکرد گیاه نقش دارند، مختل کند. تنش خشکی باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) از جمله پراکسید هیدروژن (H2O2)، رادیکال هیدروکسیل (OH) و آنیون سوپراکسید (O_2^-) می‌شود، که منجر به آسیب اکسیداتیو رنگیزه‌های فتوسنتزی، متابولیسم سلولی و ماکرومولکول‌هایی چون لیپیدهای غشایی، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌شود (قربانپور و همکاران، 2020). سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی متشکل از آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی باعث کاهش مؤثر اثرات منفی گونه‌های فعال اکسیژن می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها مولکول‌های ویژه‌ای هستند که از اکسیداسیون سایر مولکول‌ها توسط گونه‌های فعال اکسیژن جلوگیری می‌کنند و به عنوان سپر دفاعی گیاهان در برابر آسیب اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن عمل می‌کنند (اسلام و همکاران، 2015). سوپراکسید دسموتاز (SOD)، پراکسیداز (POD) و کاتالاز (CAT) مهمترین سیستم آنزیمی برای حذف گونه‌های فعال اکسیژن و مهمترین پارامتر برای اندازه‌گیری مقاومت به تنش در گیاهان می‌باشد (دیو و همکاران، 2020). بسیاری از مطالعات گزارش کرده‌اند که تنش اکسیداتیو حاصل از خشکی نقش ویژه‌ای در تخریب سامانه فتوسنتزی، تخریب غشای سلولی و کلروپلاستی و کاهش کلروفیل a و b دارد (رسام و همکاران، 1393). تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که یک سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی کاملا هماهنگ می‌تواند ظرفیت سمیت بیش از اندازه گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش داده و به محافظت از سلول در برابر آسیب اکسیداتیو و افزایش تحمل به خشکی گیاهان کمک کند (ژنگ و همکاران، 2018). کوماری و همکاران (2018) افزایش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز و پراکسیداز را در واکنش به تنش خشکی در ارقام مختلف گیاه ماش (*Vigna radiata*) و مالکی و همکاران (2011) آنزیم سوپراکسید دسموتاز در برگ، ریشه و پیاز زعفران گزارش نمودند.

پرولین یک اسید آمینه غیر پروتئینی است که به‌عنوان محافظ اسمزی (یامچی و همکاران، 1383) در ایجاد و حفظ فشار اسمزی درون گیاه نقش مؤثری داشته و در شرایط تنش، تولید و تجمع آن از سایر اسیدهای آمینه بیشتر بوده و به‌عنوان منبع ذخیره ازت و کربن عمل می‌کند. دلیل تجمع پرولین در تنش خشکی، افزایش سنتز آن در اثر کاهش اکسیداسیون گلوتامات و همچنین کاهش مصرف آن برای سنتز پروتئین‌ها به خاطر توقف رشد گیاه می‌باشد (فتحی و همکاران، 1398). مطالعات انجام شده توسط ژنگ و همکارن (2019) در گیاه کاتوس (*Cynanchum thesioides*) و دیو و همکارن (2020) در سویا (*Glycine max*) نشان داد تنش خشکی موجب افزایش معنی‌دار مقدار پروتئین محلول و پرولین می‌شود.

پایداری در سیستم‌های کشاورزی بر لزوم توسعه فناوری‌ها و روش‌هایی متمرکز است که اثر سوئی بر محیط‌زیست نداشته (پرتی، 2007) و منجر به بهبود

بازده اقتصادی و تولید بیشتر برای حفظ مشاغل کشاورزی شود (معروفی و همکاران، 1388). استفاده از کودهای آلی و زیستی به‌دلیل بهبود مواد آلی خاک، زیست‌توده و فعالیت میکروبی خاک و افزایش مقاومت خاک در برابر فرسایش می‌تواند یک جایگزین مناسب برای تداوم تولید محصولات کشاورزی با حداکثر صرفه اقتصادی و حداقل آسیب به محیط‌زیست باشد (دباغیان و همکاران، 1394 و تودان و همکاران، 2015). بیوچار که در کشاورزی به طلای سیاه مشهور است، از طریق فرآیند گرماکافت ترکیبات آلی تولید شده (اختر و همکاران، 2014) و به‌دلیل سطح ویژه، ساختار آروماتیک و نسبت O/C و H/C پایین دارای ثبات بالا بوده (برگمن و همکاران، 2014) و تجزیه آن نسبت به دیگر مواد آلی در خاک بسیار کند می‌باشد، در نتیجه می‌تواند سال‌های متمادی در خاک باقی بماند (100- 1000 سال). علاوه براین به‌دلیل توانایی بالای آن در جذب و نگهداری عناصر غذایی به‌ویژه نیتروژن و فسفر و جلوگیری از آبشویی آنها موجب بهبود رشد و عملکرد گیاهان می‌شود (برک و همکاران، 2011). بسیاری از تحقیقات نشان داده‌اند که ورمی‌کمپوست از جمله مناسب‌ترین منابع غیرشیمیایی تغذیه گیاهی می‌باشد که موجب بهبود عملکرد در زعفران به دلیل افزایش دسترسی به عناصر غذایی می‌شود (سیدی و همکاران، 2018 و امینی‌فرد و همکاران، 1398).

استراتژی حفظ رشد و نمو گیاهان در شرایط تنش خشکی را می‌توان با ارتباط بین ریشه گیاهان با قارچ میکوریز آربوسکولار و مدیریت آب تقویت کرد. میکوریز آربوسکولار به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و گسترده‌ترین انواع همزیستی، گسترش و تکامل گیاهان عالی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این همزیستی شامل مجموعه‌ای از فرآیندهای به هم پیوسته است که از یک سو تنش خشکی را از طریق جذب مستقیم آب و انتقال از طریق هیف‌های قارچی به گیاه میزبان کاهش می‌دهد و ازسوی دیگر سبب افزایش جذب عناصر غذایی و سرعت فتوسنتز خالص در گیاه میزبان می‌شود (بدر و همکاران، 2020). علاوه براین قارچ‌های میکوریز با تأثیر بر پایداری خاکدانه‌ها باعث سهولت حرکت آب در خاک و افزایش ظرفیت نگهداری آب و جلوگیری از آبشویی عناصر غذایی می‌شوند (یانگ و همکاران، 2015). هاشم و همکاران (2019) گزارش کردند که تنش خشکی محتوای نسبی آب و شاخص پایداری غشا را در گیاه نخود (*Cicer arietinum* L.) کاهش داد، در حالی که تیمار مصرف بیوچار و قارچ میکوریز آربوسکولار به صورت جداگانه یا ترکیب با هم اثرات مخرب تنش خشکی را تا حد قابل توجهی کاهش دادند و سبب افزایش مقدار این صفات در آبیاری نرمال شدند. این مطالعه به‌منظور ارزیابی پتانسیل گونه‌های بومی قارچ میکوریز آربوسکولار در دو خاک تیمار شده با بیوچار و ورمی‌کمپوست در شرایط تنش قطع آبیاری بر محتوای متابولیت‌های تنشی در زعفران انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی اسپور قارچ‌های میکوریز آربوسکولار

نمونه‌برداری از خاک برای جداسازی قارچ میکوریز آربوسکولار در پایان فصل رشد گیاه به‌صورت مرکب از عمق صفر تا 30 سانتی‌متری خاک و در جهت قطر مزرعه در دو شهرستان قائنات و نیشابور به‌ترتیب دارای اقلیم خشک و نیمه خشک در استان خراسان جنوبی و شمالی انجام شد. برای به‌دست آوردن حداکثر تنوع گونه‌ای نمونه‌برداری در مزارعی با فاصله حداقل دو کیلومتر از یکدیگر انجام شد. در مجموع 36 نمونه تهیه و پس از هوا خشک شدن به آزمایشگاه بیولوژی مؤسسه تحقیقات خاک و آب واقع در شهرستان کرج منتقل و در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری شد. با استفاده از استریومیکروسکوپ (x 200)، تعداد هشت جدایه قارچ میکوریز آربوسکولار به روش الک مرطوب و سانتریفوژ در محلول ساکارز 60 درصد، بر اساس ویژگی‌های ظاهری اسپورها شامل رنگ، اندازه، شکل دیواره و نحوه اتصال هیف به دیواره و به‌صورت مورفوتایپ‌های متمایز جداسازی شدند (گردمان و نیکولسن، 1963). برای تهیه

تعداد زیادی اسپور سالم جهت شناسایی و خالص‌سازی و تولید مایه تلقیح اقدام به برقراری کشت تله گلدانی شد. در کشت تله که با گیاه ذرت و در بستر ماسه و در شرایط کاملا استریل انجام گردید از 100 اسپور از هر جدایه برای تلقیح استفاده شد. گیاهان در شرایط گلخانه در دمای 30 درجه سانتی‌گراد و 14 ساعت دوره نوری نگهداری شدند. در پایان سه ماه بخش هوایی گیاه حذف و ریشه‌ها رنگ‌آمیزی شده و جهت اثبات برقراری رابطه همزیستی با استفاده از استریومیکروسکوب بررسی شدند. در نهایت تعداد دو جدایه که دارای رابطه همزیستی موفق و تعداد کافی اسپور بودند، برای شناسایی مولکولی انتخاب و محتویات گلدان‌ها شامل بستر، اسپورها، هیف و ریشه‌های میکوریزی کاملاً با هم مخلوط و به عنوان مایه تلقیح در کشت زعفران استفاده شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

ابتدا اسپورها به روش اسرینواسان (2014) استریل و سپس استخراج DNA از اسپور به روش سمانزیک و همکاران (2014) انجام شد. پس از استخراج DNA به آن دو میکرولیتر بافر PCR اضافه و نمونه‌ها برای واسرشت‌سازی اولیه به مدت 15 دقیقه در دمای 94 درجه سانتی‌گراد در ترموسایکلر (Techne, Genius FGEN02TP, USA) گذاشته شدند. PCR به صورت آشیانه‌ای و با کمی تغییر انجام شد (رنکر و همکاران، 2003). برای تکثیر ناحیه ژنی SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU در قارچ میکوریز آربوسکولار از جفت آغازگرهای SSUmAf و LSUmAr در مرحله اول و جفت آغازگرهای SSUmCf و LSUmBr در مرحله دوم PCR (جدول 1) استفاده شد. واکنش تکثیری در PCR اول و دوم برای یک نمونه به‌ترتیب 20 و 50 میکرولیتر بود که در PCR اول شامل 16/8 میکرولیتر آب مقطر استریل، 0/4 میکرولیتر $dNTP_s$، 0/24 میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مرحله اول و 0/32 میکرولیتر از Pfu DNA polymerase، و در PCR دوم، 39/2 میکرولیتر آب مقطر استریل، پنج میکرولیتر بافر PCR، یک میکرولیتر $dNTP_s$، یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای مرحله دوم، 0/8 میکرولیتر از Pfu DNA polymerase و دو میکرولیتر از محصول PCR اول بود. برنامه دمایی در هر دو PCR یکسان و شامل واسرشتگی اولیه، 4 دقیقه در دمای ^{o}C 94 و 30 چرخه (واسرشتگی 60 ثانیه در دمای ^{o}C 94، اتصال آغازگر 60 ثانیه در دمای ^{o}C 58، بسط 120 ثانیه در دمای ^{o}C 72) و بسط نهایی 7 دقیقه در دمای ^{o}C 72 بود. پس از اتمام واکنش 6 میکرولیتر از محصول مرحله دوم PCR با 3 میکرولیتر بافر لودینگ روی ژل آگارز 1/2 درصد الکتروفورز گردید و اندازه هر محصول به کمک نشانگر مولکولی (bp1500) تخمین زده شد. توالی‌های به‌دست آمده با استفاده از ابزار جستجوی BLAST با سایر توالی-های موجود در بانک ژن NCBI (National Center for Biotechnology Information) مورد مقایسه قرار گرفتند.

مطالعات گلدانی پژوهش

به منظور بررسی اثر قارچ میکوریز آربسکولار جداسازی شده بر صفات فیزیولوژیک زعفران در خاک تیمار شده با بیوچار و ورمی‌کمپوست در شرایط تنش قطع آب، آزمایشی به‌صورت اسپلیت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار در طی سال‌های 99 - 1397 در مؤسسه تحقیقات خاک و آب واقع در شهرستان کرج اجرا شد. تیمارها شامل رژیم آبیاری به‌عنوان عامل اصلی در سه سطح [آبیاری مطلوب، قطع آبیاری در ابتدای فصل رشد یا مرحله ظهور برگ‌ها (محدودیت ملایم آبی) و قطع آبیاری در ابتدا و اواسط فصل رشد یا مرحله ظهور برگ‌ها و افزایش وزن بنه‌ها (محدودیت شدید آبی)]، کود آلی در سه سطح [عدم مصرف کود آلی، ورمی‌کمپوست (20 تن در هکتار) و بیوچار (10 تن در هکتار) و قارچ میکوریز در سه سطح عدم مصرف قارچ میکوریز، مصرف جدایه a و جدایه b] به‌عنوان عامل فرعی در نظر گرفته شد.

جدول 1- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه

آغازگر	توالی
SSUmAf1	5’-TGGGTAATCTTTTGAAACTTYA-3’
SSUmAf2	5’-TGGGTAATCTTRTGAAACTTCA-3’
SSUmCf1	5’-TCGCTCTTCAACGAGGAATC-3’
SSUmCf2	5’-TATTGTTCTTCAACGAGGAATC-3’
SSUmCf3	5’-TATTGCTCTTNAACGAGGAATC-3’
LSUmAr1	5’-GCTCACACTCAAATCTATCAAA-3’
LSUmAr2	5’-GCTCTAACTCAATTCTATCGAT-3’
LSUmAr3	5’-TGCTCTTACTCAAATCTATCAAA-3’
LSUmAr4	5’-GCTCTTACTCAAACCTATCGA-3’
LSUmBr1	5’-DAACACTCGCATATATGTTAGA-3’
LSUmBr2	5’-AACACTCGCACACATGTTAGA-3’
LSUmBr3	5’-AACACTCGCATACATGTTAG-3’
LSUmBr4	5’-AAACACTCGCACATATGTTAGA-3’
LSUmBr5	5’-AACACTCGCATATATGCTAGA-3’

در این آزمایش گلدان‌هایی به عمق 30 و قطر 26 سانتی‌متر و گنجایش 15 کیلوگرم درنظرگرفته شد. ورمی‌کمپوست و بیوچار به‌ترتیب به‌مقدار پنج و 2/5 گرم در کیلوگرم خاک به خاک الک شده گلدان‌ها اضافه شد. بیوچار باگاس نیشکر از شرکت نوآوران زیست بنیان آویسا و ورمی‌کمپوست بقایای گیاهی از موسسه تحقیقات خاک و آب تهیه شد. نتایج حاصل از تجزیه خاک و نهاده‌های آلی استفاده شده در این بررسی در جدول 2 ارایه شده است. جمعیت قارچ میکوریز در هر گرم خاک و مایه تلقیح مورد استفاده به‌ترتیب حاوی 21 و 630 عدد اندام فعال قارچ بود که به روش دالپی (1993) شمارش شدند. کاشت در تاریخ 29 شهریور 1397 انجام شد. ابتدا نصف ارتفاع گلدان از خاک پر شده، بعد مایه تلقیح به مقدار 5 گرم برای هر گلدان به‌صورت یک لایه در مرکز بستر قرار گرفته و سپس تعداد چهار عدد بنه (میانگین وزن بنه بین 8 تا 11 گرم) روی مایه تلقیح قرار داده و در نهایت بخش دوم خاک به آن اضافه شد. گلدان‌ها در هوای آزاد قرار داده شدند. در شرایط آبیاری کامل، آبیاری به صورت یکنواخت هر 15 روز یک‌بار انجام شد و در فاکتور قطع آبیاری در اوایل فصل رشد قطع آب در 5 آذر (قطع یک دور آبیاری) و در عامل قطع آب در اوایل و اواسط فصل رشد در 5 آذر و 20 اسفند (قطع دو دور آبیاری) انجام شد. قبل و بعد از اتمام دوره قطع آب (یک‌ماهه)، آبیاری به صورت منظم انجام شد. با توجه به احتمال وقوع بارندگی در زمان قطع آبیاری از پوشش پلاستیکی برای جلوگیری از ریزش باران روی گلدان‌ها استفاده شد. عملیات آبیاری و اعمال تنش قطع آب در سال دوم همانند سال نخست انجام گرفت.

جدول 2- ویژگی‌های بیوچار، ورمی‌کمپوست و خاک مورد استفاده در آزمایش

	بافت	pH	هدایت الکتریکی ($dS\ m^{-1}$)	نسبت C/N	خاکستر	کربن آلی (%)	نیتروژن (%)	فسفر ($mg\ kg^{-1}$)	پتاسیم ($mg\ kg^{-1}$)
خاک	لوم رسی	8/4	1/4	-	-	0/68	0/08	11/5	142
بیوچار	-	7/5	0/84	249/3	5/6	69/7	0/279	459	2568
ورمی‌کمپوست	-	7/8	2/8	-	-	26/9	1/84	13200	15400

اندازه‌گیری کلنیزاسیون ریشه

برداشت ریشه در پایان دوره رشد ریشه‌ها در اوایل دی ماه یعنی پس از تخلیه کامل رطوبت بنه‌ها انجام شد. در زعفران به‌دلیل تحلیل رشد ریشه از دی ماه و از بین رفتن کامل آن در فروردین، کلنیزاسیون ریشه تحت تأثیر سطح سوم تنش قرار نگرفته و اندازه‌گیری آن با دوسطح تنش انجام شد (ثابت تیموری و همکاران، 1389 و کاسر و همکاران، 2019). درصد کلونیزاسیون ریشه بوسیله روش نوریس و همکاران (1992) تعیین شد.

اندازه‌گیری رنگیزه‌های فتوسنتزی: اندازه‌گیری محتوای کلروفیل a، b، کل و کارتنوئید بر اساس روش آرنون (1949) و از طریق ساییدن 0/2 گرم نمونه برگی در استن 80 درصد و قرائت جذب نور در طول موج‌های 652/4، 665/2 و 470 انجام شد

تعیین مقدار پروتئین محلول و آنزیم‌های آنتی اکسیدان

برای استخراج عصاره‌ی گیاهی مقدار 0/2 گرم نمونه برگی را در ازت مایع در هاون کاملاً پودر کرده سپس پودر حاصل به میکروتیوپ 2 میلی‌لیتر منتقل و 1800 میکرولیتر بافر فسفات به آن اضافه شد. همگن‌های حاصل به مدت 18 دقیقه در دمای 4 درجه‌ی سانتی‌گراد با سرعت 20000 دور سانتریفوژ شد. در نهایت محلول رویی از بخش ته‌نشین شده جدا و برای سنجش پروتئین محلول به روش بردفورد (1976) و فعالیت آنزیم‌های کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز به‌ترتیب به روش‌های ابی (1984)، تنگ و نیوتن (2005) و بیوچامپ و فریدویچ (1971) مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری پرولین

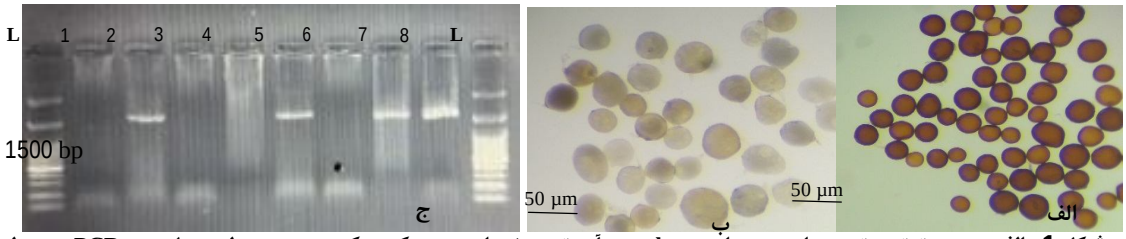
به‌منظور اندازه‌گیری پرولین با روش بیتس و همکاران (1973) مقدار 0/5 گرم از نمونه‌های تر برگ با نیتروژن مایع درون هاون ساییده و در 10 میلی‌لیتر اسید سولفوسالیسیلیک 3 درصد هموژنیزه شد. ماده همگن حاصل را با دور 15000 دور به‌مدت 15 دقیقه در دمای 4 درجه‌سانتی‌گراد با سانتریفوژ یخچال‌دار (مدل KUBOTA-6900) سانتریفوژ نموده تا مواد اضافی از محلول جدا شود. سپس 1 میلی‌لیتر از روشناور حاصل را به لوله‌های آزمایش منتقل نموده و به همه لوله‌ها 1 میلی-لیتر اسید استیک گلاسیال و 1 میلی‌لیتر اسید نین‌هیدرین اضافه شد. ترکیب حاصل به‌مدت 1 ساعت در حمام گرم و در دمای 100 درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. پس از این مرحله برای پایان یافتن واکنش، لوله‌های آزمایش در داخل یک بستر یخی قرار گرفته و 2 میلی‌لیتر تولوئن به هر لوله اضافه و به مدت 20 ثانیه ورتکس شد. سرانجام فاز رویی که به رنگ قرمز درآمده و حاوی پرولین محلول در تولوئن بوده را برداشته و همزمان با نمونه‌های استاندارد، با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج 520 نانومتر در مقایسه با شاهد که محتوی تولوئن بود قرائت شد؛ و در نهایت با توجه به منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف پرولین، میزان پرولین نمونه‌ها بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن تر محاسبه شد.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS (9.1) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

شناسایی مولکولی

نتایج حاصل از تکثیر ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU منجر به شناسایی قطعه‌ای ژنومی به طول 1500 جفت‌باز شد (کروگر و همکاران، 2009) که پس از بررسی در بانک ژن NCBI نشان داد که جدایه a با شماره دسترسی MW254988 و جدایه b با شماره دسترسی MW254990 متعلق به گونه *Rhizophagus irregularis* می‌باشد.



شکل 1- الف و ب به ترتیب تصویر اسپور جدایه a و b درون آب تحت نور استریو میکروسکوپ. ج محصول مرحله دوم PCR روی ژل آگارز 1/2 درصد، L: نشانگر، 4- 1: جدایه a، 7- 5: جدایه b و 8: شاهد

درصد کلنیزاسیون ریشه

درصد کلنی‌زایی ریشه تحت تأثیر معنی‌دار برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* قرار گرفت ($p\leq0.01$) (جدول 3). در صفت درصد کلنی-زایی ریشه هر دو جدایه موجب افزایش این صفت شدند به‌طوری‌که بین دو جدایه در تیمار بیوچار و در هر دو سطح آبیاری تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد؛ اما در تیمار ورمی‌کمپوست در شرایط آبیاری مطلوب جدایه b بهتر از جدایه a عمل کرد. بر اساس نتایج مقایسه میانگین بیشترین درصد کلنی‌زایی ریشه در گلدان در تیمار آبیاری مطلوب به‌همراه بیوچار و جدایه b (98/7 درصد) به‌دست آمد که با تیمارهای آبیاری مطلوب به‌همراه بیوچار و جدایه a، آبیاری مطلوب به‌همراه ورمی‌کمپوست و جدایه b، محدودیت ملایم آبی به‌همراه بیوچار و جدایه a و b و محدودیت ملایم آبی به‌همراه ورمی‌کمپوست و جدایه b تفاوت آماری نداشت. همچنین کمترین درصد کلنی‌زایی ریشه برای تیمار محدودیت ملایم آبی و عدم مصرف کود آلی و قارچ میکوریز (47/4 درصد) بود (جدول 4)؛ که این نتایج با مطالعه میکان و همکاران (2016) در برهمکنش بیوچار و قارچ میکوریز در شرایط تنش خشکی بر کلنیزاسیون ریشه گیاه شبدر (*Trifolium subterraneum*) مطابقت دارد، اما با نتایج لیو و همکاران (2017) در گیاه سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) کاملا تفاوت دارد. تلقیح بنه‌های زعفران با قارچ *R. intraradis* به‌صورت منفرد و ترکیب با قارچ *F. mosseae* در شرایط تنش خشکی نشان داد تلقیح با هر دو گونه بالاترین درصد کلنی‌زایی ریشه (100 درصد) را نسبت به کاربرد قارچ *R. intraradis* به‌صورت تنها (82 درصد) داشت (کاسر و همکاران، 2018).

محتوای کلروفیل

براساس نتایج به دست آمده برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* اثر معنی‌داری بر محتوای کلروفیل a، b و کل داشت ($p\leq0.01$) (جدول 3).

محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی با افزایش سطوح قطع آبیاری در همه تیمارها کاهش یافت این در حالی بود که تلقیح با هر دو جدایه *R. irregularis* در تمام تیمارهای کود آلی اثر مثبتی بر محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی نسبت به شاهد داشت. به طوری که تیمار محدودیت شدید آب و عدم مصرف کود آلی و قارچ میکوریز حداقل مقدار کلروفیل a، b و کل را داشت که نسبت به تیمار آبیاری مطلوب به همراه ورمی‌کمپوست با جدایه b که حداکثر مقدار کلروفیل a، b و کل را به خود اختصاص داد به‌ترتیب 117، 233 و 146 درصد کاهش یافت (جدول4). مطالعه پژوهشگران بر روی گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) نشان داد که تلقیح با قارچ میکوریز به تنهایی و یا به‌صورت ترکیب با ورمی-کمپوست موجب افزایش قابل‌توجه محتوای کلروفیل a و b و کاروتنوئید نسبت به شاهد شد (نیکاه نائینی و همکاران، 2017). محتوای کلروفیل با مقدار عناصر جذب شده توسط گیاه از خاک ارتباط مستقیم دارد و به دلیل اینکه ورمی‌کمپوست حاوی عناصر غذایی ماکرو و میکرو می‌باشد می‌تواند اثر مثبتی بر تغذیه گیاهی، فتوسنتز و مقدار کلروفیل برگ داشته باشد (فیاضی و همکاران، 1397). اختر و همکاران (2015) افزایش محتوای کلروفیل برگ در گیاهان میکوریزی و غیرمیکوریزی گوجه‌فرنگی رشد یافته در بستر کمپوست + بیوچار گزارش کردند. شنگ و همکاران (2008) دلیل همبستگی مثبت بین محتوای کلروفیل و قارچ میکوریز در گیاه ذرت (*Zea mays*) را افزایش جذب عناصر غذایی به ویژه منیزیم معرفی کرده‌اند. کاهش میزان کلروفیل a، b و کل در شرایط تنش کم‌آبی توسط ثابت‌تیموری و همکاران (1389) در زعفران و توسط اصلانی و همکاران (1390) در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) گزارش شده است.

جدول 3- نتایج تجزیه واریانس رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* بر کلنیزاسیون ریشه و ترکیبات بیوشیمیایی در زعفران

منابع تغییر	درجه آزادی	کلنیزاسیون ریشه	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	کاروتنوئید	کاتالاز	گایاکول پراکسیداز	سوپراکسیداز دسموتاز	پروتئین محلول	پرولین
آبیاری	2	38/5**	36524/2**	294/8**	1598/5**	6167/8**	1980/9**	1430/6**	5714/2**	6/063E3**	3/481E5**
آبیاری × تکرار	6	0/563	1/43	1/41	1/26	1/08	0/806	1/65	2/33	2/34	1/76
کود آلی	2	379/45**	968/2**	429/04**	1045/1**	873/9**	63/8**	115/5**	615/6**	964/08**	2/253E3**
قارچ میکوریز	2	3629/7**	368/3**	103/9**	282/1**	204/7**	76/7**	39/8**	171/3**	202/4**	488/6**
آبیاری × کود آلی	4	1/25^{ns}	17/95**	4/65**	1/93^{ns}	21/3**	2/9*	18/3**	20/1**	58/19**	56/12**
آبیاری × میکوریز	4	4/71**	8/93**	4/81**	3/3*	16/5**	2/87*	1/99^{ns}	17/22**	3/82**	18/48**
کود آلی × میکوریز	4	2/33^{ns}	8/83**	5/34**	8/88**	5/3**	2/63*	2/96*	8/99**	14/42**	12/51**
آبیاری × کود آلی × میکوریز	8	4/4**	3/2**	6/71**	7/95**	15/8**	3/52**	9/39**	3/93**	21/002**	29/33**
خطای فرعی	48	2/248	0/009	0/002	0/001	0/006	9/22	0/116	0/008	0/008	0/001
ضریب تغییرات (%)		1/9	5/6	1/1	2/2	1/6	5/2	2/1	1/2	1/5	3/6

ns، * و** به ترتیب نبود اختلاف معنی‌دار و اختلاف معنی‌دار در سطح پنج و یک درصد

کاروتنوئید

یافته‌های حاصل از این پژوهش نشان داد اثر برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* بر محتوای کاروتنوئید معنی‌دار شد ($p\leq0.01$) (جدول 3). با افزایش سطوح قطع آبیاری محتوای کاروتنوئید در همه تیمارها کاهش یافت. در تمام سطوح رطوبتی کاربرد کودهای آلی و قارچ میکوریز موجب افزایش محتوای کاروتنوئید نسبت به شاهد شد، به نحوی که حداکثر و حداقل مقدار کاروتنوئید به ترتیب با میانگین 0/991 و 0/105 میلی‌گرم در گرم وزن تر در تیمارهای آبیاری مطلوب به همراه ورمی‌کمپوست با جدایه b و محدودیت شدید آب و عدم مصرف کود آلی و قارچ میکوریز حاصل شد (جدول 4) چن و همکاران (2020) گزارش کردند در شرایط تنش خشکی محتوای کاروتنوئید در گیاهچه‌های پیچ‌اناری (*Catalpa bungei*) تلقیح شده با قارچ میکوریز آربوسکولار بیشتر از گیاهان تلقیح نشده بود. همچنین بین قارچ میکوریز با محتوای کلروفیل و کاروتنوئید همبستگی مثبت و معنی‌داری وجود داشت که نقش مثبت قارچ میکوریز در تولید رنگدانه‌های فتوسنتزی را تأیید می‌کند. ضیایی و همکاران (1396) کاهش میزان کاروتنوئید در شرایط تنش کم‌آبی در ارقام مختلف ماش (*Vigna radiate* L.) را به دلیل اکسید شدن رنگدانه‌های فتوسنتزی توسط اکسیژن فعال و تخریب ساختار آنها نسبت داده‌اند.

آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان

بر اساس یافته‌ها برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* اثر معنی‌داری بر فعالیت آنزیم کاتالاز، گایاکول پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز داشت ($p\leq0.01$) (جدول 3). مقایسه میانگین داده‌های مربوط به آنزیم کاتالاز (جدول 5) نشان می‌دهد که در آبیاری مطلوب بین تیمارها تفاوت معنی‌داری از لحاظ مقدار آنزیم وجود ندارد اما با افزایش قطع آبیاری فعالیت آنزیم افزایش یافت و تلقیح با دو جدایه قارچ *R. irregularis* در همه تیمارها بر فعالیت آنزیم کاتالاز اثر مثبت داشت. در بین تیمارها تیمار محدودیت شدید آبی به همراه بیوچار و ورمی‌کمپوست با جدایه b حداکثر مقدار کاتالاز داشت که نسبت به تیمار آبیاری مطلوب و عدم کاربرد کود آلی و قارچ میکوریز که حداقل مقدار کاتالاز را دارا بود 253 و 241 درصد افزایش داشت. در آنزیم‌های پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز قطع آبیاری بر فعالیت این آنزیم‌ها افزود. بیشترین مقدار پراکسیداز در تیمار محدودیت شدید آبی با جدایه b و a به‌همراه بیوچار مشاهده شد که نسبت به تیمار آبیاری مطلوب و عدم کاربرد کود آلی و قارچ میکوریز که کمترین مقدار این صفت را داشت به‌ترتیب 82 و 81 درصد افزایش نشان داد. در صفت سوپراکسید دسموتاز بیشترین مقدار این آنزیم در تیمار محدودیت شدید آبی به‌همراه بیوچار در هر دو جدایه به‌دست آمد که نسبت به شاهد به‌ترتیب 95 و 94 درصد افزایش داشت.

مطالعات نشان می‌دهند گیاهان مقاوم به تنش محیطی می‌توانند از طریق سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی با تنش‌های محیطی مقابله کنند، به‌طوری‌که افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌ها مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی را افزایش می‌دهد (رضایی‌نیا و همکاران، 1398). نتایج واکنش گیاه کتان (*Linum Usitatissimum* L.) به کاربرد کود سبز، ورمی‌کمپوست و قارچ *R. irregularis* در تنش خشکی نشان داد محدودیت آب باعث افزایش فعالیت کاتالاز، پراکسیداز و سوپراکسید دسموتاز شد، کاربرد قارچ به‌همراه مصرف یا عدم مصرف ورمی‌کمپوست موجب افزایش فعالیت هر سه آنزیم در شرایط تنش خشکی داشت (فلاح و همکاران، 2020).

جدول 4- مقایسه میانگین برهمکنش رژیم آبیاری، بستر کاشت و قارچ *R. irregularis* بر کلنیزاسیون ریشه و محتوای رنگیزه‌های فتوسنتزی در زعفران

آبیاری	کود آلی	قارچ میکوریز آربوسکولار	کلنیزاسیون ریشه (%)	کلروفیل a ($mgg^{-1}FW$)	کلروفیل b ($mgg^{-1}FW$)	کلروفیل کل ($mgg^{-1}FW$)	کاروتنوئید ($mgg^{-1}FW$)
		عدم مصرف	48/7^{i}	0/922^{g}	0/301^{jkl}	1/22^{fg}	0/698^{f}
	عدم مصرف	جدایه a	85/5^{d}	0/935^{f}	0/352^{hij}	1/28^{ef}	0/831^{d}
		جدایه b	86/3^{d}	0/958^{e}	0/401^{fgh}	1/35^{cde}	0/834^{d}
		عدم مصرف	58/6^{g}	0/997^{c}	0/482^{bcd}	1/47^{bcd}	0/966^{ab}
I_1	ورمی‌کمپوست	جدایه a	93/1^{c}	1/02^{ab}	0/512^{ab}	1/53^{ab}	0/984^{a}
		جدایه b	97/5^{a}	1/03^{a}	0/551^{a}	1/58^{a}	0/991^{a}
		عدم مصرف	65/2^{f}	0/960^{e}	0/452^{cdef}	1/41^{cd}	0/852^{d}
	بیوچار	جدایه a	98/3^{a}	0/994^{d}	0/478^{bcde}	1/47^{bcd}	0/882^{cd}
		جدایه b	98/7^{a}	1/01^{b}	0/506^{abc}	1/51^{bc}	0/929^{bc}
		عدم مصرف	47/4^{j}	0/713^{m}	0/295^{jkl}	1/01^{klm}	0/225^{l}
	عدم مصرف	جدایه a	82/9^{e}	0/716^{m}	0/324^{ijk}	1/04^{ijk}	0/389^{jk}
		جدایه b	85/3^{d}	0/733^{l}	0/336^{ijk}	1/06^{hij}	0/447^{i}
		عدم مصرف	55/4^{h}	0/764^{j}	0/414^{fg}	1/18^{gh}	0/702^{f}
I_2	ورمی‌کمپوست	جدایه a	94/4^{bc}	0/800^{h}	0/424^{efg}	1/22^{fg}	0/719^{f}
		جدایه b	96/1^{ab}	0/807^{h}	0/439^{def}	1/25^{efg}	0/775^{e}
		عدم مصرف	59/8^{g}	0/752^{k}	0/349^{hij}	1/11^{hi}	0/535^{h}
	بیوچار	جدایه a	96/7^{ab}	0/769^{j}	0/376^{ghi}	1/14^{ghi}	0/638^{g}
		جدایه b	97/3^{a}	0/787^{i}	0/379^{ghi}	1/18^{gh}	0/690^{fg}
		عدم مصرف	-	0/475^{t}	0/165^{o}	0/640^{p}	0/105^{m}
	عدم مصرف	جدایه a	-	0/496^{s}	0/220^{mn}	0/716^{o}	0/132^{m}
		جدایه b	-	0/504^{rs}	0/229^{mn}	0/733^{o}	0/233^{l}
		عدم مصرف	-	0/517^{qr}	0/294^{jkl}	0/811^{jklm}	0/441^{ij}
I_3	ورمی‌کمپوست	جدایه a	-	0/535^{o}	0/297^{jkl}	0/832^{jkl}	0/562^{h}
		جدایه b		0/559^{n}	0/303^{jkl}	0/862^{jk}	0/676^{fg}
		عدم مصرف	-	0/508^{qrs}	0/258^{lmn}	0/766no	0/275^{l}
	بیوچار	جدایه a	-	0/517^{pq}	0/264^{lmn}	0/781^{mn}	0/376^{k}
		جدایه b	-	0/529^{op}	0/278^{klm}	0/807^{lm}	0/438^{ij}

I_1: آبیاری مطلوب، I_2: محدودیت ملایم آبی و I_3: محدودیت شدید آبی. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک برمبنای آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (LSD 5%).

اثر مثبت کاربرد بیوچار در شرایط تنش رطوبتی در گیاه ذرت بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان توسط ستار و همکاران (2019) گزارشد شده است. هی و همکاران (2017) نشان دادند فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان ریشه و برگ گیاهچه‌های اقاقیا (*Robinia pseudoacacia* L.) تلقیح شده با قارچ *R. irregularis* بالاتر از گیاهچه‌های تلقیح نشده در هر دو شرایط رطوبتی بود. همچنین عالم و همکاران (2019) به اثر مثبت قارچ میکوریز در کاهش تنش اکسیداتیو و اثرات نامطلوب آن در گیاه ماش (*Vigna radiata*) اشاره کرده‌اند.

پروتئین محلول

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول 3) برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *R. irregularis* بر محتوای پروتئین محلول معنی‌دار شد ($p\leq0.01$). با افزایش سطوح قطع آبیاری مقدار پروتئین محلول افزایش یافت و این افزایش در گیاهان تلقیح شده با دو جدایه *R. irregularis* در تمام تیمارهای آلی بیشتر از شاهد بود، بر این اساس تیمار محدودیت شدید آب به همراه بیوچار

با جدایه b حداکثر مقدار پروتئین محلول با میانگین 3/46 میلی‌گرم در گرم وزن تر داشت این در حالی بود که تیمار آبیاری مطلوب و عدم مصرف کود آلی و قارچ میکوریز حداقل مقدار پروتئین محلول با میانگین 2/9 میلی‌گرم در گرم وزن تر را دارا بود (جدول 5). محققان افزایش پروتئین محلول با کاربرد قارچ میکوریز به‌همراه ورمی-کمپوست در گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) گزارش کرده‌اند (نیکاه نائینی و همکاران، 2017). همچنین بنابر گزارش بلترانو و رونکو (2008) در گندم (*Triticum aestivum*) محتوای پروتئین برگ در گیاهان میکوریزی و غیرمیکریزی در شرایط آبیاری نرمال تفاوت معنی‌داری باهم نداشت اما در شرایط تنش شدید آبی غلظت پروتئین محلول در گیاهان میکوریزی به‌طور معنی‌داری بیشتر از گیاهان غیرمیکوریزی بود. تنش آبی سبب هیدرولیز پروتئین‌های تیلاکوئیدی شده و تجزیه پروتئین‌های کلروپلاستی منبع با ارزشی برای اشکال قابل تحرک نیتروژن به محض ورود به شرایط تنش می‌باشد (قربانعلی و نیاکان، 1384). همچنین محققان گزارش کرده‌اند مدیریت تغذیه گیاه در شرایط تنش یکی از مسائل مهم در تولید محصولات گیاهی محسوب می‌شود (احمدیان و همکاران، 1390).

جدول 5- مقایسه میانگین برهمکنش رژیم آبیاری، بستر کاشت و قارچ *R. irregularis* بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین محلول و پرولین در برگ زعفران

آبیاری	کود آلی	قارچ میکوریز آربوسکولار	کاتالاز (Umg^{-1} pro min^{-1})	گایاکول پراکسیداز (Umg^{-1} pro min^{-1})	سوپراکسید دسموتاز ($Ug^{-1}FW$)	پروتئین ($mgg^{-1}FW$)	پرولین ($\mu molg^{-1}FW$)
		عدم مصرف	$0/94^{g}$	$11/56^{l}$	$5/31^{p}$	$2/89^{s}$	$0/451^{t}$
	عدم مصرف	جدایه a	$1/22^{g}$	$11/76^{l}$	$5/37^{p}$	$2/91^{r}$	$0/55^{s}$
		جدایه b	$1/23^{g}$	$11/93^{l}$	$5/49^{op}$	$2/92^{r}$	$0/571^{r}$
		عدم مصرف	$1/25^{g}$	$12/67^{k}$	$5/61^{no}$	$2/94^{q}$	$0/593^{q}$
I_1	ورمی‌کمپوست	جدایه a	$1/26^{g}$	$13/01^{jk}$	$5/7^{mno}$	$3/01^{p}$	$0/621^{p}$
		جدایه b	$1/32^{g}$	$13/17^{jk}$	$5/81^{lmn}$	$3/04^{n}$	$0/625^{p}$
		عدم مصرف	$1/25^{g}$	$13/37^{ij}$	$5/9^{klm}$	$3/05^{n}$	$0/612^{p}$
	بیوچار	جدایه a	$1/29^{g}$	$13/95^{hi}$	$5/99^{kl}$	$3/06^{n}$	$0/667^{n}$
		جدایه b	$1/39^{g}$	$14/31^{h}$	$6/08^{k}$	$3/08^{m}$	$0/681^{n}$
		عدم مصرف	$1/94^{f}$	$16/51^{g}$	$7/92^{j}$	$3/04^{n}$	$0/559^{rs}$
	عدم مصرف	جدایه a	$1/98^{f}$	$16/77^{fg}$	$8/17^{i}$	$3/14^{l}$	$0/645^{o}$
		جدایه b	$2/00^{f}$	$17/32^{ef}$	$8/32^{hi}$	$3/15^{kl}$	$0/665^{n}$
		عدم مصرف	$2/11^{f}$	$16/8^{fg}$	$8/56^{h}$	$3/15^{kl}$	$0/712^{m}$
I_2	ورمی‌کمپوست	جدایه a	$2/12^{f}$	$18/4^{bcd}$	$8/98^{fg}$	$3/16^{kl}$	$0/736^{l}$
		جدایه b	$2/42^{e}$	$18/53^{bc}$	$9/17^{ef}$	$3/17^{jk}$	$0/752^{k}$
		عدم مصرف	$2/06^{f}$	$17/8^{de}$	$8/84^{g}$	$3/15^{kl}$	$0/735^{l}$
	بیوچار	جدایه a	$2/45^{e}$	$18/52^{bc}$	$9/35^{de}$	$3/18^{ij}$	$0/767^{k}$
		جدایه b	$2/54^{e}$	$18/53^{bc}$	$9/53^{cd}$	$3/19^{h}$	$0/784^{j}$
		عدم مصرف	$2/49^{e}$	$18/3^{cd}$	$8/91^{g}$	$3/31^{g}$	$0/903^{i}$
	عدم مصرف	جدایه a	$2/73^{d}$	$18/56^{bc}$	$9/25^{e}$	$3/36^{f}$	$0/929^{h}$
		جدایه b	$2/81^{cd}$	$18/66^{bc}$	$9/27^{e}$	$3/37^{ef}$	$0/961^{g}$
		عدم مصرف	$2/80^{cd}$	$18/7^{bc}$	$9/36^{de}$	$3/38^{de}$	$1/011^{f}$
I_3	ورمی‌کمپوست	جدایه a	$2/96^{bc}$	$18/84^{bc}$	$9/63^{c}$	$3/39^{d}$	$1/092^{d}$
		جدایه b	$3/21^{a}$	$19/09^{b}$	$9/87^{b}$	$3/41^{c}$	$1/122^{c}$
		عدم مصرف	$2/83^{cd}$	$18/73^{bc}$	$9/39^{de}$	$3/44^{b}$	$1/072^{e}$
	بیوچار	جدایه a	$3/05^{b}$	$19/7^{a}$	$10/31^{a}$	$3/45^{ab}$	$1/157^{b}$
		جدایه b	$3/32^{a}$	$19/75^{a}$	$10/33^{a}$	$3/46^{a}$	$1/194^{a}$

I_1: آبیاری مطلوب، I_2: محدودیت ملایم آبی و I_3: محدودیت شدید آبی. در هر ستون میانگین‌های دارای حروف مشترک برمبنای آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (LSD 5%).

پرولین

نتایج تجزیه داده‌های به دست آمده در این بررسی نشان داد اثر برهمکنش رژیم آبیاری، کود آلی و قارچ *Rhizophagus irregularis* بر محتوای پرولین معنی‌دار شد ($p\leq0.01$) (جدول 3). محتوای پرولین در گیاهان تلقیح شده هم در شرایط رطوبتی مطلوب و هم قطع آبیاری در تیمارهای بیوچار و ورمی‌کمپوست بیشتر از شاهد بود. بر این اساس تیمارهای محدودیت شدید آبی به‌همراه بیوچار با جدایه b و آبیاری مطلوب و عدم مصرف کود آلی و قارچ میکوریز به‌ترتیب حداکثر و حداقل مقدار پرولین با میانگین 1/194 و 0/451 میکرومول بر گرم وزن تر را داشتند (جدول 5). تجمع پرولین رابطه مثبت و مستقیم با افزایش مقاومت به خشکی در تنش‌های خشکی و شوری ایجاد شده در گیاهان دارد (کشاورزفرد و همکاران، 1399). فلاح و همکاران (2020) با کاربرد ورمی‌کمپوست و قارچ *R. Irregularis* در تنش خشکی در کتان گزارش کردند که بیشترین مقدار پرولین در تیمار مصرف توأم ورمی‌کمپوست و قارچ در شرایط تنش خشکی حاصل شد. بنابر گزارش کشاورزفرد و همکاران (1399) کاربرد بیوچار در شرایط تنش روی گیاه آهار (*Zinnia elegans*) تأثیر معنی‌داری بر مقدار پرولین نداشت در حالی که گزارش کامان و همکاران (2011) نشان داد کاربرد بیوچار در شرایط تنش بر روی گیاه کینوآ (*Chenopodium quinoa*) موجب کاهش مقدار پرولین شد. محققان سطوح بالایی از پرولین را در ریشه گیاه سویا (پورسل و ریز-لوزانو، 2005) و گیاهچه‌های رز (*Rosa hybrid* L.) (پینیور و همکاران، 2005) تلقیح شده با قارچ میکوریز آربوسکولار در مقایسه با گیاهان بدون تلقیح هم در شرایط رطوبتی مطلوب و هم تحت شرایط تنش خشکی گزارش کردند.

نتیجه‌گیری

به‌طور کلی نتیجه این بررسی نشان داد تلقیح هر دو جدایه موجب افزایش درصد کلنیزاسیون ریشه در تمام تیمارهای کود آلی شد. همچنین پاسخ تلقیح هر دو جدایه در تمام تیمارها به افزایش شدت تنش خشکی مثبت بود و موجب افزایش تولید کلروفیل، کاروتنوئید، آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان، پروتئین و پرولین در گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد شدند. علاوه بر این در بیشتر صفات اندازه‌گیری شده جدایه b به‌طور قابل توجهی بالاتر از جدایه a قرار داشت. همچنین در این پژوهش مشاهده شد که کاربرد قارچ *R. Irregularis* همراه با کودهای بیوچار و ورمی‌کمپوست در شرایط مختلف رطوبتی سبب افزایش چشمگیر عملکرد گل و کلاله و محتوای عناصر غذایی در زعفران شد. در این میان اثر جدایه b به‌همراه بیوچار در شرایط نرمال بر عملکرد گل و جذب عناصر غذایی به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از دیگر تیمارها قرار داشت (حبیبی و همکاران، 1400). با توجه به نتایج این تحقیق به‌نظر می‌رسد استفاده از کودهای آلی به‌همراه جدایه b در شرایط کمبود رطوبت خاک می‌تواند نقش به‌سزایی در تولید پایدار این گیاه داشته باشد. بنابراین کاربرد آنها در شرایط مزرعه‌ای نیز پیشنهاد می‌گردد تا پس از مشاهده واکنش گیاه، به این نتیجه رسید که امکان توصیه این تیمارها در شرایط مزرعه‌ای وجود دارد یا خیر.

فهرست منابع:

1. احمدیان، ا. قنبری، ا. و سیاه‌سر، ب. 1390. اثر تنش خشکی و مصرف انواع کود آلی و معدنی و بقایای آنها بر عملکرد و اجزای عملکرد بابونه آلمانی (*Matricaria chamomilla* L.). نشریه بوم شناسی کشاورزی. جلد 3، شماره 3، ص395 -383.

2. اصلانی، ز. حسنی، ع. رسولی صدقیانی، م.ح. سفیدکن، ف. و برین، م. 1390. تأثیر دو گونه قارچ آربوسکولار مایکوریزا بر رشد، مقادیر کلروفیل و جذب فسفر در گیاه ریحان (*Ocimum basilicum* L.) تحت شرایط تنش خشکی. فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران. جلد 27، شماره3، ص 486 -471.
3. امینی فرد، م.ح. افتاده فدافن، ع. مرادی نژاد، ف. و بهدانی، م .ع. 1398. بررسی تأثیر ورمی‌کمپوست و نیتروکسین بر ویژگی‌های بنه‌های دختری و عملکرد گل زعفران (*Crocus sativus* L.). نشریه زراعت و فناوری زعفران. جلد 7، شماره 2، ص 154 -139.
4. اسمی، ر. رضوانی مقدم، پ. کوچکی، ع.ر .و احمدیان، ا. 1397. اثر وزن بنه مادری و میزان کود گاوی بر عملکرد گل و بنه زعفران. نشریه زراعت و فناوری زعفران. جلد 6، شماره 4، ص 460 -445.
5. ثابت تیموری، م. کافی، م. اورسجی، ز. و اروجی، ک. 1389. اثر تنش خشکی، اندازه و پوشش بنه بر خصوصیات مورفو اکوفیزیولوژیکی زعفران (*Crocus sativus* L.) در شرایط گلخانه. بوم‌شناسی کشاورزی. جلد 2، شماره 2، ص 334-323.
6. حبیبی، م. زعفریان، ف. رجالی، ف. و باقری، ن. 1400. جداسازی و شناسایی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار همزیست زعفران و بررسی اثر آنها بر عملکرد گل و جذب عناصر غذایی در شرایط قطع آبیاری و بسترهای مختلف کشت. مجله به‌زراعی. جلد 23، شماره 3، ص 391 -379.
7. دباغیان، ز. پیردشتی، ه. عباسیان، ا. و بهاری، ح. 1394. تأثیر کودهای زیستی تیوباسیلوس، ازتوباکتر، آزوسپیریلوم و گوگرد آلی بر گره زایی و عملکرد سویا (*Glycine Max* L.). نشریه زراعت. جلد 107، ص 25 -17.
8. رسام، ق.ع. دادخواه، ع.ر. و خوشنود یزدی، ا. 1393. ارزیابی تأثیر کمبود آب بر صفات مورفولوژیک و فیزیولوژیک گیاه دارویی زوفا. نشریه دانش زراعت. جلد 5، شماره 10، ص 12 -1.
9. رضایی‌نیا، م. بی‌همتا، م.ر. پیغمبری، س.ع. و عباسی، ع. ر. 1398. تاثیر تنش خشکی بر فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی-اکسیدانی و صفات فیزیولوژیکی در ژنوتیپ‌های نخود (*Cicer Arietinum* L.). پژوهشنامه اصلاح گیاهان زراعی. جلد 11، شماره 30، ص 22 -11.
10. رضوانی‌مقدم، پ. کوچکی، ع.ر. ملافیلابی، ع. و سیدی س.م. 1393. اثر کودهای زیستی و شیمیایی بر عملکرد گل و بنه‌های دختری زعفران (*Crocus sativus* L.). مجله علوم زراعی ایران. جلد 15، شماره 3، ص 246 -234.
11. رمضانی، ا. آرویی، ح. عزیزی، م. و احمدیان، ا. 1399. ارزیابی تأثیر مدیریت آبیاری با کاربرد کود آلی و پلیمرهای ابر جاذب ریز ترکیب بر عملکرد اقتصادی و تولید مواد مؤثره در گیاه دارویی زعفران (*Crocus sativus* L.). نشریه زراعت و فناوری زعفران، جلد 8، شماره 1، ص 18 -3.
12. ضیایی، م. خزاعی، ح.ر. و نظامی، ا. 1396. بررسی اثر سطوح مختلف آبیاری بر صفات مورفوفیزیولوژیک و بیوشیمیایی در پنج ژنوتیپ ماش (*Vigna radiata* L.). فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی گیاهان زراعی.جلد 9، شماره 34، ص21-5.
13. فتحی، ح. ایمانی، ع. امیری، م.ع. حاجیلو، ج. و نیکبخت، ج. 1398. پاسخ‌های رشدی و بیوشیمیایی برخی ژنوتیپ‌های بادام روی پایه GN_{15} به‌تنش کم‌آبیاری. فرآیند و کارکرد گیاهی. جلد 8، شماره 29، ص 30- 15.
14. فیاضی، ح. ابدالی مشهدی، ع. کوچک‌زاده، ا. پاپ‌زن، ع. و ارزانش، م.ح. 1397. اثر کودهای آلی و زیستی بر محتوای نیتروژن، فسفر و پتاسیم، رنگیزه‌های فتوسنتزی و میزان ماده مؤثره گیاه دارویی سرخارگل (*Echinacea Purpurea* L.). نشریه پژوهش‌های زراعی ایران. جلد 16، شماره 2، ص 298 -283.

15. قربانعلی، م. و نیاکان، م. 1384. بررسی اثر تنش خشکی بر روی میزان قندهای محلول، پروتیین، پرولین، ترکیبات فنلی و فعالیت آنزیم نیترات ردوکتاز گیاه سویا رقم گرگان 3. نشریه علوم دانشگاه تربیت معلم. جلد 5، شماره 1، ص 550-537.
16. کشاورزفرد، س. سلگی، م. باقری، ح. شهرجردی، ا. 1399. کاربرد بیوچار و اسید هیومیک برای افزایش مقاومت به تنش خشکی در گل آهار. مجله زیست‌شناسی کاربردی. جلد 33، شماره 1، ص 174-148.
17. یامچی، ا. رستگار جزی، ف. قبادی، س. موسوی، ا. و کارخانه‌ای، ع.ا. 1383. بیان فراوان ژن Δ-پرولین -5- کربوکسیلاز سنتتاز (P5CS)، با هدف افزایش مقاومت به تنش‌های اسموتیک در گیاه تراریخت توتون (*Nicotiana tabacum* cv.Xanthi). علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی. جلد 8، شماره 4، ص 39 -31.
18. Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. Method of Enzymology 105: 121-126.
19. Akhter, A., Ahmed, K., Soja, G. and Steinkellner, S. 2015. Compost and biochar alter mycorrhization, tomato root exudation, and development of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. Frontiers in Plant Science 6(529): 1-13.
20. Alam, M.Z., McGee, R., Hoque, A., Ahammed, G.J. and Carpenter-Boggs, L. 2019. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi, selenium and biochar on photosynthetic pigments and antioxidant enzyme activity under arsenic stress in mung bean (*Vigna radiata*). Frontiers in Physiology 10(193): 1-13.
21. Arnon, D.I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphennoloxidase in *Beta vulgaris*. Plant Physiol 24: 1-150.
22. Aslam, M., Magbool, M. A. and Cengiz. R. 2015. Drought stress in maize (*Zea mays* L.) effects, resistance mechanisms, global achievements and biological strategies for improvement. Springer Briefs in Agriculture.
23. Badr, M.A., El-Tohamy, W.A., Abou-Hussein S.D. and Gruda, N.S. 2020. Deficit irrigation and arbuscular mycorrhiza as a water-saving strategy for eggplant production. Horticulturae 6(45): 1-17.
24. Bargmann, I., Martens, R., Rillig, M.C., Kruse. A. and Kücke, M. 2014. Hydrochar amendment promotes microbial immobilization of mineral nitrogen. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 177: 59-67.
25. Bates, L.S., Waldren, R.P. and Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free prolin for water stress studies. Plant and Soil 39: 205-207.
26. Beauchamp, C. and Fridovich, I. 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Analytical Biochemistry 44: 276-287.
27. Beltrano, J. and Ronco, M.G. 2008. Improved tolerance of wheat plants (*Triticum aestivum* L.) to drought stress and rewatering by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus claroideum*: Effect on growth and cell membrane stability. Brazilian Journal of Plant Physiology 20(1): 29-37.
28. Berek, A.K., Hue, N. and Ahmad, A. 2011. Beneficial use of biochar to correct soil acidity. The Food Provider 1-3.
29. Bradford. M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitative titration of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254.
30. Caser, M., Victorino, I.M.M., Demasi, S., Berruti, A., Donno, D., Lumini, E., Bianciotto, V. and Scariot, V. 2019. Saffron cultivation in marginal alpine environments: How AMF inoculation modulates yield and bioactive compounds. Agronomy 1-14.
31. Chen, W., Meng, P., Feng, H. and Wang, C. 2020. Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on growth and physiological performance of catalpa bungei C.A.Mey. under drought stress. Forests 11(1117): 1-29.
32. Dalpé, Y. 1993. Vesicular-arbuscular mycorrhiza. p. 287- 301. In: Soil sampling and methods of analysis. (ed.) Carter, MR. Lewis Publishers, Boca Raton.

33. Du, Y., Zhao, Q., Chen, L., Yao, X. and Xie, F. 2020. Effect of drought stress at reproductive stages on growth and nitrogen metabolism in soybean. Agronomy 10(302): 1-22.
34. Fallah, m., Amini, R., Hadi, H. and Hassanzadeh-Gholttapeh, A. 2020. The Role of eco-friendly soil amendments co-application on the performance of lingrain (*Linum Usitatissimum* L.) under late-season irrigation limitation. Research Square 1-23.
35. Gerdemann, J.W. and Nicolson, T.H. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogene* species extracted from soil by wet- siving and decanting. Transaction in British Mycological Society 46: 235-244.
36. Ghorbanpour, M., Mohammadi, H. and Kariman, K. 2020. Nanosilicon-based recovery of barley (Hordeum vulgare) plants subjected to drought stress. Environmental Science Nano 7:443- 461.
37. Hashem, A., Kumar, A., Al-Dbass, A.M., Algarawi, A.A., Al-Arjani, A.F., Sing, G., Farooq, M. and Abd-Allah, E.F. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi and biochar improves drought tolerance in chickpea. Saudi Journal of Biological Sciences 26: 614-624.
38. He, F., Sheng, M. and Tang, M. 2017. Effects of rhizophagus irregularis on photosynthesis and antioxidative enzymatic system in *Robinia pseudoacacia* L. under drought stress. Frontiers in Plant Science 8(183): 1-14.
39. Kammann, C.I., Linsel, S., Gößling, G.W. and Koyro, H.W. 2011. Influence of biochar on drought tolerance of *Chenopodium quinoa* Willd and on soil–plant relations. Plant and Soil 345: 195-210.
40. Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C. and Schüßler, A. 2009. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist 183: 212-223.
41. Kumari, N., Gheek Batra, N. and Sharma, V. 2018. Photosynthetic performance and drought-induced changes in activity of antioxidative enzymes in different varieties of *vigna radiate*. Agriculchral Research 1-9.
42. Liu, C., Liu, F., Ravnskov, S., Rubæk, G.H., Sun, Z. and Andersen, M.N. 2017. Impact of wood biochar and its interactions with mycorrhizal fungi, phosphorus fertilization and irrigation strategies on potato growth. Journal of Agronomy and Crop Science 203: 131-145.
43. Maleki, M., Ebrahimzade H., Gholami M. and Niknam, V. 2011. The effect of drought stress and exogenous abscisic acid on growth, protein content and antioxidative enzyme activity in saffron (*Crocus sativus* L.). African Journal of Biotechnology 10(45): 9068-9075.
44. Mickan, A.S., Abbott, L.K., Stefanova, K. and Solaiman, Z.M. 2016. Interactions between biochar and mycorrhizal fungi in a water-stressed agricultural soil. Mycorrhiza 26: 565-574.
45. Nikkah Naeeni, F., Moghadam, A.R., Moradi, P., Rezaei, M. and Abdoosi, V. 2017. Effect of vermicompost and mycorrhiza fungi on yield and growth of milk thistle and antioxidant system activity. Iranian Journal of Plant Physiology 7 (3): 2063-2074.
46. Norris, I.R., Read, D.J. and Varma, A.K. 1992. Methods in Microbiology. Techniques for Study of Mycorrhiza. Academic Press, London 450 p.
47. Pinior, A., Grunewaldt-Stöcker, G., Alten, H.V. and Strasser, R.J. 2005. Mycorrhizal impact on drought stress tolerance of rose plants probed by chlorophyll a fluorescence, proline content and visual scoring. Mycorrhiza 15: 596-605.
48. Porcel, R. and Ruiz-Lozano, J.M. 2005. Arbuscular mycorrhizal influence on leaf water potential, solute accumulation, and oxidative stress in soybean plants subjected to drought stress. Journal of Experimental Botany 55(403): 1743-1750.

49. Pretty, J. 2007. Agricultural sustainability: concepts, principles and evidence. Philosophical Transactions of the Royal Society 365: 447-465.
50. Renker, C., Heinrichs, J., Kaldorf, M. and Buscot, F. 2003. Combining nested PCR and restriction digest of the internal transcribed spacer region to characterize arbuscular mycorrhizal fungi on roots from the field. Mycorrhiza 13: 191-198.
51. Seyyedi, S.M., Ebrahimian, E. and Rezaei-Chiyaneh, E. 2018. Saffron daughter corms formation, nitrogen and phosphorous uptake in response to low planting density, sampling rounds, vermicompost and mineral fertilizers. Communications in Soil Science and Plant Analysis 49(5): 585-603.
52. Srinivasan, M., Kumar, K., Kumutha, K. and Marimuthu, P. 2014. Establishing monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* through root organ culture. Journal of Applied and Natural Science 6(1): 290-293.
53. Symanczik, S., Blaszkowski, J., Koegel, S., Boller, T., Wiemken, A., AL-Yahayaei, M.N. 2014. Isolation and identification of desert habituated arbuscular mycorrhizal fungi newly reported from the Arabian Peninsula. Journal of Arid Land 6(4): 488-497.
54. Tang, W. and Newton, R.J. 2005. Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos. Journal of Plant Biochemistry and Physiology 43: 730-769.
55. Sattar, A., Sher, A., Ijaz, M., Irfan, M., Butt, M., Abbas, T., Hussain, S., Abbas, A., Ullah, M.S. and Cheema, M.A. 2019. Biochar application improves the drought tolerance in maize seedlings. Phyton, International Journal of Experimental Botany 88(4): 379-388.
56. Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F. and Huang, Y. 2008. Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. Mycorrhiza 18: 287-296.
57. Zhang, C., Shi, S., Liu, Z., Yang, F. and Yin, G. 2018. Drought tolerance in alfalfa (*Medicago sativa* L.) varieties is associated with enhanced antioxidative protection and declined lipid peroxidation. Journal of Plant Physiology 232: 226-240.

تأثیر قارچ‌کش‌های سیستمیک و تماسی بر همزیستی قارچ میکوریزی *Rhizophagus irregularis* و صفات رویشی در دو گیاه گندم و ذرت

فرهاد رجالی[1]، حسین کاری دولت‌آباد، مرضیه صفری و فهیمه فضلی‌خانی

دانشیار، موسسه تحقیقات خاک وآب، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ **frejali@yahoo.com**

استادیار، موسسه تحقیقات خاک وآب، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی،کرج، ایران؛ **h.kari@areeo.ac.ir**

دانش‌آموخته دوره دکتری رشته زراعت، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس؛ **m.safari@modares.ac.ir**

دانش‌آموخته دوره ارشد رشته بیولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان؛ **fazlikhanifahimeh20@yahoo.com**

دریافت: **99/12/11** و پذیرش: **1400/10/29**

چکیده

امروزه قارچ‌کش‌ها به طور گسترده‌ای به منظور جلوگیری یا از بین بردن انواع قارچ‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار می گیرند. لیکن کاربرد آن‌ها در برخی موارد ممکن است تأثیرات مخربی بر ریزجانداران مفیدی نظیر قارچ‌های میکوریزی بر جای گذارد. قارچ‌های میکوریزی پس از برقراری رابطه همزیستی، توانایی گیاه در جذب آب و عناصر معدنی و همچنین مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده را بهبود می‌بخشند. در این پژوهش تأثیر مصرف همزمان قارچ‌کش‌هایی شامل بنومیل، رورال تی‌اس، مانکوزب و تیلت بر اثربخشی قارچ میکوریز آربسکولار گونه *Rhizophagus irregularis* در رشد دو گیاه گندم و ذرت در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌های گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی در پنج تیمار شامل چهار قارچ‌کش و شاهد با چهار تکرار و با کشت دو گیاه گندم و ذرت انجام پذیرفت. تأثیر قارچ‌کش‌ها بر خصوصیات رشدی گیاه گندم (رقم چمران) و گیاه ذرت (رقم سینگل کراس 704) و رابطه همزیستی این گیاهان با قارچ *R. irregularis* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در گیاه ذرت، رورال تی‌اس و تیلت به صورت معنی‌دار درصد کلنیزاسیون ریشه نسبت به شاهد را به ترتیب از 41 درصد به 35 و 30 درصد کاهش داد. لیکن تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد در وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاه ذرت مشاهده نگردید. همچنین استفاده از بنومیل و مانکوزب تفاوت معنی‌داری بر درصد کلنیزاسیون ریشه و وزن خشک اندام هوایی در گیاه ذرت نداشتند. در گیاه گندم استفاده از بنومیل باعث کاهش معنی‌دار درصد کلنیزاسیون ریشه از 16 به 12 درصد، وزن خشک ریشه از 0/86 به 0/59 گرم و اندام هوایی از 2/75 به 2/27 گرم گردید. در تیمار استفاده از قارچ‌کش تیلت، درصد کلنیزاسیون ریشه نسبت به شاهد به میزان سه درصد افزایش نشان داد هرچند که تأثیر معنی‌داری در وزن خشک ریشه و اندام هوایی و ارتفاع گیاه مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: همزیستی میکوریزی، قارچ‌کش، کلنیزاسیون ریشه، کودهای زیستی، *Rhizophagus irregularis*

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: ایران، کرج، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات خاک وآب

مقدمه

امروزه استفاده از انواع کودهای زیستی با هدف به کارگیری قابلیت ریزجانداران مفید خاکزی در افزایش تولید، همگام با بهبود کیفیت خاک و ایمنی محیط زیست مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است (جهان و همکاران، 2009). از جمله مهم‌ترین ریزجانداران مورد استفاده در کودهای زیستی می‌توان به انواع قارچ‌های میکوریزی اشاره کرد که به طور بومی در اکثر خاک‌ها حضور دارند. اما جمعیت این ریزجانداران در اغلب موارد در حد کفایت نبوده و از این رو کاربرد آنها به صورت کودهای زیستی در بعضی موارد ضروری به نظر می‌رسد. یکی از سویه‌های پرکاربرد قارچ‌های میکوریز آربسکولار در ایران سویه *Rhizophagus irregularis* می‌باشد، که به طور گسترده‌ای در تولید کودهای زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرد. از اوایل دهه 1970 میلادی، آثار مثبت رابطه همزیستی میکوریزی بر خصوصیات رشدی گیاه میزبان مطرح شده و تاکنون تحقیقات زیادی در این زمینه به انجام رسیده است (کاردوسو و کویپر، 2006؛ ساقری و همکاران، 2009؛ احتشامی، 2011؛ اسمیت و همکاران، 2011).

قارچ‌های میکوریزی تقریباً در همزیستی با بیش از 90 درصد گیاهان مشاهده می‌شوند و تنها تعداد اندکی از گیاهان قادر به برقراری رابطه همزیستی با قارچ‌های میکوریزی نیستند (کاردوسو و کویپر، 2006؛ کامرون و همکاران، 2017). شایع‌ترین نوع همزیستی میکوریزی، نوع میکوریز آربسکولار می‌باشد که در آن قارچ ریشه را کلنیزه و از ساختارهای ویژه‌ای به نام آربسکول جهت تبادل مواد غذایی و آب با گیاه میزبان استفاده می‌کند (موریلا و پدرسون، 2008). قارچ‌های میکوریزی طیف وسیعی از شرایط محیطی را تحمل می‌کنند و از پراکندگی جغرافیایی گسترده‌ای برخوردار هستند. افزایش جذب عناصر معدنی مانند فسفر و عناصر کم مصرف مورد نیاز گیاه، افزایش توانایی گیاه میزبان در جذب آب، تولید هورمون‌های گیاهی، کاهش اثر تنش‌های محیطی، افزایش مقاومت گیاه در مقابل عوامل بیماری‌زا و بهبود ویژگی‌های کمی و کیفی محصولات زراعی از جمله صفات مثبت این رابطه همزیستی برشمرده می‌شوند که توجه بسیاری از محققان را به خود معطوف داشته است (اسمیت و همکاران، 2011؛ قورچیانی و همکاران، 2011).

امروزه اهمیت غلات بر کسی پوشیده نیست، به جرأت می‌توان گفت که قسمت اعظم غذای انسان توسط غلات تأمین می‌شود. غلات حدود یک پنجم کل کشت دنیا را در بر می‌گیرد (فائو، 2019). طبق آمار FAO در سال 2017، حدودا 218 میلیون هکتار از اراضی کشاورزی در سطح جهان به کشت گندم اختصاص یافته که تولیدی بیش از 771 میلیون تن به همراه داشته است. سطح زیر کشت ذرت نیز در سال 2017 معادل 197 میلیون هکتار بوده که تولیدی معادل 1/13 میلیارد تن داشته است (فائو، 2019). ذرت پرمحصول‌ترین گیاه از خانواده غلات به‌شمار می‌آید که از قابلیت تولید ماده خشک زیادی برخوردار است (قورچیانی و همکاران، 2011).

با توجه به اهمیت و نقش گندم و ذرت در تأمین غذای مردم و همچنین با در نظر گرفتن کمبود غذا در سطح جهانی، بررسی تمامی راهکارهایی که سبب افزایش تولید، بهبود کیفیت و استفاده بهینه از گندم و ذرت تولید شده می‌گردد، بسیار مهم و قابل توجه خواهد بود. از این رو به منظور دستیابی به حداکثر عملکرد و در عین حال حفظ سلامت محصول، کاربرد برخی نهاده‌ها مانند انواع سموم و آفت‌کش‌ها در کشت محصولات امری اجتناب ناپذیر خواهد بود. حفظ کیفیت بذر نقش مهمی در افزایش محصول نهایی ایفا می‌کند و بی‌توجهی به سلامت بذر می‌تواند منجر به فرسودگی، کاهش قوه نامیه بذور، بروز بیماری در محصولات و در نتیجه کاهش عملکرد محصول گردد (رضوانی و همکاران، 2017). علی‌رغم

فواید کاربرد قارچ‌کش‌ها در محافظت از گیاه، مصرف این سموم می‌تواند تأثیرات مضری بر ریزجانداران خاک داشته باشد و تهدیدی جدی بر پایداری سیستم‌های اکولوژیکی محسوب شود.

کاربرد انواع کودهای زیستی به منظور کاهش میزان مصرف کودهای شیمیایی و افزایش کیفیت محصول رو به افزایش است. در دهه‌های اخیر آزمایش‌های بسیاری به منظور بررسی اثرات رابطه همزیستی میکوریزی بر خصوصیات رشدی گیاهان مختلفی از جمله گندم و ذرت، به عنوان دو محصول مهم و استراتژیک در بسیاری از مناطق جهان انجام شده است. اما این در حالی است که تأثیرات کاربرد همزمان انواع سموم و آفت‌کش‌ها بر این نوع همزیستی کمتر مورد توجه بوده است. طی تحقیقات صورت گرفته کاربرد همزمان سموم و کودهای زیستی می‌تواند مانع از اثرگذاری این ریزجاندارن بر خصوصیات رشدی گیاه میزبان گردد (جین و همکران، 2013؛ کامرون و همکاران، 2017). در این میان، نتایج برخی تحقیقات حاکی از آن است که کاربرد سموم در کنار ریزجانداران مفید نه تنها اثر بازدارنده نداشته است، بلکه موجب بهبود عملکرد ریزجاندار و در نتیجه گیاه میزبان نیز شده است (شالاموک و همکاران، 2014). مطالعات نشان می‌دهد که در بین قارچ‌کش‌های مصرفی، انواع تماسی سازگاری بیشتری با ریزجانداران مفید نظیر انواع قارچ‌های میکوریز آربسکولار دارند (جین و همکاران، 2013). در مجموع به نظر می‌رسد که اثرات قارچ‌کش‌ها بر قارچ‌های میکوریزی تحت تأثیر عوامل مختلفی از جمله نوع، نحوه عملکرد و روش کاربرد قارچ‌کش، نوع قارچ میکوریزی و نیز نوع گیاه میزبان قرار می‌گیرد و بر این اساس این اثرات می‌توانند خنثی، منفی و یا حتی مثبت طبقه‌بندی شوند (جین و همکاران، 2013؛ کامرون و همکاران، 2017؛ هیج و همکاران، 2018). مانکوزب، بنومیل، پروپیکونازول و ایپرودیون-کاربندازیم از انواع قارچ‌کش‌های پرکاربرد در ایران محسوب می‌شوند و انواع تجاری آن‌ها به طور گسترده‌ای مورد استفاده کشاورزان قرار دارد. با توجه به اثرات مثبت رابطه همزیستی میکوریزی بر گیاه میزبان و نیز لزوم استفاده از سموم مختلف در کشاورزی، یافتن سویه‌های مقاوم نسبت به این سموم ضروری به نظر می‌رسد. با انجام این پژوهش، سعی گردید در مقیاس گلخانه ای امکان استفاده از قارچ میکوریز آربسکولار (*R. irregularis*) به صورت همزمان با چهار نوع از قارچ‌کش‌های پرمصرف در ایران (بنومیل، روورال تی‌اس، مانکوزب و تیلت) که به طور معمول به منظور کاهش اثرات منفی بیمارگرهای گندم و ذرت استفاده می‌شوند، مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش حاضر تأثیر قارچ میکوریز آربسکولار (*R. irregularis*) بر رشد گیاهان گندم و ذرت در استفاده همزمان با چهار نوع قارچ‌کش تماسی و سیستمیک در دو آزمایش جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی با پنج تیمار و چهار تکرار (جمعاً 20 واحد آزمایشی برای هر گیاه مورد بررسی)، در گلخانه موسسه تحقیقات خاک و آب واقع در کرج به مرحله اجرا درآمد. خاک مورد استفاده در گلدان‌ها از عمق 30-0 سانتی‌متری از خاک مزرعه تحقیقاتی موسسه تحقیقات خاک و آب تهیه شد. خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک شامل بافت، pH، EC، مقادیر قابل دسترس فسفر و پتاسیم، میزان کربن آلی و مقادیر عناصر کم مصرف مورد سنجش قرار گرفت (جدول 1).

جدول 1- خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک (0-30 سانتی‌متر)

بافت خاک	pH	EC	SP	T.N.V	کربن آلی	فسفر	پتاسیم	آهن	روی	منگنز	مس
		$dS\ m^{-1}$		%		$mg\ kg^{-1}$					
لوم	7/7	1/01	32/5	8/2	0/72	7/9	233	2/16	0/46	7/88	1/02

EC: هدایت الکتریکی، SP: درصد اشباع، T.N.V: مقدار کل خنثی‌سازی

گلدان‌های چهار کیلویی تهیه شده با ترکیب خاک، پیت‌ماس و پرلیت به نسبت 4، 1 و 1 پر شدند. تیمارهای قارچ‌کش مورد استفاده شامل چهار نوع قارچ‌کش شامل قارچ‌کش‌های سیستمیک بنومیل (B) 50 WP درصد و پروپیکونازول (T) با نام تجاری تیلت 25 درصد، و قارچ کش تماسی مانکوزب (M) با نام تجاری مانکوزب اکسیر 80 WP درصد و قارچ‌کش تماسی - سیستمیک ایپرودیون کاربندازیم (R) با نام تجاری رورال تی‌اس بودند. بذور گندم (چمران *Triticum aestivum*,) و ذرت (سینگل-کراس 704 *Zea mays*,) پس از ضدعفونی به مدت 30 ثانیه در الکل 70 درصد و سپس سه دقیقه در محلول وایتکس30 درصد پنج مرتبه با آب مقطر استریل شسته شدند (امارا و الباگوری، 2018؛ جین و همکاران، 2020). سپس بذور به مدت 30 دقیقه در محلول‌های قارچ‌کش (بنومیل، رورال تی‌اس و مانکوزب به میزان دو گرم در لیتر و تیلت به میزان دو میلی‌لیتر در لیتر) همزده شدند. در تیمار شاهد نیز بذور در آب به مدت 30 دقیقه همراه تیمارهای قارچ‌کش همزده شدند (توسان و تارکوسای، 2004). بذور مورد استفاده از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج تهیه گردید.

به منظور جوانه‌دار کردن، بذور به پلیت‌های استریل حاوی آب اگار منتقل و در انکوباتور به مدت دو روز با دمای 28 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. تعداد پنج عدد بذر جوانه‌دار شده گندم یا ذرت در هر گلدان به همراه 25 گرم مایه تلقیح *R. irregularis* (تهیه شده در موسسه تحقیقات خاک و آب) با فرم پودری که حاوی 200 اندام قارچ در هر گرم شامل اسپور، هیف و وزیکو-لهای داخل ریشه که به روش MPN و در طی یک آزمون گلخانه‌ای 30 روزه بدست آمده بود، کشت و با لایه‌ای سه سانتی‌متری از خاک پوشانده شد. رطوبت خاک گلدان‌ها در طول دوره آزمایش به روش وزنی و به میزان 80 درصد ظرفیت مزرعه نگهداری شد. بر اساس نتایج آنالیز خاک، میزان 100 میلی‌گرم نیتروژن به فرم اوره به هر گلدان اضافه گردید. کاشت گلدان‌ها در اوایل مهرماه 1397 انجام شد. پس از سبز شدن، گیاهان درون گلدان‌ها تنک شده و در نهایت سه گیاهچه در هر گلدان باقی ماند. میزان نور، دما و رطوبت گلخانه در طول دوره رشد در شرایط بهینه نگهداری شد. پس از گذشت دو ماه، گیاهان در اوایل آذرماه 1397 برداشت شدند.

در پایان آزمایش، اندام هوایی و ریشه‌ها به‌طور جداگانه برداشت شدند و پس از شستشو، در آون با درجه حرارت 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 72 ساعت قرار داده شدند. همچنین به منظور اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه، قبل از خشک کردن کل نمونه، از نقاط مختلف هر توده ریشه، حدود دو گرم نمونه تهیه گردید و درصد کلنیزاسیون ریشه با قارچ میکوریزی پس از رنگ‌آمیزی با محلول رنگی تریپان‌بلو با روش تقاطع قطعات یک سانتی‌متری ریشه با خطوط شبکه پلیت مدرج تعیین شد (فیلیپس و هیمن، 1970؛ جیووانتی و موسه، 1980؛ ساقری و همکاران، 2009). برای هر نمونه، 100 قطعه یک سانتی‌متری از ریشه‌ها با استفاده از اسکالپل برش داده شد و به طور تصادفی در پلیت‌های نه سانتی-متری با خطوط متقاطع قرار داده شدند. ریشه‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ (Leica ZOOM 2000, USA) به منظور مشاهده اندام قارچ شامل هیف، اسپور، وزیکول و آربوسکول مورد ارزیابی قرار گرفتند.

هر دو آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی به مرحله اجرا درآمدند. قبل از تجزیه واریانس، نرمال بودن

توزیع انحرافات مورد بررسی واقع شد. تجزیه تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار SAS 9.4 انجام شد. مقایسه میانگین تیمارها نیز به روش دانکن ($p \leq 0.05$) صورت پذیرفت. نمودارها در نرم افزار اکسل رسم گردید.

نتایج و بحث

تأثیر قارچ‌کش‌های مصرفی بر صفات رشدی گندم و ذرت

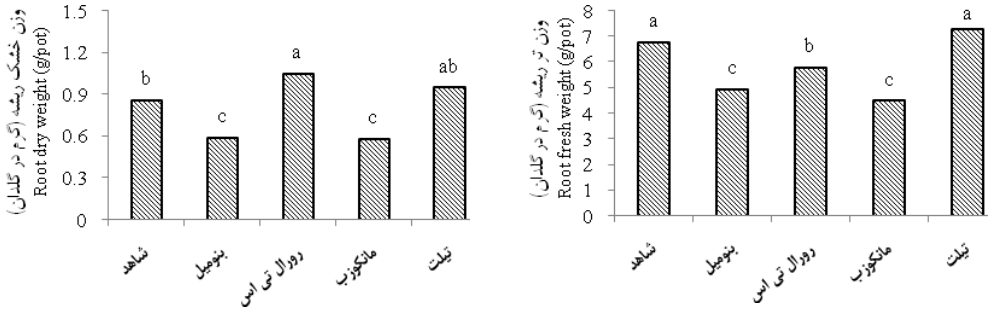
نتایج تجزیه واریانس نشان داد قارچ‌کش‌های مورد استفاده تأثیر معنی‌داری بر صفات رویشی و درصد کلنیزاسیون ریشه گندم ($p \leq 0.01$) داشتند (جدول 2). بنومیل وزن تر و خشک ریشه را به صورت معنی‌دار کاهش داد. این در حالی بود که قارچ‌کش تیلت بیشتر از سایر قارچ‌کش‌های استفاده شده این صفت را افزایش داد. اگرچه اختلاف با تیمار شاهد در سطوح آماری در نظر گرفته شده معنی‌دار نبود (شکل 1). وزن خشک ریشه درتیمار استفاده از رورال تی‌اس بالاترین میزان را به خود اختصاص داد. استفاده از قارچ‌کش‌ها کاهش وزن خشک اندام هوایی گندم را در پی داشت. تیمار بنومیل، وزن خشک اندام هوایی گندم را به 2/27 گرم در گلدان کاهش داد. درصورتیکه این شاخص در تیمار شاهد 2/75 گرم در گلدان اندازه‌گیری گردید. این در حالی بود که تیمارهای مانکوزب و تیلت اختلاف معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان ندادند. ارتفاع گندم همچنین تحت تأثیر قارچ‌کش‌های استفاده شده قرار گرفت. در تیمار استفاده از بنومیل و تیلت اختلاف ارتفاع گیاه با تیمار شاهد معنی‌دار نبوده و بیشترین ارتفاع در گیاهان تیمار شده با مانکوزب و رورال تی‌اس مشاهده شد (شکل 1).

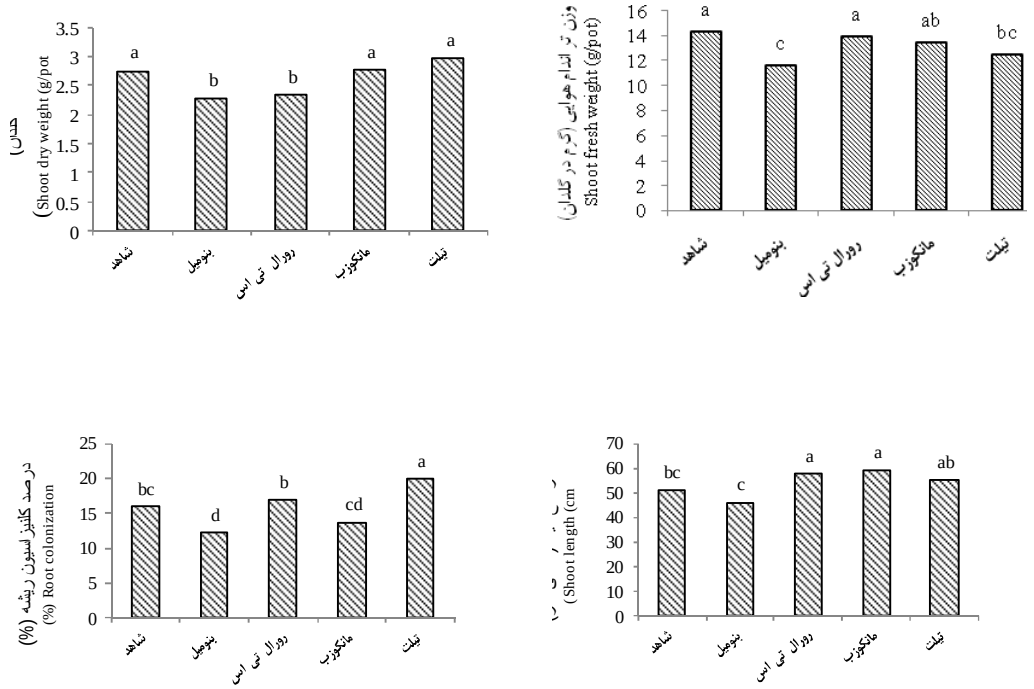
جدول 2- تجزیه واریانس اثر کاربرد تیمارهای مختلف قارچ‌کش بر خصوصیات مورفولوژی و درصد کلنیزاسیون ریشه در گیاه گندم

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		SL	SF	SD	RF	RD	Root Colonization
تیمارهای قارچ‌کش	4	115/36**	4/91**	0/356**	5/55**	0/18**	35/50**
خطا	15	16/42	0/68	0/061	0/24	0/010	2/79
کل	19						
ضریب تغییرات		7/52	6/26	9/52	8/44	12/64	10/62

**معنی دار در سطح احتمال 1 درصد، ns غیر معنی دار

SL: ارتفاع اندام هوایی، RF: وزن تر ریشه، RD: وزن خشک ریشه، SF: وزن تر اندام هوایی، SD: وزن خشک اندام هوایی





شکل 1- صفات رشدی و درصد کلنیزاسیون ریشه گیاه گندم تحت تأثیر تیمارهای مختلف قارچ‌کش

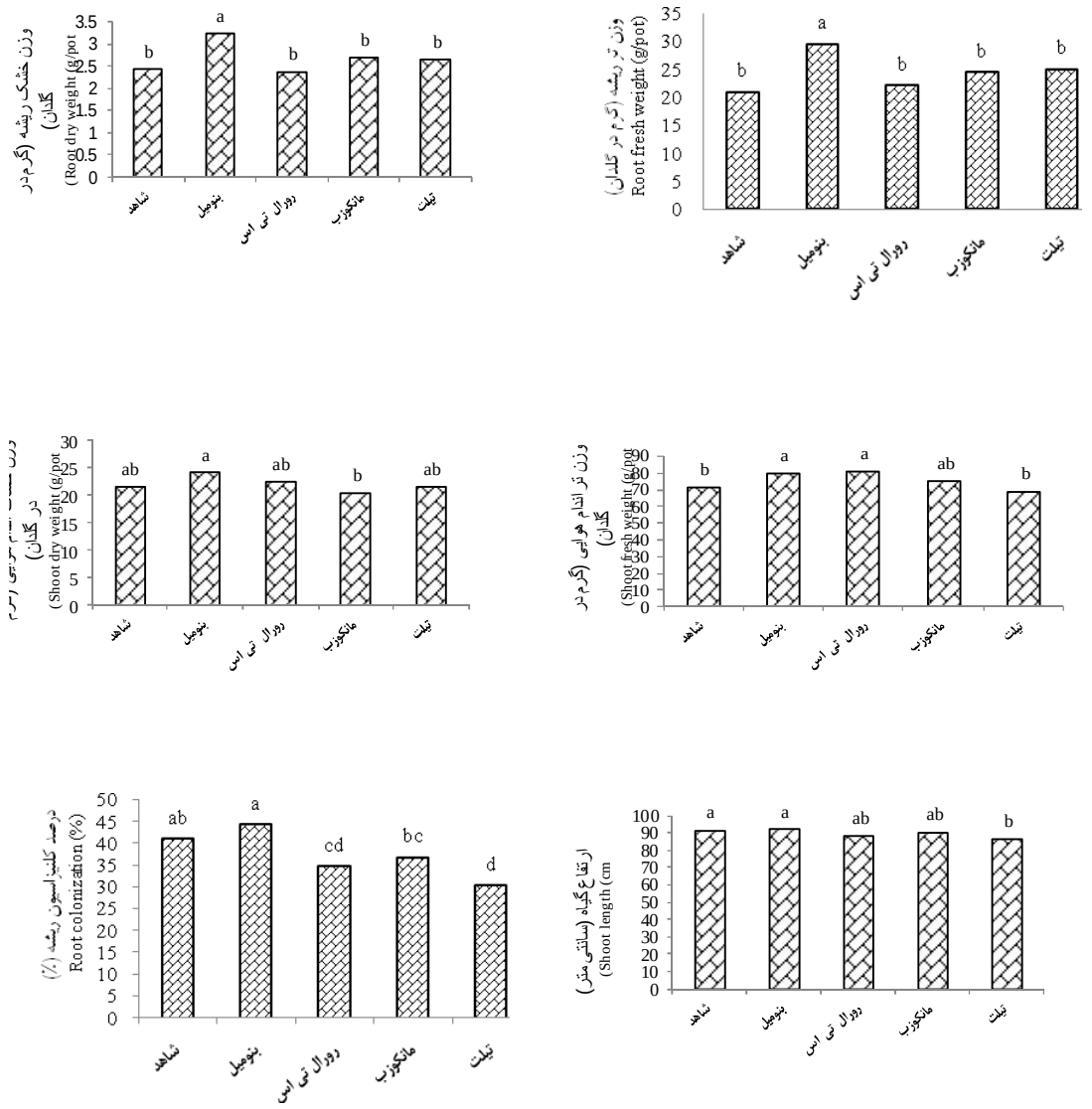
نتایج تجزیه واریانس صفات مورد بررسی در ذرت نشان داد که وزن خشک اندام هوایی تنها صفتی است که تحت تأثیر تیمارهای قارچ‌کش مصرفی قرار نگرفته است (جدول 3). از لحاظ شاخص وزن خشک ریشه، تیمارهای رورال تی‌اس، مانکوزب و تیلت تفاوت معنی‌داری با شاهد بدون استفاده از قارچ‌کش نداشتند. ارتفاع گیاه ذرت تحت تأثیر تیمار تیلت قرار گرفته بطوریکه ارتفاع گیاه در این تیمار به صورت معنی داری کاهش یافت. (شکل 2).

جدول 3- تجزیه واریانس اثر کاربرد تیمارهای مختلف قارچ‌کش بر خصوصیات مورفولوژی و درصد کلنیزاسیون ریشه در گیاه ذرت

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		SL	SF	SD	RF	RD	Root Colonization
تیمارهای قارچ‌کش	4	19/79**	106/05**	7/36 ns	43/89**	0/488**	120/99**
خطا	15	8/19	7/15	4/51	6/95	0/076	13/48
کل	19						
ضریب تغییرات		3/19	5/48	9/65	10/80	10/32	9/83

**معنی دار در سطح احتمال 1 درصد، ns غیر معنی دار

SL: ارتفاع اندام هوایی، RF: وزن تر ریشه، RD: وزن خشک ریشه، SF: وزن تر اندام هوایی، SD: وزن خشک اندام هوایی



شکل 2- صفات رشدی و درصد کلنیزاسیون ریشه ذرت تحت تأثیر تیمارهای مختلف قارچ‌کش

تحریک رشد گیاه ناشی از کاربرد قارچ‌کش‌ها در تحقیق حاضر، بویژه بنومیل در ذرت، را می‌توان به چندین عامل از جمله میزان جذب بالاتر نیتروژن، از بین رفتن بیمارگرها درون خاک و یا تأثیرات مشابه سیتوکینینی است که قارچ‌کش بنومیل دارد، نسبت داد (وانگ و همکاران، 2018).

وانگ و همکاران (2018) نشان دادند که رشد بهتر گیاه ذرت به طور مستقیم و غیرمستقیم تحت تأثیر کاربرد بنومیل به دلیل جذب بالاتر نیتروژن قرار می‌گیرد. بنومیل حاوی شش درصد نیتروژن است که به طور مستقیم توسط فعالیت میکروبی خاک تجزیه و در دسترس گیاه قرار خواهد گرفت. تأثیرات غیرمستقیم محتوی نیتروژن بنومیل از طریق کاهش رقابت بین قارچ میکوریز آربوسکولار و گیاه در جهت جذب نیتروژن بویژه در خاک‌های با محتوی نیتروژن کم خواهد بود. بنومیل از طریق اعمال اثرات بازدارنده بر قارچ میکوریز آربوسکولار، باعث کاهش غیرمتحرک‌سازی نیتروژن در میسلیوم‌های قارچی می‌شود. همبستگی منفی بین

کلنیزاسیون میکوریز و غلظت نیتروژن بافت گیاهی بویژه در مقادیر کم نیتروژن به غیرمتحرک شدن نیتروژن در بافت قارچ میکوریز نسبت داده شده است. پوسچل و همکاران (2016) به کاهش مزایای رابطه همزیستی میکوریزی بر آندروپوگون (*Andropogon gerardii*) زمانی که گیاه و قارچ برای جذب نیتروژن در مناطق با محدودیت نیتروژن رقابت می‌کنند، اشاره داشته‌اند.

در برخی موارد کنترل بیماری توسط قارچ‌کش موجب گسترش همزیستی میان قارچ میکوریز و گیاه میزبان می‌شود. تأثیرات بازدارنده بنومیل بر بیمارگرهای درون خاک بویژه در خاک‌های استریل نشده می‌تواند دلیل احتمالی دیگر برای رشد بهتر گیاه پس از کاربرد بنومیل باشد، هرچه بنومیل تأثیر بیش‌تری در کاهش بیمارگرها داشته باشد، توان بیش‌تری در تحریک رشد گیاه خواهد داشت (وانگ و همکاران، 2018). در مطالعه حاضر نیز از خاک غیراستریل استفاده شده بود از این رو، این مورد می‌تواند دلیل قابل تصور برای رشد بهتر ذرت باشد همانگونه که درصد کلنیزاسیون پس از کاربرد بنومیل در ذرت کاهش پیدا نکرد. در حقیقت به دلیل اینکه بیماری‌های قارچی فیزیولوژی گیاه را تحت تأثیر قرار می‌دهند گیاه قادر نخواهد بود کربن مورد نیاز قارچ میکوریز (همزیست اجباری) را در اختیار آن قرار دهد. لذا در حضور قارچ‌های بیماری‌زا اغلب همزیستی با قارچ میکوریز محدود می‌شود (شالاموک و همکاران، 2014).

تأثیرات مشابه سیتوکینین همچنین برای بنومیل برشمرده شده که ممکن است در تحریک رشد گیاه، کاهش پیری برگ و در نتیجه بهبود بیوماس در برخی گونه‌ها موثر واقع شود (وانگ و همکاران، 2018). با این وجود کاربرد بنومیل در تحقیق حاضر، اثرات تحریک-کننده‌ای بر رشد گندم نداشته است. نتایج حاصل از پژوهش دیگری نیز نشان داده است که کاربرد توپسین ام (قارچ‌کشی با نحوه عمل مشابه بنومیل) بسته به گونه‌ی گیاهی تأثیرات مختلفی بر رشد گیاه داشته است (ویلسن و ویلیامسون، 2008).

تأثیر قارچ‌کش‌های مصرفی بر میزان کلنیزاسیون ریشه گندم و ذرت

بررسی میزان کلنیزاسیون ریشه در گندم نشان داد که تیمارهای مورد بررسی به استثنای بنومیل تأثیر منفی معنی‌داری بر میزان کلنیزاسیون ریشه نداشتند، این در حالی است که تیمار تیلت بالاترین درصد کلنیزاسیون را موجب شده است (شکل 1). درصد کلنیزاسیون ریشه ذرت نیز تحت تأثیر تیمارهای قارچ‌کش قرار گرفت. بیش‌ترین و کم‌ترین درصد کلنیزاسیون به ترتیب در تیمارهای بنومیل و تیلت مشاهده شد (شکل 2). مطالعه‌ای نشان داد که بنومیل کلنیزاسیون ریشه ذرت را کاهش داده است (وانگ و همکاران، 2018). این در حالی است که در تیمار کاربرد بنومیل کلنیزاسیون ریشه بیشتر از سایر تیمارهای قارچ‌کش و تقریبا همانند شاهد بدون استفاده از قارچ‌کش بوده است.

مطالعات چیوچیو و همکاران (2000) نیز در ارتباط با قارچ‌کش بنومیل نشان داد که جوانه‌زنی اسپورهای قارچ میکوریزی گلوموس موسه در غلظت‌های پایین از این قارچ‌کش، نسبت به غلظت‌های بالاتر آن بیشتر بوده و اسپورهای ریزتر مقاومت بیشتری نسبت به قارچ‌کش داشتند. از طرف دیگر، تیلت باعث کاهش درصد کلنیزاسیون شده است. نتایج مطالعه‌ای نشان داد که کاربرد قارچ‌هایی از جمله فورادن و ترمیکس در مقادیر توصیه شده باعث کاهش کلنی‌زایی و اسپورزایی قارچ میکوریز آربوسکولار در شرایط مزرعه‌ای در سه گونه ارزن (*Eleusine coracana*، *Panicum miliaceum* و *Paspalum scrobiculatum*) شده است، این در حالی است که دیگر قارچ‌کش‌ها شامل فرمالدهید، باویستین، کومان،کوپراکسی‌کلراید و سولفکس تأثیری بر کلنی‌زایی و اسپورزایی قارچ نداشتند و یا حتی در مواردی بسته به گونه‌ی کشت شده ارزن منجر به افزایش این صفات شده-اند (گوسلینگ و همکاران، 2006). برخلاف نتایج بدست آمده در تحقیق ما، اونیل و میتچل نشان دادند که بنومیل از

تولید اسپور قارچ میکوریز آربوسکولار و آلودگی گیاهچه جلوگیری می‌کند (اونیل و میچل، 2000).

همچنین در مطالعه دیگری مشخص شده که کلنی‌زایی ریشه‌های ارزن با قارچ *Rhizophagus fasciculatus* و تعداد اسپور آن با کاربرد بنومیل و مانکوزب به ترتیب به میزان 26، 28/5 درصد و 7/5 و 2/9 درصد کاهش یافته است. در حالی‌که کاربرد کاپتان این صفات را 13 و 12 درصد افزایش داده است (چاناباساوا و همکاران، 2015). بررسی منابع نشان داد که مشابه نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر، کلنی‌زایی ریشه کاسنی به طور معنی‌داری در اثر استفاده از پروپیکونازول به میزان 59 و 40 درصد به ترتیب در مقادیر کاربردی 0/2 و 2 میلی‌گرم در لیتر کاهش یافته است (کالون و همکاران، 2010). نتایج تحقیقات نشان داده که تیمار تیلت مانع از سنتز برخی استرول‌های نرمال در سلول شده و رشد قارچ را کاهش داده یا متوقف می‌سازد و همچنین موجب اختلال در تنفس سلولی می‌شود (کامرون وهمکاران، 2017). لذا این قارچ‌کش می‌تواند به عنوان ممانعت کننده رشد عمل کرده و از این جهت ممکن است اثر منفی بر ارتفاع اندام هوایی گیاه نیز داشته باشد. اگرچه کاربرد تیلت در تحقیق حاضر در گندم به طور معنی‌داری باعث تحریک کلنی‌زایی ریشه شده است. مطالعات نشان داده که پروپیکونازول (تیلت 250 EC) در غلظت‌های کم 0/1 تا 1 میلی‌گرم در لیتر در تحریک رشد برخی از قارچ-های میکوریز بیرونی مؤثر بوده است (لاتیکینن و هینونن-تنسکی، 2002). نتایج این پژوهش نشان داد قارچ‌کش تماسی مانکوزب بدون تأثیر بر ویژگی‌های رویشی از قبیل وزن خشک اندام هوایی و درصد کلنیزاسیون ریشه در دو گیاه گندم و ذرت می‌باشد. بنظر می‌رسد سموم سیستمیک از آنجا که به داخل گیاه نفوذ می‌کنند و مدت بیشتری در گیاه پایدار هستند بیشتر همزیستی میکوریزی را تحت تأثیر قرار می‌دهند هر چند که نتایج تحت تأثیر میزبان متفاوت است. بطوریکه بنومیل در گیاه گندم باعث کاهش معنی‌دار وزن خشک ریشه، هوایی و درصد کلنیزاسیون ریشه شد و تیلت در گیاه ذرت باعث کاهش معنی‌دار ارتفاع گیاه و درصد کلنیزاسیون ریشه گردید. قارچ‌کش رورال تی‌اس که از ترکیب دو قارچ‌کش تماسی و سیستمیک است تأثیر متفاوتی در دو گیاه داشته است.

بطوریکه درصد کلنیزاسیون در گیاه ذرت نسبت به شاهد کاهش پیدا کرده است ولی در گندم مشابه با شاهد است. نتایج آزمایش‌های جین و همکاران نشان داد که تأثیر قارچ‌کش‌ها به میزان زیادی مرتبط با نوع قارچ‌کش به‌کار برده شده است، به طوری که قارچ‌کش‌های سیستمیک اثر منفی و قارچ‌کش‌های تماسی اثر مثبت بر همزیستی میکوریز داشته‌اند و یا اینکه بر این رابطه همزیستی بی‌تأثیر بوده‌اند (جین و همکاران، 2013).

نتیجه‌گیری

تأثیر پذیری قارچ‌های میکوریزی در برابر قارچ-کش‌ها متأثر از عوامل محیطی و گونه‌ی گیاهی؛ از بدون تأثیر تا از بین رفتن کامل قارچ همزیست، و یا کاهش یا افزایش در میزان کلنیزاسیون ریشه متغیر است. نتایج این پژوهش نشان داد که در گیاه ذرت، دو قارچ‌کش رورال تی‌اس و تیلت باعث کاهش معنی‌دار درصد کلنیزاسیون ریشه نسبت به شاهد شدند. هر چند که این کاهش منجر به تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد در وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاه نگردید. استفاده از دو قارچ‌کش بنومیل و مانکوزب تفاوت معنی‌داری را در درصد کلنیزاسیون ریشه و وزن خشک هوایی گیاه ذرت ایجاد نکردند. در گیاه گندم استفاده از قارچ‌کش بنومیل باعث کاهش معنی-دار درصد کلنیزاسیون ریشه، وزن خشک ریشه و اندام هوایی گردید. در تیمار استفاده از قارچ‌کش تیلت درصد کلنیزاسیون ریشه نسبت به شاهد به میزان سه درصد افزایش نشان داد هر چند که این افزایش تأثیر معنی‌داری در وزن خشک ریشه، وزن خشک اندام هوایی و ارتفاع گیاه نشان نداد.

بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش در مقیاس گلخانه‌ای قارچ‌کش تیلت مناسب کاربرد همزمان با این گونه قارچ میکوریز آربسکولار در زمان کشت گندم بوده

و برای توصیه مزرعه‌ای می‌بایستی پژوهش‌های مربوطه در سطح مزرعه صورت گیرد. از آنجایی که این آزمایش در محیط گلخانه و درون گلدان‌هایی با حجم محدود انجام شده است و پارامترهای مورد ارزیابی مربوط به رشد رویشی گیاه بوده‌اند لذا به منظور ارائه تفسیر دقیق‌تری از نحوه اثر قارچ‌کش‌های مصرفی بر رابطه همزیستی میکوریزی و رشد گیاه میزان، بررسی‌های دقیق‌تر در سطح مزرعه‌ای و ارزیابی پارامترهای مربوط به رشد زایشی مورد نیاز خواهد بود.

فهرست منابع:

1. Calonne, M., Fontaine, J., Debiane, D., Laruelle, F., Grandmougin-Ferjani, A. and Lounès-Hadj Sahraoui, A. 2010. Propiconazole toxicity on the non-target organism, the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus irregulare*. In: O. Carisse (ed.) Fungicides. InTech, Janeza Trdine 9, 51000 Rijeka, Croatia, pp. 325-346.
2. Cameron, J.C., Lehman, R.M., Sexton, P., Osborne, S.L. and Taheri, W.I. 2017. Fungicidal seed coatings exert minor effects on arbuscular mycorrhizal fungi and plant nutrient content. Agronomy Journal 109(3): 1005-1012.
3. Cardoso, I.M. and Kuyper, T.W. 2006. Mycorrhizas and tropical soil fertility. Agriculture, Ecosystems & Environment 116(1-2): 72-84.
4. Channabasava, A., Lakshman, H.C. and Jorquera, M.A. 2015. Effect of fungicides on association of arbuscular mycorrhiza fungus *Rhizophagus fasciculatus* and growth of Proso millet (*Panicum miliaceum* L.). Journal of Soil Science and Plant Nutrition 15 (1): 35-45.
5. Chiocchio, V., Venedikian, N., Martinez, A.E., Ana Menendez, A.M., Ocampo, J.A. and Godeas, A. 2000. Effect of the fungicide benomyl on spore germination and hyphal length of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. International Microbiology 3(3): 173-175.
6. Ehteshami, S.M. 2011. Phosphorus acquisition by two wheat cultivars supplied with rock phosphate and inoculated with *Glomus intraradices* in an alkaline soil. Technical Journal of Engineering and Applied Sciences 1: 20-25.
7. FAOSTAT. Available at http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC. (visited 29 July 2019).
8. Ghorchiani, M., Alikhani, H., Akbari, GH., Zarei, M. and Alah Dadi, I. 2011. Effect of phosphate solubilizing bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi and phosphorus fertilizer on yield and yield components of maize under normal and deficit irrigation conditions in Karaj region. Iranian Journal of Agricultural Research 10(1): 214-224. (in Persian with English abstract)
9. Giovannetti, M. and Mosse, B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist 84(3): 489-500.
10. Gosling, P., Hodge, A., Goodlass, G. and Bending, G.D. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi and organic farming. Agriculture, Ecosystems & Environment 113(1-4):17-35.
11. Hage Ahmed, K., Rosner, K. and Steinkellner, S. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi and their response to pesticides. Pest Management Science 75(3): 583-590.
12. Jahan, M., Koocheki, A., Ghorbani, R., Rejali, F., Aryayi, M. and Ebrahimi, E. 2009. The effect of biological fertilizers application on some agroecological characteristics of corn under conventional and ecological cropping systems. Iranian Journal of Agricultural Research, 7(2): 375-390. (in Persian with English abstract)
13. Jain, D., Kour, R., Bhojiya, A.A., Meena, R.H., Singh, A., Mohanty, S.R., Rajpurohit, D. and Ameta, K.D. 2020. Zinc tolerant plant growth promoting bacteria alleviates phytotoxic effects of zinc on maize through zinc immobilization. Scientific reports 10(1): 1-13.

14. Jin, H., Germida, J.J. and Walley, F.L. 2013. Suppressive effects of seed-applied fungicides on arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) differ with fungicide mode of action and AMF species. Applied Soil Ecology 72: 22-30.
15. Laatikainen, T. and Heinonen-Tanski, H. 2002. Mycorrhizal growth in pure cultures in the presence of pesticides. Microbiological Research 157:127-137.
16. Murillo-Williams, A. and Pedersen, P. 2008. Arbuscular mycorrhizal colonization response to three seed-applied fungicides. Agronomy journal 100(3): 795-800.
17. Omara, A.E.D. and Elbagory, M. 2018. Enhancement of plant growth and yield of wheat (*Triticum aestivum* L.) under drought conditions using plant-growth-promoting bacteria. Annual Research & Review in Biology pp.1-18.
18. O'neill J.J.M. and Mitchell, D.T. 2000. Effects of benomyl and captan on growth and mycorrhizal colonization of Sitka-spruce (*Picea sitchensis*) and ash (*Fraxinus excelsior*) in Irish nursery soil. Forest Pathology 30(3):165-174.
19. Phillips, J.M. and Hayman, D.S. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society 55(1): 158-161.
20. Püschel, D., Janoušková, M., Hujslová, M., Slavíková, R., Gryndlerová, H. and Jansa, J. 2016. Plant-fungus competition for nitrogen erases mycorrhizal growth benefits of *Andropogon gerardii* under limited nitrogen supply. Ecology Evolution 6(13): 4332–4346.
21. Rezvani, E., Hassani, F. and Zare, L. 2017. Seed-born fungi infection of hybrid maize seed (*Zea mays* .L) in different climates and agronomic management. Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture) 40(1): 49-64. (in Persian with English abstract)
22. Saghari, M., Barani, H., Asghari, H.R., Mesdaghi, M. and Sadroie, M. 2009. Effect of inoculation of mycorrhizal arbuscular fungus and phosphorus fertilizer on growth and production of two alfalfa cultivars. Rangeland Scientific Journal 2: 291-301. (in Persian with English abstract)
23. Schalamuk, S., Velazquez, S., Simón, M.R. and Cabello, M. 2014. Effect of septoria leaf blotch and its control with commercial fungicides, on arbuscular-mycorrhizal-fungal colonization, spore numbers, and morphotype diversity. Journal of Plant Protection Research 54(1): 9-14.
24. Smith, S.E., Jakobsen, I., Grønlund, M. and Smith, F.A. 2011. Roles of arbuscular mycorrhizas in plant phosphorus (P) nutrition: interactions between pathways of P uptake in arbuscular mycorrhizal (AM) roots have important implications for understanding and manipulating plant P acquisition. Plant Physiology 156: 1050-1057.
25. Tosun, N. and Turkusay, H. 2004. Seed and soil treatments with a natural fungicide product against some fungal and bacterial diseases of vegetables. Nutritional Biotechnology in the Feed and Food Industries, p. 383.
26. Wang, X.X., Wang, X., Sun, Y., Cheng, Y., Liu, S., Chen, X., Feng, G. and Kuyper T.W. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi negatively affect nitrogen acquisition and grain yield of maize in a N deficient soil. Frontiers in Microbiology 9: 1-10.
27. Wilson, G. and Williamson, M. 2008. Topsin-M: the new benomyl for mycorrhizal-suppression experiments. Mycologia 100(4): 548-554.

بررسی روش‌های انحلال فسفات‌های نامحلول توسط ریزجانداران حل‌کننده فسفات

علیرضا فلاح نصرت آباد[1]

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب ، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ Rezafayah@yahoo.com

دریافت: 99/4/15 و پذیرش: 1400/10/29

چکیده

فسفر یکی از مهمترین عناصر اصلی مورد نیاز گیاهان بوده و نقش‌های بسیار متعددی از جمله تولید و انتقال انرژی، افزایش ریشه‌زایی، تولید دانه و افزایش کمی و کیفی در گیاهان دارد. متاسفانه بیش از 70 درصد فسفر ورودی از طریق کودهای شیمیایی فسفاته به خاک، تثبیت شده و از دسترس گیاهان خارج می‌گردد. لذا تثبیت فسفر باعث مصرف هر چه بیشتر کودهای شیمیایی شده و مقدار فسفر کل خاک افزایش و گاهاً ممکن است ورود عناصر همراه کود فسفاتی باعث آلودگی خاک گردد. جهت افزایش حلالیت فسفات‌های نامحلول موجود در خاک یا برای جلوگیری از تثبیت فسفر می‌توان از ریزجانداران حل کننده فسفات دوستدار محیط زیست و اقتصادی مانند باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها و جلبک‌ها استفاده کرد. این ریزجانداران با روش‌های مختلف از جمله تولید اسیدهای معدنی، آلی، تولید پروتون، ترشح سیدروفور، کلاته‌کردن و تولید آنزیم فسفاتاز، قادرند ترکیبات نامحلول معدنی و آلی فسفر را به ترکیبات محلول تبدیل کنند. در خاک‌های معدنی حاوی مقادیر زیاد فسفات‌های کلسیم، منیزیم، آهن و آلومینیم، عمدتاً تولید اسیدهای معدنی و آلی و در خاک‌های آلی بیشتر آنزیم فسفاتاز مؤثر هستند. ژن‌های کدکننده حلالیت فسفات عمدتاً از باکتری‌های *Erwinia herbicola, Esherichia coli* و *Morgonella morgani* جداسازی شده‌اند. برخی از این ژن ها شامل ushA, agp, cpdB, napA , هستند. برخلاف مشکلات موجود خوشبختانه پیشرفت‌های خوبی در زمینه مهندسی ژنتیک ریزجانداران حل‌کننده فسفات حاصل شده است به طوری که ژنهای حل‌کننده فسفات قابل انتقال به باکتری‌های دیگر می‌باشند. با توجه به اینکه خاک‌ها حاوی هم ترکیبات معدنی و هم آلی هستند لذا پیشنهاد می‌شود از یک ریزجاندار با قابلیت انحلال هر دو ترکیب آلی و معدنی یا مخلوط دو یا چند ریزجاندار استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: فسفاتاز، ژن، مکانیسم، انحلال فسفات، اسیدهای آلی و معدنی

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: کرج، مشکین دشت، بلوار امام خمینی، ص .پ. 311-31785

مقدمه

فسفر یکی از عناصر ضروری و مهم گیاهان است که تأثیر بسیاری زیادی در رشد گیاهان (وانگ و همکاران، 2009) از طریق تأثیر در فرآیندهای متابولیکی مانند تقسیم سلولی و نمو، انتقال انرژی، بیوسنتز ماکرومولکول‌ها، فتوسنتز و تنفس گیاهان دارد (شنای و کالاگودی، 2005؛ آحماد و همکاران، 2009 و خان و همکاران، 2009). منابع فسفر شامل کانی‌های اولیه و ثانویه و یا ترکیبات آلی می‌باشند. غلظت فسفر در محلول خاک در مقایسه با سایر عناصر بسیار پایین و بین 0/001 تا یک میلی‌گرم در لیتر است (بردی و ویل، 2002).

به‌طور کلی ترکیبات فسفر در خاک در سه گروه ترکیبات معدنی، ترکیبات آلی هوموس و ترکیبات آلی و معدنی همراه با سلول‌های زنده قرار می‌گیرند. ترکیبات معدنی فسفر معمولا شامل آلومینیوم، آهن، منیزیم، منگنز و کلسیم بوده و از خاکی به خاک دیگر فرق می‌کند. به‌عنوان مثال در خاک‌های اسیدی به‌صورت فسفات‌های آهن، آلومینیوم و منگنز و در خاک‌های قلیایی بیشتر به‌صورت ترکیبات کلسیم و منیزیم می‌باشد. امّا به‌طورکلی نوع ترکیبات فسفاته در خاک را pH خاک، نوع و غلظت کانی‌های خاک تعیین می‌کنند. برخی از مهم‌ترین کانی‌های فسفاتی در جدول 1 آورده شده است. حدود پنج درصد فسفر کل خاک به‌صورت آلی (مائو و همکاران، 2017؛ ریچاردسون، 1994) است و محدودهٔ آن در خاک‌های مختلف بین 4 تا 90 درصد (یاداو و ورما، 2012) می‌باشد. رایج‌ترین شکل فسفر در خاک‌ها اینوسیتول (اینوسیتول هگزا فسفات) است که بیشتر در دانه گیاهان وجود دارد و به‌عمل جوانه زدن کمک می‌کند.

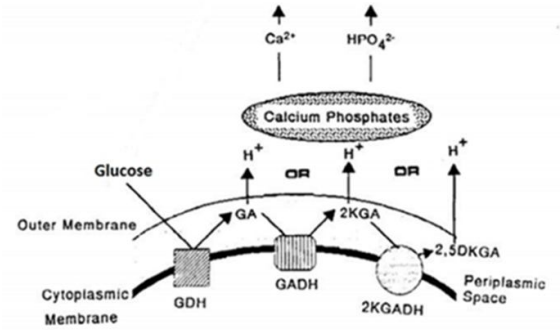
فیتین (یک نمک کلسیم یا منیزیم اسیدفیتیک) فراوان‌ترین ترکیب آلی فسفاته در خاک است. سایر ترکیبات آلی فسفاتی شامل فسفات‌های قندی (خان و همکاران، 2014)، نوکلئوتیدها (0/2 تا 2/5 درصد)، فسفوپروتئین (بسیار کم)، فسفونات‌ها (تات، 1984) و فسفولیپیدها (5-1 درصد) (یاداو و ورما، 2012) هستند. در میان اشکال مختلف فسفر گیاهان بیشتر اشکال $H_2O_4^-$ و $H_2O_4^{-2}$ را جذب می‌کنند. مقدار فسفر قابل استفاده خاک نسبت به فسفر کل بسیار کم است. مقدار بیشتری از فسفر در خاک ثبیت می‌شود و مقادیر کمی از آن قابل دسترس گیاهان است (یاداو و ورما، 2012).

کمبود فسفر در گیاهان باعث کاهش رشد، برگ‌های تیره، کاهش گلدهی و کاهش نمو سیستم ریشه گیاه می‌شود. در بیشتر گیاهان این علائم زمانی که غلظت فسفر در برگ‌ها به کمتر از 0/2 درصد ظاهر می‌شوند و در بیشتر موارد کودهای شیمیایی فسفاتی یا کودهای آلی دارای فسفر جهت برطرف کردن کمبود فسفر استفاده می‌شود. اشکال نامحلول و غیرقابل دسترس فسفر از طریق فرآیندهای حلالیت (فسفر معدنی) و معدنی شدن (فسفر آلی) به اشکال فسفات محلول تبدیل می‌شوند. در طی ایموبیلیزاسیون، ریزجانداران شکل معدنی فسفر را به فسفر آلی تبدیل کرده و جزیی از سلول‌های زندهٔ آنها محسوب می‌شود. معدنی شدن و آلی شدن به‌طور همزمان انجام می‌شود و عوامل مختلفی مانند ساختار و ترکیب میکروب‌ها، خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاک‌ها و ترشحات ژنوتیپ‌های مختلف گیاهی در آن مؤثر هستند.

خاک یک محیط پایه و طبیعی برای رشد میکروبی است، به طوری که یک گرم از آن حدود 10^1 تا 10^{10} باکتری دارد که وزنی حدود دو تن در هکتار می‌باشد (خان و همکاران،2009). ریزجانداران حل‌کننده فسفات گروهی از ریزجانداران مفید هستند که قادرند ترکیبات نامحلول معدنی و آلی فسفر را به ترکیبات محلول تبدیل کنند و به رده، جنس و گونه خاصی اطلاق نمی‌گردند. آنها به دو گروه عمده باکتری‌ها و قارچ‌های حل‌کننده فسفات تقسیم می‌شوند که باکتری‌ها 50-1 درصد جمعیت میکروبی و قارچ‌ها 0/01 تا 0/5 درصد از آنرا تشکیل می‌دهند (والپولا و یون،2012؛ خان و همکاران، 2009 و چن و همکاران، 2006).

جدول 1- انواع کانی‌های فسفاتی در خاک‌های اسیدی، خنثی و قلیایی(ریچاردسون، 1994)

نوع خاک	نام کانی	ترکیب شیمیایی
خاک‌های اسیدی	استرنگایت	$FePO_4.2H_2O$
	وریسایت	$AlPO_4.2H_2O$
خاک های آهکی و خنثی	B-تری‌کلسیم فسفات	$Ca_3(PO4)_2$
	دی‌کلسیم فسفات	$CaHPO_4$
	دی‌کلسیم فسفات هیدراته	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$
	فلوروآپاتیت	$Ca_5(PO4)_3\ F$
	هیدروکسی آپاتیت	$Ca_5(PO4)_3\ OH$
	اکتاکلسیم فسفات	$Ca_4H(PO_4)_3 \cdot 2–5\ H2O$



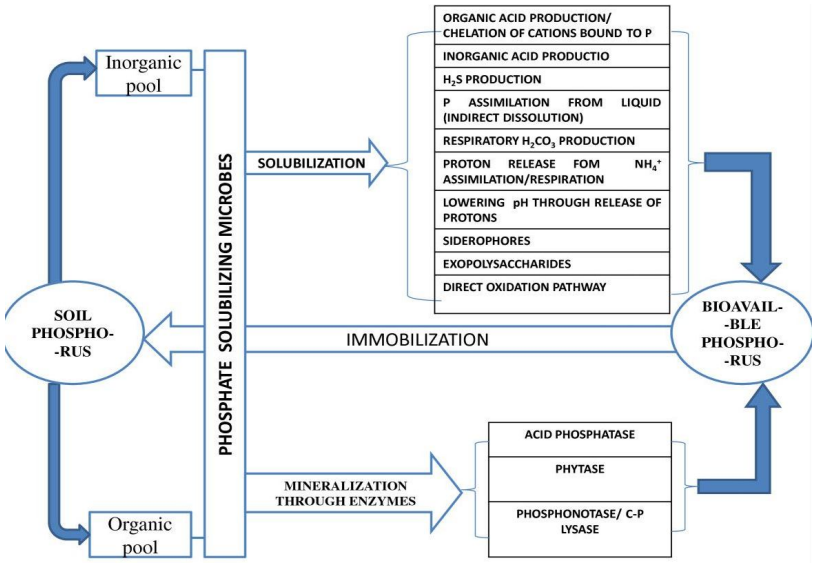
شکل 1- مسیر اکسیداسیون مستقیم در انحلال فسفر نامحلول (Goldstein, 1995)
(GDH: گلوکز دهیدروژناز، GADH: گلوکونیک اسید دهیدروژناز، 2KGADH: 2- کتوگلوکونیک اسید دهیدروژناز، 25DKGA: 5 و2 دیکوکتوگلوکونیک اسید، GA: گلوکونیک اسید، 2KGA: 2-کتوگلوکونیک اسید)

در میان آنها باکتری‌های باسیلوس، سودوموناس، و ریزوبیوم و قارچ‌های پنی‌سیلیوم و آسپرژیلوس و هم چنین قارچ‌های میکوریز بسیار قابل توجه و مهم هستند (والپولا و یون،2012). در واقع توانایی انحلال فسفات، مربوط به گروهی از ریزجانداران است که طی میلیون‌ها سال زندگی در محیط‌هایی با کمبود فسفر قابل دسترس، موفق به رشد و تکثیر در چنین شرایطی شده‌اند. ریزجانداران مذکور فسفر مورد نیاز خود را با تغییر مسیرهای متابولیسمی، تغییر نفوذ-پذیری غشای پلاسمایی و هم چنین سنتز آنزیم، بدست می‌آورند (گلدستاین[1]، 1995).

ریزجانداران حل‌کننده فسفات، با آزادکردن اسیدهای-آلی با وزن مولکولی کم[2] (وی و همکاران، 2018) و اسیدهای معدنی باعث انحلال ترکیبات معدنی نامحلول فسفات می‌شوند (گلدستاین،1987). روش عمده و اصلی انحلال فسفر معدنی در باکتری‌های حل‌کننده فسفات در شکل 1 نشان داده شده است.

1. Goldstein

2. Low molecular organic acids



شکل 2- روش‌های گوناگون انحلال فسفات در ریزجانداران حل‌کننده فسفات (شارما و همکاران، 2013)

آنزیم‌های مسیر اکسیداسیون مستقیم[1] باعث انتشار اسیدهای آلی به فضای پری‌پلاسمیک و سپس محیط خارج سلولی می‌شود. در واقع ابتدا گلوکز توسط یک آنزیم درون‌سلولی به نام کوینوپروتئین گلوکز دهیدروژناز[2] به اسید گلوکونیک تبدیل می‌شود. سپس بسته به جنس و گونه باکتری، اسید گلوکونیک ممکن است با یک یا دو الکترون یا پروتون اضافی اکسید شده و در نتیجه تبدیل به 2-کتوگلوکونیک اسید یا 5 و 2-دیکتوگلوکونیک اسید[3] تبدیل شود. مطالعات گوناگون نشان داده است که ریزجانداران حل‌کننده فسفات برای انحلال کمپلکس‌های نامحلول فسفات، اسیدهای معدنی و آلی گوناگونی آزاد می‌کنند. انتشار این اسیدها موجب انحلال ترکیبات معدنی فسفات نامحلول، به‌ویژه ترکیبات فسفات کلسیم می‌شود(مینا و همکاران، 2015 ;آندرسون و همکاران، 1985 و آنتونی، 1988).

به‌علاوه، ریزجانداران حل‌کننده فسفات با ترشح آنزیم‌های گوناگونی سبب آزاد شدن فسفر به شکل محلول و قابل دسترس از ترکیبات آلی می‌شوند که قابل استفاده گیاهان می‌باشد (خو و همکاران، 2019). این روش در محیط‌ها و زیست‌بوم‌هایی که فسفر آلی، منبع مهم فسفر ذخیره شده محسوب می‌شود بسیار مهم و حیاتی است (گلدستاین، 1995).

علاوه بر ترشح اسیدهای آلی و معدنی و آنزیم، این ریزجانداران از سازوکارهای دیگری نیز نظیر آزاد کردن پروتون (H^+)، ترشح سیدروفور و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، تولید سولفید هیدروژن و غیره برای انحلال ترکیبات گوناگون فسفر محلول بهره می‌گیرند. در ادامه این مقاله به مهم‌ترین روش‌های انحلال فسفات پرداخته خواهد شد (شکل 2).

1- تولید اسیدهای آلی

ترشح اسیدهای آلی یکی از مهم‌ترین راهکارهای ریزجانداران حل‌کننده فسفات برای انحلال ترکیبات نامحلول فسفر است(وی و همکاران، 2018). اسیدهای آلی از طریق کاهش pH و همچنین کلاته‌کردن سبب افزایش قابلیت دسترسی فسفات می‌شوند. تنوع و میزان ترشح اسیدهای آلی به نوع سوبسترای کربن و ازت و دیگر پارامترهای محیطی وابسته است (آیدا و همکاران،

1. Direct oxidation pathway
2. Quinoprotein glucose dehydrogenase
3. Diketogluconic acid

2017). به‌طورکلی انحلال فسفات نامحلول توسط اسیدهای آلی به نوع اسید آلی، غلظت اسید آلی و تولید هم‌زمان چند اسید آلی بستگی دارد (ابو عیسی و همکاران، 1991). این ریزجانداران، اسیدهای آلی گوناگونی تولید و آزاد می‌کنند که در جدول‌های (2 و 3) به آن‌ها اشاره شده است.

جدول 2- برخی اسیدهای آلی تولید شده توسط باکتری‌های حل‌کننده فسفات (خان و همکاران، 2013)

نوع باکتری	اسید آلی تولید شده	منبع
Enterobacter sp. Fs-11	MA, GA	شهید و همکاران، 2012
Pseudomonas trivialis (BIHB 769)	GA, 2-KGA, LA, SA, FA, MA	ویاس و گولاتی، 2009
P. poae (BIHB808)	GA, 2-KGA, SA, CA, MA	ویاس و گولاتی، 2009
Pseudomonas spp. (BIHB 751)	OA, GA, 2-KGA, FA, MA	ویاس و گولاتی، 2009
Enterobacter Hy-401	OA, GA, MA, LA, CA, SA, FuA	یی و همکاران، 2008
Arthrobacter Hy-505	OA, GA, LA, CA	یی و همکاران، 2008
Azotobacter Hy-510	OA, GA, TA, LA, SA, FuA	یی و همکاران، 2008
Enterobacter Hy-402	OA, GA, TA, CA, SA, FuA	یی و همکاران، 2008
Rhodococcus erythropolis (CC-BC11)	GA	چن و همکاران، 2006
Bacillus megaterium (CC-BC10)	CA, LA, PA	چن و همکاران، 2006
Arthrobacter sp. (CC-BC03)	CA, LA	چن و همکاران، 2006
A. ureafaciens (CC-BC02)	CA	چن و همکاران، 2006
Serratia marcescens (CC-BC14)	CA, GA, SA, LA	چن و همکاران، 2006
Delftia (CC-BC21)	SA	چن و همکاران، 2006
Chryseobacterium (CC-BC05)	CA	چن و همکاران، 2006
Phyllobacterium myrsinacearum (CC-BC19)	GA	چن و همکاران، 2006

GA: اسید گلوکانیک؛ 2-KGA: 2α-کتوکلونیک اسید؛ LA: اسید لاکتیک؛ SA: اسید ساکسنیک؛FA : اسید فورمیک؛ MA: اسید مالیک؛ OA: اسید اگزالیک؛ CA: اسید سیتریک؛ FuA: اسید فوماریک؛ TA: اسید تارتاریک

جدول 3- برخی اسیدهای آلی تولید شده توسط قارچ‌های حل‌کننده فسفات

ریزجانداران	اسید غالب	منبع
Aspergillus niger FS1, Penicillium canescens FS23, Eupenicillium ludwigii FS27, Penicillium islandicum FS30	سیتریک، گلوکنیک، اگزالیک	مندس و همکاران، 2013
Aspergillus awamori S19	اگزالیک، مالیک، سیتریک، ساکسنیک، فوماریک	جین و همکاران، 2012
T. flavus, T. helicus, P. purpurogenum, P. janthinellum	استیک، بوتریک، سیتریک، فوماریک، گلوکنیک، گلوکورنیک، لاکتیک، اگزالیک، پروپونیک، ساکسنیک، والریک	سروینو و همکاران، 2010
Aspergillus niger, Penicillium bilaiae, Penicillium sp	سیتریک، اگزالیک	آرویدسون و همکاران، 2010
Aspergillus flavus, A. candidus, A. niger, A. terreus, A. wentii, Fusarium oxysporum, Penicillium sp., Trichoderma isridae, Trichoderma sp.	لاکتیک، مالئیک، مالیک، استیک، تارتاریک، سیتریک، فوماریک، گلوکنیک	آکینتوکان، 2007
A. flavus, A. candidus, Penicillium oxalicum	گلوتاریک، مالیک، گلوکونیک، اگزالیک	شین و همکاران، 2006
Aspergillus flavus, A. niger, P. canescens	اگزالیک، سیتریک، گلوکنیک، ساکونیک	ملیحه و همکاران، 2004
Penicillium rugulosum	سیتریک، گلوکنیک	ریس و همکاران، 2001
A. niger	ساکونیک	وازکویس و همکاران، 2000

به‌علاوه اسیدهای آلی، دارای گروه‌های هیدروکسیلی و کربوکسیلی هستند که می‌توانند با مسدود کردن[1] جایگاه‌های فعال جذب و ترسیب[2] فسفر، حلالیت و قابلیت دسترسی زیستی فسفر را افزایش دهند (بیانکو و دفز،2010 و ظفر، 1993). توانایی اسیدهای آلی گوناگون در انحلال ترکیبات معدنی فسفات، متفاوت است. برای مثال، سویه‌های با قابلیت تولید اسید اگزالیک و اسید تارتاریک توانایی بیشتری در انحلال ترکیبات نامحلول فسفات دارند (باشان و همکاران، 2013).

2- کلات کردن[3]

اسیدهای آلی و معدنی تولید شده بوسیله ریزجانداران حل‌کننده فسفات قادرند فسفات‌های نامحلول را از طریق کلاته کردن کاتیون‌ها، آنها را حل‌کرده و در اختیار گیاه قرار دهند (پرادهان و سوکلا، 2005 و خان و همکاران، 2009). کلاته‌کردن فرآیندی است که طی آن یک ترکیب شیمیایی با یک یون فلزی ترکیب شده و آن را از دسترس خارج می‌کند. کلاته شدن شامل ترکیب دو یا چند پیوند بین یک مولکول (لیگاند و یک یون فلزی) بوده و بنابراین یک ساختار حلقوی ایجاد می‌کند. کلاته‌شدن با یک لیگاند اسید آلی از طریق اکسیژنی که در گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل وجود دارد، انجام می‌شود و فقط وقتی‌که پنج حلقه شرکت‌کننده یا کمتر از شش حلقه مشترک بتواند تشکیل شود، به وجود می‌آید (والپولا و یون،2012).

روش کلات‌های آلی در حلالیت فسفات‌های نامحلول و کانی‌های معدنی فسفاتی به تشکیل کمپلکس با کلسیم، آهن یا آلومینیوم نسبت داده می‌شود که در نتیجه آن باعث آزادسازی فسفات به‌شکل محلول می‌شوند. واکنش‌ها به شکل زیر هستند.

$CaX_2.3Ca(PO_4)_2$ + Chelate → محلول PO_4^{3-} + دار

کمپلکس کلاته کلسیم

(X = OH یا F)

[1] Blocking
[2] Percipitation
[3] Chelation

$AL(Fe).(H_2O)_3(OH)_2H_2PO_4$ + chelate → محلول PO_4^{-3} + کمپلکس کلاته آهن یا آلومینیوم

قابلیت اسیدهای آلی در انحلال فسفر نسبت به اسیدهای معدنی بیشتر است. این تفاوت به تأثیر کلاته-کنندگی اسید آلی ترشح شده توسط ریزجانداران نسبت داده می‌شود (قره باغی،2010). در این راستا مطالعات نشان داده است توانایی باکتری‌های حل‌کننده فسفات در انحلال ترکیب نامحلولی نظیر هیدروکسی آپاتیت نسبت به استفاده از اسیدهای معدنی (در یک pH معین) در محیط مایع، بیشتر است (جدول 3).

ساختار مولکولی اسیدهای آلی در توانایی کلاته‌کردن یون‌های فلزی بسیار اثرگذار است. اگر تعداد گروه‌های هیدروکسیل (OH^-) در یک مولکول ثابت، افزایش یابد، توانایی آن برای ممانعت کردن از رسوب فسفر توسط Al^{3+} و Fe^{3+} و هم‌چنین توانایی آن‌ها در کلاته‌کردن Al^{3+} و Fe^{3+} بسیار افزایش می‌یابد؛ بنابراین عامل آزادسازی فسفر تنها کاهش pH نیست. این موضوع را پژوهشگران با اسیدی کردن محیط حاوی فسفات نامحلول انجام دادند. آن‌ها میزان آزادسازی فسفر را توسط جنس‌های *Pseudomonas sp.* و *Penicillium sp.* مقایسه کردند. نتایج نشان داد که باکتری و قارچ بیشتر از اسیدکلریدریک (HCl) باعث آزادسازی فسفر می‌شود (جدول 4).

جدول 4- مقایسه حلالیت هیدروکسی آپاتیت توسط باکتری، قارچ و اسیدکلریدریک

	شاهد	*Pseudomonas sp.*	*Penicillium sp.*	HCl
pH	6/79	3/45	6/44	3/80
فسفر (میلی‌گرم در لیتر)	24/2	51/7	46/7	24/2

به‌علاوه برخی از سویه‌های حل‌کننده فسفات بدون اینکه اسیدیته محیط را کاهش دهند بر حلالیت ترکیبات کلسیم فسفات اثرگذار هستند (ایلمر و شینر،1992). با توجه به مطالب ذکر شده به نظر می‌رسد مهم‌ترین دلیل این امر کلات کردن یون‌های کلسیم است(ریبادو و همکاران، 2020).

اسیدهای آلی مختلف توانایی گوناگونی در کلات کردن دارند که این امر به تعداد گروه‌های کربوکسیلی آن‌ها نسبت داده می‌شود. برای مثال، اسید سیتریک که دارای سه گروه کربوکسیلی است قدرت کلات‌کنندگی بسیار بالاتری نسبت به اسید مالیک که دارای دو گروه کربوکسیلی است، دارد. (جدول 5). اسیدهای آلی مونوبازیک نظیر اسید لاکتیک که گروه‌های هیدروکسیل نزدیکی به گروه‌های کربوکسیلی دارند، قدرت نسبتاً کمتری در کلاته‌کردن یون‌های کلسیم دارند(ماهیدی، 2011 و والپولا و یون، 2012).

جدول 5- مقایسه ثابت حلالیت (pKa) اسیدهای آلی گوناگون مؤثر در انحلال فسفات نامحلول

نوع اسید	تعداد گروه کربوکسیل	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
سیتریک	3	3/15	4/77	6/4
مالیک	2	3/40	5/13	-
اگزالیک	2	1/27	4/28	-
گلوکونیک	1	3/86	-	-

کلاته‌کردن فسفات‌های هیدروکسی توسط اسیدهای آلی دو ظرفیتی باعث تولید نمک‌های آهن و آلومینیوم هیدروکسید و آزاد شدن یون‌های فسفات می‌شود. در میان اسیدهای دی‌کربوکسیلیک، آن‌هایی که دارای گروه‌های هیدروکسی هستند ترکیبات قوی‌تری را تشکیل می‌دهند. ترکیبات آلفا هیدروکسی نسبت به بتاهیدروکسی قوی‌تر

هستند (گروه‌های هیدروکسیلی که روی دومین اتم کربن از گروه کربوکسیلیک جای گرفته‌اند). افزایش قدرت اسیدی، اسیدهای آلفاهیدروکسی در مقایسه با اسیدهای غیرقابل جانشینی و در مقایسه با قدرت کلاته‌کردن Ca^{2+} توسط اسیدهای آلی با این‌گونه ساختار با قدرت آن‌ها در انحلال فسفات‌های کلسیم ارتباط دارد. توانایی اسیدهای آلی برای جلوگیری از جذب سطحی فسفر در خاک به این شکل کاهش می‌یابد(ماهیدی، 2011):

تری کربوکسیلیک اسید> دی کربوکسیلیک اسید> مونو کربوکسیلیک اسید

توانایی کلاته‌کردن Al^{3+} (ظرفیت حذف سمیت Al^{3+} توسط یک اسید آلی) با جایگاه نسبی گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیل روی یون کربن اصلی آن ارتباط دارد. کلات‌کننده‌های مؤثر Al^{3+} ساختار آلفا هیدروکسی دارند که تشکیل ساختارهای حلقوی پنج ضلعی را با Al^{3+} افزایش می‌دهند. اسیدهای آلیفاتیک که دارای گروه‌های هیدروکسیل و کربوکسیلیک در جایگاه مناسب هستند برای تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی نسبت به سایر اسیدهای آلیفاتیک یا آروماتیک، در آزادسازی فسفر از فسفات معدنی موثرترند. اسید بتاکتوگلوکونیک توسط بسیاری از باکتری‌های حل‌کننده فسفات تولید می‌شود و یکی از قوی‌ترین اسیدهای کربوکسیلیک تک‌ظرفیتی با ثابت انحلال اسیدی کم (pK_a=2.66) است. توانایی اسید بتاکتوگلوکونیک در محلول کردن هیدروکسی آپاتیت، به توانایی آن در کاهش pH بستگی داشته و ارتباطی با کلاته‌کردن یون‌های کلسیم ندارد. ثابت تعادل اسید بتاگلوکونیک کلسیم (Log K Ca) بسیار ناچیز است؛ بنابراین دو جدایه‌ای که pH را یکسان کاهش می‌دهند، ممکن است توانایی گوناگونی در انحلال فسفات معدنی داشته باشند. انحلال میکروبی نه‌تنها به pH نهایی محیط کشت بستگی داشته بلکه به نوع اسیدهای آلی تولید شده نیز وابسته است (ماهیدی، 2011).

3- اسیدهای معدنی

از دیگر روش‌های انحلال ترکیبات نامحلول فسفر، تولید اسیدهای معدنی توسط ریزجانداران است. تولید اسیدهای معدنی، روشی غیرمستقیم در انحلال فسفر است. در واقع در این روش موادی نظیر دی‌اکسیدکربن و غیره توسط ریزجانداران تولید و در طی واکنش‌هایی باعث انحلال فسفر می‌شوند. برای مثال، ریزجانداران خاک و ریشه گیاهان به‌عنوان تولیدکننده‌های دی‌اکسید کربن در ریزوسفر شناخته می‌شوند (رودریگز و فراگا،1999). همان‌طور که در زیر نشان داده شده است دی‌اکسیدکربن باعث تبدیل فسفر نامحلول به فرم محلول می‌شود.

$Ca_3(PO_4)_2 + CO_2 + H_2O \leftrightarrow 2CaHPO_4 + CaCO_3$
$Ca_3(PO4)_2 + 2CO_2 + 2H_2O \leftrightarrow Ca(H_2PO_4)_2 + 2CaCO_3$

آنیون‌های معدنی نظیر بی‌کربنات‌ها و کربنات‌ها (HCO_3^-، CO_3^{2-}) نیز می‌توانند باعث آزادسازی یا کاهش ته‌نشینی فسفر از طریق رقابت برای مکان‌های جذبی و تشکیل کمپلکس با یون‌های آلومینیوم، آهن و کلسیم شوند.

اسید نیتریک و اسید سولفوریکی که از طریق اکسیداسیون ترکیبات نیتروژنی یا گوگرد معدنی توسط باکتری‌های نیتریفیکاتور و *Thiobacillus spp.* تولید می‌شوند با ترکیبات نامحلول فسفر از جمله سنگ فسفات واکنش داده و فسفر را به شکل محلول در می‌آورند(خان و همکاران، 2007).

$NH_4NO_3 + 2O_2 \leftrightarrow 2HNO_3 + H_2O$
$(NH_4)_2SO_4 + 4O_2 \rightarrow 2HNO_3 + 2H_2O$
$2S + 3O_2 + H_2O \rightarrow 3H_2SO_4$
$Ca_3(PO_4)_2 + 2HNO_3 \rightarrow 2CaHPO_4 + Ca(NO_3)_2$
$Ca_3(PO_4)_2 + 4HNO_3 \rightarrow Ca(H_2PO_4)_2 + 2Ca(NO_3)_2$
$Ca_3(PO_4)_2 + H_2SO_4 \rightarrow CaHPO_4 + CaSO_4$
$Ca_3(PO_4)_2 + 2H_2SO_4 \rightarrow Ca(H_2PO_4) + 2CaSO_4$

همچنین سولفید هیدروژن از طریق احیاء اسیدهای آمینه حاوی گوگرد و یا توسط ریزجانداران هتروتروف تولید می‌شود. سولفات توسط باکتری‌های احیاءکننده آن مانند *Desulfovibrio* مطابق واکنش زیر احیاء می‌شود.

$SO_4 + 10H + 8e^- \rightarrow H_2S + H_2O$

همان‌طوری که در زیر نشان داده شده است سولفید هیدروژن تولید شده با فسفات آهن واکنش داده و باعث آزادسازی فسفات می‌شود. همان‌طور که در زیر نشان داده شده است:

$$FePO_4 + H_2S \rightarrow FeS + H_2PO_4$$

سولفید هیدروژن تحت شرایط بی‌هوازی، آهن موجود در سولفات آهن فریک نامحلول را به شکل محلول آهن (مانند سولفید آهن II) تبدیل کرده و باعث آزادسازی فسفات محلول می‌شود. لذا گوگرد می‌تواند برای انحلال ترکیبات نامحلول فسفر خاک مورد استفاده قرار گیرد (خان و همکاران، 2007).

4- خروج پروتون

به‌نظر می‌رسد ترکیبات نامحلول فسفر بدون تولید اسید و به‌واسطه آزادسازی پروتون‌های تولید شده از طریق تنفس یا احیای آمونیوم نیز انجام می‌شود (Kucery, 1983)؛ بنابراین فسفات‌های نامحلول به‌طور مستقیم در سطح سلول‌های میکروبی انحلال می‌یابند. پروتون‌های آزاد شده (+H) زیادی به‌عنوان محصول جانبی واکنش‌های درگیر در سازوکارهای باکتری‌های حل‌کننده فسفر (اسیدهای آلی و آنزیم) تولید می‌گردد. پروتون‌های آزاد شده (+H) با کربنات‌های معدنی از جمله کربنات کلسیم ($CaCO_3$) و همچنین ترکیبات Ca-P واکنش داده و نهایتاً میزان +Ca2 را در محیط افزایش داده است. تحت این شرایط می‌توان انتظار داشت که علاوه بر انحلال ترکیبات فسفری و افزایش فسفات آب، بخشی از آنیون‌های فسفات با کاتیون‌های +Ca2 واکنش داده و میزان Ca-P را افزایش می‌دهد (ماهیدی، 2011).

5- تولید سیدروفور

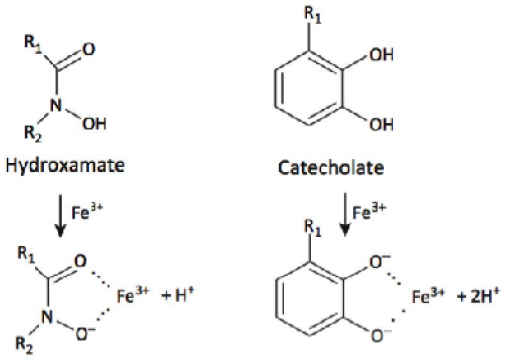
در خاک‌های با تهویه خوب، آهن سه ظرفیتی شکل غالب آهن بوده که ممکن است با فسفر محلول واکنش داده و ترکیب فسفات آهن نامحلول ($FePO_4$) را تشکیل می‌دهد. این ترکیب بسیار پایدار بوده و تحت شرایط اکسیژنی خاصی آزاد می‌شود. همان‌طور که قبلاً نیز ذکر شد تعداد اندکی از ریزجانداران حل‌کننده فسفات دارای توانایی انحلال ترکیب مذکور از طریق ترشح اسیدهای آلی هستند. با این وجود برخی از ریزجانداران از طریق تولید و ترشح ترکیبات خارج سلولی ویژه‌ای که برای تأمین آهن مورد نیاز خود بکار می‌گیرند، می‌توانند موجب آزاد شدن فسفر نیز شوند. این ترکیبات که میل ترکیبی بسیار زیادی با آهن دارند سیدروفور نامیده می‌شود (کومار و همکاران، 2018).

در واقع سیدروفورها به‌منظور مقابله با تنش کمبود آهن قابل جذب ترشح می‌شوند. به‌جز موارد استثنایی، تمام باکتری‌های هوازی، بی‌هوازی اختیاری، قارچ‌ها و اکتینومیست‌ها دارای توانایی تولید سیدروفور هستند ولی مقدار تولید سیدروفور در گونه‌های گوناگون میکروبی و حتی در سویه‌های گوناگون مربوط به هرگونه نیز بسیار متفاوت است. بین میکروارگانیسم‌های گوناگون نه‌تنها از نظر مقدار تولید بلکه از لحاظ نوع سیدروفور تولید شده نیز تفاوت چشمگیری وجود دارد. برخی از میکروارگانیسم‌ها فقط یک نوع سیدروفور تولید می‌کنند، در حالی‌که برخی دیگر ممکن است چندین نوع سیدروفور ترشح نمایند(ساتیاپراکاش و همکاران، 2017). تاکنون بیش از پانصد نوع سیدروفور میکروبی گوناگون شناسایی شده است که تعدادی از آن‌ها در جدول (6) آورده شده است.

سیدروفورها به‌دلیل داشتن گروه‌های عاملی گوناگونی که دارند، آهن را به دام می‌اندازند. البته بیشتر سیدروفورها گروه‌های عاملی مشابهی دارند. رایج‌ترین و مهم‌ترین گروه‌های عاملی شامل هیدروکسامات، کاتکولات، هیدروکسی کربوکسیلات و اتیلن دی‌آمین دی کربوکسیل هستند (سلوی و همکاران، 2017).

جدول 6-تولید سیدروفور توسط باکتری و قارچ‌های گوناگون

سیدروفور	ریزجانداران تولیدکننده
Hydroxamate	
Ferrichrome	*Ustilago sphaerogena*
Desferrioxamine B (deferoxamine)	*Streptomyces pilosus,* *Streptomyces coelicolor*
Desferrioxamine E	*Streptomyces coelicolor*
Fusarinine C	*Fusarium roseum*
Ornibactin	*Burkholderia cepacia*
Catecholate	
Enterobactin	*Escherichia coli*
Bacillibactin	*Bacillus subtilis, Bacillus anthracis*
Vibriobactin	*Vibrio cholera*
Mixed ligands	
Azotobactin	*Azotobacter vinelandii*
Pyoverdine	*Pseudomonas aeruginosa*
Yersiniabactin	*Yersinia pestis*



شکل 3- روش به دام انداختن آهن سه ظرفیتی توسط برخی سیدروفورها

به‌طورکلی سیدروفورها از دو روش می‌توانند باعث افزایش قابلیت دسترسی فسفر در محیط شوند. سیدروفورها در محیط با آهن پیوند محکمی می‌دهند و مانع از واکنش آهن با فسفر می‌شوند. همچنین سیدروفورها از طریق کلات‌کردن نیز باعث آزادسازی فسفات تثبیت شده در فسفات آهن ($FePO_4$) می‌شوند. بسیاری از ریزجانداران با این روش‌ها قادرند که حلالیت و جذب فسفر برای گیاهان را افزایش دهند. نقش سیدروفورها در حلالیت فسفر در خاک‌های اسیدی یعنی جایی که فسفات آهن سه ظرفیتی یکی از اشکال غالب است، به نظر حائز اهمیت است(دودور و طباطبایی، 2003).

6- ترشح آنزیم

ریزجانداران حل‌کننده فسفات برای انحلال ترکیبات آلی، آنزیم‌های مختلفی شامل فسفاتازها، فیتازها و فسفوناتازها تولید و آزاد می‌کنند(دودور و طباطبایی، 2003).

فسفاتازها مهم‌ترین آنزیم‌های دخیل در انحلال فسفر آلی به‌شمار می‌روند که با هیدرولیز پیوندهای فسفو-استری[1] و یا فسفوآنیدریدی[1] سبب آزاد شدن فسفر به

[1] phospho-ester

شکل محلول و قابل جذب می‌شوند. فسفاتازها به دو گروه اسیدی و قلیایی تقسیم می‌شوند. علت نام‌گذاری اسیدی یا قلیایی این آنزیم‌ها، فعالیت بهینه آن‌ها در این شرایط است (دیک و طباطبایی،1986؛ جورج و همکاران، 2008). این آنزیم‌ها بر ترکیبات آلی دارای فسفر مانند استرهای اینوزیتول فسفات، فسفولیپیدها و اسیدهای نوکلئیک اثر گذاشته و موجب آزاد شدن فسفات به شکل محلول و قابل جذب می‌شوند. فسفات‌های اینوزیتول به مقدار زیاد در مواد آلی خاک مانند بافت‌های مرده گیاهی و حیوانی خاک یافت می‌شوند، بنابراین منبع بسیار مناسبی برای فعالیت ریزجانداران آزادکننده آنزیم‌های فسفاتاز هستند (یوان و همکاران، 2007). میزان ترشح فسفاتازها در ریزجانداران گوناگون بسیار متنوع است. برخی موجودات مطلقاً توان ترشح این آنزیم را ندارند. با توجه به اهمیت فسفاتازها در آزادسازی فسفات از فسفر آلی، مطالعات زیادی روی فسفاتازهای اسیدی و قلیایی انجام شده است (طباطبایی،1982). فسفاتاز در خاک ممکن است به‌وسیله ریشه گیاهان، باکتری‌ها، قارچ‌ها و اکتینومیست‌ها تولید شود (طرفدار و مارشنر،1994). البته مطالعات انجام شده نشان داده است فسفاتاز قلیایی تماماً به‌وسیله ریزجانداران تولید شده و گیاهان آن را ترشح نمی‌کنند در حالی که وجود فسفاتاز اسیدی در ریشه گیاهان اثبات شده است (ایلمر و شینر،1995؛ دودور و طباطبایی،2003).

همچنین فیتازها گروه ویژه‌ای از فسفاتازها هستند که با اثر بر فیتات‌ها باعث آزادسازی تدریجی فسفات به شکل قابل دسترس می‌شوند. فیتات منبع اصلی ذخیره فسفر در دانه گیاهان است (هایفنر و همکاران، 2005). فسفوناتازها نیز توسط گروه‌های خاصی از ریزجانداران تولید و ترشح می‌شود که آن‌ها را قادر به زیستن در همه محیط‌ها کرده است، زیرا آنزیم فسفوناتاز با هیدرولیز پیوندهای کربن-فسفر (C-P) علاوه بر آزادشدن فسفات، موجب افزایش دسترسی کربن و ازت نیز می‌شود (دومورا و همکاران،1989؛ جورج و همکاران، 2008).

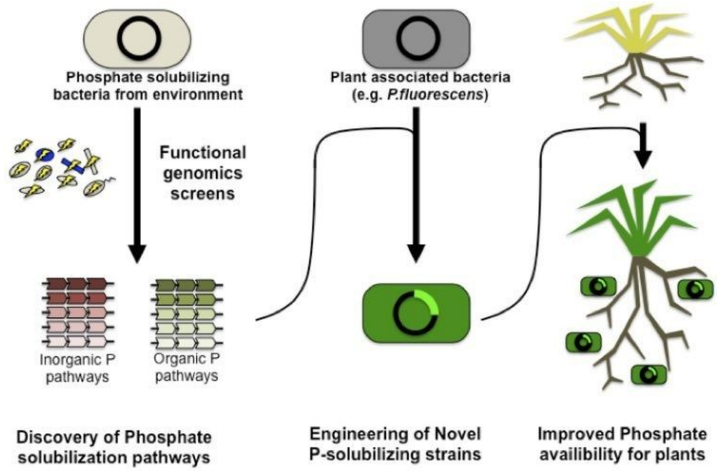
7- ژن‌های درگیر در انحلال فسفر

مطالعه نحوه بیان و توارث ژن‌های مرتبط با مواد مترشحه از این ریزجانداران که مسئول حلالیت فسفر هستند، در اصلاح ژنتیکی و بهبود کارآیی این ریزجانداران نقش اساسی ایفا می‌کند. بدین منظور روش‌های ژنتیک مولکولی برای فهم مبانی ژنتیکی تولید مواد حل‌کننده فسفات مثل اسید گلوکونیک، در باکتری‌های حل‌کننده فسفات بکار گرفته شده است. باکتری اشرشیاکولی (*E. coli*) به‌عنوان دارنده ژن آپوگلوکوز دِهیدروژناز (آنزیمی که مسئول تبدیل گلوکز به گلوکونات است) شناخته شده است، ولی کوفاکتور لازم برای این آنزیم، پیرولوکیلولین کوئینون (PQQ) را ندارد. موفقیت‌های اولیه در زمینه ژن های حل کننده فسفات توسط گلدستاین و لیو (1987) از باکتری گرم منفی *Erwinia herbicola* به دست آمده است. این ژن به کمک غربالگری نوترکیب‌های مقاوم به آنتی بیوتیک از مجموعه ژنومی محیط حاوی هیدروکسی آپاتیت جداسازی شد. بیان این ژن منجر به تولید اسید گلوکونیک و فعالیت انحلال فسفات معدنی در باکتری گردید. توالی یابی این ژن دخیل بودن احتمالی آنرا در سنتز پیرولوکیلولین کوئینون مشخص ساخت که یک فاکتور ضروری برای تشکیل آنزیم گلوگز دهیدروژناز است.

ژن مسئول در تولید PQQ در باکتری‌های *E. Herbicula* تکثیر می‌شود تا در باکتری‌های E. coli وارد شود و فنوتیپ‌های حل‌کننده فسفات معدنی جدا شوند (پانده و همکاران، 2017). به‌وسیله این روش دو ژن از باکتری *E.herbicula* بدست آمده است. یک ژن که تولید PQQ را کد می‌کند و دومی ژنی که وظیفه انتقال PQQ را به عهده دارد. ژن دیگر هم که در انتقال PQQ نقشی دارد، تکثیر می‌شود. ژن‌های ایجادکننده فنوتیپ حل‌کنندگان فسفات معدنی در E. coli تکثیر می‌شوند. ژن فسفات napA از باکتری خاکزی *Morgonella morgani*

1. phosphoanhydride bonds

جدا و از طریق وکتور pRK293 به باکتری *Burkholderia cepacia* منتقل شده است (فراگا و همکاران، 2001). تعداد 14 ژن کد کننده اسید فسفاتاز غیر اختصاصی از گونه‌های مختلف باکتریایی جداسازی شده است (رسونولی و همکاران،1984). ژنهای کد کننده فسفاتاز به سه گروه A, B و C تقسیم می‌شوند (تالر و همکاران، 1997؛ کائو و همکاران، 2010). چندین ژن فسفاتاز دیگر از باکتری*Esherichia coli* جداسازی شده که شامل ushA, agP, cpdB هستند که به ترتیب 2- 3- فسفواستراز حلقوی، گلوکز- L- فسفاتاز و 5- نوکلوتیداز را کد می‌کنند (پرادل و همکاران، 1990؛ برنز و بیچام، 1986؛ بیچام و همکاران،1980). برخلاف مشکلات موجود خوشبختانه پیشرفت‌های خوبی در زمینه مهندسی ژنتیک ریزجانداران حل کننده فسفات حاصل شده است (آرمارگر،2002). این واقعیت که صفت حل‌کنندگی فسفات با ژن‌های ویژه ارتباط دارد می‌تواند با استفاده از ژن‌های حل‌کننده فسفات در باکتری‌های ریزوسفر مانند ریزوبیوم و *Pseudomonas* راهی را برای ایجاد ریزجانداران حل‌کننده فسفات دیگر باز کند (شکل 4). معرفی ژن حل کننده فسفات دریچه جدیدی جهت توسعه کودهای زیستی ایجاد کرده است. به‌علاوه یک ناقل فسفر بسیار کارآمد از قارچ میکوریزا *Glomus vermiformis* تکثیر شده است که بیان این ژن در محیط خارج هدف نیز دیده شده است. افزایش بیان این ژن‌های بسیار کارآمد می‌تواند به توسعه بیشتر سویه‌های حل‌کننده فسفات بیانجامد (لیندا و همکاران،2014).



شکل 4- ایجاد ریزجانداران حل‌کننده فسفات نوین با بکارگیری روش‌های مولکولی (لیندا و همکاران،2014)

در *E. Coli* تنش فسفر در بیان بیش از 400 پروتئین مؤثر است و این اثر عمومی به‌وسیله دو سیستم مجزای تنظیم‌کننده به نام‌های phoR و phoB کنترل می‌شود، که phoR نقش حسگر را در کمبود فسفر بازی می‌کند و phoB یک تنظیم‌کننده مثبت هم‌جنس است. تحت شرایط تنش فسفر، phoB، PhoR را فسفریلاته می‌کند که این عمل بر توالی خاصی از DNA که جعبه PHO گفته می‌شود، اثر می‌گذارد (لیندا و همکاران،2014). ژن‌های زیادی مانند gltB gltD که با کمبود فسفر تنظیم می‌شوند، ممکن است در تجمع یا تولید فسفر نقش نداشته باشند. اخیراً تحقیقات نشان داده است که در جنس *Entrobacter* کمبود فسفر باعث تحریک گلوکز دهیدروژناز (آنزیمی که در متابولیسم اکسیداتیو گلوکز نقش دارد) می‌شود. پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد که قابلیت حلالیت فسفر مربوط به ژن و ژن‌های خاصی است که حتی در باکتری‌های غیر حل‌کننده فسفات نیز وجود دارد، ولی بیان نمی‌شود (لیندا و همکاران،2014).

نتیجه‌گیری کلی

به‌دلیل جذب و ترسیب بسیار سریع فسفر توسط کلسیم، آهن و آلومینیوم درصد بسیار زیادی از فسفر از دسترس گیاهان خارج می‌شود. همچنین نیمی از فسفر کودهای فسفاته توسط کلسیم موجود در خود این کودها از دسترس خارج می‌گردد؛ بنابراین درصد بسیار اندکی از کود فسفر (حدود 10 درصد) بکار رفته موجب افزایش فسفات قابل دسترس می‌گردد و باقی‌مانده آن به‌سرعت در خاک به شکل کمپلکس‌های نامحلول تجمع می‌یابد. کمبود فسفر با استفاده از کودهای شیمیایی فسفاتی که در واقع گران و گاهاً خطرناک هستند تأمین می‌شود. از 200 میلیون تن کود شیمیایی مصرف شده در جهان حدود 46 میلیون تن مربوط به کودهای شیمیایی فسفاته می‌باشد که در ایران به حدود یک میلیون تن می‌رسد. گرچه فسفر آلی در برخی از خاک‌ها ممکن است بخش بزرگی از فسفر خاک را تشکیل می‌دهد اما به‌طور مستقیم از آن به‌عنوان ماده مغذی استفاده نمی‌شود مگر اینکه توسط آنزیم‌های خاک تجزیه و در دسترس قرار گیرد.

با توجه به هزینه بالای کودهای شیمیایی فسفاتی و تجمع فسفر در خاک، یافتن یک جایگزین ارزان و مناسب بسیار ضروری است. در این راستا، تهیه فرآورده‌های زیستی حاوی تعداد کافی از میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات راه‌حلی برای مشکل فسفر ارائه شده است. هنگامی‌که این میکروارگانیسم‌ها روی بذر، سطوح گیاه یا خاک بکار می‌رود، در ریزوسفر یا اندوفیت‌ها استقرار می‌یابند و با فراهم آوردن فسفر، رشد گیاهان را تسهیل می‌کنند. میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات مختلفی نظیر باکتری‌ها و قارچ‌ها در خاک زندگی می‌کنند. این میکروارگانیسم‌ها با تولید اسیدهای معدنی و آلی و آنزیم‌های مختلف این کار را انجام می‌دهند. هنگامی که این میکروارگانیسم‌ها با بذور و خاک‌ها مخلوط شوند، آنها از طریق فراهمی مواد مغذی بخصوص فسفر، آزادسازی فیتوهورمون‌هایی نظیر ایندول اسیداستیک، جیبرلین و سیتوکینین، فراهم‌آوردن آهن از طریق آزادسازی سیدروفور، رهاسازی ترکیبات ضد میکروبی برای مقابله با عوامل بیماری‌زا، ایجاد مقاومت در برابر خشکی، شوری موجب رشد و توسعه گیاهان می‌گردند؛ بنابراین، استفاده از این میکروارگانیسم‌ها در تولید محصولات زراعی به‌عنوان یک جایگزین سازگار با محیط‌زیست محسوب می‌شود. بااین‌حال، برای تولید آن‌ها، ریزجانداران دارای توانایی انحلال فسفات باید جداسازی و شناسایی شده و پس از آن در گلدان و یا مزرعه آزمایش شوند. این ریزجانداران با روش‌های مختلف از جمله تولید اسیدهای معدنی، آلی، تولید پروتون، ترشح سیدروفور، کلاته‌کردن و تولید آنزیم فسفاتاز، قادرند ترکیبات نامحلول معدنی و آلی فسفر را به ترکیبات محلول تبدیل کنند. در خاک‌های معدنی حاوی مقادیر زیاد فسفات‌های کلسیم، منیزیم، آهن و آلومینیم، عمدتاً تولید اسیدهای معدنی و آلی و در خاک‌های آلی بیشتر آنزیم فسفاتاز مؤثر هستند.

از مهمترین اسیدهای معدنی می توان به اسید سولفوریک، اسید نیتریک، اسید کربنیک و از اسیدهای آلی اسید اگزالیک، مالیک، سیتریک اشاره کرد. اسیدهای آلی از طریق کاهش pH و همچنین کلاته‌کردن سبب افزایش قابلیت دسترسی فسفات می‌شوند. تنوع و میزان ترشح اسیدهای آلی به نوع سوبسترای کربن و ازت و دیگر پارامترهای محیطی وابسته است. به‌طورکلی انحلال فسفات نامحلول توسط اسیدهای آلی به نوع اسید آلی، غلظت اسید آلی و تولید هم‌زمان چند اسید آلی بستگی دارد. قابلیت اسیدهای آلی در انحلال فسفر نسبت به اسیدهای معدنی بیشتر است. اسیدهای آلی مختلف توانایی گوناگونی در کلات کردن دارند که این امر به تعداد گروه‌های کربوکسیلی آن‌ها نسبت داده می‌شود. برای مثال، اسید سیتریک که دارای سه گروه کربوکسیلی است قدرت کلات‌کنندگی بسیار بالاتری نسبت به اسید مالیک که دارای دو گروه کربوکسیلی است. میزان، نوع و تعداد سیدروفور تولیدی توسط ریزجانداران بسیار

متفاوت است و تاکنون بیش از 500 سیدروفور شناخته شده است که توسط آنها تولید می‌گردد. ریزجانداران حل‌کننده فسفات برای انحلال ترکیبات آلی آنزیم‌های مختلفی شامل فسفاتازها، فیتازها و فسفوناتازها تولید و آزاد می‌کنند. فسفاتازها به دو گروه اسیدی و قلیایی تقسیم شده و مهم‌ترین آنزیم‌های دخیل در انحلال فسفر آلی به‌شمار می‌روند که با هیدرولیز پیوندهای فسفو- استری و یا فسفوآنیدریدی سبب آزاد شدن فسفر به شکل محلول و قابل جذب می‌شوند. برای انحلال بیشتر فسفات‌های نامحلول پیشنهاد می‌شود از ریزجاندارانی استفاده شود که به طور همزمان بتوانند اسید معدنی، آلی، سیدروفور و آنزیم فسفاتاز تولید نمایند.

فهرست منابع:

1. Abu-Eishah, S. I., El-Jallad, I. S., Muthaker,M., Touqan, M. and Sadeddin, W. 1991. Beneficiation of calcareous phosphate rocks using dilute acetic acid solutions: optimisation of operating conditions for Ruseifa (Jordan) phosphate, nternational Journal of Mineral Processing, 31:1-2, pp. 115–126,.
2. Ahemad, M., Khan, M.S. 2012. Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing Pseudomonas putida isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere. Chemosphere 86:945–950.
3. Akintokun A.K., Akande G.A., Akintokun, P.O., Popoola, T.O.S. and Babalola, A.O. 2007. Solubilization of insoluble phosphate by organic acid producing fungi isolated from Nigerian soil. Int. J. Soil Sci. 2:301–307
4. Anderson, S., Marks, C.B., Lazarus, R., Miller, J., Stafford, K., Seymour, J., and Estell, D. 1985. Production of 2-keto-L-gulonate, an intermediate in L-ascorbate synthesis, by a genetically modffied erwinia herbicola. Science, 230 (47): 144-149.
5. Anthony, C. 1988. Quinoproteins and energy transduction. Bacterial Energy Transduction, 293-316. Academic Press; New York.
6. Armarger, N. 2002. Genetically modified bacteria in agriculture. Biochimie 84:1061–1072.
7. Arwidsson, Z. Johansson, E., Kronhelm, T.V., Allard, B. Van Hees, P. 2010. Remediation of metal contaminated soil by organic metabolites from fungi I—production of organic acids. Water Air Soil Pollut 205:215–226.
8. Bashan, Y. Kamnev, A.A., de-Bashan, L.E. .2013. Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. Biol Fertil Soils 49:465–479.
9. Beacham, I.R., and Garrett, S. 1980. Isolation of Escherichia colimutants (cpdB) deficient in periplasmic 2 –cyclic phosphodiesterase and genetic mapping of the cpdB locus. J Gen Microbiol; 119:31–34.
10. Bianco, C. and Defez, R. 2010. Improvement of phosphate solubilization and Medicago plant yield by an indole-3-acetic acid-overproducing strain of *Sinorhizobium meliloti*. Appl Environ Microbiol 76:4626–4632
11. Brady, N.C., and Weil, R.R. 2002.The nature and properties of soils, 13th edn. Prentice Hall of India,New Delhi, 960
12. Burns, D.M., and Beacham, I.R. 1986. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the Escherichia coli ushAgene, encoding periplasmic UDP-sugar hydrolase (5'-nucleotidase): regulation of the ushA gene, and thesignal sequence of its encoded protein product. Nucleic Acids Res;14:4325–42.

13. Cao, X., Song, C., Zhou, Y. 2010. Limitations of using extracellular alkaline phosphatase activities as a general indicator for describing P deficiency of phytoplankton in Chinese shallow lakes. Journal of Applied Phycology, 22(1): 33-41.
14. Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen, F.T., Lai, W.A. Young, C.C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Appl Soil Ecol 34:33–41
15. Chen,Y. P., Rekha, P. D., Arun,A. B., Shen,F. T., Lai,W. A., and Young, C. C. 2006.Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities, Applied Soil *Ecology*, 34 (1):33–41.
16. Dick, R.P., Tabatabai, M.A. 1986. Hydrolysis of polyphosphate in soils. Soil Sci 142:132–140
17. Dodor, D. E. and Tabatabai, M. A. 2003. Effect of cropping systems on phosphatases in soils, Journal of Plant Nutrition and Soil Science, 166(1) : 7–13.
18. Dumora, C., Lacoste, A. M. and Cassaigne, A. 1989. Phosphonoacetaldehyde hydrolase from Pseudornnnns aeruginnsci ; purification, properties, and comparison with Baci1lir.s cereus enzyme, Biochim. Biophys. Acta 997, 193-198.
19. Eida, A. A., Hirt, H., and Saad, M. M., (2017). Challenges Faced in Field Application of Phosphate-Solubilizing Bacteria. In Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation (pp. 125-143). Springer, Singapore.
20. Fraga, R., Rodriguez, H., Gonzalez, T. 2001. Transfer of the gene encoding the NapA acid phosphatase from Morganella morganii to a Burkholderia cepacia strain. Acta Biotechnol 21:359–369.
21. George T.S, Gregory P.J, Hocking P.J, Richardson A .E. 2008. Variation in root-associated phosphatase activities in wheat contributes to the utilisation of organic P substrates in vitro, but does not effectively predict P-nutrition in different soils. Environ Exp Bot 64:239–249
22. Gharabaghi, M., Irannajad, M. and Noaparast, M. A. 2010. Review of the beneficiation of calcareous phosphate ores using organic acid leaching, Hydrometallurgy, 103(1–4) : 96–107.
23. Goldstein, A.H. 1995. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. Biol Agric Hortic 12:185–193
24. Goldstein, A.H., Liu, S.T. 1987. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from Erwinia herbicola. Biotechnology 5:72–74.
25. Gyaneshwar, P., Naresh, K.G., Parekh, L.J. 1998. Effect of buffering on the phosphate solubilizing ability of microorganisms. World J Microbiol Biotechnol 14:669–673.
26. Haefner, S., Knietsch, A., Scholten, .2005. Biotechnological production and applications of phytases. Appl Microbiol Biotechnol 68, 588–597
27. Illmer, P. and Schinner, F. 1992. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. Soil Biol Biochem 24:389–395.
28. Illmer, P. and Schinner, F. 1995 Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. Soil Biol Biochem 24:389–395.
29. Jain, R., Saxena, J. and Sharma, V. 2012. Effect of phosphate solubilizing fungi *Aspergillus awamori* S29 on mungbean (*Vigna radiata* cv. RMG 492) growth. Folia Microbiol 57:533–541.
30. Khan, A., Jilani, V., Akhtari, M. S., Naqvi,S. M. S. and Rasheed, M. 2009. “Phosphorus solubilizing bacteria: occurrence, mechanisms and their role in crop production,” Journal of Agricultural and Biological Science, 1: 48–58.

31. Khan, M. S. Zaidi,A. and Wani, P. A. 2007. Role of phosphatesolubilizing microorganisms in sustainable agriculture a review, Agronomy for Sustainable Development, 27(1): 29–43.
32. Khan, M.S., Ahmad, E., Zaidi, A., Oves, M. 2013. Functional aspect of phosphate-solubilizing bacteria: importance in crop production. In: Maheshwari DK et al (eds) Bacteria in agrobiology: crop productivity. Springer, Berlin, pp 237–265.
33. Khan, M. S., Zaidi, A., & Ahmad, E. 2014. Mechanism of phosphate solubilization and physiological functions of phosphate-solubilizing microorganisms. In Phosphate solubilizing microorganisms Springer, Cham. 31-62.
34. Kucey, R. M. N. 1983. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils. Canadian Journal of Soil Science, 63 (4): 671-678.
35. Kumar,A., and Patel., H. 2018.Role of microbes in phosphorus availability and acquisition by plants, nternational Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 7(5) : 1344–1347.
36. Linda, R.,and Babyson, R. S. 2014. Molecular characterization of phosphate solubilizing bacteria (PSB) and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) from pristine soils. International Journal of Innovative Science, Engineering & Technology, 1(7): 317-324.
37. Mahidi,S. S. Hassan, G. I., Hussain,A. and Faisul, U. R., 2011.Phosphorus availability issue-its fixation and role of phosphate solubilizing bacteria in phosphate solubilization-case study, Research Journal of Agriculture Science, 2: 174–179.
38. Maliha, R., Samina, K., Najma, A., Sadia, A., Farooq, L. 2004. Organic acid production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms under in vitro conditions. Pak J Biol Sci 7:187–196
39. Mao, L., Lu, Q., Mo, W., Xin, X., Chen, X., He, Z. 2017. Phosphorus availability and release pattern from activated dolomite phosphate rock in Central Florida. J. Agric. Food Chem. 65: 4589–4596.
40. Meena, M. D., & Biswas, D. R. 2015. Effect of rock phosphate enriched compost and chemical fertilizers on microbial biomass phosphorus and phosphorus fractions. African Journal of Microbiology Research, 9(23), 1519-1526.
41. Mendes, G.O., Dias, C.S., Silva, I.R., Ju´nior, J.I.R., Pereira, O.L., Costa, M.D. 2013. Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. World J Microbiol Biotechnol 29:43–50.
42. Mendes, G.O., Dias, C.S., Silva, I.R., Ju´nior, J.I.R., Pereira, O.L., Costa, M.D. 2013. Fungal rock phosphate solubilization using sugarcane bagasse. World J Microbiol Biotechnol 29:43–50.
43. Pande, A., Pandey, P., Mehra, S., Singh, M., & Kaushik, S. 2017. Phenotypic and genotypic characterization of phosphate solubilizing bacteria and their efficiency on the growth of maize. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15(2), 379-391
44. Pradhanm, N. and Sukla,L. B. 2012.Solubilization of inorganic phosphate by fungi isolated from agriculture soil, African Journal of Biotechnology, 5: 850–854.
45. Reyes, I., Baziramakenga, R., Bernier, L., Antoun, H. 2001.Solubilization of phosphate rocks and minerals by a wild-type strain and two UV induced mutants of Penicillium rugulosum. Soil Biol Biochem 33:1741–1747
46. Ribaudo C, Zaballa J.I, and Golluscio R. 2020. Effect of the phosphorus-solubilizing bacterium *Enterobacter Ludwigii* on barley growth promotion. American Scientific Research Journal for Engineering, Technology, and Sciences (ASRJETS). Jan 26;63(1):144-57.
47. Richardson, A.E. 1994. Soil microorganisms and phosphorus availability. In: Pankhurst C.E., Doube ,B.M., Gupta, V.V.S.R., Grace, P.R. (eds) Management of the soil biota in sustainable farming systems. CSIRO Publishing, Melbourne, pp 50–62

48. Rodrıguez, H. and Fraga,R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion, iotechnology Advances, 17: 319–339.
49. Rossolini, G.M., Shippa, S., Riccio, M.L., Berlutti, F., Macaskie, L.E., Thaller, M.C. 1998. Bacterial nonspecific acid phos- phatases: physiology, evolution, and use as tools in microbial biotechnology. Cell Mol Life Sci;54:833–50.
50. Satyaprakash, M., Nikitha, T. Reddi, E. U. B. Sadhana, B. and Vani, S. S. 2017. A review on phosphorous and phosphate solubilising bacteria and their role in plant nutrition," International Journal of Current Microbiology and Applied Scences, 6: 2133–2144.
51. Scervino, J.M., Mesa, M.P., Mo´nica, I.D., Recchi, M., Moreno, N.S., and Godeas, A. 2010a. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. Biol Fertil Soil 46:755–763.
52. Scervino, J.M., Mesa, M.P., Mo´nica, I.D., Recchi, M., Moreno, N.S., Godeas, A. 2010b. Soil fungal isolates produce different organic acid patterns involved in phosphate salts solubilization. Biol Fertil Soils 46:755763
53. Selvi, K. B., Paul, J. J. A., Vijaya, V. and Saraswathi, K. 2017. Analyzing the efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques, Biochemistry and Molecular Biology Journal, 3: 1-12.
54. Shahid, M., Hameed, S., Imran, A., Ali, S., and Elsas, J.D. 2012. Root colonization and growth promotion of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by phosphate solubilizing Enterobacter sp. Fs-11. World J Microbiol Biotechnol 28:2749–2758.
55. Sharma, S.B., Sayyed, R.Z., Trivedi, M.H. and Gobi, T.A. 2013. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. SpringerPlus, 2 (1): 58-67.
56. Shenoy, V.V., Kalagudi, G.M. 2005. Enhancing plant phosphorus use efficiency for sustainable cropping. Biotechnol Adv 23:501–513.
57. Shin, W., Ryu, J., Kim, Y., Yang, J., Madhaiyan, M., Sa, T. 2006. Phosphate solubilization and growth promotion of maize [Zea mays L.] by the rhizosphere soil fungus Penicillium oxalicum. In: 18th World congress of soil science. 9–15 July, Philadelphia, PA
58. Tabatabai, M.A. 1982. Soil enzymes. In: Page A.L, Miller, R.H., Keeney, D.R. (eds) Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties, 2nd edn. American Society of Agronomy, Madison, WI, pp 903–948.
59. Tarafdar, J.C., Marschner, H. 1994. Phosphatase activity in the rhizosphere and hyphosphere of VA mycorrhizal wheat supplied with inorganic and organic phosphorus. Soil Biol Biochem 26:387–395.
60. Tate, K. R .1984. The biological transformation of P in soil. Plant Soil 76:245–256
61. Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., Lopez-Cortes, A., Bashan, Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biol Fertil Soils 30:460–468.
62. Vyas, P., Gulati, A. 2009. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent Pseudomonas. BMC Microbiol 9:174
63. Walpola, B. C. and Yoon,M. 2012. Prospectus of phosphate solubilizing microorganisms and phosphorus availability in agricultural soils: a review, African Journal of Microbiology. 6 (37): 6600-6605.
64. Wang, X., Wang, Y., Tian, J., Lim, B.L., Yan, X., and Liao, H. 2009. Overexpressing AtPAP15 enhances phosphorus efficiency in soybean. Plant Physiol 151:233–240.
65. Wei, Y., Zhao, Y., Shi, M., Cao, Z., Lu, Q., Yang, T., Fan, Y. and Wei, Z. 2018. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of

phosphorus solubilization during composting with enriched phosphatesolubilizing bacteria inoculation. Bioresour. Technol. 247: 190-199.

66. Xu, J. C., Huang, L. M., Chen, C., Wang, J., and Long, X. X. (2019). Effective lead immobilization by phosphate rock solubilization mediated by phosphate rock amendment and phosphate solubilizing bacteria. Chemosphere, 237, 124540.
67. Yadav, B.K., and Verma, A. 2012. Phosphate solubilization and mobilization in soil through soil microorganisms under arid ecosystems, the functioning of ecosystems. In: Ali, M. (ed) In Tech. ISBN:978-953-51-0573-2, Available from http://www.intechopen.com/books/the-functioning-of ecosystems/phosphate-solubilization-and-mobilization-in-soil-through-microorganismsunder-arid-ecosystems.
68. Yi, Y., Huang, W., and Ge, Y. 2008. Exo-polysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tricalcium phosphate. World J Microbiol Biotechnol 24:1059–1065.
69. Yuan, B.C., Li, Z.Z., Liu, H, Gao, M., Zhang, Y.Y. 2007. Microbial biomass and activity in salt affected soils under arid conditions. Appl Soil Ecol 35:319–328.
70. Zafar,Z. I. 1993. Beneficiation of low grade carbonate-rich phosphate rocks using dilute acetic acid solution, Fertilizer Research, 34(2) : 173–180.

Solubilization Mechanisms of Insoluble Phosphates by Phosphate Solubilizing Microorganisms

A. Fallah Nosratabad[1]
Associate Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: Rezafayah@yahoo.com
Received: July, 2021 & Accepted: January, 2022

Abstract

Phosphorus is one of the most important elements required by plants and it has many different roles, including energy production and transfer, increasing rooting, grain production and improving the quantity and quality of agricultural products. Unfortunately, more than 70% of the phosphorus entering the soil through phosphate fertilizers is stabilized and removed from the accessibility of plants. Therefore, phosphorus stabilization has caused the use of more chemical fertilizers and the amount of total phosphorus in the soil has increased and sometimes the entry of elements along with phosphate fertilizer may cause soil pollution. In order to increase the solubility of insoluble phosphates in the soil or to prevent phosphorus stabilization, environmentally friendly phosphate-solubilizing microorganisms (PSM) such as bacteria, fungi, actinomycetes and algae can be employed. These microorganisms are able to convert insoluble inorganic and organic compounds of phosphorus into soluble compounds by various methods such as production of mineral and organic acids, proton production, and secretion of siderophore, chelation and production of phosphatase enzyme. In mineral soils containing large amounts of calcium, magnesium, iron and aluminum phosphates, the production of mineral and organic acids and in organic soils the phosphatase enzymes are mostly effective. Genes encoding phosphate solubility have been isolated mainly from *Erwiniaherbicola*, *Esherichia coli* and *Morgonellamorgani*. Some of these genes include *ushA*, *agp*, *cpdB* and n*apA*. Despite the existing problems, fortunately, good progress has been made in the field of genetic engineering of phosphate-solubilizing microorganisms so that phosphate-solubilizing genes can be transferred to other bacteria. Due to the fact that soils contain both inorganic and organic compounds, it is recommended to use a microorganism with the ability to dissolve both organic and mineral compounds and a mixture of some microorganisms.

Keywords: Phosphatase, Genes, Mechanism, Phosphate solubilization, Organic and Mineral Acids

[1] Corresponding author: Associate Professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Evaluation of systemic and contact fungicides effects on symbiosis of *Rhizophagus irregularis* and vegetative traits of wheat and corn plants

F. Rejali[1], H. KariDolatabad, M. Safari and F. Fazlikhani

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

Assistant professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: h.kari@areeo.ac.ir

Agronomy Department of TarbiatModares University, Tehran, Iran; E-mail: m.safari@modares.ac.ir

Graduated M.Sc. student, Department of Soil Science, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran; E-mail:fazlikhanifahimeh20@yahoo.com

Received: March, 2022 & Accepted: January, 2022

Abstract

Today, fungicides are widely used to prevent or eradicate a variety of pathogenic fungi, but in some cases their use has destructive effects on beneficial microorganisms such as mycorrhizal fungi. Mycorrhizal fungi are among the beneficial microorganisms used in the production of biofertilizers. After mycorrhizal symbiosis, plant features included water and nutrient uptake as well as plant resistance to biotic and abiotic stresses improve. These microorganisms are also used to control soil pathogens. The present study was conducted to investigate the effect of concomitant use of fungicides including benomyl, roralthias, mancozeb and Tilt on the effectiveness of *R irregularis* in both wheat and corn plants under greenhouse conditions. The experiments were designed as a completely randomized design with five treatments and four replications. The effect of fungicides on the growth characteristics of wheat (Chamran cultivar) and corn (*Zeamays*, Single Cross 704) and their symbiosis relationship with *R. irregularis* were investigated. The results showed that the effectiveness of mycorrhizal fungus application was not affected by the concomitant use of fungicides. The application of fungicides also improved some growth characteristics in wheat and corn, although in most cases the differences with the control treatment were not significant. In general, two milliliters per liter of Tilt for wheat and two grams per liter of benomyl for corn can be recommended when using *R. irregularis* inoculum at the same time.

Keywords: Biofertilizer, Fungicide, Mycorrhizal symbiosis, Root colonization, *Rhizophagus irregularis*

[1.] Corresponding author: Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Evaluation of root colonization and biochemical compounds of saffron under irrigation regime, arbuscular mycorrhizal fungi and organic fertilizer

M. Habibi, F. Rejali[1], F. Zafarian and N. Bagheri

PhD student, Department of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: Maryam.habibi462@gmail.com

Assistant professor, Soil and Water Research Institute Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO) Karaj, Iran; E-mail: frejali@yahoo.com

Assistant professor of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: fa_zaefarian@yahoo.com

Assistant professor of Plant Breeding, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: bagherinadali@yahoo.com

Received: August, 2021 & Accepted: January, 2022

Abstract

In order to evaluate the potential of native species of saffron arbuscular mycorrhizal fungus under the conditions of irrigation cut stress on its physiological traits, a study was conducted as split plot factorial based on a randomized completely design with three replications in the institute of Soil and Water research in Karaj, during the years 2017-2019. Treatment consisted: Irrigation regime as the main factor in three levels (such as optimal irrigation as control, water interruption at the beginning of the growing season (mild restriction water) and water interruption at the beginning and mid of the growing season (severe restriction water)), organic fertilizer in three levels (no organic fertilizer, vermicompost (20 ton ha^{-1}) and biochar (10 ton ha^{-1}) and Arbuscular mycorrhizal fungal in three levels (no application, isolate a and isolate b) as the subfactor. . Based on the molecular findings, both isolate isolated from saffron rhizosphere belonged to *Rhizophagus irregularis*. The results of this study showed that the interaction of irrigation regime, organic fertilizer and *R. irregularis* had a significant effect on all measured parameters. The highest percentage of root colonization (98.7%) was for optimal irrigation treatment with biochar and isolate b. The highest content of chlorophyll a, b and carotenoids (with an average of 5.74, 4.36 and 1.52 µg / ml, respectively) was observed in the optimal irrigation treatment with vermicompost and isolate b. Also, the treatment of severe water restriction with biochar and isolate b increased 253, 82, 95 and 165% of CAT, POD and SOD enzyme activities and proline, respectively, in comparison with the optimal irrigation treatment and no application of organic fertilizer and mycorrhiza fungal, which had the lowest amount of these traits. According to the results obtained from this study, it is argued that the use of biochar and vermicompost fertilizers with isolate b can reduce the destructive effects of soil moisture stress.

Keywords: Irrigation, Antioxidant enzymes, Biochar, Proline, Identification Arbuscular mycorrhizal fungi, Root colonization

[1] Corresponding author: Soil and Water Research Institute Agricultural Research Education and Extension Organization Karaj, Iran.

Comparison of HRM and DGGE methods to study the composition of soil bacterial communities indifferent land uses

G. Jalali[1], A. Lakzian, A. R. Astaraei, and M. Mazhari
Assistant Professor, Department of Soil Science, University of Jiroft;
E-mail: gh.jalali@ujiroft.ac.ir
Professor, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad;
E-mail: lakzian@um.ac.ir
Associate Professor, Department of Soil Science, Ferdowsi University of Mashhad;
E-mail: astaraei@um.ac.ir
Assistant Professor, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Karaj Islamic Azad University; E-mail: mahboobeh.mazhari@kiau.ac.ir
Received: April, 2021 & Accepted: January, 2022

Abstract

Land use change is one of the most important factors influencing soil microbial communities which play a pivotal role in most biogeochemical and ecological processes. In order to determine the effect of land use on the composition of soil bacterial communities, High Resolution Melt (HRM) analysis and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) were used in three different land uses (orchard land, farmland and shrub land) in Jiroft plain, Iran. In the case of HRM analysis, a real-time PCR device equipped with this technique was used. DGGE technique via DCode^{TM} Universal Mutation Detection System was conducted to evaluate the composition of soil bacterial communities. The results of HRM as well as the ordination results based on the presence or absence of DGGE bands in soil samples using non-metric multidimensional scaling (NMDS) method showed that the land-use change from shrub land to agriculture (orchard and farm) had a significant effect on the soil bacterial community composition. According to the results of both methods, the soil bacterial community composition in agricultural lands (orchard and farm) was more similar than shrub land. Since HRM analysis is less expensive, easier and has less bias compared to DGGE technique, it is recommended to compare the composition of soil bacterial communities in different samples.

Keywords: Genomic DNA from soil, Soil bacterial 16S rDNA, Real-time PCR, Non-metric multidimensional scaling (NMDS)

[1]. Corresponding author: Soil Science Department, University of Jiroft, Jiroft.

Effect of mycorrhizal fungi accompanied by some microorganisms and chemical compounds on growth and photosynthesis indices of corn

M. Ahmadzadeh[1], E. Sedaghati, R. Sabri-Riseh, A. Rahimi, A. A. MohammadiMirik, and N. Hatami

M.Sc. of Plant Pathology, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran;
E-mail: Ahmadzadehmasomeh@gmail.com
Assistant professor of the Plant Pathology Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran;
E-mail: sedaghati@vru.ac.ir
Assistant professor of the Plant Pathology Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran;
E-mail: r.saberi@vru.ac.ir
Associate Professor of Agronomy, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran; E-mail: rahimia@vru.ac.ir
Associate Professor of Agronomy, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Iran;
E-mail: a.mohammadi@vru.ac.ir
Professor, Department of Agriculture, Payame Noor University, Tehran, Iran;
E-mail: narges.hatamy123@gmail.com

Received: October, 2021 & Accepted: January, 2022

Abstract

Due to the importance of mycorrhizal fungi and their ability in colonization of plants, the use of some microorganisms and chemical compounds to improve mycorrhizal activity is an important issue. In this study, an experminet was conducted as a compeletely randomized factorial desin with three replications at Valiasr University of Rafsanjan.Three fungal species, *Funneliformis mosseae*(FM), *Rhizophagus intraradices*(RI) and *Rhizophagus irregalaris* (RIr) were applied asmycorrhizal inoculant and the effect of some microorganisms including yeast (*Issatchenkia orientalis*) and bacteria (*Pseudomonas fluorescens* VUPf5) as well as chemical compounds such as compost tea, azolla extract, bacterial siderophore, humic acid and amino acid complex on fungal activity and physiological parameters of corn plant (SC750 cultivar) was examined. The results showed that all species of mycorrhizal fungi combined with bacterial treatment and chemical compounds had a significant effect on stem diameter and longitudinal growth, leaf area increase, root weight and dry weight and shoot dry weight. Variance analysis of SPAD showed that there was not significant difference between mycorrhizal and non-mycorrhizal treatments. However, the application of different species of mycorrhizal fungi had a significant effect on the content of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll and carotenoids in compared to the control (without mycorrhizal fungus) treatment. The use of humic acid and compost had the extreme effect on plant growth. Amino acid complex treatment with *Rhizophagus intraradices* had the greatest effect on chlorophyll a, chlorophyll b and total chlorophyll content. The treatments of yeast and amino acid complex had the greatest effect on carotenoids, respectively.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal, Corn,growth indexes, Chemical compounds

[1.] Corresponding author: Faculty of agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Kerman, Iran.

Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and irrigation levels on yield and growth characteristics of lemon (*Citrus aurantifolia*) trees in Darab

H. Haghighatnia[1], and F. Rejali

Assistant Professor of Soil and Water Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Darab, Fars, Iran; E-mail: hasan.haghighatnia@yahoo.com, Associate Professor of Soil and Water Research Institute, AREEO, Karaj, Iran; E-mail: frejali@yahoo.com

Received: October, 2021 & Accepted: January, 2022

Abstract

Lemon (*Citrus aurantifolia*) is particularly an important tree because its fruits are freshly used and also they are used in the food industries. Lemon tree has high economical value among all other citrus trees. In order to investigate the effects of mycorrhizal inoculation on lemon tree under draught stress, an experiment was carried out in split-block design with three replications. The study area was Darab and the experimental period was two years. The main plots consisted of three levels of irrigation (60 %, 80 % and 100 % of lemon water requirements), and the subplots were three levels of mycorrhizal inoculation (0, 1 and 2 kg per tree). Mycorrhizal inoculant was prepared by mixing of three species *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus irregularis* and *Claroideoglomus etunicatum*. The results showed that moisture stress, regardless to mycorrhizal inoculation, caused significant decrease in the majority of the measured traits, except Water use efficiency (WUE) that showed the opposite trend. Main effects of mycorrhizal inoculation increased the majority of measured traits. In 2 kg per tree inoculation treatment, fruit yield, fruit weight, leaf chlorophyll, leaf phosphorous concentration, relative water content, WUE and root colonization were significantly increased (22.1, 53.3, 42.0, 19.5, 15.3, 24.0 and 508 percent, respectively). Under the conditions of mild and sever moisture stresses, the use of mycorrhizal inoculant (1 and 2 kg per tree) improved some of the measured traits, such as fruit yield that increased 20.2% and 37.6%, respectively. As a general conclusion, using of mycorrhizal inoculation had significant effect on yield and some growth characteristics and increased tolerance to moisture stress probably due to improve P concentration and water relation in plant, such as osmotic adjustment, water hydronic conductivity and stomatal regulation.

Keywords: "Lemon (*Citrus aurantifolia*)", "Mycorrhizal fungi", "Phosphorous", "Water stress", "Water use efficiency".

[1.] Corresponding author: Soil and Water Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Darab, Fars, Iran

Effects of endophytic fungus *Serendipitaindica* on growth and nutritional characteristics of quinoa undersalinity stress conditions

S. Aliyar[1], N. Aliasgharzad, A. DabbaghMohammadiNasab, and Sh. Ostan
MSc of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran;
E-mail: aliyarsajad73@gmail.com
Professor.of Soil Biology and Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran;
E-mail: n-aliasghar@tabrizu.ac.ir
Professor. of Plant Ecophysiology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran;
E-mail: adeldabb@yahoo.com
Professor. of Soil Chemistry, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran;
E-mail: oustan@tabrizu.ac.ir
Received: May, 2021 & Accepted: January, 2022

Abstract

Quinoa (*Chenopodium quinoa*Willd.) is a high-yielding pseudo-cereal crop, belonging to the *Chenopodiaceae* plants, shows tolerance to salinity stress. As a chenopod plant, it could not establish a symbiosis relation with mycorrhizal fungi, but there are evidences that the *Serendipitaindica* (endophytic fungus) could enter the root and more likely improves the tolerance of quinoa against salt stress. This study was performed as a pot experiment in Completely Randomized Factorial Designs (CRFD) with three replications in a sterilized sandy loam soil. Experimental factors included two levels of *S. indica* (inoculated and non-inoculated) and salinity levels of 1.47 (initial electrical conductivity of soil), 5, 10, 20 and 30 dS/m. The interaction effect of salinity stress and fungal inoculation was significant for studied traits in both shoot and root ($P < 0.05$), except for the concentrations of nitrogen and phosphorus in the root. The concentrations of phosphorus, potassium, calcium and magnesium, growth traits and percentage of root colonization in quinoa were significantly reduced by increasing salinity levels ($P < 0.05$). *S. indica* increased root dry weight in control, 5 and 10 dS/m by 23.45, 25.66 and 25.57%, compared to no-fungal treatment, respectively. At initial electrical conductivity (1.47dS/m), shoot dry weight increased by 9% in inoculated plants compared to the non-inoculated treatment. Inoculation with *S. indica* reduced the concentration of root sodium at salinity levels of 10, 20 and 30 dS/m by 30.49, 66.78 and 43.55%, respectively, compared to the non-inoculated treatment. In the aerial part, the fungus could reduce the sodium concentration at 10, 20 and 30 dS/m by 20.96, 13.28 and 10.24%, respectively, compared to the treatment without the fungus. Based on the results, inoculation with the fungus significantly increased the concentrations of nitrogen, phosphorus and potassium in shoots at 20 and 30 dS/m.

Keywords: Growth characteristics, Nutrients, *S. indica*, Root colonization, Chlorophyll index.

[1]. Corresponding author: Soil science department, Faculty of agriculture, University of Tabriz.

Subject **Page**

Effects of endophytic fungus *Serendipitaindica* on growth and nutritional characteristics of quinoa undersalinity stress conditions.....1
S. Aliyar, N. Aliasgharzad, A. DabbaghMohammadiNasab and Sh. Ostan

Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and irrigation levels on yield and growth characteristics of lemon (*Citrus aurantifolia*) trees in Darab 2
H. Haghighatnia and F. Rejali

Effect of mycorrhizal fungi accompanied by some microorganisms and chemical compounds on growth and photosynthesis indices of corn 3
M. Ahmadzadeh, E. Sedaghati, R. Sabri-Riseh, A. Rahimi, A. A. MohammadiMirik and N. Hatami

Comparison of HRM and DGGE methods to study the composition of soil bacterial communities indifferent land uses.....4
G. Jalali, A. Lakzian, A. R. Astaraei, and M. Mazhari

Evaluation of root colonization and biochemical compounds of saffron under irrigation regime, arbuscular mycorrhizal fungi and organic fertilizer.....5
M. Habibi, F. Rejali, F. Zafarian and N. Bagheri

Evaluation of systemic and contact fungicides effects on symbiosis of *Rhizophagus irregularis* and vegetative traits of wheat and corn plants 6
F. Rejali, H. KariDolatabad, M. Safari and F. Fazlikhani

Solubilization Mechanisms of Insoluble Phosphates by Phosphate Solubilizing Microorganisms.....7
A. Fallah Nosratabad

Soil Science Society of Iran Soil and Water Research Institute

Journal of Soil Biology

Vol. 10, No 1

2022

***Manager-in–Charge* M. Gorji, PhD**

Professor, College of Agriculture and Natural Resources, Tehran University

Professor, University of Tehran

***Editor-in–Chief: Hadi Asadi Rahmani,* PhD**

Professor (Research), Soil and Water Research Institute

Editorial Board

Hadi Asadi Rahmani, PhD	**Professor (Research), Soil and Water Research Institute**
Hossein Ali Alikhani, phD	**Professor, University of Tehran**
Naser Aliasgharzad, PhD	**Professor, University of Tabriz**
Hossein Besharati, PhD	**Professor, Soil and Water Research Institute**
Alireza Fallah Nosratabad, PhD	**Associate Professor, Soil and Water Research Institute**
Ahmad Golchin, PhD	**Professor, University of Zanjan**
Amir Lakzian, PhD	**Professor, Ferdowsi University of Mashhad**
Habibollah Nadian Ghomshe, PhD	**Professor, Ramin Agricultural and Natural Resources University of Khuzestan**
Farshid Norbakhsh, PhD	**Professor, Isfahan University of Technology**
Abdol Hossein. Ziaeian, PhD	**Associate Professor of Agricultural and Natural Resources Research Center of Fars**

Executive Manager:	**Alireza Fallah Nosratabad**
English Editor:	**Amir Lakzian**
Type and design:	**Kobra Alinezhad**

Address: P. O. Box: 31785-311, Karaj – IRAN

Tel / Fax: 026-36208796

SSSI Website: www.soiliran.org

Soil and Water Research Institute Website: www.swri.ir

Journal Website: www.sbj.areeo.ir

E-mail: jsb.soilbiology@yahoo.com

Semiannual

Journal of Soil Biology

ISSN: 2345-2536

Vol. 10, No. 1, 2022

Subject **Page**

Effects of endophytic fungus *Serendipitaindica* on growth and nutritional characteristics of quinoa undersalinity stress conditions 1
S. Aliyar, N. Aliasgharzad, A. DabbaghMohammadiNasab and Sh. Ostan

Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and irrigation levels on yield and growth characteristics of lemon (*Citrus aurantifolia*) trees in Darab 2
H. Haghighatnia and F. Rejali

Effect of mycorrhizal fungi accompanied by some microorganisms and chemical compounds on growth and photosynthesis indices of corn 3
M. Ahmadzadeh, E. Sedaghati, R. Sabri-Riseh, A. Rahimi, A. A. MohammadiMirik and N. Hatami

Comparison of HRM and DGGE methods to study the composition of soil bacterial communities indifferent land uses 4
G. Jalali, A. Lakzian, A. R. Astaraei, and M. Mazhari

Evaluation of root colonization and biochemical compounds of saffron under irrigation regime, arbuscular mycorrhizal fungi and organic fertilizer 5
M. Habibi, F. Rejali, F. Zafarian and N. Bagheri

Evaluation of systemic and contact fungicides effects on symbiosis of *Rhizophagus irregularis* and vegetative traits of wheat and corn plants 6
F. Rejali, H. KariDolatabad, M. Safari and F. Fazlikhani

Solubilization Mechanisms of Insoluble Phosphates by Phosphate Solubilizing Microorganisms 7
A. Fallah Nosratabad

www.sbj.areeo.ir