Archive of SID

جداسازی و شناسایی قارچ‌های حل‌کننده فسفات از خاک‌های شور- سدیمی (مطالعه موردی: منطقه کرفون استان مازندران)

ندا الماسی جاویدی، بهی جلیلی[1]، فردین صادق زاده و سروش سالک گیلانی

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم خاک، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ neda_almasi12@yahoo.com

استادیار، گروه علوم خاک، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ bahi_jalilis@yahoo.com

استادیار، گروه علوم خاک، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ fardin.upm@gmail.com

مربی، گروه علوم خاک، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری؛ soroosh1352@yahoo.com

دریافت: 97/9/18 و پذیرش: 98/9/27

چکیده

شوری خاک فاکتور اصلی در کاهش تولید محصول مخصوصاً در نواحی خشک است. دسترسی به فسفر که یکی از عناصر پرمصرف مورد نیاز برای رشد و نمو گیاهان است در خاک‌های تحت تأثیر نمک کم می‌باشد. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی قارچ‌های حل‌کننده فسفات از خاک‌های شور- سدیمی و بررسی انحلال فسفات در حضور غلظت‌های مختلف نمک بود. به این منظور تعداد 20 نمونه خاک ریزوسفری گیاه سالیکورنیا (*Salicornia persica*) از اراضی منطقه کرفون استان مازندران برداشت شد. تعداد پنج جدایه قارچ حل‌کننده فسفات با تکینک کشت بر روی پلیت NBRIP-BPB[2] جداسازی شدند. برای بررسی تحمل جدایه‌ها به شوری، تمامی جدایه‌ها در محیط‌کشت جامد NBRIP-BPB حاوی غلظت‌های 0، ۵۰، 100، 200، ۴۰۰، ۶۰۰، 800 و 1000 میلی مولار NaCl کشت شدند. به منظور حصول اطمینان از توانایی انحلال فسفات جدایه‌ها، کشت شش روزه جدایه‌ها در محیط کشت مایع NBRIP فاقد NaCl صورت گرفت. جدایه‌ای که بیشترین میزان فسفر را آزاد نمود برای مطالعات بیشتر در محیط‌کشت مایع در حضور غلظت‌های مختلف NaCl انتخاب شد. اثر شوری بر انحلال فسفر با اعمال غلظت‌های 0، 50، 100، 200، 400، 600، 800 و 1000 میلی مولار NaCl در محیط کشت مایع NBRIP در طول 15 روز انجام شد. آزمون توانایی انحلال فسفات جدایه‌ها در محیط کشت جامد در حضور غلظت‌های مختلف NaCl نشان داد تمامی جدایه‌ها قادر به تشکیل هاله تا شوری 200 میلی‌مولار NaCl بودند ولی در ادامه با افزایش شوری تا 1000 میلی مولار تنها جدایه‌های KARFUN 1 و KARFUN 2 توانایی انحلال فسفات را نشان دادند. در آزمون شش روزه توانایی انحلال فسفات جدایه‌ها در محیط کشت مایع، جدایه KARFUN 1 بیشترین قابلیت انحلال فسفات را نسبت به سایر جدایه‌ها داشت. انجام شناسایی مولکولی مشابهت 100 درصدی جدایه KARFUN 1 را با گونه‌های *Aspergillus niger* و *Aspergillus tubingensis* نشان داد. نتایج انحلال فسفات در محیط کشت مایع در حضور غلظت‌های مختلف NaCl نشان داد صرف نظر از غلظت NaCl، سویه KARFUN 1 غلظت قادر به انحلال فسفات از تری کلسیم فسفات و کاهش pH محیط کشت بود. بهرحال، کمترین میزان فسفر در غلظت 1000 میلی‌مولار NaCl و بیشترین آن در تیمار شاهد حاصل شد. ماکزیمم انحلال فسفات به میزان 549 میلی‌گرم در لیتر در شوری صفر و 12 روز پس از آغاز انکوباسیون به‌دست آمد. در این زمان pH از 6 به 1/19 کاهش یافت. بهر حال، سویه KARFUN 1 توانایی انحلال فسفات را در غلظت‌های مختلف NaCl حفظ نمود به طوریکه سویه مذکور توانست میزان 224 میلی گرم در لیتر فسفر را در غلظت 1000 میلی‌مولار NaCl آزاد نماید.

واژه‌های کلیدی: مقاوم به شوری؛ *آسپرژیلوس*؛ تری کلسیم فسفات؛ فسفر محلول

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: گروه علوم خاک، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[2]. National Botanical Research Institute's phosphate growth medium- Bromo Phenol Blue

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

فسفر یکی از ضروری‌ترین عناصر پرمصرف مورد نیاز برای رشد و نمو گیاهان است (گونس و همکاران، 2009؛ کانس و همکاران، 2015). در اکثر خاک‌ها غلظت فسفر از 0/1 تا 10 میکرومول متغیر است، در حالی محصولات زراعی برای رشد بهینه به پنج تا 60 میکرومول فسفر نیاز دارند (سیائو و همکاران، 2008). کمبود فسفر یکی از مهمترین فاکتورهای شیمیایی محدود کننده رشد و عملکرد است، به‌طوریکه در سال‌های اخیر برای غلبه بر کمبود فسفر خاک و اطمینان از بهره‌وری گیاهان سالانه نزدیک به 30 میلیون تن کود شیمیایی در جهان استفاده می‌شود که 80 درصد آن به دلیل جذب، رسوب و یا تبدیل به اشکال آلی از دست می‌رود (بخشنده و همکاران، 2014). ازطرفی استفاده بی‌رویه و نامعقول از کودهای فسفردار منجربه کاهش حاصلخیزی خاک از طریق کاهش تنوع میکروبی و در نتیجه کاهش بازده محصولات زراعی می‌شود (خان و همکاران، 2010). کودهای شیمیایی علاوه بر گران بودن، از لحاظ زیست‌محیطی نامطلوب هستند (سینگ و ردی، 2011؛ یاداو و همکاران، 2011).

امروزه برخی از میکروارگانیسم‌ها، موسوم به حل‌کننده فسفات نقش قابل توجهی در تعدیل انتقال فسفات بین جزء آلی و معدنی خاک ایفا می‌کنند (ریس و همکاران، 1999؛ سان و همکاران، 2006). از جمله میکروارگانیسم‌های حل‌کننده فسفات در خاک می‌توان به باکتری‌ها، قارچ‌ها، اکتینومیست‌ها و قارچ‌های میکوریزای آربوسکولار[1] اشاره کرد. در این میان قارچ‌های حل‌کننده فسفات به دلیل قدرت رقابتی ساپروفیتی و تحمل به فلزات سنگین، مواد شیمیایی، قارچ کش‌ها و دما بیشتر حائز اهمیت می‌باشند (وایتلو، 2000). قارچ‌های خاکزی حل‌کننده فسفات عمدتاً متعلق به جنس‌های *پنی‌سیلیوم* و *آسپرژیلوس* هستند (زیدی و همکاران، 2009). این قارچ‌ها با کلات کردن و یا سنتز و ترشح اسیدهای آلی منجر به آزادسازی یون‌های فسفر از کانی‌های فسفردار به واسطه جایگزین H^+ به جای Ca، Fe و Al می‌شوند (چای و همکاران، 2011؛ سری نیواسان و همکاران، 2012). انحلال میکروبی فسفات‌های نامحلول نه تنها هزینه بالای کودهای تولیدی در صنعت را جبران می‌کند بلکه موجب پویایی کودهای افزوده شده به خاک می‌گردد (سان و همکاران، 2006). به نظر می‌رسد میکروارگانیسم‌ها جایگزین مناسبی برای کودهای شیمیایی فسفر باشند. با این حال خاک یک محیط متغیر است که موجب تنش‌های مختلف بر میکروارگانیسم‌ها می‌گردد. به این معنا که دماهای پایین، pH و شوری خاک بر فعالیت میکروارگانیسم‌ها تأثیر می‌گذارد (وسیلو و همکاران، 2012). تنش شوری جزء تنش‌های فیزیکوشیمیایی بوده که در سطح جهان گستردگی زیادی داشته و موجب اثرات مضری بر گیاهان مانند اثرات اسمزی, سمیت یونی, عدم تعادل هورمونی و برهم خوردگی تعادل عناصر غذایی و نیز تغییر در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک می‌شود (اشرف، 2009). شوری همچنین جذب فسفر بوسیله گیاه را مختل می‌کند و نیز فراهمی فسفر را از طریق فزایندهای جذب و حلالیت کم کانی‌های Ca-P کاهش می‌دهد (گراتان و گریو، 1998). مقاومت به pH، دما و شوری از عوامل مهم استقرار و گسترش میکروارگانیسم‌ها در خاک‌های تحت تأثیر نمک است (ماندرا و همکاران، 2011). از آنجا که قارچ‌ها در تنش‌های محیطی به سرعت سازگار می‌شوند (گاندی-سیمرمان و همکاران، 2009)، استفاده از مایه تلقیح آن‌ها در خاک‌های شور رویکرد مناسبی جهت مدیریت و تأمین عناصر غذایی گیاهان است که می‌تواند تولید محصول را در این اراضی افزایش دهد و از این طریق باعث احیای پوشش گیاهی و کاهش اثرات شوری در این دسته از خاک‌ها شود. بنابراین هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی قارچ‌های حل‌کننده فسفات از خاک‌های تحت تأثیر نمک بود که قادر به رشد و انحلال مؤثر فسفات به طور مؤثری باشند.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از خاک ریزوسفری

تعداد 20 نمونه خاک ریزوسفری گیاه سالیکورنیا (*Salicornia persica*) از اراضی شور و سدیمی منطقه کرفون واقع در استان مازندران تهیه و به کیسه‌های پلی اتیلن استریل منتقل گردیدند. همزمان نمونه خاک غیر ریزوسفری از عمق 0-30 سانتیمتر به منظور بررسی برخی خصوصیات شیمیایی تهیه شد. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، جداسازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات از نمونه‌های ریزوسفری صورت گرفت. لازم به ذکر است نمونه‌های ریزوسفری قبل و پس از انتقال به آزمایشگاه در دمای $4\ ^{\circ}C$ نگهداری شدند. نمونه خاک‌های غیر ریزوسفری پس از انتقال به آزمایشگاه هوا خشک شدند. pH و EC خاک به ترتیب در گل اشباع و عصاره گل اشباع اندازه‌گیری شد (رودز، 1992). سدیم، پتاسیم با دستگاه فلیم فتومتر (کنودسن و همکاران، 1992)، کلسیم و منیزیم محلول به روش کمپلکسومتری اندازه‌گیری شد (لنیون و هیلد، 1992).

[1] Arbuscular mycorrhizal fungi

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات

مقدار ده گرم خاک به 95 میلی لیتر آب مقطر استریل افزوده شد و نمونه‌ها به مدت 20 دقیقه بر روی شیکر در دمای اتاق قرار گرفتند. سوسپانسیون خاک در آب مقطر استریل به‌صورت سریالی رقیق شد و 0/1 میلی‌لیتر از رقت‌های حاصله با تکنیک کشت پخش بر روی محیط‌کشت NBRIP-BPB (گلوکز $g\ L^{-1}$ 10، $Ca_3(PO_4)_2$ $g\ L^{-1}$ 5، $MgCl_2.6H_2O$ $g\ L^{-1}$ 0/25، $MgSO_4.7H_2O$ $g\ L^{-1}$ 0/2، KCl $g\ L^{-1}$ 0/2، $(NH_4)_2SO_4$ $g\ L^{-1}$ 0/1، BPB $g\ L^{-1}$ 0/025 و آگار $g\ L^{-1}$ 15) تلقیح گردید (گونس و همکاران، 2009؛ نوتیال، 1999). pH محیط کشت برابر 6 تنظیم گردید. تری کلسیم فسفات به طور جداگانه اتوکلاو شد و سپس با سایر ترکیبات محیط کشت تحت شرایط استریل آمیخته شد. پلیت‌های تلقیح شده به مدت 3 تا 7 روز در دمای 30 ± 2 °C انکوبه شدند. کلونی‌هایی که قادر به تغییر رنگ محیط کشت از سبز- آبی تیره به زرد بودند به عنوان حل‌کننده فسفات انتخاب و جهت خالص‌سازی به طور مکرر در محیط کشت PDA[1] کشت و در دمای 30 ± 2 °C انکوبه شدند. در نهایت پس از تخلیص، جدایه‌ها به منظور مطالعات بیشتر با ثبت مشخصات‌شان، برروی محیط‌کشت شیبدار نگه‌داری شدند (سری‌نیواسان و همکاران، 2012).

تأثیر غلظت‌های مختلف NaCl بر توانایی انحلال فسفات جدایه‌ها در محیط کشت جامد

برای انجام این آزمون، جدایه‌های قارچی حل کننده فسفات بر روی محیط کشت NBRIP-BPB حاوی غلظت‌های 0، 50، 100، 200، 400، 600، 800 و 1000 میلی‌مولار NaCl (EC معادل مقادیر مذکور به ترتیب برابر0، 9/1، 18/3، 36/6، 54/9، 73/1 و 91 $dS\ m^{-1}$ است) کشت داده شدند. بدین منظور دیسک‌هایی با اندازه 2×2 میلی‌متر از کلونی‌های قارچی خالص شده برداشت شد و بر روی محیط کشت NBRIP-BPB (حاوی غلظت های مختلف NaCl) منتقل گردید. سپس پلیت‌ها در دمای 30 ± 2 °C به مدت یک هفته در انکوباتور گرماگذاری شدند. در مرحله بعد قطر هاله و قطر هر کلونی اندازه‌گیری و شاخص انحلال (نسبت مجموع قطر هاله و کلونی به قطر کلونی) برای هر جدایه در تمامی غلظت‌ها محاسبه گردید (مالویا و همکاران، 2011).

انتخاب جدایه برتر برای آزمون کشت مایع

توانایی پنج جدایه قارچی برای انحلال فسفات در محیط کشت مایع NBRIP به مدت شش روز به منظور یافتن جدایه برتر مطابق روش گسوامی و همکاران (2014) بررسی شد.

تهیه سوسپانسیون اسپور

جدایه‌های خالص‌سازی شده بر روی محیط کشت PDA کشت و به مدت هفت روز در دمای 2 ± 30 °C انکوبه شدند. اسپورهای قارچ از محیط‌کشت یک هفته‌ایی توسط محلول 0/2% (w/v) توئین 80 شسته و به بطری درب آبی استریل منتقل شد. تعداد اسپورها با استفاده از لام هموسیتومتر مورد شمارش قرار گرفت. سپس غلظت سوسپانسیون اسپور با رقیق سازی سریالی برابر 10^7 اسپور در میلی لیتر تنظیم و در دمای 4 °C نگهداری گردید (مولیگان و کمالی، 2003).

شناسایی مولکولی جدایه برتر

شناسایی مولکولی جدایه قارچی با استفاده از توالی خوانی قطعه ITS[2] به طول 520 نوکلئوتید صورت گرفت. برای این منظور، DNA ژنومی با استفاده از کیت DNeasy Plant Mini (69104; QIAGEN) با توجه به دستورالعمل کارخانه سازنده استخراج گردید. واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از 100 نانوگرم از DNA ژنومی، 0/5 میکرولیتر از هر پرایمرITS1 و ITS4 (جدول 1) و باقر High-Fidelity PCR Master Mix (F531; ThermoFisher Scientific) با حجم نهایی 20 میکرولیتر انجام گرفت. واکنش با کمک دستگاه ترموسایکلر[3] (شرکت بیومترا) انجام گرفت: چرخه های حرارتی اعمال شده شامل یک واکنش واسرشت سازی اولیه در دمای 98 °C به مدت 1 دقیقه، 35 چرخه تکثیر شامل (98 °C به مدت 10 ثانیه، 60 °C به مدت 15 ثانیه و 72 °C به مدت 30 ثانیه) و بالاخره یک چرخه گسترش نهایی در 72 °C به مدت 10 دقیقه بود. محصولات واکنش روی ژل آگاروز 2 درصد در بافر TAE توسط دستگاه عکس برداری از ژل تحت نور ماورای بنفش (طول موج 312 نانومتر) بررسی شدند. محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز پس از خالص سازی در مرکز ژنومیک کاربردی The Centre for Applied Genomics کانادا توالی یابی شد.

[1] Potato Dextrose Agar

[2] Internal Transcribed Spacer

[3] Thermocycler

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 1- پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

ناحیه	نام	توالی (5'->3')
SSU*	ITS1 (رفت)	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
5.8S	ITS4 (برگشت)	TCCTCCGCTTATTGATATGC

* small subunit

توان انحلال فسفات جدایه KARFUN 1 در محیط کشت مایع در سطوح مختلف شوری

آزمون توان انحلال فسفات جدایه KARFUN 1 در محیط کشت مایع در ارلن‌مایرهای 250 میلی لیتری حاوی 100 میلی لیتر از محیط کشت NBRIP دارای غلظت‌های 0، 50، 100، 200، 400، 600، 800، 1000 میلی مولار NaCl انجام شد. سپس یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور به عنوان مایه تلقیح به هر ارلن منتقل شد. ارلن‌ها در دمای اتاق با سرعت 150 دور در دقیقه بر روی شیکر قرار گرفتند و در فواصل زمانی مشخص (سه روز) از هر فلاسک پنج میلی لیتر از محلول برداشت گردید. سپس هر فلاسک با محیط کشت استریل NBRIP به حجم 100 میلی لیتر رسانده شد. نمونه برداشت شده از هر فلاسک پس از اتوکلاو شدن سانتریفیوژ شده و سپس مقدار فسفر محلول نیز به روش مورفی و رایلی (1962) و pH محیط‌کشت توسط دستگاه pH متر مدل JENWAY, 3520 اندازه‌گیری شد. آزمایش انحلال فسفات زمانی متوقف شد که غلظت فسفر در هر ارلن تغییر ننمود. در پایان دوره انکوباسیون زی‌توده تولید شده، برروی کاغذ صافی منتقل و وزن خشک آن اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری زی‌توده قارچی

در پایان آزمون انحلال فسفات در محیط مایع، محتویات ارلن‌ها بوسیله قیف بوخنر صاف شد. در ادامه زی‌توده قارچی با آب مقطر فراوان شسته شد و شستشو تا شفاف شدن آبشویه ادامه یافت. پس از شستشو، نمونه‌ها در آون در دمای 80 °C به مدت 24 ساعت قرار داده شدند و پس توزین و وزن خشک آن‌ها ثبت گردید (آونگ و تینگ، 2005).

آنالیز آماری

داده‌های حاصل با استفاده از نرم افزار (Statistix 8.0) و در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح 5% انجام گرفت.

نتایج

جدول 2 میزان pH، هدایت الکتریکی (EC_e) و همچنین غلظت کاتیون‌های کلسیم (Ca^{2+})، منیزیم (Mg^{2+})، پتاسیم (K^+) و سدیم (Na^+) محلول و SAR[1] خاک های مورد مطالعه را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه EC_e همه خاک‌ها بیش از 4 و میزان SAR بیشتر از 15 است، بنابراین جزء خاک‌های شور و سدیمی قرار دارند.

جداسازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات

پس از گذشت سه روز از گرماگذاری نمونه‌ها در انکوباتور، قارچ‌های حل‌کننده فسفات با ایجاد تغییر رنگ محیط کشت از سبز-آبی تیره به زرد در اطراف کلونی از دیگر میکروارگانیسم‌ها متمایز شدند. در مجموع 5 جدایه قارچی (چهار جدایه از نمونه خاک شماره 1 و یک جدایه نیز از نمونه شماره 3) از نمونه‌های خاک جداسازی شد. شاخص انحلال فسفات در جدایه‌های شماره 1، 2، 3، 4 و 5 به ترتیب برابر 3/71، 3/34، 2/36، 2/33 و 2/94 به‌دست آمد.

اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر انحلال فسفات در محیط‌کشت جامد

نتایج تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر شاخص انحلال فسفات در جدول 3 آمده است. جدول 4 شاخص انحلال فسفات در محیط کشت جامد برای جدایه‌های مورد مطالعه در غلظت‌های مختلف NaCl را نشان می‌دهد. کلیه جدایه‌ها قادر به انحلال فسفات و تشکیل هاله در اطراف کلونی‌ها تا غلظت 200 میلی‌مولار نمک در محیط‌کشت جامد بودند. در غلظت‌های 400، 600، 800 و 1000 میلی‌مولار NaCl تنها دو جدایه KARFUN 1 و KARFUN 2 قادر به تشکیل هاله در اطراف کلونی خود بودند که این مسئله نشان می‌دهد که جدایه‌های مذکور از سازوکار خوبی برای مقابله با شوری برخوردار هستند در حالی‌که سایر جدایه‌ها تنها تا شوری 200 میلی مولار هاله تشکیل دادند و غلظت‌های بالاتر NaCl موجب متوقف شدن فعالیت انحلال فسفات در آن‌ها شد. بیشترین شاخص انحلال فسفات مربوط به جدایه KARFUN 1 در تیمارهای فاقد نمک و غلظت 50 میلی مولار NaCl به‌دست آمد. لازم به ذکر است که این جدایه توانایی انحلال فسفات را تا شوری 800 میلی مولار NaCl حفظ نمود.

[1] Sodium Adsorption Ratio

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2- برخی خصوصیات شیمیایی خاک‌های مورد مطالعه

نمونه خاک	pH	قابلیت هدایت الکتریکی (dSm^{-1})	کلسیم محلول ($meql^{-1}$)	منیزیم محلول ($meql^{-1}$)	سدیم محلول ($meql^{-1}$)	پتاسیم قابل استفاده ($mgkg^{-1}$)	فسفر قابل استفاده ($mg\ kg^{-1}$)	SAR
1	7/6	9/88	48	27	115	305	4	26/6
2	7/5	8/5	40/3	23	98/3	294	3/5	24/8
3	7/5	6/5	35	21	111	285	3/8	29/8
4	7/3	4/2	39	25/5	85/3	301	3/3	21/3

جدول 3- میانگین مربعات تأثیر غلظت‌های مختلف NaCl بر شاخص انحلال فسفات جدایه‌ها در محیط کشت جامد

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	F
شوری	7	0/612	178/39
جدایه‌ها	4	0/131	72/27
شوری×جدایه‌ها	28	0/041	11/82
خطا	88	0/03	
کل	136		

جدول 4- تأثیر غلظت های مختلف NaCl بر شاخص انحلال فسفات در محیط کشت جامد

جدایه قارچی	غلظت کلرید سدیم (میلی مولار)							
	0	50	100	200	400	600	800	1000
KARFUN 1	3/75 a	3/41 ab	3/05 bcd	2/92 cde	2/68 def	2/12 ghi	1/31 kl	1/1 l
KARFUN 2	3/21 bc	2/95 cd	2/19 gh	1/81 hig	1/74 ij	1/27 klL	1/05 l	1/02 l
KARFUN 3	2/41 fg	1/80 hig	1/15 l	1/01 l	1 l	1 l	1 l	1 l
KARFUN 4	2/12 ghi	1/65 jk	1/04 l	1/03 l	1 l	1 l	1 l	1 l
KARFUN 5	3/05 bcd	2/52 efg	1/96 hig	1/12 l	1 l	1 l	1 l	1 l

در هر ستون حروف مشترک و غیر مشترک به ترتیب نشان دهنده عدم معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال 1% است.

انتخاب بهترین جدایه برای مطالعات بیشتر

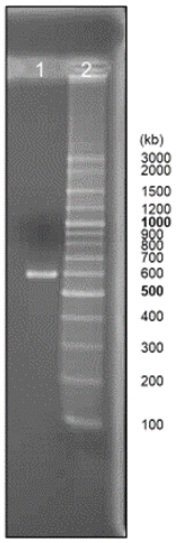
بررسی‌های شش روزه توانایی انحلال فسفات جدایه‌ها در محیط مایع نشان داد که جدایه KARFUN 1 بیشتر از سایر جدایه‌ها قادر به افزایش غلظت فسفر محلول در محیط مایع (340 میلی‌گرم در لیتر) است. این جدایه در محیط کشت جامد نیز هاله شفاف و نسبتا بزرگ تشکیل داد. ولی جدایه KARFUN 2 که شاخص انحلال فسفات قابل توجهی در محیط کشت جامد را داشت، عملکرد رضایت بخشی در انحلال فسفات در محیط مایع (72 میلی گرم در لیتر) نشان نداد.

شناسایی مولکولی جدایه برتر

جفت پرایمر ITS1/ITS4 یک بخش 570 bp را تکثیر نمود (شکل 3)، که بیان کننده خلوص DNA مورد استفاده برای تعیین توالی است. پس از تعیین توالی و بلاست نمودن و مقایسه آن با سایر توالی‌های موجود در بانک ژن NCBI، مشخص شد که جدایه KARFUN 1 مشابهت 100 درصدی با گونه های مختلف*A. niger* و *A. tubingensis* دارد.

www.SID.ir

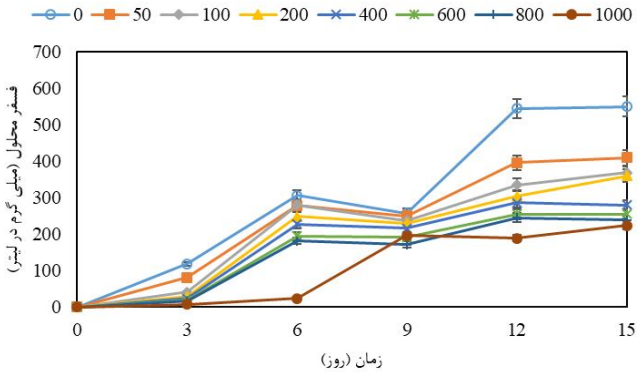
Archive of SID



شکل 1- نتایج حاصل از PCR منطقه ITS. DNA ژنومی به دست آمده از میسیلیوم برای تقویت منطقه ITS، ردیف 1، قرار گرفت و در ژل آگاروز 2% الکتروفورز شد. مارکر وزن مولکولی در ردیف 2 نشان داده شده است.

اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر انحلال فسفات در محیط کشت مایع توسط سویه KARFUN 1

توانایی سویه منتخب در انحلال تری کلسیم فسفات در حضور غلظت‌های مختلف NaCl در محیط مایع مورد بررسی قرار گرفت. شکل 2 انحلال فسفات بوسیله سویه KARFUN 1 در غلظت‌های مختلف NaCl در طی دوره 15 روزه انکوباسیون را نشان می‌دهد. قطع نظر از غلظت نمک، میزان فسفر آزاد شده در محیط مایع بین 7/5 تا 549 میلیگرم در لیتر متغیر بود. در تمامی تیمارها میزان فسفر محلول در طول دوره انکوباسیون تا روز دوازدهم انکوباسیون افزایش یافت و پس از آن تقریباً ثابت ماند. همان‌طور که در شکل 2 مشهود است با افزایش غلظت NaCl، میزان فسفر آزاد شده کاهش یافت به طوریکه در روز دوازدهم انکوباسیون که ماکزیمم میزان فسفر در تمامی تیمارها آزاد شد، بیشترین و کمترین میزان فسفر محلول به ترتیب در تیمارهای بدون شوری (شاهد) و 1000 میلی مولار NaCl به‌دست آمد. بهرحال در زمان مذکور، سویه KARFUN 1 توانایی انحلال تری کلسیم فسفات را در حضور مقادیر 50، 100، 200، 400، 600، 800 و 1000 میلی مولار NaCl به ترتیب به میزان 549، 396، 335، 304، 286، 254، 245 و 189 میلی‌گرم در لیتر داشت.



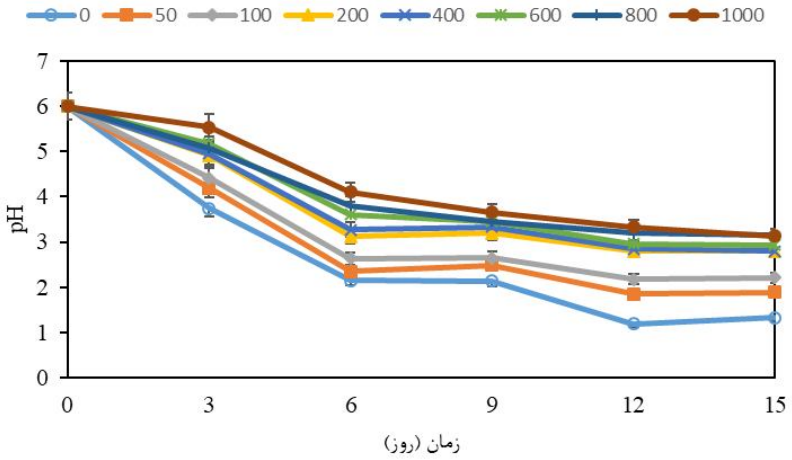
شکل 2- انحلال فسفات بوسیله سویه KARFUN 1 در غلظت‌های مختلف NaCl در محیط کشت مایع طی 15 روز انکوباسیون

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر غلظت‌های مختلف NaCl بر تغییرات pH محیط کشت

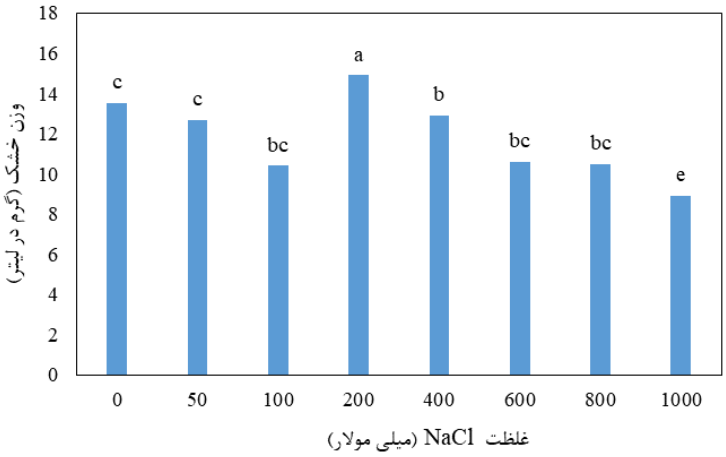
شکل 3 اثر غلظت‌های مختلف NaCl بر pH محیط کشت و تغییرات آن را در طول دوره انکوباسیون 15 روزه آزمایشات انحلال فسفات نشان می‌دهد. pH محیط کشت در ابتدای آزمایش برابر 6 تنظیم گردید. مقدار pH با گذشت زمان صرف نظر از غلظت نمک در تمامی تیمارها کاهش یافت. کمترین میزان pH در تمامی تیمارها در روز دوازدهم انکوباسیون به‌دست آمد و پس از آن ثابت ماند. میزان کاهش pH در روز دوازدهم انکوباسیون برای غلظت‌های 0، 50، 100، 200، 400، 600، 800 و 1000 میلی‌مولار نمک به ترتیب برابر 4/81، 4/15، 3/83، 3/2، 3/16، 3/04، 2/81 و 2/67 واحد بود.



شکل 3- تغییرات pH در طی آزمایش انحلال فسفات در محیط کشت مایع

تأثیر غلظت‌های مختلف NaCl بر زی‌توده قارچی

شکل 4 زی‌توده قارچی تولید شده در غلظت‌های مختلف NaCl را در انتهای دوره انکوباسیون نشان می‌دهد. سویه KARFUN 1 قادر به تولید 8/9 تا 14/9 گرم در لیتر وزن خشک در حضور غلظت‌های مختلف NaCl بود. بیشترین وزن خشک میسیلیومی در غلظت 200 میلی مولار به‌دست آمد. با افزایش غلظت NaCl وزن خشک میسیلیوم سویه KARFUN 1 کاهش یافت به‌طوریکه در غلظت نمک برابر 1000 میلی مولار به کمترین مقدار خود رسید.



شکل 4- تأثیر غلظت‌های مختلف NaCl بر تولید زی‌توده قارچی

www.SID.ir

Archive of SID

حروف مشابه نشانه عدم تفاوت معنی دار و حروف غیر مشترک نشانه تفاوت معنی براساس آزمون توکی در سطح 0/05 است.

بحث

جداسازی قارچ‌های حل‌کننده فسفات

قارچ‌هایی که قطر هاله بزرگتری دارند توانایی بیشتری برای انحلال فسفات دارند (زیدی و همکاران، 2009). گاهی برخی از قارچ‌ها انحلال فسفر خوبی در محیط‌کشت جامد نشان می‌دهند اما قادر به انحلال فسفر در محیط مایع نیستند و یا ممکن است نتایج آن رضایت بخش نباشد، بنابراین نمی‌توان تنها به نتایج محیط‌کشت جامد بسنده کرد زیرا انحلال فسفر در این محیط به صورت کمی منعکس نشده است (گوپتا و همکاران، 1994). با این حال جداسازی اولیه میکروارگانیسم‌ها به صورت کیفی در محیط جامد و اندازه‌گیری غلظت فسفر به صورت کمی در محیط کشت مایع انجام می‌شود (زیدی و همکاران، 2009؛ گوپتا و همکاران، 1994).

تأثیر غلظت‌های مختلف NaCl بر انحلال فسفات در محیط‌کشت جامد

دلیل اینکه جدایه‌ها قادر به انحلال فسفات در حضور NaCl هستند را می‌توان به شرایط خاکی که از آن جداسازی شده‌اند نسبت داد. میکروارگانیسم‌ها زمانی که در شوری‌های مختلف رشد می‌کنند پاسخ‌های متفاوتی نشان می‌دهند (مسرت و خان، 2014). توانایی سازگاری و مقاومت میکروارگانیسم‌ها به تنش‌های محیطی از جمله شوری به خصوصیات ژنتیکی میکروارگانیسم‌ها، سرعت رشد و تکثیر آن‌ها نیز مرتبط است (بخشنده و همکاران، 2014).

در این مطالعه سویه KARFUN 1 بیشترین شاخص انحلال را دارا بود. به طور معمول، قارچ‌های آسپرژیلوس از مقاومت بالایی در شرایط نامساعد محیطی برخوردار هستند. به طوری که در پژوهشی نشان داده شد که این دسته از قارچ‌ها، حتی در شرایط بیابانی نیز قادر به انحلال فسفات‌های معدنی به ویژه تری کلسیم فسفات هستند (وسیلو و همکاران، 2012). همچنین سریوودیا و همکاران گزارش دادند که قارچ‌های آسپرژیلوس نایجر و پنی‌سیلیوم اس‌پی قادر به انحلال فسفر در غلظت 2% از NaCl هستند (سریویدیا و همکاران، 2009). سرنیوواسان و همکاران 35 قارچ حل کننده فسفر از جمله قارچ‌های آسپرژیلوس اس‌پی و آسپرژیلوس تریوس را از خاک‌های شور جداسازی نمودند و رشد قارچ های مذکور در غلظت‌های0/4، 0/8، 1، 1/2، 2/6، ۱،۲ مولار NaCl توانایی انحلال این قارچ‌ها را نشان دادند (سری‌نیواسان و همکاران، 2012).

انتخاب بهترین سویه برای مطالعات بیشتر

سویه KARFUN 1 در هر دو محیط مایع و جامد انحلال فسفات قابل توجهی داشت که با نتایج مهتا و نوتیال (2001) و جمشیدی و همکاران (2016)، که بیان کردند سویه‌ها هم در محیط جامد و هم مایع توانایی انحلال فسفر داشتند همخوانی دارد. ولی یکسان نبودن نتایج محیط مایع و جامد برای سایر جدایه‌ها با یافته‌های احمد و جها (1968) مطابقت دارد که نشان دادند برخی سویه‌ها قادر به تشکیل هاله شفاف در محیط جامد هستند اما قادر به انحلال فسفات در محیط مایع نیستند. این اختلاف ممکن است به‌دلیل تفاوت در دسترسی فسفر و میزان نفوذ اسیدهای آلی در محیط کشت مایع و جامد باشد (جین و همکاران، 2012؛ گوپتا و همکاران، 1994).

تأثیر غلظت های مختلف NaCl بر انحلال فسفات در محیط‌کشت مایع توسط سویه KARFUN 1

به طور کلی شوری بر فعالیت میکروارگانیسم‌ها تأثیر منفی دارد. سمیت یون Na^+ موجب اختلال در مسیر متابولیکی سنتز مواد و کاهش آب ستوپلاسمی سلول می‌گردد (مسرت و خان، 2014؛ سری‌نیواسان و همکاران، 2012). به طوری‌که در غلظت‌های بالای NaCl بسیاری از میکروارگانیسم‌ها قادر به رشد و ادامه فعالیت نیستند (سری‌نیواسان و همکاران، 2012؛ کانس و همکاران، 2015). سلول‌های قارچی با انتخاب راهکارهایی از جمله: تولید بیوفیلم، پرولین (سری‌نیواسان و همکاران، 2012؛ وسیلو و همکاران، 2001) یا تجمع مواد محلول سازگار مانند گلیسیرین (گوپتا و همکاران، 1994) مانع از خروج آب از سیتوپلاسم شده بنابراین اثرات سوء غلظت بالای یون Na^+ تعدیل می‌شوند (سری نیواسان و همکاران، 2012). در واقع ساختار غشاء این قارچ‌ها قدرت انتخابی داشته و مانع ورود بیشتر سدیم به سلول می‌گردد در عوض موادی در سلول تجمع می‌یابند که در فرایندهای متابولیکی سلول دخالت نمی‌کند اما فشار اسمزی سلول را بالا می‌برد (گاندی-سیمرمان و همکاران، 2009). قارچ‌ها براحتی تشکیل بیوفیلم می‌دهند که ارتباط مستقیم با پلی سارکاریدهایی دارند که موجب افزایش مقاومت قارچ در برابر تنش شوری می‌گردند همچنین داشتن زی‌توده بالا و گستردگی شبکه هیف می‌تواند به بقا و توان رقابت آن‌ها در شرایط شوری کمک کند (وسیلو و همکاران، 2012). موارد مذکور می‌تواند از دلایل بقا و ادامه فعالیت سویه KARFUN 1 مورد مطالعه در مواجه با شوری باشد. در مطالعه حاضر، با افزایش شوری انحلال فسفات کاهش

www.SID.ir

Archive of SID

یافت که این امر ممکن است به دلیل خنثی شدن پروتون اسیدهای آلی و کلات‌ها توسط یون‌های کلر در محیط شور (مسرت و خان، 2014؛ سریویدیا و همکاران، 2009) و یا کاهش رشد در مواجه با شوری باشد (سریویدیا و همکاران، 2009).

تأثیر غلظت های مختلف NaCl بر تغییرات pH محیط کشت

کاهش pH می‌تواند ناشی از تولید اسیدهای آلی همچون اگزالیک، سیتریک و گلوکونیک توسط قارچ باشد (جین و همکاران، 2012). عموماً، قارچ‌های رشته‌ایی مانند *Penicillium* و *Aspergillus* به عنوان تولیدکنندگان اسیدهای آلی شناخته شده‌اند (وسیلو و همکاران، 2001). اسیدهای آلی تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها محیط اطراف سلول را اسیدی می‌کند (ریچاردسون و همکاران، 2000؛ رودریگرز و همکاران، 2004). میکروارگانیسم‌هایی که pH را در حین رشد کاهش می‌دهند تأثیر بسزایی در انحلال فسفات دارند (خان و همکاران، 2010). به نظر می‌رسد اسیدی شدن از علل انحلال فسفات توسط سویه KARFUN 1 در مطالعه حاضر است. از طرفی کاهش تغییرات pH همزمان با افزایش شوری در تیمارها ناشی از کم شدن ترشح اسیدهای آلی و کاهش اسیدی‌شدن توسط قارچ است چراکه سمیت یون Na^+ با تأثیر بر مسیر متابولیکی ترشح مواد بر تولید اسیدهای آلی سلول تأثیر می‌گذارد (سری‌نیواسان و همکاران، 2012).

تأثیر غلظت‌های مختلف NaCl بر زی‌توده قارچی

شوری با تأثیر مستقیم بر فعالیت آب سیتوپلاسمی سلول بسیاری از فرایندهای رشد را تحت تأثیر قرار می‌دهد. جذب املاح بوسیله میکروارگانیسم‌ها موجب افزایش اسمولاریته و کاهش آب سیتوپلاسمی سلول می‌گردد که این امر منجر به کاهش رشدشان در محیط‌های شور می‌شود (مسرت و خان، 2014). در مطالعه حاضر بیشترین زی‌توده قارچی در غلظت200 میلی مولار NaCl به دست آمد. که ممکن است به دلیل تولید پروتئین‌ها و یا موادی باشد که توسط سلول‌های قارچ در برابر شوری تولید یا در سلول انباشته می‌شود. تجمع این مواد موجب افزایش زی‌توده قارچ می‌گردد در ادامه با افزایش شوری تا 1000 میلی مولار وزن خشک قارچ سویه KARFUN 1 کاهش یافت. کاهش زی‌توده قارچی با افزایش غلظت NaCl می‌تواند مربوط به شرایط هایپر اسمولاریته[1] محیط کشت باشد که منجر به کاهش فعالیت آب سیتوپلاسمی می‌شود (سری‌نیواسان و همکاران، 2012).

نتیجه‌گیری

از آنجا که سویه KARFUN1 قادر به انحلال فسفات و کاهش pH در حضور غلظت‌های مختلف نمک بود. این سویه را می‌توان کاندیدای مناسبی برای کاربرد در مطالعات گلدانی و مزرعه‌ای به‌منظور بهبود وضعیت فسفر و نیز رشد گیاه در خاک‌های تحت تأثیر شوری دانست.

[1] Hyperosmolarity

www.SID.ir

Archive of SID

فهرست منابع:

1. Ahmad, N., and K.K. Jha. 1968. Solubilization of rock phosphate by microorganisms isolated from Bihar soils. The Journal of General and Applied Microbiology. 14:89-95.
2. Ashraf M. 2009. Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. Biotechnology Advances. 27:84-93.
3. Analytical Software. 2007. 'Statistix: version 2. Analytical Software, Florida.
4. Aung, K.M.M., and Y.P. Ting. 2005. Bioleaching of spent refinery processing catalyst using *Aspergillus Niger* with high-yield oxalic acid. Journal of Biotechnology, 116:171–184.
5. Bakhshandeh, E., H. Rahimian., H. Pirdashti., and G. A. Nematzadeh. 2014. Phosphate solubilization potential and modeling of stress tolerance of rhizobacteria from rice paddy soil in northern Iran. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 30(9):2437-2447.
6. Chai, B., Y. Wu., P. Liu., B. Liu., and M. Gao. 2011. Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. from soil of an alum mine. Journal of Basic Microbiology. 51:5- 14.
7. Goswami, D., Dhandhukiab, P., Patel, P., Thakkerm J. N. 2014. Screening of PGPR from saline desert of Kutch: Growth promotion in Arachis hypogea by *Bacillus licheniformis* A2. Microbiological Research 169 66-75.
8. Grattan, S.R., and C.M. Grieve. 1998. Salinity-mineral nutrient relations in horticultural. Cropping Science of Horticulture. 78:127-157.
9. Gunde-Cimerman, N., J. Ramos., and A. Plemenitas. 2009. Halotolerant and halophilic fungi. Mycological Research. 113(11):1231-1241.
10. Gunes, A., N. Ataoglu., M. Turan., A. Esitken., and Q.M. Ketterings. 2009. Effects of phosphate-solubilizing microorganisms on strawberry yield and nutrient concentrations. Journal of Plant Nutrition and Soil Science. 172:385- 392.
11. Gupta, R., R. Singal., A. Shankar., R. C. Kuhard., and R. K. Saxena. 1994. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. The Journal of General and Applied Microbiology. 40(3):255-260.
12. Jain, R., J. Saxena., and V. Sharma. 2012. Effect of phosphate- solubilizing fungi *Aspergillus awamori S29* on mung bean (Vigna radiate cv.RMG 492) growth. Folia Microbiologica. 57:533- 541.
13. Jamshidi, R., B. Jalili., M. A. Bahmanyar., and S. Salek-Gilani. 2016. Isolation and identification of a phosphate solubilizing fungus from soil of a phosphate mine in Chaluse, Iran. Mycology. 7(3):134-142.
14. Kanse, O. S., M. Whitelaw-Weckert., T. A. Kadam., and H. J. Bhosale. 2015. Phosphate solubilization by stress-tolerant soil fungus *Talaromyces funiculosus* SLS8 isolated from the Neem rhizosphere. Annals of Microbiology. 65:85-93.
15. Khan, M. S., A. Ziadi., M. Ahemad., M. Oves., and P.A. Wani. 2010. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective. Archives of Agronomy and Soil Science. 56:73- 98.
16. Knudsen, D., Peterson, G. A., and Pratt, P. F. 1992. Lithium, Sodium, and Potassium. In: Page, A.L., R.H. Miller and D.R. Keeney. Method of soil Analysis. Part II: Chemical and Mineralogical Properties (Second Edition ed.). Madison, Wisconsin: SSSA.
17. Lanyon, L. E., and Heald, W. R. 1992. Magnesium, Calcium, Strontium, and Barium. In: Page, A.L., R.H. Miller and D.R. Keeney. Method of soil Analysis. Part II: Chemical and Mineralogical Properties (Second Edition ed.). Madison, Wisconsin: SSSA.

www.SID.ir

Archive of SID

18. Malviya, J., K. Singh., and V. Joshi. 2011. Effect of phosphate solubilizing fungi on growth and nutrient uptake of ground nut (*Arachis hypogaea*) Plants. Advanced in bioresearch. 2:110-113.
19. Mehta, S., and C. S. Nautiyal. 2001. An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing bacteria. Current Microbiology. 43:51-56.
20. Mulligan C. N., Kamali M. 2003. Bioleaching of copper and other metals from low-grade oxidized mining ores by *Aspergillus niger*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 78:497–503.
21. Musarrat, J., and M. S. Khan. 2014. Factors affecting phosphate-solubilizing activity of microbes: current status. In: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds) Phosphate Solubilizing Microorganisms: 63-85.
22. Mundra, S., R. Arora., and T. Stobdan. 2011. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel temperature-, pH-, and salt-tolerant yeast, *Rhodotorula sp*. PS4, isolated from seabuckthorn rhizosphere, growing in cold desert of Ladakh, India. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 27(10):2387-2396.
23. Murphy, J., and J.P. Riley. 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. Analytica chimica acta. 27:31-36.
24. Nautiyal, C. S. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters. 170:265-270.
25. Reyes, I., L. Bernier., R.R. Simard., P. Tanguay., and H. Antoun. 1999. Characteristics of phosphate solubilization by an isolate of a tropical *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. FEMS Microbiology Ecology. 28:291-295.
26. Rhoades, J. D. 1992. Soluble salts. In: Page, A.L., R.H. Miller and D.R. Keeney. Method of soil Analysis. Part II: Chemical and Mineralogical Properties (Second Edition ed.). Madison, Wisconsin: SSSA.
27. Richardson, A., P.A. Hadobas., and J.E. Hayes. 2000. Acid phosphomonoesterase and phytase activities of wheat (*Triticum aestivum* L.) roots and utilization of organic phosphorus substrates by seedlings grown in sterile culture. Plant, Cell and Environment. 23:397-405.
28. Rodriguez, H., T., Gonzalez. I. Goire., and Y. Hashan. 2004. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum spp*. Naturwissenschaften. 91:552-555.
29. Singh, H., and S. M. Reddy. 2011. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. European Journal of Soil Biology. 47:30- 34.
30. Son, H. J., G. T. Park., M. S. Cha., and M. S. Heo. 2006. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt-and pH-tolerant *Pantoea agglomerans R-42* isolated from soybean rhizosphere. Bioresource Technology. 97:204-210.
31. Srinivasan, R., M. S. Yandigeri., S. Kashyap., and A. R. Alagawadi. 2012. Effect of salt on survival and P-solubilization potential of phosphate solubilizing microorganisms from salt affected soils. Saudi Journal of Biological Sciences. 19:427-434.
32. Srividya, S., S. Soumya., and K. Pooja. 2009. Influence of environmental factors and salinity on phosphate solubilization by a newly isolated *Aspergillus niger* F7 from agricultural soil. African Journal of Biotechnology. 8(9):1864-1870.
33. Vassilev, N., M. Vassileva., M. Fenice., and F. Federici, 2001. Immobilized cell technology applied in solubilization of insoluble inorganic (rock) phosphates and P plant acquisition. Bioresource Technology. 79:263–271.
34. Vassilev, N., B. Eichler-Lobermann., and M. Vassileva. 2012. Stress-tolerant P-solubilizing microorganisms. Applied microbiology and biotechnology. 95(4):851-859.

www.SID.ir

Archive of SID

35. Whitelaw, M. A. 2000. Growth promotion of plant inoculation with phosphate-solubilizing fungi. Advances in Agronomy. 69:99-151.
36. Xiao C.Q., R.A. Chi., X. H. Huang., G. Qiu., D. Wang., and W. Zhang. 2008. Optimization for rock phosphate solubization by phosphate– solubilizing fungi isolated from phosphate mines. Ecological engineering. 33:187-193.
37. Yadav, J., J.P. Verma., S.K. Yadav., and K.N. Tiwari. 2011. Effect of salt concentration and pH on soil inhabiting fungus *Peniciliium citrinum* Thom. for solubilization of tricalcium phosphate. Microbiology Journal. 1:25–32.
38. Zaidi, A., M.S. Khan., M. Ahemad., M. Oves., and P. A. Wani. 2009. Recent advances in plant growth promotion by phosphate-solubilizing microbes. In: Khan MS, Zaidi A, Musarrat J (eds) Microbial strategies for crop improvement. Springer, Berlin Heidelberg, 23-50.

www.SID.ir

Archive of SID

Identification of phosphate solubilizing fungi isolated from saline-sodic soils (A Case study)

N. Almasi Javidi, B. Jalili[1], F. Sadegh-Zadeh, and S. Salek-Gilani
MSc student, Soil Science Department, Faculty of Crop Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: neda_almasi12@yahoo.com
Assistant professor, Soil Science Department, Faculty of Crop Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: bahi_jalilis@yahoo.com
Assistant professor, Soil Science Department, Faculty of Crop Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: fardin.upm@gmail.com
Instructor, Soil Science Department, Faculty of Crop Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University; E-mail: soroosh1352@yahoo.com
Received: December, 2018 & Accepted: December, 2019

Abstract

Soil salinity is the main factor in reducing crop yield, especially in arid areas. The availability of Phosphorous (P), is low in salt-affected soils. The purpose of this study was to isolate and identify the phosphate solubilizing fungi from saline-sodic soils and also to investigate phosphate solubilization in the presence of different salt concentrations. For this purpose, twenty soil samples were collected from the rhizosphere of *Salicornia persica.* Isolation of phosphate solubilizing fungi was done by plate culture technique on National Botanical Research Institute's phosphate growth medium- Bromo Phenol Blue (NBRIP-BPB) solid media. Phosphate solubilization was tested in the presence of 0, 50, 100, 200, 400, 600, 800, and 1000 mM NaCl during 15 days of incubation on solid media. Thereafter, the phosphate solubilizing potential of isolates was tested in 6-day experiments in broth, and the phosphate solubilizing capability was evaluated in the presence of different concentrations of NaCl. The results showed that all strains produced halo zone until NaCl concentration reached to 200 mM, but with increasing salinity, only KARFUN 1 and KARFUN 2 could solubilize phosphate. Results of the 6-day experiment in broth culture were showed that KARFUN 1 had the highest phosphate solubilization potential, so it was selected for further investigation. Molecular identification indicated that KARFUN 1 isolate had a similarity of 100% with *Aspergillus. niger* and *A. tubingensis* species. The results showed that with increasing NaCl concentration, the phosphate solubilization increased and pH decreased. The lowest and the highest phosphorous concentration was observed in 1000 and 0 mM NaCl, respectively. Irrespective of NaCl concentration, results showed that there was an increase in phosphorous solubilization during the incubation time. The maximum phosphate solubilization was achieved (549 mgL^{-1}) after 12 days of incubation and pH reached to 1.19. However, the KARFUN1 *strain* was able to solubilize inorganic phosphate in different NaCl concentrations as it could release 224 mgL^{-1} phosphorus at 1000 mM NaCl in broth medium.

Keywords: Salt tolerant; *Aspergillus;* Tri calcium phosphate; Soluble phosphorus

[1] Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Crop Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resource

www.SID.ir