بسم الله الرحمن الرحیم

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور

تأثیر همزیستی قارچ‌های میکوریز آربسکولار و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات بر زنده‌مانی و رشد نهال‌های بنه (*Pistacia atlantica* Desf.) در شرایط گلخانه

نگارش:

محمد متینی‌زاده، نگین آرمند، مریم تیموری، فرهاد رجالی و الهام نوری

۱۴۰۴

ISBN : 978-964-473-642-1

عنوان طرح منتج به نشریه فنی	شماره مصوب
تأثیر همزیستی قارچ‌های میکوریز آربسکولار و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات بر زنده‌مانی نهال‌های بنه (*Pistacia atlantica* Desf.)- فاز اول در شرایط گلخانه	۰۹-۳-۰۹۱۰-۱۴۷-۰۰۱۳۳۱

عنوان نشریه: تأثیر همزیستی قارچ‌های میکوریز آربسکولار و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات بر زنده‌مانی و رشد نهال‌های بنه (*Pistacia atlantica* Desf.) در شرایط گلخانه

نگارش:

محمد متینی‌زاده- دانشیار پژوهش بخش تحقیقات جنگل، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

نگین آرمند- دانش‌آموخته دکتری منابع طبیعی، پردیس منابع طبیعی کرج، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

مریم تیموری- استادیار پژوهش بخش تحقیقات جنگل، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

فرهاد رجالی- دانشیار پژوهش بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، مؤسسه تحقیقات خاک و آب کشور، کرج، ایران.

طاهره علی‌زاده- کارشناس بخش تحقیقات جنگل، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

الهام نوری- کارشناس بخش تحقیقات جنگل، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

مدیر داخلی: فاطمه عباسپور

ویراستار ادبی: اصغر احمدی

صفحه‌آرا: مریم نوبخت

تهیه شده در: مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، اداره ترویج و انتقال یافته‌های تحقیقاتی/ بخش تحقیقات جنگل

نشانی: بزرگراه تهران-کرج، خروجی پیکانشهر، شهرک سرو آزاد، خیابان شهید گودرزی، بلوار باغ گیاه‌شناسی ملی ایران، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

صندوق پستی: ۱۱۶-۱۳۱۸۵ **تلفن:** ۵-۴۴۷۸۷۲۸۲-۰۲۱ **وب‌سایت:** www.rifr-ac.ir

شمارگان: الکترونیکی

سال انتشار: ۱۴۰۴

این نشریه به شماره .۶۶۸۴۱ در تاریخ ۱۴۰۴/۱۱/۱۹ در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

❖ مخاطبان نشریه:

- محققان، کارشناسان و مدیران سازمان منابع طبیعی و آبخیزداری کشور

❖ شما با مطالعه این نشریه با موارد زیر آشنا می‌شوید:

- افزایش زنده‌مانی و استقرار نهال بنه با مایه‌زنی قارچ‌های میکوریز آربسکولار و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات
- بهبود شرایط رشد نهال بنه با مایه‌زنی قارچ‌های میکوریز آربسکولار و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات

فهرست

چکیده..... ۱
درخت بنه و اهمیت آن..... ۲
افزایش توانمندی نهال‌ها..... ۲
اثرهای همزیستی قارچ‌های میکوریز آربسکولار بر گیاه..... ۴
باکتری محلول‌کننده فسفات..... ۵
مراحل انجام کار..... ۷
نمونه‌برداری..... ۷
نمونه‌های خاک و ریشه..... ۷
رنگ‌آمیزی ریشه‌ها..... ۸
اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه..... ۸
استخراج، شناسایی و تکثیر باکتری‌های محلول‌کنندهٔ فسفات..... ۹
جداسازی و خالص‌سازی..... ۹
ارزیابی توان کمی انحلال فسفات معدنی توسط جدایه‌های باکتری..... ۱۰
شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر..... ۱۰
شناسایی مولکولی قارچ‌های میکوریزی..... ۱۳
شناسایی مولکولی قارچ‌های میکوریزی..... ۱۴
تکثیر قارچ‌های میکوریز آربسکولار..... ۱۷
تولید نهال توانمندشده..... ۱۸
نتایج..... ۲۰
درصد همزیستی میکوریزی بنه و فراوانی اسپور قارچ‌های میکوریزی در خاک..... ۲۰
شناسایی مولکولی قارچ‌های میکوریز آربسکولار و باکتری محلول‌کنندهٔ فسفات ۲۱
کلنیزاسیون ریشه..... ۲۳
صفات رویشی..... ۲۳
اثر میکروارگانیسم‌ها بر ارتفاع، قطر یقه و تعداد برگ نهال یکسالهٔ بنه..... ۲۴
نتیجه‌گیری..... ۲۷
منابع..... ۲۸

چکیده

در سال‌های اخیر، عوامل محدودکننده‌ای مانند تنش خشکی، موجب کاهش زادآوری و استقرار طبیعی گونه‌های چوبی در رویشگاه‌های کشور شده‌اند. ضمن آنکه نهال‌های کاشته‌شده نیز به‌دلیل نداشتن توان کافی برای غلبه بر تنش‌های محیطی، در برنامه‌های احیا و توسعهٔ جنگل‌ها با شکست مواجه می‌شوند. استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید خاکزی، به‌ویژه قارچ‌های میکوریزی آربسکولار و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات، راهکاری کارآمد برای کاهش اثرهای منفی این تنش‌ها و بهبود رشد گیاه است.

بنه (*Pistacia atlantica* Desf.) از گونه‌های ارزشمند جنگلی ایران به‌ویژه در نواحی رویشی زاگرس، ارسباران و ایران- تورانی است. با وجود گستردگی زیاد این گونه در مناطق خشک و نیمه‌خشک کشور، استقرار آن در شرایط تنش آبی همچنان با مشکل مواجه می‌باشد که می‌تواند ناشی از فقر مواد غذایی و کاهش کارایی جذب عناصر به‌ویژه فسفر باشد. فسفر نقش مهمی در رشد ریشه، تقسیم سلولی و استقرار اولیه گیاه دارد و کمبود آن یکی از محدودیت‌های اصلی استقرار بنه در مناطق خشک محسوب می‌شود.

در این پژوهش با هدف بهبود رشد و استقرار نهال‌های بنه در شرایط گلخانه، مایه‌زنی توأم قارچ‌های میکوریزی آربسکولار و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات انجام شد. این میکروارگانیسم‌ها از ریزوسفر بنه جداسازی شدند و نهال‌های مایه‌زنی‌شده در مقایسه با شاهد، از نظر درصد کلنیزاسیون ریشه، جذب فسفر و شاخص‌های رشدی بررسی شدند. نتایج نشان داد مایه‌زنی همزمان این دو گروه میکروارگانیسم موجب افزایش معنی‌دار درصد کلنیزاسیون، جذب فسفر و بهبود رشد نهال‌های بنه در شرایط گلخانه شد. بنابراین، کاربرد توأم قارچ‌های میکوریزی آربسکولار و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات می‌تواند راهکاری مؤثر برای تقویت توان استقرار و احیای گونه‌های جنگلی ارزشمند مانند بنه در مناطق خشک و نیمه‌خشک باشد.

واژه‌های کلیدی: خاک، ریشه، زادمایه، گلخانه، میکروارگانیسم

درخت بنه و اهمیت آن

بنه یا پسته وحشی یا چاتلانقوش (*Pistacia atlantica* Desf.) یکی از گونه‌های جنس Pistacia، خانوادهٔ Anacardiaceae و راستهٔ Rosales، از گونه‌های درختی مهم ناحیهٔ رویشی زاگرس است. این گونه از عناصر شاخص ناحیه‌های رویشی ایران- تورانی و زاگرس به‌شمار می‌رود و حضور گسترده‌ای در مناطق کوهستانی، نیمه‌خشک و خشک کشور ازجمله زاگرس، ارسباران، خراسان و حاشیه فلات مرکزی دارد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که رویشگاه‌های طبیعی بنه در حدود ۲٫۴ میلیون هکتار از اراضی ایران را دربر می‌گیرند (Boudaghi, 1995; Shiran *et al*., 2021).

با وجود گستردگی پراکنش این گونه، عوامل متعددی مانند تخریب پوشش گیاهی، چرای بی‌رویهٔ دام، آتش‌سوزی، بهره‌برداری غیر اصولی از شیره (سقز) و تغییر کاربری اراضی موجب کاهش چشمگیر سطح جنگل‌های بنه و تهدید پایداری آن شده است. این در حالی است که بنه به‌دلیل داشتن نقش‌های اکولوژیک و اقتصادی مهم (ازجمله تثبیت خاک، جلوگیری از فرسایش، افزایش نفوذ آب و تولید فراورده‌هایی مانند سقز و روغن) در برنامه‌های احیا و حفاظت جنگل‌های مناطق خشک جایگاه ویژه‌ای دارد (Hamzehpour *et al*., 2018). بنه همچنین با ایجاد پوشش گیاهی مناسب، زیستگاه گونه‌های جانوری مختلف ازجمله پرندگان و خزندگان را فراهم می‌کند.

همچنین، بنه با ارتباط متقابل با میکروارگانیسم‌های خاک و نقش در چرخه‌های کربن و مواد مغذی، تأثیر قابل توجهی بر حاصلخیزی خاک و عملکرد اکوسیستم‌های جنگلی دارد. از این‌رو، حفظ و مدیریت پایدار بنه نه تنها به منظور بهره‌برداری اقتصادی بلکه برای تضمین سلامت اکولوژیکی و تداوم خدمات اکوسیستمی این جنگل‌ها ضروریست.

افزایش توانمندی نهال‌ها

زادآوری طبیعی بنه در بسیاری از رویشگاه‌ها با محدودیت مواجه است. یکی از دلایل اصلی این مسئله، فقر مواد غذایی خاک و کمبود فسفر قابل جذب است که رشد ریشه و استقرار نهال را کاهش می‌دهد. فسفر، به‌عنوان یکی از عناصر پرمصرف، در تقسیم سلولی، توسعهٔ سیستم ریشه‌ای و بهبود توان گیاه برای جذب آب نقش کلیدی دارد. در خاک‌های آهکی مناطق خشک، فسفر اغلب به‌صورت نامحلول

وجود دارد و قابل استفاده برای گیاه نیست (Richardson *et al*., 2023). به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های مفید خاکزی مانند قارچ‌های میکوریزی آربسکولار (به‌ویژه گونه‌هایی از جنس‌های *Glomus*، *Funneliformis* و *Claroideoglomus*) و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات (*Pseudomonas, Bacillus, Peribacillus*) می‌تواند با افزایش انحلال فسفات و بهبود جذب عناصر غذایی، رشد و بقای نهال‌های بنه را در مراحل ابتدایی استقرار تقویت کند (Gamalero & Glick, 2019; Rahimzadeh & Pirzad, 2017). از این‌رو، کاربرد توأم این دو گروه از میکروارگانیسم‌ها، می‌تواند یکی از رویکردهای مؤثر زیستی برای افزایش توانمندی نهال‌ها در طرح‌های احیای جنگل و بیابان‌زدایی محسوب شود.

قارچ‌های میکوریزی آربسکولار ریشهٔ بسیاری از گیاهان (بیش از ۸۰ درصد گونه‌های خشکی‌زی) را کلنیزه کرده و همزیستی متقابل برقرار می‌کند (Brundrett, 1996). هیف‌های خارج‌ریشه‌ای این قارچ‌ها با گسترش شبکهٔ هیفی در خاک، سطح جذب گیاه را افزایش داده و دسترسی مؤثرتری به عناصر غذایی، به‌ویژه فسفر، فراهم می‌کنند (Marschner & Dell, 1994). این همزیستی علاوه بر افزایش جذب مواد غذایی، موجب بهبود رشد، افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های محیطی و ارتقای ویژگی‌های فیزیکی و زیستی خاک می‌شود (Allen, 2007; Fageria, 2009). از سوی دیگر، باکتری‌های محرک رشد گیاه و به‌ویژه باکتری‌های حل‌کننده فسفات (*Pseudomonas, Bacillus, Peribacillus*)، از طریق ترشح اسیدهای آلی، آنزیم‌های فسفاتاز و پلی‌ساکاریدهای خارج‌سلولی، ترکیبات نامحلول فسفاته را به شکل‌های قابل جذب برای گیاه تبدیل می‌کنند (Richardson *et al*., 2001; Gamalero & Glick, 2019). این فرایند، ممکن است همراه با تولید تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی مانند اکسین و جیبرلین در گیاه، توانایی ریشه را در جذب آب و عناصر غذایی افزایش داده و موجب رشد بهتر نهال شود.

به‌کارگیری همزمان قارچ‌های میکوریزی و باکتری‌های حل‌کننده فسفات، به‌عنوان رویکردی هم‌افزا، سبب بهبود معنی‌دار کیفیت، عملکرد و بقا در نهال‌های گونه‌های جنگلی شده است (Rahimzadeh & Pirzad, 2017). پژوهش‌های متعدد نشان داده‌اند که این تعامل همزیستی در گونه‌هایی مانند *Cerasus mahaleb*، *Juniperus excelsa*، *Quercus brantii* و *Pistacia atlantica* منجر به افزایش رشد، کلنیزاسیون ریشه و جذب فسفر در شرایط گلخانه و عرصه‌های خشک می‌شود. بنابراین، کاربرد ترکیبی این دو گروه میکروارگانیسم در تولید نهال‌های جنگلی، می‌تواند به‌عنوان یک راهکار مدیریتی

پایدار برای افزایش بقا، رشد و استقرار نهال‌های بنه در طرح‌های احیای جنگل‌های کشور پیشنهاد شود.

اثرهای همزیستی قارچ‌های میکوریز آربسکولار بر گیاه

این قارچ‌ها با نفوذ به سلول‌های قشری ریشه و تشکیل ساختارهای ویژه‌ای به نام آربسکول و وزیکول، تبادل دوطرفه مواد غذایی را میان خود و گیاه برقرار می‌کنند. در نتیجه، گیاه با افزایش سطح جذب مؤثر خود، توانایی بالاتری در دریافت عناصر غذایی (به‌ویژه فسفر و نیتروژن) پیدا می‌کند و قارچ نیز از ترکیبات آلی فتوسنتزی گیاه بهره‌مند می‌شود (Marschner & Dell, 1994; Richardson *et al*., 2023). در خاک‌های خشک و آهکی ایران، فسفر اغلب به‌شکل‌های نامحلول وجود دارد و برای گیاه قابل جذب نیست. افزون بر فسفر، همزیستی میکوریزی سبب افزایش جذب عناصر دیگر مانند نیتروژن، پتاسیم، روی و مس می‌گردد و با تقویت سیستم ریشه‌ای و بهبود وضعیت آبی گیاه، مقاومت آن را در برابر تنش‌های غیرزیستی مانند خشکی، شوری و گرما افزایش می‌دهد (Davies *et al*., 1992; Allen, 2007). همچنین این قارچ‌ها با بهبود ویژگی‌های فیزیکی خاک، افزایش پایداری خاک‌دانه‌ها و ارتقای فعالیت‌های آنزیمی مانند دهیدروژناز، فسفاتاز و اوره‌آز، نقش مؤثری در سلامت اکوسیستم‌های خاک‌زی دارند (Barea *et al*., 1997; Wang *et al*., 2006).

گونه‌هایی از جنس‌های *Rhizophagus*, *Claroideoglomus*, *Funneliformis*, *Glomus* و *Acaulospora* رایج‌ترین قارچ‌های آربسکولار در اکوسیستم‌های جنگلی ایران هستند (Zarei *et al*., 2020). مطالعات متعددی نشان داده‌اند که مایه‌زنی نهال‌های گونه‌های جنگلی مانند *Cerasus mahaleb*، *Myrtus communis*، *Quercus brantii* و *Pistacia atlantica* با این قارچ‌ها، موجب افزایش معنی‌دار رشد، سطح برگ، جذب فسفر و بقای نهال در شرایط گلخانه و عرصه‌های خشک و نیمه‌خشک شده است (Azizi *et al*., 2019; Shirvani *et al*., 2021). بنابراین، بهره‌گیری از قارچ‌های میکوریزی آربسکولار، می‌تواند به‌عنوان روشی کارآمد و پایدار در تولید نهال‌های مقاوم و سازگار با شرایط اقلیمی خشک ایران مورد استفاده قرار گیرد.

باکتری محلول‌کننده فسفات

در بیشتر خاک‌های خشک و آهکی ایران، بخش اعظم فسفر به‌صورت ترکیبات نامحلول معدنی (فسفات‌های کلسیم، آهن و آلومینیوم) و آلی وجود دارد و تنها درصد کمی از آن برای گیاه قابل جذب است(Richardson et al., 2023) . در این شرایط، حضور و فعالیت میکروارگانیسم‌های حل‌کنندهٔ فسفات می‌تواند راهکار زیستی مؤثر برای افزایش دسترسی گیاه به فسفر باشد.

باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات (Phosphate Solubilizing Bacteria - PSB) ازجمله مهمترین گروه از ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR) هستند که با ترشح اسیدهای آلی (مانند گلوکونیک، سیتریک و لاکتیک)، کاهش pH محیط ریزوسفری، و تولید آنزیم‌های فسفاتاز، ترکیبات نامحلول فسفاته را به شکل‌های قابل جذب (مانند $H_2PO_4^-$ و HPO_4^{2-}) تبدیل می‌کنند (Alam et al., 2002; Gamalero & Glick, 2019). علاوه بر این، برخی از گونه‌های این باکتری‌ها با ترشح پلی‌ساکاریدهای خارج‌سلولی، جذب فسفات و تنظیم تعادل یونی خاک را تسهیل می‌کنند.

از مهمترین جنس‌های باکتریایی حل‌کنندهٔ فسفات می‌توان به *Pseudomonas, Bacillus, Peribacillus, Rhizobium, Enterobacter* و *Burkholderia* اشاره کرد. این باکتری‌ها علاوه بر افزایش انحلال فسفات‌های معدنی نامحلول، با تولید هورمون‌های رشد (مانند اکسین و سیتوکینین) و ترکیبات ضدبیماری، موجب بهبود رشد ریشه، افزایش مقاومت گیاه و ارتقای کیفیت خاک می‌شوند (Gamalero & Glick, 2019). در ترکیب با قارچ‌های میکوریزی آربسکولار، اثر هم‌افزایی قابل توجهی بین باکتری‌های حل‌کننده فسفات و قارچ‌های میکوریزی آربسکولار مشاهده شده است؛ به‌گونه‌ای که مایه‌زنی توأم نهال‌های *Pistacia atlantica*، *Juniperus excelsa* و *Quercus brantii* با این دو گروه موجب افزایش معنی‌دار رشد، درصد کلنیزاسیون ریشه و جذب فسفر در شرایط تنش خشکی شده است (Shirvani *et al*., 2021).بنابراین، استفاده از باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات به‌ویژه در ترکیب با قارچ‌های میکوریزی، می‌تواند روشی زیست‌سازگار و اقتصادی (با کاهش تلفات نهال‌کاری و کاهش دور آبیاری و صرفه‌جویی در هزینه‌های آن) برای بهبود رشد نهال‌های جنگلی در مناطق خشک ایران باشد.

پیشینهٔ پژوهش

مطالعات متعددی در سال‌های اخیر، تأثیر هم‌زیستی قارچ‌های میکوریزی آربسکولار و باکتری‌های محرک رشد گیاه، به‌ویژه باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات را در افزایش رشد و مقاومت گونه‌های جنگلی و زراعی بررسی کرده‌اند. این مطالعات نشان داده‌اند که در برخی موارد استفادهٔ توأم از این دو گروه میکروارگانیسم، در مقایسه با کاربرد منفرد هریک، موجب افزایش معنی‌دار رشد گیاه، جذب فسفر و مقاومت به تنش‌های محیطی می‌شود.

به‌عنوان نمونه، فلاحیان و همکاران (۱۳۸۴) گزارش کردند که مایه‌زنی درخت پسته (*Pistacia vera*) با قارچ *Glomus etunicatum* سبب افزایش وزن خشک ریشه و ساقه، سطح برگ و غلظت عناصر غذایی پتاسیم، فسفر، روی و مس شد. ویلیامز و همکاران (Williams *et al*., 2012) نیز در پژوهشی روی گونه *Podocarpus cunninghamii* نشان دادند که مایه‌زنی نهال‌ها با گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریزی بومی، به‌ویژه در مقایسه با قارچ‌های غیربومی، موجب افزایش بقاء و رشد در شرایط گلخانه گردید.

آرمند و همکاران (۱۳۹۵) اثر مایه‌زنی قارچ‌های میکوریزی بر رشد نونهال‌های محلب (*Cerasus mahaleb*) را در شرایط گلخانه‌ای بررسی کردند. یافته‌های آنان نشان داد که قارچ‌های میکوریزی توانستند به‌خوبی با نونهال محلب همزیستی برقرار کنند و این قارچ‌ها اثر معنی‌داری بر تمام شاخص‌های رویشی به‌جز طول ریشه اصلی داشتند و سبب افزایش رشد گیاه شدند. در پژوهش دیگری، عزیزی و همکاران (۱۳۹۹) گزارش کردند که کاربرد توأم قارچ‌های *Rhizophagus intraradices* و *Funneliformis mosseae* با باکتری‌های *Pseudomonas fluorescens* و *P. putida* در نهال‌های *Myrtus communis* موجب کاهش اثر تنش خشکی و افزایش رشد شد.

همچنین، متینی‌زاده و همکاران (۱۴۰۰) نشان دادند که مایه‌زنی قارچ‌های میکوریزی بومی در نهال‌های *Juniperus excelsa* سبب بهبود ارتفاع، قطر یقه و درصد زنده‌مانی نهال شد. البته استفاده از ترکیب قارچ‌های میکوریزی با باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات به عنوان راهکار زیستی مؤثر در افزایش رشد و بقای نهال‌های بنه نیز مطرح شده است (Azarmi-Atajan & Sayyari-Zohan, 2022). گونه‌هایی مانند *B. megaterium*, Bacillus *P. fluorescens*, *Pseudomonas* و *Peribacillus frigoritolerans* در

پژوهش‌های اخیر توان بالایی در افزایش قابلیت جذب فسفر و رشد نهال‌های جنگلی از خود نشان داده‌اند (Azizi *et al*., 2019; Rahimzadeh & Pirzad, 2017.) با توجه به آنچه تاکنون گفته شد، این پژوهش با هدف بررسی اثر توأم قارچ‌های میکوریزی آربسکولار و باکتری‌های حل‌کننده فسفات بر رشد و استقرار نهال‌های گونه بومی و ارزشمند بنه *Pistacia atlantica* طراحی و اجرا شد.

مراحل انجام کار

نمونه‌برداری

به‌منظور تولید نهال و مایه‌زنی با میکروارگانیسم‌های منتخب، بذر، خاک، ریزوسفر و ریشه‌های مویین، درختان مادری آنها در رویشگاهی در بالادست روستای ازگی واقع در شمال غرب تهران و در محدوده مرزی بین منطقه ۲۲ شهرداری تهران و استان البرز، شرق به غرب بزرگراه شهید خرازی، با عرض جغرافیایی ″۱۴ ′۴۷ °۳۵ شمالی و طول جغرافیایی ″۵۱ ′۰۵ °۵۱ شرقی و ارتفاع ۲۰۵۰ متر از سطح دریا در سال ۱۳۹۸ انتخاب شد. از درختان بالغ گونه بنه، ۱۰ پایه به‌طور کاملاً تصادفی انتخاب گردید (Goransson *et al*., 2008). به‌منظور استخراج، شناسایی و تکثیر قارچ‌های میکوریز آربسکولار و باکتری‌های محلول‌کنندهٔ فسفات، نمونه‌هایی از خاک اطراف ریشه از عمق حدود ۲۰ تا ۱۰ سانتی‌متری درخت و در زیر تاج‌پوشش در اوایل فصل پاییز جمع‌آوری شدند. همچنین، به‌منظور بررسی میزان کلنیزاسیون توسط قارچ، از ریشه‌های مویین (با طول کمتر از دو میلی‌متر) نیز نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در کیسه‌های نایلونی و در شرایط سرد در محفظهٔ یخدان به آزمایشگاه منتقل شدند. در فصل پاییز نیز بذرهای بنه از درختان مادری در رویشگاه جمع‌آوری شد.

نمونه‌های خاک و ریشه

نمونه‌های خاک در آزمایشگاه پس از گذراندن از الک دو میلی‌متری، برای شناسایی و استخراج قارچ‌های میکوریز آربسکولار و باکتری محلول‌کنندهٔ فسفات در یخچال و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد حداکثر به مدت یک ماه نگهداری شدند. ریشه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه تا زمان رنگ‌آمیزی در محلول تثبیت‌کننده FAA (فرمالین‌اسید استیک‌الکل با نسبت ۹۰-۵-۵) نگهداری شدند.

بدین‌منظور، ریشه‌ها را در زیر آب جاری شسته و بعد در ظروف درب‌دار و در محلول دارای الکل ۶۰ درصد تا زمان رنگ‌آمیزی نگهداری گردیدند.

رنگ‌آمیزی ریشه‌ها

برای تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه، رنگ‌آمیزی براساس روش (Phillips and Hayman, 1970) انجام شد. برای هر نمونه، ریشه‌های فرعی سالم با قطر کمتر از دو میلی‌متر جدا شدند. ریشه‌ها سه بار در آب‌مقطر شستشو داده شده، برای بی‌رنگ کردن و نرم شدن بافت‌ها، ریشه‌ها ابتدا در محلول هیدروکسید پتاسیم۱۰ درصد و درون بن‌ماری در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت یک ساعت قرار داده شدند. سپس با آب‌مقطر شسته شده و به محلول دارای آب اکسیژنه قلیایی (دارای آب اکسیژنه ۱۰ درصد و آمونیاک) انتقال داده شده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در این محلول نگهداری گردیدند، در شرایط تاریک و پس از شستشو با آب‌مقطر، در مرحله بعد حدود ۵ دقیقه در محلول اسیدکلریدریک یک درصد قرار داده شدند. در نهایت ریشه‌ها مستقیماً از محلول اسیدی به محلول رنگی آنیلین بلو ۰/۰۵ درصد منتقل و در دمای محیط نگهداری شدند.

اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشه

تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها براساس روش خطوط متقاطع (Brundrett *et al.*, 1996) انجام شد. براساس این روش، ریشه‌های رنگ‌آمیزی‌شده (حداقل ۵۰ قطعه به طول حدودی یک سانتی‌متر) به‌صورت تصادفی درون پتری‌دیش مدرج (ابعاد ۱×۱ سانتی‌متر) قرار داده و زیر بینوکولر (مدل moticam 350) مشاهده و بررسی شدند. ریشه‌های میکوریزی و غیر میکوریزی بر روی صفحهٔ شطرنجی، هریک جداگانه شمارش شدند و در نهایت با استفاده از رابطه زیر درصد کلنیزاسیون تعیین شد.

$$\text{درصد کلنیزاسیون} = \frac{\text{تعداد قطعات میکوریزی}}{\text{کل قطعات مشاهده شده}} \times 100$$

استخراج، شناسایی و تکثیر باکتری‌های محلول‌کنندهٔ فسفات

جداسازی و خالص‌سازی

برای جداسازی باکتری‌ها از روش رقت‌های متوالی و کشت بر روی محیط کشت جامد اختصاصی Sperber با pH نهایی ۷/۲ دارای تری‌فسفات کلسیم به‌عنوان منبع فسفات نامحلول استفاده شد (Sperber, 1958). از هریک از نمونه‌های خاک یک گرم وزن و به ارلن‌های محتوای ۹۹ میلی‌لیتر کلرید سدیم ۰/۹ درصد اضافه شد. ارلن‌ها بر روی شیکر قرار گرفته و به‌مدت دو ساعت مخلوط گردید. سپس در شرایط استریل و در زیر هود لامینار، از این رقت (۲ تا ۱۰)، رقت‌های متوالی تا رقت (۷ تا۱۰) تهیه شد. از هر رقت در دو تکرار به مقدار یک میلی‌لیتر به پتری‌دیش‌های دارای محیط کشت Sperber انتقال داده شد. بعد از گسترده نمودن سوسپانسیون میکروبی بر روی محیط کشت، پتری‌دیش‌ها به مدت هفت شبانه‌روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند. اجزای محیط کشت در جدول ۱ آورده شد.

جدول ۱) ترکیبات استفاده‌شده در تهیه محیط کشت جامد Sperber

نام ترکیب	مقدار مورد استفاده
عصارهٔ مخمر	۰/۵ گرم
کلرید کلسیم	۰/۱ گرم
تری‌فسفات کلسیم	۲/۵ گرم
سولفات منیزیم	۰/۲۵ گرم
آگار	۱۵ گرم
آب‌مقطر	به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر

پس از ظاهر شدن کلنی‌ها، غربالگری و جداسازی باکتری‌ها انجام شد و ۱۲ کلنی مختلف که مورفولوژی‌های متفاوتی را نشان دادند، به‌صورت جداگانه برداشته و در محیط کشت نوترینت‌آگار خالص‌سازی شدند. سپس، با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم (MacFadine, 1980)، گرم مثبت و منفی بودن جدایه‌ها مشخص شد.

ارزیابی توان کمی انحلال فسفات معدنی توسط جدایه‌های باکتری

به‌منظور ارزیابی کمی توان جدایه‌ها در انحلال فسفات، از محیط کشت اسپربر مایع استفاده شد. بدین‌منظور، ابتدا جدایه‌ها در محیط کشت مایع نوترینت‌براث کشت و به‌مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور شیکردار تکان داده شدند. پس از یکسان کردن جمعیت باکتری‌ها در حد ۳ ×۱۰۸ CFU/ml در محیط مایع NB براساس استاندارد یک مک فارلند (MacFadine, 1980) که در این روش از کدورت استاندارد محلول سولفات باریم برای تهیه سوسپانسیون باکتری‌ها استفاده می‌شود؛ ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه به ۲۵ میلی‌لیتر محیط اسپربر مایع انتقال یافت.

سپس نمونه‌های مایع بر روی شیکر انکوباتور (۱۲۰ دور در دقیقه) و به‌مدت ۱۲۰ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی قرار داده شدند. سپس، ۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری‌ها سانتریفوژ (۱۵۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقـه) و یک میلی‌لیتر از محلول رویی با سه میلی‌لیتر آب‌مقطر و یک میلی‌لیتر از معرف آمونیوم مولیبدات- وانـادات (مقدار ۲/۲۵ گرم آمونیم هپتا مولیبدات در ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر گرم برای تهیهٔ محلول آمونیم مولیبدات حل شد.

همچنین مقدار ۰/۱۲۵ گرم آمونیم وانادات در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر جوش برای تهیهٔ محلول آمونیم وانادات حل گردید. سپس هر دو محلول با هم ترکیب شده و بعد از خنک شدن ۲۵ میلی‌لیتر اسید نیتریک ۶۵ درصد به آن اضافه و در نهایت با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید) مخلوط شد. پس از گذشت ۲۰ دقیقه میزان جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Luv-100A کشور آمریکا) در طول‌موج ۴۷۰ نانومتر قرائت و مقدار فسفر محلول توسط هر جدایه با استفاده از منحنی استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مختلف KH2PO4 محاسبه شد (Gulati *et al*., 2008).

شناسایی مولکولی جدایه‌های برتر

شش جدایه که بیشترین مقدار انحلال فسفات را داشتند، در محیط کشت جامد NA، کشت (شکل ۱) و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شدند.

به منظور استخراج DNA ژنومی باکتری‌ها، از کیت استخراج DNA (CinnaGen Co., Ltd. Iran) مخصوص باکتری‌های گرم مثبت و منفی استفاده شد (Edwards *et al*., 1989).

برای تکثیر ناحیهٔ ژنی 16S rDNA از آغازگرهای عمومی[۱] 27F، و 1492R با توالی موجود در جدول ۲ استفاده شد.

جدول ۲) توالی پرایمرهای F و R

پرایمر	توالی
F27	5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3' (27F)
R1429	5'- TACGGTTACCTTGTTACGACTT- 3' (1492R)

تکثیر با استفاده از یک ترموسایکلر GTC96S (Cleaver Scientific Ltd.) انجام شد. غلظت و مقادیر حجمی مواد به‌کار رفته در تهیهٔ مخلوط واکنش PCR برای یک باکتری در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳) حجم مواد واکنش PCR ناحیهٔ ژنی 16S rDNA باکتریایی

مواد موردنیاز	حجم (میکرولیتر)
آب مقطر دوبار استریل	۴۰/۱
Template DNA	۱
Forward primer	۱
Revers primer	۱
dNTPs	۰/۵
PCR buffer	۵
منیزیم کلرید	۱
Taq DNA polymerase	۰/۴
حجم نهایی	۵۰

مخلوط واکنش PCR (USA Biorad) ۵۰ میکرولیتر بود (Turan *et al.*, 2006). طبق برنامهٔ زمانی و دمایی ذکرشده در جدول ۴، تکثیر ناحیهٔ ژنی 16S rDNA انجام شد.

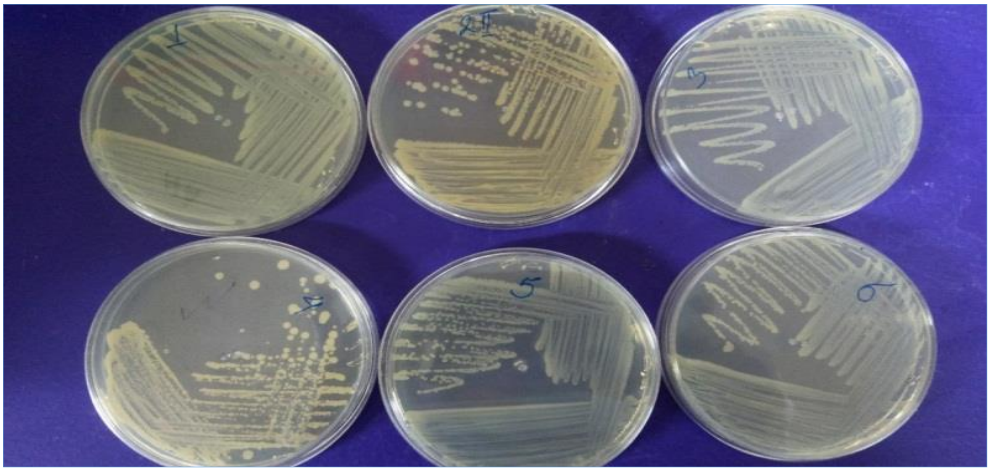
---

۱ .Universal

جدول ۴) برنامهٔ زمانی ارائه‌شده به دستگاه ترموسایکلر برای انجام واکنش

نام مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد دور
واسرشت‌سازی اولیه[۲]	۹۴	۵ دقیقه	۱
واسرشت‌سازی[۳]	۹۴	۱ دقیقه	۳۵
اتصال آغازگرها[۴]	۵۰	۱ دقیقه	۳۵
سنتز قطعه موردنظر[۵]	۷۲	۱ دقیقه	۳۵
گسترش نهایی[۶]	۷۲	۷ دقیقه	۱

محصول PCR حاصل از تکثیر ناحیهٔ ژنی 16S rDNA به وسیلهٔ الکترفورز در ژل آگاروز ۱/۲ درصد (v/v) رنگ‌آمیزی شده با DNA Safe Stain، در بافر TBE (1X) (با ولتاژ ۱۰۰ ولت به مدت ۱ ساعت) عبور داده شد. سپس ژل تحت نور UV نمایان و با استفاده از دستگاه ژل داک Alpha Imager (TM1200) تصویر آن ثبت شد.



شکل ۱) تصویر کشت شش جدایه برتر بر محیط NA

۲ .Preheating
۳ .Denaturating
۴ .Annealing
۵ .Extention
۶ .Final Extention

محصول PCR حاصل از تکثیر ژن‌های 16S rRNA جدایه‌های انتخابی با استفاده از کیت خالص‌سازی (CinnaGen Co., Ltd. Iran) خالص و برای تعیین توالی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتایج، توالی نوکلئوتیدی جدایه‌ها توسط نرم‌افزار Vector NTI اصلاح شد و یک توالی کانتیگ[۷] برای هر جدایه به‌دست آمد. توالی‌های کانتیگ در بانک ژن مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی[۸] (NCBI) با استفاده از Blast با توالی‌های موجود مقایسه شدند. تعداد مناسبی از توالی‌های ژن 16S rRNA برای هریک از جدایه‌های باکتری از طریق این پایگاه انتخاب و بعد توسط نرم‌افزار MEGA 5.1 بین توالی‌های انتخاب شده و توالی‌های جدایهٔ باکتری همردیفی انجام شد.

با استفاده از این نرم‌افزار، درخت فیلوژنتیکی به‌وسیلهٔ روش neighbor joining ترسیم و میزان صحت آن با روش bootstrap تعیین شد (Tamura *et al*., 2007). پس از تعریف جدایه‌های باکتریایی، توالی ژن 16S rRNA همهٔ آنها در بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) ثبت و کد دسترسی[۹] برای هریک از آنها به‌دست آمد.

شناسایی مولکولی قارچ‌های میکوریزی

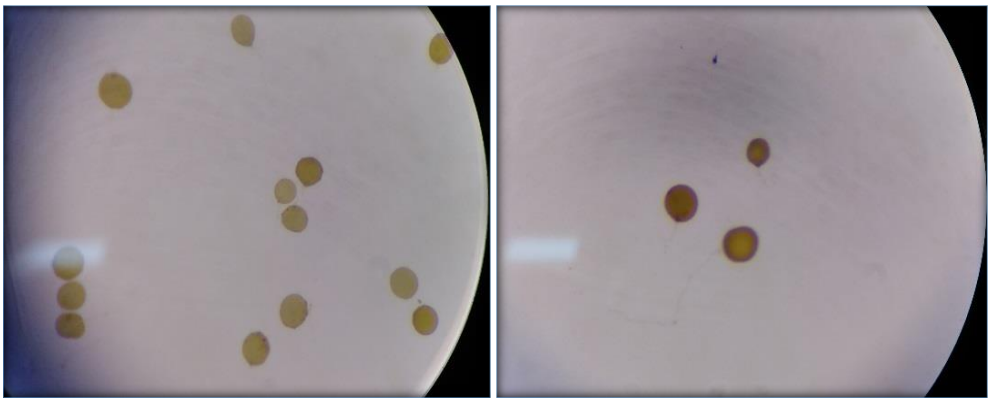
از هر نمونه خاک سه تکرار ۱۰ گرمی برای شمارش اسپورهای قارچی جدا شدند. برای جداسازی اسپورها از روش الک مرطوب (Gerdemann and Nicolson 1963) استفاده شد و در زیر بینوکولر شمارش شدند و براساس رابطه: $Xi/Xo * 100$ که Xi، تراکم جمعیت یک گونهٔ قارچی و Xo، کل جمعیت است، تراکم اسپورها برای هر گونه قارچ AM محاسبه شد. در نهایت گونه‌هایی که بیشترین فراوانی را داشتند برای تکثیر و شناسایی مولکولی انتخاب شدند (شکل ۲). شناسایی قارچ‌های میکوریزی براساس ویژگی‌های ظاهری مانند وجود یا عدم وجود اسپوروکارپ و نیز ابعاد، رنگ، شکل، اندازه و تعداد لایه‌های دیوارهٔ اسپور و نحوهٔ اتصال هیف به اسپور انجام شد (Fan *et al*., 2008) و شناسایی اسپورها با استفاده از تارنماهای اینترنتی معتبر https://invam.ku.edu/ و http://www.zor.zut.edu.pl و مقالهٔ کلیدی (Oehl *et al*. 2011) انجام گردید.

---

۷ .Contig

۸ .National Center for Biotechnology Information

۹ .Accession number



شکل ۲) اسپورهای گونه‌های قارچ‌های میکوریزی آربسکولار غالب مربوط به دو گونهٔ *Claroideoglomus luteum* و *Funneliformis geosporum* در خاک اطراف ریزوسفر با بزرگ‌نمایی ۴۰ برابر

شناسایی مولکولی قارچ‌های میکوریزی

تکثیر DNA قارچ‌های میکوریزی با واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به روش آشیانه‌ای با کمی اصلاحات انجام شد (Kruger *et al*., 2009). تکثیر ناحیهٔ ژنی SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU در قارچ میکوریز آربسکولار توسط آغازگرهای جدول ۵ انجام گردید. برای تکثیر DNA، ابتدا اسپورهای مشابه (شکل ۵) از نظر ظاهری در محلول کلرآمین T ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و بعد دو مرتبه با آب مقطر استریل شستشو شدند و پس از آن، به مدت ۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد قرار گرفته و دوباره دو مرتبه در آب مقطر استریل قرار گرفتند.

در مرحلهٔ بعد اسپورها به مدت ۵ دقیقه در استرپتومایسین ۰/۰۲ درصد قرار گرفته و بعد شستشو با آب مقطر استریل انجام شد. پس از ضدعفونی درنهایت برای هر جدایه دو تکرار در نظر گرفته شد (با یک اسپور و دو اسپور) و اسپورها با حداقل میزان آب مقطر استریل به میکروتیوپ استریل منتقل گردید و پس از افزودن بافر پی‌سی‌آر، اسپور با فشردن نوک سمپلر شکسته شد (Błaszkowski *et al*., 2015). همچنین در شناسایی مولکولی قارچ میکوریزی همواره یک گونه به عنوان شاهد در نظر گرفته می‌شود که در این پژوهش گونهٔ *Funneliformis mosseae* که از طریق کشت درون شیشه‌ای تکثیر یافته بود به‌عنوان شاهد درنظر گرفته شد.

جدول ۵) نام و توالی آغازگرهای استفاده شده

نام آغازگر	توالی (Sequence)	ناحیهٔ تکثیر (Amplification region)
SSUmAf1	5'-TGGGTAATCTTTTGAAACTTYA-3'	SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU
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'	

تکثیر ناحیهٔ ژنی SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU از طریق PCR دو مرحله‌ای انجام شد. مواد مرحله اول PCR برای یک نمونه با حجم کل ۲۰ میکرولیتر مطابق با جدول ۶ تهیه شد.

جدول ۶) غلظت و حجم مواد واکنش PCR1 ناحیهٔ ژنی SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU

حجم (میکرولیتر)	مواد موردنیاز
۲	PCR buffer 10x
۱۶/۵۶	dd H_2O
۰/۴	$MgCl_2$ (50Mm)
۰/۴	dNTPs (each 10mM)
۰/۲۴	SSUmAf (10 µM)
۰/۲۴	LSUmAr (10 µM)
۰/۱۶	Taq DNA polymerase Q (Smartaq; 5 U/µlitre)
۲۰	حجم نهایی

برنامهٔ زمانی و دمایی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مطابق جدول ۷ استفاده شد، در این مرحله قطعه‌ای به طول ۱۸۰۰ جفت باز تکثیر گردید.

جدول ۷) برنامهٔ زمانی ارائه‌شده به دستگاه ترموسایکلر برای انجام واکنش

نام مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل
واسرشت‌سازی اولیه	۹۴	۴ دقیقه	۱
واسرشت‌سازی	۹۴	۶۰ ثانیه	۳۰
اتصال آغازگرها	۵۸	۶۰ ثانیه	۳۰
سنتز قطعهٔ موردنظر	۷۲	۲ دقیقه	۳۰
گسترش نهایی	۷۲	۷ دقیقه	۱

محصول PCR اول در مرحلهٔ دوم واکنش استفاده شد که در حجم کل ۵۰ میکرولیتر با آغازگرهای SSUMCF و LSUMBR مطابق با شرایط دمایی و زمانی PCR اول انجام شد. در این مرحله قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر شد (جدول ۸).

جدول ۸) غلظت و حجم مواد واکنش PCR2 ناحیهٔ ژنی SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU

مواد موردنیاز	حجم (میکرولیتر)
PCR buffer 10x	۵
dd H_2O	۳۸/۶
$MgCl_2$ (50 mM)	۱
dNTPs (each 10 mM)	۱
SSUmCf (10 µM)	۱
LSUmBr (10 µM)	۱
Taq DNA polymerase (Smartaq; 5 U/µlitre)	۰/۴
Undiluted DNA	۲
حجم نهایی	۵۰

۶ میکرولیتر از محصولات دومین مرحله PCR به همراه ۳ میکرولیتر loading buffer را از ژل آگارز ۱/۲ درصد در بافر TBE(1X) عبور داده و اندازهٔ هر محصول به کمک نشانگر (Ladder) تخمین زده شد. مقایسهٔ باند تکثیرشده با نشانگر، تکثیر بخش موردنظر ژنوم را نشان داد.

برای بارگذاری محصول PCR از نشان‌گر وزنی ۱۵۰۰bp تا ۵۰ شرکت سیناژل استفاده و تانک الکتروفورز به دستگاه تأمین‌کننده جریان الکتریکی با ولتاژ ۹۰ تا ۸۵ ولت و شدت جریان الکتریکی ۱۰۰تا ۸۰ میلی‌آمپر به مدت یک ساعت متصل شد. پس از انجام الکتروفورز محصول PCR با قوی‌ترین باند روی ژل، تعیین و نمونهٔ موردنظر برای توالی‌یابی به شرکت Bioneer کره جنوبی ارسال شد.

در مرحلهٔ بعد، پس از دریافت نتیجهٔ توالی نوکلئوتیدی نمونه‌ها، نواحی پیوسته توسط نرم‌افزار Vector NIT V10 ایجاد و هریک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST با توالی‌های موجود در بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank) مقایسه شدند و هر دو جدایه در بانک ژن ثبت و شماره دسترسی برای هریک از آنها به‌دست آمد.

تکثیر قارچ‌های میکوریز آربسکولار

تحقیقات گلخانه‌ای این پژوهش در گلخانه تحقیقات میکوریز آربسکولار بخش تحقیقات جنگل مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور با میانگین دما و رطوبت روزانه با دستگاه دما و رطوبت‌سنج دیجیتال به‌ترتیب ۵/۷ ± ۲۳/۳ درجه سانتی‌گراد و ۹/۱۴ ± ۳۶/۷۳ درصد و شبانه به‌ترتیب ۳/۱ ± ۱۷/۵۴ درجه سانتی‌گراد و ۱۱/۴۵ ± ۴۴/۳۲ درصد انجام شد.

در این پژوهش از روش کشت تله‌ای (Trap culture) و گیاه ذرت (Zea mays) که مناسب‌ترین روش برای تولید و تکثیر انبوه است، استفاده شد (Fan *et al*., 2008). برای آلوده کردن گیاهان تله، همزمان با کاشت بذر گیاه تله، حدود ۱۰۰ عدد اسپور از قارچ‌های همزیست با گونهٔ بنه که بیشترین تراکم را داشتند، به‌عنوان زادمایه درکنار بذر بنه قرار گرفتند.

گونه‌های قارچی مورد تکثیر *Funneliformis geosporum* و *Claroideoglomus luteum* بودند. کلیهٔ بذرهای استفاده شده در این پژوهش با استفاده از هیپوکلریت سدیم ده درصد به مدت نیم ساعت استریل شدند. برای کشت ذرت از ترکیب خاک، ماسه ضدعفونی‌شده (به مدت یک ساعت در دمای

۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو) و پرلیت (به نسبت ۲:۱:۱) استفاده شد.

چهار ماه پس از رشد گیاه ذرت، از ریشه و خاک اطراف ریزوسفر آن برداشت شد و تراکم اسپور در ریزوسفر اندازه‌گیری شد. سپس از ریزوسفر آن که شامل اسپور، هیف و سایر اندام‌های قارچی بود و از قطعات ریشه به‌عنوان زادمایه نهایتاً تا دو هفته در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری و استفاده شد.

تولید نهال توانمندشده

نهال‌های موردنظر در اوایل فروردین ابتدا در فضای باز (خارج از گلخانه) از طریق بذر کاشته و تولید شدند. نهال‌ها در قالب تیمارهای میکوریز آربسکولار و باکتری محلول‌کنندهٔ فسفات، به صورت منفرد و ترکیبی، به همراه تیمار شاهد کاشته شدند، هر تیمار شامل ۹ تکرار در قالب طرح فاکتوریل بر پایهٔ طرح کاملاً تصادفی بود. برای تولید نهال، ابتدا بذرها (چهار عدد در هر گلدان) در کیسه‌های پلاستیکی به ابعاد ۱۴ × ۱۲ سانتی‌متر و در خاک ضدعفونی‌شده کاشته شدند.

تا زمان استقرار کامل نهال‌ها، گلدان‌ها روزانه آبیاری شدند و پس از آن دو تا سه بار در هفته آبیاری انجام شد. همچنین، در طول این مدت گلدان‌ها تنک شدند و در هر گلدان یک نهال نگه داشته شد. پس از گذشت حدود دو ماه از استقرار نهال‌ها، گلدان‌ها به داخل گلخانه منتقل و نهال‌ها به کیسه‌های پلاستیکی بزرگ‌تر (۳ کیلوگرم، ابعاد ۳۰ × ۱۵ سانتی‌متر) منتقل شدند تا مراحل بعدی رشد در شرایط کنترل‌شده گلخانه ادامه یابد.

همزمان با انتقال نهال‌ها، حدود ۷۰ گرم زادمایهٔ میکوریزی به ازای هر نهال (دارای حدود ۳۵ تا ۴۰ عدد اسپور در هر گرم، سایر اندام‌های قارچی و ریشهٔ ذرت) از قارچ‌های *Funneliformis geosporum* و *Claroideoglomus luteum* و مخلوط هر دو گونه برای بنه استفاده شد. همچنین، برای شبیه‌سازی با تمام تیمارها، برای تیمارهای شاهد فقط خاک اولیهٔ استفاده‌شده برای کاشت ذرت (بدون قارچ) در کنار بذرهای بنه ریخته شد.

برای تولید نهال باکتریایی از دو جدایهٔ گرم مثبت (*Peribacillus frigoritolerans*) و گرم منفی (*Pseudomonas azotoformans*) برای بنه که بیشترین میزان انحلال فسفات را داشتند، استفاده شد.

بدین‌منظور، باکتری‌های موردنظر در محیط کشت NA تکثیر شدند و پس از ۲۴ ساعت، جمعیت آنها براساس استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند روی 5/1 ×108 CFU/ml تنظیم گردید (MacFaddin, 1980). برای مایه‌زنی باکتری نیز ۴ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتریایی به صورت جدا و ترکیبی در زمان جابه‌جایی نهال‌ها به کیسه گلدان‌های بزرگ‌تر در کنار ریشه‌ها ریخته و در گلدان‌های شاهد از آب‌مقطر استریل استفاده شد. برای تولید تیمارهای مخلوط قارچ و باکتری نیز از ترکیب گونه‌های قارچی و باکتریایی استفاده گردید. در مجموع ۱۶ تیمار قارچی و باکتریایی با تعداد نه تکرار بررسی شدند (جدول ۹).

جدول ۹) اطلاعات و اختصارات قارچ‌ها و باکتری‌های شناسایی و استفاده شده در پژوهش

قارچ	باکتری	اسامی
NM	NPSB	شاهد
FG		F. geosporum
CL		C. luteum
Mix		F. geosporum + C. luteum
NM	PA	P. azotoformans
FG		F. geosporum + P. azotoformans
CL		*C. luteum +P. azotoformans*
Mix		*F. geosporum + C. luteum+ P. azotoformans*
NM	PF	*P. frigoritolerans*
FG		*F. geosporum+ P. frigoritolerans*
CL		*C. luteum+ P. frigoritolerans*
Mix		*F. geosporum + C. luteum+ P. frigoritolerans*
NM	Mixb	*P. azotoformans + P. frigoritolerans*
FG		*F. geosporum +P. azotoformans + P. frigoritolerans*
CL		*C. luteum+ P. azotoformans + P. frigoritolerans*
Mix		*F. geosporum + C. luteum+ P. azotoformans + P. frigoritolerans*

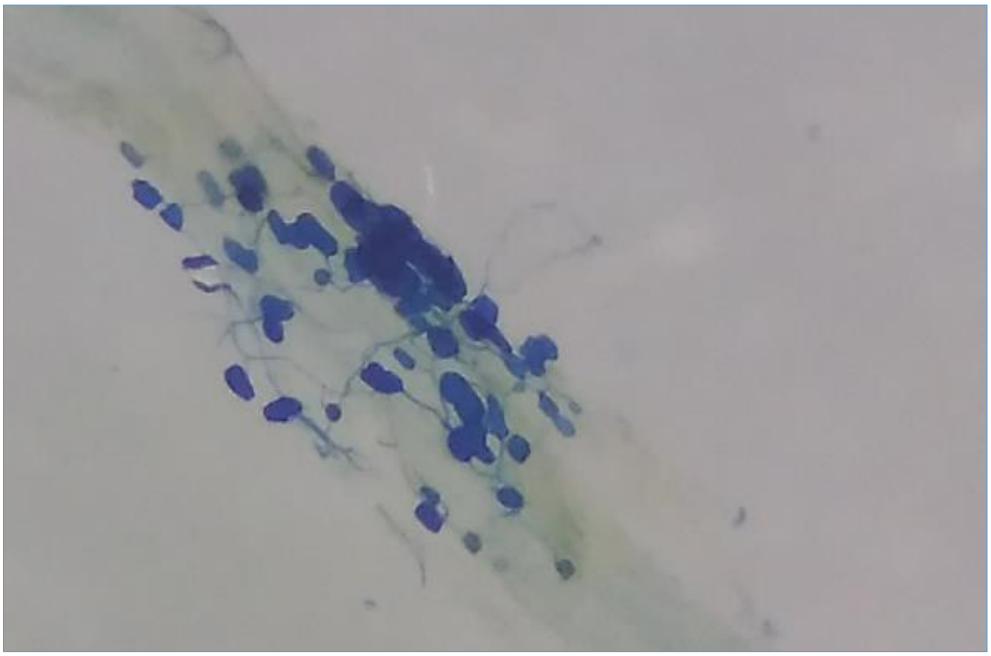
(NM, non-mycorrhizal; NPSB: non- phosphate solubilizing bacteria; FG: *F. geosporum*; CL: *C. luteum*; PF: *P. frigoritolerans*; PA: *P. azotoformans*)

نتایج

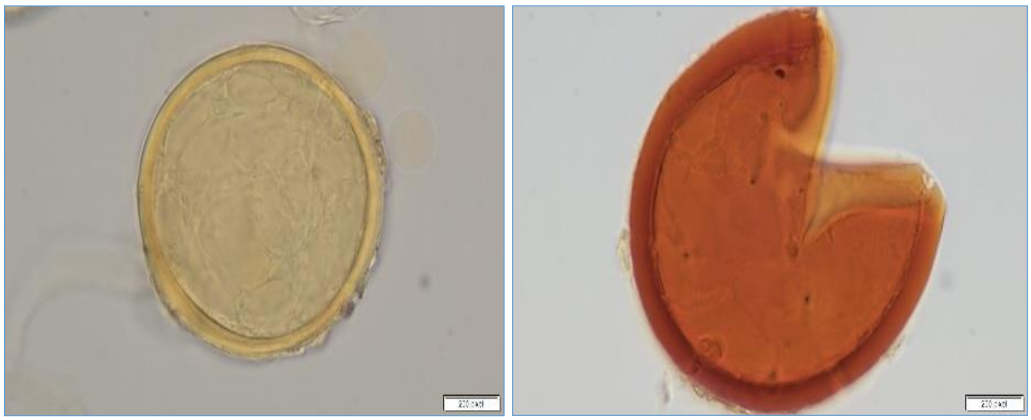
درصد همزیستی میکوریزی بنه و فراوانی اسپور قارچ‌های میکوریزی در خاک

نتایج اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون ریشهٔ گونهٔ بنه در منطقهٔ روستای ازگی نشان داد که با قارچ‌های میکوریز آربسکولار ۵۳/۶۷ درصد همزیستی داشتند (شکل ۳). همچنین بررسی فراوانی اسپور در خاک نشان داد که تعداد کل اسپور در هر گرم خاک ریزوسفر ریشه‌های بنه ۸۴/۱۸ عدد است.

همچنین دو گونهٔ *Claroideoglomus luteum* و *Funneliformis geosporum* به ترتیب با ۳۱/۸۷ و ۲۳/۸ عدد اسپور در یک گرم خاک بیشترین فراوانی را در ریزوسفر بنه داشتند که با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی شناسایی شدند (شکل ۴).



شکل ۳) اندام‌های میکوریزی در ریشه (هیف و وزیکول)



شکل ۴) اسپور قارچ‌های میکوریز آربسکولار شناسایی شده *Funneliformis geosporum* (راست) و *Claroideoglomus luteum* (چپ) با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ برابر

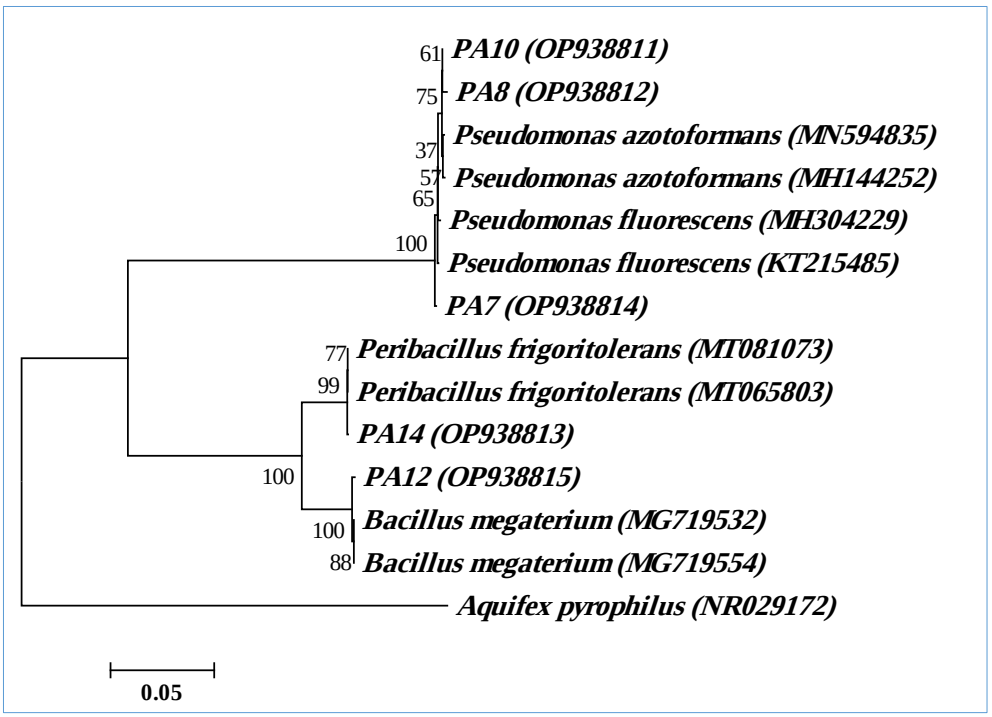
شناسایی مولکولی قارچ‌های میکوریز آربسکولار و باکتری محلول‌کنندهٔ فسفات

نتایج شناسایی جدایه‌های قارچی و باکتریایی، درصد شباهت جدایه‌ها با گونه‌های شناسایی شده و شماره دسترسی توالی‌های ثبت شده در پایگاه NCBI در جدول ۱۰ گزارش شده است.

مطابق این جدول چهار جدایهٔ باکتری محلول‌کنندهٔ فسفات شامل دو گونهٔ گرم مثبت از خانوادهٔ Bacillaceae ودو گونهٔ گرم منفی از خانوادهٔ Pseudomonadaceae شناسایی شدند (شکل ۵) اما به دلیل اینکه درصد شباهت جدایهٔ PA11 به باکتری *Pseudomonas paralactis* حدود ۹۰ درصد بود، برای این جدایهٔ کد دسترسی گرفته نشد.

جدول ۱۰) شناسایی جدایه‌های قارچ و باکتری

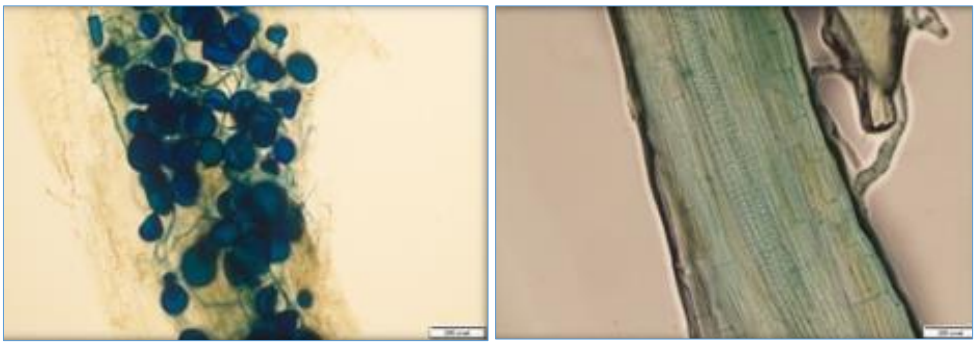
نوع جدایه	کد جدایه	گونه	شمارهٔ دسترسی	درصد شباهت
AMF	PA 88	*Funneliformis geosporum*	-	۹۰
	PA 90	*Claroideoglomus luteum*	OQ223297	۹۶/۸
PSB	PA 8	*Pseudomonas azotoformans*	OP938812	۹۹/۱۵
	PA 7	*Pseudomonas fluorescens*	OP938814	۹۸/۶۷
	PA 10	*Pseudomonas azotoformans*	OP938811	۹۹/۴۴
	PA 12	*Bacillus megaterium*	OP938815	۹۹/۲۳
	PA 14	*Peribacillus frigoritolerans*	OP938813	۹۹/۰۹
	PA11	*Pseudomonas paralactis*	-	۹۱/۹



شکل ۵) درخت تبارزایی باکتری‌های شناسایی‌شده مبتنی بر توالی 16S rDNA
ارزیابی نهال‌های تولید شده

کلنیزاسیون ریشه

کلنیزاسیون ریشه در تیمارهای حاوی قارچ‌های میکوریزی به خوبی برقرار شد، در حالی که در ریشه نهال‌های شاهد اصلاً مشاهده نشد (شکل ۶). بیشترین درصد کلنیزاسیون وقتی بود که از تیمار توأم قارچ و باکتری استفاده شد. سطح بعدی آن زمانی بود که از تیمار مخلوط قارچ استفاده گردید. قارچ *C. luteum* در حضور باکتری *P. frigoritolerans* کمترین درصد همزیستی را ایجاد کردند.



شکل ۶) ریشهٔ نهال تولید شده میکوریزی (سمت چپ) و غیرمیکوریزی (سمت راست) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ برابر

صفات رویشی

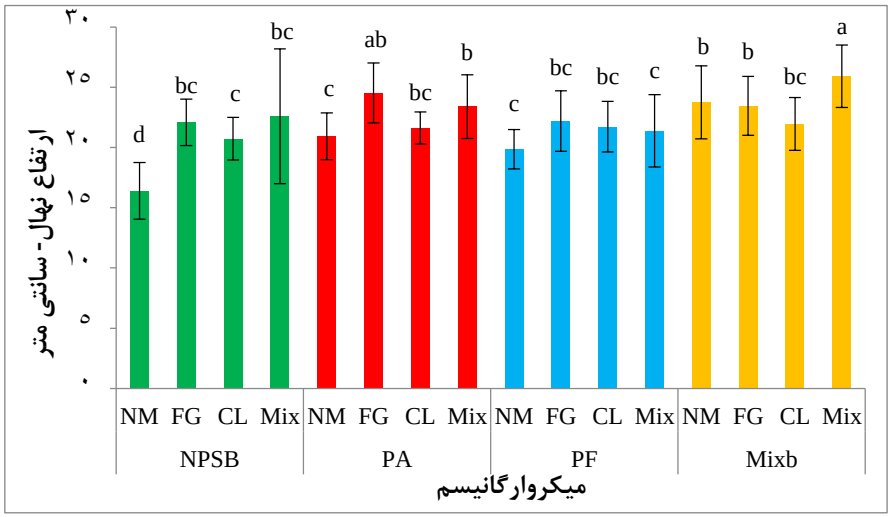
در شکل ۷ نمونه‌ای از نهال‌های مایه‌زنی‌شده با میکروارگانیسم‌ها و نهال شاهد نشان داده شده است.

شکل ۷) نهال‌های بنه A: مایه‌زنی‌شده با میکروارگانیسم‌ها، B: شاهد

اثر میکروارگانیسم‌ها بر ارتفاع، قطر یقه و تعداد برگ نهال یکسالهٔ بنه

نتایج نشان داد که تیمارهای مختلف قارچ میکوریزی آربسکولار و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات اثر معنی‌داری بر ارتفاع نهال‌ها داشتند ($p < 0.05$). بیشترین ارتفاع در تیمار ترکیب قارچ‌های *Funneliformis geosporum* و *Claroideoglomus luteum* همراه با باکتری‌های *Pseudomonas azotoformans* و *Peribacillus frigoritolerans* مشاهده شد (شکل ۸).

در حالی که کمترین ارتفاع به تیمار شاهد (بدون مایه‌زنی) تعلق داشت. در شرایط تنش خشکی، کاهش معنی‌داری در ارتفاع نهال‌ها مشاهده شد، ولی مایه‌زنی میکوریزی و باکتریایی به‌ویژه به‌صورت ترکیبی، توانست این کاهش را به میزان قابل توجهی جبران کند. افزایش ارتفاع نهال در تیمارهای مایه‌زنی‌شده احتمالاً ناشی از بهبود دسترسی گیاه به فسفر و آب از طریق گسترش شبکهٔ هیفی قارچ‌ها و نیز فعالیت آنزیمی باکتری‌ها است که سبب تحریک رشد مریستم‌های ساقه‌ای و افزایش فتوسنتز می‌شود. این یافته‌ها با نتایج Azizi *et al.* (2019) و Shirvani *et al.* (2021) در گونه‌های *Myrtus communis* و *Pistacia vera* هم‌راستا است.

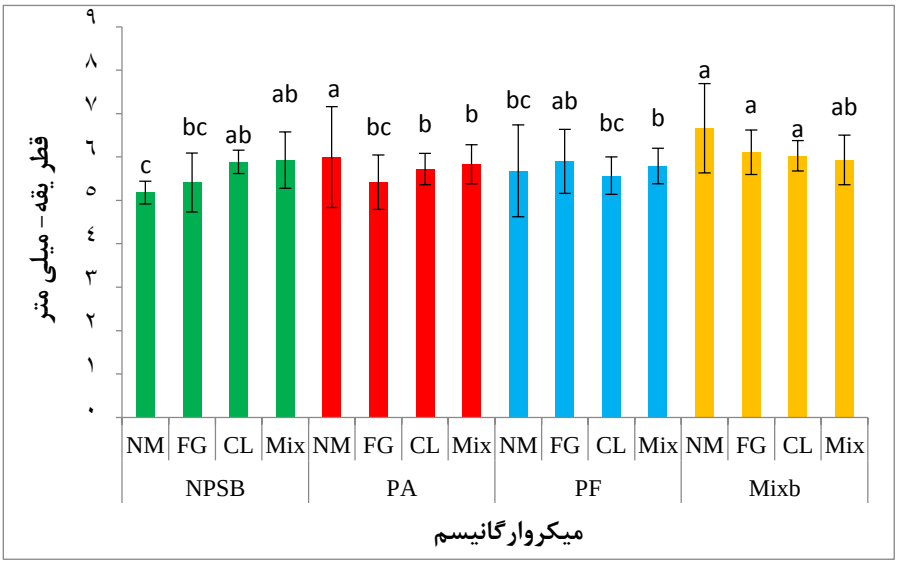


شکل ۸) اثر تیمارهای قارچ‌های میکوریزی آربسکولار و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات (۱۶ تیمار با ۹ تکرار) بر ارتفاع نهال بنه (*Pistacia atlantica*) در طرح فاکتوریل بر پایهٔ طرح کاملاً تصادفی اختلاف میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است.

(NM, non-mycorrhizal; NPSB: non- phosphate solubilizing bacteria; FG: *F. geosporum*; CL: *C. luteum*; PA: *P. azotoformans*; PF: *P. frigoritolerans*)

قطر یقه یکی از شاخص‌های کلیدی در ارزیابی استحکام و پایداری نهال است. نتایج نشان داد که تیمارهای میکوریزی و باکتریایی اثر معنی‌داری بر این شاخص داشتند (شکل ۹).

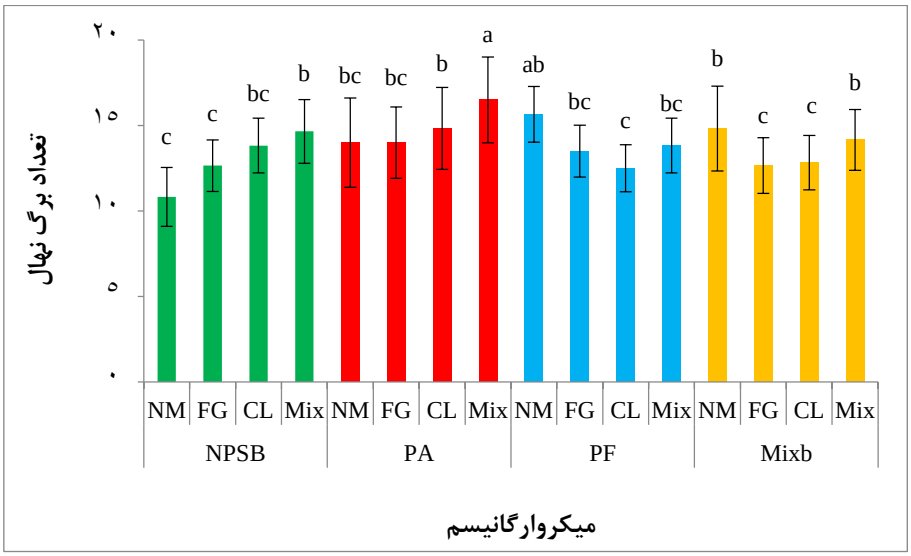
تیمار ترکیبی قارچ و باکتری بیشترین افزایش قطر یقه را نسبت به شاهد ایجاد کرد و تفاوت بین تیمارها در سطح ۵ درصد معنی‌دار بود (شکل ۹). افزایش قطر یقه در گیاهان مایه‌زنی‌شده به فعالیت متقابل میکوریز و باکتری نسبت داده می‌شود که با افزایش جذب عناصر غذایی به‌ویژه فسفر، منیزیم و پتاسیم، موجب تقویت دیواره سلولی و افزایش سنتز لیگنین می‌شوند. در شرایط تنش خشکی نیز مایه‌زنی زیستی باعث کاهش اثرهای منفی تنش و حفظ رشد قطری شد. نتایج مشابه توسط Rahimzadeh & Pirzad (2017) و Gamalero & Glick (2019) گزارش شده است.



شکل ۹) اثر تیمارهای قارچ‌های میکوریزی آربسکولار و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات (۱۶ تیمار با ۹ تکرار) بر ارتفاع قطر یقه بنه (*Pistacia atlantica*) در طرح فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی اختلاف میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است.

(NM, non-mycorrhizal; NPSB: non- phosphate solubilizing bacteria; FG: *F. geosporum*; CL: *C. luteum*; PA: *P. azotoformans*; PF: *P. frigoritolerans*)

تعداد برگ در نهال‌های مایه‌زنی‌شده با قارچ و باکتری به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود (شکل ۱۰). در تیمارهای ترکیبی، تعداد برگ‌ها به‌طور متوسط ۳۰ تا ۴۰ درصد بیشتر از تیمار شاهد برآورد شد. این افزایش احتمالاً ناشی از افزایش جذب فسفر و بهبود وضعیت آبی گیاه است که موجب افزایش سطح فتوسنتزی و تأخیر در پیری برگ‌ها می‌شود. در مقابل، نهال‌های شاهد در شرایط تنش رطوبتی کمترین تعداد برگ را داشتند که به دلیل کاهش فشار اسمزی و فعالیت متابولیکی پایین‌تر است. البته هم‌افزایی بین میکوریز و باکتری‌ها از طریق افزایش غلظت سیتوکینین‌ها و کاهش اتیلن در ریشه‌ها، به حفظ رشد رویشی و تداوم برگ‌زایی کمک می‌کند. این نتایج با مطالعات Singh *et al.* (2019) و Richardson *et al.* (2023) همخوانی دارد.



شکل ۱۰) اثر تیمارهای قارچ‌های میکوریزی آربسکولار و باکتری‌های حل‌کنندهٔ فسفات (۱۶ تیمار با ۹ تکرار) بر تعداد برگ نهال بنه (*Pistacia atlantica*) در طرح فاکتوریل بر پایهٔ طرح کاملاً تصادفی اختلاف میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار است.

(NM, non-mycorrhizal; NPSB: non- phosphate solubilizing bacteria; FG: *F. geosporum*; CL: *C. luteum*; PA: *P. azotoformans*; PF: *P. frigoritolerans*)

نتیجه‌گیری

براساس یافته‌های این پژوهش استفاده از میکروارگانیسم‌ها در گلخانه موجب بهبود ویژگی‌های رویشی این گونه شد و مایه‌زنی قارچ‌های میکوریز آربسکولار و باکتری‌های محلول‌کنندهٔ فسفات ویژگی‌های رویشی نهال بنه و درصد کلنیزاسیون ریشه را به‌طور معنی‌داری در گلخانه افزایش داد.

کاربرد توأم قارچ‌های میکوریزی آربسکولار با باکتری‌های محلول‌کنندهٔ فسفات، تیمار مخلوط (Mix) که متشکل از ترکیب دو قارچ *F. geosporum* و *C. luteum* و دو باکتری *P. azotoformans* و *P. frigoritolerans* بود، بیشترین اثر را بر افزایش ارتفاع نهال‌های بنه با ۲۵/۹۱ سانتی‌متر در گلخانه داشت.

همچنین در کاربرد توأم قارچ‌های میکوریزی آربسکولار با باکتری‌های محلول‌کنندهٔ فسفات بر قطر یقهٔ نهال‌های بنه در گلخانه، تیمار مخلوط (Mix) باکتری‌ها با تیمارهای منفرد قارچ‌های میکوریز آربسکولار: *F. geosporum* و *C. luteum* به‌ترتیب با ۶/۱۱ و ۶/۰۳ میلی‌متر، بیشترین افزایش را داشتند. در اثر توأم قارچ‌های میکوریزی آربسکولار با باکتری‌های محلول‌کنندهٔ فسفات، در تیمار منفرد باکتری *P. azotoformans* با تیمار مخلوط (Mix) قارچ، با ۱۶/۵ عدد بیشترین تعداد برگ را داشتند.

بنابراین، با توجه به نتایج به‌دست آمده از این پژوهش، کاربرد توأم قارچ‌های میکوریزی با باکتری‌های محلول‌کنندهٔ فسفات برای تولید گونهٔ ارزشمند بنه و احیای رویشگاه‌های آن می‌تواند مدنظر قرار گیرد و استفاده از میکروارگانیسم‌ها را به‌عنوان راهکاری مناسب و کاربردی برای افزایش رشد بنه در رویشگاهای طبیعی و تخریب‌شده آن پیشنهاد داد.

منابع

آرمند، ن.، متینی‌زاده، م.، شیروانی، ا.، خوشنویس، م.، ۱۳۹۵. اثر تلقیح قارچ‌های میکوریزی بر رشد نونهال‌های محلب (*Cerasus mahaleb* (L.) Mill) در شرایط گلخانه‌ای. تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۴ (۲۴): ۶۵۶-۶۶۴.

بوداغی، ع.، ۱۳۷۴. بررسی شرایط اکولوژیک، پراکنش و زادآوری درخت بنه. همایش ملی بنه (مروارید سبز)، ایلام.

تیموری، م.، خوشنویس، م.، صادق‌زاده حلاج، م.ح.، علی‌زاده، ط.، متینی‌زاده، م.، پورهاشمی، م.، ۱۳۹۷. امکان استفاده از باکتری‌های محرک رشد در عملیات احیای جنگل‌های بلوط (مطالعهٔ موردی: ایستگاه گاران، مریوان). مجلهٔ جنگل ایران، ۳ (۱۰): ۳۶۱- ۳۷۱.

حمزه‌پور، م.، بردبار، س.ک.، جوکار، ل.، عباسی، ع.ر.، ۱۳۸۵. بررسی امکان احیای جنگل‌های بنه از طریق کاشت مستقیم بذر و نهال. جنگل و صنوبر ایران، ۱۴(۳)ک ۲۲۰- ۲۷۰.

طهماسبی، م.، ۱۳۷۹. بررسی عوامل مؤثر بر پراکنش پسته وحشی در استان ایلام. طرح مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان ایلام، ۲۲۳ صفحه.

عزیزی، ص.، طبری کوچکسرایی، م.، فلاح نصرت‌آباد، ع.ر.، مدرس‌ثانوی، ع.، ۱۳۹۹. تأثیر تلقیح دو قارچ میکوریزی و دو باکتری محرک رشد بر بهبود صفات نهال‌های تحت تنش خشکی مورد (*Myrtus communis*). جنگل و فراورده‌های چوب، مجلهٔ منابع طبیعی ایران، ۷۳(۳): ۲۷۱- ۲۸۱.

فلاحیان. ف.، عباسپور، ح.، فهیمی، ح.، ۱۳۸۴. بررسی تأثیر قارچ اندومیکوریز بر تغذیه معدنی و رشد گیاه پسته در شوری، مجله پژوهش و سازندگی، شماره ۸۲، صفحات ۶۷- ۸۶.

متینی‌زاده، م.، نوری، ا.، علی‌زاده، ط.، شیروانی، ا.، ۱۴۰۰. بهبود زنده‌مانی، استقرار و ویژگی‌های رویشی نهال‌های ارس (*Juniperus excelsa*) با تلقیح قارچ‌های میکوریزی بومی. جنگل و فراورده‌های چوب، مجلهٔ منابع طبیعی ایران، ۷۴(۴): ۴۲۱- ۴۳۲.

Alam, S., Khalil, S., Ayub, N., Rashid, M., 2002. In vitrosolubilization of inorganic phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from maize rhizosphere. International Journal of Agriculture and Biology, 4: 454-458.

Allen, M.F., 2007. Mycorrhizal fungi: highways for water and nutrients in arid soils. Vadose Zone Journal, 6: 291–297.

Antoun, H., Kloepper, J., 2001. Plant growth promoting rhizobacteria. In: Encyclopedia of Genetics, (Eds.) Brenner, S. and Miller, Journal of Academy, Press, 1477-1480.

Azarmi-Atajan, F., Sayyari-Zohan, M.H., 2022. Effect of phosphate solubilizing bacteria and triple superphosphate on the growth, physiological parameters and phosphorus

uptake of pistachio seedlings. Journal of Horticulture and Postharvest Research, 5(1):69-78.

Azcon-Aguilar, C, Jaizme-Vega, M.C., Calvet, C., 2002. The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the control of soil-borne plant pathogens. Mycorrhizal technology in agriculture: from genes to bioproducts. 187-97.

Azizi, R., Pirzad, A., and Rahimzadeh, M. 2019. Effects of mycorrhizal inoculation on growth and drought tolerance of Myrtus communis seedlings. Journal of Forest Research and Development, 33(2): 221–230.

Barea, J.M., Azcon-Aguilar, C., Azcon, R., 1997. Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere micro-organisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: Gange AC, Brown VK (eds) Multitrophic interactions in terrestrial systems. Backwell, Cambridge, pp 65–77.

Brundrett, M., Bougher, N., Grove, T. Malajczuk, N., 1996. Working with Mycorrhizasin Forestry and Agriculture.Monograph 32. Australian Center for InternationalAgricultural Reserch, Canberra, Australia, p. 374.

Błaszkowski, J., Chwat, G., Góralska, A., and Bobrowska-Chwat, A. 2015. Glomus tetrastratosum, a new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). Mycoscience, 56(3): 280–286.

Cavagnaro, T.R., 2008. The role of arbuscular mycorrhzas in improving plant zinc nutrition under low soil zinc concentrations: a review. Plant and Soil, 304: 315-325.

Davies, J.r.F.T., Potter, J.R., Linderman, R.G., 1992. Mycorrhiza and repeated drought exposure affect drought resistance and extraradical hyphae development of pepper plants independent of plant size and nutrient content. Journal of Plant Physiology, 139: 289-94.

Fageria, N.K., 2009. The use of nutrients in crop plants. Taylor and Francis Group, LLC. New York.

Fan, Y., Luan, Y., An, L., Yu, K., 2008. Arbuscular mycorrhizae formed by Penicillium pinophilum improve the growth, nutrient uptake and photosynthesis of strawberry with two inoculum-types. Biotechnology letters, 30:1489-94.

Gamalero, E., Glick, B.R., 2019. Plant growth-promoting bacteria in agricultural and stressed soils. InModern soil microbiology, pp 361-380.

Gerdemann, J.W., Nicolson T.H., 1968. Spores of mycorrhizal Endogenic species extracted for soil by wet sieving and decanting. Transactions of the British Mycological Society.1968: 46: 235-244.

Goransson, P., Olsson, P.A., Postma, J., Falkengren-Grerup, U., 2008. Colonization by arbuscular mycorrhizal and fine endophytic fungi in four woodland grasses-variation in relation to pH and aluminium. Soil Biology and Biochemistry, 40: 2260–2265.

Gulati, A., Rahi, P., Vyas, P., 2008. Characterization of phosphate-solubilizing fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of seabuckthorn growing in the cold deserts of Himalayas. Current microbiology, 56:73-9.

Huang, H., Zhang, S., Wu, N., Luo, L., Christie, P., 2009. Influence of *Glomus etunicatum*/*Zea mays* mycorrhiza on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities, and soil microbial community structure. Soil Biology and Biochemistry, 41: 726-734.

Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H., and Schüßler, A. 2009. Phylogenetic

reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist, 182(4): 986–994.

MacFaddin, J.F., 1980. “Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria,” Williams and Wilkins, Baltimore.

MacFadine, J.F., 1980. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Second edition. Warley Press, Inc. U.S.A. 527 p.

Marschner, H., Dell, B., 1994. Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Plant and Soil, 59: 89–102.

Miller, R.M., Jastrow, J.D., 1992. The role of mycorrhizal fungi in soil conservation. Mycorrhizae in sustainable agriculture, 54: 29-44.

Phillips, J.M., Hayman, D.S., 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist,124: 481-488.

Rahimzadeh, S., Pirzad, A., 2017. Arbuscular mycorrhizal fungi and Pseudomonas in reduce drought stress damage in flax (*Linum usitatissimum* L.): a field study. Mycorrhiza, 27(6):537-52.

Raju, P.S., Clark, R.B., Ellis, J.R., Maranville, J.W.,1990. Effects of species of VA-mycorrhizal fungi on growth and mineral uptake of sorghum at different temperatures. Plant and soil, 121:165-70.

Richardson, A.E., Hadobas, P.A., Hayes, J.E., O'hara, C.P., Simpson, R.J., 2001. Utilization of phosphorus by pasture plants supplied with myo-inositol hexaphosphate is enhanced by the presence of soil micro-organisms. Plant and Soil, 229:47-56.

Shiran, B., et al. 2021. Genetic diversity and distribution of Pistacia atlantica populations in Iran. Forest Ecology and Management, 481: 118704.

Shirvani, M., Matinizadeh, M., and Zarafshar, M. 2021. Effects of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate-solubilizing bacteria on the growth of Pistacia atlantica seedlings under drought stress. Iranian Journal of Forest and Poplar Research, 29(4): 451–462.

Singh, S., Kapoor, R., and Aggarwal, A. 2019. Arbuscular mycorrhiza-mediated enhanced tolerance to drought in plants: Recent advances and future perspectives. Frontiers in Plant Science, 10: 470.

Sperber, J.I., 1958. Solution of apatite by soil microorganisms producing organic acids. Australian Journal of Agricultural Research, 9(6):782-7.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 24(8): 1596–1599.

Wang, F.Y., Lin, X.G., Yin, R., Wu, L.H., 2006. Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on the growth of Elsholtzia splendens and *Zea mays* and the activities of phosphatase and urease in a multi-metal-contaminated soil under unsterilized conditions. Applied Soil Ecology, 31: 110-119.

Williams, A., Ridgway, H.J., Norton, D.A. 2012. Different arbuscular mycorrhizae and competition with an exotic grass affect the growth of *Podocarpus cunninghamii* Colenso cuttings. New Forests, 44: 183–195.

Zarei, M., Fallahzade, J., and Rezaei, M. 2020. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi in different forest ecosystems of Iran. Iranian Journal of Forest and Range Protection Research, 18(1): 15–26.