Journal of Water and Soil
https://jsw.um.ac.ir

CC BY

Research Article
Vol. 37, No. 2, May-June 2023, p. 261-279

Study on Simultaneous Colonization of *Rhizophagus irregularis* and *Serendipita indica* in Barley under Different P Levels Using Monoclonal Antibody

V. Dinmohammadi[1]*, N. Aliasgharzad[2], L. Aghebati-Maleki[3]

Received: 30-11-2022
Revised: 11-02-2023
Accepted: 06-03-2023
Available Online: 06-03-2023

How to cite this article:
Dinmohammadi, V., Aliasgharzad, N., & Aghebati-Maleki, L. (2023). Study on simultaneous colonization of *Rhizophagus irregularis* and *Serendipita indica* in barley under different P levels using monoclonal antibody. *Journal of Water and Soil 37*(2): 261-279. (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/jsw.2023.79849.1230

Introduction

Recent studies show that most crops and horticultural plants can form symbiosis with the arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and the endophytic *Serendepita indica*, simultaneously. The endophytic fungus plays an important role in alleviating environmental stresses in plants. It has also been shown that excessive available phosphorus in soil limits the root colonization by arbuscular mycorrhizal fungi. No information is available on how soil phosphorus affects the establishment of endophytic fungus in root. Barley roots can be colonized by both mycorrhizal fungi and the endophytic fungus *Serendipita indica*. The objective of this study was to evaluate the effects of single or dual inoculation with *Rhizophagus irregularis* and *Serendipita indica* on barley roots under different phosphorus (P) levels. The researchers utilized a monoclonal antibody called MAb32B11 to assess the presence of glomalin, a signature molecule of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, in the roots. The glomalin content was quantified using the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method with the MAb32B11 antibody.

Materials and Methods

In this experiment, barley plants were inoculated with *Rhizaphagus irregularis* (AMF) and *Serendepita indica* (endophytic fungus) with three levels of phosphorus from triple super phosphate source. At the end of the vegetative growth period (about three months), the plants were harvested and phosphorus concentration in the plant were measured. A subsample from roots was stored in -20 ºC for determination of glomalin content. The glomalin content in the roots was analyzed using the monoclonal antibody MAb32B11. This antibody was employed to differentiate between the two fungi present in the roots and to quantify the abundance of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) specifically in plants treated with *Rhizophagus irregularis*. Additionally, the content of glomalin in the soil was determined at the end of the experiment using the same method as described above. The experiment was designed as a factorial completely randomized design (CRD) with three replications.

Results and Discussion

The results showed that the fresh and dry weights of shoot and root increased significantly in dual inoculation. At zero phosphorus level, shoot and root phosphorus concentrations were significantly higher in treatments with *R. irregularis* than in those without fungus (control). Under individual inoculation with *R. irregularis*, or *S. indica* as well as their dual inoculations, increasing level of phosphorus had no significant effect on shoot and root phosphorus concentration. In dual inoculation, the percentage of total colonization (88%) was significantly higher than that of individual inoculation treatment (68%) but the contribution of each fungus in root colonization under dual inoculation was significantly reduced as estimated by glomalin content of root and determination of total colonization. It was found that with increasing phosphorus level, total colonization percentage significantly

1 and 2- Former M.Sc. Student and Professor of Soil Biology & Biotechnology, Department of Soil Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: dinmohammadi.v.t@gmail.com)
3- Assistant Professor of Immunology, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
DOI: 10.22067/jsw.2023.79849.1230

decreased and the highest percentage of colonization (61%) was observed at zero level of phosphorus. By increasing phosphorus level, the percentage of root colonization was significantly decreased in individual inoculation by *R. irregularis*, or *S. indica* as well as dual inoculation. Results of glomalin assay in soil showed that the glomalin content was high in treatments of *R. irregularis* but control treatments without fungus and individual inoculation with *S. indica* had low glomalin. Antibody-reactive root glomalin was less in the dual inoculation treatment (1006.9 $\mu g.g^{-1}$) than in the *R. irregularis* treatment alone (1924.5 $\mu g.g^{-1}$) indicating that the presence of *S. indica*, in root inhibits, root colonization by *R. irregularis*. Moreover, the increasing of phosphorus level, significantly decreased root glomalin.

Conclusion

The increase of available phosphorus concentration in the soil caused to limit the expansion of the symbiosis of *R. irregularis* and *S. indica*, and this limitation was more for *R. irregularis*. In the case of dual inoculation with both *Rhizophagus irregularis* and *Serendipita indica*, the negative impact of phosphorus on colonization percentage was observed to be less compared to single inoculation. Although the percentage of colonization by each fungus decreased in the dual inoculation treatment compared to their individual inoculation, the overall colonization percentage increased significantly. It appears that in the dual inoculation scenario, while the total root colonization percentage increases, the presence of *S. indica* leads to a decrease in the colonization percentage specifically with *R. irregularis*. But in general, growth and nutrient absorption in the case of dual inoculation was better than the inoculation of each of them individually. It was also found that increasing the concentration of phosphorus in the soil caused a decrease in root colonization for both fungi, although the negative effect of phosphorus on the colonization of *R. irregularis* was more than that of *S. indica*. The measurement of glomalin in soil and root showed that the inhibitory effect of *S. indica* fungus on *R. irregularis* is less in soil than in root.

Keywords: Endophytic fungus, Monoclonal antibody, Co-inoculation, Simultaneous symbiosis, Arbuscular mycorrhizal fungus

نشریه آب و خاک
https://jsw.um.ac.ir

مقاله پژوهشی

جلد ۳۷، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۲، ص. ۲۷۹-۲۶۱

بررسی کلنیزاسیون دوگانه *Rhizophagus irregularis* و *Serendipita indica* در جو در سطوح مختلف فسفر با به‌کارگیری آنتی‌بادی منوکلونال

وحیده دین محمدی[1*]- ناصر علی‌اصغرزاد[2]- لیلی عاقبتی ملکی[3]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۹
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱۱/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۱۵

چکیده

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که اغلب گیاهان زراعی و باغی علاوه بر همزیستی با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار می‌توانند همراه با قارچ اندوفیت *S. indica* نیز ایجاد همزیستی کنند. مقدار بالای فسفر قابل‌جذب در خاک سبب محدودیت کلنیزاسیون قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در ریشه می‌شود اما در خصوص تأثیر آن بر همزیستی قارچ اندوفیت اطلاعات کافی در دسترس نیست. در این آزمایش گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.) با قارچ‌های *R. irregularis* (قارچ میکوریز آربوسکولار) و *S. indica* (قارچ اندوفیت) با سه سطح فسفر خاک (شامل صفر، ۱۰، ۲۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم) از منبع سوپر فسفات تریپل تلقیح شدند. میزان گلومالین (گلیکوپروتئین) در ریشه‌ها و خاک با استفاده از آنتی‌بادی منوکلونال MAb32B11 اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که در حالت تلقیح هر دو قارچ وزن تر و خشک بخش هوایی و ریشه نسبت به تلقیح انفرادی آن‌ها به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. در سطح صفر فسفر، غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه در تیمارهای دارای *R. irregularis* به‌طور معنی‌دار بیش‌تر از تیمار بدون قارچ بود. در تلقیح‌های انفرادی یا دوگانه، افزایش سطح فسفر تأثیر معنی‌داری بر غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه نداشت. در تلقیح دوگانه قارچ‌ها، گرچه درصد کلنیزاسیون کل بیشتر بود اما سهم هریک از قارچ‌ها در مقایسه با تلقیح‌های انفرادی کاهش یافت. با افزایش سطح فسفر درصد کلنیزاسیون در تلقیح‌های منفرد و تلقیح دوگانه به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. مقدار گلومالین خاک در تیمار *R. irregularis* زیاد بود اما تیمارهای شاهد بدون قارچ و تلقیح منفرد قارچ *S. indica* دارای مقدار اندکی گلومالین بودند. گلومالین ریشه در حالت تلقیح دو قارچ (۱۰۰۶/۹۴µg.g^{-1}) کم‌تر از تیمار *R. irregularis* (۱۹۲۴/۴۹µg.g^{-1}) بود که نشان می‌دهد حضور قارچ *S. indica* در ریشه، کلنیزاسیون ریشه توسط قارچ *R. irregularis* را مهار می‌کند. هم‌چنین با افزایش سطح فسفر خاک، مقدار گلومالین ریشه به‌طور معنی‌دار کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: تلقیح دوگانه، قارچ اندوفیت، قارچ میکوریز آربوسکولار، منوکلونال آنتی‌بادی، همزیستی همزمان

مقدمه

همزیستی دوگانه قارچ‌های میکوریزی و اندوفیت در یک گیاه اخیراً موردتوجه زیادی قرارگرفته است. قارچ‌های میکوریزی از طریق جذب آب و عناصر غذایی، به‌ویژه عناصر باقابلیت دسترسی کم مثل فسفر، از استقرار گیاه در انواع خاک‌ها حمایت می‌کنند (Koide and Kabir, 2000; Turner *et al*., 2013). قارچ‌های میکوریزی از طریق افزایش مقدار عناصر غذایی و تأثیر بر ترشحات ریشه‌ای گیاه، رشد گیاه و فرآیندهای ریزوسفر را اصلاح و تغییر می‌دهد (Richardson *et al*., 2009). به‌علاوه، قارچ‌های میکوریز و ترشحات آن‌ها نظیر گلومالین به‌طور مستقیم در تشکیل ساختمان خاک مشارکت دارند (Rillig and

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
(*- نویسنده مسئول: Email: dinmohammadi.v.t@gmail.com)
۳- استادیار گروه ایمونولوژی، دانشکده ایمونولوژی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

DOI: 10.22067/jsw.2023.79849.1230

(Mummey, 2006). به دلیل نقش در خاکدانه سازی و پایداری آن‌ها و افزایش ذخیره کربن و نیتروژن خاک و کاهش انتشار گازهای گلخانه‌ای بسیار موردتوجه است (Zhu and Miller, 2003; Rillig, 2004).

قارچ اندوفیت *Serendipita indica* برای اولین بار در سال ۱۹۹۷ در شمال غرب هندوستان از گیاهان خشکی‌پسند کهور و کنار در یک آزمایش برای قارچ میکوریز آربوسکولار در بیابان تار ایالت راجستان کشور هند جداسازی گردید. قارچ در سطح ریشه کلنیزه می‌شود و بعد از دو هفته داخل کورتکس ریشه می‌شود و تولید کلامیدوسپورهای گلابی شکل می‌کند اما قادر به نفوذ به استوانه مرکزی ریشه نمی‌باشد. این قارچ در جذب عناصر غذایی ازجمله فسفر به گیاه کمک می‌کند ولی احتمالاً کارایی آن در جذب فسفر به‌اندازه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار نباشد. این قارچ اندوفیت، هم‌چنین در تعدیل تنش‌ها در گیاهان به‌ویژه شوری و خشکی کارایی بهتری از میکوریز آربوسکولار نشان می‌دهد (Verma *et al*., 1998).

برخلاف قارچ‌های میکوریز آربوسکولار که قادر به ایجاد همزیستی با برخی تیره های گیاهی نمی‌باشند، قارچ *S. indica* محدودیت میزبانی ندارد (Kumari *et al*., 2003). هم‌چنین قارچ *S. indica* همزیست اختیاری بوده و به آسانی در محیط‌های کشت مصنوعی قادر به رشد است. دامنه میزبانی این قارچ و توان رشد بر روی محیط کشت مصنوعی نقطه روشنی در موضوع قارچ‌های اندوفیت ایجاد کرده و محققان فعال در این عرصه را امیدوار به کشت و تکثیر این قارچ شبه میکوریزی بدون نیاز به کشت همراه با گیاه میزبان نموده است (Verma *et al*., 1998).

با توجه به اینکه گیاهان با پتانسیل تشکیل میکوریز، قادرند بطور همزمان با قارچ‌های آربوسکولار و قارچ اندوفیت *S. indica* همزیستی دوگانه ایجاد کنند لذا برهمکنش آنها در گیاهان مورد توجه محققین قرار گرفته است. در یک آزمایش گلدانی با بستر استریل، گیاه گوجه‌فرنگی تحت شرایط تنش شوری، بصورت انفرادی و دوگانه با قارچ‌های *R. irregularis* و *S. indica* تلقیح شدند. از اسیدهای چرب نشان برای تعیین زیست توده هر قارچ در ریشه استفاده شد. نتایج نشان داد که اسید چرب قارچ اربوسکولار در ریشه در حضور قارچ *S. indica* کاهش یافت. بطور مشابه، مقدار ارگسترول ریشه بعنوان مولکول نشان قارچ *S. indica* در حضور قارچ آربوسکولار کاهش یافت که نشان دهنده رفتار رقابتی دو قارچ در حالت همزیستی دوگانه است. علیرغم این برهمکنش منفی بین دو قارچ، کلنیزاسیون ریشه (کل) در تلقیح دوگانه بطور معنی‌داری بیشتر از تلقیح انفرادی آنها بود. وزن خشک گیاه در تلقیح انفرادی با *R. irregularis* کمی بیش‌تر از تلقیح انفرادی با *S. indica* بود ولی بیش‌ترین بیومس گیاهی در تلقیح دوگانه به‌دست آمد (Heidarianpour *et al*., 2020).

مشاهده‌شده است که افزایش غلظت فسفر رابطه معکوس با میزان کلنیزاسیون[1] میکوریزی در ریشه دارد؛ اما افزودن مقادیر کم فسفر در گیاهانی که دچار کمبود شدید فسفر هستند، میزان کلنیزاسیون را افزایش می‌دهد (Gholami and Kochaki, 2010). تحقیقات انجام‌شده نشان می‌دهند که زیادی فسفر قابل‌جذب در خاک سبب محدودیت فعالیت قارچ‌های میکوریز آربوسکولار می‌شود ولی در رابطه با اثر فسفر بر روی همزیستی قارچ اندوفیت *S. indica* اطلاعات اندکی موجود است. افزایش عملکرد دانه در گیاهان جو کلنیزه شده با قارچ *S. indica* مستقل از سطوح فسفر و نیتروژن بود. حتی زمانی که عرضه فسفر و نیتروژن بالا بود، اثرات مثبت قارچ مشاهده شد. اثرات قارچ روی عملکرد (حداقل در گیاه زراعی جو) به کود دهی فسفر وابسته نیست (Achatz *et al*., 2010).

در همزیستی دوگانه قارچ میکوریز آربوسکولار و اندوفیت *S. indica* به‌کارگیری مشاهدات میکروسکوپی قادر به تفکیک سهم هریک از آن‌ها در کلنیزاسیون نیست. در این تحقیق با اندازه‌گیری گلومالین ریشه به‌عنوان مولکول نشان برای قارچ‌های میکوریز آربوسکولار، سعی شد سهم کلنیزاسیون هر یک از قارچ‌ها در تلقیح دوگانه مشخص شود. هم‌چنین تأثیر افزایش فسفر قابل‌جذب خاک بر درصد کلنیزاسیون ریشه توسط این دو قارچ در حالت انفرادی و دوگانه موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت و آماده‌سازی زاد مایه قارچ‌ها

قارچ *Serendipita indica* از گروه علوم و مهندسی خاک دانشگاه تبریز تهیه شد. برای تکثیر قارچ از محیط کشت کفر[2] استفاده شد. پس از توسعه کلنی قارچ، توده قارچی از سطح محیط کشت جمع‌آوری و در آب استریل حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ تعلیق و سوسپانسیون حاصله به‌عنوان زادمایه قارچ مورداستفاده قرار گرفت. تعداد اسپورها در زادمایه قارچ با استفاده از لام نئوبار شمارش شد و تعداد آن‌ها ۵/۶×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر بود.

قارچ *Rhizophagus irregularis* از دپارتمان بیولوژی دانشگاه لوند سوئد اخذ گردید. برای تهیه زادمایه قارچی، از کشت گلدانی با میزبان گیاه ذرت در بستر استریل استفاده شد. دو ماه پس از شروع کشت، قسمت هوایی گیاه از سطح خاک قطع‌شده و محتویات گلدان، شامل هیف، اسپور و ریشه‌های میکوریزی به‌عنوان زادمایه استفاده شد. درصد کلنیزاسیون قارچی ریشه‌ها در زادمایه به‌عنوان شاخص پتانسیل زادمایه، اندازه‌گیری شد (Aliasgharzad *et al*., 2001).

1- Colonization

2- Kaefer Medium

آماده‌سازی خاک

یک خاک لوم شنی برای کشت گیاه از ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز تهیه و پس از عبور از غربال ۴/۷ میلی‌متری، در اتوکلاو استریل شد. برخی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی نظیر بافت، pH (عصاره اشباع)، EC، کربن آلی، آهک، فسفر قابل‌جذب، پتاسیم قابل‌جذب و برخی از عناصر کم‌مصرف خاک (Mn, Fe, Zn, Cu) در تحقیقات قبلی توسط نجفی و همکاران (Najafi *et al.*, 2013) اندازه‌گیری شده بودند که نتایج آن‌ها در جدول ۱ دیده می‌شود.

آماده‌سازی بذر

بذرهای گیاه جو (*Hordeum vulgare* L.) بعد از چندین بار شست‌وشو با آب مقطر و غوطه‌ورسازی در اتانول ۷۰٪ به مدت ۳۰ ثانیه، به داخل محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ انتقال یافتند و بعد از ده دقیقه، حدود ۱۰ بار با آب مقطر استریل کاملاً شست‌وشو داده شدند.

کشت گیاه و اعمال تیمارها

گلدان‌های پلاستیکی استریل حاوی دو کیلوگرم خاک استریل آماده شدند. پنج عدد بذر ضدعفونی شده جو در هر گلدان کشت شد. در تیمارهای قارچ *Rhizophagus irregularis* (RI)، مقدار ۵۰ گرم زادمایه در عمق پنج سانتی‌متری از سطح خاک به‌صورت یک لایه پخش گردید. در تیمارهای قارچ *Serendipita indica* (SI)، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون قارچ در مجاورت هر بذر ریخته شد. در تلقیح دوگانه نیز علاوه بر ۵۰ گرم زاد مایه قارچ RI، یک میلی‌لیتر نیز سوسپانسیون قارچ SI به کنار بذر افزوده شد(RI+SI). گیاهان شاهد بدون قارچ (F_0) ، فقط عصاره زادمایه قارچ (عبور داده‌شده از کاغذ واتمن شماره ۱) دریافت کردند. بعد از ظهور گیاهچه‌ها، تعداد آنها به سه عدد در هر گلدان تنک شد بطوریکه فقط گیاهچه‌های هم اندازه نگه داشته شدند. گیاهان در گلخانه با نور طبیعی نگهداری شدند. فسفر در سه سطح شامل صفر، ۱۰، ۲۰ میلی‌گرم فسفر بر کیلوگرم، به ترتیب (P_{20},P_{10}, P_0) از منبع کود سوپر فسفات تریپل استفاده شد. از کود اوره به مقدار ۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌عنوان منبع نیتروژن، از کودهای سولفات روی، سولفات مس و سولفات منگنز هرکدام به مقدار ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌عنوان منبع روی، مس و منگنز و از کود کلات آهن به مقدار ۱۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به‌عنوان منبع آهن استفاده شد. بر اساس آزمون خاک، پتاسیم در مقادیر کافی برای گیاه وجود داشت به همین دلیل کود پتاسیم استفاده نشد. رطوبت گلدان‌ها در محدوده ۰/۷–۰/۸ رطوبت ظرفیت گلدانی[1] (PC) در طول آزمایش به روش توزین، روزانه تنظیم شدند (Junker *et al.*, 2015).

جدول ۱- برخی خصوصیات اندازه‌گیری شده در خاک مورد آزمایش

Table 1- Some properties measured in the tested soil

خصوصیات خاک (واحد) Soil properties (unit)	مقدار Value
pH پی‌اچ	7.2
EC (dS.m^{-1}) هدایت الکتریکی	0.71
P (mg.kg^{-1}) فسفر قابل‌جذب	3.4
K (mg.kg^{-1}) پتاسیم قابل‌جذب	224
Fe (mg.kg^{-1}) * آهن قابل‌جذب	3.8
Zn (mg.kg^{-1})* روی قابل‌جذب	2
Cu (mg.kg^{-1})* مس قابل‌جذب	0.9
Mn (mg.kg^{-1})* منگنز قابل‌جذب	5.3
%OC کربن آلی	0.2
N ٪ نیتروژن کل خاک	0.02
Clay ٪رس	5.16
Silt ٪سیلت	12.97
Sand ٪شن	81.87
کلاس بافت Texture class	شن لومی Loamy sand
٪CCE کربنات کلسیم معادل	2.99
PC (w/w %) رطوبت ظرفیت گلدانی خاک	24.47

*: نتایج گزارش شده در این جدول از کارهای قبلی در همین خاک اخذ شده است

*: The results reported in this table are obtained from previous works in the same soil (Najafi *et al.*, 2013).

CCE: Carbonate calcium equivalent, PC: Soil moisture at Pot Capacity

برداشت گیاه و اندازه‌گیری خصوصیات

بعد از سپری شدن دوره رشد (قبل از تشکیل سنبله) (۹۰ روز)، بخش هوایی و ریشه‌ای به‌طور جداگانه برداشت شدند. ریشه‌ها به‌دقت از ذرات خاک جدا و چندین بار با آب شسته شده و بعد از گرفتن آب اضافی، توزین و وزن به دست آمد. هم‌چنین نمونه‌هایی از ریشه جهت اندازه‌گیری گلومالین (نگهداری در دمای منفی ۲۰ درجه سلسیوس)، تعیین درصد کلنیزاسیون قارچی (نگهداری در اتانول ۵۰ درصد) و اندازه‌گیری غلظت عناصر غذایی تهیه شد. بخش هوایی گیاهان از سطح خاک قطع و وزن تر آن‌ها اندازه‌گیری شد. کلیه نمونه‌های گیاهی در داخل پاکت‌های کاغذی به داخل آون فن دار منتقل‌شده و در دمای

1 - Pot Capacity

۷۰ درجه سلسیوس به مدت دو روز خشک و پس از این مدت به کمک ترازو با دقت ۰/۰۱ g ± وزن خشک آن‌ها تعیین شد.

تعیین درصد کلنیزاسیون قارچی

برای تعیین درصد کلنیزاسیون قارچی، رنگ‌آمیزی ریشه‌ها با استفاده از روش تغییریافته کورمانیک و مک‌گراو (Kormanic and Graw, 1982) انجام شد. نمونه‌های یک گرمی از ریشه‌های تازه تهیه شدند و به قطعات یک سانتی‌متری بریده‌شده و در اتانول ۵۰ درصد (حجمی/حجمی) تثبیت شدند. ریشه‌ها سه الی چهار مرتبه با آب شست‌وشو و در لوله‌های حاوی محلول KOH ده درصد به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط قرار داده شدند. در پایان این مرحله محلول KOH به رنگ زرد یا زرد کم‌رنگ درمی‌آید. سپس محلول مذکور دور ریخته شد و ریشه‌ها سه الی چهار مرتبه با آب شست‌وشو شدند. سپس نمونه‌ها حداقل به مدت پنج دقیقه در محلول اسیدکلریدریک یک درصد قرار داده شدند تا آماده رنگ‌پذیری شوند. در ادامه اسید را خالی کرده و بدون شست‌وشو با آب، محلول رنگی به ریشه‌ها اضافه شد و ۲۴ ساعت در دمای محیط نگه‌داری گردید. محلول رنگی شامل تریپان بلو ۰/۰۵ درصد در محلول رنگ‌بر (محلول رنگ‌بر به نسبت حجمی ۱۴:۱:۱ از آب: گلیسیرین: اسیدلاکتیک تشکیل‌شده بود) بود. جهت تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه از روش تقاطع خطوط شبکه[1] استفاده شد (Norrif *et al.*, 1992 Schenck and Perez, 1988;).

اندازه‌گیری گلومالین خاک و ریشه

برای استخراج گلومالین کل خاک از محلول بافر ۵۰ میلی‌مولار سیترات سدیم (pH=۸) استفاده شد. یک گرم از خاک گلدان داخل لوله فالکون حاوی هشت میلی‌لیتر بافر سیترات سدیم ۵۰ میلی‌مولار قرار گرفت و یک دقیقه ورتکس شد، سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو گردید. سپس در ۱۰۰۰×g به مدت ده دقیقه سانتریفوژ گردید (Rosier *et al.*, 2006). سه سیکل متوالی ۶۰ دقیقه‌ای عصاره‌گیری تکرار شد و عصاره حاصل بعد از سانتریفوژ به عصاره قبلی افزوده شد. در مورد نمونه‌های ریشه یک گرم ریشه تازه جهت استخراج مورداستفاده قرار گرفت و سایر مراحل مشابه استخراج گلومالین از بستر کشت گلدانی بود (Wright and Upadhyaya, 1999). برای سنجش گلومالین به روش الایزای غیرمستقیم، ۵۰ میکرولیتر نمونه رقیق‌شده با بافر فسفات (pH=۷/۲، PBS[2]) (تقریباً معادل غلظت ۰/۰۲ میکروگرم پروتئین) به داخل چاهک‌های میکروپلیت U شکل از جنس پلی‌وینیل کلراید اضافه گردید. نمونه‌ها به مدت یک‌شب در دمای ۳۵ درجه سلسیوس داخل انکوباتور قرار گرفت.

پس از افزودن ۲۵۰ میکرولیتر شیر خشک بدون چربی (۲ درصد در PBS) تازه تهیه‌شده به داخل چاهک‌ها و انکوباسیون به مدت ۱۵ دقیقه بر روی شیکر، نمونه‌ها با افزودن ۵۰ میکرولیتر آنتی‌بادی منوکلونال 32B11 به هر چاهک به مدت یک ساعت روی شیکر انکوبه شدند. سپس محتویات میکروپلیت داخل ظرف‌شویی خالی‌شده و به‌صورت وارونه با واردکردن ضرباتی روی کاغذ خشک‌کن کاملاً خشک گردید. چاهک‌ها سه بار با بافر شستشو (بافر PBS حاوی ۰/۰۲ درصد توئین ۲۰) شستشو گردید. برای آشکار کردن آنتی‌بادی‌های منوکلونال متصل به آنتی‌ژن گلومالین از کنژوگه[3] پراکسیداز ضد ایمونوگلوبولین موش (HRP-Goat anti mouse-Igm) با رقت ۱:۱۰۰۰ (رقیق‌شده در BSA ۱٪) استفاده شد. برای این منظور، ۵۰ میکرولیتر از کنژوگه آنزیمی به هر چاهک اضافه شد و به مدت یک ساعت روی شیکر انکوبه شد. بعد از اتمام زمان انکوباسیون، محتویات میکروپلیت تخلیه گردید و به‌صورت وارونه با واردکردن ضرباتی روی کاغذ خشک‌کن کاملاً خشک شد. ۵۰ میکرولیتر از سوبسترای ۳، ۳'، ۵، ۵' – تترامتیل بنزیدین (TMB, Merck) در هر چاهک به‌منظور تولید رنگ استفاده شد. ۳۰ دقیقه بعد از افزودن سوبسترای رنگی، قرار گرفتن در فضای تاریک، و پایان واکنش با اسیدسولفوریک ۷ درصد (Sigma) شدت رنگ تولیدی از طریق اندازه گیری میزان جذب نور در طول‌موج ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه قرائت گر الایزا (Stat Fax 303, Germany) قرائت و نتایج ثبت شد. همه مراحل انکوباسیون روی شیکر چرخشی انجام شد. نمودار استاندارد در محدوده غلظت ۰/۰۰۵ تا ۰/۰۴ میکروگرم با استفاده از گلومالین حاصل از کشت گلدانی و نمونه‌های خاک با ۱۰۰ درصد واکنش‌پذیری با آنتی‌بادی تهیه گردید (Wright *et al.*, 1996 Nichols and Wright, 2004; Rillig, 2004;).

اندازه‌گیری فسفر گیاه

برای اندازه‌گیری غلظت عناصر در گیاه، از روش هضم خشک استفاده شد. یک گرم از نمونه‌های گیاهی (ریشه یا بخش هوایی) خشک و پودر شده، با ترازوی ۰/۰۰۱± گرم توزین و در بوته‌های چینی ریخته شد. کروزه‌ها در کوره الکتریکی قرار داده شدند تا خاکستر آن‌ها کاملاً سفید گردید. پس از سرد شدن خاکستر، ۱۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک یک نرمال داغ ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه روی بن‌ماری گذاشته شد و روی کروزه‌ها با شیشه ساعت پوشانده شد. بعد از ۲۰ دقیقه، محتویات کروزه با استفاده از کاغذ صافی به داخل بالون ۵۰ میلی‌لیتری صاف گردید و با آب مقطر به حجم رسانده شد (Westerm, 1990). به‌منظور اندازه‌گیری فسفر از روش رنگ‌سنجی وانادات – مولیبدات (روش زرد) استفاده شد (Cottenie, 1980).

1- Grid line Intersection Method (GIM)
2- Phosphate buffer solution
3- Conjugate

نحوه تعیین سهم هر قارچ در تلقیح دوگانه

پس از تعیین درصد کلنیزاسیون (روش میکروسکوپی) و مقدار گلومالین ریشه، رابطه خطی بین مقدار گلومالین و درصد کلنیزاسیون در گیاهانی که فقط قارچ اربوسکولار دریافت کرده بودند، به دست آمد. سپس در تیمارهای تلقیح دوگانه برای تعیین سهم هر یک از قارچ‌ها، ابتدا درصد کلنیزاسیون قارچ آربوسکولار از طریق مقدار گلومالین و به‌کارگیری رابطه خطی، محاسبه و از درصد کلنیزاسیون کل کسر گردیده و درصد کلنیزاسیون با قارچ اندوفیت تعیین شد.

طرح آزمایشی و آنالیز آماری

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. فاکتور اول شامل چهار سطح تلقیح قارچ (قارچ آربوسکولار، قارچ اندوفیت، تلقیح دوگانه و بدون قارچ) و فاکتور دوم شامل سه سطح فسفر بود. تجزیه واریانس و مقایسات میانگین داده‌ها به‌وسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS و رسم نمودارها با Excel انجام گرفت.

نتایج

وزن خشک بخش هوایی و ریشه

با توجه به نتایج تجزیه واریانس داده‌ها (جدول ۲) اثرات متقابل قارچ و فسفر بر وزن خشک اندام هوایی و ریشه معنی‌دار شد ($p<۰/۰۱$).

اثرات متقابل قارچ و فسفر بر وزن خشک بخش هوایی و ریشه معنی‌دار بود (جدول ۲). بیش‌ترین وزن خشک بخش هوایی (۶/۷۱ گرم بر گلدان) در تیمار SI و P_{10} مشاهده شد که با تیمار (SI+RI) و P_{20} اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۱). بیش‌ترین وزن خشک ریشه (۶/۱۵ گرم بر گلدان) در تیمار (SI+RI) و سطح P_{20} مشاهده شد (شکل ۲).

درصد کلنیزاسیون ریشه

بر اساس نتایج جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) اثرات متقابل قارچ و فسفر بر درصد کلنیزاسیون در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود.

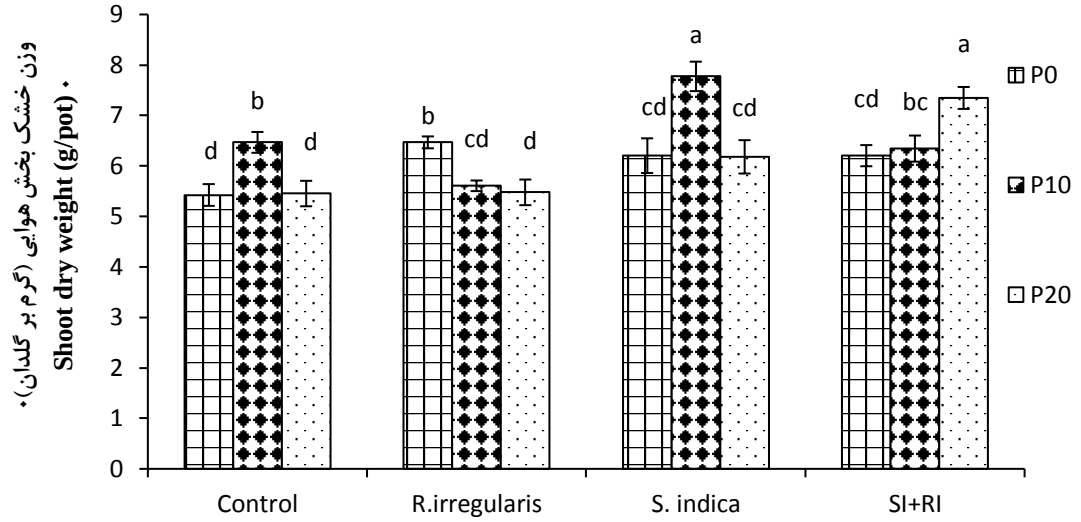
جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تلقیح قارچ و سطوح قارچ و فسفر بر وزن خشک بخش هوایی و ریشه

Table 2- Variance analysis of the effect of fungus inoculation and fungus and phosphorus levels on the dry weight of shoots and roots

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of squares	
		وزن خشک ریشه Root dry weight	وزن خشک بخش هوایی Shoot dry weight
قارچ Fungus	3	2.047**	2.234**
فسفر Phosphorus	2	8.401**	0.826*
قارچ×فسفر Fungus×Phosphorus	6	3.116**	1.589**
خطا Error	24	0.138	0.178
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variation (%)		8.231	6.758

** معنی‌دار در سطح ۱٪

** significant at the 1% level

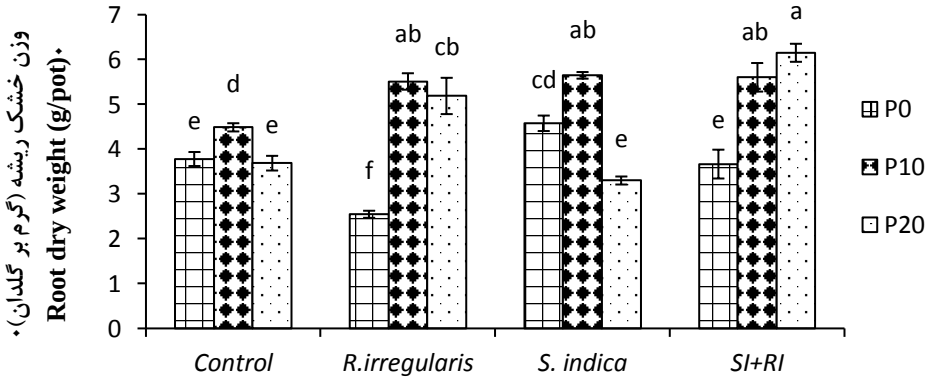


شکل ۱- اثر برهم‌کنش قارچ و فسفر بر وزن خشک بخش هوایی

P_0: بدون فسفر، P_{10}: ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان و P_{20}: ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

Figure 1- The effect of the interaction of fungus and phosphorus on the dry weight of the shoots

P_0: no phosphorus, P_{10}: 10 mg/kg pot and P_{20}: 20 mg/kg pot. Means with at least one common letter have no significant difference by Duncan's multi-range test method at the 1% probability level.



شکل ۲- اثر برهم‌کنش قارچ و فسفر بر وزن خشک ریشه

P_0: بدون فسفر، P_{10}: ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان و P_{20}: ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

Figure 2- The effect of the interaction of fungus and phosphorus on the dry weight of the roots

P_0: no phosphorus, P_{10}: 10 mg/kg pot and P_{20}: 20 mg/kg pot. Means with at least one common letter have no significant difference by Duncan's multi-range test method at the 1% probability level.

با توجه به (شکل ۳) در سطح فسفر P_0، درصد کلنیزاسیون کل ریشه در تیمار (SI+RI) بیش‌تر از RI و SI است. در این تیمار درصد کلنیزاسیون کل از سطح P_0 به سطح P_{10} کاهش معنی‌دار داشت ولی با افزایش سطح فسفر به P_{20} کاهش غیر معنی‌داری مشاهده شد. در تیمار RI ، با افزایش سطح فسفر از P_0 و P_{20}، درصد کلنیزاسیون ریشه به‌طور معنی‌دار کاهش یافت درحالی‌که در تیمار SI، با افزایش سطح فسفر از P_0 و P_{10} درصد کلنیزاسیون ریشه به‌طور معنی‌دار کاهش یافت ولی از P_{10} به P_{20} تغییر معنی‌دار نداشت، همین روند در تیمار تلقیح دوگانه قارچ نیز دیده شد اگرچه درصد کلنیزاسیون ریشه در تیمار (SI+RI) در همه سطوح فسفر به‌طورکلی بیش‌تر از تلقیح منفرد هر یک از قارچ‌ها بود.

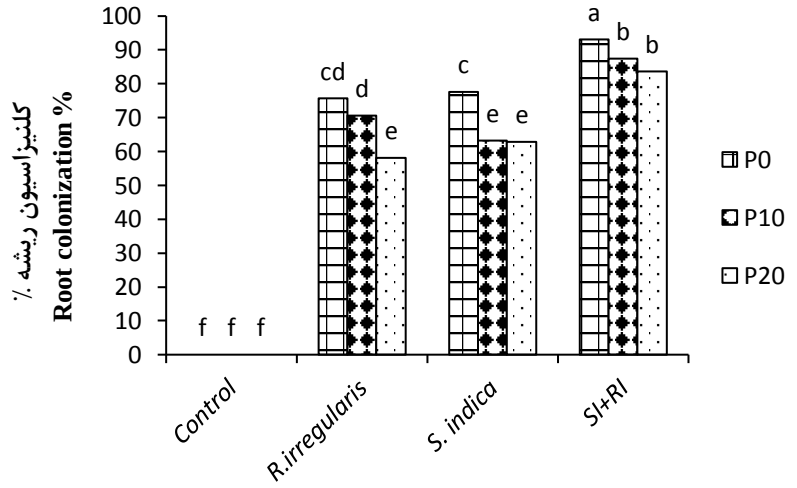
جدول ۳- جدول تجزیه واریانس اثر سطوح قارچ و فسفر بر درصد کلنیزاسیون ریشه و گلومالین خاک و گلومالین ریشه

Table 3- Variance analysis table of the effect of fungus and phosphorus levels on root colonization percentage and soil glomalin and root glomalin

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of squares		
		گلومالین ریشه Root glomalin	گلومالین خاک Soil glomalin	کلنیزاسیون ریشه% Root colonization%
قارچ Fungus	3	11010587.787**	685043.991**	13385.157**
فسفر Phosphorus	2	446608.056**	19590.19**	347.322**
قارچ×فسفر Fungus×Phosphorus	6	217667.739**	6408.726**	66.037**
خطا Error	24	21637.976	1357.816	10.454
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variation (%)		15.673	13.0562	5.76

** معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

** significant at the 1% level



شکل ۳- اثر برهم‌کنش قارچ و فسفر بر درصد کلنیزاسیون ریشه

P_0: بدون فسفر، P_{10}: ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان و P_{20}: ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

Figure 3- The effect of the interaction of fungus and phosphorus on the root colonization percentage.

P_0: no phosphorus, P_{10}: 10 mg/kg pot and P_{20}: 20 mg/kg pot. Means with at least one common letter have no significant difference by Duncan's multi-range test method at the 1% probability level.

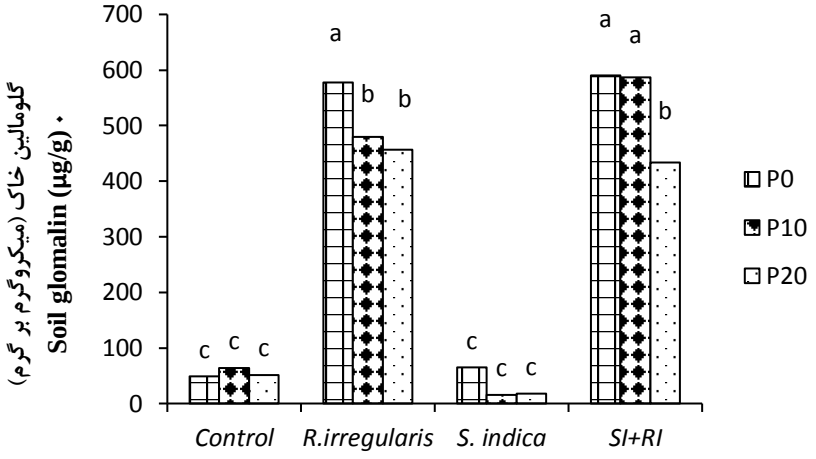
گلومالین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی در خاک و ریشه

با توجه به جدول تجزیه واریانس (جدول ۳) مشخص شد اثرات متقابل قارچ و فسفر بر گلومالین خاک و ریشه در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. با توجه به (شکل ۴) مشخص می‌شود در سطح صفر فسفر P_0، گلومالین خاک در تیمار (SI+RI) بیش‌تر از RI است ولی از نظر آماری معنی‌دار نبود. در سطح فسفر P_{10}، گلومالین خاک در حالت (SI+RI) بیش‌تر از RI است به‌طوری‌که در این سطح فسفر کاهش معنی‌دار گلومالین در RI مشاهده شد. در سطح فسفر P_{20}، مقدار گلومالین در حالت (SI+RI) به‌طور معنی‌دار کاهش یافت درحالی‌که در RI این کاهش معنی‌دار در سطح فسفر P_{10} مشاهده شد. به‌طور کلی مقدار گلومالین خاک در تیمارهای دارای RI زیاد بود و تیمارهای شاهد و SI دارای مقدار اندک گلومالین در خاک بودند. با توجه به (شکل ۵) در حالت (SI+RI) مقدار گلومالین ریشه‌ای، با افزایش سطح فسفر از P_0 به P_{10} به‌طور معنی‌دار کاهش نیافت اما با افزایش سطح فسفر به P_{20} به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. در تیمار RI با افزایش سطح فسفر از صفر به P_{10} در مقدار گلومالین ریشه‌ای کاهش معنی‌داری مشاهده نشد.

در همین تیمار با افزایش سطح فسفر به P_{20} کاهش معنی‌داری در گلومالین ریشه‌ای مشاهده شد. بیش‌ترین مقدار گلومالین ریشه‌ای در تیمار RI و P_0 مشاهده شد که ازنظر آماری اختلاف معنی‌داری با مقدار گلومالین در (SI+RI) و P_0 داشت.

رابطه خطی بین درصد کلنیزاسیون ریشه و مقدار گلومالین ریشه‌ای واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی

با توجه به داده‌های به‌دست‌آمده در اندازه‌گیری مقدار گلومالین ریشه در تیمارهای تلقیح انفرادی با قارچ اربوسکولار (جدول ۴)، رابطه خطی زیر بین درصد کلنیزاسیون و مقدار گلومالین ریشه به دست آمد (شکل ۶) (Malekzadeh *et al*., 2015).

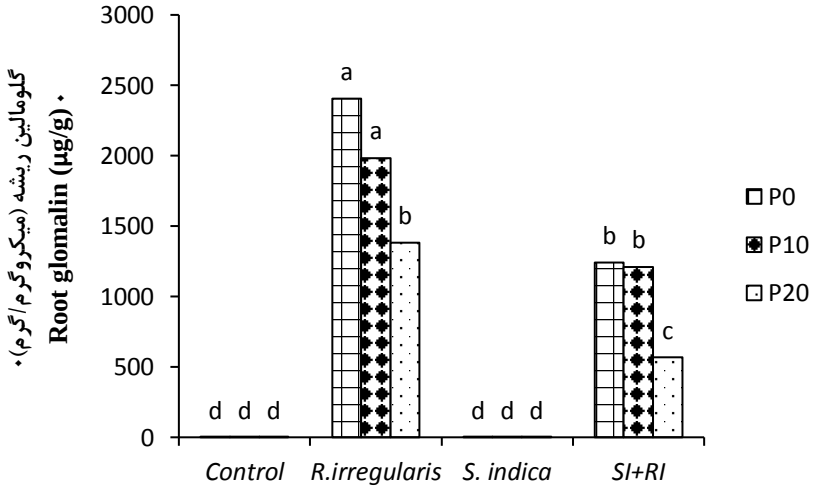


شکل ٤- اثر برهم‌کنش قارچ و فسفر بر گلومالین خاک

P_0: بدون فسفر، P_{10}: ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان و P_{20}: ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

Figure 4- The effect of the interaction of fungus and phosphorus on soil glomalin.

P_0: no phosphorus, P_{10}: 10 mg/kg pot and P_{20}: 20 mg/kg pot. Means with at least one common letter have no significant difference by Duncan's multi-range test method at the 1% probability level.



شکل ٥- اثر برهم‌کنش قارچ و فسفر بر گلومالین ریشه. P_0: بدون فسفر

P_{10}: ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان و P_{20}: ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

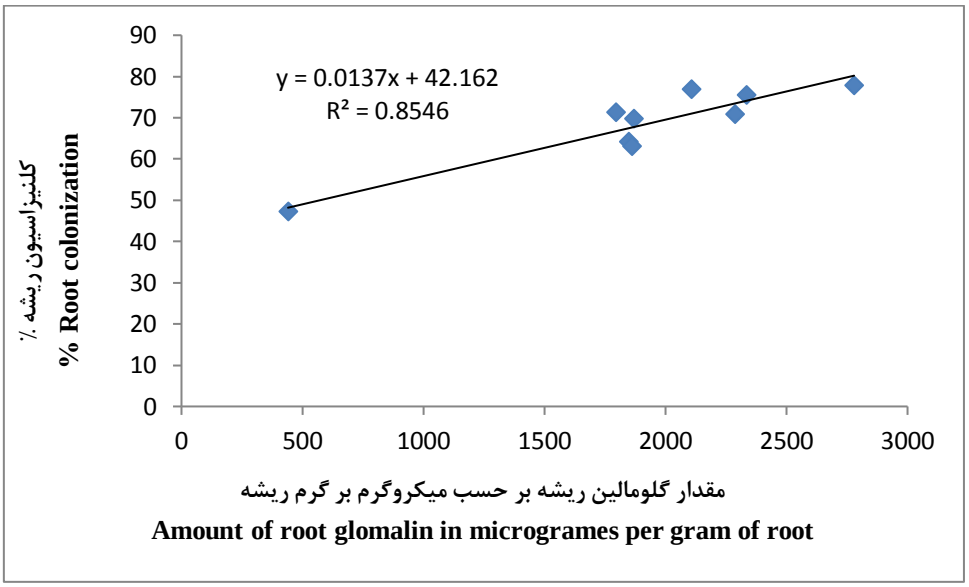
Figure 5- The effect of the interaction of fungus and phosphorus on root glomalin

P_0: no phosphorus, P_{10}: 10 mg/kg pot and P_{20}: 20 mg/kg pot. Means with at least one common letter have no significant difference by Duncan's multi-range test method at the 1% probability level.

جدول ٤- رابطه خطی بین مقدار گلومالین ریشه و درصد کلنیزاسیون ریشه

Table 4- Linear relationship between root glomalin amount and root colonization percentage

مقدار گلومالین ریشه واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی Amount of root glomalin reactive with antibody (µg/g)	کلنیزاسیون ریشه ٪ Root colonization %
2334.52	75.51
2106.36	76.86
2779.07	77.84
1795.77	71.26
1867.90	69.71
2287.42	70.84
1848.76	64.19
1860.54	63.14
440.06	47.18



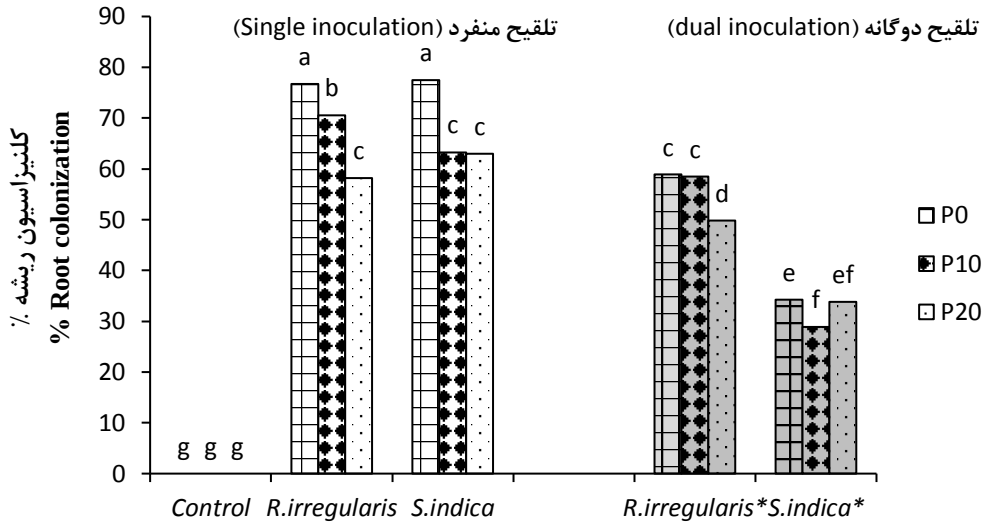
شکل ٦– رابطه خطی بین درصد کلنیزاسیون ریشه و گلومالین واکنش‌پذیر با آنتی‌بادی بر حسب میکروگرم بر گرم ریشه خشک

Figure 6- Linear relationship between root colonization percentage and antibody-reactive glomalin in micrograms per gram of dry root

همان‌گونه که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شد، در تیمارهای تلقیح دوگانه ، ابتدا درصد کلنیزاسیون ریشه از روی مقدار گلومالین محاسبه و با کسر آن از درصد کلنیزاسیون کل، درصد تقریبی کلنیزاسیون با قارچ اندوفیت تعیین گردید. روش مورد استفاده در این آزمایش برای برآورد کلنیزاسیون ریشه با قارچ اندوفیت در تلقیح دوگانه، بصورت ابتکاری بوده و برای صحت سنجی آن نیاز به آزمایش‌های بیشتر است.

درصد (تقریبی) کلنیزاسیون قارچ‌ها در حالت تلقیح دوگانه

با توجه به (شکل ۷) در حالت RI، با افزایش سطح فسفر درصد کلنیزاسیون به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. در حالت (SI+RI)، سهم درصد کلنیزاسیون قارچ *R. irregularis* با افزایش سطح فسفر از P_0 به P_{10} کاهش معنی‌داری مشاهده نشد؛ اما از سطح فسفر P_{10} به P_{20}، به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. در حالت SI با افزایش سطح فسفر از P_0 به P_{10} درصد کلنیزاسیون به‌طور معنی‌دار کاهش یافت ولی با افزایش سطح فسفر از P_{10} به P_{20} کاهش معنی‌داری در درصد کلنیزاسیون مشاهده نشد. در حالت (SI+RI)، سهم درصد کلنیزاسیون قارچ *S. indica* با افزایش سطح فسفر از P_0 به P_{10} به‌طور معنی‌دار کاهش یافت ولی با افزایش سطح فسفر از P_{10} به P_{20} درصد کلنیزاسیون به‌طور غیر معنی‌دار افزایش یافت (شکل ۷).



شکل ۷- اثر برهم‌کنش قارچ و فسفر بر درصد کلنیزاسیون در حالت تلقیح منفرد و سهم هریک از آن‌ها در تیمار تلقیح دوگانه از طریق برآورد (*)

P_0: بدون فسفر، P_{10}: ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان و P_{20}: ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

Figure 7- The effect of the interaction of fungus and phosphorus on the percentage of colonization in the single inoculation and the contribution of each of them in the dual inoculation treatment through estimation (*)

غلظت و محتوای فسفر بخش هوایی و ریشه

مطابق با (جدول ۵) اثرات متقابل سطوح فسفر و قارچ بر غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه (به ترتیب $p<۰/۰۰۱$ و $p<۰/۰۵$) و محتوای فسفر بخش هوایی و ریشه معنی‌دار بود ($p<۰/۰۱$). با توجه به (شکل ۸) در تیمار F_0، غلظت فسفر بخش هوایی با افزایش سطح فسفر از P_0 به P_{20} به‌طور معنی‌دار افزایش یافت درحالی‌که در تیمارهای تلقیح منفرد قارچ‌ها و تلقیح دوگانه آن‌ها، افزایش سطح فسفر تأثیر معنی‌داری بر غلظت فسفر بخش هوایی نداشت. در سطح P_0، غلظت فسفر بخش هوایی در تیمار RI به‌طور معنی‌دار بیش‌تر از تیمار F_0 بود. کم‌ترین غلظت فسفر بخش هوایی در تیمار F_0 و سطح فسفر P_0 مشاهده شد. با توجه به (شکل ۹) در سطح صفر فسفر، غلظت فسفر ریشه فقط در تیمار RI افزایش معنی‌دار نشان داد. در تیمارهای SI و (SI+RI)، غلظت فسفر ریشه فقط در سطح فسفر P_{20} نسبت به سطوح پایین‌تر فسفر، افزایش معنی‌دار نشان داد.

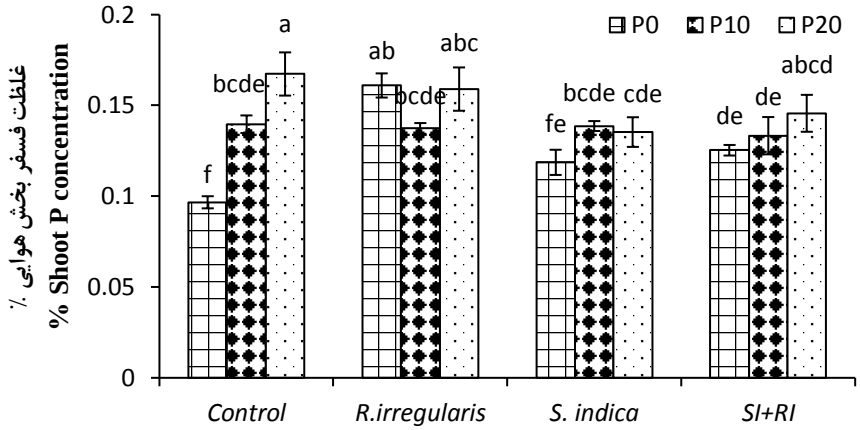
جدول ۵- تجزیه واریانس اثر سطوح قارچ و فسفر بر غلظت و محتوای فسفر بخش هوایی و ریشه

Table 5- Variance analysis of the effect of fungus and phosphorus levels on the concentration and phosphorus content of shoot and root

منابع تغییرات Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean of squares			
		محتوای فسفر ریشه Phosphorus content of roots	محتوای فسفر بخش هوایی Phosphorus content of Shoots	غلظت فسفر ریشه Root phosphorus concentration	غلظت فسفر بخش هوایی Shoot phosphorus concentration
قارچ Fungus	3	12.18***	5.66**	0.00037 ns	0.00084**
فسفر Phosphorus	2	1.50*	11.77***	0.0019***	0.0021***
قارچ×فسفر Fungus×Phosphorus	6	2.463**	6.56**	0.00040*	0.00095***
خطا Error	24	0.432	1.098	0.00014	0.00017
ضریب تغییرات (٪) Coefficient of variation (%)		14.007	11.13	12.22	9.65

*، ** و *** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۰/۰۵، ۰/۰۱ و ۰/۰۰۱ و ns غیرمعنی‌دار

*, **, and *** are respectively significant at the probability level of 0.05, 0.01, and 0.001, and non-significant ns

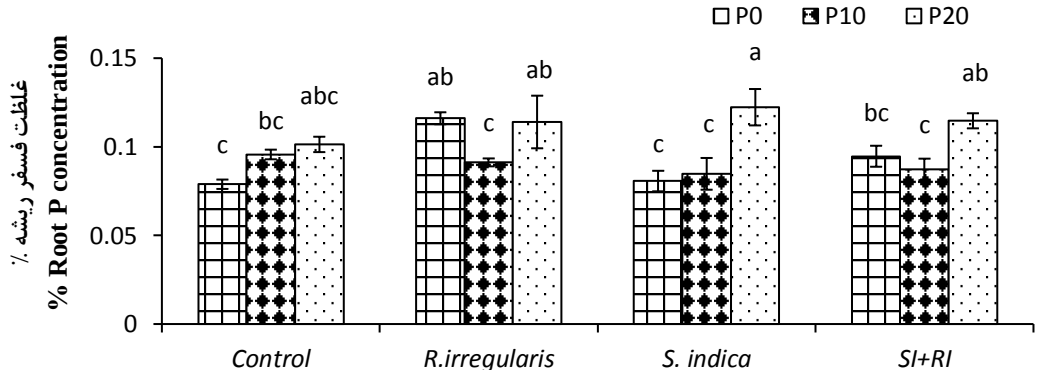


شکل ۸- اثر برهم‌کنش قارچ و فسفر بر غلظت فسفر بخش هوایی

P_0: بدون فسفر، P_{10}: ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان و P_{20}: ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

Figure 8- The effect of fungus and phosphorus interaction on the concentration of shoot phosphorus

P_0: no phosphorus, P_{10}: 10 mg/kg pot and P_{20}: 20 mg/kg pot. Means with at least one common letter have no significant difference by Duncan's multi-range test method at the 1% probability level.



شکل ۹- اثر برهم‌کنش قارچ و فسفر بر غلظت فسفر ریشه

P_0: بدون فسفر، P_{10}: ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان و P_{20}: ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

Figure 9- The effect of fungus and phosphorus interaction on the concentration of root phosphorus

P_0: no phosphorus, P_{10}: 10 mg/kg pot and P_{20}: 20 mg/kg pot. Means with at least one common letter have no significant difference by Duncan's multi-range test method at the 1% probability level.

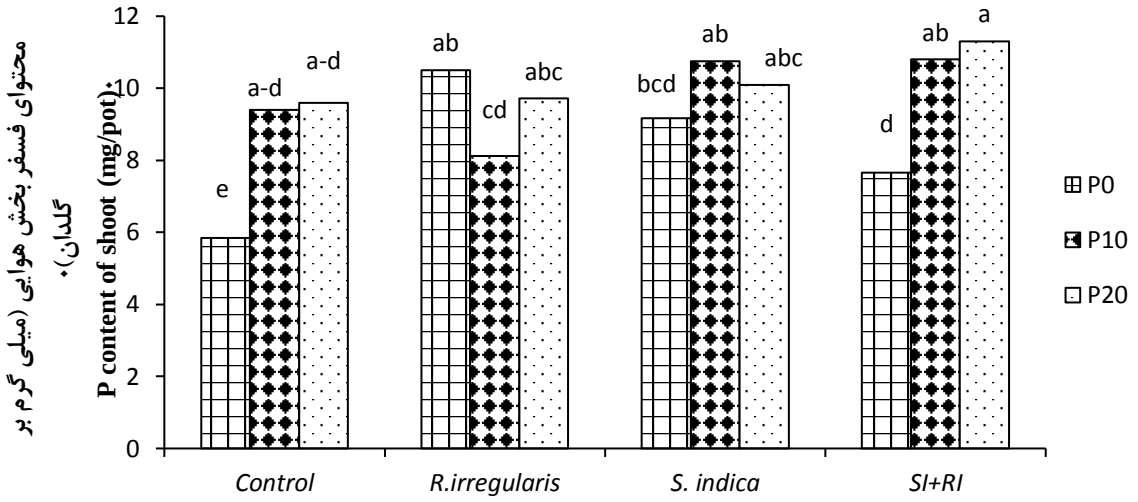
در تیمار F_0 و (SI+RI)، محتوای فسفر بخش هوایی با افزایش سطح فسفر از P_0 به P_{10} به‌طور معنی‌دار افزایش یافت درحالی‌که در تیمارهای تلقیح منفرد قارچ‌ها، افزایش سطح فسفر تأثیر معنی‌داری بر محتوای فسفر بخش هوایی نداشت. در P_0، محتوای فسفر بخش هوایی در تیمار RI به‌طور معنی‌دار بیش‌تر از تیمار F_0 بود (شکل ۱۰).

در P_0، محتوای فسفر ریشه فقط در RI افزایش معنی‌دار نشان داد. در تیمار SI، افزایش سطح فسفر تأثیر معنی‌داری بر محتوای فسفر ریشه نداشت. در تیمار (SI+RI)، محتوای فسفر ریشه فقط در سطح P_{20} نسبت به سطوح پایین‌تر فسفر، افزایش معنی‌دار نشان داد (شکل ۱۱).

بحث

وزن خشک اندام هوایی و ریشه

نتایج نشان داد زمانی که هر دو قارچ همزمان تلقیح شدند وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه افزایش یافت. بنابراین کلنیزاسیون همزمان هر دو قارچ‌های *R. irregularis* و *S. indica* اثر مثبتی بر وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه داشت. البته ذکر شود که وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه در گیاهان تلقیح شده انفرادی با قارچ *R. irregularis* و *S. indica* بیش‌تر از گیاهان شاهد بدون قارچ بود.

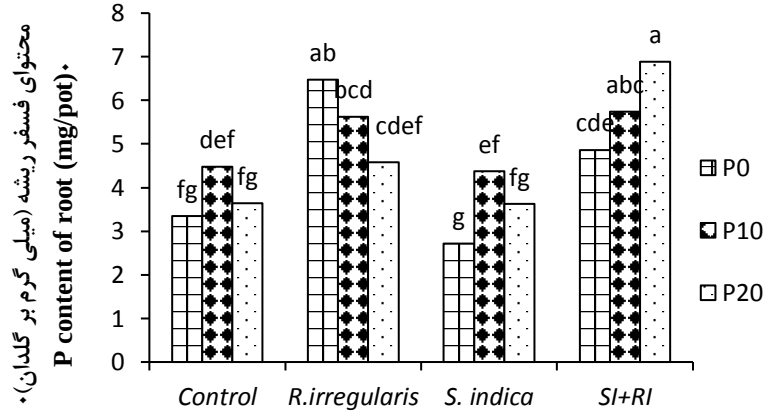


شکل ۱۰- اثر برهم‌کنش قارچ و فسفر بر محتوای فسفر بخش هوایی

P_0: بدون فسفر، P_{10}: ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان و P_{20}: ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

Figure 10- The effect of fungus and phosphorus interaction on the phosphorus content of shoot

P_0: no phosphorus, P_{10}: 10 mg/kg pot and P_{20}: 20 mg/kg pot. Means with at least one common letter have no significant difference by Duncan's multi-range test method at the 1% probability level.



شکل ۱۱- اثر برهم‌کنش قارچ و فسفر بر محتوای فسفر ریشه

P_0: بدون فسفر، P_{10}: ۱۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان و P_{20}: ۲۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم گلدان. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک فاقد اختلاف معنی‌دار به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد هستند.

Figure 11- The effect of fungus and phosphorus interaction on the phosphorus content of root

P_0: no phosphorus, P_{10}: 10 mg/kg pot and P_{20}: 20 mg/kg pot. Means with at least one common letter have no significant difference by Duncan's multi-range test method at the 1% probability level.

در تحقیق دیگر نیز گزارش کردند که وزن خشک اندام هوایی و ریشه در تلقیح دوگانه گیاه گوجه فرنگی با این قارچ‌ها در شرایط تنش شوری به‌طور معنی‌دار بیشتر از تلقیح انفرادی آنها بود (Heidarianpour *et al*., 2020).

همچنین گزارش شده است که وزن تر و خشک بیش‌تر گیاهان میکوریزی در مقایسه با گیاهان غیرمیکوریزی می‌تواند به دلیل انتشار میسلیوم‌های قارچ AMF و تشکیل یک سیستم جذب اضافی مکمل سیستم ریشه گیاه و تولید هورمون‌های رشد گیاه مانند اکسین و

سیتوکسین باشد و همین امر سبب بهبود تغذیه و تقویت رشد گیاهان میکوریزی می‌گردد. یکی از اصلی‌ترین کارکردهای قارچ AMF در نظام‌های کشاورزی افزایش دسترسی ریشه‌های گیاه به عناصر غذایی هست (Neumann and George, 2004; Jansa *et al*., 2011; Feddermann *et al*., 2010).

در مطالعات مختلف، تأثیر تلقیح قارچ *S. indica* را در افزایش زی‌توده گیاهان ذرت، تنباکو، جعفری، آرتمیزیا و درخت سپیدار موردبررسی قراردادند و نتایج آن‌ها حاکی از افزایش زیست‌توده قسمت های هوایی و ریشه گیاهان تلقیح شده با قارچ به میزان دو برابر نسبت به گیاهان شاهد تلقیح نشده بوده است (Verma *et al*., 1998). افزایش رشد و افزایش وزن خشک و تر بخش هوایی گیاه دارویی *Adhatoda vasica* در اثر تلقیح با قارچ *S. indica* را گزارش کردند (Rai and Varma, 2005; Rai *et al*., 2001). نشان دادند که قارچ *S. indica* وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی در گیاهان تلقیح شده را افزایش می‌دهد (Dolatabadi *et al*., 2010). تلقیح ریشه گیاه جو با قارچ *S. indica* سبب افزایش مقدار وزن خشک اندام هوایی و ریشه نسبت به شرایط بدون تلقیح گردید. مقایسه وزن خشک اندام هوایی و ریشه گیاهان تلقیح شده با قارچ *S. indica* نسبت به گیاه شاهد در شرایط بهینه ازنظر رطوبت خاک (ظرفیت مزرعه) به‌خوبی تأییدکننده اثر تحریک‌کنندگی رشد گیاه توسط قارچ است. به نظر می‌رسد که میسلیوم‌های قارچ با پراکنش در اطراف ریشه‌های گیاه میزبان سطح جذب آب بالاتری را فراهم آورده و باعث می‌شوند تا در شرایط یکسان گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد آب بیش‌تری را در اختیار داشته باشند (Ghabuli *et al*., 2011).

به‌طورکلی تلقیح با *R. irregularis* فقط در سطح بدون فسفر توانست ماده خشک بخش هوایی را نسبت به شاهد بدون قارچ افزایش دهد و در سطوح بالاتر، تلقیح این قارچ نه‌تنها اثر مثبت نداشت بلکه سبب کاهش معنی‌دار نیز شد. در تلقیح با *S. indica* بیش‌ترین ماده خشک بخش هوایی در سطح P_{10} حاصل شد که احتمالاً به دلیل تأثیرپذیری کم‌تر این قارچ از فسفر قابل‌جذب است، گرچه سطوح بالاتر فسفر P_{20} سبب کاهش رشد بخش هوایی شده است.

افزایش فسفر قابل‌جذب در بستر کشت با محدود کردن فعالیت قارچ همزیست، سبب کاهش رشد گیاه نیز می‌شود. اثر مثبت قارچ‌های میکوریزی در رشد گیاه، عموماً در خاک‌هایی دیده می‌شود که غلظت عناصر غذایی نظیر فسفر در فاز محلول کم‌تر باشد (Aliasgharzad, 1997). اثر بازدارندگی فسفر قاعدتا در غلظت‌های بالای فسفر اتفاق می‌افتد گرچه آستانه غلظت فسفر نیز تابع شرایط دیگر ازجمله گونه گیاهی است. در آزمایش حاضر، در سطح P_{10}، گرچه وزن خشک شاخصاره در تلقیح انفرادی قارچ میکوریز کاهش یافته ولی در تلقیح دوگانه، حتی در سطح P_{20}، بیشترین وزن خشک شاخصاره دیده می‌شود (شکل ۱). علاوه بر این، وزن خشک ریشه در سطوح P_{10} و P_{20}، در تلقیح انفرادی قارچ میکوریز و تلقیح دوگانه نه تنها نسبت به شاهد بدون فسفر، کاهش نداشت بلکه افزایش قابل ملاحظه نیز نشان داد و این در حالی است که درصد کلنیزاسیون ریشه در سطوح P_{10} و P_{20} کاهش معنی‌دار داشت (شکل ۳). بهره‌مندی گیاه از همزیستی میکوریزی علاوه بر مقدار فسفر قابل جذب خاک، به گونه گیاهی و مورفولوژی ریشه آن نیز بستگی دارد. گیاهان با ریشه افشان نظیر گرامینه‌ها، معمولا وابستگی میکوریزی کمتری دارند ولی در بین آنها نیز تفاوت‌هایی دیده می‌شود. مثلا در مقایسه سه گیاه گرامینه ذرت، جو و گندم، بیشترین درصد کلنیزاسیون میکوریزی در شرایط یکسان، مربوط به ذرت بوده و کم‌ترین آن در گندم مشاهده می‌گردد. مشاهدات مزرعه ای و گلدانی حاکی از آن است که کلنیزاسیون گیاه جو غالبا از گندم بیشتر می‌باشد (Aliasgharzad *et al*., 2001). در برخی تحقیقات نشان داده شده که با افزایش فسفر قابل جذب خاک، میزان همزیستی و عملکرد قارچ همزیست کاهش می یابد و با توجه به اینکه قارچ همزیست فقط نقش تامین فسفر نداشته بلکه سایر اثرات مثبت نیز در گیاه دارد لذا با کاهش همزیستی مسلما این اثرات نیز از بین رفته و در مقام مقایسه با گیاهان میکوریزی با فسفر قابل جذب متعادل، رشد و توسعه گیاه بهبود می‌یابد رتنایاک و همکاران (Ratnayake *et al*., 1978) گزارش کردند در زیادی فسفر، متابولیت‌های موردنیاز برای ایجاد کلنیزاسیون قارچی به مقدار کافی از ریشه ترشح نمی‌شوند. در کمبود فسفر، افزایش نفوذپذیری غشا منجر به ترشح متابولیت‌ها در مقدار کافی برای تقویت رشد اولیه و افزایش تندش اسپورهای قارچ میکوریز می‌شود. کلنیزاسیون ریشه‌ها منجر به بهبود جذب فسفر شده و به دنبال ان، ترشحات ریشه‌ای کاهش می‌یابد.

درصد کلنیزاسیون ریشه

با افزایش سطح فسفر درصد کلنیزاسیون کاهش یافت و بیش‌ترین درصد کلنیزاسیون در سطح فسفر صفر P_0 مشاهده شد. با افزایش سطح فسفر به P_{10} و P_{20} درصد کلنیزاسیون به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. درصد کلنیزاسیون ریشه میزان موفقیت همزیستی بین قارچ میکوریز و شبه میکوریز و گیاه میزبان را نشان می‌دهد. بنابراین بین فسفر اضافه‌شده به خاک و درصد کلنیزاسیون ریشه رابطه منفی وجود دارد. البته ذکر این نکته ضروری است که رشد و توسعه قارچ میکوریزی در بستر ریشه زنده صورت می‌گیرد و برای رشد و نمو ریشه، وجود فسفر قابل جذب در مراحل اولیه ضرورت دارد و این مقدار نه تنها سبب محدودیت کلنیزاسیون نمی‌شود بلکه در استقرار اولیه قارچ نیز مفید واقع می‌گردد. هم‌چنین در بسیاری از تحقیقات نشان داده شده است که با افزایش فسفر قابل جذب در خاک، از یک حدی به بالا، اثر بازدارندگی بر قارچ نمایان می‌گردد ولی این حد بستگی به نوع گیاه دارد و در گیاهان پرتوقع نسبت به فسفر، این اثر بازدارندگی ممکن است در

غلظت‌های بالاتر فسفر قابل جذب اتفاق بیفتد. در این ارتباط، اختصاص کربن از گیاه به قارچ تابع مقدار فسفر تحویلی به گیاه از طرف قارچ است (Olsson *et al*., 2010).

تلقیح دوگانه دو قارچ منجر به افزایش معنی‌دار درصد کلنیزاسیون کل ریشه شد. این امر به حضور دوگانه قارچ‌ها در ریشه برمی‌گردد زیرا وقتی دو قارچ در ریشه حضور دارند حجم بیش‌تری از ریشه توسط قارچ‌ها اشغال می‌شود و درصد کلنیزاسیون ریشه بالا می‌رود. گرچه درصد کلنیزاسیون کل در حالت تلقیح دوگانه بیش‌تر است ولی سهم هر قارچ در این حالت، در مقایسه با تلقیح انفرادی آنها کمتر است و چنین حالتی نیز قابل تفسیر است چون محصولات فتوسنتزی گیاه بین دو قارچ تقسیم می‌شود و سهم هر یک از آنها کاهش می‌یابد و نتیجه ان در میزان کلنیزاسیون آنها منعکس می‌گردد.

گزارش‌های دیگری نیز وجود دارند که نشان میدهد، که حضور گونه‌های قارچ *Serendipita*، کلنیزاسیون ریشه توسط قارچ میکوریز آربوسکولار را تحت تاثیر قرار نمی‌دهند (Hallasgo *et al*., 2020).

مطابق با (شکل ۳) در تیمار تلقیح دوگانه، درصد کلنیزاسیون در تمامی سطوح فسفر به‌طور معنی‌دار بیش‌تر از سایر تیمارها بود و با افزایش سطح فسفر درصد کلنیزاسیون کل به نسبت تیمارهای منفرد کم‌تر کاهش یافت. به عبارت دیگر در تلقیح دوگانه اثر کاهشی فسفر بر درصد کلنیزاسیون کل، کم‌تر می‌شود. مطابق با (شکل ۷) در تلقیح دوگانه، اثر فسفر بر سهم کلنیزاسیون قارچ *R. irregularis* نسبت به تلقیح منفرد آن کم‌تر می‌شود به‌طوری‌که فقط در سطوح بالاتر فسفر P_{20} به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. به نظر می‌رسد که در داخل ریشه حضور قارچ *S. indica* سبب کاهش اثر منفی فسفر بر درصد کلنیزاسیون قارچ *R. irregularis* می‌شود . در این حالت در سطوح بالاتر فسفر که سهم درصد کلنیزاسیون قارچ *R. irregularis* به‌طور معنی‌دار کاهش یافت، سهم درصد کلنیزاسیون قارچ *S. indica* به‌طور غیر معنی‌دار افزایش یافت به عبارتی احتمالاً بین دو قارچ رابطه آنتاگونیستی وجود دارد. همان‌طور که در (شکل ۷) مشاهده می‌شود در تیمار تلقیح دوگانه (SI+RI)، سهم درصد کلنیزاسیون هر یک از قارچ‌ها، کم‌تر از تلقیح منفرد آن‌ها می‌باشد و این کاهش در قارچ *S. indica* بیش‌تر از قارچ *R. irregularis* و غالبیت با قارچ *R. irregularis* بود.

مقدار گلومالین خاک و ریشه

گلومالین خاک در تلقیح دوگانه (SI+RI)، کم‌تر تحت تأثیر *S. indica* قرار گرفت ولی در ریشه کاهش یافت. به نظر می‌رسد که در داخل ریشه، حضور *S. indica* سبب کاهش زیست توده قارچ *R. irregularis* می‌شود. ازآنجایی‌که گلومالین بعنوان مولکول نشانگر برای زیست توده قارچ AM در ریشه و خاک است لذا حضور *S. indica* در ریشه باعث کاهش جمعیت قارچ *R. irregularis* نسبت به حالت تلقیح منفرد آن می‌شود. در حالت تلقیح منفرد RI مقدار گلومالین ریشه‌ای به‌طور معنی‌دار بیش‌تر از تلقیح دوگانه (SI+RI) بود. این نشان می‌دهد در تلقیح دوگانه، همزیستی قارچ *R. irregularis* نسبت به حالت منفرد آن کاهش‌یافته است. در تلقیح دوگانه (SI+RI) مقدار گلومالین (فعالیت قارچ *R. irregularis*) به‌طور معنی‌دار کاهش یافت. درنتیجه، در تلقیح دوگانه حضور قارچ *S. indica* بر همزیستی قارچ *R. irregularis* تأثیر داشته است و همزیستی AMF را کاهش داده است.

با افزایش سطح فسفر مقدار گلومالین ریشه‌ای کاهش یافت؛ می‌توان نتیجه گرفت که با کاهش فعالیت قارچ در اثر افزودن فسفر به خاک تولید گلومالین کاهش می‌یابد. یک همبستگی منفی بین فسفر اضافه‌شده به خاک و تشکیل همزیستی میکوریزی گزارش شده است (Sanders and Tinker, 1973).

غلظت و محتوای فسفر بخش هوایی و ریشه

در مطالعه حاضر، غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه تحت تأثیر کاربرد فسفر، قارچ میکوریز و شبه میکوریز قرار گرفت. با افزایش سطح فسفر مقدار فسفر بخش هوایی و ریشه افزایش یافت. این‌که کم‌ترین درصد فسفر ریشه در سطح P_{10} حاصل‌شده است (حتی کم‌تر از تیمار P_0 است) می‌تواند به دلیل اثر رقت[1] باشد؛ بدین منظور محتوای فسفر در بخش هوایی و ریشه محاسبه شد.

بیش‌ترین مقدار فسفر بخش هوایی در تلقیح منفرد *R. irregularis* مشاهده شد؛ در تلقیح منفرد با قارچ *S. indica* و تلقیح دوگانه اختلاف معنی‌داری با شاهد بدون قارچ نداشت. این اتفاق نیز می‌تواند به دلیل اثر رقت باشد، وقتی در اثر تیماری (قارچ یا فسفر) وزن گیاه زیاد می‌شود ماده خشک هم زیاد شده و درنتیجه غلظت فسفر در ماده خشک کاهش می‌یابد. نتایج محتوای فسفر بخش هوایی در تلقیح دوگانه این گفته را به اثبات رساند. محتوای فسفر بخش هوایی در تلقیح دوگانه و تلقیح منفرد قارچ *S. indica* و *R. irregularis* در یک سطح آماری و دارای اختلاف معنی‌داری با شاهد بودند. اثرات قارچ بر غلظت فسفر ریشه معنی‌دار نشد ولی بر محنوای فسفر ریشه معنی‌دار بود. محتوای فسفر ریشه در تلقیح دوگانه و تلقیح منفرد *R. irregularis* به‌طور معنی‌دار بیش‌تر از شاهد بود و در تلقیح منفرد *S. indica* با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. به نظر می‌رسد قارچ *R. irregularis* نقش بیش‌تری در مقدار فسفر جذب‌شده توسط ریشه دارد.

تلقیح منفرد *R. irregularis* در سطح صفر فسفر اثر مثبتی روی فسفر بخش هوایی و ریشه داشت. به عبارتی قارچ *R. irregularis* در سطوح پایین فسفر موجب افزایش غلظت فسفر گیاه می‌شود. در

1- Dilution effect

تیمارهای تلقیح منفرد و تلقیح دوگانه قارچ‌ها افزایش سطح فسفر تأثیر معنی‌داری بر غلظت فسفر بخش هوایی نداشت زیرا با افزایش مقدار فسفر قابل‌جذب در بستر کشت فعالیت قارچ همزیست محدود می‌شود.

نتیجه‌گیری

هدف اصلی تحقیق حاضر، بررسی تغییرات کلنیزاسیون ریشه جو با قارچ‌های *R. irregularis* و *S. indica* در تلقیح انفرادی و دوگانه و در سطوح مختلف فسفر از طریق اندازه‌گیری گلومالین به عنوان مولکول نشان برای AMF بود. اثر منفی فسفر بر کلنیزاسیون قارچ آربوسکولار و هم‌چنین مقدار گلومالین (به عنوان شاخصی از زیست توده قارچ آربوسکولار) مشاهده شد که بیش‌ترین درصد کلنیزاسیون ریشه و مقدار گلومالین در سطح صفر فسفر بود و در سطوح بالاتر فسفر درصد کلنیزاسیون و مقدار گلومالین کاهش یافتند. به‌عبارت دیگر، افزایش غلظت فسفر قابل‌جذب خاک، گسترش همزیستی قارچ‌های *R. irregulris* و *S. indica* را محدود کرد و این محدودیت برای قارچ *R. irregulris* بیش‌تر بود. حضور همزمان هر دو قارچ در ریشه سبب برهم‌کنش منفی بین آن‌ها شد. به‌طوری‌که در تلقیح دوگانه، سهم درصد کلنیزاسیون هریک ازقارچ‌ها نسبت به حالت تلقیح انفرادی آن‌ها کاهش یافت اما درصد کلنیزاسیون کل به‌طور معنی‌دار افزایش یافت. به‌طور کلی وضعیت رشد و جذب عناصر غذایی در حالت تلقیح دوگانه بهتر از تلقیح هریک از آن‌ها به صورت منفرد بود. در این تحقیق با اندازه‌گیری گلومالین به‌عنوان مولکول نشانگر قارچ *R. irregularis* توانستیم درصد کلنیزاسیون هریک از قارچ‌ها را در حالت تلقیح دوگانه برآورد نماییم ولی برای صحت‌سنجی روش، نیاز به آزمایش‌های بیشتری است.

منابع

1. Achatz, B., Von Ruden, S., Andrade, D., Neumann, E., Pons-Kuhnemann, J., Franken, P., Kogel, K.H., & Waller, F. (2010). Root colonization by *Piriformospora indica* enhances grain yield in barley under diverse nutrient regimes by accelerating early plant development. *Plant and Soil*, *333*, 59-70. http://doi.org/10.1007/s11104-010-0319-0
2. Aliasgharzad, N. (1997). *Soil Microbiology and Biochemistry (translation)*, First edition, Tabriz University Publications.
3. Aliasgharzad, N., Rastin, SN., Towfighi, H., & Alizadeh, A. (2001). Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soils of Tabriz Plain of Iran in relation to some physical and chemical properties of soil. *Mycorrhiza*, *11*, 119-122. http://doi.org/10.1007/s005720100113
4. Cottenie, A. (1980). *Soil and Plant Testing*. FAO soils Bullention, 38/2: 94-100.
5. Deshmukh, S., & Kogel, K. (2007). *Piriformospora indica* protects barley from root disease caused by *Fusarium*. *Journal of Plant Disease and Protection*, *114*(6), 236-268. http://doi.org/10.1007/BF03356227
6. Dolatabadi, H.K., Mohammadi Goltape, A., Moeini, A., & Verma, A. (2012). Evaluation of different investigations of auxin and fungus *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* on peppermint (*Mentha piperita*) and thyme (*Thymus vulgaris*) in vitro. *Quarterly Journal of Medicinal Plants*, *2*(9), 13-22. (In Persian)
7. Feddermann, N., Finaly, R., Boller, T., & Elfstrand, M. (2010). Functional diversity in arbuscular mycorrhiza-the role of gene expression, phosphorus nutrition and symbiotic efficiency. *Fungal Ecology*, *3*, 1-8. http://doi.org/10.1016/j.funeco.2009.07.003
8. Ghabuli, M., Shahriari, F., Sepehari, M., Marashi, H., & Hosseini Salekdeh, A. (2011). The effect of the endophytic fungus *Piriformospora indica* on some characteristics of barley *Hordeum vulgare* L. under drought stress conditions, *Journal of Agroecology*, *3*(3), 328-336. (In Persian)
9. Gholami, A., & Kochaki, A. (2010). *Mycorrhiza in Sustainable Agriculture* (translation), Shahrood University Publications.
10. Hallasgo, A.M., Spangl, B., Steinkellner, S., & Hage-Ahmad, K. (2020). The fungal endophyte *Serendipita williamsii* does not affect Phosphorus status but carbon and nitrogen dynamics in Arbuscular Mycorrhizal tomato plants. *Journal of Fungi*, *6*(4), 233. http://doi.org/10.3390/jof6040233
11. Heidarianpour, MB., Aliasgharzad, N., & Olsson, PA. (2020). Positive effects of co-inoculation with *Rhizophagus irregularis* and *Serendipita indica* on tomato growth under saline conditions, and their individual colonization estimated by signature lipids. *Mycorrhiza*, *30*(4), 455-466. http://doi.org/10.1007/s00572-020-00962-y
12. Jansa, J., Finlay, R., Wallander, H., Smith, F.A., & Smith, S.E. (2011). *Role of mycorrhizal symbioses in phosphorus cycling*. p.137-168. In :Phosphorus in action, vol 6. Springer, Berlin, Heidelberg.
13. Junker, A., Muraya, M.M., Weigelt-Fischer, K., Arana-Ceballos, F., Klukas, Ch., Melchinger, A.E., Meyer, Rh.C., Riewe, D., & Altmann, Th. (2015). Optimizing experimental procedures for quantitative evaluation of crop plant performance in high throughput phenotyping systems. *Plant Science*, *5*, 770. http://doi.org/ 10.3389/fpls.2014.00770
14. Koide, R.T., & Kabir, Z. (2000). Extraradical hyphae of the mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* can hydrolyse organic phosphate. *New Phytologists*, *148*(3), 511-517. http://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00776.x
15. Kormanic, P.P., & Graw, M.C. (1982). *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. Quantification of VA mycorrhizae in plant roots. p. 37-45. In: Schenck NC (Ed). Saint Paul Minnesota American, Phytopathological

Society.
16. Kumari, R., Kishan, H., Bhoon, YK., & Varma, A. (2003). Colonization of cruciferous plants by *Piriformospora indica*. *Current Science, 85*, 1672-1674.
17. Malekzadeh, E., Majidi, J., Aliasgharzad, N., & Abdolalizadeh, J. (2016). The effect of lead on the glomalin content of hypha and root reactive with monoclonal antibody and Bradford in both in vitro and pot culture conditions. *Journal of Water and Soil, 30*(2), 605-618. (In Persian with English abstract). http://doi.org/10.22067/JSW.V30I2.47802
18. Najafi, N., Mostafaei, M., Dabagh Mohammadi Nasab, A., & Ostan, S. (2013). Effect of intercropping and farmyard manure on the growth, yield and protein concentration of corn, bean and bitter Vetch, *Science of Agriculture and Sustainable Production, 23*(1), 115-99. (In Persian with English abstract)
19. Neumann, E., & George, E. (2004). Colonization with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* (Nicol & Gred) enhanced phosphorus uptake from dry soil in *Sorghum bicolor* (L.). *Plant and Soil, 261*, 245-255. http://doi.org/10.1023/B:PLSO.0000035573.94425.60
20. Nichols, K.A. (2003). *Characterization of glomalin, a glycoprotein produced by arbuscular mycorrhizal fungi*. Ph.D Dissertation. p.285.University of Maryland, College Park, Mryland.
21. Nichols, K.A., & Wright, S.F. (2004). *Contribution of fungi to soil organic matter in agroecosystems*. p. 179-198. In: F Magdoff and RP Weil (eds). Soil Organic Matter in Sustainable Agriculture. CRC Press, Florida.
22. Norrif, IR., Read, D.J., & Varma, A.K. (1992). *Methods in Microbiology Techniques for Study of Mycorrhiza*. Academic press, London.
23. Olsson, PA., Rahm, J., & Aliasgharzad, N. (2010). Carbon dynamics in mycorrhizal symbioses is linked to carbon costs and phosphorus benefits. *FEMS Microbiology Ecology, 72*(1), 125–131. http://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00833.x
24. Rai, M., Acharya, D., Singh, A., & Varma, A. (2001). Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. *Mycorrhiza, 11*(3), 123–128. http://doi.org/10.1007/s005720100115
25. Rai, M., & Varma, A. (2005). Arbuscular mycorrhiza-like biotechnological potential of *Piriformosporaindica*, which promotes the growth of *Adhatodavasica*. *Journal of Biotechnology, 8*, 107-111.
26. Ratnayake, M., Leonard, R.T., & Menge, J.A. (1978). Root exudation in relation to supply of phosphorus and its possible relevance to mycorrhizal formation. *New Phytologist, 81*, 543-552.
27. Richardson, A.E., Barea, J.M., McNeil, A.M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrotrogen in rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil, 321*, 305-339. http://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2
28. Rillig, M.C. (2004). Arbuscular mycorrhizal and terrestrial ecosystem processes. *Ecology Letters, 7*(8), 740-754. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00620.x
29. Rillig, MC., & Mummey, DL. (2006). Mycorrhizas and soil structure. *New Phytologist, 171*(1), 41-53. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01750.x
30. Rosier, C.L., Hoye, A.T., & Rillig, M.C. (2006). Glomalin –related soil protein: assessment of current detection and quantification tools. *Soil Biology and Biochemistry, 38*(8), 2205-2211. http://doi.org/10.1016/j.soilbio.2006.01.021
31. Sanders, F.E., & Tinker, P.B.H. (1973). Phosphate flow into mycorrhizal roots. *Pesticide Science, 4*, 385-395.
32. Schenck, N.C., & Perez, Y. (1988). *Mannual for the Identification of VA Mycorrhizal Fungi*. p. 241. IN:Vesicule Arbuscular Mycorrhizal, 1453 Fifield Hall, University of Florida, Gainesville, Florida, USA.
33. Turner, B.L., Lambers, H., Condron, L.M., Carmer, M.D., Leake, J.R., Richardson, A.E., & Smith, S.E. (2013). Soil microbial biomass anh the fate of phosphorus during long-term ecosystem development. *Plant and Soil, 367*, 225-234. http://doi.org/ 10.1007/s11104-012-1493-z
34. Verma, S., Varma, A., Rexer, KH., Hassel, A., Kost, G., Sarabhoy, A., Bisen, P., Butehorn, B., & Franken, P. (1998). *Piriformospora indica*, gen. et sp. Nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia, 90*(5), 896-903. http://doi.org/10.1080/00275514.1998.12026983
35. Vlot, AC., Dempsey, DA., & Klessig, DF. (2009). Salicylic acid a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology, 47*, 177-206. http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202
36. Waller, F., Achatz, B., Blatruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., Wettstein, D., Franken, P., & Kogel, KH.(2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceeding of the National Academy of Sciences, 102*(38), 13386-13391. http://doi.org/10.1073/pnas.0504423102
37. Westerm, L.Z. (1990). *Soil Testing and Plant Analysis*. Soil Science Society of America Journal, Inc. Madison, Wisconsin USA.
38. Williams, S.C.K., Vestberg, M., & Uosukainen, M. (1992). Effects of fertilizers and arbuscular mycorrhizal fungi on the post-vitro growth of micropropageted strawberry. *Agronomie, 12*(10), 851-857. http://doi.org/10.1051/agro:19921020
39. Wright, S.F., Franke-Synder, M., Morton, J.B., & Upadhyaya, A. (1996). Time-course study and partial

characterization of a protein on hyphae of arbuscular mycorrhizal fungi during active colonization of roots. *Plant and Soil*, *181*(2), 193-203. https://doi.org/10.1007/BF00012053

40. Wright, S.F., & Upadhyaya, A. (1999). Quantification of arbuscular mycorrhizal fungi activity by the glomalin concentration on hyphal traps. *Mycorrhiza*, *8*, 283–285 . https://doi.org/10.1007/s005720050247
41. Zhu, Y.G., & Miller, R.M. (2003). Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil-plant system. *Trends in Plant Science*, *8*, 407-409. https://doi.org/10.1016/s1360-1385(03)00184-5