نشریه علمی پژوهشی دانش کشاورزی و تولید پایدار
جلد ۳۲ شماره ۱/ سال ۱۴۰۱ صفحات ۱۴۸-۱۳۳

Feasibility of Commercial Grade Production of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Inoculum under Greenhouse Conditions

Nasser AliAsgharzad[1*], Hajar Mahmoudi[2], Ali lotfollahi[3], Bahman Khoshru[4]

Received: October 16, 2020 Accepted: May 31, 2021
1-Prof., Soil Biology and Biotechnology, University of Tabriz, Iran.
2-Graduate Master of Soil Biology and Biotechnology, Dept. of Soil Science, Faculty Agriculture University of Tabriz, Iran.
3-Expert of Soil Biology and Biotechnology, laboratory, Faculty Agriculture University of Tabriz, Iran.
4-PhD Student of Soil Biology and Biotechnology Laboratory, Dept. of Soil Science Faculty Agriculture University of Tabriz, Iran.
*Corresponding Author E-mail: N-aliasghar@tabrizu.ac.ir

Abstract

Background and Objectives: Due to the impossibility of producing arbuscular mycorrhizal fungi as biofertilizer in laboratory conditions and some disadvantages of soil inoculant, in this study, the pot production of this inoculant with non-soil substrates was evaluated.

Materials and Methods: In this experiment, seven species of mycorrhizal fungi were propagated in two types of pot substrates in the presence of corn plant in greenhouse conditions with a growth period of four months. Fungal species were *Rhizophagus intraradices*, *Glomus versiforme*, *Rhizophagus irregularis*, *Scutellospora calospora*, *Claroideoglomus etunicatum* and *Funneliformis mosseae*. Two types of pot substrates including A substrate: (cocopeat, vermiculite with a volume ratio of 1:1 and Humic acid with a concentration of 250 $mg.L^{-1}$) and B substrate: cocopeat, vermiculite and compost (With a volume ratio of 1: 1: 0.4) were used for plant culture.

Results: the percentage of root colonization had no significant difference between the substrates type, but the simple effects of the fungi ($P < 0.01$) and the interactions of the fungi × substrate ($P < 0.05$) were significant. In A substrate, *Rhizophagus irregularis* (72.87%) and in B substrate *Rhizophagus irregularis*-Sweden (67.12%) and *Glomus versiforme*-Tabriz (67.85%) showed the highest percentage of root colonization. The fungi *Rhizophagus irregularis* and *Glomus versiforme* were tested for inoculum potential by MPN method and the number of their propagules were 30 and 22.5 in 50 ml of substrate, respectively.

Conclusion: Based on the test results, the use of organic compost is recommended compared to humic acid in terms of economics and easy accessibility.

Keywords: Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Colonization Percentage, Inoculum, Propagule, Substrate

امکان سنجی تولید زادمایه قارچ میکوریز آربوسکولار با درجه تجاری در شرایط گلخانه‌ای

ناصر علی اصغرزاد[۱*]، هاجر محمودی[۲]، علی لطف‌اللهی[۳]، بهمن خوشرو[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۷/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۱۰

۱-استاد، هیئت علمی بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲-دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳-کارشناس آزمایشگاه بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۴-دانشجوی دکتری بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
*مسئول مکاتبه: E-mail: N-aliasghar@tabrizu.ac.ir

چکیده

اهداف: به دلیل عدم امکان تولید زادمایه قارچ میکوریز آربوسکولار به عنوان کود زیستی در آزمایشگاه و برخی معایب زادمایه خاکی، در این پژوهش تولید گلدانی این زادمایه با بسترهای غیر خاکی ارزیابی گردید.

مواد و روش ها: در این آزمایش هفت گونه قارچ میکوریز در دو نوع بستر کشت در حضور گیاه ذرت در گلخانه با دوره رشد چهار ماه تکثیر شدند. گونه‌های قارچی شامل *Rhizophagus intraradices* TA، *Glomus versiforme*، *Rhizophagus irregularis*، *Scutellospora calospora*، *Claroideoglomus etunicatum*، *Funneliformis mosseae*، *Rhizophagus intraradices* AD و بسترهای کشت شامل الف: (کوکوپیت:ورمیکولایت با نسبت حجمی ۱:۱ و اسید هیومیک با غلظت $250\ mg.kg^{-1}$) و ب: (کوکوپیت:ورمیکولایت: کمپوست، با نسبت حجمی ۰/۴:۱:۱) بود که به صورت فاکتوریل بر پایه طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد بین بسترها تفاوت معنی‌داری وجود ندارد ولی اثرات ساده قارچ ($P<0.01$) و اثرات متقابل قارچ × بستر ($P<0.05$) معنی‌دار بود. در بستر الف، قارچ *Rhizophagus irregularis* (۷۲/۸۷٪) و در بستر ب، قارچهای *Rhizophagus irregularis* (۶۷/۱۲٪) و *Glomus versiforme* (۶۷/۷۵٪) بالاترین درصد کلنیزاسیون را نشان دادند. در زاد مایه های مربوط به گونه های *Rhizophagus irregularis* و *Glomus versiforme* که درصد کلنیزاسیون بالاتری نسبت به سایر گونه ها در هر دو بستر داشتند، پتانسیل زاد مایه با روش MPN تعیین گردید که تعداد پروپاگول‌های آنها به ترتیب ۳۰ و ۲۲/۵ در ۵۰ میلی‌لیتر بستر شمارش شد.

نتیجه گیری: با استناد به نتایج آزمایش استفاده از ماده آلی کمپوست درمقایسه با اسید هیومیک به لحاظ اقتصادی و قابلیت دسترسی آسان توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: زادمایه، بستر کشت قارچ میکوریز آربوسکولار، درصد کلنیزاسیون، پروپاگول

مقدمه

هدف از کشاورزی پایدار، حفظ باروری خاک‌های زراعی است، طوری که نیاز جمعیت در حال افزایش را بدون تخریب محیط زیست و تخلیه عناصر غذایی تأمین نماید. مدیریت حاصلخیزی خاک با استفاده از کودهای زیستی می‌تواند در پیشبرد این هدف بسیار مؤثر باشد (کوور و پیوروال ۲۰۱۹). رایج‌ترین نوع همزیستی میکوریزی در گیاهان زراعی و باغی، میکوریز آربوسکولار می‌باشد (علی‌اصغرزاد ۱۹۹۲). در چند دهه اخیر مصرف کودهای شیمیایی در اراضی کشاورزی موجب بروز مشکلات زیست محیطی، از جمله آلودگی منابع آب، افت کیفیت محصولات کشاورزی و تأثیر منفی بر خصوصیات زیستی خاک‌ها گردیده است (هروینجه و همکاران ۲۰۰۷). کشاورزی پایدار بر پایه مصرف کودهای زیستی با هدف کاهش در مصرف کودهای شیمیایی، یک راه حل مطلوب جهت غلبه بر این مشکلات می‌باشد. کودهای زیستی با افزایش ماده آلی خاک، باعث بهبود خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک شده، همچنین عناصر غذایی مورد نیاز گیاهان و ریزجانداران را تأمین می‌کنند (صالح راستین ۲۰۰۳). قارچ‌های میکوریز[۱] AM یکی از انواع کودهای زیستی است که رابطه همزیستی اجباری با ریشه اغلب گیاهان زراعی دارد. اغلب محصولات کشاورزی استراتژیک از قبیل گندم، برنج، ذرت ، سیب‌زمینی و سویا با قارچ‌های AM همزیستی دارند (هیجری، ۲۰۱۶). در این همزیستی، قارچ به‌عنوان توسعه‌دهنده سیستم‌های ریشه‌ای عمل می‌کند و سطح تماس را که برای جذب عناصر غذایی مهم است، افزایش می‌دهد (اسمیت و رید ۲۰۰۸) و با افزایش جذب عناصر غذایی و آب و افزایش مقاومت در مقابل تنش‌های زیستی(پاتوژن‌ها) و غیرزیستی (خشکی، شوری و ...)، ایجاد رابطه سینرژیستی با ریزجانداران حل‌کننده فسفات و تثبیت کننده‌های نیتروژن، تولید هورمون‌های محرک رشد گیاه همانند اکسین و سیتوکینین، سبب بهبود رشد و نمو و عملکرد گیاهان میزبان در کشاورزی پایدار می‌شود (ویلیامز و همکاران ۱۹۹۲). قارچ‌های AM عمدتاً با افزایش جذب فسفر، به گیاه میزبان‌شان سود می‌رسانند (مارکس، ۲۰۰۴). قارچ‌های AM به دلیل اینکه می‌توانند ۴ تا ۲۰ درصد از کربن تثبیت شده توسط گیاهان را مصرف کنند، از مهمترین تنظیم‌کننده‌های جریان کربن از گیاهان به خاک محسوب می‌شوند (زو و میلر ۲۰۰۳). با وجود اثرات مثبت همزیستی AM، کاربرد آنها در مقیاس بزرگ به دلیل عدم امکان تولید انبوه محدود است (گائور و آدولیا، ۲۰۰۲). زیرا اندومیکوریزها به دلیل ماهیت همزیستی اجباری[۲] با گیاهان نمی‌توانند روی محیط‌های‌کشت مصنوعی رشد کنند (هبت و اسریو ۲۰۰۱). در حال حاضر برای تولید این قارچ‌ها از روش‌های کشت درون شیشه، روش ائروپونیک، روش گلدانی و روش مزرعه‌ای استفاده می‌شود. که روش‌های درون شیشه ای و ائروپونیک به دلیل هزینه بالا و نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی جهت مصرف در سطح مزرعه، صرفه اقتصادی ندارند. کشت درون شیشه و استقرار همزیستی قارچ‌های AM اولین بار در ریشه‌های بریده شبدر و گوجه‌فرنگی با موفقیت به انجام رسید. پس از آن استفاده از ریشه هویج تراریخت شده با Ri T-DNA تحت عنوان سیستم ROC[۳] معروف شد. از آن به بعد سیستم‌های متفاوت تولید مایه تلقیح AM بر پایه ROC شکل گرفت. که در روش درون شیشه علاوه بر دو روش مذکور برای تولید زادمایه روش کشت گیاه کامل نیز به کار می‌رود. که بخش هوایی در خارج از پلیت رشد نموده در حالیکه ریشه و قارچ AM در درون پلیت

[۱] - Arbuscular mycorrhiza

[2] - Obligate symbiosis

[۳] - Root Organ Culture

در محیط کشت مستقر می‌باشد. صرف‌نظر از هزینه بالا این روش‌ها عاری از هرگونه آلودگی بوده و برای تولید زادمایه قارچ در گیاهانی که به روش کشت بافت تکثیر می‌یابند بسیار مناسب می‌باشند. روش‌های ائروپونیک (تکنیک‌های کشت محلول) که شامل کشت هوا کشت و آبکشت به همراه جریان محلول غذایی (NFT[۱]) می‌باشد که در مقایسه با کشت گلدانی هزینه بالایی داشته و برای تولید در مقیاس‌های کوچک قابل استفاده می‌باشند (ساریخانی و ابراهیمی ۲۰۱۱). اما روش گلدانی، ساده، ارزان و قابل کنترل بوده و قابلیت اجرایی بالایی دارد. روش گلدانی شامل استفاده از بسترهای خاکی و غیرخاکی است. در گذشته بسترهای معمول استفاده شده بیشتر مخلوط خاک و شن بودند اما از مواد غیرآلی بی‌اثر نیز به عنوان بستر استفاده می‌شود (چلاپن و همکاران، ۲۰۰۲). اخیراً استفاده از بسترهای غیر خاکی از جمله ورمیکولایت، پرلیت و موادی از این قبیل به دلیل نداشتن مشکلات زادمایه خاکی اعم از آلودگی به قارچ‌های بومی و ریزجانداران بیماریزا و عدم نیاز این بسترها به استریل به دلیل تحمل دمای بالا در فرایند تولید و فرآوری توصیه می‌شود (محمودی ۲۰۱۵). استفاده از بسترهای با تهویه مناسب و غلظت پائین عناصر غذائی نظیر شن و ورمیکولایت فرآوری شده میتواند اسپورزائی قارچ را تحریک کرده و پتانسیل کلنیزاسیون میکوریزی را بهبود بخشد (سیلوا و همکاران ۲۰۰۷).هبت و اسریو (۲۰۰۱) طی آزمایشی گزارش کردند اگر زادمایه با استفاده از محیط‌های کشت با ظرفیت بافری خیلی پایین فسفر مثل شن سیلیسی یا بازالت خرد شده تهیه شود در این صورت بهترین روش تغذیه گیاه میزبان افزودن دوره‌ای یک محلول غذایی مانند هوگلند (هوگلند و آرنون ۱۹۵۰) با غلظت فسفر تصحیح شده ۸ میلی‌گرم بر لیتر است. افزودن محلول غذایی به بستر کشت به لحاظ اقتصادی به صرفه نیست (جانیناسی و وُشکا ۲۰۰۴) لذا توصیه به استفاده از مواد آلی می‌شود زیرا مواد آلی علاوه بر کاهش هزینه‌های مرتبط با استفاده از محلول غذایی سبب بهبود اسپورزایی نیز می‌شود (کوئلهو و همکاران ۲۰۱۴).

مواد هیومیکی در اکثر خاکهای جهان وجود دارند و به طور معمول با میسیلیوم‌های قارچ میکوریز در تماس هستند، بنابراین در استفاده از بسترهای بدون خاک، قارچ‌های میکوریز به چنین ترکیباتی نیاز دارند (گرینـدلر و همکاران ۲۰۰۶). پژوهشگران بسیاری گزارش کردند که مواد هیومیکی با افزایش خاکدانه‌سازی، تهویه و نفوذپذیری خاک، اثر مثبتی روی رشد گیاه داشتند (مولر-وگنر ۱۹۸۸). گسترش شهرنشینی و صنعتی شدن به ویژه در کشورهای در حال توسعه، انباشته شدن حجم عظیمی از زباله‌های شهری را در پی داشته است. بنابراین در دهه‌های اخیر به منظور کاهش آلودگی‌های زیست محیطی توجه زیادی به بازیافت زباله و بکارگیری کمپوست حاصل در اراضی کشاورزی شده است (یاری و همکاران ۲۰۱۷). در این راستا در این تحقیق از مواد هیومیکی شامل کمپوست و اسید هیومیک برای تولید زادمایه قارچی استفاده شد. اسید هیومیک غنی از مواد غذایی بوده (چایناچانتا و ساشریرین ۲۰۱۶) و استفاده از کمپوست نه‌تنها سبب فراهمی عناصر غذایی (دنگ و همکاران ۲۰۱۲) بلکه ، افزایش عملکرد محصول و مهار پاتوژن‌های خاکزاد (پن و همکاران، ۲۰۱۳) نیز میگردد که با ورمیکولایت فرآوری شده و کوکوپیت به عنوان بسترهای پایه رقیق شد. در این تحقیق سعی بر این بود که از بسترهای کشت مناسب با قابلیت دسترسی فراوان و قیمت توجیه پذیر استفاده شود، تا بتوان زادمایه قارچی AM با پتانسیل تلقیحی بالا، آلایندگی کمتر بدست آورد.

[۱] - Nutrient Flow Techniques

مواد و روش‌ها

این آزمایش با هدف امکان سنجی تولید نیمه انبوه زادمایه قارچ‌های میکوریز آربوسکولار در شرایط گلدانی با بکارگیری بسترهای مختلف، انجام شد. هفت گونه قارچ مورد استفاده در این تحقیق از آزمایشگاه بیولوژی خاک دانشگاه تبریز تهیه شد. مشخصات هفت گونه قارچی بکار رفته در این تحقیق، در جدول (۱) آورده شده است.

جدول ۱- نام ، محل دریافت و کد گونه‌های قارچی مورد استفاده در آزمایش

کد قارچ	محل دریافت یا جداسازی	نام سابق قارچ	نام فعلی قارچ
RIR-SW	دپارتمان بیولوژی دانشگاه لوند سوئد	*Glomus intraradices*	*Rhizophagus irregularis*
RIN-AD	دانشگاه آدلاید استرالیا	*Glomus intraradices*	*Rhizophagus intraradices* AD
RIN-TA	دشت تبریز	*Glomus intraradices*	*Rhizophagus intraradices* TA
GVE-TA	دشت تبریز	*Glomus versiforme*	*Glomus versiforme*
CET-TA	دشت تبریز	*Glomus etunicatum*	*Claroideoglomus etunicatum*
FMO-TA	دشت تبریز	*Glomus mosseae*	*Funneliformis mosseae*
SCU-AD	دانشگاه آدلاید استرالیا	*Scutellospora calospora*	*Scutellospora calospora*

این آزمایش در گلخانه تحقیقاتی گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز انجام شد.

آماده‌سازی بسترها

در این آزمایش دو نوع بستر کشت استفاده شد که بستر الف: شامل اسید هیومیک، کوکوپیت و ورمیکولایت بود که کوکوپیت و ورمیکولایت با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط شدند، اسید هیومیک نیز به مقدار $۲۵۰ mg.kg^{-1}$ در یک مرحله بصورت سوسپانسیون در آب به هنگام آبیاری به هر گلدان افزوده شد. اسید هیومیک حدود سه هفته پس از کشت، همزمان با اولین محلول غذایی استفاده شد. اسید هیومیک مورد استفاده از لئوناردیت استخراج شد که در زیر شرح داده شده است. بستر ب: شامل کوکوپیت، ورمیکولایت و کمپوست بود که به ترتیب با نسبت حجمی ۰/۴:۱:۱ مخلوط شدند. که با توجه به وزن کم و حجم زیاد مواد بستری، نسبت اختلاط آنها بصورت حجمی بیان شده است.

استخراج اسید هیومیک از لئوناردیت

استخراج اسید هیومیک طبق روش پیشنهادی توسط انجمن بین‌المللی مواد هیومیکی (سوویفت، ۲۰۰۴) انجام گرفت. برای این منظور بر روی ۵۰ گرم لئوناردیت پودر شده ۵۰۰ میلی‌لیتر NaOH ۰/۵ نرمال ریخته و به مدت ۲۰ ساعت در اتاق تاریک با دمای ۲۵ درجه سلسیوس با شدت ۱۶۰ دور در دقیقه تکان داده شد. بعد از به هم زدن سوسپانسیون، مایع رویی از کاغذ صافی عبور داده شد. عصاره صاف شده با افزودن ۲۰ میلی‌لیتر HCl غلیظ به pH=۲ رسانده شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال نگهداری شد. سپس فاز محلول از فاز رسوب با سانتریفیوژ ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی و روشناور دور ریخته شد. اسید هیومیک بدست آمده در فاز رسوب جهت حذف اسید با آب مقطر مخلوط شد و سپس سانتریفیوژ گردید و محلول رویی بیرون ریخته شد.

ویژگی‌های شیمیایی اسید هیومیک استفاده شده در این آزمایش شامل اسیدیته کل و گروه‌های عاملی (اشنیتزر، ۱۹۸۲) و نسبت های اسپکتروفتومتری E_2/E_3 (نشان‌دهنده درجه آروماتیک بودن اسید هیومیک) و E_4/E_6 (نشاندهنده درجه تراکم ترکیبات آلیفاتیک و آروماتیک مواد هومیک) و $\Delta \log k$ (درجه هوموسی شدن) با روش چن و همکاران (۱۹۷۶) تعیین و در جدول (۲) ارائه گردیده است.

جدول ۲- شاخص‌های اندازه‌گیری شده اسید هیومیک (وکیلی ۲۰۱۸)

اسیدیته‌کل (meq. g^{-1})	گروه‌های کربوکسیلی (meq. g^{-1})	گروه‌های OH –فنولی (meq.g^{-1})	E_2/E_3	E_4/E_6	Δ logk
۶/۷۵	۰/۳	۶/۴۵	۲/۶۳	۲/۴۶	۰/۳۸

کمپوست مورد استفاده از مرکز مدیریت پسماند شهرداری تبریز تهیه شد. قبل از اختلاط با بستر کشت، با اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر) استریل گردید. بقیه مواد بستر (ورمیکولایت و کوکوپیت) به دلیل اینکه در فرآیند تولید آنها از حرارت بالایی استفاده می‌شود و همچنین در یک پیش آزمایش با کشت ذرت، هیچگونه کلنیزاسیون ریشه نشان ندادند لذا بدون استریل در کشت گیاه استفاده شدند.

اندازه گیری برخی ویژگی‌های بسترهای مورد استفاده

EC، pH در هر دو بستر در عصاره ۵:۱ (W:V) اندازه‌گیری شدند (مکلین ۱۹۸۲) و ظرفیت نگهداشت آب (WHC[۱]) نیز برای هردو بستر تعیین شد (شینوهارا و همکاران ۱۹۹۹).

کشت گیاه

در این آزمایش از گیاه ذرت (*Zea mays* L.) رقم سینگل کراس ۷۰۴ به عنوان میزبان قارچ استفاده شد. بذور به مدت ۱۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی سطحی شده و سه مرتبه با آب استریل شسته شده و لای کاغذ صافی مرطوب و استریل، جوانه دار شدند. گلدان‌های هفت لیتری برای کشت گیاه استفاده شدند که هر گلدان شامل شش لیتر بستربود. دو ترکیب بستر برای کشت گیاه استفاده شد. بستر الف شامل کوکوپیت، ورمیکولایت و اسید هیومیک و بستر شامل کوکوپیت، ورمیکولایت و کمپوست بود. هفت گونه قارچی در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). پتانسیل اولیه قارچ‌ها به صورت درصد کلنیزاسیون ریشه برآورد شده است (جدول ۳). زادمایه اولیه آنها به صورت لایه‌ای در عمق ۵ سانتی‌متری از سطح بستر پخش شد. پس از آبیاری و رسیدن به رطوبت حدود ظرفیت مزرعه، ده عدد بذر جوانه‌دار به ازای هرگلدان کشت شد. بذرها در عمق حدود ۱ سانتی‌متر (با پنس استریل) قرارگرفتند. در طول دوره رشد به طور مرتب هرسه روز یکبار آبیاری شده و هفته‌ای یکبار حدود ۳۰۰ میلی لیتر محلول غذایی راریسون با نصف غلظت فسفر (راریسون ۱۹۶۹) به گلدان‌ها اضافه شد. گلدانها در شرایط گلخانه با نور طبیعی و دمای روز ۲±۳۰ و شب ۲±۲۰ به مدت چهار ماه رشد کردند.

برداشت گیاهان

در آخر دوره رشد (چهار ماه پس از کشت) بخش هوایی گیاهان با قیچی استریل از محل طوقه قطع گردید و محتوای گلدان که شامل بستر حاوی ریشه‌های کلونیزه شده، اسپورها و میسلیوم قارچ بود، برداشت و پس از برداشتن بخشی از ریشه‌های ظریف برای رنگ‌آمیزی و تعیین درصد کلنیزاسیون ، باقی ریشه‌ها با قیچی استریل خرد شده و کاملاً با بستر مخلوط شد. و به‌عنوان زادمایه قارچی مورد ارزیابی قرار گرفت.

[۱] Water-holding capacity

جدول ۳- درصد کلنیزاسون ریشه گونه‌های قارچی مورد استفاده به‌عنوان زادمایه

کد قارچ	گونه قارچی مورد استفاده	درصد کلنیزاسیون ریشه
RIR-SW	*Rhizophagus irregularis*	۸۳
RIN-AD	*Rhizophagus intraradices* AD	۷۱
RIN-TA	*Rhizophagus intraradices* TA	۷۳
GVE-TA	*Glomus versiforme*	۷۸
CET-TA	*Claroideoglomus etunicatum*	۹۲
FMO-TA	*Funneliformis mosseae*	۶۶
SCU-AD	*Scutellospora calospora*	۴۳

رنگ آمیزی ریشه

ریشه‌های ظریف و ریز جدا شده از هر گلدان، پس از شستشوی کامل با آب به مدت یک ساعت داخل لوله‌های حاوی KOH ۸ درصد و دمای ۹۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد. سپس محلول داخل لوله‌ها خالی شده و پس از شستشو با آب معمولی، به مدت ۳ دقیقه در محلول HCl ۱ درصد نگهداری شد. در مرحله بعد اسید را خالی نموده و بدون شستشو بر روی ریشه‌ها محلول رنگی تریپان بلو (۵۰ میلی‌گرم پودر تریپان بلو در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول لاکتوگلیسیرین) اضافه گردید و حدود ۴۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس حرارت داده شد. سپس محلول رنگی خالی شد و پس از شستن نمونه‌ها با آب، محلول رنگ‌بر لاکتوگلیسیرین (LG: شامل آب : گلیسرین : اسید لاکتیک : به نسبت حجمی ۱۴:۱:۱) بر روی ریشه‌ها اضافه گردید (کورمانیک و مک گراو ۱۹۸۲).

تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه

تعیین درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه با روش تقاطع خطوط شبکه (GIM[1]) انجام شد. بدین ترتیب که پشت یک پتری دیش به قطر حدود ۱۰ سانتیمتر یک مربع شطرنجی با ابعاد شبکه ۰/۵ ×۰/۵ سانتی متر رسم شده و قطعات ریشه ها به طول حدود یک سانتی‌متر در سطح پتری دیش پخش شدند و تعداد تقاطع ریشه با خطوط افقی و عمودی که دارای اندامهای قارچی بودند شمارش شدند و به صورت کسری از تعداد کل تقاطع خطوط با ریشه ها، یادداشت و در نهایت درصد کلنیزاسیون قارچی محاسبه گردید (گیووانتی و موس ۱۹۸۰).

آزمون نرمال بودن داده ها و مقایسه میانگین‌ها با نرم افزار SPSS و با آزمون دانکن انجام گرفت و رسم نمودار با نرم افزار اکسل انجام شد.

تعیین پتانسیل زادمایه قارچی به روش MPN

ایجاد همزیستی با ریشه‌های گیاه به‌وسیله قارچ‌های میکوریز می‌تواند توسط هر یک از اندامک‌های آنها از قبیل هیف، اسپور، وزیکول و آربوسکول و یا حتی قطعات ریشه کلنیزه شده صورت پذیرد. لذا درصد کلنیزاسیون ریشه به‌تنهایی نمی‌تواند مبنای تعیین پتانسیل زادمایه قارچی قرار گیرد (توسلی، ۲۰۱۲). شمارش اسپور نیز دارای محدودیت‌هایی از قبیل عدم استخراج کامل همه اسپورها از نمونه یا عدم تمایز بین اسپور این قارچها با برخی ذرات خاک و یا اسپور سایر قارچها، می باشد (بایلیس ۱۹۶۹؛ هال ۱۹۷۷). بنابراین برای تعیین پتانسیل کلنیزاسیون هر زادمایه قارچی باید تعداد کل پروپاگول‌های آنها با روش بیشترین تعداد محتمل (MPN) شمارش شوند (الکساندر ۱۹۶۵). برای این کار، ابتدا رقت‌های حجمی ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸ ، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴ از زادمایه قارچی تهیه گردید. برای تهیه رقت ۱/۲ بدین ترتیب عمل گردید که ۱ یک حجم از زادمایه با یک حجم از ورمیکولایت مخلوط گردید، و برای تهیه رقت ۱/۴ یک حجم از رقت ۱/۲ با یک حجم از

[1] - Gridlines intersection method

ورمیکولایت استریل مخلوط شد. و برای رقتهای بعدی نیز به همین ترتیب عمل شد. همچنین از بستر ورمیکولایت بعنوان شاهد (بدون زادمایه قارچ) استفاده شد. رقت‌های تهیه شده در داخل گلدان‌ها ریخته شد و برای هر رقت سه تکرار تهیه گردید و سه عدد بذر ضدعفونی شده سورگوم داخل هر گلدان کشت شد. این آزمایش به مدت ۳۰ روز و با دمای ۲۳ درجه سلسیوس و با ۱۶ ساعت روشنایی ادامه یافت. گیاهان به طور مرتب آبیاری شده و پس از گذشت ۱۰ روز ۲۰ میلی‌لیتر محلول غذایی راریسون به گلدان‌ها داده شد. بعد از چهار هفته تمام سیستم ریشه درهر گلدان برداشت شده و داخل محلول تثبیت کننده (۵۰ درصد اتانول + ۵۰ درصد اسید استیک ۶۰٪) نگهداری گردید و رنگ آمیزی مطابق روش کورمانیک مک گراو (۱۹۸۲) انجام گرفت. کل ریشه رنگ آمیزی شده از هر گلدان، داخل پتری دیش قرار داده شده و زیر استریومیکروسکپ بررسی گردید. وجود یا عدم وجود کلنیزاسیون ریشه به ترتیب به‌عنوان + یا – در نظر گرفته شد و با استفاده از روش MPN (کوکران ۱۹۵۰) تعداد کل پروپاگول در ۵۰ میلی‌لیتر بستر تعیین گردید.

نتایج و بحث

آنالیز بسترهای مورد استفاده و خصوصیات آنها

برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بسترهای مورد استفاده در جدول شماره (۴ و ۵) آمده است.

جدول ۴– برخی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بسترهای مورد استفاده

نوع بستر	EC ($dS.m^{-1}$)	pH	%WHC
بستر الف	۰/۹۱	۷/۳	۳۷۵
بستر ب	۳/۹۹	۷/۰۸	۳۱۱

جدول ۵– ویژگی‌های شیمیایی بسترهای مورد استفاده

نوع بستر	%C	%N	C/N	%P	%K	$Fe(mg.kg^{-1})$	$Zn(mg.kg^{-1})$
بسترالف	۲۰/۶	۰/۱۲	۱۷۱/۶۶	۰/۱۲	۰/۵۳۷	۲۶۵۵۹	۱۰۳/۷۷
بسترب	۱۴/۷۲	۰/۶۸	۲۱/۶۴	۲/۷۸	۰/۷۴۹	۲۲۵۸۲	۲۰۶/۲۱

طبق نتایج، بستر الف دارای EC کمتری نسبت به بستر ب می‌باشد. که به وجود کمپوست در ترکیب بستر ب نسبت داده می‌شود. pH هر دو بستر در حدود خنثی بود. اصولاً اغلب گونه‌های قارچ میکوریز آربوسکولار در pH خنثی کلنیزاسیون بهتری نشان می‌دهند. اسید هیومیک دارای pH اسیدی است. اما در اینجا بستر الف pH بالا و نزدیک خنثی دارد. که به احتمال زیاد به دلیل استفاده اسید هیومیک همراه با محلول غذایی و ظرفیت تبادل کاتیونی بالای بسترهای کوکوپیت و ورمیکولایت و درنتیجه ظرفیت بافری بالای آنها می‌باشد که مانع از کاهش pH شده است. استفاده از لئوناردیت در کشاورزی به‌طور گسترده به دلیل محتوای بالای اسید هیومیک آن می‌باشد. کیفیت و خاصیت لئوناردیت ممکن است به طور قابل‌ملاحظه از یک مکان به مکان دیگر تغییر کند. اسید هیومیک به عنوان منبع غنی تغذیه گیاه عمل می‌کند و ساختمان خاک و ظرفیت نگهداشت آب را تقویت می‌کند (چایناچانتا و شاسریرین، ۲۰۱۶). در آزمایشی که با کشت گیاه چیا (*Salvia hispanica* L.) با استفاده از زادمایه قارچی *G. mosseae* و شرایط بدون تلقیح (قارچ‌های بومی خاک) در سه pH خنثی (۷/۱)، بازی (۸/۲) و اسیدی (۵/۱) انجام گرفت، نتایج نشان داد که بیشترین درصد کلنیزاسیون در گیاهان تلقیح شده در pH خنثی بود. کلنیزاسیون ریشه در pH خنثی در گیاهان تلقیح شده با قارچ تفاوت معنی‌داری با گیاهان تلقیح نشده (کلنیزه شده با قارچ‌های بومی) داشت و گیاهان تلقیح شده درصد کلنیزاسیون بیشتری به خود

اختصاص دادند. اما در شرایط بازی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای تلقیح شده و بومی وجود نداشت. در شرایط اسیدی درصد کلنیزاسیون ریشه به شدت افت کرده و تفاوتی بین تیمارهای تلقیح شده و تلقیح نشده نبود (اوزونیدو و همکاران، ۲۰۱۵).

کوکوپیت به بالا بودن ظرفیت نگهداشت آب معروف است و با اسفاگنوم پیت که ۴۰۰ تا ۸۰۰ درصد وزن خود آب نگه می‌دارد قابل مقایسه است (آباد و همکاران ۲۰۰۵؛ ایوانس و همکاران ۱۹۹۶). ظرفیت بالای نگهداشت آب در کوکوپیت سبب هوادهی ضعیف ناحیه ریشه می‌شود. ترکیب مواد درشت دانه مانند ورمیکولایت فرآوری شده با بستر کوکوپیت این مشکل را حل می‌کند و هوادهی را بهبود می‌بخشد (یحیی و همکاران ۲۰۰۹). ورمیکولایت فرآوری شده مورد استفاده در بستر بسیار متخلخل بوده و خصوصیت موئینگی بالایی دارد و می‌تواند ۴-۳ برابر وزن خود آب جذب کند. ورمیکولایت فرآوری شده، رس حرارت دیده با pH حدود ۷ تا ۷/۵ و EC پایین است (بارتال و همکاران ۲۰۰۸).

بستر ب EC بالایی دارد که به علت و جود کمپوست در ترکیب بستر می‌باشد. کمپوست از نظر عناصر غذایی بسیار غنی بوده وسبب بالا رفتن میزان EC شده است. در آزمایشی که با هفت نوع بستر کشت و با دو گیاه سورگوم و شبدر در حضور قارچ میکوریز انجام شد از بین بسترهای مورد استفاده بسترهای کمپوست:پرلیت و کمپوست:ورمیکولایت به‌ترتیب با نسبت ۱ به ۴ بیشترین میزان EC ($۳/۶۴dS.m^{-1}$) را به خود اختصاص دادند (محمودی ۱۳۹۳). بستر ب دارای کمپوست بوده که ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی بسترها را بهبود می‌بخشد و ضمن افزایش قابلیت دسترسی عناصر غذایی پرمصرف و کم مصرف، در تامین برخی هورمونها و تنظیم کننده‌های رشد گیاه نقش مهمی ایفا میکند (اوزرس-همتان و همکاران ۲۰۰۱). مواد کمپوست شده به دلیل فشردگی زیاد، تخلخل بسترهای رشد را کاهش می‌دهند، اما با اضافه کردن ورمیکولایت به بستر، این مشکل تا حدودی جبران می‌شود (فیتزاتریک ۲۰۰۱). محدودیت‌های استفاده از کمپوست در ترکیب بسترهای رشد شامل هدایت الکتریکی بالا، pH بازی ضعیف (وردنک و همکاران ۱۹۸۳) و ظرفیت پایین نگهداشت آب هستند (آباد و همکاران ۲۰۰۱). سطوح نمک قابل حل در کمپوست به مواد اولیه و فرآوری آن بستگی دارد. ثابت شده است که کمپوست های با سطوح نمک پایین از کمپوست‌های با سطح نمک بالا برای رشد گیاه بهتر می‌باشند (گارسیا-گومز و همکاران ۲۰۰۲). کمپوست‌ها به عنوان جزئی از بسترهای رشد باید وضعیت پایدار و شوری پایینی داشته باشند. همچنین غلظت یون ها و مولکول های سمی مانند فلزات سنگین Hg، Cd و ... در آنها پایین بوده و عاری از جانداران پاتوژنی باشند (راویو و همکاران ۲۰۰۲).

درصد کلنیزاسیون ریشه

تجزیه واریانس نشان داد که اثر بستر بر درصد کلنیزاسیون ریشه گونه‌های قارچی معنی‌دار نشده است (جدول ۶). دلیل این پدیده را می‌توان به ترکیب مشابه در هر دو بستر نسبت داد زیرا کمپوست به میزان زیادی اسید هیومیک دارد. کمپوست غنی از اسید هیومیک است که رشد هیفی و اسپورزایی را افزایش می‌دهد (گریندلر و همکاران، ۲۰۰۹).

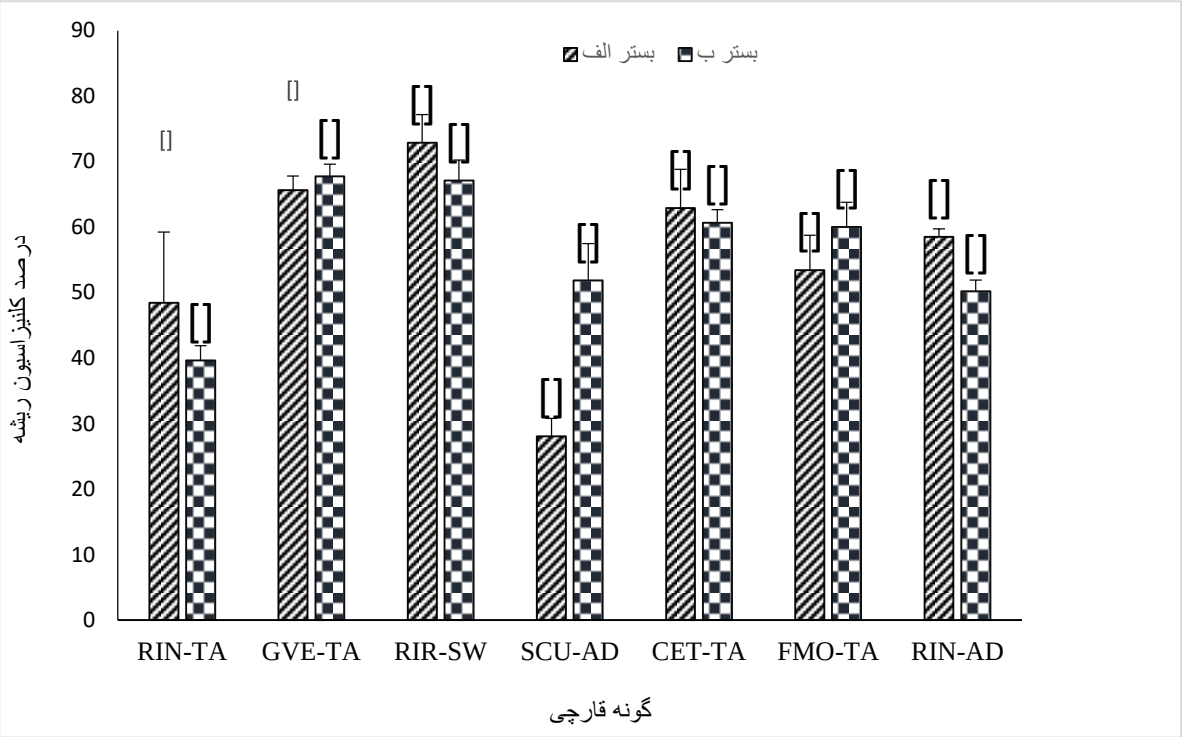
اما اثر گونه‌های قارچی بر میزان کلنیزاسیون ریشه در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار شد (جدول ۶). که دلیل آن به تفاوت سویه‌های قارچی مختلف در فیزیولوژی و ساختارشان و نیز توان سازش با شرایط محیط و گیاه میزبان برمی‌گردد. همچنین این جدول نشان می‌دهد که اثر متقابل بستر × قارچ نیز بر درصد کلنیزاسیون ریشه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار شده است. همچنین نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل قارچ × بستر بر میزان کلنیزاسیون نشان داد که درصد کلنیزاسیون در بسترها

جدول ۶- تجزیه واریانس اثر نوع بستر و گونه قارچی بر میزان کلنیزاسیون ریشه

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات کلنیزاسیون ریشه
بستر	۱	۱۱/۴۹ ns
قارچ	۶	۷۴۶/۴۳ **
قارچ × بستر	۶	۱۹۷/۲۵ *
خطای آزمایشی	۲۸	۶۰/۶۶
ضریب تغییرات (٪)		۲۳/۸۳

**، * و ns به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد و غیر معنی‌دار می باشد.

از ۷۲/۸۷-۲۸/۰۸ درصد متتغیر بود و کمترین درصد مربوط به گونه SCU-AD (۲۸/۰۸) و بیشترین درصد مربوط به گونه RIR-SW (۷۲/۸۷) بود که هر دو در بستر الف مشاهده شدند (شکل ۱). که اختلاف معنی‌داری با بستر ب (۶۷ درصد) نداشت. گونه‌های قارچی مورد استفاده در هر دوبستر به جز در گونه SCU-AD با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند و در همه گونه‌ها به جز گونه‌های FMO-TA ، SCU-AD و GVE-TA درصد کلنیزاسیون ریشه در بسترهای شامل اسید هیومیک بیشتر از بسترهای دارای کمپوست بود (شکل ۱).



شکل ۱- اثر برهم کنش نوع بستر و گونه‌های قارچی بر میزان کلنیزاسیون ریشه

RIN-TA) *Rhizophagus intraradices*-Tabriz ؛(GVE-TA) *Glomus versiforme*-Tabriz ؛(RIR-SW) *Rhizophagus irregularis*-Sweden ؛(SCU-AD) *Scutellospora calospora*-Australia Adelaide ؛(CET-TA) *Claroideoglomus etunicatum*-Tabriz(؛FMO-TA) *Funneliformis mosseae*-Tabriz ؛(RIN-AD) *Rhizophagus intraradices*-Australia Adelaide(

در آزمایشی مبنی بر تأثیر بسترهای مختلف بر میزان کلنیزاسیون قارچ میکوریز از بین هفت نوع بستر استفاده شده، مخلوط کمپوست و ورمیکولایت با نسبت حجمی ۱ به ۴ بالاترین درصد کلنیزاسیون را به خود اختصاص داد (محمودی، ۲۰۱۵). جونر و جکسون (۱۹۹۵) تأثیر مثبت مواد هیومیکی بر میزان کلنیزاسیون قارچ میکوریز را از طریق افزایش طول هیف‌ها و فراوانی آربوسکول عنوان کردند و اسید هیومیک تأثیر تغذیه‌ای مستقیم بر قارچ میکوریز ندارد زیرا قارچ همزیست اجباری است و مواد مورد نیاز خود را از گیاه تأمین می‌کند، بنابراین گسترش اندام‌های قارچی با مصرف اسید هیومیک به دلیل تأثیر اسید هیومیک بر فیزیولوژی و مورفولوژی ریشه است. (توفایل و همکاران ۲۰۱۴). وکیلی (۲۰۱۸) در پژوهشی افزایش معنی‌دار درصد کلنیزاسیون و همچنین افزایش معنی‌دار فراوانی هیف و آربوسکول و وزیکول را در تیمارهای شامل اسید هیومیک در مقایسه با تیمارهای شاهد گزارش کرد.

یانگ و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که کلنیزاسیون ریشه با AMF همبستگی مثبت معنی‌داری با افزایش کمپوست نشان داد. قارچ‌های AM ممکن است پاسخ‌های مختلفی به مقادیر کمپوست اضافه شده بسته به نوع کمپوست و گونه گیاهی بدهند (کُپتا و همکاران ۲۰۱۱). همچنین گونه‌های قارچ و نسبت C:N کمپوست نیز فاکتور مهمی در پاسخ قارچ‌های AM به کمپوست اضافه شده می‌باشد (یانگ و همکاران ۲۰۱۸). دودز و همکاران (۲۰۰۶) دریافتند که استفاده از مخلوط ورمیکولیت و کمپوست بعنوان بستر در مقایسه با خاک سبب تولید پروپاگول‌های قارچی بیشتری میشود و همچنین اثربخشی بیشتر آن در سیستم های تولید گیاه می گردد.

محتمل‌ترین تعداد پروپاگول (MPN)

با توجه به اینکه درصد کلنیزاسیون ریشه در گونه‌های قارچ *Rhizophagus irregularis* و *Glomus versiforme* در هر دو بستر بالاتر از بقیه بود و نیز به علت فضای محدود در گلخانه شمارش تعداد کل پروپاگول‌های قارچی فقط در این دو گونه صورت گرفت.

نتایج بدست آمده از آزمایش (جدول ۵) نشان داد که جمعیت پروپاگول در زادمایه هر دو گونه قارچ *Rhizophagus irregularis* و *Glomus versiforme* مورد استفاده به‌ترتیب حدود ۳۰ و ۲۲/۵ پروپاگول در ۵۰ میلی‌لیتر زادمایه بود که در محدوده متعارف بوده و برای استفاده به عنوان زادمایه می‌تواند مورد توجه باشد. با توجه با اینکه مدت زمان این آزمایش خیلی کوتاه (یک ماه) بود، در حالی که معمولاً یک دوره رشد حداقل سه ماهه برای برقراری همزیستی و تکامل پروپاگول‌های قارچی توصیه می‌شود. و بستر مورد استفاده نیز کاملا عاری از هرگونه مواد غذایی و آلی بود بنابراین نتایج بدست آمده قابل قبول به نظر می‌رسد و حتی بهتر از انتظار بود.

در آزمایشی جمعیت پروپاگول‌های قارچ در خاک جنگلی بالغ حدود ۳/۵ پروپاگول در ۵۰ میلی‌لیترخاک و در مزرعه ذرت نزدیک جنگل حدود ۱۵ پروپاگول در ۵۰ میلی لیتر خاک گزارش گردید (زاپاتا و همکاران ۲۰۱۱). فراهمی عناصر غذایی خاک نیز می‌تواند فراوانی پروپاگول‌های قارچ‌های میکوریز آربوسکولار را تحت تأثیر قرار دهد (رزیدر۲۰۰۴؛ رزیدر و الن ۲۰۰۲). برای مثال در سیستم مقایسه‌ای (NPK در مقایسه با کمپوست) ویدیا و همکاران (۲۰۰۸) دریافتند که چگالی اسپور در تیمارهای دریافت‌کننده کمپوست از تیمارهای دریافت‌کننده فسفر معدنی بالاتر بود. در آزمایشی جمعیت اسپور با افزایش کمپوست زباله شهری افزایش یافت (محمودی، ۲۰۱۵). نوع گونه قارچی نقش مهمی در کیفیت زادمایه و جمعیت پروپاگول‌های قارچی به واسطه نحوه تولید اسپور (علی‌اصغرزاد ۱۹۹۸) و میزان مقاومتشان در برابر پراکنش، تنش‌های محیطی و کارایی کسب مواد غذایی (زاپاتا و همکاران ۲۰۱۱) دارد. همچنین اندازه ذرات بستر و قطعه‌های ریشه کلنیزه شده نیز تأثیر زیادی در جمعیت پروپاگول‌های قارچی دارد (علی‌اصغرزاد ۱۹۹۸).

جدول۷- نتایج حاصل از شمارش MPN برای تعیین تعداد پروپاگول‌ها در زادمایه قارچی

نام قارچ		*Rhizophagus irregularis*		*Glomus versiforme*	
کد قارچ		RIR-SW		GVE-TA	
(a) رقت ۱:۲	R_1		+		+
	R_2		+		+
	R_3		+		+
(b) رقت ۱:۴	R_1		+		+
	R_2		+		+
	R_3		+		+
(c) رقت ۱:۸	R1		+		+
	R2		+		+
	R3		+		+
(d) رقت ۱:۱۶	R_1		+		+
	R_2	P_1	+	P_1	+
	R_3		+		+
(e) رقت ۱:۳۲	R1		+		+
	R2	P_2	+	P_2	-
	R3		-		-
(f) رقت ۱:۶۴	R_1		-		-
	R_2	P_3	-	P_3	-
	R_3		-		-

فاکتور با حد اطمینان ۹۵٪= ۲/۲۳

شکل ۲- شمایی از بسته‌بندی زادمایه قارچی

نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج بدست آمده از این تحقیق، بستر مورد استفاده شامل مخلوط ورمیکولایت و کوکوپیت توانست در تکثیر قارچ میکوریز محیط مناسبی را ایجاد کند و کیفیت زادمایه تولیدی را افزایش دهد. همچنین هر دو تیمار اسید هیومیک و کمپوست بعنوان ماده افزودنی در این بستر از لحاظ تکثیر قارچ مؤثر واقع شدند ولی تفاوت آماری معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. بنابراین با درنظر گرفتن صرفه اقتصادی و مقایسه قیمت این دو ماده افزودنی، استفاده از کمپوست با نسبت حجمی ۱:۱:۴/۰(کوکوپیت: ورمیکولایت: کمپوست) برای تولید انبوه زادمایه قارچی توصیه می‌شود (شکل ۲).

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی شماره ۴۱۴۰/ص مورخه ۹۵/۱۰/۱۴ مصوب کمسیون پژوهشی دانشگاه تبریز بوده و نویسندگان بدین وسیله از امور پژوهشی دانشگاه تبریز به خاطر تأمین مالی آن سپاسگزارند.

منابع مورد استفاده

Abad M, Fornes F, Carrión C, Noguera V, Noguera P, Maquieira Á and Puchades R. 2005. Physical properties ofvarious coconut coir dusts compared to peat. HortScience, 40(7): 2138-2144.

Abad M, Noguera P and Bures S. 2001. National inventory of organic wastes for use as growing media for ornamental potted plant production: case study in Spain. Bioresource Technology, 77(2):197–200.

Aliasgharzad N. 1994. Effects of inoculation of soybean with VA fungi and Rhizobium bacteria on growth and nutrient uptake in several soils around Karaj. Master Thesis, Agriculture Faculty, University of Tehran. (In Persian).

Aliasgharzad N. 1998. Soil Microbiology and Biochemistry (Translation), Second Edition, Tabriz University Press. (In Persian).

Baylis GTS. 1969. Host treatment and spore production by *Endogone.* "New Zealand Journal of Botany. 7: 173-4.

Bar-Tal A, Saha U, Silber A, Raviv M and Papadopoulos AP. 2008. Inorganic and synthetic organic components of soilless culture and potting mixes. Pp 505-544. In: Raviv M and Lieth JH, (eds) Soilless Culture: Theory and Practice. Academic Press.

Chellappan P, Christy SAA and Mahadevan A, 2002. Multiplication of arbuscular mycorrhizal fungi on roots. Pp. 285-297. In: Mukerji KG, Manoharachary C and Chamola BP (eds). Techniques in Mycorrhizal Studies. Springer- Netherlands.

Chen y, senesi N and schnitzer M. 1977. Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. Soil Science Society of America Journal, 41: 352-358.

Chinachanta K and Shutsrirung A. 2016. Chemical characterization of leonardite and its potential use as soil conditioner and plant growth enhancement. Research and Technology Transfer Affairs Division. Khon Kaen University. Thailand, 22(4): 1-10.

Coelho IR, Pedone-Bonfim MV, Silva F.S and Maia LC, 2014. Optimization of the production of mycorrhizal inoculum on substrate with organic fertilizer. Brazilian Journal of Microbiology. 45: 1173-1178.

Copetta A, Bardi L, Bertolone E and Berta G. 2011. Fruit production and quality of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) are affected by green compost and arbuscular mycorrhizal fungi. Plant Biosystems, 145: 106-115.

Evans MR, Konduru S and Stamps RH. 1996. Source variation in physical and chemical properties of coconut coir dust. HortScience, 31(6): 965-967.

Fitzpatrick GE. 2001. Compost utilization in ornamental and nurserycrop production systems. Compost Utilization in Horticultural Cropping Systems, p.135–150.

Garcia-Gomez A, Bernal MP and Roig A. 2002. Growth of ornamental plants in two composts prepared from agroindustrial wastes. Bioresource Technology, 83(2):81–87.

Gaur A and Adholeya A. 2002: Arbuscular mycorrhizal inoculation of five tropical fodder crops and inoculum production in marginal soil amended with organic matter. Biology and Fertility of Soils, 35: 214-218.

Gianinazzi S, Vosátka M, 2004. Inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi for production systems: science meets business. Canadian Journal of Botany. 82: 1264-1271.

Giovannetti M and Mosse B. 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular-arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist, 84: 489-500.

Gryndler M, Larsen J, Hršelová H, Řezáčová V, Gryndlerová H and Kubát J. 2006. Organic and mineral fertilization respectively increase and decrease the development of external mycelium of arbuscular mycorrhizal fungi in a long-term field experiment. Mycorrhiza, 16:159-166.

Gryndler M, Hršelová H, Cajthaml T, Havránková M, Řezáčová V, Gryndlerová H and Larsen J. 2009. Influence of soil organic matter decomposition on arbuscular mycorrhizal fungi in terms of asymbiotic hyphal growth and root colonization. Mycorrhiza, 19(4): 255-266.

Habte M and Osorio NW. 2001. Arbuscular mycorrhizas: producing and applying Arbuscular Mycorrhizal inoculum. Cooperative Extension work. Department of Tropical Plant and Soil Sciences College of Tropical Agriculture and Human Resources. University of Hawaii at Manoa.

Hall IR. 1977. Species and mycorrhizal infections of New Zealand Endogonaceae. Transactions of the British Mycological Society, 68: 341-56.

Hijri M. 2016. Analysis of a large dataset of mycorrhiza inoculation field trialson potato shows highly significant increases in yield. Mycorrhiza, 26: 209-214.

Herwijnen RV, Hutchings TR, Al-Tabbaa A, Moffat AJ, Johns ML and Ouki SK. 2007. Remediation of metal contaminated soil with mineral-amended composts. Environmental Pollution, 150: 347–354.

Joner EJ and Jakobsen I. 1995. Growth and extracellular phosphatase activity of arbuscular mycorrhizal hyphae as influenced by soil organic matter. Soil Biology and Biochemistry, 27(9): 1153-1159.

Kaur P and Purewal SS. 2019. Biofertilizers and their role in sustainable agriculture. Pp. 285-300. In: Giri B, Wu QSH, Prasad R and Varma A (eds). Biofertilizers for Sustainable Agriculture and Environment. Soil Biology. V (54).

Kormanik PP and McGraw AC. 1982. Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. Pp. 37-45. In: Schenck NC (eds). Methods and Principles of Mycorrhizal Research. American Phytopathological Society, Saint Paul, Minnesota.

Mahmoudi H. 2015. Optimizing pot culture media for inoculum production of arbuscular mycorrhizal fungi. Master Thesis, Agriculture Faculty, University of Tabriz. p. 120.

Marx J. 2004. The roots of plant-microbe collaborations. Science. 304: 234-236.

Mclean EO. 1982. Soil pH and lime requirement. Pp. 199-224. In: Page AL, Miller RH and Keeney DR (eds). Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties, Second Edition. American Society of Agronomy,Inc., Soil Science Society of America,Inc., Madison, Wisconsin.

Muller-Wegener U. 1988. Interaction of humic substances with biota. Pp 179-192. In: Frimmel FH, Christman RF (eds). Humic Substances and Their Role in the Environment. John Wiley and Sons, Chichester New York Brisbane, Toronto Singapore.

Ouzounidou G, Papadopoulou K, Skiada V and Stamatis N. 2015. Effects of soil pH and arbuscular mycorrhiza (AM) inoculationon growth and chemical composition of chia (Salvia hispanica L.) leaves. Brazilian Journal of Botany.

Ozores-Hampton M, Obreza TA and Stoffella PJ. 2001. Weed control in vegetable crops with composted organic mulches. Compost Utilization in Horticultural Cropping Systems, p. 275–286.

Pane C, Piccolo A, Spaccini R, Celano G, Villecco D and Zaccardelli M, 2013. Agricultural waste-based composts exhibiting suppressivity to diseases caused by the phytopathogenic soil-borne fungi Rhizoctonia solani and Sclerotinia minor. Applied Soil Ecology. 65: 43–51.

Raviv M, Medina S, Krasnovsky A and Ziadna H. 2002. Conserving nitrogen during composting. Biocycle, 43(9): 48–50.

Rorison A. 1987. Method Sheet 3 Nutrient solution. Recipe obtained from Sheffield University.

Salehrastin N. 2003. Biological fertilizers and their role in sustainable agriculture .Compilation and collection for the production of biological fertilizers in Iran.p. 1-54. (In Persian).

Sarikhani MR, Ebrahimi M. 2011. Phosphate Biofertilizers (Phosphate solubilizing bacteriaMycorrhizal fungi). The 1st Iranian Fertilizer Challenges congress: Half a century of the fertilizer consumption. 29 February-2 March, Tehran, Iran. (In Persian).

Shinohara Y, Hata T, Maruo T, Hohjo M and Ito T. 1999. Chemical and physical properties of the coconut-fiber substrate and the growth and productivity of tomato (*Lycopercicon esculentum* Mill.) plants. *Acta* Horticulturae 481: 145-150.

Silva FSB, Yano-Melo AM, Maia LC, 2007. Production and infectivity of inoculum of arbuscular mycorrhizal fungi multiplied in a substrate supplemented with Tris-HCl buffer. Brazilian Journal of Microbiology. 38: 752-755.

Smith S and Read D. 2008. Mycorrhizal symbiosis. Third Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam.

Schnitzer M. 1982. Organic matter characterization. Pp 581-594. in Methods of Soil Analysis, Part 2, Chemical and Microbiological properties, American Society of Agronomy- Soil Science Society of America, Madison, Wisconsin.

Swift CE. 2004. Mycorrhiza and Soil Phosphorus Levels. www.colostaate.edu.

Tavassolli A. 2012. Investigation of interactions and pattern of establishment of arbuscular mycorrhizal fungi in chickpea root with the presence of different isolates of mesorizobium Ciceri using molecular methods. Ph.D Thesis, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz-Iran. (In Persian).

Treseder KK. 2004. A meta-analysis of mycorrhizal responses to nitrogen, phosphorus, and atmospheric co_2 in field studies. New Phytologist. 164: 347–355.

Treseder KK and Allen MF. 2002. Direct nitrogen and phosphorus limitation of arbuscular mycorrhizal fungi: a model and field test. New Phytologist. 155: 507–515.

Tufail M, Nawaz Kh and Usman M. 2014. Impact of Humicacid on the Morphology and Yeild of Wheat (*Triticum aestivum* L.). World Applied Sciences, 4: 475-480.

Vaidya GS, Shrestha K, Khadge BR, Johnson NC, Wallander H. 2008. Organic matter stimulates bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi in Bauhinia purpurea and Leucaena diversifolia plantations on eroded slopes in Nepal. Restor. Ecology, 16: 79-87.

Vakilli M. 2018. The effect of humic acid on mycorrhizal symbiosis in tomato in vitro and pot culture. Master Thesis, Agriculture Faculty, University of Tabriz. (In Persian).

Verdonck O, Rd P, De-Boodt M. 1983. The physical properties of different horticultural substrates. In: International Symposium on Substrates in Horticulture other than Soils In Situ. 150: 155–160.

Williams SCK, Vestberg M, Uosukainen M, Dodd J and Jeffries P. 1992. Effects of fertilizers and arbuscular mycorrhizal fungi on the post-vitro growth of micropropagated strawberry. Agronomie. V(12).

Yahya A, Shaharom AS, Mohamad R and Selamat A. 2009. Chemical and physical characteristics of cocopeatbased media mixtures and their effects on the growth and development of (*Celosia cristata)*. American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 4(1): 63-71.

Yang W, Gu S, Xin Y, Bello A, Sun W and Xu X. 2018. Compost addition enhanced hyphal growth and sporulation of Arbuscular mycorrhizal fungi without affecting their Community Composition in the Soil. Frontiers in Microbiology, 9: 169.

Yari M, Rahimi Gh, Moradi S, Ebrahimi A and Sadeghi S. 2017. Investigation of the effect of municipal waste compost application on the classification of some heavy metals in three soil texture classes. Journal of Water and Soil, 3: 3.

Zapata JAR, Guadarrama P, Alberto JAN and Orellana R. 2011. Arbuscular mycorrhizal propagules in soils from a tropical forest and an abandoned cornfield in Quintana Roo, Mexico: Visual comparison of most-probable-number estimates. Mycorrhiza, 2: 139-44.

Zhu Y-G, Miller RM. 2003. Carbon cycling by arbuscular mycorrhizal fungi in soil plant systems. Trends in Plant Science, 8(9): 407-409.