

Evaluation of Phosphate Solubilizing and Potassium Releasing Ability of Some *Trichoderma* Species under *in-vitro* Conditions

SAFOORA NAHIDAN^{1*}, SHAMSI HASHEMI², DOSTMORAD ZAFARI³

1. Assistant Professor of Soil Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

2. Ph.D. student of Soil Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

3. Professor of Plant Patology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

(Received: Nov. 14, 2018- Revised: Jan. 10, 2019- Accepted: Jan. 12, 2019)

ABSTRACT

The deficiency of macro-nutrients such as phosphorus and potassium is very important due to vital roles of these elements. Although the total amount of phosphorus and potassium in the soil is high, the formation of insoluble forms of phosphorus, as well as the stabilization of potassium in silicates, has led to the shortage of these essential elements. The use of microorganisms, having the ability to dissolve insoluble phosphate forms and potassium fixed in silicates, can be effective in reducing the deficiency of these elements for the plant. In this research, 7 species of *Trichoderma* fungi were selected and their effects on the release of phosphorus and potassium were evaluated in Pikovskaya's, Alexandrov's and modified Pikovskaya's media. The results showed that in Pikovskaya's broth medium, phosphorus release rate by different species of fungi was consistent with decreasing pH. *Trichoderma koningii*, *T.harzianum*, *T.citrinoviride* and *T.viridescens* had the most phosphate solubilizing ability and increased soluble phosphorus by 244, 205, 191 and 190%, respectively. In both Aleksandrov's and modified pikovskaya's media, which contain both insoluble inorganic phosphate and potassium as biotite, it was observed that the dissolution rate of tri-calcium phosphate was lower than that of pikovskaya's medium which has available potassium. *T.koningii* in Aleksandrov's medium and *T.harzianum* in modified Pikovskaya's medium had the highest ability to release potassium from biotite. These species increased potassium in solution by 123 and 20% compared to control, respectively. In general, the results showed that *Trichoderma* fungi has the ability to solubilize phosphate from tri-calcium phosphate and release potassium from biotite under *in-vitro* conditions.

Keyword: Phosphate solubilization, potassium release, biotite, *Trichoderma* spp.

ارزیابی توان تعدادی از گونه‌های تریکودرما در انحلال فسفات و آزادسازی پتاسیم در شرایط درون‌شیشه‌ای

صفورا ناهیدان^{۱*}، سیده شمسی هاشمی^۲، دوستمراد ظفری^۳

۱. استادیار گروه خاکشناسی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۲. دانشجوی دکترای گروه خاکشناسی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۳. استاد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۸/۲۳ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۱۰/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۲۲

چکیده

کمبود عناصر غذایی پرمصرف از جمله فسفر و پتاسیم به دلیل نقش‌های مهم و حیاتی این عناصر بسیار مورد توجه می‌باشد. اگرچه مقدار کل فسفر و پتاسیم در خاک زیاد می‌باشد ولی ایجاد شکل‌های نامحلول فسفر و همچنین تثبیت شدن پتاسیم در سیلیکات‌ها، منجر به کمبود این عناصر ضروری شده است. استفاده از میکروارگانیسم‌های دارای توان انحلال شکل‌های فسفات نامحلول و پتاسیم تثبیت شده در سیلیکات‌ها می‌تواند در رفع کمبود این عناصر برای گیاه موثر باشند. در پژوهش اخیر، ۷ گونه قارچ تریکودرما انتخاب و تاثیر آن‌ها بر آزادسازی فسفر و پتاسیم در سه محیط کشت پیکوفسکایا، پیکوفسکایای تغییر یافته و الکساندروف مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که در محیط کشت مایع پیکوفسکایا میزان آزادسازی فسفر از منبع فسفر معدنی نامحلول (تری کلسیم فسفات) توسط تریکودرما، هم‌سو با کاهش pH بود. گونه‌های *Trichoderma* ترتیب به میزان ۲۴۴، ۲۰۵، ۱۹۱ و ۱۹۰ درصد نسبت به شاهد افزایش دادند. دو محیط کشت الکساندروف و پیکوفسکایای تغییر یافته علاوه بر فسفات معدنی نامحلول، دارای پتاسیم از منبع بیوتیت نیز بودند. مشاهده شد که میزان آزادسازی فسفر در این دو محیط نسبت به محیط کشت پیکوفسکایا که دارای پتاسیم قابل دسترس می‌باشد، کمتر است. *T.koningii* در محیط الکساندروف و *T.harzianum* در محیط پیکوفسکایای تغییر یافته نیز بیشترین توان آزادسازی پتاسیم از بیوتیت را داشتند. این گونه‌ها پتاسیم محلول را به میزان ۱۲۳ و ۲۰ درصد نسبت به شاهد افزایش دادند. به طور کلی نتایج نشان داد که گونه‌های قارچ تریکودرما دارای توانایی انحلال فسفات از تری کلسیم فسفات و آزادسازی پتاسیم از بیوتیت در شرایط درون شیشه‌ای می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: انحلال فسفات، آزادسازی پتاسیم، بیوتیت، تریکودرما

مقدمه

بوده است. غیرمتحرک شدن فسفر در خاک می‌تواند به دلیل تشکیل فسفات‌های آلومینیوم یا آهن در خاک‌های اسیدی یا فسفات‌های کلسیم و منیزیم در خاک‌های قلیایی انجام شود که منجر به کاهش حاصلخیزی خاک و بازدهی محصولات زراعی می‌شود (Rfaki et al., 2014; Khan et al., 2010). پتاسیم نیز همانند فسفر ماده مغذی مهم برای رشد و توسعه بیولوژیکی گیاهان به شمار می‌رود (Zorb et al., 2014). پتاسیم نقش کلیدی در رشد، متابولیسم و توسعه گیاهان دارد. کاهش مقدار پتاسیم در خاک باعث ضعیف شدن ریشه‌های گیاهان و تولید دانه‌های کوچک شده که در نهایت باعث رشد آرام و کاهش عملکرد گیاهان می‌شود (Singh Meena et al., 2014). با وجود آن که پتاسیم کل در خاک بیش‌تر از نیاز گیاه است ولی قسمت کوچکی از آن برای گیاه قابل دسترس است. بیش از ۹۸ درصد

فسفر پس از نیتروژن به‌عنوان دومین عنصر پرمصرف ضروری برای رشد گیاهان می‌باشد (Sharma et al., 2013). فسفر در فتوسنتز، توسعه ریشه، تامین انرژی، تولید قند و تجزیه آن، تولید اسیدهای نوکلئیک، نقل و انتقال مواد مغذی در داخل گیاه، انتقال خصوصیات ژنتیکی و تنظیم فرآیندهای سوخت و ساز دخالت دارد. همچنین فسفر موجب افزایش استحکام ساقه غلات، تشکیل گل، دانه و یا میوه می‌شود (Kuhad et al., 2011; Sharma et al., 2011). اگرچه غلظت کل فسفر معمولاً در خاک زیاد است، ولی در مقایسه با سایر عناصر غذایی در خاک تحرک و قابلیت جذب کمتری برای گیاه دارد. مسئله کمبود فسفر حتی در صورت استفاده مکرر، بی‌رویه و نامعقول از کودهای شیمیایی فسفره به دلیل بازیابی تنها ۱۰-۳۰ درصدی این کودها برای گیاه مطرح

گیاه هم کمک می کند (Dennis and Webster, 1971). تا به امروز اکثر تحقیقات در مورد تریکودرما برکنترل بیولوژیکی آن‌ها متمرکز بوده است، در حالی که استفاده از این قارچ برای تغذیه گیاهی کمتر مورد مطالعه قرار گرفته است (Rui-Xia *et al.*, 2015). طی یافته‌های Benitez *et al.* (2004) و Vinale *et al.* (2008) ثابت شده است که این گونه‌های قارچی با ترشح اسیدهای آلی نظیر گلوکونیک اسید، سیتریک اسید و فوماریک اسید باعث کاهش pH خاک و در نهایت افزایش انحلال و جذب عناصر غذایی مهم مورد نیاز برای رشد گیاه هم‌چون فسفر، آهن، منگنز و منیزیم می‌شوند (Yedidia *et al.*, 2001). Rui-*et al.* (2015) Xia توان قارچ تریکودرما در افزایش قابلیت دسترسی عناصر فسفر، آهن، منگنز، مس و روی برای گیاه گوجه فرنگی را گزارش کردند و علت این مسئله را به توانایی این قارچ از طریق ۴ مکانیسم، اسیدی کردن از طریق تولید اسیدهای آلی، کلاته کردن به‌وسیله سیدروفورها، اکسیداسیون و احیاء به‌وسیله آهن و هیدرولیز توسط آنزیم فیتاز نسبت دادند.

در پژوهش حاضر، پتانسیل گونه‌های قارچ تریکودرما در حل‌کنندگی تری‌کلسیم فسفات به‌عنوان منبع فسفر معدنی نامحلول در حضور پتاسیم قابل دسترس و یک منبع غیرقابل دسترس آن (بیوتیت) مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین رهاسازی پتاسیم از کانی بیوتیت توسط گونه‌های قارچ تریکودرما در حضور تری‌کلسیم فسفات بررسی شد.

مواد و روش‌ها

گونه‌های قارچ مورد استفاده

تعداد ۷ گونه قارچ تریکودرما شامل *Trichoderma asperellum*، *T. citrinoviride*، *T. brevicompactum*، *T. atroviride*، *T. viridescens*، *T. koningii*، *T. harzianum* از کلکسیون قارچی گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا همدان اخذ شد. برای تکثیر مجدد گونه‌های تریکودرما ای اخذ شده از محیط کشت^۱ PDA استفاده شد.

پیش تیمار اولیه بیوتیت قبل از استفاده در محیط‌های کشت با توجه به غنی بودن کانی‌های میکا از نظر پتاسیم قابل استفاده (محلول و تبادل) قبل از استفاده آن‌ها در محیط‌های کشت (الکساندروف و پیکوفسکایای تغییر یافته) اعم از محیط‌های کشت جامد و مایع، کانی‌ها پیش تیمار شدند. بدین منظور ۰/۴ گرم از پودر کانی در ۳۰ میلی‌لیتر کلریدریک اسید ۰/۱ مولار به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵۰ دور در دقیقه تکان داده شد. بعد از سانتریفیوژ

پتاسیم خاک به شکل تثبیت شده در سیلیکات‌ها بوده که نمی‌تواند مستقیماً توسط گیاهان جذب شود (Sugumaran and Janarthanam, 2007). با وجود مصرف بسیار کودهای شیمیایی هم‌چنان مشکلات زراعی قابل توجهی در خصوص کمبود مواد مغذی وجود دارد (De Santiago *et al.*, 2013). در سال‌های اخیر استفاده از میکروارگانیسم‌های آزاد کننده فسفر و پتاسیم از منابع نامحلول مانند خاک فسفات (Chai *et al.*, 2011)، میکا (مثل بیوتیت و مسکوویت)، ایلیت و دیگر کانی‌های دارای پتاسیم مثل فلدسپارها (Bennett *et al.*, 1998) در راستای کشاورزی پایدار به‌منظور افزایش قابلیت دسترسی به این عناصر مورد توجه قرار گرفته است. چندین گروه از میکروارگانیسم‌ها شامل قارچ‌ها، باکتری‌ها و اکتینومیست‌ها دارای توان حل‌کنندگی فسفر از منابع نامحلول می‌باشند (Sheng, 2005). Nahas (1996) و Rajankar *et al.* (2007) به توانایی بیش‌تر قارچ‌ها نسبت به باکتری‌ها در حل‌کردن فسفات معدنی نامحلول اشاره کرده‌اند. گزارش شده است که قارچ‌ها با ایجاد هیف و دسترسی آسانتر به فواصل دورتر خاک، همچنین تولید و ترشح بیشتر اسیدهای آلی نسبت به باکتری‌ها می‌توانند نقش مهمی در حل کردن فسفر نامحلول در خاک داشته باشند. تولید مواد کلات‌کننده فلزات و اسیدهای معدنی از جمله سولفوریک اسید، نیتریک اسید و کربونیک اسید، همچنین تولید پروتون و دی‌اکسید کربن توسط میکروب‌ها نیز از عواملی است که بر حل شدن فسفر معدنی نامحلول موثر هستند (Sharma *et al.*, 2013). شواهدی نیز در ارتباط با توانایی قارچ‌ها در آزادسازی پتاسیم وجود دارند (Meena *et al.*, 2014). میکروارگانیسم‌های آزاد کننده پتاسیم از کانی‌ها نیز با کاهش pH، تولید اسیدهای آلی و پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی و کلات کردن کاتیون‌های همراه با پتاسیم به افزایش رهاسازی پتاسیم تثبیت شده در کانی‌ها کمک می‌نمایند (Sarikhani *et al.* 2018).

تریکودرما (*Trichoderma*) از جمله قارچ‌های متداول خاک بوده که در اکوسیستم اطراف ریشه میزبان به وفور یافت می‌شوند (Harman *et al.*, 2004). گونه‌های این قارچ به‌عنوان عوامل کنترل زیستی پاتوژن‌های گیاهی خاک شناخته شده‌اند. علاوه بر این برخی از گونه‌های آن می‌توانند به طور مستقیم با ریشه گیاه تعامل داشته و رشد گیاه و تحمل به تنش‌های زیستی را بهبود بخشند (Yedidia *et al.*, 2001). تولید ترکیبات فرار و آنتی‌بیوتیک‌های متنوع توسط این قارچ نه‌تنها باعث حفاظت گیاه در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌شود بلکه به کلونیزه شدن

تری کلسیم فسفات به عنوان تنها منبع فسفر استفاده شده بود (مطابق جدول ۱). در این آزمون از میسلیوم های قارچی رشد یافته در محیط کشت PDA، قطعاتی به قطر ۵ میلی متر برداشته و در ظروف پتری حاوی محیط های کشت مورد نظر قرار داده شد. سپس ظروف پتری در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده و تشکیل هاله شفاف اطراف کلنی ها به صورت روزانه بررسی شد (Cottenie, 1980). از آن جایی که در دو محیط کشت الکساندروف و پیکوفسکایای تغییر یافته از تری کلسیم فسفات و بیوتیت به ترتیب به عنوان منبع فسفر و پتاسیم نامحلول استفاده شده است می توان چنین بیان کرد که تشکیل هاله در آن ها ممکن است به انحلال هر دو عنصر فسفر و پتاسیم نامحلول مرتبط باشد. لذا بررسی آزمون کمی الزامی است.

نمودن در ۶۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه، محلول رویی دور ریخته شد. مجدداً کانی در ۳۰ میلی لیتر آب مقطر تکان داده شد و پس از سانتریفیوژ در شرایط فوق، محلول رویی آن دور ریخته شد. کانی جمع آوری شده به مدت ۱ شب در دمای ۸۰ درجه سلسیوس خشک و سپس به مقدار لازم در محیط کشت استفاده گردید (Sarikhani, et al., 2013).

آزمون کیفی انحلال فسفات معدنی نامحلول (تری کلسیم فسفات) و رهاسازی پتاسیم از بیوتیت
قابلیت انحلال فسفات معدنی نامحلول توسط هر کدام از گونه ها در محیط کشت جامد الکساندروف^۱ و پیکوفسکایا^۲ و پیکوفسکایای تغییر یافته (بیوتیت جایگزین کلرید پتاسیم شده است) ارزیابی شد که در این محیط های کشت از ترکیب

جدول ۱- اجزای محیط کشت های مورد استفاده در آزمون ها

منابع	اجزای محیط کشت (g/l)	محیط کشت
Aleksandrov et al., 1967	Glucose, 5; Ca ₃ (PO ₄) ₂ , 2; MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.5; FeCl ₃ , 0.005; CaCO ₃ , 0.1; Mica, 2	Aleksandrov
Pikovskaya, 1948	Glucose, 10; Ca ₃ (PO ₄) ₂ , 5; MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.1; (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.5; yeast extract, 0.5; KCl, 0.2; NaCl, 0.2; FeSO ₄ , 0.002; MnSO ₄ .7H ₂ O, 0.002	Pikovskaya
تغییر یافته توسط پژوهشگر	Glucose, 10; Ca ₃ (PO ₄) ₂ , 5; MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.1; (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.5; yest extract, 0.5; Mica, 2; NaCl, 0.2; FeSO ₄ , 0.002; MnSO ₄ .7H ₂ O, 0.002	modified Pikovskaya

در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه گیری شد (Deaker et al., 2011). همچنین میزان پتاسیم آزاد شده از بیوتیت نیز در محیط کشت های حاوی آن (الکساندروف و پیکوفسکایای تغییر یافته) توسط فلیم فتومتر مورد اندازه گیری قرار گرفت. در نهایت pH محیط های کشت نیز توسط دستگاه pH متر بررسی شد.

آنالیز آماری

هفت گونه تریکودرما به عنوان تیمارهای آزمایشی با در نظر گرفتن سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی آزمون شدند. آنالیز داده ها با نرم افزار SPSS و ترسیم نمودارها با Excel انجام گرفت. مقایسات میانگین بین گونه ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

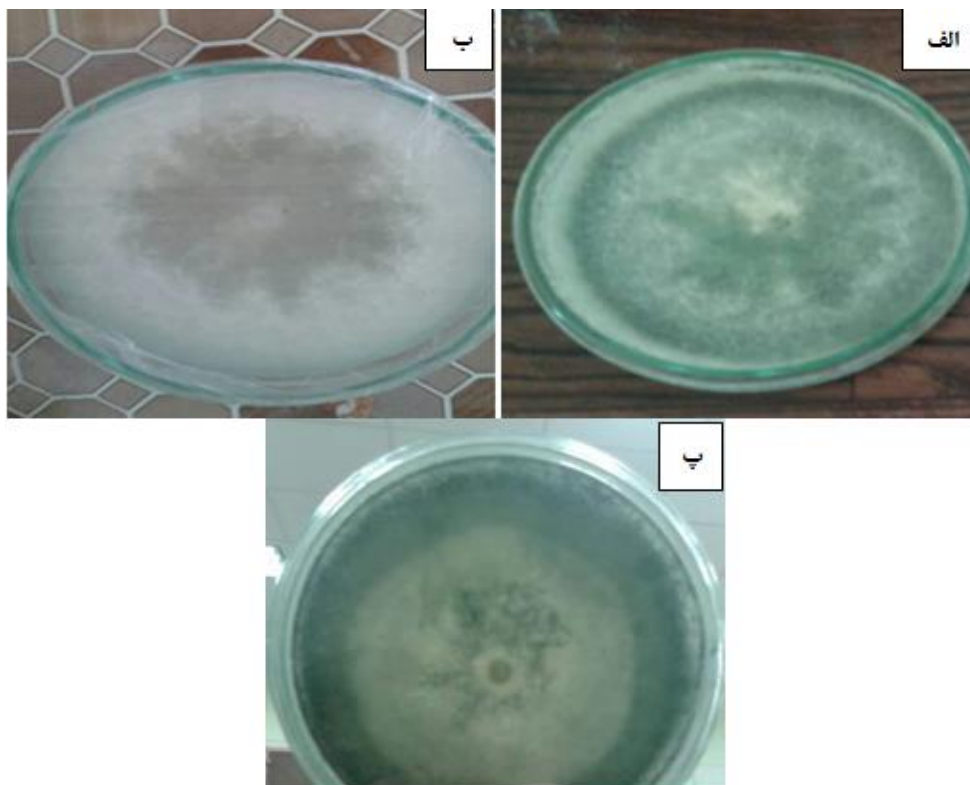
نتایج و بحث

آزمون کیفی انحلال فسفات معدنی نامحلول و رهاسازی پتاسیم تثبیت شده در بیوتیت
نتایج نشان داد که در محیط های کشت الکساندروف و پیکوفسکایای تغییر یافته، هاله شفاف مبنی بر انحلال فسفات نامحلول و یا پتاسیم توسط گونه های قارچ دیده نشد. اما نتایج

آزمون کمی انحلال فسفات معدنی نامحلول (تری کلسیم فسفات) و رهاسازی پتاسیم از بیوتیت
در این مرحله برای بررسی دقیق تر میزان انحلال فسفات نامحلول توسط گونه های تریکودرما، قطعاتی به قطر ۵ میلی متر از میسلیوم های قارچی رشد یافته در محیط کشت PDA، به ارلن های حاوی ۲۵ میلی لیتر از محیط های کشت مایع پیکوفسکایا، الکساندروف و پیکوفسکایا تغییر یافته منتقل گردیدند و سپس به همراه نمونه شاهد (بدون تلقیح قارچ تریکودرما) در سه تکرار در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد و سرعت ۱۲۰ rpm تکان داده شدند (Cottenie, 1980). مدت زمان گرماگذاری برای محیط های کشت پیکوفسکایا، پیکوفسکایا تغییر یافته و الکساندروف به ترتیب ۵، ۸ و ۱۰ روز بر اساس سرعت رشد قارچ انتخاب شد. بعد از اتمام دوره آزمایش، کل محیط کشت سانتریفیوژ (۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه) و سپس با کاغذ صافی واتمن هیفها، اسپورها و فسفات نامحلول باقیمانده از سوسپانسیون جداسازی شد. سپس از سوسپانسیون های حاصل به مقدار ۲ میلی لیتر برداشته و پس از ۵ بار رقیق سازی با آب مقطر، مقدار فسفر در مایع صاف رویی به روش وانادات مولیبدات

تأثیرگذار باشد. همچنین آمونیوم می‌تواند مدت زمان فاز تاخیری که قارچ قبل از شروع حل کردن فسفات نامحلول نیازمند است را کاهش دهد. این پژوهشگران بیان کردند که مکانیزم حل کردن خاک فسفات در بودن و نبودن آمونیوم متفاوت است و تنها گونه *P. biliaji* قادر است در نبود آمونیوم با کاهش pH توانایی انحلال فسفات از خاک فسفات را داشته باشد. در پژوهش حاضر نیز ترکیب دو محیط پیکوفسکایا و الکساندروف متفاوت می‌باشند و پیکوفسکایا محیط غنی‌تری از نظر کربن و نیتروژن است. از طرفی تغییر منبع پتاسیم از کلرید پتاسیم در پیکوفسکایا به بیوتیت در محیط کشت پیکوفسکایای تغییر یافته نیز نشان می‌دهد که کمبود پتاسیم می‌تواند مانعی بر تشکیل هاله باشد. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که صرف نظر از عناصر دیگر، پتاسیم نیز عاملی مهم بر فیزیولوژی و عملکرد قارچ تریکودرما می‌باشد. با وجود چنین مسائلی، بیان شده است که عدم تشکیل هاله شفاف در محیط کشت جامد نشان دهنده نبود توانایی انحلال فسفات نامحلول یا پتاسیم تثبیت شده در کانی‌ها توسط میکروارگانیسم‌ها نمی‌باشد و می‌بایست چنین عملکردی به صورت کمی در محیط کشت مایع نیز بررسی و اثبات گردد (Khoshru et al., 2015).

کشت گونه‌های قارچی در محیط کشت پیکوفسکایا، منجر به تشکیل هاله‌ای نسبتاً شفاف در اطراف کلنی‌های قارچی شد (شکل ۱). بنابراین چنین به نظر می‌رسد که محیط کشت پیکوفسکایا (حاوی تری کلسیم فسفات) به منظور بررسی کیفی توان انحلال فسفر معدنی نامحلول توسط گونه‌های قارچ تریکودرما می‌تواند مناسب‌تر از سایرین باشد. Fadhli and Al.Hadithi (2016)، هاله شفاف در اطراف کلونی قارچ‌های تریکودرما و *آسپرژیلوس* را در محیط کشت جامد نشان‌دهنده توانایی قارچ‌ها در انحلال فسفات معدنی نامحلول دانستند. تشکیل هاله در یک محیط کشت و عدم تشکیل آن در دو محیط دیگر می‌تواند به ترکیب عناصر و مقادیر متفاوت آن‌ها و تأثیری که می‌توانند بر توان رشد و متابولیسم میکروارگانیسم بگذارد نسبت داده شود. (Nautiyal, 1999). (Nautiyal, 1999) بیان کرد که محیط کشت^۱ NBRIP نسبت به پیکوفسکایا به دلیل نداشتن عصاره مخمر برای بررسی توان حل‌کنندگی فسفر نامحلول و تشکیل هاله شفاف توسط باکتری *سودوموناس* مناسب‌تر می‌باشد. همچنین Asea et al. (1988) مشاهده کردند که بود و نبود آمونیوم در محیط کشت می‌تواند بر توان انحلال فسفر نامحلول از خاک فسفات توسط دو گونه *Penicillium biliaji* و *P. fuscum*



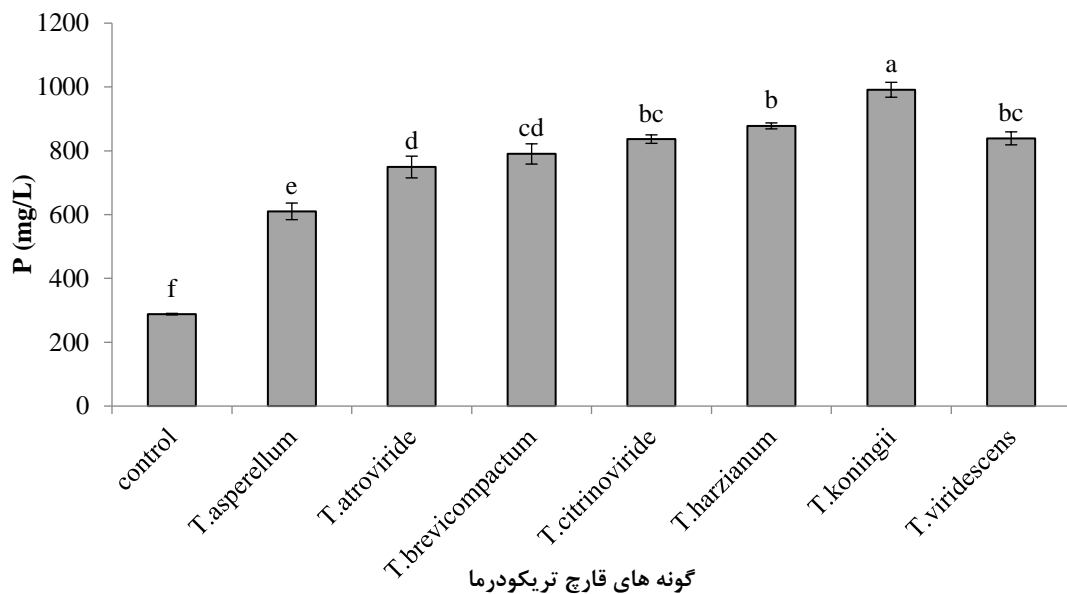
شکل ۱- گونه‌های قارچ تریکودرما می‌کشت شده در الف) محیط کشت الکساندروف، ب) پیکوفسکایای تغییر یافته و پ) پیکوفسکایا

آزمون کمی انحلال فسفات معدنی نامحلول

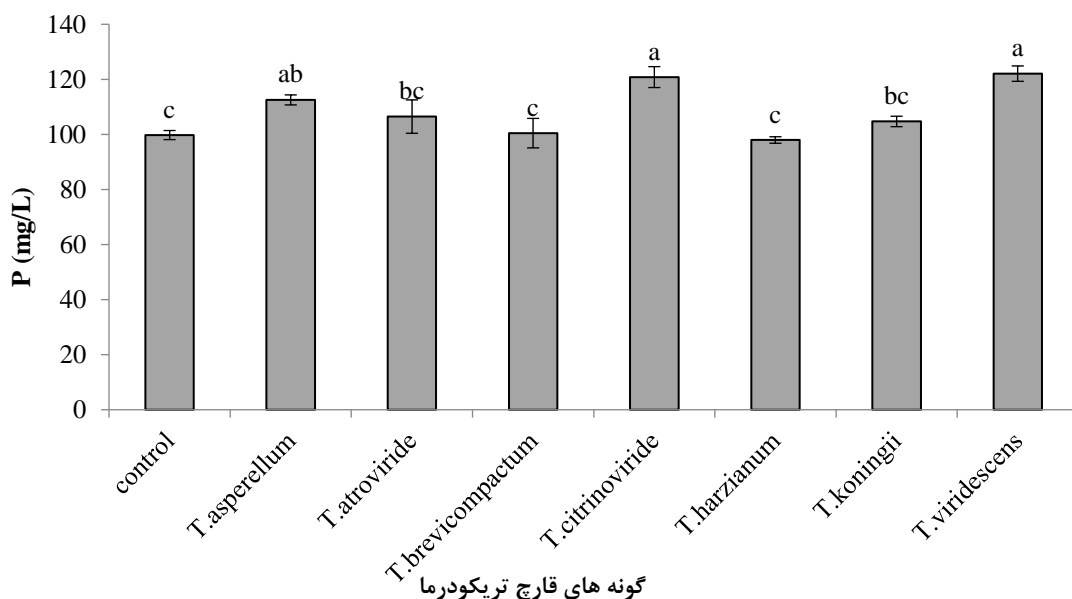
نتایج تجزیه واریانس در سه محیط کشت پیکوفسکایا، الکساندروف و پیکوفسکایای تغییر یافته نشان داد که نوع گونه‌های تریکودرما بر فسفر محلول در محیط کشت تاثیر معنی‌داری می‌گذارد ($P < 0.001$).

آزمون میانگین‌ها نشان داد که گونه‌های قارچ باعث افزایش معنی‌دار غلظت فسفر محلول در محیط کشت مایع پیکوفسکایا شدند. در بین تیمارهای قارچی، بیشترین و کمترین میزان فسفر

محلول به ترتیب در حضور گونه‌ی *T.koningii* (۹۹۱/۲۰۲) میلی‌گرم بر لیتر) و *T.asperellum* (۶۱۰/۲۵۸ میلی‌گرم بر لیتر) مشاهده شد (شکل ۲). در محیط کشت مایع الکساندروف نیز مشاهده شد که تنها گونه‌های *T.viridescens* و *T.citrinoviride* میزان فسفر محلول را نسبت به شاهد افزایش معنی‌داری دادند؛ بدین صورت که میزان فسفر محلول در حضور این گونه‌ها به ترتیب برابر ۱۲۲/۰۵۹ و ۱۲۰/۸۱۷، ۱۱۲/۵۱۶ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل ۳).



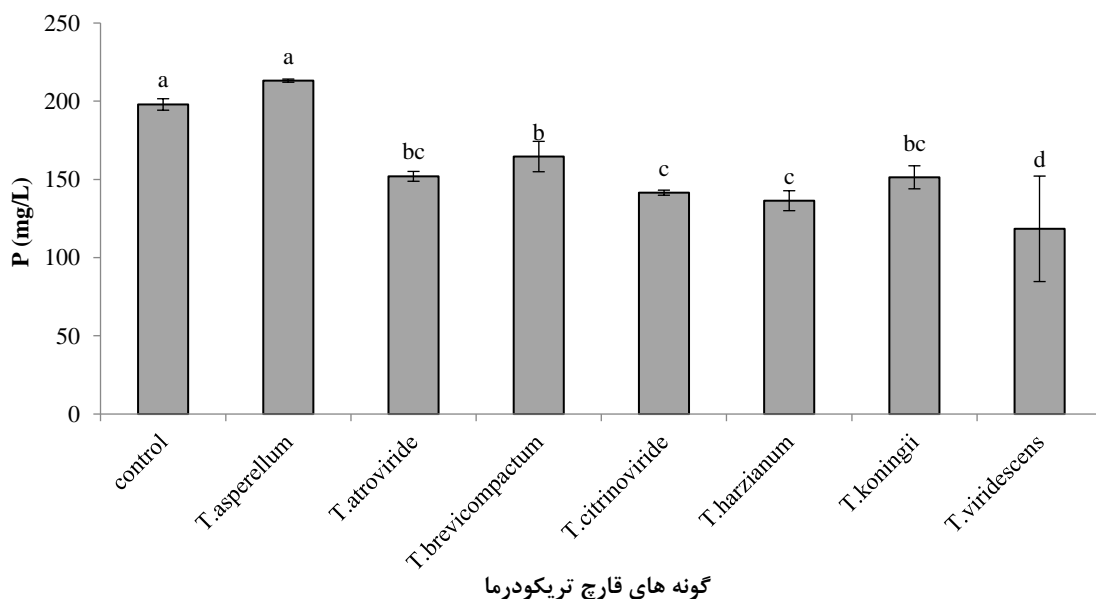
شکل ۲- میزان انحلال فسفات معدنی گونه‌های قارچ تریکودرما در روش ارزیابی کمی در محیط کشت پیکوفسکایا (حروف مشابه نشان‌دهنده نبود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد)



شکل ۳- میزان انحلال فسفات معدنی گونه‌های قارچ تریکودرما در روش ارزیابی کمی در محیط کشت الکساندروف (حروف مشابه نشان‌دهنده نبود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد)

تولید ترکیبات کلات کننده و فعالیت ردکس نسبت داده شده است (Altomare *et al.*, 1999).

آزمون میانگین های تاثیر گونه های قارچ بر غلظت فسفر محلول در محیط کشت مایع پیکوفسکایای تغییر یافته نشان داد که بین گونه ها از لحاظ تاثیر آن ها بر غلظت فسفر محلول تفاوت معنی داری وجود دارد. نتایج گویای آن بود که بین میزان فسفر محلول در تیمار شاهد و گونه *T. asperellum* تفاوت معنی داری وجود ندارد. با وجود این، میزان فسفر محلول در حضور سایر گونه های قارچ تریکودرما نسبت به شاهد کمتر بود. کم ترین میزان غلظت فسفر در محیط کشت در حضور گونه *T. viridescens* (۱۱۸/۴۴۶ میلی گرم بر لیتر) مشاهده شد (شکل ۴). البته باید توجه داشت که کاهش میزان فسفر محلول در اثر وجود قارچ به معنای عدم حلالیت فسفات توسط آن ها نمی باشد. این مسئله نشان می دهد که احتمالاً قارچ از فسفر آزاد شده به منظور رشد و تغذیه خود در این محیط کشت استفاده کرده و در بخش های درونی و یا بر روی هیف های خود تجمع داده است.



شکل ۴- میزان انحلال فسفات معدنی گونه های قارچ تریکودرما در روش ارزیابی کمی در محیط کشت پیکوفسکایای تغییر یافته (حروف مشابه نشان دهنده نبود تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن می باشد)

محیط کشت پیکوفسکایا و پیکوفسکایای تغییر یافته که تنها تفاوت آن ها منبع پتاسیم آن ها می باشد نشان می دهد که حضور بیوتیت به عنوان یک منبع پتاسیم نامحلول بر توان گونه های تریکودرما در انحلال فسفات از منبع تری کلسیم فسفات تاثیر می گذارد و آن را کاهش می دهد. با وجود این، Sarikhani *et al.*

Garcia-Lopez *et al.* (2015) گزارش کردند که گونه

T. asperellum در محیط کشت مایع الکساندروف توانایی افزایش میزان فسفر را داشت که نشان دهنده انحلال فسفر از تری کلسیم فسفات استفاده شده در این محیط می باشد. (2005) Rudresh *et al.* بیان کردند که *T. harzianum*، *T. viride* و *T. hamatum* در محیط کشت پیکوفسکایا قادر به انحلال تری کلسیم فسفات می باشند. Rui-Xia *et al.* (2015) نیز گزارش کردند که *T. harzianum* در محیط کشت SY¹ حاوی تری کلسیم فسفات، دارای توانایی انحلال فسفر می باشد. همچنین Saravanakumar *et al.* (2013) توانایی انحلال تری کلسیم فسفات در محیط کشت NBRIP توسط ۱۰ جدایه از تریکودرما را گزارش کردند و در بین جدایه ها، جدایه های TSH8 و TSH9 به ترتیب با میزان ۲۹ و ۲۶ درصد نسبت به سایر جدایه ها بیشترین توان انحلال فسفات نامحلول را داشتند. توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول توسط تریکودرما به سه مکانیسم اصلی کاهش pH به وسیله ترشح انواع اسیدهای آلی،

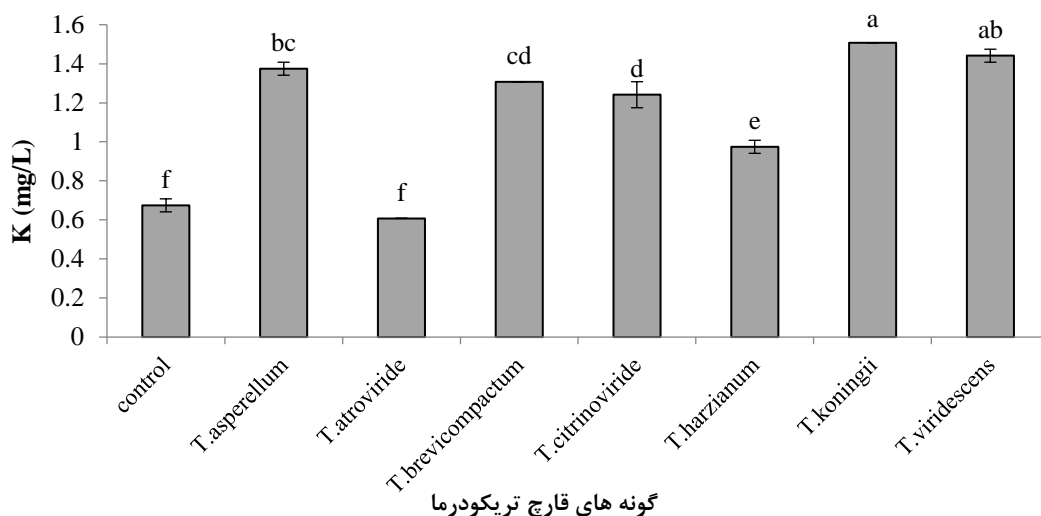
نتایج مقایسه سه محیط کشت مایع نشان می دهد که میزان انحلال فسفر نامحلول توسط گونه های تریکودرما در محیط کشت پیکوفسکایای تغییر یافته و الکساندروف کم تر از محیط کشت پیکوفسکایا می باشد. پیش از این نیز بیان گردید که هاله شفاف تنها در محیط کشت پیکوفسکایا دیده شد (شکل ۱). مقایسه دو

که فیزیولوژی گونه‌های متفاوت قارچ *تریکودرما* به ترکیبات و مقادیر مورد استفاده در محیط کشت نیز وابسته است. در این ارتباط *Sharma et al.* (2013) بیان کردند که تعدادی از باکتری-ها و قارچ‌ها (حتی در سطح گونه) فسفر را تنها در حضور آمونیوم معدنی می‌کنند. بدین صورت که با جذب آمونیوم از محیط و پمپاژ هیدروژن به بیرون از سلول باعث اسیدی شدن محیط و انحلال فسفات نامحلول می‌شوند. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که نوع ترکیبات محیط کشت بر مکانیزم آزادسازی فسفات از منابع نامحلول آن توسط گونه‌های مختلف قارچ می‌تواند متفاوت باشد.

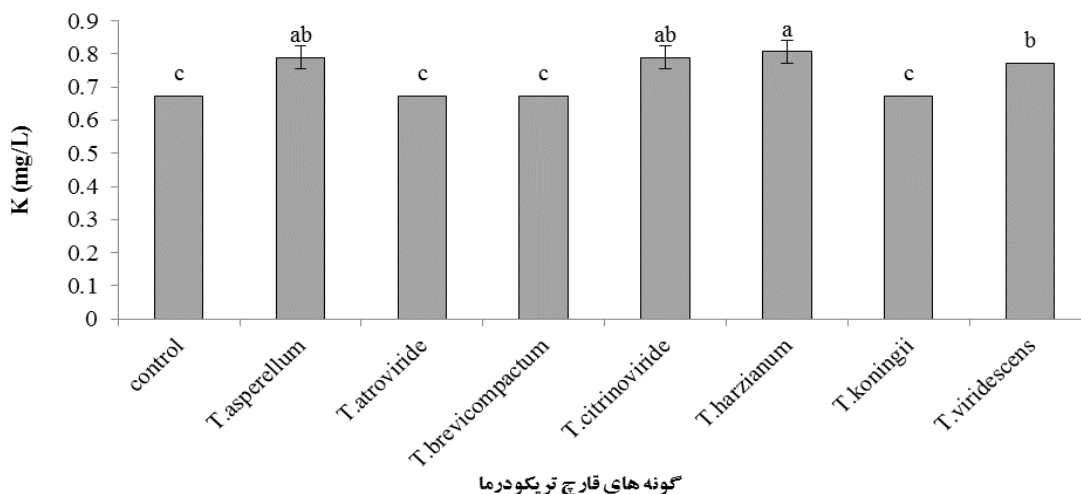
آزمون کمی رهاسازی پتاسیم از کانی بیوتیت

نتایج تجزیه واریانس در دو محیط کشت الکساندروف و پیکوفسکایای تغییر یافته نشان داد که نوع گونه‌ها بر میزان پتاسیم محلول در محیط کشت تاثیر معنی‌داری می‌گذارند ($P < 0.001$). آزمون میانگین‌ها نشان داد که در محیط الکساندروف، گونه‌های مورد آزمایش اثر معنی‌داری بر رهاسازی پتاسیم از بیوتیت داشتند. بیش‌ترین میزان پتاسیم محلول در حضور گونه‌های *T.koningi*، *T. viridescens* به ترتیب برابر ۱/۵۰۸ و ۱/۴۴۱ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین میزان پتاسیم محلول در حضور گونه *T. atroviride* برابر با ۰/۶۹۰ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد که با شاهد بدون قارچ تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۵). آزمون میانگین‌ها در محیط کشت پیکوفسکایای تغییر یافته نیز نشان داد که بیش‌ترین میزان پتاسیم محلول در حضور گونه‌های *T.harzianum*، *T.citrinoviride* و *T.asperellum* به ترتیب برابر ۰/۸۰۶، ۰/۷۸۹ و ۰/۷۸۹ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده می‌شود. کمترین میزان پتاسیم محلول نیز در حضور گونه‌های *T. atroviride*، *T.koningi* و *T.brevicompactum* (۰/۶۷ میلی‌گرم در لیتر) مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری نیز با شاهد بدون قارچ نداشت (شکل ۶). *Kalavati et al.* (2012) گزارش کردند که گونه‌های قارچ *آسپرژیلوس* دارای توانایی آزادسازی پتاسیم از کانی‌های پتاسیم‌دار از قبیل فلدسپاردار هستند، همچنین گزارش کردند که این قارچ‌ها باعث کاهش قابل توجه pH محیط کشت مورد آزمایش شده که این کاهش در pH با تولید اسیدهای آلی همراه بوده است. علاوه بر تولید اسیدهای آلی، تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی توسط میکروارگانیسم‌ها نیز از جمله مکانیزم‌هایی می‌باشد که با ایجاد کمپلکس با یون‌های همراه پتاسیم در کانی‌ها بر آزادسازی پتاسیم تاثیر می‌گذارد (Sarikhani et al. 2018).

(2016) گزارش کردند که حضور کانی‌های پتاسیمی مسکوویت و بیوتیت در محیط کشت الکساندروف برای باکتری‌های مورد آزمایش باعث انحلال بیشتر فسفر از تری‌کلسیم فسفات شده است که علت آن را به تولید احتمالی اسیدهای آلی بیش‌تر در شرایط کمبود پتاسیم و افزایش انحلال منبع فسفر نسبت داده‌اند که با نتایج پژوهش حاضر هم‌خوانی ندارد. مقایسه سه محیط کشت مورد استفاده در پژوهش حاضر نشان می‌دهند که مقدار گلوکز در محیط کشت الکساندروف کمتر از پیکوفسکایا می‌باشد. همچنین در محیط کشت الکساندروف منبع نیتروژن و عصاره مخمر وجود ندارد و در سایر عناصر میکرو و ماکرو نیز تفاوت‌هایی دیده می‌شود (جدول ۱). تولید اسیدهای آلی و نوع آن‌ها به منبع کربن وابسته است. یکی از مکانیزم‌های حل شدن فسفر توسط میکروارگانیسم‌ها نیز تولید اسیدهای آلی می‌باشد. از آن جایی که تولید اسیدهای آلی نظیر آلفا-کتو گلوتریک اسید، سیتریک اسید، مالیک اسید و غیره عمدتاً از طریق کاتابولیسم گلوکز به ویژه در چرخه کربس انجام می‌گردد، بنابراین مقدار گلوکز در دو محیط کشت می‌تواند عاملی تاثیرگذار در تولید اسیدهای آلی باشد. از طرفی مقدار فسفر و نیتروژن نیز از عواملی است که بر تولید اسید آلی توسط میکروب‌ها موثر هستند (Nahas, 2002). تولید اسیدهای آلی نه تنها به مسیرهای متابولیکی موجود در سلول میکروارگانیسم‌ها بستگی دارد بلکه به تنظیم فعالیت آنزیم‌های درگیر در این مسیرها نیز وابستگی خواهد داشت. *Withelaw et al.* (1999) مشاهده کردند که حل شدن فسفر توسط *Penicillium radicum* در محیط‌های کشت حاوی ۳۰ میلی‌گرم بر لیتر گلوکز بیشتر از محیط‌های حاوی ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر گلوکز است. *Reyes et al.* (1999) مشاهده کردند که مقدار کم آمونیوم در محیط کشت، حل شدن فسفات نامحلول را همزمان با کاهش مقدار تولید سیتریک اسید توسط *P. rugulosum* کاهش می‌دهد. *Nautiyal* (1999) گزارش کردند که افزایش مقدار گلوکز در محیط کشت NBRIP باعث افزایش توان انحلال فسفات توسط سودوموناس می‌شود. همچنین نوع منبع نیتروژن (سولفات آمونیوم و نیترات پتاسیم) بر چنین عملکردی توسط باکتری تاثیرگذار بوده و در صورت وجود نیترات پتاسیم چنین توانی کاهش یافته است. این گزارش همچنین نشان داد در صورتی که از نیترات پتاسیم به عنوان دو منبع پتاسیم و نیتروژن استفاده شود توان باکتری در انحلال فسفات معدنی نامحلول کاهش می‌یابد. مقایسه سه محیط کشت همچنین گویای آن است که عملکرد گونه‌های متفاوت قارچ *تریکودرما* به نوع محیط کشت وابسته است؛ به طوری که یک گونه قارچ توان متفاوتی از نظر انحلال فسفات در سه محیط کشت دارد. این مسئله نشان می‌دهد



شکل ۵ - میزان رهاسازی پتاسیم از بیوتیت توسط گونه های قارچ تریکودرما در روش ارزیابی کمی در محیط کشت الکساندروف (حروف مشابه نشان دهنده نبود تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن می باشد)



شکل ۶ - میزان رهاسازی پتاسیم از بیوتیت توسط گونه های قارچ تریکودرما در روش ارزیابی کمی در محیط کشت پیکوفسکایای تغییر یافته (حروف مشابه نشان دهنده نبود تفاوت معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن می باشد).

کربن و نیتروژن به منابع فسفر و پتاسیم نیز نیازمند است. با بررسی همزمان اثر قارچ بر آزادسازی فسفر و پتاسیم در این دو محیط کشت چنین برداشت می شود که قارچ با مصرف کربن و نیتروژن بیشتر در محیط غنی تر پیکوفسکایای تغییر یافته (در مقایسه با الکساندروف) به فسفر بیشتری به منظور رشد خود نیازمند شده و با آزادسازی از تری کلسیم فسفات، آن را در زیست-توده خود ذخیره کرده است (شکل ۴). با در نظر گرفتن چنین مساله ای، قارچ در محیط کشت پیکوفسکایای تغییر یافته به پتاسیم بیشتری در مقایسه با محیط کشت الکساندروف نیاز داشته است و بدین ترتیب برای رفع نیاز خود مقداری پتاسیم از بیوتیت آزاد و در ساخت زیست توده خود بکار برده و مازاد نیاز خود را بسته به نوع گونه قارچ به محیط رها کرده است (شکل ۶).

میزان آزادسازی پتاسیم توسط گونه های قارچ تریکودرما در مقایسه با شاهد در محیط کشت الکساندروف بیشتر از پیکوفسکایای تغییر یافته بود، علت این تفاوت را می توان به تفاوت در ترکیبات محیط کشت آن ها (جدول ۱) نسبت داد. همچنین توان گونه های قارچ از نظر آزادسازی پتاسیم نیز همانند فسفات نامحلول به نوع محیط کشت بستگی داشتند. بنابراین چنین به نظر می رسد که فیزیولوژی قارچ و تولید متابولیت های آن برای آزادسازی پتاسیم به نوع و مقدار ترکیبات موجود در محیط کشت وابسته بوده است. محیط کشت پیکوفسکایای تغییر یافته در مقایسه با الکساندروف محیط غنی تری از نظر میزان کربن و نیتروژن می باشد؛ اگرچه هر دو دارای دو چالش فسفر و پتاسیم می باشند. قارچ برای رشد و افزایش زیست توده خود به غیر از

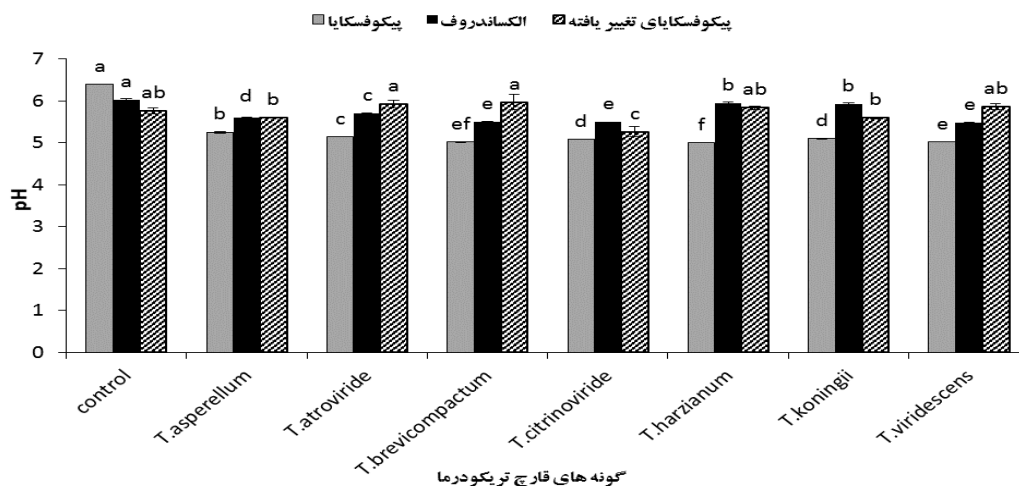
تغییرات pH در آزمون‌های کمی انحلال فسفات معدنی نامحلول و رهاسازی پتاسیم از بیوتیت

نتایج نشان داد که اثر گونه‌های قارچ بر pH هر سه محیط کشت معنی‌دار بود. در محیط کشت پیکوفسکایا، گونه‌های تریکودرما باعث کاهش شدیدتری در pH در مقایسه با سایر محیط‌های کشت شدند. بیشترین میزان کاهش pH در محیط کشت پیکوفسکایا در حضور قارچ *T. harzianum* مشاهده شد؛ بدین صورت که این گونه قارچ سبب کاهش pH از ۶/۴ در شاهد به ۵ شد. در محیط کشت الکساندروف بیشترین میزان کاهش pH در حضور *T. viridescens* به میزان ۰/۵۴ واحد و در محیط پیکوفسکایای تغییر یافته نیز در حضور *T. citrinoviride* به میزان ۰/۵۶ واحد مشاهده گردید (شکل ۷).

مقادیر هم‌بستگی بین فسفر محلول و pH محیط کشت پیکوفسکایا ($r = -0/894^{***}$)، الکساندروف ($r = -0/599^*$) و پیکوفسکایای تغییر یافته ($r = -0/03^{NS}$) نشان‌دهنده آن بود که انحلال فسفات نامحلول در محیط کشت پیکوفسکایا توسط تریکودرما می‌تواند به طور قوی‌تری به کاهش pH نسبت داده شود. Selvi et al. (2017) نیز گزارش کردند که اکثر میکروارگانیزم‌های ریزوسفری توانایی انحلال فسفر نامحلول را دارند و کاهش pH محیط کشت از ۶/۵ به ۳/۲ توسط آن‌ها مشاهده شده است. تولید سیتریک اسید، مالیک اسید، مالونیک اسید، سوکسینیک اسید، کتوگلوتریک اسید و تارتاریک اسید توسط این جدایه‌ها باعث کاهش pH محیط کشت مورد آزمایش شده و بدین ترتیب انحلال فسفر نامحلول افزایش یافته است. Saravanakumar et al. (2013) و Altomare et al. (1999) در گزارش‌های خود اعلام کردند که انحلال تری‌کلسیم فسفات

همراه با کاهش pH محیط کشت همراه بوده است. کم بودن ضریب هم‌بستگی بین دو پارامتر انحلال فسفر و pH در محیط پیکوفسکایای تغییر یافته در مقایسه با پیکوفسکایا، می‌تواند به علت پایین بودن قابلیت دسترسی پتاسیم برای قارچ و همراه شدن این محدودیت با محدودیت فسفر نامحلول باشد. از آن جایی که تنها تفاوت این دو محیط کشت قابل دسترسی پتاسیم می‌باشد بنابراین چنین به نظر می‌رسد که مکانیزم آزادسازی فسفات از تری‌کلسیم فسفات در محیط کشت پیکوفسکایای تغییر یافته از مسیری غیر از کاهش pH بوده است. چنین مشاهده‌ای در مورد محیط کشت الکساندروف نیز وجود دارد. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که مکانیزم بکار برده شده توسط گونه‌های قارچ تریکودرما به منظور انحلال فسفات معدنی نامحلول به ترکیب و مقدار عناصر موجود در محیط وابستگی دارد.

در بررسی رابطه بین pH و پتاسیم محلول مشاهده شد که تنها در محیط کشت الکساندروف رابطه منفی ضعیف و معنی‌داری ($r = -0/463^*$) بین pH و پتاسیم محلول وجود دارد و در محیط کشت پیکوفسکایای تغییر یافته ارتباط معنی‌داری وجود ندارد ($r = -0/359^{NS}$). بنابراین به نظر می‌رسد که آزادسازی پتاسیم از بیوتیت تنها از مسیر کاهش pH نمی‌باشد و سایر مکانیزم‌ها تاثیرگذار بوده است. Kalavati et al. (2012) گزارش کردند که گونه‌های قارچ *آسپرژیلوس* دارای توان آزادسازی پتاسیم از کانی فلدسپار، باعث کاهش قابل توجهی pH محیط کشت شده‌اند که این مسئله با تولید اسیدهای آلی همراه بوده است. با وجود این، تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی و کلات کردن کاتیون‌های همراه با پتاسیم در کانی‌ها نیز به انحلال کانی‌ها و آزادسازی پتاسیم تثبیت شده کمک می‌کنند.



شکل ۷ - تغییرات pH توسط گونه‌های قارچ تریکودرما در روش ارزیابی کمی در محیط‌های کشت پیکوفسکایا، الکساندروف و پیکوفسکایای تغییر یافته (حروف مشابه در هر محیط کشت نشان‌دهنده نبود تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد).

تغییر یافته که دو چالش فسفر و پتاسیم برای قارچ وجود داشت، مشاهده شد که حضور پتاسیم از منبع بیوتیت توانایی قارچ را برای انحلال فسفر معدنی نامحلول کاهش می دهد. بنابراین استفاده از محیط کشت پیکوفسکایا به منظور بررسی توانایی انحلال فسفات معدنی نامحلول نسبت به سایر محیط های کشت پیشنهاد می شود. گونه های قارچ همچنین نشان دادند که علاوه بر توانایی انحلال فسفات نامحلول، توانایی آزادسازی پتاسیم از بیوتیت را نیز دارا می باشند. تفاوت بین گونه ها از نظر توانایی آزادسازی پتاسیم در محیط کشت الکساندروف در مقایسه با پیکوفسکایا تغییر یافته به طور واضح تری قابل مشاهده بود. بنابراین محیط کشت الکساندروف را همانند پژوهش های پیشین به منظور بررسی توانایی آزادسازی پتاسیم توسط تریکودرما می توان پیشنهاد داد. با وجود این، از آنجایی که توانایی گونه های قارچ در آزادسازی پتاسیم به نوع محیط کشت وابسته بود لذا توصیه می گردد آزمایش های تکمیلی به منظور بررسی دقیق تر عوامل موثر بر چنین توانایی توسط تریکودرما انجام گردد.

REFERENCES

Aleksandrov, V. G., B lagodyr, R. N. and Iiiev, I. P. (1967). Liberation of phosphoric acid from apatite by silicate bacteria. *Microbiologist in Kiev*, 29, 111-114

Altomare, C., Norvell, W., Bjorkman, T. and Harman, G. (1999). Solubilization of phosphate and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai (1295 22). *Applied Environmental Microbiology*, 65, 2926-2933

Asea, P. E. A., Kucey, R. M. N. and Stewart, J. W. B. (1988). Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 20, 459-464.

Bennett, P. C., Choi, W. J. and Rogers, J. R. (1998). Microbial destruction of feldspars. *Mineralogical Management*, 8, 149-150

Benitez, T. Rincon, A. M., Limon, M. C. and Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 249-260.

Chai, B., Wu, Y., Liu, P., Liu, B. and Gao, M. (2011). Isolation and phosphate-solubilizing ability of a fungus, *Penicillium* sp. from soil of an alum mine. *Basic Microbiology*, 51, 5-14.

Cottenie, A. (1980). Soil and Plant Testing as a Basis of Fertilizer Recommendation. *FAO soils Bulletin*, 38, 94-100.

De Santiago, A., García-López, A. M., Quintero, J. M., Avilés, M. and Delgado, A. (2013). Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 and glucose addition on iron nutrition in cucumber grown on calcareous soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 57, 598-605.

نتیجه گیری

با توجه به هدف کشاورزی پایدار که کاهش مصرف کودهای شیمیایی و افزایش بازدهی محصولات کشاورزی می باشد، شناسایی و استفاده از میکروارگانیسم های خاکزی دارای توانایی انحلال فسفات و آزادسازی پتاسیم از منابع کم محلول فسفر و پتاسیم پیوند یافته در کانی ها باعث افزایش رشد گیاهان و کاهش نیاز به مصرف کودهای شیمیایی فسفات و پتاسه خواهد شد. این پژوهش که با هدف بررسی و ارزیابی توانایی ۷ گونه تریکودرما در انحلال فسفر معدنی نامحلول و آزادسازی پتاسیم از کانی بیوتیت انجام شد، مشاهده گردید که با توجه به نوع محیط کشت مورد استفاده میزان توانایی گونه ها تغییر می کند. در محیط کشت پیکوفسکایا که تنها چالش برای قارچ، فسفر معدنی نامحلول بود قارچ ها دارای توانایی بیشتری در افزایش فسفر محلول بودند که این مسئله با کاهش معنی دار pH محیط کشت توسط تریکودرما هم راستا بود. اما در محیط های کشت الکساندروف و پیکوفسکایا

Deaker, R., László Kecskés, M., Timothy Rose, M., Amprayn, K., Krishnen, G., Thi Kim Cuc, T., Thuy Nga, V., Thi Cong, P., Thanh Hien, N., and Robert Kennedy, I. (2011). *Practical methods for the quality control of inoculant biofertilizers*. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR).

Dennis, C. and Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* spp. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57, 25-29.

Fadhl, H. A and Al.Hadithi, B. A. A. (2016). The Effect of Fungi Inoculation Solvent Phosphate in Increasing Phosphorus availability in Calcareous Soil and its Concentration in *Cucumis sativus* L. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(9), 750-763.

Garcia-Lopez, M. A., Aviles, M. and Delgado, A. (2015). Plant uptake of phosphorus from sparingly available P-source as affected by *Trichoderma asperellum* T34. *Agricultural and Food Science* 24, 249-260.

Harman, G. E., Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology*, 2, 43-56.

Kalavati, P., Sharma, M. C. and Modi, H. A. (2012). Isolation of two potassium solubilizing fungi from ceramic industry soil. *Life Sciences Leaflets*, 5, 71-75.

Khan, M. S., Ziadi, A., Ahemad, M., Oves, M. and Wani, P. A. (2010). Plant growth promotion by

- phosphate solubilizing fungi- current perspective. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56, 73-98.
- Khoshru, B., Sarikhani, M. R., Aliasghar zad, N. and Zare, P. (2015). Assessment the important PGPR features of isolates used in biofertilizers Barvar2, Biosuperphosphate, Supernitroplus and Nitroxin. *Applied Soil Research*, 3(1), 39-52.
- Kuhad, R. C, Singh, S. Lata and Singh. A. (2011) Phosphate solubilizing microorganisms. In A. Singh, N. Parmar and R.C. Kuhad (Eds.) Bioaugmentation, biostimulation and biocontrol, (vol. 28). (pp. 65–84). Springer, Heidelberg.
- Nahas, E. (1996). Factors determining rock phosphate solubilization by microorganisms isolated from soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 567-572.
- Nahas, E. (2002). Phosphate solubilizing microorganisms: Effect of carbon, nitrogen, and phosphorus sources. In: Proceeding of *First International Meeting on Microbial Phosphate Solubilization*, 16-19 July, Salamanca, Spain, pp. 111-115.
- Nautiyal, C. S. (1999). An efficient microbiological growth medium for screening of phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letter*, 170, 265-270.
- Pikovskaya, R. I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil connection with the vital activity of some microbial species. *Microbiologiya*, 17, 362-337.
- Rajankar, P. N., Tambekar, P. R. D. and Wate, S. (2007). Study of phosphate solubilization efficiencies of fungi and bacteria isolated from saline belt of Puma river basin. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 3(6), 701-703.
- Reyes, I., Bernier, L., Simard, R. R. and Antoun H. (1999). Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by Na isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology. Ecology*, 28, 281-290.
- Rfaki, A., Nassiri, L. and Ibijbijen, J. (2014). Genetic diversity and phosphate solubilizing ability of *Triticum aestivum* rhizobacteria isolated from Meknes region, Morocco. *African Journal of Microbiolgy Research*, 8, 1931-1938.
- Rudresh, D. L., Shivaprakash, M. K. and Prasad, R.D. (2005). Tricalcium phosphate solubilizing abilities of *Trichoderma* spp. in relation to P uptake and growth and yield parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Canadian Journal of Microbiology*, 51(3), 217-222.
- Rui-Xia, L., Feng C., Guan P., Qi-Rong, S., Rong, L. and Wei. (2015). Solubilization of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *Plos One*, 25, 1-16.
- Saravanakumar, K., Shanmuga, V. and Kathiresan, K. (2013). Effect of *Trichoderma* on soil phosphate solubilization and growth improvement of *Avicennia marina*. *Aquatic Botany*, 104, 101–105.
- Sarikhani, M. R., Ebrahimi, M., Oustan, Sh., and Aliasghar zad, N. (2013). Application of potassium solubilizing bacteria a promising approach in sustainable agriculture - increasing of potassium releasing from k-containing minerals in presence of insoluble phosphate. The 1st International Conference on Environmental Crises and its Solutions, Islamic Azad University, Khozestan, Kish, Iran. (Farsi)
- Sarikhani, M. R., Khoshru, B. and Oustan, S. (2016). Efficiency of some bacterial strains in potassium release from mica and phosphate solubilization under in vitro conditions. *Geomicrobiology Journal*, 0(0), 1-7.
- Sarikhani, M.R., Oustan, S., Ebrahimi, M. and Aliasghar zad, N. (2018). Isolation and identification of potassium-releasing bacteria in soil and assessment of their ability to release potassium for plants. *European Journal of Soil Science*, 69, 1078-1086.
- Selvi, K. B., Paul, J. J. A., Vijaya, V. and Saraswathi, K. (2017). Analyzing the Efficacy of phosphate solubilizing microorganisms by enrichment culture techniques. *Biochemistry and Molecular Biology Journal*, 3, 1-7.
- Sharma, S., Kumar, V. and Tripathi, R.B. (2011). Isolation of Phosphate Solubilizing Microorganism (PSMs) from soil. *Microbiology and Biotechnology*, 1(2), 90-95.
- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H. and Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587.
- Sheng, X. F. (2005). Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. *Soil Biology and Biochemistry*, 37, 1918-1922.
- Sugumaran P, Janarthanam B. (2007). Solubilization of potassium containing minerals by bacteria and their effect on plant growth. *World Journal of Agricultural Science*, 3(3), 350-355.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Woo, S. L. and Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry*, 40, 1-10.
- Yedidia, I., Srivastva, A. K., Kapulnik, Y. and Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, 235, 235-242.
- Zorb, C., Senbayram, M. and Peiter, E. (2014). Potassium in agriculture—status and perspectives. *Journal of Plant Physiology*, 171, 656–669.