Journal of Water and Soil
Vol. 35, No. 4, Sep.-Dec. 2021, p. 505-517

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۴، مهر – آبان ۱۴۰۰، ص. ۵۱۷-۵۰۵

مقاله پژوهشی

تأثیر فیتازهای سویه‌های *آسپرژیلوس* بر فراهمی فسفر از فیتات سدیم و جذب فسفر در گیاه ذرت

تکتم ولیزاده حجار[۱]- امیر لکزیان[۲*]- اکرم حلاج نیا[۳]- محبوبه مظهری[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۹/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۲۳

چکیده

کمبود فسفر به عنوان یکی از مهم‌ترین عناصر غذایی مورد نیاز گیاه در خاک‌های آهکی مشکلی جدی بوده و به همین خاطر توجهات زیادی را به خود جلب کرده است. بخش آلی فسفر در خاک که غیر قابل جذب توسط گیاه می‌باشد در مواردی می‌تواند تا ۸۰ درصد کل فسفر را به خود اختصاص دهد. حل کردن فسفر از دو منبع آلی و معدنی توسط گونه‌های قارچی به عنوان یکی از راه‌حل‌های کارساز می‌تواند مورد توجه پژوهشگران قرار گیرد. بدین منظور و برای بررسی میزان فعالیت آنزیم فیتاز قارچی سه سویه *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و فراهمی فسفر از منبع آلی فیتات سدیم و جذب آن توسط گیاه ذرت، دو آزمایش بصورت جداگانه به صورت آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انجام شد. در بخش آزمایشگاهی میزان فعالیت آنزیم فیتاز هر یک از سه سویه قارچی در حضور فیتات سدیم بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان فعالیت فیتاز (U) ۱۶/۴۸ مربوط به سویه *آسپرژیلوس نایجر* بود. در بخش دوم تاثیر هر یک از آنزیم‌های فیتاز تولیدی و استخراجی از هر جدایه بر فراهمی فسفر از منبع فیتات سدیم و جذب این عنصر توسط گیاه ذرت بررسی شد. نتایج بخش گلخانه نشان داد که بیشترین مقدار فسفر اندام هوایی (۰/۱۲۵ درصد) و ریشه (۰/۱۰۲ درصد) گیاه ذرت و همچنین بیشترین وزن خشک این گیاه (۴۶/۰۸ گرم در گلدان) در تیمار آنزیم فیتاز *آسپرژیلوس نایجر* و در حضور فیتات سدیم مشاهده شد. بطور کلی نتایج نشان از موثرتر بودن سویه *آسپرژیلوس نایجر* در دو بخش آزمایشگاهی و گلخانه‌ای داشت و همچنین آنزیم‌های فیتاز قارچی تاثیر مثبتی بر غلظت فسفر و بهبود رشدو نمو گیاه ذرت داشتند.

واژه‌های کلیدی: *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس نایجر* ، فراهمی فسفر

مقدمه

فسفر یکی از مهم‌ترین عناصر غذایی محدودکننده رشد گیاهان است (۹). زیاد بودن مقدار این عنصر در خاک به دلیل فراهمی کم آن نتوانسته پاسخگوی نیاز رشدی گیاهان و ریزجانداران باشد (۲۴). بخش آلی این عنصر در برخی از خاک‌ها می‌تواند ۸۰ درصد از مقدار کل فسفر را به خود اختصاص داده و در بخش آلی نیز بیشترین قسمت آن (حدود ۵۰ درصد) را اینوزیتول فسفات[۵] تشکیل می‌دهد. بالا بودن مقدار فسفر در بخش آلی از یک طرف و عدم فراهمی این بخش برای گیاه باعث شده که محققین به دنبال روش‌هایی برای افزایش فراهمی این عنصر مهم در خاک باشند. البته باید توجه داشت که عمده راهکار مورد استفاده برای برآورده کردن نیاز فسفری گیاه تاکنون از طریق مصرف کودهای شیمیایی بوده که به دلیل وجود مسائلی همچون آلودگی خاک و محدود بودن منابع کود شیمیایی استفاده از آن‌ها با محدودیت‌های زیادی روبرو است. با توجه به توانایی موثر ریزجانداران خاک در فراهم کردن بخش معدنی و آلی فسفر و افزایش فراهمی آن برای گیاه؛ اهمیت و ضرورت شناخت سازوکارهای درگیر در آن فرآیند را روشن می‌کند (۱۵). نتایج پژوهش‌های مختلف نشان داده که در خاک، ریزجانداران می‌توانند هر

۱، ۲ و ۳- به‌ترتیب دانش آموخته ارشد، استاد و استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: Email: alakzian@yahoo.com)
۴- استادیار، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی

DOI: 10.22067/JSW.2021.14925.0

5- Inositol phosphate (IP)

دو بخش معدنی و آلی فسفر را با تولید ترشحات آلی مانند اسیدهای آلی، سیدرفور و آنزیم‌های فسفاتاز و فیتاز قابل استفاده نماید (۱۷). آزادسازی فسفر موجود در فیتات و جذب آن توسط گیاه بسیار مهم بوده و فراهمی بیولوژیکی اینوزیتول هگزا فسفات به هیدرولیز آن‌ها توسط فیتاز بستگی دارد (۷ و ۳۱). فیتازها[1] به گروهی از آنزیم‌ها اطلاق می‌شود که حداقل یک گروه فسفات از مولکول فیتات را جدا نمایند. فیتاز تنها آنزیم شناخته شده بوده که قادر است فسفر موجود در فیتات را آزاد کند (۷). فیتازها به‌طور متوالی اینوزیتول هگزا فسفات‌ها را به رده‌های پایینی مختلفی از استرها شامل منواسترهای اینوزیتول هیدرولیز می‌کنند (۱۰ و ۳۶). باکتری‌های جنس *سودوموناس*، *باسیلوس* و *انتروباکتر* به منظور افزایش فراهمی فسفر مورد نیاز گیاه از طریق آزادسازی فسفر آلی به عنوان مهمترین میکروارگانیسم‌های کارآمد معرفی شده‌اند (۳۰). تاثیر آنزیم فیتاز تولید شده توسط ریزجاندارانی خاک بر رشد گیاه در مطالعات مختلفی بررسی شده است. تاثیر فعالیت فیتاز تولید شده توسط ریزجاندارانی خاک از جمله *Sporotrichum thermophile* (۳۱)، *Discosia* sp. FIHB 571 (۲۳)، *Pseudomonas* sp. (۲۶) و *Bacillus amyloliquefaciens* (۱۲) بر رشد گیاهان گزارش شده است. سویه‌های *آسپرژیلوس* نیز توانایی تولید آنزیم فیتاز را دارا بوده به طوریکه چوانگ و همکاران (۲۰۰۷) با بهره‌گیری از توانایی فیتاز سنتز شده توسط *آسپرژیلوس نایجر*؛ بر تاثیر این آنزیم در فراهم کردن بخش فسفر آلی در خاک تاکید داشته است (۴). در این تحقیق در ابتدا فعالیت آنزیم فیتاز قارچی سه سویه *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس فومیگاتوس* در محیط کشت و در حضور فیتات سدیم اندازه‌گیری شد. سپس سه آنزیم تولید شده، خالص‌سازی شده و به گیاهچه ذرت اضافه شدند و تاثیر آن‌ها در حضور و عدم حضور فیتات سدیم بر مقدار فسفر اندام هوایی و ریشه و همچنین وزن خشک گیاه ذرت بررسی شد.

مواد و روش

بخش آزمایشگاهی

بمنظور مطالعه فعالیت فیتاز سه جدایه *آسپرژیلوس*، یک طرح آزمایشی کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل سه سویه *آسپرژیلوس نایجر* (A.ni) (تهیه شده از گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد)، *آسپرژیلوس فلاووس* (A.fl) و *آسپرژیلوس فامیگاتوس* (A.fu) (هر دو تهیه شده از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران) بودند. پس از تهیه، تمام سویه‌ها بر روی محیط کشت عمومی PDA (هر لیتر محیط کشت شامل: عصاره ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم گلوکز، ۱ گرم عصاره مخمر و ۲۰ گرم آگار) کشت شدند و نمونه‌ها به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای سنجش فعالیت آنزیم فیتاز قارچی از روش اصلاح شده هیونن و لاهتی (۱۹۸۱) استفاده شد (۱۱). در این روش برای سنجش فعالیت آنزیم فیتاز، ابتدا جدایه های انتخابی در محیط کشت مایع کشت داده شدند و سپس ۱۰ میلی‌لیتر از محیط کشت به مدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ ×*g*) شده و سپس مایع رویی برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم فیتاز مورد استفاده قرار گرفت. ارزیابی اسپکتروفتومتری در حجم ۲ میلی‌لیتر و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه و با استفاده از بافرهای TRIS-HCL (pH 7.4) و استات سدیم (pH 5) که شامل فیتات سدیم ۱۰ میلی‌مولار بود صورت گرفت. واکنش با افزودن ۱/۵ میلی‌لیتر از معرف استن، اسید سولفوریک ۵ نرمال و آمونیوم مولیبدات ۱۰ میلی مولار (۲:۱:۱ حجمی/ حجمی) متوقف شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر اسید سیتریک به آن اضافه گردید و فعالیت آنزیم فیتاز در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. واحد فعالیت آنزیم فیتاز (U) مقداری از آنزیم است که در مدت یک دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بتواند یک میکرومول ارتوفسفات آزاد نماید (۲۹).

تولید و استخراج فیتاز

برای تولید فیتاز از روش شیه و وار (۱۹۶۸) با اصلاحات استفاده شد (۲۸). در روش اصلاح شده، دکسترین جایگزین نشاسته محلول شده و پتاسیم دی هیدروژن فسفات بعنوان منبع فسفر استفاده می شود. بنابراین محیط کشت تخمیری اصلاح شده در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر شامل موارد ذیل می‌باشد: ۵ گرم دکسترین، ۲/۵ گرم گلوکز، ۰/۸۶ گرم نیترات سدیم، ۰/۰۰۴ گرم پتاسیم دی هیدروژن فسفات، ۰/۰۵ گرم پتاسیم کلراید، ۰/۰۵گرم سولفات منیزیم ۷ آبه و ۰/۰۱ گرم سولفات آهن ۷ آبه. pH محیط کشت قبل از سترون کردن در ۵/۵ تنظیم شد. پس از تهیه محیط کشت، ۱۰۰ میلی‌لیتر از آن برداشته شد و به آن ۱۰ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (5×10^7 اسپور در هر لیتر) مایه‌زنی شد و سپس به مدت ۱۵ روز در دمای اتاق، نگه‌داری شد. پس از تخمیر و به منظور جداسازی میسیلیوم‌ها، محلول به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ (۱۰۰۰۰ g) شد و مایع رویی جمع آوری شد. به عصاره استخراج شده سولفات آمونیوم برای رسیدن به غلظت نهایی ۲۵ درصد اضافه شد و به مدت یک ساعت در حالت شیک گرماگذاری شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ (۹۰۰۰ g) شد. در نهایت محلول رویی خارج و آمونیوم سولفات به محلول رویی اضافه شد تا به غلظت ۷۵ درصد برسد. محلول به مدت ۱۲ ساعت روی شیکر (۱۰۰ دور در دقیقه) گرماگذاری شد و سپس عصاره سلولی به مدت ۳۰

1- Phytase

دقیقه سانتریفوژ (۹۰۰۰g) شد و محلول رویی خارج و رسوب در ۵ میلی‌لیتر بافر TRIS-HCl (۲۵ میلی مولار، اسیدیته برابر با ۷/۲) مجددا حل و در همین بافر به مدت یک شب دیالیز شد.

بخش گلخانه‌ای

در این بخش تاثیر فیتازهای استخراج شده از سه سویه *آسپرژیلوس* بر فراهمی فسفر از منبع آلی (فیتات سدیم) و تاثیر آن بر گیاه ذرت بررسی شد. طرح آزمایشی بصورت کاملا تصادفی با آرایش فاکتوریل با سه تکرار بود. تیمارهای آزمایشی شامل سه نوع آنزیم فیتاز قارچی (*آسپرژیلوس نایجر* (A.ni)، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* (A. fu) و *آسپرژیلوس فلاووس* (A. fl)) و دو سطح صفر (P0) و ۵۰ (P50) میلی‌گرم در کیلوگرم فیتات سدیم تهیه شده از سیگما آلدریچ، بودند. خاک مورد مطالعه از عمق ۲۰-۰ سانتی‌متری واقع در پردیس دانشگاه فردوسی مشهد (E ´´۳۴/۱۱ ´۳۱ °۵۹، N ´´۵۵/۷۵ ´۱۸ °۳۶) جمع‌آوری و پس از هوا خشک شدن و عبور از الک ۲ میلی‌متری ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی آن طبق روش‌های مرسوم آزمایشگاهی اندازه‌گیری شدند. این پارامترها شامل pH خاک با استفاده از دستگاه pH متر در گل اشباع، قابلیت هدایت الکتریکی در عصاره گل اشباع توسط دستگاه هدایت‌سنج الکتریکی، کربن آلی به روش هضم تر (۳۲)، نیتروژن کل به روش کجلدال (۱)، فسفر فراهم خاک به روش اولسن و سامرز (۲۱)، پتاسیم قابل دسترس به روش استات آمونیوم، کربنات کلسیم معادل به روش تیتراسیون برگشتی (۱۸)، رطوبت ظرفیت مزرعه به روش وزنی و بافت خاک به روش هیدرومتری (۶) بودند. خاک، گراول و شن مورد استفاده در آزمایش‌ها در دو نوبت و به فاصله زمانی ۴۸ ساعت توسط دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱ اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه سترون شد. گلدان‌های ۵ کیلویی نیز پس از شستشو با آب معمولی، به وسیله الکل ضدعفونی شدند. خاک و گلدان‌ها تا روز استفاده در پلاستیک نگهداری شدند. در ادامه تعداد ۵ عدد بذر ذرت رقم سینگل کراس ۷۰۴ در هر گلدان کشت شد. با توجه فعالیت آنزیمی هر کدام از فیتازهای استخراج شده، حجم لازم برای هیدرولیز ۵۰ میلی‌گرم فیتات سدیم در هر گلدان به صورت بذرمال اضافه شدند. گیاهان پس از رشد و در مرحله دو برگی به تعداد دو عدد در هر گلدان تنک شدند. رطوبت گلدان‌ها به مدت دو ماه در شرایط ظرفیت زراعی نگهداری شد. در نهایت در مرحله برداشت، گیاه و ریشه به صورت جداگانه برداشت شده و پس از شست و شو، در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شدند. جهت هضم و تعیین مقدار فسفر در ریشه و اندام هوایی گیاه، یک گرم از نمونه‌های گیاهی توزین و در داخل کروزه‌های چینی ریخته شد و در داخل کوره الکتریکی به مدت ۲ ساعت تا دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شده و پس از آن به مدت ۴ ساعت در دمای ۵۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌ها پس از سرد شدن از کوره خارج و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۲ نرمال به آن‌ها اضافه شد. سپس نمونه‌ها را روی هات پلیت به مدت نیم ساعت حرارت داده تا جایی که اولین بخارات سفید خارج شود. سپس نمونه محلول به بالن ژوژه ۲۵ میلی‌لیتر منتقل شد و به حجم رسید. فسفر موجود در عصاره‌های هضم شده نیز به روش چاپمن و پرات (۳) اندازه‌گیری شد. در نهایت نتایج حاصل از آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری JUMP 11 آنالیز و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی و در سطح احتمال ۱ درصد مقایسه گردیدند. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه خاک در جدول ۱ نشان داده شده است. خاک مورد مطالعه یک خاک آهکی با بافت لوم سیلتی و فقیر از نظر عناصر غذایی پر مصرف بود. جهت انجام توصیه کودی، نیتروژن به صورت کود اوره محلول در آب (در سه نوبت) و پتاسیم به صورت سولفات پتاسیم تامین شد.

نتایج تجزیه واریانس داده‌های بخش آزمایشگاهی نشان داد که فعالیت آنزیم فیتاز قارچی در سویه‌های *آسپرژیلوس* مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری ($p<0.01$) با یکدیگر داشت.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

Table 1- Physicochemical properties of potting soil

بافت خاک Soil texture	رطوبت ظرفیت مزرعه Field capacity	کربن آلی Organic carbon	آهک $CaCO_3$	pH	نیتروژن Nitrogen	فسفر Phosphorus	پتاسیم Potassium	EC
	%				mg kg^{-1}			dS m^{-1}
لوم سیلتی Silty Loam	19	0.35	13	8.58	500	7	151	2.2

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس فعالیت آنزیم فیتاز قارچی

Table 2- Analysis of variance (ANOVA) for the fungal phytase activity

منابع تغییرات Source of variations	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات فعالیت آنزیم فیتاز قارچی Mean of squares fungal phytase activity
سویه‌های آسپرژیلوس *Aspergillus* strains	2	103.8**
خطا Error	6	0.035
کل Total	8	
ضریب تغییرات CV		0.05

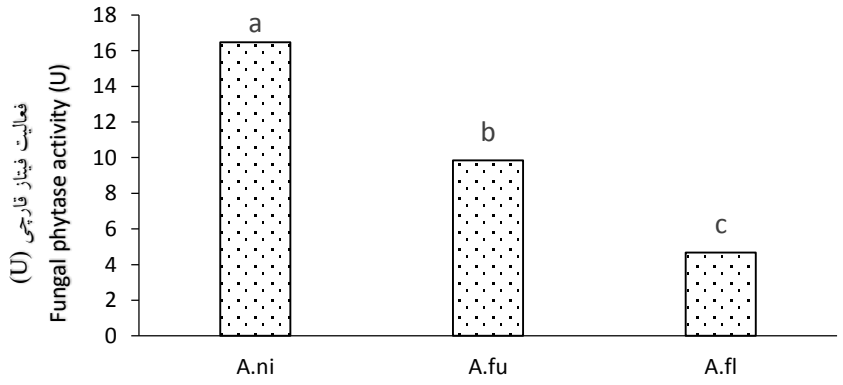
**: معنی‌داری در سطح یک درصد

نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنزیمی سویه‌های *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* نشان داد که نوع سویه مورد مطالعه تاثیر معنی‌داری ($p<0.01$) بر میزان فعالیت آنزیم فیتاز قارچی داشت. در بین سویه‌های مورد مطالعه سویه *آسپرژیلوس نایجر* با فعالیت آنزیمی معادل (U) ۱۶/۴۸ بیشترین میزان فعالیت و *آسپرژیلوس فلاووس* (U) ۴/۶۷ کمترین میزان فعالیت آنزیم فیتاز را دارا بودند (شکل ۱).

نتایج این آزمایش توانایی فعالیت آنزیمی متفاوت سه سویه مورد بررسی را نشان داد. دلیل این امر طبق گزارش چابوت و همکاران (۱۹۹۳) می‌تواند تفاوت در میزان رشد قارچ و اختلافات مورفولوژیکی و ژنتیکی باشد (۲). تفاوت بین سویه‌های مختلف در میزان تولید و فعالیت آنزیم فیتاز قارچی در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است. در مطالعه انجام شده توسط جواهری و همکاران (۲۰۱۳)، گزارش شده است که بین جدایه‌های *آسپرژیلوس* تفاوت معنی‌داری در مورد فعالیت آنزیم فسفاتاز قلیایی و فیتاز وجود داشت (۱۳). یاداو و همکاران (۲۰۰۳) توانایی سویه‌های مختلف *آسپرژیلوس*، *امریسلا* و *پنیسیلیوم* را جهت هیدرولیز گلیسرو فسفات سدیم و فعالیت آنزیم فیتاز را بررسی کرد و گزارش کردند که سویه *آسپرژیلوس نایجر* بیشترین تولید و فعالیت آنزیم فیتاز را دارا بود (۳۳).

بخش گلخانه

نتایج تجزیه واریانس داده‌های بخش گلخانه نشان داد که اثر ساده فیتات سدیم و آنزیم فیتاز قارچی و همچنین اثر متقابل این دو تاثیر معنی‌داری ($p<0.01$) بر مقدار غلظت فسفر اندام هوایی و ریشه و ارتفاع گیاه ذرت داشتند (جدول ۳).



شکل ۱- مقایسه میانگین فعالیت آنزیم فیتاز قارچی سه سویه *آسپرژیلوس*

A.ni: آسپرژیلوس نایجر، A.fu: آسپرژیلوس فامیگاتوس و A.fl: آسپرژیلوس فلاووس

Figure 1- Comparison of means in activity of three *Aspergillus* fungal phytases

A.ni: *Aspergillus niger*, A.fu: *Aspergillus fumigatus* and A.fl: *Aspergillus flavus*

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس غلظت فسفر اندام هوایی و ریشه و وزن خشک اندام هوایی ذرت

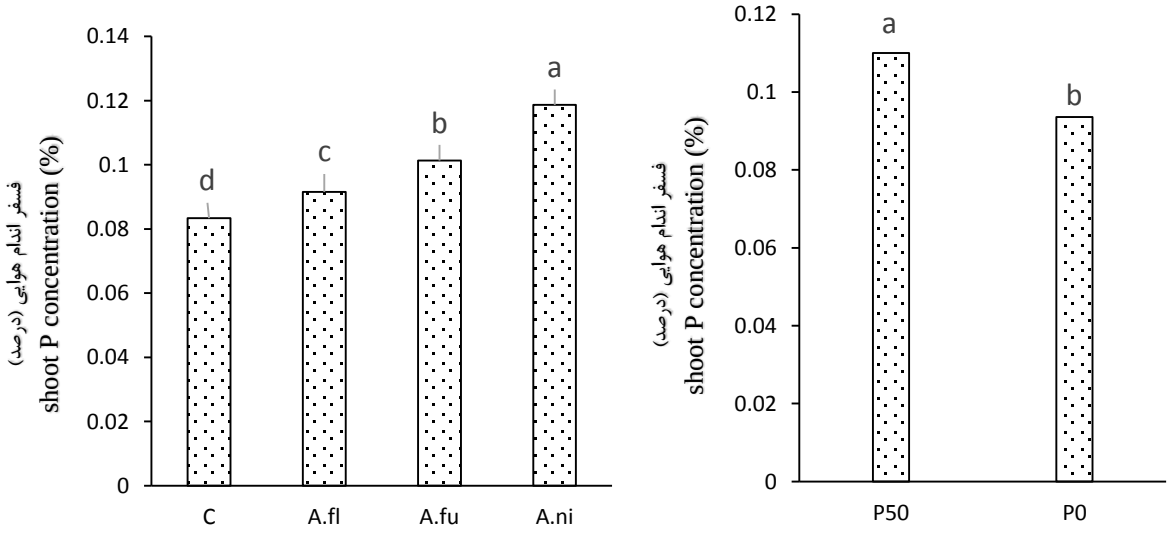
Table 3- Analysis of variance (ANOVA) P concentration in shoot and root and dry weight of maize

منابع تغییرات Sources of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات (Mean of squares)		
		وزن خشک اندام هوایی Shoot dry weight	غلظت فسفر اندام هوایی Shoot p concentration	غلظت فسفر ریشه Root P concentration
فیتات سدیم Sodium phytate	1	426.7**	0.0003**	0.0016**
آنزیم فیتاز قارچی Fungal phytase enzyme	3	205.6**	0.0013**	0.0019**
فیتات سدیم×آنزیم فیتاز قارچی Sodium phytate× Fungal phytase enzyme	3	12.1**	0.000007**	0.00017**
خطا Error	16	0.953	0.00000004	0.0000013
کل Total	23			
ضریب تغییرات CV		0.13	0.1	0.11

**: معنی‌داری در سطح یک درصد

غلظت فسفر اندام هوایی

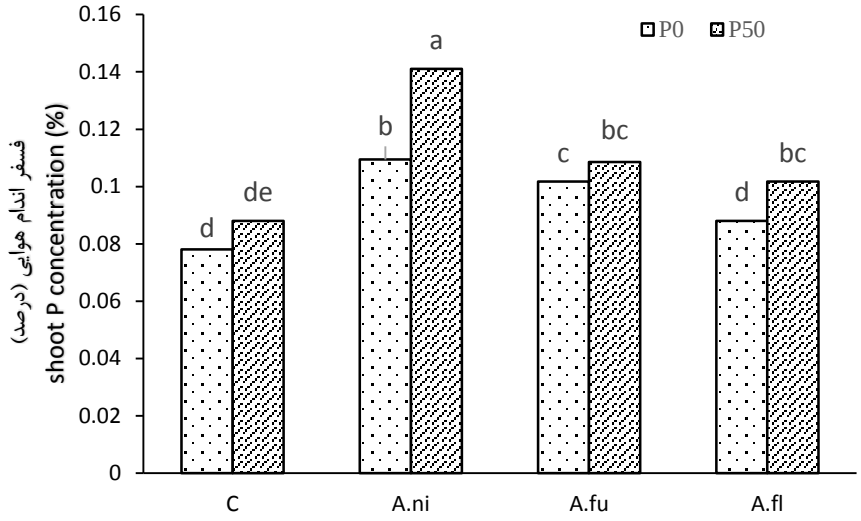
نتایج مقایسه میانگین اثر ساده فیتات سدیم بر غلظت فسفر اندام هوایی ذرت نشان داد که غلظت این عنصر در اندام هوایی گیاه ذرت در حضور فیتات سدیم افزایش ۱۸/۳ درصدی در مقایسه با شاهد (بدون فیتات سدیم) داشت. البته ذکر این نکته ضروری است که بخشی از این افزایش مربوط به فسفاتازهای گیاهی است. اما با عنایت به اینکه در تیمار شاهد (گیاهان بدون تلقیح با فیتاز) نیز در آزمایش در نظر گرفته شده بود، بنابر این در زمان مقایسه نتایج تیمارهای آزمایشی با شاهد بخش فسفاتاز گیاهی طبیعتا حذف خواهد شد (شکل ۲ الف). نتایج مقایسه میانگین اثر ساده آنزیم فیتاز قارچی نیز نشان داد که سه نوع آنزیم فیتاز به کار برده شده باعث افزایش غلظت فسفر اندام هوایی گیاه ذرت در مقایسه با شاهد شدند. در مورد غلظت فسفر اندام هوایی در حضور آنزیم‌های مورد استفاده چنین می‌توان گفت که بیشترین تاثیر مربوط در تیمار فیتاز *آسپرژیلوس نایجر* (۵۰ درصد افزایش در مقایسه با شاهد) و کمترین تاثیر مربوط به تیمار فیتاز *آسپرژیلوس فلاووس* (۸/۹ درصد افزایش) بود (شکل ۴ ب).



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر ساده فیتات سدیم (تصویر راست) و آنزیم فیتاز قارچی (تصویر چپ) بر غلظت فسفر اندام

A.ni: *آسپرژیلوس نایجر*، A.fu: *آسپرژیلوس فامیگاتوس*، A.fl: *آسپرژیلوس فلاووس* و C: بدون آنزیم- P0 و P50 به ترتیب صفر و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فیتات سدیم

Figure 2- Comparison of means of P concentration in maize shoot a) sodium phytate b) fungal phytase. A.ni: *Aspergillus niger*, A.fu: *Aspergillus fumigatus* and A.fl: *Aspergillus flavus* –P0 and P50: Two levels of zero and 50 mg/kg sodium phytate, respectively



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل آنزیم فیتاز قارچی*فیتات سدیم بر غلظت فسفر اندام هوایی ذرت

A.ni: *آسپرژیلوس نایجر*، A.fu: *آسپرژیلوس فامیگاتوس*، A.fl: *آسپرژیلوس فلاووس* و C: بدون آنزیم- P0 و P50 به ترتیب صفر و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فیتات سدیم

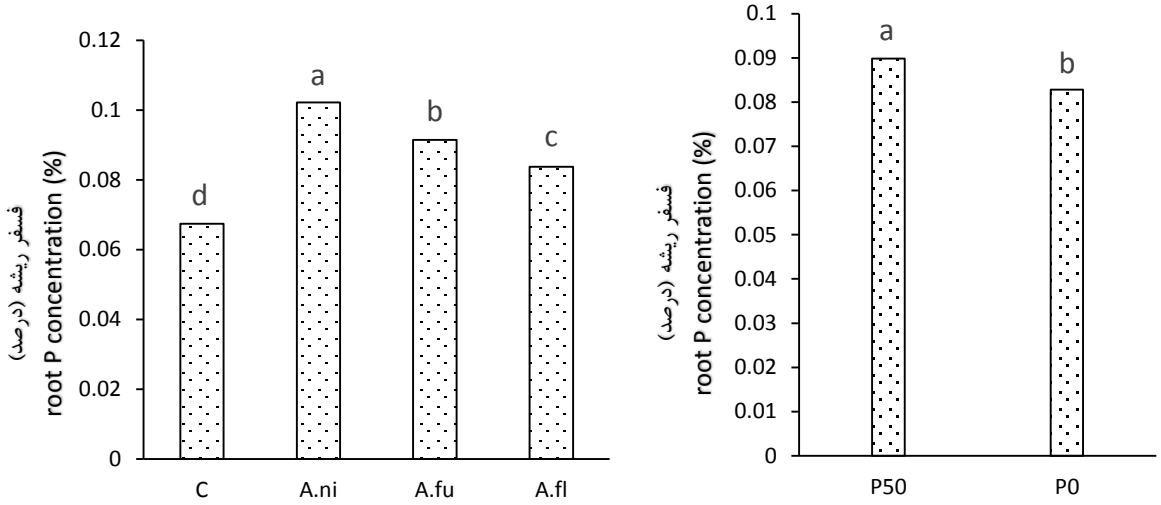
Figure 3- Interaction of fungal phytase enzyme and sodium phytate on P concentration in maize shoot. A.ni: *Aspergillus niger*, A.fu: *Aspergillus fumigatus* and A.fl: *Aspergillus flavus* –P0 and P50: f zero and 50 mg/kg sodium phytate respectively

نتایج مقایسه میانگین اثر متقابل آنزیم فیتاز و فیتات سدیم نیز نشان داد که آنزیم‌های به کار برده شده در دو سطح فیتات سدیم باعث افزایش غلظت این عنصر در اندام هوایی گیاه ذرت شدند که این افزایش در سطح ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فیتات سدیم شدت بیشتری داشت (شکل ۳). در هر دو تیمار P0 و P50 بیشترین غلظت فسفر اندام هوایی مربوط به فیتاز *آسپرژیلوس نایجر* بود. به طور کلی بیشترین غلظت فسفر اندام هوایی گیاه ذرت در تیمار A.niP50 (۰/۱۴ درصد) و کمترین غلظت این عنصر نیز در تیمار CP0 (۰/۰۷۸ درصد) اندازه‌گیری شد. حضور سه نوع آنزیم فیتاز *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* در سطح صفر فیتات سدیم به ترتیب باعث افزایش ۳۹/۷، ۲۶/۹ و ۱۲/۸ درصدی غلظت فسفر اندام هوایی گیاه ذرت شد و این افزایش در سطح ۰/۰۵ گرم بر کیلوگرم فیتات سدیم به ترتیب ۶۰/۲، ۲۲/۷ و ۱۴/۷ درصد بود (شکل ۳).

با توجه به کم بودن غلظت فسفر فراهم در خاک و نیاز گیاه ذرت (۱۵ میلی‌گرم در کیلوگرم) (۱۹)، پاسخ گیاه به افزودن منبع فسفر آلی دور از انتظار نبود. افزایش حلالیت فسفر بخش‌های آلی و معدنی و افزایش فراهمی این عنصر در خاک مهمترین عامل در افزایش غلظت این عنصر در ریشه و اندام هوایی گیاهان می‌باشد (۲۰). از طرفی علت افزایش مقدار فسفر در اندام هوایی در تیمارهای بدون فیتات سدیم احتمالا تاثیر آنزیم‌های فیتاز بر فراهمی بخش فسفر آلی خاک بوده و با افزایش بخش فسفر آلی (سطح ۰/۰۵ گرم فیتات سدیم)، تاثیر این آنزیم‌ها بیشتر شده است. تاثیر بیشتر آنزیم فیتاز *آسپرژیلوس نایجر* بر مقدار فسفر اندام هوایی در مقایسه با دو آنزیم دیگر مورد استفاده احتمالا به دلیل فعالیت بیشتر آن می‌باشد که در بخش قبل بحث شد. به طور کلی پژوهش‌های انجام شده در زمینه ریزجانداران فراهم کننده فسفر دو عامل تولید اسیدهای آلی و آنزیم (به ویژه فیتاز) را به عنوان عوامل مهم در افزایش فراهمی و جذب فسفر توسط گیاه دانستند (۲۲). در مورد تاثیر فیتاز بر فراهمی فسفر، فیندنج (۱۹۹۳) در مطالعه بر روی چند گونه تولید کننده فیتاز گزارش کرد که باکتری *سودوموناس* فعالیت فیتازی بالاتری داشته که این امر منجر به افزایش مقدار فسفر قابل دسترس، تحریک و انشعاب بیشتر ریشه برای جذب فسفر توسط ریشه و انتقال آن به اندام هوایی گردیده بود (۵).

فسفر ریشه ذرت

از جمله اندام‌های دیگر گیاه که برای بررسی میزان غلظت فسفر مورد مطالعه قرار گرفت ریشه گیاه ذرت بود. نتایج مقایسه میانگین اثر ساده فیتات سدیم بر غلظت فسفر ریشه گیاه ذرت نشان داد که سطح ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم این ماده باعث افزایش معنی‌دار ($p<0/01$) مقدار فسفر ریشه در مقایسه با شاهد (سطح صفر) شده که این مقدار افزایش ۸/۵ درصد بود (شکل ۴ الف). نتایج مقایسه میانگین اثر ساده آنزیم فیتاز نیز نشان داد که کاربرد آنزیم فیتاز سه سویه قارچ مورد مطالعه باعث افزایش غلظت فسفر ریشه گیاه ذرت شد و این افزایش در تیمارهای حاوی فیتاز *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* در مقایسه با شاهد به ترتیب ۵۲/۸، ۳۵/۵ و ۲۳/۳ درصد اندازه‌گیری شد. بیشترین مقدار فسفر ریشه گیاه ذرت در حضور آنزیم فیتاز *آسپرژیلوس نایجر* (۰/۱ درصد) و کمترین مقدار (۰/۰۶۷ درصد) نیز در تیمار شاهد (بدون آنزیم) بود (شکل ۴ ب).



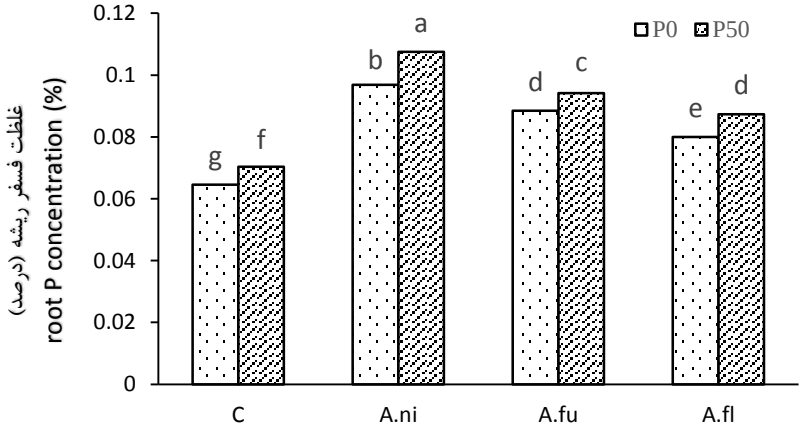
شکل ۴- مقایسه میانگین اثر ساده فیتات سدیم تصویر راست و آنزیم فیتاز قارچی (تصویر چپ) بر غلظت فسفر ریشه ذرت

A.ni: *آسپرژیلوس نایجر*، A.fu: *آسپرژیلوس فامیگاتوس* و A.fl: *آسپرژیلوس فلاووس*– P0 و P50: به ترتیب دو سطح صفر و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فیتات سدیم

Figure 4- Comparison of means of P concentration in maize root a) sodium phytate b) fungal phytase. A.ni: *Aspergillus niger*, A.fu: *Aspergillus fumigatus* and A.fl: *Aspergillus flavus* –P0 and P50: zero and 50 mg/kg sodium phytate respectively

روند مشاهده شده در مورد تاثیر تیمارهای آزمایشی بر غلظت فسفر ریشه مشابه با غلظت این عنصر در اندام هوایی گیاه ذرت بود. افزایش مقدار فسفر آلی با اضافه کردن مقدار ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فیتات سدیم و همچنین فعالیت آنزیم‌های فیتاز اضافه شده به بذر باعث افزایش غلظت فسفر در ریشه گیاه ذرت شده و در این بین بیشترین مقدار نیز در تیمار آنزیم فیتاز *آسپرژیلوس نایجر* مشاهده شد.

نتایج مقایسه میانگین اثرات متقابل فیتات سدیم و آنزیم فیتاز تولید شده از سه سویه *آسپرژیلوس* بر غلظت فسفر ریشه گیاه ذرت، معنی‌دار بودن ($p<0.01$) تاثیر تیمارها را نشان داد. بیشترین مقدار فسفر ریشه گیاه در تیمار A.niP50 (۰/۱۱ درصد) و کمترین مقدار نیز در تیمار CP0 (۰/۰۶۴ درصد) اندازه‌گیری شد (شکل ۵). در هر دو سطح صفر و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فیتات سدیم، بین تیمارهای فیتاز قارچی مورد استفاده و شاهد اختلاف معنی‌داری ($p<0.01$) مشاهده شد.



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر متقابل آنزیم فیتاز ×فیتات سدیم بر غلظت فسفر ریشه ذرت

A.ni: آسپرژیلوس نایجر، A.fu: آسپرژیلوس فامیگاتوس، A.fl: آسپرژیلوس فلاووس و C: بدون آنزیم– P0 و P50: به ترتیب دو سطح صفر و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فیتات سدیم

Figure 5- Interaction of fungal phytase enzyme and sodium phytate on P concentration in maize root. A.ni: *Aspergillus niger*, A.fu: *Aspergillus fumigatus* and A.fl: *Aspergillus flavus* –P0 and P50: zero and 50 mg / kg sodium phytate, respectively

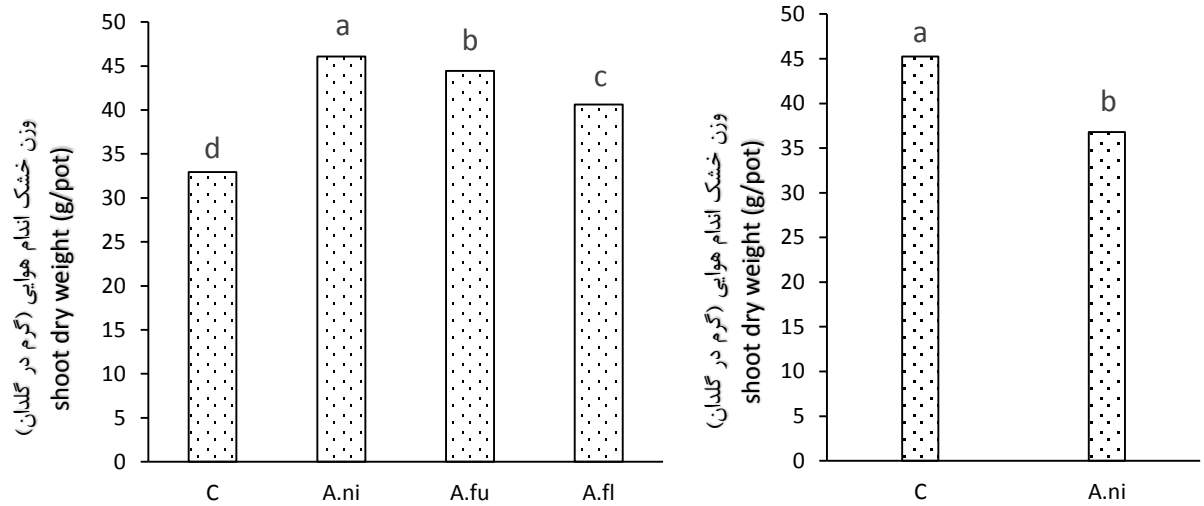
آنزیم فیتاز قارچی تولید شده توسط سه سویه *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* در سطح صفر فیتات سدیم به ترتیب باعث افزایش ۵۰/۲، ۳۶/۹ و ۲۴/۳ درصدی غلظت فسفر ریشه گیاه ذرت شدند و این افزایش در سطح ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فیتات سدیم به ترتیب ۵۲/۸، ۳۳/۴ و ۲۳/۳ درصدی در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری شد (شکل ۵).

به نظر می‌رسد که افزایش فراهمی عنصر فسفر در خاک در پی اضافه کردن منبع فسفر آلی و همچنین آنزیم فیتاز باعث افزایش غلظت این عنصر در ریشه گیاه ذرت شده است. تاثیر ریزجانداران حل‌کننده فسفر خاک و متابولیت‌های تولید شده از آن‌ها بر مقدار فسفر اندام‌های گیاه در مطالعات زیادی بررسی شده است (۱۶ و ۲۵). ریچاردسون و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که حضور ریزجانداران به دلیل تولید متابولیت‌های آن‌ها، فراهمی فسفر خاک را افزایش داده و باعث افزایش غلظت آن در اندام‌های گیاهان می‌شود (۲۵). تاثیر قارچ‌های مورد استفاده در این آزمایش در مطالعات دیگری نیز بررسی شده است. رودریگز و فراگا (۱۹۹۹) در تحقیق خود بر روی تاثیر فیتاز *آسپرژیلوس نایجر* بر فراهمی فسفر، تاثیر مثبت کاربرد این آنزیم را بر میزان فسفر ریشه گیاه گزارش کردند (۲۷).

وزن خشک اندام هوایی

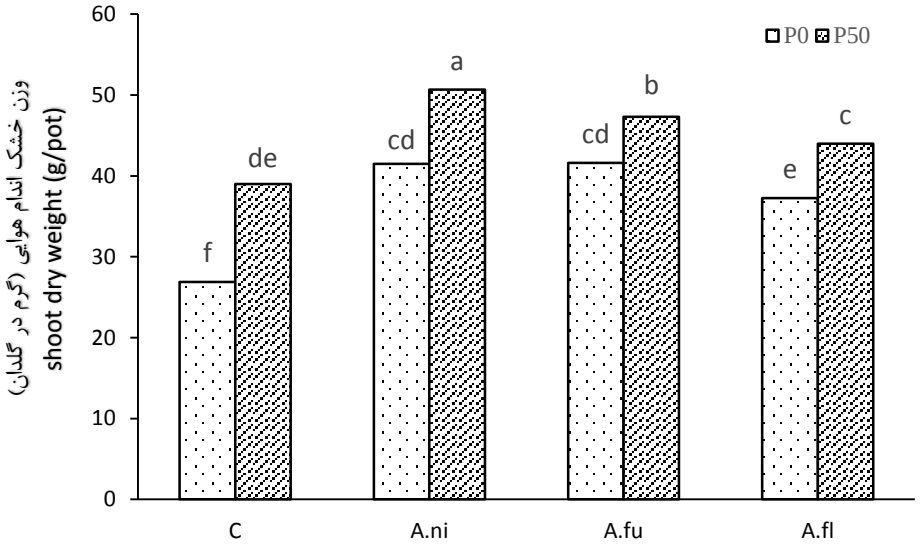
وزن خشک اندام هوایی گیاهان از جمله صفاتی است که تحت تاثیر فراهمی عناصر غذایی در خاک است و به همین خاطر این صفت نیز در این آزمایش اندازه‌گیری شد. نتایج مقایسه میانگین اثر ساده فیتات سدیم نشان داد که افزودن ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فیتات سدیم (P50) در مقایسه با شاهد (P0) باعث افزایش ۱۴/۷ درصدی وزن خشک اندام هوایی گیاه ذرت شد (شکل ۶ الف). نتایج مقایسه میانگین اثر ساده آنزیم فیتاز قارچی نیز نشان داد که کاربرد آنزیم فیتاز قارچی باعث افزایش وزن خشک اندام هوایی گیاه ذرت شد و این افزایش در تیمارهای حاوی فیتاز *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* در مقایسه با شاهد به ترتیب ۴۱/۱، ۳۶/۷ و ۲۴/۳ درصد اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان وزن خشک اندام هوایی گیاه ذرت در حضور آنزیم فیتاز *آسپرژیلوس نایجر* (۴۶/۰۸ گرم در گلدان) و کمترین مقدار (۳۲/۹۵ گرم در گلدان) نیز در تیمار شاهد (بدون آنزیم) بود (شکل ۶ ب).

نتایج اثر متقابل آنزیم فیتاز قارچی و فیتات سدیم نیز نشان داد که بیشترین وزن خشک اندام هوایی گیاه در تیمار A.niP50 با مقدار ۵۰/۷ گرم در گلدان و کمترین مقدار نیز در تیمار CP0 با مقدار ۲۶/۹ گرم در گلدان بود (شکل ۷). آنزیم فیتاز قارچی *آسپرژیلوس نایجر* بیشترین تاثیر را بر وزن خشک اندام هوایی گیاه ذرت داشت به طوریکه در دو سطح صفر و ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم فیتات سدیم بیشترین مقدار وزن خشک اندم هوایی مربوط به این آنزیم بود.



شکل ۶- مقایسه میانگین اثر ساده فیتات سدیم (تصویر راست) و آنزیم فیتاز قارچی (تصویر چپ) بر وزن خشک اندام هوایی ذرت A.ni: *آسپرژیلوس نایجر*، A.fu: *آسپرژیلوس فامیگاتوس* و A.fl: *آسپرژیلوس فلاووس*- P0 و P50: به ترتیب دو سطح صفر و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فیتات سدیم

Figure 6- Comparison of means of shoot dry weight of maize per pot a) sodium phytate b) fungal phytase. A.ni: *Aspergillus niger,* A.fu: *Aspergillus fumigatus* and A.fl: *Aspergillus flavus* –P0 and P50: zero and 50 mg/kg sodium phytate respectively



شکل ۷- مقایسه میانگین اثر متقابل آنزیم فیتاز قارچی× فیتات سدیم بر وزن خشک اندام هوایی ذرت. A.ni:*آسپرژیلوس نایجر*، A.fu: *آسپرژیلوس فامیگاتوس* و A.fl:*آسپرژیلوس فلاووس*- P0 و P50: به ترتیب دو سطح صفر و ۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم فیتات سدیم

Figure 7- Interaction of fungal phytase enzyme and sodium phytate on shoot dry weight in maize root. A.ni: *Aspergillus niger*, A.fu: *Aspergillus fumigatus* and A.fl: *Aspergillus flavus* –P0 and P50: zero and 50 mg/kg sodium phytate respectively

پس از آنزیم *آسپرژیلوس نایجر* بیشترین تاثیر مربوط به آنزیم فیتاز قارچی *آسپرژیلوس فومیگاتوس* بود و کمترین تاثیر بر وزن خشک اندام هوایی در مقایسه با شاهد در تیمار *آسپرژیلوس فلاووس* مشاهده شد. آنزیم فیتاز قارچی تولید شده از سه قارچ *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* در عدم حضور فیتات سدیم به ترتیب باعث افزایش ۵۴/۳، ۵۴/۶ و ۳۸/۵ درصدی ارتفاع گیاه ذرت شدند و این افزایش در حضور فیتات سدیم برای تیمار حاوی فیتاز *آسپرژیلوس نایجر*، *آسپرژیلوس فومیگاتوس* و *آسپرژیلوس فلاووس* فومیگاتوس در مقایسه با شاهد به ترتیب ۳۰، ۲۱/۲ و ۱۲/۸ درصد بود (شکل ۷).

به نظر می‌رسد که تاثیر آنزیم فیتاز قارچی اضافه شده به خاک و افزایش مقدار فسفر در ریشه و اندام هوایی گیاه ذرت باعث بهبود رشد این گیاه و افزایش وزن خشک اندام هوایی شده است. تاثیر فسفر بر افزایش وزن خشک اندام هوایی در مطالعه قرشی و همکاران (۲۰۱۲) و کریمیان و قنبری (۱۹۹۰) نیز گزارش شد (۸، ۱۴). مطالعه در زمینه کاربرد جداگانه آنزیم فیتاز قارچی بر خصوصیات رشدی گیاه موجود نبود و در این بین تنها در مورد تاثیر ریزجانداران حل کننده فسفر بر حل کردن این عنصر غذایی و بهبود ویژگی‌های رشدی گیاه وجود دارد. سینگ و ساتیانارایانا (۲۰۱۱) گزارش کردند که حضور آنزیم فیتاز در منطقه ریزوسفر در شرایط مزرعه‌ای باعث افزایش رشد گیاه شد (۳۱). در مطالعه دیگری ونگ و همکاران (۲۰۱۸) در مطالعه خود که در شرایط گلخانه‌ای انجام شد گزارش دادند که تلقیح گیاهان با ریزجانداران حل‌کننده فسفر، باعث افزایش وزن خشک (۲۳/۳ درصد) و وزن تازه (۲۳/۸ درصد) گیاه گندم در مقایسه با نمونه شاهد شدند. این محققین دلیل این امر را تولید اسیدهای آلی، هورمون‌های رشدی و همچنین آنزیم‌های حل کننده عناصر غذایی مانند فیتاز اعلام کردند (۳۳).

نتیجه‌گیری

به طور کلی نتایج به دست آمده در دو بخش آزمایشگاهی نشان داد که فعالیت فیتاز تولید شده توسط سویه *آسپرژیلوس نایجر* بیشتر از دو سویه دیگر بوده و در بخش گلخانه‌ای نیز این تیمار تاثیر بیشتری بر مقدار فسفر در ریشه، اندام هوایی و وزن خشک گیاه ذرت داشت. در مجموع داده‌های این تحقیق تاثیر معنی‌دار و افزایشی آنزیم‌های فیتاز قارچی سویه‌های *آسپرژیلوس* بر مقدار فسفر در اندام هوایی و ریشه گیاه ذرت و همچنین وزن خشک اندام هوایی این گیاه را نشان دادند که این افزایش در حضور فیتات سدیم شدت بیشتری داشت. به نظر می‌رسد که ریزجانداران تولید کننده آنزیم فیتاز می‌توانند نقش مهمی در بهبود رشد گیاهان با افزایش فراهمی عنصر فسفر داشته باشند و بنابراین توجه هر چه بیشتر به بخش آلی فسفر در خاک و همچنین ریزجانداران تولید کننده فیتاز باعث کاهش مصرف کودهای شیمیایی فسفردار خواهد شد.

منابع

1- Bremner J.M., and Mulvaney C.S. 1982. Nitrogen-Urea. In: Miller RH and Keeney, DR (eds). Method of Soil Analysis. Chemical and Microbiological Properties. American Society of Agronomy USA 699-708.
2- Chabot R., Cescas M.P., and Antoun H. 1993. Microbiological solubilization of inorganic P-fraction normally encountered in soils. Phosphorus, Sulfur, Silicon 77: 329-336.
3- Chapman H.I., and Pratt P.F. 1961. Methods of Analysis for Soils, Plants and Waters. The University of California's Division of Agricultural Science, Berkeley, California, USA.
4- Chuang C.C., Kuo Y.L., Chao C.C., and Chao W.L. 2007. Solubilization of inorganic phosphates and plant growth promotion by Aspergillus niger. Biology and Fertility of Soils 43: 575-584.
5- Findenegg G.R., and Neiemans J.A. 1993. The effect of phytase on the availability of from myo-inositol hexaphosphate (phytate) for maize roots. Plant and Soil 154: 189-196.
6- Gee G.W., and Bauder J.W. 1986. Particle-size analysis. Methods of soil analysis: Part 1—*Physical and mineralogical methods*. Klute A. Ed. Chap. 15. American Society of Agronomy. Soil Science Society of America 383–411.
7- George T.S., Richardson A.E., Li S.S., Gregory P.J., and Daniell T.J. 2009. Extracellular Release of a Heterologous Phytase from Roots of Transgenic Plants: Does Manipulation of Rhizosphere Biochemistry Impact Microbial Community Structure? FEMS Microbiology Ecology 70: 433-445.
8- Ghorashi L., Haghnia Gh.H., Lakzian A., and Khorasani R. 2012. Effect of phosphorus and organic matter on availability and uptake of Fe (II) in maize (Zea mays. L). Journal of Agroecology 4(1): 12-19. (In Persian)
9- Grant C., Bittman S., Montreal M., Plenchette C., and Morel C. 2005. Soil and fertilizer phosphorus: Effects on plant P supply and mycorrhizal development. Canadian Journal of Plant Science 85(1): 3-14.
10- Hariprasada, P., and Niranjana, S.R. 2009. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria in improving plant health of tomato. Plant and Soil 316: 13–24.
11- Heinonen J.K., and Lahti R.J. 1981. A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. Anal Biochemistry 113: 313-317.
12- Idriss E.E., Makarewicz O., Farouk A. … and Borriss R. 2002. Extracellular Phytase Activity of Bacillus amyloliquefaciens FZB45 Contributes to Its Plant-Growth-Promoting Effect. Micro- Biology 148: 2097-2109.
13- Javaheri T., Lakzian A., Khorasani R., and Taheri P. 2013. The Effect of Aspergillus Isolates on Hydrolysis of Soil Organic Phosphorus (Phytic Acid and Sodium Glycerophosphate). Journal of Water and Soil 27(6): 24-32. (In Persian with English abstract)
14- Karimian N., and Ghanbari A. 1990. Evaluation of different extractants for prediction of Plant response to applied P fertilizer in highly calcareous soils. Abstract, p. 25, 10th Word fertilizer congress, CIEC, Nicosia, Cyprus.
15- 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.
16- Khan M.S., Ziadi A., and Wani P.A. 2007. Role of phosphate solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. Agronomy for Sustainable Development 27: 29-43.
17- Li H., Smith S.E., Holloway R.E., Zhu Y., and Smith F.A. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi contribute to P uptake by wheat grown in a phosphorus-fixing soil even in the absence of positive-growth responses. New Phytology 172: 536–543.
18- Loeppert R.H., and Suarez D.L. 1996. Carbonate and gypsum. p. 437-474. In: Sparks, D.L. (ed.) Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. SSSA Book Series No. 5. SSSA and ASA, Madison, WI.
19- Malakoti M.J., and Homaiy M. 2004. Fertility of arid and semi-arid soils (problems and solutions). Second edition with complete revision, Tarbiat Modares University publishers, Tehran.
20- Menezes-Blackburn D., Paredes C., Zhang H., Giles C.D., Darch T., Stutter M., George T.S., Shand C., Lumsdon D., Cooper P., Wendler R., Brown L., Blackwell M., Wearing C., and Haygarth P.M. 2016. Organic acids regulation of chemical–microbial phosphorus transformations in soils. Environmental Science and Technology 50: 11521-11531.
21- Olsen S.R., and Sommers L.E. 1982. Phosphorus, In: Page A.L. ed. Methods of soil analysis, part 2, Chemical and Microbiological properties, Soil Science Society of American Journal Madison 403–430.
22- Ponmurugan P., and Gopi C. 2006. In vitro production of growth regulators and phosphatase activity by phosphate solubilizing bacteria. African Journal of Biotechnology 5: 348-350.
23- Rahi P., Vyas P., Sharma S., Gulati A., and Gulati A. 2009. Plant growth promoting potential of the fungus Discosia sp. FIHB 571 from tea rhizosphere tested on chickpea, maize and pea. Indian Journal of Microbiology 49(2): 128–133.
24- Richardson A.E., Barea J., McNeill A.M., and Prigent-Combaret C. 2009. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. Plant Soil 339: 305–339.
25- Richardson A.E., and Simpson Richard J. 2011. Soil microorganisms mediating phosphorus availability. Plant Physiology 156: 989-996.

26- Richardson A.E., Hadobas P.A., and Hayes J.E. 2001. Extracellular Secretion of Aspergillus Phytase from Arabidopsis Roots Enables Plants to Obtain Phosphorus from Phytate. The Plant Journal 25: 641-649.
27- Rodríguez H., and Fraga R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances 17: 319–339.
28- Shieh T.R., and Ware J.H. 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. Appl Microbiol 16: 1348-1351.
29- Sarikhani M.R., Malboobi M.A., Aliasgharzad N., and Greiner R. 2019. Identification of two novel bacterial phosphatase-encoding genes in Pseudomonas putida strain P13. Journal of Applied Microbiology 127(4): 1113-1124.
30- Sarikhani M.R., Malboubi M.A., and Ebrahimi A. 2014. Phosphate-solubilizing bacteria: Isolation of bacteria and genes encoding phosphate-solubilizing, mechanism and genetics of phosphate dissolution. Agricultural Biotechnology 6(1): 76-110. (In Persian)
31- Singh B., and Satyanarayana T. 2011. Microbial Phytases in Phosphorus Acquisition.
32- Walkley A., and Black I.A. 1934. An examination of digestion method for determining soil organic matter and proposed modification of the chromic acid titration. Soil Scince 37: 29-38.
33- Wang X., Wang C., Sui J., Liu Z., Li Q., Ji C., Song X., Hu Y., Wang C., Sa R., and Zhang J. 2018. Isolation and characterization of phosphofungi, and screening of their plant growth-promoting activities. AMB Express 8: 63-70.
34- Wasaki J., Maruyama H., Tanaka M., Yamamura T., Dateki H., Shinano T., Ito S., and Osaki M. 2009. Overexpression of the LASAP2 gene for secretory acid phosphatase in white lupin improves the phosphorus uptake and growth of tobacco plants. Soil Science and Plant Nutrition 55: 107–113.
35- Yadav R.S., Tarafdar J.C. 2003. Phytase and phosphatase producing fungi in arid and semi-arid soils and their efficiency in hydrolyzing different organic P compounds. Soil Biol Biochem 35(6): 745–751.
36- Yadav B.K., and Tarafdar J.C. 2009. "Extracellular acid phosphatase and phytase activities of Buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) genotypes." Journal of the Indian Society of Soil Science 57(3): 332-337.

Journal of Water and Soil
Vol. 35, No. 4, Sep.-Dec. 2021, p. 505-517

نشریه آب و خاک (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۵، شماره ۴، مهر – آبان ۱۴۰۰، ص. ۵۱۷-۵۰۵

Effects of Fungal Phytases (Aspergillus Strains) on Availability of Phosphorus from Sodium Phytate and Phosphorus Uptake in Corn Plant

T. Valizadeh[1]- A. Lakzian[2*]- A. Halajnia[3]- M. Mazhari[4]

Received: 02-12-2019
Accepted: 14-07-2021

Introduction: The deficiency of phosphorus has attracted a lot of attention as one of the most important nutrients for agricultural plants especially in calcareous soils. However, in some soils, organic phosphorous containing 80 percent of total phosphorus in some soils but in most cases, that form of phosphorus is not available for plant uptake. The availability of phosphorus from both organic and inorganic sources by phosphate-solubilizing microorganisms (PSMs) as bio-inoculants are promising substitutes for chemical fertilizer and other agrochemicals amendments. Both arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and phosphate solubilizing bacteria (PSB) play a key role in providing phosphorus for agricultural plants. Among several phosphate-solubilizing fungal isolates, *Aspergillus* sp. is able to solubilize calcium phosphates by secreting various organic acids, e.g., oxalic and formic acids, and producing phytase enzyme. The present study aimed to evaluate the ability of different strains of Aspergillus for phytase production. The second aim of this study was the purification and application of purified phytase and its efficiency in the phosphorus availability from hexaphosphorylated inositols.

Materials and Methods: Two separate experiments were carried out in two different stages. In the first one phytase was isolated from three strains of Aspergillus (*Aspergillus niger* provided by the department of plant protection, Agricultural college, Ferdowsi University of Mashhad), *Aspergillus flavus*, and *Aspergillus fumigatus* strains were collected from the Iranian biological resources center, Tehran*)*. All Isolates were recultured on PDA (potato dextrose Agar) medium for 5 days at 30 ºC in an incubator. Quality evaluation of phytase production by three strains of Aspergillus tested using hydrolysis of phytate sodium on PSM (phytase screen medium) medium. Solubility index was calculated for all three strains (Solubility index = (Colony diameter + Hallow diameter)/ Colony diameter). Phytase production was carried out on fermentation media (Shieh and Ware 1968) but starch was substituted by dextrin. Fermentation media inoculated by fungal strains for 14 days at 30 ºC. Fermentation media was centrifuged (10,000 g) for 30 minutes and supernatant was collected. *Purification of phytases was done against Tris-HCl 25mM*, pH=7.2 for *12 hours*. Phytase activities were evaluated in a completely randomized design with three replications. Then purified phytase from three Aspergillus strains was applied in a pot experiment using a completely randomized design with the factorial arrangement and three replications. The experimental factors included two levels of hexaphosphorylated inositols (and 50 mg/kg) and four types of phytase (Control, phytase isolated from *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, and *Aspergillus fumigatus*. In the greenhouse experiment, the effects of different phytase types on phosphorus availability from sodium phytate (hexaphosphorylated inositols) and phosphorus uptake by maize plant was evaluated. Corn plants (*Zea maize* 704 single cross) were grown in 5 kg pots at 70 % of water holding capacity for 60 days. Plant height, root dry weight, shoot dry weight, phosphorus concentration in shoot and root were evaluated.

Results and Discussion: The results showed that *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* had the highest (4.96) and the lowest (1.23) solubility index among the tested strains, respectively. The results from the laboratory experiment showed that phytase isolated from *Aspergillus niger* had the maximum amount of phytase activity (16.48 µmol/ min.ml) and phytase isolated from *Aspergillus flavus* had the minimum phytase activity (4.67 µmol/ min.ml). *Aspergillus niger* phytase was more effective compared to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus fumigatus* phytases. The results of the greenhouse experiment represented that the highest amount of phosphorous in the shoot (0.125 percent), root (0.0102 percent), and shoot dry weight (46.08 g/pot) belonged to the maize plants treated by phytase isolated from *Aspergillus niger* in the presence of 50 mg/kg of sodium phytate. Generally, the results showed that *Aspergillus niger* strain was more effective than the other two strains

1, 2 and 3- Graduate Master, Professor and Assistant Professor of Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, respectively.
(*- Corresponding Author Email: alakzain@yahoo.com)
4- Assistant Professor, Department of Soil Science, Agriculture and Natural Resources Faculty, Karaj Branch, Islamic Azad University
DOI: 10.22067/JSW.2021.14925.0

in both laboratory and greenhouse experiments. Phytase enzymes isolated from strains had positive effects on phosphorous concentration in a different parts of maize plant and growth characteristics of maize. Phosphatase and phytase generally improve the availability of phosphorus from different phosphorus sources. It should be kept in mind that phytase also increases the bioavailability of other essential minerals such as Ca^{2+}, Mg^{2+}, P, Zn^{2+}, Fe^{3+}, which are bound to phytic acid. Since the phytase production by fungi has been attained by different cultivation methods (solid-state, semisolid, and submerged fermentation) it seems that different cultivation methods can affect the phytase efficiency. Therefore, we suggested that phytates from different cultivation methods can be tested for phosphorus bioavailability from different sources.

Keywords: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, Phosphorus availability