نشریه دانش آب و خاک / جلد23 شماره4 صفحه‌های 235 تا 248/ سال 1392

تأثیر استرپتومایسس‌ها بر کلنیزاسیون میکوریزی ریشه گیاه تره‌فرنگی و رشد آن

زهرا پورمیرزائی[1*]، ناصر علی‌اصغرزاد[2]، نصرت‌اله نجفی[3] و علیرضا دهناد[4]

تاریخ دریافت: 90/09/22 تاریخ پذیرش: 92/01/27

[1]-دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[2]-استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[3]-دانشیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

[4]-پژوهشکده بیوتکنولوژی جهاد کشاورزی شمالغرب کشور در تبریز

[*]مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: z.pormirzae87@yahoo.com

چکیده

قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AM) از دیرباز به‌عنوان همزیست ریشه اکثر گیاهان در بهبود رشد آنها در شرایط فقر غذایی و تنش‌های محیطی مؤثر شناخته شده است. شواهدی وجود دارد که حضور برخی میکروارگانیسم‌ها از جمله اکتینومیست‌ها یا برخی متابولیت‌های حاصل از آنها با افزایش سرعت و مقدار تندش اسپور قارچ‌های AM و تولید هیف‌های بیشتر، تکثیر انبوه این قارچ‌ها را فراهم کرده و پتانسیل زادمایه آنها را افزایش داده‌اند. در یک آزمایس گلدانی گیاه تره فرنگی با قارچ*Glomus intraradices* و سه گونه استرپتوماسیس(*Streptomyces*. sp, *S. griseus* and *S. albogriseus*) در یک خاک لوم شنی استریل تلقیح شدند. در زمان برداشت، کلنیزاسیون میکوریزی و فراوانی اندامهای قارچی(هیف و وزیکول) در ریشه، وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی و همچنین غلظت فسفر ریشه و بخش هوایی اندازه گیری شدند. . نتایج نشان داد که هر سه گونه *Streptomyces* گذشته از این‌که باعث تحریک تشکیل همزیستی میکوریزی شدند، پتانسیل قارچ میکوریزی را در افزایش توانایی گیاه تره‌فرنگی در جذب فسفر و رشد ریشه و بخش هوایی به‌طور قابل توجهی افزایش دادند. هر سه گونه *Streptomyces* نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری) باعث افزایش معنی‌دار درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه گردیدند (P<0/01). این افزایش در گونه *Streptomyces*. sp، 63/01، در گونه *S. albogriseus*، 56/91 و در گونه *S. griseus*، 32/27 درصد بود. همچنین فراوانی اندام‌های قارچی در ریشه‌های میکوریزی تره‌فرنگی در تلقیح توأم با هر سه گونه *Streptomyces* به طور معنی‌داری افزایش یافت. تیمارهای باکتریایی *Streptomyces*. sp، *S. albogriseus* و *S. griseus* به ترتیب 84/1، 78/6 و 71/67 درصد فراوانی هیف ریشه‌های میکوریزی را نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری) افزایش دادند. این افزایش در مورد فراوانی وزیکول به ترتیب 43/46، 41/33 و 29/96 درصد بود. تلقیح ریشه‌های میکوریزی تره‌فرنگی با هر سه گونه *Streptomyces*، وزن تر و خشک ریشه و وزن خشک بخش هوایی و غلظت فسفر ریشه و بخش هوایی گیاه را به طور معنی‌داری افزایش دادند.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های کمکی قارچ میکوریزی، تره‌فرنگی، همزیستی میکوریز آربوسکولار، *Streptomyces*

Effects of Streptomycets on Growth and Mycorrhizal Colonization of Leek Root

Z Pourmirzaei[*1], N Aliasgharzad[2] , N Najafi[3] and AR Dehnad[4]

Received: 13 December 2011 Accepted: 16 April 2013
[1-] Former M.Sc Student, Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz, Iran
[2-] Prof., Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz, Iran
[3-] Assoc. Prof., Dept. of Soil Sci., Faculty of Agric., Univ. of Tabriz, Iran
[4-] Biotechnology Research Center of Tabriz Jehad Keshavarzi Organization, Iran
[*] Corresponding Author Email: z.pormirzae87@yahoo.com

Abstract

It has been established that arbuscular mycorrhizal fungi (AM) as symbiont of plant roots improve their growth in nutrient poor conditions as well as stressful environments. There are evidences that the presence of some microorganisms including actinomycets or their metabolites, has provided the mass production of these fungi by stimulation of their spore germination percent and rate. In a pot culture experiment, leek plants *(Allium ampeloprasum* L.) were co-inoculated with *Glomus intraradices* and *Streptomyces* species (*Streptomyces*. sp, *S. griseus* and *S. albogriseus*) in a sterile sandy loam soil. At harvest, mycorrhizal colonization and frequency of fungal organs (hyphae and vesicles) in root, fresh and dry weights of root and shoot and also root and shoot P concentrations were measured. Results indicated that not only these species of *Streptomyces* promoted symbiosis formation, but they was also implicated in complementing the function of mycorrhizal fungus, including P acquisition and root and shoot growth of leek plant. All three species of *Streptomyces* significantly increased the percentage of mycorrhizal root colonization ($p<0.01$) compared to the non- *Streptomyces* control. These increments were 63.01% in *S*. sp, 56.91% in *S. albogriseus* and 32.27% in *S. griseus* compared to the control.. The fungal organs in roots were significantly increased at the presence of three *Streptomyces* species. Three species of *Streptomyces*, signficantly increased frequency of hyphae in roots up to 84.1%, 78.6% and 71.67%, in *Streptomyces*. sp, *S. albogriseus* and *S. griseus*, respectively. Thus, *S*.sp, *S. albogriseus* and *S. griseus* enhanced the frequency of vesicles in mycorrhizal roots up to 43.46%, 41.33% and 29.96%, respectively. Mycorrhizal leek roots inoculated with each species of *Streptomyces* significantly increased the fresh and dry weights of root, and dry weight of shoot, and root and shoot P concentrations.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal symbiosis, Leek, Mycorrhiza helper bacteria, *Streptomyces*

مقدمه

همزیستی میکوریزی یکی از شناخته‌شده‌ترین و مهمترین روابط همزیستی موجود در کره‌زمین است (آلن 1991) و قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AM) معمول‌ترین نوع این رابطه همزیستی هستند که با بیش از 95 درصد گیاهان روابط دو جانبه مفید تشکیل می-دهند. این همزیستی نقش مهمی در تغذیه، سلامت و تنوع گیاهان ایفا می‌نماید (نیومن و ردل 1987). غالباً شکل‌گیری همزیستی میکوریزی با تندش اسپورهای قارچی موجود در خاک شروع می‌شود. تندش اسپور، رشد لوله تندش، توسعه میسیلیوم برون‌ریشه‌ای و شاخه شاخه شدن آنها به وسیله ذخایر لیپیدی نظیر تری‌گلیسیرید و هیدرات‌های‌کربن نظیر گلیکوژن[1] و همچنین احتمالا ترهالوز[2] موجود در اسپورهای قارچی تشدید می‌شوند (گراندموگین-فرجانی و همکاران 2005). بدین جهت فراوانی لیپیدها در قارچ‌های AM وسیله‌ای برای ارزیابی پتانسیل میکوریزی این قارچ‌ها در ریشه‌های میزبان می‌باشند (گراندموگین - فرجانی و همکاران 2005). به‌طور کلی تندش اسپور قارچ‌های AM در خاک فرآیندی غیرقابل پیش‌بینی، آهسته و گاه غیر-ممکن است (ویلسون و همکاران 1989) بدین جهت همواره پتانسیل زادمایه قارچ‌های AM در ریشه گیاهان کمتر از حد مطلوب می‌باشند، زیرا عوامل محیطی و بیولوژیکی متعدد از قبیل pH، دما، میزان CO_2، رطوبت، نور، ،غلظت عناصر غذایی، ترکیبات حاصل از ریشه‌های میزبان و غیرمیزبان، عرضه هیدرات‌های‌کربن از گیاه میزبان به قارچ، میزان ذخایر لیپیدی و هیدرات‌های‌کربن موجود در اندام‌های قارچی و در نتیجه تندش اسپور قارچ‌های AM، رشد هیف آنها و کلنیزاسیون میکوریزی ریشه گیاهان میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. با افزایش سرعت و درصد تندش اسپور قارچ‌های AM و تولید هیف‌های بیشتر می‌توان پتانسیل زادمایه این قارچ‌ها را افزایش داد و در نتیجه عملکرد گیاهان میکوریزی را بهبود بخشید (فری- کلیت و همکاران 2005).

شواهدی وجود دارد که حضور برخی میکروارگانیسم-های مایکوریزوسفری خاک مانند گونه‌هایی از سودوموناس‌ها، باسیلوس‌هاو باکتری‌های بورخولدریا[3]، ردوکوکوس[4]، آرتروباکتر[5]، آزوسپریلیوم[6]، برادی‌ریزوبیوم[7]، آگروباکتریوم[8]، اکتینومیست‌ها و غیره باعث تحریک تندش اسپور، رشد میسیلیوم قارچ‌های میکوریزی و تشکیل همزیستی میکوریزی در ریشه گیاهان میزبان می‌شوند (شارما 2008). همچنین این باکتری‌ها پتانسیل قارچ‌های میکوریزی را در افزایش توانایی گیاه میزبان در جذب آب، فسفر، نیتروژن و سایر عناصر معدنی به‌خصوص از منابع غیرقابل‌دسترس، کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی، مقاومت در برابر تنش‌های محیطی و غیره به-طور قابل توجهی افزایش می‌دهند (تارکا و فری-کلیت 2008). این باکتری‌های کمک کننده قارچ‌های میکوریزی را MHB[9] می‌نامند (گاربای 1994). استرپتومایسس‌ها که از مهمترین و فراوان‌ترین اکتینومیست‌های موجود در خاک هستند، بواسطه توانایی‌های ویژه خود از قبیل تولید متابولیت‌های متنوع مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، ویتامین-ها، هورمون‌های محرک رشد گیاه و به‌خصوص تولید انواعی از متابولیت‌های محرک تندش اسپور و رشد هیف قارچ‌های میکوریزی در حضور و عدم حضور ریشه، به نظر می‌رسد برخی از گونه‌های آنها از مهمترین باکتری‌های کمکی باشند (پول و همکاران 2001). از سازوکارهای احتمالی که این باکتری‌ها باعث افزایش کلنیزاسیون میکوریزی در ریشه‌های میزبان

[1] Glycogen
[2] Trehalose

[3] *Burkholderia*
[4] *Rhodococcus*
[5] *Arthrobacter*
[6] *Azosprillum*
[7] *Bradyrhizobium*
[8] *Agrobacterium*
[9] Mycorrhiza helper bacteria

می‌شوند، می‌توان به موارد زیر اشاره نمود: 1) قابلیت پذیرش قارچ‌های میکوریزی به وسیله ریشه‌های میزبان را از طریق افزایش تولید مواد فنولی نظیر هیپافورین[1] و غیره توسط ریشه گیاه میزبان افزایش می‌دهند 2) افزایش تندش اسپورها و رشد هیف‌های قارچی از طریق تولید متابولیت‌های محرک منجر به افزایش کلنیزاسیون میکوریزی ریشه‌های میزبان می‌شود 3) قدرت نفوذ قارچ‌ها به درون ریشه را افزایش می‌دهند (گاربای 1994). علاوه بر این سازوکارها، *Streptomyces* AcH505 به‌عنوان باکتری کمکی، کلنیزاسیون میکوریزی ریشه گیاه صنوبر با قارچ331 *Heterobasidion abietinum* را به طور معنی‌داری افزایش می‌دهد، این در حالی است که این باکتری کمکی و متابولیت‌های آن هیچ تأثیری بر رشد و توسعه میسیلیوم‌های قارچ میکوریزی ندارند بلکه باکتری با تأثیر بر فیزیولوژی گیاه میزبان و افزایش فتوسنتز گیاه منجر به افزایش عرضه هیدرات-های‌کربن از گیاه به قارچ شده و در نتیجه کلنیزاسیون ریشه گیاه با قارچ افزایش یافته است (ناگی و همکاران 2004). همچنین باکتری‌های کمکی، به طریق اصلاح خصوصیات شیمیایی خاک ریزوسفر و ایجاد شرایط مناسب برای رشد قارچ‌های میکوریزی و جلوگیری از رشد قارچ‌های پاتوژن در ریزوسفر گیاهی، رشد قارچ-های میکوریز را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهند (شارما 2008). احتمالاً تأثیر این باکتری‌ها بر نحوه بیان ژن‌های مربوط به متابولیسم قارچ‌های میکوریزی مهمترین سازوکار آنها باشد، برای نمونه دوو و همکاران (2007) گزارش کردند که باکتری *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 با تغییر در مورفولوژی قارچ و تحریک بیان ژن‌های مربوط به متابولیسم لیپید در قارچ اکتومیکوریزای *Laccaria bicolor* 5238N منجر به افزایش رشد میسیلیوم‌های قارچی و کلنیزاسیون ریشه گیاه میزبان می‌گردد. این باکتری‌ها غالباً با تولید متابولیت‌های محرک فرار و یا محلول باعث افزایش بیان ژن‌های دخیل در متابولیسم لیپید در قارچ‌ها می‌شوند (اسچری و همکاران 2005). تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر سه گونه *Streptomyces*. sp، *S. griseus* و *S. albogriseus* بر درصد کلنیزاسیون میکوریزی و فراوانی هیف و وزیکول در ریشه و رشد گیاه تره‌فرنگی میکوریزی شده با قارچ*G. intraradices* انجام شد. علت انتخاب گیاه تره‌فرنگی در این تحقیق سازگاری بهتر آن با قارچ‌های AM و پتانسیل بالای میکوریزی شدن آن بواسطه سیستم ریشه‌ای منشعب و موئین آن بود.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی زادمایه قارچی

تکثیر درون‌شیشه‌ای قارچ AM

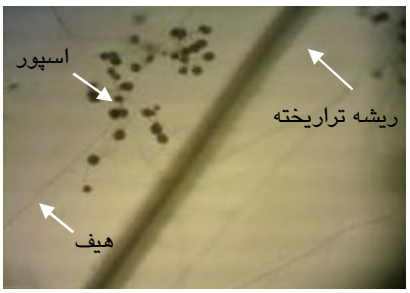
گونه قارچی *G. intraradices* به روش درون‌شیشه‌ای در کنار ریشه تراریخته هویج (این قارچ و ریشه تراریخته هویج از دپارتمان اکولوژی میکروبی دانشگاه Lund سوئد دریافت گردید) بر روی محیط کشت MSR[2] (جدول 1) به مدت سه ماه تکثیر یافت تا رابطه همزیستی میکوریزی بین دو ارگانیسم بوجود آید و قارچ با توسعه شبکه هیفی خود و تشکیل اسپورهای فراوان در محیط کشت سیکل زندگی خود را کامل نماید (شکل 1). بدین طریق زادمایه قارچی خالص و عاری از آلودگی‌های جنبی برای استفاده در ریشه گیاه تره-فرنگی آماده شد.

[1] Hypaphorine

[2] Modified Strullu- Romand

جدول 1- ترکیب محیط کشت MSR (کراننبروک و همکاران 2005).

نام محلول ذخیره	ترکیب	مقدار (g)	آب‌مقطر (mL)
Macro-elements	KNO_3	7/6	1000
	KCl	6/5	
	KH_2PO_4	0/41	
	$MgSO_4.7H_2O$	73/9	
Calcium nitrate	$Ca(NO_3).4H_2O$	35/9	1000
NaFeEDTA	NaFeEDTA	1/6	1000
Micro-elements	$MnSO_4.4H_2O$	2/45	1000
	$ZnSO_4.7H_2O$	0/28	
	H_3BO_3	1/85	
	$CuSO_4.5H_2O$	0/22	
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0/034	
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	0/0024	
Vitamins	Ca panthotenate	0/18	1000
	Pyridoxine	0/18	
	Thiamine	0/2	
	Cyanocobalamine	0/08	
	Nicotinic acid	0/2	



شکل 1- قارچ *G. intraradices* تکثیر شده به روش درون‌شیشه‌ای.

برای تهیه یک لیتر از محیط MSR: 10 میلی‌لیتر محلول Macro-elements، 10 میلی‌لیتر محلول Calcium nitrate، 5 میلی‌لیتر NaFeEDTA، 1 میلی‌لیتر محلول Micro-elements، 5 میلی‌لیتر از محلول Vitamins و 10 گرم ساکارز (منبع کربن) در آب‌مقطر حل شده و به حجم یک لیتر رسانده شد، سپس در pH=6/5 تنظیم گردید. در نهایت 6 گرم آگار به محیط اضافه شد و در دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1/2 اتمسفر به مدت 15 دقیقه اتوکلاو گردید (کراننبروک و همکاران 2005).

با بینوکلر به تعداد ریشه‌هایی که باید میکوریزی می‌شدند قطعات تقریباً 2×2 سانتی‌متری از ژل MSR عاری از آلودگی با 50 تا 60 اسپور و مقادیر تقریباً یکسان هیف و ریشه‌های میکوریزی انتخاب شده و آماده تلقیح در ریشه گیاه گردیدند.

آماده‌سازی زادمایه گونه‌های *Streptomyces*

در این تحقیق از سه گونه *Streptomyces*.sp، *S. griseus* و *S. albogriseus* استفاده شد که از پژوهشکده بیوتکنولوژی جهاد کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور در تبریز دریافت گردیدند. برای آماده‌سازی زادمایه این اکتینومیست‌ها از محیط کشت مایع Starch Casein استفاده شد(جدول 2).

جدول2- ترکیب محیط کشت S.C برای تهیه یک لیتر از آن (بنی‌اسدی و همکاران 2009).

ترکیب	نشاسته	کازئین	$MgSO_4$	$FeSO_4$	$CaCO_3$	KNO_3	NaCl	K_2HPO_4
مقدار (g)	10	0/3	0/05	0/01	0/02	2	2	2

محیط کشت در pH=7 تنظیم شد و در دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1/2 اتمسفر به مدت 15 دقیقه اتوکلاو گردید. برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها، زمانی‌که دمای محیط کشت به زیر 45 درجه سلسیوس رسید قارچ‌کش نیستاتین با فیلتر استریل 0/22µm (Millipore filter) به محیط کشت اضافه شد. بدین ترتیب که 0/1 گرم از پودر نیستات داروخانه‌ای در یک میلی‌لیتر حلال دی-متیل‌سولفوکسید حل شد و از محلول حاصل، 100 میکرولیتر به محیط کشت یک لیتری اضافه گردید. در نهایت بعد از آماده شدن محیط کشت S.C، از هر سه گونه *Streptomyces* که در پتری‌دیش‌های حاوی محیط S.C.A کشت تراکمی 72 ساعته داده شده بودند به مقدار یکسان (یک لوپ پر) توسط حلقه پلاتینی استریل به ارلن‌های حاوی محیط مایع S.C منتقل گردیدند. ارلن‌ها به مدت 7 تا 10 روز در دمای 29 درجه سلسیوس در شیکر انکوباتور با دوران 120 دور در دقیقه قرار گرفتند. بعد از این مدت جمعیت باکتری‌ها در هر میلی-لیتر سوسپانسیون با استفاده از روش کدورت سنجی با اندازه‌گیری چگالی نوری (OD) در طول موج 540nm با استفاده از جدول مک فارلند $1/1\times10^8$ تعیین شد. قابل ذکر است که اثرات تحریکی این سه گونه *Streptomyces* بر تندش اسپور و رشد هیف قارچ *G. intraradices* در یک آزمایش درون‌شیشه‌ای مشخص گردیده است (پورمیرزائی، 1390).

کشت گیاه

جوانه‌دار کردن بذر

بذرهای تره‌فرنگی (*Allium ampeloprasum* L. var. porrum.) رقم Amundo محصول شرکت Royal Sluis از گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز تهیه گردید و بعد از ضدعفونی با هیپوکلریت‌سدیم یک درصد با رعایت شرایط استریل به مدت یک هفته در دمای 18 درجه سلسیوس نگهداری شدند تا جوانه بزنند.

آماده‌سازی خاک

خاک مورد نظر از ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، انتخاب شد و بعد از هواخشک و الک شدن، به مدت 2 ساعت در دمای 121 درجه سلسیوس در اتوکلاو استریل گردید. خصوصیات خاک در جدول 3 آورده شده است.

جدول 3- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش.

خصوصیات	گروه بافت	رطوبت FC	pH(1:1)	EC	CCE	کربن آلی	پتاسیم	فسفر	آهن	روی
مقدار	لوم شنی	11	8	1/8	11/5	0/58	225/4	6/88	2/8	1/4
واحد	-	وزنی (٪)	-	dS/m	(٪)	(٪)	mg /kg	mg /kg	mg /kg	mg /kg

کشت جوانه‌ها و اعمال تیمارها

بر اساس نقشه طرح آزمایشی در تیمارهای حاوی قارچ AM از ژل کشت درون‌شیشه‌ای قارچ به مقدار یکسان (بند 1-2) با نوک اسپاتول برداشته و در عمق مورد نظر از خاک در 20 نقطه مختلف با رعایت فاصله در هر گلدان قرار داده شد. در تیمارهای شاهد بدون قارچ میکوریزی هم به همان مقدار از ژل MSR بدون قارچ قرار داده شد. سپس بذرهای جوانه‌دار شده

یکدست و هم اندازه، در همان نقاط در تماس با زادمایه قرار داده شدند. در تیمارهای حاوی گونه‌های *Streptomyces*، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری با جمعیت $1/1\times10^8$ پای هر بذر جوانه‌دار تزریق شد و برای تیمارهای شاهد بدون باکتری هم یک میلی‌لیتر از محیط مایع S.C بدون باکتری تزریق گردید. گلدان‌ها تارطوبت 0/9 ظرفیت مزرعه آبیاری شدند و با آبیاری روزانه، رطوبت گلدان‌ها در حدود 0/9 رطوبت ظرفیت مزرعه نگهداری شد. گلدان‌ها در شرایط کنترل شده اتاقک رشد با شدت نور 8000 لوکس و مدت زمان روشنایی 16 ساعت با دمای روز و شب به ترتیب 2 ± 26 و 2 ± 14 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 60 تا 70 درصد به مدت سه ماه نگهداری شدند. در طول این مدت گیاهان ابتدا با نصف غلظت محلول راریسون (راریسون 1987) و سپس با محلول غذایی کامل راریسون تغذیه شدند.

پارامترهای مورد اندازه‌گیری

وزن تر و خشک ریشه و وزن خشک بخش هوایی گیاه

اندازه‌گیری غلظت فسفر عصاره‌های گیاهی به روش وانادات مولیبدات فسفریک‌اسید یا روش زرد (کاتینه 1980)

تعیین درصد کلنیزاسیون (کورمانیک و مک‌گراو 1982، نوریس و همکاران 1992) و درصد وزیکول و هیف (السن و همکاران 2010) در ریشه‌های میکوریزی ریشه‌های تثبیت شده در محلول 50 درصد اتانول با محلول رنگی تریپان‌بلو (50 میلی‌گرم پودر تریپان‌بلو در 100 میلی‌لیتر لاکتوگلیسرین) رنگ‌آمیزی شدند، سپس حدود 30 قطعه از آنها در پتری‌دیش قرار داده شدند و با استفاده از بینوکلر و روش تلاقی خطوط شبکه درصد حضور اندام‌های قارچی در طول ریشه تخمین زده شد و همچنین برای تعیین درصد هیف و وزیکول قطعات یک سانتی‌متری از ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده روی لام قرار داده شد و در 30 مقطع با استفاده از میکروسکوپ فراوانی این اندام‌های قارچی در طول ریشه تخمین زده شد.

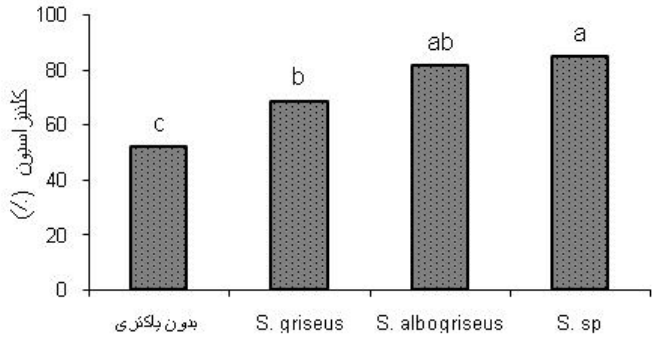
طرح آزمایشی و تجزیه‌آماری

آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور قارچ در دو سطح (شاهد و یک گونه قارچ AM) و باکتری کمکی در چهار سطح (سه گونه *Streptomyces* و یک شاهد بدون باکتری) و با سه تکرار انجام شد. آزمایش بررسی اثر استرپتومایسس‌ها بر درصد کلنیزاسیون میکوریزی و فراوانی اندام‌های قارچی در چهار تیمار شامل: تیمار شاهد بدون باکتری و سه تیمار اسپور قارچ + باکتری در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) انجام گرفت. تجزیه آماری داده‌ها شامل تجزیه واریانس، آزمون نرمال بودن توزیع داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها با نرم‌افزار MSTATC و آزمون چنددامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال 5 درصد انجام شد.

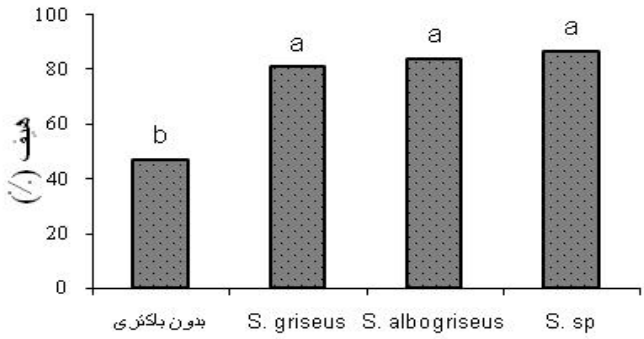
نتایج و بحث

درصد کلنیزاسیون ریشه

هر سه گونه *Streptomyces* نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری) باعث افزایش معنی‌دار درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه گردیدند ($P<0/01$) (جدول 4). این افزایش در گونه *Streptomyces.* sp، 63/01، در گونه *S. albogriseus*، 56/91 و در گونه *S. griseus*، 32/27 درصد بود و از این نظر تفاوتی بین دو گونه *Streptomyces.* sp با *S. albogriseus* و نیز *S. albogriseus* با *S. griseus* وجود نداشت ولی درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه در تلقیح توأم با گونه *Streptomyces.* sp به طور معنی-داری بیشتر از گونه *S. griseus* بود (شکل 2).



شکل 2- اثر گونه‌های *Streptomyces* بر درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه تره‌فرنگی (آزمون دانکن $P<0/05$)



شکل 3- اثر گونه‌های *Streptomyces* بر درصد هیف ریشه میکوریزی تره‌فرنگی (آزمون دانکن $P<0/05$).

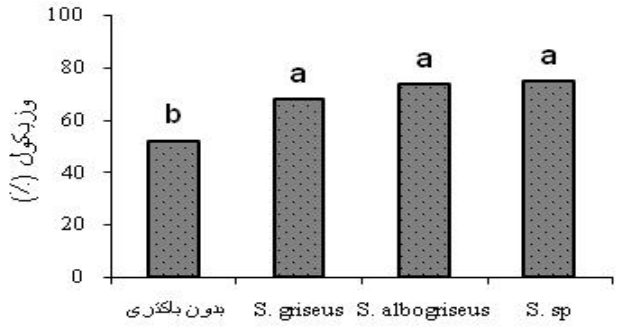
درصد هیف و وزیکول در ریشه میکوریزی

اثر هر سه گونه *Streptomyces* بر درصد هیف ($P<0/01$) و درصد وزیکول ($P<0/05$) (جدول 4) در ریشه‌های تره‌فرنگی کلنیزه شده با قارچ *G. intraradices* معنی‌دار بود. تیمارهای باکتریایی *Streptomyces.* sp، *S. albogriseus* و *S. griseus* به ترتیب 84/1، 78/6 و 71/67 درصد فراوانی هیف ریشه‌های میکوریزی را نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری) افزایش دادند (شکل3). این افزایش در مورد فراوانی وزیکول به ترتیب 43/46، 41/33 و 29/96 درصد بود (شکل 4).

جدول 4- تجزیه واریانس اثر گونه‌های *Streptomyces* بر درصد کلنیزاسیون، هیف و وزیکول در ریشه میکوریزی تره‌فرنگی

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		کلنیزاسیون(٪)	هیف(٪)	وزیکول(٪)
تیمار(*Streptomyces*)	3	660/45**	1035/77**	326/17*
خطای آزمایشی	8	59/74	53/67	54/03
کل	11			
ضریب تغییرات (٪)		10/81	9/79	10/97

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5٪ و 1٪



شکل 4- اثر گونه‌های *Streptomyces* بر درصد وزیکول ریشه میکوریزی تره‌فرنگی (آزمون دانکن $P<0/05$).

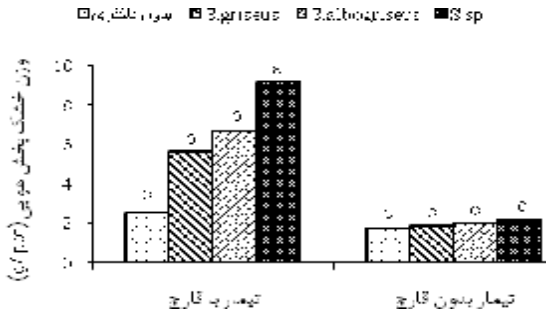
وزن خشک بخش هوایی

اثر متقابل قارچ میکوریز آربوسکولار و باکتری *Streptomyces* بر وزن خشک بخش هوایی گیاه معنی-دار بود ($p<0/01$) (جدول 5). تیمار قارچی نسبت به تیمار شاهد (بدون قارچ)، در سه سطح باکتریایی (سه سطح *Streptomyces*) دارای وزن خشک بخش هوایی بالاتری بودند. در تیمار قارچی هر سه گونه *Streptomyces* باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک بخش هوایی گیاه نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری) شدند. وزن خشک بخش هوایی گیاه از 2/49 g/pot در تیمار شاهد (بدون باکتری) به9/16 g/pot، 6/69 و 5/61 به ترتیب در کشت توأم با *Streptomyces*. sp، *S. albogriseus* و *S. griseus* افزایش یافت (شکل 5). در تیمار شاهد (بدون قارچ)، گونه‌های *Streptomyces* نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری) تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن خشک بخش هوایی گیاه نداشتند.

جدول 5- تجزیه واریانس اثر گونه‌های *Streptomyces* و قارچ AM بر وزن تر، وزن خشک و غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه تره‌فرنگی.

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات				
		وزن خشک بخش هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	فسفر بخش هوایی	فسفر ریشه
Streptomyces	3	13/12**	44/40**	3/41**	25/01**	4/81**
قارچ AM	1	98/33**	317/69**	24/12**	264/27**	117/88**
قارچ × *Streptomyces*	3	9/95**	7/03*	1/05**	4/74*	3/40*
خطا	16	1/36	1/89	0/03	1/25	0/87
ضریب تغییرات (٪)		29/40	10/15	8/03	12/16	19/61

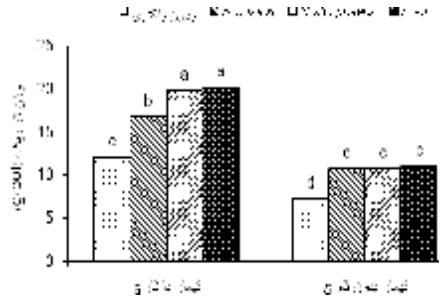
* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال 5٪ و 1٪



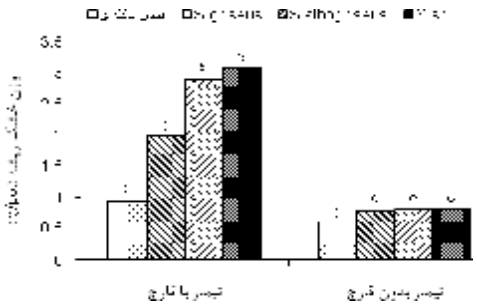
شکل 5- اثر متقابل گونه‌های *Streptomyces* و قارچ AM بر وزن خشک بخش هوایی تره‌فرنگی (آزمون دانکن $P<0/05$).

وزن تر و خشک ریشه

اثر متقابل قارچ میکوریز آربوسکولار و گونه‌های *Streptomyces* بر وزن تر ($P<0/05$) و خشک ریشه ($P<0/01$) (جدول 5) معنی‌دار بود. تیمار قارچی نسبت به تیمار شاهد (بدون قارچ) در هر چهار سطح باکتریایی (سه سطح *Streptomyces* و یک سطح شاهد (بدون باکتری)) دارای وزن تر و خشک ریشه بالاتری بود. در تیمار قارچی هر سه گونه *Streptomyces* باعث افزایش معنی‌دار وزن تر و خشک ریشه نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری) شدند. در مورد وزن تر ریشه، این افزایش در گونه *Streptomyces*. sp، 66/97، در گونه *S. albogriseus*، 63/49 و در گونه *S. griseus*، 38/49 درصد بود (شکل 6). وزن خشک ریشه هم از 1/44 g/pot در تیمار شاهد به 4/01 g/pot، 3/80 و 3/27 به ترتیب در کشت توأم با *Streptomyces*. sp، *S. albogriseus* و *S. griseus* افزایش یافت (شکل 7). در تیمار شاهد (بدون قارچ) هر سه گونه *Streptomyces* تأثیر معنی‌داری بر افزایش وزن تر و خشک ریشه گیاه نشان دادند.



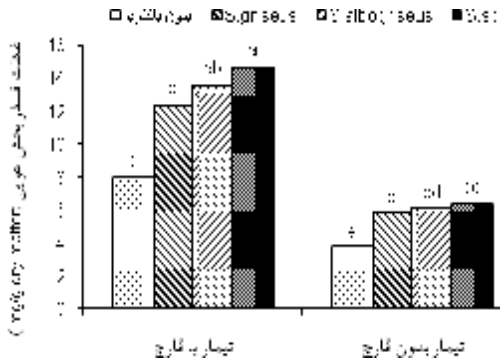
شکل 6- اثر متقابل گونه‌های *Streptomyces* و قارچ AM بر وزن تر ریشه تره‌فرنگی (آزمون دانکن $P<0/05$).



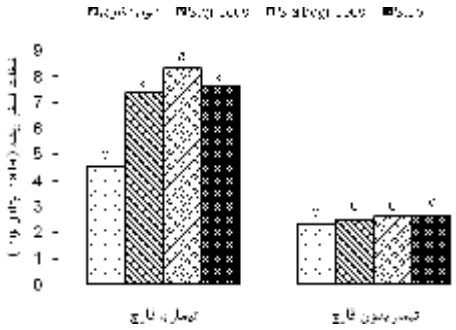
شکل 7- اثر متقابل گونه‌های *Streptomyces* و قارچ AM بر وزن خشک ریشه تره‌فرنگی (آزمون دانکن $P<0/05$).

غلظت فسفر ریشه و بخش هوایی

اثر متقابل قارچ میکوریز آربوسکولار و باکتری *Streptomyces* بر غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه ($P<0/05$) معنی‌دار شد (جدول 5). تیمار قارچی نسبت به تیمار شاهد (بدون قارچ) در هر چهار سطح باکتریایی (سه سطح *Streptomyces* و یک سطح شاهد (بدون باکتری)) دارای غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه بالاتری بودند (شکل‌های 8 و 9). در تیمار قارچی هر سه گونه *Streptomyces* نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری) باعث افزایش معنی‌دار غلظت فسفر ریشه و بخش هوایی گیاه شدند. گونه‌های *Streptomyces.* sp، *S. albogriseus* و *S. griseus* به ترتیب 83/11، 69/30 و 54/11 درصد، غلظت فسفر بخش هوایی را نسبت به تیمار شاهد (بدون باکتری) افزایش دادند (شکل 8)، این افزایش در مورد غلظت فسفر ریشه به ترتیب 66/59، 81/44 و 61/57 درصد بود (شکل 9). در تیمار شاهد (بدون قارچ)، گونه‌های *Streptomyces* به طور معنی‌داری باعث افزایش غلظت فسفر بخش هوایی گیاه شدند و از این نظر گونه‌های *Streptomyces.* sp و *S. albogriseus* بیشترین تأثیر را داشتند ولی این سه گونه تأثیری بر غلظت فسفر ریشه نشان ندادند.



شکل 8- اثر متقابل گونه‌های *Streptomyces* و قارچ AM بر غلظت فسفر بخش هوایی تره‌فرنگی (آزمون دانکن $P<0/05$).



شکل 9- اثر متقابل گونه‌های *Streptomyces* و قارچ AM بر غلظت فسفر ریشه تره‌فرنگی (آزمون دانکن $P<0/05$.)

دلیل افزایش فراوانی هیف، وزیکول و درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه را در تلقیح توأم قارچ با هر یک از سه گونه *Streptomyces* می‌توان به نقش این اکتینومیست‌ها و متابولیت‌های محرک احتمالی حاصل از آنها در افزایش ذخایر لیپیدی اندام‌های قارچی (گراندموگین-فرجانی و همکاران 2005)، تندش اسپور و رشد میسیلیوم‌های قارچی در برهمکنش سه جانبه با قارچ و ریشه گیاه نسبت داد. زیرا در یک آزمایش درون‌شیشه‌ای مشاهده شد که این گونه‌های *Streptomyces* و متابولیت‌های حاصل از آنها باعث افزایش معنی‌دار تندش اسپور و به موازات آن رشد هیف این قارچ شدند (پورمیرزائی 1390). در آزمایشی اثر باکتری *Pseudomonas monteilli* سویه HR13 بر فراوانی هیف و وزیکول ریشه درخت اقاقیای میکوریزی شده با قارچ *G. intraradices* بررسی شد و نتایج نشان داد که این باکتری کمکی به موازات افزایش درصد کلنیزاسیون میکوریزی ریشه باعث افزایش معنی‌دار فراوانی هیف و وزیکول‌ها گردید (دیوپونویز و پلنچت 2003). البته باید توجه داشت که افزایش تندش و رشد هیف‌های قارچی شرط لازم ولی کافی برای کلنیزاسیون میکوریزی ریشه نمی‌باشند بنابراین گونه‌های *Streptomyces* علاوه بر افزایش رشد قارچ احتمالاً با تولید برخی مواد از قبیل هورمون‌های محرک رشد باعث رشد و تغییر در مورفولوژی ریشه از قبیل منشعب‌تر و موئین‌تر شدن توده ریشه‌ای شدند (آلدسوکوی و همکاران 1998). ریشه‌های ریز و منشعب پتانسیل بالایی برای کلنیزاسیون میکوریزی دارند و در نتیجه قابلیت پذیرش قارچ میکوریزی به‌وسیله ریشه تره‌فرنگی افزایش یافت و کلنیزاسیون ریشه بیشتر شد. مشاهده شد که تلقیح قارچ AM به تنهایی در ریشه تره‌فرنگی باعث افزایش وزن تر و خشک ریشه و غلظت فسفر بخش هوایی و ریشه گیاه گردید و با حضور گونه‌های *Streptomyces* در ریشه‌های میکوریزی این پارامترها به‌طور معنی‌داری افزایش یافتند. تلقیح قارچ AM به تنهایی در ریشه تره‌فرنگی تأثیری بر وزن خشک بخش هوایی نداشت. احتمالاً تلقیح قارچ در ریشه با افزایش سطح تماس ریشه با خاک منجر به جذب بیشتر آب توسط گیاه شده و وزن تر آن افزایش یافته ولی تأثیری بر وزن خشک نداشت. تلقیح توأم با قارچ و گونه‌های *Streptomyces* منجر به افزایش معنی‌دار وزن خشک بخش هوایی نیز شد. تصور می‌رود که گونه‌های *Streptomyces* در مقایسه با تیمار شاهد (بدون باکتری) با افزایش درصد کلنیزاسیون میکوریزی و فراوانی اندام‌های قارچی در ریشه‌های میکوریزی تره‌فرنگی باعث افزایش سطح تماس ریشه با خاک شده و در نتیجه گیاه آب و فسفر بیشتری جذب کرده و رشد بیشتری داشته و وزن خشک بخش هوایی آن افزایش یافته است لذا همبستگی

مثبت معنی‌داری بین درصد کلنیزاسیون و فراوانی هیف در ریشه‌های میکوریزی با وزن خشک بخش هوایی وجود داشت (P<0/01). نتایج آزمایش عبدالفتاح و محمدین (2000) نشان داد که *S. coelicolor* به‌واسطه متابولیت‌های محرک ناشناخته خود، در ریشه‌های سورگوم کلنیزه شده با قارچ *G. intraradices* باعث افزایش معنی‌دار کلنیزاسیون میکوریزی ریشه و توسعه آربوسکول گردید و در نتیجه این افزایش فتوسنتز گیاه، فعالیت‌های فسفاتازی ریشه و در نتیجه غلظت فسفر گیاه و میزان آمینواسیدهای موجود در برگ گیاه به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. همچنین تصور می‌رود گونه-های *Streptomyces* مورد آزمایش با ترشح هورمون‌های رشد (اکسین، جیبرلین و سیتوکینین)، انواع ویتامین‌های گروه B و غیره باعث افزایش سرعت متابولیسم، رشد، توسعه و افزایش تراکم و وزن ریشه گردیده باشند (کراوچنکو و همکاران 1994).

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که استرپتومایسس‌های کمکی باعث افزایش رشد قارچ *G. intraradices* و تشکیل همزیستی میکوریزی در ریشه تره‌فرنگی شده وپتانسیل قارچ میکوریزی را در افزایش توانایی گیاه در جذب آب و فسفر به‌طور قابل توجهی افزایش داده و منجر به افزایش چشمگیر رشد گیاه شده‌اند. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، گونه‌های مورد آزمایش *Streptomyces* می‌توانند در فرمولاسیون زادمایه قارچ *G. intraradices* به منظور تقویت پتانسیل آن مورد استفاده قرار گیرند.

منابع مورد استفاده

پورمیرزائی ز، 1390. تأثیر گونه‌های *Streptomyces* بر تندش اسپور قارچ میکوریز آربوسکولار و کلنیزاسیون ریشه گیاه تره‌فرنگی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد علوم خاک، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز.

Abdel-Fattah GM and Mohamedin GM, 2000. Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) and *Streptomyces coelicolor* and their effects on sorghum plants grown i0n soil amended with chitin of braw scales. Biol Fertil Soils 32: 401-409.

Aldesuquy HS, Mansour FA and Abo-Hamed SA, 1998. Effect of the culture filtrates of *Streptomyces* on growth and productivity of wheat plants. Folia Microbiol 43: 465- 470.

Allen MF, 1991. The Ecology of Mycorrhizae. Cambridge University Press, P. 184.

Baniasadi F, Shahidi Bonjar GH, Baghizadeh A, Karimi Nik A, Jorjandi M, Aghighi S and Rashid Farokhi P, 2009. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of sunflower head and stem rot disease, by use of soil borne actinomycetes isolation. Am J Agric Biol Sc 4(2):146-151.

Cottenie A, 1980. Soil and plant testing. FAO soils Bulletin 38 (2) :94-100.

Cranenbrouck S, Voets L, Bivort C, Raurent L, Strullu DG and Declerck S, 2005. Methodologies for in vitro cultivation of arbuscular mycorrhiza fungi with root organs. Pp. 341-372. In: Declerck S, Strullu DG and Fortin A (eds). In Vitro Culture of Mycorrhizas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Deveau A, Palin B, Delaruelle C, Peter M, Kohler A, Pierrat JC, Sarniguet A, Garbaye J, Martin F and Frey-Klett P, 2007. The mycorrhiza helper *Pseudomonas fluorescens* BBc6R8 has a specific priming effect on the growth, morphology and gene expression of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. New Phytol 175:743-755.

Duponnois R and Plenchette C, 2003. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. Mycorrhiza 13: 85- 91.

Frey-klett P, Chavatte M, Clausse ML, Courrier SLE, Roux C, Aaijmakers J, Martinotti MG, Pierrat JC and Garbye G, 2005. Ectomycorrhiza symbiosis affects functional diversity of rhizosphere *Pseudomonas fluorescens*. New Phytol 165: 313-328.

Garbaye J, 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. Tansley review No. 76. New Phytol 128:197-210.

Grandmougin-Ferjani A, Fontaine J and Durand R, 2005. Carbon metabolism, lipid composition and metabolism in arbuscular mycorrhizal fungi. Pp. 159-180. In: Declerck S, Strullu DG and Fortin A (eds). In Vitro Culture of Mycorrhizas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Kormanik PP and Mc Graw AC, 1982. Quantification of VA mycorrhizae in plant roots. Pp. 37-45. In: Schenck NC (ed). Methods and Principles of Mycorrhizal Research. Am Phytopathol. Soc.

Kravchenko LV, Leonova EL and Trikhonovich IA, 1994. Effect of root exudates of non-legume plants on the response of auxin production by associated diazotroph. Microb Releases 2: 267-271.

Nagy NE, Fossdal CG, Dalen LS, Lonneborg A, Heldal A and Johnsen Q, 2004. Effects of *Rhizoctonia* infection and drought on peroxidase and chitinase activity in Norway spruce (*Picea abies*). Physiologia Plantarum 120:465-473.

Newman EL and Reddell P, 1987. The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. New Phytol 106:745-751.

Norris IR, Read DJ and Varma AK, 1992. Methods in Microbiology, Techniques for Study of Mycorrhiza. Academic Press, London.

Olsson PA, Rahm J and Aliasgharzad N, 2010. Carbon dynamics in mycorrhizal symbioses in linked to carbon costs and phosphorus benefits. FEMS Microbiol Ecol 72:123-131.

Poole EJ, Bending GD, Whipps JM and Read DJ, 2001. Bacteria associated with *Pinus sylvestis-Lactariusrufus* ectomycorrhiza and their effects on mycorrhiza formation in vitro. New Phytol 151:743-751.

Rorisons A, 1987. Method Sheet 3 Nutrient Solution, recipe obtained from Sheffield University.

Schrey SD, Schellhammer M, Ecke M, Hampp R and Tarkka MT, 2005. Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. New Phytol 168:205-216.

Sharma M, 2008. A functional study on the multilateval symbiosis of the fungal order *Sebacinales* with plant hosts and bacteria. M.Sc Dissertation, University of Justus- Liebig, Germany.

Tarkka MT and Frey-Klett P, 2008. Mycorrhiza helper bacteria. Pp. 113-132. In: Varma A (ed). Mycorrhiza. 3nd ed. Springer, Berlin.

Wilson GWT, Hetrick BA, Daniels, Kitt and Gerschefske D, 1989. Suppression of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus spore germination by nonsterile soil. Can J Bot 67:18-23.