تأثیر گونه‌های *Streptomyces* بر کارایی میکوریز آربوسکولار و رشد شبدر

زهرا پورمیرزائی، امیر لکزیان[1]، ناصر علی اصغرزاد، علیرضا دهناد و اکرم حلاج‌نیا

دانشجوی دکتری، گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ **z.pourmirzai@yahoo.com**

استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ **alakzian@yahoo.com**

استاد گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز؛ **n-aliasghar@tabrizu.ac.ir**

استادیار میکروبیولوژی- دپارتمان بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان آذربایجانشرقی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، تبریز؛ **a.dehnad@areeo.ac.ir**

استادیار گروه علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد؛ **halajnia@um.ac.ir**

دریافت: **99/8/3** و پذیرش: **1400/3/19**

چکیده

تعدادی از ریزجانداران از جمله اکتینوباکترها یا برخی متابولیت‌های حاصل از آنها به افزایش توسعه‌ی میسیلیوم‌های قارچی و کلنیزه شدن ریشه با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار (AM) و شاخص‌های رشدی گیاهان کمک می‌کنند. پژوهش حاضر با هدف بررسی تأثیر چهار گونه‌ی بومی *Streptomyces griseus*، *S. albogriseus*، *S. sp*$_1$ و *S. sp*$_2$ بر کلنیزه شدن و فراوانی هیف و وزیکول در ریشه‌ی گیاه شبدر برسیم (*Trifolium alexandrinum*) میکوریزی شده با قارچ *Rhizophagus irregularis* در قالب طرح کاملا" تصادفی (CRD) با سه تکرار انجام شد. تیمارها شامل 1 شاهد (تنها قارچ *R. irregularis*) و 4 تیمار قارچ *R. irregularis* + گونه‌های *Streptomyces* بودند. آزمایش بررسی تأثیر این چهار گونه‌ی *Streptomyces* بر وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه میکوریزی شده به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملا" تصادفی با دو فاکتور قارچ در دو سطح (شاهد و *R. irregularis*) و اکتینوباکتر در 5 سطح (شاهد و 4 گونه‌ی *Streptomyces*) در سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که گونه‌ی *S. albogriseus*باعث تحریک تشکیل همزیستی میکوریزی در ریشه‌ی گیاه شبدر شد و همچنین پتانسیل قارچ میکوریزی را در افزایش توانایی گیاه در جذب فسفر و رشد ریشه و اندام هوایی به طور قابل توجهی افزایش داد. سه گونه‌ی *S. griseus*، *S. albogriseus* و *S. sp*$_2$ باعث افزایش معنی‌دار درصد کلنیزه شدن و فراوانی اندام‌های قارچی در ریشه‌ی میکوریزی شبدر شدند. درصد کلنیزه شدن ریشه از 48/61 درصد در شاهد به 86/59، 72/93 و 66/90 درصد به ترتیب در کشت توأم با *S. griseus*، *S. albogriseus* و *S. sp*$_2$ افزایش یافت. فراوانی هیف در ریشه‌ی میکوریزی به ترتیب از 45/32 درصد در شاهد به 92/55، 85/48 و 71/47 درصد در تیمارهای *S. griseus*، *S. albogriseus* و *S. sp*$_2$ افزایش یافت. تلقیح ریشه‌های میکوریزی شبدر با گونه‌ی *S. albogriseus* وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه را به طور معنی‌داری افزایش داد. گونه‌های *S. griseus* و *S. sp*$_2$ تنها وزن خشک اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه را افزایش دادند. با توجه به نتایج حاصل از پژوهش حاضر پیشنهاد می‌شود که کارایی گونه‌ی *S. albogriseus* در تولید زادمایه‌ی قارچ *R. irregularis* به منظور تقویت پتانسیل آن بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: باکتری کمکی میکوریزا، شبدر، همزیستی میکوریزی، *Streptomyces*

---

[1]. نویسنده مسئول، آدرس: مشهد، دانشگاه فردوسی، دانشکده کشاورزی، گروه مهندسی علوم خاک

مقدمه

یکی از ارکان مهم در نیل به توسعه‌ی پایدار، بکارگیری روش‌های زیستی (بیولوژیک) در تولید محصولات کشاورزی است. همزیستی میکوریزی از رایج‌ترین و با سابقه‌دارترین ارتباط‌های همزیستی در سلسله‌ی گیاهی است به طوری که اکثر گیاهان (حدود 95 درصد از گونه‌های گیاهان آوندی) حداقل یکی از تیپ-های میکوریزی را دارا هستند. میکوریز آربوسکولار (AM) رایج‌ترین نوع این همزیستی میکوریزی با گیاهان است. کلنیزه شدن ریشه با این قارچ‌ها سبب افزایش مقاومت آنها در برابر تنش‌های محیطی، افزایش رشد از طریق افزایش جذب عناصر غذایی، بهبود جذب آب در گیاهان و حفاظت از آنها در برابر بیماری‌ها می‌شود (حاتمی و همکاران، 2020). به نظر می‌رسد که همزیستی با قارچ میکوریز، جهت تکامل و گسترش گیاهان اتوتروف امری ضروری باشد و از طرفی قارچ‌های میکوریز خود نیز موجوداتی شیمیوارگانوتروف و همزیست اجباری ریشه‌ی گیاهان هستند (فورتین و همکاران، 2005).

طی سال‌های اخیر روش کشت درون شیشه‌ای (*in vitro*) بیشترین موفقیت را برای تکثیر صنعتی قارچ-های AM در پی داشته است. بررسی‌های اقتصادی صورت گرفته نشان می‌دهد، این روش از لحاظ تأمین امکانات و تجهیزات پایه و همچنین هزینه‌ی لازم برای افزایش حجم زادمایه‌ی تولیدی از مزیت قابل توجهی برخوردار است (دودز و همکاران، 2000). همچنین پتانسیل بسیار خوب این روش برای تکثیر اسپورهای عاری از آلودگی‌های جنبی، پژوهشگران را بر آن داشته تا از این تکنیک ویژه به صورت وسیع در پژوهش‌های مدرن در زمینه‌های مختلف مربوط به قارچ‌های AM استفاده نمایند (فورتین و همکاران، 2002). با این وجود، ماهیت همزیست اجباری این قارچ‌ها با ریشه‌ی گیاه مانع مطالعات دقیق فیزیولوژیکی و ژنتیکی آنها می‌شود. بنابراین برای بررسی تأثیر همزیستی میکوریزی بر شاخص‌های رشدی گیاه و همچنین تکثیر درون شیشه‌ای قارچ‌های AM از اسپورهای تندش یافته این قارچ‌ها استفاده می‌شود (تیلکا و همکاران، 1991). تندش اسپور قارچ‌های AM و رشد و توسعه‌ی میسیلیوم‌های قارچی درشرایط آزمایشگاهی و همچنین شرایط طبیعی خاک فرآیندی غیرقابل‌پیش‌بینی، کند و گاه غیرممکن است و حتی احتمال دارد از چندین روز تا 6 ماه طول طول بکشد (گیووانینی و همکاران، 2020). مقدار تندش اسپور این قارچ‌ها در خاک فقط 2 الی 10 درصد گزارش شده است (دالپه و همکاران، 2005). چه بسا در این زمان طولانی، از بین رفتن ریشه و سایر عوامل متنوع مانع برقراری همزیستی قارچ AM در ریشه‌ی گیاه میزبان خواهد شد. عوامل زیستی و محیطی متعدد، تندش اسپور قارچ‌های AM، رشد هیف آنها و کلنیزه شدن ریشه‌ی گیاهان میزبان را تحت تأثیر قرار می‌دهند (فری- کلیت و همکاران، 2005).

شواهدی وجود دارد که حضور برخی باکتری-های مایکوریزوسفری بواسطه‌ی مکانیسم‌های ویژه و یا تولید برخی متابولیت‌ها باعث تحریک تندش اسپور و رشد هیف قارچ‌های میکوریزی و توسعه‌ی همزیستی‌های میکوریزی در ریشه‌ی گیاهان میزبان می‌شوند. این باکتری‌های کمک کننده قارچ‌های میکوریزی را MHB[2] می‌نامند (گاربای، 1994). مطالعات اخیر نشان داد که باکتری‌های MH (Mycorrhiza helper) ممکن است روی دیواره‌ی اسپور قارچ‌های AM، بین هیف‌های خارج ریشه‌ای در مجاورت اسپورها و یا در سیتوپلاسم اسپورها قرار گیرند. گونه‌هایی از استرپتومایسس‌ها (*Streptomyces* spp.) (علی اصغرزاد و همکاران، 2012)، سودوموناس (*Pseudomonas* sp.) و کرینوباکتریوم (*Corynebacterium* sp.) تندش اسپور قارچ‌های *Funneliformis mosseae*، *Glomus versiforme* و *Gigaspora margarita* را افزایش می‌دهند (گیووانینی و

[1] Mycorrhiza helper bacteria

همکاران، 2020). اکتینوباکترها به دلیل توانایی بالا در هیدرولیز کیتین که ترکیب اصلی دیواره‌ی اسپور قارچ-هاست، از مهمترین باکتری‌های MH هستند (آگنولوسی و همکاران 2015). همچنین استرپتومایسس‌ها به دلیل پتانسیل بالا در تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی محلول و فرار، هورمون‌های رشد و فعالیت‌های کیتینولیتیکی، در تحریک تندش اسپور و رشد هیف‌های قارچی اهمیت ویژه‌ای دارند (لانق و همکاران، 2008). این باکتری‌ها علاوه بر تحریک تشکیل همزیستی‌های میکوریزی، پتانسیل قارچ‌های میکوریزی را در افزایش توانائی گیاه میزبان در جذب عناصر معدنی نظیر فسفر و نیتروژن بخصوص از منابع غیر قابل دسترس و کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی به طور قابل توجهی افزایش می‌دهند (تارکا و همکاران، 2009). تحریک بیان ژن-های مربوط به متابولیسم لیپید در قارچ‌های AM از جمله مهمترین سازوکارهای احتمالی باکتری‌های MH در افزایش کلنیزه شدن ریشه‌های میکوریزی می‌باشند. زیرا لیپیدها مهمترین منبع کربن آلی در قارچ‌های AM هستند (گراندموگین- فرجانی و همکاران، 2005) که بالای 45 درصد وزن خشک اسپور این قارچ‌ها را تشکیل می‌دهند (جاباجی- هار و همکاران، 1984).

بنابراین فراوانی لیپیدها در قارچ‌های AM وسیله‌ای برای ارزیابی پتانسیل میکوریزی این قارچ‌ها در ریشه‌های میزبان می‌باشند زیرا تندش اسپور و توسعه‌ی هیف‌ها با استفاده از ذخایر لیپیدی آنها و احتمالاً تأثیر آنزیم‌های هیدرولیتیک از جمله آنزیم لیپاز صورت می‌گیرد (گراندموگین- فرجانی و همکاران، 2005).

میکا و همکاران (2009) گزارش کردند که متابولیت محلول آگزوفوران و آنتی‌بیوتیک WS-5995B تولید شده توسط *Streptomyces* AcH505 با تحریک و افزایش بیان ژن‌های مربوط به متابولیسم لیپید در قارچ اکتومیکوریزایی *Amanita muscaria* از جمله ژن‌های استوآسیل-کوآسنتاز (*Aacs*)، سیکلوفیلین40 (*Cyp40*) و GABA پرمه‌آز (*Uga4*) منجر به افزایش رشد قارچ و توسعه‌ی همزیستی اکتومیکوریزایی موردنظر شد. همچنین باکتری‌های MH با تأثیر بر فیزیولوژی گیاه میزبان و افزایش فتوسنتز گیاه (ناگی و همکاران، 2004)، سنتز هورمون‌های محرک رشد گیاه مثل ایندول استیک اسید (IAA)، جیبرلین‌ها و سیتوکینین و در نتیجه تغییر مورفولوژی ریشه (امیرآبادی و همکاران، 1386) و جلوگیری از رشد قارچ‌های پاتوژن در ریزوسفر (شارما 2008) می‌توانند منجر به افزایش کلنیزه شدن ریشه‌ی گیاه میزبان با قارچ میکوریزی شوند. علاوه بر این سازوکارها اسیدسیتریک یا متابولیت‌های دیگری که توسط برخی باکتری‌های MH تولید می‌شوند، به عنوان سوبسترا برای قارچ‌های میکوریزی مورد استفاده قرار می‌گیرند. ممکن است باکتری‌های MH با غیر سمی کردن متابولیت‌های سمی نظیر پلی‌فنول‌ها که در محیط رشد قارچ میکوریزی تولید می‌شوند، منجر به رشد بیشتر هیف قارچ‌های میکوریزی گردند (توماس و همکاران، 2005).

P. fluorescens با ترشح تیامین (ویتامین B_1) باعث تحریک و افزایش رشد میسیلیوم‌های قارچ اکتومیکوریزایی *Laccaria bicolor* می‌شود (فری-کلیت و همکاران، 2007). تیامین یک کوفاکتور ضروری برای چندین آنزیم مختلف در متابولیسم کربن مرکزی قارچ میکوریزی است (میکا و همکاران، 2009). کوروناتین تولید شده توسط باکتری *P. syringae* مشابه هورمون گیاهی جاسمونیک اسید عمل کرده و منجر به افزایش کلنیزه شدن قارچ *Arabidopsis tbaliana* در ریشه‌ی گیاه میزبان می‌شود (کوی و همکاران، 2005). دیوپونویز و پلنچت (2003) گزارش کردند که طی یک آزمایش درون شیشه‌ای باکتری *P. Monteilii* هیچ تأثیری بر رشد هیف قارچ اکتومیکوریزایی *Scleroderma dictyosporum* IR109 نداشت ولی در تلقیح با ریشه‌ی درخت اقاقیا منجر به افزایش معنی‌دار کلنیزه شدن ریشه با قارچ شد. آنان با بررسی‌های بیشتر مشاهده نمودند، *P. monteilii* در پاسخ به ترشحات ریشه‌ی اقاقیا منجر به افزایش رشد هیف قارچ شده است و همچنین با تحریک و افزایش

تولید مواد فنولی نظیر هیپافورین توسط ریشه‌ی اقاقیا باعث افزایش قابلیت پذیرش ریشه به این قارچ شده است و در نتیجه قارچ بیشتر به داخل ریشه نفوذ کرده و کلنیزه شدن ریشه میکوریزی افزایش یافته است. به دلیل در دسترس نبودن ژنوم کامل قارچ‌های AM (http://mycor. nancy. inra. fr/ IMGC/genome sequencing.) و همچنین ماهیت اجباری همزیستی آنها با گیاهان، مطالعات بسیار اندکی در این زمینه انجام شده است.

پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر چهار گونه‌ی بومی خاک‌های منطقه شمالغرب کشور شامل *S. griseus*، *S. albogriseus*، *S.* sp_1 و *S.* sp_2 بر درصد کلنیزه شدن و فراوانی هیف و وزیکول در ریشه‌ی گیاه شبدر میکوریزی شده با قارچ *R. irregularis* و شاخص‌های رشدی گیاه انجام شد. مؤثرترین گونه به عنوان باکتری MH معرفی شده و می‌توان از آن در تولید انبوه قارچ *R. irregularis*، برای شروع همزیستی و استقرار قارچ در ریشه استفاده کرد. پیشتر طی یک مطالعه‌ی درون شیشه‌ای مشاهده شد که گونه‌ی *S. albogriseus* بیشترین اثر تحریکی را در میان گونه‌های *Streptomyces* مورد آزمایش، بر تندش اسپور و رشد هیف قارچ *R. irregularis* دارد.

مواد و روش‌ها

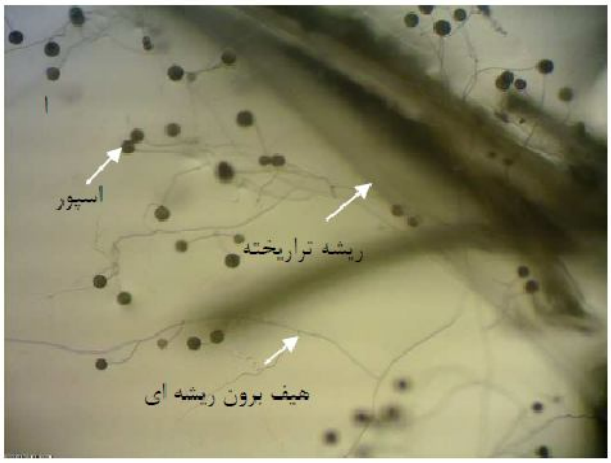
تهیه زادمایه‌ی قارچی (تکثیر درون شیشه‌ای قارچ AM)

گونه‌ی قارچی *R. irregularis* به روش درون شیشه‌ای در کنار ریشه‌ی هویج تلقیح شده با باکتری *Agrobacterium rhizogenes* (این قارچ و ریشه از مؤسسه تحقیقات آب و خاک کشور دریافت شد) بر روی محیط کشت MSR[3] (کراننبروک و همکاران، 2005) به مدت 4 ماه تکثیر یافت تا رابطه‌ی همزیستی میکوریزی بین آنها بوجود آید و قارچ با توسعه‌ی شبکه هیفی خود و تشکیل اسپورهای فراوان در محیط کشت سیکل زندگی خود را کامل کند (شکل 1). تحت شرایط استریل اسپورهای قارچی با نوک سوزن از محیط MSR جدا شده و پس از شستشو با آب مقطر استریل، ضدعفونی سطوح اسپورها به ترتیب با کلرآمین تی 2 % (20 g /l) به مدت 10 دقیقه، شستشو با آب مقطر استریل، محلول آنتی بیوتیک شامل: استرپتومایسین‌سولفات 0/02 % (20 mg/100 ml) و جنتامایسین‌سولفات 0/01 % (10 mg/100 ml) به مدت 10 دقیقه و شستشو با آب مقطر انجام شد. مراحل فوق سه بار تکرار شد. اسپورهای ضدعفونی شده به مدت یک شبانه روز در آب مقطر استریل در دمای 4+ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند و برای تکثیر قارچ در کنار ریشه‌ی تراریخته بر روی محیط MSR مورد استفاده قرار گرفتند (کراننبروک و همکاران، 2005). بدین طریق زادمایه‌ی قارچی خالص و عاری از آلودگی‌های جنبی برای استفاده در ریشه‌ی گیاه شبدر آماده شد. سپس با بینوکولر به تعداد ریشه‌هایی که باید میکوریزی می‌شدند قطعات 2×2 سانتی‌متری از ژل MSR عاری از آلودگی با 60 اسپور و مقادیر یکسان هیف و ریشه‌های میکوریزی انتخاب شده و آماده‌ی تلقیح در ریشه‌ی گیاه شدند.

تهیه زادمایه‌ی گونه‌های *Streptomyces*

در این پژوهش از چهار گونه‌ی بومی خاک‌های منطقه شمالغرب کشور *S. griseus*، *S. albogriseus*، *S.* sp_1 و *S.* sp_2 استفاده شد. این گونه‌های *Streptomyces* از پژوهشکده‌ی بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور در تبریز دریافت شد. برای تهیه‌ی زادمایه‌ی این اکتینوباکترها از محیط کشت مایع Starch casein مطابق جدول 1 استفاده شد.

[2.] Modified Strullu- Romand



شکل 1- قارچ *R. irregularis* تکثیر شده به روش درون شیشه‌ای در مدت چهار ماه

جدول 1- ترکیب محیط کشت S.C برای تهیه یک لیتر از آن (بنی‌اسدی و همکاران، 2009)

ترکیب	نشاسته	کازئین	$MgSO_4$	$FeSO_4$	$CaSO_3$	KNO_3	NaCl	K_2HPO_4
مقدار (گرم)	10	0/3	0/05	0/01	0/02	2	2	2

ابتدا از هر چهار گونه‌ی *Streptomyces* کشت تراکمی 72 ساعته بر محیط کشت S.C.A (Starch casein agar) داده شد. سپس محیط کشت مایع S.C تهیه شد، محیط کشت در pH=7 تنظیم شد و در دمای 121 درجه سانتی‌گراد و فشار 1/2 اتمسفر به مدت 15 دقیقه اتوکلاو شد. بعد از اتوکلاو شدن، زمانیکه دمای محیط کشت به زیر 45 درجه سانتی‌گراد رسید، با فیلتر استریل (0/22µm Millipore filter) 0/5 گرم قارچ‌کش نیستاتین پس از حل شدن در حلال دی‌متیل‌سولفوکسید به محیط کشت اضافه شد. در نهایت بعد از آماده شدن محیط کشت S.C، از کشت تراکمی گونه‌های *Streptomyces* توسط حلقه‌ی پلاتینی استریل به ارلن‌های حاوی محیط مایع S.C منتقل شد. ارلن‌ها به مدت 10 روز در دمای 29 درجه‌ی سانتی‌گراد بر روی شیکر انکوباتور با دوران 120 دور در دقیقه قرار گرفتند. بعد از پایان این مدت گونه‌های *Streptomyces* با جمعیت 10^8 CFU.ml^{-1}رشد کردند.

کشت گیاه

جوانه دار کردن بذر

بذرهای شبدر رقم برسیم (*Trifolium alexandrinum*) محصول شرکت پاکان بذر اصفهان با استفاده از محلول هیپوکلریت‌سدیم 2/5 درصد به مدت 3 دقیقه ضدعفونی شد و برای حذف هیپوکلریت‌سدیم باقی‌مانده در سطح بذرها، چندین بار شستشو با آب مقطر استریل صورت گرفت. سپس با رعایت شرایط استریل، به مدت یک هفته در دمای 18 درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند تا جوانه برنند. قابل ذکر است که شبدر رقم برسیم نسبت به سایر ارقام این گیاه رشد بیشتر و سریعتری دارد.

آماده‌سازی خاک

خاک با بافت لوم‌شنی (17% رس، 22/3% سیلت، 60/7% شن) از ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، تهیه شده و بعد از هوا خشک و الک شدن به مدت 2 ساعت در دمای 121 درجه‌ی سانتی‌گراد استریل شد. خصوصیات خاک در جدول 2 آورده شده است.

جدول 2- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد آزمایش

خصوصیت	رطوبتFC	pH(1:1)	EC	CCE	کربن آلی	نیتروژن	پتاسیم	فسفر	آهن	روی
مقدار	11	8	1/8	11/5	0/58	0/22	225/4	6/88	2/8	1/4
واحد	وزنی (%)	-	$dS.m^{-1}$	(%)	(%)	(%)	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$	$mg.kg^{-1}$

کشت جوانه‌ها و اعمال تیمارها

براساس طرح آزمایشی بکار رفته، در تیمارهای حاوی قارچ *R. irregularis* از ژل زادمایه‌ی قارچی انتخاب شده به مقدار یکسان و حدود یک گرم با نوک اسپاتول برداشته و در 20 نقطه‌ی مختلف با رعایت فاصله در هر گلدان قرار داده شد. در تیمارهای شاهد بدون قارچ هم به همان مقدار از ژل MSR بدون قارچ قرار داده شد. سپس بذرهای جوانه زده شده یکدست و هم اندازه، در همان نقاط در تماس با زادمایه قرار داده شدند. در تیمارهای حاوی گونه‌های *Streptomyces*، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون *Streptomyces* و برای تیمارهای شاهد بدون *Streptomyces* هم یک میلی‌لیتر از محیط مایع S.C بدون کشت، پای هر بذر جوانه زده شده مایه‌زنی شد. آبیاری تیمارهای آزمایشی به منظور حفظ رطوبت گلدان‌ها تا 90 درصد ظرفیت زراعی صورت گرفت. 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 درجه‌ی سانتی‌گراد 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 (جدول 3) تغذیه شدند. همچنین در طول دوره‌ی رشد، علایم کمبود نیتروژن در گیاه بررسی و نیاز آن به نیتروژن تأمین شد.

جدول 3- ترکیب محلول غذایی راریسون (راریسون، 1987)

نام محلول	ترکیب	مقدار (گرم)	آب‌مقطر
A	$MgSO_4.7H_2O$	62/01	500
B	$Ca(NO_3).4H_2O$	119/02	500
C	$K_2HPO_4.3H_2O$	57/69	500
	FeEDTA	6/25	
	$MnSO_4.4H_2O$	0/56	
D	H_3BO_4	0/716	500
	$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	0/046	
	$ZnSO_4.7H_2O$	0/11	
	$CuSO_4.5H_2O$	0/099	
E	KCl	20/85	500

برای تهیه محلول غذایی راریسون، 2 میلی‌لیتر از هر یک از محلول‌های مادر A، B، C و D به یک لیتر آب مقطر اضافه می‌شود، ولی در تحقیقات میکوریز، از محلول C به جای 2 میلی‌لیتر، 1 میلی‌لیتر برداشته (به علت وجود فسفر) و برای جبران 1 میلی‌لیتر باقی‌مانده از محلول E، 1 میلی‌لیتر اضافه شد.

پارامترهای مورد اندازه‌گیری

وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی گیاه شبدر با استفاده از ترازوی (±0/01g) تعیین شد. غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه بعد از هضم نمونه‌ها به طریق خشک سوزانی به روش نیترو وانادو مولیبدات (کاتینه، 1980) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Hack DR/2000) اندازه‌گیری شد. درصد کلنیزه شدن

ریشه (کورمانیک و مک‌گراو، 1982؛ نوریس و همکاران، 1992) و درصد وزیکول و هیف (السن و همکاران، 2010) در ریشه‌های میکوریزی بعد از رنگ‌آمیزی ریشه به روش تلاقی خطوط شبکه تعیین شد.

طرح آزمایشی و تجزیه آماری

آزمایش بررسی تأثیر چهار گونه‌ی *Streptomyces* بر وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه میکوریزی شده به صورت فاکتوریل و در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با دو فاکتور قارچ در دو سطح (شاهد و*R. irregularis*) و اکتینوباکتر در پنج سطح (چهار گونه‌ی *Streptomyces* و یک شاهد) و با سه تکرار، به صورت کشت گلخانه‌ای گیاه شبدر در خاک (با خصوصیات جدول 2) انجام شد. آزمایش بررسی اثر استرپتومایسس‌ها بر درصد کلنیزه شدن ریشه و فراوانی اندام‌های قارچی شامل 5 تیمار، شامل: 1 شاهد (فقط قارچ *R. irregularis*) و 4 تیمار کشت توأم اسپور قارچ با 4 گونه‌ی *Streptomyces* 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 SPSS انجام شد.

نتایج

آزمایش بررسی اثر استرپتومایسس‌ها بر درصد کلنیزه شدن ریشه و فراوانی اندام‌های قارچی در ریشه

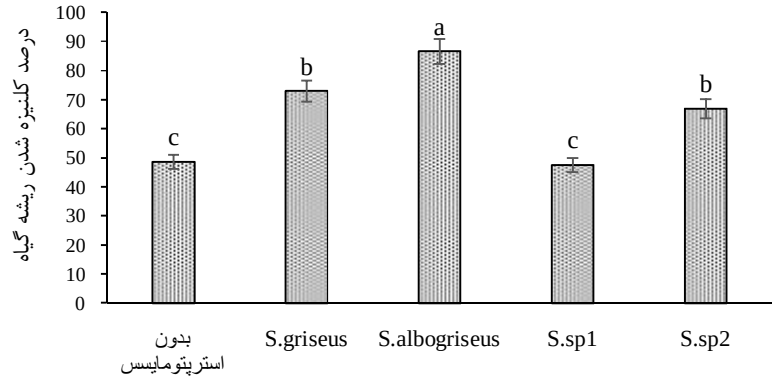
درصد کلنیزه شدن ریشه

در تیمارهای *S. griseus*، *S. albogriseus* و *S.* sp_2 درصد کلنیزه شدن ریشه‌ی گیاه به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/01$) (جدول 4). طوری‌که درصد کلنیزه شدن ریشه از 48/61 درصد در شاهد به 86/59، 72/93 و 66/90 درصد به ترتیب در کشت توأم با *S. albogriseus*، *S. griseus* و *S.* sp_2 افزایش یافت (شکل2). *S. albogriseus* بیشترین اثر تحریکی را در افزایش کلنیزه شدن ریشه‌ی شبدر با قارچ *R. irregularis* داشت. شکل 3 ریشه‌ی میکوریزی شده شبدر را نشان می‌دهد.

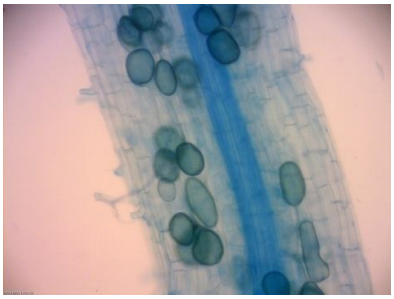
جدول 4- تجزیه واریانس اثر گونه‌های *Streptomyces* بر درصد کلنیزه شدن و فراوانی هیف و وزیکول در ریشه‌ی میکوریزی شده شبدر با قارچ *R. irregularis*

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات		
		کلنیزه شدن (%)	هیف (%)	وزیکول (%)
تیمار	4	829/098**	1300/464**	769/728**
خطای آزمایشی	10	39/988	16/313	124/29
ضریب تغییرات (%)		9/8	5/84	8/24

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال 5 و 1 درصد



شکل 2- مقایسه میانگین تأثیر گونه‌های *Streptomyces* بر درصد کلنیزه شدن ریشه‌ی میکوریزی شده شبدر با *R. irregularis*



شکل 3- ریشه‌ی شبدر کلنیزه شده با قارچ *R. irregularis* در تیمار *S. albogriseus*

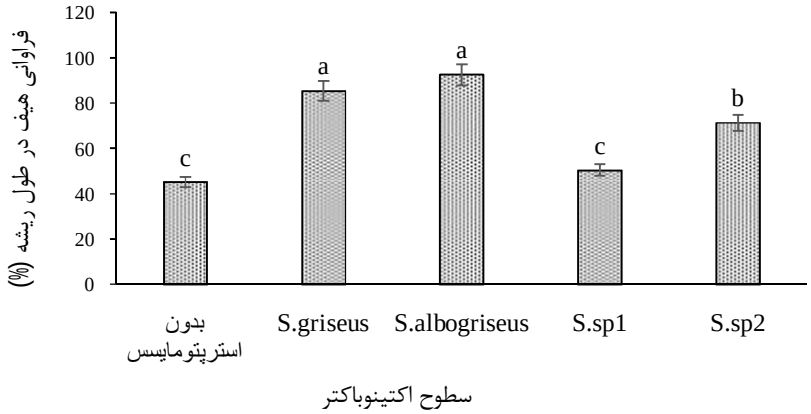
فراوانی هیف و وزیکول در ریشه‌ی میکوریزی

در تیمارهای *S. griseus*، *S. albogriseus* و $S. sp_2$ درصد هیف و وزیکول ریشه‌ی میکوریزی شده شبدر به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/01$) (جدول 4). درصد هیف در ریشه از 45/32 درصد در شاهد به 92/55، 85/48 و 71/47 درصد به ترتیب در کشت توأم با *S. albogriseus*، *S. griseus* و $S. sp_2$ افزایش یافت (شکل 4). همچنین درصد وزیکول ریشه به ترتیب 49/37، 88/33، 72/37 و 65/63 بود (شکل 5). همانند درصد کلنیزه شدن ریشه، گونه‌ی $S. sp_1$ اثر معنی‌داری بر درصد هیف و وزیکول ریشه نداشت. بیشترین افزایش تولید هیف توسط *S. albogriseus* و *S. griseus* مشاهده شد، در حالیکه تنها گونه‌ی *S. albogriseus* بیشترین اثر تحریکی را در افزایش تولید وزیکول ریشه نشان داد.

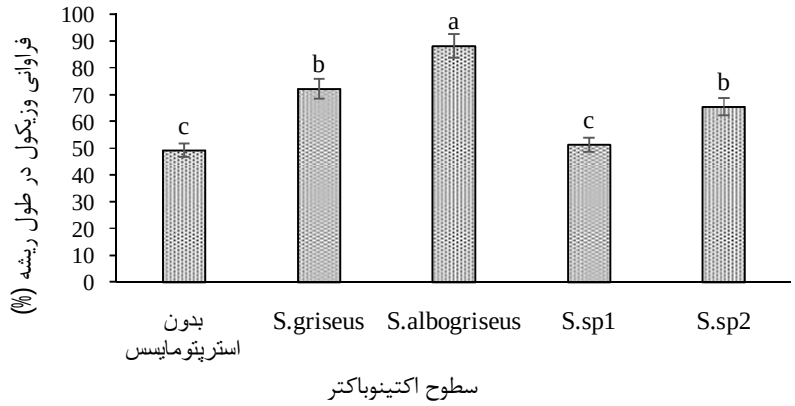
آزمایش بررسی اثر گونه‌های استرپتومایسس بر وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه

وزن تر و خشک اندام هوایی

اثر متقابل قارچ *R. irregularis* و تیمارهای *Streptomyces* بر وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه معنی‌دار بود ($P<0/01$) (شکل 6 و 7) (جدول 5). بدون حضور گونه‌های *Streptomyces*، با تلقیح قارچ *R. irregularis* در ریشه‌ی گیاه شبدر افزایش معنی‌داری در وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه مشاهده نشد ولی در تلقیح توأم قارچ با هر چهار گونه‌ی *Streptomyces* افزایش معنی‌دار در وزن خشک اندام هوایی و تنها با تلقیح گونه‌ی *S. albogriseus* افزایش معنی‌دار در وزن تر اندام هوایی گیاه مشاهده شد. *S. albogriseus* بیشترین اثر تحریکی را بر پتانسیل قارچ *R. irregularis* در افزایش وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه شبدر داشت. وزن تر اندام هوایی گیاه را از 26/08 گرم در تیمار قارچی بدون *Streptomyces* به 75/16 گرم و وزن خشک اندام هوایی را از 2/49 گرم تیمار قارچی به 17/04 گرم در تیمار *S. albogriseus* افزایش یافت. قابل توجه است که *S. albogriseus* در تیمارهای بدون قارچ نیز وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه را افزایش داده است.



شکل 4- مقایسه میانگین تأثیر گونه‌های *Streptomyces* برفراوانی هیف ریشه‌ی میکوریزی شده شبدر با *R. irregularis*

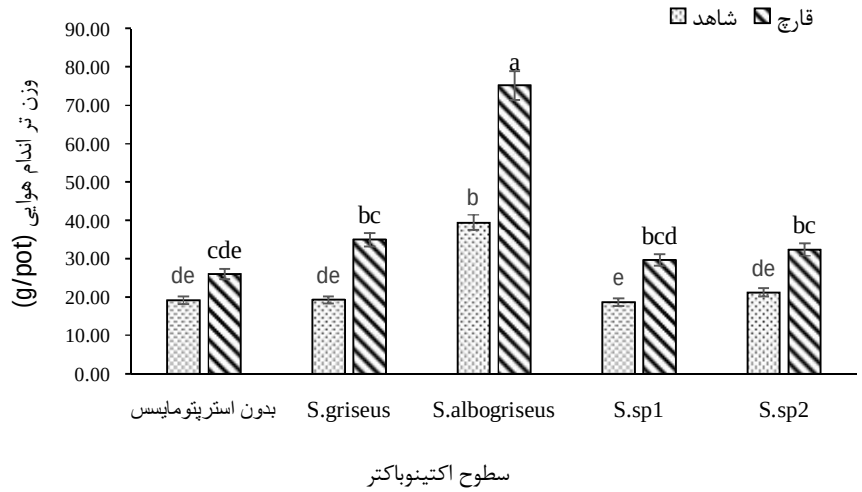


شکل 5- مقایسه میانگین تأثیر گونه‌های *Streptomyces* برفراوانی وزیکول ریشه‌ی میکوریزی شده شبدر با *R. irregularis*

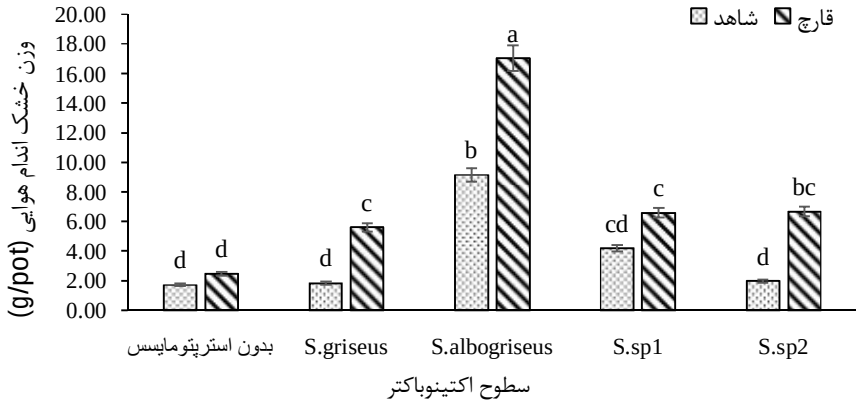
جدول 5- تجزیه واریانس اثر گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر وزن تر، وزن خشک و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی شبدر

منبع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات					
		وزن تر اندام هوایی	وزن خشک اندام هوایی	وزن تر ریشه	وزن خشک ریشه	فسفر اندام هوایی	فسفر ریشه
قارچ *R. irregularis*	1	1936/354**	114/036**	275/972**	18/424**	313/108**	/712** 128
Streptomyces	4	1259/262**	110/279**	153/02**	9/436**	39/309**	6/16**
قارچ × *Streptomyces*	4	194/151**	10/728**	5/58**	5/434**	4/683*	5/224**
خطا	20	38/712	2/238	9/415	0/364	1/21	0/751
ضریب تغییرات (%)		19/65	26/08	22/19	29/69	12/98	18/63

ns، * و ** به ترتیب غیر معنی‌داری و معنی‌داری در سطح احتمال 5 و 1 درصد



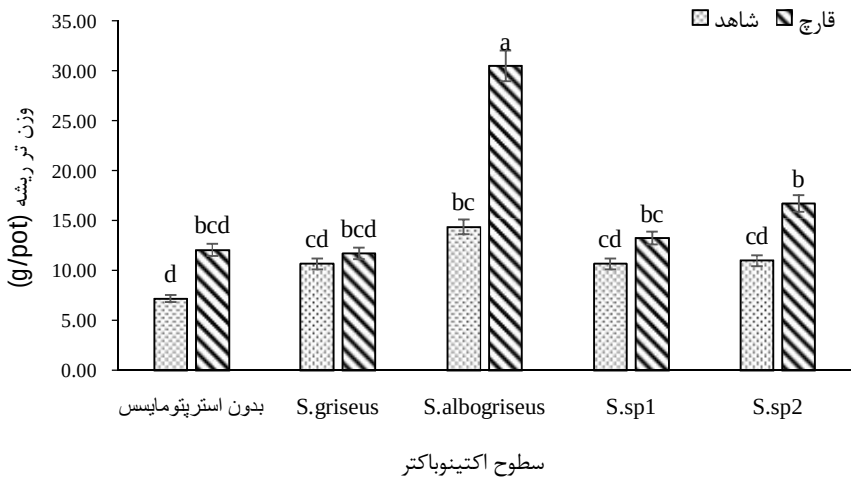
شکل 6- برهمکنش گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر وزن تر اندام هوایی گیاه شبدر



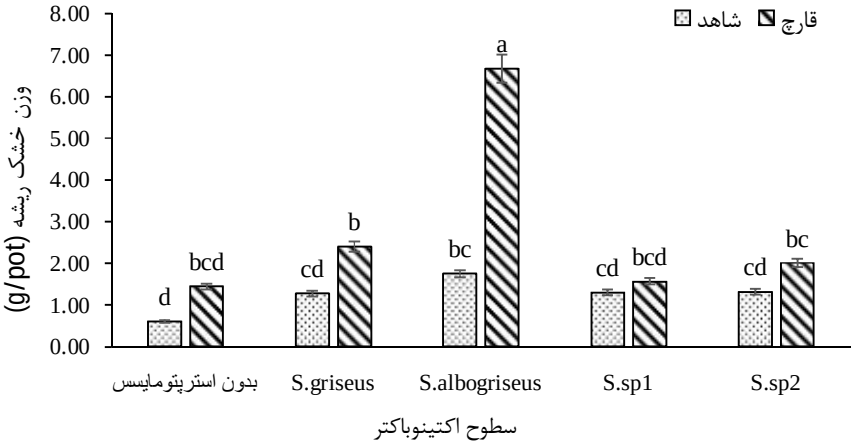
شکل 7- برهمکنش گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر وزن خشک اندام هوایی گیاه شبدر

تر و خشک ریشه

اثر متقابل قارچ *R. irregularis* و تیمارهای *Streptomyces* بر وزن تر و خشک ریشه‌ی گیاه شبدر معنی‌دار بود ($P<0/01$) (شکل 8 و 9) (جدول 5). همانند وزن تر و خشک اندام هوایی گیاه، بدون حضور گونه‌های *Streptomyces* با تلقیح قارچ *R. irregularis* در ریشه‌ی گیاه شبدر افزایش معنی‌داری در وزن تر و خشک ریشه‌ی گیاه مشاهده نشد ولی با تلقیح توأم گونه‌ی *S. albogriceus* افزایش معنی‌داری در وزن تر و خشک ریشه‌ی گیاه مشاهده شد. وزن تر و خشک ریشه به ترتیب از 12/08 و 1/44 گرم در تیمار قارچی بدون *Streptomyces* به 30/50 و 6/67 گرم در تیمار کشت توأم قارچ با *S. albogriceus* افزایش یافت.



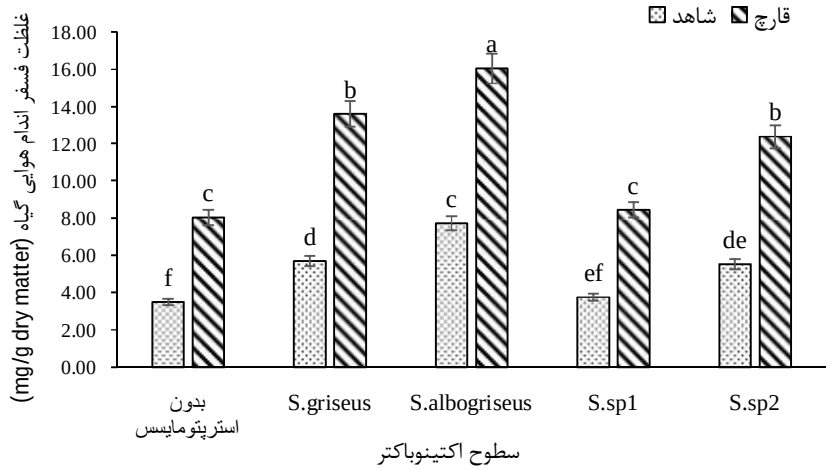
شکل 8- برهمکنش گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر وزن تر ریشه‌ی گیاه شبدر



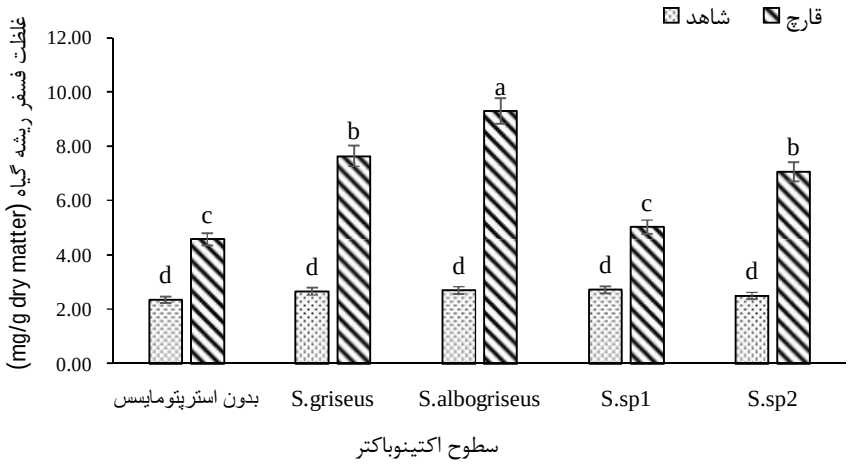
شکل 9- برهمکنش گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر وزن خشک ریشه‌ی گیاه شبدر

غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی

اثر متقابل قارچ *R. irregularis* و تیمارهای *Streptomyces* بر غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه شبدر معنی‌دار بود (P<0/01) (شکل 10 و 11) (جدول 5). تلقیح قارچ *R. irregularis* به تنهایی در ریشه‌ی گیاه شبدر باعث افزایش غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه شد و در تلقیح توأم قارچ با گونه‌های *S. griseus*، *S. albogriseus* و *S. sp*$_2$ غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه به طور معنی‌داری افزایش یافت. غلظت فسفر ریشه‌ی گیاه به ترتیب از 4/58 در شاهد به 7/64، 9/30 و 7/07 mg.g^{-1} dry matter در تیمارهای قارچ با گونه‌های *S. griseus*، *S. albogriseus* و *S. sp*$_2$ افزایش یافت. این افزایش در مورد غلظت فسفر اندام هوایی گیاه به ترتیب 8/03، 13/60، 16/04 و 12/38 mg.g^{-1} dry matter بود. *S. albogriseus* بیشترین افزایش غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه را در تیمارهای قارچی نشان داد.



شکل 10- برهمکنش گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر غلظت فسفر اندام هوایی گیاه شبدر



شکل 11- برهمکنش گونه‌های *Streptomyces* و قارچ *R. irregularis* بر غلظت فسفر ریشه‌ی گیاه شبدر

بحث

از میان گونه‌های بومی مورد آزمایش تلقیح سه گونه‌ی *S. griseus*، *S. albogriseus* و $S.\ sp_2$ در ریشه‌ی میکوریزی شبدر منجر به افزایش فراوانی هیف، وزیکول و درصد کلنیزه شدن ریشه‌ی میکوریزی شد. اثر تحریکی این سه گونه‌ی *Streptomyces* را می‌توان به نقش این اکتینوباکترها و متابولیت‌های محرک احتمالی حاصل از آنها در افزایش ذخایر لیپیدی اندام‌های قارچی و در نتیجه افـزایـش تـندش اسـپور و رشـد میسیلیوم‌های قارچی در برهمکنش سه جانبه با قارچ و ریشه‌ی گیاه نسبت داد. زیرا عدم توانایی در بیوسنتز کافی لیپیدهای خنثی توسط میسیلیوم‌های خارج ریشه‌ای و اسپورهای قارچ AM مهمترین دلیل محدودیت‌های تندش اسپور و رشد هیف این قارچ‌ها است (باگو و بکارد، 2002). علی اصغرزاد و همکاران (2012) طی یک آزمایش درون شیشه‌ای گزارش کردند که دو گونه‌ی غیربومی *S. griseus* و *S. albogriseus* و متابولیت‌های ثانویه فرار حاصل از آنها باعث افزایش معنی‌دار تندش اسپور و به موازات آن رشد

هیف قارچ *R. irregularis* شدند. افزایش تندش اسپور و رشد هیف‌های قارچی شرط لازم ولی کافی برای کلنیزه شدن ریشه‌ی میکوریزی نیستند و ممکن است گونه‌های *Streptomyces* در پاسخ به ریشه و ترشحات آن سازوکار متفاوتی داشته باشند. بنابراین لازم است اثرات تحریکی یا بازدارندگی این اکتینوباکترها طی آزمایش گلدانی نیز بررسی شود. اسچری و همکاران (2005) دو ترکیب آگزوفوران و 7- دهیدروکسی‌آگزوفوران تولید شده توسط *Streptomyces* AcH505 را بعنوان متابولیت‌های ثانویه محرک رشد قارچ *A. muscaria* معرفی کردند و گزارش کردند که تولید این متابولیت‌ها در حضور قارچ به میزان قابل توجهی افزایش یافت. گونه‌ی *S.* sp_1 احتمالا" به علت تولید آنتی‌بیوتیک‌های بیشتر نسبت به سایر گونه‌ها، افزایش معنی‌داری در تندش اسپور، رشد هیف و کلنیزه شدن ریشه با قارچ *R. irregularis* نشان نداد. کریشنا و همکاران (1982) نیز گزارش کردند که *S. cinnamomeous*با تولید آنتی‌بیوتیک سینامیسین و دورامیسین مانع رشد، اسپورزایی و کلنیزه شدن قارچ *G. fasciculatus* در ریشه‌ی گیاه ارزن شد. در آزمایشی اثر باکتری *P. monteilii* سویه HR13 بر فراوانی هیف و وزیکول ریشه‌ی درخت اقاقیای میکوریزی شده با قارچ *R. irregularis* بررسی شد و نتایج نشان داد که این باکتری کمکی منجر به افزایش معنی‌دار فراوانی هیف از 24/1 درصد در شاهد (بدون باکتری) به 91/2 درصد در کشت توأم با باکتری شد و این افزایش در مورد فراوانی وزیکول‌ها به ترتیب از 49/6 درصد به 61/6 درصد بود (دیوپونویز و پلنچت، 2003).

گونه‌های *Streptomyces* علاوه بر افزایش رشد قارچ احتمالاً با تولید برخی ترکیبات از قبیل هورمون‌های محرک رشد باعث رشد و تغییر در مورفولوژی ریشه از قبیل منشعب‌تر و موئین‌تر شدن توده‌ی ریشه‌ای و رشد اندام هوایی گیاه شدند. از آنجا که در تیمارهای بدون قارچ، گونه‌ی *S. albogriseus* باعث افزایش وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و همچنین غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه شد و گونه‌های *S. griseus* و *S.* sp_2 افزایش معنی‌دار در غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه را نشان داده‌اند. بنابراین احتمالاً این گونه‌های *Streptomyces* با ترشح هورمون‌های گیاهی و برقراری تعادل هورمون‌های رشد نظیر اکسین، جیبرلین و سیتوکینین و انواع ویتامین‌های گروه B و غیره باعث افزایش سرعت متابولیسم، رشد، توسعه و افزایش تراکم ریشه (کراوچنو و همکاران، 1994) و در نهایت افزایش نفوذپذیری ریشه، فعالیت‌های فسفاتازی (عبدالفتاح و محمدین، 2000) و جذب عنصر غذایی فسفر و انتقال آن به اندام هوایی گیاه شدند (باشان و دی- باشان، 2005). بسیاری از گونه‌های *Streptomyces* توان تولید این ترکیبات ذکر شده را دارا هستند (دیمکپا و همکاران، 2008)، طوریکه انواعی از باکتری‌های متعلق به جنس *Streptomyces* به عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR)[4] شناخته شده‌اند (باشان و دی- باشان، 2005).

مشاهده شد که تلقیح قارچ *R. irregularis* به تنهایی در ریشه‌ی شبدر، تنها باعث افزایش غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی گیاه شد ولی در رشد ریشه و اندام هوایی گیاه تأثیر معنی‌داری نداشت و در تلقیح توأم با گونه‌ی *S. albogriseus* تمامی پارامترهای رشدی اندازه-گیری شده‌ی گیاه (وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی) به بیشترین مقدار رسید. همچنین در تلقیح توأم با گونه‌های *S. griseus* و *S.* sp_2 تنها وزن خشک اندام هوایی و غلظت فسفر ریشه و اندام هوایی افزایش یافت. احتمالاً گونه‌های *S. griseus* و *S.* sp_2 قادر به بالا بردن پتانسیل قارچ *R. irregularis* در افزایش توانایی جذب آب توسط گیاه نبوده است. این دو گونه با وجود افزایش کلنیزه شدن و فراوانی اندام‌های قارچی در ریشه تأثیر معنی‌داری بر وزن تر اندام هوایی و وزن تر و خشک ریشه‌ی گیاه نداشته است واین احتمالاً به علت عدم تولید هورمون‌های محرک رشد و متابولیسم

[1] Plant growth- promoting

گیاه و یا تولید ترکیبات بازدارنده توسط این دو گونه بود. عبدالفتاح و محمدین (2000) برهمکنش بین قارچ *R. irregularis* و *S. coelicolor* و اثرات آنها را بر شاخص‌های رشدی گیاه سورگوم بررسی کردند. نتایج حاصل از مطالعه‌ی آنان نشان داد که تلقیح *S. coelicolor* سویه‌ی 2389 در ریشه‌های سورگوم کلنیزه شده با قارچ *R. irregularis* باعث افزایش معنی‌دار کلنیزه شدن ریشه-های میکوریزی شد، در حالیکه تلقیح این *Streptomyces* در ریشه‌های میکوریزی باعث کاهش معنی‌دار شاخص-های رشدی گیاه از قبیل سطح برگ، ارتفاع اندام هوایی گیاه، وزن خشک ریشه و اندام هوایی گیاه شد. آنان پیشنهاد کردند که این اثر منفی *Streptomyces* بر شاخص‌های رشدی گیاه به علت تجزیه‌ی کیتین و تولید آنتی‌بیوتیک توسط این *Streptomyces* است.

نتیجه‌گیری

از میان گونه‌های بومی *Streptomyces* مورد آزمایش، گونه‌ی *S. albogriseus* را می‌توان بعنوان مهمترین MHB (باکتری کمکی میکوریزا) برای قارچ *R. irregularis* معرفی کرد. زیرا گذشته از افزایش تندش اسپور و رشد هیف قارچ بواسطه‌ی تولید متابولیت‌های ثانویه محرک (طبق یافته‌های پژوهش پیشین)، باعث افزایش کلنیزه شدن و تشکیل همزیستی میکوریزی در ریشه‌ی گیاه شبدر شد و پتانسیل این قارچ میکوریزی را در افزایش توانایی گیاه در جذب آب و فسفر به طور قابل توجهی افزایش داد و منجر به افزایش چشمگیر رشد گیاه شد. در تکثیر صنعتی قارچ (روش درون شیشه‌ای) به منظور تولید اسپورهای تندش یافته برای شروع همزیستی و استقرار قارچ در ریشه استفاده از این گونه‌ی *Streptomyces* به طور قابل توجه مؤثر خواهد بود. همچنین پیشنهاد می‌شود که کارایی این گونه‌ی *Streptomyces* در تولید زادمایه‌ی قارچ *R. irregularis* به عنوان عامل کمکی در تقویت پتانسیل آن بررسی شود.

فهرست منابع:

1. امیرآبادی، م.، م. اردکانی، ف. رجالی، م. برجی، غ. ثواقبی. 1386. بررسی اثر میکوریزا و ازتوباکتر برمیزان کلنیزاسیون ریشه و صفات مورفولوژیکی ذرت علوفه‌ای (رقم سینگل کراس 704) تحت تأثیر مقادیر مختلف فسفر در اراک. صفحات 99-98. دهمین کنگره علوم خاک ایران، 6-4 شهریورماه ،کرج، ایران.
2. Abdel-Fattah, G. M. and Mohamedin, G. M. 2000. Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus (*Glomus intraradices*) and *Streotomyces coelicolor* and their effects on sorghum plants grown in soil amended with chitin of braw scales. Biology and Fertility of Soils. 32: 401-409.
3. Agnolucci, M., Battini, F., Cristani, C., Giovannetti, M. 2015. Diverse bacterial communities are recruited on spores of different arbuscular mycorrhizal fungal isolates. Biology and Fertility of Soils. 51: 379- 389.
4. Aliasgharzad, N., Pourmirzaei, Z., Dehnad, A. R. and Najafi, N. 2012. *Streptomyces* species favour spore germination and hyphal growth of arbuscular mycorrhizal fungus. International Journal of Agriculture. 2(6): 765-773.
5. Bago, B. and Becard, G. 2002. Bases of the obligate biotrophy of arbuscular mycorrhizal fungi. In: Gianinazzi, S., Schuepp, H., Barea, J. M. and Haselwandter, K. (eds.) Mycorrhizal technology in agriculture. Birkhauser Basel. pp. 33-48.
6. Baniasadi, F., Shahidi Bonjar, G. H., 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. American Journal of Agriculture and Biological Sciences. 4(2):146-151.

7. Bashan, Y. and de-Bashan, L. E. 2005. Plant growth-promoting. In: Encyclopedia of soils in the environment. (Editor-in-Chief) Hillel, D., Elsevier, U. K. Oxford. 1:103-115.
8. Cottenie, A. 1980. Soil and plant testing. FAO Soils Bulletin. No. 38 (2) :94-100.
9. Cranenbrouck, S., Voets, L., Bivort, C., Raurent, L., Strullu, D. G. and declerck, S. 2005. Methodologies for in vitro cultivation of arbuscular mycorrhiza fungi with root organs.In: Declerck, S., Strullu, D. G. and Fortin, A.(eds.) In Vitro Culture of Mycorrhizas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 341-372. Part VII. Volume 4.
10. Cui, J., Bahrami, A. K., Pringle, E. G., Hernandez-Guzman, G., Bender, C. L., Pierce, N. E. and Ausubel, F. M. 2005. *Pseudomonas syringae* manipulates systemic plant defenses ahainst pathogens and herbivores. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA. 102:1791-1796.
11. Dalpe, Y., de Souza, F. A. and Declerck, S. 2005. Life cycle of *Glomus* species in monoxenic culture.In: Declerck, S., Strullu, D. G. and Fortin, A. (eds.). In Vitro Culture of Mycorrhizas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 49-71. Part IV. Volume 4.
12. Dimkpa, C. O., Svatos, A., Dabrowska, P., Schmidt, A., Boland, W. and Kothe, E. 2008. Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. Chemosphere. 74:19-25.
13. Douds, D. D., Gadkar, J. V. and Adholeya, A. 2000. Mass production of VAM fungus biofertilizer. In: Mycorrhizal biology, edited by Mukerji, K. J. Kluwer Academic Plenum Publishers.
14. Duponnois, R. and Plenchette, C. 2003. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. Mycorrhiza. 13:85- 91.
15. Fortin, J. A., Becard, G., Declerck, S., Dalpe, Y., St-Arnaud, M., Coughlan, A. P. and Piche, Y. 2002. Arbuscular mycorrhiza on root-organ culture. Canadian Journal of Botanical Research. 80:1-20.
16. Fortin, J. A., Declerck, S. and Strullu, D. G. 2005. In vitro culture of mycorrhizas. In: Declerck, S., Strullu, D. G. and Fortin, A.(eds.). In Vitro Culture of Mycorrhizas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp.3-14. Part I. Volume 4.
17. Frey-Klett, P., Chavatte, M., Clausse, M. L., Courrier, S. L. E., Roux, C., Aaijmakers, J., Martinotti, M. G., Pierrat, J. C. and Garbye, G. 2005. Ectomycorrhiza symbiosis affects functional diversity of rhizosphere *Fluorescent pseudomonads*. New Phytologist. 165:313-328.
18. Frey-Klett, P., Garbaye, J. and Tarkka, M. T. 2007. The mycorrhiza helper bacteria revisited. New Phytologist. 176:22-36.
19. Garbaye, J. 1994. Helper bacteria: a new dimension to the mycorrhizal symbiosis. Tansley review No. 76. New Phytologist. 128:197-210.
20. Giovannini, L., Pallo, M., Agnolucci, M., Avio, L., Sbranu, C., Turrini, A., Giovannetti, M. 2020. Arbuscular ycorrhizal fungi and associated microbiota as plant biostimulants: research strategies for the selection of the best performing inocula. Agronomy. 10, 106.
21. Grandmougin-Ferjani, A., Fontaine, J. and Durand, R. 2005. Carbon metabolism, lipid composition and metabolism in arbuscular mycorrhizal fungi. In: Declerck, S., D. G. Strullu, and A. Fortin.(eds.). In Vitro Culture of Mycorrhizas. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 159-180. Part 9. Volume 4.
22. Hatami, N., Bazgir, E., Sedaghati, E., Darvishnia, M. 2020. The symbiosis study of arbuscular mycorrhizal fungi with some annual herbaceous plants and morphological identification of dominant species of these fungi in kerman province. Biological Journal of Microorganism. 9th year, No. 33.
23. Jabaji-Hare, S., Deschene, A. and Kendrick, B. 1984. Lipid content and composition of vesicules of a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. Mycologia. 76:1024-1030.

24. Kormanik, P. P. and Graw, A. C. Mc. 1982. Quantification of VA mycorrhizae in plant roots. In: Schenck, N. C. (eds.) Methods and principles of mycorrhizal research. American Phytopathological Society. St. Paul. pp.37-45.
25. Kravchenko, L. V., Leonova, E. L. and Trikhonovich, I. A. 1994. Effect of broot exudates of non-legume plants on the response of auxin production by associated diazotroph. Microbial Releases. 2:267-271.
26. Krishna, K. R., Balakrishna, A. N. and Bagyaraj, D. J. 1982. Interaction between a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus and *Streptomyces cinnamoeous* and their effects on finger millet. New Phytologist. 92:401-405.
27. Long, L., Zhu, H., Yao, Q., Ai, Y. 2008. Analysis of bacterial communities, associated with spores of *Gigaspora margarita* and *Gigaspora rosea*. Plant and Soil. 310: 1- 9.
28. Mika, T., Tarkka, Sarniguet, A. and Frey-Klett, P. 2009. Inter-kingdom encounters:recent advances in molecular bacterium-fungus interactions. Springer-Verlag. 55:233-243.
29. Nagy, N. E., Fossdal, C. G., Dalen, L. S., Lonneborg, A., Heldal, A. and Johnsen, Q. 2004b. Effects of *Rhizoctonia* infection and drought on peroxidase and chitinase activity in Norway spruce (*Picea abies*). Physiologia Plantarum. 120:465-473.
30. Norris, I. R., Read, D. J. and Varma, A. K. 1992. Methods in Microbiology. Techniques for Study of Mycorrhiza. Academic press, London. Volume 24.
31. Olsson, P. A., Rahm, J. and Aliasgharzad, N. 2010. Carbon dynamics in mycorrhizal symbioses in linked to carbon costs and phosphorus benefits. FEMS Microbiology Ecology. 72:123- 131.
32. Rorisons, A. 1987. Method Sheet 3 Nutrient Solution, recipe obtained from Sheffield University.
33. Schrey, S. D., Schellhammer, M., Ecke, M., Hampp, R. and Tarkka, M.T. 2005. Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* AcH505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. New Phytologist. 168:205-216.
34. Sharma, M. Sc. M. 2008. A functional study on the multilateval symbiosis of the fungal order *Sebacinales* with plant hosts and bacteria. Dissertation zur erlangung des doctor grades.
35. Tarkka, M. T., Sarniguet, A. and Frey- Klett, P. 2009. Inter- Kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium- fungus interactions. Current Genetics. 55: 233- 243.
36. Thomas, J., Aspray, E., Eirian, Jones, John, M., Gary, D. and Bending. 2005. Impotance of mycorrhization helper bacteria cell density and metabolite localization for the *Pinus sylvestris-Lactarius rufus* symbiosis. FEMS Microbiology Ecology. 1:1-9.
37. Tylka, G. L., Hussey, R. S. and Roncadori. R. W. 1991. Axenic germination of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi: Effects of selected *Streptomyces* species. Phytopathology. 81:751-754.

Effects of Streptomycets on colonization and growth of white clover inoculated with arbuscular mycorrhiza

Z. Pourmirzaei, A. Lakzian[1], N. Ali Asgharzad, A. R. Dehnad and A. Hallajnia

PhD student, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: Z.pourmirzai@yahoo.com

Professor, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: alakzian@yahoo.com

Professor, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, University of Tabriz; E-mail: n-aliasghar@tabrizu.ac.ir

Assistant Professor of Microbiology, Biotechnology Department, East Azerbaijan Research and Education Center Agricultural and Natural Resources, Razi Vaccine and Serum Research Institute, AREEO, Tabriz- Iran; E-mail: a.dehnad@areeo.ac.ir

Assistant Professor, Department of Soil Sciences, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad; E-mail: halajnia@um.ac.ir

Received: October, 2020 & Accepted: june, 2021

Abstract

The presence of some microorganisms including actinomycetes or their metabolites increase the growth of fungal mycelium, roots colonization and plant growth indices. In this study, an experiment was carried out in a completely random design (CRD) with three replications. The effects of four actinomycete species (*S. griseus*, *S. albogriseus*, *S.*sp_1 and *S.*sp_2) were examined on the frequency of hyphae, vesicles and colonization of clover root (*Trifolium alexandrinum)* inoculated by *Rhizophagus irregularis.* Wet and dry weight and phosphorus concentrations were measured in shoot and root of clover. The results showed that mycorrhizal symbiosis greatly stimulated by *S. albogriseus* and root and shoot growth and phosphorus absorption significantly increased in shoot and root of clover. Three species of *actinomycetes* considerably improved the fungal organs frequency in clover root, and the percentage of root colonization increased from 48.61% (in control) to 86.59, 72.93% and 66.90% in *S. albogriseus*, *S. griseus*, and S. sp_2 treatments respectively. The frequencies of hyphae in clover roots increased from 45.32% (in control) to 92.55, 85.48 and 71.47% *S. albogriseus, S. griseus,* and *S.* sp_2 treatments respectively. Inoculation of mycorrhizal roots of clover with *S. albogriseus* significantly increased the wet and dry weight and phosphorus concentrations of clover roots and shoots but *S. griseus* and *S.* sp_2 treatments increased shoot dry weight and phosphorus concentration in the roots and shoot of clover root. *S. albogriseus* could possibly be used in the production and preparation of *R. irregularis* inoculant.

Keywords: Mycorrhiza helper bacteria, Clover, Mycorrhiza symbiosis, *Streptomyces*.

[1.] Corresponding author: Soil Science Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad.