نشریه مدیریت خاک و تولید پایدار
جلد نهم، شماره سوم، ۱۳۹۸
۴۷-۶۸
http://ejsms.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/ejsms.2020.16071.1857

شناسایی مولکولی برخی از ریزجانداران محرک رشد گیاهی و بررسی تأثیر آن‌ها بر برخی از شاخص‌های رشدی گندم

***فرهاد رجالی[۱]، حسین کاری دولت‌آباد[۲]، هادی اسدی رحمانی[۳] و فهیمه فضلی‌خانی[۴]**

[۱]دانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران، [۲]استادیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران، [۳]دانشیار مؤسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران، [۴]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه علوم خاک، دانشگاه صنعتی اصفهان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۰۴ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۶/۱۲

چکیده

سابقه و هدف: گندم یکی از با اهمیت‌ترین محصولات غذایی است. در کشاورزی نوین به‌دلیل افزایش جمعیت و تأثیر منفی استفاده از کودهای شیمیایی مانند آلودگی‌های زیست‌محیطی و به خطر افتادن سلامتی انسان به‌کارگیری روش‌های مناسب مانند تولید کودهای زیستی که چنین خطراتی را نداشته باشد ضروری به‌نظر می‌رسد. قارچ‌ها و باکتری‌های افزایش‌دهنده رشد گیاه استفاده شده در کودهای زیستی ریزجانداران مفیدی هستند که با سازوکارهای متفاوت به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم باعث افزایش رشد، عملکرد و مقاومت گیاهان در برابر تنش‌های زنده و غیرزنده می‌شوند. با این‌که در سال‌های اخیر کودهای زیستی مورد توجه بیش‌تری قرار گرفته‌اند اما عدم شناسایی دقیق ریزجانداران استفاده شده در تولید این نوع از کودها یکی از مشکلات کودهای زیستی در ایران است. عدم شناسایی دقیق گونه ممکن است به‌دلیل نقصان روش‌های ریخت‌شناسی و یا بیوشیمیایی در قارچ‌ها و باکتری‌ها باشد. بنابر این هدف از انجام این پژوهش، شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی و باکتری و هم‌چنین بررسی تأثیر این جدایه‌ها به تنهایی و در ترکیب با قارچ میکوریز آربوسکولار روی برخی از خصوصیات رشدی گیاه گندم بود.

مواد و روش‌ها: پس از تهیه جدایه‌های قارچی و باکتریایی از مؤسسه تحقیقات خاک و آب، که تحت عنوان ریزجانداران محرک رشد گیاهی شناخته شده‌اند، شناسایی دقیق هر یک از جدایه‌ها به روش ریخت‌شناسی و یا مولکولی صورت پذیرفت. استخراج DNA ژنومی در قارچ میکوریز آربوسکولار به روش تک اسپور و در سایر جدایه‌های باکتری و قارچی به روش مبتنی بر CTAB انجام گرفت. تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA در جدایه‌های باکتری، نواحی *TEF-1α* و ITS1-5.8S-ITS2 در گونه‌های *تریکودرما*، ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 در *Serendipita indica* و ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU به‌روش آشیانه‌ای در قارچ میکوریز آربوسکولار صورت گرفت. طی یک آزمون گلخانه‌ای، تأثیر جدایه‌های قارچی و باکتریایی به‌صورت مجزا و ترکیبی همراه و عدم همراه با قارچ میکوریز آربوسکولار روی شاخص‌های رشدی گیاه گندم از جمله ارتفاع گیاه، وزن خشک هوایی و ریشه، ارتفاع و وزن خوشه و وزن دانه بررسی شدند.

* مسئول مکاتبه: frejali@yahoo.com

یافته‌ها: بر اساس بررسی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی، سه گونه از جنس *باسیلوس* شامل *Bacillus velezensis*، *B. pumilus* و *B. subtilis* و سه گونه از جنس تریکودرما شامل *Trichoderma atroviride*، *T. longibrachiatum* و *T. harzianum* و گونه‌های *S. indica* و *Rhizophagus irregularis* شناسایی شدند. از نظر تأثیر تیمارهای مختلف روی وزن خشک هوایی و وزن خوشه، تیمارهای *T. harzianum + R. irregularis* و *T. longibrachiatum* بیش‌ترین وزن را نشان دادند. تیمارهای *T. longibrachiatum + R. irregularis* و *T. atroviride* بیش‌ترین تأثیر را روی ارتفاع گیاه نشان دادند. گلدان‌های تیمارشده با *T. harzianum + R. irregularis*، *T. harzianum*، *T. atroviride* و *S. indica + R. irregularis* در مقایسه با شاهد بیش‌ترین افزایش وزن دانه را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: تیمارهای قارچی *T. harzianum + R. irregularis* و گونه‌های *Trichoderma* باعث افزایش معنی‌دار ویژگی‌های رشدی گندم گردید. بر اساس نتایج این پژوهش استفاده از زادمایه مناسب ترکیبی و تهیه فرمولاسیون‌های اولیه برای کاربرد در آزمایش‌های مزرعه‌ای جهت افزایش دسترسی مواد غذایی و بهبود رشد گیاه گندم پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *باسیلوس*، *تریکودرما*، قارچ میکوریز آربوسکولار، قارچ‌های محرک رشد گیاه

مقدمه

کشت گندم به‌دلیل افزایش روزافزون جمعیت و اهمیت این گیاه در تولید فرآورده‌های غذایی یکی از محورهای اصلی سیستم‌های زراعی می‌باشد. در کشاورزی نوین در پی بحران‌های آلودگی منابع زیستی به‌دلیل استفاده از سموم و کودهای شیمیایی و با توجه به افزایش جمعیت انسانی، اتخاذ راهکارهای مناسب که چنین خطراتی را نداشته باشند، ضروری است و این مهم با تولید کودهای زیستی میسر می‌گردد (٤٨). برخی از باکتری‌های ریزوسفری به‌طور مستقیم با ترشح هورمون‌های رشد مثل اکسین، سیتوکنین و جیبرلین، انحلال فسفات‌های معدنی و یا آلی نامحلول، تثبیت نیتروژن اتمسفری و یا با روش‌های غیرمستقیم مانند تولید آنزیم‌ها و یا ترکیباتی مثل سیانید هیدروژن و یا از طریق افزایش مقاومت طبیعی گیاه میزبان باعث رشد گیاهان می‌شوند (۲۰ و ۲۷). از طرفی گونه‌های *تریکودرما* از جمله قارچ‌های خاکزی هستندکه به‌دلیل سرعت رشد بالا و تولید زیاد کنیدیوم، با تراکم زیاد در خاک و بقایای گیاهی وجود دارند و پراکنش جغرافیایی وسیعی نیز دارند (٣٤ و ٤٣). گونه‌های *تریکودرما* با تولید ترکیباتی بیمارگرهای خاکزاد را کنترل می‌کنند و از این طریق باعث افزایش مقاومت و رشد گیاهان می‌شوند و یا باعث محلول کردن عناصر غذایی مانند فسفر، آهن، مس، روی و منگنز و افزایش قابلیت جذب آن‌ها می‌شوند. در گیاهان تلقیح‌شده با *تریکودرما*، توسعه ریشه‌ای بیش‌تر، ریشه‌ها قوی‌تر و در عمق بیش‌تر نفوذ پیدا می‌کنند که با افزایش ناحیه ریشه مویین امکان دسترسی به مواد غذایی افزایش می‌یابد. ترکیبات ثانویه مشابه اکسین به‌وسیله سویه‌های *تریکودرما* تولید می‌شود که رشد گیاه را القا و باعث توسعه ریشه های جانبی در گیاهان می‌شوند (۳۵ و ٤٥).

قارچ *Serendipita indica* از قارچ‌های با طیف میزبانی گسترده است که ناحیه اپیدرم و پوست ریشه را کلنیزه می‌کند. قارچ *S. indica* بر خلاف قارچ‌های میکوریز آربوسکولار که نیاز به موجود زنده برای همزیستی و رشد دارند، در محیط‌های سنتز شده قابل کشت می‌باشد (٥٤). هم‌چنین این قارچ قادر به ایجاد رابطه همزیستی با اعضای خانواده گیاهانی است که قادر به ارتباط همزیستی با قارچ‌های میکوریز آربوسکولار نمی‌باشند (٣٨، ٤٠ و ٤١). گزارش‌های متعددی وجود دارد که قارچ *S. indica* موجب تحریک رشد گیاه و افزایش تولید محصول شده است (٤، ١٢، ١٣، ١٩ و ٤٤). قارچ *S. indica* باعث تغییرات توسعه‌ای ریشه شده و افزایش رشد ریشه و دراز شدن ریشه‌های موئین در گیاهان تلقیح‌شده با این قارچ مشاهده می‌شود. انشعابات بیش‌تر ریشه امکان دسترسی بیش‌تری به خاک و مواد غذایی را افزایش می‌دهد. همچنین این قارچ قادر به تولید اکسین و سیتوکینین است که به رشد گیاه کمک می‌کند (٤٦ و ٥٣).

از طرف دیگر آثار مثبت رابطه همزیستی میکوریز آربوسکولار بر بقا و افزایش رشد گیاه میزبان در مناطق مختلف جهان مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته و تاکنون پژوهش‌های زیادی در این زمینه به انجام رسیده است. به‌طورکلی رابطه همزیستی میکوریزی آثار ویژه‌ای بر کیفیت شیمیایی، فیزیکی و زیستی خاک‌ها و در نتیجه رشد گیاه دارد و حتی به‌طور غیرمستقیم بر تغذیه انسان نیز مؤثر است. همزیستی میکوریزی باعث جذب کل عناصر غذایی مورد نیاز گیاه شامل عناصری هم‌چون بور، کلر، مس، کروم، سزیم، کبالت، آهن، مولیبدون، نیکل، سیلیسیوم و روی و در برخی موارد منگنز می‌شود (٢٢).

در پژوهش‌های متعددی قارچ‌های میکوریز آربوسکولار با عوامل افزایش‌دهنده رشد گیاهان مانند باکتری‌ها و قارچ‌های محرک رشد گیاهی استفاده شده‌اند (١١ و ٣٣). تأثیر قارچ‌های میکوریزی مختلف روی جمعیت باکتری و یا قارچ‌های خاک و همچنین به‌طور برعکس تأثیر این ریزجانداران روی قارچ میکوریزی متغیر است (٣٣). استفاده هم‌زمان قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و *Trichoderma harzianum* می‌تواند به‌طور معنی‌داری رشد گیاه را در مقایسه با زمانی که هر یک از قارچ‌ها به‌صورت تکی استفاده شده‌اند افزایش دهد (١٦ و ٣٧). مارتینز مدینا و همکاران (٢٠٠٩) گزارش دادند قارچ *تریکودرما* به‌طور معنی‌داری کلنیزاسیون ریشه به‌وسیله قارچ‌های میکوریز آربوسکولار *Glomus claroideum*، *G. constrictum* و *G. intraradices* را افزایش داد که ممکن است به‌دلیل ترشحات محلول و ترکیبات فراری باشد که توسط *تریکودرما* تولید شده است (٣١). انتقال فسفر توسط قارچ میکوریز *Glomus* در حضور *T. harzianum* افزایش می‌یابد که ممکن است به‌دلیل تأثیر آن در رشد و فعالیت قارچ میکوریزی باشد که به‌طور غیرمستقیم ارتباط میان دو همزیست باعث افزایش عملکرد گیاه می‌شود (١١). برهمکنش قارچ‌های میکوریزی *Rhizophagus clarus*، *Dentiscutata heterogama* و *Claroideoglomus etunicatum* با قارچ *S. indica* رشد و جذب مواد غذایی را در گیاهچه‌های آناناس افزایش داد (٣٦).

خوشبختانه در دهه اخیر توجه خوبی به نقش کودهای زیستی در بخش تولیدات گیاهی کشور شده و چندین کارخانه بزرگ و کوچک به امر تولید کودهای زیستی در کشور همت گماشته‌اند. علی‌رغم این حرکت شایسته، در حال حاضر یکی از مشکلات

کودهای زیستی در ایران عدم شناسایی دقیق ریزجانداران استفاده شده در تولید این نوع از کودها می‌باشد. عدم شناسایی دقیق گونه ممکن است به‌دلیل نقصان روش‌های شناسایی در قارچ‌ها و باکتری‌ها باشد. روش‌های سنتی استفاده شده برای شناسایی ریزجانداران بر اساس کشت ریزجاندار در محیط کشت اختصاصی و بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی و بیوشیمیایی آن انجام می‌شود. این روش‌ها پرزحمت و وقت‌گیر هستند که اغلب برای جدا کردن گونه‌های نزدیک با خصوصیت ریخت‌شناسی مشابه کافی نیستند. شناسایی گونه‌های قارچی با روش‌های ریخت‌شناسی و میکروسکوپی با توجه به تفاوت‌های بسیار جزئی آن‌ها مستلزم مهارت و تجربه زیادی می‌باشد. از طرفی ویژگی‌های ریخت‌شناسی تحت‌تأثیر شرایط محیطی مانند دما و رطوبت ممکن است تغییر کند. این مسایل اهمیت استفاده از روش‌های دیگر مثل روش‌های مولکولی که از حساسیت و سرعت بالایی برای شناسایی ریزجانداران برخوردار است را مشخص می‌کند و این روش‌ها می‌توانند جهت تشخیص نهایی گونه به‌کار گرفته شوند. در شناسایی مولکولی بسته به جنس و گونه ممکن است از یک یا چند ژن برای شناسایی استفاده شود. به‌دلیل این‌که استفاده از یک ناحیه ژنی ممکن است فقط امکان شناسایی تا سطح جنس را دهد و فاقد توانایی شناسایی دقیق گونه باشد، استفاده ترکیبی از روش‌ها و یا چند ژن ضروری می‌باشد (۸، ۱۷، ۳۲ و ۵۲). به‌عنوان مثال، یانگ و هونگ (۲۰۱۸) برای شناسایی گونه‌های قارچی *فیتوفتورا* از ناحیه ITS و ژن‌هایی مانند *Cox1*، *β-tub*، *TEF-1α* و *tigA* استفاده کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که ITS قادر به تشخیص همه گونه‌های *فیتوفتورا* نبود ولی از آن‌جا که توالی ITS به فراوانی و بیش‌تر از نواحی ژنی دیگر در پایگاه‌های اطلاعاتی وجود دارد و تکثیر آن راحت‌تر از بقیه نواحی ژنی است استفاده از ناحیه ITS برای شناسایی در اولین مرحله و نواحی ژنی دیگر برای بررسی دقیق‌تر پیشنهاد گردید (۵۶). از طرف دیگر قارچ‌های *تریکودرما*، میکوریز آربوسکولار و باکتری‌های *باسیلوس* به فراوانی در تولید کودهای زیستی استفاده می‌شوند و نواحی ژنی دخیل در شناسایی مولکولی در این ریزجانداران متفاوت است. بنابر این هدف از انجام این پژوهش، شناسایی دقیق و مولکولی جدایه‌های قارچی و باکتری و همچنین بررسی تأثیر این جدایه‌ها به تنهایی و در ترکیب با قارچ میکوریز آربوسکولار روی برخی از خصوصیات رشدی گیاه گندم بود.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت جدایه‌های قارچ و باکتری: جدایه‌های قارچی و باکتری با خصوصیات محرک رشدی از کلکسیون بخش بیولوژی مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهیه گردید. گونه قارچی میکوریز آربوسکولار برای اولین بار از خاک زیتون شهرستان رودبار جداسازی و در کلکسیون بخش بیولوژی مؤسسه تحقیقات خاک و آب نگهداری شده بود. جهت کشت جدایه‌های باکتری، یک کلنی از هر جدایه در محیط کشت حاوی آگار مغذی (NA)[1] به‌صورت خطی کشت و گرماگذاری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به‌مدت دو روز انجام گرفت تا باکتری‌ها به‌میزان کافی رشد کنند. پس از گذشت این مدت، تشتک‌های پتری برای نگهداری به دمای چهار درجه سلسیوس منتقل شدند. به‌منظور شناسایی اولیه جدایه‌های باکتری،

1- Nutrient agar

ریخت‌شناسی روی محیط باسیلوس آگار (BA[1])، رنگ‌آمیزی گرم، تولید اسپور، کاتالاز، اکسیداز و تست هیدرولیز نشاسته انجام گرفت.

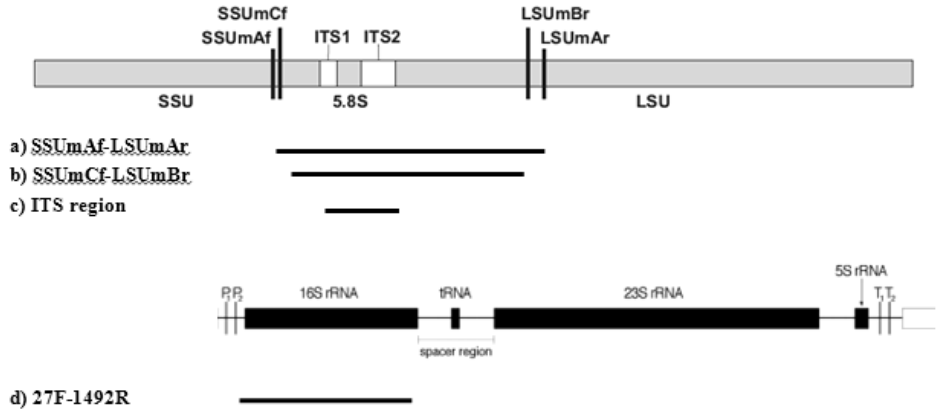
جدایه‌های *تریکودرما* در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA)[2] کشت و پس از رشد، در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای شناسایی و تفکیک ریخت‌شناسی سه جدایه قارچی *تریکودرما* در این پژوهش از ویژگی‌های ریخت‌شناسی مانند ویژگی‌های پرگنه، خصوصیات رشدی و ساختارهای تکثیری غیرجنسی در محیط کشت PDA استفاده شد.

قارچ *S. indica* روی محیط جامد کیفر (KM)[3] کشت شد (۲۶). تشتک‌های پتری حاوی محیط کیفر در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت یک هفته برای رشد نگهداری شدند.

جهت تکثیر قارچ میکوریز آربوسکولار، در ابتدا خاک هوا خشک، کوبیده و از الک دو میلی‌متری عبور داده شد. سپس با نسبت مناسب با پیت‌ماس مخلوط و مخلوط این دو بعد از سترون شدن به گلدان‌های سه کیلوگرمی منتقل شد. پس از اضافه کردن زادمایه حاوی قارچ میکوریزی به‌میزان ۲۰۰ گرم حاوی ۱۰۰ اندام فعال قارچ در هر گرم، بذور سورگوم ضدعفونی شده به تعداد مناسب در هر گلدان کشت شد. پس از گذشت حدود دو ماه از زمان کشت، اندام هوایی گیاه برداشت و محتویات گلدان شامل اسپور، بستر، هیف‌های قارچ میکوریزی و ریشه‌های میکوریزی کاملاً با هم مخلوط شدند. جداسازی اسپورهای داخل کشت تله گلدانی بدین‌صورت انجام شد که حدود ۱۰۰ گرم از نمونه برداشت و سوسپانسیونی از آب و خاک تهیه گردید. سنگریزه‌ها، تکه‌های ریشه و مواد آلی با استفاده از الک‌هایی با قطر منافذ ۲۰۰ میکرون و ۳۸ میکرون جدا و ذرات جمع شده روی الک ۳۸ میکرون به لوله سانتریفیوژ منتقل گردیدند و سپس محلولی از ساکاروز با غلظت ۶۰ درصد اضافه و به‌مدت یک دقیقه با قدرت ۲۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ گردید. لایه رویی درون لوله سانتریفیوژ، به الک ۳۸ میکرون منتقل و با مقدار کافی آب شستشو داده شد. در نهایت محتویات الک ۳۸ میکرون روی تشتک‌پتری شبکه‌بندی‌شده منتقل و تعداد ۵۰ تا ۷۰ اسپور غالب که از نظر اندازه، شکل و رنگ شبیه هم بودند توسط استریو میکروسکوپ جداسازی و به داخل آب مقطر منتقل شدند (۳ و ۲۹).

شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتری و قارچ: استخراج DNA ژنومی در جدایه‌های *باسیلوس*، قارچ‌های *تریکودرما* و *S. indica* به روش مبتنی بر CTAB انجام گرفت (۱۴). تکثیر ناحیه ژنی 16S rDNA در جدایه‌های *باسیلوس*، نواحی *TEF-1α* (فاکتور طویل‌سازی ترجمه ۱ آلفا) و ITS1-5.8S-ITS2 در گونه‌های *تریکودرما*، ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 در *S. indica* و ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU در قارچ میکوریز آربوسکولار توسط آغازگرهای جدول ۱ صورت گرفت (۲۵، ۲۸، ۳۹ و ۵۵). نواحی تکثیرشده rDNA ریبوزومی جهت شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی و باکتری در شکل ۱ نشان داده شده است.

1- Bacillus agar
2- Potato dextrose agar
3- Kafer medium



شکل ۱- تکثیر نواحی rDNA جهت شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی و باکتری. a, b) تکثیر ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز آشیانه‌ای جهت شناسایی جدایه قارچی میکوریز آربوسکلار (۲۸). C) تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 جهت شناسایی قارچ *تریکودرما* و *S. indica* d) تکثیر ناحیه 16S rDNA جهت شناسایی جدایه‌های باکتری (۵۰). خطوط تیره نشان‌دهنده نواحی تکثیر شده است.

Figure 1. The amplification of rDNA regions for molecular identification of fungal and bacterial isolates. a, b) The amplification of SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU region by nested PCR method to identify arbuscular mycorrhizal fungus isolate (28). C) The amplification of ITS1-5.8S-ITS2 region to identify *Trichoderma* and *S. indica*. d) The amplification of 16S rDNA region to identify bacterial isolates (50). Dark lines represent amplified regions.

جدول ۱- نام و توالی آغازگرهای استفاده شده در این پژوهش.

Table 1. The name and sequence of primers used in this research.

توالی Sequence	آغازگر Primer	ناحیه تکثیر Amplification region
5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'	27F	16S rDNA
5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'	1492R	
5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	ITS1	ITS1-5.8S-ITS2
5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS4	
5'-ATGGGTAAGGAGGACAAGAC-3'	EF1	*TEF-1α*
5'-GGAAGTACCAGTGATCATGTT-3'	EF2	
5'-TGGGTAATCTTTTGAAACTTYA-3'	SSUmAf1	SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU
5'-TGGGTAATCTTRTGAAACTTCA-3'	SSUmAf2	
5'-TCGCTCTTCAACGAGGAATC-3'	SSUmCf1	
5'-TATTGTTCTTCAACGAGGAATC-3'	SSUmCf2	
5'-TATTGCTCTTNAACGAGGAATC-3'	SSUmCf3	
5'-GCTCACACTCAAATCTATCAAA-3'	LSUmAr1	
5'-GCTCTAACTCAATTCTATCGAT-3'	LSUmAr2	
5'-TGCTCTTACTCAAATCTATCAAA-3'	LSUmAr3	
5'-GCTCTTACTCAAACCTATCGA-3'	LSUmAr4	
5'-DAACACTCGCATATATGTTAGA-3'	LSUmBr1	
5'-AACACTCGCACACATGTTAGA-3'	LSUmBr2	
5'-AACACTCGCATACATGTTAG-3'	LSUmBr3	
5'-AAACACTCGCACATATGTTAGA-3'	LSUmBr4	
5'-AACACTCGCATATATGCTAGA-3'	LSUmBr5	

فرآیند تکثیر PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکر (Techne, Genius FGEN02TP, USA) صورت گرفت. در این واکنش پنج میکرولیتر بافر تکثیر PCR، سه میکرولیتر نمونه حاوی DNA، ۱/۵ واحد DNA Taq polymerase، ۰/٤ میلی‌مولار dNTP، دو میلی‌مولار $MgCl_2$ و ۰/٤ میکرومولار آغازگرها (۱۰ پیکومول در میکرولیتر) و آب دیونیزه سترون تا حجم ۵۰ میکرولیتر استفاده گردید.

برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر ناحیه 16S rDNA در این واکنش واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت چهار دقیقه و برنامه حرارتی شامل ۳۰ چرخه واسرشته سازی در دمای ۹٤ درجه سلسیوس به‌مدت ٤۵ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۲ درجه سلسیوس به‌مدت ٤۵ ثانیه، توسعه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۲۰ ثانیه و توسعه نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۷ دقیقه استفاده گردید که در این مرحله قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر شد.

برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر نواحی ITS1-5.8S-ITS2 و *TEF-1α* شامل واسرشت‌سازی اولیه چهار دقیقه در ۹٤ درجه سلسیوس، ۳۰ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی در ۹٤ درجه سلسیوس، اتصال آغازگر در ۵۵ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، توسعه در ۷۲ درجه سلسیوس ٦۰ ثانیه و توسعه نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت هفت دقیقه صورت پذیرفت که در این مرحله به‌ترتیب قطعه‌هایی به طول تقریبی ٦۰۰ و ۷۰۰ جفت باز تکثیر شدند.

برای حصول DNA ژنومی در قارچ میکوریز آربوسکولار، ضدعفونی اسپورها با قرار دادن اسپورها در محلول کلرآمین T دو درصد به‌مدت ۱۰ دقیقه، شستشوی اسپور با آب مقطر استریل، قرار دادن اسپورها در محلول دو درصد هیپوکلریت سدیم به‌مدت پنج دقیقه، شستشوی اسپورها با آب مقطر استریل، قرار دادن اسپورها در محلول ۰/۰۲ درصد استرپتومایسین به‌مدت پنج دقیقه و سپس شستشو با آب مقطر استریل انجام گرفت (٤۷). در نهایت یک اسپور توسط استریومیکروسکوپ با حداقل میزان آب مقطر استریل روی اسلاید قرار گرفت. پس از خشک شدن آب، اسپور با نوک سوزن شکسته شد. سپس با ۱۰ میکرولیتر آب سترون تمامی محتویات اسپور به میکروتیوپ سترون منتقل شد (٦). واکنش زنجیره پلیمراز به روش آشیانه‌ای با تغییراتی انجام گرفت (۲۸). مواد مرحله اول پی‌سی‌ار برای یک نمونه با حجم ۲۵ میکرولیتر تهیه شد که شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر پی‌سی‌ار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP (۱۰ میلی‌مولار)، ۰/۵ میکرولیتر کلرید منیزیم (۵۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر آغازگرهای SSUmAf و LSUmAr (۱۰ پیکومول در میکرولیتر) و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Taq دی.ان.ای پلیمراز (۵ واحد در میکرولیتر) بود. برنامه دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل واسرشت‌سازی اولیه چهار دقیقه در ۹٤ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در ۹٤ درجه سلسیوس یک دقیقه، اتصال آغازگر در ۵۰ درجه سلسیوس یک دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس ۹۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت هفت دقیقه صورت پذیرفت که در این مرحله قطعه‌ای به طول ۱۸۰۰ جفت باز تکثیر شد. محصول پی‌سی‌ار اول در مرحله دوم واکنش استفاده گردید که در حجم کل ۲۵ میکرولیتر با آغازگرهای SSUmCf و LSUmBr مطابق با شرایط پی‌سی‌ار اول صورت پذیرفت. در پی‌سی‌ار مرحله دوم دمای اتصال آغازگر ۵۳ درجه سلسیوس بود که در این مرحله قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ جفت باز تکثیر شد.

نواحی تکثیر شده از ژل آگارز یک درصد در بافر TBE(1X) عبور و مقایسه باند تکثیر شده با نشانگر،

تکثیر بخش موردنظر ژنوم را نشان داد. برای بارگذاری محصول پی‌سی‌ار از نشانگرهای وزنی 50-1500bp DNA Ladder و 100-3000bp DNA Ladder شرکت سیناژن استفاده شد. تانک الکتروفورز به دستگاه تأمین‌کننده جریان الکتریکی با ولتاژ ۸۵-۹۰ و شدت جریان الکتریکی ۸۰-۱۰۰ میلی‌آمپر به‌مدت یک ساعت متصل شد.

پس از الکتروفورز قطعات حاصل از تکثیر به‌منظور تعیین توالی به شرکت بایونیز کره جنوبی ارسال گردید. پس از دریافت نتیجه توالی نوکلئوتیدی نمونه‌ها، نواحی پیوسته توسط نرم‌افزار Vector NTI V10 ایجاد و هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST با توالی‌های موجود در بانک ژن و یا بانک‌های مرتبط مقایسه شدند (۲). به‌منظور بررسی ارتباط تبارزایی گونه‌های شناسایی‌شده در این پژوهش و بررسی آرایه‌های یکه توالی‌های مشابه آن‌ها از بانک ژن (NCBI) اخذ شده بودند، هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها با استفاده از ابزار Clustal W موجود در نرم‌افزار MEGA نسخه شش انجام شد (۴۹). درخت‌های تبارزایی بیشینه صرفه‌جویی (Maximum parsimony) با استفاده از الگوی از پیش تعیین شده نرم‌افزار MEGA ترسیم گردید.

تأثیر جدایه‌های باکتریایی و قارچی روی خصوصیات رشدی گندم: برای بررسی تأثیر جدایه‌های باکتریایی و قارچی وزن خشک اندام هوایی و ریشه، ارتفاع اندام هوایی و خوشه، وزن خوشه و دانه مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. بذر گندم رقم چمران از بانک ژن مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه گردید. آزمایش‌های گلدانی در سال ۱۳۹۵ با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با ۱۸ تیمار در ۱۰ تکرار انجام شد. به‌منظور ضدعفونی، بذرها به‌مدت ٤٥ ثانیه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد قرار گرفتند و بلافاصله چندین بار با آب مقطر سترون شسته شدند.

به‌منظور اجرای تیمار تلقیح باکتریایی، باکتری‌ها تا فاز لگاریتمی تکثیر گردیدند و جمعیت باکتری‌ها در حدود 10^7 در میلی‌لیتر تنظیم شد. بذرهای استریل به فلاسک‌های حاوی زادمایه باکتری‌ها منتقل و به‌مدت ۳۰ دقیقه روی شیکر قرار گرفتند. پنج عدد بذر درون گلدان‌های پلاستیکی که با مخلوطی از ماسه: پیت: پرلیت به نسبت ۲: ۱: ۱ که با اتوکلاو سترون شده بود کشت داده شد (۱۸). از هفته دوم پس از جوانه زدن بذرها در هر هفته یک نوبت به‌منظور آبیاری گلدان‌ها از محلول غذایی هوگلند با ۵۰ درصد غلظت فسفر استفاده گردید.

تکثیر گونه‌های *تریکودرما* جهت تهیه زادمایه روی مخلوطی از ماسه و آرد ذرت (به نسبت ۹۰ گرم ماسه به ۱۰ گرم آرد ذرت + ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر) که به‌مدت دو ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار یک اتمسفر سترون شده بود انجام گرفت. بدین‌منظور چهار دیسک ۱۰ میلی‌متری از کشت هفت روزه *تریکودرما* به درون بطری‌های شیشه‌ای محتوی ۱۰۰ گرم مخلوط فوق اضافه شد. بطری‌های شیشه‌ای در دمای ۲۳ تا ۲٦ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند تا کاملاً قارچ مذکور بستر را کلنیزه کند. جهت مایه‌زنی، گونه‌های *تریکودرما* همزمان با کاشت بذر درون گلدان‌ها مایه‌زنی شدند، بدین‌صورت که ۱۰ گرم در کیلوگرم (10^6 CFU/g) زادمایه *تریکودرما* به ترکیب درون گلدان‌های مربوطه اضافه گردید (۲٤). در شاهد بدون قارچ، حامل تهیه شده تحت شرایط یکسان به گلدان‌ها اضافه گردید.

پرورش و تکثیر قارچ *S. indica* جهت تهیه زادمایه روی محیط کشت مایع کیفر که در حرارت ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار یک اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه سترون شده بود انجام گرفت. بدین‌منظور چهار دیسک ۱۰ میلی‌متری از کشت جامد ۱۰ روزه قارچ به درون فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری که دارای ۲۰۰

میلی‌لیتر محیط کشت مایع کیفر بود اضافه شد. فلاسک‌ها به‌مدت ۱۵ روز روی شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) در دمای اتاق ۲± ۲۵ درجه سلسیوس تکان داده شدند. پس از گذشت این مدت، قارچ برای نگهداری به دمای چهار درجه سلسیوس منتقل شد (۲۵). برای مایه‌زنی *S. indica* از روش کوماری و همکاران (۲۰۰۳) استفاده شد و یک گرم میسلیوم خرد شسته شده در کنار بذر به ترکیب بستر درون گلدان‌های مربوطه اضافه گردید (۳۰). زادمایه قارچ میکوریز آربوسکولار به‌میزان ۵۰ گرم در کیلوگرم زادمایه حاوی ۱۰۰ اندام فعال در هر گرم همزمان با کاشت بذر به ترکیب بستر درون گلدان‌های مربوطه اضافه گردید (۱). در هر گلدان پنج بذر گندم رقم چمران کشت گردید که پس از جوانه زنی و استقرار تعداد آن‌ها در هر گلدان به سه عدد تقلیل داده شد. پس از اتمام مرحله کاشت، گلدان‌ها به گلخانه با نور طبیعی و دمای ۱۸ الی ۲٤ درجه سلسیوس منتقل و به‌مدت چهار ماه تا اتمام دوره زایشی گیاه گندم نگهداری شدند. در طی این زمان آبیاری گلدان‌ها با آب شهر (pH: ۸/۲٦ و EC:۰/۳ dS/m) و در سه نوبت در هفته به گونه‌ای که آب از ته گلدان‌ها خارج نشود و تا رسیدن به سطح رطوبتی ۸۰ درصد ظرفیت زراعی صورت گرفت.

پس از اتمام آزمون گلخانه‌ای گیاه گندم از سطح خاک قطع و پس از اندازه‌گیری ارتفاع گیاه‌ها در هر گلدان با متر پلاستیکی، اندام هوایی درون پاکت‌های کاغذی قرار گرفته و به آون با دمای ٦۰ درجه سلسیوس انتقال داده شدند. همچنین محتویات بستر هر گلدان تخلیه و پس از شستشو و جدا کردن توده ریشه از مواد بستر، ریشه مربوط به هر گلدان به پاکت‌های کاغذی منتقل و درون آون قرار داده شدند. پس از گذشت یک هفته وزن خشک اندام هوایی، ریشه، خوشه و وزن دانه با ترازوی دیجیتال اندازه‌گیری و برای اندازه‌گیری طول خوشه از متر پلاستیکی استفاده گردید.

در آزمون گلخانه‌ای دو نوع شاهد در نظر گرفته شد در شاهد اول قارچ و باکتری مایه‌زنی نشد و در شاهد دوم حامل‌های سترونی که قارچ‌های *تریکودرما* و میکوریز آربوسکولار در آن تکثیر شده بودند به گلدان‌های مربوطه اضافه گردید تا تأثیر آن‌ها خنثی شود. بدین‌ترتیب ۱۸ تیمار برای این آزمایش در نظر گرفته شد (جدول ۲).

جدول ۲- تیمارهای استفاده شده در این پژوهش.

Table 2. The treatments used in this research.

تیمارها Treatments			
T1	Control	T10	*T. harzianum*
T2	Control (carrier)	T11	*R. irregularis*
T3	*B. velezensis*	T12	*B. velezensis* + *R. irregularis*
T4	*B. pumilus*	T13	*B. pumilus* + *R. irregularis*
T5	*B. subtilis*	T14	*B. subtilis* + *R. irregularis*
T6	*B. velezensis* + *B. pumilus* + *B. subtilis*	T15	*S. indica*+ *R. irregularis*
T7	*S. indica*	T16	*T. atroviride* + *R. irregularis*
T8	*T. atroviride*	T17	*T. longibrachiatum* + *R. irregularis*
T9	*T. longibrachiatum*	T18	*T. harzianum* + *R. irregularis*

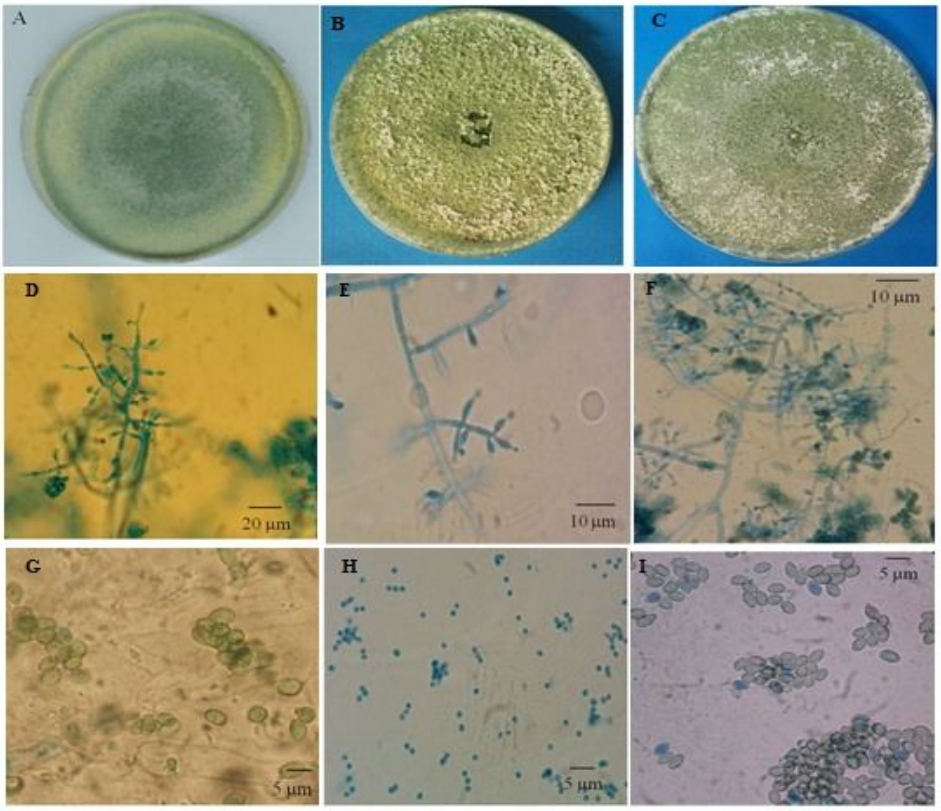
تجزیه و تحلیل داده‌ها: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 انجام شد. هم‌چنین برای مقایسه میانگین داده‌ها از روش آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث

بر اساس ویژگی‌های بیوشیمیایی و ریخت‌شناسی حاصل از مشاهده شکل ظاهری با میکروسکوپ نوری، سه جدایه باکتری SWRIv، SWRIp و SWRIs میله‌ای شکل، گرم مثبت و قادر به تولید اسپور بودند. کاتالاز و اکسیداز در هر سه جدایه مثبت مشاهده شد. در جدایه SWRIp هیدرولیز نشاسته منفی ولی در دو جدایه SWRIv و SWRIs مثبت بود.

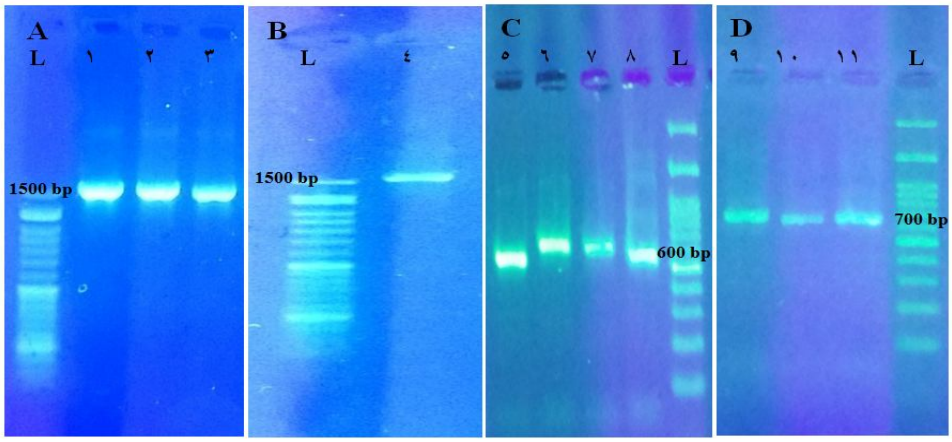
در بررسی ریخت‌شناسی گونه‌های *تریکودرما*، سرعت رشد در جدایه TL10-3-1 بیش‌تر از دو جدایه دیگر *تریکودرما* مشاهده گردید. به‌نحوی‌که قطر پرگنه در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و پس از سه روز در محیط کشت PDA، ٦٦ میلی‌متر بود در صورتی‌که در جدایه TA2-2-1، ۵۱ میلی‌متر و در جدایه TH5-1-2، ۵۷ میلی‌متر بود. در جدایه TL10-3-1 کنیدیوفورها بی‌رنگ و شاخه‌های اصلی طولانی و تقریباً مستقیم بود که روی ریسه‌هایی به قطر ۱۰-۲ میکرومتر تشکیل گردیدند و انشعابات جانبی کنیدیوفور تقریبا زاویه قائمه تشکیل داده و در جدایه TA2-2-1، کنیدیوم‌زایی به‌صورت یکنواخت روی کنیدیوفورهای درختچه‌ای روی ریسه‌های بی‌رنگ و به قطر ۱/۵-۱۰ میکرومتر تشکیل گردید. در جدایه TH5-1-2 کنیدیوفورها دارای انشعابات با زاویه راست و به حالت صلیبی شکل منظم و تشکیل یک ساختار هرمی روی هیف‌های شفاف و به پهنای ۱۲-۱/۵ میکرومتر را دادند. در جدایه TL10-3-1، ابعاد فیالیدها برابر ۳-۲/۵ × ۱۲-٦ میکرومتر مشاهده گردید که کنیدیوم‌ها یک سلولی با سطح صاف و به رنگ سبز روشن، بیضی‌شکل و به ابعاد ۳-۲ × ۷-۳/۵ میکرومتر تشکیل دادند. اندازه فیالیدها در جدایه TA2-2-1، ۳/٦-۲/٦ × ۹-۵ میکرومتر بود که روی آن کنیدیوم‌ها یک سلولی با دیواره صاف، نیمکروی تا تخم‌مرغی و در اندازه ۳/۸-۲/۹ × ۸/۲-۵/٦ میکرومتر تولید شدند. در جدایه TH5-1-2، فیالیدها با ابعاد ۳/۵-۲/۵ × ۷-٤ میکرومتر مشاهده شدند. کنیدیوم‌ها تقریباً گرد بوده و به رنگ سبز روشن دیده شدند. اندازه کنیدیوم‌ها ۲/۵-۲ × ۳-۲/۵ میکرومتر بوده، دیواره آن‌ها صاف و اندازه بزرگتر کنیدیوم‌ها و فیالیدها و رنگ سبز تیره کنیدیوم‌ها جدایه TA2-2-1 را از جدایه TH5-1-2 متمایز می‌نماید (شکل ۲).

در این پژوهش استخراج DNA به روش CTAB به‌عنوان روش مطلوب و مناسب جهت استخراج DNA جدایه‌های باکتریایی و قارچی ارزیابی شد. ارزیابی محصولات حاصل از تکثیر نواحی SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU، ITS1-5.8S-ITS2، *TEF-1α* و 16S rDNA در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و باند موجود در ژل، به‌ترتیب تکثیر بخشی از ژنوم به طول تقریبی ۱۵۰۰، ٦۰۰، ۷۰۰ و ۱۵۰۰ جفت باز را در جدایه‌های مورد بررسی نشان داد (شکل ۳). شماره دسترسی توالی‌های ثبت شده در پایگاه NCBI در جدول ۳ گزارش شده است. برای شناسایی دقیق ریزجانداران استفاده شده در این پژوهش، روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی بسته به جنس و گونه به‌صورت تکمیلی استفاده گردید. و نتایج حاصل از روش مولکولی تأییدکننده روش‌های ریخت‌شناسی بود.



شکل ۲- بررسی ریخت‌شناسی جدایه‌های تریکودرما: A–C) به‌ترتیب پرگنه هفت روزه جدایه‌های TA2-2-1، TH5-1-2 و TL10-3-1 روی محیط کشت PDA. D–F) به‌ترتیب کنیدیوفور جدایه‌های TA2-2-1، TH5-1-2 و TL10-3-1. G–H) به‌ترتیب کنیدیوم‌های جدایه‌های TA2-2-1، TH5-1-2 و TL10-3-1.

Figure 2. Morphological study of *Trichoderma* species: A-C) 7-day-old colony of TA2-2-1, TH5-1-2 and TL10-3-1 on PDA medium, respectively D-F) Conidiophores in TA2-2-1, TH5-1-2 and TL10-3-1, respectively. G-H) Conidium in TA2-2-1, TH5-1-2 and TL10-3-1, respectively.



شکل ۳- تکثیر نواحی 16S rDNA (A)، SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU (B)، ITS1-5.8S-ITS2 (C) و *TEF-1α* (D) متعلق به جدایه‌های استفاده شده در این پژوهش در ژل آگارز یک درصد. L: نشانگر، ۱: SWRIp، ۲: SWRIv، ۳: SWRIs، ٤: IA، ٥: TH5-1-2، ٦: TA2-2-1، ۷: TL10-3-1، ۸: SWRI، ۹: TL10-3-1، ۱۰: TH5-1-2 و ۱۱: TA2-2-1.

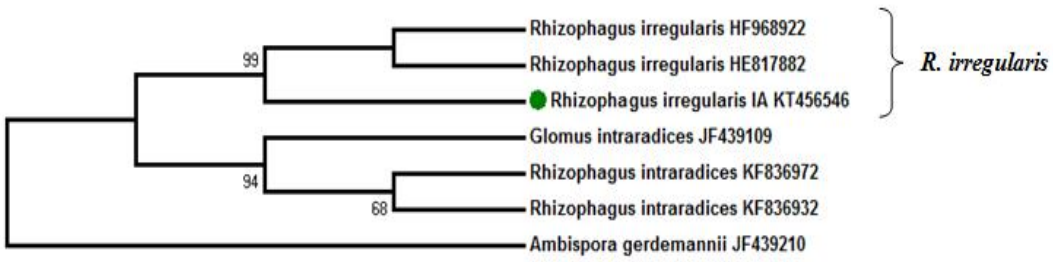
Figure 3. The Amplification of 16S rDNA (A), SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU (B), ITS1-5.8S-ITS2 (C) and TEF-1α (D) regions belonging to the isolates used in this study in 1% agarose gel. L: Ladders, 1: SWRIp, 2: SWRIv, 3: SWRIs, 4: IA, 5: TH5-1-2, 6: TA2-2-1, 7: TL10-3-1, 8: SWRI, 9: TL10-3-1, 10: TH5-1-2 and 11: TA2-2-1.

جدول ۳- شناسایی جدایه‌های قارچی و باکتری با توالی‌یابی نواحی SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU، ITS1-5.8S-ITS2، *TEF-1α* و 16S rDNA.

Table 3. Identification of fungal and bacterial isolates by sequencing SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU, ITS1-5.8S-ITS2, TEF-1α and 16S rDNA.

درصد شباهت، به‌ترتیب Similarity percentage, Respectively	شماره دسترسی Accession number				گونه Species	جدایه‌ها Isolates
	SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU	ITS-5.8S-ITS2	*TEF-1α*	16S rDNA		
99 %	-	-	-	MG563306	*Bacillus velezensis*	SWRIv
99 %	-	-	-	MG563307	*Bacillus pumilus*	SWRIp
99 %	-	-	-	MG563308	*Bacillus subtilis*	SWRIs
99 %	KT456546	-	-	-	*Rhizophagus irregularis*	IA
99 %	-	MG563310	-	-	*Serendipita indica*	SWRI
99 %, 99 %	-	KT351796	MF000375	-	*Trichoderma atroviride*	TA2-2-1
100 %, 99 %	-	KT351799	MF000378	-	*Trichoderma longibrachiatum*	TL10-3-1
99 %, 99 %	-	KT351797	MF000377	-	*Trichoderma harzianum*	TH5-1-2

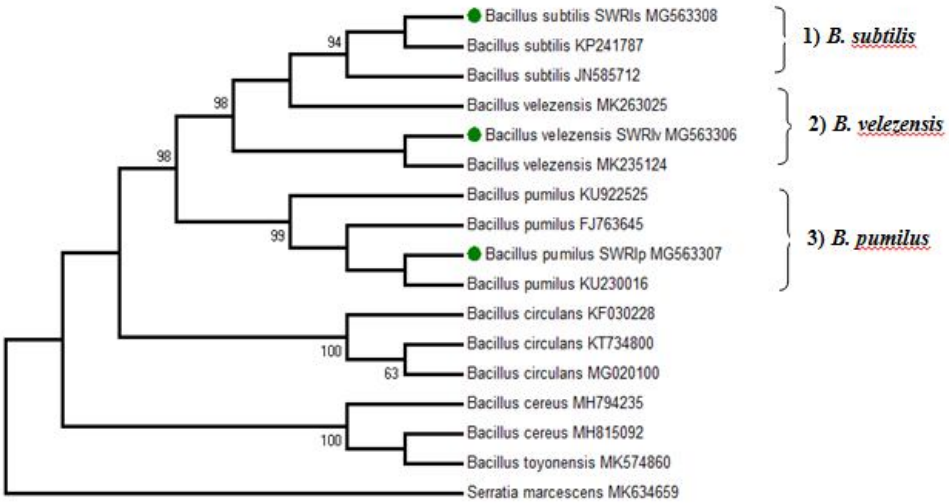
نتایج جستجوی BLASTn جدایه IA گونه *R. irregularis* نشان داد که توالی ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU این جدایه با دو جدایه از گونه مشابه موجود در بانک ژن با شماره‌های دسترسی HF968922 و HE817882، ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس روش بیشینه صرفه‌جویی مبتنی بر توالی ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU این جدایه با دو جدایه اشاره شده خوشه‌بندی شدند و کلاد مستقلی با حمایت اعتبارسنجی ۹۹ درصد ایجاد کردند. سه جدایه موجود در بانک ژن و متعلق به گونه *R. intraradices* نیز کلاد مستقلی را ایجاد کردند. توالی ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU گونه *Ambispora gerdemannii* با شماره دسترسی JF439210 به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد (شکل ٤).



شکل ٤- درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس روش بیشینه صرفه‌جویی و با استفاده از توالی ناحیه SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSU. مقادیر اعتبارسنجی بالاتر از ٦٠ درصد (١٠٠٠ تکرار) روی انشعابات نشان داده شده است. گونه (JF439210) *Ambispora gerdemannii* به‌عنوان گروه خارجی می‌باشد. گونه‌های شناسایی‌شده در این پژوهش با ● مشخص شده‌اند.

Figure 4. A Maximum Parsimony tree based on the sequences of SSU-ITS1-5.8S-ITS2-LSUregion. Bootstrap values > 60% (1000 replications) are shown at the branches. The tree rooted with *Ambispora gerdemannii* (JF439210). The species identified in this study are indicated with ●.

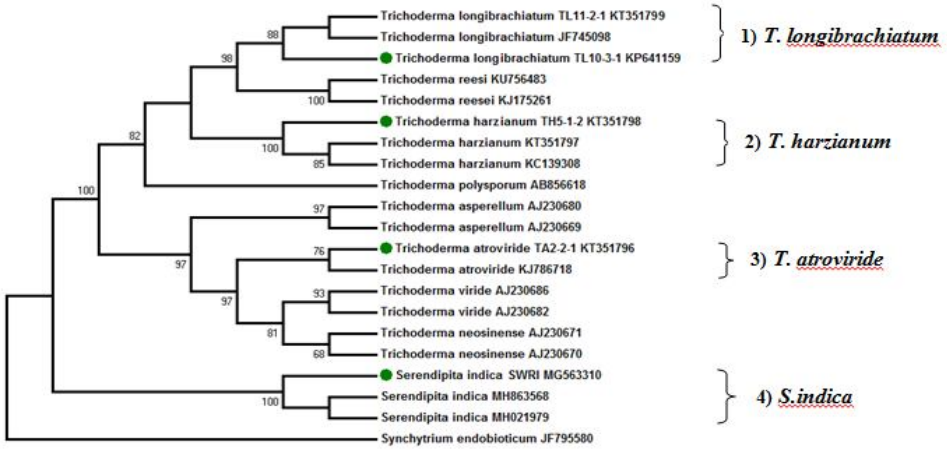
نتایج جستجوی BLASTn جدایه‌های SWRIs، SWRIv و SWRIp به‌ترتیب متعلق به گونه‌های *B. subtilis*، *B. velezensis* و *B. pumilus* نشان داد که توالی‌های ناحیه 16S rDNA این جدایه‌ها با جدایه‌هایی از گونه‌های مشابه موجود در بانک ژن، ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارند. در درخت تبارزایی ترسیم‌شده بر اساس روش بیشینه صرفه‌جویی مبتنی بر توالی‌های ناحیه 16S rDNA، این جدایه‌ها با جدایه‌هایی از گونه‌های مشابه خوشه‌بندی شدند و به‌ترتیب کلادهای با حمایت اعتبارسنجی ۹٤، ۹۸ و ۹۹ درصد ایجاد کردند. توالی ناحیه 16S rDNA گونه *Serratia marcescens* با شماره دسترسی MK634659 به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد (شکل ۵).



شکل ۵- درخت تبارزایی ترسیم‌شده بر اساس روش بیشینه صرفه‌جویی و با استفاده از توالی ناحیه 16S rDNA. مقادیر اعتبارسنجی بالاتر از ٦۰ درصد (۱۰۰۰ تکرار) روی انشعابات نشان داده شده است. گونه *Serratia marcescens* (MK634659) به‌عنوان گروه خارجی می‌باشد. گونه‌های شناسایی‌شده در این پژوهش با ● مشخص شده‌اند.

Figure 5. A Maximum Parsimony tree based on the sequences of 16S rDNA region. Bootstrap values > 60% (1000 replications) are shown at the branches. The tree rooted with *Serratia marcescens* (MK634659). The species identified in this study are indicated with ●.

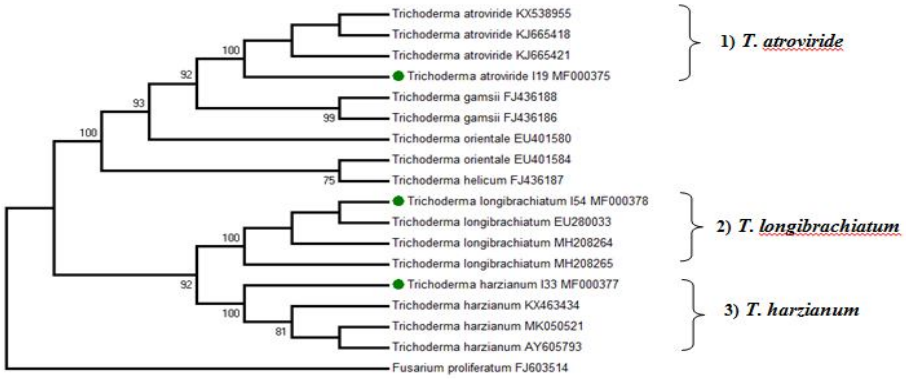
نتایج جستجوی BLASTn جدایه TL10-3-1 متعلق به گونه *T. longibrachiatum*، جدایه TH5-1-2 متعلق به گونه *T. harzianum*، جدایه TA2-2-1 متعلق به گونه *T. atroviride* و جدایه SWRI متعلق به گونه *S. indica* نشان داد که توالی‌های ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 این جدایه‌ها با جدایه‌هایی از گونه‌های مشابه موجود در بانک ژن، ۹۹ تا ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارند. در درخت تبارزایی ترسیم‌شده بر اساس روش بیشینه صرفه‌جویی مبتنی بر توالی‌های ناحیه ITS1-5.8S-ITS2، این جدایه‌ها با جدایه‌هایی از گونه‌های مشابه خوشه‌بندی شدند و به‌ترتیب کلادهای با حمایت اعتبارسنجی ۸۸، ۱۰۰، ٧٦ و ۱۰۰ درصد ایجاد کردند. توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 گونه *Synchytrium endobioticum* با شماره دسترسی JF795580 به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد (شکل ٦).



شکل ٦- درخت تبارزایی ترسیم‌شده بر اساس روش بیشینه صرفه‌جویی و با استفاده از توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2. مقادیر اعتبارسنجی بالاتر از ٦٠ درصد (١٠٠٠ تکرار) روی انشعابات نشان داده شده است. گونه *Synchytrium endobioticum* (JF795580) به‌عنوان گروه خارجی می‌باشد. گونه‌های شناسایی‌شده در این پژوهش با ● مشخص شده‌اند.

Figure 6. A Maximum Parsimony tree based on the sequences of ITS1-5.8S-ITS2 region. Bootstrap values > 60% (1000 replications) are shown at the branches. The tree rooted with *Synchytrium endobioticum* (JF795580). The species identified in this study are indicated with ●.

نتایج جستجوی BLASTn جدایه TA2-2-1 متعلق به گونه *T. atroviride*، جدایه TL10-3-1 متعلق به گونه *T. longibrachiatum* و جدایه TH5-1-2 متعلق به گونه *T. harzianum* نشان داد که توالی‌های ژن *TEF-1α* این جدایه‌ها با جدایه‌هایی از گونه‌های مشابه موجود در بانک ژن، ٩٩ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارند. در درخت تبارزایی ترسیم‌شده بر اساس روش بیشینه صرفه‌جویی مبتنی بر توالی‌های ژن *TEF-1α*، این جدایه‌ها با جدایه‌هایی از گونه‌های مشابه خوشه‌بندی شدند و کلادهایی با حمایت اعتبارسنجی ١٠٠ درصد ایجاد کردند. توالی ژن *TEF-1α* گونه *Fusarium proliferatum* با شماره دسترسی FJ603514 به‌عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شد (شکل ٧).



شکل ٧- درخت تبارزایی ترسیم شده بر اساس روش بیشینه صرفه‌جویی و با استفاده از توالی ژن *TEF-1α*. مقادیر اعتبارسنجی بالاتر از ٦٠ درصد (١٠٠٠ تکرار) روی انشعابات نشان داده شده است. گونه *Fusarium proliferatum* (FJ603514) به‌عنوان گروه خارجی می‌باشد. گونه‌های شناسایی‌شده در این پژوهش با ● مشخص شده‌اند.

Figure 7. A Maximum Parsimony tree based on the sequences of *TEF-1α* gene. Bootstrap values > 60% (1000 replications) are shown at the branches. The tree rooted with *Fusarium proliferatum* (FJ603514). The species identified in this study are indicated with ●.

از نظر تأثیر تیمارهای مختلف روی وزن خشک هوایی، تیمارهای *T. harzianum + R. irregularis*، *T. longibrachiatum* و *T. atroviride* به‌ترتیب با ۸/۴۲، ۸/۰۶ و ۸/۰۳ گرم در گلدان بیش‌ترین وزن را نشان دادند. در صورتی‌که در شاهد T_1، وزن خشک هوایی ٦/٩٣ گرم در گلدان و در شاهد T_2، ٦/٧٨ گرم در گلدان بود (جدول ٤). بیش‌ترین وزن خشک ریشه در گلدان‌هایی دیده شد که با تیمارهای *T. harzianum + R. irregularis*، *T. atroviride* و *T. harzianum* مایه‌زنی شده بودند (جدول ٤). تیمارهای *T. longibrachiatum + R. irregularis* و *T. atroviride* بیش‌ترین تأثیر را روی ارتفاع گیاه با طول ٦٦/٦٦ و ٦٦/٣٧ سانتی‌متر نشان دادند. در صورتی‌که در شاهد T_1، ارتفاع ٦١/٥٤ سانتی‌متر و در شاهد T_2، ٦٠/٧٧ سانتی‌متر بود (جدول ٤).

جدول ٤- مقایسه میانگین تأثیر تیمارهای قارچی و باکتریایی بر ارتفاع گیاه، وزن خشک اندام هوایی و ریشه، طول و وزن خوشه و وزن دانه گندم در آزمون گلخانه‌ای.

Table 4. Mean comparison of the effect of fungal and bacterial treatments on plant height, shoot and root dry weight, head length and weight, and weight of seeds of wheat in greenhouse experiment.

وزن دانه (گرم در گلدان) Weight of seeds (g/pot)	وزن خوشه (گرم در گلدان) Head weight (g/pot)	طول خوشه (سانتی‌متر) Head length (cm)	وزن خشک ریشه (گرم در گلدان) Root dry weight (g/pot)	وزن خشک اندام هوایی (گرم در گلدان) Aerial dry weight (g/pot)	ارتفاع گیاه (سانتی‌متر) Plant Height (cm)	تیمارها Treatments
0.48 ^{d}	2.53 ^{d}	7.50 ^{f}	1.10 ^{de}	6.93 ^{ef}	61.54 $^{f-i}$	T_1
0.50 ^{cd}	2.57 ^{d}	7.65 ^{ef}	1.13 ^{de}	6.78 $^{e-g}$	60.77 ^{hi}	T_2
0.52 $^{b-d}$	2.67 $^{b-d}$	7.94 $^{d-f}$	0.97 ^{e}	6.34 ^{fg}	60.97 $^{g-i}$	T_3
0.52 $^{b-d}$	2.54 ^{d}	8.19 $^{a-d}$	1.09 ^{de}	6.45 ^{fg}	59.41 ^{i}	T_4
0.48 ^{d}	2.53 ^{d}	7.85 $^{d-f}$	1.08 ^{de}	6.11 ^{g}	60.57 ^{hi}	T_5
0.48 ^{d}	2.71 ^{cd}	8.00 $^{c-e}$	1.13 ^{de}	6.93 ^{ef}	62.51 $^{e-h}$	T_6
0.51 ^{cd}	2.74 $^{a-d}$	8.14 $^{b-d}$	1.21 ^{cd}	6.97 ^{ef}	63.58 $^{c-g}$	T_7
0.59 ^{a}	2.96 $^{a-c}$	8.23 $^{a-d}$	1.55 ^{a}	8.03 $^{a-c}$	66.37 ^{ab}	T_8
0.57 ^{ab}	3.09 ^{ab}	8.66 ^{a}	1.22 ^{cd}	8.06 ^{ab}	65.67 $^{a-d}$	T_9
0.59 ^{a}	2.75 $^{a-d}$	8.27 $^{a-d}$	1.48 ^{ab}	7.48 $^{b-e}$	63.64 $^{b-g}$	T_{10}
0.55 $^{a-c}$	2.69 $^{b-d}$	8.23 $^{a-d}$	1.41 $^{a-c}$	7.68 $^{b-d}$	61.64 $^{e-i}$	T_{11}
0.46 ^{d}	2.77 $^{a-d}$	8.52 ^{ab}	1.29 $^{b-d}$	7.05 $^{d-f}$	63.76 $^{b-f}$	T_{12}
0.51 ^{cd}	2.98 $^{a-c}$	8.53 ^{ab}	1.24 ^{cd}	7.36 $^{b-e}$	63.27 $^{d-h}$	T_{13}
0.51 $^{b-d}$	2.63 ^{cd}	8.28 $^{a-d}$	1.18 ^{de}	6.96 ^{ef}	63.34 $^{a-e}$	T_{14}
0.59 ^{a}	2.52 ^{d}	8.16 $^{b-d}$	1.11 ^{de}	6.93 ^{ef}	63.12 $^{d-h}$	T_{15}
0.47 ^{d}	2.52 ^{d}	8.47 $^{a-c}$	1.22 ^{cd}	7.43 $^{b-e}$	66.17 $^{a-c}$	T_{16}
0.48 ^{d}	2.70 $^{b-d}$	8.60 ^{ab}	1.28 ^{de}	7.34 $^{c-e}$	66.66 ^{a}	T_{17}
0.59 ^{a}	3.10 ^{a}	8.49 ^{ab}	1.48 ^{ab}	8.42 ^{a}	65.29 $^{a-d}$	T_{18}

اعداد دارای حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن می‌باشند.

Values followed by different letters within columns are significantly different using Duncan's multiple range test (P<0.05).

پژوهشگران زیادی با تغییر دادن میکروفلورا در خاک‌های کشاورزی به‌دنبال افزایش رشد و عملکرد گیاهان بوده‌اند. ریزجانداران خاک باعث افزایش انتقال عناصر، تولید هورمون‌های گیاهی، قابل جذب‌سازی عناصر معدنی، مقابله با بیمارگرهای مختلف با سازوکارهای متفاوت می‌شوند و به این طریق رشد و

عملکرد گیاهان را بهبود می‌بخشند (۷). نتایج این پژوهش نشان داد که گونه‌های *تریکودرما* به تنهایی و یا به همراه *R. irregularis* باعث افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشدی در گیاه گندم می‌شوند. در سال‌های اخیر مشخص شده است که برخی از سویه‌های *تریکودرما* ارتباط سودمندی با ریشه گیاهان برقرار کرده و با کلنیزه کردن لایه‌های خارجی اپیدرم ریشه گیاهان به‌عنوان همزیست غیر بیماریزا و موفق عمل می‌کنند و با سازوکارهای مختلف هم‌چنین محلول کردن مواد غذایی و افزایش قابلیت جذب آن‌ها و افزایش توسعه ریشه‌ها باعث بهبود رشد گیاهان می‌شوند (۳۵ و ٤٥). از دیگر اثرات مفید *تریکودرما* می‌توان به توانایی آنتاگونیستی عوامل بیمارگر گیاهان با ترکیبی از سازوکارهای مایکوپارازیتیسم، تجزیه آنزیمی، ترشح آنتی‌بیوتیک‌ها و رقابت بر سر جا و مواد غذایی می‌باشد (۱۵، ۲۱ و ۲۳). کنتراس- کرنجو و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که *T. virens* با تولید ترکیبات مرتبط با اکسین مانند ایندول تری استیک اسید، ایندول تری استالدهید و ایندول تری اتانل باعث افزایش زیست توده در آرابیدوپسیس می‌شود (۱۰). کنتراس- کرنجو و همکاران (۲۰۱٤) گزارش کردند که گونه‌های *تریکودرما* باعث افزایش سطح ایندول استیک اسید و افزایش رشد در آرابیدوپسیس می‌شوند (۹). موانجی و همکاران (۲۰۱۱) گزارش دادند که تلقیح *تریکودرما* و قارچ میکوریز آربوسکولار به تنهایی و با هم تمام خصوصیات رشدی مانند ارتفاع، وزن خشک ریشه و ساقه گیاه گوجه‌فرنگی را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد (۳۷). تسوتکو و همکاران (۲۰۱٤) گزارش دادند که گونه‌های مختلف قارچ‌های میکوریز آربوسکولار از جنس گلوموس و *تریکودرما* باعث افزایش رشد و سلامتی انگور، افزایش جذب مواد غذایی و حاصلخیزی خاک می‌شوند (۵۱).

جدایه‌های باکتری استفاده شده به تنهایی و یا در ترکیب با یکدیگر و یا در ترکیب با قارچ میکوریز آربوسکولار تأثیری روی ویژگی‌های رشدی گندم نشان ندادند. مایه‌زنی *S. indica* به تنهایی و یا با ترکیب *R. irregularis* باعث افزایش بعضی از خصوصیات رشدی گیاه گندم گردید. دلیل این امر می‌تواند تولید مواد محرک رشد گیاهی و یا افزایش جذب مواد غذایی توسط *S .indica* و قارچ میکوریز آربوسکولار باشد. تولید مواد محرک رشد به‌وسیله قارچ‌های مختلفی که سطح ریشه را کلنیزه می‌کنند باعث افزایش کارایی میزبان می‌شوند. مشخص شده است که قارچ *S. indica* با تولید هورمون‌های گیاهی مانند اکسین و سیتوکینین باعث افزایش رشد گیاهان می‌شود (٤٦ و ۵۳).

بیش‌ترین وزن خوشه در تیمارهایی مشاهده گردید که با *T. harzianum + R. irregularis* و *T. longibrachiatum* مایه‌زنی شده بودند (جدول ٤). گلدان‌های تیمار شده با تیمارهای *S. indica* + *R. irregularis*، *T. harzianum + R. irregularis*، *T. harzianum* و *T. atroviride* در مقایسه با شاهد بیش‌ترین افزایش وزن دانه را نشان دادند (جدول ٤). پژوهشگران گزارش داده‌اند که مایه‌زنی *S. indica* باعث افزایش متوسط وزن دانه در گیاهان *Foeniculum vulgare*، *Nicotiana attenuata*، *Spilanthes calva*، *Arabidopsis thaliana* و *Withania somnifera* شده است (٤، ۱۲، ٤۰ و ٤۲).

استفاده هم‌زمان قارچ‌های *T. harzianum* و *R. irregularis* در افزایش شاخص‌های رشدی گندم مؤثرتر از بقیه تیمارها بودند. به‌نظر می‌رسد قارچ‌های میکوریز آریوسکولار در مقایسه با قارچ *تریکودرما* به‌طور مؤثرتری قادر به جذب آب و عناصر غذایی

هستند. از طرف دیگر به‌طور محتمل *T. harzianum* فسفر و عناصر ریز مغذی دیگر را بیش‌تر حل می‌کند و قارچ میکوریز آربوسکولار جذب آن‌ها را افزایش می‌دهد (۵ و ۳۷). قارچ *تریکودرما* به‌دلیل افزایش سطح ریشه امکان جستجوی حجم بیش‌تری از خاک را برای دسترسی به مواد غذایی، حلالیت ترکیبات نامحلول و افزایش دسترسی به عناصر کم‌مصرف فراهم می‌کند (۵). یک حقیقت قابل‌ملاحظه این است که برهمکنش میان قارچ‌های میکوریز آربوسکولار و گونه‌های *تریکودرما* ممکن است خیلی متفاوت با توجه به سویه‌های قارچی باشد. به همین دلیل انتخاب سویه به‌عنوان زادمایه برای سلامت گیاه و تولید بیش‌تر محصول مهم است (۵ و ۳۱).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج حاصله و افزایش شاخص‌های رشدی در گیاه گندم، می‌توان از قارچ‌های *T. harzianum* و *R. irregularis* به‌صورت توأم و یا گونه‌های *T. harzianum*، *T. atroviride* و *T. longibrachiatum* به‌صورت تکی برای تهیه زادمایه مناسب جهت انجام آزمون‌های مزرعه‌ای در راستای افزایش فراهمی عناصر غذایی و بهبود رشد گیاه گندم استفاده کرد. بدیهی است اطلاعات جمع‌آوری‌شده در نهایت می‌تواند در اختیار واحدهای تولیدکننده زیستی در مقیاس صنعتی قرار گرفته و استفاده عملی از این ریزجانداران محرک رشد در بخش کشاورزی کشور نمود عینی پیدا نماید.

منابع

1. Al-Karaki, G.N., and Clark, R.B. 1998. Growth, mineral acquisition, and water use by mycorrhizal wheat grown under water stress. J. Plant Nutr. 21: 2. 263-276.
2. Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of proteindatabase search programs. Nucleic Acids Research. 25: 17. 3389-3402.
3. An, Z.Q., Hendrix, J.W., Hershman, D.E., and Henson, G.T. 1990. Evaluation of the "most probable number"(MPN) and wet-sieving methods for determining soil-borne populations of endogonaceous mycorrhizal fungi. Mycologia. 82: 5. 576-581.
4. Barazani, O., Benderoth, M., Groten, K., Kuhlemeier, C., and Baldwin, I.T. 2005. *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* increase growth performance at the expense of herbivore resistance in *Nicotiana attenuata*. Oecologia. 146: 234-243.
5. Bhuvaneswari, G., Reetha, S., Sivaranjani, R., and Ramakrishnan, K. 2014. Effect of AM fungi and *Trichoderma* species as stimulations of growth and morphological character of chilli (*Capsicum annuum* L.). Inter. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 3: 3. 447-455.
6. Błaszkowski, J., Chwat, G., and Góralska, A. 2015. *Acaulospora ignota* and *Claroideoglomus hanlinii*, two new species of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) from Brazil and Cuba. Mycological Progress. 14: 4. 18.
7. Bolton, H., Fredrickson, J.K., and Elliot, L.F. 1993. Microbial ecology of the rhizosphere. Microbial production of plant growth regulators. In Soil microbial ecology. Applications in agricultural and enviromental management.F.B. Metting, Jr. (edit) Marcel Dekker, Inc., New York, Pp: 27-63.
8. Buszewski, B., Rogowska, A., Pomastowski, P., Złoch, M., and Railean-Plugaru, V. 2017. Identification of microorganisms by modern analytical techniques. J. AOAC Inter. 100: 6. 1607-1623.
9. Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Alfaro-Cuevas, R., and López-Bucio, J. 2014. *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production and Na+ elimination through root exudates. Molecular Plant-Microbe Interactions. 27: 6. 503-514.

10. Contreras-Cornejo, H.A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., and López-Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. Plant Physiology. 149: 3. 1579-1592.
11. De Jaeger, N., de la Providencia, I.E., Dupré de Boulois, H., and Declerck, S. 2011. *Trichoderma harzianum* might impact phosphorus transport by arbuscular mycorrhizal fungi. FEMS Microbiology Ecology. 77: 3. 558-567.
12. Dolatabadi, H.K., Goltapeh, E.M., Jaimand, K., Rohani, N., and Varma, A. 2011a. Effects of *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* on growth and yield of essential oil in fennel (*Foeniculum vulgare*) under greenhouse conditions. J. Basic Microbiol. 51: 33-39.
13. Dolatabadi, H.K., Goltapeh, E.M., Moieni, A., Jaimand, K., Sardrood, B.P., and Varma, A. 2011b. Effect of *Piriformospora indica* and *Sebacina vermifera* on plant growth and essential oil yield in *Thymus vulgaris* in vitro and in vivo experiments. Symbiosis. 53: 29-35.
14. Doyle, J.J., and Doyle, J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus. 12: 13-15.
15. Druzhinina, I.S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B.A., Kenerley, C.M., Monte, E., Mukherjee, P.K., Zeilinger, S., Grigoriev, I.V., and Kubicek, C.P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. Nature Reviews Microbiology. 9: 10. 749-759.
16. Dubsk'y, M., Sr'amek, M., and Vos'atka, M. 2002. Inoculation of Cyclamen (*Cyclamen persicum*) and *Euphorbia pulcherrina* with arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum*. Rostlinna Vyroba. 48: 63-68.
17. Ehgartner, D., Herwig, C., and Fricke, J. 2017. Morphological analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum* using flow cytometry - the fast alternative to microscopic image analysis. Applied Microbiology and Biotechnology. 101: 20. 7675-7688.
18. Fulchieri, M., and Frioni, L. 1994. *Azospirillum* inoculation on maize (*Zea mays*): effect on yield in a field experiment in central Argentina. Soil Biology and Biochemistry. 26: 7. 921-923.
19. Ghimire, S.R., Charlton, N.D., and Craven, K.D. 2009. The mycorrhizal fungus, *Sebacina vermifera*, enhances seed germination and biomass production in Switchgrass (*Panicum virgatum* L.). Bioenergy Research. 2: 51-58.
20. Glick, B.R., Jacobson, C.B., Schwarze, M.M.K., and Pasternak, J.J. 1994. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. Can. J. Microbiol. 40: 911-915.
21. Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 962: 190-194.
22. He, X., and Nara, K. 2007. Element biofortification: can mycorrhizas potentially offer a more effective and sustainable pathway to curb human malnutrition?. Evolution. 57: 2742-2752.
23. Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease. 87: 1. 4-10.
24. Jayaraj, J., Radhakrishnan, N.V., and Velazhahan, R. 2006. Development of formulations of *Trichoderma harzianum* strain M1 for control of damping-off of tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. Archives of Phytopathology and Plant Protection. 39: 1. 1-8.
25. Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L.R., and Fields, M.W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athalassohaline lake in northwestern China. Applied and Environmental Microbiology. 72: 6. 3832-3845.
26. Kafer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. Advances in Genetic. 19: 33-131.

27. Kloepper, J.W., Lifshitz, R., and Zablotowicz, R.M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends in Biotechnology. 7: 2. 39-44.
28. Krüger, M., Stockinger, H., Krüger, C., and Schüßler, A. 2009. DNA-based species level detection of Glomeromycota: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. New Phytologist. 183: 1. 212-223.
29. Kumar, R., Tapwal, A., da Silva, J.A.T., Pandey, S., and Borah, D. 2013. Diversity of arbuscular mycorrhizal fungi associated in a mixed natural forest of Jeypore, Assam. Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability. 7: 1. 91-93.
30. Kumari, R., Yadav, H.K., Bhoon, Y.K., and Varma, A. 2003. Colonization of cruciferous plants by *Piriformospora indica*. Current Science. 85: 1672-1674.
31. Martínez-Medina, A., Pascual, J.A., Lloret, E., and Roldán, A. 2009. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* and their effects on *Fusarium* wilt in melon plants grown in seedling nurseries. J. Sci. Food Agric. 89: 11. 1843-1850.
32. Martens, M., Dawyndt, P., Coopman, R., Gillis, M., De Vos, P., and Willems, A. 2008. Advantages of multilocus sequence analysis for taxonomic studies: a case study using 10 housekeeping genes in the genus *Ensifer* (including former *Sinorhizobium*). Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. 58: 1. 200-214.
33. Medina, A., Probanza, A., Mañero, F.G., and Azcón, R. 2003. Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effects on plant growth, microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). Applied Soil Ecology. 22: 1. 15-28.
34. Mohamed, H., and Haggag, W. 2006. Boicontrol potential of salinity tolerant mutants of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum*. Brazil. J. Microbiol. 37: 181-191.
35. Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. International Microbiology. 4: 1. 1-4.
36. Moreira, B.C., Mendes, F.C., Mendes, I.R., Paula, T.A., Junior, P.P., Salomao, L.C.C., Stürmer, S.L., Otoni, W.C., and Kasuya, M.C.M. 2015. The interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Piriformospora indica* improves the growth and nutrient uptake in micropropagation-derived pineapple plantlets. Scientia Horticulturae. 197: 183-192.
37. Mwangi, M.W., Monda, E.O., Okoth, S.A., and Jefwa, J.M. 2011. Inoculation of tomato seedlings with *Trichoderma harzianum* and arbuscular mycorrhizal fungi and their effect on growth and control of wilt in tomato seedlings. Brazil. J. Microbiol. 42: 2.508-513.
38. Oelmuller, R., Sherameti, I., Tripathi, S., and Varma, A. 2009. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological applications. Symbiosis. 49: 1-17.
39. O'Donnell, K., Kistler, H.C., Cigelnik, E., and Ploetz, R.C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences. 95: 5. 2044-2049.
40. Peskan-Berghoefer, T., Shahollaria, B., Giong, P.H., Hehl, S., Markerta, C., Blanke, V., Kost, G., Varma, A., and Oelmeuller, R. 2004. Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant–microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmatic reticulum and at the plasma membrane. Physiologia Plantarum. 122: 465-477.
41. Pham, G.H., Singh, A., Kumari, R., Malla, R., Prasad, R., Sachdev, M., Rexer, K.H., Kost, G., Luis, P., Kaldorf, M., Buscot, F., Herrrmann, S., Peskan, T., Oelmüller, R., Saxena, A.K., Declerck, S., Mittag, M.,

Stabentheinerv, E., Hehl, S., and Varma, A. 2004. Interactive of *Piriformospora indica* with diverse microorganisms in plants. In: Varma, A., Abbott, L., Werner, D. and Hampp, R. (eds). Plant Surface Microbiology. Springer-Verlag, Berlin, Pp: 237-265.

42. Rai, M., Acharya, D., Singh, A., and Varma, A. 2001. Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. Mycorrhiza. 11: 123-128.
43. Samuels, G.J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycological Research. 100: 923-935.
44. Shahollari, B., Vadassery, J., Varma, A., and Oelmuller, R. 2007. A leucine-rich repeat protein is required for growth promotion and enhanced seed production mediated by the endophytic fungus *Piriformospora indica* in *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 50: 1-13.
45. Shoresh, M., Harman, G.E., and Mastouri, F. 2010. Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. Annual Review of Phytopathology. 48: 21-43.
46. Sirrenberg, A., Göbel, C., Grond, S., Czempinski, N., Ratzinger, A., Karlovsky, P., Santos, P., Feussner, I., and Pawlowski, K. 2007. *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. Physiologia Plantarum. 131: 581-589.
47. Srinivasan, M., Kumar, K., Kumutha, K., and Marimuthu, P. 2014. Establishing monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* through root organ culture. J. Appl. Natur. Sci. 6: 1. 290-293.
48. Srivastava, N.H., Bhandari, V., and Bhatt, A.B. 2014. PGPR Isolated from rhizospheric soil of *Zanthoxylum armatum* DC. in Garhwal Himalaya. Inter. J. Herbal Med. 2: 1. 100-108.
49. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Molecular biology and evolution. 30: 12. 2725-2729.
50. Tannock, G.W. 1999. Identification of lactobacilli and bifidobacteria. Current Issues in Molecular Biology. 1: 1. 53-64.
51. Tsvetkov, I., Dzhambazova, T., Kondakova, V., and Batchvarova, R. 2014. Mycorrhizal fungi *Glomus* spp. and *Trichoderma* spp. in viticulture. Bulgari. J. Agric. Sci. 20: 4. 849-855.
52. Ueda, K., Seki, T., Kudo, T., Yoshida, T., and Kataoka, M. 1999. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. J. Bacteriol. 181: 1. 78-82.
53. Vadassery, J., Ritter, C., Venus, Y., Camehl, I., Varma, A., Shahollari, B., Novák, O., Strnad, M., Ludwig-Müller, J., and Oelmüller, R. 2008. The role of auxins and cytokinins in the mutualistic interaction between *Arabidopsis* and *Piriformospora indica*. Molecular Plant-Microbe Interactions. 21: 10. 1371-1383.
54. Verma, S., Varma, A., Rexer, K.H., Kost, G., Sarbhoy, A., Bisen, P., Butehorn, B., and Franken, P. 1998. *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. Mycologia. 95: 896-903.
55. White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T., and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. 18: 1. 315-322.
56. Yang, X., and Hong, C. 2018. Differential usefulness of nine commonly used genetic markers for identifying *Phytophthora* species. Frontiers in Microbiology. 9. 2334.

J. of Soil Management and Sustainable Production, Vol. 9(3), 2019
http://ejsms.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/ejsms.2020.16071.1857

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Molecular identification of some plant growth promoting microorganisms and their evaluation on growth characteristic of wheat

***F. Rejali[1], H. Kari Dolatabad[2], H. Asadi Rahmani[3] and F. Fazlikhani[4]**

[1]Associate Prof., Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran, [2]Assistant Prof., Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran, [3]Associate Prof., Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran, [4]M.Sc. Graduate, Dept. of Soil Science, Isfahan University of Technology

Received: 12.25.2018; Accepted: 09.03.2019

Abstract

Background and Objectives: Wheat is one of the most important food crops. In modern agriculture, Due to the increasing human population and the detrimental effects of chemical fertilizer such as environmental pollution and concerns about human health, adapting suitable alternatives like production of bio-fertilizers which have none of these dangerous effects would be necessary. Plant growth-promoting fungi and bacteria used in bio-fertilizers are the beneficial microorganisms that can enhance plant growth, yield and resistance to biotic and abiotic stresses directly or indirectly through a wide variety of mechanisms. Although bio-fertilizers have become more noticeable in recent years, the lack of accurate identification of microorganisms used in the production of these fertilizers is one of the problems of bio-fertilizers in Iran. Failure to accurate identification of species is due to deficiencies in morphological or biochemical methods in fungi and bacteria. Therefore, the purpose of this study was to identify of fungal and bacterial isolates molecularly and also to investigate the effect of these isolates alone and in combination with arbuscular mycorrhizal fungus on some growth characteristics of the wheat plant.

Materials and Methods: After the preparation of fungal and bacterial isolates from the Soil and Water Research Institute, which are known as plant growth promoting microorganisms, accurate identification of each isolate was performed based on morphological and molecular methods. Extraction of genomic DNA in arbuscular mycorrhizal fungus was done by single-spore method and in other bacterial and fungal isolates by CTAB method. Amplification of 16S rDNA region in bacterial isolates, *TEF-1α* and ITS1-5.8S-ITS2 regions in *Trichoderma* species, ITS1-5.8S-ITS2 region in *Serendipita indica* and SSU-ITS1-5.8S-ITS2- LSU region by nested PCR method in the arbuscular mycorrhizal fungus was performed. To investigate the effect of fungal and bacterial isolates alone or in combination with arbuscular mycorrhizal fungus in a greenhouse, their effect on wheat growth indices such as plant height, shoot and root dry weight, head height and weight and dry weights of seeds were measured.

Results: Based on the morphological and molecular investigation, three species of *Bacillus* including *Bacillus velezensis, B. pumilus,* and *B. subtilis* and three species of *Trichoderma* including *Trichoderma atroviride*, *T. longibrachiatum*, and *T. harzianum* and *S. indica* and *Rhizophagus irregularis* were identified. *T. harzianum* + *R. irregularis* and *T. longibrachiatum* showed the maximum dry weight and head weight. *T. longibrachiatum* + *R. irregularis* and *T. atroviride* showed the highest effect on plant height. Pots treated with *T. harzianum* + *R. irregularis*, *T. harzianum*, *T. atroviride* and *S. indica* + *R. irregularis* showed the highest weight of seeds compared to control plants.

* Corresponding Author; Email: frejali@yahoo.com

Conclusion: The result showed that the effect of fungal treatments such as *T. harzianum* + *R. irregularis* and *Trichoderma* spp. on growth characteristics of wheat was significant. According to the results of this study, the use of an appropriate combination of inoculants and the preparation of primary formulations for use in farm experiments is proposed to increase the availability of nutrients and improve the growth of wheat plants.

Keywords: Arbuscular mycorrhizal fungus, *Bacillus*, Plant growth promoting fungi, *Trichoderma*