فصلنامه علمی - پژوهشی تحقیقات جنگل و صنوبر ایران
جلد ۲۴ شماره ۱، صفحه ۱۲۷-۱۱۶، (۱۳۹۵)

اثر تلقیح قارچ‌های میکوریزی و باکتری *Pseudomonas fluorescens* بر رشد و زنده‌مانی گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از کشت بافت انگور فرنگی (*Ribes khorasanicum* Saghafi & Assadi)

هادی درودی[۱]، عباس صفرنژاد[۲*]، مسلم اکبری‌نیا[۳]، سیدمحسن حسینی[۴] و محمد حاجیان‌شهری[۵]

۱- دکتری جنگل‌داری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۲*- نویسنده مسئول، دانشیار پژوهشی، بخش تحقیقات منابع طبیعی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی و شعبه مشهد، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران. پست الکترونیک: Sebre14@yahoo.com

۳- دانشیار، گروه جنگل‌داری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۴- استاد، گروه جنگل‌داری، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی نور، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

۵- استادیار، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران

چکیده

یکی از گونه‌های بومی و ارزشمند خراسان رضوی، انگورفرنگی خراسانی یا قره‌قات (*Ribes khorasanicum* Saghafi & Assadi) است که در ارتفاعات رشته کوه هزارمسجد در محدوده کوچکی از شهرستان‌های درگز و کلات به‌صورت توده‌های پراکنده وجود دارد. این گونه به‌دلیل دخالت‌های انسانی، نیاز اکولوژیکی زیاد و قوه نامیه کم بذر آن، در حال از بین رفتن است. هدف از پژوهش پیش‌رو بررسی نقش میکروارگانیسم‌های همزیست در بهبود رشد و زنده‌مانی گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از کشت بافت قره‌قات بود. بدین منظور آزمایشی به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. تیمارها شامل قارچ میکوریزی (فاقد میکوریز، تلقیح گونه‌های *Rhizophagus intraradices*، *Glomus mosseae*، *Glomus mosseae + Rhizophagus intraradices* و قارچ‌های جداسازی شده از رویشگاه) و تیمار باکتری (فاقد باکتری و تلقیح باکتری *Pseudomonas fluorescens*) بودند. نتایج بررسی‌ها نشان داد که تلقیح باکتری باعث بهبود درصد زنده‌مانی، سطح تاج و تعداد برگ گیاهچه‌ها شد. همچنین تلقیح قارچ‌های میکوریزی استخراج‌شده از رویشگاه باعث بهبود درصد استقرار میکوریز در ریشه گیاهچه‌ها، درصد زنده‌مانی، ارتفاع، سطح تاج و تعداد برگ گیاهچه‌ها شد. ترکیب قارچ‌های میکوریزی *Glomus mosseae+ Rhizophagus intraradices* نیز باعث بهبود درصد زنده‌مانی نهال‌ها شد. در مجموع می‌توان گفت که تلقیح قارچ و باکتری باعث بهبود سازگاری گیاهچه‌ها به شرایط خارج شیشه شده است.

واژه‌های کلیدی: زنده‌مانی، قره‌قات، کشت بافت، میکوریز، *Pseudomonas fluorescens*.

مقدمه

گیاه انگور فرنگی خراسانی یا قره‌قات (*Ribes khorasanicum* Saghafi & Assadi) یک گونه گیاهی بسیار باارزش متعلق به تیره تک‌جنسی انگورک فرنگی (Grossulariaceae) و به فرم درختچه است که موارد استفاده مختلفی دارد (Assadi & Saghafi, 1996). گونه قره‌قات خراسانی در محدوده کوچکی از رشته کوه‌های هزارمسجد به‌صورت توده‌های پراکنده گسترش یافته است. به‌دلیل بهره‌برداری بی‌رویه از میوه آن توسط افراد بومی منطقه و چرای دام، رویشگاه‌های این گونه تخریب شده

است. از سوی دیگر بذرهای آن نیز دارای درصد قوه‌نامیه کمی است که همه این عامل‌ها بقای این گیاه را به مخاطره انداخته است. یکی از راه‌های حفظ، تکثیر و کمک به احیای رویشگاه‌های این گونه در معرض خطر، تکثیر غیرجنسی آن از طریق کشت بافت است. گیاهان ریزازدیادی‌شده به‌روش درون‌شیشه‌ای (*In vitro*) در یک شرایط استریل با رطوبت زیاد تولید می‌شوند و باید قبل از انتقال و کشت در مزرعه در شرایط رطوبتی زیاد تطابق یابند، بنابراین تطابق یا سازش، بحرانی‌ترین مرحله در تولید گیاهان به‌روش ریزازدیادی است. گیاهچه‌ها در ابتدای انتقال به شرایط محیط خارج از آزمایشگاه، در معرض شرایط تنش غیرزیستی (دمای متغیر، شدت نور و رطوبت متفاوت) و تنش‌های زیستی مانند میکروفلور خاک (قارچ‌ها و باکتری‌های مضر) قرار می‌گیرند، بنابراین نیازمند سازگاری برای استقرار و زنده ماندن گیاهچه‌ها هستند (Deb & Imchen, 2010).

امروزه گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از کشت بافت را در معرض میکروارگانیسم‌های مفید قرار می‌دهند که رشد آنها را افزایش می‌دهد و همکاری‌های دوجانبه را تقویت می‌کند (Hao *et al*., 2010). ازجمله باکتری‌های مفید در این رابطه می‌توان به برخی از گونه‌های جنس *Pseudomonas* اشاره کرد، به‌طوری‌که گزارش شده است که *Pseudomonas fluorescence* رشد گیاه را به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم از طریق تولید مواد افزاینده رشد گیاه و بهبود جذب عناصر غذایی معینی از خاک بهبود می‌بخشد. به‌علاوه، این باکتری اثرات آفت‌کشی بر برخی از میکروارگانیسم‌های مضر نشان می‌دهد (Rincon *et al*., 2005). قارچ‌های میکوریزی آربسکولار متعلق به راسته Glomales، یکی از فراوان‌ترین قارچ‌ها در خاک‌های کشاورزی هستند که قادرند با ریشه تقریباً ۹۰ درصد از گونه‌های خشکی‌زی همزیستی داشته باشند. در این همزیستی، گیاه فراورده‌های سنتزی را با آب و عناصر معدنی به‌دست‌آمده توسط قارچ از خاک مبادله می‌کند (Selosse *et al*., 2006). ازجمله مزایای میکوریز آربسکولار می‌توان به توسعه سیستم ریشه‌ای بهتر (Puthur *et al*., 1998)، افزایش کارایی فتوسنتزی (Kapoor & Bhatnagar, 2007)، افزایش ظرفیت هدایت آبی (Kapoor *et al*., 2008)، افزایش جذب عناصر غذایی (Turk *et al*., 2006)، دفع حمله میکروارگانیسم‌های مضر موجود در خاک (Elsen *et al*., 2001)، تخفیف تنش‌های محیطی (Kapoor *et al*., 2008) و بهبود ساختمان خاک (Khosrojerdi *et al*., 2013) اشاره کرد. درمورد کشت بافت گونه‌های درختی و درختچه‌ای تحقیق‌های زیادی در داخل کشور انجام شده است؛ در حالی‌که در مورد اثر همزمان قارچ‌های میکوریزی و باکتری بر رشد و زنده‌مانی گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از کشت بافت در داخل کشور، تحقیق‌های زیادی انجام نشده است. ازجمله پژوهش‌های انجام‌شده می‌توان به تحقیق Irannejad و همکاران (۲۰۱۱) در بهبود ریشه‌زایی و سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی زیتون زرد (*Olea europaea* L. cv. Zard) با استفاده از باکتری *Agrobacterrium rhizogenes* و قارچ *Trichoderma* اشاره کرد. نتایج تحقیق آنها نشان داد که تلقیح ریزقلمه‌ها با باکتری باعث القای ریشه‌زایی بیشتر و به‌میزان قابل توجهی کالوس کمتر در مقایسه با نمونه‌های شاهد شده است. تأثیر برقراری همزیستی اکتومیکوریزایی بر خصوصیات فیزیولوژیکی و رویشی ریزقلمه‌های سفید پلت (*Populus caspica*) توسط Zamani و همکاران (۲۰۱۲) بررسی شد. نتایج نشان داد که برقراری همزیستی اکتومیکوریزی بر گیاهچه‌های سفید پلت سبب افزایش ارتفاع ساقه، زی‌توده ریشه، ساقه و برگ، فتوسنتز، تعرق، هدایت روزنه‌ای و کلروفیل برگ شده است و از سوی دیگر اثرات منفی تنش خشکی را کنترل کرده است. ریزازدیادی زیتون و کاربرد میکوریز در بهبود استقرار گیاهچه‌ها نیز توسط Binet و همکاران (۲۰۰۷) بررسی شد. تلقیح اکوتیپ Laragne با قارچ میکوریزی *Glomus mossaeae* به‌طور معنی‌داری رشد و زنده‌مانی گیاه را بهبود بخشید. در پژوهشی، Panigrahi و همکاران (۲۰۱۴) به بررسی پتانسیل استفاده از میکروارگانیسم‌های همزیست در کشت بافت در بهبود تغذیه گیاهان پرداختند. نتایج نشان داد که تلقیح گیاهان با

قارچ و باکتری باعث افزایش عناصر غذایی پرمصرف و کم‌مصرف شده و تشکیل پروتئین و مقاومت گیاهان کشت‌شده را افزایش داده است. در سال‌های اخیر استفاده از این روش در حفاظت از محصولات کشاورزی و گیاهان در معرض خطر رو به افزایش است، بنابراین هدف از پژوهش پیش‌رو بررسی نقش میکروارگانیسم‌های همزیست در بهبود رشد و زنده‌مانی گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از کشت بافت قره‌قات است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور ریزازدیادی قره‌قات ابتدا به رویشگاه این گونه در ارتفاعات کوه‌های هزارمسجد در ارتفاع ۲۴۰۰ تا ۲۷۰۰ متری از سطح دریا در خراسان رضوی مراجعه شد. سپس پرآوری و ریشه‌زایی تکثیر آن با استفاده از ریزنمونه جوانه جانبی و انتهایی از طریق کشت بافت، پس از طی مراحل جوانه‌زنی انجام شد (Darroudi *et al*., 2015). پس از این‌که گیاهچه‌ها در شرایط درون‌شیشه‌ای ریشه‌دار شدند و به اندازه کافی رشد کردند (یعنی اندازه گیاهچه‌ها دو الی سه سانتی‌متر شد و ریشه‌های آنها توسعه مناسب یافت)، اقدام به خارج کردن آنها از شیشه شد. پس از خارج کردن گیاهچه‌ها از داخل شیشه محیط اطراف ریشه شسته شد. پس از شستشوی ریشه، گیاهچه‌ها به داخل گلدان‌های حاوی بستر مناسب شامل پیت‌ماس+ پرلایت با نسبت ۱:۱ که از قبل با اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه به مدت دو ساعت در فشار ۱/۲ اتمسفر استریل شده بود، منتقل شدند (Schreiner & Bethlenfalvay, 2003). قارچ‌های میکوریزی استفاده‌شده برای تلقیح گیاهچه‌ها، *Rhizophagus intraradices* و *Glomus mosseae* بودند که با توجه به مطالعات انجام‌شده درباره گونه‌های دیگر جنس قره‌قات و امکان دسترسی به آن‌ها انتخاب شدند. قارچ‌های مورد نظر از مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهیه و با روش کشت تله‌ای تکثیر شدند. مقدار مایه تلقیحی مورد استفاده باتوجه به میزان تراکم اندام‌های تلقیحی حدود ۵۰۰ الی ۶۰۰ اسپور، میسلیوم و قطعات ریشه مبتلا به همزیست برای هر گیاه بود که به‌همراه حدود ۱۵ گرم خاک در مجاورت ریشه گیاهچه در هر گلدان قرار گرفت. برای تیمار شاهد که فاقد قارچ میکوریزی بود، بدین صورت عمل شد که ابتدا مایه تلقیحی متشکل از دو نوع قارچ (نسبت وزنی ۱:۱) با اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه به مدت دو ساعت در فشار ۱/۲ اتمسفر استریل شد، سپس به مقدار ۱۵ گرم از آن در پای گیاهچه‌ها ریخته شد (Wu *et al*., 2010).

علاوه‌بر دو گونه قارچ مذکور، به‌منظور بررسی اثر قارچ‌های میکوریزی موجود در رویشگاه‌های طبیعی این گونه، ابتدا قارچ‌های میکوریزی موجود در خاک ترکیبی (خاک قسمت‌های مختلف سه رویشگاه مورد بررسی قره‌قات) با استفاده از روش الک تر استخراج شد. سپس این قارچ‌های استخراج‌شده از خاک رویشگاه‌ها ضدعفونی شدند و طی یک دوره رویشی دو ماهه در مجاورت ریشه گیاه میزبان (شبدر)، اسپورهای آنها جوان‌سازی و تکثیر شد تا برای تلقیح گیاهچه‌ها استفاده شوند. ضدعفونی سطحی اسپورهایی که از رویشگاه‌ها جمع‌آوری شده بودند، براساس روش ارایه‌شده توسط Becard و Piche (۱۹۹۲) انجام شد. بدین‌صورت که ابتدا اسپورهای قارچ میکوریزی آربسکولار شامل *G. mosseae*، *G. geosporum*، *G. fasciculatum*، *G. constrictum*، *G.* sp.، *Acaulospora bireticulata*، *Acaulospora leavis*، *Gigaspora* sp. در محلول Tween20 ۰/۰۵ درصد به‌مدت یک دقیقه شستشو شدند. سپس برای دو دوره ۱۰ دقیقه‌ای در محلول دو درصد کلرامین T هم زده شدند و دوباره در ترکیبی از مواد ضدباکتری شامل استرپتومایسین (۲۰۰میلی‌گرم در لیتر) و جنتامایسین (۱۰۰میلی‌گرم در لیتر) چهار مرتبه و هر بار به‌مدت یک دقیقه غوطه‌ور شدند. سپس اسپورها به‌وسیله آب مقطر استریل‌شده چند بار شسته شدند تا اثرات مواد ضدعفونی‌کننده شسته شود. اسپورهای ضدعفونی‌شده برای تلقیح به گیاه میزبان استفاده شدند (Rai, Kapoor *et al*., 2008; Yasmeen *et al*., 2012; 2001). پس از طی حدود دو ماه، قسمت‌های هوایی گیاه میزبان حذف شد و خاک و قسمت‌های زیرزمینی که حاوی

اسپورهای جوان و دارای قوه نامیه بهتر بودند، برای تلقیح استفاده شدند. ۵۰۰ تا ۶۰۰ اسپور و اندام قارچی مربوط به گونه‌های جداسازی‌شده از رویشگاه که تقریباً همراه با ۱۵ تا ۲۰ گرم خاک بود، برای تلقیح به پای گیاهچه‌ها افزوده شد.

باکتری استفاده‌شده برای تلقیح، *Pseudomonas fluorescens* بود که از باکتری‌های افزاینده رشد است. باکتری مورد مطالعه به‌صورت مایع از مؤسسه تحقیقات خاک و آب تهیه شد. غلظت باکتری مورد استفاده برای تلقیح ۱×۱۰^{۸} باکتری در هر میلی‌لیتر بود. تلقیح گیاهچه‌ها با باکتری به روش خیساندن خاک (Gosal *et al.*, 2010) بود که به‌صورت ۲ml محلول‌پاشی به گیاهچه‌ها بلافاصله پس از کشت آنها انجام شد. به‌علت کاهش تعداد باکتری با گذشت زمان، محلول‌پاشی هر چهار هفته یک‌بار انجام شد (Gosal *et al.*, 2010).

طرح آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در غالب طرح کامل تصادفی انجام شد. تیمارها شامل قارچ میکوریزی (فاقد میکوریز، *R. intraradices*، *G. mosseae*، *G. mosseae* + *R. intraradices* و قارچ‌های جداسازی‌شده از رویشگاه) و تیمار باکتری (فاقد باکتری و تلقیح باکتری *P. fluorescens*) بودند که برای هر یک از ترکیب تیمارها، سه تکرار درنظر گرفته شد و در هر تکرار ۱۰ عدد نهال کشت شد. بستر مورد استفاده شامل پیت‌ماس+ پرلایت با نسبت ۱:۱ بود که قبل از استفاده ابتدا با اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه به‌مدت دو ساعت در فشار ۱/۲ اتمسفر استریل شده بودند (Schreiner & Bethlenfalvay, 2003). رنگ‌آمیزی ریشه‌ها برای بررسی همزیستی از روش Phillips و Hayman (۱۹۷۰) و با استفاده از معرف رنگی لاکتوفنل کاتن‌بلو انجام شد (Phillips & Hayman, 1970). تعیین درصد استقرار میکوریز براساس روش Giovannetti و Mosse (۱۹۸۰) با استفاده از میکروسکوپ محاسبه و مشخص شد (Giovannetti & Mosse, 1980).

تجزیه و تحلیل داده‌ها در نرم‌افزار $SPSS_{15}$ انجام شد. برای فاکتورهای کمی مانند سطح تاج پس از تعیین نرمال بودن داده‌ها با آزمون کولموگروف- سمیرنوف و همگنی با آزمون لیون، برای مقایسات کلی از آزمون تجزیه واریانس دوطرفه و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. داده‌های زنده‌مانی که به‌صورت درصد بیان می‌شوند، ابتدا با استفاده از فرمول$\text{Arcsin}\sqrt{x}$ تبدیل شده و سپس تجزیه و تحلیل‌های آنها انجام شد. فاکتورهای مورد بررسی شامل درصد زنده‌مانی، رشد ارتفاعی، سطح تاج و تعداد برگ گیاهچه‌ها بودند که زنده‌مانی به درصد، ارتفاع به سانتی‌متر و سطح تاج به سانتی‌متر مربع تعیین شد.

نتایج

درصد کلونیزاسیون ریشه گیاهچه‌ها توسط قارچ‌های تلقیح‌شده

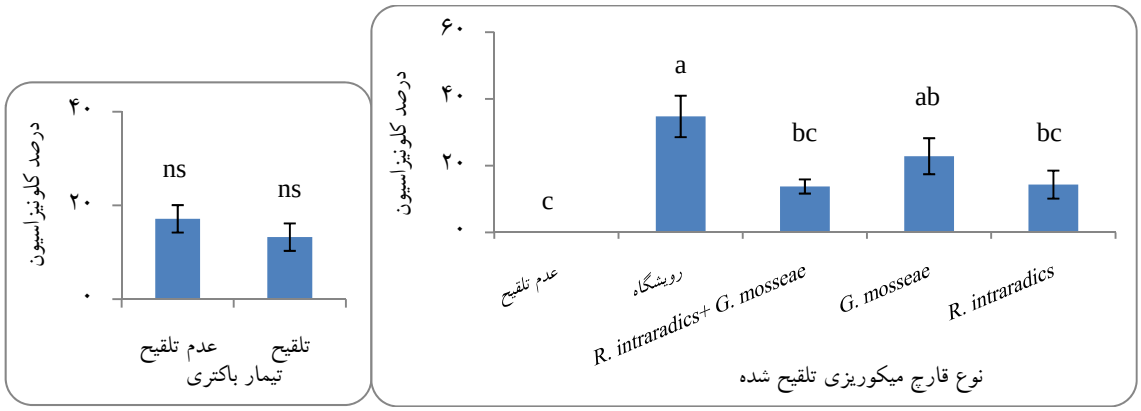
بررسی درصد کلونیزاسیون ریشه توسط اندام‌های قارچی نشان داد که تنها تلقیح قارچ میکوریزی باعث ایجاد اثر معنی‌داری در میزان استقرار در ریشه گیاهچه‌ها شد، اما تلقیح باکتری *P. fluorescens* و اثر متقابل تلقیح توأم قارچ و باکتری، تأثیری بر کلونیزاسیون ریشه گیاهچه نداشت (جدول ۱).

نتایج مقایسه میانگین درصد کلونیزاسیون ریشه تحت تأثیر قارچ‌های میکوریزی مشخص کرد که قارچ‌های جمع‌آوری‌شده از رویشگاه بیشترین میزان کلونیزاسیون ریشه گیاهچه‌ها را به خود اختصاص دادند (شکل ۱). تلقیح توأم قارچ میکوریزی و باکتری تفاوت معنی‌داری را در میزان استقرار میکوریز در ریشه گیاهچه‌ها ایجاد نکرد، با این حال بیشترین میزان استقرار میکوریز مربوط به ترکیب تیمار قارچ‌های جمع‌آوری‌شده از رویشگاه و عدم تلقیح باکتری بود (جدول ۲).

جدول ۱- بررسی آزمون تجزیه واریانس فاکتورهای مورد بررسی گیاهچه‌ها تحت تأثیر تیمارهای مختلف

فاکتور مورد بررسی	منبع تغییرات	مجموع مربعات	df	میانگین مربعات	معنی‌داری
درصد کلونیزاسیون ریشه گیاهچه‌ها	باکتری	۱۱۴/۴۲	۱	۱۱۴/۴۲	۰/۳۵۷ ns
	نوع قارچ میکوریزی	۲۸۱۴/۲۲۵	۴	۷۰۳/۵۵۶	۰/۰۰۱ **
	نوع قارچ× باکتری	۳۹۸/۳۴۴	۴	۹۹/۵۸۶	۰/۵۵۵ ns
درصد زنده‌مانی	باکتری	۰/۰۸۹	۱	۰/۰۸۹	۰/۰۴ *
	نوع قارچ میکوریزی	۰/۵۴۸	۴	۰/۱۳۷	۰/۰۰۱ **
	نوع قارچ× باکتری	۰/۰۷	۴	۰/۰۱۸	۰/۴۵۹ ns
ارتفاع نهال	باکتری	۱۸/۹۹۶	۱	۱/۰۵۸	۰/۳۰۵ ns
	نوع قارچ میکوریزی	۳۴۶/۸۳	۴	۸۶/۷۰۸	۰/۰۰۱ **
	نوع قارچ× باکتری	۲۲۷/۷۶۱	۴	۵۶/۹۴	۰/۰۱۶ *
سطح تاج نهال	باکتری	۶۴/۳۱۷	۱	۶۴/۳۱۷	۰/۰۰۱ **
	نوع قارچ میکوریزی	۵۶/۵۰۹	۴	۱۴/۱۲۷	۰/۰۳ *
	نوع قارچ× باکتری	۵/۱۷۳	۴	۱/۲۹۳	۰/۹۰۷ ns
تعداد برگ	باکتری	۵/۸۲۳	۱	۵/۸۲۳	۰/۰۴۸ *
	نوع قارچ میکوریزی	۲۳/۱۲۸	۴	۵/۷۸۲	۰/۰۰۴ **
	نوع قارچ× باکتری	۳/۴۴۵	۴	۰/۸۶۱	۰/۶۷۱ ns

** معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۹ درصد؛ * معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد؛ ns غیرمعنی‌دار



شکل ۱- درصد کلونیزاسیون ریشه توسط قارچ‌های میکوریزی تحت تأثیر نوع قارچ تلقیحی و باکتری (اشتباه معیار نیز نشان داده شده است)

درصد زنده‌مانی

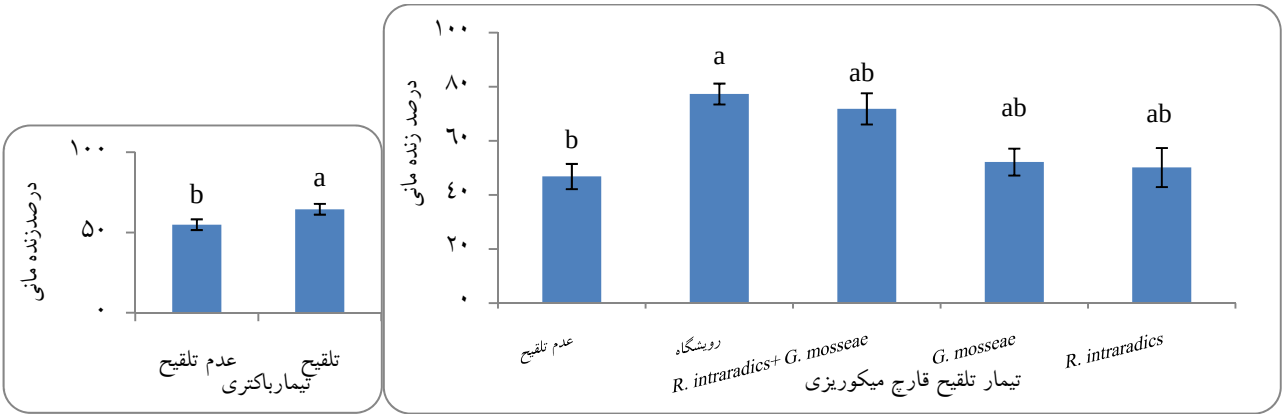
آزمون تجزیه واریانس زنده‌مانی نهال‌ها نشان داد که تلقیح باکتری و قارچ میکوریز باعث بهبود درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها شد، اما تلقیح توأم قارچ میکوریزی و باکتری‌های همزیست تأثیر معنی‌داری بر درصد زنده‌مانی نهال‌ها نداشت (جدول ۱). مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی نهال‌ها تحت تأثیر تیمار تلقیح باکتری نشان داد که تلقیح باکتری باعث بهبود زنده‌مانی نهال‌ها با متوسط درصد زنده‌مانی ۶۴/۵ درصد در مقایسه با نهال‌هایی که تلقیح باکتری در آنها انجام نشده با متوسط زنده‌مانی ۵۵ درصد، شد (شکل ۲). مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی نهال‌ها تحت تأثیر تیمار تلقیح قارچ میکوریزی نشان داد که تلقیح

قارچ‌های میکوریزی جداسازی‌شده از رویشگاه با درصد زنده‌مانی ۷۷/۵ درصد و ترکیب تیمار *R. intraradics* همراه با *G. mosseae* با ۷۱ درصد بیشترین زنده‌مانی را به‌خود اختصاص دادند (شکل ۲). نتایج آزمون تجزیه واریانس ترکیب تیمار تلقیح توأم قارچ و باکتری نشان داد که بین آنها تفاوت معنی‌داری ازنظر درصد زنده‌مانی وجود نداشت (جدول ۲).

جدول ۲- مقایسه میانگین ارتفاع گیاهچه‌ها تحت تأثیر اثر متقابل تلقیح قارچ و باکتری (اشتباه معیار نیز نشان داده شده است)

ترکیب تیمار	درصد کلونیزاسیون ریشه	درصد زنده‌مانی	ارتفاع نهال (cm)	سطح تاج نهال (cm^2)	تعداد برگ
قارچ‌های رویشگاه	۳۴/۸±۶/۳ ns	۷۱ ±۷/۵ ns	۱۱/۷۴ ±۱/۰۳ b	۳۰/۱ ±۶/۶ ns	۱۲/۴۱ ±۲/۰۲ ns
فاقد قارچ و باکتری	۰	۴۳/۳۳ ±۷/۵ ns	۱۰/۳۱ ±۱/۲۲ bc	۱۸ ±۷/۹ ns	۷/۷۵ ±۲/۴۱ ns
R. intraradics	۱۴/۳ ±۴/۲ ns	۵۰ ±۷/۵ ns	۱۱/۷۳ ±۱/۱ b	۲۱/۷ ±۷ ns	۸/۷ ±۲/۱۶ ns
G. mosseae	۲۲/۹±۵/۴ ns	۵۰ ±۷/۵ ns	۱۱/۶۸ ±۱/۱ b	۲۷/۸ ±۷ ns	۱۰/۳ ±۲/۱۶ ns
R. intraradics + G. mosseae	۱۳/۸±۲/۱ ns	۶۰ ±۷/۵ ns	۱۲/۹۲ ±۱ ab	۲۶ ±۶/۴ ns	۱۰/۴ ±۱/۹۷ ns
قارچ‌های رویشگاه + *P. fluorescens*	۱۹/۵±۱/۷ ns	۸۳/۶۶ ±۷/۵ ns	۱۵/۵۱ ±۰/۹۵ a	۵۴/۳ ±۶/۱ ns	۱۷/۹ ±۱/۹ ns
Pseudomonas fluorescens	۰	۵۰/۳۳ ±۷/۵ ns	۷/۴۸ ±۱/۲۲ c	۲۶/۹ ±۷/۹ ns	۷/۷۵ ±۲/۴ ns
P. fluorescens + R. intraradics	۴/۹ ±۰/۸ ns	۵۰/۳۳ ±۷/۵ ns	۱۰/۴۳ ±۱/۲۲ bc	۳۸/۵ ±۷/۹ ns	۱۲/۴ ±۲/۴ ns
P. fluorescens + G. mosseae	۲۳/۴±۴/۵ ns	۵۴/۳۳ ±۷/۵ ns	۱۰/۳۹ ±۱/۱۸ bc	۴۸ ±۷/۵ ns	۱۳/۷ ±۲/۳۲ ns
R. intraradics + P. fluorescens + G. mosseae	۱۸/۳±۲/۷ ns	۸۳/۶۶ ±۷/۵ ns	۱۱ ±۰/۹۵ b	۴۵/۵ ±۶/۱ ns	۱۵/۸ ±۱/۸۷ ns

ns غیرمعنی‌دار. حروف انگلیسی متفاوت، اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد را نشان می‌دهد.

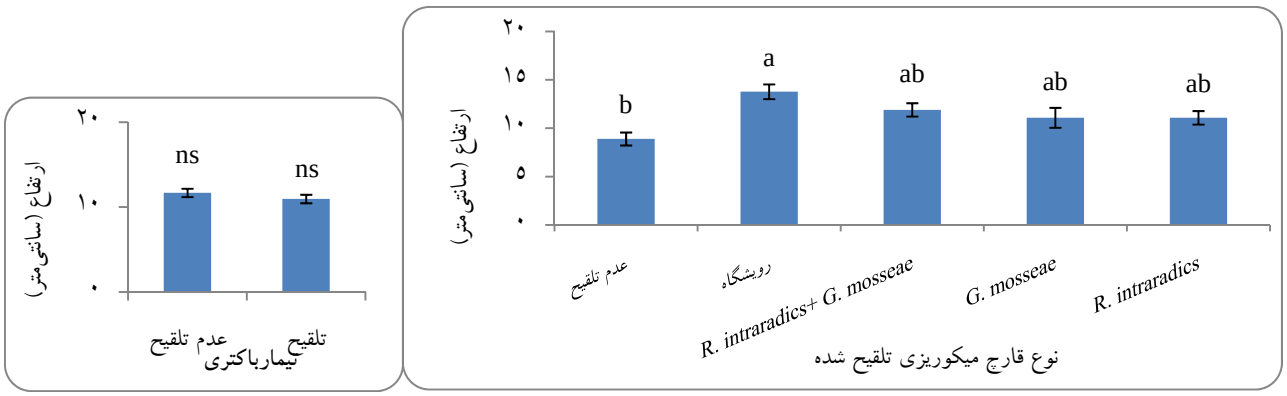


شکل ۲- مقایسه میانگین درصد زنده‌مانی گیاهچه‌ها تحت تأثیر تیمارهای مختلف (اشتباه معیار نیز نشان داده شده است)

رشد ارتفاعی

نتایج آزمون تجزیه واریانس نشان داد که از بین تیمارهای مورد بررسی، نوع قارچ میکوریزی و اثر متقابل با باکتری تأثیر معنی‌داری بر رشد ارتفاعی گیاهچه‌های قره‌قات داشتند، اما تلقیح باکتری *P. fluorescens* تأثیر معنی‌داری بر رشد ارتفاعی گیاهچه‌ها نداشت (جدول ۱). مقایسه میانگین ارتفاع گیاهچه‌ها نشان داد که بین انواع قارچ‌های میکوریزی تلقیح‌شده، تفاوت معنی‌داری وجود داشته و بیشترین میزان مربوط به تیمار تلقیح قارچ‌های

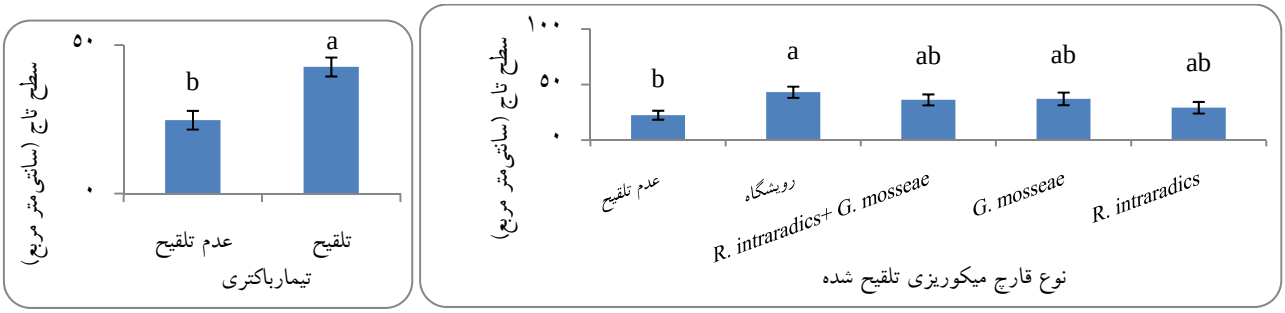
استخراج‌شده از رویشگاه با میانگین ارتفاع ۱۳/۶ سانتی‌متر بود (شکل ۳). مقایسه میانگین‌های اثر متقابل نوع قارچ میکوریزی و تلقیح باکتری نیز نشان داد که بیشترین رشد ارتفاعی مربوط به ترکیب تیمار قارچ میکوریزی جداسازی‌شده از رویشگاه همراه با تلقیح باکتری با میانگین ارتفاع ۱۵/۵۱ سانتی‌متر بود و کمترین مقادیر مربوط به تلقیح باکتری به‌تنهایی با میانگین ارتفاع ۷/۵ سانتی‌متر بود (جدول ۲).



شکل ۳- مقایسه میانگین ارتفاع گیاهچه‌ها تحت تأثیر تیمارهای مختلف (اشتباه معیار نیز نشان داده شده است)

سطح تاج پوشش گیاهچه‌ها

نتایج نشان داد که از بین فاکتورهای مورد بررسی تلقیح باکتری و نوع قارچ میکوریزی تأثیر معنی‌داری بر سطح تاج گیاهچه‌ها داشت، اما اثر متقابل این دو عامل بر سطح تاج گیاهچه‌ها معنی‌دار نبود (جدول ۱). مقایسه میانگین سطح تاج گیاهچه‌ها نشان داد که تلقیح باکتری باعث بهبود سطح تاج نهال‌ها شد. بستر تلقیح‌شده با باکتری با میانگین سطح تاج ۴۲/۶ سانتی‌متر مربع بیشترین میزان را به خود اختصاص داد (شکل ۴). مقایسه میانگین سطح تاج نهال‌ها نشان داد که بیشترین میزان سطح تاج نهال‌ها مربوط به تیمار تلقیح قارچ‌های جمع‌آوری‌شده از رویشگاه با میانگین سطح تاج ۴۲/۲ سانتی‌متر مربع بود (شکل ۴).

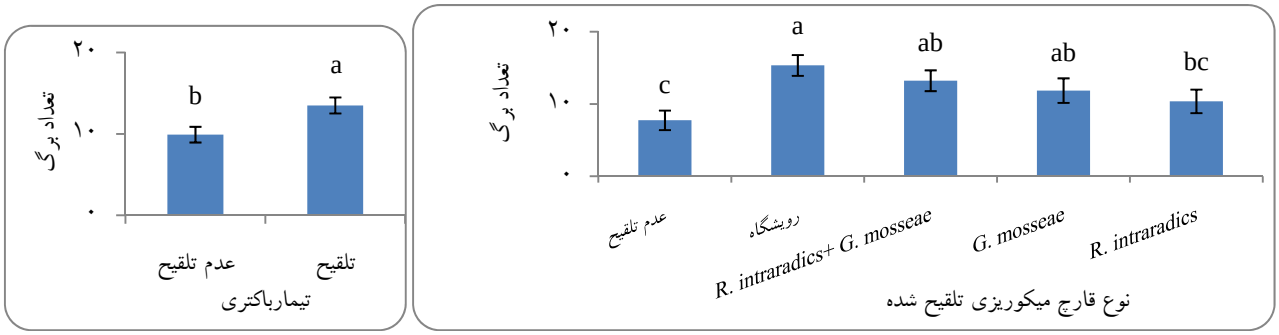


شکل ۴- مقایسه میانگین سطح تاج گیاهچه‌ها تحت تأثیر تیمارهای مختلف (اشتباه معیار نیز نشان داده شده است)

تعداد برگ

نتایج آزمون تجزیه واریانس تعداد برگ گیاهچه‌ها نشان داد که تلقیح باکتری و قارچ تأثیر معنی‌داری بر تعداد برگ گیاهچه‌ها داشت، اما اثر متقابل قارچ و باکتری تأثیر معنی‌داری بر تعداد برگ گیاهچه‌ها نداشت (جدول ۱). مقایسه میانگین تعداد برگ گیاهچه‌ها نشان داد که بیشترین تعداد برگ با ۱۳/۵ عدد برگ در گیاهچه‌های تلقیح‌شده با باکتری به‌دست آمد. میانگین تعداد برگ در گیاهچه‌های فاقد

باکتری ۹/۹ برگ بود (شکل ۵). مقایسه میانگین تعداد برگ گیاهچه‌ها در تلقیح قارچ‌های مختلف به گیاهچه‌ها نشان داد که بیشترین برگ در تیمار تلقیح قارچ‌های رویشگاه با میانگین ۱۵/۱۳ عدد برگ در هر گیاهچه به‌دست آمد (شکل ۵).



شکل ۵- مقایسه میانگین تعداد برگ گیاهچه‌ها تحت تأثیر تیمارهای مختلف (اشتباه معیار نیز نشان داده شده است)

بحث

نتایج پژوهش پیش‌رو نشان داد که تیمار تلقیح قارچ‌های میکوریزی جداسازی‌شده از رویشگاه دارای بیشترین میزان کلونیزاسیون در بین تیمارهای مختلف بود. به‌نظر می‌رسد علت آن تنوع بیشتر قارچ‌های میکوریزی در این تیمار، عملکردهای متفاوت آنها و سازگاری بیشتر گیاهچه‌های قره‌قات با تعداد بیشتری از قارچ‌های میکوریزی جداسازی‌شده از رویشگاه باشد که باعث شد میزان کلونیزاسیون بیشتری انجام گیرد. تشکیل همزیستی میکوریزایی برای اصلاح تغذیه عناصری که مقدار آنها در خاک کم است یا دارای تحرک کمی هستند (به‌خصوص فسفر) ایجاد می‌شود. هر عاملی که این کمبود را تشدید کند، منجر به افزایش میزان میکوریزایی خواهد شد. از جمله این عامل‌ها می‌توان به تنش خشکی و رقابت اشاره کرد. تشکیل میکوریزا به گونه قارچ و گیاه میزبان نیز مرتبط است. گیاه میزبان با توجه به میزان و نوع ترشحات، نیاز به عناصرغذایی، میزان سازگاری و تخصیص مواد فتوسنتزی به جزء قارچی، متفاوت عمل می‌کند که برخی از ویژگی‌ها به خصوصیات وراثتی گیاه میزبان و قارچ همزیست ارتباط دارد (Jahani *et al.*, 2009).

همانند نتایج پژوهش پیش‌رو، در مطالعه انجام‌شده توسط Giri و همکاران (۲۰۰۴) استقرار قارچ‌های میکوریزی در ریشه و تولید اسپور در خاک اطراف گیاه با تلقیح توأم هر دو قارچ به‌طور معنی‌داری تغییر کرد. میزان میکوریزی شدن و تولید اسپور در تلقیح دوتایی در مقایسه با هر یک از قارچ‌ها به‌تنهایی، بیشتر بود. استقرار بیشتر در ریشه‌های گیاه میزبان و کارآمدی بیشتر تلقیح توأم دو قارچ اشاره بر این دارد که هر دو قارچ بر یکدیگر درخصوص استقرار بهتر و عملکرد مناسب‌تر اثر می‌گذارند.

نتایج تجزیه و تحلیل‌ها نشان داد که تلقیح قارچ‌های میکوریزی جداسازی‌شده از رویشگاه و همچنین ترکیب قارچ‌های میکوریزی *R. intraradics* + *G. mosseae* باعث افزایش معنی‌داری در زنده‌مانی گیاهچه‌ها شده است. علت میزان موفقیت تلقیح دو یا چند نوع قارچ میکوریزی در مقایسه با یک نوع قارچ را می‌توان تنوع عملکردی بیشتر قارچ‌های میکوریزی در زمان تلقیح بیش از یک نوع قارچ میکوریزی بیان کرد. در همین رابطه، این نکته که قارچ‌های میکوریزی ازنظر عملکرد تفاوت دارند و گیاهان در واکنش با قارچ‌های میکوریزی تفاوت دارند، اشاره بر این دارد که سیستم‌های با غنای قارچ میکوریزی بیشتر دارای مزیت بیشتری هستند. تعداد گونه قارچ‌های

میکوریزی بیشتر به معنی عملکردهای بیشتری است که برای توسعه روابط سودمند است (Sharma *et al*., 2008).

تجزیه و تحلیل‌ها مشخص کرد که ترکیب تیمار قارچ‌های میکوریزی جداسازی‌شده از رویشگاه به تنهایی و همراه با باکتری سودوموناس و همچنین *R. intraradics* + *G. mosseae* همراه با باکتری*P. fluorescens* از رشد ارتفاعی بیشتری برخوردار بود که نشان‌دهنده اثرات هم‌افزاینده قارچ و باکتری بر رشد گیاه است. دلیل آن را می‌توان اثرات تسهیل‌کننده قارچ میکوریزی در بهبود کلونیزاسیون ریشه گیاه توسط باکتری و اثرات افزاینده باکتری در بهبود کلونیزاسیون ریشه گیاه توسط قارچ‌های میکوریزی و همچنین تنوع عملکردی قارچ‌های میکوریزی به‌دلیل تلقیح بیشتر از یک نوع قارچ میکوریزی ذکر کرد که باعث شده که جذب آب و موادغذایی به‌طور مؤثرتری انجام گیرد. همچنین با ترشح مواد ثانویه مانند اکسین باعث بهبود رشد ریشه و انشعابات آن و همچنین رشد ارتفاعی گیاه شده‌اند. در این رابطه می‌توان به تحقیق Siviero و همکاران (۲۰۰۸) بر گیاهی از خانواده بقولات (*Schizolobium amazonicum*) اشاره کرد. نتایج تحقیق آنها نشان داد که زمانی که گیاهان با قارچ‌های میکوریزی تلقیح شدند، نسبت به موقعی که با باکتری تثبیت‌کننده نیتروژن تلقیح شدند، رشد بهتری داشتند. در مورد تلقیح توأم هر دو، نتایج مشابهی مشاهده شد و رشد گیاه بهبود پیدا کرد.

تلقیح باکتری *P. fluorescens* باعث افزایش معنی‌دار درصد تاج‌پوشش گیاهچه‌ها در مقایسه با شاهد شد که به‌نظر می‌رسد به‌دلیل بهبود جذب عناصر غذایی با تحریک ریشه‌زایی و انشعابات بیشتر ریشه در اثر تلقیح باکتری و بهبود جذب برخی عناصر غذایی باشد. نتایج همچنین نشان داد که تلقیح قارچ‌های میکوریزی جداسازی‌شده از رویشگاه باعث بیشترین رشد تاجی در گیاهچه‌های قره‌قات شد. قارچ‌های میکوریزی با نقش مثبت خود در بهبود جذب عناصر غذایی و رطوبت خاک به گیاه، در تأمین نیازها و مقابله با تنش‌های محیطی کمک می‌کنند. به‌نظر می‌رسد که عملکرد مناسب‌تر قارچ‌های جداسازی‌شده از رویشگاه به‌علت تعداد گونه‌های بیشتر آنها و سازگاری بهتر آنها در همزیستی با گیاه باشد. زیرا این قارچ‌ها از رویشگاه‌های قره‌قات جمع‌آوری شدند و استقرار بهتر و مؤثرتری در ریشه گیاه داشته و بهتر توانستند گیاه را در مقابله با تنش‌های محیطی حمایت کنند. در مورد عملکرد متفاوت گیاه و قارچ و باکتری همزیست می‌توان گفت که واکنش نسبت به تلقیح قارچ و باکتری، به محیط کشت، گیاه و گونه قارچ میکوریزی بستگی دارد و میزان میکوریزی شدن ریشه‌ها به‌وسیله قارچ‌ها متغیر است (Vestberg *et al*., 2005).

تجزیه و تحلیل‌ها بیان‌گر افزایش تعداد برگ گیاهچه‌ها با تلقیح باکتری *P. fluorescens* به گیاهچه‌ها بود که به‌نظر می‌رسد باکتری با اثرات مثبتی که بر گیاه داشته باعث رشد بیشتر گیاه و در نتیجه باعث ایجاد تعداد برگ بیشتر شد. تلقیح قارچ‌های جداسازی‌شده از رویشگاه به گیاهچه‌ها باعث افزایش معنی‌دار تعداد برگ گیاهچه‌ها شد که به‌دلیل رشد بیشتر گیاهچه‌ها (با توجه به اثرات مثبت قارچ‌های میکوریزی بر جذب عناصر غذایی و آب و تسهیل سازگاری گیاه نسبت به شرایط خارج از آزمایشگاه) و در نتیجه نیاز بیشتر به فراورده‌های فتوسنتزی و درنهایت تعداد برگ بیشتر بود.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش پیش‌رو می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تلقیح قارچ میکوریزی و باکتری *P. fluorescens* باعث بهبود سازگاری و افزایش رشد گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از کشت بافت قره‌قات خراسانی شده است، بنابراین می‌توان از این میکروارگانیسم‌ها برای بهبود درصد زنده‌مانی و کاهش دوره سازگاری گیاهچه‌های به‌دست‌آمده از کشت بافت استفاده کرد. به‌علاوه با توجه به نتایج مناسب‌تر قارچ‌های میکوریز جداسازی‌شده از رویشگاه، بهتر است برای هر گونه سعی شود که از گونه‌های موجود در رویشگاه آن استفاده شود. تلقیح توأم چند گونه قارچ میکوریزی و تلقیح توأم قارچ و باکتری نیز باعث بهبود وضعیت گیاهچه‌ها شد.

required for flavonoid accumulation in suspension cells of *Ginkgo biloba*. Biotechnology Letters, 32: 305-314.
- Irannejad, A., Vatan pour, A., Rahnama, H., Jalyani, N. and BozorgPour, R., 2011. Improvement of rooting and acclimization of tissue cultured plantlets of Olive (*Olea europaea* L. cv. Zard) by *Agrobacterium rhizogenes* and *Trichoderma harzianum*. Seed and Plant Production Journal, 26 (2): 85-93 (In Persian).
- Jahani, M., Daghighi, S., Daghighi, M. and Nakhaie, A., 2009. Identification of mycorrhiza in Jujube tree (*ziziphus jujuba* mill) and the effect of the age of the tree on the quantity of mycorrhiza. Journal of Plant Production, 16(1): 75- 86 (In Persian).
- Kapoor, R. and Bhatnagar, A.K., 2007. Attenuation of cadmium toxicity in mycorrhizal Celery (*Apium graveolens* L.). World Journal of Microbiology and Biotechnology, 20: 1083-1089.
- Kapoor, R., Sharma, D. and Bhatnagor, A.K., 2008. Arbuscular mycorrhizae in micropropagation systems and their potential applications. Scientia Horticulture, 116: 227-239.
- Khosrojerdi, M., Shahsavni, S., Gholipour., M. and Asghari, H., 2013. Effect of rhizobium and mycorrhizal fungi inculation on some nutrient uptake by chickpea at different levels of iron sulfate fertilizer. Crop Production, 6(3): 215-243 (In Persian).
- Panigrahi, S., Lakshmi, K.A., Umesh, N. and Khan, W.A., 2014. Enhanced growth in the clonal propagated plants. Helix, 4: 568 -573.
- Phillips, J.M. and Hayman, J.M., 1970. Improved procedures for clearing roots by staining parasitic and vesicular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. British Mycological Society, 55: 158-160.
- Puthur, J.S., Prasad, K.V.S.K., Sharmila, P. and Pardha Saradhi, P., 1998. Vesicular arbuscular mycorrhizal fungi improves establishment of micropropagated *Leucaena leucocephala* plantlets. Plant Cell Tissue Organ Culture, 53: 41-47.
- Rai, M.K., 2001. Current advances in mycorrhization in micropropagation. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 37: 158-167.

References

- Assadi, M. and Saghafi, F., 1996. *Ribes khorasanicum* Grossulariaceae, a new species from NE Iran. The Iranian Journal of Botany, 7(1): 7-10 (In Persian).
- Becard, G. and Piche, Y., 1992. Establishment of vesicular Arbuscular mycorrhiza in root organ culture: review and proposed methodology: 89-108. In: Norris, J.R., Read, D.J. and Varma, A.K., (Eds.). Methods in Microbiology. Academic Press, London.
- Binet, M.N., Lemoine, M.C., Martin, C., Chambon, C. and Gianinazzi, S., 2007. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 43:473-478.
- Darroudi, H., Akbarinia, M., Safarnejad, A., Hosseini, S.M. and HajianShahri, M., 2015. Micropropagation of *Ribes khorasanicum* species by tissue culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research, 23(1): 65-76.
- Deb, C.R. and Imchen, T., 2010. An efficient *in vitro* hardening of tissue culture raised plants. Biotechnology, 9: 79-83.
- Elsen, A., Declerck, S. and De Waele, D., 2001. Effects of *Glomus intraradices* on the reproduction of burrowing nematode (*Radopholus similis*) in dixenic culture. Mycorrhiza, 11: 49-51.
- Giovannetti, M. and Mosse, B., 1980. An evaluation of techniques to measure vesicular arbuscular infection in roots. New Phytol, 84: 489-500.
- Giri, B., Kapoor, R., Agarwal, L. and Mukerji, K.G., 2004. Preinoculation with Arbuscular mycorrhizae helps *Acacia auriculiformis* grow in degraded Indian wasteland soil. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 35(1-2): 193-204.
- Gosal, S.K., Karlupia, A., Gosal, S.S., Chhibba, I.M. and Varma, A., 2010. Bitization with *Piriformospora indica* and *Pseudomonas fluorescens* improves survival rate nutrient acquisition field performance and saponin content of micropropagated *Chlorophytum sp*. Indian Journal of Biotechnology, 9: 289-297.
- Hao, G., Du, X., Zhao, F. and Ji, H., 2010. Fungal endophytes-inducedabscisic acid is

- Rincon, A., Ruiz-Diez, B., Garcia-Fraile, S., Garcia, J.A.L., Fernandez-Pascual, M., Pueyo, J.J. and de Felipe, M.R., 2005. Colonisation of *Pinus halepansis* roots by *Pseudomonas fluorescens* and interaction with the ectomycorrhizal fungus *Suillus granulatus*. FEMS Microbiology Ecology, 51: 303-311.
- Schreiner, R.P. and Bethlenfalvay, G.J., 2003. Crop residue and Collembola interact to determine the growth of mycorrhizal pea plants. Biology and Fertility of Soils, 39:1-8.
- Selosse, M.A., Richard, F., He, X.H. and Simard, S.W., 2006. Mycorrhizal networks: des liaisons dangereuses?. Trends in Ecology and Evolution, 21: 621-628.
- Sharma, D., Kapoor, R. and Bhatnagar, A.K., 2008. Arbuscular mycorrhizal(AM) technology for the conservation of *Curculigo orchioides* Gaertn: an endangered medicinal herb. World Journal Microbiology and Biotechnology, 24: 395-400.
- Siviero, M.A., Motta, A.M., Lima, D.D.S., Birolli, R.R., Yun Huh, S., Santinoni, I.A., Murate, L.S., De Castro, C.M.A., Miyauchi, M.Y.H., Zangaro, W., Nogueira, M.A. and Andrade, G., 2008. Interaction among N-fixing bacteria and AM fungi in Amazonian legume tree (*Schizolobium amazonicum*) in field conditions. Applied Soil Ecology, 39(2): 144-152.
- Turk, M.A., Assaf, T.A., Hameed, K. and Al-Tawaha, M., 2006. Significance of mycorrhizae. World Journal of Agricultural Sciences, 2: 16-20.
- Vestberg, M., Saari, K., Kukkonen, S. and Hurme, T., 2005. Mycotrophy of crops in rotation and soil amendment with peat influence the abundance and effectiveness of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi in field soil. Mycorrhiza, 15:447-458.
- Wu, Q.S., Zou, Y.N. and He, X.H., 2010. Contributions of arbuscular mycorrhizal fungi to growth, photosynthesis, root morphology and ionic balance of citrus seedlings under salt stress. Acta Physiologiae Plantarum, 32:297-304.
- Yasmeen, T., Hameed, S., Tariq, M. and Ali, S., 2012. Significance of arbuscular mycorrhizal and Bacterial symbionts in tripartite association with *Vigna radiata*. Acta Physiologiae Plantarum, 34(4): 1-10.
- Zamani, S.M., Mohmmadi Gol Tapeh, A., Safayee, N., Emam, M., Bojari, J. and Farsi, M.J., 2012. The effect of ectomycorrhizal establishment on physiological and growth characteristics of *Populus caspica* Bornm. Iranian Journal of forest and range protection research, 10(1): 19-32 (In Persian).

Effects of mycorrhizal fungi and *Pseudomonas fluorescens* Bacteria on the growth and survival of *Ribes khorasanicum* Saghafi & Assadi tissue culture plantlets

H. Darroudi[1], A. Safarnejad[2*], M. Akbarinia[3], S.M. Hosseini[4] and M. Hajian Shahri[5]

1- Ph.D. Student, Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
2-* Corresponding author, Associate Prof., Research Division of Natural Resources, Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center and Mashhad Branch, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran. Email: Sebre14@yahoo.com
3- Associate Prof., Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
4- Prof., Department of Forestry, Faculty of Natural Resources and Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran
5- Assistant Prof., Plant Protection Research Department, Razavi Khorasan Agricultural and Natural Resources Research Center, AREEO, Mashhad, Iran

Abstract

Ribes khorasanicum Saghafi & Assadi is considered as one of the valuable medicinal native species of Razavi Khorasan province that is distributed across high-altitudes of Hezar Masjed Mountains in a small range of Dargaz and Kalat cities as scattered patches. Because of human interference, high ecological requirements and low seeds germination this species is currently endangered and as even considered to be prone to extinction. The aim of this study was to investigate the role of symbiotic microorganisms in the growth and survival of plantlets produced by tissue culture techniques. For this purpose a factorial experiment was conducted in a completely randomized design. Mycorrhiza fungi treatments included treatments without mycorrhiza, those with *Rhizophagus interaradics*, *Glomus mosseae*, as well as *R. interaradics* + *G. mosseae* and fungus that were separated from the test site. Bacteria treatments included those without bacteria and those with *Pseudomonas fluorescens* inoculation. The results showed that bacteria inoculation could improve survival, crown area and number of leaves. The results also showed that the inoculation of mycorrhizal fungi separated from the site habitat improved root colonization, survival, height, number of leaves and crown area. Furthermore, the combination of mycorrhizal fungi *R. intraradices* + *G. mosseae* improved the survival rate. It was concluded that the inoculation of fungi and bacteria improved plant acclimatization in ex vitro conditions.

Keywords: Survival, Ghareghat, tissue culture, mycorrhiza, *Pseudomonas fluorescens*.