علوم و تحقیقات بذر ایران

سال اول/ شماره دوم/ ۱۳۹۳ (۷۸ - ۶۷)

تأثیر بیوپرایمینگ بذر با قارچ‌های *Piriformospora indica* و *Trichoderma virens* بر مؤلفه‌های رویشی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهچه ماش سبز (*Vigna radiata* L.)

ندا سلیمی تملی[۱]، فهیمه سراج[۱]، همت اله پیردشتی*[۲]، یاسر یعقوبیان[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۵/۱۹

چکیده

با توجه به اهمیت روزافزون کاربرد کودهای زیستی در راستای نیل به کشاورزی پایدار، مطالعه حاضر جهت بررسی تأثیر بیوپرایمینگ بذر با قارچ‌های *Piriformospora indica* و *Trichoderma virens* بر مؤلفه‌های رویشی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهچه ماش سبز (*Vigna radiata* L.) اجرا گردید. آزمایش با چهار سطح تلقیح قارچی شامل عدم تلقیح (شاهد)، تلقیح قارچ اندوفیت *P. indica* (Pi)، تلقیح *T. virens* (Trich) و تلقیح همزمان دو قارچ (Trich+Pi) در پاییز ۱۳۹۳، در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شد. بذرهای ماش پس از تلقیح با تیمارهای قارچی، در خاک استریل کشت شده و پس از چهار هفته صفات مورفولوژیکی (تعداد برگ، ارتفاع بوته، قطر ساقه و طول ریشه)، رویشی (وزن تر و خشک ساقه، برگ، ریشه و بخش هوایی) و همچنین رنگیزه‌های فتوسنتزی (کلروفیل a، b، a+b، a/b و کارتنوئید) برگ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیوپرایمینگ بذر با Pi، Trich و Trich+Pi ارتفاع بوته (به ترتیب ۴، ۸ و ۲ درصد) و طول ریشه (به ترتیب ۱۸، ۳۱ و ۱۳ درصد) را نسبت به شاهد افزایش داد که این افزایش تنها در کاربرد قارچ Pi معنی‌دار بود. همچنین وزن تر و خشک اندام‌های رویشی نیز در اثر بیوپرایمینگ افزایش یافت که بیشترین افزایش مربوط به تلقیح Pi و در صفات وزن خشک ساقه، بخش هوایی و بوته (به ترتیب بیش از ۵، ۳ و ۲ برابر) بود. همچنین، مقادیر کلروفیل a، b و a+b نیز در برگ گیاهان تلقیح شده با Pi (به ترتیب حدود ۸، ۱۵ و ۹ درصد) افزایش یافت. در مجموع، به نظر می‌رسد بیوپرایمینگ بذر ماش سبز با قارچ‌های افزاینده رشد به ویژه *P. indica* اثر مثبتی بر مولفه‌های رشدی گیاه در مراحل استقرار و رشد اولیه گیاه دارند.

واژه‌های کلیدی: بذر، تریکودرما، شبه‌میکوریزا، قارچ، کلروفیل، ماش سبز

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲- دانشیار گروه زراعت ، پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- دانشجوی دکتری زراعت، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان

* نویسنده مسئول: h.pirdashti@sanru.ac.ir

مقدمه

زراعت در زمین‌های با حاصل‌خیزی کم و نیز در معرض انواع تنش‌های محیطی مانند کم‌آبی، شوری و دماهای بالا و پایین با مشکلات فراوانی رویه رو است که عمده‌ترین آن‌ها مربوط به جوانه‌زنی و استقرار مناسب محصول در مزرعه است (Toupchizadegan *et al*., 2009). یکی از روش‌های مورد استفاده در این زمینه استفاده از پرایمینگ است. پرایمینگ فناوری است که به واسطه آن بذرها پیش از قرار گرفتن در بستر کشت از لحاظ فیزیولوژیکی و بیولوژیکی، آمادگی جوانه‌زنی را به‌دست می‌آورند. این امر سبب تغییرات زیستی و فیزیولوژیکی زیادی در بذرها و همچنین گیاه حاصل از آن می‌گردد، به‌طوری که نتیجه آن جوانه‌زنی بهتر و استقرار مناسب گیاهچه است (Ashraf and Foolad, 2005). همچنین سرعت و یکنواختی سبز شدن و رشد گیاهچه‌ها به‌ویژه تحت شرایط تنش بیشتر می‌گردد (Parera and Cantliffe, 1991). در پرایمینگ بذر از روش‌های مختلفی نظیر هیدروپرایمینگ، اسموپرایمینگ، پرایمینگ شیمیایی، پرایمینگ هورمونی و بیوپرایمینگ استفاده می‌شود (Jisha *et al*., 2013). در این میان استفاده از ریزجانداران مفید برای پرایمینگ بذر، بخصوص اگر ریزجانداران مورد استفاده به مدت طولانی در ریزوسفر ریشه گیاه ماندگار بوده و به مدت طولانی به سلامتی یا رشد گیاه یاری رساند، می‌تواند کمک بیشتری به استقرار گیاه کند (Bennett and Whipps, 2008). در این روش که به عنوان بیوپرایمینگ یا پیش‌تیمار زیستی شناخته می‌شود، به‌جای تیمار شیمیایی بذر، از ریزجانداران مفید و عوامل زیستی مانند قارچ‌ها (از جمله میکوریزا و تریکودرما) و باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPR) استفاده می‌گردد که می‌توانند سازگاری و پایداری گیاهان را افزایش دهند (Bennett and Whipps, 2008). در چند سال گذشته تقویت زیستی بذر با بکارگیری قارچ‌ها و باکتری‌های افزاینده رشد گیاه، از جمله کارآمدترین روش‌های پرایمینگ بذر بوده و در حال جایگزینی تدریجی با تیمارهای شیمیایی می‌باشد (Bashan *et al*., 2004).

قارچ‌های تریکودرما در بسیاری از خاک‌هایی که گیاه در آن کشت می‌شود وجود دارند و به عنوان افزاینده رشد در دامنه وسیعی از گیاهان زراعی و زینتی مؤثر هستند. این قارچ‌ها از گونه‌های فعال موجود در ریزوسفر گیاهان هستند که قادرند با توسعه ریشه روی آن رشد نموده (Chang *et al*., 1986) و با کنترل فلور میکروبی خاک در ناحیه ریزوسفر گیاهان به افزایش رشد آن‌ها کمک کنند (Baker, 1998). اکثر گونه‌های قارچ تریکودرما به‌خاطر خاصیت آنتاگونیستی و به دلیل موفقیت در زمینه کنترل بیماری‌های قارچی، امروزه به طور وسیع به عنوان مهم‌ترین عامل قارچی در کنترل زیستی مورد توجه قرار گرفته‌اند (Tjamos *et al*., 1992; Radwan *et al*., 2006). علاوه بر مزایای این شیوه کنترل، ترشحات این قارچ‌ها حاوی عامل تنظیم‌کننده رشد می‌باشد که موجب افزایش جوانه‌زنی بذرها و رشد گیاه و همچنین جذب بیشتر مواد غذایی می‌شود (Windham *et al*., 1986). هم‌چنین گونه‌هایی از تریکودرما تحت مکانسیم‌های خاصی سبب افزایش رشد گیاه می‌شوند. از جمله مکانیسم‌های بیان شده در این زمینه می‌توان به کنترل زیستی بیماری‌های خاک‌زی با ترشح آنزیم (Brunner *et al*., 2005; Singh *et al*., 2007) و تولید آنتی‌بیوتیک‌ها (Aneja *et al*., 2005) اشاره کرد. مستوری و همکاران (Mastouri *et al*., 2010) نیز افزایش جوانه‌زنی و رشد گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی را در اثر تلقیح با قارچ تریکودرما، تحت تنش‌های شوری، خشکی و سرما گزارش کردند. بهبود ظهور و بنیه گیاهچه، رشد رویشی و در نهایت عملکرد گندم نیز در تیمار تلفیقی کمپوست دامی و گونه‌های قارچ تریکودرما گزارش شده است (Shahsavari *et al*., 2010). همچنین بهبود فعالیت ریزجانداران خاک و خصوصیات رشدی گیاهانی مانند زیره (Haggag and Abo-Sedera, 2005)، خیار (Yedida *et al*., 2001)، اسفناج (Mottaghian *et al*., 2009)، نخودفرنگی (Kukuk *et al*., 2007)، سویا (Yazdani *et al*., 2008) و گندم (Shahsavari *et al*., 2010) در تیمار با گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما نیز گزارش شده است.

از سوی دیگر، در پژوهش‌های مختلف گزارش شده است که همزیستی قارچ *P. indica* نیز با گیاهان موجب تحریک رشد، افزایش عملکرد و تحمل گیاه به تنش‌های شوری، خشکی و عوامل بیماری‌زای ریشه و برگ شده است (Rai *et al*., 2001; Kumari *et al*., 2003; Sepehri *et al*., 2009; Waller *et al*., 2005). نتایج پژوهش‌های انجام شده روی گیاهانی مانند گندم، جو و ریحان نیز نشان داد که تلقیح قارچ *P .indica* با این گیاهان باعث بهبود

رشد و عملکرد گیاه به ترتیب تحت شرایط خشکی، شوری و عناصر سنگین گردید (Yaghoubian *et al.*, 2012; Sepehri *et al.*, 2009; Faghih Abdollahi *et al.*, 2012). همچنین تأثیر این قارچ بر گیاهانی مانند نخود (*Cicer arietinum* L.)، نخود فرنگی (*Pisum sativum* L.)، لوبیا (*Phaseolus aereus* L.)، سویا (*Glycine max* L.) و اسفناج (*Spinacia oleracea* L.) ثابت شده است (Rai and Varma, 2005; Varma *et al.,* 2012). بیوپرایمینگ بذر با این قارچ نیز بهبود جوانه‌زنی و رشد گیاهچه را در گیاهانی چون برنج (*Oryza sativa*)، ذرت (*Zea mays*)، توتون (*Nicotina tabacum*) و کلم (*Brassica oleracea*) به دنبال داشته است (Varma *et al.*, 2012).

از طرفی ماش سبز با نام علمی *Vigna radiata* L.، گیاهی یک‌ساله، بوته‌ای با ارتفاع حدود ۹۰ سانتی‌متر (Kuchaki and Banayan, 2004) می‌باشد که در خاک‌های مختلف قادر به رشد است (Majnoon Hosseini, 1996). این گیاه که یکی از منابع مهم تأمین‌کننده پروتئین گیاهی برای انسان به شمار می‌رود (Majnoon Hosseini, 1996)، بومی مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری بوده و به دلیل همزیستی با باکتری ریزوبیوم قابلیت تثبیت نیتروژن را به میزان ۱۰۰-۵۰ کیلوگرم در هکتار دارد (Majnoon Hosseini, 2008). هم‌چنین سطح زیرکشت ماش در دنیا در حدود ۵/۳ میلیون هکتار و تولید سالانه آن ۲/۳ میلیون تن است. سطح زیر کشت ماش در ایران متفاوت بوده به طوری که در استان‌های لرستان، خوزستان، فارس و کرمان به ترتیب ۲۲۰۰، ۳۴۰۰، ۴۴۰۰ و ۴۸۰۰ هکتار از مزارع به کشت آبی این گیاه اختصاص داشت (Khorramian, 2010). بنابراین با توجه به مطالب ذکر شده، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر پیش‌تیمار زیستی (بیوپرایمینگ) قارچ‌های تریکودرما و *P. indica* بر رشد رویشی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی گیاهچه ماش سبز انجام شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در گلخانه تحقیقاتی پژوهشکده ژنتیک و زیست‌فناوری کشاورزی طبرستان واقع در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری در پاییز ۱۳۹۳ به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار به اجرا درآمد. تیمارهای آزمایشی چهار سطح بیوپرایمینگ شامل عدم تلقیح (شاهد)، تلقیح با قارچ *Trichorerma virens* (Trich)، تلقیح با قارچ *Piriformospora indica* (Pi) و تلقیح همزمان دو قارچ (Trich+Pi) در نظر گرفته شدند. قارچ‌های مورد استفاده در آزمایش از پژوهشکده ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان تهیه شد. قارچ *P. indica* در محیط کشت کفر[1] (Kaefer, 1977) کشت شده و به مدت دو هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه روی شیکر قرار گرفت. پس از گذشت مدت زمان مذکور که رشد رویشی قارچ به حداکثر خود رسید، با استفاده از محلول آب توئین ۰/۰۵ درصد، سوسپانسیونی با غلظت حدود 10^9 کلونی در میلی‌لیتر تهیه شده و جهت بیوپرایمینگ بذرها استفاده شد. قارچ تریکودرما نیز به مدت دو هفته در محیط کشت PDB و تحت شرایط ذکر شده برای *P. indica* کشت شده و سوسپانسیون آن جهت بیوپرایمینگ بذرها تهیه گردید. برای تیمار تلقیح همزمان دو قارچ از نسبت ۱:۱ سوسپانسیون دو قارچ و همچنین برای تیمار شاهد نیز از محلول آب توئین ۰/۰۵ درصد استفاده شد.

خاک مورد استفاده در آزمایش از عمق ۳۰-۰ سانتی‌متری مزرعه‌ی تحقیقاتی تهیه و پس از الک کردن با نسبت ۱:۲ با ماسه شسته مخلوط گردید. خاک استریل شده به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو و در گلدان‌هایی با ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر و قطر پنج سانتی‌متر ریخته شد. بذرهای ماش سبز (توده بومی مازندران) ابتدا در هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ده دقیقه ضدعفونی و چهار بار با آب مقطر شسته شد. بذرها جهت تلقیح با تیمارهای قارچی به مدت ۳۰ دقیقه در سوسپانسیون قارچ قرار گرفته و سپس تعداد پنج عدد بذر در عمق یک سانتی‌متری خاک در هر گلدان کشت شدند. پس از ظهور نهایی، گیاهچه‌ها تنک شده و به تعداد چهار بوته در هر گلدان رسید. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵±۷۰ درصد در نور طبیعی نگهداری و آبیاری آنها هر دو روز یک بار به‌طور یکنواخت انجام شد. پس از گذشت چهار هفته، از هر گلدان یک گیاهچه برداشت و غلظت کلروفیل a، b، a+b، a/b و کارتنوئید در برگ با روش پورا (Porra, 2002) و بوسیله

[1] Kaefer

دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Analytik Jena-SPEKOL 1300) اندازه‌گیری و با استفاده از روابط ۱ تا ۵ محاسبه گردید.

$C_a\,(\mu g/ml)= 16.72\,A_{665.2} - 9.16\,A_{652.4}$ (رابطه ۱)

$C_b\,(\mu g/ml)= 34.09\,A_{652.4} - 15.28\,A_{665.2}$ (رابطه ۲)

$C_{(a+b)}\,(\mu g/ml)= C_a + C_b$ (رابطه ۳)

$C_{(a/b)}\,(\mu g/ml)= C_a / C_b$ (رابطه ۴)

$C_{(x+c)}\,(\mu g/ml)=(1000\,A_{470} - 1.63_{ca} - 104.96_{cb})/221$ (رابطه ۵)

در این رابطه‌ها C_a، C_b، $C_{(a+b)}$، $C_{(a/b)}$و $C_{(x+c)}$ به‌ترتیب کلروفیل *a*، *b*، *a+b*، *a/b* و کارتنوئید و همچنین $A_{665.2}$، $A_{652.4}$، A_{470} میزان نور جذبی محلول در طول موج‌های ۶۶۵/۲، ۶۵۲/۴ و ۴۷۰ نانومتر می‌باشد. سپس سه گیاهچه باقی‌مانده نیز برداشت شده و صفات مورفولوژیک شامل تعداد برگ، قطر ساقه، ارتفاع بوته و طول ریشه و همچنین صفات رویشی شامل وزن تر و خشک ریشه، ساقه، برگ، بخش هوایی و کل بوته اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری وزن اندام‌های رویشی با استفاده از ترازوی حساس ۰/۰۰۱ (AND HR-100, Japan) انجام شد. جهت اندازه‌گیری وزن خشک نیز نمونه‌های گیاهی به مدت ۴۸ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

در نهایت داده‌های به دست آمده از آزمایش با روش کولموگروف- اسمیرنوف آزمون نرمال و با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ تجزیه شدند. میانگین‌های حاصله نیز با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد مقایسه شدند. همچنین ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

صفات مورفولوژیک و رنگیزه‌های فتوسنتزی

نتایج حاصل از تجزیه واریانس اثر تیمارهای آزمایشی بر صفات مورفولوژیک و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهچه ماش سبز (جدول ۱)، نشان داد که از بین صفات مورفولوژیک مورد بررسی، صفات ارتفاع بوته و طول ریشه به‌صورت معنی‌داری (در سطح احتمال پنج درصد) تحت تأثیر بیوپرایمینگ قرار گرفتند. همچنین اثر بیوپرایمینگ بر غلظت کلروفیل *a*، b و کلروفیل a+b در سطح احتمال پنج درصد معنی‌دار بود، ولی نسبت کلروفیل a/b و کارتنوئید تحت تأثیر همزیستی همزمان تریکودرما و *P. indica* قرار نگرفتند.

جدول ۱- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر بیوپرایمینگ بر صفات مورفولوژیک و رنگیزه‌های فتوسنتزی گیاهچه ماش سبز

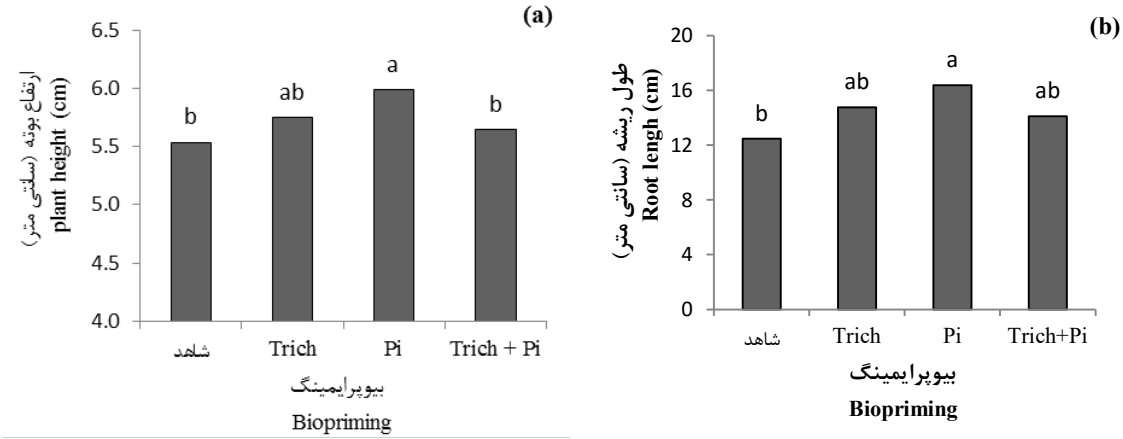
Table 1. Analysis of variance (mean squares) for the effect of biopriming on morphological traits and photosynthetic pigments of mung bean

S.O.V	منابع تغییر	بیوپرایمینگ Biopriming	خطای آزمایشی Error	ضریب تغییرات (درصد) CV (%)
Df	درجه آزادی	3	8	
Number of leaf	تعداد برگ	0.53	0.26	16.4
Plant height	ارتفاع بوته	0.11*	0.02	2.5
Stem diameter	قطر ساقه	0.001	0.003	4.8
Root length	طول ریشه	7.8*	1.87	9.5
Chl a	کلروفیل a	0.18*	0.03	2.8
Chl b	کلروفیل b	0.05*	0.01	5.8
Chl a+b	کلروفیلa+b	0.42*	0.06	2.9
Chl a/b	کلروفیل a/b	0.03	0.06	7.2
Carotenoid	کاروتنوئید	0.002	0.003	2.4

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

* and ** are significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

نتایج نشان داد بیوپرایمینگ بذر ماش با تریکودرما و قارچ اندوفیت *P. indica* به تنهایی یا هم‌زمان، ارتفاع بوته را نسبت به شاهد (به ترتیب ۴، ۸ و ۲ درصد) افزایش داد هرچند این افزایش تنها در کاربرد قارچ *P. indica* نسبت به شاهد معنی‌دار بود (شکل ۱- a). همچنین طول ریشه نیز تحت تأثیر بیوپرایمینگ قرار گرفته و در تلقیح با قارچ *P. indica* افزایش معنی‌داری (۳۱ درصد) نسبت به شاهد نشان داد، ولی از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با ریشه گیاهچه‌های پیش‌تیمار شده با تریکودرما و Trich+Pi نداشت (شکل ۱- b). در همین زمینه بررسی دوبی و همکاران (Dubey *et al.*, 2006) نشان داد که پرایمینگ بذر با *Trichoderma viride* افزایش رشد ریشه و اندام هوایی نخود را به دنبال داشت. ری و همکاران (۲۰۰۱) بیان کردند که طول ریشه و ساقه، وزن و سطح برگ در حضور *P. indica* افزایش می‌یابد. انیس و همکاران (Anith *et al.*, 2011) نیز در بررسی اثر توأم قارچ‌های تریکودرما و *P. indica* روی گیاه فلفل سیاه افزایش ارتفاع بوته و تعداد برگ بوته را گزارش دادند. همچنین پژوهش چاکون و همکاران (Chacon *et al.*, 2007) نشان داد که تیمار گیاه توتون با قارچ تریکودرما سبب افزایش وزن تر (۱۴۰ درصد)، سطح برگ (۳۰۰ درصد)، تعداد ریشه‌های جانبی (۳۰۰ درصد) و برگ (۱۴۰ درصد) شد. اثر مفید پرایمینگ بذر با قارچ *P. indica* بر رشد گیاهان ذرت (Kumar *et al.*, 2009) و جو (Waller *et al.*, 2005) نیز گزارش شده است. موچیارلی و همکاران (Mucciarelli *et al*., 2003) تأثیر قارچ اندوفیت را روی نعناع (*Mentha piperita*) در شرایط درون‌شیشه‌ای و گلخانه‌ای ارزیابی کرده و اعلام نمودند نعناع‌های همزیست-شده با قارچ هم از لحاظ اندازه و هم از لحاظ مقدار اسانس نسبت به گیاهان شاهد برتری داشتند.

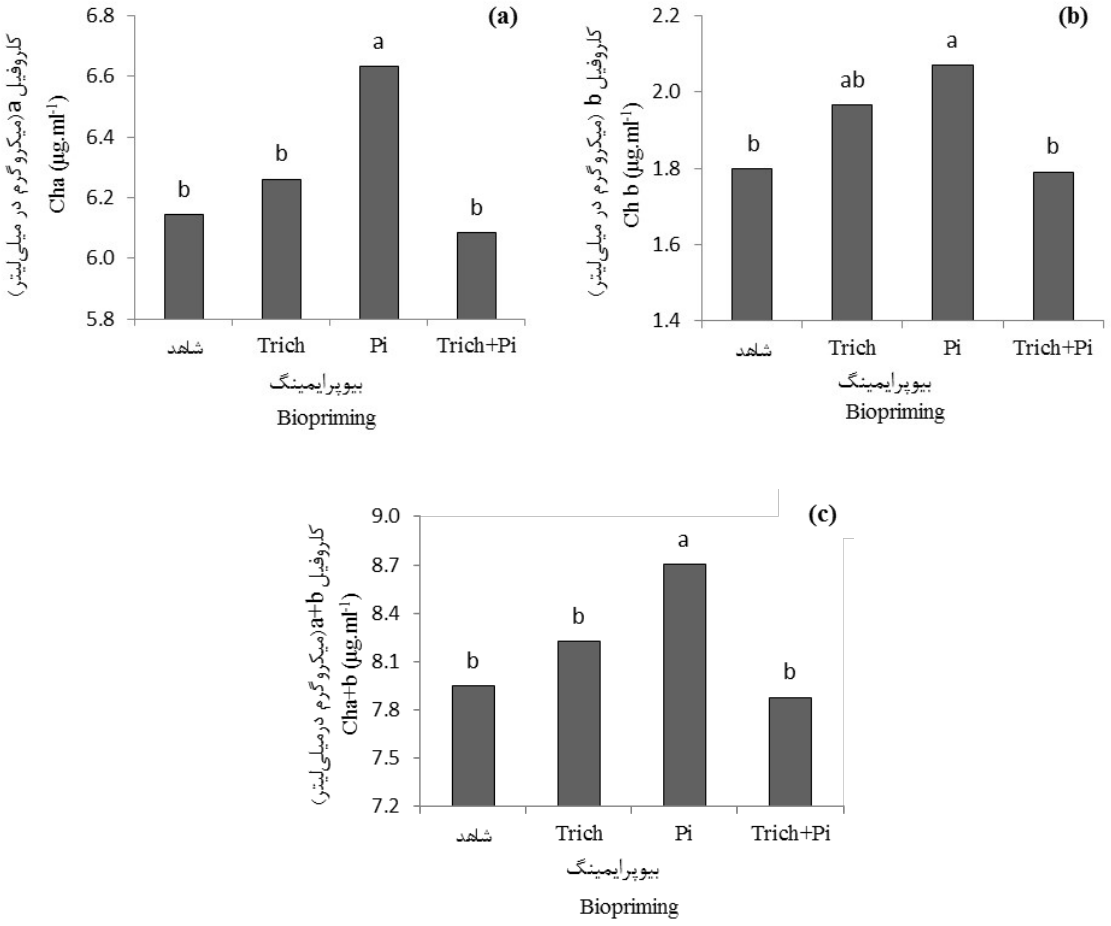


شکل ۱- اثر بیوپرایمینگ بر ارتفاع بوته (الف) و طول ریشه (ب) گیاهچه ماش سبز

Figure 1. The effect of biopriming on plant height (a) and root length (b) of mung bean

مقادیر کلروفیل a، b و a+b در برگ گیاهچه‌های پیش‌تیمار شده با قارچ‌های تریکودرما و شبه‌میکوریزا افزایش قابل توجهی نسبت به گیاهچه‌های پیش‌تیمار نشده نشان دادند، به طوری که این افزایش برای کلروفیل a، b و a+b در تلقیح تریکودرما به ترتیب ۲، ۹ و ۴ درصد و در تلقیح *P. indica* به ترتیب ۸، ۱۵ و ۹ درصد بود، هرچند که این افزایش تنها در گیاهچه‌های تلقیح شده با *P. indica* معنی‌دار بود (شکل ۲). از طرفی افزایش محتوای کلروفیل a، b و a+b در گیاهان تلقیح شده با قارچ *P. indica* می‌تواند به دلیل بهبود وضعیت آبی و همچنین جذب بیشتر عناصر معدنی باشد (Jenschke *et al.*, 2000). انتصاری و همکاران (Entesari *et al.*, 2014) گزارش دادند، در هر سه نوع کلروفیل، ترکیب تیماری بذرهای پرایمینگ شده با سولفات روی و قارچ *T.*

harzianum دارای بیشترین مقدار و با سایر تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری بودند. بررسی‌های یعقوبیان و همکاران (Yaghoubian *et al.*, 2014) در گندم نیز نشان داد که غلظت کلروفیل a، b و کلروفیل کل (a+b) در گیاهان تیمار با قارچ‌های میکوریزا و *P. indica* تحت شرایط تنش خشکی دارای اختلاف معنی‌داری با گیاهان تیمارنشده می‌باشند. دمیر (Demir, 2004) نیز نشان داد که هم-زیستی میکوریزایی سبب افزایش غلظت کلروفیل در برگ‌های گیاه فلفل می‌شود.



شکل ۲- اثر همزیستی قارچی بر غلظت کلروفیل a (a) کلروفیل b (b) و a+b (c) در برگ گیاهچه ماش سبز

Figure 2. The effect of biopriming on chlorophyll a (a), b (b) and a+b (c) concentration in leaf of mung bean

صفات رویشی

براساس جدول تجزیه واریانس اثر بیوپرایمینگ بر وزن تر و خشک اندام‌های رویشی گیاهچه ماش سبز (جدول ۲)، اثر قارچ‌ها بر صفات وزن تر ساقه، برگ و بخش هوایی و همچنین وزن خشک کل بوته در سطح احتمال پنج درصد و در صفات وزن خشک ساقه و وزن خشک بخش هوایی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. با این وجود، وزن تر ریشه و کل بوته و همچنین وزن خشک برگ و ریشه تحت تأثیر تیمارهای مورد بررسی قرار نگرفتند.

براساس یافته‌ها، بیوپرایمینگ با قارچ بر وزن تر ساقه گیاهچه ماش اثر معنی‌داری داشت (جدول ۲). تلقیح قارچ تریکودرما و *P. indica* وزن تر ساقه را به صورت معنی‌داری نسبت به شاهد (به ترتیب حدود ۱۰ و ۱۳ درصد) افزایش داد (شکل ۳- a). کاربرد همزمان دو قارچ نیز افزایش وزن تر ساقه را به دنبال داشت ولی این افزایش

نسبت به تیمار شاهد معنی‌دار نبود. از طرفی همزیستی قارچ *P. indica* و تلقیح همزمان دو قارچ وزن تر برگ را در مقایسه با شاهد به ترتیب حدود ۲۴ و ۱۴ درصد افزایش داد (شکل ۳- b). همچنین بیوپرایمینگ قارچ‌های تریکودرما، *P. indica* و Trich+Pi به ترتیب باعث افزایش ۱۱، ۲۰ و ۱۳ درصدی وزن تر بخش هوایی گیاهچه ماش سبز نسبت به گیاهچه‌های پرایم نشده گردید (شکل ۳- c). وزن تر بخش هوایی و وزن خشک ساقه نیز در گیاهچه‌های پرایم شده با تیمارهای قارچی نسبت به گیاهچه‌های شاهد، افزایش چشمگیری نشان داد به طوری که این افزایش در وزن خشک ساقه در تلقیح قارچ‌های تریکودرما، *P. indica* و Trich+Pi به ترتیب بیش از ۲/۵، ۴ و ۳ برابر (شکل ۳- d) و همچنین در وزن خشک بخش هوایی به ترتیب ۶۲ درصد، بیش از دو برابر و ۸۷ درصد (شکل ۳- e) بود.

وزن خشک کل نیز در بیوپرایمینگ قارچ *P. indica* و کاربرد همزمان دو قارچ تریکودرما و *P. indica* نسبت به شاهد حدود ۱۰۹ و ۷۰ درصد افزایش یافت. با این وجود، بین تریکودرما و ترکیب همزمان دو قارچ تریکودرما و *P. indica* اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (شکل۳- f). علاوه بر این، کاربرد قارچ تریکودرما نیز وزن خشک کل بوته را حدود ۵۰ درصد افزایش داد هرچند که این افزایش نسبت به شاهد معنی‌دار نبود.

جدول ۲- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) اثر بیوپرایمینگ بر صفات رویشی گیاهچه ماش سبز

Table 2. Analysis of variance for the effect of Biopriming on growth parameters of mung bean

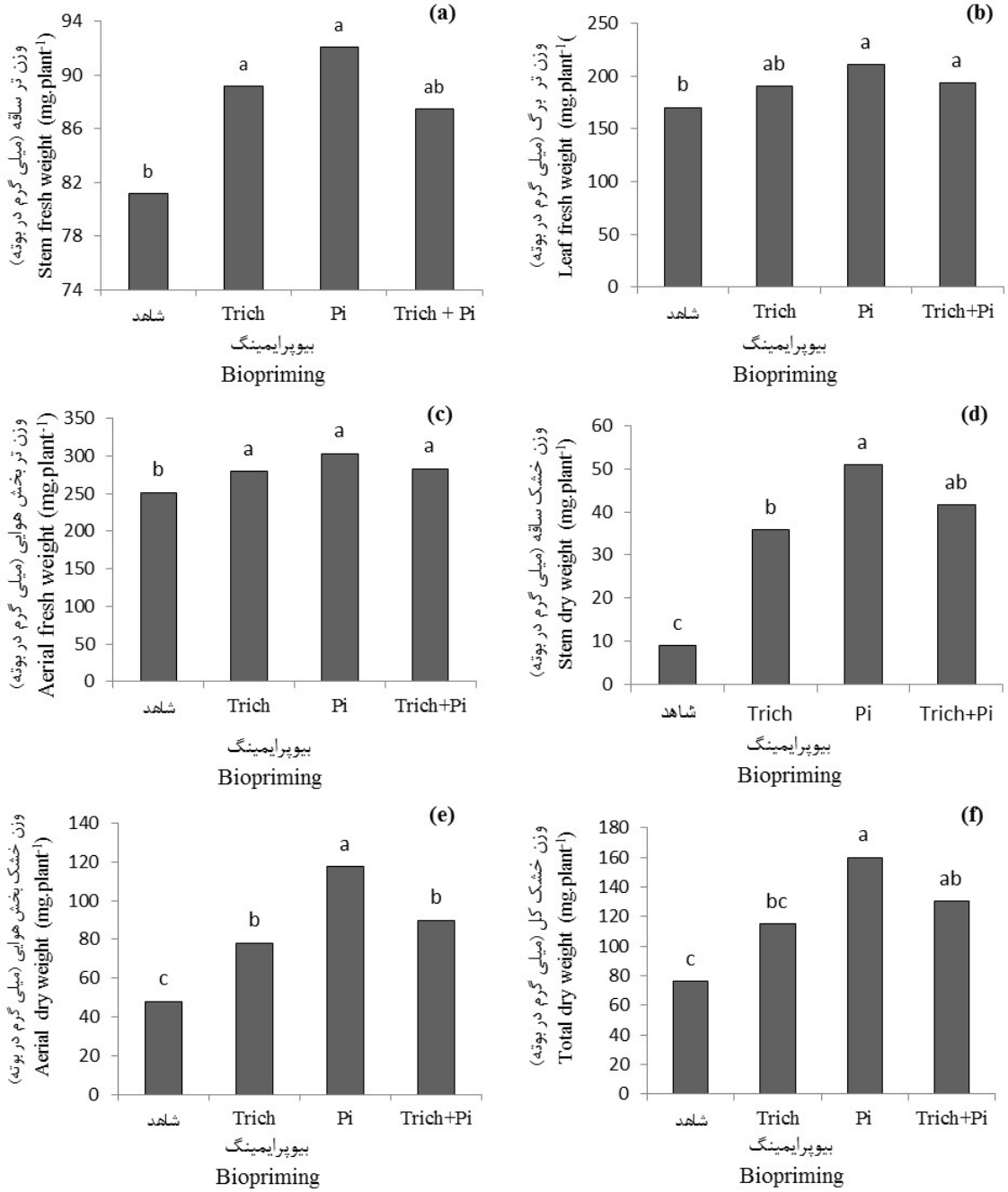
S.O.V	منابع تغییر	بیوپرایمینگ Biopriming	خطای آزمایشی Error	ضریب تغییرات (درصد) CV (%)
Df	درجه آزادی	3	8	
Fresh weight	وزن تر			
Stem	ساقه	63.88*	15.63	4.5
Leaf	برگ	838.2*	126.0	5.9
Root	ریشه	3245	3642	12.1
Aerial part	بخش هوایی	1358.9*	194.2	5.0
	کل	8826	3828	8.8
Dry weight	وزن خشک			
Stem	ساقه	969.13**	40.72	18.6
Leaf	برگ	452.5	142.5	24.3
Root	ریشه	103.74	32.84	17.7
Aerial part	بخش هوایی	2478.9**	170.8	15.7
Total	کل	3622.2*	528.4	19.1

* و ** به ترتیب معنی‌دار در سطح احتمال پنج و یک درصد.

* and ** are significant at 5 and 1% probability levels, respectively.

در همین زمینه، یزدانی و همکاران (Yazdani *et al.*, 2008) در پژوهش مشابه دیگری گزارش کردند که تلقیح قارچ *T. viride* سبب افزایش معنی‌دار طول ریشه، وزن ساقه، وزن گیاهچه و تعداد گره در گیاه سویا شده است. پژوهش‌های چانگ و همکاران (Chang *et al.*, 1986) نیز بیانگر افزایش رشد گیاه فلفل با حضور قارچ تریکودرما در خاک بوده است. گراول و همکاران (Gravel *et al.*, 2007) در بررسی پاسخ صفات رشد ریشه و ساقه گوجه فرنگی به قارچ تریکودرما نشان دادند که رشد ریشه و ساقه بوته‌های گوجه فرنگی به واسطه تولید هورمون‌های رشد مانند ایندول استیک افزایش می‌یابد. در پژوهش‌های مشابهی، اندوفیت‌های ریشه مانند *P. indica* با افزایش میزان رشد از طریق مسیرهای بیوشیمیایی درگیر در تولید هورمون‌های رشد و یا تشدید جذب عناصر غذایی، توانستند سبب افزایش توان سازگاری و رقابتی بالای گیاه میزبان شدند (Zhang *et al.*, 2006). کاپور و همکاران

(Kapoor *et al.*, 2004) دریافتند که همزیستی میکوریزایی از طریق بهبود گسترش هیف‌های قارچ در منافذ خاک، سبب افزایش وزن خشک گیاه در گیاه رازیانه گردید. همچنین سپهری و همکاران (Sepahri *et al.*, 2009) بیان کردند برقراری ارتباط همزیستی قارچ *P. indica* سبب تحریک رشد گیاه و در نتیجه افزایش عملکرد آن شده است.



شکل ۳ - اثر بیوپرایمینگ بر وزن تر ساقه (a)، برگ (b) و بخش هوایی (c) و وزن خشک ساقه (d)، بخش هوایی (e) و وزن خشک کل (f) گیاهچه ماش سبز

Figure 3. The effect of biopriming on stem (a), leaf (b) and aerial part (c) fresh weights and stem (d), aerial part (e) and total (f) dry weights of mung bean

نتیجه‌گیری

در مجموع، نتایج نشان داد بیوپرایمینگ بذرهای گیاه ماش سبز با قارچ‌های تریکودرما و *P. indica* و همچنین تلقیح همزمان آنها بر صفات مورفولوژیک شامل ارتفاع بوته، طول ریشه، و غلظت رنگیره‌های فتوسنتزی ازجمله کلروفیل *a*، *b* و *a+b* اثر مثبت داشت، که در این میان اثر مثبت تلقیح قارچ *P. indica* بیشتر بود. از سوی دیگر نتایج این آزمایش همانند نتایج قبلی (Shahsavari *et al*., 2010; Alizadeh Frutan *et al*., 2014; Yaghoubian *et al.*, 2014) بیانگر سودمندی تلقیح بذر گیاه ماش سبز با قارچ شبه‌میکوریزای *P. indica* و تریکودرما بر رشد رویشی گیاهچه ماش بوده و بر اهمیت برقراری ارتباط همزیستی قارچ‌های *P. indica* و *T. virens* با گیاه و اثر مثبت آنها در تحریک مولّفه‌های رشدی آن دلالت دارد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری آقایان دکتر ولی‌اله بابائی‌زاد و دکتر محمدعلی تاجیک بخاطر فراهم نمودن قارچها و نظرات ارزشمند سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از مساعدت‌ها و حمایت‌های مالی پژوهشکده‌ی ژنتیک و زیست فناوری کشاورزی طبرستان، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری قدردانی می‌گردد.

منابع

Alizadeh Frutan, M., Pirdashti, H. and Yaghoubian, Y. 2014. Effect of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) medicinal plant seed biopriming in copper heavy metal tolerance at germination and seedling stages. Seed Research, 4(2): 1-12. (In Persian) **(Journal)**

Anith, K.N., Faseela, K.M., Archana, P.A. and Prathapan, K.D. 2011. Compatibility of *Piriformospora indica* and *Trichoderma harzianum* as dual inoculants in black pepper *(Piper nigrum* L.). Symbiosis, 55:11–17. **(Journal)**

Aneja, M., Gianfagna, T.J. and Hebbar, P.K. 2005. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology, 67: 304-307. **(Journal)**

Ashraf, M. and Foolad, M.R. 2005. Pre-sowing seed treatment-a shotgun approach to improve germination growth and crop yield under saline and none-saline conditions. Advances in Agronomy, 88: 223-271. **(Journal)**

Baker, R. 1988. *Trichoderma* sp. as plant-growth stimulants. Critical reviews in Biotechnology, 7: 97-106. **(Journal)**

Bashan, Y., Holguin, G. and De-Bashan, L. 2004. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. Canadaian Journal of Microbiology, 50:521–577. **(Journal)**

Bennett, A.J. and Whipps, J.M. 2008. Dual application of beneficial micro-organisms to seed during drum priming. Applied Soil Ecology, 38:83–89. **(Journal)**

Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S.L., Lorito, M., Kubicek, C.P. and Mach, R.L. 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic diseas resistance. Applied and Environmental Microbiology, 71: 3959-3965. **(Journal)**

Chacon, M.R., Rodríguez-Galán, O., Benítez, T., Sousa, S., Rey, M., Llobell, A. and Delgado-Jarana1, J. 2007. Microscopic and transcriptome analyses of early colonization of tomato roots by *T. harzianum*. International Microbiology, 10: 19-27. **(Journal)**

Chang, Y.C., Baker, R., Kleifeld, O. and Chet, I. 1986. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. Plant Disease, 70: 145-148. **(Journal)**

Demir, S. 2004. Influence of arbuscular mycorrhiza on some physiological growth parameters of pepper. Turkish Journal of Biology, 28: 85–90. **(Journal)**

Dubey, S.C., Suresh, M. and Singh, B. 2006. Evaluation of Trichoderma species against *Fusarium oxysporumf* sp. ciceris, for integrated management of chickpea wilt. Biological Control, 40:118-127. **(Journal)**

Entesari, M., Sharifzadeh, F., Dashtaki, M., Ahmadzadeh, M. 2014. Effects of biopriming on the germination traits, physiological characteristics, aantioxidant enzymes and control of *Rhizoctonia*

solani of a bean cultivar (*Phaseolus vulgaris* L.). Iranian Journal of Crop Sciences, 44 (1): 35-45. (In Persian) **(Journal)**

Faghih Abdollahi, L., Pirdashti, H., Yaghoubian, Y. and Alavi, S.A. 2012. Study on mycorrhizae like fungi and Trichoderma efficiency on copper nitrate stress improvement. In: Proceeding of National Congress of Soil and Sustainable Agriculture. Malayer, Iran. (In Persian)**(Congress)**

Gravel, V., Antoun, H. and Tweddell, R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry, 39: 1968-1977. **(Journal)**

Haggag, W.M. and Abo-Sedera, S.A. 2005. Characteristics of three Trichoderma species in peanut haulms compost involved in biocontrol of cumin wilt disease. International Journal Agriculture Biology, 7(2): 222-229. **(Journal)**

Jenschke, G., Brandes, B., Kuhn, A.J., Schoder, W.H., Becker, J.S. and Godlbdd, D.L. 2000. The mycorrhizal fungus Paxillus in volutes magnesium to Norway spruce seedlings. Evidence from stable isotope labeling. Plant and Soil, 220: 243-246. **(Journal)**

Jisha, K.C., Vijayakumari, K. and Puthur, J.T. 2013. Seed priming for abiotic stress tolerance: an overview. Acta Physiologiae Plantarum, 35: 1381–1396. **(Journal)**

Kaefer, E. 1977. Meiotic mitotic recombination in Aspergillus and its chromosomal aberration. Advances in Genetics, 19: 33-131. **(Journal)**

Kapoor, R., Giri, B. and Mukerji, K.G. 2004. Improved growth and essential oil yield and quality in *Foeniculum vulgare* Mill on mycorrhizal inoculation supplemented with P-fertilizer. Bioresourse Technology, 93: 307-311. **(Journal)**

Khorramian, S. 2010. The effect of deficit irrigation and plant density on yield of mungbean cultivars in Izeh. M.Sc. Thesis, Department of Agriculture, Islamic Azad University of Dezful, Iran.

Kuchaki, A. and Banayan aval, M. 2004. Pulses Agronomy. Mashhad Jihad-e-Daneshgahi Press. **(Book)**

Kucuk, C., Kivanc, M., Kinaci, E. and Kinaci, G. 2007. Efficacy of *Trichoderma harzianum* (Rifaii) on inhibition of ascochyta blight disease of chickpea. Annals of Microbiology, 57: 665-668. **(Journal)**

Kumar, M., Yadav, V., Tuteja, N., and Johri, A.K. 2009. Antioxidant enzyme activities in maize plants colonized with *Piriformospora indica*. Microbiology, 155: 780-790. **(Journal)**

Kumari, R., Kishan, H., Bhoon, Y.K. and. Varma, A. 2003. Colonization of cruciferous plants by *Piriformospopra indica*. Current Science, 85: 1672-1674. **(Journal)**

Majnoon Hosseini, N. 1996. Pulses in Iran. Jihad-e –Daneshgahi Press. (In Persion) **(Book)**

Majnoun Hoseini, N. 2008. Pulses Agronomy and production. Tehran Jihad-e-Daneshgahi. Press. 238 Page. **(Book)**

Mastouri, F., Björkman, T. and Harman, G.E. 2010. Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. Biological Control, 100(11): 1213-1221. **(Journal)**

Mottaghian, A., Pirdashti, H., Bahmanyar, M.A., Shahsavari, A. and Hasanpour, R. 2009. Effect of three Trichoderma species and different amounts of enriched municipal waste compost on growth parameters in spinach (*Spinacia oleracea*). In: Proceedings of 5th International Scientific Conference of Iran and Russia on Agricultural Development Problems. Saint Petersburg, Russia, 8-9 October: 267-270. (In Persion)

Mucciarelli, M., Scannerini, S., Berrtea, C. and Maffei M. 2003. *In vitro* and *in vivo* peppermint (*Mentha piperita*) growth promotion by nonmycorrhizal fungal colonization. New Phytologist, 158:579 - 91. **(Journal)**

Parera, C.A. and Cantliffe, D.J. 1991. Improved germination and modified imbibitions of shrunken-2sweet corn by seed disinfection and solid matrix priming. Journal of the American Society for Horticultural Science, 116: 942–945. **(Journal)**

Porra, R.J. 2002. The chequered history of the development and use of simultaneous equations for the accurate determination of chlorophylls a and b. Photosynthesis Research, 73: 149–156. **(Journal)**

Radwan, M.B., Fadel, A.M. and Mohammad, I.A.M. 2006. Biological control of *Sclerotiorum rolfsii* by using indigenous *Trichoderma spp*. Isolates from Palestine Hebron University. Hebron University Research Journal, 2(2): 27-47pp. **(Journal)**

Rai, M. and Varma, A. 2005. Arbuscular mycorrhiza-like biotechnological potential of *Piriformospora indica*, which promotes the growth of *Adhatoda vasica*. Electron Journal of Biotechnology, 8: 107-111. **(Journal)**

Rai, M., Achaya, D., Singh, A. and Varmam, 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. **(Journal)**

Sepahri, M., Saleh Rastin, N., Hossieni Salkedeh, G. and Khayam Nekoui, M. 2009. Effect of endophytic fungus *Piriformospora indica* on growth and resistance of *H. vulgare* L. to salinity stress. Rangeland Journal, 3(3): 508-518. (In Persian). **(Journal)**

Shahsavari, A., Pirdashti, H., Motaghiyan, A. and Tajik Ghanbari, M.A. 2010. Response of wheat (*Triticum aestivum* L.) growth parameters and yield to co-inoculation of farmyard manure, *Trichoderma* spp. and *Psudomunas* spp. Journal of Agroecology, 2 (3): 448-458. (In Persian) **(Journal)**

Singh, A., Srivastava, S. and Singh, H.B. 2007. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. Bioresource Technology, 98: 470-473. **(Journal)**

Tjamos, E.C., Papavizas, G.C. and Cook, R.J. 1992 Biological control of plant diseases. Progress and challenges for the future. Plenum Press, New York. **(Book)**

Toupchizadegan, L., Rahimzadeh Khouei, F. and Eyvazi, A.R. 2009. The effect of pretreated seed on the germination and growth of the seedling in the variety of tomato. Journal of Research in Crop Sciences, 1(4): 1-14. (In Persian)**(Journal)**

Varma, A., Chordia P., Bakshi M. and Olmüller, R. 2012 Sebacinales: the state-of-art. In: Piriformospora indica sebacinales and their biotechnological applications (Eds: Varma A, Gerhard K, and Ralf O) Springer-Verlag, Germany. **(Book)**

Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R.,Neumann, C., Wettstein, D., Franken, P. and Kogel, K.H. 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 102: 13386-13391.

Windham, M.T., Elad, Y. and Baker, K. 1986. A mechanism for increased plant growth inoculated by *Trichoderma* spp. Phytopathology, 6: 518-521.**(Journal)**

Yaghoubian, Y., Mohammadi Goltapeh, E., Pirdashti, H., Esfandiari, E., Feiziasl, V., Kari Dolatabadi, H., Varma, A. and Haryani Hassim, M. 2014. Effect of *Glomus mossea* and *Piriformospora indica* on defense mechanism and lipid peroxidation of wheat under drought stress. Agricultural Research, 3(3): 239-245.**(Journal)**

Yaghoubian, Y., Pirdashti, H., Mohammadi Goltapeh, E., Feiziasl, V. and Esfandiari, E. 2012. Investigation of dryland wheat (*Triticum aestivum* cv. Azar2) plants response to symbiosis with arbuscular mycorrhiza and mycorrhiza like fungi under different levels of drought stress. Journal of Agroecology, 4(1): 63-73. (In Persian)**(Journal)**

Yazdani, M., Pirdashti, H. and Tajik Ghanbari, M.A. 2008. Effect of *Trichoderma* spp. and different organic manures on growth and development in soybean [*Glycine max* (L.) Merril.]. Electron Journal of Crop Production, 1(3): 65-82. (In Persian with English abstract)**(Journal)**

Yedidia, I., Srivastava, A.K., Kapulnik, Y. and Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. Plant and soil, 235(2): 235-242.**(Journal)**

Zhang, H.W., Song, Y.C. and Tan, R.X. 2006. Biology and chemistry of endophytes. Natural Product Report, 23: 753-771.

The effect of seed biopriming by *Piriformospora indica* and *Trichoderma virens* on the growth, morphological and physiological parameters of mung bean (*Vigna radiate* L.) seedlings

Neda Salimi Tamalla[1], Fahimeh Seraj[1], Hemmatollah Pirdashti*[2], Yasser Yaghoubian[3]

Received: April 13, 2014 Accepted: August 10, 2014

Abstract

Nowadays, the use of biofertilizer is steadily increasing in sustainable agriculture, therefore the present study was aimed to evaluate the effect of seed biopriming by Piriformospora indica and Trichoderma virens on the growth, morphological and physiological parameters of mung bean (*Vigna radiate* L.). Experiment was conducted as completely randomized design with three replicates in 2014. Treatments were included four levels of biopriming (control, inoculation by *P. indica* or *T. virens* and dual inoculation by *P. indica* and *T. virens*). Seeds of mung bean were sown in sterile soil and grown for four weeks and then some morphological, growth and photosynthetic pigments parameters were determined. Results showed that seed biopriming by Trichoderma, *P. indica* and dual inoculation increased plant height (4, 8 and 2 %, respectively) and root length (18, 31 and 13 %, respectively) as compared to the uninoculated control. However, the increase was significant only for *P. indica* inoculated seeds. Furthermore, shoot fresh and dry weights increased when mung bean seeds inoculated by both fungi. The maximum increase in stem, shoot and plant dry weights (5, 3 and 2 times of control) were recorded when seeds inoculated with *P. indica.* Also, inoculation of seeds by *P. indica* improved chlorophyll *a*, *b*, *a+b* contents (nearly 8, 15 and 9 %, respectively). In conclusion, it seems that seed biopriming of mung bean by growth promoting fungi particularly *P. indica* positively improved the growth attributes in early growth stages.

Key words: Chlorophyll; Fungi; Seed; Trichoderma; Mung bean; Mycorrhizae like

1: M.Sc. Student of Agronomy, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

2: Associate Professor, Department of Agronomy, Genetics and Agricultural Biotechnology Institute of Tabarestan, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

3: Ph.D. Student of Agronomy, Department of Agronomy and Plant Breeding, Ramin Agricultural and Natural Resources University. Khouzestan, Iran.

*Corresponding author: h.pirdashti@sanru.ac.ir