گیاهپزشکی (مجله علمی کشاورزی)، جلد ۳۹ شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵

غربالگری جدایه‌های تریکودرما از نظر تحمل شوری و دما و تاثیر جدایه برتر بر رشد گیاه ذرت در شرایط آزمایشگاهی

فاطمه نصرآبادی[۱]، نعیمه عنایتی ضمیر[۲*]، مهدی مهرابی کوشکی[۳] و محمود شمیلی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۲- *نویسنده مسوول: استادیار گروه علوم و مهندسی خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۳- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۴- مدیر بخش زراعی موسسه تحقیقات و آموزش توسعه نیشکر و صنایع جانبی خوزستان

تاریخ دریافت: ۹۴/۰۷/۰۴ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۴

چکیده

بسیاری از جدایه‌های قارچ بیوکنترلی *Trichoderma* با افزایش تحمل گیاه به تنش‌های محیطی باعث بهبود شاخص‌های رشدی گیاه و افزایش محصول می‌شوند. به منظور بررسی اثر تنش شوری بر روی ۱۰ جدایه از هفت گونه تریکودرما آزمایشی بصورت طرح کاملا تصادفی در سه تکرار به اجرا درآمد. تیمارهای آزمایش شامل پنج سطح شوری(۷، ۹، ۱۳، ۳۰، ۶۰ دسی‌زیمنس بر متر) از سه منبع کلرید سدیم، کلرید کلسیم و کلرید منیزیم به نسبت۱:۲:۳ و ۱۰جدایه تریکودرما بود. اثر شوری بر روی رشد جدایه های تریکودرما برروی محیط کشت جامد سیب‌زمینی-دکستروز-آگار حداقلی (¼-Strength PDA) که دارای غلظت های مختلف نمک در سطوح شوری تعریف شده بود، انجام شد. همچنین جدایه‌ها از نظر تحمل به دما، در دماهای ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس غربالگری شدند. نتایج نشان‌دهنده اثر بازدارنده شوری بر روی رشد جدایه‌ها و تفاوت معنی‌دار جدایه‌ها از نظر تحمل شوری بود. مقاوم‌ترین جدایه به شوری با ۱۲ درصد بازدارندگی رشد در سطح شوری ۶۰ دسی زیمنس برمتر *T. hrazianum* Isf-60 و حساس‌ترین جدایه با 100 درصد بازدارندگی رشد *T. capillare* Isf-7 بودند. هیچ کدام از جدایه ها قادر به رشد در دمای ۴۰ درجه سلسیوس نبودند و در دمای ۳۵ درجه نیز تنها ٤ جدایه رشد کردند که شامل جدایه های *T. harzianum* Isf-B، *T. koningiopsis* Arak-96 ، *T. harzianum* Isf-60 و *T. virens* Ham-65 بودند. افزایش دما باعث کاهش رشد سه جدایه و افزایش رشد *T. hrazianum* Isf-60 نسبت به دمای ۳۰ درجه سلسیوس شد. نتایج تلقیح بذر ذرت با جدایه مقاوم به شوری و دما (*T. hrazianum* Isf-60) نشان دهنده تاثیر معنی دار قارچ در افزایش وزن تر، خشک و ارتفاع ریشه و اندام هوایی در شرایط شور و غیرشور بود.

کلید واژه‌ها: شوری، تریکودرما، بازدارندگی، رشد شعاعی، افزایش رشد

مقدمه

امروزه در اثر تغییر اقلیم و کاهش میزان بارندگی در مناطق خشک و نیمه خشک، مشکلات ناشی از کمبود آب و شوری بر تولید گیاهان زراعی نمود بیشتری یافته است. شوری خاک مناطق کشاورزی یک مشکل جهانی است. برآورد شده است که ۱۰ درصد زمین های کشاورزی و بیش از ۲۷ درصد زمین های تحت آبیاری به طور مستقیم تحت تأثیر شوری هستند، همچنین بیش از یک سوم زمین های تحت آبیاری در معرض شوری ثانویه قرار دارند (Hariadi et al., 2011; Shabala and Cuin, 2008). به دلیل قرارگرفتن ایران در منطقه آب و هوایی خشک و نیمه خشک، نزدیک به ۵۰ درصد سطح زیرکشت محصولات

کشاورزی، به درجات مختلف با مشکل شوری مواجه می باشد. مطالعات خاکشناسی حدود ۳۸ درصد از ۶/۵ میلیون هکتار اراضی خوزستان نشان داده است که تنها ۳/۱۵ درصد از اراضی مطالعه شده هیچ گونه محدودیتی ندارند، در حالی که ۱۴/۷ درصد از این خاک ها در کلاس دو قرار گرفته و دارای محدودیت‌های گوناگون، به ویژه شوری هستند. حدود یک میلیون هکتار از اراضی خوزستان با مشکل شوری مواجه است (Taherzadeh, 2004). ذرت با آستانه تحمل حدود ۲ دسی‌زیمنس بر متر یک گیاه نیمه حساس به شوری است (Jafari, 1990).

به طور کلی در شرایط شور قابلیت جذب عناصر غذایی در محلول خاک به دلیل غلظت زیاد یون‌های کلرید و سدیم کاهش یافته و منجر به اختلال در امر تغذیه گیاهان می گردد(Zhang et al., 2008). با توجه به گسترش روز افزون مساحت خاک های شور، ضرورت دستیابی به راه حل‌های علمی برای افزایش بازده محصول در شرایط شوری، بیشتر احساس می شود.

گونه‌های جنس *Trichoderma* از مهم‌ترین قارچ‌های آنتاگونیست هستند که به عنوان قارچ ساپروفیت همه‌جازی در اغلب خاک‌ها وجود دارند (Harman et al., 2004). آن‌ها دامنه وسیعی از ریزبوم‌های[1] خاک را در مناطق سرد تا مناطق گرم و مرطوب کلونیزه می‌کنند. این ریزبوم‌های اکولوژیکی افق بالای خاک‌های کشاورزی، باغات، جنگل، چمنزار و بیابان را شامل می‌شوند (Roiger et al., 1991). قدرت سازش بالای این جنس قارچی باعث شده که بعضی گونه‌های تریکودرما حتی در محیط‌های فوق‌العاده شبیه بوته‌زارهای مانگرو و نمکی یعنی جائیکه اختلاف پتانسیل اسمزی بسیار بالا دارد، نیز بسر برند (Domsch et al., 1980).

گونه‌های مختلف تریکودرما با تسخیر فراریشه و رقابت بهتر در استفاده از مواد غذائی، تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچی، میکوپارازیتیسم و تولید انواع آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی قارچ‌های بیماریزا، باعث کنترل بیمارگرهای قارچی گیاهان مخصوصا" عوامل خاکزاد شده‌اند (Harman et al., 2004). این تاثیرات بیوکنترلی گاهی موثرتر از مواد شیمیایی بوده و به‌علاوه فاقد اثرات مضر زیست محیطی می‌باشند (Papavizas, 1985). همچنین گونه‌های مختلف تریکودرما با استفاده از راهکارهایی سبب افزایش رشد گیاهان می‌شوند که از آن جمله می‌توان به افزایش جذب عناصر غذایی به‌دلیل افزایش حلالیت عناصر و تغییر در pH فراریشه، ترشح هورمون‌های رشد و تولید اتیلن اشاره نمود (Contreras-Cornejo et al., 2013; Brotman et al., 2013 Velázquez-Robledo et al., 2011). اغلب سویه‌های تریکودرما محیط اطراف خود را با ترشح اسیدهای آلی همچون اسید گلوکونیک، اسید سیتریک و اسید فوماریک، اسیدی می کنند و در نتیجه قادر به حل کردن فسفات، ریزمغذی‌ها، آهن، منگنز و منیزیوم خواهند بود (Harman et al., 2004). این قارچ‌ها همچنین باعث افزایش مقاومت گیاه در برابر تنشهای زنده و غیر زنده می‌گردند(Djonovic et al., 2007; Harman et al., 2004). همانند گیاهان که از تنش های محیطی متاثر می شوند ریزموجودات نیز تحت تاثیر این تنشها قرار می‌گیرند. توسعه حضور ریزموجودات در اکوسیستم بستگی به توانایی آنها برای استقرار و تکثیر در شرایط نامساعد محیطی مانند خشکی، دمای بالا، کمبود مواد غذایی، حضور فلزات سنگین و شوری‌دارد.کلنیزاسیون‌گیاه به وسیله استرین‌های تریکودرما غالبا" رشد و توسعه ریشه، مقاومت به تنش‌های غیرزنده و جذب و استفاده از مواد غذائی را افزایش می‌دهد (Bae et al., 2009; Rawat et al., 2011; Woo and Lorito, 2006). حاصلخیزی خاک‌های تیمار شده با بعضی استرین‌های تریکودرما می‌تواند بطور معنی‌داری بهبود پیدا کند زیرا بعضی از استرین‌های تریکودرما اثرات سودمندی روی رشد گیاه و افزایش مقاومت به تنش‌های زنده و غیرزنده دارند (Hermosa *et al.*, 2012). برهمکنش تریکودرما با ریشه‌گیاهان منجر به نتایج متعددی همچون: افزایش مقاومت گیاه به تنش‌های زنده (مقاومت القائی سیستمیک) و عوامل غیر

1- Niches

زنده (رطوبت، نمک زیاد و درجه حرارت‌های بالا) ، افزایش راندمان استفاده از نیتروژن و افزایش درصد و نسبت جوانه‌زنی بذور پوشش داده شده می‌شوند (Shoresh et al., 2010). بیشتر گونه‌های تریکودرما مزوفیل هستند لیکن دامنه درجه حرارت مطلوب رشد برای گونه‌های تریکودرما نسبتا وسیع است و لذا می‌تواند از دمای ۰°C برای *T. polysporum* و دمای نسبتا بالای ۴۰°C برای *T. koningii* متغیر باشد (Domsch et al., 1980). با وجود اثرات مثبت جدایه-های تریکودرما در کنترل عوامل بیماریزا و همچنین تحریک رشد گیاه معمولا امکان استفاده از آنها تحت تاثیر دما و شوری بالای محیط محدود می گردد (Ragazzi et al., 1994). بازدارندگی رشد تریکودرما در غلظتهای بالای نمک کلریدسدیم (۱۶ گرم بر لیتر) گزارش شده است (Amina and Lahlou, 2005).

با توجه به دمای بالای استان خوزستان و همچنین متاثر بودن اراضی تحت کشت از شوری بالا، شناسایی گونه های تریکودرمای مقاوم به دما و شوری بالا حائز اهمیت می باشد. بنابراین پژوهش حاضر به منظور شناسایی جدایه های جدید تریکودرما با توانایی تحمل شوری بالا به منظور استفاده برای افزایش رشد گیاه در نواحی شور انجام شده است. نتایج حاصل برای تعیین گونه مقاوم و استفاده از آن در کنترل عوامل بیماریزای گیاهان گرمسیری و القای مقاومت گیاهان در برابر تنشهای محیطی مفید خواهد بود. بنابراین با توجه به توسعه اراضی شور در کشور و خصوصا خوزستان این پژوهش در راستای افزایش تحمل گیاهان به شوری با استفاده از قارچ‌های محرک رشد گیاه انجام شد.

مواد و روش ها

جدایه‌های تریکودرما

تعداد ده جدایه تریکودرما از هفت گونه از گروه گیاهپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز تهیه شد (Mehrabi Koshki et al., 2015). این جدایه‌ها شامل: *T. capillare*Isf-7، *T. virens* Ham-65، *T. pleuroticola* Isf-11، *T. virens* Isf-77، *T. hrazianum* Isf-60، *T. koningiopsis* Arak-12، 96، *T. brevicompactum* Arak-146 و *T. harzianum* Isf-B بودند. جدایه‌ها برای کوتاه مدت روی محیط PDA و برای درازمدت بصورت توده‌های اسپور در لوله‌های محتوی ماسه نگهداری شدند.

غربالگری جدایه‌ها از نظر تحمل به شوری

به منظور بررسی اثر شوری بر برخی جدایه‌های تریکودرما آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در سه تکرار به اجرا درآمد. تیمارهای آزمایش شامل پنج سطح شوری (۹،۷، ۱۳، ۳۰، ۶۰ دسی‌زیمنس بر متر) از سه منبع کلرید سدیم، کلریدکلسیم و کلرید منیزیم به نسبت۱:۲:۳ و شاهد(محیط کشت بدون افزودن نمک) و ۱۰جدایه *تریکودرما* بود. اثر شوری بر روی رشد جدایه های تریکودرما با قرار دادن یک پلاگ پنج میلیمتری از حاشیه در حال رشد هرکدام از جدایه ها برروی تشتک‌های حاوی محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز آگار حداقلی (- ¼strength PDA) انجام شد. این محیط‌های حداقلی دارای غلظت های مختلف نمک به منظور رسیدن به شوری های تعریف شده بود. تشتک‌های مایه‌زنی شده در دمای ۳۰-۲۸ درجه سلسیوس به مدت سه روز نگهداری شدند و میزان رشد شعاعی پرگنه‌ها در ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از انتقال پلاگ اندازه‌گیری شد. میزان رشد قارچ در ۲۴ ساعت اولیه، جهت جلوگیری از تاثیر خطای دیسک گذاری در آنالیزهای آماری حذف شد. میزان بازدارندگی رشد شعاعی جدایه‌ها با استفاده از معادله زیر تعیین گردید (Amalraj et al., 2010).

$$\text{درصد بازدارندگی از رشد} = \frac{\text{میانگین رشد شعاعی تیمار(میلیمتر)- میانگین رشد شعاعی شاهد(میلیمتر)}}{\text{میانگین رشد شعاعی شاهد(میلیمتر)}} \times ۱۰۰$$

در نهایت شاخص EEC50 (Effective EC for 50% growth reduction) برای تعیین میزانی از شوری

که باعث بازدارندگی ۵۰ درصد رشد قارچ می گردد با استفاده از نرم افزار Origin lab 9.1 تعیین گردید.

غربالگری جدایه از نظر تحمل به دمای بالا

اثر دما بر روی رشد جدایه‌های تریکودرما با قرار دادن یک پلاگ پنج میلیمتری از حاشیه در حال رشد هرکدام از جدایه ها برروی تشتک حاوی محیط کشت جامد سیب-زمینی-دکستروز- آگار انجام شد. سپس تشتک ها در دمای ۳۰، ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس به مدت سه روز نگهداری شدند. میزان کاهش رشد شعاعی جدایه‌ها در دمای بالا نسبت به دمای ۳۰ درجه سلسیوس به عنوان کنترل با استفاده از معادله فوق تعیین گردید(Amalraj et al., 2010). تجزیه واریانس داده‌ها، با نرم افزار SAS (نسخه ۹) و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

تاثیر برترین جدایه از نظر تحمل به شوری و دما بر رشد گیاه ذرت تحت تنش شوری

تهیه مایه تلقیح قارچ

از کشت تازه جدایه *T. harzianum* Isf-60، بر روی تشتک حاوی محیط کشت جامد سیب‌زمینی-دکستروز-آگار برای تهیه سوسپانسیون اسپور استفاده شد. بدین منظور اسپور قارچ با استفاده از آب مقطر سترون جمع آوری و سوسپانسیون اسپور با استفاده از اسلاید هموسیتومتر در سطح $۵*۱۰^{۶}$ در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید.

کشت ذرت در شرایط درون شیشه ای

بذرهای سالم ذرت(سینگل کراس ۷۰۴) که داری قوه نامیه بالایی بودند(۹۸ درصد) ازمرکز تحقیقات صفی آباد دزفول تهیه شد. قبل از تلقیح، بذور را به مدت ۳۰ ثانیه با الکل ۹۶ درصد و سپس به مدت ۱/۵ تا ۲ دقیقه در محلول وایتکس ۱۰ درصد ضدعفونی سطحی کرده و با آب مقطر سترون ۷ تا ۸ مرتبه شستشو داده شدند. بذور در سوسپانسیون اسپور به دفعات متناوب غلت داده شدند. سپس به تعداد یک بذر در لوله‌های حاوی ۰/۸ درصد آب-آگار با شوری‌های (۲، ۵ و ۸ دسی‌زیمنس برمتر) در پنج تکرار کشت شدند. لوله‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در شرایط ۱۶ ساعت روشنایی، ۸ ساعت تاریکی به مدت دو هفته نگهداری شدند. طول ریشه-چه، ارتفاع گیاه، وزن تر و خشک اندامهای هوایی و زمینی اندازه‌گیری و سپس داده‌ها با نرم افزار SAS (نسخه ۹) در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج و بحث

تاثیر شوری بر جدایه‌های تریکودرما

نتایج تجزیه واریانس اثر سطوح مختلف شوری بر رشد ۱۰ جدایه تریکودرما در جدول۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد رشد شعاعی قارچ تحت تاثیر سطوح شوری(درسطح یک درصد)، نوع جدایه و اثرمتقابل جدایه و شوری(در سطح یک درصد) قرار داشت.

مقایسه میانگین اثر متقابل شوری و قارچ(شکل۱) نشان دهنده تفاوت جدایه‌ها از نظر تحمل به سطوح مختلف شوری بود. رشد تمام جدایه‌ها در سطوح شوری ۳۰ و ۶۰ دسی زیمنس بر مترکاهش یافت. بیشترین(۱۰۰درصد بازدارندگی) و کمترین(۱۲/۱۶ درصد بازدارندگی) کاهش رشد در سطح شوری ۶۰ دسی زیمنس بر متر به ترتیب مربوط به جدایه‌های *T. capillare* Isf-7 و *T. harzianum* Isf-60 بود. در سطح شوری ۷ دسی‌زیمنس بر متر رشد جدایه‌های *T. brevicompactum* Arak-146 ، *T. capillare* Isf-7 و*T. virens* Isf-77 و در سطوح شوری ۹ و ۱۳ دسی‌زیمنس بر متر رشد جدایه-های *T. brevicompactum* Arak-146 ، *T. capillare* Isf-7، *T. virens* Isf-77 و *T. harzianum*Isf-B کاهش یافت. درحالیکه سطوح شوری ۷، ۹ و ۱۳ دسی‌زیمنس برمتر نه تنها عامل بازدارنده رشد جدایه‌های *T. koningiopsis* Arak-96، *T. harzianum* Isf-60، *T. asperellum* Arak-12، *T. pleuroticola* Isf-15، *T. pleuroticola* Isf-11 و*T. virens* Ham-65 نبود بلکه باعث افزایش رشد قارچ شد، هر چند با افزایش سطح شوری از ۹ به ۱۳ دسی‌زیمنس بر متر، رشد این جدایه‌ها کاهش داشت. این امر نشان دهنده نقش محرک

جدول ۱- میانگین مربعات اثر تیمارها بر بازدارندگی رشد قارچ
Table 1. Mean square of treatments effect on fungal growth inhibition

Source of variation	df	Inhibition
fungus	9	7838.62**
Salinity	4	22728.51*
Fungus*Salinity	36	479.93**
Error	100	5.07
CV		11.17

*, ** significant at P<0.05 and P<0.01, respectively

رشدی بعضی از سطوح نمک برای قارچ‌های مذکور است. نتایج مقادیرEEC50 نیز نشان داد قارچ *T. hrazianum* Isf-60 توانایی بالایی در تحمل شوری داشت(جدول۲) و قارچ *T. capillare* Isf-7 حساس‌ترین جدایه به مقادیر مختلف شوری است. گونه‌های مختلف تریکودرما از نظر تحمل به شوری متفاوت بود.

در مطالعات گذشته، وجود بعضی گونه‌های تریکودرما در بوته‌زارهای مانگرو و نمکی، مناطقی‌که اختلاف پتانسیل اسمزی بسیار بالا دارد، گزارش شده است (Domsch et al., 1980). گونه *T. asperellum* از طریق تجمع ترهالوز، مانوز و رافینوز قادر به تحمل دمای ۳۷ درجه سلسیوس و شوری یک مولار کلرید سدیم بود (Poosapati et al., 2014).

مطالعات نشان داده است تجمع مانوز به میزان ۱۰ تا ۱۵ درصد وزن خشک قارچ‌های رشته‌ای به تحمل تنشهای غیرزنده کمک کرد (Ruijter et al., 2003).

افزایش میزان شوری اراضی کشاورزی در ایران خصوصا خوزستان تاثیر زیادی بر بخش بیولوژیکی خاک شامل جمعیت، تنوع و فعالیت ریزموجودات خاک می‌گذارد. بررسی‌های قبلی نشان دهنده تاثیر معنی‌دار تنش شوری بر کاهش رشد، تولید اسپور و فعالیت انتاگونیستی سویه‌های وحشی *T. harzianum* علیه *Fusarium oxysporum* بود(Kredic et al., 2000).

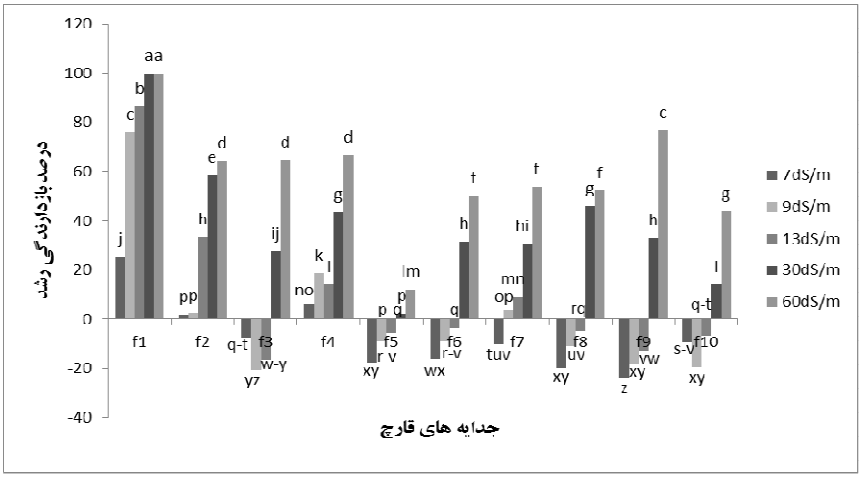
در محیط شورتولید اسپور توسط تریکودرما کاهش و گاها متوقف شده و تنها حضور توده سفید رنگ میسلیوم قارچ قابل مشاهده است(Poosapati et al., 2014). کاهش رشد جدایه‌های مختلف تریکودرما در نتیجه تنش شوری ناشی از نمک کلرید سدیم (۲۰۰تا ۱۶۰۰میلی مولار) گزارش شده است (Bheemaraya et al., 2013).

همچنین Abd-Allah and Omar (1998) کاهش تولید آنزیمهای خارج سلولی پلی گالاکتوروناز توسط قارچ *T. harzianum* را در نتیجه افزایش سطح شوری گزارش کرده‌اند.

نتایج پژوهش حاضر نشان می‌دهد جدایه‌های با توانایی تحمل سطوح شوری بالا، قابل استفاده برای کاهش اثرات تنشی شوری و افزایش رشد گیاه هستند، خصوصا اینکه معمولا منبع شوری خاکها سه نمک سدیم، کلسیم و منیزیم کلرید می‌باشند که در این پژوهش نیز از این سه نمک استفاده شد.

تاثیر دما بر رشد جدایه‌های تریکودرما

با افزایش دما از ۳۰ به ۴۰ درجه سلسیوس هیچ کدام از جدایه‌ها قادر به رشد نبودند. در دمای ۳۵ درجه سلسیوس تنها ۴ جدایه *T. harzianum*Isf-B ، *T. koningiopsis* Arak-96، *T. harzianum* Isf-60 و *T. virens* Ham-65 رشد کردند. تجزیه واریانس(جدول۳) و مقایسه میانگین داده‌ها (شکل۲) نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در رشد جدایه‌ها بود.



شکل ۱-اثر متقابل شوری و نوع جدایه بر درصد بازدارندگی رشد شعاعی قارچ (میانگین‌های با حروف یکسان دارای اثر متقابل معنی‌دار نمی‌باشند).

Figure 1. Salinity and isolate interaction effect on radial growth inhibition percentage of fungus (Means followed by the same letter are not significantly different (Duncan's tests, P>0.05).
f1: *T. capillare* Isf-7, f2: *T. brevicompactum* Arak-146, f3: *T. koningiopsis* Arak-96, f4: *T. virens* Isf-77, f5: *T. harzianum* Isf-60, f6: *T. asperellum* Arak-12, f7: *T. harzianum* Isf-B, f8: *T. pleuroticola* Isf-15, f9: *T. pleuroticola* Isf-11, f10: *T. virens* Ham-65

جدول ۲- مقادیر EEC50 و EEC80 شوری برای جدایه‌ها

Table 2. Salinity EEC50 and EEC80 of isolates

Isolate	EEC80 (dS/m)	EEC50 (dS/m)	R-square
T. capillare Isf-7	9.42	7.90	0.98***
T.brevicompactum Arak-146	81.70	31.75	0.86**
T.koningiopsis Arak-96	77.41	42.72	0.79**
T.virens Isf-77	104.33	38.68	0.98***
T.harzianum Isf-60	310.24	159.06	0.48*
T.asperellum Arak-12	108.92	85.15	0.79**
*T.harzianum*Isf-B	30.93	6.65	0.92**
T.pleuroticola Isf-15	96.55	50.07	0.70**
T.pleuroticola Isf-11	62.75	42.50	0.80**
T.virens Ham-65	108.00	67.59	0.73**

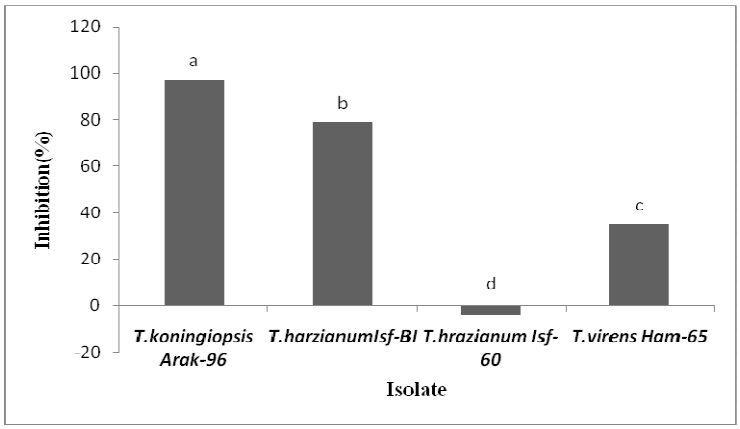
*, **, *** significant at P<0.05, P<0.01 and P <0.001 respectively

جدول ۳- میانگین مربعات اثر دما بر بازدارندگی رشد قارچ

Table 3. Mean square of temperature effect on fungal growth inhibition

Source of variation	df	Inhibition
fungus	3	8230.68**
Error	12	1.197
CV	-	8.59

** Significant at P<0.01



شکل ۲- مقایسه میانگین اثر دمای ۳۵ درجه سلسیوس بر درصد بازدارندگی رشد شعاعی جدایه‌های تریکودرما (میانگین‌های با حروف یکسان، در سطح ۵ درصد آزمون دانکن دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند)

Figure 2. Effect of temperature (35^{0}C) on radial growth inhibition percentage of *Trichoderma* isolates (Means followed by the same letter are not significantly different (Duncan's tests, P>0.05)

بیشترین کاهش رشد مربوط به جدایه *T. koningiopsis* Arak-96 بود و کمترین کاهش رشد به جدایه *T. virens* Ham-65 اختصاص داشت. قابل ذکر است افزایش دما از ۳۰ به ۳۵ درجه سلسیوس اثر تحریک کننده بر رشد جدایه *T.hrazianum* Isf-60 داشت. بیشتر سویه‌های تریکودرما مزوفیل هستند و دمای بهینه رشد آنها ۲۰ تا ۳۰ درجه سلسیوس است (Eastburn and Butler, 1991).

با توجه به تاثیر افزایش دما بر کاهش رشد تریکودرما (Arif Mahmud and Ohmasa, 2008) استفاده موثر از آن در زمینهای کشاورزی با شرایط اقلیمی گرم محدود می‌شود (Magan, 1988). لذا شناسایی سویه‌های برتر تریکودرما از نظر تحمل به دمای بالاتر از حد بهینه رشد، با توجه به افزایش دما و استفاده از آن برای افزایش رشد گیاه و مقابله با عوامل بیماریزای گیاهی سودمند است. Poosapati et al.(2014) جدایه‌های برتر تریکودرما را از نظر تحمل به دمای بالا (۴۸،۵۰،۵۲ درجه سلسیوس) جداسازی کردند. نامبردگان نشان دادند افزایش دما موجب تغییرات مورفولوژیکی جدایه‌ها می‌شود. در بیشتر جدایه‌ها، تولید اسپور کاهش و در مقابل رشد میسلیومی افزایش یافته و رنگدانه زرد بیشتری تولید می‌گرددکه این تغییر رنگ در نتایج پژوهش حاضر نیز مشاهده شد.

جوانه‌زنی قارچ با افزایش دما کاهش می‌یابد(Kim et al., 2010). در دمای بیشتر از ۳۷ درجه سلسیوس رشد تریکودرما وابسته به سطح رطوبت خاک است. محققین طی بررسی تاثیر آب قابل دسترس (Available water)، دما و واکنش محیط کشت بر رشد شعاعی چهار سویه *Trichoderma asperellum* ، نشان دادند تاثیر آب قابل دسترس بر رشد سویه‌های تریکودرما بیشتر از دو پارامتر دیگر است؛ با افزایش دما از ۲۰ به ۳۰ درجه سلسیوس رشد تمام سویه‌ها در مقادیر aw بین ۰/۹۹۵ تا ۰/۹۸۵ بیشتر بود (Begoude et al., 2007).

بنابراین ارزیابی توان تحمل تنشهای محیطی همچون دما و شوری و انتخاب جدایه برتر برای کاربرد در نواحی با تنشهای محیطی به منظور بقا و افزایش مقاومت گیاه در برابر تنشهایی مانند خشکی (Bae et al., 2009)، سرما (Ait Baraka et al., 2006)، دمای بالا (Ali et al., 2009) و شوری (Mastouri et al., 2010) حائز اهمیت می‌باشد.

تاثیر جدایه Isf-60 *T. harzianum* بر رشد ذرت در سطوح مختلف شوری

تجزیه واریانس داده‌ها (جدول۴) نشان دهنده تاثیر معنی‌دار شوری، قارچ و اثر متقابل قارچ و شوری درسطح یک درصد بر صفات اندازه‌گیری شده ذرت بود. اثر متقابل قارچ و شوری(جدول۵) نشان داد با افزایش سطح شوری کلیه صفات اندازه‌گیری شده کاهش معنی‌داری یافت.

تلقیح بذور با Isf-60 *T. harzianum* باعث افزایش میزان صفات اندازه‌گیری شده در تمام سطوح شوری نسبت به بذور تلقیح نشده گردید، که این موضوع نشان دهنده تاثیر معنی‌دار قارچ در افزایش تحمل گیاه به تنش شوری بود.

گزارشات محدودی مبنی برتاثیر قارچها بر افزایش تحمل گیاهان در برابر تنشهای غیرزنده وجود دارد. نتایج مطالعات موجود نشان دهنده تاثیر معنی‌دار تریکودرما برکاهش اثر تنشهای محیطی همچون خشکی(Bae et al., 2009) و شوری (Mastouri et al., 2010) است. بهبود رشد گیاه آرابیدوبسیز توسط تریکودرما در شرایط تنش شوری (Contreras-Cornejo et al., 2011) و همچنین افزایش رشد گندم در نتیجه تلقیح بذور گندم قبل از کشت با *T. harzianum* در محیط شور (EC ۶dS/m) گزارش شده است(Rawat et al., 2011). نامبردگان افزایش ارتفاع گیاهان گندم مایه‌زنی شده با تریکودرما را در نتیجه کم شدن تجمع سدیم در گیاه گزارش نمودند (Rawat et al., 2011).

همچنین تاثیر هورمونهای رشد مانند سیتوکنین مترشحه از تریکودرما در افزایش رشد گیاه مشخص شده است (Benitez et al., 2004; Howell, 2003). کاربرد تریکودرما از طریق بهبود رشد ریشه، افزایش ظرفیت نگهداری آب گیاه(Bae et al., 2009) یا افزایش جذب مواد غذایی مانند پتاسیم (Yildirim et al., 2006) ، تولید متابولیتهایی با فعالیت مشابه هورمون های گیاهی مانند اکسین(Chowdappa et al., 2013) و ACC-دآمیناز(آمینوسیکلوپروپان- کربوکسیلات- دآمیناز) باعث افزایش مقاومت گیاه به تنشهای محیطی و غیر زنده می‌شود (Viterbo et al., 2002). افزایش بیان ژنهای مرتبط با سنتز آنزیم‌های گلوتاتیون رداکتاز و گلوتاتیون اس- ترانسفراز که در افزایش تحمل گیاه در برابر تنش های غیرزنده دخیل هستند در ذرت تلقیح شده با *T. harzianum* ذکر شده است (Mastouri et al., 2010).

جدایه‌های *T. viride* باعث افزایش طول ساقه، طول ریشه و وزن هزار دانه گندم می‌شود (Aggrawal et al., 2001). همچنین گزارشی مبنی بر افزایش رشد گیاه توسط سویه *T. harzianum* با افزایش انحلال فسفات و عناصر ریزمغذی موجود است (Altomare et al., 1999).

جدول ٤- میانگین مربعات اثر شوری و قارچ بر رشد ذرت

Table 4. Mean square of salinity and fungus effect on maize growth

Source of variation	df	Dry weight root	Wet weight of root	Dry weight of arial part	Wet weight of arial part	Root length	Plant height
fungus	1	53.33**	1428.30**	2376.30**	125712.13**	2980.03**	5070.33**
Salinity	2	30.23**	2146.30**	186.10**	20162.80	16990/0**	593.43**
Fungus*Salinity	2	7.23**	118.30**	110.10**	13088.13	37.43**	152.23**
Error	24	0.18	10.21	1.5	18.21	9.05	1.2
CV	-	9.17	6.93	9.49	3.79/	5.58	3.7

** Significant at P<0.01

جدول ۵- مقایسه میانگین اثرات متقابل قارچ و شوری بر رشد ذرت

Table5. Mean comparison of salinity and fungus interaction effect on maize growth

Properties / Treatment	Plant height(mm)	Root length(mm)	Wet weight of arial part (mg)	Dry weight of arial part (mg)	Wet weight of root (mg)	Dry weight root (mg)
F1*S1	30.4^{d}	54.6^{c}	55.6^{d}	5.0^{d}	50.0^{c}	5.0^{c}
F1*S2	27.6^{e}	45.0^{e}	50.0^{e}	4.0^{de}	40.0^{d}	3.0^{d}
F1*S3	22.6^{f}	32.0^{f}	38.0^{f}	3.0^{e}	27.0^{f}	2.0^{e}
F2*S1	65.0^{a}	79.0^{a}	260.0^{a}	29.0^{a}	70.0^{a}	7.0^{b}
F2*S2	51.6^{b}	62.8^{b}	174.0^{b}	22.6^{b}	55.0^{b}	7.6^{a}
F2*S3	42.0^{c}	49.6^{d}	98.0^{c}	13.8^{c}	34.0^{e}	3.4^{d}

(Means followed by the same letter are not significantly different (Duncan's tests, P>0.05).
(F1: without inoculation; F2: with inoculation; S1:2dS/m; S2:5dS/m; S3:8dS/m)

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد سطوح مختلف شوری تاثیر متفاوتی بر رشد جدایه‌های مختلف تریکودرما داشت. در برخی جدایه ها با افزایش سطح شوری تا حد معینی رشد قارچ نه تنها کاهش نیافت بلکه افزایش نشان داد. به طور کلی رشد جدایه‌ها تحت تاثیر دما و شوری بالا محدود می‌گردد. جدایه *T. hrazianum* Isf-60 تحمل قابل توجهی به سطوح شوری بالا و همچنین دمای ۳۵ درجه سلسیوس داشت و موجب تحریک رشد گندم در سطوح مختلف شوری شد.

REFERENCES

Abd-Allah, M.H., and Omar S.A. 1998. Wheat straw and cellulytic fungi application increase nodulation, nodule efficiency and growth of fenugreek grown in saline soil. Biology and Fertility of Soils, 26: 58-65.

Aggarawal, R., Srivastava, K.D., and Singh, D.V. 2001. Biological control of loose smut of wheat: seed treatment with *Trichoderma viride* and its influence on plant growth. Annals of Plant Protection Sciences, 9: 63-67.

Ait Baraka, E., Nowak, J., and Clement, C. 2006. Enhancement of chilling resistance of inoculated grapevine plantlets with a plant growth promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain psjn. Applied and Environmental Microbiolgy, 72: 7246-7252.

Ali, S.K.Z., Sandhya, V., Minakshi, G., Kishore, N., and Venkateswar Rao, L. 2009. *Pseudomonas* sp. strain AKM-P6 enhances tolerance of sorghum seedlings to elevated temperatures. Biology and Fertility of Soils, 46: 45-55.

Altomare, C., Norvell, W.A., Bjorkman, T., and Harman, G.E. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai. Applied and Environmental Microbiology, 65: 2926-2933.

Amalraj, D., Kumar,P., Desai, S., and Ahmed, S.K. 2010. In vitro Characterization of *Trichoderma viride* for abiotic stress tolerance and field evaluation against root rot disease in *Vigna mungo* L. Journal of Biofertilizers and Biopesticides, 2(3): 1-5.

Amina, R., and Lahlou, H. 2005. Effect of salinity on in vitro *Trichoderma harzianum* antagonism against *Vericellium dhaliae*. Pakistan Journal of Biological Science, 8: 872-876.

Arif Mahmud, M., and Ohmasa, M. 2008. Effect of culture conditions on high temperature tolerance of *Lentinula edodes* mycelia. Pakistan Journal of Biological Science, 11: 342– 350.

Bae, H., Sicher, R. C., Kim, M. S., Kim, S.H., Strem, M.D., Melnick, R.L., and Bailey, B. A. 2009. The beneficial endophyte *Trichoderma hamatum* isolate DIS 219b promotes growth and delays the onset of the drought response in *Theobroma cacao*. Journal of Experimental Botany, 60: 3279-3295

Begoude, B.A.D., Lahlali, R., Friel, D., Tondje, P.R., and Jijakli, M.H. 2007. Response surface methodology study of the combined effects of temperature, pH, and aw on the growth rate of *Trichoderma asperellum*. Journal of Applied Microbiology, 103: 845 – 854.

Benitez, T., Rincon, A M., Limon, M.C., and Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, 7: 249–260.

Bheemaraya, M.B., Yenjerapa, S.T., Amaresh, Y.S., and Naik, M. K. 2013. Salinity stress tolerance in native *Trichoderma* isolates. Environment and Ecology, 31: 727-729.

Brotman, Y., Landau, U ., Cuadros-Inostroza, Á., Tohge, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A., and Willmitzer, L. 2013. *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. PLOS Pathogens, 9: e1003221.

Chowdappa, P., Kumar, S.P., and Upreti, K. 2013. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPBI or *Trichoderma harzianum* OTPB3. Biological Control, 6: 109-117.

Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Beltrán-Peña, E., Herrera- Estrella, A., and López-Bucio, J. 2011. *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal and camalexin dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. Plant Signaling and Behavior, 6: 1554-1563.

Contreras-Cornejo, H. A., Ortiz-Castro, R., and López-Bucio, J. 2013. In Mukherjee, P. K., Horwitz, B. A., Singh, U. S., Schmoll, M. (eds.), Promotion of plant growth and the induction of systemic defense by *Trichoderma*: physiology, genetics and gene expression. *Trichoderma:* biology and applications. CABI, London. pp: 175-196.

Djonovic, S., Vargas, W.A., Kolomiets, M.V., Homdeski, M., Wiest, A., and Kenerley, C.M. 2007. A proteinaceous elicitor Sm1 from the beneficial fungus *Trichoderma virens* is required for induced systemic resistance in maize. Plant Physiology, 145: 875-889.

Domsch, K. H., Gams, W., and Anderson, T. H. 1980. Compendium of soil fungi. London; New York: Academic Press.

Eastburn, D.M., and Butler, E.E. 1991. Effect of soil moisture and temperature on the saprophytic ability of *Trichoderma harzianum*. Mycologia, 83(3): 257 – 263.

Hariadi, Y., Marandon, K., Tian, Y., Jacobsen, S. E., and Shabala, S. 2011. Ionic and osmotic relations in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) plants grown at various salinity levels. Journal of Experimental Botany, 62: 185-193.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, a virulent plant symbionts. Nature Reviews, 2: 43-56.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., and Monte, E. 2012. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. Microbiology, 158: 17–25.

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 Journal, 87: 4–10.

Jafari, M. 1990. Salinity and its effect on soil and plant. Jahade Daneshgahi Publication, Tehran. P: 360. (in Farsi).

Kim, J. S., Skinner, M., Hata, T., and Parker, B.L. 2010. Effects of culture media on hydrophobicity and thermotolerance of Bb and Ma conidia, with description of a novel surfactant based hydrophobicity assay. Journal of Invertebrate Pathology, 105(3): 322– 328.

Kredic, L., Antal, Z., and Manczinger, L. 2000. Influence of water potential on growth, enzyme secretion and in vitro enzyme activitie of *Trichoderma harzianum* at different temperatures. Current Microbiology, 40: 310-314.

Magan, N.1988. Effects of water potential and temperature on spore germination and germ tube growth in vitro and on straw leaf sheaths. Transactions of the British Mycological Society Journal, 90(1): 97 –107.

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. Phytopathology, 100(11): 1213-1221.

Mehrbi Kushki, M., Bavarsad, M., Farrokhi Nezhad, R., Jamshidi, M., and Alimohammadi, A. 2015. Identification of *Trichoderma* isolates by partial sequencing of rDNA and Tef1α genes. Final Report of Internal Project. Shahid Chamran University of Ahvaz. P: 37.

Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, 23: 23-54.

Poosapati, S., Ravulapall, P.D., Tippirishetty, N., and Vishwanathaswamy, D.K. 2014. Selection of high temperature and salinity tolerant *Trichoderma* isolates with antagonist activity against *Sclerotium rolfsii.* SpringerPlus, 3: 641-742.

Ragazzi, A., Vecchio, V., Dellavalle, I., Cucchi, A., and Mancini, F. 1994.Variations in the pathogenicity of *Fusarium oxysporum* F.sp. vasinfectum (FOV) in relation to salinity of the nutrient medium. Journal of Plant Disease and Protection, 101(3): 263– 266.

Rawat, L., Singh, Y., Shukla, N., and Kumar, J. 2011. Alleviation of the adverse effects of salinity stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) by seed biopriming with salinity tolerant isolates of *Trichoderma harzianum*. Plant and Soil, 347: 387-400.

Roiger, D. J., Jeffers, S. N., and Caldwell, R. W. 1991. Occurrence of *Trichoderma* species in apple orchard and woodland soils. Soil Biology & Biochemistry, 23: 353-359.

Ruijter, G.J.G., Bax M, Patel, H., Flitter, S.J., van de Vondervoort, P.J.I., De Vries, R.P., Van Kuyk, P.A., and Visser, J. 2003. Mannitol is required for stress tolerance in *Aspergillus niger* conidiospores. Eukaryotic Cell, 4: 690 –698.

Shabala, S., and Cuin, T. A. 2008. Potassium transport and plant salt tolerance. Physiologia Plantarum, 133: 651-669.

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.

Taherzadeh, M.H. 2004. The distribution determination of saline and sodic soils in Khuzestan province by RS-DIS and consideration those improvement methods using ordinary and saline water. Proceedings of the Conference on Water, Agriculture and Future Challenges. Pp: 64-85.

Velázquez-Robledo, R., Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Hernández-Morales, A., Aguirre, J., Casas-Flores, S., López-Bucio, J., and Herrera-Estrella, A. 2011. Role of the 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* in secondary metabolism, and induction of plant defense responses. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 24: 1459-1471.

Viterbo, A., Montero, M., Ramot, O., Friesem, D., Monte, E., Llobell, A., and Chet, I. 2002. Expression regulation of the end *Ochitina sechit* 36 from *Trichoderma asperellum* (*T.harzianum* T-203). Current Genetics, 42: 114-122.

Woo, S.L., and Lorito, M. 2006. Exploiting the interactions between fungal antagonists, pathogens and the plant for biocontrol. 1st ed. Springer, Amsterdam.

Yildirim, E., Taylor, A. G., and Spittler, T. D. 2006. Ameliorative effect of biological treatments on growth of squash plants under salt stress. Scientia Horticulturae, 111: 1-6.

Zhang, H., Kim, M. S., Sun, Y., Dowd, S. E., Shi, H., and Paré, P.W. 2008. Soil bacteria confer plant salt tolerance by tissue-specific regulation of the sodium transporter HK T1. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal, 21: 737-744.

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 39(2) Summer 2016

Screening of salinity and temperature tolerant *Trichoderma* isolates, and the effect of superior isolate on corn (*Zea mays*) growth under in vitro conditions

F. Nasrabadi[1], N. Enayatizamir[2]*, M. Mehrabi-Koushki[3] and M. Shomeili[4]

1. M.Sc. Student, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2. *__Corresponding Author__: Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
4. Manager of Agronomy Department, Sugarcane and Byproducts Research and Training Institute of Khuzestan, Iran

Received: 26 September 2015 Accepted: 13 February 2016

Abstract

Many biocontrol isolates of *Trichoderma* improve plant growth and yields by increasing plant tolerance to environmental stresses. In order to evaluate the effect of salinity stress on 10 isolates from seven species of *Trichoderma*, an experiment was carried out as a randomized design with three replications. The treatments included five levels of salinity (7, 9, 13, 30 and 60dS/m) from NaCl, CaCl2, MgCl2 sources and 10 isolates of *Trichoderma*. Salt stress effect on the radial growth of isolates was monitored on PDA medium (1/4-Strenghth PDA) containing different concentrations of salts. The incubation temperature influence (30, 35 and 40˚C) was also evaluated on the radial growth of *Trichoderma* isolates. The results demonstrated the inhibitory effect of salinity on fungal growth and a significant difference among isolates. The tolerant isolate with 12 percent growth inhibition on PDA medium containing 60dS/m salinity was *T. harzianum* Isf-60 and the sensitive isolate with 100 percent growth inhibition was *T. capillare* isf-7. None of the isolates was able to grow at 40˚C, while only 4 isolates from 10 isolates were able to grow at 35˚C. These isolates were *T. harzianum* Isf-B, *T. koningiopsis* Arak-96, *T. harzianum* Isf-60 and *T. virens* Ham-65. The incubation temperature increment from 30 to 35˚C caused inhibition in the growth of 3 above mentioned isolates while promoted the growth of *T. hrazianum* Isf-60. The results of maize inoculation with salinity and temperature tolerant isolate (*T. hrazianum* Isf-60) indicated a significant effect of this fungus on increasing wet and dry weight and height of root and shoot of plants grown under both saline and non-saline conditions.

Keywords: Growth increment, Inhibition, Radial growth, Salinity, Trichoderma