مجله علوم گیاهان زراعی ایران
دوره ۴۴، شماره ۱، ۱۳۹۲ (۴۵-۳۵)

تاثیر بیوپرایمینگ بر مولفه‌های جوانه‌زنی، صفات فیزیولوژیکی، آنزیم های آنتی اکسیدانت و کنترل بیماری رایزوکتونیایی لوبیا (*Phaseolus vulgaris L.*)

محمد انتصاری[1*]، فرزاد شریف زاده[2]، محمد دشتکی[3] و مسعود احمد زاده[4]
۱، ۲، ۳، ۴، دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، کارشناس و دانشیار پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۲۷ - تاریخ تصویب: ۹۱/۸/۲۴)

چکیده

در دو آزمایش جداگانه اثر بیوپرایم برخی جدایه های *Trichoderma* spp. و باکتری *Pseudomonas fluorescens* بر خصوصیات مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی لوبیا رقم یاس و همچنین اثر تیمارهای مذکور بر کنترل بیماری رایزوکتونیا سولانی(*Rhizoctonia solani*) گیاه مذکور مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش اول بصورت فاکتوریل در قالب بلوک های کامل تصادفی در سه تکرار اجرا گردید. فاکتور اول آزمایش جدایه‌های قارچ و باکتری شامل *Trichoderma harzianum bp4*، *Trichoderma virens As 10-5* ، *Trichoderma atroviride Cs2-1* و فاکتور دوم مورد آزمایش تیمارهای مختلف پرایمینگ بذرها شامل بدون پرایم و پرایم با سولفات روی و سالیسیلیک اسید بود. صفات مورد اندازه‌گیری در این آزمایش شامل طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه و طول گیاهچه، وزن خشک ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه و گیاهچه، سطح برگ، مقدار کلروفیل، درصد نیتروژن و محتوی آهن و آنزیم های آنتی اکسیدانت بود. آزمایش دوم بصورت بلوک کامل تصادفی در سه تکرار بود. تیمارهای مورد بررسی در این آزمایش شامل ترکیب تیماری مختلف بیوپرایم در آزمایش اول و صفت مورد ارزیابی بیماری‌زای گیاهچه های حاصل از بذرها تیمار شده بود. بذرهایی که با سولفات روی پرایم شده و با تریکودرما تیمار شدند نسبت به بقیه ترکیب های تیماری خصوصیات رشدی از جمله وزن خشک گیاهچه، و درصد نیتروژن بیشتری داشتند. بیشترین محتوی آهن (۲۶۵/۶mg/kg) از بذور پرایم شده با سولفات روی و تیمار شده با باکتری UTPF5 بدست آمد. بذرهای که با سالیسیلیک اسید پرایم گردیده و با باکتری UTPF5 تیمار گردیدند دارای فعالیت آسکوربات پراکسیداز((۱۷/۴ APX(U.mg^{-1}proteins) بیشتری نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی بودند. بیشترین کاهش بیماری نیز تحت تاثیر ترکیب تیماری اخیر(۷۷/۳۳٪) بدست آمد.

واژه های کلیدی: تریکودرما، بیوپرایمینگ، لوبیا، خصوصیات رشدی، آنزیم های آنتی اکسیدانت

مقدمه

حبوبات و در بین آنان لوبیا از مهمترین منابع تأمین پروتئین گیاهی بشر می باشند. لوبیا با دارا بودن ۲۰-۲۵ درصد پروتئین و ۵۰-۶۵ درصد کربوهیـــدرات با ارزش-ترین حبوبات از نظر خوراکی در سرتاسر دنیا و همچنین ایران می باشد. این گیاه همچنین بخاطر قدرت تثبیت ازت اتمسفری در ریشه که سبب حاصلخیزی و اصلاح خاک می گردد، از اهمیت زیادی برخوردار بوده و دارای بیشترین سطح زیر کشت در بین سایر حبوبات می باشد (Majnoun Hosseini, 2008). استفاده از عناصر ریز

* نویسنده مسئول: محمد انتصاری تلفن: ۰۹۳۷۵۹۳۲۵۶۲ E-mail:Mentesari@ut.ac.ir

مغذی بخصوص عنصر روی (Zn) دارای اثراتی مثبت بر رشد گیاهچه و جوانه زنی درگیاهانی مانند گندم و نخود بوده است(Harris et al., 2008) و با توجه به اینکه کمبود روی یکی از مهمترین و گسترده‌ترین کمبودهای عناصر ریزمغذی در دنیا می‌باشد که سبب کاهش در تولید محصولات زراعی می گردد(Cakmak, 2008) در تحقیق حاضر از این عنصر با توجه به اینکه شواهد نشان می دهد در طی پرایمینگ مکانیزمهای فیزیولوژیکی بسیاری رخ می دهد، مانند: ترمیم آسیبهای وارده به سلولهای بذر، پیشرفت وقایع متابولیکی که در فاز دوم جذب آب اتفاق افتاده و منجر به خروج ریشه چه می گردند و وقایعی مثل تسهیم بهتر آندوسپرم و مواد ذخیره ای که اجازه رشد بیشتر جنین را می دهند، ممکن است در طی پرایمینگ بذر اتفاق بیافتند و کارآیی آن را افزایش می دهند (Jie, 2002). برای افزایش مولفه های رشد و همچنین کنترل بیمار های خاکزاد، دراین روش به جای تیمار شیمیایی بذر از عوامل بیولوژیک مثل قارچها و باکترها استفاده می گردد، که مهمترین آنها شامل قارچ تریکودرما (*Trichoderma* spp.) و باکتری سودوموناس فلورسنت (*Pesodomonas flurescens*)می‌باشد، که در سالهای اخیر تحقیقات وسیعی روی آنها صورت گرفته است. قارچهای تریکودرما سبب افزایش حلالیت فسفر و عناصر میکرو شده و قابلیت دسترسی این عناصر را برای گیاه افزایش می دهد. افزایش جذب عناصر غذائی در نتیجه فعالیت قارچ‌های تریکودرما نیز می‌تواند سبب افزایش رشد و بنیه گیاه شده و گیاه را در برابر عوامل بیماریزا مقاوم سازد (Singh et al., 2007). در بسیاری از گزارشات کنترل بوسیله تریکودرما خیلی بهتر از قارچ کش‌های شیمیایی بوده است بطوریکه در مقایسه با قارچ کش های شیمیایی، کنترل بوسیله تریکودرما یک کاهش ۳۳٪در آلودگی بیماری های نشان داد، استفاده از تریکودرما هارزانیوم و قارچ‌کش کربوکسین تیرام به میزان ۲ گرم بر کیلوگرم بذر برای تیمار شده بهبود جوانه‌زنی را ۱۲ تا ۱۴ درصد و عملکرد دانه را حدود ۴۲/۶ تا ۷۲/۹ درصد و شیوع بیماری را حدود ۴۴/۱تا ۶۰/۳٪ کاهش داد (Dubey, 2007). در بین باکتری‌های محرک رشد گیاه، باکتری‌های جنس سودوموناس به دلیل توزیع گسترده در خاک، توانایی کلونیزه کردن ریزوسفر بسیاری از گیاهان و تولید طیف متنوعی از متابولیت‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. این باکتری‌ها دارای طیف گسترده‌ای از صفات محرک رشد گیاهی مانند تولید اکسین (Patten & Glick, 2002)، تولید آنزیم ACC (آمینو سیکلوپروپان -۱-کربوکسیلیک اسید) دی آمیناز، حل کنندگی فسفات (Rashid et al., 2004)، تولید سیدروفور، سالیسیلیک اسید، کیتیناز (Ajit et al., 2006) و سیانید هیدروژن می‌باشند که به طور مستقیم یا غیر مستقیم باعث افزایش رشد گیاه می گردند(Haas & Geneviève, 2005). تیمارهای بیولوژیک رشد گیاه را افزایش و مکانیسم های مقاومت در گیاه را فعال می کنند (Harman et al., 2007). آلودگی های بافت های گیاهی به این ریز موجودات موجب القای تقسیم سلولی توسط سیتوکنین و تشکیل ساختارهای ویژه می شود، مانند قارچ ریشه مایکوریزا، تریکودرما، سودوموناس فلورسنس که در آن، یک رابطه همزیستی دو جانبه با گیاه است. در ضمن تولید سیتوکنین در ریشه موجب افزایش ریشه‌های جانبی و در برگ باعث تولید کلروپلاست‌های با گرانای گسترش یافته و کلروفیل و آنزیم‌های فتوسنتزی با سرعت بیشتری ساخته می شوند(Sakakibara, 2006).

آنتاگونیست ها از طریق دو مسیر[1](SAR) و[2](ISR) می توانند سبب القای مقاومت در گیاه بشوند و این دومسیر بترتیب تحت تاثیر سالیسیلیک اسید و اتیلن - جاسمونات قرار می‌گیرند که آنزیم های آنتی اکسیدانتی سیگنالهای برای فعال کردن این مسیرها محسوب می شوند (Segarra et al, 2007). سیستم‌های آنتی-اکسیدانتی شامل آنزیم‌ها و متابولیت‌های آنتی‌اکسیدانتی باعث حذف‌گروه‌های فعال اکسیژن می شوند. متابولیت های آنتی‌اکسیدانتی مانند ویتامین E، اسید آسکوربیک و دیگر ترکیبات به ویژه در بذر و برگ‌ها نقش مهمی دارند (Bailly, 2004). آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانت شامل کاتالاز، پراکسیداز، سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم‌های دیگر باعث حذف و غیر فعال شدن گونه های فعال

1. systemic acquired resistance
2. induced systemic resistance

اکسیژن می شوند (Bailly, 2004, McDonald, 1999). آنزیم کاتالاز به طور مستقیم باعث تجزیه پراکسید هیدروژن (H_2O_2) می‌شود (Jiang& Huang, 2001). آنزیم آسکوربات پراکسیداز در چرخه گلوتاتیون- آسکوربات با استفاده از آسکوربات به عنوان دهنده الکترون موجب تجزیه پراکسید هیدروژن می شود، که با حذف پراکسید هیدروژن و رادیکال های سوپراکسید در طی واکنش هابر- وایس می شوند(Sung, 1996). در این تحقیق سعی بر آن شد تا با بررسی تیمارهای پرایمینگ بذر به همراه مواد بیولوژیک و تاثیر آن بر مولفه‌های رشدی، فیزیولوژیکی و همچنین تاثیر آن بر کنترل بیماری *Rhizoctonia solani* لوبیا، نگرشی جدید در استفاده از تیمارهای بذری و بیولوژیک را رقم بزنیم.

مواد و روش‌ها

مواد آزمایشی مورد استفاده جدایه هایی از ۳ گونه تریکودرما که قبلاً به کمک روشهای مولکولی شناسایی شده بودند (Naimi, et al 2011)، مورد استفاده قرار گرفتندکه شام*Trichoderm harzianum bp4*،*As10-5* *Trichoderma virens* و *Trichoderma atroviride* *Cs2-1* بودند. و جدایه باکتری *Pseudomonas UTPF5* *fluorescens* و قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* (AG4) بود که از آزمایشگاه کنترل بیولوژیک گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران تهیه شدند. لوبیا سفید رقم یاس از بانک ژن گروه زراعت و اصلاح نباتات تهیه گردید. پرایمینگ با سولفات روی($ZnSo_4$) و سالیسیلیک اسید(SA) صورت گرفت.تیمار۲۵ppm در دمای ۱۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت برای سالیسیلیک اسید و سولفات روی تیمار ppm ۳۰۰ در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۸ ساعت به عنوان تیمار پرایمینگ مورد استفاده قرار گرفت.

بیوپرایمینگ بذور

برای این کار ابتدا بذرها را پرایمینگ کرده و بعد از مدت معین که در بالا ذکر گردید از محیط محلول پرایمینگ خارج و پس از ۳ بار شستشو با آب مقطر بمدت ۲۴ ساعت خشک گردیدند و سپس با اسپور قارچ تریکودرما و سلولهای باکتری تلقیح شدند. تیمارهای استفاده شده شامل (۱) پرایمینگ با سولفات روی، (۲) پرایمینگ با سالیسیلیک اسید و (۳) حالت بدون پرایمینگ و تیمار بیولوژیک شامل: جدایه‌های قارچ تریکودرما و یک جدایه از باکتری سودوموناس فلورسنس، که در ترکیب با تیمارهای پرایمینگ به کار برده شد و شاهدها شامل: (۱) تیمار پرایمینگ با سولفات روی، (۲) پرایمینگ با سالیسیلیک اسید و (۳) حالت بدون پرایم،که طرح آزمایشی بصورت فاکتوریل در قالب بلوک کامل تصادفی بود. در همه آزمایشات صورت گرفته ترکیب های تیماری بالا به کاربرده شد و طرح همه تیمارها نیز بدین صورت بود. صفات اندازه گیری شده در این آزمایش شامل: طول ریشه‌چه، طول ساقه-چه و طول گیاهچه، وزن خشک ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه و وزن خشک گیاهچه، سطح برگ، کلروفیلa، کلروفیلb، کلروفیل کل، محتوی آهن و درصد نیتروژن، فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی ومیزان کنترل بیماری رایزوکتونیایی لوبیا بود.

روش آغشته سازی بذر با اسپور تریکودرما

پرگنه‌های جدید قارچ روی محیط PDA[1] تهیه شد. پس از رشد قارچ و اسپوردهی فراوان و متراکم قارچ، به داخل ارلن سترون ریخته شد. تعداد اسپورها شمارش شد اسپورهای قارچ جدایه‌های تریکودرما با غلظت ۳×۱۰^{۷} با استفاده از روش رقت سریالی با آب مقطر استریل تهیه شد. به منظور بهتر چسبیدن اسپور تریکودرما به سطح بذور لوبیا مقدار یک درصد متیل سلولز به عنوان چسباننده به سوسپانسیون اسپور تریکودرما اضافه شد و در نهایت از سوسپانسیون مذکور به نسبت ۱۰ میلی لیتر در هر ۱۰۰ گرم بذر با بذرهای از پیش سترون شده مخلوط شد و در داخل ارلن و روی شیکر با دور ۱۲۸ و زمان ۴۵ دقیقه قرار گرفتند. بعد از یک ساعت، بذرهای تیمار شده روی کاغذهای سترون در زیر هود سترون قرار گرفته تا کاملاً خشک شوند. برای اطمینان از وجود اسپور تریکودرما در سطح بذر، ۱گرم از بذرها را در محلولی که حاوی توین ۲۰ بود قرار داده شد و با استفاده از روش سری رقت سریالی، در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون را برداشته و روی محیط کشت PDA ریخته و بعد از ۲۴ ساعت اسپورهای جوانه زده

1. Potato dextrose agar

شمارش شدند. تعداد اسپورها در سطح بذور به مقدار ۲×۱۰^{۷} بود (Harman, 2008).

روش آغشته سازی بذر با باکتری آنتاگونیست

به منظور آغشته سازی بذر به جدایه های آنتاگونیست از روش (weller et al., 1983) استفاده شد. یک لوپ کامل از کشت ۴۸ ساعته هر جدایه آنتاگونیست باکتریایی روی محیط کینگ بی به فلاسک های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع کینگ بی منتقل شده و به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) در دمای$۲۷^{o}C$ قرار گرفت. سلول های باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ(به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰۰۰g) رسوب داده شدند و چند بار با محلول نمک فیزیولوژیک برای برطرف شدن باقیمانده محیط غذایی شستشو شدند. سپس سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ مجدد از این محلول جداسازی شده و بعد از تعیین جمعیت سوسپانسیون ۱×۱۰^{۷} آنها در محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز در سطح بذر قرار گرفتند.

میزان کلروفیل

برای اندزه گیری میزان کلروفیل از برگ هایی که نمو آنها بطور کامل صورت پذیرفته بود استفاده شد. برای این منظور از روش تغییر یافته (Arnon, 1949) استفاده شد.

بدین ترتیب که ۰/۵ گرم از هر نمونه برگ را در ۵ میلی لیتر استون۸۰٪ هموژن گردید و بعد از انجام سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه مایع روئی برداشته شد و حجم آن به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس میزان جذب نور با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu uv 180) و در طول موج های ۶۴۵، ۶۶۳ نانومتر تعیین گردید و غلظت کلروفیل a، b و مجموع آنها از طریق روابط زیر بدست آمد:#

W×V/1000×(۲/۶۹(A۶۴۵)- (A۶۶۳)=۱۲/۷گرم بافت / میلی گرم کلروفیلa

W×V/1000×(۴/۶۹(A۶۶۳)- (A۶۴۵)=۲۲/۹گرم بافت / میلی گرم کلروفیلb

W×V/1000×(۸/۰۲(A۶۶۳)+ (A۶۴۵)=۲۰/۲گرم بافت / میلی گرم کلروفیل کل

در روابط بالا V حجم نهایی نمونه استخراج شده و W وزن تر نمونه است.

تهیه استانداردهای پروتئین

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول در عصاره-های استخراج شده از روش (Bradford, 1976) استفاده شد. پس از استخراج هر آنزیم مقدار ۵۰ میکرولیتر از عصاره استخراج شده و به ۲۹۵۰میکرولیتر محلول برادفورد اضافه شد و پس از ۲۰ دقیقه میزان جذب مخلوط در ۵۹۵ نانومتر قرائت شد. از سرم آلبومین گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

ابتدا ۰/۱ گرم برگ تازه را در هاون چینی حاوی ازت مایع پودر کرده و داخل بافر Tris-HCL ریخته و به سانتریفیوژ با دمای ۴درجه با ۱۴۰۰۰دور منتقل کرده و مایع روشناور را برداشته و داخل تیوپ های یک میلی لیتری ریخته و فریز کرده و برای مراحل بعدی کار به یخچال ۸۰- منتقل گردید. فعالیت آنزیم کاتالاز در دمای $۲۵ \pm ۱^{o}C$ به روش اسپکتروفتومتری ثبت شد. برای خواندن کاتالاز طول موج دستگاه را روی ۲۴۰ نانومتر تنظیم کرد و ابتدا دستگاه را صفر می‌کنیم . کوویت شاهد شامل ۳ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم + ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن می باشد. دستگاه را بعد از قرائت ،صفر کرده و تیمارها را در داخل کوویت ریختیم که شامل مواد بالا به همراه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره استخراجی و سپس دستگاه را استارت نمودیم. (Janda, 1999). میزان پراکسیدهیدروژن تجزیه شده با استفاده از ضریب خاموشی(ε=39.4 mM-1cm-1) فعالیت ویژه آنزیم بر اساس میکرومول پراکسید هیدروژن تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین بیان شد.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز نیز همانند آنزیم قبلی، به روش اسپکتروفتومتری و در دمای $۲۵ \pm ۱^{o}C$ با استفاده از روش ناکانو و اسدا (Nakano and Asda, 1987) اندازه‌گیری شد. نوع و میزان مواد استفاده شده بافر فسفات پتاسیم (pH ۷/۸) ۵۰ میلی مولار به میزان ۱۵۰۰ میکرولیتر، هیدروژن پراکسید ۰/۱ میلی مولار به میزان ۴۰۰ میکرولیتر، آسکوربیک اسید

۳۰٪ ۴۰۰ میکرولیتر، EDTA ۰/۱ میلی مولار ۶۰۰ میکرولیتر و عصاره استخراج شده ۱۰۰ میکرولیتر بود که در نهایت حجم کل محلول برابر ۳۰۰۰ میکرولیتر گردید. برای گزارش فعالیت ویژه آنزیم برای آسکوربات پراکسیداز به صورت تعداد میکرومول آسکوربات تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین گزارش گردید ($\varepsilon = 2.8\ mM^{-1}cm^{-1}$).

شدت بیماری زایی

برای آلودگی گلدان ها مقدار ۱/۵ گرم اینوکلوم بذر ارزن آلوده به *Rhizoctonia solani* برای تلقیح ۱کیلوگرم خاک به کار گرفته شد.

بدین ترتیب که نصف گلدان با خاک آلوده پر شد و سپس یک لایه خاک استریل به ارتفاع دو سانتی متر روی آن ریخته شد و سپس بذرهای تیمار شده در روی آن قرار گرفتند و با خاک پوشیده شدند. بعد از ۳ هفته ریشه ها به ملایمت در زیر آب شسته شدند و شدت بیماری آنها بر اساس مقیاس یک تا پنج از روش اصلاح شده Kim et al, 1997 به صورت زیر ارزیابی گردید.

۰= گیاهان سالم و بدون هیچگونه علائم آلودگی.

۱= کمتر از ۲۰٪ ریشه آلوده شده و حداقل یک شانکر درشت قهوه ای داشته باشد.

۲= حدود ۵۰٪ ریشه دارای شانکرهای تیپیک باشد.

۳= بیش از ۷۰-۶۰٪ ریشه دارای شانکر باشد.

۴= مرگ گیاهچه پس از سبز از خاک (Postemergence)، طول گیاهچه کمتر از ۵ سانتی متر باشد.

۵= مرگ گیاهچه قبل از سبز از خاک (Preemergence)، یا پوسیدگی بذر.

شاخص بیماری برحسب درصد و از رابطه زیر محاسبه شد.

$$DI\% = \frac{\sum_{i=1}^{n}(\text{مقیاس آلودگی} \times \text{گیاهچه‌های تیمار})}{5 \times \text{تعداد کل گیاهچه‌ها}} \times 100$$

مخرج کسر حداکثر مقیاس آلودگی× تعداد گیاهچه های کشت شده است که نتیجه آن حداکثر شدت بیماری ممکن می باشد.

برای رسم جدول ها و نمودارهای آماری نیز از نرم افزارهای EXCEL 2010 و WORD استفاده گردید. برای محاسبات آماری از نرم افزارSAS نسخه ۹/۲ و برای مقایسه میانگین ها از نرم افزار MSTATC و آزمون چند دامنه ای دانکن با سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

صفات مورفولوژیکی گیاهچه

طول ریشه‌چه، ساقه چه و گیاهچه

اثر تیمارهای بیولوژیک و تیمار پرایمینگ و اثرات متقابل آنها به ترتیب در سطح یک درصد معنی داری و اثرات متقابل برای شاخص طول ریشه‌چه در سطح ۵ درصد معنی داری بود.

مقایسه میانگین‌ها نشان داد که ترکیب تیماری تریکودرما هارزیانوم با تیمار پرایمینگ سولفات روی دارای بیشترین طول ریشه‌چه بود به طوری که این شاخص را نسبت به شاهد ۵۷٪ افزایش داده است. البته این ترکیب تیماری با ترکیب تیماری باکتری با تیمارهای پرایمینگ با سولفات روی و سالیسیلیک اسید در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول۱). ترکیب تیماری پرایمینگ با سولفات روی و قارچ تریکودرما هارزیانوم توانست دارای بیشترین مقدار طول ساقه‌چه و گیاهچه و با بقیه تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان داد،

این تیمار توانست این شاخص ها را بترتیب به میزان ۶۰ و ۵۹ درصد نسبت به شاهد افزایش دهد. در همه تیمارها، شرایط پرایمینگ نسبت به حالت بدون پرایم کارایی بهتری داشت. در راستای آزمایش حاضر، در آزمایشی که بر روی ذرت انجام شد به این نتیجه رسیدند که افزایش ریشه های جانبی و طول ریشه در اثر T.h22 به علت وجود این ترکیبات می باشد. در ساقه‌ها، متیونین سینتاز افزایش می یابد، متیونین سینتاز می تواند متیونین را به اس آدنوزین متیونین شود که پیش ماده اتیلن میباشد، (Shoresh, 2010)، احتمالاً این موضوع ثابت می‌کند سیستم‌های تنظیم اتیلن درارتباط بین گیاه و تریکودرما مهم هستند.

جدول ۱- تجزیه واریانس تیمار بیوپرایمینگ با تریکودرما و سودوموناس بر صفات مورفولوژیک لوبیا

منابع تغییرات	درجه آزادی	طول ریشه چه	طول ساقچه	طول گیاهچه	وزن خشک ریشه چه	وزن خشک ساقچه	وزن خشک گیاهچه	سطح برگ
تکرار	۲	۰/۲۸^{ns}	۱/۸^{ns}	۰/۰۶^{ns}	۰/۰۲۸^{ns}	۰/۰۰۰۶^{ns}	۰/۰۲۵^{ns}	۲۱/۰۸^{ns}
تیماربیولوژیک	۴	۱۶۴/۴۶**	۲۲۵/۵**	۷۶۵/۹۱**	۵/۱۰**	۳/۴۵**	۱۶/۴۳**	۳۱۵۳/۹۲**
تیمار پرایمینگ	۲	۱۲۵/۷**	۲۷۵/۲**	۷۶۹/۶۸**	۵/۳۵**	۵/۸۶**	۲۲/۲۷**	۳۵۶۷/۰۲**
تیماربیولوژیک×تیمار پرایمینگ	۸	۷/۰۳*	۹/۹۸**	۲۵/۴۱**	۰/۴۲**	۰/۳۸**	۱/۴۸**	۱۵۰/۹۳**
اشتباه	۲۸	۲/۳۸	۲/۶۳	۶/۵۲	۰/۰۲۸	۰/۰۳۸	۰/۰۸	۲۶/۰۶
ضریب تغییرات٪		۹/۴۲	۱۰/۷۴	۸/۵	۱۲/۴۴	۱۰/۴۴	۱۱/۵۵	۹/۲۵

ns، *و** به ترتیب نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱درصد می باشد.

جدول ۲- تجزیه واریانس تیمار بیوپرایمینگ با تریکودرما و سودوموناس بر صفات فیزیولوژیک لوبیا

منابع تغییرات	درجه آزادی	کلروفیل a	کلروفیل b	کلروفیل کل	آهن	نیتروژن	فعالیت کاتالاز	فعالیت پراکسیداز
تکرار	۲	۰/۰۰۰۷^{ns}	۰/۰۰۰۲^{ns}	۰/۰۰۱^{ns}	۲۳/۱۹^{ns}	۰/۰۰۲^{ns}	۰/۰۸۶^{ns}	۰/۷۶^{ns}
تیماربیولوژیک	۴	۰/۲۴**	۰/۰۵۸**	۰/۵۴**	۵۲۹۲/۳۵**	۰/۷۱۲**	۶/۳۸**	۹۰/۱۳**
تیمار پرایمینگ	۲	۰/۴۴**	۰/۱۱۸**	۱/۰۲۵**	۵۸۴۵/۲۴**	۱/۴۴**	۱۰/۵۵**	۹۵/۸۴**
تیماربیولوژیک× تیمار پرایمینگ	۸	۰/۰۲۹**	۰/۰۰۷**	۰/۰۶**	۲۴۰/۷۶**	۰/۲۶۲**	۱/۰۲**	۵/۸۸**
اشتباه	۲۸	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱	۹/۹۹	۰/۰۰۷	۰/۰۲۸	۰/۲۴
ضریب تغییرات%		۱۳/۲۱	۱۱/۵۶	۱۰/۸۵	۱۲/۱۸	۸/۶۵	۱۱/۹	۱۴/۳۶

ns، و** به ترتیب نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری و معنی داری در سطح احتمال ۱درصد می باشد.

وزن خشک ریشه‌چه، ساقه‌چه و گیاهچه

این شاخص های رشدی توانستند تحت تاثیر تیمارهای مورد آزمایش قرار بگیرند بطوریکه اثرات متقابل و اصلی آنها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. با توجه به معنی دار بودن اثرات متقابل مقایسه میانگین نیز بر روی آن صورت پذیرفت. همان طور که در جدول (۳) مشاهده می گردد بهترین ترکیب تیماری که در مورد این صفات توانست بیشترین مقدار را داشته باشد، ترکیب تیماری قارچ تریکودرما هارزیانوم با بذور پرایمینگ شده توسط سولفات روی بود. این ترکیب تیماری توانست وزن خشک ریشه‌چه، ساقه‌چه و گیاهچه را نسبت به شاهد سولفات روی به ترتیب ۶۵/۶، ۶۴/۲۵ و ۶۴/۹۳ درصد افزایش دهد. با توجه به جدول (۳) مشخص می گردد که ترکیب مواد بیولوژیک با بذور پرایمینگ شده نسبت به ترکیب با بذور بدون پرایمینگ تاثیر معنی‌داری بر شاخص های نامبرده داشته است، بطوریکه ترکیب قارچ تریکودرما هارزیانوم با بذور پرایمینگ شده توسط سولفات روی نسبت به بذور که پرایمینگ نشده بودند توانست وزن خشک ریشه‌چه، ساقه‌چه و گیاهچه را بترتیب ۵۲/۲۹، ۵۰ و ۵۲/۶ درصد افزایش معنی‌داری دهد.Bennett et al (2009) بیان داشتند که تیمار دروم پرایمینگ هویج و پیاز نسبت به شرایط شاهد و پرایمینگ توانسته بود وزن تر گیاهچه ها، شاخص برداشت و سرعت سبز شدن را افزایش دهد.

سطح برگ و محتوی کلروفیل برگ

بیشترین مقدار سطح برگ در اثر ترکیب تیماری قارچ تریکودرما هارزیانوم با بذور پرایمینگ شده با سولفات روی بود. بطوریکه نسبت به بذور بدون پرایمینگ شده همراه با تریکودرما، توانست ۲۹ درصد و نسبت به شاهد بدون پرایمینگ ۴۷ درصد افزایش معنی داری دهد. همانطور که در جدول(۳) مشاهده می‌گردد، همه ترکیبات تیمارهای بیولوژیک با بذور پرایمینگ شده با سولفات روی، نسبت به دیگر ترکیبات پرایمینگ کارایی بالاتری داشته است.

میزان کلروفیل‌های a، b و کل در بین تیمارهای اعمال شده، باکتری و قارچ های آنتاگونیست و تیمار پرایمینگ و اثر متقابل این تیمارها در سطح احتمال یک درصد اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول۲). محتوی کلروفیل a، b و کل نیز تحت تأثیر تیمارهای مختلف بیوپرایمینگ قرار گرفت. بطوریکه در هر ۳ نوع کلروفیل

ترکیب تیماری بذور پرایمینگ شده با سولفات روی و قارچ تریکودرما هارزیانوم دارای بیشترین مقدار و با بقیه تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری بودند.

جدول ۳- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای قارچ تریکودرما، باکتری سودوموناس و پرایمینگ بر روی صفات مورفولوژیک لوبیا

تیمار عامل بیولوژیک	پرایمینگ عامل پرایمینگ	طول ریشه چه (سانتی متر)	طول ساقه چه (سانتی متر)	طول گیاهچه (سانتی متر)	وزن خشک ریشه چه(گرم)	وزن خشک ساقه چه(گرم)	وزن خشک گیاهچه (گرم)	سطح برگ (سانتی مترمربع)
T. harzianum	سولفات روی	۲۹/۶۷ ^{a}	۳۴/۶۷^{a}	۶۴/۳۳^{a}	۳/۸۷^{a}	۴^{a}	۷/۸۷^{a}	۲۰۴/۳^{a}
	سالیسیلیک اسید	۲۵/۶۷ ^{bc}	۳۱/۳۳^{b}	۵۷^{bc}	۲/۹۵^{bc}	۲/۵۶^{de}	۵/۵۱۷^{de}	۱۹۱^{b}
	بدون پرایمینگ	۲۲/۳۳ ^{de}	۲۳/۳۳^{d}	۴۵/۶۷^{fg}	۱/۷۳۳^{d}	۲^{fg}	۳/۷۳۳^{f}	۱۵۸/۳^{f}
T. viren	سولفات روی	۲۵/۶۷ ^{bc}	۲۸^{c}	۵۳/۶۷^{cd}	۲/۸۱۷^{bc}	۳/۳۶۷^{b}	۶/۱۸۳^{c}	۱۸۵/۷^{bcd}
	سالیسیلیک اسید	۲۳ ^{cde}	۲۸/۶۷^{c}	۵۱/۶۷^{de}	۲/۷۳۳^{c}	۲/۷۶۷^{d}	۵/۵^{de}	۱۷۹^{cde}
	بدون پرایمینگ	۲۰/۶۷ ^{ef}	۲۳^{d}	۴۳/۶۷^{g}	۱/۵^{d}	۱/۷۶۷^{g}	۳/۲۶۷^{f}	۱۴۸/۳^{fg}
T. atroviride	سولفات روی	۲۴^{cd}	۲۷/۶۷^{c}	۵۱/۶۷^{de}	۲/۶۶۷^{c}	۲/۹^{cd}	۵/۵۶۷^{de}	۱۷۰/۳^{e}
	سالیسیلیک اسید	۲۱/۳۳^{def}	۲۷/۳۳^{c}	۴۸/۶۷^{ef}	۲/۷۶۷^{c}	۲/۷۶۷^{d}	۵/۵۳۳^{de}	۱۵۵/۳^{f}
	بدون پرایمینگ	۱۹/۳۳^{f}	۲۰e	۳۹/۳۳^{h}	۱/۷^{d}	۱/۶۶۷^{g}	۳/۳۶۷^{f}	۱۴۴^{g}
Utpf5	سولفات روی	۲۷/۳۳^{ab}	۳۱^{b}	۵۸/۳۳^{b}	۳/۸^{a}	۳/۲۳۳^{bc}	۷/۰۳۳^{b}	۱۸۷/۷^{bc}
	سالیسیلیک اسید	۲۷a^{b}	۲۷^{c}	۵۴^{bcd}	۳/۱^{b}	۲/۸^{d}	۵/۹^{cd}	۱۷۶/۷^{de}
	بدون پرایمینگ	۱۹^{f}	۱۹^{e}	۳۸^{h}	۲/۷۶۷^{c}	۲/۲۶۷^{ef}	۵/۰۳۳^{e}	۱۵۸/۳^{f}
بدون عامل بیولوژیک	سولفات روی	۱۶/۳۳^{g}	۱۷/۳۳^{e}	۳۳/۶۶^{i}	۱/۳۳^{e}	۱/۴۳۳^{g}	۲/۷۶^{g}	۱۳۷/۶۶^{hi}
	سالسیلیک اسید	۱۵/۶۷^{g}	۱۸^{e}	۳۳/۶۶^{i}	۱/۳۳^{e}	۱/۵^{g}	۲/۸۳^{g}	۱۴۱/۶^{gh}
	بدون پرایمینگ	۱۲/۶۷^{h}	۱۳/۶۶^{f}	۲۶/۳^{j}	۱^{f}	۱/۰۶۶^{h}	۲/۰۶^{h}	۱۲۹/۳۳^{i}

اعداد هر ستون که دارای یک حرف مشترک باشند از نظر آماری برحسب آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد معنی‌دار نمی‌باشند.

بطوریکه این ترکیب تیماری میزان کلروفیل a، b و کل را نسبت بذور بدون پرایمینگ همراه با تریکودرما بترتیب ۵۷، ۶۰ و ۵۸ درصد افزایش و نسبت به شاهد سولفات روی به میزان ۸۵/۸، ۴۶/۹ و ۸۶/۶ درصد افزایش معنی‌داری نشان داد. در راستای نتایج این آزمایش تریکودرما توانست هم سطح برگ و مقدار فتوسنتز را درگیاه ذرت افزایش بدهد و همچنین مشاهده شده که فتوسنتز در گیاه آرابیدوپسیس در شرایط تنش نوری با حضور تریکودرما نزدیک به شرایط نرمال بود (Harman, 2005).

محتوی آهن و نیتروژن برگ

محتوی آهن و نیتروژن برگ لوبیا توانست تحت تاثیر تیمارهای اعمال شده قرار گرفت و در سطح احتمال یک درصد اثرات اصلی و اثرات متقابل آن معنی دار گردد. تیمار باکتریUTPF5 با میزان ۲۶۵/۶ میلیگرم بر گرم دارای بیشترین میزان آهن و با بقیه تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری نشان داد و توانست نسبت به شاهد یک افزایش ۳۷/۵۵ درصدی داشته باشد. میزان نیتروژن تیمار ترکیبی پرایمینگ با سولفات روی به همراه قارچ تریکودرما هارزیانوم به میزان ۴/۸۳ در واحد درصد دارای بیشترین مقدار بوده و نسبت به سایر تیمارها بویژه تیمارهای سولفات روی و تریکودرما بهتر بود. از جمله دلایلی که می تواند این ویژگی جذب مواد غذایی توسط این قارچ را توجیه کرد به خاطر این می باشد که تریکودرما اسیدهای ارگانیک مثل: گلوکونیک، سیتریک یا فوماریک اسید که PH خاک را کاهش می دهد و اجازه می دهد فسفات‌ها، مواد ریز مغذی و کاتیون‌های معدنی شبیه آهن، منگنز و منیزیوم که برای متابولیسم گیاه مهم می‌باشند تولید نمایند (Harman, 2005).

فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدانتی

نتایج تجزیه واریانس‌ها و مقایسات میانگین بین تیمارهای اعمال شده نشان داد که تیمارهای قارچ تریکودرما، باکتری سودوموناس فلورسنس و تیمار پرایمینگ واثرات متقابل این تیمارها در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد. همانطور که در جدول (۴) مشاهده می شود در مورد آنزیم کاتالاز بیشترین فعالیت آنزیم مربوط به تیمار ترکیبی پرایمینگ با سالیسیلیک اسید و استفاده از قارچ *T.virens* بود، که نسبت به شاهد دارای ۶۵ درصد افزایش فعالیت آنزیم بود. فعالیت آنزیم

آسکوربات پراکسیداز نیز تحت تاثیر تیمارهای اعمال شده بر لوبیا قرار گرفت به طوری که اختلاف تیمارها در سطح احتمال یک درصد معنی دار بود. طبق جدول(۳) ترکیب تیماری باکتری UTPF5 وپرایمینگ با سالیسیلیک اسید دارای بیشترین میزان فعالیت آنزیم بود و نسبت به شاهد ۷۶/۶۶ درصد افزایش داشت (جدول۳). نتایج ما در راستای یافته های Mastouri (2010), می باشد که به این نتیجه رسیدند که آغشته کردن بذور با تریکودرما باعث افزایش آنتی اکسیدانت‌ها گردیده و میزان ROS ها را کاهش میدهد و این همان خصوصیت القای مقاومتی است که توسط این آنتاگونیست اتفاق می‌افتد.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثر متقابل تیمارهای قارچ تریکودرما، باکتری سودوموناس و پرایمینگ بر روی صفات فیزیولوژیک لوبیا

عامل بیوپرایمینگ	سطح پرایمینگ	کلروفیل a(میلی- گرم /گرم بافت)	کلروفیل b (میلی- گرم/گرم بافت)	کلروفیل کل (میلی‌گرم /گرم بافت)	محتوی آهن (میلی گرم بر کیلوگرم برگ)	محتوی نیتروژن(٪)	فعالیت کاتالاز (میکرومول پراکسید هیدروژن بر دقیقه در میلیگرم پروتئین)	فعالیت آسکوربات پراکسیداز (میکرومول آسکوربات بر دقیقه در میلیگرم پروتئین)
T.harzianum	سولفات روی	۱/۳۶^{a}	۰/۶۶^{a}	۲/۰۲^{a}	۲۵۶/۱^{b}	۴/۸۳۷^{a}	۲/۹۷۳^{f}	۸/۴۵^{fg}
	سالیسیلیک اسید	۱/۲۱^{c}	۰/۵۸۵^{c}	۱/۷۹۵^{c}	۲۱۲/۵^{e}	۳/۵۴۷^{c}	۴/۲۶۷^{c}	۱۲/۱۴^{c}
	بدون پرایمینگ	۰/۸۶۳^{g}	۰/۴۱۲^{h}	۱/۲۷۵^{h}	۱۳۹/۶^{g}	۳/۳۵^{e}	۲/۲۶۷^{h}	۶/۳۹۶^{h}
T.viren	سولفات روی	۱/۱۶۷^{cd}	۰/۵۶۳۷^{de}	۱/۷۲^{de}	۲۲۵^{d}	۳/۸۸۳^{c}	۳/۵^{de}	۹/۰۷۶^{ef}
	سالیسیلیک اسید	۰/۹۹۷^{f}	۰/۴۷۸۷^{g}	۱/۴۷۶^{g}	۲۰۱/۳^{f}	۳/۵^{de}	۶^{a}	۱۵/۵۸^{b}
	بدون پرایمینگ	۰/۷۸۵۳^{h}	۰/۳۴۹۷^{j}	۱/۱۳۵^{i}	۱۸۷^{h}	۳/۳۶^{e}	۳^{f}	۷/۷۷۶^{g}
T.atroviride	سولفات روی	۱/۱۳۴^{de}	۰/۵۴۸۳^{ef}	۱/۶۸۲^{ef}	۲۱۳/۳^{e}	۳/۷۳^{c}	۲/۶۶۷^{g}	۷/۹۶۶^{g}
	سالیسیلیک اسید	۱/۱۰۳^{e}	۰/۵۳۲۷^{f}	۱/۶۳۶^{f}	۱۹۸^{fg}	۳/۵۲۷^{d}	۳/۲۶۷^{ef}	۹/۷۶۶^{e}
	بدون پرایمینگ	۰/۷۷۳^{h}	۰/۳۶۷۷^{i}	۱/۱۴۱^{i}	۱۸۵/۳^{h}	۳/۳۵۳^{e}	۲/۶^{g}	۷/۷۶۶^{g}
Utpf5	سولفات روی	۱/۲۹^{b}	۰/۶۲۶^{b}	۱/۹۱۶^{b}	۲۶۵/۶^{a}	۴/۰۶۷^{b}	۳/۷۳۳^{d}	۱۱/۹۱^{c}
	سالیسیلیک اسید	۱/۱۹۲^{c}	۰/۵۷۷^{cd}	۱/۷۶۹^{cd}	۲۳۶/۸^{c}	۳/۸۴^{c}	۵/۳۶۷^{b}	۱۷/۱۴^{a}
	بدون پرایمینگ	۰/۸۷۵۳^{g}	۰/۴۱۸۷^{h}	۱/۲۹۴^{h}	۲۱۷/۴^{e}	۳/۵۴۳^{d}	۳/۴^{e}	۱۰/۸۵^{d}
بدون عامل بیولوژیک	شاهد سولفات روی	۰/۷۳۱۶^{k}	۰/۳۵۰۴^{ij}	۱/۰۸۲^{ij}	۱۷۵/۰۳^{i}	۳/۱۵۶^{g}	۲/۴۳۳^{gh}	۶/۰۳^{h}
	سالیسیلیک اسید	۰/۷۳۶۳^{jk}	۰/۳۵۲۷^{ij}	۱/۰۸۹^{ij}	۱۸۴/۶۶^{h}	۳/۲۵^{fg}	۲/۲^{hi}	۴/۱^{i}
	بدون پرایمینگ	۰/۷۲۱^{k}	۰/۳۴۵۴^{j}	۱/۰۶۶^{j}	۱۶۵/۸۶^{j}	۳/۱۶^{g}	۲/۱^{i}	۴^{j}

*اعداد هر ستون که دارای یک حرف مشترک باشند از نظر آماری برحسب آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد معنی‌دار نمی‌باشند.

شدت بیماری زایی

براساس جدول(۵) اختلاف بین تیمارهای آزمایشی بر روی صفت شدت بیماری زایی در سطح احتمال یک درصد معنی دار شد.

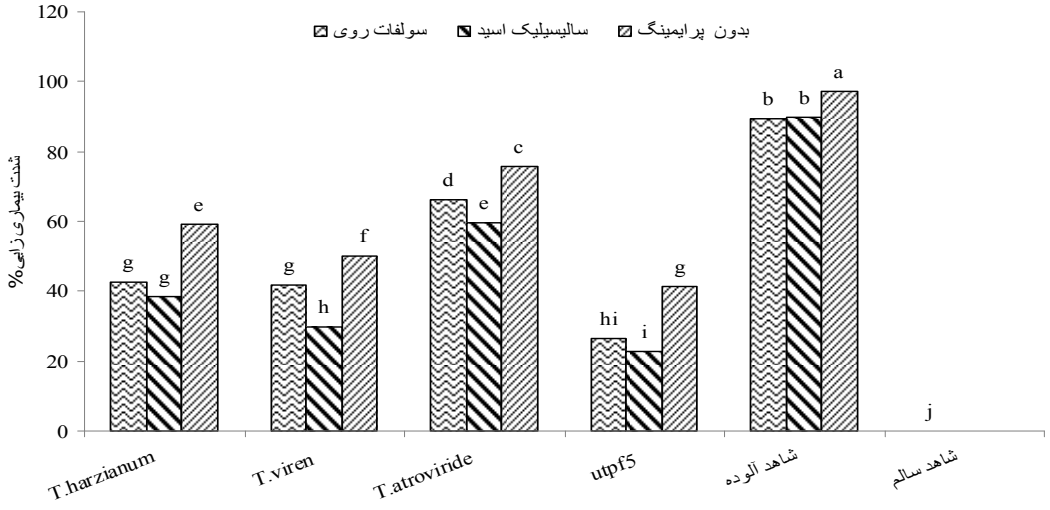
براساس مقایسه میانگین ترسیم شده در شکل(۱) مشاهده می گردد که تیمار سالیسیلیک اسید به همرا باکتری UTPF5 با ۷۷/۳۳ درصد بیشترین کاهش را در بیماری داشت که این کاهش نسبت به شرایط بدون پرایمینگ در این باکتری ۴۵ درصد بهبود نشان داد. در همه تیمارها شرایط پرایمینگ با آنتاگونسیت های موجود بهتر از شرایط بدون پرایمینگ بود. این نتایج با نتایج Begum et al (2010) که از تیمار بیوپرایمینگ بذر سویا با تریکودرما برای مقابله با بیمارگر *Colletotrichum truncatum* و همچنین Abuamsha et al (2011) که برای کنترل *Leptosphaeria maculans* از بیوپرایمینگ با باکتری سودوموناس استفاده کردند مطابقت دارد. بعضی از گونه های تریکودرما از جمله*T. viride*، *T. harzianum* با برخورداری توأم از خواصی مثل میکوپارازیتیسم ، آنتی بایوزیس و قابلیت رقابت ساپروفیتی قادرند جمعیت قارچ های بیماریزا را به میزان قابل توجهی کاهش دهند(Soltani et al, 2005) ولی در شرایط طبیعی به دلیل پایین بودن واحد های تکثیری آنها در خاک، به نحو موثری درکنترل بیماری های قارچی موثر نیستند (Cavalcante et al., 2008).

یکی از روشهایی که باعث افزایش واحدهای تکثیری می گردد استفاده از تیمارهای پرایمینگ در تلفیق با آنتاگونیست ها می باشد.

جدول۵- تجزیه واریانس تیمار بیوپرایمینگ با تریکودرما و سودوموناس برشدت بیماری زایی لوبیا

منابع تغییرات	درجه آزادی	شدت بیماری زایی
تکرار	۲	۳/۵۸۳۳
تیمار با شاهد	۱۵	۲۱۹۸/۲۵۴۱۷**
اشتباه	۳۰	۱۰/۳۸۳۳
ضریب تغییرات٪		۱۳/۲۰

ns، *و** نشان دهنده عدم اختلاف معنی داری، معنی داری در سطح احتمال ۵ و ۱درصد می باشد.



شکل ۱- مقایسه میانگین تیمار بیوپرایمینگ با تریکودرما و سودوموناس برشدت بیماری زایی لوبیا

نتیجه گیری کلی

بطور کلی می توان بیان داشت که استفاده از تیمارهای بیولوژیک به همراه بذرهای پرایمینگ شده می تواند نسبت به شرایطی که بذور بدون این ترکیب تیماری باشند (حتی اگر یکی از این تیمارها باشد) کارایی مولفه های جوانه زنی و همچنین فعـالیت هـای فیزیولوژیکی گیاه را بهبود ببخشد. نتایج نشان داد که تیمار پرایمینگ نسبت به بدون پرایمینگ در ترکیب با مواد بیولوژیک کارایی بهتری داشتند. در رابطه با کنترل بیماری نیز ترکیب های تیماری پرایمینگ با مواد بیولوژیک نسبت به سایر ترکیب های تیماری توانست شدت بیماری زایی را تحـت تاثیـر قرار دهـد.

REFERENCES

1. Abuamsha, R., Salman, M & Ehlers, R.U. (2011). Effect of seed priming with *Serratia plymuthica* and *Pseudomonas chlororaphis* to control Leptosphaeria maculans in different oilseed rape cultivars Ruba & Mazen .*Eur J Plant Pathology*, 130, 287-295.
2. Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, 105, 121-126.
3. Ajit, N.S., Verma, Rajni. & Shanmugam, V. (2006). Extracellular chitinases of fluorescent pseudomonads antifungal to *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi causing carnation wilt. *Current Microbiology*, 52, 310-316.
4. Arnon, D. T. (1949). Copper enzymes in isolation chloroplast phenoloxidase in (*Beta vulgaris* L.). *Plant Physology*, 24, 1-15.

5. Begum, M.M., Sariah, M., Puteh, A. B., Zainal Abidin, M. A., Rahman, M. A. & Siddiqui, Y. (2010). Field performance of bio-primed seeds to suppress *Colletotrichum truncatum* causing damping-off and seedling stand of soybean. *Biological Control*, 53, 18-23.
6. Bennett, A. J., Mead, A. & Whipps, J. M. (2009). Performance of carrot and onion seed primed with beneficial microorganisms in glasshouse and field trials. *Biological Control*, 51, 417-426.
7. Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14, 93-107.
8. Bradford, M. M. (1976). A dye binding assay for protein. *Annals of Biochemistry*, 72, 248-254.
9. Cakmak, I. C. (2008). Enrichment of cereal grains with zinc: agronomic or genetic biofortification?, *Plant Soil*, 302 , 1-17.
10. Cavalcante, R. S., Lima, H. L. S., Pinto, G. A. S., Gava, C. A. T. & Rodriguez, S. (2008). Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Microbiol Biotechnology*, 24, 319-325.
11. Dubey, S.C., Dubey, M. & Suresh, B. S. (2007). Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. Sp. Ciceris for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control* , 40, 118-127.
12. Haas,D. Geneviève, D. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by *pseudomonads fluorescent*. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 43-56.
13. Harris, D., Rashid, A., Miraj, G. & Arif, M. (2008). Yunas On-farm' seed priming with zinc in chickpea and wheat in Pakistan. *Plant Soil*, 306, 3-10.
14. Harman, G. E. (2005). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. The nature and application of biocontrol microbes II: *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 190- 194.
15. Harman , G,. E., Björkman ,T., Ondik, K. & Shoresh, M. (2008). Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* Spp. For Biocontrol. *Outlooks Pest Manag*,19, 24-9.
16. Harman, G. E. & Shoresh, M. (2007). The mechanisms and applications of opportunistic plant symbionts. *Novel Biotechnologies for Biocontrol Agent Enhancement and Management*, 131-53.
17. Janda, T., Szalai, G., Tari, I. & Paldi, E. (1999). Hydroponic treatment with salicylic acid decreases the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L.) plants. *Plantarium*, 208,175-180.
18. Jiang, Y. & Huang, B. (2001). Drought and heat stress injury to two cool-season turfgrasses in relation to antioxidant metabolism and lipid peroxidation. *Crop Scince*, 41, 436-442.
19. Jie L., Gong She, L., Dong Mei, O., Fang Fang., L. & En Hua, W. (2002). Effect of PEG on germination and active oxygen metabolism in wild rye (Leymu.7 chinensis) seeds. *Acta Prataculturae Sinica*, 11, 59-64.
20. Kim, D. S., Cook, R. J. & Weller, D. M. (1997). *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three roots diseases of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* , 87, 551-558.
21. McDonald, M. B. (1999). Seed deterioration: physiology, repair, and assessment. *Seed Science and Technology*, 27, 177-237.
22. Majnoun Hosseini, N. (2008). *Grain legume production*. Jihad-Daneshgahi Pub. University of Tehran. 283 pages. (In Farsi).
23. Mastouri, F,. Björkman, T. & Harman, G.A. (2010). Seed Treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. *Phytopathology*,100 ,11,1213-1221.
24. Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22, 867-880.
25. Naeimi, S., Kocsubé, S., Antal, Z,. Okhovvat, S.M., Javan-Nikkhah, M., Vágvölgyi,C. & Kredics, L. (2011). Strain-specific SCAR markers for the detection of *Trichoderma harzianum* AS12-2, a biological control agent against *Rhizocto nia solani,* the causal agent of rice sheath blight. *Acta Biologica Hungarica*, 62, 73-84 .
26. Patten, C.L. & Glick,B.R. (2002). The role of bacterial indoleacetic acid in the development of the host plant root system. *Appl. Environ. Microbiol*, 68, 3795-3801.
27. Rashid, M., Khalil, S., Ayub, N., Alam, S. & Latif, F. (2004). Organic acids productions solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under in vitro conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7, 187-196.
28. Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, Biosynthesis, and Translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 431-449.
29. Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M. A., Oliveira, E. & Trillas,I. (2007). Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics*, 7, 3943-3952.
30. Singh, A., Srivastava, S. & 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.
31. Soltani, H., Zafari, D. & Rohani. (2005). A study on biological control of the crown, root and tuber

fungal diseases of potato by *Trichoderma harzianum* in-vitro and field condition in Hamadan. *Pajhohesh keshavarzi va ab*, 5, 13-25.

32. Shoresh , M., Harman ,G.E. & Mastouri, F. (2010). Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *The Annual Review Phytopathology*, 48, 21-43.
33. Vara, J. M., Ligero, M. P. &.Ureba, M. J. B. (2000). Comparison of physical, chemical and biological methods of controlling garlic white root. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 581-588.
34. Weller, D. M. & Cook, R. J. (1983). Suppression of take-all of wheat by seed treatments with *fluorescent pseudomonads*. *Phytopathology*, 78, 463-469.