

Research Paper

Biopriming with *Trichoderma*: An Effective Method for Modifying Root Architecture and Expanding the Root System of Rice

Mogegan Kowsari¹, Leila Jabbari², Mahdi Nikrad²

1- Assistant Professor, Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz,
(Corresponding author: kowsari@abrii.ac.ir)

2- Researcher, Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Alborz

Received: 26 January, 2025

Revised: 7 April, 2025

Accepted: 29 May, 2025

Extended Abstract

Background: Water scarcity and drought stress are major constraints on crop production in arid and semi-arid regions worldwide. Climate change, including reduced water resources and rising temperatures, can significantly impact agriculture, particularly affecting the production and quality of cereal grains. In Iran, the issue of drought stress is especially critical due to the specific climatic conditions and the high water requirements of rice. Various methods have been proposed to address drought stress and improve rice resilience, with seed bio-priming being one of the most effective techniques. Bio-priming involves pre-treating seeds with microorganisms or biological agents to enhance germination and early plant growth. This technique is valuable due to its positive effects on increasing crop yield, improving soil fertility sustainably, and boosting plant resistance to adverse conditions. In this study, probiotic formulations of *Trichoderma* were utilized for bio-priming rice seeds. *Trichoderma*, known for its growth-promoting and biocontrol properties, can enhance root architecture and root system development. This research aims to improve rice plants' ability to access water and enhance their resilience to environmental stresses, such as drought and water scarcity. Seed bio-priming, particularly through boosting germination rates, strengthening root growth, and improving the plant's capacity to absorb water and nutrients, helps mitigate the adverse effects of drought stress. Therefore, employing probiotic *Trichoderma* formulations can improve rice performance under stress conditions and enhance overall production efficiency.

Methods: To assess the impact of seed bio-priming using *Trichoderma* fungi on improving the root system and morphological traits of the Hashemi rice cultivar (*Oryza sativa* L.), experiments were designed and carried out under both laboratory and greenhouse conditions. In the initial phase, bio-priming treatments were applied to both coated and uncoated seeds in the laboratory. The effectiveness of these treatments on uncoated seeds was validated through preliminary testing. Following this, bio-priming experiments with 60 *Trichoderma* isolates were conducted in a factorial design based on a randomized complete block design (RCBD) with 15 replications, using coated seeds. The experimental factors included bio-priming rice seeds with 10 selected *Trichoderma* isolates, applied at two levels: with and without the fungi. The most effective treatments from the laboratory phase were then evaluated separately and in combination for their ability to stimulate root growth and impact morphological traits in greenhouse conditions. The greenhouse cultivation setup was designed to accurately replicate field conditions. Seeds treated in the laboratory were allowed to germinate and then transferred to seedling trays in the greenhouse. Subsequently, the seedlings were moved to pots, and data on morphological traits were collected at one-month intervals, including inoculation of the pots. Measurements of root surface area, root length, and number of roots were recorded once the plants reached the reproductive stage.

Results: Analysis of rice seed germination during the early growth stages revealed that treatments M4, (M9+M74+GL89), and (M9+G131+M4+GL89) resulted in 100% seed germination. Statistical analysis indicated that the germination percentage in treated samples was significantly higher than in control samples, with all treatments showing greater germination rates than the control under greenhouse conditions. Heat Map analysis, variance analysis, and mean comparisons demonstrated that the use of *Trichoderma* significantly (68%) increased the number of tillers, root length, and root number compared to the control treatment.



Specifically, the M75 treatment, with 50 roots compared to 23 in the control, had the most significant effect on root number increase. Additionally, the KhB2 treatment produced the longest roots at 35.5 cm, and the GL89 treatment yielded the highest number of tillers at 2.14. Furthermore, the M75 treatment achieved the greatest stem length of 82.5 cm. These results indicate that seed biopriming with *Trichoderma* can effectively enhance seedling characteristics, root systems, and phenological growth stages of rice plants. Three-dimensional root interaction analyses using Image J software and Heat Map analysis confirmed the superiority of the KhB2 and GL89 treatments in all morphological assessments. These analyses provided a comprehensive view of the root morphology of the superior treatments through three-dimensional charts and Z-scores. The three-dimensional charts revealed that the root surface area in the superior treatments GL89 and KhB2 was significantly greater than in the control treatment. The root surface area for KhB2 was three times greater, and for GL89, it was 1.5 times greater than that of the control. These increases clearly indicate a significant enhancement in the root cross-sectional area in the probiotic treatments compared to the control. These findings are consistent with mean comparison data and Heat Map results, confirming the positive impact of probiotic treatments on root surface expansion. Furthermore, an assessment of the biocontrol properties of 10 selected *Trichoderma* isolates showed that these isolates significantly reduced the longitudinal growth and spore germination of 15 pathogenic fungi compared to the control. Among these isolates, KhB2 and GL89 were identified as having the best performance with reductions of 100% and 93%, respectively, compared to the control.

Conclusion: The final analysis of the findings revealed that the use of the superior *Trichoderma* strains, KhB2 and GL89, which possess excellent biocontrol and growth-promoting properties, had the greatest impact on increasing root length and number in rice plants. Therefore, the application of these selected probiotic formulations can be recommended as an effective option for introduction to rice growers and use in fields.

Keywords: Growth promotion, Morpho-anatomy, Rice, Root architecture, *Trichoderma*

How to Cite This Article: Kowsari, M., Jabbari, L., & Nikrad, M. (2025). Biopriming with *Trichoderma*: An Effective Method for Modifying Root Architecture and Expanding the Root System of Rice. *J Crop Breed*, 17(3), 16-29. DOI: 10.61882/jcb.2024.1569



مقاله پژوهشی

بیوپرایمینگ تریکودرما: روشی کارآمد در تغییر معماری و گسترش سیستم ریشه برنج

مژگان کوثری^۱، لایلا جباری^۲ و مهدی نیکرادی^۲^۱- هیئت علمی بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران، (نویسنده مسؤل: kowsari@abrii.ac.ir)^۲- کارشناس بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۸

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۴/۰۱/۱۸
صفحه: ۱۶ تا ۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۰۷

چکیده مبسوط:

مقدمه و هدف: کم آبی و تنش خشکی از مهم ترین عوامل محدودکننده تولید گیاهان زراعی در مناطق خشک و نیمه خشک جهان به شمار می آید. تغییرات اقلیمی، از جمله کاهش منابع آب و افزایش دما، می توانند تأثیرات قابل توجهی بر کشاورزی و به ویژه بر تولید و کیفیت دانه های غلات بگذارند. در ایران، به ویژه با توجه به شرایط اقلیمی خاص و نیاز بالای آب گیاه برنج، موضوع تنش خشکی از اهمیت ویژه ای برخوردار است. برای مقابله با تنش خشکی و افزایش مقاومت برنج، روش های مختلفی پیشنهاد شده اند که یکی از مؤثرترین آن ها بیوپرایمینگ بذر است. بیوپرایمینگ به فرایند پیش تیمار بذر با استفاده از میکروارگانیسم ها یا ترکیبات زیستی اشاره دارد که به منظور بهبود جوانه زنی و رشد اولیه گیاهان انجام می شود. این روش به دلیل تأثیرات مثبت آن بر افزایش تولید محصول، بهبود حاصل خیزی پایدار خاک و افزایش مقاومت گیاه به شرایط نامساعد، اهمیت زیادی دارد. در این تحقیق، فرمولاسیون های پروبیوتیک تریکودرما برای بیوپرایمینگ بذر برنج مورد استفاده قرار گرفت. تریکودرما، به عنوان یک میکروارگانیسم با خواص محرک رشد و زیست مهارگری، می تواند به بهبود معماری ریشه و توسعه سیستم ریشه کمک کند. هدف این مطالعه، افزایش توانمندی گیاه برنج در دسترسی به آب و بهبود مقاومت به تنش های محیطی مانند خشکی و کم آبی است. بیوپرایمینگ بذر به ویژه از طریق افزایش قدرت جوانه زنی، تقویت رشد ریشه، و بهبود توانایی گیاه در جذب آب و مواد غذایی، به کاهش اثرات منفی تنش خشکی کمک می کند. در نتیجه، استفاده از فرمولاسیون های پروبیوتیک تریکودرما می تواند به بهبود عملکرد برنج در شرایط تنش و افزایش بهره وری تولید کمک کند.

مواد و روش ها: برای بررسی تأثیر بیوپرایمینگ بذر با استفاده از قارچ های *Trichoderma* بر بهبود سیستم ریشه و صفات مورفولوژیکی رقم هاشمی برنج (*Oryza sativa* L.)، آزمایش هایی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای طراحی و اجرا شدند. در مرحله اول، تیمارهای بیوپرایمینگ بر روی بذرهای پوشش دار و بدون پوشش در شرایط آزمایشگاهی اعمال شدند. تأثیر این تیمارها بر بذرهای بدون پوشش از طریق کشت متقابل تأیید گردید. سپس، آزمایش بیوپرایمینگ با ۶۰ جدایه قارچ *Trichoderma* به صورت فاکتوریل و در قالب طرح بلوک های کامل تصادفی با ۱۵ تکرار، بر روی بذرهای پوشش دار انجام شد. فاکتورهای آزمایشی شامل بیوپرایمینگ بذر برنج با ۱۰ تیمار منتخب از جدایه های *Trichoderma* در دو سطح کاربرد و عدم کاربرد قارچ بودند. بهترین تیمارهای حاصل از مرحله آزمایشگاهی، به طور جداگانه و در ترکیب با یکدیگر از نظر توانایی تحریک رشد ریشه و تأثیر بر صفات مورفولوژیکی در شرایط گلخانه ای بررسی شدند. شرایط کشت در گلخانه به گونه ای طراحی شد که شبیه سازی دقیقی از شرایط مزرعه ای را فراهم آورد. بذور تیمار شده در آزمایشگاه جوانه زدند و گیاهان به سینی های نشا در گلخانه منتقل شدند. سپس گیاهان به گلدان ها منتقل شدند و در فواصل زمانی یک ماهه، داده برداری از صفات مورفولوژیکی و افزودن مایه تلقیح به گلدان ها انجام شد. پس از ورود گیاهان به فاز زایشی، داده برداری از سطح ریشه، طول و تعداد ریشه ها صورت گرفت.

یافته ها: تحلیل جوانه زنی بذر برنج در مراحل اولیه رشد نشان داد که تیمارهای M4، M9+M74+GL89، و M9+G131+M4+GL89 موجب ۱۰۰ درصد جوانه زنی بذرها شدند. تحلیل آماری داده ها نشان داد که درصد جوانه زنی در نمونه های تیمار شده به طور معنی داری بالاتر از نمونه های شاهد بود و در شرایط گلخانه ای نیز تمامی تیمارها درصد جوانه زنی بیشتری را نسبت به شاهد نشان دادند. تحلیل Heat Map، تجزیه و تحلیل واریانس و مقایسه میانگین ها نشان دادند که استفاده از *Trichoderma* به طور معنی داری (۶۸ درصد) تعداد پنجه ها، طول و تعداد ریشه ها را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد. به ویژه، تیمار M75 با تولید ۵۰ ریشه، در مقایسه با شاهد که ۲۳ ریشه داشت، بیشترین تأثیر را در افزایش تعداد ریشه ها نشان داد. همچنین، تیمار KhB2 با طول ریشه ۳۵/۵ سانتی متر، بیشترین طول ریشه و تیمار GL89 با تعداد ۲/۱۴ پنجه، بیشترین تعداد پنجه را تولید کردند. علاوه بر این، تیمار M75 با طول ساقه ۸۲/۵ سانتی متر، بیشترین رشد طولی را ثبت نمود. این نتایج نشان می دهند که بیوپرایمینگ بذر برنج با *Trichoderma* به طور مؤثری می تواند ویژگی های گیاهچه ای، سیستم ریشه ای و مراحل فنولوژیکی رشد گیاه را بهبود بخشد. تحلیل های سببیتی ریشه با استفاده از نرم افزار Image J و نقشه های حرارتی (Heat Map) برتری تیمارهای KhB2 و GL89 را در تمامی ارزیابی های مورفولوژیکی تأیید کرد. این تحلیل ها به طور جامع مورفولوژی سطح ریشه تیمارهای ممتاز را با استفاده از نمودارهای سببیتی و مقیاس Z به تصویر کشیدند. نتایج نمودار سببیتی نشان دادند که درصد سطح ریشه ها در تیمارهای ممتاز GL89 و KhB2 به طور معنی داری بالاتر از تیمار شاهد بود. سطح ریشه برای تیمار KhB2 سه برابر و برای تیمار GL89 یک و نیم برابر شاهد افزایش یافت. این افزایش ها به وضوح نشان دهنده ارتقاء معنی دار سطح مقطع ریشه ها در تیمارهای پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد است. این یافته ها با داده های مقایسه میانگین ها و نقشه های حرارتی هم خوانی دارند و تأثیر مثبت تیمارهای پروبیوتیک بر گسترش سطح ریشه را تأیید می کنند.

علاوه بر این، بررسی خواص زیست مهارگری ۱۰ جدایه منتخب *Trichoderma* نشان داد که این جدایه ها به طور معنی داری درصد رشد طولی و جوانه زنی اسپورهای ۱۵ قارچ پاتوژن را نسبت به شاهد کاهش دادند. در میان این جدایه ها، KhB2 و GL89 با کاهش های ۱۰۰٪ و ۹۳٪ نسبت به شاهد، به عنوان بهترین عملکردها شناسایی شدند.

نتیجه گیری: آنالیز نهایی یافته ها نشان داد که استفاده از سویه های ممتاز قارچ تریکودرما، KhB2 و GL89، که دارای خواص زیست مهارگری و تحریک رشد بسیار خوب هستند، بیشترین تأثیر را بر افزایش طول و تعداد ریشه ها در گیاه برنج داشت. بنابراین، کاربرد فرمولاسیون های پروبیوتیک این سویه های منتخب می تواند به عنوان یک گزینه مؤثر برای معرفی به شالی کاران و استفاده در مزارع توصیه شود.

واژه های کلیدی: برنج، تریکودرما، محرک رشد، معماری ریشه، مورفواناتومی

مقدمه

اساسی برای تأمین نیازهای غذایی جوامع بشری ضروری است (Campanhola et al., 2018). برنج یکی از قدیمی ترین و مهم ترین غلات در سطح دنیا و گیاه مدل

با توجه به پیش بینی جمعیت ۹.۱ میلیارد نفری جهان در سال ۲۰۵۰، افزایش تولیدات کشاورزی به عنوان یک راهبرد

شوری مطرح می‌شود. پیش‌تیمار بذر به‌عنوان یک فناوری نوین، سبب افزایش سرعت و درصد جوانه‌زنی، بهبود کیفیت گیاهچه‌ها و استقرار بهتر گیاه می‌شود و از طریق فعال‌سازی مکانیزم‌های اولیه جوانه‌زنی قبل از کاشت، عملکرد گیاه را ارتقاء می‌دهد (Eslahi et al., 2020). سیستم ریشه، که به افزایش بهره‌وری از منابع آب و جذب مواد مغذی معدنی از خاک کمک می‌کند، برای بقای گیاه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. از این‌رو، استفاده از محرک‌های زیستی، به‌دلیل اثرات مثبت آن‌ها بر محیط زیست، برای بهبود ریشه‌دهی و استقرار گیاه بسیار ضروری است. تکنیک بیوپرایمینگ، که در آن بذرها قبل از کاشت و مواجهه با شرایط محیطی، با استفاده از موادی خاص به‌طور فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی برای جوانه‌زنی آماده می‌شوند، تأثیرات مثبتی بر جوانه‌زنی، استقرار اولیه گیاه، بهره‌برداری از منابع محیطی، زودرسی و افزایش کمی و کیفی محصول دارد (Wang & Shi, 2024). در بذرهایی پرایم‌شده، تغییرات متابولیکی از جمله هیدرولیز هیدرات‌های کربن تحت تأثیر آنزیم‌ها رخ می‌دهند که این تغییرات بذرها را برای فرایند جوانه‌زنی آماده می‌کنند، و این مسئله می‌تواند تسریع در جوانه‌زنی و کاهش زمان متوسط آن را توضیح دهد (Singh et al., 2016). بیوپرایمینگ با قارچ *Trichoderma* موجب بهبود رشد گیاه برنج در شرایط تنش خشکی می‌شود، این بهبود با فعال‌سازی مسیرهای متابولیکی گیاه مرتبط با سیستم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی، متابولیت‌های ثانویه و تنظیم هورمونی محقق می‌شود (Bashyal et al., 2021). بیوپرایمینگ بذر همچنین موجب افزایش نرخ جوانه‌زنی در بذر گندم و بهبود شاخص‌های رشد گیاهچه می‌گردد (Shaffique et al., 2023). علاوه بر این، اثرات مثبت پرایمینگ بذر با قارچ بر روی رشد گیاهان ذرت به‌خوبی مستند شده است. همچنین، مطالعات نشان داده‌اند که قارچ‌های اندوفیت در شرایط *in vitro* بر روی نفع تأثیر مثبتی دارند؛ به‌طوری‌که گیاهان همزیست با این قارچ‌ها از لحاظ اندازه و تولید اسانس برتری معنی‌داری نسبت به گیاهان شاهد نشان داده‌اند (Altbach et al., 2017).

کنترل بیولوژیکی نه‌تنها به‌عنوان یکی از راهکارهای اصلی و مؤثر در کاهش عوامل بیماری‌زای گیاهی مورد توجه قرار گرفته است، بلکه به‌دلیل عدم ایجاد خطرات زیست‌محیطی و عدم تأثیر منفی بر سلامت مصرف‌کنندگان و تولیدکنندگان، به‌طور فزاینده‌ای در کشاورزی مدرن مورد استقبال قرار گرفته است.

این پژوهش با هدف بررسی تأثیر تیمارهای *Trichoderma* با خواص زیست‌مهارگر و محرک رشد بر توسعه سیستم ریشه گیاه برنج انجام شده است و تلاش دارد تا فرمولاسیونی مؤثر را برای بهره‌برداری در مزارع برنج ارائه دهد.

مطلوبی برای مطالعات ژنتیکی و مولکولی است (Ahmadi Nasr Abad-Sofla et al., 2023). برنج، به‌عنوان دومین محصول زراعی مهم جهان پس از گندم، نقش حیاتی را در تأمین رژیم غذایی جهانی، به‌ویژه در قاره آسیا، ایفا می‌کند. از این‌رو، انجام تحقیقات گسترده در زمینه افزایش کمیت و کیفیت تولید این محصول زراعی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا بهبود عملکرد برنج می‌تواند سهم عمده‌ای از نیاز غذایی جمعیت جهانی را تأمین کند (Bagirov et al., 2020). پیش‌بینی‌ها حاکی از آن هستند که تقاضا برای برنج تا سال‌های ۲۰۳۵ و ۲۰۵۰ به‌ترتیب حدود ۲۶ و ۵۰ درصد افزایش خواهد یافت (Talebi kouyakh et al., 2023).

کاهش تولید برنج به‌ویژه به‌دلیل مشکلات مربوط به استقرار و رشد کند گیاه در مراحل اولیه رشد، به یکی از چالش‌های جدی تبدیل شده است. حتی در مناطقی با شرایط اقلیمی مناسب و سیستم‌های آبیاری مطمئن، تولید برنج در معرض خطر کاهش قرار دارد (Farooq et al., 2016). تنش خشکی یکی از مهم‌ترین عوامل کاهش جوانه‌زنی و رشد گیاه است. کاهش شدید جوانه‌زنی و رشد گیاه تحت تأثیر کمبود آب در شرایط تنش خشکی به‌وضوح مشاهده می‌شود (Kadam et al., 2017). ارتقای جوانه‌زنی تا حد زیادی به توسعه یک سیستم ریشه‌ای کارآمد و گسترده در گیاه برنج بستگی دارد؛ سیستمی که علاوه بر توانایی نفوذ به عمق خاک، دارای ریشه‌های جانبی فراوانی باشد. الگوی ریشه‌دهی برنج تحت تأثیر توانایی ژنتیکی و شرایط محیطی قرار دارد.

از جمله عوامل غیر ژنتیکی که می‌توانند به توسعه سیستم ریشه‌ای در گیاه برنج کمک کنند، میکروارگانیسم‌های محرک رشد مانند گونه‌های قارچ تریکودرما هستند. گونه‌های قارچ *Trichoderma* در خاک‌های مناطق مختلف اقلیمی یافت می‌شوند و از طرق مختلف باعث افزایش رشد گیاه و جذب عناصر غذایی از خاک می‌گردند. این قارچ‌ها با تغییر متابولیسم گیاه، منجر به توسعه ریشه، افزایش باروری محصول، و تقویت مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی می‌شوند (Yao et al., 2023).

اهمیت گونه‌های قارچی *Trichoderma* مانند *T. virens* و *T. atroviride* در افزایش رشد و زیست‌توده گیاهی و تحریک رشد و توسعه ریشه‌ها، به‌ویژه ریشه‌های جانبی، به‌طور گسترده‌ای شناخته شده است (Kowsari et al., 2014). این اثر به‌دلیل تولید ترکیباتی است که به فعال‌سازی هورمون اکسین در گیاهان کمک می‌کنند (Contreras-Cornejo et al., 2009). گونه‌های *Trichoderma* با تولید ترکیبات مرتبط با اکسین، مانند Indole-3-acetic acid، Indole-3-ethanol و Indole-3-acetaldehyde، مسیرهای پیام‌رسانی اکسین را فعال می‌کنند و موجب افزایش هورمون اکسین در ریشه‌های گیاه می‌شوند، که این امر به‌نوبه خود منجر به تقویت رشد و توسعه ریشه‌های جانبی می‌گردد (Contreras-Cornejo et al., 2014).

یکی از روش‌های مؤثر و کم‌هزینه برای بهبود جوانه‌زنی، پرایمینگ بذر با استفاده از میکروارگانیسم‌ها است، که به‌عنوان یک راهبرد کارآمد در مقابله با تنش‌های خشکی و

مواد و روش‌ها

برای بررسی تأثیر جدایه‌های تریکودرما بر ویژگی‌های رشدی، جوانه‌زنی، و ساختار ریشه برنج، ابتدا جدایه‌های قارچ *Trichoderma* انتخاب شدند و سپس تحقیقات و غربالگری این جدایه‌ها در دو سطح آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انجام گرفت. در این پژوهش، رقم هاشمی گیاه برنج به‌دلیل کیفیت بالا و تقاضای بازار مورد استفاده قرار گرفت.

انتخاب جدایه‌های قارچ تریکودرما

۶۰ جدایه تریکودرما، با توجه به تحقیقات پیشین و ویژگی‌های اختصاصی مرتبط با این پروژه، از بانک میکروبی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی انتخاب شدند. این جدایه‌ها که قبلاً از خاک و گیاهان شالیزارهای شمال کشور جداسازی شده بودند، با رایزوسفر گیاه برنج در شرایط غوطه‌وری در آب کاملاً سازگارند. پژوهش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی و در دو مرحله آزمایشگاهی و یک مرحله گلخانه‌ای در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران انجام شد.

آماده‌سازی جدایه‌ها

در ابتدا، جدایه‌های تریکودرما در محیط کشت PDA (عصاره سیب‌زمینی، دکستروز و آگار) به‌مدت یک هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی کشت داده شدند. پس از گذشت ۷ روز و رسیدن به مرحله اسپورزایی، غلظت اسپورهای تولید شده با استفاده از لام نتوبار تنظیم و به غلظت 10^7 cfu/mL (واحد تشکیل کلونی در هر میلی‌لیتر) رسید تا برای انجام تست‌های بیوپرایمینگ آماده شود. این غربالگری در دو سطح آزمایشگاهی (با دو روش) و همچنین در شرایط گلخانه‌ای انجام شد.

بررسی ویژگی‌های محرک رشد جدایه‌های تریکودرما مرحله اول فاز آزمایشگاهی

برای تسریع اثربخشی تیمار در بیوپرایمینگ، ابتدا پوشش شلتوک‌های بذور برنج جدا شدند. بدین‌منظور، تمامی ظروف و بذور به‌طور کامل ضدعفونی شدند. بذور برنج بدون پوست با الکل ۷۰٪ به‌مدت ۱ دقیقه و سپس با هیپوکلریت سدیم ۵٪ به‌مدت ۱۵ و ۳۰ دقیقه ضدعفونی سطحی و پس از آن با آب مقطر استریل شسته شدند. بذور بدون پوشش بر روی دستمال مرطوب در شرایط استریل رشد داده شدند. بذور جوانه‌دار شده پس از ۳ روز، به محیط کشت آگار حاوی 10^7 ٪ محیط کشت Murashige and Skoog (MS) در پتری‌دیش‌های ۸ سانتی‌متری منتقل شدند. برای بررسی تأثیر جدایه‌های تریکودرما، یک پلاک 0.5 سانتی‌متری از میسلیم ۷ روزه هر جدایه، در فاصله ۵ سانتی‌متری از نوک ریشه گیاهچه‌ها قرار داده شد تا امکان انتشار ترکیبات قارچی مؤثر بر رشد و توسعه گیاه فراهم گردد. پس از ۵ روز، میزان رشد ریشه و توسعه ریشه‌های جانبی گیاهچه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت (Contreras-Cornejo et al., 2009).

در این مرحله، کشت متقابل هر جدایه قارچ با دو تکرار و همچنین کشت جوانه‌ها بدون قارچ به‌عنوان شاهد انجام شد. پتری‌دیش‌های مورد آزمایش به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه

سانتی‌گراد منتقل شدند. پس از تحلیل نتایج مرحله اول، که به‌منظور ارزیابی خاصیت محرک رشد سویه‌ها بود، نتایج بدست آمده در مرحله بعدی (دوم) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مرحله دوم فاز آزمایشگاهی

در مرحله دوم، بذور برنج (با پوشش) مشابه مرحله اول ضدعفونی سطحی شدند. پس از تهیه مایه تلقیح از جدایه‌های تریکودرما، شلتوک‌های برنج ضدعفونی‌شده با تیمارهای مختلف تریکودرما در بازه‌های زمانی ۵، ۱۵ و ۳۰ دقیقه تلقیح شدند. سپس، بذور تلقیح‌شده در شیشه‌های مخصوص حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل قرار داده شدند و در شرایط دمایی ۲۸ درجه سانتی‌گراد با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. برای ارزیابی تأثیر جدایه‌های تریکودرما، اثرات آنها بر ویژگی‌های مختلف شامل سطح سب‌بعدی ریشه، تعداد پنجه‌ها، طول و تعداد ریشه‌ها بررسی شد (Doni et al., 2014).

تست زیست‌مهارگری (کشت متقابل قارچ و پاتوژن)

تیمارهایی که محرک رشد بودند از لحاظ خواص زیست‌مهارگر در جهت مبارزه با پاتوژن‌های مهم در بخش کشاورزی (*Paecilomyces formosus*, *Fusarium solani*, *Fusarium redolens*, *Mortierella alpina*, *Alternaria malorum*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria multififormis*, *Mortierella alpina*, *Pencillium expansum*, *Fusarium equiseti*, *Botritis cinerea*, *As4-fusarium*, *Didymella glomerata*, *Ahternaria alternata*) مورد بررسی قرار گرفتند. تست به این صورت انجام گرفت که یک پلاک 0.5 سانتی‌متری از میسلیم ۷ روزه جدایه‌های قارچ تریکودرما به‌منظور امکان انتشار ترکیبات قارچی که می‌تواند بر روی رشد و توسعه پاتوژن تأثیر بگذارد در فاصله ۶ سانتی‌متری از پاتوژن‌های موردنظر قرار گرفت و ۵ روز بعد از انجام این عمل، میزان رشد و توسعه جدایه‌ها و پاتوژن‌ها بررسی شد. به‌منظور بررسی اثر قارچ بر رشد پاتوژن‌ها، کشت متقابل هر قارچ با دو تکرار و کشت جوانه‌ها بدون قارچ (شاهد) انجام شد. سپس پتری‌دیش‌های مورد آزمایش به انکوباتور ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند. پس از به‌دست آوردن نتایج جهت کاهش رشد پاتوژن‌ها، جدایه‌های توانمند برای فاز گلخانه انتخاب شدند.

تست زیست‌مهارگری (کشت متقابل قارچ و پاتوژن)

برای ارزیابی خواص زیست‌مهارگری جدایه‌های تریکودرما، تیمارهایی که به‌عنوان محرک رشد شناسایی شده بودند، از نظر توانایی آنها در مقابله با پاتوژن‌های مهم کشاورزی مورد بررسی قرار گرفتند. پاتوژن‌های مورد بررسی شامل *Paecilomyces formosus*, *Fusarium solani*, *Fusarium redolens*, *Mortierella alpina*, *Alternaria malorum*, *Alternaria infectoria*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria multififormis*, *Mortierella alpina*, *Pencillium expansum*, *Fusarium equiseti*, *Botritis cinerea*, *As4-fusarium*, *Didymella glomerata*, *Ahternaria alternata* بودند.

برای انجام تست زیست‌مهارگری، یک پلاک 0.5 سانتی‌متری از میسلیم ۷ روزه جدایه‌های تریکودرما به‌منظور انتشار ترکیبات مهارگر در فاصله ۶ سانتی‌متری از پاتوژن‌های

گروه اصلی تقسیم شدند: ۱- تیمارهای تک‌جدایه: شامل ۱۰ جدایه تریکودرما ۲- تیمارهای چندجدایه: شامل ۴ فرمولاسیون کمپلکس از ترکیب چندین جدایه و نمونه پروبیوتیک تجاری (تریکورویین) و تیمار شاهد. برای انتخاب مناسب‌ترین سویه‌ها، ابتدا نتایج تیمارهای مختلف بر روی خصوصیات مورفولوژیکی گیاهان مورد بررسی قرار گرفتند. سپس، تیمارهایی که به‌عنوان محرک رشد شناسایی شدند، از نظر خواص زیست‌مهارگری نیز مورد ارزیابی قرار گرفتند. تیمارهایی که توانستند از میان ۱۵ پاتوژن بررسی‌شده، در برابر حداقل ۱۱ پاتوژن رشد ۱۰۰٪ را نشان دهند، برای اعمال در فاز گلخانه‌ای انتخاب شدند (جدول ۱).

موردنظر قرار داده شد. این آزمایش به‌مدت ۵ روز انجام شد و سپس میزان رشد و توسعه پاتوژن‌ها در پتری‌دیش‌ها بررسی گردید. به‌منظور ارزیابی اثر قارچ بر رشد پاتوژن‌ها، کشت متقابل هر قارچ با دو تکرار انجام شد و کشت جوانه‌ها بدون قارچ به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. پتری‌دیش‌های مورد آزمایش به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و پس از تحلیل نتایج، جدایه‌های دارای توانمندی بالا در کاهش رشد پاتوژن‌ها برای مراحل گلخانه‌ای انتخاب شدند.

فاز گلخانه

تدوین و اعمال تیمارهای نهایی

در این تحقیق، ۱۰ جدایه منتخب قارچ تریکودرما (تیمارهای A-J، مطابق با جدول ۱) که در فاز آزمایشگاهی موجب افزایش طول ریشه و تعداد ریشه‌ها شدند، برای ارزیابی در فاز گلخانه‌ای انتخاب شدند. در این مرحله، ۱۶ تیمار به دو

جدول ۱- تیمارهای منتخب برای فاز گلخانه

Table 1. Selected treatments for the greenhouse phase

تیمارهای تک جدایه		تیمارهای مرکب	
M74 (A)	KhB2 (E)	G131(I)	M74+G189+M9 (M)
G146-2 (B)	G50-10 (F)	KhB7 (J)	G146-2+M74+G189+M9 (N)
M9 (C)	G189 (G)	Control (K)	G189+M4+G131+M9 (O)
M75 (D)	M4(H)	Tricho Roocin (L)	G189+M9 (P)

شکل ۴) و داده‌برداری‌های لازم برای ارزیابی تأثیرات تیمارها بر ویژگی‌های رشدی و مورفولوژیکی گیاه انجام شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب

سویه‌های منتخب برای مرحله بعدی (شناسایی مولکولی) انتخاب شدند. شناسایی مولکولی بر مبنای تکثیر ژن 18S rDNA و تعیین توالی ژن مذکور انجام شد. پس از استخراج DNA ژنومی جدایه منتخب، کیفیت و غلظت DNA استخراج‌شده با استفاده از نانودراپ اسپکتوفومتر (Thermo Scientific, 2000C) و در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

به‌منظور تکثیر ژن 18S rDNA، واکنش PCR در حجم ۴۰ میکرولیتر با استفاده از ۲۰ میکرولیتر Master mix و آغازگر پیش‌رو^۱ (ITS1) (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' (۲ میکرولیتر، آغازگر پس‌رو^۲ (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-) (۳ میکرولیتر، ITS4 (3' ۲ میکرولیتر، ۲ میکرولیتر DNA الگو و ۱۴ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شامل ۴ دقیقه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴°C و ۳۵ چرخه به‌صورت ۱ دقیقه در ۹۴°C، ۱ دقیقه در ۵۹°C، ۲ دقیقه در ۷۳°C و مرحله گسترش نهایی در ۷۳°C به‌مدت ۵ دقیقه انجام شد (Zakaria et al., 2010). محصول PCR روی ژل آگاروز ۱٪ با ولتاژ ۸۰ الکتروفورز شد و پس از الکتروفورز برای تعیین توالی به شرکت فزایژه ارسال شد. توالی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار BLAST در بانک ژن پایگاه اطلاعاتی NCBI مورد تحلیل و ثبت قرار گرفتند (Drevinek, 2023).

شلتوک برنج رقم هاشمی با تیمارهای مختلف به‌مدت ۵ دقیقه تلقیح شد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی، حدود یک ماه در شیشه‌های حاوی ۲۰ سی‌سی آب نگهداری و سپس به سینی کشت منتقل گردید. در این راستا، برای شبیه‌سازی شرایط آزمایش با گلخانه، خاک شالیزار موسسه تحقیقات برنج شمال کشور در فاز گلخانه استفاده شد. خاک ابتدا اتوکلاو شد و نشاها پس از ۲ هفته به گلدان سه کیلویی با قطر دهانه ۲۱ سانتی‌متر وارد و در گلخانه با شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی وارد شدند. سپس، ۱۶ تیمار قارچی با ۱۵ تکرار وارد فاز گلخانه شدند و داده‌برداری‌ها انجام شد.

تلقیح و انتقال نشاها به گلخانه

شلتوک برنج رقم هاشمی با تیمارهای مختلف به‌مدت ۵ دقیقه تلقیح شد و سپس در شیشه‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی به‌مدت حدود یک ماه نگهداری شد. پس از این مدت، شلتوک‌های تلقیح‌شده به سینی‌های کشت منتقل شدند. برای شبیه‌سازی شرایط گلخانه، از خاک شالیزار موسسه تحقیقات برنج شمال کشور استفاده شد.

ابتدا خاک شالیزار تحت عمل اتوکلاو قرار گرفت تا استریل شود. نشاهای تولیدشده پس از ۲ هفته به گلدان‌های سه کیلویی با قطر دهانه ۲۱ سانتی‌متر منتقل شدند و در گلخانه با شرایط نوری مشابه (۱۶ ساعت روشنائی و ۸ ساعت تاریکی) قرار گرفتند.

در فاز گلخانه‌ای، ۱۶ تیمار قارچی با ۱۵ تکرار بیولوژیک، در شرایط گلخانه‌ای بررسی شدند (جدایه‌های ذکرشده در

¹ Forward

² Reverse

پردازش و کمی سازی تصاویر ریشه در تیمارهای بهینه با استفاده از نرم افزار ImageJ

برای بررسی توسعه سیستم ریشه برنج تحت تأثیر تیمارهای منتخب پروبیوتیک قارچ تریکودرما، از نرم افزار ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) برای پردازش و کمی سازی تصاویر گیاهان کشت شده در فاز گلخانه استفاده شد. این نرم افزار با استفاده از افزونه های تخصصی خود، ابزاری قدرتمند برای تحلیل و پردازش تصاویر در حالت سه بعدی فراهم می آورد. در این تحقیق، تأثیر بهترین تیمارهای منتخب نسبت به گیاه شاهد از نظر طول و تعداد ریشه ها و سطح ریشه ها مورد بررسی قرار گرفتند. هدف اصلی این بررسی، تحلیل تأثیر پروبیوتیک های گیاهی بر توسعه سیستم ریشه ای بود. به این ترتیب، سیستم ریشه ای گسترش یافته در فضای سه بعدی به دقت با استفاده از این نرم افزار تصویربرداری شد و نتایج آن به طور دقیق مورد ارزیابی قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده ها و بررسی نرمال بودن خطاهای آزمایشی با استفاده از نرم افزار آماری SAS انجام شد. برای مقایسه میانگین ها، از آزمون (Least Significant Difference) LSD در سطح احتمال ۵٪ استفاده گردید. این تحلیل به منظور ارزیابی دقیق تأثیر تیمارهای مختلف بر ویژگی های رشدی و سایر پارامترهای موردنظر به کار رفت.

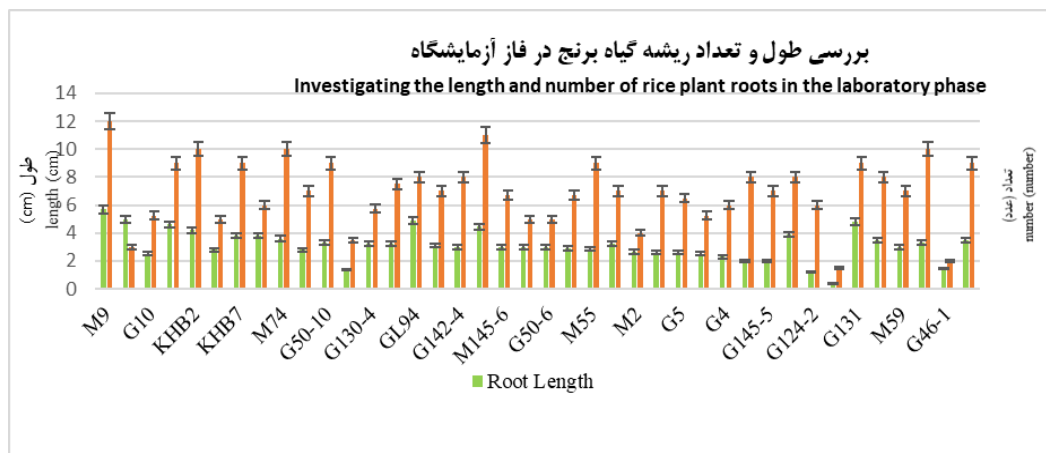
نتایج و بحث

نتایج مرحله اول فاز آزمایشگاهی

در مرحله اول فاز آزمایشگاهی، ضد عفونی بذرها با هیپوکلریت سدیم به مدت ۳۰ دقیقه به عنوان روش بهینه انتخاب شد. جوانه زنی بذرها برنج در محیط کشت Murashige and Skoog (MS) پس از ۳ روز آغاز شد. نتایج آزمایش ها نشان دادند که تیمارهای مختلف تأثیرات معنی داری بر ویژگی های سیستم ریشه بذرها برنج داشتند. به ویژه، تیمارهای مختلف تغییرات قابل توجهی را در تعداد ریشه های کرون، ریشه های موین، و طول ریشه ها ایجاد کردند. پس از ۷ روز از جوانه زنی، تفاوت های معنی داری در ساختار و گسترش سیستم ریشه ها در نمونه های تیمار شده نسبت به گروه شاهد مشاهده شد، که تأثیر مثبت تیمارها بر بهبود ویژگی های ریشه را تأیید می کند.

نتایج مرحله دوم فاز آزمایشگاهی

در مرحله دوم فاز آزمایشگاهی، ارزیابی صفات مورفولوژیکی شامل طول ریشه، تعداد ریشه و طول ساقه روی ۶۰ جدایه تریکودرما به مدت یک ماه انجام شد. لازم به ذکر است که ۲۰ جدایه هیچ تأثیری روی بهبود سیستم ریشه و ساقه نداشتند و در مراحل بعدی از تحلیل آماری حذف شدند. تحلیل داده ها روی ۴۰ جدایه باقیمانده، تغییرات معنی داری را در طول و تعداد ریشه ها را نشان داد. نتایج تحلیل ها حاکی از آن هستند که از میان ۴۰ تیمار تریکودرما، ۱۴ تیمار طول ریشه بیشتری را نسبت به نمونه های شاهد نشان دادند و این تغییرات معنی دار بودند. هشت جدایه دیگر تعداد ریشه بیشتری را تولید کردند. این یافته ها به وضوح در شکل ۱ نشان داده شده اند و تأثیر مثبت برخی جدایه ها بر بهبود طول و تعداد ریشه ها را در مقایسه با تیمار شاهد تأیید می کنند.



شکل ۱- بررسی صفات مورفولوژیکی گیاه برنج در فاز آزمایشگاه

Figure 1. Investigating the morphological characteristics of rice plants in the laboratory phase

دادند. به ویژه، این تیمارها قادر بودند تا رشد ۱۰۰٪ از حداقل ۱۲ پاتوژن را مهار کنند (شکل ۲).

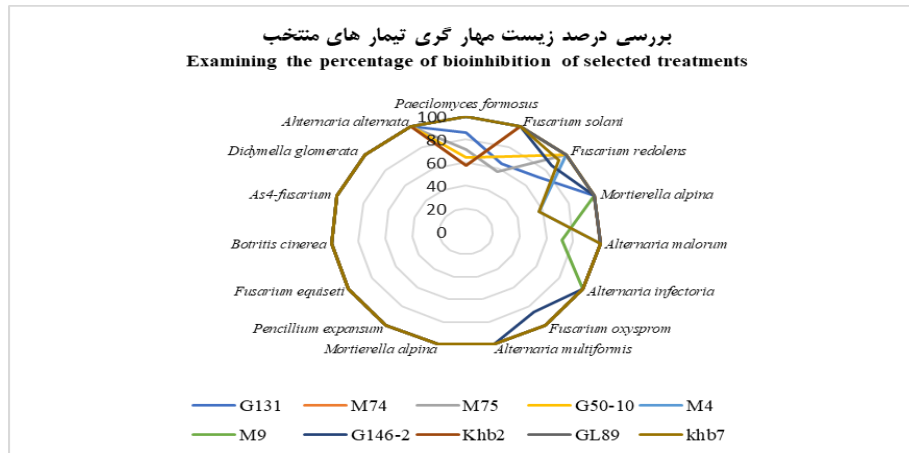
در نمودار رادار، هر چه قطر دایره ها بزرگ تر باشد، درصد کاهش رشد جدایه های تریکودرما در مقایسه با پاتوژن ها بالاتر است. در میان سویه های منتخب، سویه GL89 با قطر دایره ۱۰۰، نشان دهنده مهار کامل رشد (۱۰۰٪) از ۱۵ پاتوژن مختلف بود و بالاترین فعالیت زیست مهارگری را به نمایش

آنانالیز یافته ها نشان داد که از ۶۰ تیمار تریکودرما، ۱۴ تیمار طول ریشه بلندتر و هشت جدایه تعداد ریشه بیشتری نسبت به شاهد داشتند.

نتایج تست زیست مهارگری

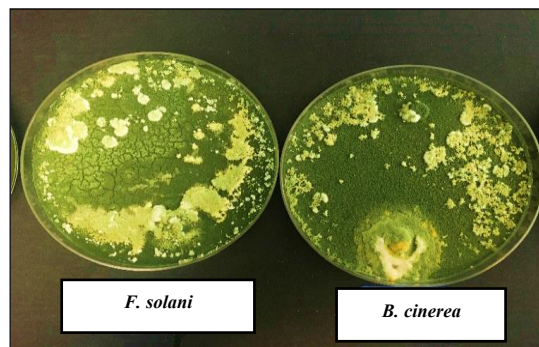
نتایج ارزیابی زیست مهارگری که در نمودار رادار ارائه شده اند، نشان می دهند که کلیه تیمارهای منتخب توانایی بالای ۸۰٪ در کاهش رشد پاتوژن های کلیدی را از خود نشان

گذاشت. سویه‌های M9، M74، M4 و M9 نیز با کاهش رشد ۹۳٪ در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند.



شکل ۲- بررسی خصوصیات زیست‌مهارگر ۱۰ سویه منتخب برای تیمار در سطح گلخانه
Figure 2. Investigating the bioinhibitor properties of 10 selected strains for treatment at the greenhouse level

شکل ۳ فعالیت زیست‌مهارگری سویه GL89 را در مقابل دو پاتوژن مهم، *Fusarium solani* و *Botrytis cinerea* به‌طور دقیق نمایش می‌دهد.

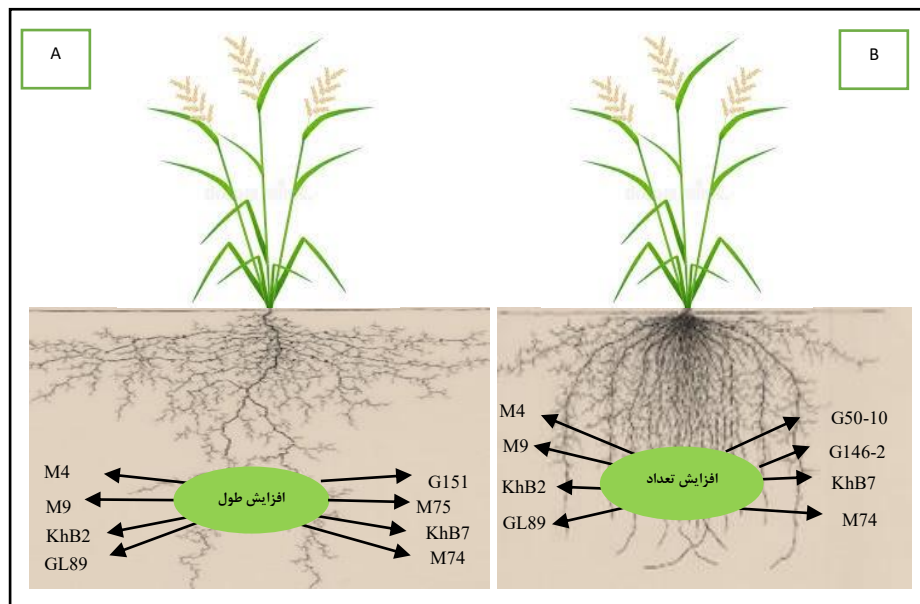


شکل ۳- بررسی خواص بازدارنده زیستی سویه انتخاب‌شده (GL89)
Figure 3. Investigating the bioinhibitor properties of a selected strain (GL89)

تیمارها تعداد ریشه‌های بیشتری نسبت به نمونه شاهد (۹ عدد) داشتند. در این میان، جدایه M9 با تولید ۱۲ عدد ریشه، بیشترین تعداد ریشه را به ثبت رساند. دلایل انتخاب این تیمارها برای فاز گلخانه به تفصیل در شکل ۴ نمایش داده شده‌اند.

نتایج غربالگری سویه‌ها در اثبات ویژگی‌های محرک رشد

نتایج غربالگری سویه‌ها برای ارزیابی ویژگی‌های محرک رشد نشان دادند که تمامی تیمارهای منتخب طول ریشه بیشتری را نسبت به نمونه شاهد (۳/۴۵ سانتی‌متر) تولید کردند. در میان این تیمارها، جدایه M9 با طول ریشه ۵/۷ سانتی‌متر بیشترین میزان رشد را نشان داد. همچنین، ۸۰٪ از



شکل ۴- تیمارهای منتخب برای فاز گلخانه. A-تیمارهای مؤثر در افزایش طول ریشه B-تیمارهای مؤثر در افزایش تعداد ریشه
Figure 4. Selected treatments for the greenhouse phase. A-treatments effective in increasing root length; B-treatments effective in increasing the number of roots

ثبت شد. اسم جنس و گونه و کد بانک NCBI این سویه‌ها در جدول ۲ نشان داده شده‌اند.

شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب

جدایه‌هایی که بیشترین اثربخشی را در فاز آزمایشگاهی داشتند جهت انجام تحقیق در فاز گلخانه، شناسایی مولکولی شدند. اطلاعات توالی‌های این سویه‌ها در بانک ژن NCBI

جدول ۲- نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب

Table 2. Results of the molecular identification of selected isolates

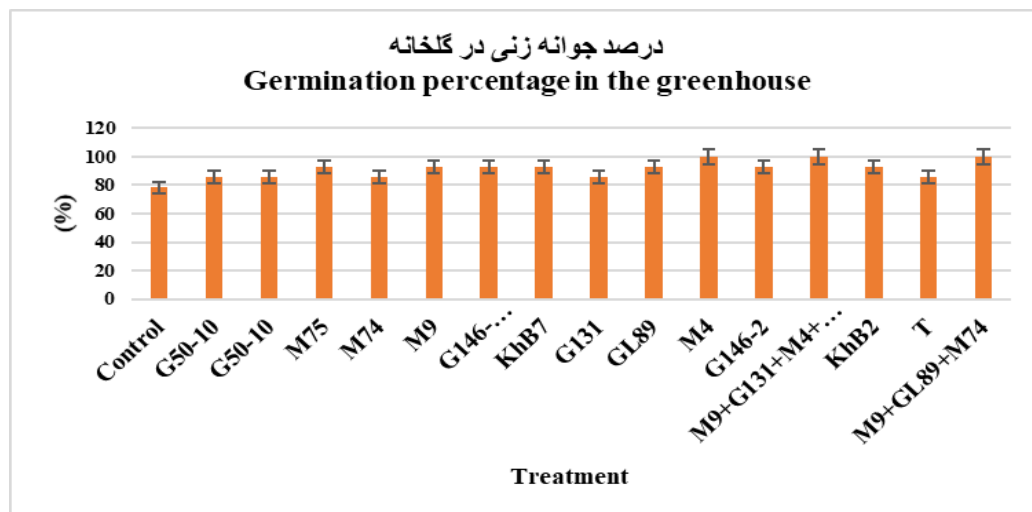
Description	GenBank	Sample
<i>Trichoderma</i> sp.	OR037753	G131
<i>Paecilomyces variotii</i>	OR053659	G146-2
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	OR131270	M9
<i>Trichoderma epimyces</i>	OR037509	G50-10
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	OR053682	GL89
<i>Trichoderma harzianum</i>	OR196114	KhB2
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	OR121581	KhB7
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	OR131266	M4
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	OR138296	M74
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	OR131309	M75

گروه شاهد نشان دادند. تیمارهای M4، M9+M74+GL89 و M9+G131+M4+GL89 دارای ۱۰۰٪ درصد جوانه‌زنی بودند (شکل ۵).

نتایج ارزیابی رشد گیاهان در گلخانه

درصد جوانه‌زنی

تحلیل داده‌ها نشان داد که درصد جوانه‌زنی در نمونه‌های تیمار شده به‌طور قابل توجهی بالاتر از نمونه‌های شاهد بود. در فاز گلخانه، تمامی تیمارها درصد جوانه‌زنی بیشتری نسبت به



شکل ۵- درصد جوانه‌زنی در فاز گلخانه
Figure 5. The germination percentage in the greenhouse phase

در بررسی بیوپرایمینگ روی بذر پنبه (*Gossypium hirsutum* L) نشان داده شد که با این تکنیک زمان لازم برای سبز شدن تا ۹۰٪ کاهش یافت. همچنین، مطالعات بر روی برنج تأکید کرده‌اند که بیوپرایمینگ با افزایش فعالیت آنزیم‌های متابولیسم کربوهیدرات‌ها، از جمله آلفا و بتا آمیلاز، پروتئاز و آنزیم‌های تجزیه‌کننده لیپیدها، موجب تجزیه ماکرومولکول‌ها و تسهیل رشد و توسعه جنین می‌شود، که در نهایت به تسریع سبز شدن و کاهش زمان جوانه‌زنی کمک می‌کند (Sharma, Rathore, Srinivasan, & Tyagi, 2014). علاوه بر این، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که بیوپرایمینگ بذر برنج با سلنیوم سدیم از طریق افزایش مالون دی‌آلدئید و کاتالاز می‌تواند مدت زمان سبز شدن را تا ۵۰٪ کاهش دهد (Du et al., 2019).

بررسی میزان رشد بر اساس صفات مورفولوژیکی

تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها (جدول ۴) نشان دادند که کاربرد قارچ تریکودرما تأثیر معنی‌داری بر صفات مورفولوژیکی برنج از جمله تعداد و طول ریشه، تعداد پنجه و طول ساقه در سطح احتمال ۵٪ داشت. بر اساس نتایج جدول مقایسه میانگین (جدول ۳)، حضور تریکودرما منجر به افزایش حدود ۶۸٪ در طول ریشه برنج شد، به طوری که میانگین طول ریشه به ۲۶.۱ سانتی‌متر رسید. این نتایج با یافته‌های مطالعات قبلی همخوانی دارند (Contreras-Cornejo et al., 2009). گزارشات مشابه نشان دادند که گونه‌های مختلف تریکودرما موجب افزایش رشد و زیست‌توده گیاهی و تحریک رشد ریشه‌ها و افزایش ریشه‌های جانبی می‌شوند. بیوپرایمینگ با تریکودرما موجب بهبود رشد برنج در خاک‌های تحت تنش خشکی از طریق فعال‌سازی مسیرهای متابولیک گیاهی مرتبط با دفاع آنتی‌اکسیدانی، تولید متابولیت‌های ثانویه و تنظیم تغییرات هورمونی می‌شود (Bashyal et al., 2021).

این نتایج حاکی از آن هستند که تیمارهای مورد استفاده به‌طور مؤثر کیفیت فیزیولوژیکی بذر را بهبود داده‌اند. تحقیقات دیگر نیز نشان داده‌اند که پیش‌تیمار بذر برنج با مواد مغذی موجب افزایش درصد و سرعت سبز شدن شده است. این افزایش به فعالیت بالاتر آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی نظیر سوپراکسید دیسموتاز، پراکسیداز، کاتالاز و همچنین ترکیبات غیر آنزیمی مانند گلوتاتیون نسبت داده می‌شود (Khan et al., 2018). علاوه بر این، بهبود درصد و سرعت سبز شدن با بهبود کیفیت غشاء سیتوپلاسمی و کاهش اتلاف الکترولیت‌ها مرتبط است. به نظر می‌رسد که پوشش‌دهی بذر برنج موجب تکمیل مؤثر مرحله متابولیسم می‌شود و بهبود درصد سبز شدن را به همراه دارد (Huang et al., 2021).

در واقع، بذرهای پیش‌تیمار شده نسبت به بذرهای پیش‌تیمار نشده، مراحل جوانه‌زنی را سریع‌تر طی می‌کنند. پژوهش‌ها نشان داده‌اند که تسریع درصد سبز شدن در اثر پوشش‌دهی بذر با ترکیبات اُسمزی به عوامل مختلفی نسبت داده می‌شود، از جمله افزایش فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده نظیر آلفا آمیلاز، افزایش سطح انرژی زیستی از طریق افزایش مقدار ATP، و ارتقاء سنتز RNA و DNA. این تغییرات منجر به بهبود عملکرد میتوکندری‌ها و تسهیل رشد و توسعه گیاهچه‌ها می‌شود. همچنین، ممکن است سیالیت بالاتر غشاء پلاسمایی، تحریک تقسیم سلولی، و افزایش تولید پروتئین‌های پاسخ‌دهنده به تنش غیر زیستی در این فرایند نقش داشته باشند. علاوه بر این، مطالعات دیگر کاهش زمان لازم برای جوانه‌زنی برنج به دلیل بیوپرایمینگ را به عواملی مانند افزایش تقسیم سلولی، جذب بهتر آب توسط بذر، ترمیم و سنتز DNA و RNA، افزایش فعالیت آنزیم‌های کلیدی مانند اسید فسفاتاز، دهیدروژناز، و آمیلاز نسبت داده‌اند (Afrouz, 2023).

جدول ۳- تجزیه واریانس (میانگین مربعات) برخی صفات مورفولوژیک در گیاه برنج پرایم شده با تریکودرما
Table 3. Analysis of variance (mean square) for some morphological traits in rice plants primed with *Trichoderma*

منبع تغییرات	درجه آزادی	طول ساقه	تعداد پنجه	تعداد ریشه	طول ریشه
Source of variance	Degree of freedom	Stem length	Number of tillers	Number of roots	Root length
تیمار	15	72.4*	1.62*	34*	26.1*
ضریب تغییرات	CV (%)	3.7	30	13	7.1
مربع ضریب همبستگی	R ²	0.91	0.5	0.7	0.90
معنی دار بودن	*	<.0001	0.035	0.0015	<.0001

Significant at the 5% probability level*

*معنی دار در سطح احتمال ۵٪

آنالیز داده‌ها

آنالیز داده‌ها نشان داد که طول ریشه در تمامی تیمارها نسبت به شاهد افزایش قابل توجهی داشت. در میان این تیمارها، سویه KhB2 با طول ریشه ۳۵/۵ سانتی‌متر، بیشترین طول ریشه را از آن خود کرد، که دوبرابر طول ریشه شاهد (۱۷/۵ سانتی‌متر) بود. این افزایش طول ریشه ممکن است به دلیل تأثیر بیوپرایمینگ بر بهبود توانایی گسترش دیواره‌های سلولی جنین باشد، همان‌طور که میسگانا و همکاران (Misganaw *et al.*, 2020) نیز تأیید کردند. آن‌ها گزارش کردند که بیوپرایمینگ با افزایش میزان دی‌فسفاتیدیل‌گلیسرول در بذرها، باعث سازمان‌دهی بهتر غشاهای میتوکندری و افزایش تولید ATP می‌شود، که در نهایت منجر به افزایش رشد ریشه می‌گردد.

در بررسی‌های انجام‌شده پس از چهار ماه، تعداد ریشه‌ها در اکثر تیمارها (۱۴ تیمار) بیشتر از شاهد بود. سویه M75 با ۵۰ ریشه بیشترین تعداد ریشه را داشت که دوبرابر تعداد ریشه در شاهد بود. همچنین، آنالیزها نشان دادند که در این مرحله از رشد گیاه، تمامی تیمارها ارتفاع بیشتری نسبت به شاهد داشتند و در میان آن‌ها، سویه M75 با ارتفاع ۸۲/۵ سانتی‌متر، بیشترین ارتفاع را به نسبت به شاهد به‌خود اختصاص داد.

تعداد پنجه بارور و تأثیر بیوپرایمینگ بر عملکرد برنج

تعداد پنجه بارور یکی از عوامل کلیدی در تعیین عملکرد برنج است. تحلیل داده‌ها نشان داد که گیاهان تیمار شده با

قارچ تریکودرما تعداد پنجه بیشتری نسبت به گروه شاهد داشتند. از میان این تیمارها، سویه GL89 بالاترین تعداد پنجه بارور را به‌خود اختصاص داد. به‌نظر می‌رسد که این افزایش تعداد پنجه‌ها ناشی از تحریک رشد اولیه گیاهچه‌ها از طریق بیوپرایمینگ باشد. بیوپرایمینگ به‌وسیله تأمین عناصر غذایی ضروری برای رشد در مراحل اولیه فصل، منجر به سبز شدن سریع‌تر گیاهچه‌ها و انتقال زودتر آن‌ها به مرحله اتوتروف می‌شود. این فرآیند به‌نوبه خود توانایی جذب مواد مغذی را افزایش داده، بهبود ویژگی‌های زایشی از جمله افزایش تعداد پنجه‌های بارور را به‌همراه دارد (Khan, 2020). پیش‌تیمار با عناصر غذایی تأثیر به‌سزایی بر فرآیندهای آنزیمی، تنفس، جذب و تثبیت CO₂، سنتز پروتئین‌ها و بهبود فتوسنتز از طریق تنظیم عملکرد روزنه‌ها و روابط آب در گیاه دارد. این تأثیر به‌ویژه در شرایط تنش خشکی نمایان می‌شود و موجب افزایش عملکرد گیاهان می‌گردد (Wang *et al.*, 2013). به‌طور خاص، پژوهش‌ها نشان داده‌اند که پوشش‌دهی بذر برنج با کلرید کلسیم و کلرید پتاسیم به‌طور قابل ملاحظه‌ای تعداد پنجه‌ها در واحد سطح را افزایش می‌دهد.

نتایج کلی صفات مورفولوژیک

نتایج نهایی تأثیر بیوپرایمینگ بذر با پروبیوتیک تریکودرما بر ویژگی‌های ریشه و ساقه برنج در جدول ۴ ارائه شده‌اند.

جدول ۴- نتایج کلی تأثیر پیش‌تیمار کردن بذر بر خصوصیات ریشه و ساقه برنج در ۴ ماهگی
Table 4. General results of the effect of seed pretreatment on the characteristics of rice root and stem

تیمار	تعداد پنجه (عدد در بوته)	طول ساقه (سانتی‌متر در بوته)	طول ریشه (سانتی‌متر در بوته)	تعداد ریشه (عدد در بوته)
Treatment	Tillers (number per plant)	Stem length (cm per plant)	Root length (cm per plant)	Number of roots (number per plant)
Control	1.01c	61e	18	23e
G131	1.66ab	65.5c	26.7abc	36bc
G146-2	1.66ab	74b	30ab	29cde
G146-2+M9+GL89+M74	1.78ab	74.3b	25.7abc	35bc
G50-10	1.33bc	65cd	19.3c	29cde
GL89	2.33a*	73bc	32ab	39b
KhB2	1.66ab	63e	35.5a*	37b
KhB7	1.66ab	71.8bc	33.1ab	34bcd
M4	1.333bc	67.4cd	23.8bc	27de
M74	1.66ab	63e	31ab	34bcd
M75	1.66ab	82.5a*	26.3abc	50a*
M9	1.66ab	81a*	27.6abc	39b
M9+G131+M4+GL89	1.66ab	81.5a*	26.3abc	32bcd
M9+GL89	1.83ab	74b	24.6bc	36bc
M9+GL89+M74	1.5bc	76.6b	24.2bc	44ab
T	1.33bc	81a*	26.4ab	28de

میانگین‌های در هر ستون که دارای حداقل یک حرف مشترک هستند، اختلاف معنی‌داری بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد ندارند.

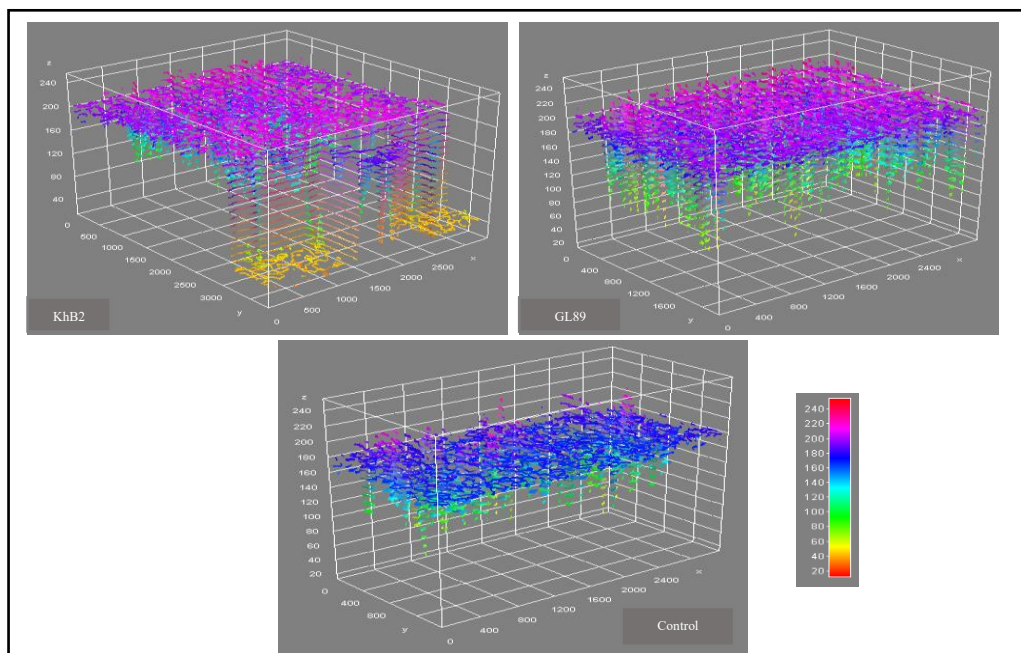
The means in each column that share at least one common letter do not have a significant difference according to the least significant difference (LSD) test at the 5% level.

این نمودار، محور Y برای تیمار شاهد در بازه ۰ تا ۱۲۰۰ واحد تنظیم شده است، در حالی که این بازه برای تیمار KhB2 به ۳۵۰۰ واحد و برای تیمار GL89 به ۲۰۰۰ واحد افزایش یافته است. این افزایش‌ها به‌وضوح نشان‌دهنده ارتقاء معنی‌دار سطح مقطع ریشه‌ها در تیمارهای ممتاز پروبیوتیک نسبت به تیمار شاهد هستند. این یافته‌ها با داده‌های مقایسه میانگین‌ها و نقشه حرارتی (Heat Map) همخوانی دارند و تأثیر مثبت تیمارهای پروبیوتیک بر گسترش سطح ریشه را تأیید می‌کنند.

تحلیل سه‌بعدی سطح ریشه و تأثیر تیمارهای ممتاز
این تحلیل شامل بررسی جامع مورفولوژی سطح ریشه‌ها (شکل ۶) است که با استفاده از نمودار سه‌بعدی و مقیاس Z به تصویر کشیده شده است (شکل ۷). نمودار سه‌بعدی نمای دقیقی از سطح ریشه‌ها را نمایش می‌دهد که شدت رنگ آن به درصد سطح ریشه‌های رشد یافته مربوط می‌شود. نتایج این نمودار نشان می‌دهند که درصد سطح ریشه‌ها در تیمارهای ممتاز GL89 و KhB2 (با رنگ بنفش، که نشان‌دهنده امتیاز بالاتر است) به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد است. در



شکل ۶- نمای نزدیک از ریشه تیمارهای ممتاز در کنار شاهد جهت بررسی ریشه در سطح سه‌بعدی
Figure 6. A close-up view of the root of the premium treatments next to the control to examine the root in three dimensions



شکل ۷- Interactive 3D surface در ریشه‌های برنج
Figure 7. Interactive 3D surface diagram in rice roots

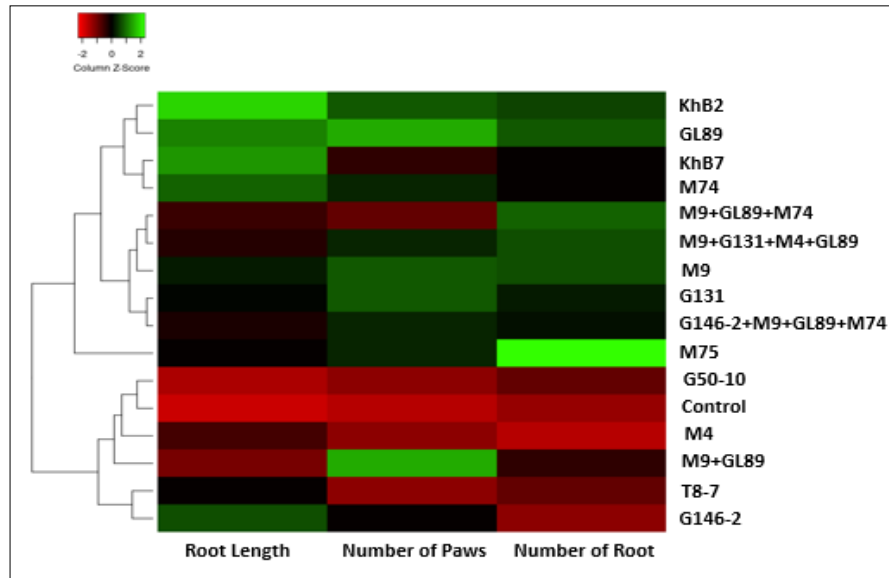
پنجه، طول ریشه، و تعداد ریشه مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۸). جهت تحلیل جامع این داده‌ها و انتخاب بهترین جدایه، از نمودار Heat Map استفاده شد که امکان مقایسه همزمان میانگین‌های سه صفت موردنظر را فراهم می‌کند.

طراحی فرمولاسیون پروبیوتیک گیاهی تریکودرما برای گیاه برنج

برای معرفی جدایه‌های مؤثر در طراحی فرمولاسیون جدید پروبیوتیک، تأثیر هر جدایه بر سه صفت کلیدی شامل تعداد

در بهبود ویژگی‌های رشدی گیاه برنج نشان دادند. این نتایج به‌وضوح مؤید این هستند که تیمارهای KhB2 و GL89 در طراحی فرمولاسیون پروبیوتیک گیاهی برای بهبود رشد و عملکرد گیاه برنج، مؤثرترین گزینه‌ها هستند.

نتایج تحلیل داده‌ها این نمودار نشان دادند که ۶۸٪ از تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد، از نظر تعداد پنجه، طول ریشه، و تعداد ریشه به‌طور معنی‌داری برتری داشتند. در بین تیمارهای مختلف، جدایه KhB2 و پس از آن GL89، بهترین نتایج را



شکل ۸- آنالیز نهایی صفات کلیدی (تعداد پنجه‌ها، طول و تعداد ریشه)

Figure 8. Final analysis of key traits (number of tillers, length, and number of roots)

ریشه‌ها بودند که منجر به بهبود دسترسی گیاه به منابع آب و افزایش تاب‌آوری گیاه برنج در شرایط تنش خشکی شدند. از میان تیمارهای مختلف، تیمار M75 بیشترین تأثیر را بر افزایش تعداد ریشه‌ها و طول ساقه داشت، در حالی که تیمار KhB2 بیشترین تأثیر را بر افزایش طول ریشه نشان داد. همچنین، تعداد پنجه‌ها تحت تأثیر تیمار تریکودرما افزایش یافت و تیمار GL89 بیشترین اثربخشی را در این زمینه داشت. با توجه به نتایج این تحقیق، می‌توان نتیجه گرفت که قارچ تریکودرما قادر است به‌طور مؤثر ساختار مورفولوژیکی گیاه برنج را بهبود بخشد. استفاده از تیمارهای مختلف به‌صورت انفرادی یا به‌عنوان کنسرسیوم‌های مختلف می‌تواند به‌عنوان راهکارهای مؤثر در کشاورزی مورد استفاده قرار گیرد. توسعه و به‌کارگیری فرمولاسیون‌های اثربخش می‌تواند به کشاورزان کمک کند تا در شرایط کم‌آبی، عملکرد و کیفیت محصول برنج را بهبود بخشند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق تأثیر مثبت پوشش‌دهی بذرها با قارچ تریکودرما را در بهبود ویژگی‌های رشدی و جوانه‌زنی گیاه برنج نشان می‌دهند. پرایمینگ بذر برنج با تریکودرما به‌طور مؤثری درصد و سرعت سبز شدن بذرها را افزایش می‌دهد و ساختار سیستم ریشه‌ای گیاه را بهبود می‌بخشد. پوشش‌دهی بذر با عوامل بیولوژیکی مانند تریکودرما که قادر به کنترل گستره‌ای از عوامل بیماری‌زا و میکروبی خاک است، در افزایش مقاومت گیاه به استرس‌های بیولوژیکی و محیطی نقش مهمی ایفا می‌کند و می‌تواند به‌عنوان یک استراتژی مؤثر برای بهبود رشد و مقاومت گیاهان در نظر گرفته شود. پرایمینگ بذر برنج با تریکودرما موجب کاهش مدت زمان لازم برای دستیابی به مراحل مختلف فنولوژیکی به‌میزان سه تا ده روز شد. نتایج نشان دادند که تیمار بذر برنج با سویه‌های منتخب تریکودرما تغییرات قابل‌توجهی را در ساختار سیستم ریشه‌ای ایجاد کرد. این تغییرات شامل افزایش طول و تعداد

References

- Ahmadi Nasr Abad-Sofla, F., Amiri Fahlani, R., Dehdari, M., & Farajee, H. (2023). The Response of Genetic, Morphological, and Biochemical Parameters of Rice (*Oryza sativa* L.) F2: 4 Genotypes to Drought Stress at the Germination Stage. *Journal of Crop Breeding*, 15(48), 103-112. [In Persian]
- Afrouz, M., Sayyed, R. Z., Fazeli-Nasab, B., Piri, R., Almalki, W., & Fitriatin, B. N. (2023). Seed bio-priming with beneficial *Trichoderma harzianum* alleviates cold stress in maize. *Peerj*, 11, e15644.
- Altbach, P. G. (2017). *Responding to massification: Differentiation in postsecondary education worldwide* (pp. 1-12). SensePublishers.
- Bagirov, V., Treshkin, S., Korobka, A., Dereka, F., Garkusha, S., Kovalev, V., & Kizinek, S. (2020). Scientific support of the rice growing industry of the agroindustrial complex of the Russian Federation in solving the problems of food security. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 210, p. 05006). EDP Sciences.

- Bashyal, B. M., Parmar, P., Zaidi, N. W., & Aggarwal, R. (2021). Molecular programming of drought-challenged *Trichoderma harzianum*-bioprimered rice (*Oryza sativa* L.). *Frontiers in Microbiology*, 12, 655165.
- Campanhola, C., & Pandey, S. (Eds.). (2018). *Sustainable food and agriculture: An integrated approach*. Academic Press.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Alfaro-Cuevas, R., & López-Bucio, J. (2014). *Trichoderma* spp. improve growth of *Arabidopsis* seedlings under salt stress through enhanced root development, osmolite production, and Na⁺ elimination through root exudates. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(6), 503-514.
- Contreras-Cornejo, H. A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C., & López-Bucio, J. (2009). *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149(3), 1579-1592.
- Du, B., Luo, H., He, L., Zhang, L., Liu, Y., Mo, Z., & Tang, X. (2019). Rice seed priming with sodium selenate: Effects on germination, seedling growth, and biochemical attributes. *Scientific Reports*, 9(1), 4311.
- Doni, F., Isahak, A., Che Mohd Zain, C. R., & Wan Yusoff, W. M. (2014). Physiological and growth response of rice plants (*Oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. inoculants. *Amb Express*, 4, 1-7.
- Drevinek, P., Hollweck, R., Lorenz, M. G., Lustig, M., & Bjarnsholt, T. (2023). Direct 16S/18S rRNA gene PCR followed by Sanger sequencing as a clinical diagnostic tool for detection of bacterial and fungal infections: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 61(9), e00338-23.
- Eslahi, N., Kowsari, M., Motallebi, M., Zamani, M. R., & Moghadasi, Z. (2020). Influence of recombinant *Trichoderma* strains on growth of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by increased root colonization and induction of root growth related genes. *Scientia Horticulturae*, 261, 108932.
- Huang, P., He, L., Abbas, A., Hussain, S., Hussain, S., Du, D., & Saqib, M. (2021). Seed priming with sorghum water extract improves the performance of camelina (*Camelina sativa* L. crantz.) under salt stress. *Plants*, 10(4), 749.
- Kadam, N. N., Tamilselvan, A., Lawas, L. M., Quinones, C., Bahuguna, R. N., Thomson, M. J., Yin, X. (2017). Genetic control of plasticity in root morphology and anatomy of rice in response to water deficit. *Plant Physiology*, 174(4), 2302.
- Khan, A., Alam, M., & Jamal, Y. (2020). Effect of bio-priming, organic and inorganic nitrogen sources and beneficial microorganisms on growth and biochemical traits of wheat. *Sarhad Journal of Agriculture*, 36(2), 685-701.
- Khan, F., Hussain, S., Tanveer, M., Khan, S., Hussain, H. A., Iqbal, B., & Geng, M. (2018). Coordinated effects of lead toxicity and nutrient deprivation on growth, oxidative status, and elemental composition of primed and non-primed rice seedlings. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 21185-21194.
- Kowsari, M., Motallebi, M., & Zamani, M. (2014). Protein engineering of chit42 towards improvement of chitinase and antifungal activities. *Current Microbiology*, 68, 495-502.
- Misganaw, A., Aklil, M., & Kesete, N. (2020). Review on the effects of seed priming on performance of maize seedlings. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 10, 31-39.
- Nawaz, A., Farooq, M., Ahmad, R., Basra, S. M. A., & Lal, R. (2016). Seed priming improves stand establishment and productivity of no till wheat grown after direct seeded aerobic and transplanted flooded rice. *European Journal of Agronomy*, 76, 130-137.
- Shaffique, S., Imran, M., Kang, S.-M., Khan, M. A., Asaf, S., Kim, W.-C., & Lee, I.-J. (2023). Seed Bio-priming of wheat with a novel bacterial strain to modulate drought stress in Daegu, South Korea. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1118941.
- Sharma, A. D., Rathore, S. V. S., Srinivasan, K., & Tyagi, R. K. (2014). Comparison of various seed priming methods for seed germination, seedling vigour and fruit yield in okra (*Abelmoschus esculentus* L. Moench). *Scientia Horticulturae*, 165, 75-81.
- Singh, V., Upadhyay, R. S., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2016). Seed bio-priming with *Trichoderma asperellum* effectively modulate plant growth promotion in pea. *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 9(3), 361-365.
- Talebi kouyakh, S., Maleki zanjani, B., Modarresi, M., & Tarang, A. (2023). Genetic and phenotypic screening of different rice genotypes according to the functional marker related to the semi-dwarfing Sd1 Gene. *Journal of Crop Breeding*, 15(48), 14-21. [In Persian]
- Wang, M., Zheng, Q., Shen, Q., & Guo, S. (2013). The critical role of potassium in plant stress response. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 7370-7390.
- Wang, X., & Shi, Y. (2024). Effects of different seed priming agents on seed germination and physiological characteristics of wheat under saline-alkali stress. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 84(4), 489-499.
- Yao, X., Guo, H., Zhang, K., Zhao, M., Ruan, J., & Chen, J. (2023). *Trichoderma* and its role in biological control of plant fungal and nematode disease. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1160551.