مقاله پژوهشی

نشریه علمی تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران | شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/IJMAPR.2021.352573.2897
جلد ۳۷، شماره ۳، صفحه ۵۲۹-۵۱۳ (۱۴۰۰) | شناسه دیجیتال (DOR): 20.1001.1.17350905.1400.37.3.10.5

تأثیر بیوپرایمینگ بذر با قارچ *Trichoderma harzianum* روی تولید متابولیت‌های ثانویه در زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.)

نیما خالدی[1*]، عباس ده‌شیری[2] و فرشید حسنی[2]

۱*- نویسنده مسئول، استادیار، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

پست‌الکترونیک: n_khaledi@areeo.ac.ir

۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۹ | تاریخ اصلاح نهایی: خرداد ۱۴۰۰ | تاریخ پذیرش: تیر ۱۴۰۰

چکیده

این مطالعه به‌منظور بررسی تأثیر بیوپرایمینگ با تعدادی از جدایه‌های بومی قارچ *Trichoderma harzianum* روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه بذر یک توده بومی زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) انجام شد. همچنین تأثیر آنزیم‌های خارج سلولی تولیدشده توسط این جدایه‌ها به‌عنوان الیسیتور بر تولید و انباشت متابولیت‌های ثانویه در گیاهچه‌های حاصل از بذرهای بیوپرایم شده بررسی شد. براساس نتایج، تمام جدایه‌های *T. harzianum* قادر به تولید آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز، سلولاز، زایلاناز، کیتیناز و لیپاز بودند. نتایج همچنین نشان داد که بیوپرایمینگ بذر زیره سبز به‌طور قابل‌توجهی روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی بذر تأثیر گذاشته و موجب بهبود کیفیت و سلامت بذر و گیاهچه شد. در این مطالعه، اسانس گیاهچه‌های حاصل از بذرهای بیوپرایم شده به روش تقطیر با آب استخراج و ترکیب‌های شیمیایی آن با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی شناسایی شدند. نتایج نشان داد که ترکیب‌های اصلی شناسایی شده شامل بتا-پینن، پارا-سیمن، لیمونن، گاما-ترپینن، ترپینن-۴-اُل، آلفا-ترپینئول، کومین آلدهید و بتا-فارنزن بودند. همچنین قارچ *T. harzianum* و آنزیم‌های ترشح شده توسط آن به‌عنوان الیسیتور موجب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با تولید و انباشت متابولیت‌های ثانویه در زیره سبز شدند. این اولین گزارش در مورد تأثیر بیوپرایمینگ بذر با جدایه‌های بومی قارچ *T. harzianum* روی ترکیب‌های اسانس گیاهچه‌های زیره سبز می‌باشد. یافته‌های این پژوهش نشان داد که مقدار آنزیم‌های خارج سلولی ترشح شده توسط جدایه‌های *T. harzianum* متفاوت است و روی میزان تولید و انباشت متابولیت‌های ثانویه در زیره سبز تأثیر می‌گذارد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی، بیوپرایمینگ، ترپنوئیدها، *Cuminum cyminum* L.، کیفیت بذر.

مقدمه

گیاه زیره سبز با نام علمی *Cuminum cyminum* L. از خانواده چتریان (Apiaceae) بوده و سرشار از متابولیت‌های ثانویه است که به‌دلیل خواص دارویی، غذایی و آرایشی دارای ارزش اقتصادی زیادی می‌باشد (Sowbhagya *et al.*, 2008). متابولیت‌های ثانویه ترکیب‌هایی با وزن مولکولی معمولاً کمتر از ۳ کیلو دالتون و ساختار متنوع هستند که توسط میکروارگانیسم‌ها و گیاهان بیوسنتز می‌شود (Vinale

& Sivasithamparam, 2020). متابولیت‌های ثانویه گیاهان معمولاً براساس مسیر متابولیسمی آنها از لحاظ ساختاری و بیوشیمیایی در سه گروه عمده ترپن‌ها، فنول‌ها و ترکیب‌های نیتروژن‌دار و سولفوردار در نظر گرفته می‌شوند (Gholami, 2017). قارچ‌ها دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه را تولید می‌نمایند که به‌طور مستقیم برای رشد مورد نیاز نمی‌باشند، اما در فعالیت‌های مختلف زیستی و اکولوژیک ازجمله دفاع در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، تنظیم برهم‌کنش میکروارگانیسم‌ها با یکدیگر و گیاهان و همچنین سازگاری با محیط نقش مهمی دارند (Harvey *et al*., 2015؛ Moore *et al*., 2014؛ TajickGhanbari *et al*., 2014؛ Reino *et al*., 2008).

اسانس‌های گیاهی به‌عنوان منبعی غنی از متابولیت‌های ثانویه تولید شده در گیاهان دارویی شناخته می‌شوند (Aali *et al*., 2017). تفاوت‌های ژنتیکی و ساختاری تحت تأثیر شرایط محیطی در تقابل و تعامل با میکروارگانیسم‌های مختلف روی فرایندهای مختلف فیزیولوژیک و متابولیسمی و در نتیجه کمّیت و کیفیت ترکیب‌های شیمیایی اسانس‌های گیاهی تأثیر می‌گذارند (Kazemizadeh *et al*., 2011). خواص دارویی و آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی وابسته به ترکیب‌های شیمیایی آنهاست که تحت تأثیر منشأ جغرافیایی، ژنوتیپ گیاه، اندام‌های مختلف گیاه، مرحله رشد و شرایط محیطی قرار می‌گیرد (Brooks *et al*., 2007).

محققان بخش داروسازی و کشاورزی با توجه به اهمیت اسانس‌های گیاهی به‌عنوان ترکیب‌های دارویی طبیعی و محدودیت اراضی مستعد و قابل کشت همواره به‌دنبال راهکاری برای افزایش عملکرد محصول و بهبود بخشیدن بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان هستند (Aali *et al*., 2017). به‌طور کلی، بالابردن عملکرد محصول تابع عوامل خاصی است که مهمتر از همه، انتخاب و کشت بذر پرمحصول می‌باشد که باید در کنار عوامل دیگر ازجمله مدیریت بیماری‌ها در نظر گرفته شود (Hampton *et al*., 2013).

بذر به‌عنوان یکی از مهمترین نهاده‌ها در کشاورزی پایدار بوده و نقش مهمی در دستیابی به قابلیت واقعی عملکرد دارد. پرایمینگ بذر تکنیکی برای پیش تیمار بذر با استفاده از مواد شیمیایی، هورمونی و بیولوژیک است که ضمن بهبود کیفیت بذر به لحاظ فیزیولوژیک، بیولوژیک و بیوشیمیایی، گیاهچه‌ها را پیش از مواجهه شدن با شرایط اکولوژیک مختلف و عوامل بیماری‌زای بذرزاد و خاکزاد آماده می‌نماید (Ansari *et al*., 2012؛ Bennett & Whipps, 2008). یکی از انواع پرایم‌ها، استفاده از پیش‌تیمارهای زیستی به‌ویژه قارچ‌های تریکودرما و مایکوریزا و همچنین باکتری‌های محرک رشد گیاهی می‌باشد که از طریق سازوکارهای مختلفی ازجمله تولید آنزیم‌های خارج سلولی، آنتی‌بیوتیک‌ها و شبه هورمون‌های گیاهی به‌عنوان الیسیتور موجب بهبود رشد گیاه و کنترل عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Pu *et al*., 2009؛ Bennett & Whipps, 2008). از سوی دیگر استفاده از عوامل کنترل زیستی به‌دلیل سازگاری با محیط‌زیست و پایداری کمتر می‌توانند جایگزین مناسبی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی محسوب شوند. استفاده از الیسیتورها با منشأ زیستی و غیر زیستی یکی از مهمترین روش‌ها برای افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌باشند که از طریق القای پاسخ‌های دفاعی تغییرات فیزیولوژیک و تجمع فیتوآلکسین باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه در گیاهان می‌شوند (Esmaeilzadeh Bahabadi & Sharifi, 2013).

گونه‌های مختلف *Trichoderma* منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه بوده و در برهم‌کنش با میکروارگانیسم‌ها از سازوکارهای مختلفی ازجمله تولید آنتی‌بیوتیک، میکوپارازیتیسم، رقابت، آنتی‌بیوز، القاء مقاومت، تغییر در ریزوسفر، القای مقاومت سیستمیک، تنظیم و القای فاکتورهای رشدی، تولید طیف وسیع و متنوعی از متابولیت‌های فرّار (مانند ترکیب‌های ترپنی) و غیرفرّار (مانند تریکوتسین و تریکودرمین) و همچنین تولید آنزیم‌های خارج سلولی (مانند سلولاز، کیتیناز، پروتئاز و گلوکاناز) استفاده می‌کنند (Vinale & Sivasithamparam, 2020؛ Khaledi & Taheri, 2016؛ Keswani *et al*., 2014؛

Reino ؛Lorito *et al*., 2010 ؛Mukherjee *et al*., 2012 *et al*., 2008). تحقیقات مختلفی در زمینه استخراج و شناسایی متابولیت‌های ثانویه قارچ *Trichoderma* انجام شده است (Habibi *et al*., 2015 ؛Zavvari *et al*., 2012 ؛Gupta *et al*., 2005 ؛Jun *et al*., 2011).

ترپن‌ها متابولیت‌های ثانویه غنی از ترکیب‌های پنج کربنه به نام ایزوپرن هستند که از استیل کوآنزیم A و از طریق مسیر موالونیک اسید بیوسنتز می‌شوند (Sangwan *et al*., 2001). ترکیب‌های ترپنوئیدی گروهی از ترپن‌ها بوده که دارای گروه عاملی دیگری به‌ویژه اکسیژن می‌باشند و در اثر اکسیداسیون این ترکیبات حاصل می‌شوند (Zhao *et al*., 2013). ترپنوئیدها در گیاهان نقش‌های مهمی در فرایندهای ساختاری، عملکردی و اکولوژیک دارند. این ترکیب‌ها در بسیاری از فرایندهای متابولیسم سلولی ازجمله فتوسنتز، تنفس، زنجیره انتقال الکترون، بیوسنتز و نفوذپذیری غشاء و دیواره سلولی و تنظیم رشد و نمو سلول نقش‌های مهمی دارند (Mazid *et al*., 2011). علاوه‌براین برخی از ترپن‌ها در برهم‌کنش گیاه با سایر میکروارگانیسم‌ها و جذب عوامل گرده‌افشان نقش داشته و می‌توانند موجب محافظت گیاهان در مقابل گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زا شوند (Malmierca *et al*., 2015؛ Leeder *et al*., 2011؛ Paiva, 2000). ترکیب‌های ترپنوئیدی موجب مهار رشد میسلیومی قارچ‌های*Fusarium oxysporum* و *Rhizoctonia solani* می‌شوند (Cakir *et al*., 2004).

اگرچه تحقیقات فراوانی در مورد ترکیب‌های اسانس زیره سبز و درصد آنها انجام شده است اما تاکنون گزارشی در مورد تأثیر بیوپرایمینگ بذر زیره سبز روی درصد ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس گیاهچه‌های حاصل از آنها انجام نشده است. بنابراین، هدف از این پژوهش (الف) بررسی فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح شده توسط جدایه‌های *T. harzianum*، (ب) تأثیر بیوپرایم بذر زیره سبز روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی و (ج) ارزیابی ارتباط بین تأثیر میزان آنزیم‌های خارج سلولی ترشح‌شده با میزان درصد ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس گیاهچه‌های حاصل از بذرهای بیوپرایم شده با *T. harzianum* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی و مواد گیاهی

ده جدایه بومی از قارچ *Trichoderma harzianum* از کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد دریافت گردید. خاصیت آنتاگونیستی این جدایه‌ها در پژوهش‌های قبلی روی قارچ‌ها و نماتدهای بیماری‌زای گیاهی و بیماری‌های ناشی از آنها مورد بررسی قرار گرفته بود (Khaledi & Taheri, 2016). توده بذری زیره سبز مشهد از مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال تهیه شد. قبل از شروع آزمایش، میزان زنده‌مانی بذر با استفاده از آزمایش تترازولیوم از طریق قرار دادن آنها در محلول ۰/۱٪ تترازولیوم در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت و بعد تغییر رنگ بذرهای سالم به رنگ ارغوانی مایل به نیلی کنترل شد (زنده‌مانی بذر= حدود ۹۰٪).

روش سنجش فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی ترشح شده توسط جدایه‌ها

برای استخراج آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز، سلولاز، زایلاناز، کیتیناز و لیپاز توسط جدایه‌های قارچی به‌ترتیب از محیط کشت‌های مایع حاوی نشاسته (Miller, 1959)، آزوکازئین (Garcia-Careno *et al*., 1994)، کربوکسی متیل سلولز (Abdel-Razik, 1970)، زایلان جو دوسر (Miller, 1959)، کیتین کلوئیدی (Ulhoa & Peberdy, 1992) و روغن زیتون (Ortega *et al*., 2013) استفاده و میزان فعالیت آنزیم‌ها به‌ترتیب در طول موج‌های ۵۵۰، ۴۴۰، ۵۵۰، ۵۴۰، ۵۴۴ و ۴۴۰ نانومتر بررسی شد. شاهد منفی شامل محیط کشت مایع بدون ترکیب‌های ذکر شده به همراه هریک از جدایه‌های قارچی بود. میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی، ۲۴ ساعت پس از تلقیح ارزیابی شد. با توجه به مطالعات قبلی، فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی در شرایط آزمایشگاهی در مدت ۱۰ روز پس از تلقیح بررسی گردید (Ortega *et al*., 2013؛ Zhao *et al*., 2013؛ Kikot *et al*., 2009).

واحد فعالیت آنزیمی آمیلاز، با توجه به منحنی استاندارد، تحت عنوان مقدار آنزیمی که یک میکرومول قند احیاءکننده را در یک دقیقه آزاد می‌کند، در نظر گرفته شد (Miller, 1959). یک واحد از فعالیت پروتئاز به‌عنوان مقدار آنزیمی که یک میکرومول آزوکازئین را در هر ساعت طی واکنش هیدرولیز تولید می‌کند، اندازه‌گیری شد (Gutowska *et al*., 2004). میزان فعالیت آنزیم سلولاز براساس جذب در غلظت‌های مختلف گلوکز با معرف اسید دی‌نیتروسالیسیلیک اندازه‌گیری شد و یک واحد از فعالیت سلولاز به‌عنوان مقدار آنزیمی که ۰/۱ میکرومول گلوکز را در هر دقیقه طی واکنش هیدرولیز تولید می‌کند، تعیین شد (Wood & Bhat, 1998). یک واحد از فعالیت زایلاناز به‌صورت مقدار آنزیمی که یک میکرومول زایلوز را در هر دقیقه تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی‌گراد آزاد می‌کند، اندازه‌گیری شد (Bailey *et al*., 1992). همچنین یک واحد از فعالیت کیتیناز به‌عنوان مقدار آنزیمی که یک میکرومول ان–استیل گلوکزآمین را در هر ساعت آزاد می‌کند، اندازه‌گیری شد (Ulhoa & Peberdy, 1992). میزان فعالیت آنزیم لیپاز براساس جذب در غلظت‌های مختلف پی‌نیتروفنل پالمیتات در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۵۰ میلی‌مولار بافر Tris-HCl (۷ pH) اندازه‌گیری شده و یک واحد از فعالیت لیپاز به‌عنوان مقدار آنزیمی که یک میکرومول پی‌نیتروفنل پالمیتات را در هر دقیقه طی واکنش هیدرولیز کاتالیز تولید می‌کند، مشخص گردید (Ortega *et al*., 2013). آزمایش برای هر آنزیم چهار تکرار داشت و آزمایش دو بار تکرار شد.

روش تیمار بیوپرایمینگ بذرها

برای تیمار بیوپرایمینگ بذرها از روش شرح داده‌شده توسط Entesari و همکاران (۲۰۱۳) استفاده شد. برای این منظور بذرها قبل از تیمار توسط محلول هیپوکلریت سدیم (حاوی ۱٪ کلر فعال) به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی شده و بعد با آب‌مقطر استریل سه بار شستشو شدند. سوسپانسیون اسپور جدایه‌های قارچ *T. harzianum* در غلظت ۱×۱۰^{۷} اسپور در میلی‌لیتر با استفاده از روش سری رقّت سریالی با آب‌مقطر استریل تهیه شد (Harman *et al*., 2006). به‌منظور بهتر چسبیدن اسپورهای *T. harzianum* به سطح بذرها مقدار ۱٪ کربوکسی متیل سلولز به‌عنوان چسباننده به سوسپانسیون اسپور قارچ اضافه شد و در نهایت از سوسپانسیون مذکور به نسبت ۱۰ میلی‌لیتر در هر ۱۰۰ گرم بذر مخلوط شده و در داخل ارلن و روی شیکر با سرعت ۱۲۸ دور در دقیقه به مدت ۱۸۰ دقیقه قرار گرفت (Piri *et al*., 2019). سپس، بذرهای تیمار شده روی کاغذهای سترون قرار گرفتند و در زیر هود لامینار فلو خشک شدند. برای اطمینان از وجود اسپورهای *T. harzianum* در سطح بذر، یک گرم از بذرها با استفاده از روش سری رقّت سریالی در محلولی که حاوی توییین ۲۰ بود قرار داده شد. در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار ریخته شد و در دمای ۱±۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بعد از ۲۴ ساعت تعداد اسپورهای جوانه زده شمارش شدند (Harman, 2008).

ارزیابی تأثیر بیوپرایمینگ بذرها روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه

آزمون جوانه‌زنی استاندارد براساس دستورالعمل انجمن بین‌المللی آزمون بذر انجام شد (ISTA, 2010). برای این منظور تعداد ۴۰۰ بذر (چهار تکرار با ۱۰۰ عدد بذر) از بذرهای بیوپرایم شده به‌صورت تصادفی انتخاب و روی کاغذ صافی واتمن در داخل ظروف پتری قرار داده شدند و به اتاقک رشد در دمای ۱±۲۴ درجه سانتی‌گراد و با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل گردیدند (Piri *et al*., 2019). پس از ۱۴ روز، میانگین درصد جوانه‌زنی (خروج ریشه‌چه حداقل دو میلی‌متر یا بیشتر به‌عنوان معیار جوانه‌زنی)، میانگین درصد گیاهچه‌های عادی و غیرعادی (تغییر شکل یافته و بیمار)، میانگین

ارتفاع ساقه‌چه و ریشه‌چه، میانگین وزن‌تر و وزن خشک که شامل مجموع بخش هوایی و زیرزمینی می‌باشند (با قرار دادن در آون به مدت ۲۴ ساعت در ۷۵ درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری شد. وزن خشک گیاهچه‌ها، پس از خشک کردن آنها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در درون آون تعیین شد. همچنین شاخص طولی و وزنی بنیه بذر با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (Nautiyal, 2009).

درصد جوانه‌زنی × (میانگین طول ریشه‌چه + میانگین طول ساقه‌چه) = شاخص طولی بنیه

درصد جوانه‌زنی نهایی×وزن خشک گیاهچه = شاخص وزنی بنیه

استخراج اسانس و شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده آن

گیاهچه‌های زیره سبز حاصل از بذرهای بیوپرایم شده با جدایه‌های مختلف قارچ *T. harzianum* و شاهد که شامل مجموع بخش هوایی و زیرزمینی بودن در مرحله فنولوژیکی ساقه دادن، پس از شستشو و خشک کردن در سایه و دمای اتاق، با استفاده از آسیاب خرد گردید. اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب به مدت حدود ۳ ساعت در دستگاه کلونجر انجام شد. اسانس بدست‌آمده به‌وسیله سولفات سدیم خشک، آب‌گیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. درصد اسانس با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید.

$$\text{درصد اسانس} = \frac{\text{وزن اسانس}}{\text{وزن خشک گیاه}} \times 100$$

برای تفکیک ترکیب‌های اسانس از دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Agilent 6890 مجهز به ستون مویین HP-5MS با طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. برنامه حرارتی ستون از ۶۰ تا ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد با سرعت افزایش ۴ درجه سانتی‌گراد در دقیقه برنامه‌ریزی شد. دمای محفظه تزریق و آشکارساز به‌ترتیب ۲۵۰ و ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم و از گاز هلیوم با سرعت جریان ۰/۹ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان گاز حامل استفاده شد. شناسایی ترکیب‌ها توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی مدل 5793N Agilent با ستون مویین HP-5MS با طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر انجام شد. برنامه‌ریزی حرارتی ستون مشابه با برنامه‌ریزی ستون در کروماتوگرافی گازی بوده اما دمای محفظه تزریق ۲۶۰ درجه تنظیم شد. انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، زمان اسکن برابر یک ثانیه و ناحیه جرمی از ۴۰ تا ۳۵۰ amu بوده است. شناسایی ترکیب‌ها با کمک پارامتر شاخص بازداری و طیف‌های جرمی و مقایسه آنها با ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در بانک اطلاعات انجام شد (Adams, 2007).

تجزیه‌وتحلیل آماری

تحلیل آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف پس از نرمال‌سازی داده‌ها با تبدیل لگاریتمی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار با استفاده از نرم‌افزار (version 9.2) SAS انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح $P<0.05$ ارزیابی شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 استفاده گردید.

نتایج

بررسی فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی ترشح‌شده توسط جدایه‌های *T. harzianum* نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به تولید آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز، زایلاناز، سلولاز، کیتیناز و لیپاز به‌عنوان اصلی‌ترین آنزیم‌های هیدرولیزکننده دیواره سلولی بودند. حداکثر سطح فعالیت آمیلاز، پروتئاز، زایلاناز، سلولاز، کیتیناز و لیپاز در بسیاری از جدایه‌های مورد بررسی به‌ترتیب در ۱۴۴، ۱۶۸، ۹۶، ۷۲، ۷۲ و ۱۹۲ ساعت پس از کشت در محیط مایع، مشاهده شد. پس از آن، با گذشت زمان فعالیت این آنزیم‌ها کاهش یافت (جدول ۱، شکل ۱). در زمانی که بیشتر جدایه‌ها حداکثر سطح فعالیت آنزیمی را نشان دادند، سطح فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی در میان جدایه‌های *T. harzianum* برای آمیلاز $\mu g.ml^{-1}$ ۳۲۷/۳–۱۹۴/۳، پروتئاز $\mu g.ml^{-1}$ ۲۶/۳–۱۵/۷، زایلاناز $\mu g.ml^{-1}$ ۱۲۳۸/۷–۶۸۵، سلولاز $\mu g.ml^{-1}$ ۷۲۳/۳–۴۴۲، کیتیناز $\mu g.ml^{-1}$ ۲۰/۷–۱۲/۷و لیپاز $\mu g.ml^{-1}$ ۴۰/۳–۲۲/۷ مشاهده شد (جدول ۱). بیشترین و کمترین فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی مورد بررسی در شرایط آزمایشگاهی به‌ترتیب مربوط به جدایه‌های TH7 و TH17 بود.

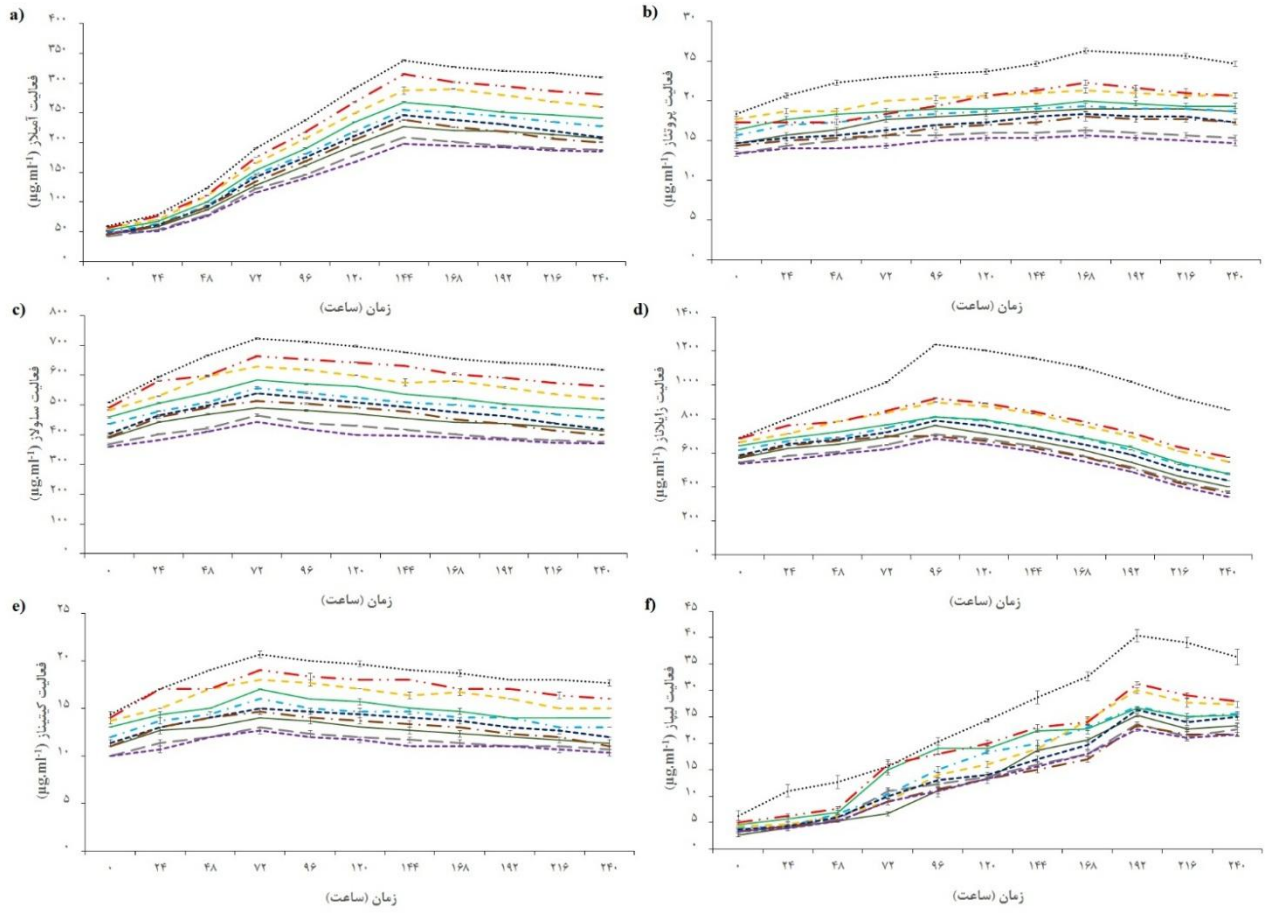
جدول ۱– میزان حداکثر فعالیت آنزیم‌های ترشح شده توسط جدایه‌های مختلف *Trichoderma harzianum*

کد جدایه	حداکثر فعالیت آنزیم ($\mu g.mL^{-1}$)					
	آمیلاز (۱۴۴ hpc)	پروتئاز (۱۶۸ hpc)	زایلاناز (۹۶ hpc)	سلولاز (۷۲ hpc)	کیتیناز (۷۲ hpc)	لیپاز (۱۹۲ hpc)
TH1	۲۲۰/۰ ± ۰/۶ h	۱۹/۰ ± ۰/۰ ef	۷۶۳ ± ۲/۶ f	۴۸۹/۷ ± ۱/۲ h	۱۴/۰ ± ۰/۰ g	۲۵/۳ ± ۰/۳ d
TH5	۲۹۰/۰ ± ۰/۶ c	۲۱/۳ ± ۰/۳ c	۸۹۹/۳ ± ۱/۴ c	۶۲۸/۰ ± ۱/۷ c	۱۸/۰ ± ۰/۰ c	۳۰/۰ ± ۰/۶ b
TH7	۳۲۷/۳ ± ۰/۹ a	۲۶/۳ ± ۰/۳ a	۱۲۳۸/۷ ± ۲/۳ a	۷۲۳/۳ ± ۲/۲ a	۲۰/۷ ± ۰/۳ a	۴۰/۳ ± ۱/۲ a
TH8	۲۵۰/۰ ± ۰/۶ e	۱۹/۳ ± ۰/۳ de	۸۱۳/۰ ± ۲/۵ d	۵۵۶/۷ ± ۳/۵ e	۱۶/۰ ± ۰/۰ e	۲۷/۰ ± ۰/۰ c
TH11	۲۰۱/۰ ± ۰/۶ i	۱۶/۳ ± ۰/۳ h	۷۱۰/۳ ± ۱/۴ g	۶۴۶/۷ ± ۳/۸ i	۱۳/۰ ± ۰/۰ h	۲۳/۷ ± ۰/۳ e
TH13	۲۳۸/۰ ± ۰/۶ f	۱۸/۳ ± ۰/۳ fg	۷۹۰/۷ ± ۱/۲ e	۵۳۸/۳ ± ۱/۸ f	۱۵/۰ ± ۰/۰ f	۲۶/۳ ± ۰/۳ cd
TH15	۲۲۵/۷ ± ۰/۳ g	۱۸/۰ ± ۰/۶ g	۶۹۹/۷ ± ۱/۴ h	۵۱۲/۷ ± ۱/۸ g	۱۴/۷ ± ۰/۳ f	۲۳/۳ ± ۰/۳ e
TH17	۱۹۴/۳ ± ۰/۹ j	۱۵/۷ ± ۰/۳ h	۶۸۵/۰ ± ۲/۳ i	۴۴۲/۰ ± ۱/۷ j	۱۲/۷ ± ۰/۳ h	۲۲/۷ ± ۰/۳ e
TH20	۲۶۰/۳ ± ۱/۲ d	۲۰/۰ ± ۰/۰ d	۸۱۱/۳ ± ۱/۸ d	۵۸۳/۰ ± ۰/۶ d	۱۷/۰ ± ۰/۰ d	۲۶/۷ ± ۰/۳ cd
TH22	۳۰۱/۳ ± ۱/۲ b	۲۲/۳ ± ۰/۳ b	۹۲۲/۳ ± ۱/۷ b	۶۶۴/۷ ± ۲/۱ b	۱۹/۰ ± ۰/۰ b	۳۱/۳ ± ۰/۳ b
LSD (0.05)	۲/۳۲	۰/۹۸	۵/۷۸	۶/۶۲	۰/۵۳	۱/۴۹

hpc: ساعت پس از کشت، میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد، اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با توجه به آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌دار داشتند. آزمایش دو بار تکرار شد.

نتایج درصد جوانه‌زنی بذر زیره سبز بیوپرایم شده با جدایه‌های قارچی در آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذرها در نمونه‌ها از ۶۹/۵۰٪ تا ۸۶/۲۵٪ متغیر بود (جدول ۲). میانگین درصد گیاهچه‌های غیرعادی تغییر شکل داده و بیمار در نمونه‌های بیوپرایم شده با جدایه‌های قارچ کاهش یافت و

به‌ترتیب کمتر از ۶/۵٪ و ۵٪ شد. بالاترین درصد گیاهچه عادی مربوط به نمونه بذر بیوپرایم شده با جدایه TH7 بدست آمد. نتایج حاصل از آزمون استاندارد جوانه‌زنی نشان داد که شاخص بنیه گیاهچه در تیمارهای بذری بیوپرایم شده با جدایه‌های بومی قارچ *T. harzianum* نسبت به تیمارهای شاهد افزایش یافت. میزان شاخص طولی بنیه در تیمارهای بذری بیوپرایم شده از ۷۵/۷۵ تا ۱۳۶/۰۷ و شاخص وزنی بنیه از ۰/۹۳ تا ۲/۶۳ متغیر بود (جدول ۲). بیشترین و کمترین شاخص بنیه گیاهچه در تیمارهای بذری بیوپرایم شده به‌ترتیب متعلق به بذر بیوپرایم شده با جدایه‌های TH7 و TH17 بود. بذرهای بیوپرایم شده با جدایه‌های قارچ *T. harzianum* اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه مورد ارزیابی نشان دادند. میانگین طول و وزن گیاهچه که شامل مجموع بخش هوایی و زیرزمینی بود در بذرهای بیوپرایم شده بیشتر از شاهد بدست آمد. میانگین طول ساقه‌چه از ۵۶/۷۵ تا ۸۲/۲۵ سانتی‌متر، میانگین طول ریشه‌چه از ۵۲/۲۵ تا ۷۵/۵۰ سانتی‌متر، وزن‌تر گیاهچه (مجموع بخش هوایی و زیرزمینی) از ۰/۱۳۱ تا ۰/۱۵۸ گرم و وزن خشک آن از ۰/۰۱۳۵ تا ۰/۰۳۰۵ گرم متغیر بود (جدول ۲).



شکل ۱- فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح شده توسط جدایه‌های *Trichoderma harzianum*، فعالیت آمیلاز (a)، فعالیت پروتئاز (b)، فعالیت سلولاز (c)، فعالیت زایلاناز (d)، فعالیت کیتیناز (e) و فعالیت لیپاز (f)

میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد ارائه شده‌اند. آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد.

جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی در تیمارهای بذری زیره سبز بیوپرایم شده با جدایه‌های مختلف ***Trichoderma harzianum***

تیمارها (جدایه‌های مختلف *T. harzianum*)	GP (%)	DS (%)	SD (%)	SL (mm)	RL (mm)	FW (g)	DW (g)	SLVI	SWVI
TH1	۷۲/۲۵ e	۵/۰۰ cd	۴/۰۰ de	۶۳/۲۵ e	۵۸/۲۵ e	۰/۱۴۲ e	۰/۰۲۰۲ e	۹۱/۴۳ e	۱/۵۲ f
TH5	۸۲/۲۵ b	۳/۵۰ e	۱/۵۰ f	۷۶/۲۵ b	۷۱/۰۰ b	۰/۱۵۱ b	۰/۰۲۵۵ c	۱۲۱/۱۲ b	۲/۰۹ c
TH7	۸۶/۲۵ a	۰/۵۰ f	۰/۲۵ g	۸۲/۲۵ a	۷۵/۵۰ a	۰/۱۵۸ a	۰/۰۳۰۵ a	۱۳۶/۰۷ a	۲/۶۳ a
TH8	۷۷/۲۵ d	۵/۰۰ cd	۳/۷۵ de	۶۶/۲۵ b	۶۱/۷۵ d	۰/۱۴۷ d	۰/۰۲۲۲ d	۹۸/۸۹ d	۱/۷۲ e
TH11	۷۱/۰۰ f	۵/۷۵ bc	۴/۷۵ bc	۵۸/۷۵ f	۵۳/۲۵ g	۰/۱۳۵ g	۰/۰۱۵۵ g	۷۹/۵۲ f	۱/۱۰ h
TH13	۷۷/۲۵ d	۴/۵۰ d	۳/۵۰ e	۶۶/۵۰ d	۶۲/۰۰ d	۰/۱۳۸ f	۰/۰۲۲۵ d	۹۹/۲۶ d	۱/۷۴ e
TH15	۷۴/۵۰ e	۵/۲۵ cd	۴/۲۵ cd	۶۲/۵۰ e	۵۶/۷۵ f	۰/۱۳۹ f	۰/۰۱۸۲ f	۸۸/۸۴ e	۱/۳۵ g
TH17	۶۹/۵۰ g	۶/۵۰ b	۵/۰۰ b	۵۶/۷۵ g	۵۲/۲۵ g	۰/۱۳۱ h	۰/۰۱۳۵ h	۷۵/۷۵ g	۰/۹۳ i
TH20	۷۹/۷۵ c	۳/۵۰ e	۱/۷۵ f	۷۱/۲۵ c	۶۸/۵۰ c	۰/۱۴۸ c	۰/۰۲۵۰ c	۱۱۱/۴۶ c	۱/۹۹ d
TH22	۸۳/۰۰ b	۳/۲۵ e	۱/۲۵ f	۷۷/۰۰ b	۷۲/۲۵ b	۰/۱۵۱ b	۰/۰۲۷۲ b	۱۲۳/۸۶ b	۲/۲۶ b
Control	۶۴/۲۵ h	۹/۰۰ a	۷/۵۰ a	۵۵/۰۰ h	۴۹/۰۰ h	۰/۱۲۵ i	۰/۰۱۰۵ i	۶۶/۸۲ h	۰/۶۷ j
CMC	۶۴/۲۵ h	۹/۰۰ a	۷/۵۰ a	۵۴/۷۵ h	۴۹/۰۰ h	۰/۱۲۴ i	۰/۰۱۰۵ i	۶۶/۶۵ h	۰/۶۷ j
LSD (0.05)	۱/۴۷	۰/۹۳	۰/۶۹	۱/۷۲	۱/۳۲	۰/۰۰۱	۰/۰۰۰۸	۲/۸۸	۰/۰۵

Control: زیره سبز بدون پرایم (شاهد)، CMC: زیره سبز پرایم شده با کربوکسی متیل سلولز، GP: درصد جوانه‌زنی، DS: میانگین درصد گیاهچه‌های تغییر شکل داده، SD: میانگین درصد گیاهچه‌های بیمار، SL: میانگین ارتفاع ساقه‌چه (میلی‌متر)، RL: میانگین ارتفاع ریشه‌چه (میلی‌متر)، FW: میانگین وزن تر مجموع بخش هوایی و زیرزمینی (گرم)، DW: میانگین وزن خشک مجموع بخش هوایی و زیرزمینی (گرم)، SLVI: شاخص طولی بنیه، SWVI: شاخص وزنی بنیه. اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با توجه به آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌دار داشتند.

با توجه به نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی، در مجموع ۱۶ ترکیب در اسانس‌ها شناسایی شد (جدول ۳). ترکیب‌های اسانس شاهد و تیمارهای بذری به‌ترتیب ۷۳/۹۰٪ تا ۸۱/۷۰٪ از اجزای اسانس را به خود اختصاص دادند. درصد اسانس در گیاهچه‌های حاصل از بذرهای بیوپرایم شده با جدایه‌های T7، T22 و T17 قارچ *T. harzianum* به‌ترتیب ۳/۲۲٪، ۳/۱۷٪، ۳/۰۵٪ و در تیمار بذری شاهد میزان آن ۲/۹۲٪ بود.

جدول ۳- ترکیب‌های شناسایی‌شده در اسانس گیاهچه‌های زیره سبز حاصل از بذرهای بیوپرایم شده با جدایه‌های مختلف قارچ *Trichoderma harzianum*

ردیف	نام ترکیب	شاخص بازداری	فراوانی (٪) ترکیب‌های اسانس در تیمار بذر با جدایه‌های مختلف قارچ *T. harzianum*			
			TH7	TH22	TH17	Control
۱	α-thujene	۹۳۰	۰/۳	۰/۳	۰/۲	۰/۲
۲	α-pinene	۹۳۵	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۳
۳	sabinene	۹۵۴	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۲
۴	β-pinene	۹۷۹	۷/۸	۷/۵	۷/۵	۷/۴
۵	myrcene	۹۹۰	۰/۴	۰/۴	۰/۳	۰/۲
۶	α-phellandrene	۹۹۵	۰/۳	۰/۳	۰/۳	۰/۱
۷	ρ-cymene	۱۰۲۴	۱۶/۷	۱۶/۷	۱۶/۵	۱۶/۴
۸	limonene	۱۰۳۰	۰/۹	۰/۸	۰/۷	۰/۶
۹	γ-terpinene	۱۰۶۰	۱۷/۳	۱۷/۱	۱۵/۴	۱۳/۹
۱۰	terpinen-4-ol	۱۱۶۹	۱/۳	۱/۱	۰/۹	۰/۷
۱۱	α-Terpineol	۱۱۸۰	۰/۹	۰/۹	۰/۷	۰/۶
۱۲	cuminaldehyde	۱۲۵۳	۳۳/۶	۳۳/۵	۳۲/۳	۳۲/۲
۱۳	cumin alcohol	۱۲۸۳	۰/۴	۰/۴	۰/۳	۰/۲
۱۴	β-farnesene	۱۴۴۳	۰/۷	۰/۷	۰/۶	۰/۶
۱۵	carotol	۱۵۷۴	۰/۴	۰/۴	۰/۴	۰/۳
-	کل	-	۸۱/۷	۸۰/۸	۷۶/۷	۷۳/۹

Control: بذرهای زیره سبز بدون پرایم (شاهد)، TH17: بذرهای زیره سبز بیوپرایم شده با جدایه TH17، TH22: بذرهای زیره سبز بیوپرایم شده با جدایه TH22 و TH7: بذرهای زیره سبز بیوپرایم شده با جدایه TH7

نتایج نشان داد که بتا-پینن، پارا-سیمن، لیمونن، گاما-ترپینن، ترپینن-۴-اُل، آلفا-ترپینئول، کومین آلدهید و بتا-فارنزن به عنوان ترکیب‌های اصلی اسانس گیاهچه های حاصل از بذرهای بیوپرایم شده شناسایی شدند. سایر ترکیب‌ها به میزان کمتر از ۵٪ بودند (جدول ۳). تمامی ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس تیمارهای مختلف متعلق به گروه ترپنوئیدها بودند که از این میان نه ترکیب آلفا-توجن، آلفا-پینن، سابینن، بتا-پینن، میرسن،

آلفا-فلاندرن، پارا-سیمن، لیمونن و گاما-ترپینن (۶۰٪) متعلق به مونوترپن‌های هیدروکربنه، چهار ترکیب ترپینن-۴-اُل، آلفا-ترپینئول، کومین آلدهید و کومین الکل (۲۶/۷٪) متعلق به مونوترپن های اکسیژن‌دار و دو ترکیب بتا-فارنزن و کاروتول (۱۳/۳٪) متعلق به سزکوئی ترپن های اکسیژن‌دار بودند. همچنین، میزان ترکیب‌ها در اسانس تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد بیشتر بدست آمد. در بررسی‌های انجام شده در این پژوهش مشخص گردید که قسمت اعظم اسانس گیاه زیره سبز را ترکیب‌های مونوترپنی تشکیل می دهند و سزکوئی ترپن ها درصد جزئی از مواد موجود در اسانس را به خود اختصاص می‌دهند.

بحث

در این پژوهش، نقش بیوپرایمینگ بذر روی میزان بهبود شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی زیره سبز و همچنین تأثیر آنزیم‌های خارج سلولی ترشح‌شده توسط جدایه‌های بومی قارچ *T. harzianum* به‌عنوان الیسیتور در میزان تولید اسانس بررسی شد. دیواره سلولی گیاهان از پلی‌ساکاریدها، گلیکوپروتئین‌ها و لیگنین تشکیل شده است (Held *et al*., 2014). پلی‌ساکاریدهای دیواره سلولی شامل سلولز، همی‌سلولز و پکتین می‌باشند که در نسبت‌های مختلف در دیواره تمام سلول‌های گیاهی وجود داشته و بخش عمده‌ای از دیواره سلولی را تشکیل می‌دهند (Zhao *et al*., 2013). طیف گسترده‌ای از موجودات زنده ازجمله قارچ‌ها، مخمرها، باکتری‌ها، پروتوزوآها، حشرات و نماتدها آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی گیاهان را تولید می‌کنند (Favela-Torres *et al*., 2005).

ترشح و تولید آنزیم‌های مختلف تجزیه‌کننده دیواره سلولی از مهمترین سازوکارهای گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* در برهم‌کنش با گیاه میزبان می‌باشند که ضمن کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزاد، بذرزاد و همراه بذر موجب کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی ناشی از آنها نیز می‌شوند (Brunner *et al*., 2005؛ Horta *et al*., 2018؛ Aneja *et al*., 2005؛ Singh *et al*., 2007). نتایج حاصل از ارزیابی میزان فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی در این پژوهش نشان داد که جدایه‌های بومی قارچ *T. harzianum* توانایی تولید آنزیم‌های آمیلاز، پروتئاز، زایلاناز، سلولاز، کیتیناز و لیپاز را دارند. این نتایج با مشاهدات Habibi و همکاران (۲۰۱۸) که گزارش کردند، جدایه‌های گونه *T. harzianum* قادر به تولید آنزیم‌های آمیلاز، سلولاز، لیپاز و پروتئاز می‌باشند، مطابقت دارد.

در طول مدت بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی در این پژوهش، مشاهده شد که حداکثر میزان فعالیت هر آنزیم برای جدایه‌های مختلف، متفاوت ولی زمان رسیدن به اوج این فعالیت برای بیشتر جدایه‌ها مشابه بود. سلولاز و کیتیناز اولین آنزیم‌هایی بودند که در زمان کوتاه‌تری فعالیت آنها به اوج رسید، در حالی‌که پس از آن به‌ترتیب فعالیت حداکثر آنزیم‌های زایلاناز، آمیلاز، پروتئاز و لیپاز با تأخیر بیشتر مشاهده شد که این نتایج مشابه با نتایج گزارش شده توسط Da Silva Delabona و همکاران (۲۰۱۶)، Ortega و همکاران (۲۰۱۳)، Seyis و Aksoz (۲۰۰۵)، Habibi و همکاران (۲۰۱۸)، Harighi و همکاران (۲۰۰۶) و Seyed Asli و همکاران (۲۰۰۴) بود.

نتایج آزمون جوانه‌زنی نشان داد که تیمارهای بذری زیره سبز بیوپرایم شده با جدایه‌های بومی قارچ *T. harzianum* به‌طور قابل‌توجهی روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی بذر تأثیر گذاشته و موجب افزایش کیفیت به‌ویژه سلامت گیاهچه‌ها شدند. در تحقیقاتی بیوپرایمینگ بذر زیره سبز با *T. harzianum* ضمن افزایش شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی، موجب بهبود توانایی گیاهچه‌ها در تحمل تنش‌های زنده (Singh *et al*., 2007) و غیر زنده (Piri *et al*., 2019) شد. Piri و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که بیوپرایمینگ بذر زیره سبز با *T. harzianum* موجب افزایش شاخص‌های رشدی و ظهور گیاهچه می‌شود که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. پرایمینگ بذر موجب افزایش معنی‌دار درصد جوانه‌زنی، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه و وزن گیاهچه زیره سبز می‌شود (Tabatabaei & Shakeri, 2014). Rezalou و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردند که

بیوپرایمینگ بذر با *Trichoderma* باعث بهبود مؤلفه‌های رشدی گیاه به‌ویژه در مراحل استقرار و رشد اولیه آن می‌شود. نتایج این پژوهش با مشاهدات Haggag و Abo-sedera (۲۰۰۵) مطابقت داد. آنان گزارش کردند که خصوصیات رشدی زیره در تیمار با گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* بهبود یافت. همچنین Singh و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که تیمار بذر با *Trichoderma* ضمن افزایش شاخص‌های بنیه، جوانه‌زنی و همچنین عملکرد زیره سبز در مزرعه موجب کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌شود که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. همچنین Vyas و Mathur (۲۰۰۲) گزارش کردند که تیمار همزمان بذر و خاک با قارچ‌های *T. harzianum* و *T. aureoviride* ضمن افزایش درصد جوانه‌زنی بذرهای زیره سبز موجب کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌شود.

افزایش درصد جوانه‌زنی و ظهور گیاهچه می‌تواند به دلیل تأثیر قارچ *Trichoderma* در افزایش تولید برخی از هورمون‌ها به‌ویژه جیبرلین و همچنین تولید و رهاسازی برخی از آنزیم‌های خارج سلولی به‌ویژه آمیلاز باشد (Zahir *et al*., 2004؛ Kaymak *et al*., 2009). بنابراین به نظر می‌رسد که علت افزایش طول ریشه و ساقه و همچنین وزن تر گیاهچه‌های تحت تأثیر تیمار *Trichoderma* ناشی از تولید ایندول-۳-استیک اسید باشد که پیش‌ماده سنتز هورمون اکسین است (Gravel *et al*., 2007). Windham و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که ترشحات قارچ *Trichoderma* موجب افزایش جوانه‌زنی بذرها می‌شود که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. همچنین بهبود شاخص‌های رشدی گیاه می‌تواند ناشی از تولید و ترشح مواد شبه فیتوهورمونی مانند سیتوکینین، جیبرلین، اکسین، اسید جاسمونیک و اتلین باشد که موجب افزایش جذب آب و مواد غذایی می‌شوند (Piri *et al*., 2019؛ Windham *et al*., 2005).

گاز کروماتوگراف متصل به طیف‌سنج جرمی اسانس‌های تیمارهای بذری زیره سبز بیوپرایم شده نشان داد که بتا-پینن، پارا-سیمن، لیمونن، گاما-ترپینن، ترپینن-۴-اُل، آلفا-ترپینئول، کومین آلدهید و بتا-فارنزن ترکیب‌های اصلی شناسایی‌شده بودند. این نتایج مشابه با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان بود. Boughendjioua (۲۰۱۹) گزارش کرد که بتا-پینن، پاراسیمن، گاما-ترپینن، کومین آلدهید و کومین الکل عمده‌ترین ترکیب‌های اسانس زیره سبز بودند. EL-Manylawi و Hanaa (۲۰۰۹) گزارش کردند که کومین آلدهید و گاما-ترپینن به‌ترتیب به‌عنوان مونوترپن‌های اکسیژن‌دار و هیدروکربنه عمده‌ترین ترکیب‌های اسانس زیره سبز بودند. Derakhshan و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که عمده‌ترین ترکیب‌های اسانس زیره سبز جمع‌آوری شده از استان تهران شامل کومین آلدهید، گاما-ترپینن، بتا-پینن و پارا-سیمن بود. بتا-پینن، پارا-سیمن، کومین آلدهید و گاما-ترپینن عمده‌ترین ترکیب‌های اسانس گیاه زیره سبز جمع‌آوری شده از کشورهای ایران (Tavakoli *et al*., 2015؛ Esmaeili, 2015)، مصر (Wanner *et al*., 2010)، پاکستان (Rana *et al*., 2014)، چین (Li & Jiang, 2004) و ترکیه (Beis *et al*., 2000) گزارش شدند. نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی اسانس زیره سبز نشان داد که بیشتر ترکیب‌های شناسایی‌شده در اسانس شامل هیدروکربن‌های ترپنی، ترکیب‌های آلدهیدها، کتون‌ها و الکل‌ها بودند که این ترکیب‌ها از نظر شیمیایی و بیولوژیک دارای اهمیت هستند (Sahana *et al*., 2011).

میزان و نوع ترکیب اسانس زیره سبز در زمان‌های مختلف، متفاوت است. نمونه‌های اسانس زیره سبز جمع‌آوری شده از کشورهای ایران و پاکستان به‌ترتیب دارای حدود ۳۲/۴٪ و ۲۰٪ کومین آلدهید بود که موجب تفاوت‌های معنی‌دار ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی اسانس شد (Peter, 2003؛ Behera *et al*., 2004).

بررسی‌های انجام شده در این پژوهش نشان داد که ارتباط قوی بین میزان آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی ترشح‌شده توسط جدایه‌ها و تولید ترپن‌ها به‌ویژه مونوترپن‌ها و سزکوئی‌ترپن‌های فرّار وجود دارد. گونه‌های قارچ *Trichoderma* توانایی تولید متابولیت‌های فرّار و غیرفرّار مختلفی ازجمله ترپن‌ها را دارند (Shi *et al*., 2020؛

Bansal & Mukherjee, 2016). متابولیت‌های فرّار به‌ویژه ترپن‌ها روی برهم‌کنش میکروارگانیسم‌ها با گیاه میزبان تأثیر می‌گذارند (Gershenzon & Dudareva, 2007). نوع و میزان متابولیت‌های فرّاری که در برهم‌کنش قارچ با گیاه میزبان تولید می‌شوند روی متابولیت‌های ثانویه گیاهان تأثیر می‌گذارند (Fiers *et al*., 2013). متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط گیاه در جذب عوامل گرده‌افشان و دفع آفات، گیاه‌خواران و عوامل بیماری‌زا نقش دارند (Dicke *et al*., 2009). متابولیت‌های فرّار تولید و ترشح شده توسط قارچ *Trichoderma* در تنظیم رشد گیاه و فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی نقش مهمی دارند (Malmierca *et al*., 2015؛ Vinale *et al*., 2008). بسیاری از سزکوئی‌ترپن‌های تولیده شده توسط قارچ‌ها موجب تعدیل برهم‌کنش قارچ و گیاهان می‌شوند (Fiers *et al*., 2013).

این مطالعه نشان داد که جدایه بومی TH7 که سطح بالاتری از فعالیت آنزیم‌های خارج سلولی را نشان می‌داد موجب افزایش میزان تولید ترکیب‌های ترپنوئیدی در گیاهچه زیره سبز حاصل از بذر بیوپرایم شده شد. بیوپرایمینگ بذرهای زیره سبز با *Trichoderma harzianum* موجب افزایش میزان پروتئین و آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی در گیاهچه‌ها می‌شود (Piri *et al*., 2019). ازاین‌رو به نظر می‌رسد که قارچ *T. harzianum* ضمن تولید ترکیب‌های فرّار و غیرفرّار موجب القای بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز ترپن‌ها در گیاه زیره سبز می‌شود که با مشاهدات Malmierca و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت دارد. آنان گزارش کردند که قارچ *T. harzianum* ضمن القای بیان ژن‌های مربوط به بیوسنتز ترپن‌ها در گیاه گوجه‌فرنگی موجب تولید بیشتر ترپن‌ها در گیاه میزبان می‌شود. از سوی دیگر تولید ترکیب‌های فرّار به‌ویژه ترپن‌های القاء شونده توسط گیاه میزبان موجب افزایش تولید و ترشح آنزیم کیتیناز توسط قارچ *T. harzianum* می‌شود که روی برهم‌کنش قارچ *T. harzianum* و عوامل ساپروفیت و بیماری‌زای گیاهی تأثیر می‌گذارند که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد.

محققان گزارش کردند که الیسیتورها به‌ویژه الیسیتورهای قارچی از طریق القای پاسخ‌های دفاعی باعث بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه مانند ترپنوئیدها، مشتقات کومارین، آلکالوئیدها، فلاونوئیدها در گیاه میزبان می‌شوند که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد (Namdeo, 2007؛ Zhao *et al*., 2005). بنابراین به‌نظر می‌رسد قارچ *T. harzianum* و یا ترکیب‌ها و آنزیم‌های ترشح‌شده توسط آن به‌عنوان الیسیتور موجب افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه در زیره سبز می‌شود. این اولین گزارش در مورد تأثیر آنزیم‌های خارج سلولی ترشح‌شده توسط جدایه‌های *T. harzianum* به‌عنوان الیسیتور در بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه در اسانس گیاهچه‌های حاصل از بذرهای بیوپرایم شده زیره سبز می‌باشد.

با توجه به آنکه میزان محتوای پروتئینی و اندوخته بذر بسیار اندک می‌باشد و همچنین میزان درصد جوانه‌زنی و بنیه توده‌های بومی زیره سبز پایین بوده و گیاهچه‌های استقرار یافته ضعیف می‌باشند، در نتیجه بیوپرایمینگ بذر با عوامل بیولوژیک به‌ویژه جدایه بومی *T. harzianum* که موجب بهبود و ارتقای کیفیت، سلامت و استقرار گیاهچه‌های حاصل می‌شوند، پیشنهاد می‌شود. علاوه‌براین، قارچ *T. harzianum* ضمن تولید ترپن‌ها موجب القای بیان ژن‌های مرتبط با تولید این ترکیب‌ها در گیاه میزبان نیز می‌شود. در نتیجه شناخت و مطالعه مسیرهای بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه گیاهان و نقش الیسیتورهای زیستی در القای پاسخ‌های دفاعی و افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه می‌تواند ضمن کاهش اثرهای مخرب بیماری‌های ناشی از بذر و خاک موجب افزایش میزان تولید و بهبود کیفیت محصول شود. علاوه‌براین، قارچ *T. harzianum* موجب القای بیوسنتز و انباشت متابولیت‌های ثانویه در زیره سبز شده و زمینه را برای تولید و استخراج ترکیب‌های فعال زیستی در فرایندهای تولید ترکیب‌های دارویی، عوامل طعم‌دهنده، رنگ‌های طبیعی و سموم زیستی تسهیل می‌کند.

سپاسگزاری

نویسندگان از دست‌اندرکاران مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال برای حمایت مالی از این پژوهش (با شماره پروژه ۹۹۰۵۵۲-۹۸۰۲۴-۰۰۵-۰۸-۰۸-۱۲۴) تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

- Aali, E., Mahmoudi, R., Kazeminia, M., Hazrati, R. and Azarpey, F., 2017. Essential oils as natural medicinal substances: review article. Tehran University Medical Journal, 75: 480-489.
- Abdel-Razik, A.A., 1970. The parasitism of white *Sclerotium cepivorum* Berk. the incitant of white rot of onion. Ph.D. thesis, Faculty of Agriculture, Assiut University, Assiut, Egypt.
- Adams, R.P., 2007. Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, Illinois, USA, 804p.
- Aneja, M., Gianfagna, T.J. and Hebbar, P.K., 2005. *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. Physiological and Molecular Plant Pathology, 67(6): 304-307.
- Ansari, O., Choghazardi, H.R., Sharif Zadeh, F. and Nazarli, H., 2012. Seed reserve utilization and seedling growth of treated seeds of mountainray (*Seecale montanum*) as affected bydrought stress. Cercetări Agronomice în Moldova, 2: 43-48.
- Bailey, M.J., Biely, P. and Poutanen, K., 1992. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. Journal of Biotechnology, 23(3): 257-270.
- Bansal, R. and Mukherjee, P.K., 2016. Identification of novel gene clusters for secondary metabolism in *Trichoderma* genomes. Microbiology, 85: 185-190.
- Behera, S., Nagarajan, S. and Rao, L.J.M., 2004. Microwave heating and conventional roasting of cumin seeds (*Cuminum cyminum* L.) and effect on chemical composition of volatiles. Food Chemistry, 87: 25-29.
- Beis, S.H., Azcan, T.N., Ozek, I.T., Kara, I.M. and Baser, K.H.C., 2000. Production of essential oil from cumin seeds. Chemistry of Natural Compounds, 36(3): 265-268.
- Bennett, A.J. and Whipps, J.M., 2008. Dual application of beneficial microorganisms to seed during drum priming. Applied Soil Ecology, 38: 83-89.
- Boughendjioua, H., 2019. Characterization of aroma active compounds of cumin *(Cuminum cyminum* L.) seed essential oil. Modern Applications of Bioequivalence & Bioavailability, 4(2): ID555634.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S. and Morse, S.A., 2007. Medical Microbiology. New York: McGraw-Hill, 818p.
- Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S.L., Lorito, M., Kubicek, C.P. and Mach, R.L., 2005. Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma atroviride* to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. Applied and Environmental Microbiology, 71: 3959-3965.
- Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Izumi, S. and Hirata, T., 2004. Composition and antifungal activity of essential oils isolated from *Hypericum hyssopifolium* and *Hypericum heterophyllum*. Flavour and Fragrance Journal, 19: 62-68.
- Da Silva Delabona, P., Lima, D.J., Robl, D., Rabelo, S.C., Farinas, C.S. and Da Cruz Pradella, J.G., 2016. Enhanced cellulase production by *Trichoderma harzianum* by cultivation on glycerol followed by induction on cellulosic substrates. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 43: 617-626.
- Derakhshan, S., Sattari, M. and Bigdeli, M., 2010. Effect of cumin (*Cuminum cyminum*) seed essential oil on biofilm formation and plasmid integrity of *Klebsiella pneumoniae*. Pharmacognosy Magazine, 6: 57-61.
- Dicke, M., Van Loon, J.J.A. and Soler, R., 2009. Chemical complexity of volatiles from plants induced by multiple attack. Nature Chemical Biology, 5: 317-324.
- EL-Manylawi, M.A. and Hanaa, F.M.A., 2009. Gas chromatography-mass spectroscopy analysis and evaluate cumin seeds and their essential oil as growth promoters of New Zeland white rabbits. International Journal of Agricultural Research, 4: 107-115.
- Entesari, M., Sharifzadeh, F., Dashtaki, M. and Ahmadzadeh, M., 2013. Effects of biopriming on the germination traits, physiological characteristics, antioxidant enzymes and control of *Rhizoctonia solani* of a Bean cultivar (*Phaseolus vulgaris* L.). Iranian Journal of Field Crop Science, 44: 35-45.
- Esmaeili, F., 2015. Composition of essential oil of *Cuminum cyminum*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 18: 507-509.
- Esmaeilzadeh Bahabadi, S. and Sharifi, M., 2013. Increasing the production of plant secondary metabolites using biotic elicitors. Journal of Cell & Tissue, 4: 119-128.
- Favela-Torres, E., Aguilar, C., Contreras-Esquivel, J.C. and Viniegra-Gonzalez, G., 2005. Pectinases:

atroviride PTCC5220. Iranian Journal OF Biology, 19: 203-214.
- Harman, G.E., Björkman, T., Ondik, K. and Shoresh, M., 2008. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* spp. for biocontrol. Outlooks on Pest Management, 19: 24-29.
- Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology, 96: 190-194.
- Harvey, A.L., Edrada-Ebel, R. and Quinn, R.J., 2015. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. Nature Reviews Drug Discovery, 14: 111-112.
- Held, M., Hou, H., Miri, M., Huynh, C., Ross, L., Hossain, M.S., Sato, S., Tabata, S., Perry, J., Wang, T.L. and Szczyglowski, K., 2014. Lotus *Japonicus cytokinin* receptors work partially redundantly to mediate nodule formation. Plant Cell, 26: 678-694.
- Horta, M.A.C., Filho, J.A.F., Murad, N.F., Santos, E.D.O., dos Santos, C.A., Mendes, J.S., Brandão, M.M., Azzoni, S.F. and de Souza, A.P., 2018. Network of proteins, enzymes and genes linked to biomass degradation shared by *Trichoderma* species. Scientific Reports, 8(1341): 1-11.
- ISTA, 2010. International rules for seed testing. International Seed Testing Association (ISTA), Zurich, Switzerland.
- Jun, H., Kieselbach, T. and Jönsson, L., 2011. Enzyme production by filamentous fungi: analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. Microbial Cell Factories, 10(68): 1-10.
- Kaymak, H.C., Guvenc, I., Yarali, F. and Donmez, M.F., 2009. The effects of bio-priming with PGPR on germination of radish (*Raphanus sativus* L.) seeds under saline conditions. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, 33: 173-179.
- Kazemizadeh, Z., Moradi, A. and Yousefi, M., 2011. Volatile constituentes from leaf and flower of *Achillea nobilis* L. subsp. *neireichii* from North of Iran. Journal of Medicinal Plants, 10: 156-162.
- Keswani, C., Mishra, S., Sarma, B.K., Singh, S.P. and Singh, H.B., 2014. Unraveling the efficient applications of secondary metabolites of various *Trichoderma* spp. Applied Microbiology and Biotechnology, 98: 533-544.
- Khaledi, N. and Taheri, P., 2016. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina*. Journal of Plant Protection Research, 56: 21-31.
- Kikot, G.E., Hours, R.A. and Alconada, T.M., 2009. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: A review. Journal of Basic Microbiology, 49: 231-241.

273-296. In: Pandey, A., Webb, C., Soccol, C.R. and Larroche, C., (Eds.), Enzyme Technology. vol. 14, Asiatech publisher, New Delhi, 742p.
- Fiers, M., Lognay, G., Fauconnier, M.L. and Jijakli, M.H., 2013. Volatile compound-mediated interactions between barley and pathogenic fungi in the soil. PLoS ONE, 8: e66805.
- Garcia-Careno, F., Hernandez-Cortes, M.P. and Haard, N.F., 1994. Enzymes with peptidase and proteinase activity from the digestive systems of a freshwater and a marine decapods. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42: 1456-1461.
- Gershenzon, J. and Dudareva, N., 2007. The function of terpene natural products in the natural world. Nature Chemical Biology, 3: 408-414.
- Gholami, A.A., 2017. Production of secondary metabolites through genetic engineering and plant tissue culture. Journal of Biosafety, 10: 17-36.
- Gravel, V., Antoun, H. and Tweddell, R.J., 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry, 39: 1968-1977.
- Gupta, A., Roy, I., Patel, R.K., Singh, S.P., Khare, S.K. and Gupta, M.N., 2005. One step purification and characterization of an alkaline protease from haloalkalophilic *Bacillus* sp. Journal of Chromatography A, 1075: 103-108.
- Gutowska, M., Drazen, J. and Robison, B., 2004. Digestive chitinolytic activity in marine fishes of Monterey Bay, California. Comparative Biochemistry and Physiology B, 139: 351-358.
- Habibi, R., Rahnama, K. and Taghinasb, M., 2015. Evaluating the effectiveness of native *Trichoderma* species in production of extracellular enzymes during interaction with plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Journal of Applied Research Plant Protection, 4: 73-85.
- Habibi, R., Rahnama, K. and taghinasab, M., 2018. Investigation on the effect of different levels of temperature and pH of some *Trichoderma* isolates for biological control of tomato wilt disease under laboratory and greenhouse conditions. Journal of Plant Protection, 32: 195-199.
- Haggag, W.M. and Abo-sedera, S.A., 2005. Characteristics of three *Trichoderma* species in peanut haulms compost involved in biocontrol of cumin wilt disease. International Journal Agriculture Biology, 7: 222-229.
- Hampton, J.G., Boelt, B., Rolston, M.P. and Chastain, T.G., 2013. Effects of elevated CO_2 and temperature on seed quality. Journal of Agricultural Science, 151: 154-162.
- Harighi, M.J., Motallebi, M. and Zamani, M.R., 2006. Purification of chitinase 42 from *Trichoderma*

- Leeder, A.C., Palma-Guerrero, J. and Glass, N.L., 2011. The social network: deciphering fungal language. Nature Reviews Microbiology, 9: 440-451.
- Li, R. and Jiang, Z., 2004. Chemical composition of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. from China. Flavour and Fragrance Journal, 19: 311-313.
- Lorito, M., Woo, S.L., Harman, G.E. and Monte, E., 2010. Translational research on *Trichoderma*: from 'omics to the field. Annual Review of Phytopathology, 48: 395-417.
- Malmierca, M.G., Mccormick, S.P., Cardoza, R.E., Alexander, N.J., Monte, E. and Gutiérrez S., 2015. Production of trichodiene by *Trichoderma harzianum* alters the perception of this biocontrol strain by plants and antagonized fungi. Environmental Microbiology, 17(8): 2628-2646.
- Mazid, M., Khan, T. and Mohammad, F., 2011. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Biochemical Medicine, 3: 232-249.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31: 426-428.
- Moore, B.D., Andrew, R.L., Kulheim, C. and Foley, W.J., 2014. Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. New Phytologist, 201: 733-750.
- Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A. and Kenerley, C.M., 2012. Secondary metabolism in *Trichoderma* - A genomic perspective. Microbiology, 158: 35-45.
- Namdeo, A.G., 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites. Pharmacognosy Reviews, 1: 69-79.
- Nautiyal, P.C., 2009. Seed and seedling vigor traits in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Seed Science and Technology, 37: 721-735.
- Ortega, L.M., Kikot, G.E., Astoreca, A.L. and Alconada, T.M., 2013. Screening of *Fusarium graminearum* isolates for enzymes extracellular and deoxynivalenol production. Journal of Mycology, 358140: 1-7.
- Paiva, N.L., 2000. An introduction to the biosynthesis of chemicals used in plant microbe interactions. Journal of Plant Growth Regulation, 19: 131-143.
- Peter, K.V., 2003. Handbook of Herbs and Spices: Vol. 1. Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd, 319p.
- Piri, R., Moradi, A., Balouchi, H. and Salehi, A., 2019. Improvement of cumin (*Cuminum cyminum*) seed performance under drought stress by seed coating and biopriming. Scientia Horticulturae, 257: 1-8.
- Pu, G.B., Dong-Ming, M., Chen, J.L., Ma, L.Q., Wang, H. and Li, G.F., 2009. Salicylic acid activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. Plant Cell Report, 28: 1127-1135.
- Rana, V.S., 2014. Chemical composition of the essential oil of *Cuminum cyminum* L. seeds from Western India. Journal of Medicinal Plants and By-products, 3: 207-210.
- Reino, J.L., Guerrero, R.F., Hernandez-Galan, R. and Collado, I.G., 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochemistry, 7: 89-123.
- Rezalou, Z., Shahbazi, S. and Askari, H., 2020. Effect of biopriming with *Trichoderma* on germination and vegetative characteristics of sweet corn, sugar. Iranian Journal of Seed Science and Technology, 8: 199-210.
- Sahana, K., Nagarajan, S. and Rao, L.J.M., 2011. Cumin (*Cuminum cyminum* L.) seed volatile oil: Chemistry and role in health and disease prevention: 417-427. In: Preedy, V.R., Watson, R.R., Patel, V.B., (Eds.). Nuts & Seeds in Health and Disease Prevention. New York, Elsevier, 1226p.
- Sangwan, N.S., Farooqi, A.H., Shabih, F. and Sangwan, R.S., 2001. Regulation of essential oil production in plants. Journal of Plant Growth Regulation, 34: 21-34.
- Seyed Asli, N., Harighi, M.J., Zamani, M.R. and Motalebi, M., 2004. Study of chitinolytic enzyme production in *Trichoderma* isolates. Iranian Journal of Biology, 17: 227-246.
- Seyis, I. and Aksoz, N., 2005. Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. International Biodeterioration and Biodegradation Journal, 55: 115-119.
- Shi, T., Shao, C., Liu, Y., Zhao, D., Cao, F., Fu, X., Yu, J., Wu, J., Zhang, Z. and Wang, C., 2020. Terpenoids from the coral-derived fungus *Trichoderma harzianum* (XS-20090075) induced by chemical epigenetic manipulation. Frontiers in Microbiology, 11: 1-12.
- Singh, A., Srivastava, S. and Singh, H.B., 2007. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. Bioresource Technology, 9: 470-473.
- Sowbhagya, H.B., Sathyendra Rao, B.V. and Krishnamurthy, N., 2008. Evaluation of size reduction and expansion on yield and quality of cumin (*Cuminum cyminum*) seed oil. Journal of Food Engineering, 84: 595-600.
- Tabatabaei, S.A. and Shakeri, E., 2014. Effect of seed priming on germination traits Cumin (*Cuminum cyminum*) under drought and salinity stresses. Arid Biome Scientific and Research Journal, 4: 66-74.
- TajickGhanbari, M.A., Mohammadkhani, H.S. and Babaeizad, V., 2014. Identification of some secondary metabolites produced by four *Penicillium* species. Mycologia Iranica, 1: 107-113.

cyminum, Apiaceae). Natural Product Communications. 5: 1355-1358.
- Windham, M.T., Elad, Y. and Baker, K. 2005. A mechanism for increased plant growth inoculated by *Tricoderma* spp. Phytopathology, 6: 518-521.
- Wood, T.M. and Bhat, M., 1998. Methods for measuring cellulase activities. Methods in Enzymology, 160: 87-112.
- Zahir, Z.A., Arshad, M.G. and Frankenberger, W.T., 2004. Plant growth promoting Rhizobacteria application and perspectives in agriculture. Advances in Agronomy, 81: 96-168.
- Zavvari, F., Sahebani, N.A. and Etebarian, H.R., 2012. Measuring of b-1,3-glucanase activity in *Trichoderma virens* isolates and selection of the best isolates for biological control of cucumber root rot. Journal of Agricultural Knowledge and Sustainable Production, 22: 149-161.
- Zhao, J., Davis, L.C. and Verpoorte, R., 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances, 23: 283-333.
- Zhao, Z., Liu, H., Wang, C. and Xu, J.R., 2013. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. BMC Genomics, 14: 274.
- Tavakoli, H.R., Mashak, Z., Moradi, B. and Sodagari H.R., 2015. Antimicrobial activities of the combined use of *Cuminum Cyminum* L. essential oil, Nisin and storage temperature against *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in vitro. Jundishapur Journal of Microbiology, 8: 1-7.
- Ulhoa, C.J. and Peberdy, J.F., 1992. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. Enzyme and Microbial Technology, 14: 236-240.
- Vinale, F. and Sivasithamparam, K., 2020. Beneficial effects of Trichoderma secondary metabolites on crops. Phytotherapy Research, 34(11): 1-8.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Barbetti, M.J., Li, H., Woo, S.L. and Lorito, M., 2008. A novel role for Trichoderma secondary metabolites in the interactions with plants. Physiological and Molecular Plant Pathology, 72: 80-86.
- Vyas, R.K. and Mathur, K., 2002. *Trichoderma* spp. in cumin rhizosphere and their potential in suppression of wilt. Indian Phytopathology, 55: 455-457.
- Wanner, J., Bail, S., Jirovetz, L., Buchbauer, G., Schmidt, E., Gochev, V., Girova, T., Atanasova, T. and Stoyanova, A., 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of cumin oil (*Cuminum*

Effects of seed biopriming with fungus *Trichoderma harzianum* on secondary metabolites production in cumin (*Cuminum cyminum* L.)

N. Khaledi[1*], A. Dehshiri[2] and F. Hassani[2]

1*- Corresponding author, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran, E-mail: n_khaledi@areeo.ac.ir
2- Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: November 2020 Revised: June 2021 Accepted: June 2021

Abstract

This study was aimed at investigating the effects of biopriming with a number of native isolates of *Trichoderma harzianum* on the germination and seed vigor indices of a native cumin (*Cuminum cyminum* L.) population. Also, the effects of extracellular enzymes produced by these isolates as elicitors on the production and accumulation of secondary metabolites in the seedlings obtained from bioprimed seeds were studied. Based on the results, all the *T. harzianum* isolates were able to produce the enzymes amylase, protease, cellulase, xylanase, chitinase, and lipase. The results also showed that the cumin seed biopriming significantly affected the germination and seed vigor indices and improved the quality and health of seeds and seedlings. In this study, the essential oil of seedlings obtained from the bioprimed seeds was extracted by water distillation and its chemical compounds were identified by GC and GC/MS. The results showed that the main compounds identified included β-pinene, ρ-cymene, limonene, γ-terpinene, terpinen-4-ol, α-terpineol, cuminaldehyde, and β-farnesene. Also, *T. harzianum* and the enzymes secreted by it as elicitors increased the expression of genes associated with the production and accumulation of secondary metabolites in cumin. This is the first report on the effects of seed biopriming with the native isolates of *T. harzianum* on the essential oil compounds of cumin seedlings. The findings of this research showed that the amount of extracellular enzymes secreted by the *T. harzianum* isolates is different and affects the production and accumulation of secondary metabolites in cumin.

Keywords: Cell wall degrading enzymes, biopriming, terpenoids, *Cuminum cyminum* L., seed quality.