

Screening of *Trichoderma* strains by optimized conditions in test plate media for siderophore production and measuring of cellulytic enzyme

Nassibeh Barahoei

Ph.D. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Kerman, Iran. E-mail address: n.barahoei@gmail.com

Hossein Alaei 

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Kerman, Iran. E-mail address: hossein.alaei@vru.ac.ir

Ebrahim Sedaghati 

Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Kerman, Iran. E-mail address: sedaghati@vru.ac.ir

Roohallah Saberi-Riseh 

Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Kerman, Iran. E-mail address: r.saberi@vru.ac.ir

Peyman Abbaszadeh-dahaji 

Assistant Professor, Department of Soil Science, Faculty of Agriculture, Vali-e-Asr University of Rafsanjan, Kerman, Iran. E-mail address: p.abbaszadeh@vru.ac.ir

Abstract

Objective

The production of siderophore and cellulase by *Trichoderma* species is one of the effective indexes in plant growth, effective control and management of pathogens as well as application in industry. Therefore, primary screening of best isolates is very important based on the defined indicators.

Materials and methods

In this study, the optimal conditions for the qualitative and quantitative production of siderophore and cellulase were investigated using test plate method for the initial screening of 27 *Trichoderma* strains. For measuring cellulase enzymes (Endoglucanase, exoglucanase and beta glucosidase), the reactive dyes phenol red, Congo red (0.5, 0.05 and 0.015%) were used at pH levels of 4, 5, 7 and 9 with carbon sources including Avicel, CMC and cellobiose. Quantitative measurement of cellulase was investigated using the dinitrosalicylic acid method. Screening of *Trichoderma*

strains for siderophore production was studied by CAS agar method as mycelial culture and crude extract in a well method.

Results

The results of this research showed phenol red 0.015% under pH5 is the best reagent for detection of cellulase, Because of there is no inhibition on mycelial growth and the purple zone diameter is clear. In quantitative cellulase assay, the highest enzyme specific activity is related to *T. harzianum* CT-763 with 3 U/mg. *T. atroviride* CT-482, CT-473 and CT-865 were known as active strains in siderophore production, which were able to produce two types of siderophore, hydroximate and catechol. The results of siderophore production in liquid medium using the well method showed that *T. afroharzianum* CT-891 has the highest siderophore production by creating a halo zone of 1.2 cm, while *T. harzianum* CT566 produced the lowest amount of siderophore without creating halo.

Conclusions

Considering the application efficiency using of siderophore and cellulase in sustainable agriculture and importance of the role of *Trichoderma* species in production these metabolites, the well method for siderophore and dinitrosalicylic acid method for cellulase detection suggested. In this study *T. atroviride* and *T. harzianum* species had the highest production in siderophore and cellulase, respectively.

Keywords: Beta glucosidase, Endoglucanase, Exoglucanase, *T. atroviride*, *T. harzianum*.

Paper Type: Research Paper.

Citation: Brahoei N, Alaei H, Sedaghati E, Saberi-Riseh R, and Abbaszadeh-dahaji P (2023) Screening of *Trichoderma* strains by optimized conditions in test plate media for siderophore production and measuring of cellulytic enzyme. *Agricultural Biotechnology Journal* 15 (3), 115-140.

Agricultural Biotechnology Journal 15 (3), 115-140. DOI: 10.22103/jab.2023.20519.1442

Received: May 04, 2023.

Received in revised form: June 27, 2023.

Accepted: June 28, 2023.

Published online: September 30, 2023.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant



Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© the authors

غربال‌گری جدایه‌های *Trichoderma* با بهینه‌سازی شرایط محیط کشت برای تولید

سیدروفور و سنجش آنزیم سلولاز

نسبیه براهویی

دانشجوی دکتر، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، کرمان، ایران. رایانامه:

n.barahoei@gmail.com

حسین علایی

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، کرمان، ایران. رایانامه:

hossein.alaei@vru.ac.ir

ابراهیم صداقتی

دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، کرمان، ایران. رایانامه:

sedaghati@vru.ac.ir

روح‌الله صابری ریس

استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان، کرمان، ایران. رایانامه:

r.saberi@vru.ac.ir

پیمان عباس‌زاده دهجی

استادیار، گروه مهندسی علوم خاک، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان، کرمان، ایران. رایانامه:

p.abbaszadeh@vru.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۴ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۲/۰۴/۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۷

چکیده

هدف: تولید سیدروفور و آنزیم‌های سلولازی توسط گونه‌های تریکودرما از جمله شاخص‌های موثر در رشد گیاه، کنترل و مدیریت موفق بیمارگرها و یا کاربرد در صنعت است. بنابراین غربالگری اولیه جدایه‌های برتر بر اساس شاخص‌های تعریف شده اهمیت زیادی دارد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش شرایط بهینه تولید کیفی و کمی سیدروفور و سلولاز به روش محیط کشت برای غربالگری اولیه ۲۷ جدایه تریکودرما بررسی شد. برای سنجش آنزیم سلولاز شامل اندوگلوکاناز، آگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز از رنگ‌های واکنشی فنل قرمز، کنگو قرمز (در غلظت‌های ۰/۵، ۰/۰۵ و ۰/۰۱۵ در صد) در pH های ۴، ۵، ۷ و ۹ و منابع کربنی آویسل، کربوکسی متیل سلولز و سلوبیوز استفاده شد. سنجش کمی سلولاز به روش دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید بررسی شد. غربالگری جدایه‌ها برای تولید سیدروفور نیز به روش کروم آزرول سولفانات آگار و بصورت کشت میسلیموم و عصاره خام فیلتر شده جدایه‌های *Trichoderma* در روش چاهک مطالعه گردید.

نتایج: نتایج این تحقیق نشان داد که از بین رنگ‌های واکنشی فنل قرمز با ۰/۰۱۵ در صد در شرایط pH ۵ بهترین معرف برای ردیابی سلولاز می‌باشد، زیرا مانعی بر رشد میسلیمومی وجود ندارد و قطر ناحیه ارغوانی مشخص است. در سنجش کمی سلولاز، بیش‌ترین فعالیت ویژه آنزیمی مربوط به *Trichoderma harzianum* CT-763 با ۳ U/mg بود. جدایه‌های CT-865، CT-482 و CT-473 از *Trichoderma atroviride* به عنوان جدایه فعال در زمینه‌ی تولید سیدروفور شناخته شدند که توان تولید دو نوع سیدروفور هیدروکسیمات و کتکول را داشتند. نتایج بررسی تولید سیدروفور در کشت مایع به روش چاهک نشان داد که *T. afroharzianum* CT-891 با ایجاد هاله‌ی ۲/۱ سانتی متر بیش‌ترین میزان تولید سیدروفور را دارد در حالی که *T. harzianum* CT-566 بدون ایجاد هاله کمترین میزان تولید سیدروفور را به خود اختصاص داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به کارایی کاربرد سیدروفور و سلولاز در کشاورزی پایدار و اهمیت نقش گونه‌های *Trichoderma* در تولید این متابولیت‌ها، استفاده از روش چاهک برای ردیابی سریع سیدروفور و روش دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید برای ردیابی سلولاز پیشنهاد می‌شود. در این مطالعه گونه‌های *T. atroviride* و *T. harzianum* به ترتیب بیش‌ترین تولید را در سیدروفور و سلولاز را داشتند.

کلیدواژه‌ها: آگزوگلوکاناز، اندوگلوکاناز، بتاگلوکوزیداز، *T. atroviride*، *T. harzianum*

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: براهویی نسبی، علایی حسین، صداقتی ابراهیم، صابری ریسه روح الله و عباس زاده دهجی پیمان (۱۴۰۲) غربالگری جدایه‌های *Trichoderma* با بهینه‌سازی شرایط محیط کشت برای تولید سیدروفور و سنجش آنزیم سلولاز. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۱۵-۱۴۰، (۳)۱۵.

Publisher: Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.



© the authors

قارچ *Trichoderma* به عنوان عامل زیست‌مهار موفق و مؤثر برای کنترل اکثر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی شناخته شده است. گونه‌های *Trichoderma* جزء فراوان‌ترین قارچ‌های جدا شده از خاک می‌باشند که به صورت فرصت‌طلب و هم‌زیست با گیاه در زیست‌بوم ریشه‌ی گیاهان وجود دارند (Mannai et al. 2022). این گروه از قارچ‌ها به دلیل توانایی رقابت برای مواد مغذی و فضا، تولید متابولیت‌های ضد میکروبی، القای پاسخ عمومی دفاعی و افزایش رشد گیاه، عوامل زیست‌مهار قوی محسوب می‌گردند. برای مثال کاربرد *Trichoderma* به عنوان کود زیستی باعث افزایش سطح و تعداد برگ‌ها و تسریع ظهور شاخسار در فلفل سیاه و پسته می‌شود (Syam et al. 2021). مطالعات نشان داده است که افزودن مستقیم *T. longibrachiatum* و *T. asperelloides* به دانه‌های ذرت باعث بهبود عملکرد و افزایش محصول در مقایسه با گیاهان غیرآلوده می‌شود (Intana et al. 2022). از این رو گونه‌های *Trichoderma* جزء عوامل مهارزیستی موفق بوده که به‌طور تجاری به صورت قارچکش یا کود زیستی علیه دامنه وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی استفاده شده است. سازوکار مهار زیستی گونه‌های *Trichoderma* از گونه‌ای به گونه دیگر و حتی با توجه به بیمارگرهای قارچی متفاوت است (Sharma et al. 2017). در حال حاضر، گونه‌های مختلفی از *Trichoderma* مانند *T. viride* و *T. harzianum* و چندین گونه دیگر برای کاربردهای تجاری در قالب تیمار بذر یا خاک در برابر بیمارگرهای مختلف گیاهی موجود در خاک مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Frascella et al. 2022; Asadi et al. 2019). سیدروفور یکی از ترکیبات تولید شده توسط گونه‌های *Trichoderma* است. این ترکیبات مواد کلاته کننده آهن سه ظرفیتی با وزن مولکولی کم هستند که تحت شرایط کمبود آهن تولید می‌شوند و با یون آهن ترکیب می‌شوند. سیدروفور تولید شده توسط *Trichoderma* به طور مستقیم باعث تحریک رشد گیاه از طریق افزایش دسترسی گیاه به آهن خاک اطراف ریشه و یا غیر مستقیم باعث مهار بیمارگر گیاه از طریق کمبود آهن برای بیمارگر می‌شود (Muniroh et al. 2019). جدایه‌های *Trichoderma* باعث رشد و تحریک مقاومت گیاه در برابر تنش‌های زنده و غیر زنده می‌شوند. کمبود آهن در خاک‌های شور و قلیایی یکی از تنش‌های شناخته شده است که به شکل غیر قابل حل تبدیل می‌شود و این عامل مانع از رشد گیاهان و حتی باعث زردی و مرگ گیاه می‌شود (Yehuda et al. 1996). در چنین شرایطی گیاه به طور همزمان با تنش شوری و کمبود آهن مواجه می‌شود (Qi & Zhao 2013). بهترین راه مقابله با کمبود آهن، افزایش کلات‌ها به صورت کودهای شیمیایی کلاته به خاک اطراف گیاه و یا پاشیدن آنها مستقیماً به برگ، برای جذب آهن مورد نیاز در گیاه است (Knepper 2003). در طبیعت، علاوه بر آهن سایر یون‌های فلزی مانند دی‌والنت‌ها، از جمله Cd^{2+} ، Cu^{2+} ، Ni^{2+} ، Pb^{2+} و Zn^{2+} ، کاتیون‌های سه‌گانه مانند Mn^{3+} ، Co^{3+} و Al^{3+} برای محل‌های اتصال سیدروفور رقابت می‌کنند (Ahmed & Holmstrom 2014).

امروزه کنترل بیماری‌های گیاهی با استفاده از محصولات شیمیایی انجام می‌شود که ممکن است باعث آلودگی محیط زیست، مقاومت به بیمارگرها، افزایش هزینه‌های تولید و خطرات جدی برای محیط زیست و سلامت انسان شود. یک جایگزین برای حفاظت از محصول در برابر بیمارگر، مهار زیستی است که توسط برخی از ریز موجودات تولید کننده سیدروفور اعمال می‌شود. این امر موجب

افزایش بیان ژن‌های مربوط به دفاع می‌شود. بنابراین، فعال شدن یک پاسخ دفاعی سیستمیک، همراه با اثر رشد دهنده گیاه توسط ریزموجودات تولید کننده‌ی سیدروفور انجام می‌شود (Macías-Rodríguez et al. 2020). بیمارگرها به دلایل زیادی به وسیله سیدروفور سرکوب می‌شوند، یکی از این عوامل عدم توانایی تولید سیدروفور و عدم توانایی استفاده از سیدروفورهای تولید شده توسط عوامل زیست‌مهار یا سایر ریزموجودات در محیط است و همچنین بیمارگرها سیدروفوری را که تولید می‌کنند توسط عامل زیست‌مهار مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما خودشان قادر به استفاده از سیدروفور عامل زیست‌مهار نمی‌باشد (Weller 1988). از دیدگاه رقابتی، بهترین راهبرد برای یک ریزموجود این است که قادر به استفاده از تمام سیدروفورهای خارج سلولی موجود در زیستگاه خود باشد و سیدروفوری را که سایر گونه‌ها قادر به استفاده‌ی آن نباشند را تولید کند (Haas et al. 2008). نتایج مطالعات Khodadadi-Pourarpanaei et al. (2021) نشان داده است که جدایه‌های مختلف *Trichoderma* با تولید سیدروفور علاوه بر کلاته کردن آهن محیط رشد لوبیاچشم بلبلی موجب کاهش رشد بیمارگرهای گیاهی از جمله *Rhizoctonia solani* شدند. تولید سیدروفور در گونه‌های *Trichoderma* به وسیله‌ی متغیرهای مختلفی از جمله pH و غلظت آهن در خاک تحت تاثیر قرار می‌گیرد. نتایج مطالعات Qi & Zhao (2013) نشان داده است که سیدروفور در شرایط تحت تنش شوری با تنظیم جذب آهن باعث بهبود رشد گیاه می‌شود. شاخص‌های رشدی مثل طول ساقه، وزن تر و خشک در تیمار سیدروفور-آهن بیش‌تر از تیمار شاهد (آهن) بوده است و همچنین نتایج محققین نشان می‌دهد که استفاده از گونه‌های *Trichoderma* شاخص‌های رشدی خیار و بادمجان را با القای حفاظت فیزیولوژیکی در شرایط تحت تنش شوری افزایش داده است (Montesinos et al. 2020) و بیان داشتند سیدروفورهای تولید شده توسط *Trichoderma* نقش کلیدی در کاهش اثرات منفی شوری داشتند (Montesinos et al. 2020). بررسی‌ها نشان داده است که ترکیب هارزینیک اسید^۱ که از *T. harzianum* خالص‌سازی شده باعث تحریک و القاء رشد در گیاه می‌شود (Vinale et al. 2009). برای مثال در آزمایشی که روی گیاه کلزا انجام شده است، هارزینیک اسید باعث کنترل بیمارگرهای مختلف قارچی در گیاه کلزا گردیده است و گیاهان حاصل از بذرهای تیمار شده با این ترکیب نیز وزن تر و خشک و طول ساقه و ریشه بیشتری نسبت به شاهد داشته‌اند (Vinale et al. 2013).

مهمترین و اصلی‌ترین سازوکار زیست‌مهار که باعث شده *Trichoderma* به عنوان یک عامل زیست‌مهار موفق بکار رود توانایی قارچ‌انگلی و تولید آنتی‌بیوتیک آن است. یکی دیگر از متابولیت‌های تولید شده توسط *Trichoderma*، آنزیم سلولاز است. که وظیفه‌ی اختصاصی آن از بین بردن اجزاء تشکیل دهنده‌ی دیواره‌ی سلولی در قارچ‌ها است. از آنجا که دیواره‌ی سلولی نخستین و مهم‌ترین سد در برابر آنزیم‌های تجزیه کننده است از میان بردن اجزای تشکیل دهنده دیواره‌ی قارچی از جنس گلوکان، وظیفه‌ی اختصاصی بسیاری از این آنزیم‌ها می‌باشد. بر همین اساس برای کنترل بیمارگرهایی که در دیواره‌ی خود سلولز دارند (الیست‌هایی مانند فیتوفتورا و پیتوم، ...) از عوامل مهار زیستی که توان سلولازی بالایی دارند، استفاده می‌شود. برای مثال دیواره سلولی

¹ Harzianic acid

Phytophthora citrophthora و *Phytophthora drechsleri* دارای سلولز (زنجیره‌های بتا ۱-۴ گلوکان) و بتا ۱-۳ گلوکان و بتا ۱-۶ گلوکان است، حساسیت بالایی نسبت به آنزیم‌های سلولازی دارد (Win et al. 2021; Barahoei et al. 2023). از طرفی توسعه فناوری استفاده از مواد لیگنوسلولزی تاکنون توجه زیادی را به خود جلب کرده است ولی تبدیل مقرون به صرفه لیگنوسلولز به قندهای قابل تخمیر یک محدودیت عمده برای این هدف است. چنین تبدیلی را می‌توان به طور پایدار با هیدرولیز آنزیمی (عمدتاً با استفاده از سلولازها) انجام داد. غربالگری ریزموجودات جدید، دستکاری ژنتیکی گونه‌ها و استفاده از انواع مختلف ریزموجودات برای بهبود بازده تولید سلولاز انجام شده است. گونه *Trichoderma reesei* یکی از تولیدکنندگان اصلی سلولاز، به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (Taherzadeh-Ghahfarokhi et al. 2022). دو نوع هیدرولیز برای سلولز وجود دارد: هیدرولیز اسیدی و هیدرولیز آنزیمی که هیدرولیز آنزیمی می‌تواند کارآمد و سازگار با محیط زیست باشد (Gao et al. 2021). تخریب سلولز به گلوکز توسط آنزیم‌های اندو بتا ۱-۴ گلوکاناز، اکزوگلوکاناز و بتا گلوکوزیداز انجام می‌شود. اندوبتاگلوکاناز به صورت تصادفی پلیمر سلولزی را تکه‌تکه می‌کند. محل اثر اکزوبتاگلوکوزیداز انتهای زنجیره‌ی حاصل از اندوبتاگلوکاناز می‌باشد و محصول نهایی آن سلوبیوز است. سلوبیوز حاصل به وسیله بتاگلوکوزیداز به قند گلوکز شکسته می‌شود (Xiang et al. 2020). یون‌های فلزی می‌توانند فعالیت‌های آنزیمی گونه‌های *Trichoderma* را تحت تاثیر قرار دهند و منجر به تغییراتی در توان زیست‌مهارتی این قارچ علیه بیمارگرهای گیاهی می‌شوند. یون‌های منگنز فعالیت سلوبیوهیدرولاز را افزایش می‌دهند، برای مثال طبق بررسی که در سال ۹۲ بر روی چهار جدایه *Trichoderma* انجام شده، میزان فعالیت ویژه‌ی آنزیمی زمانی که در محیط حاوی ریزمغذی منگنز رشد یافته نسبت به شاهد بیشتر بوده است، ولی میزان فعالیت در سایر ریزمغذی‌ها نسبت به شاهد کاهش یافته است. برخی یون‌های فلزی سنگین مثل Cu^{2+} با چسبیدن به محل‌های فعال آنزیم مانع از اتصال ماده زمینه‌ای به آنزیم شده و در این واکنش اختلال ایجاد می‌کنند (Morid & Zafari 2013). کلسیم و منیزیم باعث افزایش تولید سلولاز در *T. reesei* می‌شود ولی منیزیم در غلظت‌های بالا اثر مهارکننده دارد. آهن، منگنز، کبالت و روی، جزء عناصر موثر بر تولید آنزیم سلولاز هستند (Gupta et al. 2014). غربالگری جدایه‌ها از جمله روش‌های مناسب برای رسیدن به اهداف خاص با چند جدایه برتر می‌باشد به خصوص هنگامی که تعداد زیادی از جدایه وجود دارد. روش استفاده از غربالگری کیفی یک روش ساده و سریع برای تشخیص برترین جدایه‌ها می‌باشد که از این روش می‌توان برای غربالگری جدایه‌های *Trichoderma* از نظر تولید سیدروفور و آنزیم سلولاز استفاده کرد (Yoon et al. 2007). برای ردیابی سیدروفور از روش کروم آزرول سولفانات آگار^۲ استفاده می‌شود که یک روش جهانی برای شناسایی و تعیین سیدروفورها با استفاده از میل ترکیبی بالا با آهن (III) است (Verma et al. 2012). در این محیط کشت هاله نارنجی رنگ اطراف پرگنه روی آگار آبی رنگ^۳ نشان دهنده‌ی وجود سیدروفور در محیط کشت است. وجود سیدروفور در محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار باعث می‌شود که سیدروفور به عنوان یک اتصال قوی با آهن موجود در محیط واکنش دهد و ماده‌ی کروم آزرول

² Chrome Azurol S (CAS) Agar

³ Blue agar

سولفانات از آهن جدا شود که این واکنش به صورت تغییر رنگ مشاهده می‌شود (Ayyandurai et al. 2021). نتایج مطالعات Chen et al. (2019) روی غربالگری جدایه‌های *Trichoderma* از نظر میزان تولید و نوع سیدروفور در محیط کشت کروم آزول سولفانات آگار نشان داد که گونه‌های *T. atroviride*، *T. paraviridescens* و *T. koningii* سیدروفور از نوع کتوکل و *T. asperellum* هر دو نوع سیدروفور کتوکل و هیدروکسیمات را تولید می‌کند. از روش غربالگری کیفی نیز می‌توان برای ردیابی جدایه برتر *Trichoderma* از نظر فعالیت آنزیم سلولازی استفاده کرد. روش غربالگری کیفی ابزاری برای ردیابی تجزیه‌ی پلی‌ساکارید توسط قارچ است که در آن از رنگ‌های مختلفی مثل فنل قرمز^۴ و کنگو قرمز^۵ استفاده می‌شود. اصولاً به این نوع از معرف‌های رنگی، رنگ‌های واکنشی می‌گویند که در روش غربالگری کیفی استفاده می‌شود. برای مثال طی بررسی که در سال ۲۰۰۷ برای غربالگری ۱۹ گونه قارچی متفاوت صورت گرفت مشخص شد که از بین رنگ‌های بریلیان^۶، تریفان بلو^۷، فنل قرمز و کنگو قرمز، رنگ فنل قرمز و کنگو قرمز برای ردیابی آنزیم‌های اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز کارایی بیشتری دارند (Yoon et al. 2007). روش اندازه‌گیری سلولاز ممکن است به شکل اندازه‌گیری سلولاز کل و یا اندازه‌گیری آنزیم‌های سلولاز باشد. اندازه‌گیری سلولاز کل شامل ارزیابی اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز است و اندازه‌گیری آنزیم‌های سلولاز هر یک از این آنزیم‌ها به تنهایی مورد سنجش قرار می‌گیرد (Gajora & Vakharia 2012). در مطالعه‌ای که روی غربالگری ۱۷ گونه متفاوت *Trichoderma* جدا شده از خاک‌های شور و قلیایی باغات پسته انجام شده است آنزیم‌های سلولاز را در غربالگری کیفی با معرف فنل قرمز ارزیابی نمودند. نتایج نشان داد که دو گونه *T. harzianum* و *T. longibrachiatum* از نظر تولید هر سه آنزیم سلولاز نسبت به سایر گونه‌ها برتری دارند. بنابراین با توجه به کارایی استفاده از سیدروفور و سلولاز در کشاورزی پایدار و اهمیت نقش *Trichoderma* در تولید این ترکیبات، این پژوهش با هدف غربالگری سریع جدایه‌های *Trichoderma* بومی از نظر تولید سیدروفور و آنزیم سلولاز برای انتخاب جدایه برتر با روش‌های مختلف و ارائه یک روش مطمئن، سریع و ساده برای هر ترکیب طراحی و انجام گردید.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های *Trichoderma*: جدایه‌های قارچ *Trichoderma* | استفاده شده در این پژوهش، از کلکسیون کشت قارچ بخش بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان تهیه شد. این جدایه‌ها از خاک و ریزوسفر مرکبات از مناطق مختلف استان کرمان جمع‌آوری، جداسازی و براساس روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی شده بودند. شناسایی ریخت‌شناسی

⁴ Phenol red

⁵ Congo red

⁶ Brilliant blue

⁷ Tryphan blue

جدایه‌ها براساس ویژگی‌های ماکرومورفولوژیک از قبیل نحوه رشد و شکل پرگنه، وجود یا عدم وجود جوش، تولید رنگدانه و ویژگی‌های میکرومورفولوژیکی مانند شکل و نحوه‌ی انشعاب کنیدیفور، شکل و اندازه فیالید، شکل و اندازه کنیدی با استفاده از کلید شناسایی گمس و بیست (Gams and Bissett, 1998) و کلید موجود در سایت تریکودرما (<http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm>) انجام شده بود. شناسایی بر پایه مشخصه‌های مولکولی با استفاده از تکثیر و ترادف نوکلئوتیدی ناحیه‌ی ITS از DNA ریبوزومی با استفاده از جفت آغازگرهای ITS4 –ITS1F انجام شده بود (Gardes and Bruns, 1993 ; White *et al.*, 1990). در این پژوهش ۲۷ جدایه مورد بررسی قرار گرفت که ویژگی‌های آنها در جدول ۱ آورده شده است.

بررسی سنجش تولید سیدروفور به روش کروم آزرول سولفانات آگار: تشخیص کیفی توان تولید سیدروفور

توسط جدایه‌های منتخب *Trichoderma* با استفاده از محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار به روش شرح داده شده توسط Alexander & Zuberer (1991) انجام شد. پس از آماده‌سازی محیط کشت، برای کشت جدایه‌های مورد نظر، از حاشیه کشت چهار روزه هر جدایه، یک قرص میسلیمی پنج میلی‌متری روی محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار قرار داده شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و محیط‌های کشت در شرایط تاریکی با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. اندازه‌ی قطر پرگنه و قطر هاله نارنجی تشکیل شده در اطراف آن، به مدت یک هفته بصورت روزانه با خط‌کش اندازه‌گیری شد. نسبت قطر هاله به قطر پرگنه برای هر جدایه محاسبه و میانگین هفت روز به عنوان معیار ارزیابی تولید سیدروفور در نظر گرفته شد. برای بررسی جدایه‌های *Trichoderma* که در محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار توانایی رشد نداشتند از روش تغییر یافته محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار، شرح داده شده توسط Milagres *et al.* (1999) استفاده شد. در این روش ابتدا محیط کشت عصاره مالت آگار دو درصد تهیه و بعد از سترون کردن در تشتک‌های پتری نه سانتی‌متری ریخته شد. پس از انجماد محیط کشت، نیمی از آن با کاردک کاملاً استریل برداشته شد و با ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار (Alexander & Zuberer 1991) جایگزین این بخش از محیط کشت گردید. برای کشت جدایه‌های مورد نظر، از حاشیه کشت چهار روزه هر جدایه، یک قرص میسلیمی پنج میلی‌متری روی نیمه محیط کشت عصاره مالت آگار کنار لبه تشتک پتری قرار داده شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و تشتک‌های پتری به مدت یک هفته در شرایط تاریکی با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس میزان تولید سیدروفور با اندازه‌گیری قطر هاله ایجادشده، ارزیابی شد.

بررسی تاثیر آهن در تولید سیدروفور: این آزمایش با هدف مقایسه توانایی جدایه‌های *Trichoderma* برای تولید

سیدروفور در حضور و عدم حضور آهن در محیط کشت انجام شد. بدین منظور محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار حاوی ۴ میلی‌مولار کلراید آهن تهیه گردید و پس از کشت جدایه‌ها، تشتک‌های پتری درون انکوباتور در شرایط تاریکی با دمای ۲۸ درجه

سل سیوس نگهداری شدند. تیمار شاهد بدون یون آهن در نظر گرفته شد (Schwyn & Neilanos 1987; Zhao et al. 2020).

بررسی سنجش تولید سیدروفور در محیط کشت مایع: برای سنجش توان تولید سیدروفور در محیط کشت مایع از

روش تغییر یافته Shin et al. (2001) با ایجاد چاهک در محیط کشت کروم آزروول سولفانات آگار به روش نشت در آگار^۸ انجام شد. بعد از ریختن محیط کشت درون تشتک پتری، با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن پنج میلی‌متری، چاهک‌هایی در تشتک‌های حاوی محیط کشت ایجاد شد. تشتک‌ها تا زمان استفاده درون کیسه‌های پلاستیکی و در یخچال نگهداری شدند. برای تهیه محیط کشت مایع از روش Elad & Chet (1983) با کمی تغییر استفاده شد. محیط کشت مایع حاوی یک گرم در لیتر مواد معدنی NaNO_3 ، K_2HPO_4 و NH_4NO_3 ، نیم گرم در لیتر KCL و MgSO_4 ، سه گرم در لیتر گلوکز با pH ۵/۵ استفاده شد و پس از سترون کردن محیط، سه قرص میسلومی پنج میلی‌متری از جدایه‌های *Trichoderma* در فلاسک‌های ارلن حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع کشت داده شد و سپس روی دستگاه تکان دهنده با دور ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸ درجه سل سیوس به مدت هشت روز نگهداری شدند. در مرحله بعد ۴۰۰ میکرولیتر از عصاره خام فیلتر شده هر جدایه درون چاهک‌ها ریخته شد. برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته شد و تشتک‌های محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار گرفتند و سپس قطر هاله‌ی نارنجی ایجاد شده اطراف چاهک با خط‌کش اندازه‌گیری شد.

بررسی سنجش کیفی و کمی میزان تولید آنزیم سلولاز: به منظور سنجش کیفی فعالیت آنزیمی سلولازی

جدایه‌های *Trichoderma* از روش Katatny et al. (2000) با تغییراتی استفاده شد. بدین منظور از محیط کشت MSM^9 حاوی یک در صد عصاره مخمر، ۰/۱ در صد NaNO_3 و K_2HPO_4 ، ۰/۰۵ در صد KCL و MgSO_4 و ۰/۰۰۱ در صد FeSO_4 استفاده گردید. به منظور ردیابی و بررسی توان تولید هر یک از آنزیم‌های سلولاز، از منابع کربنی ۰/۵ در صد آویسل، کربوکسی متیل سلولز و سلوبیوز به ترتیب برای اندازه‌گیری اگزوگلوکاناز، اندوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز استفاده شد. سپس با اضافه نمودن مقدار ۲/۵ در صد آگار به محیط کشت، در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون گردید. از حاشیه کشت چهار روزه هر جدایه، یک قرص میسلومی پنج میلی‌متری در مرکز محیط کشت قرار داده شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت سه الی چهار روز قرار گرفت. میزان تولید آنزیم سلولاز به صورت کیفی با اندازه‌گیری قطر هاله ارغوانی رنگ ناشی از تولید آنزیم در ۲۴ تا ۹۶ ساعت پس از کشت در حضور مقادیر ۰/۵، ۰/۰۵ و ۰/۱۵ درصد از رنگ‌های واکنشی کنگو قرمز و فنل قرمز با pH های ۴، ۵، ۷ و ۹ مورد بررسی و محاسبه قرار گرفت. سنجش کمی میزان تولید آنزیم سلولازی جدایه‌های تریکودرما با استفاده از روش رنگ‌سنجی با سنجش میزان قند موجود در محیط، انجام شد (Neethu et al. 2012). بدین منظور

⁸ CAS-AD

⁹ Minimal Synthetic Medium

تعداد چهار قرص میسلیمی پنج میلی متری از کشت چهار روزه جدایه *Trichoderma* در شرایط سترون به فلاسک‌های ارلن حاوی محیط مایع سترون حاوی ۰/۲ درصد NaNO_3 ، ۰/۱ درصد K_2HPO_4 ، ۰/۰۵ درصد KCL و ۰/۲ درصد MgSO_4 ، پروتئاز پیتون و ۰/۵ درصد کربوکسی متیل سلولز (به عنوان منبع کربن) با pH چهار اضافه گردید و به مدت یک هفته در شرایط دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس روی دستگاه تکان دهنده با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. سپس سوسپانسیون محیط مایع به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سلسیوس و دور ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید و از محلول رونشین به عنوان آنزیم خام استفاده شد. مخلوط واکنش برای سنجش آنزیم سلولاز شامل ۵۰۰ میکرولیتر از محلول یک درصد کربوکسی متیل سلولز و ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره‌ی آنزیمی بود. مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم دمای ۵۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد و سپس با اضافه کردن سه میلی لیتر معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید (۰/۲۵ گرم دی نیتروسالیسیلیک اسید + ۷۵ گرم سدیم پتاسیم تارتارات + ۵۰ میلی لیتر سدیم هیدروکسید دو نرمال برای حجم نهایی ۲۵۰ میلی لیتر) واکنش متوقف شد (Kim et al. 2014). در مرحله بعد نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در آب در حال جوشیدن قرار داده شد تا در اثر احیاء معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید توسط قند احیاء شده (گلوکز)، تغییر رنگ معرف از زرد به قرمز انجام پذیرد و سرانجام با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری نانودراپ میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شد. معرف تنها با اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به جای نمونه‌ی آنزیم به همان روش بالا بررسی شد (Zhang et al. 2009). از غلظت‌های یک، سه، پنج و هفت میکرومول بر میلی لیتر گلوکز به عنوان استاندارد استفاده گردید. یک واحد فعالیت آنزیمی (میکرومول بر میلی لیتر) مقدار آنزیمی است که برای آزاد شدن یک میکرومول قند احیاء شده به صورت گلوکز در مدت یک دقیقه در یک میلی لیتر لازم می باشد. اندازه گیری فعالیت آنزیم برای هر جدایه در سه تکرار انجام شد. میزان پروتئین کل بر اساس روش Bradford (1976) اندازه گیری شد.

جدول ۱. لیست گونه‌های *Trichoderma* مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. List of *Trichoderma* species used in this study

کد جدایه Strain code	گونه Species	کد جدایه Strain code	گونه Species	کد جدایه Strain code	گونه Species
CT-865	<i>T. atroviride</i>	CT-722	<i>T. harzianum</i>	CT-792	<i>T. guizhouense</i>
CT-482	<i>T. atroviride</i>	CT-655	<i>T. harzianum</i>	CT-936	<i>T. aureoviridis</i>
CT-937	<i>T. guizhouense</i>	CT-634	<i>T. harzianum</i>	CT-489	<i>T. harzianum</i>
CT-731	<i>T. harzianum</i>	CT-862	<i>T. harzianum</i>	CT-4817	<i>T. afroharzianum</i>
CT-734	<i>T. pseudoharzianum</i>	CT-473	<i>T. atroviride</i>	CT-977	<i>T. afroharzianum</i>
CT-612	<i>T. virens</i>	CT-031	<i>T. atroviride</i>	CT-891	<i>T. afroharzianum</i>
CT-447	<i>T. afroharzianum</i>	CT-9715	<i>T. virens</i>	CT-763	<i>T. harzianum</i>
CT-055	<i>T. afroharzianum</i>	CT-062	<i>T. virens</i>	CT-203	<i>T. harzianum</i>
CT-566	<i>T. harzianum</i>	CT-773	<i>T. afroharzianum</i>	CT-873	<i>T. harzianum</i>

نتایج و بحث

بررسی سنجش تولید سیدروفور به روش کروم آزرول سولفانات آگار: تولید سیدروفور در جدایه‌های

Trichoderma با اندازه‌گیری قطر پرگنه در فواصل زمانی معین و بررسی قطر هاله تغییر رنگ یافته در محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش توان تولید سیدروفور را داشتند. تولید سیدروفور (قطر هاله) و رشد شعاعی میسلیمی (قطر پرگنه)، بسته به نوع جدایه متفاوت بود (جدول ۲). نسبت قطر هاله به پرگنه جدایه‌ها بین ۲/۴۱-۰/۲۶ متغیر بود. نسبت قطر هاله به قطر پرگنه برای هر جدایه در هفت روز متوالی و همراه با میانگین هفت روز در جدول ۲ آورده شده است. از بین جدایه‌های مورد آزمایش، نسبت قطر هاله به قطر پرگنه در جدایه‌های CT-473، CT-482 و CT-865 متعلق به گونه‌ی *T. atroviride* بیش‌تر از سایر جدایه‌ها ارزیابی گردید. در این خصوص شدت ترشح سیدروفور نیز بیش از رشد میسلیم بود که به عنوان جدایه‌های فعال در زمینه‌ی تولید سیدروفور شناخته شدند. این سه جدایه به ترتیب با قطر ۲/۴۱، ۲/۲۳ و ۱/۷۱ سانتی‌متر بیشترین تولید سیدروفور را در بین جدایه‌ها داشتند و در خصوص سایر جدایه‌ها، بسته به نوع جدایه میانگین قطر هاله به پرگنه از ۰/۲۶-۰/۹۷ متفاوت بود. نتایج بدست آمده بیانگر آن است که هر جدایه در شرایط محیطی خاص واکنش متفاوتی از خود نشان می‌دهد. معرف کروم آزرول سولفانات، هنگامی که آهن به آن متصل است به رنگ آبی دید می‌شود و در صورتی که آهن از آن جدا شود بسته به نوع سیدروفورهای ترشح شده به رنگ زرد، نارنجی یا بنفش ظاهر می‌شود (Milagres et al. 1999). برای اینکه اتصال کروم آزرول سولفانات-آهن قوی نیست، هر عاملی که بتواند با گرفتن آهن این پیوند را بشکند باعث بروز این تغییر رنگ می‌شود. این محیط در مقابل هر ماده‌ای که خاصیت سیدروفوری داشته باشد جواب می‌دهد؛ بنابراین قطر هاله تغییر رنگ داده شده برآوردی تقریبی از مقدار مجموع سیدروفورهای آن جدایه است (شکل ۱). از بین جدایه‌های مورد بررسی فقط این سه جدایه توان تولید هر دو نوع سیدروفور هیدروکسیمات^{۱۰} و کتکول^{۱۱} را داشتند. این در حالی بود که جدایه‌های *T. afroharzianum* (CT-055, CT-891)، *T. harzianum* (CT-763, CT-634, CT-566)، *T. pseudoharzianum* CT-734، *virens* CT-9715 و *T. guizhouense* (CT-792, CT-937) فقط سیدروفور از نوع هیدروکسیمات را تولید کردند و جدایه‌های *T. harzianum* (CT-655, CT-489, CT-862, CT-722, CT-731)، *T. afroharzianum* CT-977، *T. virens* CT-612 و *T. aureoviridis* CT-936 نیز قادر به تولید سیدروفور از نوع کربوکسیلات^{۱۲} بودند (جدول ۲).

¹⁰ Hydroxamate¹¹ Catechol¹² Carboxylate

جدول ۲. ارزیابی جدایه‌های انتخابی *Trichoderma* بر اساس تولید سیدروفور و شدت واکنش در محیط کشت کروم آزورول سولفانات آگار

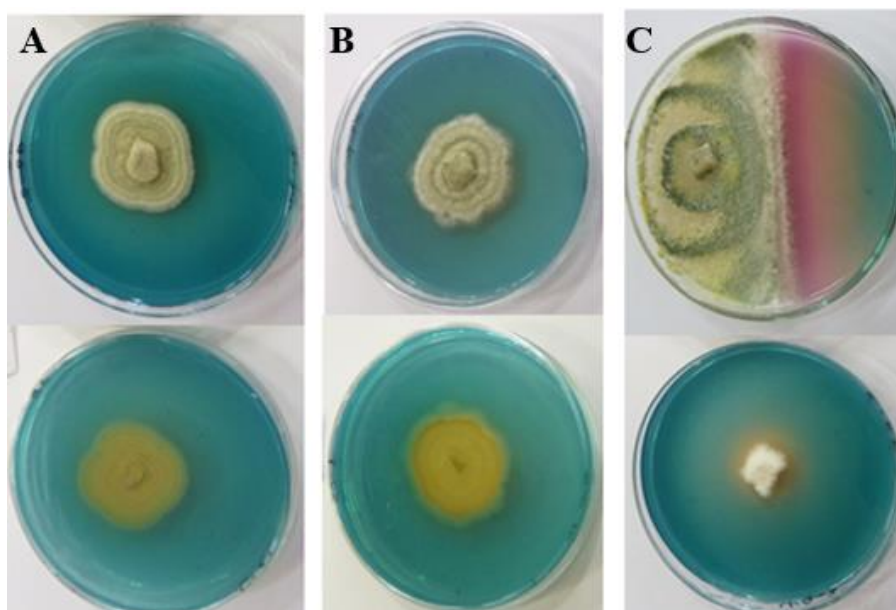
Table 2. Evaluation of selected *Trichoderma* strains based on siderophore production and intensity of reaction in Chrome Azurol S (CAS) agar medium

کد جدایه	تغییر رنگ ایجاد شده	نوع سیدروفور	شدت واکنش	نسبت قطر هاله به قطر پرگنه در روز پس از کشت (سانتی متر) The ratio of halo zone to colony diameter in days post culture (cm)							میانگین ۷ روز Average 7 days
				۲	۳	۴	۵	۶	۷		
CT-055	نارنجی orange	هیدروکسیمات Hydroxamate	++	0	0.5	0.56	0.67	0.67	0.73	0.52	
CT-655	زرد yellow	کربوکسیلات Carboxylate	+	0	0.45	0.4	0.53	0.56	0.61	0.43	
CT-891	نارنجی orange	هیدروکسیمات Hydroxamate	++	0	0	0.83	0.8	0.8	0.84	0.55	
CT-489	زرد yellow	کربوکسیلات Carboxylate	+	0	0	0.38	0.5	0.58	0.69	0.36	
CT-763	نارنجی orange	هیدروکسیمات Hydroxamate	++	0.63	0.67	0.86	0.86	0.8	0.87	0.78	
CT-031	زرد yellow	کربوکسیلات Carboxylate	+	0.52	0.38	0.3	0.33	0.57	0.62	0.45	
CT-792	نارنجی orange	هیدروکسیمات Hydroxamate	++	1	0.9	0.8	1	0.91	0.94	0.93	
CT-473	نارنجی و بنفش Orange and Purple	هیدروکسیمات و کتکول Hydroxamate and Catechol	+++	2.0	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.41	
CT-482	نارنجی و بنفش Orange and Purple	هیدروکسیمات و کتکول Hydroxamate and Catechol	+++	1.6	2.0	2.3	2.5	2.5	2.5	2.23	
CT-865	نارنجی و بنفش Orange and Purple	هیدروکسیمات و کتکول Hydroxamate and Catechol	+++	1.0	1.5	1.8	2.0	2.0	2.0	1.71	
CT-9715	نارنجی orange	هیدروکسیمات Hydroxamate	+	0.6	0.33	0.25	0.27	0.22	0.33	0.33	
CT-936	زرد yellow	کربوکسیلات Carboxylate	+	0	0	0.22	0.42	0.43	0.8	0.31	
CT-977	زرد yellow	کربوکسیلات Carboxylate	+	0.33	1	0.91	1	1	1	0.87	
CT-722	زرد yellow	کربوکسیلات Carboxylate	+	0	1	1	1	1	1	0.83	
CT-566	نارنجی orange	هیدروکسیمات Hydroxamate	+	0	0.6	0.67	0.63	0.73	0.8	0.57	
CT-734	نارنجی orange	هیدروکسیمات Hydroxamate	++	1	1	1	1	1	1	1	
CT-731	زرد yellow	کربوکسیلات Carboxylate	+	0	0	0.25	0.45	0.54	0.53	0.3	
CT-862	زرد yellow	کربوکسیلات Carboxylate	+	0.55	0.26	0.2	0.2	0.38	0.47	0.34	
CT-937	نارنجی orange	هیدروکسیمات Hydroxamate	++	1	1	1	1	0.95	0.89	0.97	
CT-634	نارنجی orange	هیدروکسیمات Hydroxamate	++	1	1	0.86	0.7	0.72	0.65	0.82	
CT-612	زرد yellow	کربوکسیلات Carboxylate	+	0	0	0	0.33	0.4	0.45	0.26	
کنترل Control	آبی Blue	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

intense قوی (+++)

medium متوسط (++)

weak ضعیف (+)



شکل ۱. تغییر رنگ ایجاد شده روی محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار در اثر ترشح انواع مختلف سیدروفور در گونه‌های *Trichoderma* (A) هاله زرد رنگ سیدروفور از نوع کربوکسیلات در *Trichoderma harzianum* CT-722 (B) هاله نارنجی رنگ سیدروفور از نوع هیدروکسیمات در *Trichoderma harzianum* CT-634 (C) هاله بنفش رنگ سیدروفور از نوع کتکول در *Trichoderma atroviride* CT-473

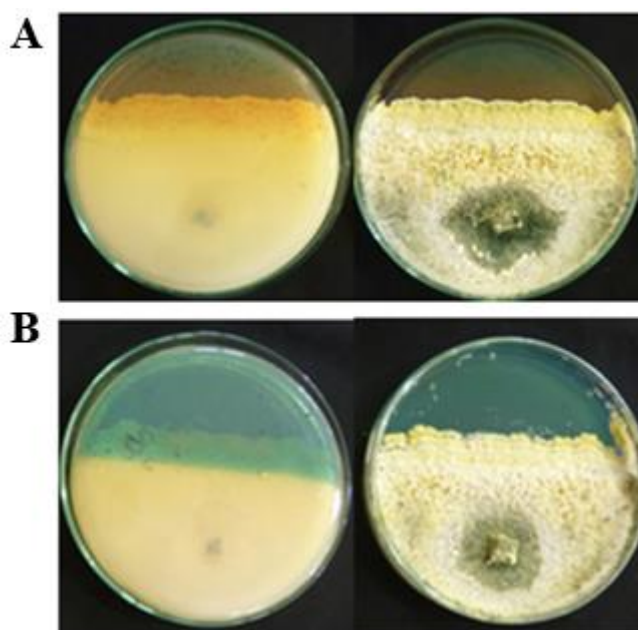
Figure 1. The color change created on the Chrome Azurol S (CAS) agar plates due to the secretion of different types of siderophore by *Trichoderma* species (A) the yellow halo zone of carboxylate-type siderophore in *Trichoderma harzianum* CT-722 (B) the orange halo zone of hydroxamate-type siderophore in *Trichoderma harzianum* CT-634 (C) the purple halo zone of catechol-type siderophore in *Trichoderma atroviride* CT-473

برخی از جدایه‌ها روی محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار دارای رشد خیلی محدودی بودند به همین علت از روش اصلاح شده کروم آزرول سولفانات آگار استفاده شد. روش اصلاح به دلیل سمیت هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید^{۱۳} در محیط کشت می‌باشد (Inbar et al. 1994; Verma et al. 2012). تغییر رنگ متفاوت در جدایه‌های مختلف به تفاوت ساختاری در انواع سیدروفورها مربوط می‌شود. انواع مختلفی از سیدروفور وجود دارند که می‌توان به کتکول، هیدروکسیمات و کربوکسیلات اشاره نمود (شکل ۱). تغییر رنگ محیط از آبی به بنفش به دلیل ترشح سیدروفور نوع کتکول، تغییر رنگ آبی به نارنجی به دلیل

¹³ Hexa Decyl Tri Methyl Ammonium bromide

ترشح سیدروفور نوع هیدروکسیمات و تغییر رنگ آبی به زرد روشن به دلیل وجود سیدروفور از نوع کربوکسیلات می باشد (Inbar et al. 1994; Chen et al. 2019).

بررسی تاثیر آهن در تولید سیدروفور در محیط کشت: نتایج کاربرد آهن در محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار با غلظت ۴ میلی مولار نشان داد که غلظت بالای آهن محیط، باعث بازداری کامل از تولید سیدروفور می شود. زمانی که آهن در محیط به مقدار خیلی کم وجود داشته باشد، رقابتی برای دستیابی به آهن بین ریزموجودات بوجود می آید به همین علت ریزموجودات برای دستیابی به آهن مورد نیاز، در محیط اطرافش سیدروفور تولید می کند تا بتواند در رقابت بین سایر ریزموجودات موفق باشد. در غیر این صورت به علت فراوانی آهن در محیط تولید سیدروفور صورت نمی گیرد (شکل ۲).

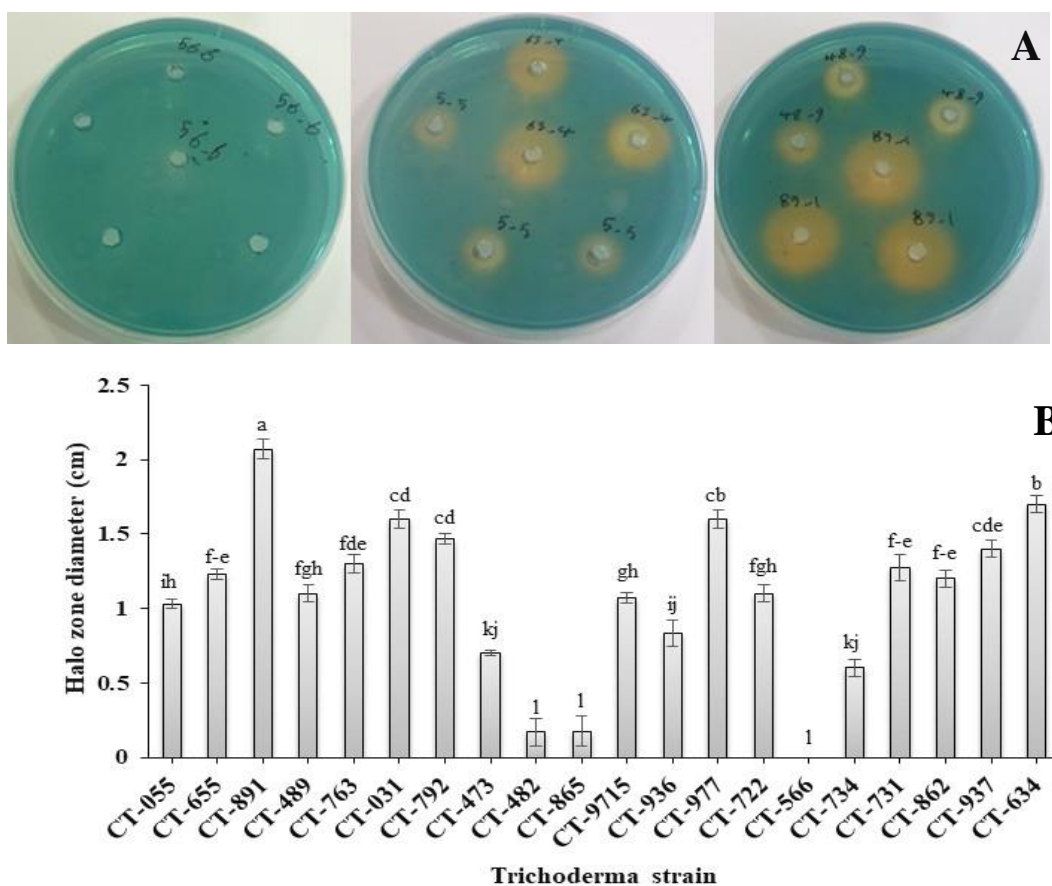


شکل ۲. توانایی تولید سیدروفور توسط جدایه *Trichoderma atroviride* CT-865 در محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار: (A) بدون حضور یون آهن Fe^{3+} (B) همراه با آهن $FeCl_3$ با غلظت 4mM

Figure 2. Siderophore production capability in *Trichoderma atroviride* CT-865 on Chrome Azurol S (CAS) agar medium in (A) without presence of iron Fe^{3+} (B) the presence of iron $FeCl_3$ with a concentration of 4mM

بررسی سنجش تولید سیدروفور در محیط کشت مایع: جدایه های *Trichoderma* به علت وجود مواد دترجنت هگزا دسیل تری متیل آمونیوم بروماید فاقد توانایی رشد مناسب روی محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار بودند، در نتیجه میزان تولید سیدروفور آنها به این روش قابل اندازه گیری دقیق نیست. همچنین به منظور بررسی و مقایسه تولید سیدروفور توسط جدایه های *Trichoderma* در محیط های جامد و مایع از روش اصلاح شده نشت در محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار با

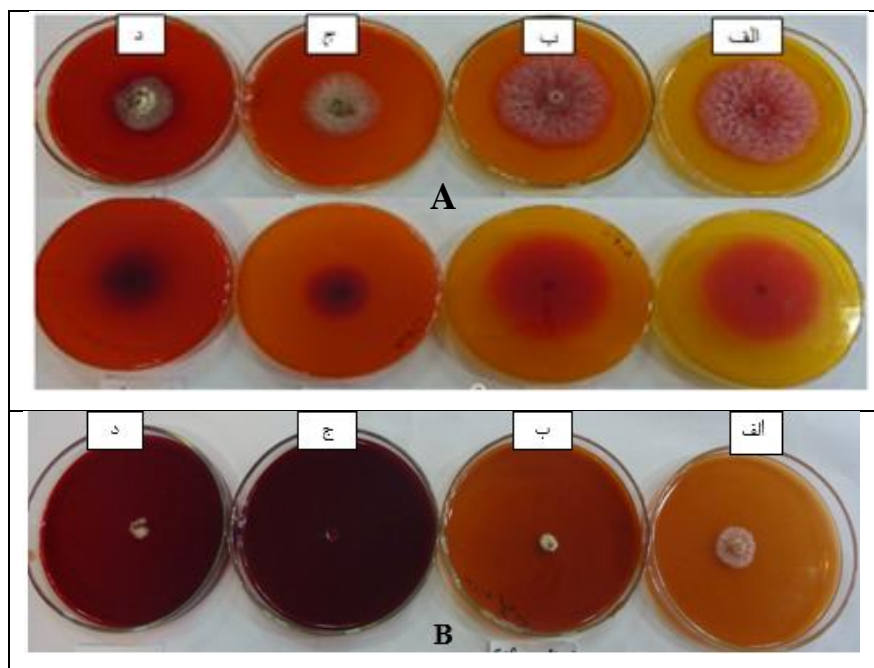
ایجاد چاهک استفاده شد بطوریکه به جای کشت مستقیم روی محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار، از عصاره سیدروفوری تولید شده توسط جدایه‌های *Trichoderma* در محیط کشت اختصاصی استفاده می‌شود. نتایج به دست آمده از این روش برای تعدادی از جدایه‌ها با دو روش بررسی شده در محیط جامد متفاوت بود. نتایج نشان داد که جدایه *T. afroharzianum* CT-891 با ایجاد هاله‌ی رنگی ۲/۱ سانتی‌متر در اطراف چاهک، بیش‌ترین تولید سیدروفور را دارد و جدایه *T. harzianum* قادر به تولید هیچ گونه سیدروفوری نبود (شکل ۳). در صورتی که مقدار تولید آنها در روش‌های قبلی پایین‌تر از میانگین بود (جدول ۲).



شکل ۳. (A) سنجش کیفی تولید سیدروفور در محیط کشت کروم آزرول سولفانات آگار با استفاده از عصاره خام فیلتر شده جدایه‌های *Trichoderma* به روش آزمون چاهک (B) مقایسه میزان تولید سیدروفور در جدایه‌های *Trichoderma* (بارها میزان تغییرات بین تکرارها را نشان می‌دهد)

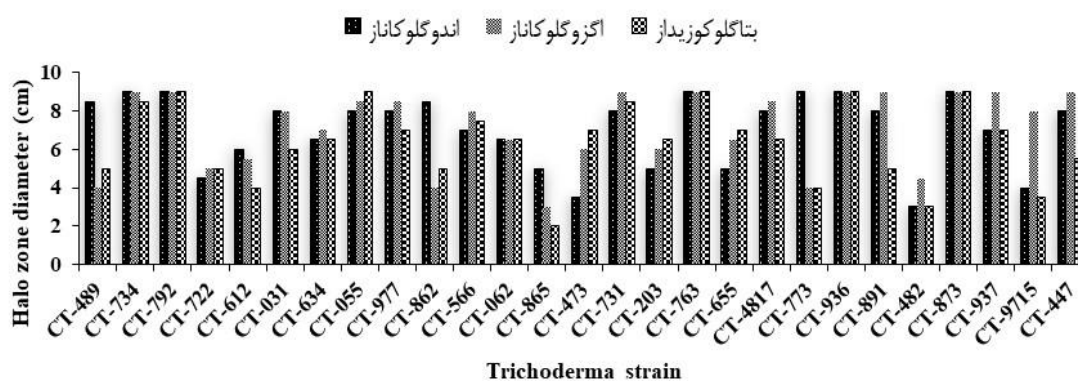
Figure 3. (A) Qualitative evaluation of siderophore production on chrome azurol S (CAS) agar plates using filtrate crude extract of *Trichoderma* strains by well test (B) Relative comparison of siderophore production in *Trichoderma* strains. (Bars represent the amount of variation between replicates)

بررسی سنجش کیفی و کمی میزان تولید آنزیم سلولازی: نتایج بررسی بهینه‌سازی سنجش آنزیم سلولاز به روش غربالگری کیفی نشان داد از بین دو رنگ فنل قرمز و کنگو قرمز رنگ اول بهترین رنگ برای مشاهده و اندازه‌گیری قطر هاله‌ی ایجاد شده برای هر سه منبع کربن (آویسل، کربوکسی متیل سلولز و سلوبیوز) می‌باشد. در این بررسی مقادیر ۰/۵، ۰/۰۵ و ۰/۰۱۵ درصد برای هر دو معرف و pH های چهار و پنج برای فنل قرمز و هفت و نه برای کنگو قرمز مورد بررسی قرار گرفت. برای معرف کنگو قرمز ۰/۵ درصد نتایج نشان داد در pH های هفت و نه محیط کشت کاملا تیره و قارچ بدون رشد بود و برای کنگو قرمز ۰/۰۵ درصد با pH هفت نیز محیط نسبتا تیره و رشد قارچ بسیار کم بود. این بدان معنی است که رنگ‌های معرف در غلظت‌های بالاتر برای قارچ خاصیت سمی دارند، بطوریکه در غلظت ۰/۰۱۵ درصد با pH هفت محیط به رنگ روشن و رشد قارچ مناسب بود ولی هاله‌ای برای اندازه‌گیری آنزیم سلولاز ایجاد نشده بود. بنابراین معرف کنگو قرمز برای ردیابی و سنجش آنزیم سلولاز در روش استفاده از غربالگری کیفی مناسب نبود. نتایج استفاده از معرف ۰/۵ درصد فنل قرمز در pH های چهار و پنج نشان داد ضمن تیره شدن محیط کشت موجب کندی رشد قارچ و سخت شدن اندازه‌گیری هاله‌ی ایجاد شده برای بررسی میزان آنزیم تولید شده می‌شود. در حالیکه مقادیر ۰/۰۵ و ۰/۰۱۵ درصد معرف فنل قرمز با pH ۵ در روش استفاده از غربالگری کیفی برای رشد قارچ و سنجش آنزیم سلولاز مساعد می‌باشد (شکل ۴). در این روش ناحیه‌ی روشنی که در محیط کشت دیده می‌شود در واقع مواد تجزیه شده به وسیله آنزیم می‌باشد. بنابراین معرف فنل قرمز بهترین رنگ برای ردیابی آنزیم‌های سلولازی در روش غربالگری کیفی می‌باشد. نتایج غربالگری جدایه‌های *Trichoderma* با استفاده از غربالگری کیفی برای سنجش آنزیم سلولاز نشان داد بیشترین تولید برای هر سه آنزیم اگزوگلوکاناز، اندوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز مربوط به جدایه‌های *T. guizhouense* CT-792، *T. aureoviride* CT-936، *T. harzianum* (CT-763، CT-731، CT-873)، *pseudoharzianum* CT-734 و *T. afroharzianum* CT-055 می‌باشد. با توجه به این موضوع که این جدایه‌ها بیشتر مربوط به گونه *T. harzianum* باشند پس می‌توان گفت جدایه‌های مختلف *T. harzianum* در تولید آنزیم سلولاز نسبت به سایر جدایه‌ها برتری دارند (شکل ۵). نتایج Jamali et al. (2016) نشان داد از بین گونه‌های *T. harzianum*، *T. aureoviride*، *T. asperellum*، *T. longibrachiatum*، *T. koningii*، *T. virens* و *T. crassum* گونه *T. harzianum* بیشترین تولید آنزیم سلولاز و بتا ۱ و ۳ گلوکاناز را به ترتیب با مقادیر 2.7 U/mg و 6 U/mg داشته است. نتایج این پژوهش با نتایج Jamail et al. (2016) مطابقت دارد. در سنجش کمی فعالیت ویژه آنزیم سلولاز نتایج نشان داد همه‌ی جدایه‌های *Trichoderma* توانایی تولید آنزیم سلولاز را دارند که این مقادیر بین ۳ تا ۱/۰۵ U/mg متغیر بود. بطوریکه بیشترین میزان فعالیت ویژه آنزیمی متعلق به جدایه *T. harzianum* CT-763 با ۳ U/mg و کمترین میزان آن متعلق به جدایه‌های *T. afroharzianum* CT-773 و *T. harzianum* (CT-634، CT-873) بود (شکل ۶). این میزان فعالیت ویژه آنزیم سلولاز در حقیقت نشان دهنده‌ی سلولاز کل یعنی مجموع هر سه آنزیم اگزوگلوکاناز، اندوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز بر اساس میزان گلوکز تولید شده می‌باشد.



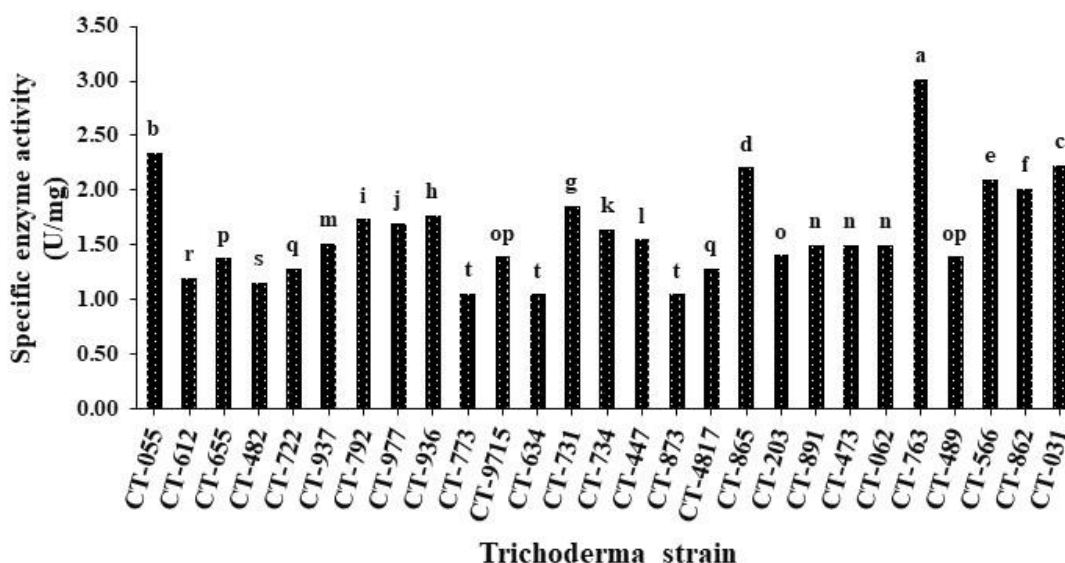
شکل ۴. سنجش کیفی تولید آنزیم‌های سلولولازی در جدایه‌های انتخابی *Trichoderma* در روش محیط کشت با مقدار و شرایط pH مختلف با استفاده از (A) معرف فنل قرمز: (الف) 0.015% - pH5، (ب) pH5، (ج) 0.05% - pH4، (د) 0.5% - pH5، (B) معرف کنگو قرمز: (الف) 0.015% - pH7، (ب) 0.05% - pH7، (ج) 0.5% - pH7، (د) 0.5% - pH9

Figure 4. Qualitative evaluation of the production of cellulase enzymes in selected strains of *Trichoderma* in culture medium method under different pH conditions using (A) phenol red reagent: (a) pH5 - 0.015%, (b) pH5 - 0.05%, (c) pH4 - 0.5%, (d) pH5 - 0.5%, (B) Congo red reagent: (a) pH7 - 0.015%, (b) pH7 - 0.05%, (c) pH7 - 0.5%, (d) 0.5% - pH9



شکل ۵. سنجش کیفی میزان تولید آنزیم‌های سلولولازی توسط جدایه‌های *Trichoderma* در روش غربالگری کیفی با ارزیابی قطر هاله در روز سوم پس از کشت

Figure 5. Qualitative evaluation of the production of cellulase enzymes by *Trichoderma* strains in the qualitative screening method by evaluating the halo zone diameter at three days post culture



شکل ۶. مقایسه میانگین فعالیت ویژه آنزیم سلولاز جدایه‌های *Trichoderma* در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس پس از هفت روز در طول موج ۵۴۰ نانومتر

Figure 6. Comparison of average cellulase specific activity of *Trichoderma* strains at 28°C after seven days at 540 nm wavelength

مطالعات نشان داده است که استفاده از دیواره سلولی *Phytophthora drechsleri* به عنوان منبع اصلی کربن می‌تواند فعالیت ویژه گلوکاناز و سلولاز را در گونه‌های *T. harzianum*، *T. aureoviride*، *T. asperellum*، *T. virens*، *T. koningii*، *T. longibrachiatum* و *T. crassum* در مقایسه با گلیسرول افزایش دهد (Jamali et al. 2016). نتایج Zavari et al. (2014) نشان داد که بین درصد بازدارندگی *P. drechsleri* و میزان فعالیت بتا ۱-۳ گلوکانازی چهار جدایه *T. virens* ارتباط مستقیمی وجود دارد. نتایج بررسی‌های پیشین حاکی از آن است که بتا ۱-۳ گلوکاناز در *T. harzianum* مانع رشد *Botrytis cinerea*، *Rhizoctonia solani* و *P. citrophthora* در شرایط آزمایشگاهی می‌شود و در این زمینه حداکثر مهار در برابر *P. citrophthora* ثبت شده است (Sookchaoy et al. 2009; Barahoei et al. 2023). با توجه به نقش و اهمیت آنزیم سلولاز در زیست‌مهار عوامل بیماری‌گر و صنعت، دست‌یابی به جدایه برتر در تولید این آنزیم‌ها بسیار مهم است. بنابراین می‌توان با شناسایی این جدایه‌ها در راستای تولید بیشتر ترکیبات سلولازی اقداماتی انجام داد. بر اساس مطالعه Bagheri et al. (2018) بر روی گونه *Trichoderma viride* نشان دادند با القاء جهش با پرتو گاما می‌توان تولید آنزیم سلولاز را بالا برد.

نتیجه‌گیری: بررسی‌های تولید سیدروفور توسط ریزموکودات، در برنامه‌های کاربردی و استفاده‌ی بالقوه آنها در کشاورزی توجه قابل ملاحظه‌ای را به خود جلب کرده است. *Trichoderma* از طریق محروم کردن بیمارگر از تغذیه آهن باعث کنترل زیستی

آن می‌شود و در نتیجه باعث افزایش عملکرد محصول می‌گردد (Strivastava et al. 2013). به همین دلیل ردیابی جدایه‌ها از نظر تولید سیدروفور امری مهم و ضروری می‌باشد. یکی از روش‌های ردیابی سیدروفور، استفاده از روش کروم آزرول سولفانات آگار که یک روش جهانی برای شناسایی و تعیین سیدروفورها با استفاده از میل ترکیبی بالا با آهن (III) هست، می‌باشد. در این پژوهش جدایه CT-891 بیش‌ترین تولید سیدروفور را در روش چاهک داشت که مربوط به گونه *T. afroharzianum* بود. جدایه‌های CT-482، CT-865 و CT-473 که مربوط به گونه *T. atroviride* بودند نیز در غربالگری کیفی بیشترین هاله را از نظر تولید سیدروفور داشتند. یکی دیگر از سازوکارهای زیست‌مهری قارچ *Trichoderma*، تولید آنزیم‌های هیدرولازی نظیر کیتیناز و بتا-۱-۳ گلوکاناز است که باعث تجزیه و تخریب دیواره سلولی عوامل بیماری‌زای گیاهی قارچی می‌گردد. گلوکانازهای حاصل از *Trichoderma*، کیتینازها و سایر آنزیم‌های تجزیه‌کننده در کنترل بیماری‌های قارچی مؤثرتر از آنزیم‌های جدا شده از گیاهان، باکتری‌ها یا سایر قارچ‌ها هستند. چنین آنزیم‌هایی برای برانگیختن پاسخ دفاعی گیاه شناخته شده‌اند، بنابراین تحمل بیماری را افزایش می‌دهند (Mustafa et al. 2020) و همچنین با توجه به اینکه مواد لیگنوسلولوزی به مقدار زیاد توسط فعالیت‌های مختلف کشاورزی تولید می‌شود و از طرفی با وجود ریزموجودات مثل قارچ *Trichoderma* که توانایی تولید آنزیم سلولاز را دارد می‌توان با داشتن اهداف فواید سلولز به دنبال شناسایی گونه‌های صنعتی مفید بود و این شناسایی باید به روش درست و قابل اعتماد انجام شود. روش غربالگری جدایه‌ها به وسیله‌ی غربالگری کیفی یک روش ساده و سریع برای تشخیص جدایه‌ها با فعالیت آنزیم سلولازی می‌باشد. این روش ابزاری برای ردیابی تجزیه‌ی پلی ساکارید توسط قارچ است. رنگ‌های آزمایش شده در این آزمایش از قبیل کنگو قرمز، فنل قرمز رنگ‌های واکنشی می‌گویند برای اینکه ناحیه‌ی که قارچ رشد کرده و از ماده‌ی غذایی استفاده کرده با رنگ محیط کشت متفاوت است و این تفاوت به وضوح مشخص است (Yoon et al. 2007). نتایج این مطالعه نشان داد بهترین رنگ برای ردیابی آنزیم سلولاز در غربالگری کیفی معرف فنل قرمز می‌باشد و همچنین برای تشخیص آنزیم‌های خارج سلولی به روش مایع، روش دی‌نیتروسالیسیلیک‌اسید یک روش بسیار مناسب است. در روش کشت مایع برای اینکه آنزیم سلولاز توسط *Trichoderma* تولید شود باید در محیط فقط منبع کربنی کربوکسی متیل سلولز استفاده کرد. *Trichoderma* برای تجزیه‌ی کربوکسی متیل سلولز، آنزیم‌های اندوگلوکاناز، آگزوگلوکاناز و بتاگلوکوزیداز تولید می‌کند. در این پژوهش جدایه‌های CT-763 و CT-055 بیشترین مقدار فعالیت ویژه آنزیمی را داشتند که به ترتیب مربوط به گونه‌های *T. harzianum* و *T. afroharzianum* می‌باشند. بنابراین بر اساس پژوهش انجام شده می‌توان در راستای کشاورزی پایدار گونه‌های *T. atroviride* و *T. harzianum* را به عنوان گونه‌های برتر به ترتیب برای تولید سیدروفور و سلولاز پیشنهاد کرد و ترکیبات تولید شده توسط این گونه‌ها روی بیمارگرهای قارچی در سطح گلخانه و مزرعه مورد بررسی بیشتری قرار گیرد.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر

سپاسگزاری می‌شود. از داوران محترم به خاطر ارائه نظرهای ساختاری و علمی سپاسگزاری می‌شود.

منابع

- اسدی فرزانه، علایی حسین، صابری ریشه روح الله، زین الدینی ریشه اعظم (۱۳۹۷) بررسی تاثیر سویه های *Trichoderma* جدا شده از خاک های شور و سدیمی در کنترل بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه خیار (*Fusarium solani*). مهار زیستی در گیاه پزشکی ۶ (۲)، ۴۳-۴۵.
- باقری خدیجه، شهبازی سمیرا، عسکری حامد، موجرلو شیده، امیرلو فرنگیس (۱۳۹۶) افزایش فعالیت آنزیم سلولاز در قارچ تریکودرما و بریده با پرتو گاما. علوم زیستی ۴ (۴)، ۳۲۹-۳۳۶.
- براهویی نسیم، علایی حسین، صابری روح الله، صداقتی ابراهیم (۱۴۰۱) ارزیابی اثر آنتاگونیستی گونه های *Trichoderma* روی *Phytophthora citrophthora*. عامل پوسیدگی ریشه و طوقه مرکبات. دانش گیاه پزشکی ایران ۵۳، ۲۹۵-۳۱۱.
- جمالی سکینه، پنجه که ناصر، محمدی امیرحسین (۱۳۹۵) مطالعه اثر بازدارندگی گونه های مختلف *Trichoderma* بر رشد رویشی و تولید زئوسپورهای *Phytophthora drechsleri* و بررسی نقش آنزیم های هیدرولیتیک. مجله بین المللی خشکبار ۲ (۷)، ۱۳۷-۱۴۸.
- خدادادی-پورارپنایی صدیقه، مهربانی کوشکی مهدی، فرخی نژاد رضا (۱۳۹۹) بررسی اثرات ضد قارچی چند سویه *Trichoderma* علیه چهار بیمارگر ریشه و طوقه لوبیا چشم بلبلی. فصلنامه علمی زیست شناسی میکروارگانیسم ها ۱۰ (۳۹)، ۵۱-۶۳.
- زواری فاطمه، صاحبانی نوازلال، اعتباریان حسن رضا (۱۳۹۱) اندازه گیری فعالیت آنزیمی بتا ۱ و ۳ گلوکاناز برون یاخته ای در جدایه های *Trichoderma virens* و انتخاب جدایه های برتر در کنترل بوته میری خیار. دانش کشاورزی و تولید پایدار ۲ (۲۲)، ۴-۱۵۹.
- مرید مائده، مظفری دوست مراد (۱۳۹۲) بررسی تاثیر ریزمغذی ها روی میزان تولید و فعالیت آنزیم کیتیناز گونه هایی از تریکودرما. مجله بیمارهای گیاهی ۴۹ (۳)، ۳۴۱-۳۳۵.

References

- Ahmed E, Holmstrom SJM (2014) Siderophores in environmental research: roles and applications. *Microb Biotechnol* 7, 196-208.
- Alexander DB, Zuberer DA (1991) Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils* 12, 39-45.
- Asadi F, Alaei H, Saberi Riseh R, Zeynadini Riseh A (2019). The effect of beneficial *Trichoderma* species isolated from sodic and saline soils to control *Fusarium* root rot of cucumber (*Fusarium solani*). *J Biocontrol Plant Prot* 6, 43-55 (In Persian).
- Ayyandurai M, Akila R, Manonmani K et al. (2021) Phytostimulation and growth promotion activities of *Trichoderma* spp. on groundnut (*Arachis hypogaea* L.) crop. *J Appl Nat Sci* 13, 1172 - 1179.

- Bagheri K, Shahbazi S, Askari H et al. (2018) Cellulase enzyme production enhancement in *Trichoderma viride* by gamma ray induced mutation. *Nova Biologica Reperta* 4, 329-336 (In Persian).
- Barahoei N, Alaei H, Saberi Riseh R et al. (2023) Evaluation of the antagonistic effect of *Trichoderma* species on *Phytophthora citrophthora*, the causal agent of citrus root and crown rot. *Iran J Plant Prot Sci* 53, 295-311 (In Persian).
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Chen L, Bóka B, Kedves O et al. (2019) Towards the biological control of devastating forest pathogens from the genus *Armillaria*. *Forests* 10, 1013.
- Elad Y, Chet I (1983) Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. *Phytoparasitica* 11, 55-58.
- Frascella A, Sarrocco S, Mello A et al. (2022) Biocontrol of *Phytophthora xcambivora* on *Castanea sativa*: selection of local *Trichoderma* spp. isolates for the management of ink disease. *Forests* 13, 1065.
- Gajora HP, Vakharia DN (2012) Production of lytic enzymes by *Trichoderma* isolates during in vitro antagonism with *Aspergillus niger*, the causal agent of collar rot of peanut. *Braz J Microbiol* 43, 43-52.
- Gams W, Bissett J (1998) Morphology and identification of *Trichoderma*. In: *Trichoderma and Gliocladium. Basic Biology, Taxonomy and Genetics* (Vol. 1). Harman GE, Kubicek CP (eds). Taylor and Francis Ltd. London. pp. 3-34.
- Gao MJ, Yan JJ, Zhao Y (2021) Expression of a thermostable β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* in *Pichia pastoris* and use in oligoglucosides hydrolysis. *Process Biochem* 107, 74-82.
- Gardes M, Bruns TD (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* 2, 113-118.
- Gupta V, Schmoll M, Estrella AH (2014) *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Oxford OX5 1GB, UK, Poland, 235-2.
- Haas H, Eisendle M, Turgeon BG (2008) Siderophores in fungal physiology and virulence. *Annu Rev Phytopathol* 46, 149–187.
- Inbar J, Abramsky M, Cohen D, Chet I (1994) Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. *Eur J Plant Pathol* 100, 337-346.

- Intana W, Wonglom P, Suwannarach N, Sunpapao A (2022) *Trichoderma asperelloides* PSU-P1 induced expression of pathogenesis-related protein genes against gummy stem blight of muskmelon (*Cucumis melo*) in field evaluation. *Fungi* 8, 156.
- Jamali S, Panjehkeh N, Mohammadi AH (2016) Inhibition of *Trichoderma* species from growth and zoospore production of *Phytophthora drechsleri* and their effects on hydrolytic enzymes. *Nuts* 7, 137-148 (In Persian).
- Katatny MH, Somitsch W, Robra KH (2000) Production of chitinase and β -1,3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technol Biotechnol* 38, 173–180.
- Khodadadi-Pourarpanaei S, Mehrabi-Koushki M, Farokhinejad R (2021) A study of the antifungal effects of *Trichoderma* strains on root and crown pathogens of Cowpea. *Biol J Microorganism* 10, 51-63 (In Persian).
- Kim JJ, Kim JH, Lee YD (2014) Effective microwell plate-based screening method for microbes producing cellulase and xylanase and its application. *J Microbiol Biotechnol* 24, 1559-1565.
- Knepper TP (2003) Synthetic chelating agents and compounds exhibiting complexing properties in the aquatic environment. *TrAC Trends Anal Chem* 22, 708-724.
- Macías-Rodríguez L, Contreras- Cornejo HA, Adame-Garnica SG et al. (2020) The interactions of *Trichoderma* at multiple trophic levels: inter-kingdom communication. *Microbiol Res* 240, 126552.
- Mannai S, Boughalleb-M'Hamdi N (2022) In vitro and in planta potential effect of some indigenous antagonists against *Fusarium* and *pythiaceous* species associated with peach seedlings decline. *Egypt J Biol Pest Control* 32, 1-10.
- Milagres AMF, Machuca A, Napoleao D (1999) Detection of siderophore production from several fungi and bacteria by a modification of chrome azurol S (CAS) agar plate assay. *J Microbiol Methods* 37, 1-6.
- Montesinos BS, Dianez F, Moreno-Gavira A et al. (2020) Role of *Trichoderma aggressivum* f. *europaeum* as plant-growth promoter in horticulture. *Agronomy* 10, 1004.
- Morid M, Zafari D (2013) Evaluation of micronutrients effects on production and activity of chitinase enzyme of some *Trichoderma* species. *Iran J Plant Pathol* 49, 335-341 (In Persian).
- Muniroh MS, Nusaibah SA, Vadamalai G, Siddique Y (2019) Proficiency of biocontrol agents as plant growth promoters and hydrolytic enzyme producers in *Ganoderma boninense* infected oil palm seedlings. *Curr Plant Biol* 20, 100116.

- Mustafa G, Anwar S, Joyia FA (2020) Molecular characterization and mycoparasitic aptitude of indigenous biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. J Anim Plant Sci 30, 1508-1515.
- Neethu K, Rubeena M, Sajith S et al. (2012) A novel strain of *Trichoderma viride* shows complete lignocellulolytic activities. Adv Biosci Biotechnol 3, 1160-1166.
- Qi W, Zhao L (2013) Study of the siderophore-producing *Trichoderma asperellum* Q1 on cucumber growth promotion under salt stress. J Basic Microbiol 53, 355-364.
- Schwyn B, Neilands JB (1987) Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem 160, 47-56.
- Sharma V, Salwan R, Sharma PN, Kanwar SS (2017) Elucidation of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against different plant fungal pathogens: Universal yet host specific response. Int J Biol Macromol 95, 72-79.
- Shin SH, Lim Y, Lee SE et al. (2001) CAS agar diffusion assay for the measurement of siderophores in biological fluids. J Microbiol Methods 44, 89-95.
- Sookchaoy K, Panthachode S, Thipchu J (2009) Screening of *Trichoderma* spp. for *Phytophthora* root and foot rot on *Citrus sinensis* biocontrol. International Conference on the Role of Universities in Hands-On Education Chiang-Mai, Thailand. pp. 356-362.
- Srivastava MP, Tiwari R, Sharma N (2013) Effect of different cultural variables on siderophores produced by *Trichoderma* spp. Int J Adv Res 1, 1-6.
- Syam N, Sabahannur S, Nurdin A (2021) Effects of *Trichoderma* and foliar fertilizer on the vegetative growth of black pepper (*Piper nigrum* L.) seedlings. Int J Agron, 1-9.
- Taherzadeh-Ghahfarokhi M, Panahi R, Mokhtarani B (2022) Medium supplementation and thorough optimization to induce carboxymethyl cellulase production by *Trichoderma reesei* under solid state fermentation of nettle biomass. Prep Biochem Biotechnol 52, 375-382.
- Verma V, Joshi K, Mazumdar B (2012) Study of siderophore formation in nodule-forming bacterial species. Res J Chem Sci 2, 26-29.
- Vinale F, Flematti G, Sivasithamparam K et al. (2009) Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. J Nat Prod 72, 2032-2035.
- Vinale F, Nigro M, Sivasithamparam K et al. (2013) Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. EFMS Microbiol 347, 123-129.
- Weller DM (1988) Biological control of soil borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annu Rev Phytopathol 26, 379-407.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a Guide to Methods and

- Applications. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.). Academic Press, New York. pp. 315-322.
- Win TT, Malec P, Khan S, Fu P (2021) Newly isolated strain of *Trichoderma asperellum* from disease suppressive soil is a potential biocontrol agent to suppress *Fusarium* soil borne fungal phytopathogens. *Plant Pathol* 103, 549-561.
- Xiang L, Lin Y, Tian Y (2020) Ammonium ions induce cellulase synthesis in *Trichoderma koningii*. *Curr Microbiol* 78, 3201-3211.
- Yehuda Z, Shenker M, Romheld V, Marschner H et al. (1996) The role of ligand exchange in the uptake of iron from microbial siderophores by gramineous plants. *Plant Physiol* 112, 1273-1280.
- Yoon JH, Park JE, Suh DY (2007) Comparison of dyes for easy detection of extracellular cellulases in fungi. *Mycobiology* 35, 21-24.
- Zavari F, Sahbani N, Etbarian HR (2014) Measurement of extracellular beta 1-3 glucanase enzyme activity in *Trichoderma virens* isolates and selection of superior isolates in the control of cucumber blight. *Agric Sustain* 22, 150-159 (In Persian).
- Zhang YP, Hong J, Ye X (2009) Cellulase assays. In: *Biofuels*. Mielenz JR (ed). Springer: Humana Press. pp. 213-231.
- Zhao L, Wang Y, Kong S (2020) Effects of *Trichoderma asperellum* and its siderophores on endogenous auxin in *Arabidopsis thaliana* under iron-deficiency stress. *Int Microbiol*, 1-9.

