نشریه علمی پژوهشی دانش کشاورزی و تولید پایدار
جلد ۳۱ شماره ۴ / سال ۱۴۰۰ صفحات ۲۷۰-۲۵۵

Effect of Some Probiotics Consortia on Inhibition of Fusarium Yellowing and Wilting disease (*Fusarium redolens* Wollenweber) and Growth Promoting in Chickpeas

Nahid Moarrefzadeh[1]*, Rouhallah Sharifi[1], Hadi Khateri[1] , Saeed Abbasi[2]

Received: January 21, 2021 Accepted: April 15, 2021
1-Assist. Prof., Plant Pathology, Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.
2-Assoc. Prof., Plant Pathology, Dept. of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.
*Corresponding Author Email: Nahid Moarrefzadeh, n.moarrefzadeh@razi.ac.ir

Abstract

Background & Objective: *Fusarium redolens* is one of the most important pathogen in chickpea which causes yellowing and wilting. This study was conducted to investigate the biocontrol effects of individual and combined applications of several probiotics on the pathogen control and evaluate growth promoting effects on plant.

Methods & Materials: Effects of separate and combined treatments of the fungus *Trichoderma asperellum* (Ta), the bacteria *Alcaligenes faecalis* (Af) and *Delftia tsuruhatensis* PIIR (Dt) and the mycorrhizal fungus *Rhizophagus intraradices* (Ri) on disease severity and chickpea growth parameters in the presence of *F. redolens* was evaluated in a completely randomized design with four replications and 17 treatments and at greenhouse conditions.

Results: Applying probiotics individually increased the chickpeas growth and reduced the incidence of symptoms, but combined using of them had variable effects; Some combinations (Af+Dt, Af+Ta, Dt+Ta, Af+Dt+Ta, Dt+Ri and Af+Ri) were compatible, they stimulated the growth and reduced disease severity. Treatments Ta+Ri (except shoot fresh-weight), Dt+Ri+Ta (except root-length and shoot fresh-weight), Af+Dt+Ri+Ta and Af+Dt+Ri had no effect on growth stimulation and just reduced the disease symptoms. Af+Ri+Ta had no effect on growth-promoting or reducing the disease. Treatments of Af and Dt showed the best effect on promoting the growth- and disease-reducing.

Conclusion: The effects of probiotics combinations in promoting plant growth or reducing the disease were not always positive, meanwhile none of combinations had a synergism with these indices in comparition with single application.

Keywords: Biocontrol, Growth Stimulation, Microbial Combinations, Sustainable Agriculture, Synergistic Effect

اثر ترکیب برخی پروبیوتیک‌ها در مهار بیماری زردی و پژمردگی فوزاریومی (ناشی از *Fusarium redolens* Wollenweber) و تحریک رشد نخود

ناهید معرف‌زاده [۱*]، روح‌اله شریفی [۱]، هادی خاطری [۱]، سعید عباسی [۲]

تاریخ دریافت: ۹۹/۱۱/۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱/۲۶

۱- استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۲- دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
نویسنده مسئول: Email: Nahid Moarrefzadeh, n.moarrefzadeh@razi.ac.ir

چکیده

اهداف: قارچ *Fusarium redolens* از عوامل مهم بروز عارضه زردی و پژمردگی فوزاریومی نخود است. هدف از این پژوهش، بررسی اثر کاربرد جداگانه و ترکیبی چند پروبیوتیک در کنترل زیستی این بیمارگر و تحریک رشد نخود بود.

مواد و روش‌ها: اثر تیمارهای جداگانه و ترکیبی قارچ *Trichoderma asperellum* RUT1 (Ta)، باکتری‌های *Alcaligenes faecalis* (Af) و *Delftia tsuruhatensis* PIIR (Dt) و میکوریز *Rhizophagus intraradices* (Ri) بر شدّت علائم بیماری و پارامترهای رشدی نخود با حضور *F. redolens* در گلخانه و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و ۱۷ تیمار ارزیابی شد.

یافته‌ها: کاربرد منفرد کلیه انواع پروبیوتیک‌ها سبب افزایش رشد نخود و کاهش بروز علائم بیماری شد اما ترکیب‌های آن‌ها، اثرات متفاوتی داشت؛ برخی ترکیب‌ها (Af+Dt، Af+Ta، Dt+Ta، Af+Dt+Ta، Dt+Ri و Af+Ri) با هم سازگار بوده و سبب تحریک رشد و کاهش شدّت بیماری شدند. تیمارهای Ta+Ri (به‌جز وزن تر اندام‌هوایی)، Dt+Ri+Ta (به‌استثنای طول ریشه و وزن تر اندام‌هوایی)، Af+Dt+Ri+Ta و Af+Dt+Ri سبب بهبود رشد نشدند و فقط باعث کاهش علائم بیماری گردیدند. تیمار Af+Ri+Ta اثری بر افزایش رشد یا کاهش بیماری نداشت. تیمارهای Af و Dt نیز بهترین تیمارهای محرک رشد و کاهنده بیماری بودند.

نتیجه‌گیری: ترکیب عوامل پروبیوتیک همواره در افزایش رشد گیاه و یا کاهش بروز بیماری مؤثر نبود و هیچ‌کدام از ترکیب‌ها نسبت به کاربرد جداگانه، اثر هم‌افزایی بر این شاخص‌ها نداشتند. توصیه می‌شود با یافتن میکروارگانیسم‌های دارای اثر هم‌افزا در ترکیب با پروبیوتیک‌های این تحقیق، گامی مهم جهت کاهش مصرف ترکیبات شیمیایی و دستیابی به کشاورزی پایدار برداشته شود.

واژه‌های کلیدی: اثر هم‌افزا، کنترل زیستی، تحریک رشد، ترکیب‌های میکروبی، کشاورزی پایدار

مقدمه

حبوبات یکی از منابع مهم پروتئینی برای جمعیت رو به رشد بشر هستند. در میان حبوبات کشت‌شده در سراسر جهان، نخود (*Cicer arietinum* L.) به دلیل اهمیت غذایی و نقشی که در مدیریت حاصلخیزی خاک به‌ویژه در مناطق خشک دارد، دارای ارزش بالایی است (جیمِنز-فرناندز و همکاران ۲۰۱۱؛ رحمان و همکاران ۲۰۱۳). بیماری‌های خاکزاد مختلفی نخود را آلوده می‌کنند که از مهم‌ترین آن‌ها عوامل زردی و پژمردگی فوزاریومی هستند (رحمان و همکاران ۲۰۱۳). این عوامل باعث کاهش عملکرد و کیفیت محصول شده و در شرایط مطلوب برای اپیدمی شدن، قادرند کل محصول را از بین ببرند (کالا و همکاران ۲۰۱۵). قارچ *Fusarium redolens* از عوامل ایجادکننده این بیماری است (اسماعیلی طاهری و همکاران ۲۰۱۱) که بیماری‌زایی آن روی نخود در سال‌های اخیر از ایران (زربانوی ۲۰۱۵) و کشورهای دیگر از جمله لبنان، مراکش، پاکستان و اسپانیا (جیمِنز-فرناندز و همکاران ۲۰۱۱) گزارش شده است. این بیمارگر سبب ایجاد نکروز در ریشه و طوقه و بروز زردی در بخش‌های هوایی نخود می‌شود که به سمت بخش‌های فوقانی گیاه توسعه می‌یابد (جیمِنز-فرناندز و همکاران ۲۰۱۱).

در کشاورزی پایدار، مدیریت تلفیقی آفات (IPM[۱]) راهبردی اساسی برای حفاظت از گیاه در مقابل انواع بیماری‌های گیاهی است. در مورد پژمردگی‌های فوزاریومی، IPM مبتنی بر اصلاح روش‌های کشت، استفاده از ارقام مقاوم، استفاده حداقلی از مواد شیمیایی برای ممانعت از آلودگی و کنترل بیولوژیک با استفاده از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌باشد (رحمان و همکاران ۲۰۱۳). از مهم‌ترین پروبیوتیک‌هایی که با ریشه گیاهان در تعامل‌اند ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPR[۲]) هستند که علاوه بر کلنیزه نمودن ریشه گیاهان، موادی تولید می‌کنند که در افزایش رشد گیاه و حفاظت از آن در برابر بیماری‌های مختلف نقش دارند (سینگ و سینگ ۲۰۱۳). جنس‌های باکتریایی *Alcaligenes* و *Delftia* به دلیل تولید متابولیت‌های مختلف و بروز مکانیسم‌های متعدد به‌عنوان PGPR و کنترل‌کننده‌های کارآمد بیماری‌های گیاهی مختلف گزارش شده‌اند (ناندینی و همکاران ۲۰۱٤؛ مورل و همکاران ۲۰۱۵؛ پراساناکومار و همکاران ۲۰۱۵؛ بن‌عبداله و همکاران ۲۰۱٦). در میان قارچ‌های محرک رشد گیاه (PGPF[۳])، اعضای جنس *Trichoderma* علاوه بر بهبود رشد گیاه، به دلیل دخالت در مکانیسم‌های کنترل زیستی مختلف نظیر رقابت، آنتی‌بیوزیس، مایکوپارازیتیسم و القای مقاومت در میزبان، از کارآمدترین آنتاگونیست‌های موفق برای مهار بیمارگرهای قارچی خاکزاد مختلف (کاستیلو و همکاران ۲۰۱۹) از جمله پژمردگی فوزاریومی نخود (*F. oxysporum* f.sp. *ciceris*) (دوبِی و همکاران ۲۰۰۷) هستند. میکوریزهای دارسانه‌ای (AMF[٤]) نیز گروه مهمی از ارگانیسم‌های مفید ریزوسفر می‌باشند که با ریشه اکثر گیاهان همزیستی متقابل ایجاد نموده و با افزایش جذب آب و مواد غذایی و افزایش مقاومت گیاه به خشکی و عوامل بیماری‌زا (حاج‌احمد و همکاران ۲۰۱۹) در تغذیه و سلامت آن نقش دارند (آگنولوچی و همکاران ۲۰۱۵). قارچ میکوریزی *Rhizophagus intraradices* (با نام قبلی *Glomus intraradices*) از همزیست‌های شناخته شده است که اثر آن در افزایش رشد گیاهان و کاهش شدّت بیماری‌های خاکزاد مختلف از جمله پوسیدگی فوزاریومی ریشه نخود (*Fusarium solani* f.sp. *pisi*) به اثبات رسیده است (سهرابی و همکاران ۲۰۱۵).

یکی از محدودیت‌های کاربرد عوامل کنترل زیستی، عملکرد ناپایدار و کارایی نامناسب آن‌ها در شرایط محیطی مختلف است که سبب می‌شود در رقابت

---

۱ Integrated pest management

۲ Plant growth promoting rhizobacteria

۳ Plant growth promoting fungi

٤ Arbuscular mycorrhizal fungi

با میکروفلور بومی و یافتن جایگاه مناسب برای بقا طی دوره‌های طولانی و فعال نمودن مکانیزم‌های مربوطه با مشکلات زیادی مواجه شوند (شِزِک ۲۰۰۸). همچنین احتمال دارد به دلیل تنوع ژنتیکی در جمعیت بیمارگر، یک سویه تأثیر یکسانی روی همه پاتوتیپ‌های موجود در جمعیت بیمارگر نداشته باشد (آلابووت و همکاران ۲۰۰۱). از راهبردهای غلبه بر این مشکل، استفاده از ترکیب دو یا چند عامل زیستی مختلف می‌باشد که ممکن است بتوانند با فراهم کردن چند مکانیسم مختلف مهار بیماری، داشتن الگوهای مختلف برای کلنیزاسیون گیاه، دارا بودن چند ویژگی جهت تحریک رشد، دسترسی بهتر گیاه به عناصر مورد نیاز، داشتن جامعه ریزوسفری باثبات‌تر و اثربخشی در طیف وسیع‌تری از شرایط محیطی، سلامت و عملکرد محصول و پایداری و کارایی کنترل زیستی بیماری را بهبود بخشند (آلابووت و همکاران ۲۰۰۱؛ سریواستاوا و همکاران ۲۰۱۰؛ پالمیری و همکاران ۲۰۱۶؛ آتوا ۲۰۱۸).

در مورد تعاملات هم‌افزا میان ترکیب عوامل زیستی و تأثیر مثبت آن‌ها در بهبود رشد گیاه یا حفاظت علیه بیماری‌های گیاهی خاکزاد، مستندات متعددی موجود است. در یک پژوهش، تلقیح ترکیبی *Bacillus megaterium*، *Rhizobium* و *Trichoderma* spp. جذب مواد غذایی، جوانه‌زنی، زیست‌توده کل و عملکرد نخود را در مقایسه با تلقیح منفرد این سویه‌ها یا شاهد تلقیح نشده افزایش داد (رودرِش و همکاران ۲۰۰۵). در آزمایش دیگری تیمار بذرهای خیار با ترکیب سه سویه PGPR مختلف شامل *Bacillus subtilis*، *B. pumilus* و *Curtobacterium flaccumfaciens* نسبت به کاربرد جداگانه آن‌ها، حفاظت بیشتر و کنترل پایدارتری در برابر چند بیمارگر خیار (*Colletotrichum orbiculare*، *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* و *Erwinia tracheiphila*) ایجاد کرد (راوپاچ و کلوپر ۱۹۹۸). ترکیب *R. intraradices* با *B. subtilis* یا *Trichoderma harzianum*، به ترتیب پوسیدگی پیتیومی و فوزاریومی ساقه و ریشه کرفس (نِمِک و همکاران ۱۹۹۶) و پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی بوته‌های گوجه‌فرنگی (داتنوف و همکاران، ۱۹۹۵) را مؤثرتر از کاربرد جداگانه این سویه‌ها کنترل نمود. تحت شرایط گلخانه نیز ترکیب *B. subtilis* + AMF یا *P. fluorescence* + AMF نسبت به کاربرد منفرد این عوامل در افزایش شاخص‌های رشدی و عملکرد و مهار بیماری پوسیدگی ساقه لوبیا (*Sclerotium rolfsii*) کارآمدتر بود (محمد و همکاران ۲۰۱۹). در آزمایشی مزرعه‌ای بین ترکیب‌های مختلف *Trichoderma*، AMF و *P. fluorescens*، تیمار ترکیبی سه‌گانه این عوامل، بیشترین افزایش عملکرد و القای آنزیم‌های دفاعی در فلفل را نشان داد (دوک و همکاران ۲۰۱۷). البته گزارش‌هایی نیز در مورد عدم تأثیر ترکیب عوامل زیستی بر مهار بیماری یا افزایش رشد گیاه موجود است (تچامنی و همکاران ۲۰۱۱). در برخی موارد نیز ترکیب عوامل زیستی مختلف، اثر ضعیف‌تری نسبت به تیمارهای منفرد نشان داده‌اند (لارکین و فراول ۱۹۹۸؛ کاستیلو و همکاران ۲۰۱۹). بنابراین قبل از کاربرد ترکیب عوامل باکتریایی و قارچی ، باید از سازگاری آن‌ها با یکدیگر و عدم تأثیر آنتاگونیستی‌شان علیه هم اطمینان حاصل نمود (مارتینز-مدینا و همکاران ۲۰۰۹).

پژوهش‌های پیشین نویسندگان نشان داده‌اند که دو سویه باکتریایی *Alcaligenes faecalis* و *Delftia tsuruhatensis* توانایی خوبی در کنترل زیستی زردی و پژمردگی فوزاریومی ناشی از *F. redolens* داشته و سبب تحریک رشد نخود در حضور این بیمارگر می‌گردند (اطلاعات منتشر نشده). قابلیت کنترل زیستی برخی عوامل بیماریزای فوزاریومی نخود توسط *R. intraradices* و برخی گونه‌های تریکودرما نیز قبلاً به اثبات رسیده است (سینگ و همکاران ۲۰۱۳؛ سهرابی و همکاران ۲۰۱۵). در سال‌های اخیر *F. redolens* در مناطق غربی کشور به عنوان غالب‌ترین گونه عامل پژمردگی فوزاریومی نخود شناسایی شده است (زربانوی ۲۰۱۵). بر اساس نکات مذکور و اهمیت این بیمارگر در کاهش کیفیت و کمیت محصول نخود، و با توجه به اینکه تاکنون تحقیقی در زمینه استفاده ترکیبی

از عوامل پروبیوتیک برای کنترل این بیمارگر در نخود ثبت نشده است، این پژوهش با چند هدف مشخص انجام شد که عبارتند از مقایسه قابلیت کنترل زیستی کاربرد جداگانه و ترکیبی قارچ *Trichoderma asperellum* RUT1، باکتری‌های *A. faecalis* 1624 و *D. tsuruhatensis* PIIR و میکوریز *R. intraradices* علیه *F. redolens*، ارزیابی توانایی این عوامل به‌صورت جدا و ترکیب با هم در تحریک رشد نخود در حضور بیمارگر مذکور، بررسی سازگاری ترکیب‌های مختلف این عوامل و تأثیر هم‌افزایی آن‌ها در مهار زیستی بیمارگر و تحریک رشد نخود انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه بیمارگر *Fusarium redolens* و سویه‌های کنترل بیولوژیک

سویه‌ای از قارچ تریکودرما با نام *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckf. & Nirenberg 1999 RUT1 (با نام اختصاری Ta) و سویه باکتریایی *Delftia tsuruhatensis* Shigematsu *et al.*, 2003 PIIR (Dt) از مجموعه آنتاگونیست‌های بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی و سویه باکتریایی *Alcaligenes faecalis* (Castellani and Chalmers 1919) Austin *et al.* 1981 (Af) از مرکز میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه شدند. قارچ میکوریز *Rhizophagus intraradices* (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler 2010 (Ri) نیز به صورت فرمولاسیون تجاری از شرکت زیست فناور توران (شاهرود) دریافت گردید. جدایه‌ای از قارچ بیماری‌زای *Fusarium redolans* (Fr) که شناسایی آن پیش‌تر بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی و مولکولی انجام شده و بیماری‌زایی آن روی نخود به اثبات رسیده بود، از کلکسیون قارچ‌های بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی تهیه شد.

آماده‌سازی مایه تلقیح بیمارگر و آنتاگونیست‌های باکتریایی و قارچی

برای تهیه مایه تلقیح باکتری‌های آنتاگونیست، یک لوپ از کشت ۲٤ ساعته باکتری‌های رشد یافته روی محیط آگار غذایی (NA[1])، به فلاسک‌های حاوی محیط مایع NB[2] انتقال یافت. فلاسک‌های حاوی کشت باکتری روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از ٤۸ ساعت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ٦۰۰ نانومتر، تنظیم غلظت باکتریایی صورت گرفت. مایه تلقیح قارچ بیماریزای *F. redolens* و قارچ آنتاگونیست *T. asperelleum* نیز با افزودن ۱۰ قرص آگار یک سانتی‌متری از کشت جوان این قارچ‌ها روی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار، به فلاسک‌های حاوی ترکیب دو بار سترون محتوی ورمیکولیت، سبوس گندم و عصاره سیب‌زمینی دکستروز (به نسبت ۲:۱:۲) تهیه شد. فلاسک‌ها پس از مایه‌زنی، به مدت ۱٤ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

ارزیابی اثر جداگانه و ترکیبی عوامل پروبیوتیک در مهار بیماری ناشی از *Fusarium redolens* و شاخص‌های رشدی نخود در شرایط گلخانه

به منظور مقایسه قابلیت کنترل زیستی کاربرد جداگانه و ترکیبی عوامل باکتریایی و قارچی در بازدارندگی از *F. redolens* و تأثیر آن‌ها بر شاخص‌های رشدی نخود و امکان تأثیر هم‌افزایی ترکیب آن‌ها، آزمایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و ۱۷ تیمار در گلخانه با کشت گیاهان در گلدان اجرا شد. نام تیمارها در جدول ۱ قید گردیده است. ضدعفونی سطحی بذور نخود رقم سارالبا استفاده از اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم نیم درصد انجام شده و پس از چند بار شستشو با آب مقطر، به مدت دو روز در ظروف پتری استریل شده حاوی لایه نازکی از آب مقطر قرار گرفتند. بستر رشد پایه گیاه شامل ترکیبی از پرلیت و پیت‌ماس ضدعفونی‌شده (با نسبت ۲ به ۱)، به گلدان‌های پلاستیکی با قطر دهانه ۱۲ سانتی‌متر و حجم

[1] Nutrient agar

[2] Nutrient broth

یک لیتر اضافه شد. مایه تلقیح جدایه‌های کنترل زیستی در زمان کاشت بذور به نسبت‌های ذکر شده به بستر کشت افزوده شدند؛ به ازای هر گلدان، مایه تلقیح میکوریز به میزان ۵۰ گرم (هر گرم خاک حاوی میکوریز دارای ۱۰۰ عدد اسپور قارچ) و *T. asperelleum* به نسبت ۱ به ۱۵ (حجمی) با بستر کشت مخلوط شد. در هر گلدان چهار عدد بذر نخود کاشته شد و پس از اطمینان از سبز شدن، یک گیاهچه حذف گردید. در تیمارهای دارای باکتری، بذرها قبل از کشت به مدت یک ساعت در سوسپانسیون حاوی 10^8 سلول باکتری در میلی‌لیتر غوطه‌ور شدند و پس از کشت بذور، سوسپانسیون باکتری‌ها نیز به‌صورت تیمار اولین آبیاری به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر به هر گلدان افزوده شد. در تیمار شاهد از بستر کشت پایه بدون عوامل کنترل زیستی استفاده شد. دو هفته پس از کشت بذرها، مایه‌زنی بیمارگر با قرار دادن مایه تلقیح در حفره مرکزی گلدان به میزان یک پانزدهم حجم خاک گلدان و به روش جاسم و همکاران (۲۰۱۸) انجام شد. گلدان‌های تیمارهای مختلف در گلخانه به صورت تصادفی قرار گرفتند و تا زمان ظهور نشانه‌های بیماری، با شرایط دمایی ۵±۲۵ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور نگهداری شدند و یک روز در میان با جریان بسیار ملایم آب حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام کود کامل (NPK+TE, 20-20-20[1]) آبیاری گردیدند.

تقریباً ۱۰ هفته پس از مایه‌زنی بیمارگر، بوته‌های نخود از گلدان بیرون آورده شده و ریشه‌ها با جریان ملایم آب کاملاً شسته شدند. سپس فاکتورهای رشدی نخود شامل طول، حجم، وزن تر و وزن خشک ریشه و نیز وزن تر و وزن خشک اندام‌هوایی در آن‌ها اندازه‌گیری شد. به منظور ارزش‌گذاری شدّت بیماری، دو شاخص زردی بوته و نکروز ریشه به‌صورت جداگانه و به ترتیب مطابق روش هوانگ و همکاران (۱۹۹٤) و اسماعیلی طاهری و همکاران (۲۰۱۱) با کمی تغییر و به‌صورت زیر محاسبه گردیدند: ۰: فاقد زردی در قسمت‌های هوایی یا نکروز ریشه، ۱: تا ۲۵ درصد زردی در قسمت‌های هوایی یا نکروز ۲۵ درصد ریشه، ۲: بین ۲۵ تا ۵۰ درصد زردی قسمت‌های هوایی یا نکروز ۲۵ تا ۵۰ درصد ریشه، ۳: بین ۵۰ تا ۷۵ درصد زردی قسمت‌های هوایی یا نکروز ۵۰ تا ۷۵ درصد ریشه، ٤: بین ۷۵ تا ۱۰۰ درصد زردی قسمت‌های هوایی یا نکروز ۷۵ تا ۱۰۰ درصد ریشه. اطلاعات حاصل از آزمایش توسط نرم‌افزار SAS (نسخه 9.3) و در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه‌وتحلیل شدند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چنددامنه‌ای دانکن استفاده گردید و در کلیه محاسبات این تحقیق، سطح احتمال آماری پنج درصد در نظر گرفته شد.

ارزیابی درصد کلنیزه‌شدن ریشه توسط *R. intraradices* در حضور و در فقدان بیمارگر

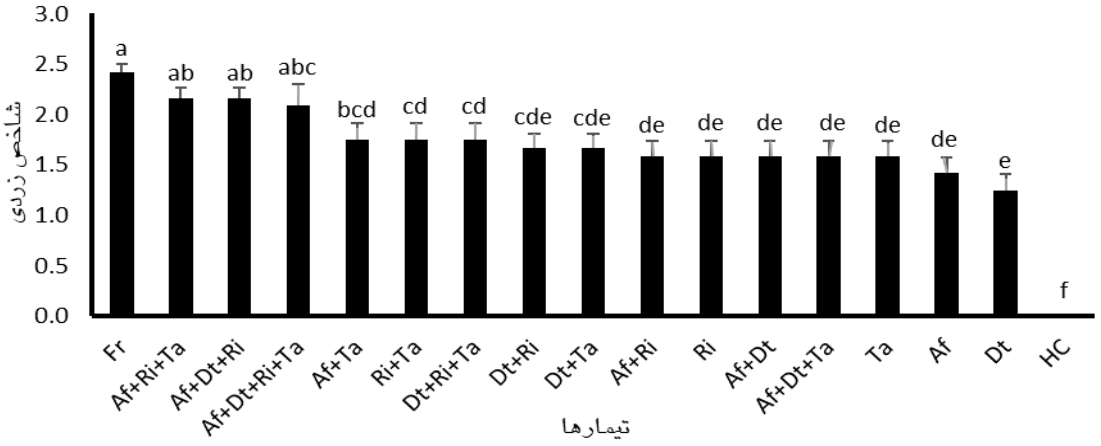
برای تعیین میزان قابلیت کلنیزه‌شدن ریشه‌های نخود توسط میکوریز *R. intraradices* و اثر بیمارگر بر میزان میکوریزی شدن در ریشه، بذرهای نخود در دو سری گلدان چهارتایی حاوی بستر کشت پایه به همراه میکوریز کشت شدند و پس از دو هفته، به یک سری از گلدان‌ها بیمارگر افزوده شد. ۱۲ هفته پس از کاشت، ارزیابی میزان کلنیزاسیون ریشه‌ها توسط میکوریز به روش فیلیپس و هیمن (۱۹۷۰) با اندکی تغییر صورت گرفت. از ریشه‌های جوان هر گلدان یک گرم جدا شد و پس از شستشوی کامل با آب مقطر، به‌صورت قطعات یک سانتیمتری خرد گردیده و به لوله‌های حاوی هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد منتقل شد. ریشه‌ها جهت رنگ‌بری، یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند و پس از چند مرتبه شستشوی کامل با آب، ۵ دقیقه در محلول اسیدکلریدریک یک درصد قرار داده شدند. سپس بدون آنکه شست‌وشو داده شوند، به مدت یک ساعت در محلول لاکتوگلیسرول اسید فوشین ۰۱ / ۰ درصد و یک ساعت نیز در حمام آب گرم ۹۰ درجه سلسیوس قرار گرفته و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه در محلول لاکتوگلیسرول نگهداری گردیدند. ۱۰۰ قطعه از ریشه‌های رنگ‌آمیزی شده مربوط به هر تیمار (تیمار

[1] Nitrogen, Phosphorous, Potassium

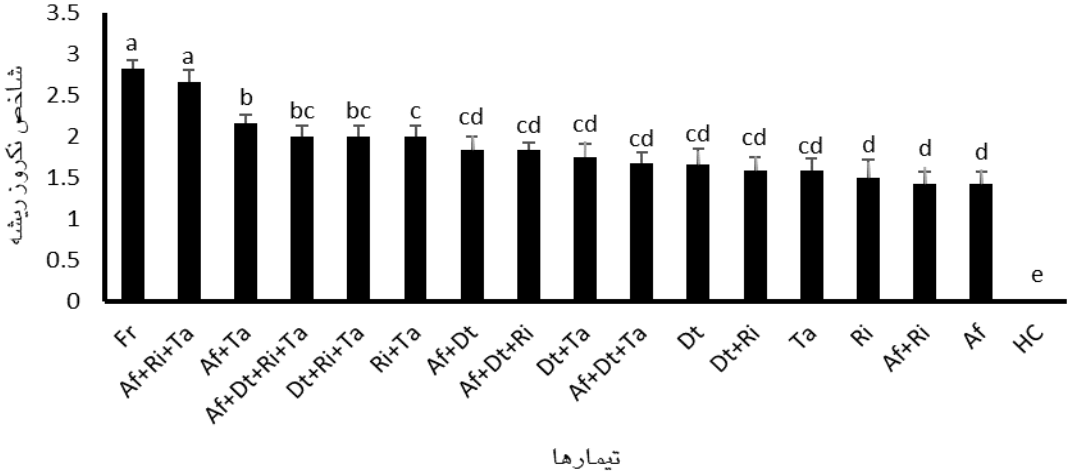
میکوریز تنها و تیمار میکوریز+بیمارگر) با میکروسکوپ نوری و بزرگنمایی ۱۰۰ و ٤۰ از نظر وجود اندام‌های مربوط به *R. intraradices* بررسی گردیدند. پس از شمارش ریشه‌های آلوده و غیر آلوده به میکوریز، درصد کلنیزاسیون ریشه مطابق روش سهرابی و همکاران (۲۰۱۵) تعیین شد.

نتایج

کلیه تیمارهای این آزمایش به‌استثنای تیمار Af+Ri+Ta، در سطح احتمال پنج درصد سبب کاهش معنی‌دار علائم نکروز ریشه ناشی از *F. redolens* شدند (شکل ۱– A). تیمارهای Af و Af+Ri با وجود این که با برخی تیمارهای دیگر در یک سطح آماری قرار گرفتند، اما با ۵۰ درصد کاهش شدّت نکروز ریشه نسبت به شاهد آلوده، بهترین اثر را در کاهش علائم نکروز داشتند. همچنین کلیه تیمارها به‌جز Af+Ri+Ta و Af+Dt+Ri و Af+Dt+Ri+Ta، علائم زردی اندام‌های هوایی را کاهش دادند. تیمارهای Dt و Af نیز به ترتیب با کاهش علائم زردی به میزان ٤۸ و ٤۱ درصد نسبت به شاهد آلوده، بهتر از سایر تیمارها بودند، هرچند که تفاوتشان با برخی تیمارهای دیگر معنی‌دار نبود (شکل ۱–B).



(A)



(B)

شکل ۱ – اثر جداگانه و ترکیبی سویه‌های باکتریایی و قارچی بر شدّت زردی (A) و نکروز ریشه (B) ناشی از قارچ *F. redolens* در گلخانه

Fr =*Fusarium redolens* infected control, Af = *Alcaligenes faecalis* 1624, Dt = *Delftia tsuruhatensis* PIIR, Ri= *Rhizophagus intraradices*, Ta = *Trichoderma asperelleum* RUT1 and HC = healthy control.

جدول ۱ - اثر سویه‌های باکتریایی و قارچی بر پارامترهای رشدی نخود در حضور بیمارگر *Fusarium redolens* در گلخانه

تیمار	طول ریشه (cm)	حجم ریشه (ml)	وزن تر ریشه (g)	وزن خشک ریشه (g)	وزن تر اندام‌هوایی (g)	وزن خشک اندام‌هوایی (g)
Fr	16/35 d	9/94 h	15/84 ghi	0/8 fg	23/94 f	5/05 e
HC	18/58 abcd	20/45 b	28/85 a	1/87 b	35/63 d	6/83 cd
Af	18/93 abc	22/52 a	27/34 ab	2/28 a	39/68 cd	7/49 ab
Dt	18/65 abc	23/06 a	25/78 abc	2 b	43/35 ab	7/77 a
Ri	18/75 abc	14/87 de	18/38 efg	1/24 de	37/35 cd	6/94 bcd
Ta	19/73 ab	18/16 c	21/7 cdef	1/44 cd	41/79 abc	7/44 abc
Af+Dt	19/65 ab	16/23 cd	23/45 bcd	2 b	39/92 abcd	7/42 abc
Af+Ri	19/15 abc	12/98 ef	21/01 def	1/47 c	35/88 d	6/56 d
Af+Ta	20/08 a	10/17 gh	17/27 fgh	1/19 e	41/76 abc	7/3 abc
Dt+Ri	18/4 abcd	12/03 fg	17/39 fgh	1/18 e	30/79 e	5/43 e
Dt+Ta	19/58 ab	13/47 ef	19/81 defg	1/32 cde	38/72 cd	6/93 bcd
Ri+Ta	17/58 bcd	9/39 h	12/48 ij	0/83 f	29/58 e	5/47 e
Af+Dt+Ri	18/5 abcd	6/23 i	12/09 ij	0/6 g	26/97 ef	4/89 e
Af+Dt+Ta	19/6 ab	17/53 c	22/75 cde	1/22 e	44/66 a	7/33 abc
Af+Ri+Ta	16/85 cd	5/63 i	11/19 j	0/63 fg	26/03 ef	5/12 e
Dt+Ri+Ta	19/9 ab	6/4 i	9/96 j	0/65 fg	30/55 e	5/17 e
Af+Dt+Ri+Ta	17/75 abcd	9/1 h	13/94 hij	0/7 fg	27/24 ef	4/86 e

اعداد درج‌شده در جدول، میانگین چهار تکرار هستند. حروف غیرمشترک قرار گرفته در کنار اعداد هر ستون، نمایانگر تفاوت آماری معنی‌دار تیمارها بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد می‌باشند.

Fr =*Fusarium redolens* is the infected control, Af = *Alcaligenes faecalis*, Dt = *Delftia tsuruhatensis*, Ri= *Rhizophagus intraradices*, Ta = *Trichoderma asperelleum* and HC = healthy control.

بررسی فاکتورهای رشدی نخود در حضور بیمارگر نشان داد به‌جز پنج تیمار (Af+Ri+Ta، Ri+Ta، Af+Dt+Ri، Dt+Ri و Af+Dt+Ri+Ta)، سایر تیمارها نسبت به شاهد آلوده سبب افزایش طول ریشه شدند. در صفت حجم ریشه نیز، تیمارهای Af+Ta، Ri+Ta و Af+Dt+Ri+Ta با شاهد آلوده در یک سطح آماری قرار گرفتند و تیمارهای Af+Ri+Ta، Af+Dt+Ri و Dt+Ri+Ta از شاهد آلوده نیز ضعیف‌تر عمل کردند. سایر تیمارها (۹ تیمار) سبب افزایش حجم ریشه شدند. از این میان، تیمارهای Af و Dt به ترتیب با افزایش حجم ریشه به میزان ٥٦ و ٥٥ درصد نسبت به شاهد آلوده و ۱۱ و ۹ درصد نسبت به شاهد سالم بهترین اثر را داشتند. علاوه براین Af، Dt، Ta و ترکیب Af+Dt، Af+Ri و Af+Dt+Ta نسبت به شاهد آلوده، سبب افزایش وزن تر ریشه شدند که Af و Dt با افزایش این فاکتور به ترتیب به میزان ٤٢ و ۳۸ درصد نسبت به شاهد آلوده، بهترین تیمارها بوده و با شاهد سالم نیز در یک گروه آماری قرار گرفتند. اثر سایر تیمارها بر این فاکتور، خنثی (Af+Dt+Ri+Ta، Af+Ta، Dt+Ri، Dt+Ta و Ri) یا منفی (Dt+Ri+Ta، Af+Ri+Ta، Af+Dt+Ri و Ri+Ta) بود.

همچنین کلیه تیمارها به استثنای Af+Ri+Ta، Af+Dt+Ri و Af+Dt+Ri+Ta، نسبت به شاهد آلوده سبب افزایش وزن تر اندام‌هوایی شدند که برخی از آن‌ها (Af+Dt+Ta، Af+ Ta، Ta وDt) نسبت به شاهد سالم نیز حداقل ١٤ درصد این پارامتر را ارتقا دادند.

در کلیه تیمارهای این پژوهش به‌جز تیمارهای Af+Dt+Ri، Dt+Ri+Ta، Af+Ri+Ta و Af+Dt+Ri+Ta افزایش وزن خشک ریشه نسبت به شاهد آلوده مشاهده گردید. تیمارهای Af، Dt و ترکیب این دو (Af+Dt) با افزایش به ترتیب ٦٥، ٦٠ و ٦٠ درصدی این شاخص نسبت به شاهد آلوده، بهترین تیمارها بودند و با شاهد سالم نیز در یک گروه آماری واقع شدند. وزن خشک اندام‌هوایی در کلیه تیمارها به‌جز Af+Dt+Ri، Dt+Ri+Ta، Af+Ri+Ta، Af+Dt+Ri+Ta، Ri+Ta و Dt+Ri افزایش یافت و Af و Dt با افزایش این پارامتر به میزان ٣٥ و ٣١ درصد نسبت به شاهد آلوده و ١٦ و ٨/٦٨ درصد نسبت به شاهد سالم، بهتر از دیگر تیمارها بودند.

ارزیابی کلنیزاسیون ریشه توسط *R. intraradices*

بررسی‌های میکروسکوپی مشخص نمود در تیمار میکوریز ٧٤ درصد و در تیمار میکوریز و بیمارگر ٤٥ درصد از قطعات ریشه نخود توسط *R. intraradices* کلنیزه شده‌اند. بنابراین *F. redolens* کلنیزاسیون ریشه توسط *R. intraradices* را ٣٩/١٨ درصد کاهش داد.

بحث

در این پژوهش، اثر کاربرد جداگانه و ترکیبی چند سویه مختلف باکتریایی و قارچی در مهار بیماری زردی و پژمردگی فوزاریومی نخود (*F. redolens*) و پارامترهای رشدی آن در گلخانه و در حضور این بیمارگر بررسی شد. در این تحقیق، کاربرد هر چهار عامل پروبیوتیک به صورت جداگانه سبب کاهش بروز علائم بیماری و افزایش رشد گیاه گردید. به‌ویژه Af و Dt که در میان کلیه تیمارها، بهترین اثرها را در افزایش رشد و کاهش بیماری داشتند. این دو سویه باکتریایی اثر کنترل زیستی قابل‌توجهی نیز علیه پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی (*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*) و افزایش شاخص‌های رشدی گوجه‌فرنگی در حضور این بیمارگر نشان داده‌اند و قابلیت تولید اکسین و علاوه بر آن توانایی حل نمودن فسفات‌های معدنی و تولید سیدروفور را داشته‌اند (سیفی ٢٠١٩). تولید ترکیبات اکسینی توسط برخی PGPR می‌تواند منجر به تغییر ساختار ریشه، افزایش مقدار زیست‌توده و تولید ریشه‌های جانبی در گیاهان و متعاقباً بهبود جذب مواد غذایی و افزایش کلی رشد آن‌ها شود (سینگ و سینگ ٢٠١٣؛ افضل و همکاران ٢٠١٩). در پژوهش حاضر نیز این دو سویه قادر بودند در حضور بیمارگر، حجم ریشه را به صورت معنی‌داری افزایش دهند. فسفر نیز یکی از عناصر ضروری مورد نیاز گیاهان جهت رشد و انجام فرآیندهای بیولوژیکی مختلف می‌باشد که معمولاً با اجزای خاک به‌صورت ترکیبات کم محلول تا نامحلول در می‌آید و دسترسی گیاه به آن دشوار است (سینگ و دوبِی ٢٠١٨). البته افزایش در دسترس بودن فسفر توسط باکتری‌های خاک می‌تواند روی کلنیزاسیون ریشه توسط میکوریزها اثر منفی داشته باشد (لاگوس و همکاران، ٢٠١٨). در این پژوهش، ترکیب دو سویه باکتریایی با یکدیگر (Af+Dt) نیز سازگاری داشت و از بهترین تیمارهای افزاینده شاخص‌های رشدی نخود بود که سبب کاهش علائم بیماری نیز گردید. اما نسبت به کاربرد جداگانه این باکتری‌ها اثر هم‌افزایی بر شاخص‌های ارزیابی‌شده نداشت. برخی مطالعات قبلی نیز نشان داده‌اند که ترکیب سویه‌های PGPR نسبت به کاربرد جداگانه آن‌ها، نه‌تنها مزیتی جهت افزایش رشد و عملکرد گیاه (چیارینی و همکاران ١٩٩٨؛ شاهین و همکاران ٢٠٠٤) یا بهبود اثر کنترل زیستی (لاتا و همکاران ٢٠٠٩) نداشته، بلکه در برخی موارد نسبت به مایه‌زنی جداگانه آن‌ها سبب عملکرد کمتر گیاه شده است. این موضوع

ممکن است به دلیل رقابت این عوامل بر سر منابع انرژی در خاک یا تعاملات بین‌گونه‌ای میان آن‌ها باشد (چیارینی و همکاران ۱۹۹۸؛ اِلکوکا و همکاران ۲۰۱۰). در مقابل، در برخی مطالعات، تلقیح چندگانه باکتری‌ها در مقایسه با کاربرد جداگانه آن‌ها سبب کنترل کارآمدتر (پالمیری و همکاران ۲۰۱٦) و رشد یا عملکرد بهتر گیاه (ناندینی و همکاران ۲۰۱٤) شده است.

در این تحقیق، سویه *T. asperellum* به‌صورت منفرد، ترکیب با هر یک از دو سویه باکتریایی (Af+Ta و Dt+Ta) و یا ترکیب هم‌زمان با هر دو باکتری (Af+Dt+Ta) نقش مؤثری در کاهش بیماری و بهبود صفات رشدی نخود داشت. یاداو و همکاران (۲۰۱۳) نیز به اثر مثبت بیوپرایمینگ بذور نخود و لوبیا به‌صورت جدا و ترکیبی توسط *T. asperellum*، *P. fluorescens* و *Rhizobium* sp. بر رشد گیاه پی بردند اما برخلاف نتایج تحقیق حاضر، ترکیب عوامل مذکور نسبت به کاربرد تنهای آن‌ها اثر هم‌افزایی در بهبود رشد داشت. راجسواری و کاپور (۲۰۱۷) علت بهبود کنترل زیستی پژمردگی فوزاریومی بادام‌زمینی را در ترکیب *T. viride* و *P. fluorescens* نسبت به کاربرد جداگانه آن‌ها، وجود مکانیسم‌های متنوع کنترل زیستی و برهم‌کنش‌های خاص عوامل کنترل زیستی در ترکیب ذکر نمودند.

نتایج تحقیق حاضر با گزارش‌های مبنی بر اثر *R. intraradices* در کاهش بیماری‌های خاکزاد نخود نظیر پوسیدگی ریشه ناشی از *F. solani* f.sp. *pisi* (سهرابی و همکاران ۲۰۱۵) و *Macrophomina phaseolina* و کارایی این میکوریز در افزایش رشد گیاه (اختر و صدیقی ۲۰۰۷) سازگار هستند. افزایش جریان مواد غذایی در گیاهان میکوریزدار علاوه بر اینکه سبب بهبود رشد گیاه می‌شود، بلکه همراه با ایجاد تغییرات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سبب افزایش مقاومت مکانیکی گیاه و کاهش آسیب‌پذیری آن در برابر حمله بیمارگر می‌گردد. همچنین گزارش شده است که رقابت با بیمارگرهای خاکزاد بر سر کلنیزاسیون مواد غذایی و ریشه‌های میزبان، تولید ترکیبات ضدمیکروبی، فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاع گیاه همراه با ایجاد تغییرات ریخت‌شناختی در ریشه مانند ضخیم شدن دیواره‌های سلولی از طریق لیگنینی شدن و تولید پلی‌ساکاریدهای دیگر جهت جلوگیری از نفوذ و رشد عوامل بیماری‌زا و کاهش تراوش‌های ریشه که به کمتر شدن کشش شیمیایی بیمارگر به سمت ریشه یا کاهش جوانه‌زنی زادمایه‌های بیمارگر منجر می‌شود، در مهار بیماری‌های گیاهی توسط AMF نقش دارند (اختر و صدیقی ۲۰۰۷؛ آتوا ۲۰۱۸؛ باگیاراج ۲۰۱۸؛ کاستیلو و همکاران ۲۰۱۹). در این پژوهش، ترکیب Ri با هر یک از دو باکتری (Dt+Ri و Af+Ri) نیز سازگار بود و سبب افزایش رشد گیاه و کاهش شدّت بیماری شد اما نسبت به کاربرد جداگانه این عوامل فاقد اثر هم‌افزا در بهبود رشد یا کنترل زیستی بود که با یافته‌های ایمپریالی و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت دارد. تیمار ترکیبی میکوریز و دو باکتری (Af+Dt+Ri) نیز با وجود کاهش علائم نکروز ریشه، فاقد اثر افزایشی بوده و اثری در بهبود رشد نخود نداشت. در مقابل، در برخی تحقیقات، تعاملات هم‌افزا بین AMF و PGPR و افزایش حفاظت زیستی علیه بیماری‌های خاکزاد (باگیاراج، ۲۰۱۸) یا بهبود شاخص‌های رشدی گیاه (محمد و همکاران ۲۰۱۹) مشاهده شده و برخی پژوهشگران علت آن را چنین بیان کرده‌اند که تعاملات زیرزمینی میان ریشه‌های گیاه، AMF و PGPR ممکن است سلامت و رشد گیاه را از طریق تأثیرات مکمل و هم‌افزا بر حل شدن و جذب مواد غذایی و نیز فعال کردن مسیرهای دفاع چندگانه و افزایش القای مقاومت سیستمیک در میزبان در برابر بیمارگرها بهبود بخشد (پرز-دِلوکوه و همکاران، ۲۰۱۷). نقش باکتری‌هایی از گروه‌های تاکسونومیکی مختلف به عنوان حامی میکوریز گزارش شده است. از جمله جنس‌های شناخته شده *Azospirillum*، *Azobacter*، *Burkholderia*، *Bradyrhizobium*، *Pseudomonas*، *Rhizobium*، *Bacillus*، *Paenibacillus*، *Streptomyces* و *Arthrobacter* (دیویاو و لابه ۲۰۱٦) اما بر اساس

بررسی نگارندگان، گزارشی از تعامل مثبت با میکوریز در مورد *Delftia* و *Alcaligenes* منتشر نشده است.

با وجود این که گزارش‌های مختلفی مبنی بر اثر ترکیب گونه‌های تریکودرما و AMF بر بهبود رشد گیاه و کارایی کنترل زیستی علیه بیمارگرهای خاکزاد وجود دارد (مارتینز-مدینا و همکاران ۲۰۰۹؛ سریواستاوا و همکاران ۲۰۱۰؛ یوان و همکاران ۲۰۱٦)، در پژوهش حاضر، تیمارهای ترکیب میکوریز و تریکودرما روی بیشتر صفات رشدی بررسی شده اثر مثبتی نداشتند. به عنوان مثال، ترکیب Ta+Ri به‌جز وزن تر اندام‌هوایی، نقشی در بهبود پارامترهای رشدی نداشت و تنها سبب کاهش علائم بیماری آن هم بدون اثر هم‌افزا نسبت به کاربرد جداگانه این عوامل گردید. این پدیده در گزارش های مختلفی ذکر شده است. کاستیلو و همکاران دریافتند که ترکیب *T. harzianum* و *Glomus* spp. اثر افزایشی بر کاهش پژمردگی فوزاریومی موز (*F. oxysporum* f.sp. *cubense*)، نداشته و *Glomus* spp. به‌تنهایی کارآمدترین تیمار در کنترل این بیماری بوده است. آن‌ها بیان کردند در تیمار ترکیبی این عوامل، اثرات رقابتی *T. harzianum* بر سر مواد مغذی و جایگاه‌ها با اثرات مفید *Glomus* spp. تداخل ایجاد می‌کند (کاستیلو و همکاران ۲۰۱۹). تعاملات میان سویه‌های *Trichoderma* و AMF و تأثیرشان بر رشد گیاه و مهار بیماری ممکن است توسط خصوصیات ذاتی گونه‌ها یا حتی سویه‌های هر دو قارچ تحت تأثیر قرار گیرد (مک‌آلیستر و همکاران ۱۹۹٤؛ یوان و همکاران ۲۰۱٦). به عنوان مثال از میان سه گونه *T. harzianum*، *T. viride* و *T. virens* تنها *T. harzianum* تعامل مثبتی با میکوریزها جهت افزایش رشد لوبیای سودانی و مهار فوزاریوم آن برقرار نموده است (دهاریا و همکاران ۲۰۱۵). البته برهم‌کنش *T. harzianum* هم با *G. intraradices* مثبت بود ولی با گونه‌های دیگر میکوریز تعامل منفی داشت (مارتینز-مدینا و همکاران، ۲۰۰۹). همچنین *Rhizophagus irregularis* و *T. viride* به تنهایی عملکرد خوبی داشتند ولی در تلفیق با هم رشد گیاه را کاهش دادند. در حقیقت هر دو قارچ روی کلنیزاسیون یکدیگر اثر منفی داشتند و حضور گیاه در بروز این اثر منفی مهم بود (لاگوس و همکاران ۲۰۱۸). در حقیقت سویه‌های میکروبی با تداخلات هورمونی می‌توانند رشد و مقاومت گیاه را کاهش دهند (کورن‌نیف و پیترسه ۲۰۰۸) در مورد *T. asperellum* هم تعامل منفی آن با میکوریزها در رشد کاکائو مشاهده شده است (تچامنی و همکاران ۲۰۱۱). گفته شده که کمک قارچ‌ها و باکتری‌ها به حلالیت فسفات، نرخ کلنیزاسیون میکوریز را کاهش می‌دهد (تچامنی و همکاران ۲۰۱۱؛ لاگوس و همکاران ۲۰۱۸).

در تحقیق حاضر، در ترکیب هر کدام از دو سویه باکتریایی با Ri و Ta، نتیجه متفاوتی مشاهده شد، تیمار حاوی Dt (Dt+Ri+ Ta) علاوه بر کاهش شدّت بیماری، سبب بهبود برخی فاکتورهای رشدی نخود (رشد طولی ریشه و وزن تر اندام‌هوایی) گردید اما ترکیب دارای Af (Af+Ri+Ta)، اثری بر مهار بیماری یا افزایش رشد گیاه نداشت. چیارینی و همکاران (۱۹۹۸) بیان نموده‌اند که سویه‌های منفرد میکروبی ممکن است در حضور سایر مایه‌های میکروبی، به یک میزان رشد خوبی نداشته باشند. همچنین در این پژوهش، ترکیب دو باکتری با تریکودرما و میکوریز (Af+Dt+Ri+Ta) فقط سبب کاهش بروز بخشی از علائم بیماری (نکروز ریشه) گردید و اثری در بهبود رشد نخود نداشت. این نتایج با گزارش‌های برخی محققین (سریواستاوا و همکاران ۲۰۱۰؛ دوک و همکاران ۲۰۱۷) مبنی بر مزایای بیشتر ترکیب AMF، *Trichoderma* و PGPR نسبت به کاربرد جداگانه آن‌ها و اثر هم‌افزای ترکیبشان در مهار بیماری و افزایش رشد گیاه مغایرت دارد.

برهم‌کنش‌ها و روابطی که میان گیاهان-میکروارگانیسم‌ها و نیز میکروارگانیسم‌های مختلف با یکدیگر ایجاد می‌شود، بسیار پیچیده بوده و به شکل شبکه‌ای از روابط چندگانه و متقابل با اثرات گوناگون است. بنابراین رفتار عوامل زیستی به‌تنهایی، در مقایسه

با زمانی که عوامل پیرامونی دیگر نظیر سایر عوامل میکروبی وجود دارند، ممکن است به دلیل تعامل متقابل با آن عوامل، بسیار متفاوت باشد. این امکان وجود دارد که افزوده شدن یک عامل میکروبی خاص به یک سیستم، ماهیت روابط میان موجودات قبلی را تغییر دهد و یا اثر PGPR یا PGPF روی پاسخ‌های دفاعی گیاه با حضور سایر میکروارگانیسم‌های موجود در محیط گیاه، تحت تأثیر قرار گیرد. همچنین چون تعدادی از عوامل میکروبی قادرند مولکول‌های سیگنال یا مواد تقویت‌کننده رشد تولید شده توسط PGPR یا PGPF را تجزیه نمایند، بنابراین ممکن است روی رفتار عوامل دیگر اعم از مفید یا مضر نیز تأثیرگذار باشند. از سوی دیگر، شرایط محیطی نیز می‌توانند فیزیولوژی گیاهان را تغییر داده و یا بر نوع رابطه و یا تعامل میان PGPR یا PGPF و گیاهان میزبان آن‌ها در یک محیط تأثیر بگذارند (بنت ۲۰۰۶؛ احمدزاده ۲۰۱۳؛ منندز و پاچو ۲۰۲۰). علاوه بر مطالب فوق ممکن است در میان میکروارگانیسم‌های مفید مهارکننده یک بیمارگر، برخی تعاملات آنتاگونیستی مانند رقابت رخ داده و یا مواد متابولیتی تولید شده توسط باکتری‌ها یا قارچ‌های کنترل زیستی که به فعالیت آنتاگونیستی آن‌ها در برابر قارچ‌های بیماریزا کمک می‌کنند، بر سایر میکروارگانیسم‌های مفید نیز تأثیرگذار باشند (واهیونو و همکاران ۲۰۱۶). بنابراین طبیعی است که نتایج به‌دست‌آمده در تحقیقات مختلف و حتی در یک تحقیق (نظیر تحقیق حاضر) در ترکیب سویه‌های مختلف باکتریایی و قارچی کاملاً متفاوت باشد. با توجه به اینکه تعاملات پیچیده که در ریزوسفر بین عوامل کنترل زیستی و میکروبیوتای بومی رخ می‌دهند، قادرند اثرات سودمند گونه‌های جداگانه را تقویت یا مهار کنند، هنگام استفاده از ترکیب عوامل زیستی باید اثرات چنین تعاملاتی را به‌دقت بررسی نموده و در طول تولید تجاری محصولات میکروبی مورد توجه قرار داد (ویپس ۲۰۰۱؛ پاسکوال ۲۰۱۶).

در این تحقیق، Ri توانست ریشه‌های نخود را به‌خوبی کلنیزه نماید (۷۴ درصد) اما در حضور بیمارگر، میزان کلنیزاسیون ریشه توسط این قارچ به ۴۵ درصد کاهش یافت. بنابراین حضور بیمارگر اثر منفی بر کلنیزاسیون ریشه گیاه توسط میکوریز داشت. سهرابی و همکاران (۲۰۱۵) نیز دریافتند میزان کلنیزاسیون ریشه نخود توسط *R. intraradices* ۶۹/۵ درصد ریشه بود که در حضور بیمارگر عامل پوسیدگی ریشه (*Fusarium solani* f.sp. *pisi*) به ۴۱/۲۵ کاهش یافت. *F. redolens* بیمارگری است که در بافت کورتکس ریشه فعال بوده و سبب نکروز ریشه می‌شود و این موضوع احتمالاً نشان‌دهنده وقوع تعاملات رقابتی بالا میان این دو قارچ است.

نتیجه‌گیری

به طور کلی در این تحقیق کاربرد عوامل باکتریایی و قارچی به‌صورت منفرد اثر خوبی در افزایش رشد گیاه و کاهش بروز بیماری داشت. اما کاربرد دوگانه، سه‌گانه یا چهارگانه این عوامل، از لحاظ تأثیر بر این شاخص‌ها همواره کارآمد و مفید نبود. هیچ‌کدام از ترکیبات باکتریایی و قارچی نیز اثر هم‌افزایی در بهبود رشد و کارایی کنترل زیستی نداشت. به‌هرحال با توجه به مزایای گوناگون استفاده از ترکیب میکروارگانیسم‌ها نسبت به کاربرد سویه‌های منفرد آن‌ها، حتی اگر هیچ بهبودی در کنترل بیماری یا افزایش رشد گیاه قابل‌تشخیص نباشد، ترکیب آن‌ها همچنان به دلایل متعدد دیگر از جمله کنترل بیمارگرهای متعدد، کنترل پایدارتر یا کنترل در طیف وسیع‌تری از شرایط محیطی همچنان سودمند است (لارکین و فراول ۱۹۹۸). با توجه به اینکه هر کدام از عوامل باکتریایی و قارچی به‌کار رفته در این تحقیق، کارایی خوبی در کنترل زیستی و تحریک رشد داشته‌اند، توصیه می‌شود در مطالعات آینده، اثر ترکیبشان با سویه‌های مناسب و سازگار ارزیابی شود و بهترین گزینه‌ها که بتوانند در افزایش

رشد و بهبود عملکرد گیاه و کاهش بیماری هم‌افزا باشند، انتخاب و جهت کاربردهای عملی در مزرعه فرموله شوند. واضح است که چنین اقدامی نه‌تنها سبب کاهش وابستگی کشاورزان به کودها و سموم شیمیایی می‌شود بلکه در کاهش هزینه‌های تولید محصولات کشاورزی و حفاظت از محیط زیست و دستیابی به کشاورزی پایدار نقش به سزایی خواهد داشت (سینگ و سینگ ۲۰۱۳).

سپاسگزاری

نویسندگان از گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی (دانشگاه رازی) به دلیل تأمین امکانات گلخانه‌ای و آزمایشگاهی تشکر می‌نمایند.

منابع مورد استفاده

Afzal I, Shinwari ZK, Sikandar S and Shahzad S. 2019. Plant beneficial endophytic bacteria: Mechanisms, diversity, host range and genetic determinants. Microbiological Research, 221: 36-49.

Agnolucci M, Battini F, Cristani C and Giovannetti M. 2015. Diverse bacterial communities are recruited on spores of different arbuscular mycorrhizal fungal isolates. Biology and Fertility of Soils, 51(3): 379-389.

Ahmadzadeh M. 2013. Biological Control of Plant Diseases, Plant Probiotic Bacteria. University of Tehran Press, Tehran, Iran. (In Persian).

Akhtar MS and Siddiqui ZA. 2007. Biocontrol of a chickpea root-rot disease complex with *Glomus intraradices*, *Pseudomonas putida* and *Paenibacillus polymyxa*. Australasian Plant Pathology, 36(2): 175-180.

Alabouvett C, Olivain C, Cordier C, Lemanceau P and Gianinazzi S. 2001. Enhancing Biological Control by Combining Microorganisms In: Vurro, M., Gressel, J., Butt, T., Harman, G., Nuss, D., Sends, D. and Leger, R.S. (Eds.), Enhancing Biocontrol Agents and Handling Risks. IOP Press Amsterdam, pp. 64-76.

Atwa M. 2018. Combination of biocontrol agents for controlling soybean damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. Egyptian Journal of Phytopathology, 46(2): 15-38.

Bagyaraj D. 2018. Arbuscular mycorrhizal fungi and biological control of soil-borne plant pathogens. Kavaka, 51(1): 1-6.

Ben Abdallah RA and Mejdoub-Trabelsi BM. 2016. Isolation of endophytic bacteria from *Withania somnifera* and assessment of their ability to suppress Fusarium wilt disease in tomato and to promote plant growth. Journal of Plant Pathology & Microbiology, 07(05).

Bent E. 2006. Induced systemic resistance mediated by plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF) In: Tuzun, S. and Bent, E. (Eds.), Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants. Springer, pp. 225-258.

Castillo AG, Puig CG and Cumagun CJR. 2019. Non-synergistic effect of *Trichoderma harzianum* and *Glomus* spp. in reducing infection of Fusarium wilt in banana. Pathogens, 8(2): 43.

Chiarini L, Bevivino A, Tabacchioni S and Dalmastri C. 1998. Inoculation of *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* and *Enterobacter* sp. on *Sorghum bicolor*: root colonization and plant growth promotion of dual strain inocula. Soil Biology and Biochemistry, 30(1): 81-87.

Datnoff L, Nemec S and Pernezny K. 1995. Biological control of Fusarium crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. Biological Control, 5(3): 427-431.

Dehariya K, Shukla A, Sheikh I and Vyas D. 2015. *Trichoderma* and arbuscular mycorrhizal fungi based biocontrol of *Fusarium udum* butler and their growth promotion effects on pigeon pea. Journal of Agricultural Science and Technology, 17(2): 505-517.

Deveau A and Labbé J. 2016. Mycorrhiza helper bacteria In: Martin, F. (Ed.), Molecular Mycorrhizal Symbiosis, pp. 437-450.

Dubey SC, Suresh M and Singh B. 2007. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. Biological Control, 40(1): 118-127.

Duc NH. 2017. Combined inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi, *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma* spp. for enhancing defense enzymes and yield of three pepper cultivars. Applied Ecology and Environmental Research, 15(3): 1815-1829.

Elkoca E, Turan M and Donmez MF. 2010. Effects of single, dual and triple inoculations with *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* and *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* on nodulation, nutrient uptake, yield and yield parameters of common bean (*Phaseolus vulgaris* L. cv. 'Elkoca-05'). Journal of Plant Nutrition, 33(14): 2104-2119.

Esmaeili Taheri A, Hamel C, Gan Y and Vujanovic V. 2011. First report of *Fusarium redolens* from Saskatchewan and its comparative pathogenicity. Canadian Journal of Plant Pathology, 33(4): 559-564.

Hage-Ahmed K, Rosner K and Steinkellner S. 2019. Arbuscular mycorrhizal fungi and their response to pesticides. Pest Management Science, 75(3): 583-590.

Hwang SF, Howard RJ, Chang KF, Park B and Burnett PA. 1994. Etiology and severity of fusarium root rot of lentil in Alberta. Canadian Journal of Plant Pathology, 16(4): 295-303.

Imperiali N, Chiriboga X, Schlaeppi K, Fesselet M, Villacrés D, Jaffuel G, Bender SF, Dennert F, Blanco-Pérez R and Van Der Heijden MG. 2017. Combined field inoculations of *Pseudomonas* bacteria, arbuscular mycorrhizal fungi, and entomopathogenic nematodes and their effects on wheat performance. Front Plant Sci, 8: 1809.

Jasem AM, Sharifi R and Abbasi S. 2018. Induced systemic resistance to wheat take-all disease by probiotic bacteria. Journal of Plant Protection Research, 58(3): 304-310.

Jimenez-Fernandez D, Navas-Cortes JA, Montes-Borrego M, Jimenez-Diaz RM and Landa BB. 2011. Molecular and pathogenic characterization of *Fusarium redolens*, a new causal agent of Fusarium yellows in chickpea. Plant Disease, 95(7): 860-870.

Kala C, Gangopadhyay S and Godara SL. 2015. Eco-friendly management of wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *Ciceri* in chickpea. Legume Research, 39(1): 129-134.

Koornneef A and Pieterse CM. 2008. Cross talk in defense signaling. Plant Physiology, 146(3): 839-844.

Lagos C, Larsen J, Correa ES, Almonacid L, Herrera H, Fuentes A and Arriagada C. 2018. Dual inoculation with mycorrhizal and saprotrophic fungi suppress the maize growth and development under phenanthrene exposure. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, 18: 721-734.

Larkin RP and Fravel DR. 1998. Efficacy of various fungal and bacterial biocontrol organisms for control of Fusarium wilt of tomato. Plant Disease, 82(9): 1022-1028.

Latha P, Anand T, Ragupathi N, Prakasam V and Samiyappan R. 2009. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plants by mixtures of PGPR strains and *Zimmu* leaf extract against *Alternaria solani*. Biological Control, 50(2): 85-93.

Martínez-Medina A, Pascual JA, Lloret E and Roldán A. 2009. Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* and their effects on Fusarium wilt in melon plants grown in seedling nurseries. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89(11): 1843-1850.

McAllister C, Garcia-Romera I, Godeas A and Ocampo J. 1994. Interactions between *Trichoderma koningii*, *Fusarium solani* and *Glomus mosseae*: effects on plant growth, arbuscular mycorrhizas and the saprophyte inoculants. Soil Biology and Biochemistry, 26(10): 1363-1367.

Menendez E and Paco A. 2020. Is the application of plant probiotic bacterial consortia always beneficial for plants? Exploring synergies between rhizobial and non-rhizobial bacteria and their effects on agro-economically valuable crops. Life (Basel), 10(3): 1-18.

Mohamed I, Eid KE, Abbas MHH, Salem AA, Ahmed N, Ali M, Shah GM and Fang C. 2019. Use of plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR) and mycorrhizae to improve the growth and nutrient utilization of common bean in a soil infected with white rot fungi. Ecotoxicology and Environmental Safety, 171: 539-548.

Morel MA, Cagide C, Minteguiaga MA, Dardanelli MS and Castro-Sowinski S. 2015. The pattern of secreted molecules during the co-inoculation of alfalfa plants with *Sinorhizobium meliloti* and *Delftia* sp. strain JD2: an interaction that improves plant yield. Molecular Plant-Microbe Interactions, 28(2): 134-142.

Nandini K, Preethi U and Earanna N. 2014. Molecular identification of phosphate solubilizing bacterium (*Alcaligenes faecalis*) and its interaction effect with *Bradyrhizobium japonicum* on growth and yield of soybean (*Glycine max* L.). African Journal of Biotechnology, 13(34): 3450-3454.

Nemec S, Datnoff L and Strandberg J. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. Crop Protection, 15(8): 735-742.

Palmieri D, Vitullo D, De Curtis F and Lima G. 2016. A microbial consortium in the rhizosphere as a new biocontrol approach against fusarium decline of chickpea. Plant and Soil, 412(1-2): 425-439.

Pascual JA. 2016. The use of arbuscular mycorrhizal fungi in combination with *Trichoderma* spp. in sustainable agriculture In: Arora, N.K. (Ed.), Bioformulations: for Sustainable Agriculture, pp. 137-146.

Pérez-de-Luque A, Tille S, Johnson I, Pascual-Pardo D, Ton J and Cameron DD. 2017. The interactive effects of arbuscular mycorrhiza and plant growth-promoting rhizobacteria synergistically enhance host plant defences against pathogens. Scientific Reports, 7(1): 16409.

Phillips JM and Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. Transactions of the British Mycological Society, 55(1): 158-IN118.

Prasannakumar SP, Gowtham HG, Hariprasad P, Shivaprasad K and Niranjana SR. 2015. *Delftia tsuruhatensis* WGR-UOM-BT1, a novel rhizobacterium with PGPR properties from *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. ex Kurz also suppresses fungal phytopathogens by producing a new antibiotic-AMTM. Letters in Applied Microbiology, 61(5): 460-468.

Rajeswari P and Kapoor R. 2017. Combinatorial efficacy of *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas fluorescens* to enhance suppression of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium* wilt of *Arachis hypogaea*. L. International Journal of Agricultural Research, Innovation and Technology, 7(2): 36-42.

Raupach GS and Kloepper JW. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathology, 88(11): 1158-1164.

Rudresh DL, Shivaprakash MK and Prasad RD. 2005. Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). Applied Soil Ecology, 28(2): 139-146.

Şahin F, Çakmakçi R and Kantar F. 2004. Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N_2-fixing and phosphate solubilizing bacteria. Plant and Soil, 265(1-2): 123-129.

Seifi S. 2019. Screening of nitrate removal bacteria and effect of these bacteria on biological control of *Fusarium* wilt disease in tomato. PhD Thesis. University of Tehran, Karaj, Iran. (In Persian).

Shabir UR, W AD, S AG, Javid AB, Gh HM, Rubina L, Sumati N and Pardeep KS. 2013. Comparative efficacy of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum* f sp. *ciceris* causing wilt of chickpea. African Journal of Microbiology Research, 7(50): 5731-5736.

Singh JS and Singh DP. 2013. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): Microbes in Sustainable Agriculture In: Malik, A., Grohmann, E. and Alves, M. (Eds.), Management of Microbial Resources in the Environment. Springer Netherlands, pp. 361-385.

Singh PK, Singh M, Agnihotri V and Vyas D. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi: biocontrol against Fusarium wilt of chickpea. International Journal of Scientific and Research Publications, 3(1): 38-42.

Singh R and Dubey AK. 2018. Diversity and Applications of Endophytic Actinobacteria of Plants in Special and Other Ecological Niches. Front Microbiol, 9: 1767-1767.

Sohrabi M, Mohammadi H and Mohammadi A. 2015. Influence of AM Fungi, *Glomus mosseae* and *Glomus intraradices* on chickpea growth and root-rot disease caused by *Fusarium solani* f. sp. *pisi* under greenhouse conditions. Journal of Agricultural Science and Technology, 17: 1919-1929.

Srivastava R, Khalid A, Singh US and Sharma AK. 2010. Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and *Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. Biological Control, 53(1): 24-31.

Szczech M. 2008. Mixtures of microorganisms in biocontrol In: Kim, M.B. (Ed.), Progress in Environmental Microbiology. Nova Science Publishers, New York, USA, pp. 69-110.

Tchameni SN, Ngonkeu MEL, Begoude BAD, Wakam Nana L, Fokom R, Owona AD, Mbarga JB, Tchana T, Tondje PR, Etoa FX and Kuaté J. 2011. Effect of *Trichoderma asperellum* and arbuscular mycorrhizal fungi on cacao growth and resistance against black pod disease. Crop Protection, 30(10): 1321-1327.

Wahyuno D, Manohara D and Octivia Trisilawati O. 2016. Pretreatment effect of black pepper seedlings with *Pseudomonas*, *Trichoderma* and mycorrhiza on foot rot disease incidence. Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat, 27(1): 55-66.

Whipps JM. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 52: 487-511.

Yadav SK, Dave A, Sarkar A, Singh HB and Sarma BK. 2013. Co-inoculated biopriming with *Trichoderma*, *Pseudomonas* and *Rhizobium* improves crop growth in *Cicer arietinum* and *Phaseolus vulgaris*. International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology, 6(2): 255-259.

Yuan S, Li M, Fang Z, Liu Y, Shi W, Pan B, Wu K, Shi J, Shen B and Shen Q. 2016. Biological control of tobacco bacterial wilt using *Trichoderma harzianum* amended bioorganic fertilizer and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae*. Biological Control, 92: 164-171.

Zarbanoei G. 2015. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* species complex, the causal agent of chickpea wilt and leaf yellowing in Kermanshah Province. M.Sc. Thesis. Razi University, Kermanshah, Iran. (In Persian).