

## کنترل پوسیدگی و پژمردگی فوزاریومی ریشه نخود با عوامل *Fusarium solani* و *Fusarium oxysporum* با استفاده از باکتری‌های محرک رشد گیاه

مسعود سهرابی<sup>۱</sup>، خسرو چهری<sup>۲</sup> و روح‌الله شریفی<sup>۳\*</sup>

۱- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه؛ masoodsohrabi13677@gmail.com

۲- استادیار قارچ‌شناسی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه رازی، کرمانشاه؛ khchehri@gmail.com

۳- استادیار کنترل بیولوژیک، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۷/۰۲

### چکیده

بیماری پوسیدگی و پژمردگی فوزاریومی نخود که به ترتیب توسط گونه‌های *Fusarium solani* و *Fusarium oxysporum* ایجاد می‌شود. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های نخود در ایران است. در این پژوهش، امکان افزایش رشد گیاه و کنترل بیماری توسط باکتری‌های محرک رشد گیاه جدا شده از ریزوسفر گیاه نخود مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۰۰ جدایه باکتری به دست آمده بر اساس روش هاله بازدارندگی علیه هر دو بیمارگر، ۱۶ جدایه انتخاب شدند. بیشترین هاله بازدارندگی مربوط به جدایه B13 با ۱۱ میلی‌متر علیه بیمارگر *F. oxysporum* بود. سه آزمایش شامل افزایش رشد گیاه در عدم حضور بیمارگرها، مهار پژمردگی فوزاریومی و مهار پوسیدگی فوزاریومی توسط جدایه‌های منتخب و در شرایط گلخانه انجام شد. در عدم حضور بیمارگرها، جدایه B2 وزن خشک اندام‌های هوایی را از ۱/۰۸ به ۳/۶۹ افزایش داد و جدایه‌های B3 و B4 بهترین جدایه‌ها در بهبود رشد ریشه بودند. در آزمایش دوم، جدایه‌های B2 و B13 بیماری پژمردگی فوزاریومی با عامل *F. oxysporum* را بیش از ۹۳ درصد کاهش دادند. جدایه B2 در حضور این بیمارگر، میانگین وزن خشک اندام هوایی را ۴/۴ برابر و میانگین وزن خشک ریشه را ۵/۴ برابر افزایش داد. در آزمایش سوم، جدایه B6 بهترین جدایه علیه بیمارگر *F. solani* بود و شاخص بیماری را بیش از ۷۳ درصد کاهش داد. این جدایه در حضور این بیمارگر، وزن خشک اندام‌های هوایی را ۳/۲ برابر و وزن خشک ریشه را ۲/۹ برابر افزایش داد. شناسایی مولکولی به روش rDNA نشان داد که جدایه‌های B2، B3، B6 و B13 به ترتیب متعلق به *Bacillus sp.*، *Achromobacter sp.*، *Bacillus pumilus* و *Bulkholderia sp.* بودند. در مجموع استفاده از باکتری‌های ریزوسفری می‌تواند رهیافتی امیدبخش در مدیریت بیماری‌های فوزاریومی نخود باشد.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری‌های محرک رشد گیاه، کشاورزی پایدار، کنترل بیولوژیک، *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani*

### مقدمه

بیماری و استفاده از روش‌های بیولوژیکی معطوف شده است (Nakkeeran et al., 2006). باکتری‌های مفید از طریق آنتی‌بیوز، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، پارازیتیسیم، تحریک سیستم دفاعی گیاه، تحریک رشد گیاه و همچنین از طریق رقابت برای جا و غذا باعث مهار بیماری می‌شوند (Nakkeeran et al., 2006, Sharifi & Ryu, 2017). گزارش‌های متعددی از مهار گونه‌های فوزاریوم به وسیله باکتری‌های مفید خاک در گیاهان مختلف گزارش شده است. باکتری‌های از جنس ریزوبیوم و سودوموناس قادر بوده‌اند بیماری ناشی از قارچ *F. solani* f. sp. *phaseoli* را در باقلا تا ۶۶ درصد کنترل کنند (Golpayegani et al., 2011). در مطالعه دیگر باکتری محرک رشد *Rhizobium leguminosarum* قادر بود بیماری پوسیدگی ریشه باقلا با عامل *F. solani* را ۶۰ درصد کنترل کند

گیاه نخود (*Cicer arietinum*) توسط بیمارگرهای متعددی مورد حمله قرار می‌گیرد که بیماری پژمردگی و بوته زردی با عامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* یا *Fusarium redolens* و پوسیدگی ریشه با عامل *Fusarium solani* از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه می‌باشد (Shanthi & Vittal, 2013, Singh et al., 2013). مبارزه با قارچ فوزاریوم مانند بیشتر قارچ‌های خاکزی آسان نیست. روش‌های شیمیایی و زراعی برای مبارزه با این بیماری‌ها ارائه شده است که البته با توجه به مادت زیست‌شناسی و بیماری‌زایی این قارچ چندان موفق نبوده‌اند (Naseby et al. 2000). لذا در سال‌های اخیر بیشترین توجه به سمت مبارزه تلفیقی این

\* نویسنده مسئول: r.sharifi@razi.ac.ir

یک قرص میسلیمیومی از کشت جوان قارچ بیمارگر در وسط تشتک پتری قرار گرفت و پتری‌ها تا زمان کامل شدن رشد تشتک پتری شاهد در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند.

استخراج DNA، تعیین ترادف و شناسایی جدایه‌های منتخب استخراج DNA باکتری به روش لیز قلیایی انجام شد (Rademaker & de Bruijn, 1997) و ناحیه 16S rRNA با استفاده از آغازگرهای عمومی 27F (5-AGAGTTTGGATCMTGGCTCAG-3) و 1429 (5-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3) تکثیر شد (Jiang et al., 2006). پس از مشاهده باند مدنظر روی ژل الکتروفورز یک درصد، مقدار ۵۰ میکرولیتر محصول PCR جهت تعیین توالی قطعه به شرکت Bioneer (Korea) ارسال شد. جدایه‌های قارچ روی محیط کشت PDA کشت شدند و به مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و DNA جدایه‌ها مطابق روش (Möller et al., 1992) استخراج شد. تکثیر و توالی ژن Translation Elongation Factor (*TEF-1α*) با استفاده از آغازگرهای 5'-ATG GGT EF1 (AAG GAG GAC AAG AC-3' و EF2 (AGT ACC AGT GAT CAT GTT-3' (O'Donnell et al., 1998) انجام شد. ژن تکثیر یافته *TEF-1α* با استفاده از کیت خالص‌سازی (Quiagen)، مطابق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت سازنده خالص‌سازی شد. محصول به دست آمده، به منظور تعیین توالی DNA، به شرکت First Base در سنگاپور فرستاده شد. توالی‌های دریافت شده از جدایه‌های باکتری و قارچ به روش دستی و با استفاده از نرم‌افزار Bioedit ویرایش گردیدند. رشته‌های برآیند با برنامه Basic Local Aligment Search Tool (BLAST) در Gene bank با توالی‌های موجود در این پایگاه مقایسه گردید.

#### آزمون گلخانه‌ای

##### تهیه مایه بیمارگر

گونه‌های بیمارگر از مزارع نخود کرمانشاه جداسازی شده و با استفاده از اطلس (Gerlach & Nirenberg, 1982) شناسایی شدند. اثبات بیماری‌زایی در شرایط گلخانه و روی نخود رقم بیونینج انجام گرفت. برای تهیه مایه قارچ‌های بیمارگر، ورمی‌کولایت طی دو نوبت با فاصله زمانی ۲۴ ساعت سترون (دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۰ دقیقه) گردید. مقدار ۱۵۰ میلی‌لیتر از محیط مایع PDB (Potato Dextrose Broth) به ۲۵۰ میلی‌لیتر ورمی‌کولایت سترون اضافه و دوباره اتوکلاو شد. در شرایط سترون قرص‌های میسلیمیومی قارچ از حاشیه کشت جوان قارچ روی محیط PDA به داخل بطری‌های

(Serajzadeh et al., 2013). باکتری‌های محرک رشد از جنس‌های *Rhizobium* و *Pseudomonas* توانستند بیماری را در لرستان تا ۶۶ درصد کنترل کنند (Golpayegani et al., 2011). عوامل بیوکنترل قادر به مهار قارچ عامل پژمردگی نیز بوده‌اند. سویه‌های متعلق به گونه *Pseudomonas fluorescens* به صورت مؤثری بیماری پژمردگی گوجه‌فرنگی ناشی از قارچ *F. oxysporum* را ۳۳/۰۸ درصد مهار کرده‌اند (Manafi Dizaji et al., 2012). در نخود نیز سویه‌ای از *P. fluorescens* توانست بیماری پژمردگی فوژاریومی نخود با عامل *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* را ۱۰۰ درصد کنترل کند (Ebrahimi Kazemabad et al., 2013).

هدف این پژوهش جداسازی و غربال‌گری جدایه‌های باکتری‌های از ریزوسفر گیاه نخود در استان‌های کرمانشاه و کردستان و بررسی اثر آن‌ها علیه دو بیماری پوسیدگی و پژمردگی فوژاریومی نخود در شرایط گلخانه بود. در نهایت جدایه‌های برتر با تعیین توالی ژن DNA ریبوزومی شناسایی شدند.

#### مواد و روش‌ها

##### جداسازی باکتری‌های محرک رشد گیاه

نمونه‌برداری از مزارع نخود در استان‌های کرمانشاه و کردستان از اوایل اردیبهشت تا اواخر خردادماه ۱۳۹۶ صورت پذیرفت. برای جدا کردن باکتری‌های محرک رشد گیاه، از بوته‌هایی که رشد بیشتری داشتند و در مزرعه دارای بیماری، از بوته‌های کمتر آلوده، نمونه‌برداری شد. جهت جدا کردن باکتری‌ها، ریشه‌ها زیر آب شست‌وشو داده شده و سپس با استفاده از هاون چینی ضد عفونی گردیده و آب مقطر سترون سوسپانسیونی از ریشه‌های له شده و خاک چسبیده به ریشه تهیه گردید. سری رقت تهیه شد و از سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت NA (Nutrient Agar) به صورت مخطط کشت داده شد. تشتک‌های پتری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۷ درجه نگهداری شدند و سپس کلنی‌های ایجاد شده که از نظر شکل ظاهری متفاوت بودند، جداسازی و خالص گردیدند.

##### آزمون هاله بازدارندگی

به منظور بررسی قدرت بازدارندگی جدایه‌ها از رشد قارچ بیمارگر از روش (Hagedorn et al., 1989) استفاده شد. هر یک از جدایه‌های باکتری به صورت سه نقطه‌ای با فاصله نیم سانتی‌متری از لبه پتری حاوی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت

تصادفی با چهار تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نسخه 9.3 نرم‌افزار SAS تجزیه واریانس و با استفاده از روش حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد مقایسه میانگین شدند.

### نتایج و بحث

تعداد ۱۰۰ جدایه باکتری فراریشه نخود، از مزارع آبی و دیم ۹ شهرستان استان کرمانشاه و شش شهرستان استان کردستان جدا گردید. توانایی جدایه‌ها در مهار رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش هاله بازدارندگی انجام شد. بر اساس نتایج هاله بازدارندگی، ۱۶ جدایه علیه هر دو بیمارگر هاله تشکیل دادند. بیشترین هاله بازدارندگی مربوط به جدایه B13 با ۱۱ میلی‌متر علیه بیمارگر *F. oxysporum* بود. جدایه B6 بیشترین هاله بازدارندگی را علیه قارچ *F. solani* نشان داد (شکل ۱). از این جدایه‌ها در آزمایش‌های گلخانه به منظور مهار دو بیمارگر مذکور در نخود استفاده شد.

### آزمون تأثیر بر افزایش رشد با استفاده از جدایه‌های باکتری بدون حضور بیمارگر

جدول ۱، اثر جدایه‌های باکتری روی وزن خشک اندام‌های هوایی را نشان می‌دهد. جدایه B2 اختلاف معنی‌داری با جدایه‌های دیگر داشت و با میانگین وزن خشک اندام هوایی ۳/۶۹ گرم، بیشترین اثر را نسبت به شاهد سالم با میانگین وزن خشک اندام هوایی ۱/۰۸ گرم نشان داد. پس از آن باکتری‌های N1 و B3 در یک گروه آماری قرار گرفتند و وزن خشک اندام هوایی را نسبت به شاهد سالم به ترتیب ۱/۱۲ و ۱/۰۱ گرم افزایش دادند. باکتری‌های B6 و B10 پس از شاهد ضعیف‌ترین تیمارهای این آزمایش بودند و میانگین وزن خشک اندام هوایی آن‌ها به ترتیب ۱/۳۳ و ۱/۲۳ گرم بود. در مجموع همه جدایه‌ها باعث افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی نسبت به شاهد سالم شدند. بیشترین وزن خشک ریشه به مقدار ۱/۴۲ و ۱/۳۶ به ترتیب در جدایه‌های B3 و B4 مشاهده شد و کمترین وزن خشک ریشه مربوط به شاهد سالم با میانگین ۰/۵۲ گرم بود. ضعیف‌ترین جدایه باکتری N1 بود که با میانگین وزن خشک ریشه ۰/۶۶ گرم کمترین تأثیر را روی این صفت نشان داد. این جدایه جزو جدایه‌های مطلوب در بهبود رشد اندام‌های هوایی بود.

### آزمون کنترل زیستی با استفاده از جدایه‌های باکتری با حضور بیمارگر *F. oxysporum*

شکل ۲، اثر جدایه‌های باکتری را روی شاخص بیماری *F. oxysporum* نشان می‌دهد. جدایه‌های B2 و B13، بهترین جدایه‌ها در کاهش شاخص بیماری بودند. این جدایه‌ها بیماری را بیش از ۹۳ درصد کنترل کردند و اختلاف آماری نیز با هم

حاوی بستر رشد انتقال داده شدند. بطری‌های به مدت سه هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد داخل انکوباتور نگهداری شدند. در فاصله زمانی هفته‌ای یک بار بطری‌ها به آرامی تکان داده شدند. به منظور رقیق کردن مایه بیمارگر، از ورمی‌کولایت با نسبت یک قسمت مایه بیمارگر با ۱۰ قسمت از ورمی‌کولایت اتوکلاو شده مخلوط کرده و در آزمایشات گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفت.

### تهیه سوسپانسیون باکتری‌ها و آغشته‌سازی بذور

ابتدا یک لوپ پر از کشت ۴۸ ساعته باکتری روی محیط آگار مغذی را به فلاسک‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع NB اضافه کرده و فلاسک‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. سلول‌های باکتری با سانتریفوژ به مدت ۷ دقیقه در ۶۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند. رسوب حاصل با محلول سرم فیزیولوژیک (۸ گرم در لیتر سدیم کلرید) حاوی ۵ گرم در لیتر متیل سلولز به جمعیت  $1 \times 10^9$  رسانده شد.

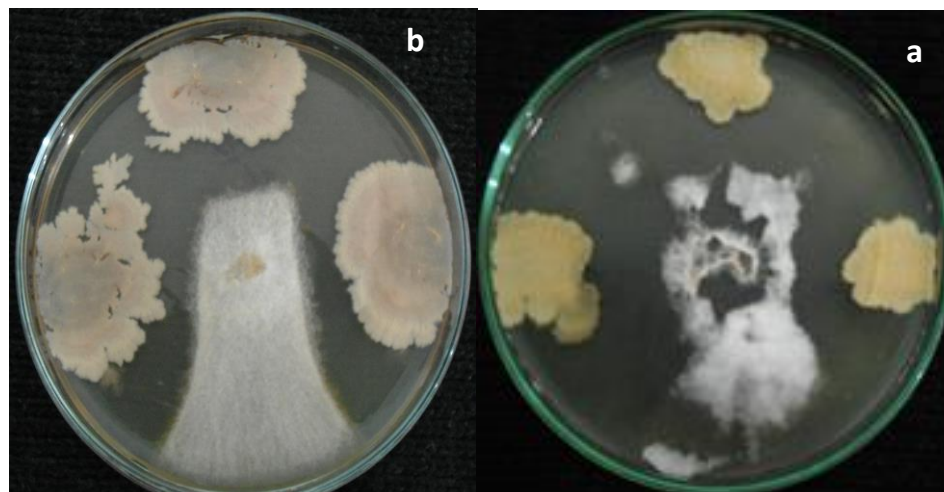
بذور نخود با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی شده و بعد از شستشو با آب مقطر، روی کاغذ صافی مرطوب انتقال داده شد و این مجموعه در دمای ۲۷ درجه نگهداری گردید. بعد از جوانه‌زنی بذرها به مدت ۲۰ دقیقه در سوسپانسیون باکتری غوطه‌ور شدند (Weller & Cook, 1983).

### ارزیابی مهار بیماری در شرایط گلخانه

در این آزمایش از گلدان‌های پلاستیکی به قطر دهانه ۸ سانتی‌متر و ارتفاع ۱۰ سانتی‌متر (با ظرفیت ۲۵۰ گرم خاک سترون) استفاده شد. یک سوم از حجم گلدان‌ها با مخلوط سترون شده از نسبت ۳:۱:۱ خاک، کود حیوانی و پرلیت پر شد و به هر گلدان ۴ گرم مایه بیمارگر رقیق شده اضافه گردید. یک لایه خاک به گلدان‌ها اضافه شد و بذور تلقیح شده داخل گلدان قرار گرفتند و روی بذرها یک لایه خاک ریخته شد. آبیاری به صورت یک‌روز در میان انجام شد. گلدان‌ها تا زمان ظهور نشانه‌های بیماری در گلخانه با ۱۸ ساعت روشنایی و دمای  $28 \pm 4$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت مدت زمان ۳۰ روز، گیاهچه‌ها به آرامی از درون گلدان‌ها خارج و صفات مربوط به رشد و بیماری‌زایی مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت ارزیابی شدت بیماری از شاخص نمره‌دهی ۰-۴ استفاده شد (Cachinero et al., 2002; Hartman et al., 1997). البته با توجه به خسارت بیمارگر به ریشه و جذب مواد غذایی میزبان، وزن ریشه و اندام‌های هوایی نیز شاخصی از بیماری محسوب می‌شوند. این آزمایش در قالب طرح کرت‌های کاملاً

داشته باشند. جدایه B6 به عنوان ضعیف‌ترین جدایه قادر بود بیماری را ۴۰ درصد کاهش دهد.

نداشتند. جدایه‌های B6، B10 و B4 کمترین اثر را در کاهش شاخص بیماری داشتند، ولی با وجود این، این جدایه‌ها نسبت به شاهد قادر بودند کاهش قابل توجهی در شاخص بیماری



شکل ۱. تأثیر بازدارندگی جدایه‌های باکتری از رشد میسلیموم بیمارگر. (a) تأثیر جدایه B13 در تشکیل هاله بازدارندگی علیه قارچ

*Fusarium solani* (b) تأثیر جدایه B6 در تشکیل هاله بازدارندگی علیه قارچ *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris*

Fig. 1. The effect of bacterial isolates in growth inhibition of pathogenic fungi. a) The effect of B13 against *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris*; b) Inhibition halo of B6 against *Fusarium solani*

جدول ۱- اثر جدایه‌های باکتری بر وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی در حضور و عدم حضور بیمارگرهای *Fusarium oxysporum f.sp.* و *Fusarium solani* در شرایط گلخانه

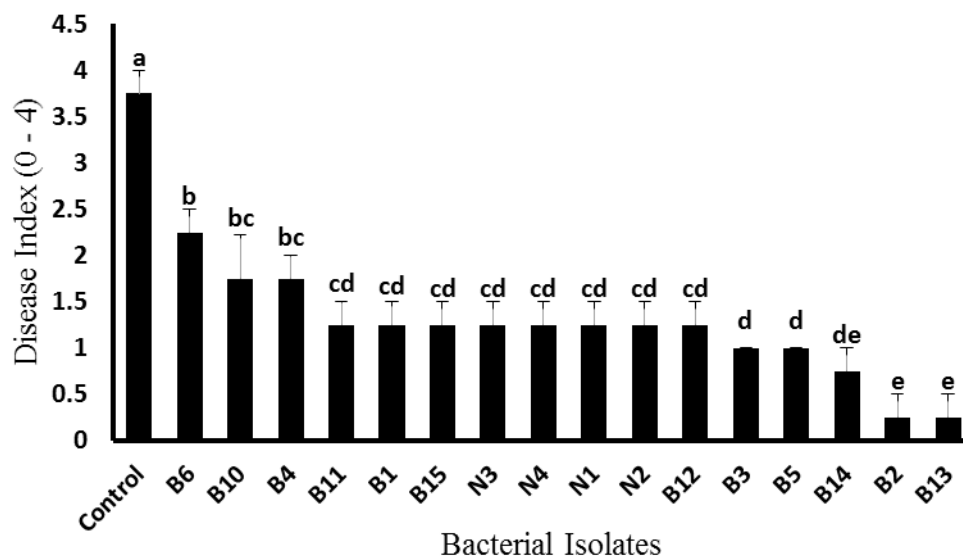
Table 1. The effect of bacterial isolates on chickpea shoot and root dry weight in presence or absence of pathogens, *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* and *Fusarium solani*, in greenhouse

جدایه‌های باکتری Bacteria isolated	وزن خشک اندام‌های هوایی و ریشه Shoot and root dry weight (g)					
	شاهد Control		<i>Fusarium solani</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	
	SDW**	RDW	SDW	RDW	SDW	RDW
B1	1.71 de*	0.89 cd	1.08 f	0.58 g	1.25 ghi	0.71 de
B2	3.69 a	0.91 c	1.87 a	0.86 c	2.49 a	1.31 b
B3	2.09 b	1.42 a	1.45 cd	1.37 a	1.72 cd	1.33 b
B4	1.81 cd	1.36 a	1.38 de	1.09 b	1.61 de	1.49 a
B5	1.75 cde	1.10 b	1.77 ab	1.09 b	1.12 i	1.09 c
B6	1.33 g	0.81 cde	1.47 cd	0.71 de	1.37 fg	0.55 fg
B10	1.23 g	0.80 cde	1.09 f	0.72 d	0.89 j	0.52 g
B11	1.63 ef	0.69 ef	1.39 cde	0.71 de	1.26 ghi	0.53 g
B12	1.86 c	0.77 def	1.40 cde	0.64 defg	1.44 f	0.49 g
B13	1.74 cde	0.79 cde	1.12 f	0.61 efg	1.81 bc	0.75 d
B14	1.75 cde	0.91 c	1.34 e	0.84 c	1.18 hi	0.79 d
B15	1.71 de	1.16 b	1.38 de	0.59 fg	1.81 bc	0.73 de
Control	1.08 h	0.52 g	0.46 h	0.24 h	0.56 k	0.24 h
N1	2.20 b	0.66 f	1.84 ab	0.60 efg	1.89 b	0.52 g
N2	1.70 de	0.81 cde	1.75 b	0.57 g	1.29 gh	0.64 ef
N3	1.69 de	0.71 ef	1.50 c	0.70 def	1.62 d	0.53 g
N4	1.54 f	0.80 cde	0.79 g	0.60 efg	1.47 ef	0.70 de

\* مقایسه میانگین با روش حداقل تفاوت معنی دار و در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفته است و تیمارهای دارای حرف مشابه اختلاف آماری با هم ندارند.  
\*\* SDW: وزن خشک اندام‌های هوایی؛ RDW: وزن خشک ریشه

\* Means comparison analysis was done by Fisher protected LSD. Means with the same letters do not have significant difference.

\*\* SDW: Shoot Dry Weight, RDW: Root Dry Weight



شکل ۲- تأثیر جدایه‌های باکتری بر شاخص بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود با عامل *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* در شرایط گلخانه ستون‌ها نشانگر میانگین ± انحراف معیار بوده و مقایسه میانگین با روش حداقل تفاوت معنی‌دار و در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفته است. تیمارهای دارای حروف مشابه، اختلاف آماری معنی‌داری با هم ندارند.

**Fig. 2. The effect of bacterial isolates on disease index of *Fusarium oxysporum f.sp. ciceris* wilt of chickpea in greenhouse**

Columns represent mean±standard deviation. Means comparison analysis was done by Fisher protected LSD. Treatments with the same letters do not have significant difference.

شدند. اثر متقابل قارچ *F. oxysporum* و جدایه B2 روی بوت‌ه نخود در شکل ۳ قابل مشاهده است.

#### آزمون بیوکنترول با استفاده از جدایه‌های باکتری با حضور بیمارگر *F. solani*

شکل ۴، اثر جدایه‌های باکتری را روی شاخص بیماری *F. solani* نشان می‌دهد. جدایه B6، به‌عنوان بهترین جدایه قادر بود شاخص بیماری را از ۳/۷۵ به ۱ برساند و به‌عبارتی شاخص بیماری را بیش از ۷۳ درصد کاهش دهد. جدایه‌های B2، N1، B1 و N4 به‌عنوان جدایه‌های بعدی اختلاف معنی‌داری نشان ندادند و شاخص بیماری را از ۳/۷۵ به ۱/۲۵ رساندند و به‌عبارتی شاخص بیماری را بیش از ۶۶ درصد کاهش دادند. جدایه‌های B4 و B13، اختلاف آماری با هم نشان ندادند و شاخص بیماری را بیش از ۴۶ درصد کاهش دادند. در مجموع همه جدایه‌ها سبب کاهش شاخص بیماری شدند. کمترین اثر در جدایه B12 دیده شد که شاخص بیماری را نسبت به شاهد آلوده ۲۰ درصد کاهش داد.

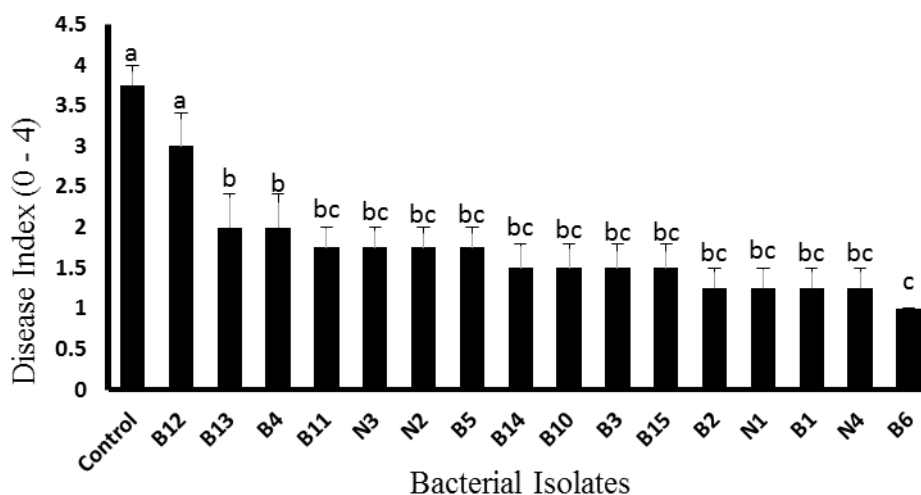
همان‌طور که جدول ۱ قابل مشاهده است، جدایه B2 در حضور بیمارگر *F. solani*، میانگین وزن خشک اندام هوایی را از ۰/۴۶ گرم شاهد به ۱/۸۷ گرم (۳/۸ برابر) افزایش داد.

جدول ۱، اثر جدایه‌های باکتری بر میانگین وزن خشک اندام هوایی در حضور بیمارگر *F. oxysporum* را نشان می‌دهد. جدایه‌های مورد استفاده نه تنها بیماری را کاهش دادند، بلکه قادر بودند صفات رشدی گیاه مانند میانگین وزن خشک اندام هوایی را به‌صورت قابل‌توجهی بهبود بخشند. جدایه B2 میانگین وزن خشک اندام هوایی را از ۰/۵۶ گرم شاهد به ۲/۴۹ گرم (۴/۴۵ برابر) افزایش داد. جدایه‌های N1، B13 و B15 با میانگین وزن خشک ۱/۸۹، ۱/۸۱ و ۱/۸۱ در گروه دوم آماری قرار گرفتند. کمترین اثر در جدایه B10 دیده شد که میانگین وزن خشک اندام هوایی را ۵۹ درصد افزایش داد. در صفت وزن خشک ریشه، جدایه B4، اختلاف آماری با دیگر جدایه‌ها داشت و میانگین وزن خشک ریشه را از ۰/۲۴ گرم شاهد، به ۱/۴۹ گرم (۵/۳۷ برابر) افزایش داد. اختلاف این جدایه با جدایه بعدی (B3)، ۰/۱۶ گرم بود. جدایه‌های N3، B11، B12 و N1، B6، کمترین اثر را در افزایش میانگین وزن خشک ریشه داشتند، اما با این وجود، این جدایه‌ها قادر بودند نسبت به شاهد آلوده، میانگین وزن خشک ریشه را به‌صورت معنی‌داری افزایش دهند. جدایه B12، به‌عنوان ضعیف‌ترین جدایه قادر بود میانگین وزن خشک ریشه را از ۰/۲۴ گرم، به ۰/۴۹ گرم (۱۰۴ درصد) افزایش دهد. در مجموع همه جدایه‌ها باعث افزایش معنی‌دار میانگین وزن خشک ریشه در حضور بیمارگر



شکل ۳- اثر تیمار با جدایه باکتری در مهار بیماری پژمردگی و پوسیدگی فوزاریومی نخود؛ ۱) شاهد آلوده به قارچ *Fusarium oxysporum* بدون حضور باکتری، ۲) تأثیر متقابل قارچ *F. oxysporum* و باکتری B2، ۳) شاهد آلوده در حضور قارچ *Fusarium solani* بدون جدایه باکتری، ۴) تأثیر متقابل قارچ *F. solani* و باکتری B6

Fig. 3. The effect of bacterial isolates in suppression of chickpea *Fusarium* wilt and root rot disease  
1) Control infected with *Fusarium oxysporum*, 2) *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* infected and B2 inoculated plant, 3) Control infected with *Fusarium solani*, 4) *F. solani* infected and B6 inoculated plant



شکل ۴- تأثیر جدایه‌های باکتری بر شاخص بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه نخود با عامل *Fusarium solani* در شرایط گلخانه  
ستون‌ها نشانگر میانگین ± انحراف معیار بوده و مقایسه میانگین، با روش حداقل تفاوت معنی‌دار و در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفته است.  
تیمارهای دارای حروف مشابه، اختلاف آماری معنی‌داری با هم ندارند.

Fig. 4. The effect of bacterial isolates on disease index of *Fusarium solani* root rot of chickpea in greenhouse  
Columns represent mean ± standard deviation. Means comparison analysis was done by Fisher protected LSD.  
Treatments with the same letters do not have significant difference.

اثر در جدایه N4 دیده شد که میانگین وزن خشک اندام هوایی را ۷۲ درصد افزایش داد. جدایه B3 به عنوان بهترین جدایه، میانگین وزن خشک ریشه را نسبت به شاهد، از ۰/۲۴ گرم، به

در جدایه‌های N1 و B5 به ترتیب میانگین وزن خشک اندام هوایی ۱/۸۴ و ۱/۷۷ گرم ثبت شد. در مجموع همه جدایه‌ها سبب افزایش معنی‌دار میانگین وزن خشک شدند و کمترین

منتخب قادر بودند در شرایط آزمایشگاه و گلخانه باعث کاهش قابل‌ملاحظه شاخص بیماری ناشی از هر دو قارچ بیمارگر شوند. جدایه‌های B13 و B2 شاخص بیماری *F. oxysporum* را به صورت قابل ملاحظه‌ای کاهش دادند. این جدایه‌ها به ترتیب متعلق به *Burkholderia* sp. و *Bacillus* sp. هستند. بهترین جدایه در مهار *F. solani* نیز B3 *B. pumilus* بود. جدایه *Bacillus* sp. از ناحیه ریزوسفر ریشه نخود استان کردستان (سنندج)، روستای سمیران جداسازی شده بود. در منابع موجود، گونه‌های باسیلوس به عنوان ریزوباکترهای مؤثر افزایش‌دهنده رشد و سلامت گیاه شناخته شده‌اند (Kumar et al., 2011). مکانیسم عمده بیوکنترلی باسیلوس را می‌توان به تولید متابولیت‌های مختلف از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد فرار ضدقارچی و القای مقاومت سیستمیک نسبت داد. آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند سوبتیلین و ایتورین از مهم‌ترین ترکیبات ضدقارچی این باکتری می‌باشند. آنتی‌بیوتیک مایکوسوبتیلین تولیدی توسط برخی از باسیلوس‌ها، باعث بیوکنترل بیماری مرگ گیاهچه گوجه‌فرنگی بوده است (Henis & Inbar, 1968; Leclère et al., 2005; Sharifi & Ryu, 2016a, Szczech & Shoda, 2006). قبلاً ترکیبات فرار باسیلوس نیز به عنوان متابولیت‌های غالب ضدقارچی در نظر گرفته می‌شدند، ولی مطالعات اخیر نشان داده است که این ترکیبات در غلظت‌های طبیعی خود بیشتر عامل القای مقاومت هستند تا مهار مستقیم قارچ‌های بیمارگر (Sharifi & Ryu, 2016b). در یک پژوهش، اثر جدایه‌هایی از *B. subtilis* *P. fluorescens* B. و قارچ کش بنومیل بر بیماری پژمردگی فوزاریومی نخود ایرانی با عامل *F. oxysporum* *ciceris* f.sp. بررسی شد. نتایج نشان داد که جدایه *B. subtilis* در خاک آلوده به قارچ نه تنها باعث افزایش رشد بوته‌های نخود شدند، بلکه شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی را نیز کاهش دادند (Jamali et al., 2005).

سویه *Burkholderia* sp. با کد شناسایی B13 از ناحیه ریزوسفر ریشه نخود استان کردستان، شهرستان دیواندره و روستای شالی‌شل جداسازی شد. این سویه باعث افزایش وزن خشک نسبت به شاهد شد. در منابع علمی *B. cepacia* به عنوان پروبیوتیکی که رشد گیاهان را افزایش می‌دهد، شناخته شده است (Hayat et al., 2010; Kang et al., 2012). هشت میکروارگانسیم توسط سازمان حفاظت از محیط‌زیست آمریکا ثبت شده که باعث افزایش رشد گیاهان می‌شوند و سویه *B. cepacia* MBI 600 جزو آن‌ها محسوب می‌شود (Kumar, et al. 2011). باکتری *B. cepacia* قادر بوده است با تولید پروتئاز، سیانید هیدروژن و سیدرفور از رشد

۱/۳۷ گرم (۵/۷ برابر) افزایش داد. جدایه‌های B4 و B5 میانگین وزن خشک ریشه را ۴/۵ برابر افزایش دادند. سویه‌های B1، B15، N4 و N2 کمترین اثر را در افزایش میانگین وزن خشک ریشه داشتند، ولی با این حال، این سویه‌ها نسبت به شاهد قادر بودند افزایش قابل توجهی در میانگین وزن خشک ریشه داشته باشند. اثر متقابل *F. solani* و جدایه B6 روی بوته نخود در شکل ۳ قابل مشاهده است.

#### شناسایی مولکولی باکتری‌های منتخب

بر اساس نتایج، جدایه‌های B2 و B13 بهترین تیمارها در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی (*F. oxysporum* f.sp. *ciceris*) بودند و جدایه B6 بهترین جدایه در مهار بیماری پوسیدگی فوزاریومی (*F. solani*) ریشه بود. جدایه B2 و B3 نیز بهترین جدایه در بهبود وزن خشک گیاه بود. این چهار جدایه که دارای نتایج مناسب بودند جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند. ناحیه 16S نمونه‌های انتخابی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تکثیر گردید. اندازه این قطعه برای باکتری‌ها در حدود ۱۵۰۰ جفت باز بود. با مشخص شدن صحت اندازه قطعات تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای 27F (جولبر) و 1492R (عقب‌بر) روی ژل آگاروز یک درصد، نمونه‌ها جهت توالی‌سنجی در جهت رفت ارسال گردیدند.

جدایه B2 با ۹۷ درصد شباهت به گونه *Bacillus* sp. با شماره دسترسی KM001604 از کشور کره نزدیک بود (Baby et al., 2013). جدایه B3 با ۹۹ درصد شباهت به گونه *Achromobacter* sp. با شماره دسترسی KU712016 از کشور کره نزدیک بود (You et al., 2017). جدایه B6 با ۹۸ درصد شباهت به گونه *B. pumilus* با شماره دسترسی KU501377 از کشور برزیل نزدیک بود (Tangerina et al., 2017). جدایه B13 با ۹۸ درصد شباهت به گونه *Burkholderia* sp. با شماره دسترسی KU860102 از کشور مصر نزدیک بود (Atef et al., 2016). مقایسه ترتیب توالی ژن *TEF-1a* جدایه‌های بیمارگر در بانک ژنی (GenBank) با ۹۷ و ۹۸ درصد، بیشترین شباهت را با *F. solani* و *F. oxysporum* f.sp. *ciceris* نشان داد.

کنترل شیمیایی عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد معمولاً مشکل و گاهی غیرممکن است. لذا جهت مهار این بیماری‌ها روش‌های جایگزین همچون تولید ارقام مقاوم و کنترل بیولوژیک، در حال توسعه است. باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست که در ناحیه ریزوسفر و فیلوسفر گیاهان وجود دارند، می‌توانند به عنوان جایگزینی مناسب و بی‌خطر برای کنترل شیمیایی در نظر گرفته شوند (Sharifi & Ryu, 2017). در این پژوهش، باکتری‌های

sp. جدا شده از ریشه گوجه‌فرنگی سبب کنترل پژمردگی آوندی با عامل *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* شده است (Moretti et al., 2008; Srinivasan et al., 2009).

#### نتیجه‌گیری

در مجموع مشاهده شد که جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش، کارایی متفاوتی در افزایش رشد قسمت‌های مختلف گیاه و در مهار بیماری‌گرهای متفاوت داشتند. جدایه *Bacillus* sp. بهترین باکتری در بهبود وزن خشک اندام‌های هوایی بود. در مقابل جدایه *Achromobacter* sp. B3 توانایی بالایی در افزایش وزن خشک ریشه داشت، ولی کارایی آن در بهبود رشد اندام‌های هوایی متوسط بود. یک متابولیت باکتری می‌تواند اثر دوگانه‌ای در تنظیم رشد داشته باشد. اکسین در مقدار بالا، رشد ریشه را زیاد می‌کند، ولی رشد قسمت‌های هوایی را کاهش می‌دهد (Sharifi & Ryu, 2017). این نقش دوگانه متابولیت‌های باکتری و حساسیت به آن‌ها در مورد قارچ‌های بیمارگر نیز دیده می‌شود (Glazebrook, 2005; Pieterse et al., 2009). با توجه به این موارد توصیه می‌شود در امر مهار بیماری‌های فوزاریومی ریشه که معمولاً به صورت توأم در مزرعه دیده می‌شوند، از ترکیبی از جدایه‌ها استفاده شود.

قارچ *Rhizoctonia solani* روی محیط کشت PDA جلوگیری نماید. باکتری *B. cepacia* باعث افزایش درصد جوانه‌زنی، طول ریشه و وزن تر بوته‌های لوبیا سه هفته پس از کاشت گردیده است (Ahmadzadeh et al., 2009).

جدایه *Achromobacter* sp. با کدشناسایی B3 از ناحیه ریزوسفر نخود و از شهرستان روانسر و روستای کلاه‌کبود جدا شد. این جدایه باعث افزایش قابل توجه میانگین وزن خشک ریشه شد. محققان سویه *A. xylosoxidans* را مورد استفاده قرار دادند که سبب بیش از ۵۰ درصد افزایش رشد در گوجه فرنگی نسبت به شاهد شد (Moretti et al., 2008). محققان (Mayak et al., 2004) در بررسی خود افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه گوجه‌فرنگی تحت شرایط تنش شوری را با استفاده از سویه *Achromobacter* sp. H14G6 مشاهده کردند. در پژوهش حاضر، این سویه باکتری سبب کنترل حدود ۶۵ درصد بیماری گردید. به دلیل توانایی القای مقاومت توسط این سویه می‌توان مکانیسم بازدارندگی را به القای مقاومت سیستمیک نسبت داد. چنانچه برخی محققان (Bertrand et al., 2000) مکانیسم اصلی مهار بیماری در یک سویه از این جنس را مربوط به القای مقاومت سیستمیک می‌دانند. به کاربردن گونه *A. xylosoxidans* روی نشای گوجه‌فرنگی سبب کنترل ۵۰ درصد بیماری *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* نسبت به شاهد شد. سویه *Achromobacter*

#### منابع

- Ahmadzadeh, M., Sharifi Tehrani, A., and Nabizadeh, M. 2009. Biological control of *Rhizoctonia Solani* Kuhn casual agent of common bean damping-off through *Burkholderia cpacia* (ex. Burk) Yabucchi. Iranian Journla of Plant Protection Science 39: 81-90.
- Baby, V., Rajakumar, S., and Ayyasamy, P. 2013. Reduction of ferric iron in synthetic medium amended with acetate as a sole carbon source. International Journl of Current Microbiology 2: 501-513.
- Bertrand, H., Plassard, C., Pinochet, X., Touraine, B., Normand, P., and Cleyet-Marel, J. 2000. Stimulation of the ionic transport system in *Brassica napus* by a plant growth-promoting rhizobacterium (*Achromobacter* sp.). Canadian Journal of Microbiology 46: 229-236.
- Cachinero, J., Hervás, A., Jiménez-Díaz, R., and Tena, M. 2002. Plant defence reactions against fusarium wilt in chickpea induced by incompatible race 0 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and nonhost isolates of *F. oxysporum*. Plant Pathology 51: 765-776.
- Ebrahimi Kazemabad, Z., Rohani, H., Jamali, F., and Mahdikhani Moghadam, E. 2013. Antagonistic effect of *Pseudomonas fluorescens* isolates against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Iranian Journal of Pulses Research 3: 1-10.
- Gerlach, W., and Nirenberg, H. 1982. The Genus *Fusarium*-A Pictorial Atlas Berlin-Dahlem.
- Glazebrook, J. 2005. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Reveiw of Phytopathology. 43: 205-227.
- Golpayegani, S., Zafari, D., and Khodakaramian, G. 2011. The Biological control of important faba bean root rot agents caused by rhizospheric antagonist bacteria. Iranian Journal of Plant Protection Science 41: 283-292.
- Hagedorn, C., Gould, W., and Bardinelli, T. 1989. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. Applied and Environmental Microbiology 55: 2793-2797.



10. Hartman, G., Huang, Y., Nelson, R., and Noel, G. 1997. Germplasm evaluation of *Glycine max* for resistance to *Fusarium solani*, the causal organism of sudden death syndrome. *Plant Disease* 81: 515-518.
11. Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., and Ahmed, I. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology* 60: 579-598.
12. Henis, Y., and Inbar, M. 1968. Effect of *Bacillus subtilis* on growth and sclerotium formation by *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology* 58: 933-938.
13. Jamali, F., Sharifi Tehrani, A., Okhovat, M., and Zakeri, Z. 2005. Effect of antagonistic bacteria on the control of Fusarium wilt of chickpea caused by *Fusarium oxysporum* under greenhouse conditions Iran *Journal of Agricultural Sciences* 36: 711-717.
14. Jiang, H., Dong, H., Zhang, G., Yu, B., Chapman, L.R., and Fields, M.W. 2006. Microbial diversity in water and sediment of Lake Chaka, an athallassohaline lake in northwestern China. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3832-3845.
15. Kang, S.M., Khan, A.L., Hamayun, M., Shinwari, Z.K., Kim, Y.H., Joo, G.J., and Lee, I.J. 2012. *Acinetobacter calcoaceticus* ameliorated plant growth and influenced gibberellins and functional biochemicals. *Pakistan Journal of Botany* 44: 365-372.
16. Kumar, A., Prakash, A., and Johri, B. 2011. *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. In: *Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems*. Springer. p. 37-59.
17. Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathélet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., and Jacques, P. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology* 71: 4577-4584.
18. Manafi Dizaji, R., Babay Ahari, A., Arzanlou, M., and Valizadeh, M. 2012. Assessment of resistance in tomato varieties under greenhouse conditions against Fusarium wilt, and biological control of the disease. *Journal of Agricultural Science And Sustainable Production* 22: 145-158.
19. Mayak, S., Tirosh, T., and Glick, B.R. 2004. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 565-572.
20. Moretti, M., Gilardi, G., Gullino, M., and Garibaldi, A. 2008. Biological control potential of *Achromobacter xylosoxydans* for suppressing Fusarium wilt of tomato. *International Journal of Botany* 4: 369-375.
21. Nakkeeran, S., Kavitha, K., Chandrasekar, G., Renukadevi, P., and Fernando, W. 2006. Induction of plant defence compounds by *Pseudomonas chlororaphis* PA23 and *Bacillus subtilis* BSCBE4 in controlling damping-off of hot pepper caused by *Pythium aphanidermatum*. *Biocontrol Science and Technology* 16: 403-416.
22. Naseby, D., Pascual, J., and Lynch, J. 2000. Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *Journal of Applied Microbiology* 88: 161-169.
23. Pieterse, C.M., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology* 5: 308-316.
24. Rademaker, J.L., and de Bruijn, F.J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. *DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews* 1: 151-171.
25. Serajzadeh, N., Khodakaramian, G., and Soleymani Pari, M.J. 2013. Interaction between root nodulating bacteria and *Fusarium solani* the causal agent of faba-bean root rot. *Scientific Journal Management System* 2: 1-8.
26. Shanthi, A.T., and Vittal, R.R. 2013. Biocontrol potentials of plant growth promoting rhizobacteria against Fusarium wilt disease of cucurbit. *International Journal of Phytopathology* 2: 155-161.
27. Sharifi, R., and Ryu, C.M. 2016a. Are bacterial volatile compounds poisonous odors to a fungal pathogen *Botrytis cinerea*, alarm signals to *Arabidopsis* seedlings for eliciting induced resistance, or both? *Frontiers in Microbiology* 7: DOI: 10.3389/fmicb.2016.00196.
28. Sharifi, R., and Ryu, C.M. 2016b. Making healthier or killing enemies? Bacterial volatile-elicited plant immunity plays major role upon protection of *Arabidopsis* than the direct pathogen inhibition. *Communicative & Integrative Biology*. DOI: 10.1080/19420889.2016.1197445.
29. Sharifi, R., DOI Ryu, C.M. 2017. Chatting with a tiny belowground member of the holobiome: communication between plants and growth-promoting Rhizobacteria. *Advances in Botanical Research* 82: 135-160.
30. Singh, P.K., Singh, M., Agnihotri, V., and Vyas, D. 2013. Arbuscular mycorrhizal fungi: biocontrol against Fusarium wilt of chickpea. *International Journal of Scientific Research Publication* 3: 1-5.

31. Srinivasan, K., Gilardi, G., Garibaldi, A., and Gullino, M. 2009. Bacterial antagonists from used rockwool soilless substrates suppress Fusarium wilt of tomato. *Journal of Plant Pathology* 147-154.
32. Szczech, M., and Shoda, M. 2006. The Effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Phytopathology* 154: 370-377.
33. Tangerina, M.M., Correa, H., Haltli, B., Vilegas, W., and Kerr, R.G. 2017. Bioprospecting from cultivable bacterial communities of marine sediment and invertebrates from the underexplored Ubatuba region of Brazil. *Archive of Microbiology* 199: 155-169.
34. Weller, D., and Cook, R. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 73: 463-469.
35. You, Y.H., Park, J.M., Yi, P.H., Back, C.G., Park, M.J., Han, K.S., Yoon, J.B., Kim, H.H., and Park, J.H. 2017. Microflora of phytopathogen-transferring *Bradysia agrestis*: a step toward finding ideal candidates for paratransgenesis. *Symbiosis* 71: 35-46.

## Biological control of chickpea *Fusarium* wilt and root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* with plant probiotic bacteria

Sohrabi<sup>1</sup>, M., Chehri<sup>2</sup>, Kh. & Sharifi<sup>3\*</sup>, R.

1. MSc. of Plant Biology, Department of Biology, Razi University, Kermanshah, Iran;  
masoodsohrabi13677@gmail.com

2. Assistant Professor of Mycology, Department of Biology, Razi University, Kermanshah, Iran; khchehri@gmail.com

3. Assistant Professor of Biological Control, Department of Plant Protection, Razi University, Kermanshah

Received: 14 January 2018

Accepted: 24 September 2018

DOI: 10.22067/ijpr.v11i1.70081

### Introduction

Wilt and root rot diseases caused by *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* are among the most important diseases of chickpea throughout the world and Iran. However, there is not effective chemical fungicide against these soil-borne pathogenic fungi. In recent years, rhizospheric bacteria and fungi developed as promising biofungicides against soil-borne plant pathogens. These microbes exploit several mechanisms such as antibiotics, volatile organic compounds, siderophore and induced systemic resistance to suppress pathogenic fungi. Recently, the cost of agrochemical innovation and the period of time for their registration have increased rapidly due to stringent legislation, both of these reasons favor investment in the manufacture of biopesticides. The annual progress rate of the biopesticide bazaar is more than 16%, but that of synthetic pesticides has been decreasing by 1.5% annually. Biopesticide companies such as Agroquest, Gustafson, Marrone Bio Innovation, Certis, BioWorks, Becker Underwood, ABiTEP GmbH, and Propytha have released effective biopesticides to the market. Agrochemical great-companies such as Bayer CropScience have also been engrossed in the bio-pesticide market. Bayer CropScience bought Agroquest in 2012 at a price of 425 million US dollars. Overall, biological control of plant pathogens is promising technology in management of plant disease in sustainable agriculture.

### Materials & Methods

In this study, potential of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) were investigated on biological control of this diseases in laboratory and greenhouse condition. Soil samples were collected from chickpea fields in Kermanshah and Kurdistan provinces. The effect of isolated bacteria were assessed on mycelial growth of *F. oxysporum* and *F. solani* in dual culture test. The chickpea seeds were inoculated by 10<sup>9</sup> CFU/ml of each bacterial isolates and sown in pots. The effect of bacterial isolates have been investigated on plant growth factors in greenhouse situation. The same experiment was conducted to assess the biocontrol ability of selected isolates against *Fusarium* wilt and root rot disease of chickpea. The greenhouse experiments were conducted based on completely randomized design with four replicates. Data were subjected to analysis of variance procedure in SAS ver. 9.1 software and means comparison analysis was done by Fisher protected LSD. Finally, the 16S rDNA of the four selected isolates, B2, B3, B6 and B13 were sequenced and identified based on Genbank data.

### Results & Discussion

Sixteen out of 100 isolated inhibited the growth of both fungi *in vitro*. Isolates B13 with 11 mm inhibition zone had the highest growth inhibition activity against *F. oxysporum*. In absence of pathogens, B2 increased aerial part dry weight from 1.08 to 3.69 g in greenhouse condition. B3 and B4 were the best isolates in improving root growth. They increase root dry weight to 1.42 and 1.36 g, respectively. B2 and B13 isolates had the greatest effect on plant health and reduced disease severity up to 90% in *F. oxysporum* inoculated plants. The lowest biocontrol activity against *F. oxysporum* was recorded for isolate B6. B2 increased aerial part fresh weight from 0.56 to 2.49 g, root fresh weight from 0.24 to 1.31 g. B6 was the best isolate for suppression of *F. solani* and reduced the disease index by 73%. This isolate increased aerial

\*Corresponding Author: r.sharifi@razi.ac.ir

---

organs fresh weight as up to 3.2 folds and root fresh weight up to 2.9 folds. However, all of bacteria isolates were able to reduce *Fusarium* root rot disease, significantly. Isolates B2, B3, B6 and B13 were characterized as *Bacillus* sp., *Achromobacter* sp., *Bacillus pumilus* and *Burkholderia* sp. based on 16S rDNA sequencing, respectively. *Bacillus* spp. strains exploit several mechanisms such as antibiosis, volatile organic compound production and induced systemic resistance against plant pathogens. These bacteria are good candidate to be formulated in spore suspension form. Here, *Achromobacter* introduced as good candidate for biological control of *Fusarium* diseases of chickpea for first time. Overall, plant probiotic bacteria could be consider as promising approach in management of chickpea *Fusarium* diseases.

### Conclusion

Bacterial isolates have different ability in plant growth improvement and suppression of plant pathogens. *Bacillus* sp. was the best isolate for enhancing the shoot dry weight while *Achromobacter* sp. was the best to improving root dry weight. Indeed, bacteria have several mechanisms for promoting plant growth. Auxin induction by volatiles of *Bacillus* spp. increase root while decreasing the shoot accumulation of auxin. Overall, consortia of bacteria strains seems to be promising approach to suppression of both diseases in chickpea.

**Keywords:** Biological Control, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, PGPR, Sustainable Agriculture