

کنترل بیولوژیک *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* عامل زردی و پژمردگی فوزاریومی نخود توسط ترکیب برخی عوامل میکروبی

ناهید معرفزاده^{۱*}، روح اله شریفی^۱، هادی خاطری^۱ و سعید عباسی^۲

۱- استادیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

۲- دانشیار بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۰۵)

چکیده

زردی و پژمردگی فوزاریومی ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* یکی از مهم ترین بیماری های نخود است. در این پژوهش اثر کاربرد جداگانه و ترکیبی قارچ *Trichoderma harzianum* T33، باکتری *Pseudomonas putida* RUP1 و میکوریز *Rhizophagus intraradices* بر مهار این بیمارگر و تأثیر آن ها بر فاکتورهای رشدی نخود در حضور بیمارگر در گلخانه و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. به استثنای تیمار ترکیبی سه گانه (متشکل از سه عامل بیوکنترل)، همه تیمارها در مقایسه با شاهد بیمار سبب کاهش معنی دار علائم زردی قسمت های هوایی و نکرور آوندی ناشی از بیمارگر و نیز افزایش حجم و وزن خشک ریشه و اندام هوایی شدند. همچنین به جز تیمار سه گانه و تیمار ترکیبی *R. intraradices* و *T. harzianum* T33 سایرین وزن تر ریشه و اندام هوایی را نیز افزایش دادند. میکوریز *R. intraradices* توانست ریشه های نخود را در حضور بیمارگر به میزان ۶۰ درصد و در غیاب بیمارگر به میزان ۷۴ درصد کلونیزه نماید. ترکیب دوگانه سویه های بیوکنترلی با وجود سازگار بودن، اثر هم افزایی در بهبود کارایی بیوکنترل و تحریک رشد گیاه نداشت و ترکیب سه گانه این عوامل، فاقد قابلیت بیوکنترلی و یا افزایش فاکتورهای رشدی نخود بود. این پژوهش نشان داد ترکیب عوامل بیوکنترل همیشه هم افزا یا کارآمد نیست.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک های گیاهی، میکوریز، کنترل بیولوژیک، بیمارگرهای گیاهی، تحریک رشد.

Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, the causal agent of the fusarial yellowing and wilting of chickpea by mixtures of some microbial agents

Nahid Moarrefzadeh^{1*}, Rouhallah Sharifi¹, Hadi Khateri¹ and Saeed Abbasi²

1. Assistant professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi university, Kermanshah, Iran.

2. Associate professor of Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

(Received: : November 17, 2020 - Accepted: Febr 21, 2021)

ABSTRACT

Fusarial yellowing and wilting caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* is one of the most important diseases of chickpea. The effects of separate and combined applications of *Trichoderma harzianum* T33, *Pseudomonas putida* RUP1 and *Rhizophagus intraradices* were evaluated on suppression of this disease and improving growth factors of chickpea in the presence of the pathogen. The experiments were conducted in greenhouse in a completely randomized design with four replications. Except for the triple treatment (consisting of three biocontrol agents), all treatments significantly reduced the yellowing symptoms of foliage and vascular necrosis caused by the pathogen and also increased the roots volume and dry weight and shoot dry weight. Also, in addition to the triple treatment and the combined treatment of *R. intraradices* and *T. harzianum* T33, other biocontrol treatments increased the fresh weight of roots and shoots. *R. intraradices* was able to colonize 60% and 74% of chickpea roots in the presence and absence of the pathogen, respectively. Despite their compatibility, the dual combination of biocontrol strains did not have a synergistic effect in improving biocontrol efficiency and chickpea growth promoting, and the triple combination of these factors did not have biocontrol capability or plant growth promoting. This study showed that the combination of biocontrol agents is not always synergistic or efficient.

Keywords: Plant Probiotics, Mycorrhiza, Biological Control, Plant Pathogens, Growth Stimulation.

مقدمه

علاوه بر فعالیت آنتاگونیستی و کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای خاکزاد، سبب افزایش رشد آن گردند (Landa et al. 2004, Idris et al. 2007, Elmahdi et al. 2015).

طی سالیان اخیر تلاش‌های متعددی به منظور یافتن موجوداتی با قابلیت بیوکنترل *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* انجام شده و گزارش‌های مختلفی در این زمینه ارائه گردیده است. به عنوان مثال، عملکرد مثبت برخی جدایه‌های *Pseudomonas* spp تحت شرایط کنترل شده آزمایشگاه و گلخانه و گاه مزرعه، در مانع از رشد این بیمارگر و افزایش شاخص‌های رشدی بوته‌های نخود به اثبات رسیده است (Vidhyasekaran and Muthamilan 1995, Nautiyal et al. 2012). بررسی قابلیت گونه‌هایی از قارچ *Trichoderma* در برابر این بیمارگر نشان داده که نه تنها در زمینه مهار این بیماری تحت شرایط گلخانه و یا مزرعه بسیار نویدبخش بوده‌اند، بلکه سبب افزایش جوانه‌زنی بذر و رشد گیاه نیز گشته‌اند (Kaur and Mukhopadhyay 1992, Dubey et al. 2007). قارچ‌های میکوریزی دارسانه‌ای (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF) نیز در حفاظت از نخود در برابر پژمردگی فوزاریومی نقش داشته و سبب افزایش عملکرد آن شده‌اند (Singh et al. 2013).

اکثر راهبردهای مهار زیستی عوامل بیماری‌زای خاکزاد به یک عامل میکروبی منفرد متکی هستند که دارای طیف فعالیت نسبتاً کمی در مقایسه با آفت‌کش‌های مصنوعی بوده و ممکن است در شرایط متغیر محیط علیه همه عوامل بیماری‌زا فعال نباشد و یا به دلیل کلنی‌زاسیون ناکافی، قابلیت بروز اثرات مفید خود را از دست بدهد و باعث عملکرد ناپایدار عوامل بیوکنترل شود. یکی از رویکردهای غلبه بر این ناپایداری، استفاده از ترکیب عوامل زیستی با الگوهای مختلف کلنی‌زاسیون گیاهان است که از طریق مکانیسم‌های مختلف مهار بیماری یا داشتن چند ویژگی افزایش‌دهنده رشد بتوانند در طیف وسیعی از شرایط محیطی در کنترل بیمارگرهای مختلف و رشد گیاه مفید باشند (Akhtar and Siddiqui 2008a, Szczech et al. 2017).

گیاه نخود (*Cicer arietinum*. L) یکی از مهم‌ترین منابع پروتئینی رژیم غذایی انسان می‌باشد (Gaur et al. 2012). این گیاه، میزبان عوامل بیماری‌زای گیاهی متعددی است که زردی و پژمردگی فوزاریومی نخود، *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* از مهم‌ترین آن‌هاست (Abera et al. 2011). خسارت سالانه ناشی از این بیماری بر عملکرد نخود بسته به شرایط محیطی بین ۱۰ تا ۱۵ درصد برآورد شده اما گاه در شرایط مساعد، اپیدمی‌های این بیماری قادرند کل محصول را نابود نمایند (Jimenez-Fernandez et al. 2013). این بیماری سبب پژمردگی، زردی، تغییر رنگ آوندی و حتی مرگ گیاه می‌شود (Tekeoglu et al. 2017). برای کنترل این بیماری خاکزاد از اقدامات مدیریتی متعددی استفاده می‌شود. یکی از اقتصادی‌ترین و عملی‌ترین این روش‌ها کشت ارقام مقاوم است (Jendoubi et al. 2017)، اما اثر این راهبرد مدیریتی ممکن است با تغییرپذیری زیاد در جمعیت بیمارگر کاهش یابد (Jimenez-Fernandez et al. 2013). استفاده از تناوب زراعی نیز در برخی موارد غیراقتصادی بوده (Mavrodi et al. 2017) و به دلیل دوام طولانی مدت کلأمیدوسپور گونه‌های فوزاریوم در خاک، پتانسیل کمی برای مدیریت این بیماری دارد (Harvas et al. 1997). کنترل شیمیایی نیز علاوه بر غیراقتصادی بودن، کارآیی لازم علیه بیمارگرهای خاکزاد را ندارد. از سوی دیگر، تداوم کاربرد این روش سبب توسعه مقاومت در بیمارگر شده و اثرات منفی بر کیفیت محصولات غذایی و محیط‌زیست و موجودات مفید غیرهدف دارد (Dubey et al. 2007, Elmahdi et al. 2015, Mavrodi et al. 2017). استفاده از میکروارگانسیم‌های مفید کلنیزه کننده ریزوسفر یکی از روش‌هایی است که برخلاف مواد شیمیایی، بقایای سمی برجای نمی‌گذارد (Dubey et al. 2007) و محققان جهت مدیریت تلفیقی این بیماری به دنبال روش‌های سالم، کم‌هزینه و کم‌خطر برای محیط‌زیست هستند. همچنین این موجودات قادرند با برهمکنش‌های متقابل سودمند خود با گیاه،

و *P. putida* RUP1 باکتری *T. harzianum* T33 میکوریز *R. intraradices* بر مهار این بیمارگر خاکزاد و نیز تأثیرشان بر رشد نخود در حضور بیمارگر در شرایط گلخانه انجام شد.

مواد و روشها

تهیه جدایه بیمارگر و سویه های کنترل بیولوژیک

یک جدایه از قارچ *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* از مجموعه قارچ های بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی تهیه شد. شناسایی این جدایه پیش تر بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی انجام شده و بیماری زایی آن روی نخود اثبات گردیده است. قارچ میکوریز *R. intraradices* از شرکت زیست فناور توران (شاهرود) و قارچ *T. harzianum* T33 نیز از بخش گیاهپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی استان کرمانشاه دریافت گردید. باکتری *P. putida* RUP1 از کلکسیون باکتری های آنتاگونیست بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی تهیه شد.

بررسی اثر عوامل میکروبی روی شدت بیماری ناشی از *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* و پارامترهای رشدی نخود در شرایط گلخانه

تهیه مایه تلقیح جدایه های قارچی و باکتریایی

به منظور تهیه مایه تلقیح قارچ بیماریزای *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* و قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T33 پنج قرص آگار ده میلی متری از کشت این قارچ ها روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار به فلاسک های حاوی ترکیب دو بار سترون (شامل ۱۰۰ میلی لیتر ورمیکولیت، ۵۰ میلی لیتر سبوس گندم و ۱۰۰ میلی لیتر عصاره سیب زمینی دکستروز) اضافه شد. سپس فلاسک ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت دو هفته نگهداری گردیدند. برای تهیه مایه تلقیح باکتری یک لوپ پر از کشت ۴۸ ساعته باکتری رشد کرده روی محیط آگار غذایی، به فلاسک حاوی محیط مایع (nutrient broth NB) اضافه گردید و روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۲۰ دور

2008, Atwa 2018, Etesami and Maheshwari (2018). همچنین، ترکیب عوامل بیوکنترلی مختلف از نظر تاکسونومیک که از نظر دما، pH و رطوبت شرایط بهینه متفاوتی دارند، ممکن است ریشه ها را با توانایی بیشتری کلنیزه کنند و رشد گیاه و اثربخشی بیوکنترل را بهبود بخشند (Akhtar and Siddiqui 2008a). به عنوان مثال، گزارش شده است که *Trichoderma koningii* در ترکیب با برخی سودوموناس های فلورسنت بیماری پاخوره گندم را کارآمدتر از زمانی که به تنهایی استفاده شود، مهار می کند (Duffy et al. 1996). تیمار ترکیبی *T. harzianum* و *Rhizophagus intraradices* (با نام قبلی *Glomus intraradices*) نیز در مقایسه با تیمارهای تلقیحی منفرد یا شاهد، سبب کاهش معنی دار آلودگی به بیمارگر خاکزاد *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* در گوجه فرنگی گردید (Mbuthia et al. 2019). راجاموهان و همکاران نیز کاربرد ترکیبی تیمارهای بیوکنترلی *Trichoderma* *G. mosseae* و *P. fluorescens viride* را نسبت به تیمارهای فردی کارآمدتر یافتند (Rajamohan et al. 2019). هرچند که در بسیاری از منابع علمی به استفاده از ترکیب آنتاگونیست ها توصیه شده است، باین حال باید اطمینان حاصل نمود که عوامل به کار رفته در سیستمی که این روش قرار است اعمال شود، با هم سازگار بوده و تأثیر آنتاگونیستی بر یکدیگر ندارند (Martínez-Medina et al. 2009). طی بررسی های پیشین نویسندگان، یک سویه قارچ *Trichoderma harzianum* و یک سویه باکتری *Pseudomonas putida* RUP1 از پتانسیل خوبی در مهار پژمردگی فوزاریومی ناشی از *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* و تقویت رشد نخود برخوردار بوده اند (اطلاعات منتشر نشده). از سوی دیگر اهمیت میکوریزها در مهار زیستی برخی بیمارگرهای فوزاریومی نخود قبلاً به اثبات رسیده است (Singh et al. 2015, Sohrabi et al. 2013). بر اساس نکات مذکور و اهمیتی که *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در کاهش کیفیت و کمیت محصول نخود دارد، پژوهش حاضر با هدف مقایسه اثر کاربرد منفرد و ترکیبی قارچ

نیز سوسپانسیون باکتری‌ها به صورت تیمار اولین آبیاری به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر به هر گلدان اضافه شد. در تیمار شاهد از بستر کشت پایه بدون عوامل بیوکنترل استفاده شد.

مایه‌زنی بیمارگر در مجاورت ریشه نخود، دو هفته پس از کشت بذرها و مطابق روش جاسم و همکاران انجام شد (Jasem *et al.* 2018). گلدان‌ها تا زمان ظهور نشانه‌های بیماری، با چیدمان کاملاً تصادفی در شرایط گلخانه (5 ± 20 درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور) نگهداری شدند و آبیاری آن‌ها یک روز در میان با جریان بسیار ملایم آب حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام کود کامل (NPK+TE, 20-20-20) انجام شد.

اندازه‌گیری شاخص بیماری و فاکتورهای رشدی گیاهان مربوط به تیمارهای مختلف

هشت هفته پس از زمان کاشت، گیاهان مربوط به تیمارهای مختلف به آرامی از گلدان خارج گردیده و پس از شستشوی کامل ریشه، شاخص‌های شدت علائم بیماری، حجم، وزن تر و وزن خشک ریشه و همچنین وزن تر و وزن خشک اندام هوایی در آن‌ها اندازه‌گیری شد. برای ارزش‌گذاری شدت بیماری، از دو شاخص زردی بوته و نکروز آوندی استفاده شد؛ شاخص زردی بوته مطابق روش هوانگ و همکاران محاسبه گردید: ۰: بدون زردی در قسمت‌های هوایی، ۱: تا ۲۵ درصد زردی قسمت‌های هوایی، ۲: بین ۲۵ تا ۵۰ درصد زردی در قسمت‌های هوایی، ۳: بین ۵۰ تا ۷۵ درصد زردی قسمت‌های هوایی و ۴: بین ۷۵ تا ۱۰۰ درصد زردی قسمت‌های هوایی (Hwang *et al.* 1994). شاخص نکروز آوندی نیز مطابق روش آرورا و پندی ارزیابی شد؛ ۱: فاقد تغییر رنگ در آوند چوبی، ۲: ناحیه تغییر رنگ یا قهوه‌ای شدن آوند چوبی بین ۵-۱۰ میلی‌متر، ۳: ناحیه تغییر رنگ آوند چوبی به صورت متراکم و بین ۱۰-۱۵ میلی‌متر، ۴: ناحیه تغییر رنگ آوند چوبی کاملاً متراکم و دارای خطوطی بیش از ۱۵ میلی‌متر (Arora and Pandey 1989).

داده‌های به‌دست‌آمده توسط نرم‌افزار SAS (نسخه ۹.۳) و در قالب طرح تصادفی تجزیه و تحلیل

در دقیقه به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت. اندازه‌گیری جمعیت سلول‌های باکتریایی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر انجام شد و غلظت آن روی 10^8 سلول باکتری در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید.

آزمایش جدایه‌های بیوکنترلی در گلخانه

بررسی اثر منفرد و ترکیبی آنتاگونیست‌ها در مهار *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* و تأثیر آن‌ها بر فاکتورهای رشدی گیاه نخود در حضور بیمارگر، در شرایط گلخانه با روش گلدانی و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و نه تیمار (جدول ۱) انجام شد. از ترکیب پرلیت و پیت‌ماس سترون به نسبت ۲:۱ به عنوان بستر پایه و گلدان‌های پلاستیکی به حجم یک لیتر با قطر دهانه ۱۲ سانتی‌متر برای کشت گیاه استفاده شد. بذور نخود رقم سرال پس از ضدعفونی سطحی با الکل ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم دو درصد و شستشو با آب مقطر (Nasir Hussein *et al.* 2018)، به مدت ۳۶ ساعت در پلیت‌های سترون حاوی کاغذ صافی و لایه نازکی از آب مقطر قرار گرفتند تا جوانه ریشه‌چه آن‌ها ظاهر شود. افزودن مایه تلقیح جدایه‌های بیوکنترلی به بستر کشت پایه درست در هنگام کاشت بذور در گلدان صورت گرفت. مایه تلقیح *T. harzianum* T33 به نسبت ۱ به ۱۵ (حجمی) و مایه تلقیح میکوریز به میزان ۵۰ گرم به ازای هر گلدان، با بستر کشت مخلوط شدند (هر گرم از خاک حاوی میکوریز حاوی ۱۰۰ عدد اسپور قارچ بود). گلدان‌ها به اندازه تقریبی سه‌چهارم گنجایش با بستر کشت پایه (پیت‌ماس و پرلیت سترون) که با مایه یک یا هر دو عامل بیوکنترل قارچی مخلوط شده بود، پر شدند. سپس پنج عدد بذر نخود در هر گلدان قرار داده شدند و روی بذور با لایه نازکی از پیت‌ماس و پرلیت سترون پوشانده شد. بعداً پس از اطمینان از سبز شدن بذور، یک گیاهچه حذف گردید. در تیمارهایی که شامل باکتری *P. putida* RUP1 بودند، بذره‌های جوانه‌زده به مدت یک ساعت در سوسپانسیون حاوی 10^8 سلول باکتری در میلی‌لیتر قرار گرفتند و پس از کشت بذور

(Sohrabi et al. 2015).

نتایج

اثر عوامل آنتاگونیستی بر شاخص های بیماری در

شرایط گلخانه

مطابق نتایج (شکل A1) و (شکل B1)، به جز تیمار ترکیب سه عامل بیوکنترل *T. harzianum* T33، *R. intraradices* و *P. putida* RUP1 (Th+Pp+Ri) که در هر دو شاخص زردی و نکروز آوندی تفاوت معنی داری با شاهد آلوده نداشت، سایر تیمارها در سطح احتمال پنج درصد سبب کاهش معنی دار علائم زردی قسمت های هوایی و نکروز آوندی ناشی از *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* گیاه شدند. در شاخص زردی بین سایر تیمارهای بیوکنترلی اختلاف معنی داری مشاهده نشد و حداکثر میزان مهار این شاخص در تیمار *T. harzianum* T33 (۴۵.۲ درصد) دیده شد. این تیمار بیشترین اثر را در کاهش نکروز آوندی نیز نشان داد (۵۰ درصد) و غیر از تیمار ترکیبی *T. harzianum* T33 و *R. intraradices* (Th+Ri) اختلاف معنی داری با سایر تیمارها نداشت.

اثر عوامل آنتاگونیستی بر تحریک رشد نخود در

حضور بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp.

ciceris در شرایط گلخانه

اثر عوامل بیوکنترلی به تنهایی یا به صورت ترکیب با هم، بر فاکتورهای رشدی نخود در حضور بیمارگر بررسی شد. به استثنای تیمار ترکیبی Th+Pp+Ri سایر تیمارها در سطح احتمال پنج درصد در حضور *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در میان این تیمارها به استثنای تیمار ترکیبی *T. harzianum* T33 و *R. intraradices* (Th+Ri) سایرین حجم ریشه را نسبت به شاهد سالم نیز افزایش دادند (جدول ۱). تیمارهای منفرد *P. putida* RUP1 و *R. intraradices* به ترتیب حجم ریشه را ۳۰۹۷ و ۳۰۲۷ برابر نسبت به شاهد بیمار افزایش داده و بهتر از سایرین عمل نمودند. همچنین به جز تیمارهای ترکیبی Th+Pp+Ri و Th+Ri سایر تیمارها سبب افزایش وزن تر ریشه شدند و *P. putida* (RUP1) برابر نسبت به شاهد بیمار بهتر از

شدند. برای مقایسه میانگین ها از آزمون چند دامنه ای دانکن استفاده گردید و سطح احتمال آماری در کلیه محاسبات پنج درصد در نظر گرفته شد.

تعیین درصد کلنیزاسیون ریشه های نخود توسط

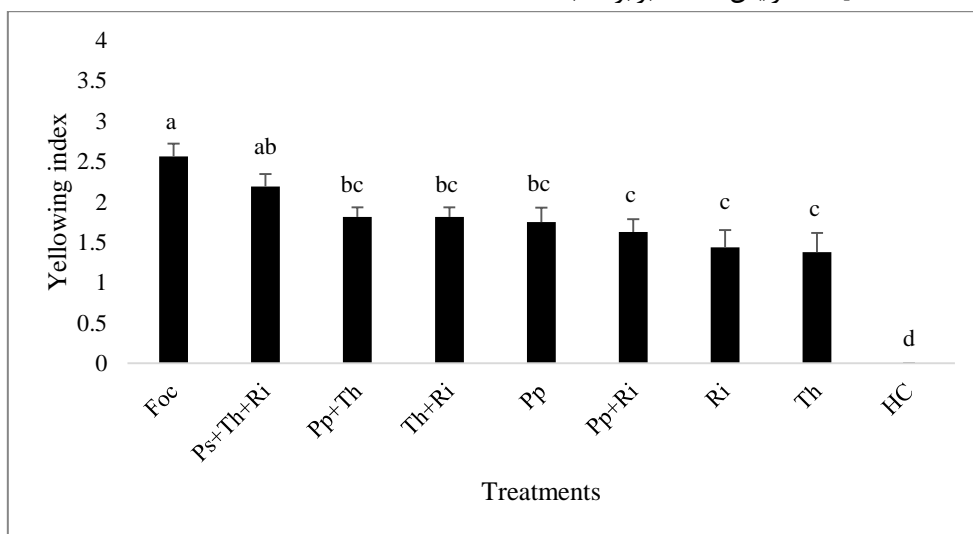
R. intraradices میکوریز

بذرهای نخود در دو سری گلدان چهارتایی که حاوی بستر کشت پایه به اضافه میکوریز بودند، کشت شدند و پس از دو هفته به یک سری از آن ها بیمارگر افزوده شد. دو ماه پس از کاشت، ریشه ها از خاک خارج گردیدند. به منظور تعیین میزان کلنیزاسیون ریشه های نخود توسط میکوریز *R. intraradices* و اثر بیمارگر بر میزان میکوریزی شدن ریشه، از روش فیلیپس و هایمن (۱۹۷۰) استفاده شد با این تفاوت که به جای محلول تریپان بلو در لاکتوفنل، از محلول اسید فوشین در لاکتوگلیسرول استفاده گردید. به طور خلاصه، یک گرم از ریشه های جوان هر گلدان جدا گردید و با آب مقطر به طور کامل شسته شد. ریشه ها به قطعات یک سانتیمتری خرد شده و به لوله های حاوی هیدروکسید پتاسیم ۱۰ درصد انتقال یافتند. جهت رنگ بری، ریشه ها به مدت یک ساعت در حمام آب گرم دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. نمونه ها چند مرتبه به طور کامل با آب شسته شده و به مدت ۵ دقیقه در محلول اسید کلریدریک یک درصد قرار گرفتند. سپس بدون شست و شو به مدت یک ساعت به محلول لاکتوگلیسرول اسید فوشین ۰/۰۱ درصد منتقل شده و یک ساعت در حمام آب گرم با دمای ۹۰ درجه سلسیوس و سپس جهت رنگ بری به مدت ۳۰ دقیقه در محلول لاکتوگلیسرول قرار گرفتند.

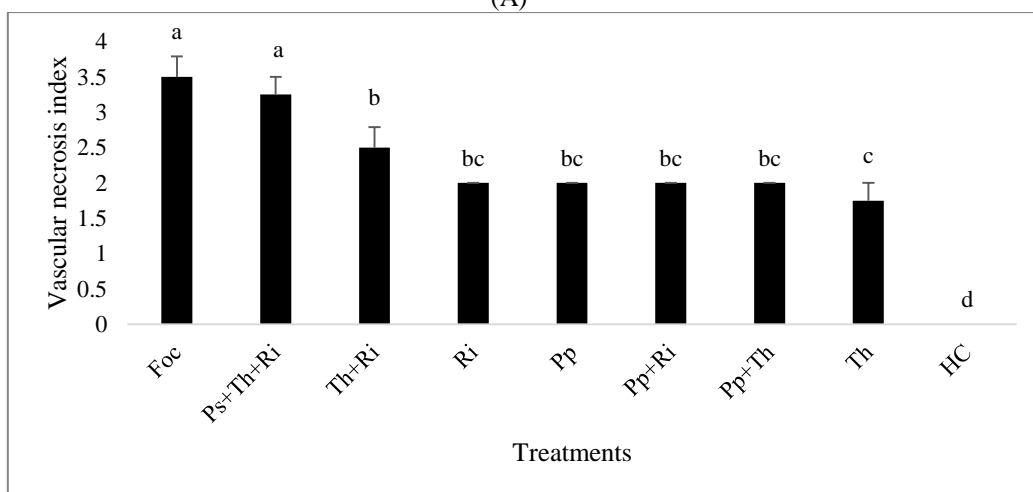
برای بررسی میزان کلنیزاسیون، ۱۰۰ قطعه از ریشه های رنگ آمیزی شده هر تیمار روی لام منتقل شده و با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰۰ و ۴۰۰ از نظر وجود کلامیدوسپور، هیف، وزیکول و دارسانه *R. intraradices* بررسی شدند و شمارش ریشه های آلوده و غیر آلوده انجام شد. درصد کلنیزاسیون ریشه با تقسیم نمودن مجموع ریشه های آلوده به میکوریز به مجموع کل ریشه ها ضرب در ۱۰۰، تعیین گردید

به شاهد بیمار) بهترین تیمار بود و نسبت به شاهد سالم نیز این شاخص را (۱۰۱۶ برابر) افزایش داد.

سایرین عمل نمود. وزن خشک ریشه نیز توسط کلیه تیمارها به استثنای تیمار ترکیبی Th+Pp+Ri افزایش یافت و *P. putida* RUP1 (افزایش ۳۰۷۵ برابر نسبت



(A)



(B)

شکل ۱ - اثر سویه‌های بیوکنترلی بر شدت زردی (A) و تغییر رنگ آوندی (B) ناشی از قارچ (*Fusarium oxysporum* f. *sp. ciceris*) روی بوته‌های نخود در گلخانه. تیمار سویه‌های بیوکنترلی درست در زمان کاشت بذور نخود در گلدان‌ها و مایه‌زنی بیمارگرها دو هفته پس از آن صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری فاقد اختلاف معنی‌دار با هم می‌باشند.

Figure 1. Effects of the biocontrol strains on severity of yellowing (A) and discoloration of vascular tissues (B) caused by *Fusarium oxysporum* f. *sp. ciceris* on chickpea plants in greenhouse. Biocontrol strains treatments were applied right at the time of planting chickpea seeds in pots, but inoculation of pathogen was done two weeks later. Mean comparison analyses were done by Duncan test at 5% probability level. Means with at least the same letters have no significant difference.

Foc = *Fusarium oxysporum* f. *sp. ciceris* is the infected control, Pp = *Pseudomonas putida* RUP1, Ri = *Rhizophagus intraradices*, Th = *Trichoderma harzianum* T33 and HC = healthy control.

و Th+Ri سبب افزایش وزن تر اندام هوایی شدند که تیمار ترکیبی *T. harzianum* T33 و *P. putida* تیمارهای منفرد *T. harzianum* (RUP1) و تیمارهای منفرد

تیمار Th+Ri نیز با وجود افزایش این شاخص، نسبت به سایر تیمارها ضعیف‌تر عمل نمود. علاوه بر این، کلیه تیمارها به جز تیمارهای ترکیبی Th+Pp+Ri

تیمارها به جز تیمار ترکیبی Th+Pp+Ri افزایش یافت و به جز تیمار ترکیبی Th+Ri و *P. putida* RUP1 سایرین این فاکتور را نسبت به شاهد سالم نیز حداقل ۱۰۲۷ برابر افزایش دادند.

T33 و *R. intraradices* بهتر از سایر تیمارها عمل نموده و به ترتیب این شاخص را ۲۰۶۱، ۲۰۴۷ و ۲۰۳۳ برابر شاهد بیمار افزایش دادند و سبب افزایش معنی دار این شاخص نسبت به شاهد سالم نیز گردیدند. وزن خشک اندام هوایی نیز توسط همه

جدول ۱ - اثر تیمارهای جداگانه و ترکیبی سویه های بیوکنترلی بر پارامترهای رشدی نخود در حضور بیمارگر *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* در گلخانه.

Table 2. The effect of separate and combined treatments of biocontrol strains on chickpea growth parameters in the presence of *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* in greenhouse.

Treatment	Root volume (ml)	Root wet weight (gr)	Root dry weight (gr)	Foliage dry weight (gr)	Foliage wet weight (gr)
Foc	4.78 e	3.94 cd	0.36 d	2.09 e	9.11 e
HC	12.76 c	11.84 b	1.157 b	3.45 cb	16.49 cd
Th	14.86 bc	13.52 b	1.14 b	4.45 a	22.52 ab
Pp	18.98 a	18.15 a	1.35 a	4.02 ab	18.35 bc
Ri	15.63 b	12.89 b	1.22 ab	4.41 a	21.29 ab
Th+Pp	14.12 bc	13.59 b	1.07 b	4.46 a	23.77 a
Th+Ri	6.96 d	6.15 c	0.66 c	3.03 cd	13.16 de
Pp+Ri	13.17 c	11.71 b	1.1 b	4.51 a	20.03 abc
Th+Pp+Ri	3.98 e	3.1 d	0.32 d	2.57 de	9.77 e

اعداد جدول میانگین چهار تکرار می باشند. حروف غیرمشترک موجود در کنار اعداد هر ستون، نشان دهنده تفاوت آماری معنی دار تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

Data are means of 4 replicates. Different characters besides the numbers in each column indicate statistically significant difference at 5% probability level according to Duncan test.

Foc = *Fusarium oxysporum f. sp. ciceris* is the infected control, Pp = *Pseudomonas putida* RUP1, Ri = *Rhizoglyphus intraradices*, Th = *Trichoderma harzianum* T33 and HC = healthy control.

مانند بیوکنترل بیماری های گیاهی توسط میکروارگانیسم های محرک رشد گیاه به عنوان بخشی از مدیریت تلفیقی این قبیل بیماری ها افزایش چشمگیری یافته است (Elshahat et al. 2016, Matrood et al. 2020). در میان این عوامل، AMF و برخی اعضای جنس سودوموناس و تریکودرما از رایج ترین مایه های زیستی استفاده شده در بیوکنترل بیمارگرهای گیاهی و تحریک رشد گیاه هستند (Garbeva et al. 2004, Costa et al. 2006, Singh et al. 2011). از راهبردهایی که به منظور غلبه بر عملکرد متغیر عوامل کنترل بیولوژیک و کنترل بهتر بیماری های گیاهی و بهبود عملکرد محصول توسط آنها وجود دارد، استفاده از ترکیبی از این عوامل است که مکانیزم های مختلفی برای کنترل بیماری های گیاهی داشته یا توانایی کلنیزاسیون میکروسایتهای

ارزیابی کلنیزاسیون ریشه توسط *R. intraradices*

طبق بررسی های میکروسکوپی مشخص گردید ۷۴ درصد از قطعات ریشه در تیمار میکوریز تنها کلنیزه شده بودند. در تیماری که بیمارگر دو هفته بعد از میکوریز به کار رفته بود، کلنیزاسیون ریشه ها توسط میکوریز ۶۰ درصد بود، بنابراین میزان کلنیزاسیون ریشه توسط *R. intraradices* در حضور بیمارگر ۱۸۰۹۱ درصد کاهش یافت.

بحث

امروزه به دلیل اثرات منفی کاربرد قارچ کش های شیمیایی و نگرانی های عمومی ناشی از آنها از یک سو و عدم کنترل مؤثر عوامل بیماری زای خاکزاد توسط آنها از سوی دیگر، نیاز به استفاده از روش های ایمن

همزیستی AMF با ریشه گیاهان علاوه بر بهبود عملکرد ریشه‌های گیاه و دسترسی بیشتر آن‌ها به آب و مواد معدنی به‌ویژه فسفات نامحلول خاک (Kilam *et al.* 2017) سبب حفاظت از گیاهان در برابر بسیاری از بیماری‌گرهای قارچی و شبه قارچی خاکزاد و افزایش مقاومت گیاهان نسبت به آن‌ها می‌شود (Mbutia *et al.* 2019). در این تحقیق نیز *R. intraradices* علاوه بر بهبود رشد نخود، در بیوکنترل بیمارگر کارآمد بود. برخی محققان نیز ذکر نموده‌اند که تلقیح گیاهان با *R. intraradices* سبب کاهش پوسیدگی ریشه نخود در اثر *Macrophomina phaseolina* (Akhtar and Siddiqui 2007)، پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی (Akköprü and *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) (Demir 2005) و پوسیدگی ریشه نخودفرنگی ناشی از *Aphanomyces etueiches* (Bødker *et al.* 1998) گردیده است.

در این تحقیق دو سویه بیوکنترلی *P. putida* RUP1 و *T. harzianum* T33 در ترکیب با یکدیگر سازگار بوده و علاوه بر کاهش علائم زردی و نکروز آوندی، موجب افزایش کلیه شاخص‌های رشدی نخود در حضور بیمارگر گردیدند. این نتایج مطابق مشاهدات رینی و سولوچانا است که به سازگاری ترکیب *Trichoderma pseudokoningii* یا *T. harzianum* با *P. fluorescens* پی برده و دریافتند این ترکیب سبب بهبود رشد و مهار قابل توجه بیماری پوسیدگی ریشه ناشی از *Rhizoctonia solani* در گیاهچه‌های فلفل می‌گردد (Rini and Sulochana 2007). استفاده از ترکیب *Trichoderma* و *P. fluorescens* باعث کاهش بروز بیماری پوسیدگی ساق‌بُن در فلفل سیاه در گلخانه نیز گردیده است (Wahyuno *et al.* 2016). کاربرد تلفیقی RUP1 *P. putida* و *T. harzianum* T33 در این تحقیق با وجود سازگار بودن، اثر هم‌افزایی در کاهش بیماری و افزایش رشد گیاه نداشت. این مورد با نتایج برخی محققین دیگر که گزارش کردند ترکیب *T. viride* و *P. fluorescens* در مقایسه با سویه‌های منفرد در مدیریت بیماری پژمردگی فوزاریومی بادام‌زمینی مؤثرتر بوده است،

مختلف ریشه را دارند (Whipps 2001, Manjula *et al.* 2004, Yadav *et al.* 2013)؛ بنابراین در مطالعه حاضر، به بررسی و مقایسه اثر کاربرد منفرد و ترکیبی *R. putida* RUP1، *T. harzianum* T33 و میکوریز *intraradice* بر مهار بیماری زردی و پژمردگی فوزاریومی نخود و فاکتورهای رشدی نخود در شرایط گلخانه و در حضور این بیمارگر پرداخته شد.

تیمار کلیه آنتاگونیست‌های اعمال‌شده در این پژوهش به‌صورت تنها و ترکیبی (به‌استثنای تیمار ترکیبی Th+Pp+Ri) باعث کاهش شدت بیماری *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* و افزایش رشد نخود گردید. قارچ *T. harzianum* T33 بهترین اثر را در کاهش بروز نشانه‌های زردی و نکروز آوندی ناشی از بیمارگر نشان داد و کارایی خوبی نیز در افزایش کلیه شاخص‌های رشدی نخود ارائه داد. اعضای جنس تریکودرما به دلیل توانایی تکثیر زیاد و استفاده از مواد غذایی، قابلیت زنده ماندن در شرایط بسیار نامساعد محیط، تهاجم شدید نسبت به قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی (Kamala and Devi 2012) و همچنین داشتن مکانیسم‌های بیوکنترلی متنوع مانند میکوپارازیتیسیم، آنتی‌بیوز با تولید ترکیبات فرار و آنتی‌بیوتیک‌های غیر فرار، رقابت برای مواد غذایی یا جایگاه‌ها، غیرفعال کردن آنزیم‌های عامل بیماری‌زا و تحریک مقاومت القایی، از کارآمدترین آنتاگونیست‌ها برای مهار رشد بیماری‌گرهای قارچی خاکزاد مختلف (Castillo *et al.* 2019) از جمله پژمردگی فوزاریومی نخود هستند. آن‌ها همچنین قادرند رشد و عملکرد گیاه را با تولید بعضی از محرک‌های رشد (Dubey *et al.* 2007) و یا از طریق بهبود جذب آب و مواد غذایی توسط گیاه، افزایش دهند (Jogaiah *et al.* 2018).

باکتری *P. putida* RUP1 نیز در این پژوهش علاوه بر کاهش شدت بروز علائم بیماری، از بهترین تیمارهای افزایش‌دهنده شاخص‌های رشدی نخود بود. مشخص شده سودوموناس‌ها نقش عمده‌ای در بازدارندگی خاک در برابر پژمردگی‌های فوزاریومی و تبدیل خاک‌های پذیرنده به خاک‌های بازدارنده از بیماری دارند (Scher and Baker 1982).

کاهش بروز و شدت پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه گوجه‌فرنگی (*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) را با استفاده از کاربرد جداگانه و ترکیبی *T. harzianum* و *R. intraradices* مشاهده کردند (Datnoff et al. 1995). با وجود این در تحقیق حاضر، اثر انفرادی این عوامل روی فاکتورهای ذکر شده بهتر از کاربرد ترکیبی آن‌ها بود. کاستیلو و همکاران نیز اذعان داشتند تیمار *Glomus* spp به‌تنهایی کارآمدترین تیمار در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی موز (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) بوده و توانسته سبب افزایش فاکتورهای رشدی موز گردد؛ اما ترکیب *T. harzianum* و *Glomus* spp با وجود تأثیر معنی‌دار بر کاهش پژمردگی فوزاریومی، غیر هم‌افزا بوده است. آن‌ها بیان نمودند در تیمار ترکیبی این دو عامل، پیش تیمار خاک با *T. harzianum* به دلیل اثرات رقابتی‌اش با اثرات *Glomus* spp تداخل ایجاد می‌کند (Castillo et al. 2019). در این آزمایش با وجود این که کاربرد تنها یا ترکیبات دوگانه *R. putida* RUP1، *T. harzianum* T33 و *intraradices* کاهش شاخص‌های بیماری و بهبود رشد نخود گردید، تیمار متشکل از ترکیب این سه عامل (Th+Pp+Ri) بی‌تأثیر بود و با بیمارگر در یک سطح آماری قرار گرفت. روابط میکروبی موجود در طبیعت بسیار پیچیده بوده و شبکه‌ای از روابط چندگانه و متقابل دارای اثرات مختلف را تشکیل می‌دهد. نکته مهم در استفاده کاربردی از پروبیوتیک‌های گیاهی این است که رفتار آن‌ها به‌تنهایی نسبت به آنچه در تعامل و تقابل با سایر عوامل پیرامونی آن‌ها رخ می‌دهد، بسیار تفاوت دارد. علاوه بر تأثیر شرایط محیطی بر نوع رابطه بین میکروارگانیسم‌های موجود در یک محیط، وارد شدن جزء سوم به یک سیستم نیز می‌تواند ماهیت روابط بین دو موجود اول را تغییر دهد. برخلاف نتایج این تحقیق سربوآستاوا و همکاران دریافتند ترکیب تیمارهای سه‌گانه *Pseudomonas* فلورسنت، *T. harzianum* و *R. intraradices* کنترل بهتری از پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی نسبت به هر یک از

مغایرت دارد (Rajeswari 2019). علیزاده و همکاران مشاهده نمودند ترکیب سویه‌هایی از *T. harzianum* و *Pseudomonas* sp نسبت به کاربرد جداگانه این عوامل، سبب القای سطح بالاتری از مقاومت در خیار شد که با بیان پرایم‌شده مجموعه‌ای از ژن‌های مرتبط با دفاع به‌محض چالش با *Fusarium* همراه بود، اما در آراییدوپسیس با وجود این که هردوی این عوامل باعث تحریک مقاومت القایی نسبت به *Botrytis cinerea* شدند، ترکیب آن‌ها اثر افزایش‌یافته‌ای نشان نداد. این محققین بیان کردند در آراییدوپسیس، *T. harzianum* و *Pseudomonas* sp مسیر سیگنال‌رسانی یکسانی را فعال می‌کنند و در نتیجه ترکیب آن‌ها اثر افزایش‌یافته‌ای ندارد. در مقابل، حفاظت افزایش‌یافته در خیار توسط ترکیب این دو عامل، به‌احتمال زیاد به دلیل فعال شدن مسیرهای سیگنال‌رسانی مختلف توسط این دو عامل بیوکنترلی است (Alizadeh et al. 2013).

برخی تحقیقات نشان داده برهمکنش‌های هم‌افزا بین AMF و PGPR ممکن است حفاظت زیستی علیه بیماری‌های گیاهی خاکزاد را افزایش دهد. به‌عنوان مثال، تیمارهای ترکیبی *Glomus etunicatum* + *Pseudomonas aeruginosa* و *Glomus mosseae* + *Pseudomonas* sp در مقایسه با کاربرد جداگانه آن‌ها، بیماری پژمردگی فوزاریومی موز را کاملاً کنترل نمود (Sumathi and Thangavelu 2016). در برخی منابع ذکر شده است که برخی سویه‌های سودوموناس موجب تحریک جوانه‌زنی اسپور و رشد میسلیم AMF (Meyer and Linderman 1986) و نیز افزایش کلنیزاسیون ریشه توسط این قارچ‌ها می‌شوند (Barea et al. 1998) که به این باکتری‌ها "helper bacteria" گفته می‌شود (Akhtar and Siddiqui 2008b).

همچنین در این پژوهش سازگاری ترکیب سویه‌های *T. harzianum* T33 و *R. intraradices* با کاهش بروز نشانه‌های بیماری و بهبود فاکتورهای رشدی نخود (به‌جز وزن تر ریشه و اندام هوایی) در حضور بیمارگر اثبات شد. داتنوف و همکاران نیز

استفاده از کنسرسیوم میکروارگانسیم‌های سازگار با مکانسیم‌های متعدد مهار بیماری و نیازهای متفاوت برای رشد ممکن است کارایی، قابلیت اطمینان و پایداری آن‌ها را تحت شرایط محیطی متغیر خاک افزایش دهد (Stockwell *et al.* 2011) و نسبت به کاربرد سویه‌های منفرد، طیف فعالیت وسیع‌تر و اثر بیوکنترلی پایداری داشته باشد (Szczech 2008). همچنین با وجود این که برخی تحقیقات نشان داده‌اند که کاربرد ترکیبی چند عامل بیوکنترلی سبب بهبود اثربخشی این عوامل و افزایش رشد گیاه میزبان می‌شود (Srivastava *et al.* 2010, Rajamohan *et al.* 2019)، در این تحقیق ترکیب سه‌گانه عوامل بیوکنترل، هیچ‌گونه قابلیت بیوکنترلی و یا افزایش رشدی در نخود نشان نداد؛ بنابراین ترکیب عوامل مفید همیشه کارآمد و موفقیت‌آمیز نبوده و هنگام استفاده از ترکیب سویه‌های بیوکنترلی باید تعاملات پیچیده‌ای که ممکن است در ریزوسفر بین عوامل کنترل بیولوژیک و میکروبیوتای بومی رخ دهند را در طول تولید محصولات میکروبی تجاری مورد توجه قرار داد و در ترکیب عوامل بیوکنترل سویه‌هایی را غربال نمود که با یکدیگر برهمکنش‌های سازگاری داشته و هیچ عضوی از ترکیب، بازدارنده دیگری نباشد (Whipps 2001). به‌طورکلی برخی یافته‌های این تحقیق می‌تواند از طریق افزایش تولید و درآمد از طریق کاهش نهاده‌ها و مواد شیمیایی در برابر همه‌گیری‌های پژمردگی فوزاریومی، برای کشاورزان مفید باشد.

REFERENCES

- Abera M, Sakhujia PK, Fininsa C, Ahmed S (2011) Status of chickpea fusarium wilt (*Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris*) in northwestern Ethiopia. Archives of Phytopathology and Plant Protection 44(13): 1261-1272.
- Akhtar MS, 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.
- Akhtar MS, Siddiqui ZA (2008a) *Glomus intraradices*, *Pseudomonas alcaligenes*, and *Bacillus pumilus*: effective agents for the control of root-rot disease complex of chickpea (*Cicer arietinum* L.). Journal of General Plant Pathology 74(1): 53-60.
- Akhtar MS, Siddiqui ZA (2008b) Biocontrol of a root-rot disease complex of chickpea by *Glomus intraradices*, *Rhizobium* sp. and *Pseudomonas straita*. Crop Protection 27(3-5): 410-417.
- Akköprü A, Demir S (2005) Biological control of fusarium wilt in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some rhizobacteria. Journal of Phytopathology 153(9): 544-550.

عوامل اعمال شده به‌تنهایی و نسبت به سایر تیمارهای ترکیبی ارائه داد و حداکثر افزایش وزن خشک اندام هوایی مربوط به این تیمار بود (Srivastava *et al.* 2010). راجاموهان و همکاران نیز در تحقیقات خود نتایج مشابهی را به‌دست آورده و عنوان کردند این مسأله ممکن است به دلیل اثر افزایشی و تعاملی عوامل زیستی با یکدیگر باشد (Rajamohan *et al.* 2019).

در این تحقیق *R. intraradices* توانایی بالایی در کلنیزاسیون ریشه‌های نخود نشان داد اما در حضور بیمارگر میزان کلنیزاسیون ریشه توسط این قارچ به میزان کمی (۱۸٫۹۱ درصد) کاهش یافت که با نتایج فکرت و همکاران مبنی بر کاهش کلنیزاسیون ریشه گوجه‌فرنگی توسط *Glomus versiform* در حضور بیمارگر *F. oxysporum* (Fekrat *et al.*)؛ بنابراین می‌توان گفت وجود بیمارگر اثر کمی بر کلنیزاسیون ریشه توسط این بیمارگر داشته و این میکوریز می‌تواند قابلیت رقابت بالایی با این بیمارگر در کلنیزاسیون ریشه نخود داشته باشد.

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش استفاده از عوامل زیستی به‌صورت منفرد یا ترکیب دوگانه سبب کاهش بروز بیماری زردی و پژمردگی فوزاریومی نخود گردید اما با وجود سازگار بودن ترکیب دوگانه عوامل بیوکنترلی با یکدیگر، آن‌ها اثر هم‌افزایی در بهبود بیوکنترل و بهبود رشد گیاه نداشتند. با این حال باید در نظر داشت که

- Alizadeh H, Behboudi K, Ahmadzadeh M, Javan-Nikkhah M, Zamioudis C, Pieterse CMJ, Bakker PAHM** (2013) Induced systemic resistance in cucumber and *Arabidopsis thaliana* by the combination of *Trichoderma harzianum* Tr6 and *Pseudomonas* sp. Ps14. *Biological Control* 65(1): 14-23.
- Arora D, Pandey A** (1989) Effects of soil solarization on *Fusarium* wilt of chickpea. *Journal of Phytopathology* 124(1): 13-22.
- Atwa M** (2018) Combination of biocontrol agents for controlling soybean damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. *Egyptian Journal of Phytopathology* 46(2): 15-38.
- Barea J, Andrade G, Bianciotto V, Dowling D, Lohrke S, Bonfante P, O'gara F, Azcon-Aguilar C** (1998) Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for biocontrol of soil-borne fungal plant pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* 64(6): 2304-2307.
- Bødker L, Kjølner R, Rosendahl S** (1998) Effect of phosphate and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*. *Mycorrhiza* 8(3): 169-174.
- Castillo AG, Puig CG, Cumagun CJR** (2019) Non-synergistic effect of *Trichoderma harzianum* and *Glomus* spp. in reducing infection of *Fusarium* wilt in banana. *Pathogens* 8(2): 43.
- Costa R, Gomes NCM, Peixoto RS, Rumjanek N, Berg G, Mendonça-Hagler LCS, Smalla K** (2006) Diversity and antagonistic potential of *Pseudomonas* spp. associated to the rhizosphere of maize grown in a subtropical organic farm. *Soil Biology and Biochemistry* 38(8): 2434-2447.
- Datnoff L, Nemeš S, 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.
- Dubey SC, Suresh M, 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.
- Duffy BK, Simon A, Weller DM** (1996) Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 86(2): 188-194.
- Ebrahimi Kazemabad Z, Rohani H, Jamali F, Mahdikhani Moghadam E** (2012) Antagonistic effect of *Pseudomonas fluorescens* isolates against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Iranian Journal of Pulses Research* 3(2): 55-64 (In Persian).
- Elmahdi S, Kadir J, Mohamed MTM, Vadamalai G, Akter S** (2015) Isolation, screening and characterization of effective microbes with Potential for biological control of *Fusarium* wilt of rock melon. *World Journal of Agricultural Research* 3(1): 11-16.
- Elshahat MR, Ahmed AA, Enas AH, Fekria MS** (2016) Plant growth promoting rhizobacteria and their potential for biocontrol of phytopathogens. *African Journal of Microbiology Research* 10(15): 486-504.
- Etesami H, Maheshwari DK** (2018) Use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPRs) with multiple plant growth promoting traits in stress agriculture: Action mechanisms and future prospects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 156: 225-246.
- Fekrat F, Azami-Sardooei Z, Moghbeli EM, Hanzai EM** (2017) Effect of vermicompost and *Glomus versiform* on control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* on tomato plant. *Biological Control of Pests and Plant Diseases* 6(2): 127-138 (In Persian).
- Garbeva P, Veen JA, Elsas JD** (2004) Assessment of the diversity, and antagonism towards *Rhizoctonia solani* AG3, of *Pseudomonas* species in soil from different agricultural regimes. *FEMS Microbiology Ecology* 47(1): 51-64.
- Gaur PM, Jukanti AK, Varshney RK** (2012) Impact of genomic technologies on chickpea breeding strategies. *Agronomy* 2(3): 199-221.
- Harvás A, Landa B, Jiménez-Díaz* RM** (1997) Influence of chickpea genotype and *Bacillus* sp. on protection from *Fusarium* wilt by seed treatment with nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Plant Pathology* 103(7): 631-642.
- Hwang SF, Howard RJ, Chang KF, Park B, Burnett PA** (1994) Etiology and severity of *Fusarium* root rot of lentil in Alberta. *Canadian Journal of Plant Pathology* 16(4): 295-303.
- Idris HA, Labuschagne N, Korsten L** (2007) Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control* 40(1): 97-106.
- Jasem AM, Sharifi R, Abbasi S** (2018) Induced systemic resistance to wheat take-all disease by probiotic bacteria. *Journal of Plant Protection Research* 58(3): 304-310.
- Jendoubi W, Bouhadida M, Boukteb A, Béji M, Kharrat M** (2017) *Fusarium* wilt affecting chickpea crop. *Agriculture* 7(3): 23.

- Jimenez-Fernandez D, Landa BB, Kang S, Jimenez-Diaz RM, Navas-Cortes JA** (2013) Quantitative and microscopic assessment of compatible and incompatible interactions between chickpea cultivars and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* races. *PLoS One* 8(4): e61360.
- Jogaiah S, Abdelrahman M, Tran LSP, Ito SI** (2018) Different mechanisms of *Trichoderma virens*-mediated resistance in tomato against Fusarium wilt involve the jasmonic and salicylic acid pathways. *Molecular Plant Pathology* 19(4): 870-882.
- Kamala T, Devi SI** (2012) Biocontrol properties of indigenous *Trichoderma* isolates from North-east India against *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. *African Journal of Biotechnology* 11(34): 8491-8499.
- Kaur NP, Mukhopadhyay AN** (1992) Integrated control of 'chickpea wilt complex' by *Trichoderma* and chemical methods in India. *Tropical Pest Management* 38(4): 372-375.
- Kilam D, Sharma P, Agnihotri A, Kharkwal A, Varma A** (2017) Microbial symbiosis and bioactive ingredients of medicinal plants, In: Varma A, R Prasad and N Tuteja (ed.), *Mycorrhiza - Eco-Physiology, Secondary Metabolites, Nanomaterials*. 4th^{ed}. Springer International Publishing, Cham, Switzerland. pp. 283-302.
- Landa BB, Navas-Cortés JA, Hervás A, Jiménez-Díaz RM** (2001) Influence of temperature and inoculum density of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* on suppression of Fusarium wilt of chickpea by rhizosphere bacteria. *Phytopathology* 91(8): 807-816.
- Landa BB, Navas-Cortes JA, Jimenez-Diaz RM** (2004) Integrated management of fusarium wilt of chickpea with sowing date, host resistance, and biological control. *Phytopathology* 94(9): 946-60.
- Manjula K, Kishore GK, Girish A, Singh S** (2004) Combined application of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma viride* has an improved biocontrol activity against stem rot in groundnut. *Plant Pathology Journal* 20(1): 75-80.
- Martínez-Medina A, Pascual JA, Lloret E, 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.
- Matrood AA, Khriebe MI, Okon OG** (2020) Synergistic interaction of *Glomus mosseae* T. and *Trichoderma harzianum* R. in the induction of systemic resistance of *Cucumis sativus* L. to *Alternaria alternata* (Fr.) K. *Plant Science Today* 7(1): 101-108.
- Mavrodi DV, Yang M, Mavrodi OV, Wen S** (2017) Management of soilborne plant pathogens with beneficial root-colonizing *Pseudomonas*, In: Singh HB, BK Sarmarotationr and C Keswani (ed.), *Advances in PGPR Research*. CABI Publishing, Croydon, UK. pp. 147-164.
- Mbuthia LW, Kiirika LM, Afolayan G, Alten V** (2019) Interactive effects of arbuscular mycorrhiza fungi *Glomus intraradices* and *Trichoderma harzianum* against Fusarium wilt of tomato. *International Journal of Biosciences* 15(1): 251-268.
- Meyer JR, Linderman R** (1986) Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizas formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil Biology and Biochemistry* 18(2): 191-196.
- Nasir Hussein A, Abbasi S, Sharifi R, Jamali S** (2018) The effect of biocontrol agents consortia against *Rhizoctonia* root rot of common bean *Phaseolus vulgaris*. *Journal of Crop Protection* 7(1): 73-85.
- Nautiyal CS** (1997) Selection of chickpea-rhizosphere-competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI1303 antagonistic to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, *Rhizoctonia bataticola* and *Pythium* sp. *Current Microbiology* 35(1): 52-58.
- Phillips JM, 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-IN18.
- Rajamohan K, Udhayakumar R, Sanjaygandhi S, Kumar LV, Selvi MT, Sudhasha S, Yuvarani R** (2019) Efficacy of VAM fungi and antagonistic bacteria against onion basal rot incited by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry SP2*: 413-418.
- Rajeswari P** (2019) Combination of *Trichoderma viride* and *Pseudomonas fluorescens* for the enhanced control of Fusarium wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* infecting *Arachis hypogaea* L. *Journal of Applied and Natural Science* 11(1): 138-143.
- Rini C, Sulochana K** (2007) Management of seedling rot of chilli (*Capsicum annuum* L.) using *Trichoderma* spp. and fluorescent pseudomonads (*Pseudomonas fluorescens*). *Journal of Tropical Agriculture* 44(1-2): 79-82.
- Scher FM, Baker R** (1982) Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to Fusarium wilt pathogens. *Phytopathology* 72(12): 1567-1573.

- Singh LP, Gill SS, Tuteja N** (2011) Unraveling the role of fungal symbionts in plant abiotic stress tolerance. *Plant Signaling & Behavior* 6(2): 175-191.
- Singh PK, Singh M, Agnihotri V, Vyas D** (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi: biocontrol against *Fusarium* wilt of chickpea. *International Journal of Scientific and Research Publications* 3(1): 38-42.
- Sohrabi M, Mohammadi H, 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, 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.
- Stockwell VO, Johnson KB, Sugar D, Loper JE** (2011) Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. *Phytopathology* 101(1): 113-123.
- Sumathi S, Thangavelu R** (2016) Co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and their mycorrhizae helper bacteria (MHB) effectively suppresses *Fusarium* wilt in banana. *Plant Archives* 16(1): 365-375.
- Szczecz M** (2008) Mixtures of microorganisms in biocontrol, In: Kim MB (ed.), *Progress in Environmental Microbiology*. Nova Science Publishers, New York, USA. pp. 69-110.
- Tekeoğlu M, Özkılınç H, Tunalı B, Küsmenoğlu İ, Chen W** (2017) Molecular identification of *Fusarium* spp. causing wilt of chickpea and the first report of *Fusarium redolens* in Turkey. *Mediterranean Agricultural Sciences* 30(1): 27-33.
- Vidhyasekaran P, Muthamilan M** (1995) Development of formulations of *Pseudomonas fluorescens* for control of chickpea wilt. *Plant Disease* 79(8): 782-786.
- Wahyuno D, Manohara D, 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, 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.