کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۹ (۱۵۹-۱۴۳) مقاله پژوهشی DOI: 10.22059/jbioc.2021.324966.305

اثر برخی پروبیوتیک‌های گیاهی در کنترل زیستی عوامل زردی و پژمردگی فوزاریومی نخود

ناهید معرف‌زاده [1*]، روح‌اله شریفی[1]، هادی خاطری[1]، سعید عباسی[2]
۱. استادیاران بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
۲. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۹ - تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۷/۲۵)

چکیده

بیماری زردی و پژمردگی فوزاریومی نخود با عوامل قارچی ***Fusarium redolens*** (به اختصار: **Fr**) و ***Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*** (به اختصار: **Foc**)، از بیماری‌های مهم این محصول در ایران است. در این پژوهش اثر برخی سویه‌های پروبیوتیک باکتریایی و قارچی دریافتی از منابع مختلف که متعلق به جنس‌های ***Alcaligenes***، ***Bacillus***، ***Delftia***، ***Pseudomonas***، ***Stenotrophomonas*** و ***Trichoderma*** بودند، در مهار بیمارگرهای مذکور در آزمایشگاه و گلخانه و تأثیرشان بر شاخص‌های رشدی نخود در حضور بیمارگرها بررسی شد. ترکیبات فرّار کلیه پروبیوتیک‌ها از رشد میسلیوم بیمارگرها جلوگیری نمودند. در آزمون کشت متقابل نیز همه پروبیوتیک‌ها بر رشد **Foc** اثر بازدارنده داشتند، اما فقط اثر ***Bacillus pumilus* INR7** و ***Trichoderma harzianum* T33** در مهار رشد **Fr** معنی‌دار بود. در گلخانه، ***Delftia tsuruhatensis* PIIR** و ***Alcaligenes faecalis* 1624** به ترتیب با کاهش ۳۸،۲ و ۲۳،۵۸ درصدی زردی و ۳۵،۲ درصدی نکروز ریشه ناشی از **Fr** و افزایش فاکتورهای رشدی، و در مقابل، ***T. harzianum* T33** و ***Pseudomonas putida* RUP1** به ترتیب با کاهش ۵۰ و ۳۷/۶۶ درصدی زردی و ۴۴/۷۵ و ۳۷/۸۴ درصدی نکروز آوندی ناشی از **Foc** و بهبود رشد نخود، جزو بهترین تیمارها بودند؛ در مجموع، پروبیوتیک‌های مورد استفاده، پتانسیل تحریک رشد گیاه و بیوکنترل عوامل زردی و پژمردگی فوزاریومی نخود را داشتند.

واژه های کلیدی: باکتری‌های محرک رشد گیاه، بیماری خاکزاد، فاکتورهای رشدی، ترکیبات فرّار، کنترل زیستی.

The effect of some plant probiotics in the biocontrol of the causal agents of chickpea Fusarium yellowing and wilting

Nahid Moarrefzadeh [1]*, Rouhallah Sharifi[1], Hadi Khateri[1] and Saeed Abbasi[2]
1. Assistant professors 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: June 9, 2021 - Accepted: October 17, 2021)

Abstract

Chickpea Fusarium yellowing and wilting disease, caused by *Fusarium redolens* (Fr) and *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* (Foc) is one of the most common diseases of this plant in Iran. In this study, the effect of bacterial and fungal probiotic strains received from different sources belonging to *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Delftia*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* and *Trichoderma* genera was investigated on mycelial growth of the plant pathogens in the laboratory and chickpea growth and disease indices in the greenhouse. The volatile compounds of all probiotics prevented the growth of pathogens mycelium. In dual-culture test, all probiotics had an inhibitory effect on Foc growth, but only the effect of *Bacillus pumilus* INR7 and *Trichoderma harzianum* T33 on Fr growth inhibition was significant. In the greenhouse, *Delftia tsuruhatensis* PIIR and *Alcaligenes faecalis* 1624 were among the best treatments in reducing Fr disease indices and increasing growth factors. In contrast, *T. harzianum* T33 and *Pseudomonas putida* RUP1 were the best strains in decreasing disease indices and improving plant growth from Foc infected plants. Overall, the probiotics had the potential for promoting plant growth and biocontrol of these pathogens and after the necessary studies, can be recommended in integrated management of Fusarium disease of chickpeas.

Keywords: Plant growth promoting bacteria, Soil-borne disease, Growth factors, Volatile compounds, Biological control

Acknowledgement: The authors would like to thank Dr. Mahyar Sheikholeslami and Dr. Sonia Seifi for providing some of the isolates used in this study.

E-mail: nmoarref@gmail.com

مقدمه

نخود گیاهی یک‌ساله از خانواده باقلائیان با نام علمی *Cicer arietinum* L. است که ۱۸ درصد تولید جهانی دانه‌های حبوبات را به خود اختصاص داده است. بیمارگرهای گیاهی خاکزاد از مهم‌ترین عوامل کاهش عملکرد و کیفیت این محصول در سراسر جهان هستند (Jendoubi *et al.* 2017). زردی و پژمردگی فوزاریومی نخود یکی از مهم‌ترین این بیماری‌ها است که خسارت سالانه‌اش بر عملکرد نخود بین ۱۰ تا ۱۵ درصد برآورد شده است (Jimenez-Fernandez *et al.* 2013). دو گونه قارچی *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* و *Fusarium redolens* از عوامل مهم ایجادکننده این بیماری هستند (Esmaeili Taheri *et al.* 2011, Jimenez-Fernandez *et al.* 2011) که قادرند در تمام مراحل رشد، گیاه را از طریق ریشه‌ها آلوده نموده و به ترتیب سبب تغییر رنگ آوندی (Tekeoğlu *et al.* 2017) و ایجاد نکروز در ریشه و طوقه (Jimenez-Fernandez *et al.* 2011) و هر دو سبب بروز زردی و پژمردگی در بخش‌های هوایی نخود شوند.

به‌طورکلی کنترل بیماری‌های گیاهی ناشی از بیمارگرهای گیاهی خاکزاد از جمله بیماری‌های فوزاریومی، بسیار دشوار است. علی‌رغم امیدبخش بودن ارقام مقاوم برای مدیریت بیماری‌های فوزاریومی نخود و تلاش‌های انجام‌شده برای اصلاح و گزینش ارقام نخود، وضعیت بیماری نسبت به گذشته تغییر چندانی نکرده است، چون تغییرپذیری بالا و بروز نژادهای بیماری‌زای جدید در این بیمارگرها می‌تواند اثرات مقاومت در برابر آن‌ها را کاهش دهد (Harvás *et al.* 1997, Jendoubi *et al.* 2017). همچنین گونه‌های فوزاریوم قادرند سال‌های متمادی به‌صورت کلامیدوسپور در خاک زنده بمانند، و این مسأله کارایی تناوب زراعی را برای مدیریت این بیماری‌ها کاهش می‌دهد (Harvás *et al.* 1997). قارچ‌کش‌های شیمیایی نیز علاوه بر هزینه‌بر بودن، به اندازه کافی علیه بیمارگرهای خاکزاد کارآمد نیستند (Lemanceau and Alabouvette 1993) و کاربرد مداوم آن‌ها سبب توسعه مقاومت در بیمارگر نسبت به قارچ‌کش‌ها، به خطر انداختن سلامت انسان و بروز مشکلات زیست‌محیطی می‌شود (Elmahdi *et al.* 2015). در سال‌های اخیر، مدیریت زیستی پژمردگی فوزاریومی نخود با استفاده از باکتری‌ها و قارچ‌های محرک رشد گیاه مورد توجه قرار گرفته است (Landa *et al.* 2004, Bhattacharyya and Jha 2012). این عوامل از یک‌سو قادرند با سازوکارهایی مانند رقابت برای مواد غذایی و مکان در ریزوسفر، تولید متابولیت‌های ضد میکربی و ترکیبات فرّار، تولید آنزیم‌های خارج سلولی برای هیدرولیز دیواره سلول قارچی و نیز القای مقاومت سیستمیک در گیاه، از رشد بیمارگرها ممانعت کنند و از سوی دیگر با روش‌هایی نظیر حل نمودن فسفات‌های معدنی، تثبیت نیتروژن، تولید هورمون‌های گیاهی مانند ایندول استیک اسید (IAA) از گروه اکسین‌ها، تولید ۱-آمینوسیکلوپروپان-۱-کربوکسیلات (ACC) دِآمیناز برای کاهش سطح اتیلن در ریشه و در نتیجه افزایش طول و رشد آن و نیز افزایش تحمل گیاه در برابر تنش‌های غیرزیستی، سبب افزایش رشد گیاه شوند (Bhattacharyya and Jha 2012, Elshahat *et al.* 2016).

گزارش‌های متعددی در مورد کارایی عوامل پروبیوتیک قارچی و باکتریایی با مکانیسم‌های اثر مختلف، جهت بیوکنترل بیماری‌های فوزاریومی خاکزاد نخود در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی یا گلخانه وجود دارد. چند گونه *Trichoderma* با تولید ترکیبات فرار و مواد آنتی‌بیوتیکی غیر فرار و رقابت برای فضا و مواد غذایی از رشد میسلیوم *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* در آزمایشگاه ممانعت نموده و در گلخانه نیز سبب کاهش پژمردگی ناشی از این بیمارگر و افزایش جوانه‌زنی بذر و طول ریشه و ساقه نخود شده‌اند (Dubey *et al.* 2007). همچنین برخی محققین مهار بیمارگرهای خاکزاد از جمله *F.oxysporum* f. sp. *ciceri* توسط گونه‌های *Trichoderma* را به ترشح آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی (مانند کیتیناز، گلوکاناز، پروتئاز و سلولاز) (Lorito *et al.* 1994, Sreeramulu *et al.* 2009, Shabir R *et al.* 2013) یا تولید متابولیت‌های ثانویه (مانند گلیوویریدین، ویریدین و گلیوتوکسین) (Inbar *et al.* 1994) نسبت داده‌اند. علاوه بر این، ذکر شده که *T. harzianum* می‌تواند به‌عنوان الیسیتور پاسخ‌های دفاعی در نخود در برابر

F.oxysporum f. sp. *ciceri* عمل نماید (Sreeramulu *et al.* 2009). برخی سویه‌های *Pseudomonas fluorescens* مانع رشد *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در آزمایشگاه شده و در گلخانه، سبب کاهش شدت بیماری و افزایش شاخص‌های رشدی نخود گردیده‌اند (Nautiyal 1997, Ebrahimi Kazemabad *et al.* 2012). در یکی از این تحقیقات همبستگی معنی داری بین تولید متابولیت‌های ضدقارچی جدایه های باکتریایی با کاهش بیماری مشاهده شده است (Ebrahimi Kazemabad *et al.* 2012). اثر برخی جدایه‌های *Pseudomonas* spp.، *Bacillus* spp.، *Paenibacillus* spp. و جدایه‌های غیربیماری‌زای *F. oxysporum* به‌دست آمده از ریزوسفر نخود نیز در بازدارندگی از پژمردگی فوزاریومی نخود تحت شرایط کنترل‌شده مشاهده گردیده است (Landa *et al.* 2004). همچنین آغشته نمودن بذر نخود با *Bacillus* sp. و *Brevibacillus brevis* با افزایش تجمع آنزیم‌های دفاعی، فنل و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی در گیاه، سبب افزایش مقاومت آن در برابر *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* گردیده است (Kumari and Khanna 2019). علاوه بر موارد ذکر شده، سویه‌های مختلف جنس *Alcaligenes* فعالیت ضد قارچی وسیعی در برابر چند بیمارگر قارچی از جمله *F. oxysporum* و فرم‌های اختصاص‌یافته آن نشان داده‌اند (Ben Abdallah and Mejdoub-Trabelsi 2016, Gong *et al.* 2019). توانایی باکتری‌های جنس *Delftia* به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک علیه بیمارگرهایی مانند *Rhizoctonia solani*، *Pythium aphanidermatum* و *Fusarium oxysporum* به اثبات رسیده است (Han *et al.* 2005, Ghasemi *et al.* 2012, Morel *et al.* 2015, Prasannakumar *et al.* 2015, Janahiraman *et al.* 2016). همچنین گزارش شده برخی سویه‌های جنس *Stenotrophomonas* سبب مهار عوامل بیماری‌زای قارچی از جمله *F. oxysporum* شده‌اند (Jeong *et al.* 2006, Szentes *et al.* 2013). در تحقیقی دیگر ویراراتنه و کوستا (۲۰۱۸) چهار جدایه *B. velezensis* C19، *Psudomonas* sp. SB904، *D. tsuruhatensis* E8 و *S. Maltophilia* ATCC13637 به ترتیب ۶۴/۷۰، ۶۱/۸۰، ۵۷/۰۲ و ۴۷/۳۳ درصد توانایی بازدارندگی از رشد FOL race 1 در آزمون کشت متقابل نشان دادند. با این حال، تاکنون تحقیقی درباره اثر سه جنس باکتریایی اخیر روی پژمردگی فوزاریومی نخود صورت نگرفته است و یافتن گزینه‌ها و سویه‌های بیوکنترلی جدید برای رسیدن به مدیریت مؤثر و کنترل پایدار بیمارگرهای گیاهی ضروری به نظر می‌رسد. همچنین با وجود تحقیقات متعدد در زمینه بیوکنترل بیماری‌های فوزاریومی، پژوهشی اختصاصی روی بیوکنترل قارچ بیمارگر *Fusarium redolens* که در سال‌های اخیر از گونه *F. oxysporum* تفکیک شده، به چشم نمی‌خورد. بر اساس موارد مذکور و اهمیت کشت نخود و بیماری زردی و پژمردگی فوزاریومی روی این محصول در کشور، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثر برخی پروبیوتیک‌های گیاهی بر عوامل زردی و پژمردگی فوزاریومی نخود *F. redolens* و *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* و تأثیر آن‌ها بر فاکتورهای رشدی نخود در حضور این بیمارگرها انجام شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های بیمارگر و پروبیوتیک

دو جدایه قارچ بیمارگر *Fusarium redolens* و *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* از کلکسیون قارچ‌های گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی تهیه گردید. این جدایه‌ها قبلاً بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی شناسایی شده‌اند و بیماری‌زایی آن‌ها روی نخود به اثبات رسیده است (Zarbanoei 2015). سویه‌ای از باکتری پروبیوتیک *Pseudomonas putida* RUP1 از کلکسیون باکتری‌های آنتاگونیست بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی دریافت گردید. این سویه در بررسی‌های آزمایشگاهی علیه *Fusarium solani* نخود موثر بوده است (Sohrabi 2016). سویه *Bacillus pumilus* INR7 از پروفسور کلوپر از دانشگاه آوبورن ایالات متحده آمریکا دریافت گردید و تاکنون، علیه طیف گسترده‌ای از بیمارگرهای خاکزاد (Lokesh *et al.* 2007, Ardalan *et al.* 2017) مؤثر بوده است. سویه *Alcaligenes faecalis* 1624 از مرکز میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران و سویه‌های *Delftia tsuruhatensis* PIIR و *Stenotrophomonas*

maltophilia S37 از خانم دکتر سیفی (Seifi 2019) دریافت شدند. نقش سه سویه اخیر در بازدارندگی از بیمارگر عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* به اثبات رسیده است (Seifi 2019). سویه قارچی *Trichoderma harzianum* T33 نیز از مرکز تحقیقات کشاورزی بخش گیاهپزشکی استان کرمانشاه تهیه گردید. این سویه در کاهش خسارت نماتود ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* در گوجه‌فرنگی مؤثر بوده است (Sohrabi *et al.* 2020).

بررسی آنتاگونیسم جدایه‌های باکتریایی و قارچی علیه بیمارگرهای فوزاریومی در آزمایشگاه

آزمون کشت متقابل

در این آزمون، اثر آنتاگونیستی جدایه قارچی *T. harzianum* T33 علیه بیمارگرهای *F. redolens* و *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*، با روش دوبی و همکاران (Dubey *et al.* 2007) بررسی گردید و وجود هاله بازدارنده در اطراف جدایه‌ها پس از یک هفته اندازه‌گیری شد. میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر، مطابق روش هوانگ و همکاران (Huang *et al.* 2017) با فرمول $IR\,\% = \frac{(C-B)}{C} \times 100$ محاسبه گردید که IR درصد بازدارندگی، C قطر کلنی قارچ در پلیت شاهد و B قطر کلنی قارچ در هر یک از پلیت‌های دارای تیمار *Trichoderma* می‌باشد. در مورد جدایه‌های باکتریایی برای انجام آزمون فوق مطابق شیوه گاربوا و همکاران (Garbeva *et al.* 2008) از روش دیسک مرکزی استفاده شد. پس از هفت روز انکوباسیون، میانگین قطر هاله بازدارنده اندازه‌گیری و میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر مطابق روش هوانگ و همکاران (Huang *et al.* 2017) محاسبه شد.

آزمون تولید ترکیبات فرّار دارای فعالیت ضد قارچی

این آزمون مطابق روش دنیس و وبستر با اندکی تغییر انجام شد (Dennis and Webster 1971). سویه‌های پروبیوتیک باکتریایی و قارچی روی محیط PDA کشت شده و پس از کشت ۴۸ ساعت درب تشتک‌های پتری حاوی آن‌ها برداشته شد و بلافاصله به‌طور معکوس روی تشتک‌های دارای یک دیسک نیم‌سانتیمتری حاوی میسلیوم جوان بیمارگر قرار گرفتند. محل اتصال دهانه دو تشتک با پارافیلم به خوبی مسدود شد و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. میزان رشد میسلیوم بیمارگر در تیمارهای مختلف پس از یک هفته ثبت گردید و مجدداً درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ‌های بیمارگر، طبق روش هوانگ و همکاران (Huang *et al.* 2017) محاسبه شد. دو آزمون فوق برای هر تیمار در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های مربوط به جدایه‌های پروبیوتیک باکتریایی و *T. harzianum* T33 به‌ترتیب توسط رویه تجزیه واریانس و رویه آزمون تی در نرم‌افزار SAS نسخه ۹,۳ صورت گرفت و برای مقایسه میانگین‌ها، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال آماری پنج درصد استفاده شد.

آزمون قابلیت فرا انگلی[1] *T. harzianum* T33

اثر جدایه *T. harzianum* T33 بر دو بیمارگر در این آزمون با اندکی تغییر مشابه روش قنبرزاده و همکاران (Ghanbarzadeh et al. 2014) بررسی شد. قارچ‌های بیمارگر و *T. harzianum* T33 در طرفین یک لام میکروسکوپی سترون که در وسط تشتک پتری حاوی لایه نازک آب آگار (WA) قرار گرفته بود، کشت شدند. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد قرار گرفته و پس از یک هفته، در لام حاوی میسلیوم قارچ‌ها، تعاملات ریسه‌ای میان *T. harzianum* T33 با جدایه‌های بیمارگر، توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر بررسی گردید.

بررسی اثر جدایه‌های پروبیوتیک قارچی و باکتریایی روی شدت علائم بیمارگرهای فوزاریومی و فاکتورهای رشدی نخود در شرایط گلخانه

تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح جدایه‌های بیماری‌زای فوزاریوم و قارچ *T. harzianum*

جهت تکثیر مایه تلقیح قارچ‌های بیماری‌زای *F. redolens* و *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* و همچنین

1 Hyperparasitism

T. harzianum T33، ترکیبی از ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره سیب‌زمینی دکستروز (حاوی عصاره ۳۰ گرم سیب‌زمینی و دو گرم دکستروز) به همراه ۱۰۰ میلی‌لیتر ورمیکولیت و ۵۰ میلی‌لیتر سبوس گندم (که به صورت تجربی به دست آمده بود) در فلاسک‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری تهیه شد و پس از سترون نمودن، ۱۰ قرص آگار از کشت در حال رشد فعال جدایه‌های قارچی که روی محیط PDA رشد کرده بودند، به آن‌ها اضافه شد و به مدت دو هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه‌ی مایه‌ی تلقیح جدایه‌هایی باکتریایی

پس از اضافه نمودن یک لوپ پر از کشت خالص و تازه باکتری‌های پروبیوتیک روی محیط آگار غذایی به فلاسک‌های حاوی محیط مایع Nutrient broth (NB) و قرار دادن آن‌ها به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه، جمعیت سلول‌های باکتریایی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۶۰۰ نانومتر روی کدورت نوری یک تنظیم شد.

بررسی اثر جدایه‌های پروبیوتیک در کنترل بیمارگرهای زردی و پژمردگی فوزاریومی و فاکتورهای رشدی نخود در شرایط گلخانه

این بخش از تحقیق طی دو آزمون جداگانه در گلخانه به روش گلدانی و در قالب طرحی کاملاً تصادفی با چهار تکرار و در مجموع ۱۵ تیمار انجام شد که به این تیمارها در جدول های ۲ و ۳ اشاره گردیده است. به منظور آماده‌سازی بستر رشد گیاه، ترکیبات پرلیت و پیت‌ماس سترون به نسبت ۲ به ۱ با هم ترکیب‌شده و به گلدان‌های پلاستیکی با حجم یک لیتر و قطر دهانه ۱۲ سانتی‌متر اضافه شدند. مایه تلقیح جدایه *T. harzianum* T33 به نسبت ۱ به ۱۵ وزنی با کل خاک گلدان ترکیب شد. جدایه‌های پروبیوتیک درست در زمان کاشت بذر نخود و دو هفته قبل از کاربرد جدایه‌های بیمارگر به گلدان‌ها اضافه شدند. در گلدان‌های شاهد به جای مایه تلقیح، از سوبسترای فاقد قارچ یا باکتری استفاده گردید. بذور نخود رقم سارال پس از ضدعفونی سطحی با اتانول ۷۰ درصد و هیپوکلریت سدیم نیم درصد و شستشو با آب مقطر، جهت جوانه‌دار شدن به مدت ۳۶ ساعت در پلیت‌های حاوی کاغذ صافی و لایه نازکی از آب مقطر سترون قرار گرفتند. پنج بذر نخود در هر گلدان کاشته شد و پس از اطمینان از سبز شدن، یک گیاهچه حذف گردید. برای بذور نخودی که باید توسط باکتری‌های پروبیوتیک تیمار می‌شدند، سوسپانسیون باکتری‌های پروبیوتیک با رقت یک‌دهم از کدورت نوری یک آماده شد و بذور قبل از کاشت، به مدت یک ساعت در این سوسپانسیون قرار گرفتند. پس از کشت بذور، این سوسپانسیون‌ها به‌صورت تیمار اولین آبیاری نیز به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر به هر گلدان اضافه شدند. دو هفته پس از کاشت، مایه تلقیح بیمارگرها به روش جاسم و همکاران (Jasem *et al.* 2018)، به میزان یک پانزدهم حجم خاک به گلدان اضافه شد. گلدان‌ها به‌صورت تصادفی قرار گرفته و تا زمان ظهور نشانه‌های بیماری در شرایط گلخانه ۵ ±۲۰ درجه سانتی‌گراد و ۱۶ ساعت نور نگهداری شدند و یک روز در میان با جریان بسیار ملایم آب حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام کود کامل حاوی نیتروژن، فسفر، پتاسیم و عناصر کم مصرف (NPK+TE, 20-20-20) آبیاری گردیدند. هفت هفته پس از اضافه نمودن بیمارگر، گیاهان مربوط به تیمارهای مختلف به‌آرامی از گلدان‌ها خارج شده و پس از شستشوی ریشه، شدت علائم بیماری و شاخص‌های رشدی مانند وزن تر و خشک و حجم ریشه و نیز وزن تر و خشک اندام هوایی اندازه‌گیری شد. شدت علائم بیماری در مورد هر بیمارگر بر اساس دو شاخص ارزیابی گردید؛ در مورد *F. redolens* شاخص‌های زردی بوته و نکروز ریشه بین ۰ تا ۴ به‌طور جداگانه و به ترتیب مطابق روش هوانگ و همکاران (Hwang *et al.* 1994) و اسماعیلی طاهری و همکاران (Esmaeili Taheri *et al.* 2011) با اندکی تغییر و به‌صورت زیر محاسبه شد: ۰: بدون زردی در بخش‌های هوایی یا نکروز ریشه، ۱: تا ۲۵ درصد زردی بخش‌های هوایی یا نکروز ۲۵ درصد ریشه، ۲: بین ۲۵ تا ۵۰ درصد زردی بخش‌های هوایی یا نکروز ۲۵ تا ۵۰ درصد ریشه، ۳: بین ۵۰ تا ۷۵ درصد زردی بخش‌های هوایی یا نکروز ۵۰ تا ۷۵ درصد ریشه، ۴: بین ۷۵ تا ۱۰۰ درصد زردی بخش‌های هوایی یا نکروز ۷۵ تا ۱۰۰

درصد ریشه. جهت ارزیابی شدت علائم بیماری ناشی از بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* نیز از شاخص زردی بوته به‌روش هوانگ و همکاران (Hwang *et al.* 1994) و شاخص نکروز آوندی مطابق روش آرورا و پاندی (Arora and Pandey 1989) استفاده شد: ۱: بدون تغییر رنگ آوند چوب، ۲: ناحیه تغییر رنگ قهوه‌ای شدن آوند چوب بین ۵-۱۰ میلی‌متر، ۳: ناحیه تغییر رنگ آوند چوب به‌صورت خطوط متراکم و بین ۱۰- ۱۵ میلی‌متر، ۴: ناحیه تغییر رنگ آوند چوب کاملاً متراکم و با اندازه خطوط بیش از ۱۵ میلی‌متر.

داده‌های حاصل توسط نرم‌افزار SAS و در قالب طرح اجرا شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. سطح احتمال آماری در کلیه محاسبات نیز همچنان پنج درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

بازدارندگی از رشد بیمارگرهای فوزاریومی توسط پروبیوتیک‌ها روی محیط کشت در شرایط آزمایشگاه

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر جدایه‌های پروبیوتیک روی رشد کلنی قارچ‌های *Fusarium redolens* و *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* در آزمون‌های کشت متقابل و تولید ترکیبات فرّار در محیط PDA.

Table 1- Mean comparison of influence of probiotic isolates on colony growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* and *Fusarium redolens* in dual culture and volatile compounds production tests on PDA.

	F. redolens		*F. oxysporum*	
Treatment	Inhibitory halo in dual culture (mm)	Inhibition by volatile compounds (%)	Inhibitory halo in dual culture (mm)	Inhibition by volatile compounds (%)
Alcaligenes faecalis 1624	5 ab	46.185 a	4.6667 a	42.963 a
Bacillus pumilus INR7	8 a	11.245 c	1.3333 b	14.815 c
Control	0 b	0 d	0 c	0 d
Delftia tsuruhatensis PIIR	1.333 b	15.663 bc	1.3333 b	25.185 b
Pseudomonas putida RUP1	2.333 b	16.064 bc	1.6667 b	17.407 bc
Stenotrophomonas maltophilia S37	1.333 b	20.08 b	1.6667 b	25.556 b

اعداد، میانگین سه تکرار هستند. حروف غیرمشترک در کنار هر ستون نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

Data are means of 3 replicates. Different characters beside each column indicate statistically significant difference at 5% probability level according to Duncan test.

بازدارندگی از رشد *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*

همه سویه‌های باکتریایی در آزمون کشت متقابل از رشد بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* جلوگیری نمودند. بیشترین میزان بازدارندگی مربوط به جدایه *A. faecalis* 1624 با پهنای بازدارندگی ۴٫۶ میلی‌متر بود (جدول ۱). *T. harzianum* T33 نیز با ۴۰٫۷۴ درصد کاهش رشد

بازدارندگی از رشد *F. redolens*

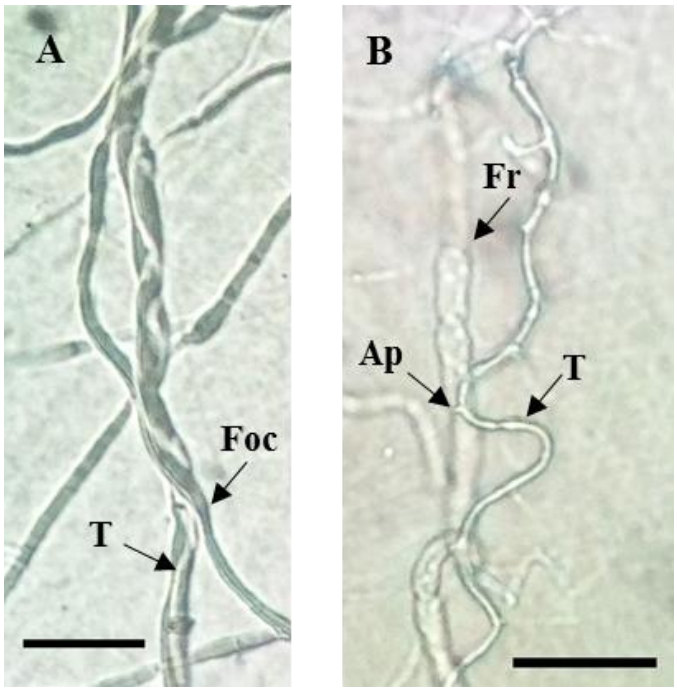
در آزمون کشت متقابل، در میان باکتری‌ها فقط *B. pumilus* INR7 با تشکیل هاله بازدارنده‌ای به قطر ۸ میلی‌متر، در سطح احتمال پنج درصد اثر معنی‌داری در بازدارندگی از بیمارگر *F. redolens* داشت (جدول ۱). *T. harzianum* T33 نیز بر اساس آزمون تی با ۴۳٫۸۲ درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر، اختلاف معنی‌داری با شاهد نشان داد.

در آزمون تولید ترکیبات فرّار، همه جدایه‌های باکتریایی از رشد میسلیوم بیمارگر جلوگیری نمودند و بیشترین و کمترین بازدارندگی به ترتیب مربوط به *A. faecalis* 1624 و *B. pumilus* INR7 بود. همچنین بین میزان بازدارندگی جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده شد (جدول ۱). *T. harzianum* T33 نیز ۴۵٫۵۵ درصد نسبت به شاهد از رشد بیمارگر جلوگیری نمود.

میسلیوم قارچ، اثر معنی‌داری روی این بیمارگر نشان داد. در آزمون تولید ترکیبات فرّار نیز اثر همه سویه‌های باکتریایی در ممانعت از رشد این بیمارگر معنی‌دار بود و دو جدایه *B. pumilus* INR7 و *A. faecalis* 1624 با بازدارندگی ۴۲٫۹۶ و ۱۴٫۸۱ درصد به‌ترتیب دارای بیشترین و کمترین اثر بودند. بین میزان بازدارندگی جدایه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری وجود داشت (جدول ۱). قارچ *T. harzianum* T33 نیز با ۴۳٫۸۲ درصد بازدارندگی، اثر معنی‌داری بر مهار رشد این بیمارگر داشت.

آزمون قابلیت فرا انگلی جدایه *T. harzianum*

در بررسی میکروسکوپی اثر سویه *T. harzianum* T33 بر بیمارگرها، پیچش ریسه‌ای آن در اطراف ریسه‌های هر دو بیمارگر (شکل ۱) دیده شد و در برخی موارد زائده اپرسوریوم مانند، توسط *T. harzianum* T33 در محل اتصال به میسلیوم بیمارگر مشاهده گردید و پس از چند روز، قطعه‌قطعه شدن میسلیوم بیمارگرها رؤیت شد. این وقایع نشان دهنده فعالیت فرا انگلی *T. harzianum* T33 نسبت به دو بیمارگر مورد بررسی بود.



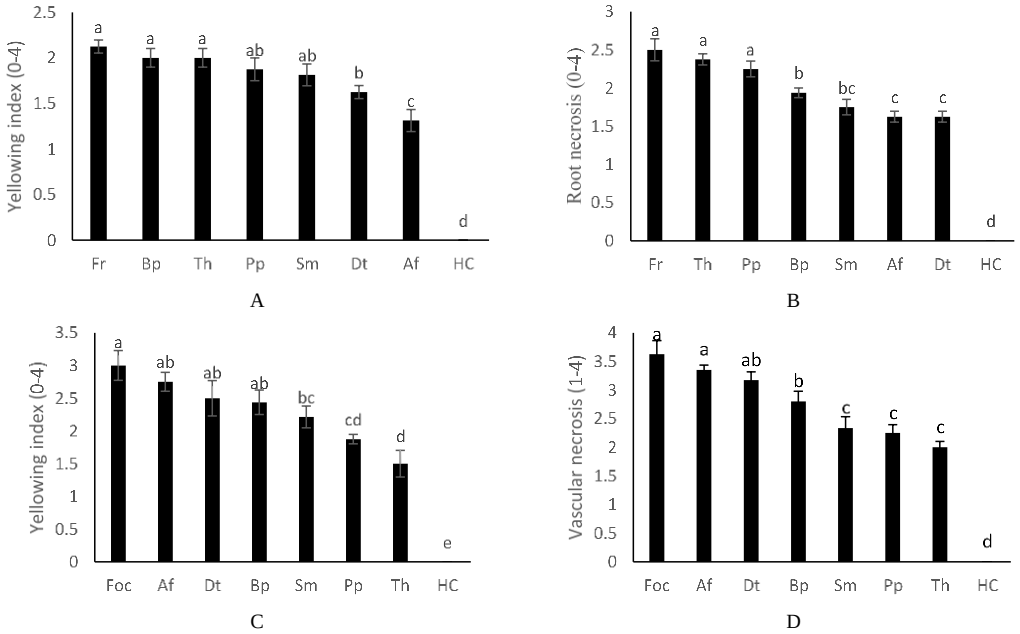
شکل ۱- تصویر میکروسکوپی از تعاملات ریسه‌ای *Trichoderma harzianum* T33 با بیمارگرهای *Fusarium redolens* و *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. A) پیچش ریسه *T. harzianum* T33 (T) در اطراف ریسه *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc)؛ B) تشکیل اپرسوریوم (Ap) توسط *T. harzianum* T33 در محل اتصال به ریسه *Fusarium redolens* (Fr). (مقیاس‌ها = ۲۰ میکرومتر)

Figure 1. Microscopic image of the hyphal interactions of *Trichoderma harzianum* T33 with *Fusarium redolens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*. A) Twisting of *T. harzianum* T33 (T) hypha around *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* (Foc); B) formation of appressorium (Ap) by *T. harzianum* T33 at the junction with *Fusarium redolens* (Fr) hypha. (Scales = 20 micrometers)

آزمون کنترل زیستی بیمارگر *F. redolens* توسط جدایه‌های پروبیوتیک در شرایط گلخانه

نتایج حاصل از کاربرد عوامل آنتاگونیستی بر بیمارگر *F. redolens* نشان دهنده اثر *D. tsuruhatensis* PIIR و *A. faecalis* 1624 در کاهش بروز نشانه‌های زردی به ترتیب به میزان ۳۸٫۲ و ۲۳٫۵۸ درصد در سطح احتمال پنج درصد بود. سایر تیمارها با وجود کاهش شدت نشانه‌های زردی، با شاهد آلوده اختلاف معنی‌دار نداشتند (شکل ۲، A). همچنین به‌جز *P. putida* RUP1 و *T. harzianum* T33، سایر تیمارها موجب کاهش

معنی‌دار نکروز ریشه نسبت به شاهد آلوده شدند و *D. tsuruhatensis* PIIR و *A. faecalis* 1624 با کاهش ۳۵٫۲ درصدی این علائم، بهترین تیمارها بودند (شکل ۲، B).



شکل ۲ - اثر تیمار پروبیوتیک‌ها بر شدت زردی (A) و نکروز ریشه (B) ناشی از قارچ *Fusarium redolens* و اثر آن‌ها بر شدت زردی (C) و تغییر رنگ آوندی (D) ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* در گلخانه. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، از نظر آماری با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

Figure 2. Effects of the probiotic agents treatment on yellowing A and root necrosis B severity caused by *Fusarium redolens* and their effect on the severity of yellowing C and discoloration of vascular tissues D caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* in greenhouse condition. Mean comparison analyses were done by Duncan test at 5% probability level. Means with at least the same letters have no significant difference.

Fr =*Fusarium redolens* and Foc *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* are the infected controls, Af = *Alcaligenes faecalis* 1624, Bp = *Bacillus pumilus* INR7, DS = *Delftia tsuruhatensis* PIIR, Pp = *Pseudomonas putida* RUP1, Sm = *Stenotrophomonas maltophilia* S37, Th = *Trichoderma harzianum* T33 and HC = healthy control.

با مقایسه میانگین‌ها مشخص شد کلیه تیمارها در حضور بیمارگر *F. redolens* سبب افزایش حجم ریشه شده‌اند و از این نظر بین خود تیمارهای پروبیوتیک نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. باکتری *A. faecalis* 1624 و پس از آن *D. tsuruhatensis* PIIR و *B. pumilus* INR7 با افزایش حجم ریشه به ترتیب به نسبت ۲٫۲۵ و ۲٫۱۷ برابر نسبت به شاهد آلوده، بهتر از سایرین عمل نموده و حجم ریشه را نسبت به شاهد سالم نیز ۲۹٫۲۶ و ۲۴٫۳۹ درصد افزایش دادند و سویه *P. putida* RUP1 با افزایش حجم ریشه به میزان ۱٫۴۹ برابر شاهد آلوده، کمترین اثر را داشت (جدول ۲). علاوه بر این، کلیه پروبیوتیک‌ها به‌جز *P. putida* RUP1 و *T. harzianum* T33 در حضور این تیمار کلیه عوامل آنتاگونیست، سبب افزایش وزن تر بیمارگر سبب افزایش وزن تر ریشه گردیدند و *A. faecalis* 1624 با افزایش ۱٫۸۴ برابری این فاکتور نسبت به شاهد آلوده، بهترین تیمار بود (جدول ۲). همچنین اندام هوایی نسبت به شاهد آلوده گردید. سویه‌های *D. tsuruhatensis* PIIR و *A. faecalis* 1624 به‌ترتیب با افزایش ۴۵٫۳۹ و ۳۶٫۹۵ درصدی این شاخص نسبت به شاهد آلوده بهترین، و *P. putida* RUP1 و *T. harzianum* T33 ضعیف‌ترین تیمارها بودند (

جدول ۲). کلیه پروبیوتیک‌های مورد آزمون به‌استثنای *T. harzianum* T33، نه‌تنها در حضور بیمارگر *F. redolens* سبب افزایش وزن خشک ریشه شدند، بلکه این شاخص را (البته به‌استثنای *P. putida* RUP1 و *T. harzianum* T33) نسبت به شاهد سالم نیز افزایش دادند. در این میان، سویه‌های *B. pumilus* INR7، *A. faecalis* 1624 و *D. tsuruhatensis* PIIR به ترتیب با افزایش ۱٫۶۷، ۱٫۶۵ و ۱٫۵۷ برابری این فاکتور رشدی نسبت به شاهد آلوده و افزایش ۱٫۳۶، ۱٫۳۴ و ۱٫۲۸ برابری آن نسبت به شاهد سالم، بهترین اثر را بر وزن خشک ریشه داشتند (

جدول ۲). ارزیابی اثر تیمارها بر وزن خشک اندام هوایی نیز نشان داد همه آن‌ها به‌استثنای *T. harzianum* T33 باعث افزایش این شاخص نسبت به شاهد آلوده گردیده‌اند و مجدداً تیمارهای *A. faecalis* 1624، *B. pumilus* INR7، *D. tsuruhatensis* PIIR به ترتیب با افزایش این فاکتور به میزان ۴۳٫۳۱، ۳۹٫۶۷ و ۳۸٫۸۶ درصد نسبت به شاهد آلوده، بهتر از سایرین عمل نمودند. همچنین باکتری *A. faecalis* 1624 توانست وزن خشک اندام هوایی را نسبت به شاهد سالم به میزان ۱۲٫۳۸ درصد افزایش دهد.

جدول ۲- اثر پروبیوتیک‌ها بر پارامترهای رشدی نخود در حضور قارچ *Fusarium redolens* در گلخانه

Table 2. Effect of probiotics on chickpea growth parameters in the presence of *Fusarium redolens* in greenhouse.

Treatment	Root volume (ml)	Root wet weight (gr)	Root dry weight (gr)	Foliage dry weight (gr)	Foliage wet weight (gr)
Alcaligenes faecalis 1624	13.25 a	11.86 a	0.66 a	3.545 a	26.61 a
Bacillus pumilus INR7	12.75 a	11.7275 a	0.6775 a	3.4525 ab	26.145 ab
Delftia tsuruhatensis PIIR	12.75 a	11.3 ab	0.635 a	3.4325 abc	28.25 a
Fusarium redolens	5.875 d	6.4325 d	0.4 d	2.4725 e	19.438 c
Healthy control	10.25 b	8.3725 cd	0.4925 cd	3.155 bcd	25.493 ab
Pseudomonas putida RUP1	8.75 c	8.0375 cd	0.52 bc	3.065 cd	23.023 b
Stenotrophomonas maltophilia S37	8.875 bc	9.755 bc	0.6 ab	3.1535 bcd	25.513 ab
Trichoderma harzianum T33	9.75 bc	8.2025 cd	0.4675 cd	2.7975 de	22.93 b

اعداد جدول میانگین چهار تکرار هستند. حروف غیرمشترک کنار هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

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

آزمون کنترل زیستی بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* توسط جدایه‌های پروبیوتیک در شرایط گلخانه

مطابق شکل ۲، C به‌جز *D. tsuruhatensis* PIIR، *A. faecalis* 1624 و *B. pumilus* INR7، تیمار سه پروبیوتیک دیگر سبب کاهش معنی‌دار شدت علائم زردی ناشی از *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* در قسمت‌های هوایی گردید و *T. harzianum* T33 و سپس *P. putida* RUP1 به ترتیب با کاهش ۵۰ و ۳۷٫۶۶ درصدی این شاخص، نسبت به تیمارهای دیگر اثر بیشتری بر این بیمارگر داشتند. همچنین به‌استثنای *D. tsuruhatensis* PIIR و *A. faecalis* 1624 سایر پروبیوتیک‌ها باعث کاهش معنی‌دار نکروز آوندی شدند که مجدداً *T. harzianum* T33 و *P. putida* RUP1 به ترتیب با کاهش ۴۴٫۷۵ و ۳۷٫۸۴ درصدی این علائم نسبت به شاهد آلوده، بهترین تیمارها بودند (شکل ۲، D). بر اساس مقایسه میانگین‌ها، همه تیمارهای پروبیوتیک بررسی‌شده در حضور *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* ضمن قرار گرفتن در گروه‌های آماری مختلف، سبب افزایش حجم ریشه نسبت به شاهد آلوده شدند و *P. putida* RUP1 و *A. faecalis* 1624 به ترتیب با

افزایش ۱٫۸۸ و ۱٫۳۳ برابری این پارامتر نسبت به شاهد آلوده، بیشترین و کمترین اثر را داشتند. همچنین به‌استثنای *A. faecalis* 1624 کلیه تیمارها در حضور بیمارگر وزن تر ریشه را نسبت به شاهد آلوده افزایش داده و *S. maltophilia* S37 و *P. putida* RUP1 با افزایش ۷۷٫۸۰ و ۶۹٫۷۴ درصدی این فاکتور نسبت به شاهد آلوده بهتر از تیمارهای دیگر بودند. علاوه بر این، فقط سه تیمار *T. harzianum* T33، *P. putida* RUP1 و *S. maltophilia* S37 به ترتیب با ۸۴٫۴۳، ۵۶٫۳۹ و ۴۴٫۲۱ درصد افزایش وزن تر اندام هوایی نسبت به شاهد بیمار، اثر معنی‌داری داشتند.

همچنین، به‌استثنای *D. tsuruhatensis* PIIR و *A. faecalis* 1624 در سایر تیمارها افزایش وزن خشک اندام هوایی در حضور بیمارگر *F. oxysporum* مشاهده گردید و مجدداً سویه‌های *T. harzianum* T33 و *P. putida* RUP1، به ترتیب با افزایش ۱٫۴۳ و ۱٫۳۵ برابری این فاکتور نسبت به شاهد آلوده، تأثیرشان بهتر از سایر تیمارها بود. ارزیابی اثر تیمارهای مختلف بر وزن خشک ریشه نیز نشان داد به‌جز *A. faecalis* 1624، پروبیوتیک‌های دیگر سبب افزایش این فاکتور شده و تیمارهای *P. putida* RUP1، *S. maltophilia* S37 و *T. harzianum* T33 که با شاهد سالم در یک گروه آماری قرار داشتند، به ترتیب با افزایش ۶۸٫۷۵، ۵۶٫۲۵ و ۵۳٫۱۲ درصدی وزن خشک ریشه نسبت به شاهد آلوده، قوی‌تر از سایرین عمل نمودند.

جدول ۳- اثر پروبیوتیک‌ها بر شاخص‌های رشدی نخود در حضور *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* در گلخانه.

Table 3. Effect of treatment with probiotics 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)
Alcaligenes faecalis 1624	7.5 c	5.735 d	0.37 dc	2.73 ab	12.313 e
Bacillus pumilus INR7	8 bc	8.09 bc	0.4525 abc	2.845 a	16.04 cd
Delftia tsuruhatensis PIIR	9.25 ab	8.2025 bc	0.445 bc	2.755 ab	16.658 cd
Fusarium oxysporum f. sp. *ciceris*	5.625 d	5.5225 d	0.32 d	2.2725 b	13.308 de
Healthy control	10.25 a	8.3725 abc	0.4925 ab	3.155 a	25.493 a
Pseudomonas putida RUP1	10.625 a	9.37 ab	0.54 a	3.08 a	20.805 b
Stenotrophomonas maltophilia S37	10 a	9.8725 a	0.5025 ab	2.93 a	19.185 bc
Trichoderma harzianum T33	8.375 bc	7.4175 c	0.4925 ab	3.26 a	24.538 a

اعداد جدول میانگین چهار تکرار هستند. حروف غیرمشترک در کنار هر ستون نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد است.

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

بحث

آنتی‌بیوز یکی از شناخته‌شده‌ترین راهبردهای عوامل پروبیوتیک در کنترل زیستی بیمارگرها و کنترل بیماری‌های گیاهی دارد. در تحقیق حاضر کلیه سویه‌های پروبیوتیک مورد بررسی، در آزمون تولید ترکیبات فرّار و برخی در آزمون کشت متقابل، قابلیت خود را در تولید متابولیت‌های ثانویه و ترکیبات بازدارنده از رشد میسلیوم دو بیمارگر نشان دادند. برخی از این سویه‌ها علاوه بر اثر بازدارنده بر بیمارگرها در آزمایشگاه، در گلخانه نیز سبب کاهش شدت علائم بیماری و بهبود فاکتورهای رشدی ارزیابی‌شده در حضور یک یا هر دو بیمارگر *F. redolens* و *Fusarium oxysporum* شدند. پیش‌تر نیز قابلیت برخی از این جدایه‌ها (*A. faecalis* 1624، *D. tsuruhatensis* PIIR و *S. maltophilia* S37) در بازدارندگی از بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* و افزایش درصد جوانه‌زنی بذور گوجه‌فرنگی و شاخص‌های رشدی آن در حضور بیمارگر به اثبات

رسیده است (Seifi 2019). علاوه بر این، سویه‌های مختلف جنس *Alcaligenes* با تولید متابولیت‌های خارج سلولی (Elmahdi *et al.* 2015)، ترکیبات فرّار ضد قارچی (Gong *et al.* 2019)، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی (Ben Abdallah and Mejdoub-Trabelsi 2016) و سیدروفور (Sayyed and Chincholkar 2009)، فعالیت ضد قارچی وسیعی در برابر چند بیمارگر قارچی (Gong *et al.* 2019) از جمله *F. oxysporum* و برخی فرم‌های اختصاص‌یافته آن (Ben Abdallah and Mejdoub-Trabelsi 2016) نشان داده‌اند. جنس *Delftia* قبلاً به‌عنوان عامل بیوکنترلی بیمارگرهای قارچی دیگر نظیر *Rhizoctonia solani*، *Pythium aphanidermatum* و *Fusarium oxysporum* در محصولات مختلف (Han *et al.* 2005, Morel *et al.* 2015, Prasannakumar *et al.* 2015, Janahiraman *et al.* 2016) شناخته شده و سازوکارهای بیوکنترلی این جنس به تولید سیدروفور (Jeong *et al.* 2006) و فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و بتا ۱،۳-گلوکاناز (Jørgensen *et al.* 2009) نسبت داده شده است. نقش سویه‌های جنس *Stenotrophomonas* نیز پیشتر در مهار برخی بیمارگرهای قارچی گیاهان از جمله *F. oxysporum* به اثبات رسیده (Jeong *et al.* 2006, Szentes *et al.* 2013) و ذکر شده که این قابلیت با تولید آنزیم‌های خارج سلولی (Ben Abdallah *et al.* 2016)، متابولیت‌های ضد قارچی مانند alteramid A و maltophilin (Berg *et al.* 1999)، سیدروفور (Minkwitz and Berg 2001) و ترکیبات فرّار (Ben Abdallah *et al.* 2016, Elshahat *et al.* 2016) مرتبط است. سویه *B. pumilus* INR7 نیز علاوه بر تحریک رشد گیاه، با آنتاگونیسم مستقیم و القای مقاومت سیستمیک (Kloepper *et al.* 2004, Jeong *et al.* 2014)، علیه طیف گسترده‌ای از بیمارگرهای خاکزاد (Lokesh *et al.* 2007) مؤثر بوده است. در برخی پژوهش‌ها اشاره شده ترکیبات فرّار برخی باکتری‌ها از جمله گونه‌های *Bacillus* علاوه بر مهار رشد میسلیوم قارچ‌ها (Elshahat *et al.* 2016) به‌عنوان عوامل اصلی رشد گیاه و تحریک مقاومت سیستمیک عمل می‌کنند (Kloepper *et al.* 2004, Sharifi and Ryu 2016a).

در این تحقیق، جدایه‌های *P. putida* RUP1 و *T. harzianum* T33 علاوه بر مهار رشد *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*، اثر بسیار خوبی در افزایش رشد گیاه داشتند. فعالیت آنتاگونیستی سویه‌های سودوموناس در برابر بیمارگرهای مختلف از جمله پژمردگی‌های فوزایومی نخود و اثرشان در بهبود رشد گیاه قبلاً به اثبات رسیده (Kaur *et al.* 2007, Ebrahimi Kazemabad *et al.* 2012) است. قابلیت بیوکنترلی سودوموناس‌ها را با تولید سیدروفور (Costa and Loper 1994)، ترکیبات فرّار و آنتی‌بیوتیک‌ها (Elshahat *et al.* 2016)، رقابت برای جایگاه‌ها و مواد غذایی (Validov *et al.* 2009)، القای مقاومت سیستمیک (Duke *et al.* 2017) و اثرشان بر افزایش رشد گیاه را نیز با تولید هورمون‌های محرک رشد (Vaja *et al.* 2016) حل کردن فسفات، تثبیت بیولوژیکی نیتروژن و کلاته کردن آهن (Vacheron *et al.* 2013) مرتبط دانسته‌اند. تأثیر مثبت *T. harzianum* بر این بیمارگر نیز مطابق یافته‌های دوبی و همکاران (Dubey *et al.* 2007) بوده است. قابلیت بیوکنترلی سویه‌های تریکودرما به مایکوپارازیتیسم، تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی (Villamizar-Gallardo *et al.* 2017)، مواد فرّار (Nwankiti and Gwa 2018)، آنتی‌بیوتیک، رقابت برای مواد غذایی (Benítez *et al.* 2004) و القای مقاومت سیستمیک (Herrera-Tellez *et al.* 2019) و اثرشان بر بهبود رشد گیاه به ترشح برخی محرک‌های رشد (Dubey *et al.* 2007) و بهبود جذب آب و مواد غذایی توسط گیاه (Jogaiah *et al.* 2018) نسبت داده شده است.

برخی از پروبیوتیک‌های مورد آزمون علاوه بر کاهش علائم بیماری، توانستند در حضور بیمارگرها به‌طور قابل‌توجهی سبب بهبود صفات رشدی گیاه شوند. تولید ترکیبات اُکسینی توسط برخی پروبیوتیک‌ها سبب افزایش مقدار زیست‌توده، سطح ریشه و تولید ریشه‌های جانبی در گیاهان میزبان می‌شود (Afzal *et al.* 2019). جالب این که قابلیت تولید ترکیبات اُکسینی توسط سویه‌های *A. faecalis* 1624، *D. tsuruhatensis* PIIR، *S. maltophilia* S37 و *B. pumilus* INR7 استفاده شده در این تحقیق، قبلاً به اثبات رسیده و علاوه بر آن این

سویه ها، توانایی حل نمودن فسفات و به استثنای *B. pumilus* INR7 تولید سیدروفور که از دیگر خصوصیات محرک رشد در پروبیوتیک‌هاست، را داشته‌اند (Seifi 2019). پژوهش‌های دیگر نیز به جنس‌های باکتریایی مذکور به‌عنوان محرک‌های کارآمد رشد گیاه و نقش خصوصیات مذکور به عنوان عوامل دخیل در تحریک رشد توسط این باکتری‌ها اشاره نموده‌اند (Han *et al.* 2005, Jeong *et al.* 2006, Prasannakumar *et al.* 2015, Ben Abdallah and Mejdoub-Trabelsi 2016, Janahiraman *et al.* 2016, Wozniak *et al.* 2019).

در تحقیق حاضر مانند برخی پژوهش‌های دیگر (Knudsen *et al.* 1997, Jamali *et al.* 2005) نتایج متناقضی بین کاربرد آنتاگونیست‌ها در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مشاهده شد؛ سویه‌های *P. putida* RUP1 و *T. harzianum* T33 علی‌رغم بازدارندگی از رشد بیمارگر *F. redolens* در آزمایشگاه، در گلخانه کارایی خوبی در کاهش بروز بیماری نشان ندادند. همچنین، سویه‌های *D. tsuruhatensis* PIIR و *A. faecalis* 1624 با وجود اثر بر رشد میسلیوم بیمارگر *F. oxysporum* در آزمایشگاه، در گلخانه قادر به کاهش شدت بیماری نبودند. برهم‌کنش‌های سه جزئی میان گیاه میزبان، بیمارگر و آنتاگونیست پیچیده بوده و عوامل بیوکنترل علاوه بر گیاه، با بیمارگر مورد هدف و میکروفلور ساکن نیز تعامل دارند (Köhl *et al.* 2019, Sharifi and Ryu 2020). سایر شرایط آزمایش، محلول خاک یا بستر رشد نیز ممکن است بر اثربخشی عوامل بیوکنترل تأثیرگذار باشند (Lemanceau and Alabouvette 1993).

در پژوهش حاضر هیچکدام از سویه‌های پروبیوتیک باعث کاهش رشد گیاه در مقابل شاهد آلوده نشدند. البته از آنجایی که این سویه‌ها بر اساس کارایی قبلی‌شان در افزایش رشد میزبان‌های مختلف انتخاب شده بودند و صفات پروبیوتیکی برخی از آن‌ها مانند تولید سیدروفور، اکسین و افزایش حلالیت فسفات به اثبات رسیده بود (Ardalan *et al.* 2017, Seifi 2019)، انتظار می‌رفت اثر منفی بر رشد میزبان نداشته باشند. با این وجود، میزان اثرگذاری آن‌ها بسته به پاتوسیستم بسیار متنوع بود و این موضوع یکی از نتایج جالب این پژوهش بود که نشان داد باکتری‌ها الزاماً در پاتوسیستم‌های مختلف پاسخ یکسانی نمی‌دهند؛ در پاتوسیستم نخود و بیمارگر *F. redolens*، سویه‌های *D. tsuruhatensis* PIIR و *A. faecalis* 1624 در افزایش رشد گیاه و مهار بیماری بهترین سویه‌ها بودند و سویه‌های *P. putida* RUP1 و *T. harzianum* T33 در حفظ سلامت گیاه در حضور بیمارگر موثر نبودند. به‌ویژه *T. harzianum* T33 در اغلب فاکتورهای رشدی بررسی شده، اختلاف معنی‌داری با شاهد آلوده نشان نداد. اما در پاتوسیستم نخود و بیمارگر *F. oxysporum*، شرایط تقریباً برعکس بود و سویه‌های *P. putida* RUP1 و *T. harzianum* T33 در کاهش بیماری بهترین تیمارها بودند، در صورتی‌که سویه‌های *D. tsuruhatensis* PIIR و *A. faecalis* 1624 تفاوت معنی‌داری با شاهد آلوده نداشتند. این تفاوت را نمی‌توان به سادگی و صرفاً بر اساس توانایی تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر مواد بازدارنده و یا تولید متابولیت‌های افزاینده رشد گیاه تفسیر کرد. در روابط سه جزئی میان میزبان، بیمارگر و آنتاگونیست این روابط اکولوژیک هستند که سرنوشت‌سازند (Heil 2008, Turlings and Erb 2018, Sharifi and Ryu 2020). به عبارتی یک مکانیسم ممکن است در یک رابطه فعال شده و در رابطه دیگر، فعال نگردد. دو بیمارگر مورد استفاده در این پژوهش با این که از لحاظ جایگاه تاکسونومیکی به هم نزدیک‌اند، ولی از لحاظ مکانیسم بیماری‌زایی و مکان کلونیزاسیون متفاوت می‌باشند. گونه *F. oxysporum*، بیشتر در بافت‌های آوندی و دور از تماس با باکتری‌های ریزوسفری قرار می‌گیرد. البته احتمال اثر مستقیم سویه‌های اندوفیتی مانند سویه *B. pumilus* روی آن وجود دارد. بر عکس *F. redolens* در بافت کورتکس ریشه فعال است و بیشتر باعث نکروز ریشه می‌شود (Jimenez-Fernandez *et al.* 2011, Palmieri *et al.* 2016, Bouhadida *et al.* 2017). در نتیجه احتمال بیشتری وجود دارد که تحت تأثیر مکانیسم‌های مستقیم مهارگری توسط عوامل بیوکنترل قرار گیرد. علاوه بر این، یکی از مکانیسم‌های غالب در مهار بیمارگرهای گیاهی، مقاومت میزبان و القای این مقاومت توسط عوامل بیوکنترل است (Contreras-Cornejo *et al.* 2011, Sharifi and Ryu 2016b). میزبان گیاهی بر اساس مکانیسم‌های بیماری‌زایی بیمارگر، مسیرهای پیام‌رسانی متفاوتی را فعال می‌کند. به‌صورت عمومی مسیر سالیسیلیک اسید

بیشتر علیه بیمارگرهای بیوتروف و مسیر جاسمونیک اسید بیشتر علیه بیمارگرهای نکروتروف مؤثر است (Glazebrook 2005, Pieterse *et al.* 2012, Sharifi and Ryu 2017). البته بسیاری از بیمارگرهای گیاهی در طول چرخه بیماری‌زایی خود رفتارهای متفاوتی نشان می‌دهند و بر اساس این رفتارها مسیرهای متفاوتی را فعال می‌کنند که به بیمارگرهای همی‌بیوتروف معروفند (Martínez- Medina *et al.* 2017). دو بیمارگر مورد استفاده در این پژوهش نیز رفتارهای بیماری‌زایی متفاوتی دارند که بر اساس آن پاسخ گیاه به آن‌ها متفاوت است. عوامل بیوکنترل القاکننده مقاومت نیز بر اساس گونه و سویه خود، مسیرهای متفاوتی را فعال می‌کنند. لذا اثرگذاری آن‌ها روی این بیمارگرها می‌تواند متفاوت باشد. بنابراین طبیعی است که در این دو پاتوسیستم متفاوت، برآیند روابط اکولوژیک متفاوت و گاهاً متضاد باشد، چرا که مسیرهای پیام رسانی ذکر شده در برخی موارد اثر متضادی روی یکدیگر دارند (Pieterse *et al.* 2012).

پروبیوتیک‌های به‌کار رفته در این تحقیق برای اولین بار به‌عنوان عوامل محافظت‌کننده نخود در برابر *F. redolens* و همچنین *A. faecalis*، *D. tsuruhatensis* و *S. maltophilia* برای نخستین بار به‌عنوان عوامل بیوکنترل *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* گزارش می‌شوند.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی جدایه‌های پروبیوتیک مورد استفاده در این پژوهش، در بررسی‌های آزمایشگاهی توانایی مهار بیمارگرهای *F. redolens* و *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* را داشتند اما در گلخانه قابلیت‌های متفاوتی برای کاهش شدت بیماری و اثر بر پارامترهای رشدی نخود در حضور این دو بیمارگر نشان دادند. *T. harzianum* T33 و *P. putida* RUP1 بهترین تیمارها در کاهش بروز نشانه‌های بیماری ناشی از *F. oxysporum* f. sp. *ciceris* بوده و در خاک آلوده به این بیمارگر، بهترین تأثیر را در افزایش برخی پارامترهای رشدی داشتند. در مقابل، *D. tsuruhatensis* PIIR و *A. faecalis* 1624 در کاهش بروز نشانه‌های زردی و نکروز ریشه علیه *F. redolens* و افزایش فاکتورهای رشدی در حضور این بیمارگر تیمارهای بهتری بودند. بنابراین، پس از بررسی‌های کامل و لازم و با توجه به مشکل بیماری فوزاریومی رایج منطقه، کاربرد این پروبیوتیک‌ها را می‌توان به‌صورت تیمار بذری یا خاک قبل از تلقیح بیمارگر، به‌عنوان روشی کارآمد در کشاورزی پایدار جهت مدیریت بیماری‌های فوزاریومی و بهبود رشد نخود توصیه نمود. با این وجود، لازم است خصوصیات مثبت و منفی این سویه‌های باکتریایی و نیز اثر آن‌ها روی موجودات غیر هدف، قبل از توصیه آن‌ها ارزیابی شود. البته با توجه با این‌که معمولاً این دو بیماری به صورت همزمان در مزارع ظاهر شده و خسارت ایجاد می‌کنند و کاربرد یک سویه کارامد روی یک بیمارگر ممکن است اثری روی بیمارگر دیگر نداشته باشد، می‌توان از کنسرسیومی از عوامل بیوکنترل استفاده نمود که در مجموع روی هر دو بیمارگر مؤثر باشند. همچنین لازم است اثر ترکیب این باکتری‌ها روی همدیگر و گیاه میزبان نیز مورد ارزیابی قرار گیرد. علاوه بر این پیشنهاد می‌شود اثر این پروبیوتیک‌ها روی کارایی رابطه همزیستی نخود با باکتری‌های تثبیت‌کننده ازت بررسی شود.

سپاسگزاری

نویسندگان از دکتر مهیار شیخ‌الاسلامی و دکتر سونیا سیفی بابت در اختیار نهادن برخی جدایه‌های مورد استفاده در این تحقیق، کمال تشکر را دارند.

REFERENCES

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

Ardalan A, Abbasi S, Sharifi R (2017) Effect of some mineral elements on biocontrol efficiency of *Bacillus pumilus* INR7 against bean damping-off caused by *Rhizoctonia solani*. Biological Control of Pests and Plant Diseases 6(2): 187-195 (In Persian).

Arora D, Pandey A (1989) Effects of soil solarization on *Fusarium* wilt of chickpea. Journal of

Phytopathology 124(1): 13-22.

Ben Abdallah RA, Jabnoun-Khiareddine H, Nefzi A, Mokni-Tlili S, Daami-Remadi M (2016) Endophytic bacteria from *Datura stramonium* for Fusarium wilt suppression and tomato growth promotion. Journal of Microbial and Biochemical Technology 8(1): 030-041.

Ben Abdallah RA, 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).

Benítez T, Rincón AM, Limón MC, Codon AC (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7(4): 249-260.

Berg G, Roskot N, Smalla K (1999) Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. Journal of Clinical Microbiology 37(11): 3594-3600.

Bhattacharyya PN, Jha DK (2012) Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology 28(4): 1327-1350.

Bouhadida M, Jendoubi W, Gargouri S, Beji M, Kharrat M, Chen W (2017) First report of *Fusarium redolens* causing Fusarium yellowing and wilt of chickpea in Tunisia. Plant Disease 101(6): 1038-1038.

Contreras-Cornejo HA, Macias-Rodriguez L, Beltran-Pena E, Herrera-Estrella A, Lopez-Bucio J (2011) *Trichoderma*-induced plant immunity likely involves both hormonal- and camalexin-dependent mechanisms in *Arabidopsis thaliana* and confers resistance against necrotrophic fungi *Botrytis cinerea*. Plant Signaling and Behavior 6(10): 1554-63.

Costa JM, Loper JE (1994) Characterization of siderophore production by the biological control agent *Enterobacter cloacae*. Molecular Plant Microbe Interactions 7(4): 440-448.

Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57(1): 41-48.

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.

Duke KA, Becker MG, Girard IJ, Millar JL, Dilantha Fernando WG, Belmonte MF, de Kievit TR (2017) The biocontrol agent *Pseudomonas chlororaphis* PA23 primes *Brassica napus* defenses through distinct gene networks. BMC Genomics 18(1): 467.

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.

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

Garbeva P, Van Elsas J, Van Veen J (2008) Rhizosphere microbial community and its response to plant species and soil history. Plant and Soil 302(1-2): 19-32.

Ghanbarzadeh B, Safaie N, Goltapeh EM (2014) Antagonistic activity and hyphal interactions of *Trichoderma* spp. against *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum In vitro*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 47(16): 1979-1987.

Ghasemi A, Rostami M, Yazdaninia T (2012) *In vitro* antagonistic and biodegradation activity of a newly isolated *Delftia tsuruhatensis* from rice plant in Iran. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 4(2): 40-44.

Glazebrook J (2005) Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review of Phytopathology 43(1): 205-27.

Gong AD, Wu NN, Kong XW, Zhang YM, Hu MJ, Gong SJ, Dong FY, Wang JH, Zhao ZY, Liao YC (2019) Inhibitory effect of volatiles emitted from *Alcaligenes faecalis* N1-4 on *Aspergillus flavus* and aflatoxins in storage. Frontiers in Microbiology 10: 1419.

Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, Yang H, Wang Y, Song W (2005) Characterization of a novel plant growth-promoting bacteria strain *Delftia tsuruhatensis* HR4 both as a diazotroph and a potential biocontrol agent against various plant pathogens. Systematic and Applied Microbiology 28(1): 66-76.

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.

Heil M (2008) Indirect defence via tritrophic interactions. New Phytologist 178(1): 41-61.

Herrera-Tellez VI, Cruz-Olmedo AK, Plasencia J, Gavilanes-Ruiz M, Arce-Cervantes O, Hernandez-Leon S, Saucedo-Garcia M (2019) The protective effect of *Trichoderma asperellum* on tomato plants against *Fusarium oxysporum* and *Botrytis cinerea* diseases involves inhibition of reactive oxygen species production. International Journal of Molecular Sciences 20(8).

Huang Y, He Y, Ye B-C, Li C (2017) Rhizospheric *Bacillus subtilis* exhibits biocontrol effect against *Rhizoctonia solani* in pepper (*Capsicum annuum*). BioMed Research International 2017: 1-9.

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.

Inbar J, Abramsky M, Cohen D, Chet I (1994) Plant growth enhancement and disease control by *Trichoderma harzianum* in vegetable seedlings grown under commercial conditions. European Journal of Plant Pathology 100(5): 337-346.

Jamali F, Sharifi Tehrani A, Okhovvat M, Zakeri Z (2005) Effect of antagonistic bacteria on the control of Fusarium wilt of chickpea caused by *Fusarium oxysporum*. Iranian, J. Agric. Sci. 36: 711-717 (In Persian).

Janahiraman V, Anandham R, Kwon SW, Sundaram S, Karthik Pandi V, Krishnamoorthy R, Kim K, Samaddar S, Sa T (2016) Control of wilt and rot pathogens of tomato by antagonistic pink pigmented facultative methylotrophic *Delftia lacustris* and *Bacillus* spp. Front Plant Sci 7: 1626.

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.

Jeong DE, Lee SJ, Seul KJ, Park YM, Ghim SY (2006) Characterization of diazotrophs isolated from rice rhizosphere and their antifungal activities. Microbiology and Biotechnology Letters 34(2): 180-184.

Jeong H, Choi SK, Kloepper JW, Ryu CM (2014) Genome sequence of the plant endophyte *Bacillus pumilus* INR7, triggering induced systemic resistance in field crops. Genome Announcements 2(5): e01093-14.

Jimenez-Fernandez D, Navas-Cortes JA, Montes-Borrego M, Jimenez-Diaz RM, 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.

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.

Jørgensen NO, Brandt KK, Nybroe O, Hansen M (2009) *Delftia lacustris* sp. nov., a peptidoglycan-degrading bacterium from fresh water, and emended description of *Delftia tsuruhatensis* as a peptidoglycan-degrading bacterium. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59(9): 2195-2199.

Kaur R, Singh R, Alabouvette C (2007) Antagonistic activity of selected isolates of fluorescent Pseudomonas against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Asian Journal of Plant Sciences 6(3): 446-454.

Kloepper JW, Ryu CM, Zhang SA (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94(11): 1259-1266.

Knudsen I, Hockenhull J, Jensen DF, Gerhardson B, Hökeberg M, Tahvonen R, Teperi E, Sundheim L, Henriksen B (1997) Selection of biological control agents for controlling soil and seed-borne diseases in the field. European Journal of Plant Pathology 103(9): 775-784.

Köhl J, Kolnaar R, Ravensberg WJ (2019) Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. Frontiers in Plant Science 10: 845.

Kumari P, Khanna V (2019) Seed bacterization stimulated resistance in chickpea against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. Indian Phytopathology 72(4): 689-697.

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.

Lemanceau P, Alabouvette C (1993) Suppression of fusarium wilts by fluorescent pseudomonads: Mechanisms and applications. Biocontrol Science and Technology 3(3): 219-234.

Lokesh S, Bharath B, Raghavendra V, Govindappa M (2007) Importance of plant growth-promoting

rhizobacteria in enhancing the seed germination and growth of watermelon attacked by fungal pathogens. Acta Agronomica Hungarica 55(2): 243-249.

Lorito M, Hayes C, Di Pietro A, Woo S, Harman GJP (1994) Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1, 3-beta-glucosidase and an N-acetyl-beta-glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. Phytopathology 84(4): 398-405.

Martínez-Medina A, Fernandez I, Lok GB, Pozo MJ, Pieterse CM, Van Wees S (2017) Shifting from priming of salicylic acid-to jasmonic acid-regulated defences by *Trichoderma* protects tomato against the root knot nematode *Meloidogyne incognita*. New Phytologist 213(3): 1363-1377.

Minkwitz A, Berg G (2001) Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. Journal of Clinical Microbiology 39(1): 139-145.

Morel MA, Cagide C, Minteguiaga MA, Dardanelli MS, 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.

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.

Nwankiti A, Gwa V (2018) Evaluation of antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* against *Fusarium oxysporum* causal agent of white yam (*Dioscorearotundata poir*) tuber rot. Trends in Technical & Scientific Research 1(1): 0012-0018.

Palmieri D, Vitullo D, De Curtis F, 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.

Pieterse CM, Van der Does D, Zamioudis C, Leon-Reyes A, Van Wees SC (2012) Hormonal modulation of plant immunity. Annual Review of Cell and Developmental Biology 28: 489-521.

Prasannakumar SP, Gowtham HG, Hariprasad P, Shivaprasad K, 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): 460-8.

Sayyed RZ, Chincholkar SB (2009) Siderophore-producing *Alcaligenes feacalis* exhibited more biocontrol potential vis-à-vis chemical fungicide. Current Microbiology 58(1): 47-51.

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.

Shabir R R, Kumar EJ, Talat M, Ganie SA, Dar WA, Bhat JA (2013) Eco-friendly management of root-rot of chilli caused by *Rhizoctonia solani* Kuhn. African Journal of Agricultural Research 8(21): 2563-2566.

Sharifi R, 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.

Sharifi R, Ryu CM (2016b) Making healthier or killing enemies? Bacterial volatile-elicited plant immunity plays major role upon protection of *Arabidopsis* than the direct pathogen inhibition. Communicative and Integrative Biology 9(4): e1197445.

Sharifi R, Ryu CM (2017) Chatting With a Tiny Belowground Member of the Holobiome. Advances in Botanical Research 82: 135-160.

Sharifi R, Ryu C-M (2020) Contribution of Bacterial Volatiles to Chemical Ecology, In: Ryu C-M, L Weisskopf and B Piechulla (ed.), Bacterial Volatile Compounds as Mediators of Airborne Interactions. Springer Singapore, Singapore. pp. 167-186.

Sohrabi F, Sheikholeslami M, Heydari R, Rezaee S, Sharifi R (2020) Investigating the effect of *Glomus mosseae*, *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* on plant growth and controlling *Meloidogyne javanica* in tomato. Indian Phytopathology 73(2): 293-300.

Sohrabi M (2016) Biological control of Fusarium species associated to chickpea wilt and root rot in Kermanshah and Kurdistan Proviences by plant growth promoting rhizobacteria. MSc thesis, Razi University, Kermanshah, Iran.

Sreeramulu K, Jayalakshmi SK, Raju S, S U, Benagi V (2009) *Trichoderma harzianum* L1 as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense responses in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*. Australian Journal of Crop Science 3(1): 44-52.

Szentes S, Radu G-L, Laslo É, Lányi S, Mara G (2013) Selection and evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from a raised bog environment. Crop Protection 52: 116-124.

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. Medıterranean Agrıcultural Scıences 30(1): 27-33.

Turlings TCJ, Erb M (2018) Tritrophic interactions mediated by herbivore-induced plant volatiles: Mechanisms, ecological relevance, and application potential. Annual Review of Entomology 63(1): 433-452.

Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, Touraine B, Moënne-Loccoz Y, Muller D, Legendre L, Wisniewski-Dyé F, Prigent-Combaret C (2013) Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning. Frontiers in Plant Science 4: 356.

Vaja KN, Gajera HP, Hirpara DG, Vaja VN, Golakiya BA (2016) Biochemical characterization and molecular identification of *Pseudomonas* antagonists inhibiting *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri* and *Sclerotium rolfsii* Sacc. Indian Journal of Agricultural Biochemistry 29(2): 175-183.

Validov SZ, Kamilova F, Lugtenberg BJ (2009) *Pseudomonas putida* strain PCL1760 controls tomato foot and root rot in stonewool under industrial conditions in a certified greenhouse. Biological Control 48(1): 6-11.

Villamizar-Gallardo RA, Ortíz-Rodriguez OO, Escobar JW (2017) Symbiotic and endophytic fungi as biocontrols against cocoa (*Theobroma cacao* L.) phytopathogens. Summa Phytopathologica 43(2): 87-93.

Wozniak M, Galazka A, Tyskiewicz R, Jaroszuk-Scisel J (2019) Endophytic bacteria potentially promote plant growth by synthesizing different metabolites and their phenotypic/physiological profiles in the biolog GEN III MicroPlate^{TM} Test. International Journal of Molecular Sciences 20: 5283.

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.