پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۱۱ (۱): ۱۰۸-۹۷ (۱۴۰۱)- مقاله پژوهشی

Journal of Applied Research in Plant Protection 11(1): 97-108 (2022)-Research Article

DOI: https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2021.13600

اثر چند باکتری پروبیوتیک و روش‌های مختلف کاربرد آنها در کنترل زیستی بیماری برق‌زدگی نخود

ناهید معرف‌زاده✉، هادی خاطری، روح‌اله شریفی

گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران. ✉ n.moarrefzadeh@razi.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱۲ بازنگری: ۱۴۰۰/۲/۲۵ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۹

چکیده

بیماری برق‌زدگی نخود ناشی از قارچ *Ascochyta rabiei* در سراسر جهان سبب کاهش عملکرد و کیفیت نخود (*Cicer arietinum*) می‌شود. در این پژوهش، پتانسیل کنترل زیستی ۱۲ سویه باکتری پروبیوتیک از جنس‌های *Alcaligenes*، *Arthrobacter*، *Bacillus*، *Delftia*، *Lysinibacillus*، *Pseudomonas* و *Stenotrophomonas* علیه *A. rabiei* بررسی گردید. در آزمون‌های کشت متقابل و تولید ترکیبات فرار، همه باکتری‌های پروبیوتیک (به‌جز یک جدایه Bacillus) اثر بازدارندگی معنی‌داری بر رشد میسلیوم بیمارگر داشتند. بیشترین بازدارندگی در آزمون کشت متقابل توسط *Bacillus subtilis* BS (۵۷,۸۴ درصد) و در آزمون ترکیبات فرار توسط *Alcaligenes faecalis* 1624 (۷۲,۵ درصد) به‌دست آمد. شش باکتری پروبیوتیک با بهترین نتایج بازدارندگی در آزمایشگاه انتخاب شدند و اثر کنترل زیستی آنها بر بیماری و تحریک‌کنندگی رشد گیاه (وزن تر و خشک) در حضور بیمارگر با دو روش کاربرد بذری و محلول‌پاشی برگی، در گلخانه ارزیابی گردید. همه باکتری‌های پروبیوتیک منتخب در هر دو روش کاربرد، با اختلاف معنی‌دار نسبت به شاهد بیمار سبب کاهش شاخص بیماری و افزایش فاکتورهای رشدی نخود شدند ولی با تیمار بذری *A. faecalis* 1624 افزایش وزن تر اندام هوایی مشاهده نشد. تیمار برگی *B. subtilis* BS با اختلاف زیاد نسبت به تیمارهای دیگر، کارآمدترین سویه در کاهش شاخص بیماری (۶۳,۸۰ درصد) و افزایش فاکتورهای رشدی گیاه نخود بود. طبق نتایج این تحقیق، کاربرد برگی *B. subtilis* BS پتانسیل بالایی در کنترل زیستی برق‌زدگی و افزایش رشد نخود داشت. بنابراین در صورت تایید کارایی این باکتری در مطالعات مزرعه‌ای، در آینده می‌توان از آن در مدیریت تلفیقی این بیماری استفاده نمود.

کلمات کلیدی: کشت متقابل، ترکیبات فرار، برق‌زدگی نخود، آغشته‌سازی بذر، پاشش برگی

The effect of some probiotic bacteria and different methods of their application in biological control of chickpea ascochyta blight disease

Nahid Moarrefzadeh✉, Hadi Khateri, Rouhallah Sharifi

Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran ✉n.moarrefzadeh@razi.ac.ir

Received: 2 May 2021 Revised: 15 May 2021 Accepted: 19 May 2021

Abstract

Chickpea ascochya blight caused by *Ascochyta rabiei*, reduces the yield and quality of chickpea (*Cicer arietinum*) around the world. The biocontrol potential of 12 bacterial probiotics from genera *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Delftia*, *Lysinibacillus*, *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas* was investigated against *A. rabiei*. In dual-culture and volatile compounds production tests, all probiotic bacteria (except one Bacillus isolate) significantly inhibited the mycelial growth of pathogen. The highest inhibition in these tests was obtained by *Bacillus subtilis* BS (57.84%) and *Alcaligenes faecalis* 1624 (72.5%), respectively. Six probiotic bacteria with the best inhibitory results in the laboratory were selected and their biocontrol and growth stimulation (fresh and dry weight) effects were evaluated in the presence of the pathogen using seed application and foliar spraying methods in the greenhouse. In comparison to the disease control, all selected probiotics in both application methods significantly reduced the disease index and increased the growth factors of chickpea plants (except for the seed treatment of *A. faecalis* 1624 which did not increase the fresh weight of shoots). Foliar application of *B. subtilis* BS, with large difference to other treatments, was the most effective treatment in reducing the disease index (63.80%) and increasing the growth factors of chickpea. According to the results of this study, foliar application of *B. subtilis* BS had great potential in biocontrol of ascochya blight and growth promotion of chickpea. Therefore, if its effectiveness is confirmed by field studies, it could be used in integrated management of this disease in the future.

Keywords: Chickpea ascochyta blight, Dual culture, Foliar spray, Seed application, Volatile compounds

How to cite:

Moarrefzadeh N, Khateri H, Sharifi R, 2022. The effect of some probiotic bacteria and different methods of their application in biological control of chickpea ascochyta blight disease. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 11 (1): 97–108.

مقدمه

حبوبات از منابع مهم پروتئین با محتوای فیبر زیاد هستند و مقادیر زیادی ویتامین و مواد معدنی برای رژیم غذایی انسان تأمین می‌نمایند (Manjunatha *et al.* 2018). نخود (*Cicer arietinum* L.) یکی از مهم‌ترین حبوبات است که در سراسر جهان، به‌ویژه در کشورهای آفریقایی و آسیایی کشت و مصرف می‌شود (Baite & Dubey 2018). این گیاه نه‌تنها یکی از منابع اصلی پروتئین با کیفیت بالا در رژیم غذایی انسان است (Pande *et al.* 2005)، بلکه مانند سایر حبوبات با تثبیت زیستی نیتروژن، در افزایش حاصلخیزی خاک (Ahmad *et al.* 2020) و کشاورزی پایدار (Sharma *et al.* 2010) نقش مهمی دارد.

علی‌رغم وسعت بالای اراضی زیر کشت نخود، به دلیل حساسیت آن به تعدادی از تنش‌های زیستی و غیرزیستی، در سراسر جهان فاصله زیادی بین عملکرد بالقوه (پنج تن در هکتار) و عملکرد واقعی نخود (۰٫۸ تن در هکتار) وجود دارد (Pande *et al.* 2011). در میان تنش‌های زیستی که محصول نخود را تحت تأثیر قرار می‌دهند، بیماری برق‌زدگی نخود (Ascochyta blight) مخرب‌ترین بیماری این محصول در سطح جهان است (Parida *et al.* 2020). عامل بیماری، *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr. ((teleomorph: *Didymella rabiei* (Kov.) v. Arx) (Baite & Dubey 2018)، یک قارچ نکروتروف است که اغلب در شرایط آب و هوایی خنک و مرطوب در طول فصل کشت پدیدار شده و قادر است در تمامی مراحل رشدی، قسمت‌های هوایی نخود را آلوده کرده (Tadesse *et al.* 2017; Manjunatha *et al.* 2018) و عملکرد و کیفیت دانه را به میزان قابل توجهی کاهش دهد. به‌گونه‌ای که در برخی شرایط، خسارت عملکرد ارقام حساس تا ۱۰۰ درصد می‌رسد (Benzohra *et al.* 2020). در ایران نیز خسارت بالایی از این بیماری در محصول نخود از برخی استان‌ها شامل گلستان، ایلام، کرمانشاه، لرستان و فارس گزارش شده است (Vafaei *et al.* 2017; Jamshidipoor & Vafaei 2021). علائم برق‌زدگی در تمام قسمت‌های هوایی گیاه ایجاد می‌شود که با زخم‌های برنزه‌ای رنگ بافت‌مرده با حاشیه‌های تیره مشخص می‌شود. پیکنیدها در داخل زخم‌ها ایجاد شده و غالبا در اطراف محل آلودگی حلقه‌های متحدالمرکزی ایجاد می‌کنند (Sharma *et al.* 2010).

مؤثرترین راهبردهایی که تا به امروز در مدیریت این بیماری به‌کار رفته‌اند شامل استفاده از بذور سالم، روش‌های زراعی مانند تناوب، تغییر تاریخ کشت، استفاده از ارقام دارای مقاومت بهتر و استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی برای کاربرد در بذر و بخش‌های هوایی گیاه بوده است (Rajakumar *et al.* 2005; Bahr *et al.* 2016). گرچه کاربرد و گسترش ارقام مقاوم مؤثرترین و اقتصادی‌ترین راهکار برای مدیریت این بیماری است (Pande *et al.* 2005)، با این حال، مقاومت کامل به *A. rabiei* در ارقام نخود یافت نشده است (Jayakumar *et al.* 2005). از سوی دیگر اصلاح ارقام مقاوم در برابر این بیماری، به دلیل تغییر زیاد در جمعیت بیمارگر *A. rabiei* دشوار است (Benzohra *et al.* 2012). همچنین با اینکه چندین قارچ‌کش در کنترل بیماری برق‌زدگی مؤثر واقع شده‌اند (Javaid *et al.* 2020)، به دلیل نیاز به کاربرد مکرر یا دائم آن‌ها، در مناطقی که عملکرد محصول کم است، این روش اقتصادی نبوده (Manjunatha *et al.* 2018) و سبب ایجاد مقاومت قارچ بیمارگر در برابر قارچ‌کش‌ها و اثرات سوء بر محیط و بروز مشکلات زیست‌محیطی متعدد می‌شود (Ennouri *et al.* 2020). علاوه بر این، بیمارگر قادر است تا چهار سال در بقایای گیاهان آلوده زنده مانده و آسکوسپورهای هوابرد تولید نماید. از این رو، تناوب زراعی می‌تواند پتانسیل اپیدمی بیماری را کاهش دهد، اما آن را از بین نخواهد برد (Gan *et al.* 2009). با توجه به کارایی محدود راهکارهای ذکر شده در کاهش آسیب‌های ناشی از بیماری، امروزه کنترل زیستی این بیماری توسط آنتاگونیست‌های میکروبی توجه محققان را به خود جلب کرده است و یکی از مؤلفه‌های ایمنی است که در برنامه‌های مدیریت تلفیقی برق‌زدگی نخود می‌تواند گنجانده شود.

در مورد امکان کنترل زیستی برق‌زدگی نخود مطالعات متعددی با استفاده از میکروارگانیسم‌های قارچی صورت گرفته است. به‌عنوان مثال اثر بازدارندگی از رشد میسلیوم *A. rabiei* توسط قارچ *Trichoderma harzianum* Rifai در شرایط آزمایشگاه (Küçük *et al.* 2007; Benzohra *et al.* 2013) و توانایی کنترلی آن در شرایط مزرعه (Ahmad *et al.* 2021) مشاهده شده است. کشت فیلتر شده قارچ *Chaetomium globosum* Kunze در آزمایشگاه باعث کاهش جوانه‌زنی کنیدی‌ها و رشد پرگنه *A. rabiei* شده و در شرایط گلخانه کاربرد محلول‌پاشی آن قبل و پس از مایه‌زنی بیمارگر، سبب کاهش شاخص بیماری نسبت به شاهد گردیده است (Rajakumar *et al.* 2005).

پتانسیل کنترل زیستی برخی آنتاگونیست‌های باکتریایی علیه *A. rabiei* نیز توسط معدودی از محققین بررسی شده و در برخی موارد نتایج امیدبخشی ارائه گردیده است. Azizpour & Rouhrazi (2016) پتانسیل کنترل زیستی ۱۰ سویه باکتریایی به‌دست‌آمده از ریزوسفر گیاهان نخود سالم را در شرایط

آزمایشگاه در برابر *A. rabiei* بررسی نموده و دریافتند که کلیه این باکتری‌ها قادر به مهار این قارچ روی محیط سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) هستند. شناسایی این سویه‌ها با استفاده از تعیین توالی 16S rDNA نشان داد که این باکتری‌ها به گونه‌های *Pseudomonas fluorescens* Migula (Trevisan) Migula، *P. putida* Vandamme *et al.* و *Burkholderia multivorans* (Nour *et al.*) Jarvis *et al.* تعلق دارند. Zerroug *et al.* (2011) مشاهده کردند کشت فیلتر شده *B. megaterium* de Bary می‌تواند از رشد قارچ *A. rabiei* و جوانه‌زنی اسپور آن جلوگیری نماید. در پژوهش دیگری *Azospirillum brasilense* Tarrand, Krieg & Döbereiner قادر بود اثر سوء *A. rabiei* را روی ژنوتیپ‌های حساس (Bivanij) و مقاوم (ICC 12004) نخود کاهش دهد، هرچند خاصیت کنترل زیستی این باکتری در پیشگیری از بیماری، در ژنوتیپ مقاوم در مقایسه با ژنوتیپ حساس بارزتر بود (Parmasi *et al.* 2019). بررسی‌های Wang *et al.* (2003) نیز نشان داد آنتاگونیست‌های باکتریایی *P. fluorescens*، *Bacillus* spp. و *Serratia* spp. به‌طور قابل‌توجهی شدت برق‌زدگی را در نخودفرنگی تحت شرایط گلخانه کاهش می‌دهند.

در ایران کشت نخود اهمیت زیادی دارد و همچنان‌که پیش‌تر ذکر شد، بیماری برق‌زدگی نخود قادر است در برخی استان‌ها خسارت بالایی به این محصول وارد نماید. از سوی دیگر تا به امروز در جهان و ایران تحقیقات معدودی در مورد کنترل زیستی این بیماری توسط پروبیوتیک‌های باکتریایی انجام شده است. جهت دستیابی به مدیریت پایدار بیمارگرهای گیاهی، تلاش برای یافتن سویه‌های جدید دارای پتانسیل کنترل زیستی امری ضروری است؛ بنابراین تحقیق پیش رو با هدف ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی چند باکتری پروبیوتیک در برابر بیمارگر *A. rabiei* در شرایط آزمایشگاه و بررسی تأثیر باکتری‌های منتخب بر مهار بیماری و ویژگی‌های رشدی نخود در حضور بیمارگر با دو روش کاربرد در شرایط گلخانه انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه بیمارگر و آزمون اثبات بیماری‌زایی

یک جدایه بیماری‌زا از قارچ *A. rabiei*، که پیش‌تر بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی شناسایی شده بود، از کلکسیون قارچ‌های بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی تهیه و در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت جامد عصاره آرد نخود - دکستروز - آگار (CDA= Chickpea Seed Meal Dextrose Agar) (حاوی ۴۰ گرم آرد دانه نخود، ۲۰ گرم دکستروز و ۱۸ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر)، کشت گردید و در شرایط دمایی ۲۰-۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شد (Benzohra *et al.* 2013; Farahani *et al.* 2019). برای اطمینان از حفظ بیماری‌زایی این جدایه، پیش از انجام آزمون اصلی، بیماری‌زایی آن روی نخود رقم حساس بیونیج (Bivanij) تحت شرایط کنترل شده در گلخانه بررسی گردید.

تهیه سویه‌های پروبیوتیک باکتریایی

برای انجام این تحقیق، از ۱۲ جدایه پروبیوتیک متعلق به جنس‌های مختلف باکتریایی استفاده شد. هفت مورد از این سویه‌ها شامل *B. megaterium* B15، *B. thuringiensis* B48Pet، *B. subtilis* BS، *B. subtilis* AS، *Lysinibacillus boronitolerans* RUPB71، *P. putida* RUP1 و *Arthrobacter citreus* B27Pet از کلکسیون باکتری‌های آنتاگونیست گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه رازی تهیه شدند. سویه *Alcaligenes faecalis* 1624 از مرکز میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران و سویه *B. pumilus* INR7 از پروفسور کلوپر از دانشگاه آوبورن ایالات‌متحده آمریکا دریافت شد. سویه‌های *Delftia tsuruhatensis* PIIR، *Stenotrophomonas maltophilia* S37 و *B. velezensis* JPS19 نیز توسط خانم دکتر سیفی (Seifi 2019; Seifi *et al.* 2020) اهدا شدند.

بررسی آنتاگونیسم جدایه‌های باکتریایی علیه بیمارگر A. rabiei در آزمایشگاه

آزمون کشت متقابل

به‌منظور بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌های باکتریایی بر رشد میسلیوم بیمارگر، آزمون کشت متقابل مطابق روش Garbeva *et al.* (2008) و با روش دیسک مرکزی انجام شد با این تفاوت که به‌جای PDA، از محیط کشت CDA استفاده گردید. پس از دو هفته نگهداری در انکوباتور در دمای ۲۰-۲۲ درجه سلسیوس، میانگین قطر هاله بازدارندگی اندازه‌گیری و میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر مطابق روش Huang *et al.* (2017) با فرمول $IR\ (\%) = \frac{(C-B)}{C} \times 100$ محاسبه گردید که در این رابطه، IR (Inhibition rate) درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ، C قطر پرگنه قارچ در تشتک پتری شاهد و B قطر پرگنه قارچ در تشتک پتری دارای تیمار باکتریایی می‌باشد.

آزمون تولید ترکیبات فرار ضدقارچی

این آزمون با اندکی تغییر، مطابق روش Dennis & Webster (1971) روی محیط CDA انجام شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۰-۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شده و نتایج پس از دو هفته ثبت شدند. درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر نیز طبق فرمول Huang *et al.* (2017) محاسبه گردید.

در مورد هر تیمار باکتریایی، دو آزمون فوق در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شدند. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با روش تجزیه واریانس در نرم‌افزار SAS (نسخه 9.3) انجام شد. مقایسه میانگین داده‌ها توسط آزمون چنددامنه‌ای دانکن و با سطح احتمال آماری پنج درصد صورت گرفت.

بررسی قابلیت جدایه‌های باکتریایی در کنترل زیستی A. rabiei و پارامترهای رشدی نخود در گلخانه

تهیه مایه تلقیح جدایه بیماری‌زای قارچی

قارچ بیماری‌زای *A. rabiei*، روی پتری‌های حاوی محیط CDA کشت شده و به مدت چهار هفته در دمای ۲۲-۲۰ درجه سلسیوس نگهداری گردید تا از تولید پیکنید اطمینان حاصل شود. محیط‌ها به‌منظور جدا کردن پیکنیدهای حاوی کنیدی با آب مقطر سترون غرقاب شدند و پس از یک ساعت به‌آرامی با یک اسکالپل سترون خراشیده شدند. غلظت سوسپانسیون کنیدی‌ها با لام گلبول‌شمار (Hemacytometer) چک شده و به میزان ۲×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر (Bai *et al.* 2011) تنظیم شد.

تهیه مایه تلقیح باکتری‌های پروبیوتیک

از میان باکتری‌های پروبیوتیکی با بهترین نتایج در آزمون‌های آزمایشگاهی (تولید ترکیبات فرار و کشت متقابل)، شش باکتری برای بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. نام این باکتری‌ها در جدول ۲ ذکر شده است. برای تهیه مایه تلقیح این باکتری‌ها، از کشت دو روزه آن‌ها روی محیط آگار غذایی، یک لوپ برداشته و به فلاسک‌های حاوی محیط مایع نوترینت براث (Nutrient broth) اضافه شد. سپس فلاسک‌ها روی دستگاه شیکر قرار گرفته و سرعت آن ۱۲۰ دور در دقیقه تنظیم شد. فلاسک‌ها به مدت ۴۸ ساعت در این وضعیت و در دمای اتاق قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری جمعیت سلول‌های باکتریایی از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد. جمعیت باکتری در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر، به میزان $۱۰^{۸}$ سلول باکتری در میلی‌لیتر تنظیم گردید.

مایه‌زنی بوته‌های نخود جهت بررسی اثر کاربرد جدایه‌های پروبیوتیک در کنترل A. rabiei در گلخانه

در گلخانه به‌منظور بررسی اثر شش باکتری پروبیوتیک منتخب در مهار *A. rabiei* و تأثیر این سویه‌ها بر فاکتورهای رشدی نخود در حضور این بیمارگر، آزمایشی گلدانی در قالب طرح کاملا تصادفی با شش تکرار و ۱۴ تیمار انجام شد. تیمارهای اعمال‌شده در این پژوهش، در جدول ۲ آورده شده است. بستر رشد گیاه شامل ترکیبی از پرلیت و پیت‌ماس سترون (به نسبت سه به یک) بود که درون گلدان‌های پلاستیکی با حجم ۴۰۰ میلی‌لیتر به قطر دهانه هشت و ارتفاع ۱۳ سانتی‌متر ریخته شد. بذور نخود رقم بیونیج ابتدا با اتانول ۷۰ درصد و سپس هیپوکلریت سدیم نیم درصد هر کدام به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و پس از چند بار شستشو با آب مقطر سترون، برای جوانه‌زنی به مدت ۳۶ ساعت در تشتک‌های پتری سترون حاوی لایه نازکی از آب مقطر سترون در دمای اتاق قرار گرفتند. در این تحقیق، برای کاربرد جدایه‌های دارای پتانسیل کنترل زیستی از دو روش استفاده شد؛ در روش اول که شامل تیمار بذر و محلول‌ریزی در خاک بود، اضافه نمودن باکتری‌های پروبیوتیک در زمان کاشت بذور و دو هفته قبل از اضافه نمودن بیمارگر به گلدان‌ها انجام شد. به این صورت که بذور نخود قبل از کاشت، به مدت یک ساعت در سوسپانسیون حاوی $۱۰^{۸}$ سلول باکتری در میلی‌لیتر قرار گرفتند. پس از پر کردن گلدان‌ها به اندازه تقریبی بیش از سه‌چهارم گنجایش با ترکیب پیت‌ماس و پرلیت سترون، تعداد سه عدد بذر نخود جوانه‌زده در هر گلدان در عمق دو سانتی‌متری کاشته شد که پس از اطمینان از جوانه‌زنی بذور، یک گیاهچه حذف گردید. در گلدان‌های شاهد به‌جای مایه تلقیح، محیط کشت فاقد باکتری اضافه گردید. پس از کشت، روی بذرها با لایه‌ای از پیت‌ماس و پرلیت سترون پوشانده شد. در گلدان‌های دارای تیمار باکتری پس از کشت بذور، سوسپانسیون باکتری‌ها به‌صورت تیمار اولین آبیاری نیز به میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر به هر گلدان اضافه شد. روش دوم که شامل محلول‌پاشی برگی بود، ۱۲ روز پس از کاشت بذور نخود و ۴۸ ساعت قبل از مایه‌زنی بیمارگر، سوسپانسیون حاوی $۱۰^{۸}$ سلول باکتری در میلی‌لیتر به‌صورت محلول‌پاشی، تا ریزش اولین قطره سوسپانسیون از سطح برگ، به برگ‌های نخود انجام گرفت. در هر دو روش اعمال‌شده، برای بررسی شدت بیماری‌زایی بیمارگر در تیمارهای مختلف به‌طور یکسان عمل شد: ۱۴ روز پس از کاشت بذور، سوسپانسیون حاوی ۲×۱۰^{۵} کنیدی قارچ در میلی‌لیتر آب، که تنظیم آن توسط لام گلبول‌شمار صورت گرفته

بود، توسط افشانه‌های دستی به‌طور یکنواخت به سطح گیاهچه‌های نخود پاشش شد و تا مرحله ریزش اولین قطره از سطح برگ، ادامه یافت. سپس به‌منظور حفظ رطوبت، سطح گیاهان تلقیح شده توسط پلاستیک شفاف پوشانده شده و پس از ۷۲ ساعت، پوشش پلاستیکی برداشته شد. روی تیمار شاهد سالم نیز فقط آب مقطر پاشیده شد (Liu *et al.* 2016). گیاهان تلقیح شده، در شرایط گلخانه در دمای ۲ ± ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. آبیاری گیاهان نیز روزانه با جریان ملایم آب حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام کود کامل (NPK+TE, 20-20-20) انجام شد (Moarrefzadeh *et al.* 2021b).

اندازه‌گیری شاخص بیماری و فاکتورهای رشدی گیاهان مربوط به تیمارهای مختلف

۱۴ روز پس از تلقیح بیمارگر و تقریبا یک هفته پس از ظهور نشانه‌های بیماری روی تیمار شاهد آلوده، برای درجه‌بندی شدت بیماری برق‌زدگی در تیمارهای مختلف مطابق روش (Chen *et al.* 2004) از مقیاس درجه‌بندی ۱-۹ به‌صورت زیر استفاده شد: ۱) گیاه سالم بوده و فاقد بیماری است؛ ۲) لکه‌های بیماری موجودند، اما کوچک و غیرقابل‌مشاهده هستند؛ ۳) لکه‌ها به‌آسانی دیده می‌شوند، اما گیاه عمدتا سبز هستند؛ ۴) لکه‌های شدید به‌وضوح قابل‌مشاهده می‌باشند؛ ۵) لکه‌ها ساقه‌ها را احاطه می‌کنند و روی اکثر برگ‌ها، لکه‌ها دیده می‌شوند؛ ۶) گیاه در حال زوال است، انتهای ساقه‌های گیاه دچار خشکیدگی می‌شوند؛ ۷) گیاه در حال مرگ است، اما حداقل سه برگ سبز وجود دارد؛ ۸) گیاه تقریبا مرده و هیچ برگ سبزی باقی نمانده، اما هنوز دارای ساقه سبز است؛ ۹) گیاه مرده و تقریبا هیچ قسمت سبزی روی گیاه مشاهده نمی‌شود.

پس از ارزیابی شاخص بیماری، گیاهان مربوط به تیمارهای مختلف به‌آرامی از گلدان خارج شدند و پس از شستشوی ریشه، شاخص‌های رشدی بوته‌ها شامل وزن تر و خشک ریشه و نیز وزن تر و خشک اندام هوایی اندازه‌گیری شد. داده‌های حاصل ثبت شده و توسط نرم‌افزار SAS و در قالب طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید و سطح احتمال آماری در کلیه محاسبات نیز همچنان پنج درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

بازدارندگی از رشد بیمارگر A. rabiei روی محیط کشت توسط باکتری‌های پروبیوتیک در شرایط آزمایشگاه

در آزمون کشت متقابل، از ۱۲ سویه باکتریایی بررسی شده، ۱۱ سویه اثر معنی‌داری در بازدارندگی از رشد بیمارگر *A. rabiei* در سطح احتمال پنج درصد نشان دادند و فقط بین رشد باکتری *B. megaterium* B15 و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید (جدول ۱). بین میزان بازدارندگی برخی جدایه‌ها با هم نیز اختلاف معنی‌دار وجود داشت. بیشترین میزان بازدارندگی از رشد میسلیوم بیمارگر مربوط به جدایه‌های *B. subtilis* BS با ۵۷,۸۴ درصد کاهش رشد و کمترین میزان بازدارندگی مربوط به جدایه *A. citreus* B27Pet با ۳,۹۲ کاهش رشد بود.

در بررسی قابلیت تولید ترکیبات فرار نیز کلیه جدایه‌های باکتریایی توانستند با اختلاف معنی‌دار با تیمار شاهد، از رشد میسلیوم بیمارگر جلوگیری نمایند. بیشترین و کمترین میزان ممانعت از رشد بیمارگر مربوط به سویه‌های *A. faecalis* 1624 و *B. thuringiensis* B48Pet به ترتیب با ۷۲,۵ و ۷,۹۱ درصد بازدارندگی بود (جدول ۱). بین میزان بازدارندگی جدایه‌ها نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید.

اثر جدایه‌های پروبیوتیک بر کنترل زیستی بیمارگر A. rabiei در شرایط گلخانه

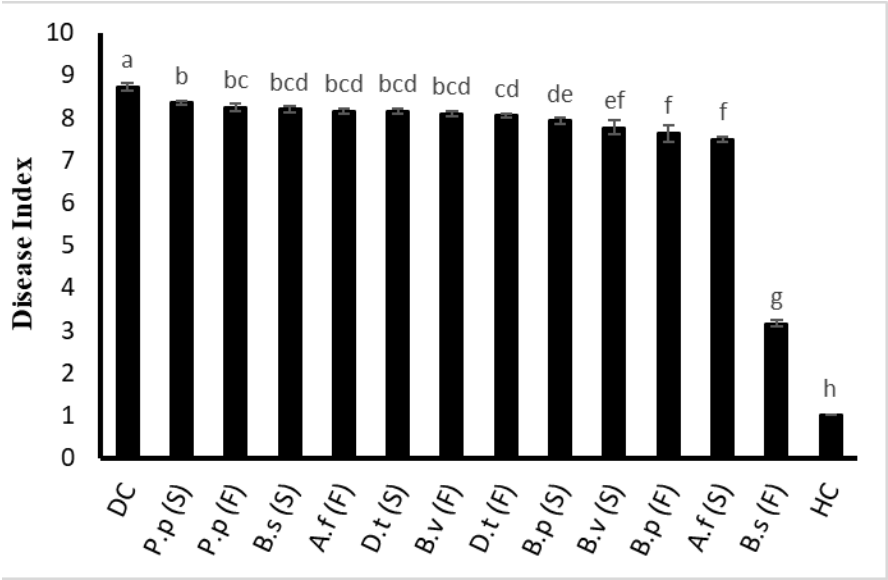
مطابق شکل ۱، نتایج تیمار عوامل آنتاگونیستی علیه بیمارگر *A. rabiei* در شرایط گلخانه نشان داد هر شش باکتری پروبیوتیک منتخب توانسته‌اند در سطح احتمال پنج درصد و در هر دو روش تیمار بذر و محلول‌ریزی در خاک (S) و کاربرد برگی (F)، اثر معنی‌داری در کاهش بروز نشانه‌های بیماری نسبت به تیمار شاهد آلوده داشته باشند، هرچند که بین میزان اثر آنها در مهار بیماری اختلاف زیادی مشاهده گردید. بیشترین میزان مهار بیماری مربوط به *B. subtilis* BS (F) به میزان ۶۳,۸۰ درصد و کمترین میزان مربوط به *P. putida* RUP1 (S) و به میزان ۴,۳۵ درصد نسبت به شاهد بیمار بود (شکل ۱).

جدول ۱. مقایسه میانگین اثر سویه‌های پروبیوتیک باکتریایی روی رشد پرگنه قارچ *Ascochyta rabiei* در آزمون‌های کشت متقابل و تولید ترکیبات فرار.

Table 1. Mean comparison of influence of baccterial probiotic strains on colony growth of *Ascochyta rabiei* in dual culture and volatile compounds production tests.

Treatment	Inhibitory effect in dual culture test (%)	Inhibition in volatile compounds production test (%)
Alcaligenes faecalis 1624	21.57 e	72.5 a
Arthrobacter citreus B27Pet	3.92 i	31.67 e
Bacillus megaterium B15	1.47 ij	19.17 f
Bacillus pumilus INR7	36.27 d	52.5 c
Bacillus subtilis BS	57.84 a	41.67 d
Bacillus subtilis AS	18.63 ef	33.33 e
Bacillus thuringiensis B48Pet	14.71 gh	7.92 g
Bacillus velezensis JPS19	48.04 c	54.17 c
Delftia tsuruhatensis PIIR	53.92 b	40.42 d
Lysinibacillus boronitolerans RUPB71	17.65 fg	40.42 d
Pseudomonas putida RUP1	45.1 c	62.5 b
Stenotrophomonas maltophilia S37	13.73 h	42.92 d
Disease control	0 j	0 h

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



شکل ۱. اثر تیمار پروبیوتیک‌های باکتریایی بر شاخص بیماری ناشی از قارچ *Ascochyta rabiei* در گلخانه در دو روش کاربرد بذری و محلول‌ریزی خاک (S) و محلول‌پاشی برگی (F). 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 1. Effects of the bacterial probiotic treatments on disease index caused by *Ascochyta rabiei* in greenhouse in two application methods of seed and soil drenching (S) and foliar spray (F). Mean comparison analyses were done by Duncan test at 5% probability level. Means with at least the same letters have no significant difference.
DC is *A. rabiei* or the infected control, Af = *Alcaligenes faecalis* 1624, BS = *Bacillus subtilis* BS, Bp = *Bacillus pumilus* INR7, DS = *Delftia tsuruhatensis* PIIR, Pp = *Pseudomonas putida* RUP1, BV = *Bacillus velezensis* JPS19 and HC = healthy control.

اثر پروبیوتیک‌ها بر تحریک رشد نخود در حضور بیمارگر A. rabiei در شرایط گلخانه

با مقایسه میانگین‌ها مشخص گردید به‌استثنای *A. faecalis* 1624 (F) تیمار کلیه سویه‌های پروبیوتیک منتخب، با هر دو روش کاربرد، در حضور بیمارگر *A. rabiei* سبب افزایش وزن تر اندام هوایی نسبت به شاهد آلوده گردیده است. در بین این تیمارها، *B. subtilis* BS (F) بیشترین و تیمار *B. subtilis* BS (S) کمترین اثر را بر این ویژگی رشدی داشتند که به ترتیب سبب افزایش ۴٫۰۵ و ۱٫۱۷ برابری آن نسبت به شاهد آلوده شدند (جدول ۲). علاوه بر این، کلیه پروبیوتیک‌های بررسی شده در گلخانه و در هر دو روش کاربرد، سبب افزایش وزن تر ریشه گردیدند. سویه *B. pumilus* INR7 (F) توانست با افزایش ۸٫۱۵ برابری وزن تر ریشه نسبت به شاهد آلوده، قوی‌تر و *A. faecalis* 1624 (F) با افزایش ۴٫۵۳ برابری این فاکتور نسبت به شاهد آلوده، ضعیف‌تر از سایر تیمارها عمل نمایند. تیمارهای *B. pumilus* INR7 (F)، *P. putida* RUP1 (F)، *D. tsuruhatensis* PIIR (F) و *B. subtilis* BS (F) توانستند در حضور بیمارگر وزن تر ریشه را نسبت به شاهد سالم نیز به‌طور معنی‌دار و به ترتیب به میزان ۳۱٫۹۵، ۲۲٫۸۲، ۲۰٫۳۳ و ۱۳٫۲۷ درصد افزایش دهند (جدول ۲).

همچنین کلیه پروبیوتیک‌های مورد آزمون در حضور بیمارگر و در هر دو روش کاربرد سبب افزایش معنی‌دار وزن خشک اندام هوایی شدند که بیشترین و کمترین تأثیر به ترتیب مربوط به *B. subtilis* BS (F) و *A. faecalis* 1624 (F) با ۲٫۱۴ و ۱٫۱۴ برابر افزایش نسبت به شاهد بیمار بود (جدول ۲). وزن خشک ریشه نیز با هر دو روش کاربرد توسط کلیه پروبیوتیک‌ها نسبت به شاهد آلوده افزایش معنی‌داری نشان داد و مجددا تیمارهای *B. subtilis* BS (F) و *A. faecalis* 1624 (F) به ترتیب با افزایش ۵ و ۲٫۶۶ برابری این پارامتر رشدی توانستند بیشترین و کمترین اثر را نسبت به شاهد بیمار داشته باشند. قابل ذکر است که سویه *B. subtilis* BS (F) توانست در حضور بیمارگر سبب افزایش وزن خشک ریشه نخود (۱۵٫۳۸ درصد) نسبت به شاهد سالم شود (جدول ۲).

جدول ۲. اثر پروبیوتیک‌های باکتریایی بر پارامترهای رشدی نخود در حضور قارچ بیمارگر *A. rabiei* در گلخانه در دو روش کاربرد بذری و محلول‌ریزی خاک (S) و محلول‌پاشی برگی (F).

Table 2. Effect of bacterial probiotics on chickpea growth parameters in presence of *A. rabiei* in greenhouse in two application methods of seed and soil drenching (S) and foliar spray (F).

Treatment	Foliage wet weight (g)	Root wet weight (g)	Foliage dry weight (g)	Root dry weight (g)
Alcaligenes faecalis 1624 (F)	1.01 gf	1.77 e	0.24 e	0.08 f
Alcaligenes faecalis 1624 (S)	1.45 c	2.44 d	0.32 cd	0.13 b
Bacillus pumilus INR7 (F)	1.49 c	3.18 a	0.35 bc	0.12 c
Bacillus pumilus INR7 (S)	1.45 c	1.9 e	0.37 b	0.1 d
Bacillus subtilis BS (F)	3.73 b	2.73 c	0.45 a	0.15 a
Bacillus subtilis BS (S)	1.08 ef	1.92 e	0.26 e	0.1 de
Bacillus velezensis JPS19 (F)	1.15 e	2.38 d	0.26 e	0.1 d
Bacillus velezensis JPS19 (S)	1.3 d	2.32 d	0.38 b	0.12 c
Delftia tsuruhatensis PIIR (F)	1.3 d	2.9 bc	0.34 c	0.13 bc
Delftia tsuruhatensis PIIR (S)	1.09 ef	1.86 e	0.26 e	0.09 ef
Pseudomonas putida RUP1 (F)	1.09 ef	2.96 b	0.34 c	0.09 ef
Pseudomonas putida RUP1 (S)	1.1 ef	1.9 e	0.3 d	0.1 def
Disease control	0.92 g	0.39 f	0.21 f	0.03 g
Healthy control	4.04 a	2.41 d	0.43 a	0.13 b

Data are means of 6 replicates. Different characters beside each column indicate statistically significant difference at 5% probability level according to Duncan test.

بحث

در پژوهش حاضر توان کنترل زیستی ۱۲ سویه پروبیوتیک متعلق به جنس‌های مختلف باکتریایی در شرایط آزمایشگاه و شش باکتری منتخب در شرایط گلخانه علیه بیمارگر عامل برق‌زدگی نخود مورد بررسی قرار گرفت. کلیه پروبیوتیک‌های بررسی شده توانستند با تولید متابولیت‌های ضدقارچی مختلف در آزمون تولید ترکیبات فرار و نیز کشت متقابل (به استثنای تیمار *B. megaterium* B15)، از رشد میسلیوم بیمارگر *A. rabiei*در آزمایشگاه جلوگیری نمایند. در بررسی دیگری نیز کلیه باکتری‌های جدا شده از خاک ریزوسفری بوته‌های نخود که به گونه‌های *P. fluorescens*، *P. putida*، *B. multivorans* و *M. ciceri* تعلق داشتند، در محیط کشت PDA اثر بازدارندگی بر رشد این بیمارگر داشتند (Azizpour & Rouhrazi 2016). میزان بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر توسط باکتری‌های پروبیوتیک مورد مطالعه در آزمایشگاه بسیار متفاوت بود و برخی جدایه‌ها از قبیل *B. subtilis* BS، *D. tsuruhatensis* PIIR، *B. velezensis* JPS19، *P. putida* RUP1 و *B. pumilus* INR7 در آزمون کشت متقابل، با بیش از ۳۶ درصد بازدارندگی (فاصله رشد پرگنه قارچ تا باکتری ۲۵ میلی‌متر یا بیشتر) فعالیت آنتاگونیستی بسیار قوی نشان دادند که در میان آنها سویه *B. subtilis* BS بیشترین قابلیت مهار رشد میسلیوم *A. rabiei* را داشت. Liu *et al.* (2016) نیز مشاهده نمودند در میان جدایه‌های مختلف به دست آمده از نمونه‌های خاک و ریزوسفر نخودفرنگی، دو گونه از چهار جدایه‌ای که فعالیت آنتاگونیستی بسیار قوی نسبت به برق‌زدگی نخودفرنگی (*A. pinodes* L.K. Jones) نشان دادند، بر اساس توالی‌یابی 16S rRNA به‌عنوان *B. subtilis* شناسایی شدند. اعضای جنس *Bacillus* قادر به تولید طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌های لیپوپپتیدی همچون سورفکتین، فنجایسین و مایکوسوبتیلین هستند که قادرند روی قارچ‌های گوناگون اثر بازدارندگی از رشد داشته باشند (Farace *et al.* 2015).

در پژوهش حاضر، شش جدایه از باکتری‌های پروبیوتیک که در آزمایشگاه نتایج بهتری ارائه دادند، انتخاب شده و اثرشان بر بیمارگر و فاکتورهای رشدی نخود در حضور بیمارگر و با دو روش کاربرد بذری و محلول‌ریزی در خاک (S) و محلول‌پاشی برگی (F) در شرایط گلخانه ارزیابی گردید. نتایج نشان داد کلیه این پروبیوتیک‌ها علاوه بر مهار بالای رشد بیمارگر در آزمایشگاه، در گلخانه و در هر دو روش مورد مطالعه نیز توانستند اثر معنی‌داری بر کاهش شدت علائم بیماری برق‌زدگی نسبت به شاهد آلوده داشته باشند. باکتری‌های محرک رشد گیاه (PGPB) قادرند با استفاده از مکانیسم‌های متعدد به‌طور مستقیم یا غیرمستقیم سبب مهار رشد یا بیماری‌زایی بیمارگرهای گیاهی شوند (Khabbaz *et al.* 2019). با توجه به اینکه کاربرد بذری پروبیوتیک‌ها، بدون وجود ارتباط مستقیم میان باکتری- بیمارگر، سبب کاهش شدت بیماری گردید، بنابراین این پروبیوتیک‌ها در این روش کاربرد، احتمالا از طریق مکانیسم القای مقاومت سیستمیک (ISR) در گیاه، که یکی از مکانیسم‌های غالب در مهار بیمارگرهای گیاهی توسط عوامل کنترل زیستی است (Contreras-Cornejo *et al.* 2011; Sharifi & Ryu 2016; Ghorbani *et al.* 2021; Viani *et al.* 2021)، توانسته‌اند سبب کاهش بیماری گردند. ترکیبات آلی فرار تولید شده توسط PGPB قادرند علاوه بر مهار رشد بیمارگر، به‌عنوان آغازگرهای پاسخ‌های دفاعی در گیاهان عمل کنند (Zhang *et al.* 2015; Khabbaz *et al.* 2019) و در فرآیند القای مقاومت در گیاه نقشی اساسی داشته باشند. به‌عنوان مثال، مواد فرار آزاد شده از *B. subtilis* GB03 و *B. amyloquefaciens* IN937a عامل فعال‌سازی ISR در گیاهچه‌های آرابیدوپسیس علیه بیمارگر عامل پوسیدگی نرم باکتریایی *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* بوده‌اند (Ryu *et al.* 2004). با توجه به اینکه در پژوهش حاضر نیز این شش جدایه منتخب در آزمایشگاه، قابلیت تولید ترکیبات فرار و جلوگیری از رشد میسلیوم بیمارگر را داشتند، بنابراین ممکن است با تولید این ترکیبات، در القای مقاومت سیستمیک در گلخانه نیز نقش داشته باشند. کاربرد برگی این پروبیوتیک‌ها به‌ویژه سویه *B. subtilis* BS، دو روز قبل از مایه‌زنی بیمارگر نیز اثر معنی‌داری بر کاهش بروز بیماری برق‌زدگی داشت، بنابراین می‌توان چنین استنباط نمود که این جدایه‌ها توانسته‌اند از طریق بروز برخی مکانیسم‌های مستقیم کنترلی زیستی به‌ویژه آنتی‌بیوز نیز سبب کاهش بروز بیماری شوند. به‌خصوص که در بررسی‌های آزمایشگاهی در تعامل مستقیم با بیمارگر، هر شش جدایه قابلیت خوبی در تولید متابولیت‌های ضدقارچی و بازدارندگی از رشد بیمارگر نشان داده بودند. Liu *et al.* (2016) نیز مشاهده نمودند در میان جدایه‌های مختلف انتخاب شده از نمونه‌های خاک و ریزوسفر نخودفرنگی، جدایه‌هایی که در آزمایشگاه فعالیت آنتاگونیستی بسیار قوی نسبت به برق‌زدگی ناشی از *A. pinodes* نشان دادند، کارایی خوبی نیز در کاهش شدت بیماری در شرایط گلخانه (بیش از ۶۵ درصد) و مزرعه داشتند (Liu *et al.* 2016).

پروبیوتیک‌های منتخب در این پژوهش در هر دو روش کاربرد در گلخانه توانستند علاوه بر کاهش شاخص بیماری، فاکتورهای رشدی نخود را حتی در حضور بیمارگر بهبود بخشند. لازم به ذکر است که سویه‌های به‌کار رفته در این پژوهش، بر اساس کارایی آنها در کاهش اثر بیماری‌های مختلف گیاهی یا تحریک رشد میزبان‌های مختلف از منابع مختلف انتخاب شده بودند که از آن جمله می‌توان به نقش برخی از آنها در بهبود رشد نخود در حضور بیمارگرهای عامل پژمردگی فوزاریومی نخود *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* و *F. redolens* Wollenweber (Moarrefzadeh *et al.* 2021a, b)، گوجه‌فرنگی در حضور عامل پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Seifi 2019) و گل‌جالیز (Borzouei *et al.* 2019) اشاره نمود. در مورد برخی از این جدایه‌ها شامل *A. faecalis* 1624، *D. tsuruhatensis* PIIR، *B. velezensis* JPS19 و *B. pumilus* INR7، تولید ترکیبات اکسینی، توانایی حل نمودن فسفات و در مورد سه پروبیوتیک اول، تولید سیدروفور به اثبات رسیده است (Ardalan *et al.* 2017; Seifi 2019; Seifi *et al.* 2020) که همگی از مکانیسم‌های PGPB در تحریک رشد گیاه هستند. لازم به ذکر است که ترکیبات آلی فرار تولید شده توسط PGPB قادرند با تنظیم سنتز یا متابولیسم فیتوهورمون‌ها، در تحریک رشد گیاه نیز نقش به‌سزایی داشته باشند (Tahir *et al.* 2017). بنابراین با توجه به قابلیت تولید ترکیبات فرار توسط سویه‌های این پژوهش، طبیعی است که ترکیبات فرار تولید شده توسط آنها به‌طور غیرمستقیم و با تأثیر بر هورمون‌های گیاهی، در افزایش رشد گیاه دخیل باشند.

در این پژوهش اثر سویه‌های پروبیوتیک در تحریک رشد گیاه و ممانعت از بیمارگر متفاوت بود. سویه باکتریایی *B. subtilis* BS که در آزمون کشت متقابل بیشترین اثر بازدارندگی را در مهار رشد میسلیوم بیمارگر نشان داد، در آزمایش‌های گلخانه‌ای و در کاربرد برگی نیز در مهار رشد بیمارگر بسیار قوی‌تر از جدایه‌های پروبیوتیک دیگر عمل نمود و کارآمدترین جدایه در کاهش شاخص بیماری و همچنین افزایش شاخص‌های رشدی نخود در حضور بیمارگر بود. تیمار برگی این جدایه توانست در حضور بیمارگر، وزن تر و خشک ریشه را حتی بهتر از شاهد سالم افزایش دهد. قابلیت سویه‌های مختلف *B. subtilis* بر مهار بیمارگرهای بخش‌های هوایی گیاهان دیگر قبلا به اثبات رسیده است. به‌عنوان مثال، کاربرد سویه‌هایی از این گونه باکتری روی گیاه سیب‌زمینی، باعث کاهش بروز بیماری بادزدگی سیب‌زمینی ناشی از *Phytophthiora infestans* (Mont.) de Bary شده است (Kumbar *et al.* 2019). جالب آنکه کاربرد بذری *B. subtilis* BS با وجود کاهش شدت بیماری و تقویت فاکتورهای رشدی بررسی شده، نسبت به کاربرد برگی آن در تحریک رشد و کاهش بیماری اثر بسیار کمتری داشت. اعضای جنس باسیلوس به علت تاب‌آوری بالا در شرایط نامساعد ریز اقلیم‌های فیلوسفری از باکتری‌های شناخته شده فیلوسفر هستند (Legein *et al.* 2020). توأم شدن مکانیسم‌های بازدارندگی مستقیم و القای مقاومت سیستمیک می‌تواند عامل کارایی بالاتر این سویه در شرایط فیلوسفر باشد. Han *et al.* (2005) نیز مشاهده کردند فعالیت کنترل زیستی سویه‌ای از باکتری *D. tsuruhatensis* در برابر بیمارگر عامل بلاست برنج (*Pyricularia oryzae* Cavara) در دو رقم برنج در گلخانه، در تیمار محلول‌پاشی برگی یک روز قبل از تلقیح بیمارگر نسبت به روش خیساندن بذر در کشت باکتریایی قبل از کاشت، نتایج بهتری حاصل نمود.

از فاکتورهای مهمی که بر کارایی عوامل کنترل زیستی در کنترل بیماری‌های گیاهی تأثیر می‌گذارد، روش کاربرد این عوامل (Tsegaye *et al.* 2018) و نوع یا گونه باکتری‌های محرک رشد گیاه می‌باشد (PGPB) (Efthimiadou *et al.* 2020). علاوه بر این، توانایی رقابتی PGPR بستگی به ظرفیت آنها برای بهره‌گیری از یک محیط مساعد یا سازگارپذیری با شرایط جدید دارد (Khabbaz *et al.* 2019). در بسیاری از مطالعات انجام شده در زمینه کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی، عوامل کنترل زیستی باکتریایی معمولا از طریق آغشته نمودن بذرها به میکروب‌ها (microbiolization) به گیاهان منتقل می‌شوند و به‌ندرت از پاشش برگی استفاده می‌شود (Sangiogo *et al.* 2018). اما این پژوهش نشان داد کاربرد برگی برخی عوامل کنترل زیستی نیز می‌تواند اثر بسیار خوبی در کنترل بیماری برق‌زدگی نخود داشته باشد. البته باید توجه داشت فیلوسفر گیاه دائما در معرض تغییرات دمایی شب و روز، رطوبت نسبی، شبنم، باران، باد و تابش نور خورشید قرار دارد. بنابراین در کاربرد برگی، پتانسیل آب میکروارگانیسم‌های برگ‌رویه (phylloplane) همواره در حال تغییر است. از سوی دیگر، غلظت مواد غذایی مانند اسیدهای آمینه، اسیدهای آلی و قندهای مترشحه از زخم‌ها، روزنه‌ها، عدسک‌ها و روزنه‌های آبی تفاوت زیادی با هم دارد و این موضوع کارایی و زنده‌مانی آنتاگونیست‌ها را در ناحیه برگ‌رویه به‌شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (Andrews 1992). اما گونه‌های باسیلوس چون توانایی تولید اسپورهایی را دارند که حتی در شرایط نامساعد محیطی نیز می‌توانند زنده بمانند، از

مؤثرترین آنتاگونیست‌ها برای پاشش برگی در نظر گرفته می‌شوند که می‌توانند بر این شرایط فائق آیند (Tahir *et al.* 2017).

قابل‌ذکر است که با توجه به بررسی‌های نگارندگان، این اولین گزارش از اثر کنترل زیستی برخی باکتری‌های به‌کاررفته در این تحقیق (شامل *Ar. citreus*، *B. velezensis*، *L. boronitolerans*، *D. tsuruhatensis*، *S. maltophilia* و *A. faecalis*) علیه *A. rabiei* در دنیا است.

در این تحقیق شواهدی ارائه گردید که نشان می‌دهند کاربرد بذری و برگی کلیه سویه‌های باکتریایی پروبیوتیک بررسی شده، علاوه بر اثر بازدارندگی بر بیمارگر در آزمایشگاه و گلخانه، قابلیت تحریک رشد نخود در حضور بیمارگر را نیز دارند. در میان کلیه پروبیوتیک‌های بررسی شده سویه *B. subtilis* BS نه‌تنها کارایی بسیار خوبی در مهار رشد بیمارگر در آزمایشگاه نشان داد، بلکه کاربرد برگی این سویه در گلخانه نیز بهترین اثر بازدارندگی از بیماری و افزایش رشد را نشان داد. به‌گونه‌ای که با وجود بیمارگر این تیمار توانست وزن تر و خشک ریشه را حتی بهتر از شاهد سالم افزایش دهد. بنابراین به نظر می‌رسد *B. subtilis* BS از توان بالایی در کنترل زیستی برق‌زدگی نخود برخوردار باشد و در صورت انجام مطالعات مزرعه‌ای و تأیید اثربخشی این سویه، در آینده می‌توان از آن در مدیریت تلفیقی این بیماری استفاده نمود. پیداست که چنین راهبردی علاوه بر کاهش میزان مصرف قارچ‌کش‌ها در کشت نخود، از نظر اقتصادی و زیست‌محیطی در حفظ و بهبود کیفیت و عملکرد محصول مؤثر بوده و به توسعه کشت پایدار آن نیز کمک خواهد نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان از آقای دکتر سعید عباسی بابت در اختیار نهادن جدایه قارچ بیمارگر و خانم دکتر سونیا سیفی بابت در اختیار نهادن برخی جدایه‌های باکتریایی مورد استفاده در این تحقیق کمال تشکر را دارند.

Refferences

Ahmad I, Jameel S, Fatima K, 2020. Assessment and management of microbial pathogens associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.) grains. *The International Journal of Biological Research* 3 (4): 1–12.

Ahmad S, Khan MA, Ahmad I, Iqbal Z, Ashraf E, *et al.*, 2021. Efficacy of fungicides, plant extracts and biocontrol agents against Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under field conditions. *Plant Science Today* 8 (2): 255–262.

Andrews JH, 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30: 603–635.

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 with English abstract).

Azizpour N, Rouhrazi K, 2016. Isolation and characterization of rhizosphere bacteria for the biocontrol of the *Ascochyta rabiei* in Iran. *Advances in Plants and Agriculture Research* 3(4): 121–125.

Bahr L, Castelli MV, Barolo MI, Ruiz Mostacero N, Tosello ME, *et al.*, 2016. Ascochyta blight: isolation, characterization, and development of a rapid method to detect inhibitors of the chickpea fungal pathogen *Ascochyta rabiei*. *Fungal Biology* 120 (3): 424–432.

Bai JY, Wang DY, Li HJ, Wang XM, 2011. First report of *Ascochyta rabiei* causing ascochyta blight of *Cicer arietinum* in China. *Journal of Plant Pathology* 93 (4): S83.

Baite MS, Dubey SC, 2018. Pathogenic variability of *Ascochyta rabiei* causing blight of chickpea in India. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 102: 122–127.

Benzohra EE, Bendahmane BS, Labdi M, Benkada MY, 2012. Determination of pathotypes and physiological races in *Ascochyta rabiei*, the agent of ascochyta blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Algeria. *African Journal of Agricultural Reseearch* 7(7): 1214–1219.

Benzohra IE, Bendahmane BS, Labdi M, Bnekada MY, 2013. *In vitro* biocontrol using the antagonist *Trichoderma harzianum* against the algerian isolates of *Ascochyta rabiei* (Pass.) Labr., the agent of Ascochyta blight in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *International Journal of Microbiological Research* 2 (2): 124–128.

Benzohra IE, Bendahmane BS, Benkada MY, Mégateli M, Belaidi H, 2020. Use of three synthetic fungicides to reduce the incidence of Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea (*Cicer arietinum* L.): A susceptible cultivars case. *Indian Journal of Agricultural Research* 54: 459–464.

Borzouei S, Sharifi R, Moarrefzadeh N, 2019. Induction of systemic resistance in tomato against broomrape (*Phelipanche aegyptiaca*). *Journal of Phytopathology* 167 (10): 567–575.

Chen W, Coyne CJ, Peever TL, J. Muehlbauer F, 2004. Characterization of chickpea differentials for pathogenicity assay of ascochyta blight and identification of chickpea accessions resistant to *Didymella rabiei*. *Plant Pathology* 53 (6): 759–769.

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.

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.

Efthimiadou A, Katsenios N, Chanioti S, Giannoglou M, Djordjevic N, *et al.*, 2020. Effect of foliar and soil application of plant growth promoting bacteria on growth, physiology, yield and seed quality of maize under Mediterranean conditions. *Scientific Reports* 10 (1): 21060.

Ennouri A, Lamiri A, Essahli M, Bencheqroun SK, 2020. Chemical composition of essential oils and their antifungal activity in controlling *Ascochyta rabiei*. *Journal of Agricultural Science and Technology* 22 (5): 1371–1381.

Farace G, Fernandez O, Jacquens L, Coutte F, Krier F, *et al.*, 2015. Cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine. *Molecular Plant Pathology* 16 (2): 177–187.

Farahani S, Talebi R, Maleki M, Mehrabi R, Kanouni H, 2019. Pathogenic diversity of *Ascochyta rabiei* isolates and identification of resistance sources in core collection of chickpea germplasm. *The Plant Pathology Journal* 35 (4): 321–329.

Gan Y, Warkentin TD, Chandirasekaran R, Gossen BD, Wolf T, *et al.*, 2009. Effects of planting pattern and fungicide application systems on *Ascochyta* blight control and seed yield in chickpea. *Agronomy Journal* 101 (6): 1548–1555.

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.

Ghorbani M, Sabagh SK, Karimi A, 2021. Biological control of fusarium wilt of chickpea using *Rhizophagus irregularis* fungus and nitroxin bio-fertilizer. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 10 (4): 61–70.

Han J, Sun L, Dong X, Cai Z, Sun X, *et al.*, 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.

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.

Jamshidipoor S, Vafaei SH, 2021. Impact of the virulence and spore concentration of *Didymella rabiei* isolates on the reaction of chickpea genotypes to ascochyta blight. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 10 (3): 63–71 (in Persian with English abstract).

Javaid A, Munir R, Khan IH, Shoaib A, 2020. Control of the chickpea blight, *Ascochyta rabiei*, with the weed plant, *Withania somnifera*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30 (1): 1–8.

Jayakumar P, Gan YT, Gossen BD, Warkentin TD, Banniza S, 2005. Ascochyta blight of chickpea: infection and host resistance mechanisms. *Canadian Journal of Plant Pathology* 27 (4): 499–509.

Khabbaz SE, Ladhalakshmi D, Babu M, Kandan A, Ramamoorthy V, *et al.*, 2019. Plant growth promoting bacteria (PGPB) – A versatile tool for plant health management. *Canadian Journal of Pesticides and Pest Management* 1 (1): 1–25.

Küçük Ç, Kivanç M, Kinaci E, Kinaci G, 2007. Efficacy of *Trichoderma harzianum* (Rifaii) on inhibition of ascochyta blight disease of chickpea. *Annals of Microbiology* 57 (4): 665–668.

Kumbar B, Mahmood R, Nagesha SN, Nagaraja MS, Prashant DG, *et al.*, 2019. Field application of *Bacillus subtilis* isolates for controlling late blight disease of potato caused by *Phytophthora infestans*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 22.

Legein M, Smets W, Vandenheuvel D, Eilers T, Muyshondt B, *et al.*, 2020. Modes of action of microbial biocontrol in the phyllosphere. *Frontiers in Microbiology* 11.

Liu N, Xu S, Yao X, Zhang G, Mao W, *et al.*, 2016. Studies on the control of Ascochyta blight in field peas (*Pisum sativum* L.) caused by *Ascochyta pinodes* in Zhejiang Province, China. *Frontiers in Microbiology* 7: 481.

Manjunatha L, Saabale PR, Srivastava AK, Dixit GP, Yadav LB, *et al.*, 2018. Present status on variability and management of *Ascochyta rabiei* infecting chickpea. *Indian Phytopathology* 71 (1): 9–24.

Moarrefzadeh N, Sharifi R, Khateri H, Abbasi S, 2021a. Effect of some probiotics consortia on inhibition of Fusarium yellowing and wilting disease (*Fusarium redolens* Wollenweber) and growth promoting in chickpeas. *Journal of*

Agricultural Science and Sustainable Production 31 (4): 255–270.

Moarrefzadeh N, Sharifi R, Khateri H, Abbasi S, 2021b. 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. *Biological Control of Pests and Plant Diseases* 9 (1): 61–73.

Pande S, Siddique KHM, Kishore GK, Bayaa B, Gaur PM, *et al.*, 2005. Ascochyta blight of chickpea (*Cicer arietinum* L.): a review of biology, pathogenicity, and disease management. *Australian Journal of Agricultural Research* 56 (4): 317–332.

Pande S, Sharma M, Gaur PM, Tripathi S, Kaur L, *et al.*, 2011. Development of screening techniques and identification of new sources of resistance to Ascochyta blight disease of chickpea. *Australasian Plant Pathology* 40 (2): 149–156.

Parida SK, Gayacharan, Rani U, Singh S, Basandrai AK, *et al.*, 2020. Identification of novel resistant sources for ascochyta blight (*Ascochyta rabiei*) in chickpea. *PLoS One* 15 (10): e0240589.

Parmasi Z, Tahmasebi Z, Zare MJ, Nourollahi K, Kanouni H, 2019. Biocontrol of Ascochyta blight by *Azospirillum* sp. depending on the degree of resistance of chickpea genotypes. *Journal of Phytopathology* 167 (10): 601–607.

Rajakumar E, Aggarwal R, Singh B, 2005. Fungal antagonists for the biological control of Ascochyta blight of chickpea. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 40 (1–2): 35–42.

Ryu CM, Farag MA, Hu CH, Reddy MS, Kloepper JW, *et al.*, 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134(3): 1017–26.

Sangiogo M, Rodriguez DP, Moccellin R, Bermudez JMM, Corrêa BO, *et al.*, 2018. Foliar spraying with bacterial biocontrol agents for the control of common bacterial blight of bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 53 (10): 1101–1108.

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.

Seifi S, Behboudi K, Sharifi R, Shapleigh JP, 2020. Introduction, mechanisms of action and genomic description in plant probiotic bacterium *Bacillus velezensis*. *Iranian Journal of Plant Protection Science* 50 (2): 159–175 (in Persian with English abstract).

Sharifi R, Ryu CM, 2016. 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.

Sharma M, Pande S, Rathore A, 2010. Effect of growth stages of chickpea on the genetic resistance of Ascochyta blight. *European Journal of Plant Pathology* 128(3): 325–331.

Tadesse M, Turoop L, Ojiewo CO, 2017. Survey of chickpea *Cicer arietinum* L) Ascochyta blight (*Ascochyta rabiei* Pass.) disease status in production regions of Ethiopia. *Plant* 5(1): 23.

Tahir HAS, Gu Q, Wu H, Raza W, Hanif A, *et al.*, 2017. Plant growth promotion by volatile organic compounds produced by *Bacillus subtilis* SYST2. *Frontiers in Microbiology* 8: 171.

Tsegaye Z, Assefa F, Tefera G, Alemu T, Gizaw B, *et al.*, 2018. Concept, principle and application of biological control and their role in sustainable plant diseases management strategies. *International Journal of Research Studies in Biosciences* 6 (4): 18–34.

Vafaei S, Rezaee S, Moghadam AA, Zamanizadeh H, 2017. Screening of Chickpea germ plasms for selection of resistant genotypes to Ascochyta blight. *Applied Entomology and Phytopathology* 85(1): 97–110 (in Persian with English abstract).

Viani A, Pouralibaba HR, Abolfathzadeh S, 2021. Effect of lentil seed priming as hydropriming, biopriming and with resistance inducing materials in management of Fusarium wilt disease under laboratory, glasshouse and field conditions. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 10 (4): 47–59.

Wang H, Hwang SF, Chang KF, Turnbull GD, Howard RJ, 2003. Suppression of important pea diseases by bacterial antagonists. *BioControl* 48 (4): 447–460.

Zerroug MM, Bouzid D, Mezaache S, 2011. Effect of *Bacillus megaterium* filtrates on the growth and spore germination of *Ascochyta rabiei*. In: AFPP –Quatrième Conférence Internationale Sur Les Méthodes Alternatives En Protection Des Cultures, March 8–10, Lille, France. P. 634–637.

Zhang L, Khabbaz S, Wang A, Li H, Abbasi P, 2015. Detection and characterization of broad-spectrum antipathogen activity of novel rhizobacterial isolates and suppression of Fusarium crown and root rot disease of tomato. *Journal of Applied Microbiology* 118 (3): 685–703.

This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)