Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)
46(4), Winter, 2024

10.22055/ppr.2024.45945.1730

Biocontrol of bean bacterial wilt disease using *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* biological agents

H. Mirzaei Najafgholi[1*], S.M. Moosavian[2], S. Ghanaei[3], N. Rouhani[4]

1. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Lorestan, Khorramabad, Iran (mirzaeih89@gmail.com)
2. Ph.D. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Lorestan, Khorramabad, Iran
3. Instructor, Department of Agricultural Science, Technical and Vocational University (TVU), Tehran, Iran
4. Ph.D. student, Department of Plant Protection, Faculty of agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received: 25 January 2024 Accepted: 9 March 2024

Abstract

Background and Objectives

Curtobacterium flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens* is the cause of bean bacterial wilt (*CFF*) and a dangerous pathogen for bean fields. To date, no definitive control has been found for this pathogen. In sustainable agriculture, it is used to control plant pathogens by applying management methods related to preserving the environment and producing organic products. The use of biological agents such as *Trichoderma* fungi and *Pseudomonas* bacteria is among these management methods. Minimal research has been done worldwide on biological agents' effects on *CFF*. Therefore, the present research will investigate the effect of inhibiting the growth and activity of two biological agents, including *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum*, against *CFF* in laboratory and greenhouse conditions.

Materials and Methods

First, the pathogenicity test of *CFF* was carried out on the greenhouse's Sadri variety pinto bean plant. Then, the effect of fungal and bacterial biological agents against the pathogenic agent was investigated by two methods of mutual culture and their secreted substances in laboratory conditions. By measuring the diameter of the transparent halo formed around the extract and spot culture of biological agents, the growth inhibition power of these biological agents against *CFF* was evaluated. In order to investigate the effect of these biological agents against bacterial wilt disease in greenhouse conditions, these biological agents and pathogens were propagated and expanded, and a standard suspension was first prepared from them. These suspensions were inoculated on the host plant using the spraying method. During 21 days, disease symptoms and bean plant indicators have been recorded. Then, the disease severity of progress under the influence of these biological factors was checked using the 0 to 4 scoring system. Also, the plant resistance type to the pathogen was evaluated using the 1-5 scoring system. The data obtained from the laboratory (inhibition percentage) and greenhouse (treatment changes, plant resistance, and plant indices) studies were analyzed in a completely randomized design using SPSS 21 software.

Results
In laboratory conditions, *P. fluorescens* and *T. harzianum* treatment prevented the growth of pathogenic bacteria *CFF* by 18.67 and 27.33%, with a diameter of the inhibitory halo of 14 and 20.5 mm, respectively. It was also found that a significant part of the inhibitory effect of *P. fluorescens* bacteria (about 85.70%) is related to the secreted substances of the bacterial cells. In contrast, in the biological fungus *T. harzianum*, the effect of the secreted substances was about 50.02%. The effect of biological factors on *CFF* in greenhouse conditions showed that these biological factors strengthen the defense reaction of bean plants against *CFF*. So, the sensitive reaction of the plant against *CFF* bacteria (with a disease severity of 83.13%) was transformed into a semi-resistant reaction by inoculating *P. fluorescens* and *T. harzianum* with the diseased plant. Also, the inoculation of the combination of these two biological factors made the plant resistant to pathogenic bacteria. Treatment of *P. fluorescens+T. harzianum*, by affecting *CFF* bacteria, was the best treatment in reducing the severity of the disease during 7, 14, and 21 days; the severity of the disease on these days was 21.87, 33.12, and 36.25%, respectively, which showed a significant difference with the disease severity index in infected treatment during these few days at the statistical level of 1%. Treatment of *P. fluorescens+T. harzianum*, with a disease severity index of 36.25% and a 57.04% reduction in disease severity, showed the most significant effect on the reduction of bean bacterial wilt disease.
Discussion
In the present study, the use of two biological agents, *P. fluorescens* and *T. harzianum*, showed significant controlling effects on *CFF* in laboratory and greenhouse conditions, and 57.04% reduced the severity of this disease in the bean plant. These two biological factors prevent the growth and spread of plant pathogens by using mechanisms such as the production of secondary metabolites, acidifying the environment, competing for food and space, colonizing and stimulating the plant to produce phytoalexin, proteins related to pathogens, salicylic acid, etc. Therefore, using these two biological agents as safe, effective, and durable biological control agents in sustainable agriculture against bean bacterial wilt disease is recommended.

***Keywords*: *biological control, antagonist, pathogenicity, curtobacterium*.**

Associate editor: R. Rezaei (Ph.D.)

Citation: Mirzaei Najafgholi, A., Moosavian, S.M., Ghanaei, S. & Rouhani, N. (2024). Biocontrol of bean bacterial wilt disease using *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* biological agents. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *46*(4), 7-23. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2024.45945.1730.

گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ٤٦، شماره ٤، زمستان ١٤٠٢

doi 10.22055/ppr.2024.45945.1730

مهار زیستی بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا با استفاده از عوامل زیستی *Trichoderma harzianum* و *Pseudomonas fluorescens*

حسین میرزایی نجفقلی [1*]، سید مسلم موسویان [2]، صدیقه غنایی [3]، ندا روحانی [4]

۱- **نویسنده مسوول**: استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران (mirzaeih89@gmail.com)
۲- دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم¬آباد، ایران
۳- مربی، گروه مهندسی کشاورزی، دانشگاه فنی و حرفه ای، تهران، ایران
۴- دانشجوی دکتری، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۱/۰۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۹

چکیده

استفاده از روش‌های جایگزین سموم شیمیایی، برای تولید محصولات ارگانیک از اهمیت بالایی در کشاورزی پایدار برخوردار است. یکی از این روش‌ها استفاده از عوامل زیستی میکروبی علیه بیمارگرهای گیاهی است. در پژوهش حاضر نیز اثر عوامل آنتاگونیستی *P. fluorescens* و *T. harzianum* علیه بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا با عامل *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (*CFF*) در شرایط آزمایشگاه و گلخانه سنجیده شد. بدین منظور بعد از تهیه عوامل میکروبی، ابتدا اثر جلوگیری کننده از رشد باکتری *CFF* با دو روش کشت متقابل عوامل زیستی و مواد مترشحه آن‌ها در شرایط آزمایشگاه بررسی شد. سپس اثر این عوامل زیستی روی شدت و روند پیشرفت بیماری ایجادشده توسط *CFF* و همچنین شاخص‌های گیاه لوبیا در شرایط گلخانه، طی چهار تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی سنجیده شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد در شرایط آزمایشگاه عوامل آنتاگونیست *P. fluorescens* و *T. harzianum* به‌ترتیب ۱۸/٦۷ و ۲۷/۳۳ درصد و مواد مترشحه آن‌ها ١٦ و ۱۳/٦۷ درصد از رشد باکتری *CFF* جلوگیری کردند. در شرایط گلخانه تیمارهای *P. fluorescens* و *T. harzianum* و ترکیب این دو عامل با هم، به ترتیب ۵۰/٦۲ و ۵۵/۳۲ و ۳٦/۲۵ درصد، شدت بیماری را کاهش دادند. همچنین این سه تیمار به ترتیب ٤٠ و ۳٤/۰۷ و ۵۷/۰٤ درصد، علائم بیماری را کاهش دادند. همچنین تیمار ترکیبی دو عامل زیستی بیشترین اثرگذاری را روی کاهش بیماری و افزایش شاخص‌های گیاه لوبیا نشان داد. لذا عوامل زیستی بکارگرفته شده می‌توانند به‌عنوان عوامل مهارزیستی بیماری پژمردگی باکتریایی و افزاینده رشد گیاه لوبیا باهدف کاربردی نمودن آن‌ها در مطالعات آینده موردتوجه قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: مهار زیستی، آنتاگونیست، بیماری‌زایی، کورتوباکتریوم

دبیر تخصصی: دکتر رسول رضایی

Citation: Mirzaei Najafgholi, A., Moosavian, S.M., Ghanaei, S. & Rouhani, N. (2024). Biocontrol of bean bacterial wilt disease using *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* biological agents. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *46*(4), 7-23. https://doi.org/ 10.22055/ppr.2024.45945.1730.

مقدمه

باکتری *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) عامل پژمردگی باکتریایی لوبیا (*CFF*)، بیمارگری خطرناک برای مزارع کشت لوبیا محسوب می‌شود. این باکتری قدرت نامیه بذور را کاهش داده و یا به‌طور کامل از بین می‌برد. علائم این بیمارگر به‌صورت ایجاد سوختگی شدید با حاشیه زردرنگ در بافت‌های هوایی و پژمردگی عمومی گیاهان آلوده مشاهده می‌شود که درنهایت فعالیت این بیمارگر در گیاه باعث کاهش عملکرد محصول لوبیا در واحد سطح می‌شود (Osdaghi et al., 2020). علائم این بیمارگر (*CFF*) روی محصول لوبیا (بذر) به‌صورت تغییر رنگ بذر لوبیا و چروک شدن آن نمایان می‌شود که بر کیفیت لوبیا معمولی و درنتیجه بازارپسندی تأثیر می‌گذارد. باکتری *CFF* به‌صورت نهفته در بذور لوبیا نیز وجود دارد و هیچ‌گونه علائمی از خود نشان نمی‌دهد. لذا کشاورزان با کشت این بذرهای آلوده شده به باکتری *CFF* که از برداشت قبلی محصول یا از بازارهای مجاور تهیه شده است، باعث انتشار و شیوع بیماری پژمردگی باکتریایی در سطح وسیعی می‌شوند (Tegli et al., 2020).

گرچه علیه پژمردگی باکتریایی لوبیا، ماده شیمیایی مؤثری تاکنون تولید و عرضه نگردیده است ولی برای کنترل بیمارگرهای گیاهی معمولاً از سموم شیمیایی مسی استفاده می‌شود (Wang et al., 2018). مهار این بیمارگرهای گیاهی با استفاده از مواد شیمیایی دارای معایب زیادی از جمله اختلال در تنوع زیستی و طبیعی است. بسیاری از آفت‌کش‌ها از جمله آفت‌کش‌های غیرانتخابی علاوه بر موجود هدف، گونه‌های مفید و بی‌ضرر را نیز از بین می‌برند. از طرفی باقی‌مانده آفت‌کش‌هایی که در زنجیره غذایی استفاده می‌شوند اثرات منفی زیادی بر سلامتی انسان‌ها همانند ایجاد سرطان دارند (Wang et al., 2018; Tegli et al., 2020). از این رو، به‌کارگیری راهبردهایی برای پیشگیری و مهار این بیماری که سازگار با محیط‌زیست باشد، در اولویت قرار دارد به‌کارگیری عوامل مهارزیستی میکروبی می‌تواند یکی از این استراتژی‌ها باشد. عوامل بیوکنترل روشی ایمن و سازگار با محیط‌زیست و یک جایگزین بالقوه برای استفاده از سموم شیمیایی برای مدیریت بیماری‌های گیاهی به‌حساب می‌آیند (Martins et al., 2013). این عوامل زیستی به‌صورت اختصاصی علیه بیمارگر وارد عمل می‌شوند و به گونه‌های غیرهدف آسیب نمی‌رسانند و درنهایت از استقرار یا عفونت پاتوژن بیماری‌زا در گیاه جلوگیری می‌کنند (Singh et al., 2019; Manoj et al., 2020).

تولید مولکول‌های محرک رشد گیاه، کاهش وابستگی کشاورزی به آفت‌کش‌های شیمیایی، سازگاری بالا با محیط زیست، کاهش اثرات منفی زیست‌محیطی، حفظ میکروارگانیسم‌های مفید خاک و مقرون به‌صرفه بودن از مزیت های مهم مهار زیستی می باشد که پژوهشگران با اطلاع از این ویژگی‌ها و همچنین بررسی مکانیسم‌های اثرگذار آن‌ها، می‌توانند عواملی را که فعالیت مهاری بالایی علیه *CFF* دارند را شناسایی و با تکثیر و گسترش آن‌ها و در نهایت با بکار گرفتن این عوامل زیستی در قالب فرمولاسیون آفت‌کش‌های زیستی، آن‌ها را مورد استفاده قرار دهند (Arwiyanto, 2014; Khavari & Shakarami, 2020; Manoj et al., 2020). باکتری‌های محرک رشد گیاهی (PGPB[1]) و قارچ‌های محرک رشد گیاهی (PGPF[2]) وسیع‌ترین گروه از ریزوباکترهای محرک رشد گیاهی (PGPR[3]) هستند که با فعالیت در فراریشه گیاهان اثرات مثبتی روی مهار بیمارگرهای گیاهی و افزایش رشد گیاهان دارند (Tariq et al., 2017; Nurfalah et al., 2019). از مهم‌ترین گونه‌های باکتریایی که در مهار زیستی استفاده زیادی دارد می‌توان به گونه‌هایی از باکتری‌های *Pseudomonas* sp. (Migula) و *Bacillus* sp. (Cohn) و از جمله مهم‌ترین عوامل زیستی قارچی می‌توان به قارچ‌های گونه *Trichoderma* sp. (Pers) اشاره نمود (Paulitz & Belanger, 2001; Abassi et al., 2014; Des et al., 2021). که در پژوهش‌های زیادی خاصیت مهار زیستی این عوامل باکتریایی و قارچی علیه بیمارگرهای گیاهی اثبات شده است (Martins et al.,

1- plant growth-promoting bacteria
2- plant growth-promoting fungi
3- Plant growth-promoting rhizobacteria

2013; Spago et al., 2014; Dönmez, & Aliyeva, 2019; Mokrani et al., 2019; Bedine Boat et al., 2020; Kamel et al., 2020; Ketta & Hewedy, 2021; Belete et al., 2021).

با توجه به اینکه بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا (*CFF*) در ایران بیماری نوظهوری است (Osdaghi et al., 2020) و بیشتر تحقیقات در رابطه با شناسایی و ردیابی این بیمارگر انجام شده است و هیچ‌گونه تحقیقی در مورد مهار زیستی این بیمارگر در ایران انجام نگردیده است و در سطح جهان نیز پژوهش‌های محدودی در این مورد صورت پذیرفته است و این تحقیقات در سطح جهانی نیز محدود به استفاده از عوامل باکتریایی PGPB بوده (Hsieh et al., 2005; Martins et al., 2013; Corrêa et al., 2014; Munene, 2023; Munene et al., 2023) و اثربخشی عوامل PGPF مانند قارچ‌های تریکودرما تاکنون چه در سطح کشور و چه در سطح جهانی بررسی نشده است لذا بر این اساس در این تحقیق به بررسی مهار زیستی بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا (*CFF*) با استفاده از قارچ *Trichoderma harzianum* (Rifai) و باکتری *Pseudomonas fluorescens* (Flügge) و همبستگی متقابل این بیمارگر و عوامل زیستی، روی شاخص‌های رشدی گیاه لوبیا پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش سویه باکتری *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* UTMC00162 از کلکسیون بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی شیراز تهیه شد. از جدایه‌های آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* T.BI و *Pseudomonas fluorescens* CHAO موجود در کلکسیون بخش گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان استفاده شد.

آزمون اثبات بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی *CFF* روی گیاهچه‌های هفت‌روزه‌ی لوبیا چیتی رقم صدری در گلخانه با دمای ۱±۲۵ رطوبت ۱۰±۷۰ درصد انجام گردید ابتدا بذور لوبیا به مدت ۳۰ ثانیه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی و سپس با آب مقطر شستشو داده شدند. بذور سترون شده در پتری‌دیش‌های استریل حاوی کاغذ صافی با مقدار کمی آب استریل نگهداری شدند. بعد از ۲۴ ساعت و به محض مشاهده ریشه‌چه، بذور جوانه‌زده به مخلوط حاوی خاک مزرعه، کود و شن (به نسبت ۱:۱:۲) استریل در گلدان پلاستیکی دو کیلویی انتقال داده شدند. پس از گذشت دو هفته و ظهور برگ‌های حقیقی، سه برگچه دوم بوته‌ها توسط جدایه‌های باکتریایی *CFF* که توسط دستگاه اسپکتروفتومتر به غلظت CFU/ml 10^8 رسانده شده بود، مایه‌زنی شدند. مایه‌زنی بیمارگر به گیاه لوبیا با روش ایجاد زخم روی بافت گیاه و سپس اسپری‌پاشی سوسپانسیون عامل بیماری‌زا انجام پذیرفت (Urrea & Harveson, 2014). از آب مقطر سترون، به‌عنوان شاهد منفی(شاهد) استفاده شد. به‌منظور حفظ رطوبت بوته‌های مایه‌زنی شده، گلدان‌ها به مدت ۷۲ ساعت زیر پوشش پلاستیکی و با اسپری آب مقطر سترون رطوبت تامین گردید. آزمایش مزبور تحت تیمارهای شاهد سالم، شاهد آلوده در چهار تکرار در قالب طرح کامل تصادفی انجام پذیرفت. ظهور علائم در طول مدت ۲۰ الی ۳۰ روز یادداشت‌برداری شد و درنهایت شدت بیماری‌زایی در هفته سوم، روی گیاهان لوبیا به روش نمره‌دهی چشمی بر مقیاس صفر تا ۴ انجام پذیرفت (Hsieh et al., 2020) در این سیستم کد صفر گیاه سالم کد ۱ پژمردگی روی یکی از برگ‌های اولیه، کد ۲ پژمردگی روی دوتا از برگ‌های اولیه، کد ۳ پژمردگی روی سه برگ و کد ۴ پژمردگی روی چهار برگ یا بیشتر می‌باشد. همچنین از سیستم نمره‌دهی ۱ تا ۵ برای سنجش تغییرات مقاومت گیاه لوبیا در برابر باکتری *CFF* استفاده شد (Webster et al., 1983). در این سیستم کد ۱: هیچ علائمی از بیماری روی گیاه نیست (گیاه ایمن) کد ۲: لکه‌ها کمتر از ۲۵ درصد سطح برگ‌ها را در کمتر ۱۰ درصد برگ‌ها می‌پوشاند (گیاه)، کد ۳: مقاوم لکه‌ها کمتر از ۲۵ درصد سطح برگ‌ها را در ۵۰-۱۰ درصد برگ‌ها می‌پوشاند (گیاه نیمه مقاوم)، کد ۴: لکه‌ها بیش از ۲۵ درصد سطح برگ‌ها را در ۵۰-۱۰ درصد برگ‌ها می‌پوشاند (گیاه نیمه حساس) و کد ۵: لکه‌ها بیش از ۲۵ درصد سطح برگ‌ها را در بیش از ۵۰ درصد برگ‌ها می‌پوشاند (گیاه حساس) می‌باشد. بعد از ثبت علائم (کد دادن به گیاه) از فرمول

زیر به‌منظور بررسی شدت بیماری باکتری *CFF* روی لوبیا استفاده شد (Dhanya et al., 2007).

$$\text{شدت بیماری} = \left[\frac{\text{مجموع کدهای اختصاص داده شده به گیاه}}{\text{مجموع برگ‌های مشاهده شده} \times \text{بزرگ‌ترین کد}}\right] \times 100$$

بررسی خاصیت آنتاگونیستی باکتری *P. fluorescens* علیه باکتری *CFF* در شرایط آزمایشگاه

بدین منظور از دو روش برای تأثیر باکتری زیستی روی باکتری بیمارگر استفاده شد: در روش اول ابتدا سوسپانسیونی با غلظت 10^8 CFU/ml از باکتری *CFF* با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر تهیه شد و سپس این سوسپانسیون با محیط کشت M9 (جدول ۱) مخلوط و سپس در پتری‌دیش[1] ریخته شد. بعد از ۴ ساعت که محیط کشت حاوی باکتری بیمارگر جامد شد، باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* به‌صورت نقطه‌ای در آن کشت شد. درنهایت پس از ۲۴ ساعت، تغییرات بازدارندگی از رشد باکتری بیمارگر، که به‌صورت هاله شفاف اطراف کشت نقطه‌ای باکتری آنتاگونیست قابل مشاهده است، با اندازه‌گیری قطر این هاله محاسبه گردید (Nguyen & Ranamukhaarachchi, 2010).

جدول ۱. تهیه محیط کشت M9

Table 1. Preparation of culture medium M9 Minimal Salts

Materials		Amount	Autoclave disinfection step
M9 Salt	H2O	500 ml*	Autoclave and Cool to 50 °C
	1. Na_2HPO_4	60 g*	
	2. KH_2PO_4	30 g	
	3. NaCl	5gr	
	4. NH_4Cl	10 g	
	Agar	15 g	
	1M* $MgSO_4$	1 ml	Not Autoclave
	1M $CaCl_2$	0.1 ml	
	50% Glucose	4 ml	
	1% Thiamine	0.25 ml	

*ml: Milliliter *g: Gram *1M: One molar concentration

در روش دوم، ابتدا باکتری آنتاگونیست به‌صورت لکه گرد در تشتک‌های حاوی محیط کشت نیوترینت آگار (NA)[2] تهیه شده از شرکت مرک آلمان کشت داده شد. بعد از اینکه پرگنه باکتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت رشد کرد، ابتدا پرگنه باکتری توسط پنبه استریل آغشته شده به الکل ۹۶ درصد از سطح محیط کشت حذف می‌گردد. برای اطمینان از حذف کامل سلول باکتری آنتاگونیست، روی درب تشتک پتری حاوی محیط کشت باکتری، دو قطره کلروفرم ریخته و سپس = تشتک پتری را به‌صورت وارونه به مدت ۲۰ دقیقه روی درب آن گذاشته شد و بعد از آن به مدت ۳۰ دقیقه هوادهی محیط کشت جهت حذف کلروفرم انجام گردید. بعد از انجام هوادهی، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا (*CFF*) با غلظت 10^8 CFU/ml در هر پتری اسپری گردید و به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. درنهایت برای بررسی اثر بازدارنده مواد مترشحه باکتری آنتاگونیست *P. fluorescens* قطر هاله ایجاد شده در ناحیه کشت شده، اندازه گرفته شد. در این بخش از آزمایش برای تیمار شاهد به‌جای باکتری *CFF*، آب مقطر استریل استفاده شد (Sakthivel and Mew, 1991). درنهایت درصد بازدارندگی رشد باکتری آنتاگونیست با استفاده از رابطه زیر با تغییرات جزئی محاسبه گردید (Pandey et al., 1982).

$$\text{درصد بازدارندگی از رشد} = \frac{\text{قطر ناحیه رشد کرده باکتری} - \text{قطر پتری}}{\text{قطر پتری}} \times ۱۰۰$$

بررسی تأثیر عوامل آنتاگونیست در شرایط گلخانه علیه باکتری *CFF*

بدین منظور ابتدا گیاه لوبیا همانند مرحله بیماری‌زایی، کشت گردیدند سپس سوسپانسیونی از سلول‌های باکتری‌های آنتاگونیست و بیماری‌زا با غلظت 10^8

1- Petri dish

2- Nutrient Agar

CFU/ml (تعیین غلظت با دستگاه اسپکتروفومتر)و قارچ آنتاگونیست با غلظت با 10^6 اسپور در میلی‌لیتر (به روش سری رقت) تهیه شد. باکتری و قارچ آنتاگونیست در مرحله ظهور برگ‌های حقیقی و سه برگچه دوم بوته‌های لوبیا و طبق تیماربندی جدول (۲) روی گیاه لوبیا اسپری پاشی گردید. این اسپری پاشی به نحوی انجام می‌گردد که آب از سطح برگ جاری شود. برای فراهم نمودن گیاه برای ورود بیمارگر و عوامل آنتاگونیست، سطح برگ با سوزن استریل به آرامی زخم شدند. سپس برای حفظ رطوبت اطراف بوته، کیسه نایلونی شفافی روی بوته‌های مایه‌زنی شده کشیده شد. این مراحل (اسپری پاشی و پوشش نایلونی) بعد از گذشت ۷۲ ساعت مجدداً تکرار گردید. در این آزمایش، برای تیمار شاهد آلوده (شاهد مثبت) از آب مقطر سترون، به‌جای سوسپانسیون عوامل آنتاگونیست و برای تیمارهای شاهد سالم (شاهد منفی) از آب مقطر استریل به‌جای سوسپانسیون باکتری بیماری‌زا روی گیاه لوبیا اسپری پاشی شد. این آزمایش تحت تیمارهای شاهد منفی (بدون مایه‌زنی بیمارگر به گیاه)، شاهد مثبت (گیاه آلوده شده به بیمارگر)، تیمارهای زیستی (*P. fluorescens* +گیاه آلوده، *T. harzianum* +گیاه آلوده و ترکیب هر دو عامل زیستی+گیاه آلوده) و تیمار شاهد عوامل زیستی (*P. fluorescens* +گیاه سالم، *T. harzianum* +گیاه سالم و ترکیب هر دو عامل زیستی+گیاه سالم) در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت. پس از گذر از مرحله حساس گیاه، به‌منظور مطالعه تأثیر این عوامل آنتاگونیست روی بیماری پژمردگی لوبیا شاخص‌هایی وزن‌تر و خشک ریشه و ساقه، ارتفاع ریشه و ساقه گیاه لوبیا و درصد بیماری‌زایی باکتری *CFF* در حضور و عدم حضور عوامل آنتاگونیست یادداشت‌برداری و اندازه‌گیری شد. داده‌های خام به دست آمده ابتدا همگن‌سازی سپس نرمال‌سازی و درنهایت با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 در سطح احتمال یک درصد مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت (جدول ۲).

نتایج

اثبات بیماری‌زایی باکتری *CFF* روی گیاه لوبیا

علائم بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا ۲ تا ۳ هفته بعد از مایه‌زنی باکتری بیمارگر (*CFF*) روی گیاه لوبیا رقم صدری به‌صورت علائم کلروز با حاشیه زرد کم‌رنگ بین رگبرگی و حاشیه برگ نمایان شد. این لکه‌ها به‌مرور به هم پیوسته شده و به‌صورت سوختگی یا کلروز شدیدی تبدیل شد. همزمان با این علائم پژمردگی سیستمیک روی گیاه لوبیا مشاهده شد (شکل ۱).

خاصیت ضدباکتریایی عوامل آنتاگونیست علیه *CFF* در شرایط آزمایشگاه

نتایج تجزیه واریانس تأثیر عوامل آنتاگونیست باکتریایی و قارچی روی *CFF* در شرایط آزمایشگاه نشان داد، هنگامی‌که این عوامل آنتاگونیست به‌صورت مستقیم و غیرمستقیم (مواد مترشحه از آنتاگونیست) در تقابل با کشت این بیمارگر قرار می‌گیرند از رشد این پاتوژن به‌صورت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد جلوگیری به عمل می‌آید. در کشت متقابل عامل آنتاگونیست *P. fluorescens* و *T. harzianum* به ترتیب با قطر هاله بازدارنده ۱۴ و ۲۰/۵ میلی‌متر به ترتیب ۱۸/۶۷ و ۲۷/۳۳ درصد از رشت باکتری بیمارگر *CFF* جلوگیری به عمل آوردند (جدول ۳).

جدول ۲- تیماربندی آماری تأثیر عوامل زیستی در شرایط گلخانه روی بیماری پژمردگی لوبیا (*CFF*)

Table 2- Statistical treatment of the effect of biological factors on bean wilt disease in greenhouse conditions

Treatment	Code
Infected treatment	-A
Non-infected treatment	+A
T. harzianum (*Control treatment*)	AT
P. fluorescens (*Control treatment*)	AP
T. harzianum+ *P. fluorescens* (*Control treatment*)	ATP
T. harzianum + *CFF*	T+*CFF*
P. fluorescens + *CFF*	P+*CFF*
B. subtilis+ *P. fluorescens*+*CFF*	TP+*CFF*

شکل ۱- علائم بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا در اثر باکتری *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens*
Figure 1- Symptoms of bean bacterial wilt disease caused by *Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens*

زمانی که اثر بازدارندگی مواد مترشحه این عوامل آنتاگونیست روی باکتری *CFF* مورد بررسی قرار گرفت مشخص گردید که بخش عمده‌ای از اثر بازدارندگی باکتری *P. fluorescens* (حدود ۸۵/۷۰ درصد) مربوط به مواد مترشحه سلولی باکتری است درحالی‌که در قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* این عدد ۵۰/۰۲ درصد می‌باشد. این نتیجه بیانگر این می‌باشد که مکانیسم اصلی اثر بازدارندگی از رشد *P. fluorescens* مربوط به مواد مترشحه سلولی است ولی در قارچ *T. harzianum* اضافه بر مواد مترشحه، مکانیسم‌هایی چون رقابت بر سر فضا و مواد غذایی (کلونیزه کردن محیط کشت) در خاصیت این عامل آنتاگونیست علیه باکتری *CFF* اثرگذار است (شکل ۲ و ۳).

تأثیر عوامل زیستی قارچی و باکتریایی روی شاخص شدت پژمردگی باکتریایی لوبیا

مقایسه میانگین شاخص شدت بیماری پژمردگی لوبیا در طی سه هفته در مایه‌زنی با عوامل آنتاگونیست نشان داد، وقتی عوامل آنتاگونیست به گیاه لوبیا آلوده مایه‌زنی می‌شود باعث تقویت واکنش دفاعی گیاه در طی سه هفته گردید. به نحوی که واکنش حساس گیاه در مقابل باکتری *CFF* (شدت بیماری ۸۳/۱۳ درصد) با مایه‌زنی باکتری *P. fluorescens* و قارچ *T. harzianum* به واکنش نیمه مقاوم و با مایه‌زنی ترکیبی این دو عامل زیستی به واکنش مقاوم تبدیل شد (شکل ۴). تیمار ترکیبی *P. fluorescens+T. harzianum* با تأثیر بر باکتری *CFF* بهترین تیمار در کاهش شدت بیماری در طی ۷، ۱۴ و ۲۱ روز بود شدت بیماری در این روزها به ترتیب ۲۱/۸۷، ۳۳/۱۲ و ۳۶/۲۵ درصد بود و با تیمار آلوده که شاخص شدت بیماری در آن به ترتیب طی این چند روز ۳۱/۲۵، ۶۲/۵ و ۸۴/۳۸ درصد بود تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد نشان داد (جدول ۴).

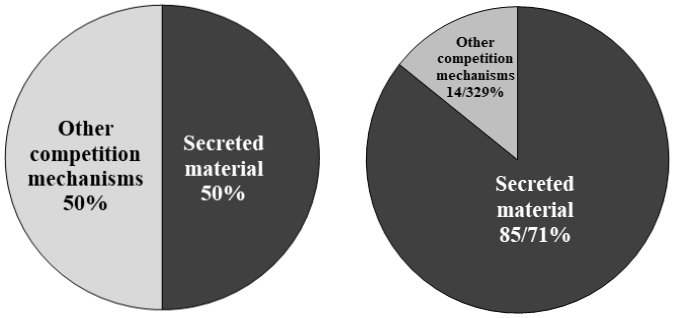
تیمار *P. fluorescens+T. harzianum* با شاخص شدت بیماری ۳۶/۲۵ درصد و کاهش ۵۷/۰۴ درصدی شدت بیماری نسبت به گیاه آلوده به *CFF* بیشترین اثرگذاری را روی کاهش این بیماری نشان داد و با سایر تیمارها در سطح آماری یک درصد تفاوت معنی دارد. همچنین تیمارهای *P. fluorescens* و *T. harzianum* به ترتیب با کاهش ۴۰ و ۳۴/۰۷ درصد شدت بیماری تأثیر معنی‌داری برشدت بیماری *CFF* در سطح یک درصد دارد و مقاومت نسبی (مقاوم و نیمه مقاوم) در گیاه آلوده به این بیمارگر به وجود آوردند (جدول ۵).

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر عوامل آنتاگونیست *P. fluorescens* و *T. harzianum* در جلوگیری از رشد باکتری بیمارگر *CFF* در دو روش کشت متقابل و مواد مترشحه سلولی

Table 3. Comparison of the average effect of *P. fluorescens* & *T. harzianum* antagonists in preventing the growth of pathogenic bacteria *CFF* in two methods of cross-culture & cell secreted substances

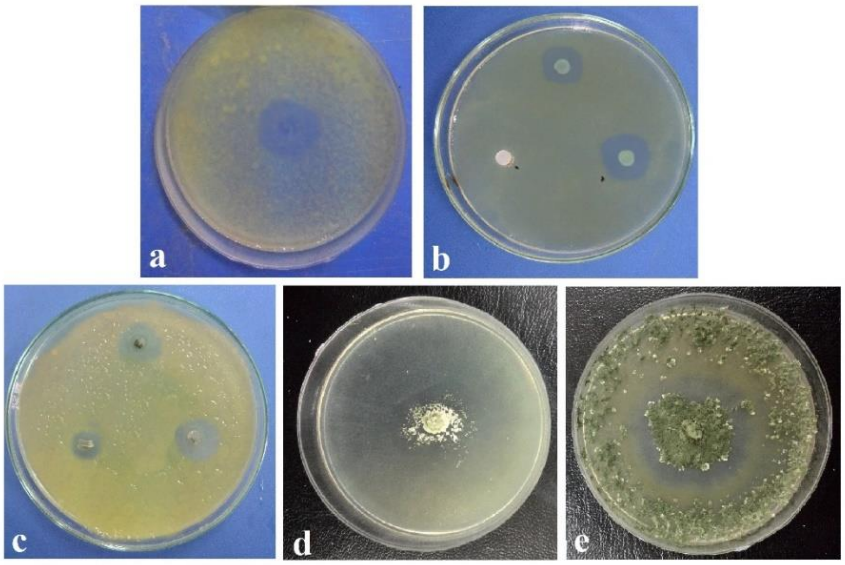
Treatment	Type test	diameter of the inhibitory halo (mm)	Growth inhibition percentage)
P. fluorescens	Cross-Culture	14 [b]	18.67 **
	Cell Secreted Substances	12 [bc]	16**
T. harzianum	Cross-Culture	20.5 [a]	27.33 **
	Cell Secreted Substances	10.25 [c]	13.67 **

The values in a row followed by different letters are significantly different (P < 0.01) according to Dunkan test.



شکل ۲- سهم مواد مترشحه و سایر مکانیسم‌های رقابتی باکتری *P. fluorescens* و قارچ *T. harzianum* در جلوگیری از رشد باکتری عامل پژمردگی لوبیا (*CFF*)

Figure 2. The contribution of secreted substances & other competitive mechanisms in *P. fluorescens* & *T. harzianum* in preventing the growth of bean wilt bacteria (*CFF*)



شکل ۳- بررسی هاله بازدارنده رشد در کشت متقابل و مواد مترشحه عوامل آنتاگونیست علیه باکتری *CFF* در شرایط آزمایشگاه: شکل (a و b) به ترتیب هاله بازدارنده ناشی از مواد مترشحه سلولی و کشت متقابل *P. fluorescens* شکل (c و d) به ترتیب هاله بازدارنده ناشی از مواد مترشحه سلولی و کشت متقابل *T. harzianum* شکل (e) کلونیزه شدن سلول‌های باکتری *CFF* توسط قارچ *T. harzianum*

Figure 3- Investigating the growth inhibitory halo in Cross-culture & secreted substances of antagonist agents against *CFF* in laboratory conditions: Figure (a-b) respectively the inhibitory halo caused by cell secreted substances & the cross-culture of *P. fluorescens*. Figure (c-d) respectively the inhibitory halo caused by cell secreted substances & the cross-culture of *T. harzianum*. Figure (e) Colonization of *CFF* bacterial cells by *T. harzianum*.

تأثیر عوامل زیستی روی شاخص‌های گیاه لوبیای آلوده به بیماری پژمردگی باکتریایی

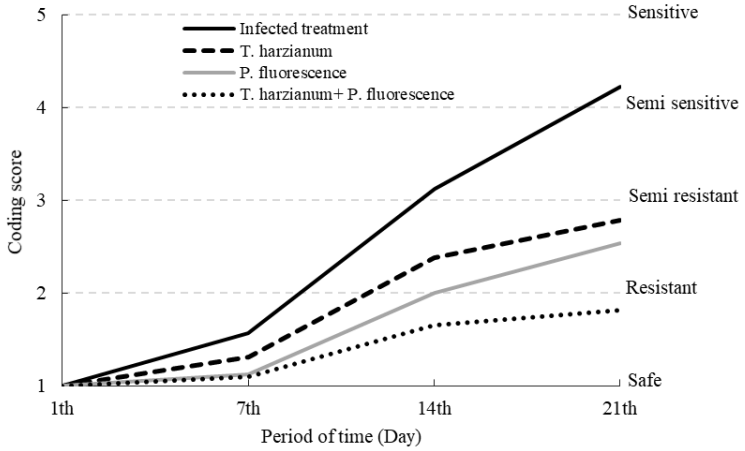
نتایج تجزیه واریانس تأثیر عوامل زیستی باکتری و قارچی روی خصوصیات رشدی گیاه لوبیا در حضور و عدم حضور باکتری عامل پژمردگی (*CFF*) این گیاه نشان داد که عوامل زیستی بکارگرفته شده در این پژوهش روی تمام شاخص‌های گیاهی لوبیای سالم و آلوده شده به باکتری *CFF* در سطح آماری یک درصد تفاوت معنی‌داری ایجاد نموده است. مقایسه میانگین تأثیر این دو عامل زیستی روی ارتفاع اندام هوایی و ریشه گیاه لوبیای سالم و آلوده شده به باکتری *CFF* نشان داد، که به‌طورکلی مایه‌زنی عوامل آنتاگونیست *T. harzianum* و *P. fluorescens* به گیاه سالم و آلوده لوبیا، باعث تأثیر معنی‌داری در رشد اندام هوایی در مقایسه با گیاه بدون مایه‌زنی یا عوامل آنتاگونیست شده است. مایه‌زنی تیمار ترکیبی این عوامل زیستی (*P. fluorescens+T. harzianum*) به گیاه لوبیا سالم و آلوده شده به *CFF* به ترتیب با ارتفاع ساقه ۵۲/۸۷ و ۳۴/۵ سانتی‌متر، بیشترین اثرگذاری را در بین تیمارهای سالم و آلوده شده به باکتری بیمارگر دارد و با سایر تیمارهای بکارگرفته شده تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد نشان داد. تیمارهای زیستی بکار گرفته شده اضافه بر اینکه باعث تغییرات مثبت وزن اندام هوایی گیاه لوبیای غیر آلوده به *CFF* شدند، در حضور عامل بیماری، نیز باعث بهبود شاخص‌های هوایی گیاه لوبیا شدند به نحویکه وزن تر و خشک اندام هوایی در هر سه تیمار آنتاگونیست شامل *P. fluorescens*، *T. harzianum* و تیمار ترکیب آن‌ها (*P. fluorescens+T. harzianum*) با تیمار آلوده تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد ایجاد نمود. و از بین این تیمارها تیمار *P. fluorescens+T. harzianum* با ۷/۸۲ گرم وزن تر و ۳/۷۴ گرم وزن خشک اندام هوایی بهترین تیمار این آزمایش بود و با تیمار شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری ایجاد نمود گرچه این تیمار با تیمار *P. fluorescens* تفاوت معنی‌داری ایجاد ننمود بنابراین می‌توان این دو تیمار را به‌عنوان اثرگذارترین تیمار، روی این شاخص گیاهی لوبیای آلوده به *CFF* نام برد (جدول ۶).

جدول ٤- تغییرات شدت بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا در طی دوره زمانی ۲۱ تحت تأثیر عوامل زیستی *P. fluorescens* و *T. harzianum*

Table 4. Changes in the severity of bean bacterial wilt disease during the 21st period under the influence of *P. fluorescens* & *T. harzianum*

Tereatment	Treatment Code	Percentage of disease severity over time (days)		
		21th	14th	7th
Infected treatment	+A	84.38 a	62.50 a	31.25 a
T. harzianum	T+*CFF*	55.32 b	47.50 ab	26.25 ab
P. fluorescens	P+*CFF*	50.62 b	40 b	21.25 b
P. fluorescens+T. harzianum	TP+*CFF*	36.25 c	33.12 b	21.87 b

The values in a row followed by different letters are significantly different (P < 0.01) according to Dunkan test.



شکل ٤- تغییرات مقاومت گیاه لوبیای آلوده به باکتری *CFF* در طی دوره زمانی ۲۱ تحت تأثیر عوامل زیستی *P. fluorescens* و *T. harzianum*

Figure 4. Changes in resistance of bean plant infected with *CFF* during the period of 21 days under the influence of *P. fluorescens* & *T. harzianum* biological factors

همانند تأثیر مثبت عوامل آنتاگونیست بکار گرفته شده روی شاخص‌های هوایی گیاه آلوده شده به *CFF* این عوامل آنتاگونیست روی شاخص‌های زمینی گیاه نیز تأثیر مثبتی ایجاد نمودند، به نحویکه روی طول ریشه هر سه تیمار شامل *P. fluorescens*، *T. harzianum* و تیمار ترکیب آن‌ها (*P. fluorescens+T. harzianum*) روی طول، وزن خشک و تر ریشه تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد آلوده نشان دادند و در بین آن‌ها تیمار ترکیب دو عامل زیستی به ترتیب با ۲۲ سانتی‌متر طول، ۳/۲۳ گرم وزن تر و ۱/۲۱ گرم وزن خشک ریشه لوبیا، تفاوت معنی‌داری با شاهد لوبیای آلوده به باکتری *CFF* با ۱۶ سانتی‌متر طول، ۲/۱۳ گرم وزن تر، ۰/۵۵ گرم وزن خشک در سطح یک درصد نشان داد و بهترین و اثرگذارترین تیمار روی این شاخص گیاهی نیز شناخته شد (جدول ۷).

بحث و نتیجه‌گیری

در طول سال‌های گذشته تا به امروز پژوهش‌های زیادی روی قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست مؤثر روی بیمارگرهای گیاهی و به‌عنوان کود زیستی برای بهبود رشد گیاهان و همچنین کنترل بیماری‌های گیاهی انجام پذیرفته است. آنتاگونیست های اندوفیت به دلیل مزیت بیشتری که نسبت به سموم شیمیایی دارد، پژوهشگران را متقاعد کرده است که بیشتر مطالعات خود را روی شناسایی توانایی‌های این عوامل زیستی در حفاظت از گیاهان در برابر تنش‌های محیطی زنده و غیرزنده از جمله بیماری‌های گیاهی معطوف کنند. در پژوهش حاضر نیز کاربرد دو عامل زیستی *P. fluorescens* و *T. harzianum* علیه باکتری *CFF* به‌عنوان یکی از بیمارگرهای مهم گیاه لوبیا، اثرات مهارکنندگی مثبتی نشان داد به نحویکه در شرایط آزمایشگاه این دو عامل زیستی به ترتیب ۱۸/۶۷ و ۲۷/۳۳ درصد از رشد باکتری جلوگیری به عمل آورد. در پژوهشی مشابه مشخص گردید که باکتری *P. fluorescens* با ایجاد هاله بازدارنده روی محیط کشت مصنوعی از رشد این باکتری جلوگیری به عمل می‌آورد (Munene, 2023). همچنین دیگر پژوهشگران از جمله Corrêa و همکاران (۲۰۱۴) خاصیت بازدارندگی از رشد این عامل زیستی را علیه باکتری عامل پژمردگی لوبیا اثبات نموده‌اند. که نتایج آن‌ها با نتایج این پژوهش مشابهت دارد.

در مطالعه حاضر، بررسی‌های تأثیر عصاره باکتری و قارچ آنتاگونیست روی باکتری *CFF* بیانگر این موضوع بود که ۵۰/۰۲ درصد از قدرت بازدارندگی قارچ *T. harzianum* و ۸۵/۷۰ درصد از قدرت بازدارندگی باکتری *P. fluorescens* مربوط به مواد مترشحه از آن‌هاست. درواقع بخش عمده‌ای قدرت باکتری *P. fluorescens* به خاطر مواد مترشحه سلولی آن می‌باشد و حدود ۱۴ درصد از قدرت بازدارندگی این باکتری به خاطر سایر مکانیسم‌های رقابتی از جمله اشغال فضا و مواد غذایی می‌باشد. این درحالی است که تقریباً نیمی از قدرت مهارکنندگی قارچ *T. harzianum* به خاطر سایر توانایی‌های رقابتی این قارچ از جمله قدرت بالای این قارچ در کلونیزه کردن محیط، اشغال فضا و رقابت بر سر مواد غذایی است.

جدول ۵- کاهش شدت بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا تحت تأثیر عوامل زیستی *P. fluorescens* و *T. harzianum*

Table 5. Reduction of bean bacterial wilt disease severity under the influence of *P. fluorescens* & *T. harzianum* biological agents

Treatment	Treatment Code	Reducing the severity of the disease	Coding score	Resistance type
Infected treatment	+A	–	4-5	Sensitive- semi sensitive
P. fluorescens	P+*CFF*	40	3-4	Semi Resistant-Resistant
T. harzianum	T+*CFF*	34.07	3	Semi Resistant
P. fluorescens+T. harzianum	TP+*CFF*	57.04	2	Resistant

توانایی رقابت بر سر فضا و مکان با مشاهدات چشمی رشد قارچ *T. harzianum* روی محیط کشت حاوی باکتری بیمارگر کاملاً مشهود و واضح بود. بنابراین قطعا در عصاره این عوامل زیستی باید مواد بازدارنده از رشدی وجود داشته باشد، در پژوهش های مشابه بیان شده است باکتری *P. fluorescens* با مکانیسم‌هایی همانند اسیدی‌کردن محیط، تولید مواد مهارگر باکتری[1]، رقابت برای غذا، تولید هربیکولین[2] و تولید ترکیبات آنتی‌بیوتیکی باعث بازدارندگی از رشد عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌شوند (Vanneste, 2000; Wodzinski et al., 1994; Nur Mawaddah et al., 2023). همچنین مشخص شده است که باکتری *P. fluorescens* با تولید پروتئاز و سیانید هیدروژن از رشد باکتری‌های بیمارگر جلوگیری به عمل می‌آورد (Esmaili et al., 2015).

در مورد تأثیر زیستی گونه‌های مختلف *Trichoderma* sp. روی باکتری *CFF* تاکنون پژوهشی انجام نگردیده است ولی خاصیت مهار زیستی این قارچ روی سایر بیمارگرهای بیماری‌زا مشخص نموده است که قارچ *T. harzianum* با تولید متابولیت‌های ثانویه از جمله ویریدیوفانجین[3]، ویریدین[4]، هپتلیدیک اسید[5] و ترکیباتی مانند پتی‌بول‌ها[6] و اسید هارزیاتیک و به‌طورکلی تولید مواد خارج سلولی باعث جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی می‌شود (Reino et al., 2008: Abassi et al., 2014; Mirzaei Najafgholi et al., 2015; Karimi et al., 2015). همچنین مشخص شده است قارچ *T. harzianum* از طریق ازدحام جمعیت و اشغال محیط کشت (کلونیزه کردن محیط کشت) مانع از رشد باکتری‌های بیماری‌زا می‌شود (Kalita et al., 1996; Nazvar et al., 2021).

بررسی‌های گلخانه‌ای پژوهش حاضر نشان داد تیمار ترکیبی *P. fluorescens+T. harzianum* با کاهش ۵۷/۰۴ درصدی شدت بیماری بیشترین اثرگذاری را روی شدت بیماری در بین تیمارهای مورد مطالعه داشت. همچنین تیمارهای *P. fluorescens* و *T. harzianum* به ترتیب با کاهش ۴۰ و ۳۴/۰۷ درصد شدت بیماری را کاهش دادند. واکنش گیاه لوبیا در تیمار *P. fluorescens+T. harzianum* در مقابل بیماری *CFF* از نوع واکنش مقاوم و در دو تیمار دیگر نیمه مقاوم بود درواقع تیمارهای زیستی باعث شدند واکنش حساس گیاه به بیمارگر به یک واکنش مقاوم و نیمه مقاوم تبدیل گردد.

شکل ۵- تغییرات علائم بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا تحت تأثیر حضور عوامل زیستی *T. harzianum* و *P. fluorescens*

Figure 5. Changes in bean bacterial wilt disease symptoms under the influence of *T. harzianum* & *P. fluorescens* biological agents

1- Bacteriostatic
2- Herbicolin
3- Viridiofungin
4- Viridin
5- Heptelidic acid
6- Petibols

جدول ٦- تأثیر عوامل آنتاگونیست روی شاخص‌های هوایی گیاه لوبیا سالم و آلوده شده به بیمارگر *CFF*

Table 6. The effect of antagonistic agents on the aerial parameters of uninfected & infected bean plant with *CFF* pathogen

	Treatment	Code	Stem dry weight (gr)	Stem fresh weight (gr)	Stem Length (cm)
Uninfected	Control	-A	3.73 ^{c}	09.67 ^{b}	43.50 ^{c}
	P. fluorescens	AP	4.62 ^{b}	10.47 ^{ab}	48.85 ^{b}
	T. harzianum	AT	4.82 ^{b}	10.52 ^{ab}	49.88 ^{b}
	P. fluorescens+*T. harzianum*	ATP	5.33 ^{a}	11.32 ^{a}	52.87 ^{a}
Infected	Control	+A	2.35 ^{e}	05.65 ^{d}	25.50 ^{f}
	P. fluorescens	P+*CFF*	3.54 ^{c}	07.30 ^{c}	31.51 ^{e}
	T. harzianum	T+*CFF*	3.25 ^{d}	07.25 ^{c}	29.55 ^{e}
	P. fluorescens+*T. harzianum*	TP+*CFF*	3.74 ^{c}	07.82 ^{c}	34.50 ^{d}

The values in a row followed by different letters are significantly different ($P < 0.01$) according to Dunkan test.

در پژوهشی مشابه باکتری *P. fluorescens* به میزان ۸۱ درصد پژمردگی باکتریایی لوبیا را مهار نموده است (Munene, 2023). همچنین اثربخشی باکتری *P. fluorescens* در پژوهش‌های Corrêa و همکاران (۲۰۱۴) علیه باکتری عامل بیماری پژمردگی باکتریایی در لوبیا اثبات گردیده است این پژوهشگران بیان داشته‌اند که فعالیت پروتئولیتیک[1]، کیتینولیتیک[2] و لیپولیتیک[3] و همچنین تولید آمونیاک توسط این باکتری باعث مهار باکتری *CFF* شده است. همچنین مطالعات Cochard و همکاران (۲۰۲۲) نشان داده‌اند که *P. fluorescens* می‌تواند از راه بذر و آوندهای گیاه تیمار شده به سایر قسمت‌های گیاه مخصوصاً قسمت‌های هوایی گیاهان مهاجرت کند. این باکتری هنگامی‌که به‌عنوان تیمار بذر و محلول‌پاشی استفاده می‌شود، قادر به زنده ماندن و تکثیر در ریزوسفر[4] و فیلوسفر[5] است که این ویژگی‌ها باعث پتانسیل بالای این باکتری در مهار بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا شده است (Munene, 2023).

باکتری *P. fluorescens* با فعال کردن ژن‌های دفاعی کد کننده کیتیناز، پراکسیداز و گلوکاناز موجب تولید فیتوالکسین در گیاه می‌شود، که درنتیجه افزایش بیان این ژن‌ها، باعث ایجاد مقاومت سیستمیک ناشی از گیاهان[6] در برابر بیمارگرهای گیاهی می‌شود (Nagarajkumar et al., 2004; Nur Mawaddah et al., 2023). لیپوپلی ساکاریدهای استخراج شده از غشای خارجی *P. fluorescens* باعث تولید فیتوالکسین‌ها، افزایش مقدار ترکیبات فنولیک، پروتئین‌های مرتبط با بیمارگرها و اسید سالیسیلیک شد که خود بیانگر نقش این عامل زیستی در ایجاد مقاومت سیستمیک در گیاه می‌باشد (Nur Mawaddah et al., 2023).

مطالعه حاضر مشخص نمود قارچ *T. harzianum* همانند باکتری *P. fluorescens* باعث محافظت گیاه در برابر باکتری *CFF* شده است و مقاومت نسبی در برابر این بیمارگر ایجاد نمود. قارچ *T. harzianum* با آزاد کردن ترکیبات درون‌سلولی مختلف از جمله تولید پپتیبول، زایلاناز، سراتوپلاتینین، نیتریلاز، ۱-آمینوسیکلوپروپن-۱-کربوکسیلیک اسید (ACC)[7] باعث بوجود آمدن مقاومت سیستمیک در گیاه بیمار می‌شود. این ترکیبات باعث ایجاد مقاومت در گیاه در برابر عوامل زنده و غیرزنده و افزایش بهره‌وری استفاده از نیتروژن و بهبود فتوسنتز می‌شود (Druzhinina et al., 2011). گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* sp. با تولید زیلاناز[8] باعث بوجود آمدن واکنش دفاعی در گیاه، با تولید ACC باعث مهار تشکیل اتیلن و درنتیجه منجر به افزایش رشد ریشه گیاه و با ترشح نیتروسلولاز باعث فعال شدن مکانیسم ایندول استیک اسید در گیاه می‌شود (Druzhinina et al., 2011).

1- Proteolytic
2- Chitinolytic
3- Lipolytic
4- Rhizosphere

5- Phyllosphere
6- Induced Systemic Resistance
7- 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid
8- Xylanase

جدول ۷- تأثیر عوامل آنتاگونیست روی شاخص‌های زمینی گیاه لوبیا سالم و آلوده به بیمارگر *CFF*

Table 7. The effect of antagonist agents on the ground parameters of uninfected & infected bean plant with *CFF* pathogen

	Treatment	Code	Root dry weight (gr)	Root fresh weight (gr)	Root length (cm)
Uninfected	Control	-A	1.61 [c]	3.70 [b]	25.50 [c]
	P. fluorescens	AP	2.03 [b]	4.21 [a]	30.50 [ab]
	T. harzianum	AT	1.72 [c]	4.10 [a]	28.50 [b]
	P. fluorescens+T. harzianum	ATP	2.22 [a]	4.33 [a]	31.60 [a]
Infected	Control	+A	0.55 [g]	2.13 [e]	16.00 [e]
	P. fluorescens	P+*CFF*	1.01 [e]	3.22 [c]	20.75 [d]
	T. harzianum	T+*CFF*	0.81 [f]	2.81 [d]	19.75 [d]
	P. fluorescens+T. harzianum	TP+*CFF*	1.21 [d]	3.23 [c]	22.00 [d]

The values in a row followed by different letters are significantly different ($P < 0.01$) according to Dunkan test.

از آنجایی که عوامل زیستی *P. fluorescens* و *T. harzianum* استفاده شده در این پژوهش دارای قابلیت محرک رشد و مهارکننده بیماری پژمردگی باکتریایی لوبیا می‌باشند، بنابراین استفاده از این عوامل زیستی میکروبی می‌تواند پتانسیل زیادی برای استفاده تجاری به‌عنوان عامل مهارکننده و کود زیستی داشته باشد و می‌توانند به‌عنوان عوامل مهارکننده زیستی بی‌خطر، مؤثر و بادوام در کشاورزی پایدار، در جهت کاهش وابستگی کشاورزی به آفت‌کش‌های شیمیایی و کودهای شیمیایی و ارتقای سلامت محیط‌زیست و حفظ میکروارگانیسم‌های مفید خاک در مهار بیماری پژمردگی باکتریایی و بهبود رشد گیاه لوبیا مورداستفاده قرار گیرند. بااین‌حال جهت تحقق این هدف، لازم است مطالعات بیشتری در زمینه کاربردهای میدانی و تجاری‌سازی این دو عامل میکروبی به‌عنوان عوامل مهار زیستی مؤثر و مفید، انجام شود.

سپاس‌گزاری

این پژوهش در گلخانه‌های تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی لرستان و همچنین با استفاده از امکانات کلینیک گیاه‌پزشکی مرکزی خرم‌آباد انجام پذیرفته است. لذا نگارندگان مقاله از حمایت‌های معنوی و امکانات فراهم‌شده توسط دانشگاه و مجموعه کلینیک تشکر و قدردانی به عمل می‌آورد.

References

Abassi, S., Safaie, N., Shamsbakhsh, M., & Shahbazi, S. (2014). Evaluation of antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* mutants against some plant pathogenic fungi in vitro. *Plant Protection Scientific Journal of Agriculture*, *37*(4), 91-102.

Akter, S., Kadir, J., Juraimi, A.S., Saud, H.M. & Elmahdi, S. (2014). Isolation & identification of antagonistic bacteria from phylloplane of rice as biocontrol agents for sheath blight. *Journal of Environmental Biology*, 35(6), 1095–1100.

Arwiyanto, T. (2014). Biological control of plant disease caused by bacteria. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, *18*(1), 1-12.

Bedine Boat, M. A., Sameza, M. L., Iacomi, B., Tchameni, S. N., & Boyom, F. F. (2020). Screening, identification and evaluation of *Trichoderma* spp. for biocontrol potential of common bean damping-off pathogens. *Biocontrol Science and Technology*, *30*(3), 228-242.

Belete, T., Bastas, K. K., Francesconi, S., & Balestra, G. M. (2021). Biological effectiveness of *Bacillus subtilis* on common bean bacterial blight. *Journal of Plant Pathology*, *103*, 249-258.

Cochard, B., Giroud, B., Crovadore, J., Chablais, R., Arminjon, L., Lefort, F. (2022). Endophytic PGPR from tomato roots: isolation, *in vitro* characterization & *in vivo* evaluation of treated tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.). *Microorganisms*, *10*(4), 765.

Commare, R. R., Nandakumar, R., Kandan, A., Suresh, S., Bharathi, M., Raguchander, T., & Samiyappan, R. (2002). *Pseudomonas fluorescens* based bio-formulation for the management of sheath blight disease and leaffolder insect in rice. *Crop Protection*, *21*(8), 671-677.

Corrêa, B. O., Schafer, J. T., Moura, A. B. (2014). Spectrum of biocontrol bacteria to control leaf root & vascular diseases of dry bean. *Biological Control*, *72*, 71–75.

Das, M. M., Aguilar, C. N., Haridas, M., & Sabu, A. (2021). Production of bio-fungicide, *Trichoderma harzianum* CH1 under solid-state fermentation using coffee husk. *Bioresource Technology Reports*, *15*, 100708.

Dhanya, M. K., & Mary, C. A. (2007). Management of bacterial blight of anthurium (*Anthurium andreanum* Linden.) using ecofriendly materials. *Journal of Tropical Agriculture*, *44*, 74-75.

Dönmez, M. F., & Aliyeva, Z. (2023). Biological Control of Bean Halo Blight Disease (*Pseudomonas savastanoi* Pv. *phaseolicola*) with Antagonist Bacterial Strains. *Gesunde Pflanzen*, *75*(4), 815-824.

Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., & Kubicek, C. P. (2011). Trichoderma: the genomics of opportunistic success. *Nature reviews microbiology*, *9*(10), 749-759.

Esmaili, M., & Maarefat, A. (2015). Identification of soil inhabiting bacteria in Qazvin province vineyards and investigation of their inhibitory effect on *Rhizobium vitis*, the causal agent of grape root and crown gall. *Plant Protection Scientific Journal of Agriculture*, *38*(1), 79-90.

Hsieh, T. F., Huang, H. C., & Erickson, R. S. (2005). Biological control of bacterial wilt of bean using a bacterial endophyte, *Pantoea agglomerans*. *Journal of Phytopathology*, *153*(10), 608-614.

Huang, H. C., Erickson, R. S., & Hsieh, T. F. (2007). Control of bacterial wilt of bean (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) by seed treatment with *Rhizobium leguminosarum*. *Crop Protection*, *26*(7), 1055-1061.

Kalita, P., Bora, L. C., & Bhagabati, K. N. (1996). Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. *Indian Phytopathology*, *49*(3), 234-237.

Kamel, S. M., Farag, F. M., Arafa, R. A., & Essa, T. A. (2020). Biocontrol potentials of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii* the causative of root and crown rot in tomato, common bean and cabbage. *Egyptian Journal of Phytopathology*, *48*(1), 122-136.

Karimi, E., Safaie, N., Shamsbakhsh, M., & Mahmoodi, S. B. (2015). Control of Seedling Damping-off Disease on Sugarbeet Caused by *Rhizoctonia solani* AG-2-2 by Endophytic Fungi and Resistance Inducer Compounds as Seed Treatment. *Plant Protection Scientific Journal of Agriculture*, *38*(4), 33-52.

Ketta, H. A., & Hewedy, O. A. E. R. (2021). Biological control of *Phaseolus vulgaris* and *Pisum sativum* root rot disease using *Trichoderma* species. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *31*, 1-9.

Khavari, H., & Shakarami, G. (2020). Response of yield and yield components of six genotypes of Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* L.) inoculation with *Rhizobium phaseoli*. *Iranian Journal Pulses Research*, *10*(2), 132-148.

Manoj, S. R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P. I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., & Rajkumar, M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced

phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of environmental management*, *254*, 109779.

Martins, S. J., de Medeiros, F. H. V., de Souza, R. M., de Resende, M. L. V., & Junior, P. M. R. (2013). Biological control of bacterial wilt of common bean by plant growth-promoting rhizobacteria. *Biological Control*, *66*(1), 65-71.

Mirzaei Najafgholi, H., Narimani, S., Aeini, M., Taghavi, S. M., Tarighi, S., & Javaheri, M. (2015). Investigation the performance and biological control of the various tomato cultivars against the bacterial wilt disease (*Ralstonia solanacearum*). *Biocontrol in Plant Protection*, *2*(2), 47-57.

Mokrani, S., Rai, A., Belabid, L., Cherif, A., Cherif, H., Mahjoubi, M., & Nabti, E. (2019). *Pseudomonas* diversity in western Algeria: role in the stimulation of bean germination and common bean blight biocontrol. *European Journal of Plant Pathology*, *153*, 397-415.

Munene, L. W. (2023). *Bacterial biological control agents in the management of bacterial wilt (curtobacterium Flaccumfaciens PV. Flaccumfaciens) in the common bean* (Doctoral dissertation, UoEm).

Munene, L., Mugweru, J., & Mwirichia, R. (2023). Management of bacterial wilt caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in common bean (*Phaseolus vulgaris*) using rhizobacterial biocontrol agents. *Letters in Applied Microbiology*, 76(1), ovac011.

Nagarajkumar, M., Bhaskaran, R. & Velazhahan, R. (2004). Involvement of secondary metabolites & extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiological Research*, 159(1), 73–81.

Nazvar, A., Mamarabadi, M., & Taheri, P. (2021). Biological control of sesame *Fusarium* wilt using *Trichoderma harzianum* in Khorasan Razavi province under in vitro and in vivo conditions. *Plant Protection Scientific Journal of Agriculture*, *44*(3), 11-28.

Nguyen, M. T., & Ranamukhaarachchi, S. L. (2010). Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato and pepper. *Journal of Plant Pathology*, 395-405.

Nur Mawaddah, S., AW, M. Z., & Sapak, Z. (2023). The potential of *Pseudomonas fluorescens* as biological control agent against sheath blight disease in rice: a systematic review. *Food Research*, 7(2), 46-56.

Nurfalah, A., Ayuningrum, N., Affandi, M. R., & Hastuti, L. D. S. (2019, July). Promoting growth of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by using trichoderma–compost–rice bran based biofertilizer. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 305, No. 1, p. 012074). IOP Publishing.

Osdaghi, E., Young, A. J., & Harveson, R. M. (2020). Bacterial wilt of dry beans caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*: A new threat from an old enemy. *Molecular plant pathology*, *21*(5), 605-621.

Pandey, D. K., Tripathi, N. N., Tripathi, R. D., & Dixit, S. N. (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of Hyptis suaveolens/Fungitoxische und phytotoxische Eigenschaften des ätherischen Öis von Hyptis suaveolens. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 344-349.

Paulitz, T. C., & Bélanger, R. R. (2001). Biological control in greenhouse systems. *Annual review of phytopathology*, *39*(1), 103-133.

Reino, J. L., Guerrero, R. F., Hernández-Galán, R., & Collado, I. G. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent Trichoderma. *Phytochemistry Reviews*, *7*, 89-123.

Sakthivel, N., & Mew, T. W. (1991). Efficacy of bacteriocinogenic strains of Xanthomonas oryzae pv. oryzae on the incidence of bacterial blight disease of rice (Oryza sativa L.). *Canadian journal of microbiology*, *37*(10), 764-768.

Singh, A., Bhardwaj, R., & Singh, I. K. (2019). Biocontrol agents: potential of bio pesticides for integrated pest management. *Biofertilizers for sustainable agriculture and environment*, 413-433.

Spago, F. R., Mauro, C. I., Oliveira, A. G., Beranger, J. P. O., Cely, M. V. T., Stanganelli, M. M., ... & Andrade, G. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. *Crop Protection*, *62*, 46-54.

Tariq, M., Noman, M., Ahmed, T., Hameed, A., Manzoor, N., & Zafar, M. (2017). Antagonistic features displayed by plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): a review. *J Plant Sci Phytopathol*, *1*(1), 038-43.

Tegli, S., Biancalani, C., Ignatov, A. N., & Osdaghi, E. (2020). A Powerful LAMP Weapon against the Threat of the Quarantine Plant Pathogen *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. *Microorganisms*, *8*(11), 1705.

Urrea, C. A., & Harveson, R. M. (2014). Identification of sources of bacterial wilt resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Plant Disease*, *98*(7), 973-976.

Vanneste, J. L. (Ed.). (2000). *Fire blight: the disease and its causative agent, Erwinia amylovora*. Cabi Publishing.

Wang, J., Andersen, S. U., & Ratet, P. (2018). Molecular and cellular mechanisms of the legume-rhizobia symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, *9*, 1839.

Watts, R., Dahiya, J., Chaudhary, K., & Tauro, P. (1988). Isolation and characterization of a new antifungal metabolite of Trichoderma reesei. *Plant and Soil*, *107*, 81-84.

Webster, D. M., Temple, S. R., & Galvez, G. (1983). Expression of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* under tropical conditions. *Plant Disease*, *67*(4), 394-396.

Wodzinski, R. S., Umholtz, T. E., Rundle, J. R., & Beer, S. V. (1994). Mechanisms of inhibition of *Erwinia amylovora* by Erw. herbicola in vitro and in vivo. *Journal of Applied Microbiology*, *76*(1), 22-29.

© 2024 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.