



Bacillus velezensis* and *Trichoderma harzianum* interactions in controlling Fusarium wilt of potatoes caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi

**Mohsen Bahra¹ , Hossein Saremi² , Mojtaba Moradzadeh Eskandari³ ,
Masoud Ahmadzadeh⁴ **

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: mohsen.bahra@ut.ac.ir
2. Corresponding Author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: hsn.saremi@ut.ac.ir
3. Plant Protection Research Department, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran. E-mail: mmeplantpathologist@gmail.com
4. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran. E-mail: ahmadz@ut.ac.ir

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	The biological control of Fusarium wilt in potato, caused by the soil-borne fungal pathogen <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tuberosi</i> (FOT), is essential for sustainable agriculture. Therefore, this study investigated the interaction between two beneficial microorganisms, the bacterium <i>Bacillus velezensis</i> UTB96 and the fungus <i>Trichoderma harzianum</i> T22, in suppressing Fusarium wilt of potato under in vitro and in vivo conditions. A completely randomized design was employed to ensure robust, reliable results. In vitro, the combined treatment of <i>B. velezensis</i> UTB96 and <i>T. harzianum</i> T22 inhibited the pathogen's growth by 77.73%, whereas <i>B. velezensis</i> UTB96 and <i>T. harzianum</i> T22 alone reduced growth by 40.12% and 70.12%, respectively. In greenhouse conditions, the combined application of <i>B. velezensis</i> UTB96 and <i>T. harzianum</i> T22 outperformed the individual treatments in controlling Fusarium wilt. The <i>B. velezensis</i> UTB96 + <i>T. harzianum</i> T22 combination reduced disease incidence by 76.75% and significantly enhanced plant height as well as fresh and dry biomass of various potato organs. By comparison, the individual treatments reduced disease incidence by 62.3% (<i>B. velezensis</i> UTB96 alone) and 57.5% (<i>T. harzianum</i> T22 alone). Thus, although each isolate of <i>B. velezensis</i> and <i>T. harzianum</i> partially controls Fusarium wilt, their combined application was more effective in suppressing the disease in potato.
Article history: Received: 11 April 2025 Revised: 10 May 2025 Accepted: 31 May 2025 Published online: Spring and Summer 2025	
Keywords: <i>Bacillus</i> , <i>Biological Control</i> , <i>Synergistic</i> , <i>Trichoderma</i> .	
Cite this article: Bahra, M., Saremi, H., Joradzadeh Eskandari, M. & Ahmadzadeh, M. (2025). <i>Bacillus velezensis</i> and <i>Trichoderma harzianum</i> interactions in controlling Fusarium wilt of potatoes caused by <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Tuberosi</i> . <i>Iranian Journal of Plant Protection Science</i> , 56 (1), 103-120. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.402124.1007092	
	
© The Author(s). DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.402124.1007092	Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

Potato is among the world's most important crops, and Fusarium wilt causes substantial annual losses. Various management strategies are employed to control the disease and mitigate its impacts. Among these, biological control using beneficial microorganisms has long attracted attention.. In recent years, the combination of *Bacillus* and *Trichoderma* has emerged as a promising approach for plant disease management, with multiple studies reporting synergistic effects from the concurrent application of these two agents. This study evaluated the effectiveness of the combined use of *Bacillus velezensis* strain UTB96 and *Trichoderma harzianum* strain T22, in comparison with their individual application, for controlling Fusarium wilt in potato.

Materials and methods

Fungal isolates FOT and *Trichoderma harzianum* T22 were obtained from the plant pathology collection at the Khorasan Razavi Agricultural Research Center. The bacterium *Bacillus velezensis* (Probio96, Biorun Co.) was cultured and purified for experimental use. Compatibility between *T. harzianum* and *B. velezensis* was evaluated via dual culture on potato dextrose agar (PDA). Antagonistic activity against the pathogen was assessed using in vitro dual culture and volatile metabolite assays, arranged in a completely randomized design with four replications. The radial growth inhibition of FOT was calculated as described below.

For greenhouse experiments, FOT inoculum was prepared on sterilized wheat and incubated for four weeks. *T. harzianum* T22 spore suspension (10^6 spores/mL) was prepared in PDB, and *B. velezensis* UTB96 was applied as a commercial formulation (10^8 cfu/mL). The potato cultivar Agria was planted in sterilized soil inoculated with FOT at a rate of 14 g/kg soil. Treatments included individual and combined applications of the biocontrol agents. Plants were maintained under greenhouse conditions at 24°C. At 75 days after planting, growth parameters were recorded, including plant height and fresh and dry weights of roots, stems, and leaves. Data were analyzed with SPSS, and means were compared using Duncan's multiple range test at 1% significance.

Results and discussion

The compatibility test showed no antagonism between *Bacillus velezensis* UTB96 and *Trichoderma harzianum* T22, confirming their suitability for combined use. In dual culture assays, the *B. velezensis* UTB96 + *T. harzianum* T22 combination significantly reduced FOT mycelial growth by 77.73%, greater than either *B. velezensis* UTB96 alone (40.12%) or *T. harzianum* T22 alone (70.12%). Volatile metabolite assays likewise demonstrated the highest antifungal activity for the combined treatment, indicating a synergistic effect. All biological and chemical treatments significantly reduced Fusarium wilt severity in greenhouse conditions compared with the control. The combined application of *B. velezensis* + *T. harzianum* achieved the greatest disease suppression (76.75%) and improved plant growth parameters. Among individual treatments, *T. harzianum* T22 performed better than *B. velezensis* UTB96 in reducing disease severity. Significant differences ($p < 0.01$) were observed among treatments for plant height, and fresh and dry weights of roots, stems, and leaves.

Overall, the combined application of the biocontrol agents yielded the most favorable outcomes, reducing Fusarium wilt while simultaneously enhancing plant growth under greenhouse conditions. The results align with prior work showing that consortia of microbial biocontrol agents can outperform single organisms (synergistic effects). For example, *Bacillus subtilis* V26 reduced Fusarium wilt in potato under greenhouse conditions (Khedher et al., 2021). Across studies, *Trichoderma harzianum* has reduced disease severity by approximately 54.8%–60.8%, supporting the present findings, and has been reported to control up to 65% of disease in greenhouse settings (Bibi et al., 2024). Collectively, these findings underscore the potential of microbial agents such as *T. harzianum* and *B. velezensis* as sustainable alternatives to chemical controls. In conclusion, integrating biological agents appears to be an effective strategy for managing potato Fusarium wilt in greenhouse environments.

Conclusion

The combined application of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus velezensis* can serve as an effective strategy for deploying biological control agents to manage Fusarium wilt of potato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* at the field level. This combination demonstrated superior efficacy not only under greenhouse conditions but also in laboratory assays compared with individual treatments. The concurrent use of *T. harzianum* and *B. velezensis* led to increased seedling height and enhanced fresh and dry biomass relative to the control. Based on the results obtained, the combined use of *T. harzianum* and *B. velezensis* is recommended for managing Fusarium wilt in potato.

Author Contributions

Mohsen Bahra: Software, Formal analysis, Data curation, Sampling, Extraction and Writing-original draft; **Hossein Saremi:** Supervision for real samples, planning, Investigation, Validation, Writing-original draft; **Mojtaba Moradzadeh Eskandari:** Methodology, Data curation, Investigation, Validation; **Masoud Ahmadzadeh:** Methodology, Formal analysis, Validation. All authors have read and approved the published version of the manuscript.

Data availability statement

Data will be available upon request.

Acknowledgements

The authors greatly thank the Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP) to provide the necessary facilities and equipment.

Ethical considerations

Not applicable.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.



تعامل *Trichoderma harzianum* و *Bacillus velezensis* برای کنترل پژمردگی *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* از سیبزمینی ناشی از

محسن بهرا^۱ | حسین صارمی^۲ | مجتبی مرادزاده اسکندری^۳ | مسعود احمدزاده^۴

۱. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: mohsen.bahra@ut.ac.ir
۲. نویسنده مسئول، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: hsn.saremi@ut.ac.ir
۳. بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران. رایانامه: mmeplantpathologist@gmail.com
۴. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران. رایانامه: ahmadz@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۲۲ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۱۰ تاریخ انتشار: بهار و تابستان ۱۴۰۴ کلیدواژه‌ها: باسیلوس، تریکودرما، کنترل بیولوژیک، هم‌افزایی.	امروزه کنترل بیولوژیک بیماری پژمردگی فوزاریومی سیبزمینی ناشی از قارچ <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tuberosi</i> بسیار حائز اهمیت است. بنابراین پژوهش حاضر با هدف بررسی تعامل باکتری <i>Bacillus velezensis</i> UTB96 و قارچ <i>Trichoderma harzianum</i> T22 برای کنترل پژمردگی فوزاریومی سیبزمینی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه، در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نتایج نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی میزان مهار رشد قارچ عامل بیماری در تیمار ترکیبی <i>T. harzianum</i> T22 + <i>B. velezensis</i> UTB96 به ۷۷/۷۳ درصد رسید، درحالی که در تیمارهای انفرادی، <i>B. velezensis</i> UTB96 و <i>T. harzianum</i> T22 به ترتیب به میزان ۴۰/۱۲ و ۷۰/۱۲ درصد توانستند باعث مهار رشد قارچ شوند. در شرایط گلخانه نیز کارایی استفاده همزمان این دو میکروارگانیسم بهتر از تیمارهای انفرادی بود به طوری که ترکیب <i>B. velezensis</i> UTB96 + <i>T. harzianum</i> T22 توانست بیماری پژمردگی فوزاریومی سیبزمینی را به میزان ۷۶/۷۵ درصد کنترل کند و باعث افزایش ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام‌های مختلف گیاه سیبزمینی شود. در صورتی که <i>B. velezensis</i> UTB96 به تنهایی ۶۲/۳ درصد و <i>T. harzianum</i> T22 به تنهایی ۵۷/۵ درصد توانستند باعث مهار بیماری شوند. بنابراین، همان‌طور که جدایه‌های <i>B. velezensis</i> UTB96 و <i>T. harzianum</i> T22 به تنهایی قادر به کنترل نسبی بیماری می‌باشند؛ این پژوهش نشان داد که کاربرد ترکیبی قارچ <i>T. harzianum</i> و باکتری <i>B. velezensis</i>، تاثیر بهتری در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی سیبزمینی داشت.
استناد: بهرا، محسن؛ صارمی، حسین؛ مرادزاده اسکندری، مجتبی و احمدزاده، مسعود (۱۴۰۴). تعامل <i>Bacillus velezensis</i> و <i>Trichoderma harzianum</i> برای کنترل پژمردگی فوزاریومی سیبزمینی ناشی از <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>tuberosi</i> نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، ۵۶ (۱)، ۱۰۳-۱۲۰. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.402124.1007092	© نویسندگان. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2025.402124.1007092



مقدمه

گیاه سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) در برابر تعدادی از عوامل بیماری‌زا حساس می‌باشد. بالغ بر ۹۰ بیماری اعم از قارچی، باکتریایی، ویروسی، نماتدی، فیتوپلاسمایی و فیزیولوژیک برای این گیاه معرفی شده است که در این بین یکی از مهمترین عوامل بیماری‌زا، قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* (FOT) می‌باشد (Rich, 1983). پژمردگی فوزاریومی ناشی از FOT بیشتر در اواسط فصل رشد روی بوته سیب‌زمینی ظهور می‌یابد. علائم بیماری به صورت پژمردگی سریع و خشک شدن بوته‌ها قبل از موعد است. در اثر آلودگی بوته به این بیماری، زردی برگ‌ها از پایین بوته شروع و به تدریج به قسمت‌های بالایی پیشروی می‌کند. آوندهای چوبی در ریشه، ساقه و به‌ویژه در طوقه تغییر رنگ می‌دهد و به رنگ قهوه‌ای در می‌آیند (الهی نیا، ۱۳۹۳). علائم پژمردگی آوندی فوزاریومی شامل خمش دم‌برگ همراه با کوتولگی، زردی برگ‌های پایینی، پژمردگی شدید و در پایان مرگ گیاه است (Michielse & Rep, 2009).

باتوجه به اهمیت این محصول در دنیا و خسارت قابل توجهی که از سوی قارچ FOT بر آن وارد می‌شود، تدابیر مدیریتی مختلفی جهت کنترل بیماری و کاهش خسارت ناشی از آن حائز اهمیت است. یکی از اقدامات مهم که در زمینه کنترل بیماری‌ها از گذشته تاکنون مورد توجه محققین بوده است، استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک در مسیر کاهش خسارت بیماری‌های گیاهی است. امکان کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای خاکری با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست بیش از ۹۰ سال است که مورد توجه محققین قرار گرفته است (Slininger et al., 2003).

باکتری *Bacillus subtilis* یکی از بهترین و پرکاربردترین باکتری‌ها در کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی می‌باشد (Ongena & Jacques, 2008). این باکتری همراه با دیگر گونه‌های باسیلوس، ماده موثره حدود نیمی از آفت‌کش‌های زیستی تجاری سازی شده در دنیا را به خود اختصاص داده است (Fravel, 2005). باکتری *B. velezensis* می‌تواند با استقرار در محیط ریشه، به صورت رقابتی جایگاه و مواد مغذی را از بیمارگرها تصاحب کند و همچنین با القای مقاومت سیستمیک در گیاه، میزبان را در برابر بیماری‌ها مقاوم‌تر کند (Kenfaoui et al., 2024). علاوه بر گونه‌های آنتاگونیست باسیلوس، یک گروه از قارچ‌های مهم که از عوامل کنترل بیولوژیک علیه قارچ‌های بیماری‌زا محسوب می‌شود، گونه‌های *Trichoderma* هستند (Katatny et al., 2001). گونه‌های تریکودرما از میکروارگانیسم‌های شناخته شده‌ای هستند که معمولاً در قالب عوامل میکروبی کنترل بیولوژیک در کشاورزی استفاده می‌شوند. این موضوع، به دلیل توانایی آنها در محافظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا، افزایش رشد رویشی و حفظ جمعیت بیمارگر زیر آستانه خسارت اقتصادی و همچنین به عنوان اصلاح کننده خاک برای بهبود تغذیه گیاهان عمل می‌کند. ویژگی‌های مثبت گونه‌های تریکودرما باعث شده که ترکیبات زیستی بر پایه این قارچ در بازار کشاورزی دنیا، نه تنها به عنوان یک قارچ‌کش بیولوژیک علیه بیمارگرهای گیاهی، بلکه به عنوان یک زاد مایه زیستی که باعث القاء مقاومت گیاهان به تنش‌های زنده و یا غیرزنده می‌شود، شناخته شود (Abdel-lateif, 2017).

ترکیب *Bacillus* و *Trichoderma* در سال‌های اخیر به عنوان یک روش موثر برای کنترل بیماری‌های گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته است. بررسی‌های متعدد نشان داده است که استفاده همزمان از این دو ترکیب بیولوژیک، می‌تواند تأثیرات هم‌افزایی در کاهش اثرات مخرب بیماری‌های گیاهی داشته باشد و همچنین باعث افزایش عملکرد گیاهان شود (Poveda & Eugui, 2022).

این تحقیق با هدف ارزیابی تأثیر ترکیب سویه *B. velezensis* UTB96 و سویه *T. harzianum* T22 در مقایسه با استفاده منفرد هریک از آنها برای کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب‌زمینی انجام شد.

پیشینه پژوهش

پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که تعاملات بین گونه‌ای میان قارچ‌ها و باکتری‌ها، به‌ویژه بین تریکودرما و باسیلوس، نقش مهمی در کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی دارند. این هم‌افزایی می‌تواند علاوه بر مهار مستقیم بیمارگرها، موجب تحریک

سیستم دفاعی گیاه و بهبود رشد شود. با این حال، شواهد بیانگر آن است که موفقیت این ترکیب وابسته به انتخاب سویه‌های سازگار و پایدار است و مطالعات بیشتری برای تعیین مکانیسم‌های خاص این هم‌افزایی در برخی از تحقیقات مورد نیاز است (Din et al., 2025; Poveda & Eugui, 2022).

در تحقیقی شش جدایه از *Trichoderma* و سه جدایه از باکتری *Bacillus subtilis* در شرایط آزمایشگاه به صورت استفاده جداگانه و ترکیبی، برای افزایش رشد گیاه لوبیا و همچنین میزان کنترل بیماری بوته میری خیار با عامل *Rhizoctonia solani* مورد بررسی قرار گرفت. تمامی جدایه‌های قارچی و باکتریایی به عنوان تیمار بذر در مطالعات گلخانه‌ای استفاده شدند. آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان داد که مایه‌زنی ترکیبی *Trichoderma atroviride* strain 6 و *B. subtilis* B69 بیشترین افزایش رشد لوبیا را از نظر زیست توده خشک گیاهچه (۴۳ درصد نسبت به شاهد مایه‌زنی نشده) داشت. در آزمایش‌های کنترل بیولوژیک، استفاده توأم *Trichoderma* و *B. subtilis* نسبت به استفاده *Trichoderma* به صورت جداگانه توانست میزان بیشتری بیماری بوته میری خیار را کنترل کند. در انتها، نتایج نشان داد که ظرفیت استفاده از مخلوط تریکودرما و باسیلوس برای بهبود رشد گیاهان و کنترل بیمارگرهای گیاهی وجود دارد (Yobo et al., 2011).

در ایران ۶۸۰ باکتری متعلق به *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Rhizobium* از خاک مزرعه‌های استان زنجان جداسازی شد. از این تعداد، ۲۰۰ جدایه به عنوان نماینده از نظر بیوشیمیایی مشخص شدند و در شرایط آزمایشگاهی برای مهار رشد میسلیم *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* مورد غربالگری قرار گرفتند. ۱۶ جدایه از ریزوباکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی توانستند به شدت رشد قارچ عامل بیماری را کنترل کنند. از این تعداد پنج ریزوباکتری برای سرکوب بیماری و افزایش رشد گیاه در شرایط گلخانه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفتند. مایه‌زنی ترکیب ریزوباکترها باعث افزایش بیشتر در سرکوب بیماری، وزن ماده خشک و تر گیاه (بخش هوایی و ریشه)، ارتفاع بوته و تعداد غلاف در بوته نسبت به تیمار شاهد شد. در آخر آن‌ها به این نتیجه رسیدند که کنترل این بیماری با ترکیب ریزوباکترها می‌تواند نسبت به استفاده منفرد آنها موثرتر باشد (Kalantari et al., 2018).

همچنین در پژوهشی، اثرات آنتاگونیستی دو جدایه *B. subtilis* MF352017 (Bs1) و *T. harzianum* KX523899 (T5) جدا شده از ریزوسفر نخود، به طور جداگانه و به صورت ترکیبی برای اثربخشی آن‌ها در کنترل پژمردگی فوزاریومی نخود مورد بررسی قرار گرفت. بذر مال با *B. subtilis* MF352017 (Bs1) و *T. harzianum* (T5) به طور قابل توجهی از نشاء نخود در برابر *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* در مقایسه با گیاهان تیمار نشده محافظت کردند. حفاظت از گیاه در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* بیشتر از گیاهان تیمار شده با *B. subtilis* بود. استفاده از هر دو عامل بیولوژیک به طور موثر ۹۳/۶۷ درصد از بیماری را سرکوب کرد و همچنین رشد گیاه را بهبود بخشید که منجر به افزایش ارتفاع بوته، طول ریشه، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه شد. مخلوط آنتاگونیست‌ها اثربخشی جدایه *B. subtilis* MF352017 (Bs1) را بر پژمردگی فوزاریومی نخود افزایش داد و باعث افزایش رشد گیاهان نخود شد (Zaim et al., 2018).

نتایج مطالعه‌ای دیگر نشان داد که استفاده همزمان از *T. virens* Gl006 و *B. velezensis* Bs006 توانست به صورت هم‌افزا جمعیت قارچ بیماری‌زای *Fusarium oxysporum* f. sp. *physalis* را در خاک کاهش دهد و مقاومت گیاه توت طلایی (*Physalis peruviana*) را در برابر بیماری پژمردگی فوزاریومی القا کند. جدایه Bs006 بیشتر از طریق القای مقاومت سیستمیک و تولید ترکیبات لیپوپپتیدی عمل می‌کند، در حالی که جدایه Gl006 با سازوکارهای غیرمستقیم و تشریح آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره‌ی سلولی نقش دارد. ترکیب این دو عامل موجب تقویت اثرات مستقیم و غیرمستقیم کنترل بیماری شد و کارایی آن‌ها در کاهش تراکم قارچ عامل بیماری در خاک افزایش یافت. در انتها به این نتیجه رسیدند که استفاده همزمان از این میکروارگانیسم‌ها می‌تواند راهکاری پایدار و زیست‌سازگار برای مدیریت پژمردگی فوزاریومی در کشت توت طلایی باشد (Izquierdo-García & Moreno-Velandia, 2024).

روش‌شناسی پژوهش

تهیه جدایه‌های قارچی و باکتریایی

جدایه *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* strain13 از کلکسیون بخش گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی تهیه شد (قلعه‌دزدانی و همکاران، ۱۳۸۲). همچنین، سویه *Trichoderma harzianum* T22 به صورت فرم تجاری به نام Trianum-P ساخت شرکت کوپرت هلند تهیه شد که برای اطمینان از خلوص جدایه، فرایند تک اسپور انجام گرفت. جدایه باکتری *Bacillus velezensis* UTB96 نیز به صورت فرم تجاری با نام Probio 96 ساخت شرکت بایوران تهیه شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن روی محیط کشت Nutrient agar پخش شد و پس از ظهور پرگنه‌ها، تک پرگنه خالص از آن تهیه و برای استفاده‌های آتی، ذخیره شد.

بررسی سازگاری بین عوامل بیوکنترل

به منظور بررسی سازگاری بین جدایه قارچ تریکودرما و باکتری باسیلوس، از تکنیک کشت دوطرفه^۱ استفاده شد. برای این منظور، از تشتک پتری‌هایی با قطر ۱۰ سانتی‌متر حاوی محیط کشت PDA استفاده شد. در یک طرف تشتک پتری به فاصله یک سانتی‌متر از لبه، دیسک پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه جدایه قارچ تریکودرما و در مقابل آن ۱۰۰ میکرولیتر باکتری باسیلوس با غلظت 10^8 cfu/ml به فاصله یک سانتی‌متر از لبه تشتک پتری به صورت خطی^۲ قرار داده شد، سپس تشتک‌ها درون انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت یک هفته نگهداری شدند (Singh et al., 2021).

بررسی اثر آنتاگونیستی به صورت کشت متقابل

قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما و باسیلوس و ترکیب آنها در مقابل قارچ عامل بیماری به صورت کشت همزمان مورد ارزیابی قرار گرفت (Montealegre et al., 2003). ابتدا در فاصله یک سانتی‌متری از لبه تشتک پتری یک قرص پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* strain13 قرار داده شد. در طرف مقابل نیز قرص پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه تریکودرما و در تیمار دیگر سوسپانسیون باکتری به صورت خطی و تیمار سوم قرص قارچ FOT در کنار سوسپانسیون خطی باکتری قرار گرفت. در تیمار شاهد نیز آب مقطر سترون به جای عوامل بیوکنترل قرار گرفت. تمام تیمارها (شامل *T. harzianum* T22 + *B. velezensis* UTB96، *B. velezensis* UTB96، *T. harzianum* T22 و آب مقطر سترون) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار تحت دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد و زمانی که تیمار شاهد تمام تشتک پتری را فراگرفت، میزان رشد شعاعی قارچ FOT اندازه‌گیری و درصد رشد میسلیم با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Anupama et al., 2015):

$$\text{رشد شعاعی بیمارگر در تیمار حاوی بیمارگر و آنتاگونیست - رشد شعاعی بیمارگر در تیمار شاهد} \times 100 = \frac{\text{رشد شعاعی بیمارگر در تیمار حاوی بیمارگر و آنتاگونیست - رشد شعاعی بیمارگر در تیمار شاهد}}{\text{رشد شعاعی بیمارگر در تیمار حاوی بیمارگر و آنتاگونیست - رشد شعاعی بیمارگر در تیمار شاهد}} \times 100$$

بررسی اثر متابولیت‌های فرار در کاهش رشد میسلیم قارچ FOT

آزمون مربوطه بر اساس روش دنیس و وبستر (Dennis & Webster, 1971) با کمی تغییر انجام گرفت. در این آزمون چهار تیمار در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار در نظر گرفته شد (جدول ۱).

^۱ Dual culture

^۲ Streak

جدول ۱. محیط‌های کشت استفاده شده برای تیمارهای آزمون بررسی اثر ترکیبات فرار ضد قارچی.

تیمار	محیط کشت
<i>Trichoderma harzianum</i>	PDA
<i>Bacillus velezensis</i>	Nutrient agar
<i>Trichoderma harzianum</i> + <i>Bacillus velezensis</i>	PDA
شاهد (آب مقطر سترون)	PDA

برای قارچ تریکودرما یک قرص ۱۰ میلی متری از کشت هفت روزه استفاده شد. همچنین تیمار باکتری به صورت خطی کشت شد و برای تیمار شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد که در وسط تشتک پتری دارای محیط کشت ذکر شده در (جدول ۱) کشت شد و برای مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از آن روی تشتک پتری دیگری که دارای محیط کشت PDA بود، قارچ عامل بیماری کشت شد. در شرایط سترون دو تشتک پتری به صورتی روی یکدیگر قرار گرفتند که تشتک پتری دارای قرص قارچ عامل بیماری در بالا و تشتک پتری حاوی آنتاگونیست یا شاهد در پایین قرار گرفت، سپس اطراف تشتک پتری‌ها به خوبی مسدود شدند تا ارتباط دو تشتک پتری با محیط بیرون کاملاً قطع شده و از خروج ترکیبات فرار جلوگیری شود. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند و زمانی که در شاهد، قارچ بیمارگر تمام تشتک پتری را فرا گرفت درصد بازدارندگی از رشد میسلیم با توجه به رابطه زیر محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{رشد شعاعی بیمارگر در تیمار حاوی بیمارگر و آنتاگونیست} - \text{رشد شعاعی بیمارگر در تیمار شاهد}}{\text{رشد شعاعی بیمارگر در تیمار شاهد}} = \text{درصد بازدارندگی رشد شعاعی بیمارگر}$$

تهیه ماده تلقیح قارچ FOT

برای آماده سازی ماده تلقیح قارچ FOT، به هر ظرف ارلن ۵۰۰ میلی لیتری درب دار مقدار ۱۰۰ گرم گندم و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر سترون اضافه شد و برای مدت زمان یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس برای ۳ روز متوالی اتوکلاو شد. پس از سرد شدن ۵ تا ۷ قرص از کشت یک هفته‌ای فوزاریوم در هر ظرف ارلن ریخته شد و ۴ هفته در دمای ۲۴ درجه سلسیوس قرار گرفت و هر روز هم زده شد (Ommati & Zaker, 2012).

تهیه غلظت مشخص قارچ تریکودرما

برای تهیه غلظت مشخصی از *T. harzianum* T22، از کشت یک هفته‌ای قارچ، تعداد ۴ قرص ۵ میلی متری جدا شد و به ظروف ارلن دارای محیط کشت PDB انتقال یافت و سپس به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در انکوباتور لرزاننده قرار گرفت. پس از گذشت این مدت، سوسپانسیون اسپور از پارچه ملل سترون عبور داده شد و به وسیله لام هموسیتمتر جمعیت اسپورها در غلظت 10^6 اسپور در میلی لیتر تنظیم شد (Sahebani & Hadavi, 2008).

مایه تلقیح باسیلوس

با توجه به منشأ جدایه باکتری *B. velezensis* UTB96، برای آزمایشات گلخانه‌ای از فرم تجاری این باکتری با نام probio96 با غلظت 10^8 cfu/ml، استفاده شد.

اثر ترکیب باسیلوس و تریکودرما در کنترل FOT در گلخانه

برای انجام مطالعات گلخانه‌ای، در تمام آزمایش‌ها از سیبزمینی رقم آگria که از حساسیت بالایی به این بیماری برخوردار است، استفاده شد و گلدان‌هایی به قطر دهانه ۲۰ سانتی متر انتخاب و با خاک سترون (مخلوط خاک رس، شن و پیت ماس به نسبت برابر) پر شدند و با توجه به تهیه ماده تلقیح فوزاریوم در مراحل قبل، مقدار ۱۴ گرم گندم آلوده به ازای هر یک کیلوگرم خاک به گلدان‌ها افزوده شد و پس از آن غده‌های سیبزمینی جوانه زده در آن‌ها کاشته شد و در اتاقک گلخانه با دمای ۲۴

درجه سلسیوس نگهداری شدند (Ommati et al., 2012). پس از ۱۴ روز، تیمار تریکودرما با استفاده از ۱۰۰ میلی لیتر سوسپانسیون قارچ *T. harzianum* T22 با غلظت ۱۰^۶ اسپور در میلی لیتر آبیاری شد. تیمار باسیلوس نیز با ۱۰۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری *B. velezensis* UTB96 با غلظت ۱۰^۸ cfu/ml آبیاری شد. در تیمار ترکیبی، از محلولی شامل ۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون *T. harzianum* T22 و ۵۰ میلی لیتر سوسپانسیون *B. velezensis* UTB96 با غلظت‌های نامبرده استفاده شد. همچنین تیمار قارچ کش شیمیایی با محلول قارچ کش رورال تی اس (Roral TS) به نسبت ۰/۱ گرم در ۱۰۰ میلی لیتر، آبیاری شد و در نهایت برای تیمار شاهد به تنهایی از ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استفاده شد. هفتاد و پنج روز پس از کاشت گیاهان، به منظور اندازه گیری وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ و همچنین ارتفاع، ابتدا گیاهان هر گلدان به آرامی از درون خاک خارج شدند و سپس خاک اطراف ریشه‌ها زیر جریان آرام آب شیر شسته شدند. سپس گیاهان از محل طوقه بریده شدند و ریشه، ساقه و برگ به صورت جداگانه به وسیله ترازوی دیجیتالی به دقت ۰/۰۱ گرم توزین گردید. پس از آن به منظور تعیین وزن خشک، تک تک بوته‌ها با ذکر مشخصات برای مدت یک هفته در محیط قرار گرفتند و سپس جهت خشک شدن کامل نمونه‌ها داخل آون با دمای ۷۵ درجه سلسیوس به مدت ۳ روز قرار گرفتند و پس از خشک شدن کامل مجدداً به طور جداگانه با ترازوی دیجیتالی توزین و وزن آن‌ها یادداشت برداری شد. شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی، ۷۵ روز پس از کاشت، بر اساس شدت آسیب برگی ارزیابی شد. شاخص آسیب برگ (LDI) با استفاده از مقیاس ۰-۴ ثبت شد که در آن ۰ = برگ‌های بدون علامت، ۱ = برگ‌های پژمرده، ۲ = برگ‌های دارای زردی یک طرفه، ۳ = برگ‌های دارای نکرز یک طرفه و ۴ = برگ‌های مرده مورد ارزیابی قرار گرفت (Manici and Cerato, 1994). این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و گروه‌بندی تیمارها با آزمون دانکن در سطح ۱ درصد انجام گردید.

یافته‌های پژوهشی

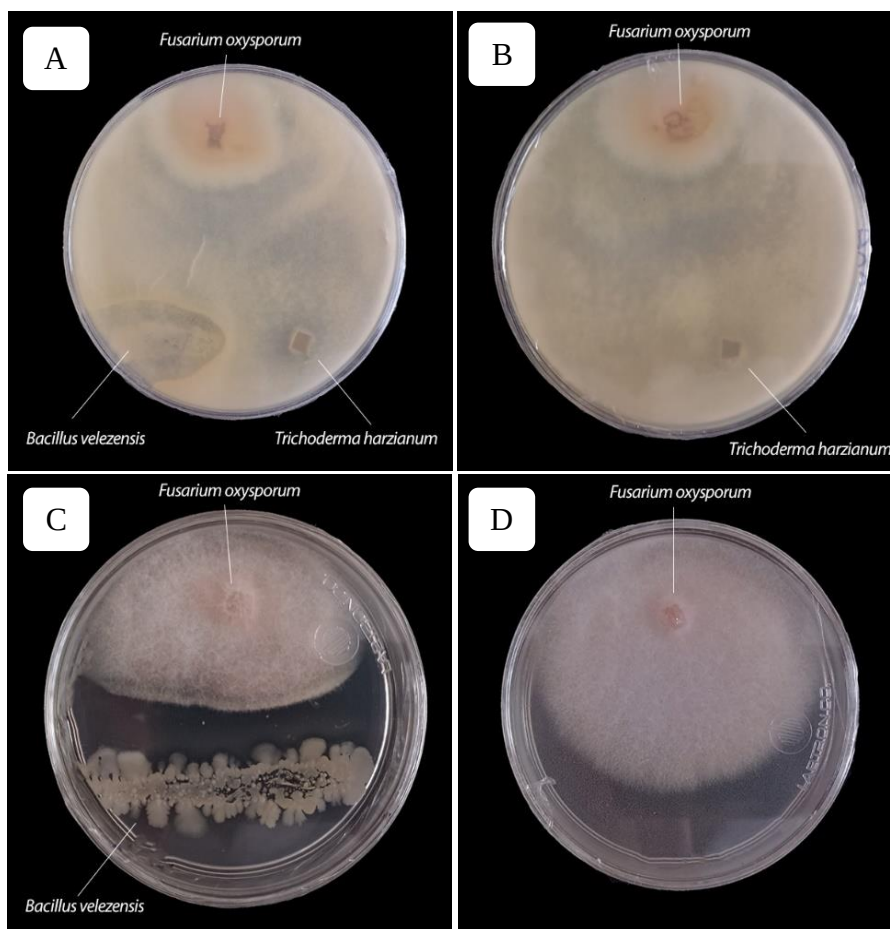
سازگاری جدایه‌های *B. velezensis* UTB96 و *T. harzianum* T22

بررسی میزان هاله بازدارنده در آزمون کشت متقابل جدایه‌ی تریکودرما با جدایه‌ی باسیلوس نشان داد که هاله بازدارنده قابل مشاهده و اندازه‌گیری در برهمکنش این جدایه‌ها تشکیل نشد. در این آزمایش مشخص شد که میسلیم‌های جدایه‌ی تریکودرما در نقطه تلاقی با جدایه باسیلوس به صورت سالم می‌باشند و روی پرگنه‌های باکتری به رشد خود ادامه می‌دهند. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که جدایه *B. velezensis* UTB96 با جدایه *T. harzianum* T22 سازگاری دارند.

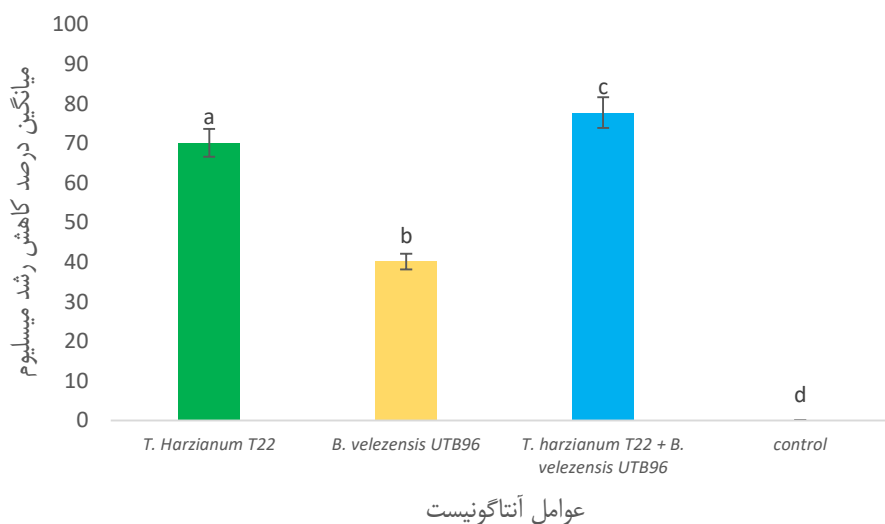
اثر عوامل بیوکنترل بر رشد میسلیم قارچ FOT در آزمایشگاه

شکل ۱ نتایج آزمون کشت متقابل بین عوامل بیوکنترل و قارچ عامل بیماری را نشان می‌دهد. در تیمارهای مختلف، رشد میسلیم قارچ *F. oxysporum* f. sp. *tuberosi* strain13 در مجاورت با *T. harzianum* T22 و *B. velezensis* UTB96 به‌طور محسوسی کاهش یافت. در تیمار ترکیبی (شکل ۱ A) رشد قارچ بیشترین مهار را نشان داد، در حالی که در تیمارهای انفرادی (شکل ۱ B و C) میزان بازدارندگی کمتر بود و در تیمار شاهد (شکل ۱ D) رشد کامل میسلیم مشاهده شد. این نتایج بیانگر اثر هم‌افزایی استفاده ترکیبی از دو عامل بیوکنترل برای مهار رشد قارچ عامل بیماری است.

نتایج حاصل از این آزمایش (شکل ۲) نشان می‌دهد که عوامل آنتاگونیست اثر معنی داری روی کاهش رشد میسلیم قارچ عامل بیماری داشتند و بین تیمارها اختلاف معنی داری در سطح ۱ درصد وجود داشت. تیمار *T. harzianum* T22 + *B. velezensis* UTB96 با ۷۷/۷۳ درصد کاهش رشد بیشترین و تیمار *B. velezensis* UTB96 با ۴۰/۱۲ درصد کاهش رشد کمترین تاثیر را بر رشد میسلیم قارچ FOT داشت.



شکل ۱. آزمون کشت متقابل به صورتی که قارچ *F. oxysporum* f. sp. *tuberosi* strain 13 در مقابل عامل یا عوامل بیوکنترل قرار گرفته است. (A) در مقابل *T. harzianum* T22 + *B. velezensis* UTB96، (B) در مقابل *T. harzianum* T22، (C) در مقابل *B. velezensis* UTB96، (D) FOT به تنهایی (شاهد).

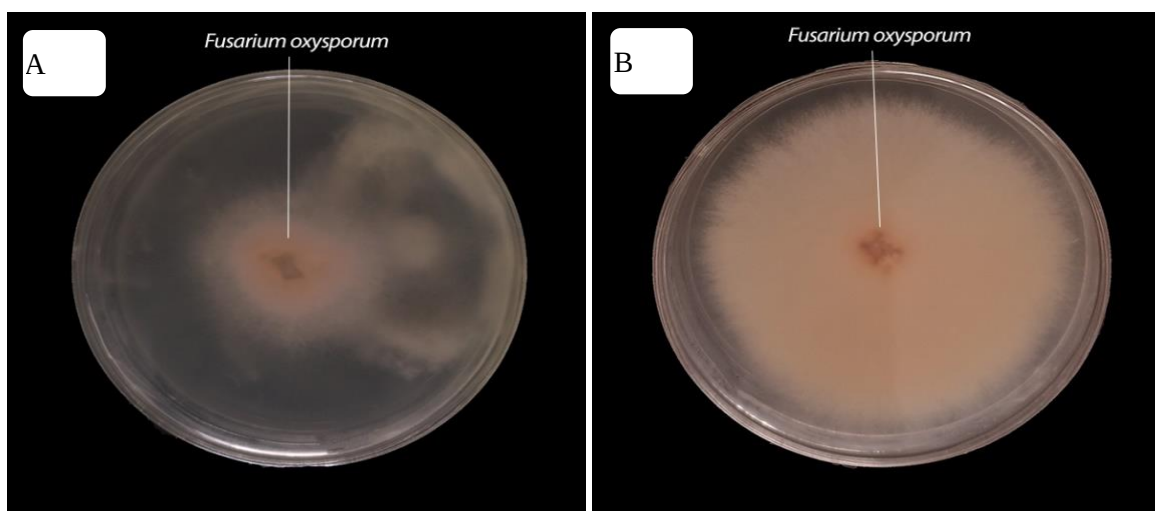


شکل ۲. میانگین درصد بازدارندگی از رشد میسلیمی قارچ FOT توسط عوامل آنتاگونیست در کشت متقابل همزمان روی تشتک پتری حاوی محیط کشت در شرایط آزمایشگاه. میانگین در تیمارهای مختلف در سطح یک درصد با آزمون دانکن مقایسه شدند. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند، با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند.

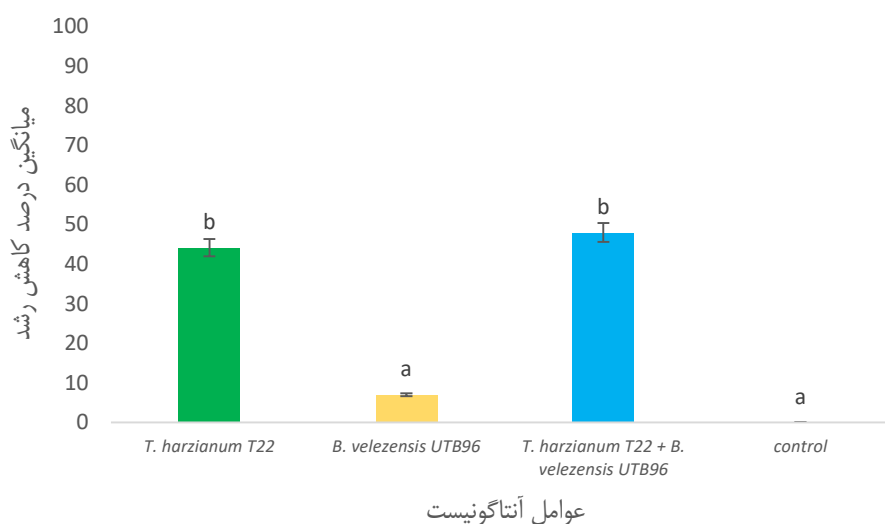
اثر بازدارندگی متابولیت‌های فرار بر رشد میسلومی قارچ FOT

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، در تیمار ترکیبی (شکل ۳ A) کاهش قابل توجهی در رشد قارچ نسبت به شاهد (شکل ۳ B) مشاهده گردید که نشان‌دهنده نقش مؤثر متابولیت‌های فرار در مهار رشد بیمارگر بدون نیاز به تماس مستقیم است. این امر بیانگر آن است که هر دو عامل بیوکنترل علاوه بر تأثیر مستقیم، از طریق ترشح ترکیبات فرار ضدقارچی نیز در کنترل قارچ نقش دارند.

بررسی اثر ترکیبات خارج سلولی بر رشد میسلوم قارچ نشان داد که جدایه‌ها از نظر توانایی کاهش رشد میسلوم قارچ بیمارگر نسبت به یکدیگر متفاوت بوده و تیمارهای *T. harzianum* T22 + *B. velezensis* UTB96، *T. harzianum* T22 و *B. velezensis* UTB96 به ترتیب با ۴۷/۹۴، ۴۴/۱۰ و ۶/۹۶ درصد توانستند رشد قارچ بیمارگر را کاهش دهند (شکل ۴).



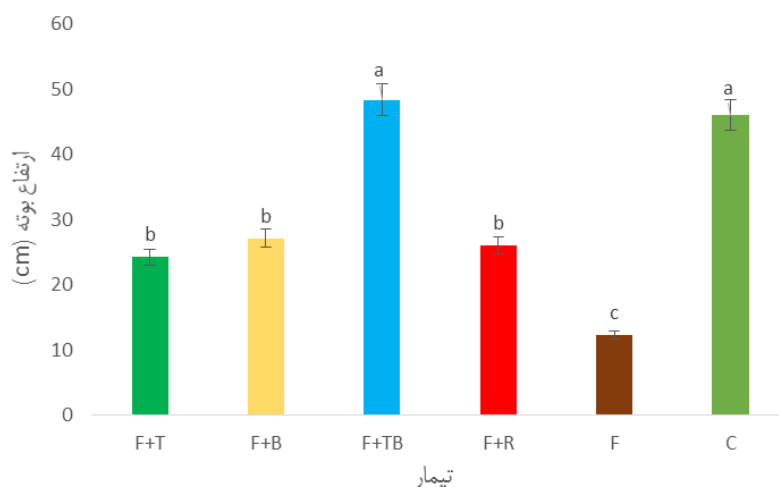
شکل ۳. آزمون ترکیبات فرار ضدقارچی در شرایط آزمایشگاهی به صورتی که تشک پتری حاوی *F. oxysporum* f. sp. *tuberosi* strain 13 در بالا و تشک پتری حاوی آنتاگونیست در پایین قرار دارد. (A) ترکیب *B. velezensis* UTB96 + *T. harzianum* T22 در مقابل FOT، (B) استفاده از آب مقطر سترون روی محیط کشت در مقابل FOT.



شکل ۴. میانگین درصد بازدارندگی از رشد میسلیمی قارچ *F. oxysporum* f. sp. *tuberosi* strain13 در آزمون ترکیبات فرار ضدقارچی در شرایط آزمایشگاهی به صورتی که پتری حاوی FOT در بالا و تشک پتری حاوی آنتاگونیست در پایین قرار دارد. میانگین در تیمارهای مختلف در سطح یک درصد با آزمون دانکن مقایسه شدند. تیمارهایی که دارای حروف مشترک هستند در سطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی دار ندارند.

اثر ترکیب تریکودرما و باسیلوس روی بیماری در گلخانه

براساس نتایج حاصل از این آزمایش، تمام عوامل بیولوژیک و شیمیایی در مقایسه با تیمار شاهد باعث کاهش شدت پژمردگی فوزاریومی سیبزمینی شدند. کاهش شدت بیماری زایی در تیمار *B. velezensis* UTB96 + *T. harzianum* T22 قابل توجه بود و نسبت به تیمارهای دیگر توانست شدت بیماری را بیشتر کاهش دهد (شکل ۷). جدایه های *B. velezensis* UTB96 و *T. harzianum* T22 نیز به تنهایی توانستند از پژمردگی سیبزمینی جلوگیری کنند. اما تیمار *B. velezensis* UTB96 عملکرد بهتری نسبت به *T. harzianum* T22 داشت ولی اختلاف معنی داری نداشتند. قارچ کش Rovral TS باتوجه به استفاده در یک مرحله توانست برای مدت زمان کمی از پژمردگی جلوگیری کند. تیمار ترکیبی *B. velezensis* UTB96 + *T. harzianum* T22 بیشترین افزایش ارتفاع را نسبت به سایر تیمارها و شاهد داشت که بیانگر اثر هم افزایی این دو میکروارگانیسم در بهبود رشد گیاه و کاهش تنش بیماری است. همچنین، تیمارهای انفرادی نسبت به شاهد بهبود قابل توجهی در رشد بوته ها نشان دادند (شکل ۵). علاوه بر این تیمارهای مختلف اثرات متفاوتی روی وزن تر و خشک اندام های ریشه، ساقه و برگ داشتند (شکل ۶). به صورت کلی ترکیب *B. velezensis* UTB96 + *T. harzianum* T22 با ۷۶/۷۵ درصد، بیشترین اثر را در کاهش شدت بیماری را داشت. این افزایش رشد احتمالاً ناشی از کنترل مؤثر بیماری و بهبود شرایط فیزیولوژیکی گیاه است. تیمارهای انفرادی نیز نسبت به شاهد عملکرد بهتری داشتند، اما میزان افزایش رشد در تیمار ترکیبی به طور معنی داری بیشتر بود (جدول ۲).



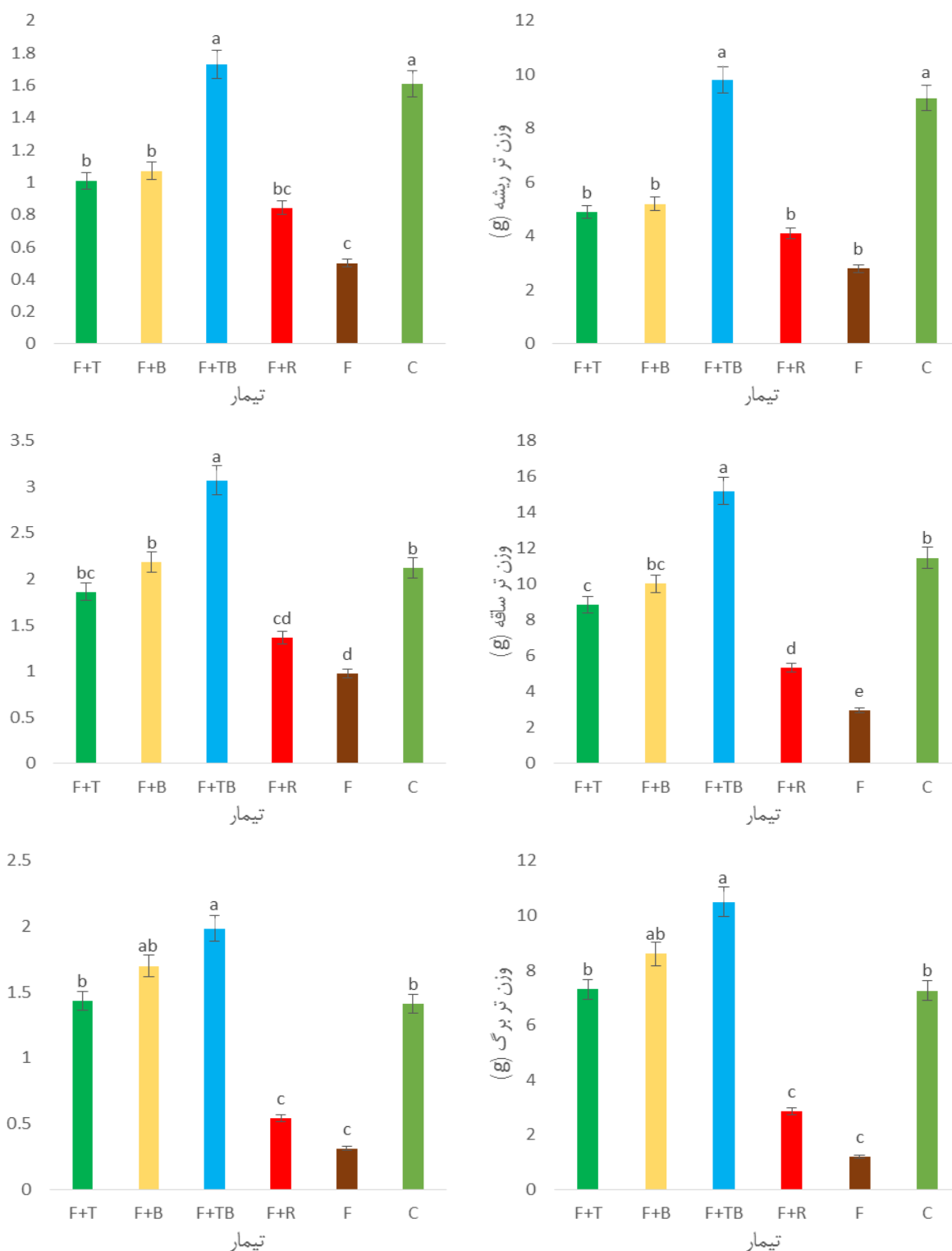
شکل ۵. مقایسه ارتفاع بوته های سیبزمینی در تیمارهای مختلف در شرایط گلخانه ۷۵ روز پس از کاشت. میانگین تیمارهای مختلف در سطح یک درصد با آزمون دانکن مقایسه شدند. تیمارهایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی دار ندارند.

F. oxysporum+*T. harzianum*+*B. velezensis*: F+TB، *F. oxysporum*+*B. velezensis*: F+B، *F. oxysporum*+*T. harzianum*: F+T، *F. oxysporum*: F، *F. oxysporum*+Rovral TS: F+R، *B. velezensis*: C شاهد (فاقد عامل بیولوژیک و بیمارگر).

جدول ۲. تجزیه واریانس داده های مربوط به اثر تیمارهای مختلف روی وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ سیب زمینی.

میانگین مربعات (MS)						درجه آزادی	منبع تغییرات
وزن خشک برگ	وزن خشک ساقه	وزن خشک ریشه	وزن تر برگ	وزن تر ساقه	وزن تر ریشه		
۱/۷۴۵**	۲/۱۱۱**	۰/۸۷۲*	۵۰/۲۱**	۷۶/۱۹۳**	۳۱/۸۹۹**	۵	تیمار
۰/۰۲۹	۰/۰۷۷	۰/۰۴۳	۱/۲۷۲	۰/۹۵۲	۱/۴۸۵	۱۸	خطا
						۲۳	کل

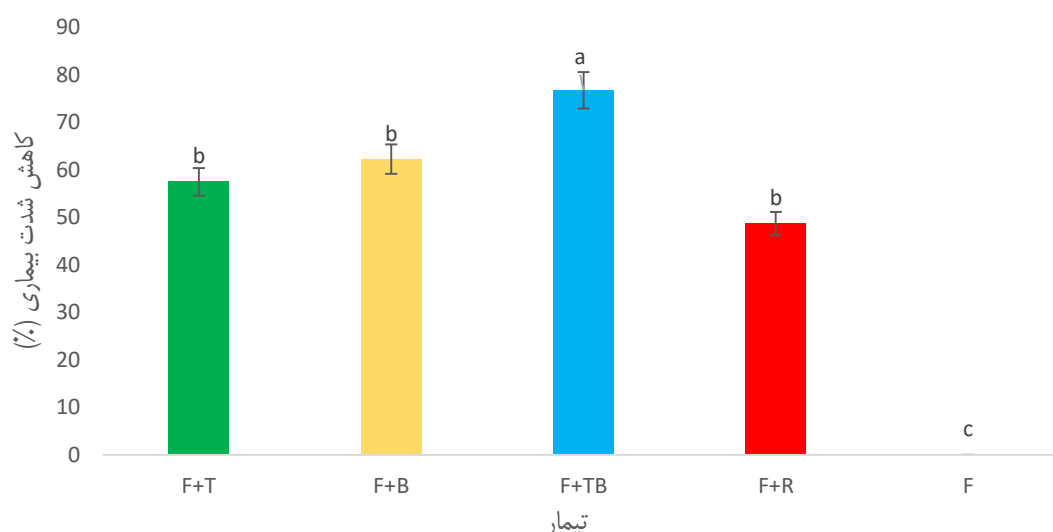
** اختلاف در سطح ۱ درصد معنی دار است.



شکل ۶. مقایسه وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ پوت‌های سیب‌زمینی در تیمارهای مختلف، ۷۵ روز پس از کاشت. میانگین تیمارهای مختلف در سطح یک درصد با آزمون دانکن مقایسه شدند. تیمارهایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌دار ندارند.

F. oxysporum+*T. harzianum* :F+TB، *F. oxysporum*+*B. velezensis* :F+B، *F. oxysporum*+*T. harzianum* :F+T

F. oxysporum :F، *F. oxysporum*+Rovral TS :F+R، *harzianum*+*B. velezensis* :F+R



شکل ۷. میزان کاهش شدت بیماری تیمارهای مختلف ۷۵ روز پس از کاشت. میانگین تیمارهای مختلف در سطح یک درصد با آزمون دانکن مقایسه شدند. تیمارهایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح یک درصد با یکدیگر اختلاف معنی دار ندارند.

F+T : *F. oxysporum*+*T. harzianum*، F+B : *F. oxysporum*+*B. velezensis*، F+TB : *F. oxysporum*+*T. harzianum*+*B. velezensis*، F+R : *F. oxysporum*+Rovral TS، F : *F. oxysporum*

بحث

با توجه به بالا بودن میزان خسارت بیماری پژمردگی فوزاریومی و نیز اهمیت گیاه سیب زمینی در میان محصولات کشاورزی، یافتن روشی مناسب برای جلوگیری و کاهش خسارت های ناشی از بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب زمینی ضروری است. ارائه روش های مدیریتی مناسب جهت کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب زمینی و افزایش کمی و کیفی محصول سیب زمینی که ضمن کارآمدی، سازگار با محیط زیست بوده و سلامت مصرف کننده را نیز تامین کنند ضروری می باشد. بنابراین جهت رسیدن به این هدف، استفاده از ترکیب باسیلوس و تریکودرما در مقابله با پژمردگی فوزاریومی سیب زمینی در تحقیق حاضر و پژوهش های پیشین می تواند در رسیدن به هدف مورد نظر راهگشا باشد. آزمون سازگاری اولیه بین *Bacillus velezensis* و *Trichoderma harzianum* یک گام اولیه حیاتی بود، چرا که موفقیت یک استراتژی ترکیبی کنترل بیولوژیک، به همزیستی میکروارگانیسم های معرفی شده وابسته است. عدم تشکیل هاله بازدارنده در آزمون کشت دوطرفه، سازگاری این دو جدایه را تأیید می کند. این مشاهده نشان می دهد که این سویه ها را می توان به صورت همزمان بدون ایجاد آنتاگونیسم متقابل به کار برد و در نتیجه اجازه داد تا اثرات هم افزایی آن ها ظاهر شود. این یافته با گزارش پژوهشگران مطابقت دارد که همزیستی موفق سویه های سازگار *Bacillus* و *Trichoderma* را تأیید کرده اند (Izquierdo-García et al., 2020).

در آزمون کشت متقابل، تیمارهای *B. velezensis* UTB96، *T. harzianum* T22 و *T. harzianum* T22 + *B. velezensis* UTB96 و شاهد در برابر *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* strain13 قرار گرفتند. تمامی تیمارها سبب کاهش رشد میسلیم قارچ شدند. در شرایط آزمایشگاهی، تیمار ترکیبی *B. velezensis* UTB96 و *T. harzianum* T22 بیشترین میزان مهار رشد میسلیمی را در آزمون کشت متقابل مستقیم نشان داد که به طور معنی داری بیشتر از تیمارهای انفرادی بود. این برتری را می توان به مکانیسم های عمل مکمل و احتمالاً هم افزایی بین این دو عامل نسبت داد. در تحقیقی مشابه که سینگ و همکارانش انجام دادند ادعا کردند که استفاده ترکیبی *T. harzianum* و *B. subtilis* در شرایط آزمایشگاهی می تواند میزان رشد

میسلیوم *F. oxysporum* را کاهش دهد و به بهبود سلامت ریشه و افزایش تحمل گیاه نسبت به عوامل تنش‌زا کمک کند (Singh et al., 2021). *T. harzianum* به توانایی آن در پارازیت کردن مستقیم بیمارگرهای قارچی، رقابت برای فضا و مواد مغذی و تولید آنزیم‌های لیتیک مانند کیتیناز و گلوکاناز شناخته شده است (Katatny et al., 2001). در مطالعات جدیدتر نیز به طور مفصل به توانایی‌های *T. harzianum* در القای مقاومت سیستمیک و رقابت مؤثر پرداخته‌اند (Oyesola et al., 2024). از سوی دیگر، *Bacillus* spp. نیز به تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ضد قارچی از جمله لیپوپپتیدهای حلقوی یا بیوسورفکتانت و آنتی‌بیوتیک‌ها معروف هستند (Ongena & Jacques, 2008). هنگامی که با هم استفاده می‌شوند، این مکانیسم‌ها می‌توانند به طور هم افزایی باعث مهار قوی‌تر بیمارگر شوند. مطالعات جدید نیز نشان می‌دهند که مکانیسم‌های عمل مکمل این دو میکروارگانیسم، می‌تواند به اثر هم‌افزایی و مهار قوی‌تر بیمارگر بینجامد (Zhou et al., 2021).

نتایج آزمون متابولیت‌های فرار به طور قانع‌کننده‌ای نقش ترکیبات ضد قارچی منتشر شده در هوا را در فعالیت بیوکنترلی هر دو عامل، به ویژه در استفاده توأم آن‌ها، برجسته می‌کند. درصد بازداری از رشد قارچ *F. oxysporum* در اثر این ترکیبات با گذشت زمان افزایش می‌یابد، که ممکن است به دلیل تجمع بیشتر ترکیبات فرار در طول گذشت زمان در محیط بسته داخل تشک پتری باشد (Chavan et al., 2009). اثربخشی بالاتر تیمار ترکیبی در این آزمون، که در آن تماس فیزیکی مستقیم وجود ندارد، به وضوح نشان می‌دهد که مهار تنها ناشی از رقابت برای فضا و مواد مغذی نیست، بلکه ترکیبات ضد میکروبی منتشر شده در فاز گازی سهم عمده‌ای دارند. این مشاهده با یافته‌های دیگر پژوهشگران مطابقت دارد و اهمیت این متابولیت‌های ثانویه را در کنترل بیماری‌های خاک‌زی تأیید می‌کند، به صورتی که می‌توانند در منافذ خاک پخش شده و بدون تماس مستقیم روی بیمارگر تاثیر گذار باشند (Chavan et al., 2009). اهمیت ترکیبات فرار در سال‌های اخیر بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات جدید نشان می‌دهند که این متابولیت‌ها می‌توانند حتی در غلظت‌های بسیار کم نیز اثر بازدارندگی قوی داشته و نقش کلیدی در کنترل بیولوژیک در خاک ایفا کنند (Li et al., 2020).

ارزیابی‌های گلخانه‌ای به وضوح برتری عملکرد تیمار ترکیبی را تأیید کرد. بالاترین میزان کاهش بیماری در تیمار ترکیبی نه تنها اثربخشی این روش را در محیطی پیچیده‌تر نشان می‌دهد، بلکه مزیت اضافی بهبود قابل توجه پارامترهای رشد گیاه، از جمله ارتفاع بوته و وزن تر و خشک ریشه، ساقه و برگ را نیز به همراه داشت. این بهبود رشد می‌تواند ناشی از مهار مؤثر بیمارگر باشد که به گیاه اجازه می‌دهد منابع خود را به جای مبارزه با بیماری، به رشد اختصاص دهد. علاوه بر این، *Trichoderma* و *Bacillus* به دلیل توانایی‌شان در القای مقاومت سیستمیک در گیاهان و تولید فیتوهورمون‌ها یا تسهیل جذب مواد مغذی که محرک رشد هستند، شناخته شده‌اند (Hao et al., 2024). تریکودرما با ایجاد یک رابطه همزیستی با ریشه، مسیرهای مقاومت القایی سیستمیک (ISR) را در گیاه فعال می‌کند. این فعال‌سازی منجر به تولید سریع‌تر و قوی‌تر ترکیبات دفاعی در گیاه هنگام مواجهه با بیمارگر می‌شود. هنگامی که *Bacillus* نیز حضور دارد، این پاسخ تقویت می‌شود (Mendoza-Mendoza et al., 2018). تحقیقات نشان می‌دهد که سویه‌های خاصی از *B. velezensis* (مانند FZB42) قادرند ژن‌های مرتبط با سنتز فیتوالکسین‌ها و پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR Proteins) را در گیاه القا کنند (Borriss et al., 2019). نتایج حاضر مبنی بر برتری تیمار ترکیبی، با یافته‌های جدید در زمینه مکانیسم‌های هم‌افزایی در سطح مولکولی همسو است. مطالعات اخیر نشان می‌دهند که هنگام کاربرد توأم *Bacillus velezensis* و *Trichoderma harzianum*، رونوشت‌برداری از ژن‌های مرتبط با سنتز لیپوپپتیدهای ضد قارچی (مانند فنگیسین، سورفکتین و ایتورین) در *Bacillus* به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، *Trichoderma* نه تنها بیان ژن‌های کیتیناز و گلوکاناز خود را افزایش می‌دهد، بلکه با القای حالت رقابتی شدید، *Bacillus* را نیز به تولید بیشتر متابولیت‌های ثانویه وامیدارد. این جریان شیمیایی پیچیده و برهم‌کنش متقابل در نهایت منجر به ایجاد یک اثر سرکوبگری قوی‌تر و پایدارتر علیه بیمارگر می‌شود (Fifani et al., 2022). همچنین، اثبات شده که این کنسرسیوم میکروبی با هماهنگی در القای مسیرهای سیگنال‌های هورمونی در گیاه، یک حالت آماده‌باش قوی ایجاد کرده و

گیاه را برای یک پاسخ دفاعی سریع تر و قوی تر در برابر حمله بیمارگر آماده می کند (Sidharthan et al., 2023). بنابراین، برتری تیمار ترکیبی مشاهده شده در این تحقیق را می توان تابعی از این برهم کنش های چندسطحی و پیچیده دانست. نتایج حاصل با پژوهش دیگر محققان در رابطه با کنترل زیستی بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب زمینی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* توسط ترکیب عوامل بیولوژیک مطابقت دارد به صورتی که Khedher و همکارانش (۲۰۲۱) ادعا کردند که *Bacillus subtilis* V26 توانسته شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب زمینی را ۵۴/۸ تا ۶۰/۸ درصد در شرایط گلخانه کاهش دهد. همچنین در تحقیق دیگری که اثر *T. harzianum* در کنترل پژمردگی فوزاریومی سیب زمینی را بررسی شد، به این نتیجه رسیدند که در شرایط گلخانه این قارچ می تواند به میزان ۶۵ درصد عامل بیماری را کنترل کند (Bibi et al., 2024). بنابراین استفاده از میکروارگانیسم های زیستی نظیر *T. harzianum* و *B. velezensis* به عنوان عوامل بیوکنترل، می تواند جایگزینی مناسب برای مدیریت بیماری های گیاهی در شرایط گلخانه ای محسوب می شود و این رویکرد ترکیبی می تواند به عنوان یک جایگزین موثر و سازگار با محیط زیست در برنامه های مدیریت تلفیقی آفات برای کشت سیب زمینی در نظر گرفته شود.

نتیجه گیری و پیشنهادها

استفاده ترکیبی *Trichoderma harzianum* و *Bacillus velezensis* می تواند راهکار مناسبی جهت کاربرد عوامل بیولوژیک برای کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب زمینی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* باشد. این ترکیب علاوه بر گلخانه، در شرایط آزمایشگاهی نیز توانایی بهتری در کنترل عامل بیماری نسبت به تیمارهای منفرد داشت. استفاده همزمان *T. harzianum* و *B. velezensis* می تواند باعث افزایش طول گیاهچه، افزایش وزن تر و خشک گیاه نسبت به تیمار شاهد شود. به طور کلی، با توجه به نتایج به دست آمده، استفاده توأم از *T. harzianum* و *B. velezensis* برای کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی سیب زمینی توصیه می گردد. علاوه بر این، پیشنهاد می شود تحقیقات بیشتری به منظور بررسی سازگاری جدایه های باسیلوس و تریکودرما با دیگر عوامل بیولوژیک صورت گیرد.

منابع

الهی نیا، س. ۱۳۹۳. قارچ و بیماری شناسی گیاهی (جلد اول). انتشارات دانشگاه گیلان. ۶۶۸ صفحه.
قلعه دزدانی، ح.، فلاحتی رستگار، م.، جعفرپور، ب.، و مرادزاده اسکندری، م. (۱۳۸۲). تعیین گروه های سازگاری رویشی قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* در استان خراسان. علوم کشاورزی ایران، ۳۴ (۱)، ۶۷-۷۵.

REFERENCES

- Abdel-lateif, K. S. (2017). *Trichoderma* as biological control weapon against soil borne plant pathogens. *African Journal of Biotechnology*, 16(50), 2299–2306. <https://doi.org/10.5897/AJB2017.16270>
- Anupama, S., Manali, M., Sonali, R., & others. (2015). Antifungal activity of a fungal isolates against Pomegranate wilt pathogen *Fusarium*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(2), 48–57.
- Bibi, A., Mubeen, F., Rizwan, A., Ullah, I., Hammad, M., Waqas, M. A. B., Ikram, A., Abbas, Z., Halterman, D., & Saeed, N. A. (2024). Morpho-Molecular Identification of *Fusarium equiseti* and *Fusarium oxysporum* Associated with Symptomatic Wilting of Potato from Pakistan. *Journal of Fungi*, 10(10), 701. <https://doi.org/10.3390/jof10100701>
- Borriess, R., Wu, H., & Gao, X. (2019). Secondary metabolites of the plant growth promoting model rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 are involved in direct suppression of plant pathogens and in stimulation of plant-induced systemic resistance. In *Secondary metabolites of plant growth promoting Rhizomicroorganisms: Discovery and applications* (pp. 147-168). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-5862-3_8
- 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), 25-IN3. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80077-3)

- Din, A. R. J. M., Azam, Z. M., Yong, J. W. H., & others. (2025). *Trichoderma*-bacterial network: A balance inter-kingdom interaction for agricultural relevance. *The Microbe*, 7. <https://doi.org/10.1016/j.microb.2025.100360>
- Fifani, B., Steels, S., Helmus, C., Delacuvellerie, A., Deracinois, B., Phalip, V., & Jacques, P. (2022). Coculture of *Trichoderma harzianum* and *Bacillus velezensis* based on metabolic cross-feeding modulates lipopeptide production. *Microorganisms*, 10(5), 1059. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051059>
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 43(1), 337–359. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.032904.092924>
- Hao, J., Wang, Z., Zhao, Y., Feng, S., Cui, Z., Zhang, Y., & Zhou, H. (2024). Inhibition of potato Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* ZWZ-19 and *Trichoderma asperellum* PT-29: A comparative analysis of non-targeted metabolomics. *Plants*, 13(7), 925. <https://doi.org/10.3390/plants13070925>
- Izquierdo-García, L. F., & Moreno-Velandia, C. A. (2024). Modes of action of *Trichoderma virens* Gl006 and *Bacillus velezensis* Bs006: decoding the arsenal of the microbial consortium. *European Journal of Plant Pathology*, 170(1), 39-65. <https://doi.org/10.1007/s10658-024-02881-6>
- Izquierdo-García, L. F., González-Almario, A., Cotes, A. M., & Moreno-Velandia, C. A. (2020). *Trichoderma virens* Gl006 and *Bacillus velezensis* Bs006: a compatible interaction controlling Fusarium wilt of cape gooseberry. *Scientific Reports*, 10(1), 6857. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63689-y>
- Izquierdo-García, L. F., González-Almario, A., Cotes, A. M., & Moreno-Velandia, C. A. (2020). *Trichoderma virens* Gl006 and *Bacillus velezensis* Bs006: a compatible interaction controlling Fusarium wilt of cape gooseberry. *Scientific Reports*, 10(1), 6857. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63689-y>
- Katatny, M. H., Gudelj, M., Robra, K. H., Elnaghy, M. A., & Gübitz, G. M. (2001). Characterization of a chitinase and an endo-beta-1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1–2), 137–143. <https://doi.org/10.1007/s002530100646>
- Kalantari, S., Marefat, A., Naseri, B., & Hemmati, R. (2018). Improvement of bean yield and Fusarium root rot biocontrol using mixtures of *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Rhizobium*. *Tropical Plant Pathology*, 43(6), 499–505. <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-018-0252-y>
- Kenfaoui, J., Dutilloy, E., Benchli, S., Lahlali, R., Ait-Barka, E., & Esmaeel, Q. (2024). *Bacillus velezensis*: a versatile ally in the battle against phytopathogens—insights and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 439. <https://doi.org/10.1007/s00253-024-13255-7>
- Khedher, S. Ben, Mejdoub-Trabelsi, B., & Tounsi, S. (2021). Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of Fusarium wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control*, 152, 104444. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104444>
- Li, X., Wang, X., Shi, X., Wang, B., Li, M., Wang, Q., & Zhang, S. (2020). Antifungal effect of volatile organic compounds from *Bacillus velezensis* CT32 against *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum*. *Processes*, 8(12), 1674. <https://doi.org/10.3390/pr8121674>
- Manici, L. M., & Cerato, C. (1994). Pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *tuberosi* isolates from tubers and potato plants. *Potato Research*, 37(2), 129-134. <https://doi.org/10.1007/BF02358713>
- Mendoza-Mendoza, A., Zaid, R., Lawry, R., Hermosa, R., Monte, E., Horwitz, B. A., & Mukherjee, P. K. (2018). Molecular dialogues between *Trichoderma* and roots: role of the fungal secretome. *Fungal Biology Reviews*, 32(2), 62-85. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.12.001>
- Montealegre, J. R., Reyes, R., Pérez, L. M., Herrera, R., Silva, P., & Besoain, X. (2003). Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(2), 115–127.
- Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 10(3), 311. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>
- Ommati, F., & Zaker, M. (2012). Evaluation of some *Trichoderma* isolates for biological control of potato wilt disease (*Fusarium oxysporum*) under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Crop Protection*, 1(4), 279–286.
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Oyesola, O., Rosemary-Kinge, T., Bello, O., Taiwo, O., & Obembe, O. (2024). *Trichoderma*: a review of its mechanisms of action in plant disease control. <https://doi.org/10.20944/preprints202405.1378.v1>
- Poveda, J., & Eugui, D. (2022). Combined use of *Trichoderma* and beneficial bacteria (mainly *Bacillus* and *Pseudomonas*): Development of microbial synergistic bio-inoculants in sustainable agriculture.

- Biological Control*, 176, 105100. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105100>
- Rich, A. E. (1983). 1 - *Introduction* Potato Diseases (pp. 1–2). Academic Press.
- Sahebani, N., & Hadavi, N. (2008). Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(8), 2016–2020. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.03.011>
- Sidharthan, V. K., Pothi-raj, G., Suryaprakash, V., Singh, A. K., Aggarwal, R., & Shanmugam, V. (2023). A synergic and compatible microbial-based consortium for biocontrol of Fusarium wilt of tomato. *Phytopathol. Mediterr*, 62(2), 183-197. <https://doi.org/10.36253/phyto-13055>
- Singh, S., Balodi, R., Meena, P. N., & Singhal, S. (2021). Biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* against *Meloidogyne incognita*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. *Indian Phytopathology*, 74(3), 703–714. <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00368-6>
- Slininger, P. J., Behle, R. W., Jackson, M. A., & Schisler, D. A. (2003). Discovery and development of biological agents to control crop pests. *Neotropical Entomology*, 32, 183–195. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2003000200001>
- Yobo, K. S., Laing, M. D., & Hunter, C. H. (2011). Effects of single and combined inoculations of selected *Trichoderma* and *Bacillus* isolates on growth of dry bean and biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off. *African Journal of Biotechnology*, 10(44), 8746–8756. <https://doi.org/10.5897/AJB10.2213>
- Zaim, S., Bekkar, A. A., & Belabid, L. (2018). Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Trichoderma harzianum* combination on chickpea Fusarium wilt caused by *F. oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 51(3–4), 217–226. <http://dx.doi.org/10.1080/03235408.2018.1447896>
- Zhou, Y., Yang, L., Wang, J., Guo, L., & Huang, J. (2021). Synergistic effect between *Trichoderma virens* and *Bacillus velezensis* on the control of tomato bacterial wilt disease. *Horticulturae*, 7(11), 439. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7110439>