Applied Entomology and Phytopathology
Vol. 89, No. 2, March 2022
DOI: 10.22092/JAEP.2021.356180.1416

آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۹، شماره ۲، اسفند ۱٤۰۰

مقاله پژوهشی

تأثیر قارچ ریشه‌های آربوسکولار، *Trichoderma harzianum* و ترکیب آن‌ها بر پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه نهال‌های پسته رقم ممتاز: ویژگی‌های رشدی، تغذیه‌ای و بیوشیمیایی

فاطمه شمس الدین سعید[۱]، ناصررادمان[۲]، امیرحسین محمدی[۳]✉، عبدالحسین طاهری[٤]، مهدی پیرنیا[٥]

۱، ۲، ۵- به‌ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه زابل، زابل، ایران؛ ۳- استادیار پژوهشکده پسته، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران؛٤- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

(تاریخ دریافت: مهر ۱٤۰۰؛ تاریخ پذیرش: آبان ۱٤۰۰)

چکیده

استفاده از عوامل مهار زیستی یکی از روش‌های کاهش پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه درختان پسته می‌باشد. در تحقیق حاضر تأثیر مایه‌زنی مخلوط سه گونه قارچ‌ریشه آربوسکولار (AM)، *Trichoderma harzianum* (Th) و ترکیب آن‌ها (AM+Th) بر پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه ناشی از *Phytophthora drechsleri* (Pd) در نهال‌های پسته رقم ممتاز ارزیابی شد. قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار، Th و ترکیب آن‌ها همزمان با کاشت بذرهای پسته مایه‌زنی شد و بیمارگر دوماه بعد، یتایج نشان داد که درتیمارهای AM، Th، AM+Th و برهمکنش آن‌ها با Pd، ویژگی‌های رشدی، تغذیه‌ای و بیوشیمیایی به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد و بیمارگر افزایش یافته که بیشترین میزان افزایش در تیمارهای AM+Th و AM+Th+Pd مشاهده شد. در انتهای آزمایش، مرگ و میر نهال‌ها از ۹۲ درصد در تیمار Pd، به ٦۷، ٦۷ و ۵۰ درصد در تیمارهای AM+Pd، Th+Pd و AM+Th+Pd رسید. نتایج تحقیقات حاضر نشان داد که مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار و Th و به‌خصوص ترکیب آن‌ها می‌تواند علاوه بر بهبود خصوصیات رشدی، تغذیه‌ای و بیوشیمیایی، موجب مهار زیستی پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه در نهال‌های پسته شود.

واژه‌های کلیدی: پرولین، عناصرغذایی، قندهای محلول، مقاومت، مهار زیستی، *Phytophthora drechsleri*

The effect of arbuscular mycorrhizas, *Trichoderma harzianum* and their combination on Phytophthora root rot of pistachio seedlings cv. Momtaz: growth, nutritional and biochemical characteristics

F. SHAMSADDIN SAEED[1], N. RADMAN[2], A.H. MOHAMMADI[3]✉, M. PIRNIA[4], A.H. TAHERI[5]

1, 2, 5. PhD student, Associate Professors, Department of Plant Protection, University of Zabol Respectively; 3. Associate Professors, Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran; 4. Associate Professors, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

Using biocontrol agents is one of the methods to reduce mortality of Phytophthora root rot in pistachio orchards. In the present study, the effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AM) (mixture of three species), *Trichoderma harzianum* (Th) and their combination (AM+Th) were evaluated on Phytophthora root rot caused by *Phytophthora drechsleri* (Pd) in pistachio seedlings cv. Momtaz. Arbuscular mycorrhizal fungi, Th and their combination were inoculated at the time of sowing pistachio seeds, but the pathogen was inoculated two months later. The results showed that AM, Th and AM+Th treatments and their interaction with Pd significantly increased growth, nutritional and biochemical characteristics of seedlings compared to the control and Pd treatment. The highest increase was observed in AM+Th and AM+Th+Pd treatments. At the end of the experiment, the mortality of pistachio seedlings was significantly reduced from 92% in Pd treatment and reached to 67, 67 and 50% in AM+Pd, Th+Pd and AM+Th+Pd treatments, respectively. It is concluded that inoculation of AM, Th and especially their combination improved the growth, nutritional and biochemical characteristics which can lead to biological control of Phytophthora root rot of pistachio seedlings.

Keywords: Biological control, mineral elements, proline, resistance, soluble sugars, *Phytophthora drechsleri*

✉ **E–mail ah-mohammadi@pri.ir**

©2022, The Author(s). Published by Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP). This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0).

مقدمه

پسته اهلی (*Pistacia vera* L.) تنها گونه موجود در خانواده *Anacardiaceae* است که از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار بوده (Esmailpour *et al*., 2020) و در کشورهایی مانند ایران، ترکیه، آمریکا، سوریه، چین، یونان، افغانستان و ایتالیا، به‌عنوان یکی از محصولات باغبانی مهم کشت می‌شود (Ak *et al*., 2016). تاکنون بیماری‌های متعددی ناشی از عوامل بیماریزای قارچی، شبه‌قارچی، نماتُدها و پروکاریوت‌ها در ایران و سایر کشورها از درختان پسته گزارش شده است (Esmailpour *et al*., 2020). پوسیدگی فیتوفتورایی طوقه و ریشه پسته (گموز یا انگومک) که باغداران آن را به‌نام شیره سیاه نیز می‌شناسند، می‌تواند در یک دوره زمانی ۵ تا ۱۰ ساله حدود ۸۰ درصد درختان یک باغ آلوده را از بین ببرد (Moradi *et al*., 2017). گونه‌های مختلفی از *Phytophthora* به‌عنوان عامل بیماری انگومک پسته در مناطق مختلف پسته‌کاری ایران، گزارش شده‌اند (Mirabolfathy *et al*., 2001; Banihashemi and Moradi, 2004; Mostowfizadeh . Ghalamfarsa *et al*., 2008) که گونه *Phytophthora drechsleri* Tucker بیشترین فراوانی را در باغ‌های پسته دارد (Mirabolfathy *et al*., 2001; Banihashemi and Moradi, 2004). با توجه به‌خطرات متعدد قارچکش‌ها برای محیط زیست و انسان‌ها و لزوم استفاده از روش‌های کنترل بیماری‌های گیاهی که سازگاری بیشتری با محیط زیست دارند (Sanchez *et al*., 2019)، استفاده از قارچ‌ریشه‌های دارسانه (Mohammadi and Banihashem, 2010b) و گونه‌های مختلف تریکودرما (Fani *et al*., 2013; Jamali *et al*., 2016) برای کنترل پوسیدگی فیتوفتورایی پسته پیشنهاد شده است.

گونه‌های مختلف تریکودرما به‌دلیل سرعت زیاد رشد، اسپورزایی و قدرت تهاجم، پراکنش وسیع در زیست‌بوم‌های مختلف و جداسازی آسان از خاک، تغییر در جمعیت میکروبی فراریشه، بهبود ویژگی‌های رشدی و تحریک سازوکارهای دفاعی گیاهان نقش مهمی در مهار زیستی بیماری‌های گیاهی دارند (Vinale *et al*., 2008; Sirvastava *et al*., 2016; Harman *et al*., 2019).

یکی دیگر از عوامل مهار زیستی، قارچ‌ریشه‌های دارسانه (Arbuscular Mycorrhiza=AM) بوده که تقریباً در همه زیست‌بوم‌ها یافت شده و با حدود ۹۷ درصد گیاهان هم‌زیستی برقرار می‌کنند. این قارچ‌های رشته‌ای، سلول‌های ریشه و فضای فراریشه را کلنیزه کرده و تا چندسانتی‌متری اطراف ریشه نیز به‌صورت ریسه‌هایی با انشعابات متعدد گسترش می‌یابند (Poveda and Baptista, 2021). تأثیر مثبت قارچ‌ریشه‌های دارسانه در افزایش مقاومت گیاهان به‌بیماری (Mohammadi and Banihashemi, 2010b; Poveda and Baptista, 2021) و همچنین بهبود خصوصیات رشدی، تغذیه‌ای و آنزیمی گیاهان با سازوکارهای مختلف به‌اثبات رسیده است (Poveda and Baptista, 2021). همچنین تأثیر بهتر کاربرد توام تریکودرما و قارچ‌ریشه‌های دارسانه بر کاهش بیماری‌های مختلف و بهبود ویژگی‌های رشدی و تغذیه‌ای در مطالعات مختلفی نشان داده شده است (Sukhada *et al*., 2011; Yuan *et al*., 2016). در تحقیق حاضر تأثیر مایه‌زنی مخلوط سه گونه قارچ‌ریشه دارسانه (AM)، *T. harzianum* و ترکیب آن‌ها بر ویژگی‌های رشدی، تغذیه‌ای، بیوشیمیایی، میزان مرگ و میر و کلنیزاسیون *P. drechsleri* و قارچ‌ریشه‌ها در ریشه نهال‌های پسته رقم ممتاز در شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی

تکثیر زادمایه قارچ‌ریشه‌های دارسانه، *Trichoderma harzianum* و *Phytophthora drechsleri*

در این تحقیق از ترکیب سه گونه قارچ‌ریشه دارسانه *Funneliformis mosseae* (Syn: *Glomus mosseae*)، *Rhizophagus irregularis* (Syn: *G. intraradices*) (KT456544) و *Claroideoglomus etunicatum* (Syn: *G. etunicatum*) استفاده گردید. قارچ‌ریشه *F. mosseae* با کد pri 87-25 از پژوهشکده پسته (Mohammadi and Banihashemi, 2010a) و دو گونه *R. irregularis* (با شماره دسترسی KT456544) و *C. etunicatum*

به‌صورت محصول تجاری با نام میکوروت (MycoRoot) از شرکت زیست فناور پیشتاز واریان تهیه گردید. تکثیر زادمایه هرسه گونه قارچ AM روی ذرت و به‌مدت چهارماه انجام شد. پس از قطع آبیاری، ریشه‌ها به‌مدت دوهفته هواخشک شده که پس از آسیاب کردن، با پرلیت سترون مخلوط شده و بستره‌ی حاوی سه گونه قارچ‌ریشه با نسبت مساوی و دارای حداقل ۱۰۰ زادمایه فعال در هر گرم تهیه گردید (Norris *et al*., 1994).

جدایه Th23-53 گونه *T. harzianum* مورد استفاده در این تحقیق با شماره دسترسی KJ000310.1، قبلاً از خاک باغ‌های پسته جداسازی شده بود (Mirkhani *et al*, 2016) و دارای بیشترین اثر بازدارندگی بر رشد رویشی، تولید و آزادسازی اسپورانژیوم‌ها و زئوسپورهای *P. drehsleri* در شرایط آزمایشگاهی بود (Jamali *et al*., 2016). برای تکثیر این جدایه از دانه گندم استفاده شد (Ruano Rosa and Lopez Herrera, 2009). داخل فلاسک‌های ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰۰ گرم دانه گندم سه مرتبه‌سترون شده در دمای ۱۲۱درجه سلسیوس و فشار ۱۰۳/۴۱ کیلوپاسکال، ده دیسک ٦ میلی‌متری از حاشیه پرگنه‌های ٤ روزه تریکودرما انداخته شده و به‌مدت یک ماه در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

برای تکثیر زادمایه *P. drechsleri* مخلوطی از ۲۰۰ و ۱۲۰ میلی‌لیتر ورمی‌کولیت و عصاره ٦۰ گرم در لیتر شاهدانه داخل فلاسک‌های ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱۰۳/۴۱ کیلوپاسکال سترون شده و سپس با ۱۰ عدد دیسک ٦ میلی‌متری از حاشیه پرگنه‌های ٤ روزه *P. drechsleri* روی محیط کشت عصاره هشت سبزی-آگار (عصاره هشت سبزی برند Campbell's آمریکا: ۱۰۰ میلی لیتر، آب مقطر: ۹۰۰ میلی لیتر، آگار: ۱۸ گرم) (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa *et al*., 2010) مایه‌زنی شده و به‌مدت یک‌ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند (Banihashemi and Fatehi, 1989). جدایه *P. drechsleri* مورد استفاده در این تحقیق که از طوقه درختان پسته در رفسنجان جداسازی شده بود با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی ITS-DR2 , ITS-DF2 (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa *et al*., 2007) شناسایی شده و با شماره دسترسی MZ645950 در بانک ژن ثبت شده است.

کاشت نهال‌های پسته، مایه زنی عوامل زیست‌مهار و بیمارگر

در این تحقیق، از بذر پسته رقم ممتاز موجود در کلکسیون ارقام پژوهشکده پسته که بر اساس مطالعات بنی هاشمی و غیثی (Banihashemi and Gheisi, 1995) به‌عنوان یک رقم حساس به‌پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه گزارش شده، استفاده گردید. بذرهای پسته به‌مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۱۰ درصد هیپوکلریت سدیم ضدعفونی شده و پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر، به‌مدت ۷ ساعت در آب مقطر خیسانده شدند. بستره کاشت مخلوط خاک بکر و ماسه بادی به‌نسبت ۱:۱ بود که قبل از استفاده در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۲ ساعت پاستوریزه شده بود. مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های دارسانه (AM) و *Trichoderma harzianum* (Th) به‌روش آل آمری و همکاران (Alamri *et al*., 2012) با اندکی تغییرات به‌شرح زیر انجام شد. در گلدان‌های ٤ کیلوگرمی، ۲ کیلوگرم بستره کاشت با ۱۰۰ گرم زادمایه سه گونه قارچ‌ریشه و ٤۰ گرم‌زادمایه *T. harzianum* (۱۰ گرم به‌ازاء هر نهال) مخلوط شده که پس از کاشت ٦ تا۸ عدد بذر پسته و پوشاندن روی آن‌ها با خاک، وزن نهایی گلدان‌ها، ۲٦۰۰ گرم تنظیم شد. گلدان‌ها به‌روش وزنی و در حد ظرفیت زراعی با آب شهری آبیاری شده که پس از سبز شدن بذرهای پسته و رشد گیاهچه‌ها تا مرحله ٤ برگی، تعداد نهال‌ها در هر گلدان به٤ عدد کاهش داده شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۳ ± ۲۵ درجه سلسیوس و میزان روشنایی ٦۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. دو ماه پس از مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های دارسانه و Th، مایه‌زنی بیمارگر روی ریشه نهال‌های پسته به‌روش حاج‌ابراهیمی و بنی‌هاشمی (Hajebrahimi and Banihashemi, 2011) انجام شد. پس از کنار زدن خاک اطراف ریشه نهال‌ها،۱۰ میلی‌لیتر مایه تکثیر شده *P. drechsleri* به‌ازاء هر نهال پسته اطراف

ریشه‌ها ریخته شده و روی آن با خاک پوشانده شد. گلدان‌ها به‌مدت یک شب غرقاب شده و پس از ایجاد سوراخ در ته گلدان‌ها، آب اضافی آن‌ها خارج شد. تولید و آزادسازی زئوسپورها در زه‌آب گلدان‌ها با استفاده از دیسک‌های ۵ میلی‌متری برگ لیمو و با استفاده از محیط کشت CMA-PARP بررسی شد (Banihashemi, 2004). گلدان‌های شاهد با ورمی‌کولیت آغشته به‌عصاره شاهدانه و بدون بیمارگر مایه‌زنی شدند.

سنجش ویژگی‌های رشدی

هفت هفته پس از مایه‌زنی (Pd) *P. drechsleri*، برداشت گیاهان آغاز شد. ریشه نهال‌ها در محل طوقه از اندام هوایی جدا شده و به‌طور کامل با آب شسته شدند. ارتفاع ساقه نهال‌ها از محل طوقه با استفاده از خط‌کش، سطح برگ‌ها با استفاده از دستگاه اسکنر سطح برگ مدل DAC AM100 و میانگین قطر نهال‌ها نیز در سه ناحیه پایینی، میانی و انتهایی ساقه با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری شد. وزن خشک اندام گیاهی و ریشه نیز با استفاده از آون با دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس به‌مدت ٤۸ ساعت محاسبه‌شد.

اندازه‌گیری غلظت عناصر غذایی در اندام هوایی

آماده سازی اندام هوایی برای عصاره‌گیری و تعیین غلظت عناصر غذایی به‌روش خاکستر خشک (dry ashing) و هضم به‌وسیله اسید کلریدریک (۳ نرمال) صورت گرفت (Kalra and Maynard, 1991). غلظت نیتروژن با روش کجدال (Bradstreet, 1954) و غلظت یون‌های فسفر، پتاسیم، کلسیم، منیزیوم، آهن، مس، روی و منگنز با استفاده از دستگاه ICP (Inductively couple plasma-mass spectrometry) (Masson *et al*., 2010) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری غلظت و شاخص کلروفیل برگ‌ها

پس از عصاره‌گیری نیم گرم بافت تازه برگ‌ها به‌همراه ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد و نیم گرم پودر سنگ روی یخ و صاف کردن عصاره با کاغذ صافی (Macherey-Nagel MN 615)، میزان جذب در طول موج‌های ٦٤٧ و ٦٦٣ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر خوانده شد. غلظت کلروفیل‌های a، b و کل با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه‌گردید (Lichtenthaler, 1987).

کلروفیل a = $(۱۲/۲۵\times A_{663})-(۲/۷۹\times A_{647})$

کلروفیل b = $(۲۱/۵\times A_{647})-(۵/۱\times A_{663})$

کلروفیل کل = $(۷/۱۵\times A_{663})-(۱۸/۷۱\times A_{647})$

همچنین برای هر نهال تعداد ۱۰ عدد برگ از قسمت‌های مختلف انتخاب شده و شاخص کلروفیل با استفاده از دستگاه کلروفیل‌متر دستی (SPAD-502^{+}) اندازه‌گیری شد.

اندازه‌گیری غلظت پرولین و قندهای محلول ریشه

برای محاسبه‌غلظت پرولین از روش باتس و همکاران (Bates *et al*., 1973) استفاده شد. پس از عصاره‌گیری نیم گرم بافت تازه ریشه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالیسیلیک اسید و سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از این عصاره به‌همراه ۲ میلی‌لیتر ناین هیدرین اسیدی (۱/۲۵ گرم ناین هیدرین حل شده در ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلایسیال و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول ٦ مولار اسید فسفوریک) و ۲ میلی لیتر اسید استیک گلایسیال به‌مدت ۱ ساعت در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس نگهداری شده و سپس به‌سرعت روی یخ دمای آن کاهش داده شد. پس از افزودن ٤ میلی لیتر تولوئن و مخلوط نمودن کامل آن با عصاره، میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر T80 U/VIS Spectrometer PG Instruments Ltd اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد پرولین از ال-پرولین استفاده شده و غلظت پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ریشه محاسبه‌شد.

برای اندازه‌گیری قندهای محلول، ۰/۵ گرم از بافت تازه ریشه با استفاده از ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد عصاره گیری شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ٤۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. یکصد میکرولیتر از این عصاره با سه میلی‌لیتر از آنترون تازه تهیه شده (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون به‌علاوه ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد) مخلوط شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در حال جوشیدن قرار داده شد. پس از

خنک شدن، میزان جذب در طول موج ٦٢٥ نانومترخوانده شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوگز رسم شده و غلظت قندهای محلول بر اساس میلی‌گرم بر وزن تر ریشه محاسبه‌گردید (Irigoyen *et al.*, 1992).

رنگ‌آمیزی ریشه و اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون قارچ ریشه‌های دارسانه در ریشه

برای رنگ آمیزی ریشه‌ها و محاسبه‌درصد کلنیزاسیون قارچ‌ریشه‌ها از روش کورمانیک و مک گراو (Kormanic and Mc Graw, 1982) با تغییراتی استفاده شد. ریشه‌ها پس از شستشو با آب مقطر، دو مرتبه‌به‌مدت یک ساعت در لوله‌های آزمایش حاوی هیدروکسید پتاسیم ۱۲ درصد داخل بن ماری با دمای ۹۰ درجه‌سلسیوس نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها ۳ مرتبه با آب مقطر شسته و به‌مدت ۲۰ دقیقه در آب اُکسیژنه قلیایی (۳ میلی لیتر NH_4OH، ۳۰ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۱۰ درصد و ٥٦٧ میلی لیتر آب مقطر) و در دمای اتاق نگهداری شده که پس از شستشوی مجدد با آب مقطر، به‌مدت ۳ تا ٤ دقیقه در محلول یک درصد اسیدکلریدریک نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها بدون شستشو به‌محلول لاکتوفنل-اسید فوشین ۰/۱ درصد منتقل شده و به‌مدت ۳۵ دقیقه در حمام بن ماری با دمای ۹۰ درجه‌سلسیوس قرار داده شد و پس از خنک شدن، به‌منظور رنگبری به‌محلول لاکتوفنل منتقل شدند. با انتخاب ٦٠ قطعه ۱ سانتی‌متری از ریشه‌ها به‌صورت تصادفی و قرار دادن ۱۰ عدد از آن‌ها روی هر اسلاید میکروسکوپی، درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها به‌وسیله قارچ‌ریشه‌ها با بزرگنمایی ٤٠٠X اندازه‌گیری شد. همچنین طول ریشه‌های کلنیزه شده نیز به‌روش Gridline-intersect محاسبه شد (Giovannetti and Mosse, 1980).

اندازه‌گیری میزان مرگ و میر نهال‌ها و درصد کلنیزاسیون بیمارگر در ریشه و طوقه نهال‌ها

با شمارش تعداد نهال‌های خشک شده در هر گلدان، میزان مرگ و میر نهال‌ها محاسبه شد. تعداد ٤٠ قطعه نیم سانتی‌متری از ریشه‌های اصلی و طوقه نهال‌های پسته به‌صورت تصادفی جداشده که پس از شستشو با آب شهری به‌مدت ۳۰ دقیقه و گرفتن رطوبت آن‌ها با استفاده از دستمال کاغذی سترون، روی محیط کشت CMA-PARP کشت داده شدند. با شمارش تعداد قطعات کلنیزه شده به‌وسیله Pd، درصد کلنیزاسیون بیمارگر در ریشه و طوقه محاسبه‌گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ٥ تکرار اجرا شد. فاکتورها عبارت بودند از عوامل زیست‌مهار مایه‌زنی شده (قارچ‌ریشه‌های دارسانه، Th و مخلوط آن‌ها)، بیمارگر و زمان برداشت. اندازه‌گیری ویژگی‌های رشدی، تغذیه‌ای، بیوشیمیایی در انتهای آزمایش و محاسبه میزان مرگ و میر و کلنیزاسیون *P. drechsleri* و قارچ‌های AM در ریشه نهال‌های پسته رقم ممتاز به‌ترتیب در ٥ و ۸ زمان مختلف پس از مایه‌زنی بیمارگر انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ٥ درصد و نرم افزار SAS استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از قارچ‌ریشه‌های دارسانه (AM) و(Th) *T.harzianum* و ترکیب آن‌ها، می‌تواند باعث افزایش صفات رویشی نهال‌های پسته نسبت به‌شاهد گردد که این افزایش به‌استثنای ارتفاع ساقه در تیمار مایه‌زنی با Th و قطر ساقه در کلیه تیمارها، در سایر موارد دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ٥ درصد با شاهد بود (جدول۱). کلیه صفات رویشی اندازه‌گیری شده در تیمار مایه‌زنی با (Pd) *P. drechsleri*، به‌طور معنی‌داری کمتر از شاهد بود که این موضوع با توجه به‌حساس بودن رقم ممتاز به‌بیماری انگومک (بنی هاشمی و غیثی، ۱۳۷٤)، کاملاً قابل انتظار بود. در تیمارهای AM+Pd، Th+Pd و AM+Th+Pd، کلیه صفات رویشی اندازه‌گیری شده به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار مایه‌زنی با Pd به‌تنهایی بود علاوه بر این‌که بیشترین میزان صفات اندازه‌گیری شده نیز در تیمار AM+Th+Pd مشاهده شد که به‌همراه تیمار AM+Pd دارای اختلاف معنی‌داری با شاهد

در سطح ۵ درصد بودند (جدول۱). این موضوع نشان می‌داد استفاده از این عوامل زیست‌مهار به‌خصوص ترکیب AM+Th می‌تواند به‌طور مؤثری اثرات مخرب بیمارگر روی صفات رویشی نهال‌های پسته ممتاز را کاهش دهد. بهبود وضعیت رشدی گیاهان مختلف در اثر مایه‌زنی گونه‌های تریکودرما (Fani *et al*., 2013; Delkhah and Behboudi, 2021) و قارچ ریشه‌های دارسانه (Mohammadi and Banihashemi, 2010b; Behmanesh *et al*., 2019; Fattahi *et al*., 2021) در حضور و غیاب بیمارگرها و در تیمارهای ترکیب عوامل زیست‌مهار در مقایسه با مایه‌زنی به‌تنهایی هریک از این عوامل (Martinez- Medina *et al*., 2011; Yuan *et al*., 2016; El-Sharkawy *et al*., 2021) از جمله گزارش‌هایی است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. هرچند مطالعات اندکی نیز حاکی از عدم وجود اثر هم‌افزایی تریکودرما و قارچ‌ریشه‌های دارسانه روی ویژگی‌های رشدی گیاهان می‌باشد (Castillo *et al* ., 2019).

مایه‌زنی بیمارگر (Pd) باعث کاهش معنی‌دار و مایه‌زنی AM، Th و AM+Th باعث افزایش معنی‌دار عناصر پرمصرف (فسفر، نیتروژن، پتاسیم، کلسیم و منیزیوم) و عناصر کم‌مصرف (روی، آهن، منگنز و مس) در مقایسه با شاهد گردید (جدول۲). بیشترین میزان این افزایش در تیمار AM+Th بود هرچند که این افزایش، اختلاف معنی‌داری را در سطح ۵ درصد با تیمارهای AM و Th نشان نداد. در تیمارهای AM+Pd، Th+Pd و AM+Th+Pd غلظت کلیه عناصر به‌طور معنی‌داری بیشتر تیمار Pd بود. در تیمار AM+Pd، غلظت نیتروژن، کلسیم و عناصر کم‌مصرف، در تیمار Th+Pd، علاوه بر عناصر فوق، غلظت فسفر و پتاسیم و در تیمار AM+Th+Pd، تنها غلظت کلسیم، روی، آهن و مس در مقایسه با تیمارهای AM، Th و AM+Th کاهش معنی‌دار در سطح ۵ درصد نشان داد که این موضوع بیانگر تأثیر بهتر مایه‌زنی توام دو عامل زیست‌مهار بر کاهش اثرات مخرب بیمارگر روی غلظت عناصر غذایی می‌باشد (جدول۲). یافته‌های مختلفی حاکی از تأثیر مثبت مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های دارسانه و تریکودرما و به‌خصوص ترکیب آن‌ها بر افزایش غلظت عناصر پرمصرف، کم‌مصرف و کم‌تحرک (Zn و Cu) در گیاهان می‌باشد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (Mohammadi and Banhihashemi, 2010b; Behrooz *et al*., 2019; Metwally, 2020). افزایش سطح و حجم ریشه‌ها در اثر مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های دارسانه و تریکودرما، اسیدی شدن فراریشه، کاهش pH خاک و افزایش حلالیت عناصر غذایی و نگهداری عناصر در بیومس قارچی و آزاد نمودن آن‌ها در شرایط کمبود عناصر غذایی و تامین نیاز گیاه از جمله دلایل افزایش عناصر غذایی در گیاهان کلنیزه شده با این عوامل زیست‌مهار می‌باشند (Azarmi *et al*., 2011; Metwally, 2020).

جدول ۱– تأثیر قارچ‌ریشه‌های دارسانه (AM)، *Trichoderma harzianum* (Th)، ترکیب آن‌ها (AM+Th) و برهمکنش با *Phytophthora drechsleri* (Pd) بر ویژگی‌های رویشی نهال‌های پسته رقم ممتاز.

Table 1. Effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, *Trichoderma harzianum* (Th), their mixture (AM+Th) and interaction with *Phytophthora drechsleri* (Pd) on growth characteristics of pistachio seedlings cv. Momtaz.

Treatments	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Stem height (cm)	Leaf area (cm^2)	Stem diameter (cm)
Control	4.90 ± 0.72^{de}	2.53 ± 0.18^{d}	25.00 ± 1.87^{bc}	116.6 ± 5.03^{e}	2.94 ± 0.13^{abc}
Pd	1.76 ± 0.30^{f}	1.32 ± 0.13^{e}	18.40 ± 1.52^{d}	86.40 ± 6.73^{f}	1.86 ± 0.21^{d}
AM	5.98 ± 0.49^{ab}	3.32 ± 0.34^{ab}	29.20 ± 1.92^{ab}	139.8 ± 5.63^{b}	3.22 ± 0.23^{ab}
AM+Pd	5.26 ± 0.37^{cd}	2.92 ± 0.13^{c}	24.48 ± 1.99^{bc}	134.2 ± 7.01^{c}	2.84 ± 0.19^{bc}
Th	5.62 ± 0.48^{bc}	3.12 ± 0.33^{bc}	28.00 ± 1.58^{abc}	130.8 ± 4.44^{d}	3.10 ± 0.23^{ab}
TH+Pd	4.54 ± 0.43^{e}	2.44 ± 0.22^{d}	24.12 ± 1.23^{c}	115.8 ± 6.46^{e}	2.64 ± 0.15^{c}
AM+Th	6.44 ± 0.5^{a}	3.58 ± 0.18^{a}	31.20 ± 1.3^{a}	147.4 ± 6.50^{a}	3.31 ± 0.19^{a}
AM+Th+Pd	5.84 ± 0.63^{bc}	3.38 ± 0.19^{ab}	29.20 ± 1.64^{ab}	137.6 ± 5.68^{b}	3.18 ± 0.16^{ab}

درهر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک طبق آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند. اعداد همراه علامت ± خطای معیار هستند.

For each column, means with the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). The numbers with ± sign are the standard error.

مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های دارسانه، *T. harzianum* و ترکیب آن‌ها (AM+Th) در غیاب بیمارگر (Pd)، موجب افزایش معنی‌دار غلظت پرولین و قندهای محلول ریشه در مقایسه با شاهد گردید (جدول ۳). بیشترین غلظت این دو ماده در تیمار AM+Th مشاهده شد که با تیمار AM در یک گروه آماری قرار می‌گرفت اما دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با تیمار Th بود. گزارش‌ها در مورد تأثیر تریکودرما و قارچ ریشه‌های دارسانه بر غلظت پرولین در گیاهان متناقض می‌باشد. تأثیر مثبت قارچ‌ریشه‌های دارسانه و تریکودرما بر افزایش رشد گیاه، میزان فتوسنتز و افزایش تولید کربوهیدرات و پروتئین در ریشه و اندام هوایی از جمله دلایل افزایش غلظت پرولین (Rajeswari *et al*., 2015) و تأثیر این عوامل زیست مهار بر افزایش غلظت یون پتاسیم و نقش مهم آن در تنظیم فشار اسمزی در گیاهان (Wang *et al*. 2004) از جمله دلایل کاهش غلظت پرولین بیان شده است (Amaral *et al*., 2019). همچنین افزایش میزان فتوسنتز و تولیدات آن از جمله قندهای محلول، انتقال بیشتر قندها از شاخه به‌ریشه و تبدیل نشاسته به‌قندهای محلول برای مقابله با تنش آبی از جمله دلایل افزایش غلظت قندهای محلول در اثر عوامل زیست مهار می‌باشد (Metwally, 2020). همانند نتایج ژنگ و همکاران (Zheng *et al*., 2004) در تحقیق حاضر نیز مایه‌زنی Pd به‌طور معنی‌داری غلظت پرولین و قندهای محلول ریشه را در مقایسه با شاهد کاهش داد (جدول ۳) که به‌نظر می‌رسد دلیل آن حساسیت پسته رقم ممتاز به‌بیمارگر و فعالیت مخرب شبه‌قارچ فیتوفتورا در ایجاد پوسیدگی و اختلال در فعالیت سلول‌های ریشه باشد (Grote *et al*., 2006).

جدول ۲- تأثیر قارچ‌ریشه‌های دارسانه (AM)، *Trichoderma harzianum* (Th)، ترکیب آن‌ها (AM+Th) و برهمکنش با *Phytophthora drechsleri* (Pd) بر غلظت عناصر غذایی در اندام هوایی نهال‌های پسته رقم ممتاز.

Table 2. The effect of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi, *Trichoderma harzianum* (Th), their mixture (AM+Th) and interaction with *Phytophthora drechsleri* (Pd) on nutrient concentrations in shoot of pistachio seedlings cv. Momtaz.

Treatments	P (%)	N (%)	K (%)	Mg (%)	Ca (%)	Zn (µg g^{-1})	Fe (µg g^{-1})	Mn (µg g^{-1})	Cu (µg g^{-1})
Control	0.17±0.03^{c}	1.5±0.16^{e}	1.74±0.2^{d}	0.69±0.04^{c}	2.48±0.19^{cd}	22.6±2.4^{d}	96.6±3.8^{e}	28±1.7^{ef}	4.9±0.5^{cd}
Pd	0.07±0.02^{d}	0.73±0.11^{f}	0.8±0.16^{e}	0.44±0.07^{d}	1.2±0.2^{e}	12.8±3.4^{e}	51.40±2.4^{f}	13±1.6^{g}	2.5±0.4^{e}
AM	0.25±0.03^{ab}	2.11±0.13^{ab}	2.38±0.22^{ab}	0.94±0.07^{a}	3.04±0.24^{a}	29.4±2.5^{ab}	110±2.7^{c}	32±1.4^{cd}	5.9±0.4^{ab}
AM+Pd	0.22±0.02^{b}	1.91±0.07^{c}	2.10±0.2^{bc}	0.89±0.07^{ab}	2.34±.07^{d}	21.78±3.6^{d}	95.6±2.7^{e}	27.06±1.5^{f}	4.58±0.8^{d}
Th	0.23±0.03^{b}	1.94±0.17^{bc}	2.26±0.2^{ab}	0.91±0.04^{ab}	2.90±0.22^{ab}	31.60±2.8^{ab}	114.4±2.9^{ab}	33.80±1.8^{bc}	6.12±0.3^{ab}
TH+Pd	0.16±0.02^{c}	1.70±0.13^{d}	1.81±0.3^{cd}	0.84±0.06^{b}	2.23±0.21^{d}	23.8±3.3^{cd}	103±3.3^{d}	30±1.2^{de}	4.92±0.5^{cd}
AM+Th	0.27±0.02^{a}	2.20±0.13^{a}	2.58±0.3^{a}	0.97±0.07^{a}	3.18±0.23^{a}	33±2.7^{a}	117.4±2.6^{a}	37±1.6^{a}	6.32±0.7^{a}
AM+Th+Pd	0.25±0.02^{ab}	2.07±0.11^{abc}	2.37±0.2^{ab}	0.90±0.05^{ab}	2.70±0.27^{bc}	27.4±2.9^{bc}	113±2^{bc}	35.60±2.1^{ab}	5.46±0.6^{bc}

درهر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک طبق آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند. اعداد همراه علامت ± خطای معیار هستند.

For each column, means with the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). The numbers with ± sign are the standard error.

جدول ۳- تأثیر قارچ ریشه‌های دارسانه (AM)، *Trichoderma harzianum* (Th)، مخلوط آن‌ها (AM+Th) و برهمکنش با *Phytophthora drechsleri* (Pd) بر غلظت پرولین و قندهای محلول ریشه و کلروفیل a، b و a+b و شاخص کلروفیل در برگ نهال‌های پسته ممتاز.

Table 3. The effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF), *Trichoderma harzianum* (Th), their mixture (AMF+Th) and interaction with *Phytophthora drechsleri* (Pd) on content of proline and soluble sugar in roots and chlorophyll a,b,a+b in leaves of pistachio seedlings cv. Momtaz.

Treatments	Proline µmol g^{-1} FW	Soluble sugars mg g^{-1} FW	Chlorophyll *a* mg g^{-1} FW	Chlorophyll *b* mg g^{-1} FW	Chlorophyll *a*+*b* mg g^{-1} FW	Chlorophyll index
Control	13.5±0.87^{cd}	20.30±1.13^{e}	1.5±0.29^{b}	1.24±0.31^{b}	2.75±0.29^{c}	60.69±1.47^{c}
Pd	3.56±0.88^{f}	7.80±1.48^{f}	0.98±0.34^{c}	0.48±0.33^{c}	1.46±0.44^{d}	49.94±1.22^{d}
AM	15.66±0.95^{ab}	27.00±1.22^{bc}	2.17±0.18^{a}	2.14±0.36^{a}	4.32±0.29^{ab}	68.45±1.07^{ab}
AM+Pd	12.46±1.04^{d}	25.80±0.84^{cd}	2.11±0.37^{a}	1.88±0.20^{a}	4.00±0.32^{b}	63.83±2.02^{b}
Th	14.34±0.84^{bc}	26.00±1.58^{cd}	2.13±0.15^{a}	2.12±0.40^{a}	4.25±0.51^{ab}	64.26±1.60^{b}
TH+Pd	10.88±0.92^{e}	24.40±0.89^{d}	1.59±0.24^{b}	1.33±0.33^{b}	2.92±0.18^{c}	59.66±1.72^{c}
AM+Th	16.26±0.97^{a}	29.00±1.41^{a}	2.39±0.24^{a}	2.42±0.38^{a}	4.81±0.44^{a}	67.34±1.41^{a}
AM+Th+Pd	14.48±0.69^{bc}	28.40±1.14^{ab}	2.28±0.33^{a}	2.22±0.75^{a}	4.50±0.59^{ab}	65.72±1.20^{ab}

درهرستون، میانگین‌های دارای حروف مشترک طبق آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند. اعداد همراه علامت ± خطای معیار هستند.

For each column, means with the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). The numbers with ± sign are the standard error.

در تیمارهای AM+Pd، Th+Pd و AM+Th+Pd غلظت پرولین و قندهای محلول ریشه در مقایسه با تیمار Pd به‌تنهایی به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. از آن‌جایی که پرولین یک اسیدآمینه مهم در گیاهان بوده که همراه با قندهای محلول در تنظیم فشار اسمزی سلول‌های گیاهی به‌خصوص سلول‌های ریشه نقش بسزایی دارد بنابراین با حضور عوامل زیست مهار به‌خصوص ترکیب AM+Th توانایی نهال‌های پسته برای مقابله با تنش آبی ناشی از فعالیت بیمارگر افزایش می‌یابد (Behrooz *et al*., 2019; Yu and lu, 2020).

همچنین بر اساس اطلاعات موجود در جدول ۳، مایه‌زنی Pd موجب کاهش معنی‌دار و مایه‌زنی AM، Th و AM+Th باعث افزایش معنی‌دار غلظت کلروفیل a، b، a+b و شاخص کلروفیل در مقایسه با شاهد شدند. در تیمارهای AM+Pd، Th+Pdو AM+Th+Pd غلظت و شاخص کلروفیل به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار مایه‌زنی با Pd به‌تنهایی بود. برخلاف تیمار Th+Pd، غلظت هر سه نوع کلروفیل به‌همراه شاخص کلروفیل در تیمارهای AM+Pd و AM+Th+Pd اختلاف معنی‌داری با تیمارهای AM و AM+Th نشان ندادند. تأثیر مایه‌زنی Th و قارچ‌ریشه‌های دارسانه بر افزایش غلظت کلروفیل در تحقیق حاضر با نتایج تحقیقات سایر محققین در گیاهان مختلف مطابقت دارد (Behmanesh *et al*., 2012; Sanchez *et al*., 2019; Fattahi *et al*., 2021). غلظت بالای رنگدانه‌های فتوسنتزی در برگ گیاهان مایه‌زنی شده با قارچ ریشه‌های دارسانه و *T.harzianum* می‌تواند به‌دلیل افزایش جذب منیزیم و فسفر، افزایش تعرق، هدایت روزنه‌ای و جذب کربن باشد (Sharma *et al*., 2016). همانگونه که در جدول ٤ مشاهده می‌گردد در کلیه تیمارها با گذشت زمان، درصد ریشه‌های کلنیزه شده و کلنیزاسیون طول ریشه نهال‌های پسته رقم ممتاز به‌وسیله قارچ‌ریشه‌های دارسانه افزایش می‌یابد. همچنین میزان این دو صفت در طول آزمایش در تیمارهای AM+Th و AM+Th+Pd به‌طور معنی‌داری بالاتر از تیمارهای AM و AM+Th بود. در تیمار AM+Pd درصد ریشه‌های کلنیزه شده و میزان کلنیزاسیون طول ریشه با قارچ ریشه‌ها به‌ترتیب از روز هشتم و چهاردهم پس از مایه‌زنی به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار AM بود. در تیمار AM+Th+Pd، کاهش‌معنی‌دار درصد ریشه‌های کلنیزه شده در مقایسه با تیمار AM+Th از روز چهاردهم تا انتهای آزمایش مشاهده شده در حالی‌که کلنیزاسیون طول ریشه تنها در روزهای ١٤، ٢١ و ٢٨ پس از مایه‌زنی بیمارگر دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار AM+Th بود (جدول ٤).

به‌عبارت دیگر مایه‌زنی توام Th و قارچ‌ریشه‌های دارسانه توانسته بود که اثرات منفی بیمارگر روی کلنیزاسیون قارچ-ریشه‌ها را کاهش دهد. به‌نظر می‌رسد رقابت میان بیمارگر و قارچ‌ریشه‌های دارسانه برای فضا و یا منابع غذایی میزبان، یکی از عوامل مهم در کاهش کلنیزاسیون این قارچ‌ریشه‌ها در ریشه گیاهان باشد (Vos *et al*., 2014) که علاوه بر تحقیق حاضر، این موضوع توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Tian *et al*., 2021). همچنین بالاتر بودن درصد کلنیزاسیون قارچ‌ریشه‌های دارسانه در ریشه نهال‌های پسته رقم ممتاز در تیمار AM+Th نسبت به‌تیمار AM، می‌تواند در اثر تحریک جوانه‌زنی اسپور قارچ‌ریشه‌ها ناشی از تولید ترکیبات فرار و ترشحات مایع خارج سلولی توسط Th باشد (Martinez-Medina *et al*., 2011; Sharma *et al*., 2016; Metwally, 2020). درصد کلنیزاسیون ریشه به‌وسیله Pd و مرگ و میر نهال‌ها، در تیمارهای AM+Pd، Th+Pd و AM+Th+Pd به‌طور معنی‌داری کمتر از تیمار Pd بود که کمترین میزان این دو صفت در تیمار AM+Th+Pd مشاهده شد (جدول ٥). به‌نظر می‌رسد که با گذشت زمان، مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های دارسانه، Th و به‌خصوص ترکیب آن‌ها می‌تواند به‌میزان قابل ملاحظه‌ای درصد کلنیزاسیون ریشه و مرگ و میر نهال‌ها توسط بیمارگر را نسبت به‌تیمار مایه‌زنی با Pd به‌تنهایی کاهش دهد (جدول ٥). تأثیر گونه‌های مختلف تریکودرما

جدول ٤- درصد ریشه‌های کلنیزه شده و کلنیزاسیون طول ریشه پسته رقم ممتاز با قارچ‌ریشه‌های دارسانه در تیمارهای مایه‌زنی با AM، ترکیب AM با *Trichoderma harzianum* (AM+Th) و برهمکنش آن‌ها با *Phytophthora drechsleri* (Pd) در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی بیمارگر.

Table 4. The percentage of colonized roots and root length colonized (%) of pistachio seedlings cv. Momtaz by arbuscular mycorrhizal fungi in AM, mixture of AM with *Trichoderma harzianum* (AM+Th) and their interaction with *Phytophthora drechsleri* (Pd) in different days after inoculation of pathogen.

	Days after pathogen inoculation							
Treatments	**0**	**8**	**14**	**21**	**28**	**35**	**42**	**49**
	Colonized root (%)							
AM	61.0±3.6^{klm}	62.7±3.5^{i-l}	66±4^{g-k}	67.7±3.5^{f-j}	69.3±3.1^{fgh}	72.0±3.0^{efg}	73.3±3.1^{c-f}	77±3.6^{b-e}
AM+Pd	62.0±3.0^{i-m}	56.0±3.6^{mno}	52.0±3.0^{o}	50.7±3.5^{o}	54.3±3.1^{no}	59.3±3.1^{lmn}	63.7±3.5^{h-l}	67.7±3.1^{f-j}
AM+Th	69.7±3.1^{fgh}	72.7±3.5^{def}	76±3^{b-e}	78.7±3.5^{a-d}	79.3±4^{abc}	80.0±3.0^{ab}	82.0±3.6^{ab}	84.0±3.6^{a}
AM+Th+Pd	68.0±2.6^{f-i}	67.7±2.5^{f-j}	67.7±3.8^{g-j}	60.7±3.5^{klm}	61.7±.3.5^{j-m}	67.7±2.5^{f-j}	73.0±3.0^{def}	77.0±3.0^{b-e}
	Root length colonized (%)							
AM	56.3±2.5^{k-n}	57.3±3.1^{i-n}	59.3±2.1^{g-m}	60.3±2.5^{f-k}	61±2.6^{e-k}	61.7+±2.5^{e-i}	63.3±2^{c-g}	65.3±2.5^{b-e}
AM+Pd	56.7+±2.1^{j-n}	53.0±3.0^{n-q}	49.3±2.9^{q}	50.3±3.1^{pq}	51.7±2.5^{opq}	54.7±3.1^{m-p}	56.3±2.1^{k-n}	58.3±3.1^{h-m}
AM+Th	61.3±2.5^{e-j}	62.3±3.1^{d-h}	64.3±3.1^{c-f}	65.3±2.5^{b-e}	67.0±2.6^{a-d}	67.7±2.5^{abc}	69.3±2.5^{ab}	70.3±2.5^{a}
AM+Th+Pd	59.7±2.0^{f-l}	58.7±2.5^{g-m}	55.3±2.5^{l-o}	56.7±2.1^{j-n}	58.3±2.9^{h-m}	63.0±2.0^{c-h}	65.3±2.1^{b-e}	67.3±3.1^{abc}

میانگین‌های دارای حروف مشترک طبق آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند. اعداد همراه علامت ± خطای معیار هستند.

The means with the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). The numbers with ± sign are the standard error.

جدول ۵- درصد کلنیزاسیون بیمارگر در ریشه و مرگ و میر نهال‌هاي پسته ممتاز در تیمارهاي *Phytophthora drechsleri* (Pd) و برهمکنش آن با قارچ‌ریشه‌هاي دارسانه (AM+Pd)، *Trichoderma harzianum* (Th+Pd) و ترکیب آنها (AM+Th+Pd) در روزهاي مختلف پس از مایه‌زني با بیمارگر.

Table 5. The percentage colonization of the pathogen in roots and mortality of pistachio seedling Momtaz in *Phytophthora drechsleri* (Pd), interaction with arbuscular mycorrhizal fungi (AM+Pd), *Trichoderma harzianum* (Th+Pd) and their mixture (AM+Th+Pd) treatments at different days after inoculation of the pathogen.

	Days after pathogen inoculation				
Treatments	**21**	**28**	**35**	**42**	**49**
Pd	16.7±3.1^{h-k}	38.3±3.8^{de}	58.7±2.3^{c}	77.0±2.0^{b}	89.0±3.0^{a}
AM+Pd	6.3+±1.5^{mn}	11.7±2.1^{kl}	17.7±3.1^{hij}	31.7±3.1^{fg}	37.7±2.5^{de}
Th+Pd	9.3±2.5^{lm}	15.7±2.5^{ijk}	21.7±2.1^{h}	35.3±3.1^{ef}	42.0±3.6^{d}
AM+Th+Pd	3.7±3.2^{n}	8.7±3.5^{lm}	13.7±3.1^{jkl}	20.7±2.5^{hi}	28.7±3.6^{g}
	Mortality of seedlings (%)				
Pd	0.0^{j}	25.0±5.0^{g}	41.7±5.8^{e}	75.0±5.0^{b}	91.7±6.6^{a}
AM+Pd	0.0^{j}	8.3±5.8^{i}	16.7+5.8^{h}	50.0±5.0^{d}	66.7±6.6^{c}
Th+Pd	0.0^{j}	16.7±5.8^{h}	25.0±5.0^{g}	50.0±5.0^{d}	66.7±6.2^{c}
AM+Th+Pd	0.0^{j}	8.3±5.8^{i}	16.7±5.8^{h}	33.3±5.8^{f}	50.0±5.0^{d}

میانگین‌هاي با حروف مشترک طبق آزمون دانکن در سطح ۵ درصد اختلاف معني‌دار با یکدیگر ندارند. اعداد همراه علامت ± خطاي معیار هستند.

The means with the same letter are not significantly different according to Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). The numbers with ± sign are the standard error.

(Fani *et al*., 2013; Sanchez *et al*., 2019; Delkhah and Behboudi, 2021) و قارچ‌ریشه‌های دارسانه (Mohammadi and Banihashemi, 2010b; Behmanesh *et al*., 2019) بر کاهش مرگ و میر و کلنیزاسیون ریشه ناشی از گونه‌های مختلف فیتوفتورا و افزایش مقاومت گیاهان به‌این بیمارگر از جمله گزارش‌هایی است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین کاهش معنی‌دار پژمردگی باکتریایی توتون (Yuan *et al*., 2016)، پوسیدگی رایزوکتونیایی لوبیا (Nasir Husssein *et al*., 2018)، پژمردگی فوزاریومی خربزه (Martinez-Medina *et al*., 2011) و پوسیدگی فیتوفتورایی خربزه درختی (پاپایا) (Sukhada *et al*., 2011) در مایه‌زنی توام تریکودرما و قارچ‌ریشه‌های دارسانه با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. برخلاف قارچ‌ریشه‌های دارسانه

که تأثیر مستقیمی روی بیمارگر ندارند (Sukhada *et al*., 2011). گونه‌های تریکودرما با سازوکارهایی مانند آنتی‌بیوز و میکوپارازیتسم باعث کاهش فعالیت بیمارگرها می‌شوند (Sanchez *et al*., 2019). رقابت با میکروارگانیسم‌های فراریشه برای فضا و مواد غذایی، تحریک سیستم‌های دفاعی و بهبود فاکتورهای رشدی و تغذیه‌ای میزبان از جمله سازوکارهای مشترک این دو گروه از عوامل زیست‌مهار برای کاهش خسارت بیمارگرهای مختلف از جمله فیتوفتورا می‌باشد (Sanchez *et al*., 2019; Delkhah and Behboudi, 2021). بر اساس نتایج تحقیق حاضر می‌توان انتظار داشت که با مایه‌زنی توام قارچ‌ریشه‌های دارسانه و *T. harzianum* روی ریشه نهال‌های پسته در نهالستان یا در باغ‌های پسته، ضمن افزایش رشد و نمو نهال‌ها، مقاومت آن‌ها به‌پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه را نیز افزایش داد

تشکر و قدردانی

از پژوهشکده پسته، بابت فراهم نمودن شرایط اجرای این تحقیق تقدیر و تشکر می‌گردد.

References

AK, B.E., I. ACAR, E. SAKAR, and S. GURSOZ, 2016. The importance of *Pistacia* species for pistachio production in Turkey. International Society for Horticultural Science, 1139: 183-188.

ALAMRI, S., M. HASHEM, and Y.S. MOSTAFA, 2012. *In vitro* and *in vivo* biocontrol of soil-borne phytopathogenic fungi by certain bioagents and their possible mode of action. Biocontrol Science, 17(4): 155-167.

AMARAL, J., G. PINTO, J.A. FLORES-PACHECO, J.J. DÝEZ-CASERO, A. CERQUEIRA, P. MONTEIRO, A. ALVES, and J.MARTIN-GARCIA, 2019. Effect of *Trichoderma viride* pre-inoculation in pine species with different levels of susceptibility to *Fusarium circinatum*: physiological and hormonal responses. Plant Pathology, 68(9): 1645-1653.

AZARMI, R., B. HAJIEGHRARI, and A. GIGLOU, 2011. Effect of *Trichoderma* on tomato seedling growth response and nutrient uptake. African Journal of Biotechnology, 10(31): 5850-5855.

BANIHASHEMI Z. and J. FATEHI, 1989. Reaction of cucurbit cultivars to *Phytophthora drechsleri* and *P. capsici* in greenhouse. Proceeding of 9th Iranian Plant Protection Congress, 9-14September 1989, Ferdosi University,Mashhad, Iran, 89 (abstract).

BANIHASHEMI, Z. 2004. A method of monitor the activity of *Phytophthora* spp. in the root zone of *Pistacia* spp. Phytopathologia Mediterranea, 43: 411-414.

BANIHASHEMI, Z. and K. GHEISI, K. 1995. Comparison of rootstocks of domestic and wild pistachio cultivars to *Phytophthora* species. Proceeding of 12th Iranian Plant Protection Congress, Karaj. P.226.

BANIHASHEMI, Z., and M. MORADI, 2004. The frequency of isolation of *Phytophthora* spp. from crown and root of pistachio nut tree and reaction of the crown and root to the causal agent. Iranian Journal of Plant Pathology, 40: 57-55.

BATES, L.S., R.P.WALDREN, and I.D. TEARE, 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil, 39: 205–207.

BEHMANESH, Z., H. ALAEI, A.H. MOHAMMADI, and H. DASHTI, 2019. Effect of arbuscular mycorrhizas *Glomus intraradices* and *Glomus mosseae* on pistachio root rot caused by Phytophthora under salinity stress. Iranian Journal of Plant Protection Science, 50(2): 197-212. (In Persian with English summery)

BEHROOZ, A., K. VAHDATI, F. REJALI, M. LOTFI, S. SARIKHANI, and C. LESLIE, 2019. Arbuscular

mycorrhiza and plant growth-promoting acteria alleviate drought stress in walnut. HortScience, 54(6); 1087-1092.

BRADSTRET, R.B.,1954, .kjeldahl method for organic nitrogen. Analytical Chemistry 26(1): 185-187.

CASTILLO, A.G., G. PUIG CECIRLY, C. JOSEPH, and R. CUMAGUN, 2019. Non-Synergistic Effect of *Trichoderma harzianum* and *Glomus* spp. in Reducing Infection of Fusarium Wilt in Banana. Pathogens, 8: 43

DELKHAH, Z. and K. BEHBOUDI, 2021. Improvement of biocontrol efficacy of *Trichoderma harzianum* Tr6 vs. *Phytophthora drechsleri*, the causal agent of damping-off disease in *Cucumis sativus*. Journal of Crop Protection, 10(2): 411-423.

EL-SHARKAWY, H.H., M.S. ABBAS, A.S. SOLIMAN, S.A. IBRAHIM, and I.A. EL-NADY, 2021. Synergistic effect of growth-promoting microorganisms on biocontrol of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*, growth, yield, physiological and anatomical characteristics of pea plants. Pesticide Biochemistry and Physiology, 104939.

ESMAILPOUR, A., Y. EMAMI, M. BASIRAT; A. TAJABADIPOUR, J. HOSSINIFARD, M. HAGHDEL, H. HOKMABADI, A. SHAKER ARDEKANI, R. SEDAGHAT, N. SEDAGHATI, H. ALAVI, A.H. MOHAMMADI, and H. HASHEMI RAD, 2020. Pistachio of Iran. Agricultural Education and Extension Press, 424p.

FANI, R., M. MORADI GHAHDERIJANI, M. ALIPOUR MOGHADDAM, S. SHERAFATI, M. MOHAMMADI MOGHADDAM, E. SEDAGHATI, and P. KHODAYGAN, 2013. Efficacy of Native Strains of *Trichoderma harzianum* in Biocontrol of Pistachio Gummosis. Iranian Journal of Plant Protection Science, 44 (2): 243-252.

FATTAHI, M., A. MOHAMMADKHANI, B. SHIRAN, B. BANINASAB, R. RAVASH, and Y.GOGORCENA, 2021. Beneficial effect of mycorrhiza on nutritional uptake and oxidative balance in pistachio (*Pistacia* spp.) rootstocks submitted to drought and salinity stress. Scientia Horticulturae, 281. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.109937.

GIOVANNETTI, M. and B. MOSSE, 1980. An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. New Phytologist, 84(3): 489–500.

GROTE, D., R. SCHMIDT, and W.CLAUSSEN, 2006. Water uptake and proline index as indicators of predisposition in tomato plants to *Phytophthora nicotianae* infection as influenced by abiotic stresses. Physiological and Molecular Plant Pathology, 69(4-6): 121-130.

HAJEBRAHIMI, S. and Z. BANIHASHEMI, 2011. Host range of *Phytophthora parsiana*: a new high temperature pathogen of woody plants. Phytopathologia Mediterranea, 50: 159−165.

HARMAN, G. E., F. DONI, R. B. KHADKA, and N. UPHOFF, 2019. Endophytic strains of *Trichoderma* increase plants' photosynthetic capability. Journal of Applied Microbiology, 130(2): 529-546.

HUANG, X.Q., L.H. CHEN, W. RAN, Q.R. SHEN, and X.M. YANG, 2011. *Trichoderma* sp. Strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping off disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism. Applied Microbiology and Biotechnology, 91: 741–755.

IRIGOYEN J.J., D.W. EMERICH, and M. SANCHEZ-DIAZ,1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Journal of Plant Physiology, 84: 55-60.

JAMALI, S., N. PANJEHKEH, and A. H. MOHAMMADI, 2016. Inhibition of *Trichoderma* species from growth and zoospore production of *Phytophthora drechsleri* and their effects on hydrolytic enzymes. Journal of Nuts, 7(02): 137-148.

KALRA, Y.P. and D.G. MAYNARD. 1991. Methods Manual for Forest Soil and Plant Analysis, Northern Forestry Centre, Edmonton.125pp.

KORMANIK, P.P. and A.C. MCGRAW, 1982. Quantification of vesicular–arbuscular mycorrhizae in plant roots. In Methods andprinciples of

mycorrhizal research. Edited by N.C. Schenck. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. pp. 37–45.

LICHTENTHALER, H.K. 1987. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. Methods in Enzymology, 148: 350-382.

MARTÍNEZ-MEDINA, A., A. ROLDÁ, A. ALBACETE and J.A. PASCUAL, 2011. The Interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. Phytochemistry, 72: 223-229.

MASSON, P., T. DALIX, and S. BUSSIERE, 2010. Determination of major and trace elements in plant samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry. Communications in Soil Science and Plant Analysis, 41: 231-243.

METWALLY, R.A., 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma viride* cooperative effect on biochemical, mineral content, and protein pattern of onion plants. Journal of Basic Microbiology, 1–10.

MIRABOLFATHY, M., D. E. COOKE, J. M. DUNCAN, N. A. WILLIAMS, D. ERSHAD, and A. ALIZADEH, 2001. *Phytophthora pistaciae* sp. nov. and *P. melonis*: the principal causes of pistachio gummosis in Iran. Mycological Research, 105: 1166-1175.

MIRKHANI, F., H. ALAEI, A.H. MOHAMMADI, and M. HAGHDEL, 2016. Identification of dominant *Trichoderma* species in pistachio orchards of Kerman province. Journal of Plant Protection, 30 (1): 82-92. (In Persian)

MOHAMMADI, A.H. and Z. BANIHASHEMI, 2010a. Effect of two isolates of *Glomus mosseae* from saline and non-saline soil and NaCl level on the growth, biochemical incides and mineral composition of three pistachio rootstocks. 1. Growth and biochemical characteristics. Iranian Journal of Plant Pathology 46(1): 51-69. (In Persian with English summary)

MOHAMMADI, A.H. and Z. BANIHASHEMI, 2010b. Effect of VAM colonization in pistachio rootstocks on Growth, nutrition and Phytophthora root rot. Phytopathology, 100:S85.

MORADI, M., A.H. MOHAMMADI, M. HAGHDEL, 2017. Efficiency of Elite fungicide for control of pistachio gummosis. Journal of Nuts, 8(01): 11-20.

MOSTOWFIZADEH-GHALAMFARSA, R., D.COOKE and Z.BANIHASHEMI. 2008. *Phytophthora parsiana* sp. nov., new high-temperature tolerant species. Mycological Research, 112: 783-794.

MOSTOWFIZADEH-GHALAMFARSA, R., D.E.L. COOKE and Z. BANIHASHEMI, 2007. Development of specific PCR primers based on ribosomal and mitochondrial genome for identification of *Phytophthora drechsleri* Tucker. Asian Mycology Congress (Parkroyal Penang, Malaysia), p: 199.

MOSTOWFIZADEH-GHALAMFARSA, R., F. PANABIÈRES, Z. BANIHASHEMI and D.E.L. COOKE. 2010. Phylogenetic relationship of *Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff and *P. drechsleri* Tucker. Fungal Biology, 114(4): 325-339.

NASIR HUSSEIN, A., S. ABBASI, R. SHARIFI, and S. JAMALI, 2018. The effect of biocontrol agents consortia against Rhizoctonia root rot of common bean *Phaseolus vulgaris*. Journal of Crop Protection, 7(1): 73-85.

NORRIS, J. R., D. READ, and A.K. VARMA, 1994. Techniques for mycorrhizal research methods in microbiology. Academic Press Inc., San Diego, pp:928.

POVEDA, J. and P. BAPTISTA, 2021. Filamentous fungi as biocontrol agents in olive (*Olea europaea* L.) diseases: mycorrhizal and endophytic fungi. Crop Protection, 105672. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105672

RAJESWARI, P., 2015. Control of *Fusarium oxysporum* causing Fusarium wilt by *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas fluorescens* on *Arachis hypogaea L*. International Journal of Advanced Biotechnology Research, 6: 57 –65.

RUANO ROSA, D., and C. LOPEZ HERRERA, 2009. Evaluation of *Trichoderma* spp. as biocontrol agents against avocado white root rot. Biological Control, 51(1): 66-71.

SÁNCHEZ, A.D., M.J. OUSSET, and M.C. SOSA, 2019. Biological control of Phytophthora collar rot of pear

using regional *Trichoderma* strains with multiple mechanisms. Biological Control, 135: 124-134.

SHARMA, N., K. YADAV and A. AGGARWAL, 2016, Synergistic effect of arbuscular mycorrhizae and *Trichoderma* sp. on growth, nutrient uptake and yield of *Phaseolus mungo* L. cultivars. Journal of Trop Plant Physiology, 8: 23-31

SRIVASTAVA, M., V. KUMAR, M. SHAHID, S. PANDEY, and A. SINGH, 2016. *Trichoderma*-a potential and effective bio fungicide and alternative source against notable phytopathogens: A review. African Journal of Agricultural Research, 11: 310–316

SUKHADA, M., R. MANJULA, and R.D. RAWAL, 2011. Evaluation of arbuscular mycorrhiza and other biocontrol agents against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* infecting papaya (*Carica papaya* cv. *surya*) and enumeration of pathogen population using immune techniques. Biological Control, 58: 22-29.

TIAN, L., Y.N. ZOU, Q.S. WU, and K. KUČA, 2021. Mycorrhiza-induced defence responses in trifoliate orange infected by *Phytophthora parasitica*. Acta Physiologia Plantarum, 43(3): 1-8.

VINALE, F., K. SIVASITHAMPARAM, E .L. GHISALBERTI, R. MARRA, S. L. WOO, and M. LORITO, 2008. Trichoderma-plant-pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry Journal, 40: 1–10.

VOS, C.M., Y. YANG, B. DE CININCK, B.P.A. CAMMUE, 2014. Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. Biological Control, 74:65–81.

WANG, S., C.WAN, Y.WANG, H. CHEN, Z. ZHOU, H. FU, and E. SOSEBEE, 2004. The characteristics of Na+, K+ and free proline distribution in several drought- resistant plants of the Alxa Desert. China. Journal of Arid Environments, 56: 525–539.

YU, C., AND X. LUO, 2020. *Trichoderma koningiopsis* controls *Fusarium oxysporum* causing damping-off in *Pinus massoniana* seedlings by regulating active oxygen metabolism, osmotic potential, and the rhizosphere microbiome. Biological Control, 150: 104352.

YUAN, S., L. MEIYUN, F. ZHIYING, L. YAN, S. WEN , P. BING, W. KAI, S.H. JUNXIONG, S.H. BIAO and S.H.QIRONG, 2016. Biological control of tobacco bacterial wilt using *Trichoderma harzianum* amended bioorganic fertilizer and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae.* Biological Control, 92:164–171.

ZHENG, H.Z., KIM, Y.W., LEE, H.J., PARK, R.D., JUNG, W.J., KIM, Y.C., LEE,S.H., KIM,T.H and KIM, K.Y. 2004. Quantitative changes of PR proteins and antioxidative enzymes in response to *Glomus intraradices* and *Phytophthora capsici* in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants. Journal of Microbiology and Biotechnology, 14(3), 553-562.