

مقاله پژوهشی

تأثیر قارچ ریشه‌های آربوسکولار، *Trichoderma harzianum* و ترکیب آن‌ها بر پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه نهال‌های پسته رقم ممتاز: ویژگی‌های رشدی، تغذیه‌ای و بیوشیمیاییفاطمه شمس‌الدین سعید^۱، ناصررادمان^۲، امیرحسین محمدی^۳، عبدالحسین طاهری^۴، مهدی پیرنیا^۵

۱، ۲ و ۵- به ترتیب دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی و دانشیارهای گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه زابل، زابل، ایران؛ ۳- استادیار پژوهشکده پسته، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران؛ ۴- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

(تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۰؛ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۰)

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، نتایج نشان داد که در تیمارهای 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 ۶۷، ۶۷ 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، عناصر غذایی، 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 SAEED¹, N. RADMAN², A.H. MOHAMMADI³✉, M. PIRNIA⁴, A.H. TAHERI⁵

1, 2 and 5- PhD student and Associate Professors of Department of Plant Protection, University of Zabol Respectively;

3. Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran; 4. Associate Professor, 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*

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 کشورهای 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، نماتدها 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 Banihashemi, 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.*, 2019; Harman *et al.*, 2016).

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 ریشه‌هایی با انشعابات متعدد گسترش می‌یابند (Poveda and Baptista, 2021). تأثیر مثبت قارچ‌ریشه‌های دارسانه در افزایش مقاومت گیاهان به‌بیماری 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 *Rhizophagus* (*Funneliformis mosseae* (Syn: *Glomus mosseae*) و *irregularis* (Syn: *G. intraradices*) (KT456544) استفاده گردید. قارچ‌ریشه *F. mosseae* با کد 87-25 pri از پژوهشکده پسته (Mohammadi and Banihashemi, 2010a) و دو گونه *R. irregularis* (با شماره دسترسی KT456544) و *C. etunicatum*

جداسازی شده بود با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی-ITS (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa *et al.*, 2007) DR2 , ITS-DF2 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 (Banhashemi and Gheisi, 1995) به‌عنوان یک رقم حساس به‌پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه گزارش شده، استفاده گردید. بذرها را 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 ۴ کیلوگرمی، ۲ کیلوگرم بستره کاشت با ۱۰۰ گرم زادمایه سه گونه قارچ‌ریشه و ۴۰ گرم زادمایه *T. harzianum* (۱۰ گرم به‌ازاء هر نهال) مخلوط شده که پس از کاشت ۶ تا ۸ عدد بذر پسته و پوشاندن روی آن‌ها با خاک، وزن نهایی گلدان‌ها، ۲۶۰۰ گرم تنظیم شد. گلدان‌ها به‌روش وزنی و در حد ظرفیت زراعی با آب شهری آبیاری شده که پس از سبز شدن بذرها پسته و رشد گیاهچه‌ها تا مرحله ۴ برگ، تعداد نهال‌ها در هر گلدان به ۴ عدد کاهش داده شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای 25 ± 3 درجه سلسیوس و میزان روشنایی ۶۰۰۰ لوکس نگهداری شدند. دو ماه پس از مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های دارسانه و Th، مایه‌زنی بیمارگر روی ریشه نهال‌های پسته به‌روش حاج‌ابراهیمی و بنی‌هاشمی (Hajebrahimi and Banhashemi, 2011) انجام شد. پس از کنار زدن خاک اطراف ریشه نهال‌ها، ۱۰ میلی‌لیتر مایه تکثیر شده *P. drechsleri* به‌ازاء هر نهال پسته اطراف

به‌صورت محصول تجاری با نام میکوروت (MycoRoot) از شرکت زیست فناور پیشتاز واریان تهیه گردید. تکثیر زادمایه هر سه 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 زئوسپوره‌های *P. drechsleri* 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 ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱۰۳/۴۱ کیلوپاسکال، ده دیسک ۶ میلی‌متری از حاشیه پرگنه‌های ۴ 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 ۶۰ 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 ۶ میلی‌متری از حاشیه پرگنه‌های ۴ روزه *P. drechsleri* روی محیط کشت عصاره هشت سبزی-آگار (عصاره هشت سبزی برند Campbell's آمریکا: ۱۰۰ میلی‌لیتر، آب مقطر: ۹۰۰ میلی‌لیتر، آگار: ۱۸ گرم) (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa *et al.*, 2010) مایه‌زنی شده و به‌مدت یک‌ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند (Banhashemi and Fatehi, 1989). جدایه *P. drechsleri* مورد استفاده در این تحقیق که از طوقه درختان پسته در رفسنجان

استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Lichtenthaler, 1987).

$$a = \text{کلروفیل} = (12/25 \times A_{663}) - (2/79 \times A_{647})$$

$$b = \text{کلروفیل} = (21/5 \times A_{647}) - (5/1 \times A_{663})$$

$$\text{کلروفیل کل} = (7/15 \times A_{663}) - (18/71 \times A_{647})$$

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

اندازه‌گیری غلظت پرولین و قندهای محلول ریشه

برای محاسبه غلظت 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 ساترifiوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، ۲ میلی‌لیتر از این عصاره به همراه ۲ میلی‌لیتر ناین هیدرین اسیدی (۱/۲۵ گرم ناین هیدرین حل شده در ۳۰ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول ۶ مولار اسید فسفوریک) و ۲ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال به مدت ۱ ساعت در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس نگهداری شده و سپس به سرعت روی یخ دمای آن کاهش داده شد. پس از افزودن ۴ میلی‌لیتر 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 محاسبه شد.

برای اندازه‌گیری قندهای محلول، ۰/۵ گرم از بافت تازه ریشه با استفاده از ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد عصاره‌گیری شده و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه ساترifiوژ شد. یکصد میکرولیتر از این عصاره با سه میلی‌لیتر از آنترون تازه تهیه شده (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون به علاوه ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد) مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در حال جوشیدن قرار داده شد. پس از

ریشه‌ها ریخته شده و روی آن با خاک پوشانده شد. گلدان‌ها به مدت یک شب غرقاب شده و پس از ایجاد سوراخ در ته گلدان‌ها، آب اضافی آن‌ها خارج شد. تولید و آزادسازی زئوسپورها در زه آب 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 به عصاره شاهدانه و بدون بیمارگر مایه‌زنی شدند.

سنجش ویژگی‌های رشدی

هفت هفته پس از مایه‌زنی *P. drechsleri* (Pd)، برداشت گیاهان آغاز شد. ریشه نهال‌ها در محل طوقه از اندام هوایی جدا شده و به طور 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 به مدت ۴۸ ساعت محاسبه شد.

اندازه‌گیری غلظت عناصر غذایی در اندام هوایی

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

اندازه‌گیری غلظت و شاخص کلروفیل برگ‌ها

پس از عصاره‌گیری نیم گرم بافت تازه برگ‌ها به همراه 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 ۶۴۷ و ۶۶۳ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر خوانده شد. غلظت کلروفیل‌های a، b و کل با

به مدت 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 به وسیله Pd، درصد کلنیزاسیون بیمارگر در ریشه و طوقه محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ 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* قارچ‌های AM در ریشه نهال‌های پسته رقم ممتاز به ترتیب در ۵ و ۸ زمان مختلف پس از مایه‌زنی بیمارگر انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و نرم افزار SAS استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از قارچ‌ریشه‌های دارسانه (AM) و *T. harzianum* (Th) و ترکیب آن‌ها، می‌تواند باعث افزایش صفات رویشی نهال‌های پسته نسبت به شاهد گردد که این افزایش به استثنای ارتفاع ساقه در تیمار مایه‌زنی با Th و قطر ساقه در کلیه تیمارها، در سایر موارد دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد با شاهد بود (جدول ۱). کلیه صفات رویشی اندازه‌گیری شده در تیمار مایه‌زنی با *P. drechsleri* (Pd)، به‌طور معنی‌داری کمتر از شاهد بود که این موضوع با توجه به حساس بودن رقم ممتاز به بیماری انگومک (بنی هاشمی و غیثی، ۱۳۷۴)، کاملاً قابل انتظار بود. در تیمارهای AM+Pd، Th+Pd، 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

خنک شدن، میزان جذب در طول موج ۶۲۵ نانومتر خوانده شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوکز رسم شده و غلظت قندهای محلول بر اساس میلی‌گرم بر وزن تر ریشه محاسبه گردید (Irigoyen et al., 1992).

رنگ‌آمیزی ریشه و اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون قارچ ریشه‌های دارسانه در ریشه

برای رنگ‌آمیزی ریشه‌ها و محاسبه درصد 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 مرتبه به مدت یک ساعت در لوله‌های آزمایش حاوی هیدروکسید پتاسیم ۱۲ درصد داخل بن ماری با دمای ۹۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها ۳ مرتبه با آب مقطر شسته و به مدت ۲۰ دقیقه در آب اُکسیژنه قلیایی (۳ میلی‌لیتر NH₄OH، ۳۰ میلی‌لیتر آب اُکسیژنه ۱۰ درصد و ۵۶۷ میلی‌لیتر آب مقطر) و در دمای اتاق نگهداری شده که پس از شستشوی مجدد با آب مقطر، به مدت ۳ تا ۴ دقیقه در محلول یک درصد اسید کلریدریک نگهداری شدند. سپس نمونه‌ها بدون شستشو به محلول لاکتوفنل-اسید فوشین ۰/۱ درصد منتقل شده و به مدت ۳۵ دقیقه در حمام بن ماری با دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و پس از خنک شدن، به‌منظور رنگبری به محلول لاکتوفنل منتقل شدند. با انتخاب ۶۰ قطعه ۱ سانتی‌متری از ریشه‌ها به صورت تصادفی و قرار دادن ۱۰ عدد از آن‌ها روی هر اسلاید میکروسکوپی، درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها به وسیله قارچ‌ریشه‌ها با بزرگنمایی ۴۰۰X اندازه‌گیری شد. همچنین طول ریشه‌های کلنیزه شده نیز به روش Gridline-intersect محاسبه شد (Giovannetti and Mosse, 1980).

بیمارگر در ریشه و طوقه نهال‌ها

با شمارش تعداد نهال‌های خشک شده در هر گلدان، میزان مرگ و میر نهال‌ها محاسبه شد. تعداد ۴۰ قطعه نیم سانتی‌متری از ریشه‌های اصلی و طوقه نهال‌های پسته به صورت تصادفی جدا شده که پس از شستشو با آب شهری

در سطح ۵ درصد با تیمارهای AM و Th نشان نداد. در تیمارهای AM+Pd، AM+Th+Pd و 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 (جدول ۲). یافته‌های مختلفی حاکی از تأثیر مثبت مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های دارسانه و تریکودرما و به‌خصوص ترکیب آن‌ها بر افزایش غلظت عناصر پر مصرف، کم مصرف و کم تحرک (Cu و Zn) 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).

در سطح ۵ درصد بودند (جدول ۱). 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 Banhihashemi, 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 پر مصرف (فسفر، نیتروژن، پتاسیم، کلسیم و منیزیم) و عناصر کم مصرف (روی، آهن، منگنز و مس) در مقایسه با شاهد گردید (جدول ۲). بیشترین میزان این افزایش در تیمار AM+Th بود هرچند که این افزایش، اختلاف معنی‌داری را در

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 ^c	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}

در هر 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.

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 فتوستتوز و تولیدات آن از جمله قندهای محلول، انتقال بیشتر قندها از شاخه به ریشه و تبدیل نشاسته به قندهای محلول برای مقابله با تنش آبی از جمله دلایل افزایش غلظت قندهای محلول در اثر عوامل زیست مہار 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 به بیمارگر و فعالیت مخرب شبه‌قارچ فیتوفتورا در ایجاد پوسیدگی و اختلال در فعالیت سلول‌های ریشه باشد (Grote *et al.*, 2006).

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 فتوستتوز 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 مہار بر افزایش غلظت یون پتاسیم و نقش مهم آن در

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 ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Fe ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Mn ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Cu ($\mu\text{g g}^{-1}$)
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 ^c	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 ^e	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±0.07 ^d	21.78±3.6 ^d	95.6±2.7 ^c	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}

در هر 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 $\mu\text{mol g}^{-1}$ 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 ^e	0.48±0.33 ^e	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 ^c	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}

در هر 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.

در تیمارهای AM+Pd، AM+Th+Pd و Th+Pd، غلظت پرولین و قندهای محلول ریشه در مقایسه با تیمار Pd به‌تنهایی به‌طور معنی‌داری بالاتر بود. از آنجایی که پرولین یک اسیدآمین 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 زیست‌مهار 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، AM+Th+Pd و Th+Pd غلظت و شاخص کلروفیل به‌طور معنی‌داری بیشتر از تیمار مایه‌زنی 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 ۴ 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، کاهش معنی‌دار درصد ریشه‌های کلنیزه شده در مقایسه با تیمار AM+Th از روز چهاردهم تا انتهای آزمایش مشاهده شده در حالی که کلنیزاسیون طول ریشه تنها در روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از مایه‌زنی بیمارگر دارای اختلاف معنی‌دار با تیمار AM+Th بود (جدول ۴).

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 به تیمار 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 ۵). 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 به تیمار مایه‌زنی Pd به‌تنهایی کاهش دهد (جدول ۵). تأثیر گونه‌های مختلف تریکودرما

جدول ۴- 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.

Treatments	Days after pathogen inoculation							
	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 ^{fj}	69.3±3.1 ^{gh}	72.0±3.0 ^{efg}	73.3±3.1 ^{c-f}	77±3.6 ^{b-c}
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 ^{fj}
AM+Th	69.7±3.1 ^{gh}	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 ^{fi}	67.7±2.5 ^{fj}	67.7±3.8 ^{g-j}	60.7±3.5 ^{klm}	61.7±3.5 ^{j-m}	67.7±2.5 ^{fj}	73.0±3.0 ^{def}	77.0±3.0 ^{b-c}
	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 ^{fk}	61±2.6 ^{e-k}	61.7±2.5 ^{e-i}	63.3±2 ^{c-g}	65.3±2.5 ^{b-c}
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-c}	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 ^{fl}	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-c}	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 نهال‌های پسته ممتاز در تیمارهای *Phytophthora drechsleri* (Pd) و برهمکنش آن با قارچ‌ریشه‌های دارسانه (AM+Pd)، *Trichoderma harzianum* (Th+Pd) و ترکیب آنها (AM+Th+Pd) در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی 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.

Treatments	Days after pathogen inoculation				
	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 ^{kl}	20.7±2.5 ^{hi}	28.7±3.6 ^e
	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

میانگین‌های با 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.

معنی‌دار پژمردگی باکتریایی توتون (Yuan *et al.*, 2016)، پوسیدگی رایزوکتونایی 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

(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 به این بیمارگر از جمله گزارش‌هایی است که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. همچنین کاهش

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 به پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه را نیز افزایش داد

تشکر و قدردانی

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

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 میکروارگانسیم‌های 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).

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. D'YÉZ-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. HOSSINFARD, 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 and principles 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 indices 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 trifoliolate 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 annum* L.) plants. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14(3), 553-562.