Iranian Journal of Plant Protection Science
Vol 53, No2, Autumn and Winter 2022 (239-254)
DOI: 10.22059/IJPPS.2022.348955.1007010

دانش گیاهپزشکی ایران
دورۀ ۵۳، شمارۀ ۲، پاییز و زمستان ۱۴۰۱ (ص۲۵۴-۲۳۹)مقاله پژوهشی

تأثیر مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار بر پژمردگی ورتیسلیومی دو پایه پسته احمدآقایی و بادامی زرند: ویژگی‌های رشدی، تغذیه‌ای و بیوشیمیایی

سکینه جمالی پاقلعه[۱]، ناصررادمان[۲]، امیرحسین محمدی[۳]، مهدی پیرنیا[۴]،عبدالحسین طاهری[۵]
۱.دانشجوی دکتری گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، ایران
۲و۴. دانشیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه زابل، ایران
۳.استادیار پژوهشکده پسته، مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رفسنجان، ایران
۵. دانشیار گروه گیاه پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۱۲- تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۸/۱۶)

چکیده

پژمردگی ورتیسلیومی یکی از بیماری‌های مهم بوده که می‌تواند خسارت زیادی را به درختان پسته وارد نماید. قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار علاوه بر بهبود وضعیت رشدی گیاهان باعث افزایش تحمل به عوامل بیماریزا می‌گردند. در این تحقیق تاثیر مخلوط سه گونه قارچ‌ریشه آربوسکولار *Funneliformis mosseae*، *Rhizophagus irregularis* و *Claroideoglomus etunicatum* بر بیماری پژمردگی ورتیسلیومی دو پایه پسته احمدآقایی و بادامی زرند (به ترتیب حساس و مقاوم به بیماری) ارزیابی گردید. مایه‌زنی قارچ-ریشه‌های آربوسکولار (AM) در هنگام کاشت بذرها و مایه‌زنی بیمارگر (Vd) پس از ۵۲ روز، با استفاده از اینوکولوم تکثیر شده روی بستره ماسه-آرد جو-آب مقطر، انجام شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه‌ای کاملاً تصادفی با ۵ تکرار در گلخانه اجرا شد. نتایج نشان داد که مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار در هر دو پایه پسته وزن خشک ریشه و اندام هوایی، ارتفاع و قطر ساقه، سطح برگ، غلظت عناصر غذایی، پرولین، قندهای محلول، کلروفیل و شاخص کلروفیل را در مقایسه با گیاهان شاهد و مایه‌زنی شده با بیمارگر افزایش می‌دهد. در تیمار AM+Vd، تنها در پایه احمدآقایی حضور بیمارگر باعث کاهش درصد کلنیزاسیون قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار در مقایسه با تیمار AM گردید. در انتهای آزمایش شاخص بیماریزایی در تیمار Vd در دو پایه احمدآقایی و بادامی زرند به ترتیب ۳/۹ و ۱/۹ بود که در تیمار AM+Vd به ۳/۶ و ۱/۱ رسید که کاهش معنی‌داری را نشان می‌داد. نتایج تحقیق حاضر بیانگر این موضوع بود که مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار با بهبود خصوصیات رشدی، تغذیه‌ای و بیوشیمیایی می‌تواند باعث افزایش مقاومت نهال‌های پسته به پژمردگی ورتیسلیومی شود.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، کلروفیل، پرولین، عناصر غذایی، *Verticillium dahliae*

The effect of arbuscular mycorrhizae on Verticillium wilt of pistachio rootstocks Ahmad Aghaei and Badami Zarand: growth, nutritional and biochemical characteristics

Sakineh Jamali Paghaleh [1], Nasser Radman [2], Amir Hossein Mohammadi [3], Mahdi Pirnia [4], Abdol Hossein Taheri [5]
1. Ph.D student, Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran
2,4. Associate Professor, Department of Plant pathology, Faculty of Agriculture, University of Zabol, Iran
3. Assistant Professor, Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran
5- Associate Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
(Received: Oct, 04, 2022 - Accepted: Nov, 07, 2022)

ABSTRACT

Verticillium wilt is one of the important diseases that causes economic damage to pistachio trees. Arbuscular mycorrhizae in addition to improvement of plant growth, can increase tolerance to plant pathogens. In this research, the effect of mixture of three species of arbuscular mycorrhizal fungi, *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus irregularis* and *Claroideoglomus etunicatum* was evaluated on Verticillium wilt of pistachio rootstocks Ahmad Aghaei and Badami Zarand (susceptible and resistant to *Verticillium dahliae*, respectively). Arbuscular mycorrhizae (AM) inoculation was done at the time of sowing pistachio seeds and pathogen (Vd) inoculated after 52 days using amended inoculum on sand-barley flour-distilled water substrate. The experiment was performed as factorial in completely randomized design with 5 replications in greenhouse conditions. The results showed that the inoculation of AM increases shoot and root dry weight, stem height and diameter, leaf area, concentration of nutrients, proline, soluble sugars, chlorophyll comparison with the control and inoculated plants with the pathogen. In AM+Vd treatment, the presence of the pathogen only in Ahmad Aghaei rootstock caused a decrease in the colonization percentage of arbuscular mycorrhizal fungi comparison with the AM treatment. At the end of the experiment, the pathogenicity index in the Vd treatment was 3.9 and 1.9 in Ahmad Aghaei and Badami Zarand rootstocks respectively but in the AM+Vd treatment it reached to 3.6 and 1.1, which showed a significant decrease in disease severity. It is concluded that inoculation of AM by improving the growth, nutritional and biochemical characteristics can increase resistance of pistachio seedlings to Verticillium wilt.

Key words: Biological control, Chlorophyll, Proline, Mineral elements, *Verticillium dahliae.*

* Corresponding author E-mail: ah-mohammadi@pri.ir

مقدمه

پسته با نام علمی *Pistacia vera* L. در ۲۸ استان کشور کشت می‌شود و در سال ۱۳۹۹ با ۵۳۴ هزار هکتار سطح زیرکشت، حدود ۳۸۷ هزار تن تولید داشته است (Ahmadi *et al.*, 2020). از نظر صادرات، این محصول رتبه اول را در میان محصولات کشاورزی و صنایع غذایی داشته و در سال ۱۳۹۹ حدود ۱۳۶۶ میلیون دلار ارز وارد کشور نموده است (سازمان توسعه تجارت، ۱۳۹۹).

پژمردگی ورتیسلیومی یکی از مهمترین بیمارهای درختان پسته بوده که از باغ‌های پسته آمریکا و یونان، ایران و اسپانیا گزارش شده است (Epstein *et al.*, 2004; Mohammadi & Banihashemi, 2008; Mohammadi *et al.*, 2007; Moral *et al.*, 2010). گونه *V. dahliae* به عنوان گونه تیپ جنس *Verticillium*، عامل بروز خسارت اقتصادی به بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی میزبان در سرتاسر دنیا می‌باشد (Inderbitzin *et al.*, 2011; Kowalska, 2021). این گونه می‌تواند برای مدت حداقل ۱۴ سال و در غیاب میزبان در خاک دوام بیاورد (Inderbitzin & Subbarao, 2014). پژمردگی ورتیسلیومی عمدتاً در مناطق معتدله، با فراوانی کمتر در مناطق نیمه گرمسیری و بندرت در مناطق گرمسیری شیوع دارد (Inderbitzin *et al.*, 2011). تولید آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی و فیتوتوکسین‌ها از جمله مکانیسم‌های *V. dahliae* برای ایجاد علائم بیماری (پژمردگی و زردی برگ، قهوه‌ای شدن دسته‌های آوندی و در نهایت مرگ زودرس درخت) می‌باشد (Fradin & Thomma, 2006; Luo *et al.*, 2014). این بیمارگر با مسدود کردن آوندهای چوبی، روی انتقال آب و مواد غذایی در گیاه اثر گذاشته (Klosterman *et al.*, 2009; Shaban *et al.*, 2018) و باعث عدم تعادل آب در گیاه و علائمی مانند پژمردگی، زرد شدن برگ‌ها و در نهایت مرگ گیاه می‌شود (Temple *et al.*, 1973). در ایران پژمردگی ورتیسلیومی به عنوان یکی از بیماری‌های مهم درختان پسته از استان‌های مختلف مانند کرمان، سمنان، فارس، قزوین و خراسان گزارش شده است (Mohammadi & Banihashemi, 2008; Mohammadi *et al.*, 2007). محدودیت‌هایی مانند فعالیت بیمارگر داخل آوندهای چوبی، ممنوعیت استفاده از سموم تدخینی، غیرموثر بودن اقدامات زراعی، دامنه میزبانی وسیع و دوام طولانی مدت بیمارگر در خاک به واسطه تولید میکرواسکلروت‌های ملانین‌دار، باعث کاهش اثربخشی روش‌های کنترل بیمارگر شده است (Fradin & Thomma, 2006; Puri *et al.*, 2021; Usami *et al.*, 2017). قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار[1]، میکروارگانیسم‌های مفید خاک هستند که با ایجاد روابط همزیستی با ریشه گیاهان، علاوه بر حاصلخیزی خاک، می‌توانند تحمل گیاهان نسبت به عوامل زنده و غیرزنده را افزایش دهند (Sowik *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2020). سازوکارهای پیشنهادی برای محافظت گیاهان توسط قارچ‌ریشه‌ها در مقابل بیمارگرها عبارتند از رقابت در جذب مواد غذایی و مکان، پارازیتیسم (انگلی)، آنتی بیوز یا فعال شدن واکنش‌های دفاعی گیاه (Poveda Arias & Baptista, 2021)، تحریک رشد گیاه، مقاومت در برابر تنش‌ها و افزایش جذب فسفر (Piliarová *et al.*, 2019). القاء مقاومت سیستمیک (Bastías *et al.*, 2018; Vahabi *et al.*, 2018; Whipps, 2004)، افزایش مقاومت گیاه در مقابل بیمارگرها در نتیجه بهبود تغذیه (Karagiannidis *et al.*, 2002)، تغییر در ساختار ریشه (Pozo *et al.*, 2013; Raza *et al.*, 2022; Singh *et al.*, 2019; Vigo *et al.*, 2000) و تغییرات بیوشیمیایی در گیاه (Boutaj *et al.*, 2020a; Boutaj *et al.*, 2020b). گزارش‌های متعددی از تاثیر مثبت قارچ‌ریشه‌ها بر ویژگی‌های رشدی و تغذیه گیاهان و کاهش شدت پژمردگی ورتیسلیومی وجود دارد از آن جمله می‌توان به پژمردگی ورتیسلیومی زیتون (Boutaj *et al.*, 2019; Kapulnik *et al.*, 2010; Khrieba *et al.*, 2019)، توت فرنگی (Langendorf, 2017; Sowik *et al.*, 2016)، فلفل (Garmendia *et al.*, 2004) و پنبه (Norouzi *et al.*, 2011) اشاره کرد.

از آنجایی که تاکنون تحقیقی در مورد تاثیر قارچ-

1 :Arbuscular mycorrhizae

ریشه‌های آربوسکولار بر بیماری پژمردگی ورتیسلیومی پسته انجام نشده و با توجه به اهمیت اقتصادی پسته در ایران و خسارت ناشی از این بیماری، در پژوهش حاضر سعی شده تا تاثیر مایه‌زنی مخلوط سه گونه قارچ‌ریشه آربوسکولار *Funneliformis mosseae* (Syn: *Glomus mosseae*)، *Rhizophagus irregularis* (Syn: *G. intraradices*) و *Claroideoglomus etunicatum* (Syn: *G. etunicatum*) بر کنترل پژمردگی ورتیسلیومی در نهال های دو پایه پسته‌احمدآقایی و بادامی زرند و برخی از سازوکارهای آن در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه *Verticillium dahliae*، تعیین پاتوتایپ و تهیه زادمایه

در این مطالعه، از یک جدایه *Verticillium dahliae* که توسط محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2007) از درختان پسته رفسنجان جداسازی شده بود، استفاده گردید. این جدایه با کد IRAN 2432C در کلکسیون ملی قارچ‌های زنده ایران در موسسه تحقیقات گیاهپزشکی و با شماره دسترسی OL361776 در بانک ژن ثبت شده است. این جدایه به همراه جدایه IRAN 2430C که از درختان پسته استهبان فارس جداسازی شده بود، به مدت هفت روز در ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط Czapek Dox (Kim *et al.*, 2005) دارای دو گرم در لیتر از عصاره مخمر، عصاره مالت، پپتون و کازئین (Pérez-Artés *et al.*, 2000) کشت داده شدند که پس از برداشت توده قارچی و سه بار شستشو با آب مقطر سترون، استخراج DNA با استفاده از کیت DNG ^{TM}-Plus solution (شرکت سیناکلون) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. غلظت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (NanoDrop Technologies, USA) اندازه‌گیری شد. براساس روش مرکادو بلانکو و همکاران (Mercado-Blanco *et al.*, 2002) برای شناسایی پاتوتایپ بیمارگر از آغازگرهای D1/D2 (D1, 5'-CATGTTGCTCTGTTGACTGG-3'; D2, 5'-GACACGGTATCTTTGCTGAA-3') استفاده گردید. ساخت آغازگرها توسط شرکت سیناژن انجام شد. تکثیر DNA با استفاده از زوج آغازگرها در واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (با غلظت ۱۵-۲۰ ng/µl)، ۱ میکرولیتر از آغازگرهای اختصاصی (با غلظت ۲۰ µMol) و ۲۳ میکرولیتر محلول آماده Taq DNAPolymerase 2x Master Mix Red (Ampliqon, Denmark) بود. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Biometra, Göttingen, Germany) انجام شده و شامل مرحله واسرشت سازی اولیه به مدت چهار دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، به همراه ۳۰ چرخه شامل واسرشت سازی به مدت یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال آغازگرها به مدت یک دقیقه در دمای ۵۸ درجه سلسیوس و مرحله بسط به مدت یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. مرحله بسط نهایی به مدت شش دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود.

برای تهیه زادمایه بیمارگر از روش هوانگ و همکاران با اندکی تغییرات استفاده گردید (Huang *et al.*, 2006). در فلاسک‌های ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری، مخلوطی از ماسه بادی شسته-آرد جو-آب مقطر (۱۹۰گرم، ۱۰ گرم، ۳۰ میلی‌لیتر) ریخته شده و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱۵ پوند بر اینچ مربع استریل شدند. به هر فلاسک ارلن هشت دیسک شش میلی‌متری از حاشیه پرگنه-های هفت روزه *V. dahliae* روی محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA, Himedia) اضافه شده و به مدت یک ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد تا کلنیزاسیون بستره به صورت کامل صورت گیرد.

تهیه زادمایه قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار

مخلوط سه گونه قارچ‌ریشه آربوسکولار *Funneliformis mosseae* (Syn: *Glomus mosseae*)، *Rhizophagus irregularis* (Syn: *G. intraradices*) (با شماره دسترسی KT456544) و *Claroideoglomus*

etunicatum (Syn: *G. etunicatum*) به صورت محصول تجاری با نام میکوروت (MycoRoot) از شرکت زیست فناور پیشتاز واریان تهیه گردید. بستره حاوی سه گونه قارچ‌ریشه دارای حداقل ۱۰۰ زادمایه فعال در هر گرم (با نسبت مساوی از هر گونه) بود.

کاشت نهال‌های پسته، مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار و *Verticillium dahliae*

برای کاشت نهال‌های پسته از بذرهای دو پایه احمدآقایی و بادامی زرند (به ترتیب حساس و متحمل به پژمردگی ورتیسلیومی) استفاده شد (Hadizadeh & Banihashemi, 2005). پس از جداسازی پوست چوبی و ضدعفونی بذرهای پسته به مدت ۱۰ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد، بذرها سه مرتبه با آب مقطر سترون شسته شده و به مدت هفت ساعت در آب مقطر خیسانده شدند. بستر کاشت شامل مخلوط خاک بکر و ماسه بادی (به نسبت ۱:۱) بوده که قبل از استفاده در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت دو ساعت سترون شده بود. در هر گلدان سه کیلوگرمی، ۱/۷ کیلوگرم بستره کاشت حاوی پنج درصد (وزنی) از زادمایه سه گونه قارچ‌ریشه آربوسکولار ریخته شده و سپس هفت عدد بذر پسته روی آن قرار داده شد. روی بذرها با بستره کاشت به ارتفاع حدود سه سانتیمتر پوشانده شده و وزن نهایی گلدان‌ها، دو کیلوگرم تنظیم گردید. آبیاری گلدان‌ها در این مرحله با استفاده از آب شهری به روش وزنی و در حد ظرفیت مزرعه انجام گردید. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۳ ± ۲۵ درجه سلسیوس و شدت نور ۶۰۰۰ لوکس (ترکیب نور طبیعی و مصنوعی) به صورت ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی نگهداری شدند. پس از سبز شدن بذرها و رشد گیاهچه‌ها تا مرحله چهار برگی، در هر گلدان چهار عدد نهال یکنواخت نگهداری شده و سایر نهال‌ها همراه با ریشه از خاک بیرون آورده شدند. نهال‌ها به مدت ۵۲ روز در این شرایط نگهداری شدند. پس از تهیه نمونه‌هایی از ریشه نهال‌ها و اطمینان از کلنیزاسیون قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار، مایه‌زنی *V. dahliae* به روش هوانگ و همکاران با اندکی تغییرات انجام شد (Huang *et al.*, 2006). در ته گلدان‌های چهار کیلوگرمی، مقدار ۷۰۰ گرم بستره کاشت به ترتیب حاوی هشت و پنج درصد (وزنی/وزنی) زادمایه بیمارگر و قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار ریخته شده و سپس نهال‌های پسته به همراه خاک اطراف ریشه از گلدان‌های سه کیلویی خارج شده و به این گلدان‌ها منتقل شدند. در گلدان‌های چهار کیلوگرمی مربوط به تیمارهای شاهد، مایه‌زنی با بیماگر و قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار نیز ۷۰۰ گرم بستر کاشت ریخته شد که در تیمار شاهد، بدون زادمایه بیمارگر و قارچ‌ریشه آربوسکولار و در دو تیمار دیگر به ترتیب دارای هشت درصد وزنی زادمایه بیمارگر و پنج درصد وزنی زادمایه قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار بود. وزن نهایی گلدان‌ها در کلیه تیمارها، ۳/۱ کیلوگرم تنظیم گردید.

سنجش ویژگی‌های رشدی

چهارده هفته پس از مایه‌زنی *V. dahliae* و همزمان با ظهور نشانه‌های بیماری در نهال‌های پسته احمدآقایی 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 تا جوانه انتهایی با استفاده از خط‌کش، سطح برگ‌ها با استفاده از دستگاه اسکنر سطح برگ مدل DAC AM100 و میانگین قطر ساقه نهال‌ها در سه ناحیه پایینی، میانی و انتهایی ساقه با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه‌گیری گردید. قبل از اندازه‌گیری وزن خشک اندام هوایی و ریشه با استفاده از آون در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس و به مدت ۴۸ ساعت، مقدار دو گرم از اندام هوایی و ریشه به طور مساوی از کلیه نهال‌ها برداشت شده و برای اندازه‌گیری‌های بعدی استفاده شد.

تعیین غلظت عناصر غذایی در اندام هوایی

مقدار نیم گرم از اندام هوایی (برگ و ساقه) برای عصاره‌گیری و تعیین غلظت عناصر غذایی به روش خاکستر خشک (dry ashing) و هضم به وسیله اسیدکلریدریک (۳ نرمال) مورد استفاده قرار گرفت

(Kalra & 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 (PerkinElmer, Optima 7000 DV, USA) اندازه‌گیری شد (Masson *et al.*, 2010)

تعیین غلظت و شاخص کلروفیل برگ‌ها

برای اندازه‌گیری غلظت کلروفیل، نیم گرم بافت تازه برگ‌ها به همراه ۱۰ میلی‌لیتر استون ۸۰ درصد و نیم گرم پودر سنگ روی یخ عصاره‌گیری شده که پس از صاف کردن عصاره با کاغذ صافی (Macherey-Nagel MN 615)، میزان جذب در طول موج‌های ۶۴۷ و ۶۶۳ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر (Spectrometer PG Instruments Ltd, T80 U/VIS, England) خوانده شد. غلظت کلروفیل‌های a، b و کل با استفاده از فرمول‌های زیر محاسبه گردید (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 = $(۷/۱۵\times A_{663})-(۱۸/۷۱\times A_{647})$

با انتخاب ۱۰ عدد برگ در هر نهال از قسمت‌های مختلف، شاخص کلروفیل (Chlorophyll index) با استفاده از دستگاه کلروفیل‌متر دستی ($SPAD-502^{+}$) اندازه‌گیری شد.

تعیین غلظت پرولین و قندهای محلول ریشه

برای محاسبه غلظت پرولین بر اساس روش باتس و همکاران(Bates *et al.*, 1973)، نیم گرم بافت تازه ریشه‌ها در ۱۰ میلی‌لیتر محلول ۳ درصد سولفوسالیسیلیک اسید عصاره‌گیری شده و پس از سانتریفیوژ با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، دو میلی‌لیتر از این عصاره به همراه ۲ میلی‌لیتر ناین هیدرین اسیدی (۱/۲۵ گرم ناین هیدرین حل شده در ۳۰ میلی‌لیتر اسیداستیک گلایسیال و ۲۰ میلی‌لیتر از محلول ۶ مولار اسیدفسفوریک) و ۲ میلی‌لیتر اسیداستیک گلایسیال به مدت یک 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 میلی لیتر تولوئن و مخلوط نمودن کامل آن با عصاره، میزان جذب در طول موج ۵۲۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. پس از تهیه غلظت‌های مختلف اِل-پرولین و رسم منحنی استاندارد، غلظت پرولین بر حسب میکرومول بر گرم وزن تر ریشه محاسبه شد

(Bates *et al.*, 1973). همچنین برای تعیین غلظت قندهای محلول، پس از عصاره‌گیری نیم گرم بافت تازه ریشه در ۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد و سانتریفیوژ کردن عصاره به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه، یکصد میکرولیتر از این عصاره با سه میلی‌لیتر از آنترون تازه تهیه شده (۱۵۰ میلی‌گرم آنترون به علاوه ۱۰۰ میلی لیتر اسید سولفوریک ۷۲ درصد) مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری در حال جوشیدن قرار داده شد. پس از خنک شدن، میزان جذب در طول موج ۶۲۵ نانومترخوانده شد. منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های مختلف گلوگز رسم شده و غلظت قندهای محلول بر اساس میلی‌گرم بر وزن تر ریشه محاسبه گردید (Irigoyen *et al.*, 1992).

اندازه‌گیری درصد ریشه‌های کلنیزه شده و کلنیزاسیون طول ریشه به وسیله قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار

به منظور محاسبه درصد کلنیزاسیون قارچ‌ریشه‌ها، ابتدا ریشه‌ها با استفاده از روش تغییر یافته کورمانیک و مک گراو (Kormanik & McGraw, 1982) رنگ آمیزی شدند. در این روش ریشه‌های شسته شده با آب مقطر، در دو نوبت یک ساعته در محلول هیدروکسید پتاسیم ۱۲ درصد داخل بن ماری با دمای۹۰ درجه سلسیوس نگهداری شده و پس از سه مرتبه شستشو با آب مقطر، به مدت ۲۰ دقیقه در آب اُکسیژنه قلیایی (سه میلی‌لیتر NH_4OH، ۳۰ میلی‌لیتر آب اکسیژنه ۱۰ درصد و ۵۶۷ میلی‌لیتر آب مقطر) در

دمای اتاق نگهداری شدند. پس از این مرحله و شستشوی مجدد با آب مقطر، نمونه‌ها به مدت سه تا چهار دقیقه در محلول یک درصد اسید کلریدریک و پس از آن به مدت ۳۵ دقیقه در محلول لاکتوفنل-اسید فوشین ۰/۱ درصد در حمام بن ماری با دمای ۹۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در پایان مرحله رنگ آمیزی، نمونه‌ها پس از خنک شدن، به منظور رنگبری در محلول لاکتوفنل قرار گرفتند. با انتخاب ۶۰ قطعه یک سانتی‌متری از ریشه‌ها به صورت تصادفی و قرار دادن ۱۰ عدد از آن‌ها روی هر لام میکروسکوپی، درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها به وسیله قارچ‌ریشه‌ها با بزرگنمایی ۴۰۰X اندازه‌گیری گردید. همچنین طول ریشه‌های کلنیزه شده نیز به روش Gridline-intersect محاسبه شد (Giovannetti & Mosse, 1980). محاسبه میزان کلنیزاسیون قارچ-ریشه‌ها همزمان با مایه‌زنی بیمارگر چهار، هشت، ۱۲ و ۱۴ هفته (انتهای آزمایش) پس از مایه‌زنی بیمارگر انجام شد.

اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون بیمارگر و شاخص شدت بیماری

برای اندازه‌گیری درصد کلنیزاسیون *V. dahliae*، مطابق روش محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2007)، پس از ضدعفونی سطحی تعداد ۳۰ قطعه حداکثر پنج میلی‌متری از سه ناحیه پایینی، میانی و بالایی ساقه نهال‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد به مدت یک دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر سترون، رطوبت اضافی نمونه‌ها با استفاده از دستمال کاغذی سترون گرفته شد. این قطعات روی محیط کشت PDA حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی-بیوتیک ریفامپین کشت داده شده و پس از هشت روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، تعداد قطعات کلنیزه شده با بیمارگر یادداشت گردید (Mohammadi *et al.*, 2007). شاخص شدت بیماری با استفاده از روش مورگان و همکاران (Morgan *et al.*, 1992) با تغییراتی به شرح زیر ارزیابی گردید:

صفر: بدون نشانه‌های بیماری. ۱:پژمردگی خفیف (کمتر از ۲۰ درصد برگ‌ها)، زردی ملایم برگ‌های بالایی. ۲: پژمردگی متوسط (تا ۵۰ درصد برگ‌ها)، نکروز برگ‌های پایینی و زردی شدید برگ‌های بالایی. ۳: پژمردگی شدید (بیش از ۵۰ درصد برگ‌ها)، نکروز و ریزش برگ‌های بالایی و پایینی. ۴: مرگ گیاه.

تجزیه و تحلیل آماری

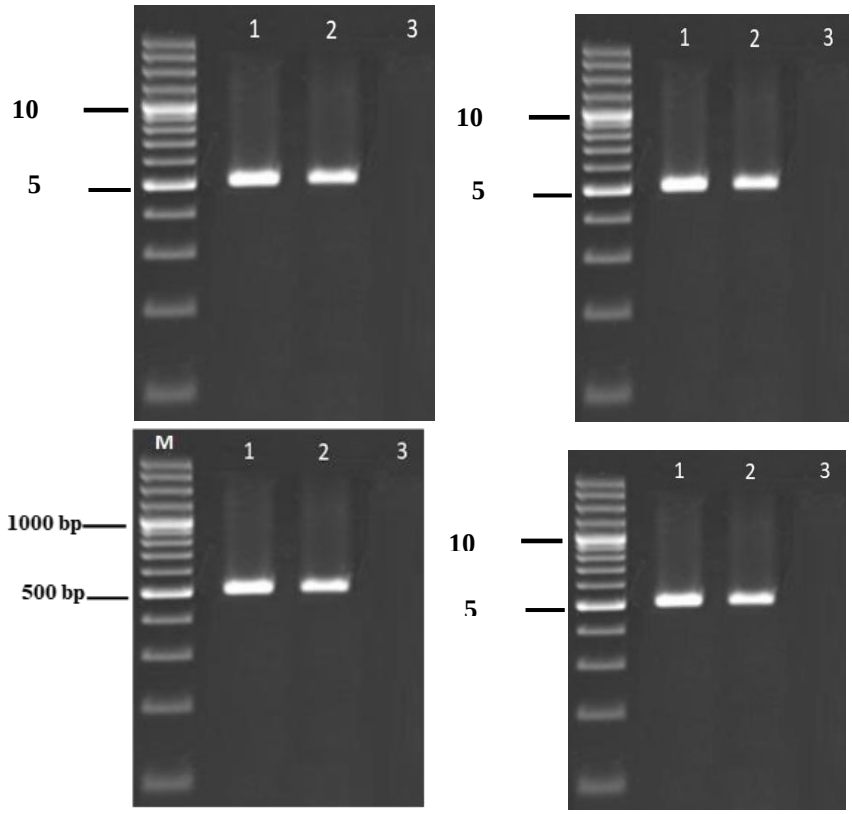
آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار در گلخانه انجام شد. تیمارهای مورد استفاده در این طرح عبارت بودند از شاهد، مایه-زنی با مخلوط قارچ‌ریشه‌ها (AM)، *V. dahlia* (Vd) و برهمکنش قارچ‌ریشه‌ها و *V. dahliae* (AM+Vd). برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد و نرم افزار SAS ver. 9.1 استفاده شد. سنجش ویژگی‌های رشدی، تغذیه‌ای، بیوشیمیایی در انتهای آزمایش و کلنیزاسیون قارچ-ریشه‌های آربوسکولار (کلنیزاسیون طول ریشه و درصد ریشه‌های کلنیزه شده) و کلنیزاسیون ساقه توسط *V. dahliae* و شاخص بیماری‌زایی در پنج زمان مختلف پس از مایه‌زنی بیمارگر انجام شد.

نتایج

همانطور که در شکل ۱ مشاهده می‌شود تکثیر DNA دو جدایه *V. dahliae* با استفاده از آغازگرهای D1/D2 منجر به تولید قطعه‌ای با طول ۵۴۸ جفت باز شد.

نتایج مطالعات گلخانه‌ای نشان داد که استفاده از قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار (AM) می‌تواند باعث افزایش معنی‌دار صفات رویشی در دو پایه پسته احمدآقایی و بادامی زرند (به ترتیب حساس و متحمل به بیماری) نسبت به شاهد شود که تنها استثنای آن قطر ساقه در پایه احمدآقایی بود که اختلاف معنی-داری را با شاهد نشان نداد (جدول ۱). مایه‌زنی *V. dahliae* موجب کاهش معنی‌دار صفات رویشی در مقایسه با شاهد در پایه احمدآقایی شد، در حالیکه در پایه بادامی زرند بیماگر نتوانست اثر معنی‌داری بر این صفات نشان دهد. ترکیب قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار و بیمارگر (AM+Vd) موجب افزایش معنی‌دار صفات

رویشی نسبت به تیمار *V. dahliae* در هر دو پایه پسته گردید.



شکل ۱. نتایج الکتروفورز محصولات PCR تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی D1/D2 روی ژل آگارُز یک درصد. M: مارکر مولکولی bp ۱۰۰، ۱ و ۲: به ترتیب پاتوتایپ برگریز جدایه‌های IRAN 2432C و IRAN 2430C، ۳: شاهد منفی

Figure 1. Electrophoresis of PCR products amplified by special primers D1/D2 on agarose gel (1%). M: DNA ladder (100 bp). 1 and 2: Defoliating pathotype of IRAN 2432C and IRAN2430C isolates, respectively, 3: Negative control

در پایه احمدآقایی صفات رویشی به استثنای قطر ساقه در تیمار ترکیب قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار و بیمارگر اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان ندادند اما در پایه بادامی زرند، وزن خشک اندام هوایی و ریشه و ارتفاع ساقه به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار شاهد بود اما دو ویژگی سطح برگ و قطر ساقه بدون اختلاف معنی‌دار با شاهد بودند (جدول ۱).

در هر دو پایه پسته، مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار (AM) موجب افزایش معنی‌دار غلظت عناصر پرمصرف در مقایسه با شاهد شد. در مقابل مایه‌زنی بیمارگر (Vd) در پایه احمدآقایی غلظت این عناصر را در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری کاهش داد اما در پایه بادامی زرند غلظت عناصر پرمصرف بدون تفاوت معنی‌دار با شاهد بود (جدول ۲). در پایه احمدآقایی، برهمکنش قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار و *V. dahliae* موجب افزایش معنی‌دار غلظت عناصر پرمصرف در مقایسه با تیمار Vd گردید اما در مقایسه با تیمار شاهد، تنها غلظت فسفر، نیتروژن و پتاسیم بدون اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد بوده و غلظت منیزیوم و کلسیم کاهش معنی‌داری را نسبت به شاهد نشان داد. در پایه بادامی زرند غلظت عناصر پرمصرف در تیمار AM+Vd، در مقایسه با شاهد و تیمار Vd به طور معنی‌دار بالاتر بود (جدول ۲).

جدول ۱. تأثیر قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار، *Verticillium dahliae* و ترکیب آن‌ها روی صفات رویشی دو پایه پسته احمدآقایی و بادامی زرند .

Table 1. Effect of arbuscular mycorrhizae, *Verticillium dahliae* and their combination on growth characteristics of pistachio rootstocks Ahmad Aghahei and Badami Zarand

Treatments	Shoot dry weight (g)	Root dry weight (g)	Stem height (cm)	Leaf area (cm^2)	Stem diameter (cm)
Ahmad Aghaei rootstock					
Control	5.30±0.35^{cd}	2.12±0.24^{de}	25.80±1.30^{bc}	122±5.25^{cd}	3.62±0.22^{cd}
AM	6.38±0.38^{b}	2.62±0.28^{bc}	29.4±1.39^{a}	132.8±5.57^{b}	3.94±0.23^{bc}
Vd	2.64±0.43^{e}	1.32±0.26^{f}	17.80±1.3^{d}	88.8±5.93^{e}	2.56±0.21^{f}
AM+Vd	4.88±0.33^{d}	1.88±0.26^{e}	24±1.14^{c}	114.8±5.93^{d}	3.24±0.25^{e}
Badami Zarand rootstock					
Control	5.52±0.41^{c}	2.4±0.23^{cd}	26.40±1.32^{b}	126.2±5.85^{bc}	3.76±0.27^{bcd}
AM	7.2±0.4^{a}	3.24±0.23^{a}	30.6±1.32^{a}	145±5.83^{a}	4.28±0.27^{a}
Vd	5.1±0.31^{cd}	2.20±0.25^{de}	25.2±1.35^{bc}	120.2±5.26^{cd}	3.58±0.22^{d}
AM+Vd	6.68±0.33^{ab}	2.84±0.32^{b}	28.80±1.28^{a}	132.8±5.17^{b}	4.04±0.23^{ab}

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. (AM:Arbuscular mycorrhizae, Vd: *Verticillium dahliae*, AM+Vd: Combination of the treatments)

جدول ۲. تأثیر قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار، *Verticillium dahliae* و ترکیب آن‌ها روی غلظت عناصر پرمصرف در اندام هوایی دو پایه پسته احمدآقایی و بادامی زرند.

Table 2. Effect of arbuscular mycorrhizae, *Verticillium dahliae* and their combination on macro-elements concentrations in shoot of pistachio rootstocks Ahmad Aghahei and Badami Zarand

Treatments	P (%)	N (%)	K (%)	Mg (%)	Ca (%)
Ahmad Aghaei rootstock					
Control	1.9 ±0.3^{c}	16.1±1.03^{de}	18.3±1.2^{cd}	8±0.9^{c}	26.2±1.5^{c}
AM	2.54±0.29^{b}	18.04±1.30^{bc}	20.92±1.36^{b}	9.66±0.82^{b}	28.9±1.32^{b}
Vd	0.9±0.28^{d}	9.52±1.36^{f}	10.20±1.14^{e}	4.02±0.82^{e}	15.18±1.66^{e}
AM+Vd	1.84±0.27^{c}	14.62±1.49^{e}	17.50±0.96^{d}	5.8±0.79^{d}	22.06±1.66^{d}
Badami Zarand rootstock					
Control	2.10±0.25^{c}	16.84±1.47^{cd}	19.70±1.19^{bc}	8.4±0.79^{c}	27.30±1.37^{bc}
AM	3.06±0.21^{a}	20.78±1.45^{a}	25.48±1.50^{a}	11.50±0.73^{a}	32.88±1.78^{a}
Vd	1.84±0.30^{c}	15.56±1.08^{de}	18.46±1.48^{cd}	7.50±0.78^{c}	25.54±1.73^{c}
AM+Vd	2.82±0.24^{ab}	19±1.34^{b}	24±1.35^{a}	10.52±0.8^{ab}	31.92±2.1^{a}

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. (AM:Arbuscular mycorrhizae, Vd: *Verticillium dahliae*, AM+Vd: Combination of the treatments)

همانگونه که در جدول ۳ مشاهده می‌شود مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار در پایه احمدآقایی نتوانست غلظت عناصر کم مصرف را در مقایسه با شاهد افزایش دهد، اما در پایه بادامی زرند تاثیر قارچ‌ریشه‌ها روی عناصر کم مصرف افزایشی و معنی‌دار بود. مایه‌زنی بیمارگر (Vd) موجب کاهش معنی‌دار غلظت عناصر کم مصرف در اندام هوایی پایه احمدآقایی در مقایسه با شاهد گردید، اما در پایه بادامی زرند غلظت این عناصر تغییر معنی‌داری را در مقایسه با شاهد نشان نداد (جدول ۳). در تیمار ترکیب قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار و *V. dahliae* (AM+Vd) غلظت عناصر کم مصرف پایه احمدآقایی در مقایسه با تیمار مایه‌زنی با بیماگر (Vd) افزایش معنی‌دار و در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌دار نشان داد. در پایه بادامی زرند تنها غلظت روی، آهن و منگنز در مقایسه با تیمارهای مایه‌زنی با بیمارگر و شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد(جدول ۳).

جدول ۳. تأثیر قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار، *Verticillium dahliae* و ترکیب آن‌ها روی غلظت عناصر کم‌مصرف در اندام هوایی دو پایه پسته احمدآقایی و بادامی زرند

Table 3. Effect of arbuscular mycorrhizae, *Verticillium dahliae* and their combination on micro-elements concentrations in shoot of pistachio rootstocks Ahmad Aghahei and Badami Zarand

Treatments	Zn ($\mu g\ g^{-1}$)	Fe ($\mu g\ g^{-1}$)	Mn ($\mu g\ g^{-1}$)	Cu ($\mu g\ g^{-1}$)
		Ahmad Aghaei rootstock		
Control	23.6±1.34^{bc}	95.2±3.5^{c}	29.2±2.3^{cd}	6.2±0.4^{bc}
AM	25.6±1.64^{b}	98.6±3.36^{c}	32.2±2.25^{bc}	6.7±0.42^{ab}
Vd	11.6±1.66^{e}	51.2±3.7^{e}	13.3±2.33^{f}	3.34±0.55^{e}
AM+Vd	20.4±1.52^{d}	79.2±3.7^{d}	20.14±2.17^{e}	4.32±0.45^{d}
		Badami Zarand rootstock		
Control	24.62±1.38^{bc}	98.2±3.7^{c}	30.4±2.3^{cd}	6.38±0.52^{bc}
AM	29.8±1.64^{a}	116±3.81^{a}	37.4±1.98^{a}	7.08±0.53^{a}
Vd	22.8±1.39^{d}	95.6±3.51^{c}	28.6±2.3^{d}	5.84±0.43^{c}
AM+Vd	28±1.44^{a}	110.6±3.29^{b}	34.4±2.3^{b}	6.46±0.5^{abc}

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. (AM:Arbuscular mycorrhizae, Vd: *Verticillium dahliae*, AM+Vd: Combination of the treatments)

معنی‌دار صفات فوق در مقایسه با شاهد شد، اما در پایه بادامی زرند، بیمارگر تاثیر معنی‌داری روی این صفات نشان نداد. در تیمار برهمکنش قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار و *V. dahliae* (AM+Vd) و در هر دو پایه پسته، غلظت پرولین، قندهای محلول، کلروفیل‌های a، b و a+b و شاخص کلروفیل در مقایسه با تیمار مایه‌زنی با *V. dahliae* (Vd) افزایش معنی‌دار نشان داد. در پایه احمدآقایی صفات فوق الذکر در مقایسه با شاهد کاهش معنی‌دار داشتند، اما در پایه بادامی زرند، این صفات در مقایسه شاهد افزایش معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۴).

در هر دو پایه پسته و در تیمار مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار (AM) با گذشت زمان درصد ریشه‌های کلنیزه شده روند افزایشی نشان داد که این افزایش در پایه‌های احمدآقایی و بادامی زرند به ترتیب از روزهای ۵۶ و ۲۸ پس از مایه‌زنی بیمارگر در مقایسه با زمان شروع مایه‌زنی با بیمارگر (روز صفر) معنی‌دار بود (جدول ۵). در پایه احمدآقایی و در تیمار ترکیب قارچ‌ریشه و بیمارگر (AM+Vd) درصد ریشه‌های کلنیزه شده با قارچ‌ریشه‌ها در روزهای ۲۸ و ۵۶ پس از مایه‌زنی بیمارگر کاهش معنی‌داری را در مقایسه با زمان شروع مایه‌زنی با بیمارگر (روز صفر) نشان داد اما در طی روزهای ۸۴ و ۹۸ پس از مایه‌زنی بیماگر این روند افزایشی و بدون اختلاف معنی‌دار با زمان شروع مایه‌زنی با بیمارگر بود. در پایه بادامی زرند ترکیب قارچ‌ریشه و بیمارگر (AM+Vd) نه تنها اثر کاهشی روی درصد ریشه‌های کلنیزه شده نداشت بلکه از روز ۵۶ تا انتهای آزمایش این روند افزایشی و دارای اختلاف معنی‌دار با زمان شروع مایه‌زنی با بیمارگر بود (جدول ۵).

درصد کلنیزاسیون طول ریشه دو پایه پسته با قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار در تیمار AM در طول آزمایش روند افزایشی داشته و اختلاف معنی‌داری را با زمان شروع مایه‌زنی با بیمارگر (روز صفر) نشان داد. در تیمار ترکیب قارچ‌ریشه و بیمارگر (AM+Vd) درصد کلنیزاسیون طول ریشه در پایه احمدآقایی در روزهای ۲۸ و ۵۶ پس از مایه‌زنی بیمارگر در مقایسه با زمان شروع مایه‌زنی کاهش معنی‌دار داشته اما پس از آن با وجود روند افزایشی همچنان بدون اختلاف معنی‌دار با زمان شروع مایه‌زنی با بیمارگر (روز صفر) بود. در پایه بادامی زرند با وجود حضور بیمارگر (تیمار AM+Vd) درصد کلنیزاسیون طول ریشه هم دارای روند افزایشی و هم دارای اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد در مقایسه با زمان شروع مایه‌زنی با بیمارگر بود (جدول ۵).

جدول۴. تأثیر قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار، *Verticillium dahliae* و ترکیب آن‌ها بر غلظت پرولین و قندهای محلول ریشه و کلروفیل a، b و a+b و شاخص کلروفیل در دو پایه پسته احمدآقایی و بادامی زرند.

Table 4. Effect of arbuscular mycorrhizae, *Verticillium dahliae* and their combination on content of proline and soluble sugar in roots and chlorophyll a,b,a+b in leaves of pistachio rootstocks Ahmad Aghahei and Badami Zarand.

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
Ahmad Aghaei rootstock						
Control	12.52±1.14^{c}	18.98±1.31^{d}	1.73±0.23^{c}	1.48±0.23^{b}	3.21±0.16^{c}	62.38±1.87^{c}
AM	14.22±1.1^{b}	22.22±1.37^{b}	2.2±0.26^{b}	1.81±0.23^{ab}	4.01±0.31^{b}	68.06±2.12^{b}
Vd	5.3±1.09^{e}	9.52±1.2^{f}	0.66±0.27^{e}	0.41±0.35^{d}	1.08±0.39^{e}	49.62±1.98^{e}
AM-Vd	10.92±1.12^{d}	16.84±1.45^{e}	1.23±0.35^{d}	1.03±0.35^{c}	2.27±0.16^{d}	58.02±1.93^{d}
Badami Zarand rootstock						
Control	13.42±1.03^{bc}	20.8±0.97^{bc}	1.76±0.27^{c}	1.50±0.27^{b}	3.27±0.30^{c}	63.64±2.06^{c}
AM	16.54±1.15^{a}	28.64±1.3^{a}	2.6±0.35^{a}	2.13±0.26^{a}	4.73±0.21^{a}	71.1±2.15^{a}
Vd	13.74±0.94^{bc}	19.52±1.15^{cd}	1.54±0.26^{cd}	1.51±0.25^{b}	3.06±0.17^{c}	62.06±2.22^{c}
AM-Vd	15.92±1.33^{a}	27.26±1.5^{a}	2.28±0.23^{ab}	2.06±0.32^{a}	4.34±0.51^{ab}	69.34±2.37ab

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. (AM:Arbuscular mycorrhizae, Vd: *Verticillium dahliae*, AM+Vd: Combination of the treatments)

جدول ۵. درصد ریشه‌های کلنیزه شده و کلنیزاسیون طول ریشه در دو پایه پسته احمدآقایی و بادامی زرند با قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار در تیمارهای مایه‌زنی با قارچ‌ریشه‌ها و ترکیب آن با *Verticillium dahliae* در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی بیمارگر.

Table 5. The percentage of colonized roots and root length colonized (%) of pistachio seedlings rootstocks Ahmad Aghaei and Badami Zarand by arbuscular mycorrhizae in AM and combination of AM and *Verticillium dahliae* treatments at different days after inoculation of pathogen.

	Days after pathogen inoculation (AM inoculation)				
Treatments	0 (52)	28 (80)	56 (108)	84 (136)	98 (150)
	Colonized root (%)				
AM (AA)	59±2.9^{hi}	62±2.5^{gh}	68±2.9^{f}	74.8±3.3^{e}	76.2±3.2^{de}
AM+Vd (AA)	60±2.8^{h}	54.2±3^{j}	55.2±2.3^{ij}	58.2±2.9^{hi}	62±3^{gh}
AM (B)	66.8±3.1^{f}	74±3^{e}	82±2.8^{bc}	87.2±3^{a}	88±3.3^{a}
AM+Vd (B)	68±2.9^{f}	65.2±3^{fg}	79.2±2.8^{cd}	84±2.8^{ab}	84.8±2.8^{ab}
	Root length colonized (%)				
AM (AA)	50.2±2.8^{k}	55.4±3.4^{ij}	61.8±3.8^{fgh}	65.2±3^{ef}	66.4±3.3^{de}
AM+Vd (AA)	49.8±3^{k}	44.8±2.8^{l}	43±3.1^{l}	51±3.3^{k}	52±3^{jk}
AM (B)	58.2±2.8^{hi}	63±3^{efg}	70±2.5^{cd}	76.2±2.9^{ab}	76.8±2.8^{a}
AM+Vd (B)	59.8±3^{gh}	55.8±2.8^{ij}	67±3^{de}	72.6±2.5^{bc}	73.4±2.4^{abc}

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. AM: Arbuscular mycorrhizae, AM+Vd: Combination of arbuscular mycorrhizae and *Verticillium dahliae*, AA: Ahmad Aghaei rootstock, B: Badami Zarand

و Vd درصد کلنیزاسیون ساقه توسط بیمارگر شاخص بیماریزایی در هر دو پایه پسته با گذشت زمان افزایش یافت. در کلیه زمان‌های نمونه برداری این دو ویژگی در پایه احمدآقایی به طور معنی‌داری بیشتر از پایه بادامی زرند بود (جدول ۶). مایه‌زنی قارچ‌ریشه-های آربوسکولار در هر دو پایه پسته موجب کاهش و شاخص Vdدرصد کلنیزاسیون ساقه توسط بیمارگر بیماریزایی گردید، به طوریکه این دو ویژگی در تیمار بود. Vd به طور معنی‌داری کمتر از تیمار AM+Vd تنها استثنای این مورد درصد کلنیزاسیون ساقه توسط در روز ۹۸ پس از مایه‌زنی بیمارگر و در پایه Vd احمدآقایی بود که اختلاف معنی‌داری میان تیمار Vd با تیمار AM+Vdمشاهده نشد.

جدول ۶. درصد کلنیزاسیون ساقه توسط بیمارگر و شاخص بیماری‌زایی در دو پایه پسته احمدآقایی و بادامی زرند در تیمارهای مایه‌زنی با *Verticillium dahliae* و ترکیب آن با قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار در روزهای مختلف پس از مایه‌زنی بیمارگر.

Table 6. The percentage colonization of the pathogen in shoot (%) and Pathogenicity index of pistachio seedlings rootstocks Ahmad Aghaei and Badami Zarand in *Verticillium dahliae* and combination of the pathogen and arbuscular mycorrhizae treatments in different days after inoculation of the pathogen.

	Days after pathogen inoculation				
Treatments	63	70	77	84	98
	Shoot colonization by pathogen (%)				
Vd (AA)	16.8±3^{g}	32.4±3.4^{e}	65.8±3.3^{c}	88.8±4^{a}	92±3.3^{a}
AM+Vd (AA)	8.4±3.2^{h}	18±3.2^{g}	42.4±3.7^{d}	74.4±3.5^{b}	89.8±3.1^{a}
Vd (B)	0^{i}	6.6±3.4^{h}	16±2.9^{g}	31.2±3^{e}	40.8±3.3^{d}
AM+Vd (B)	0^{i}	0^{i}	8±3.1^{h}	22.4±3.6^{f}	25.2±3^{f}
	Pathogenicity index (%)				
Vd (AA)	0.6±0.2^{jk}	1.70±03^{fg}	2.5±0.4^{e}	3.2±0.3^{c}	3.9±0.2^{a}
AM+Vd (AA)	0^{m}	1±0.4^{i}	1.4±0.4^{h}	2.8±0.3^{d}	3.6±0.2^{b}
Vd (B)	0^{m}	0.4±0.2^{kl}	0.9±0.2^{ij}	1.4±0.2^{gh}	1.9±0.2^{f}
AM+Vd (B)	0^{m}	0^{m}	0.2±0.1^{lm}	0.9±0.2^{ij}	1.1±0.2^{hi}

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. Vd: *Verticillium dahliae*, AM+Vd: Combination of arbuscular mycorrhizae and *Verticillium dahliae*, AA: Ahmad Aghaei rootstock, B: Badami Zarand

بحث

جدایه‌های *V. dahliae* به دو دسته برگریز (Defoliating) و غیربرگریز (Non defoliating) تقسیم می‌شوند که نشانه‌های بیماری ناشی از جدایه‌های برگریز شدیدتر از جدایه‌های غیربرگریز بوده و حتی می‌توانند موجب مرگ و میر گیاهان شوند (Mercado-Blanco *et al.*, 2002). شناسایی پاتوتایپ‌های *V. dahliae* بر اساس واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، نقش مهمی در تعیین پراکنش جدایه‌های برگریز در کوتاه‌ترین زمان ممکن داشته و به این ترتیب راهکارهای مدیریت پژمردگی ورتیسلیومی را با جلوگیری از انتشار پاتوتایپ‌های برگریز به مناطق جدید با موفقیت بیشتری همراه می‌سازد (Mercado-Blanco *et al.*, 2002; Pérez-Artés *et al.*, 2000). در ایران جعفری و همکاران با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق نشان دادند که در باغ‌های زیتون طارم هر دو نوع پاتوتایپ برگریز و غیربرگریز وجود داشته که به نظر آنها پراکندگی پاتوتایپ غیربرگریز بیشتر می‌باشد (Jafary *et al.*, 2014).

با توجه به اندازه باند ۵۴۸ جفت بازی در الکتروفورز و بر اساس تحقیقات انجام شده در اسپانیا و ایران (Mercado-Blanco *et al.*, 2002; Jafary *et al.*, 2014)، جدایه IRAN 2432C (مورد استفاده در تحقیق حاضر) و جدایه IRAN 2430C (جداشده از درختان پسته استهبان فارس) به عنوان پاتوتایپ‌های برگریز *V. dahliae* شناسایی شدند. هرچند که پراکنش پژمردگی ورتیسلیومی پسته در مناطق مختلف ایران مشخص شده (Mohammadi & Banihashemi, 2008; Mohammadi *et al.*, 2007)، اما تاکنون اطلاعی از پراکندگی پاتوتایپ‌های برگریز و غیر برگریز *V. dahliae* در باغ‌های پسته وجود نداشته و این، اولین گزارش از وجود پاتوتایپ برگریز *V. dahliae* در باغ‌های پسته ایران می‌باشد. استفاده از جدایه‌های مختلف تریکودرما برای کاهش رشد *V. dahliae* و افزایش مقاومت نهال‌های پسته به پژمردگی ورتیسلیومی (Fotoohiyan *et al.*, 2015; Jamdar *et al.*, 2013) در کنار استفاده از ارقام مقاوم و یا متحمل (Epstein *et al.*, 2004) از جمله روش‌های کاربردی برای کاهش شدت این بیماری در باغ‌های پسته می‌باشد.

نتایج تحقیق حاضر به وضوح نشان داد که مایه‌زنی بیمارگر (Vd) در پایه احمدآقایی موجب کاهش معنی‌دار صفات رویشی و غلظت عناصر پرمصرف و کم‌مصرف در مقایسه با شاهد شده در حالیکه در پایه بادامی زرند، بیماگر تاثیر معنی‌داری بر این صفات نشان نداد. این نتایج با نتایج Hadizadeh and

(Hadizadeh & Banihashemi, Banihashem 2005)در مورد پسته مطابقت داشت. همچنین مایه‌زنی بیماگر تنها در پایه احمدآقایی صفات بیوشیمیایی (غلظت پرولین، قندهای محلول، کلروفیل ها و شاخص کلروفیل) را کاهش داد این نتایج حاکی از تحمل بیشتر پایه بادامی زرند به پژمردگی ورتیسلیومی است. تاثیر V. *dahliae* بر خصوصیات رشدی و تغذیه‌ای به خصوص در ارقام گیاهی حساس در گیاهان دیگری همچون توت فرنگی، پنبه و سیب زمینی نیز گزارش شده است (Garmendia *et al.*, 2004; Norouzi *et al.*, 2011; Sowik *et al.*, 2016).

بر اساس نتایج حاضر مایه‌زنی قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار روی ریشه نهال‌های دو پایه پسته سبب بهبود خصوصیات رشدی، غلظت عناصر غذایی، پرولین، قندهای محلول، کلروفیل و شاخص کلروفیل در مقایسه با گیاهان شاهد و گیاهان مایه‌زنی شده با *V . dahliae* شد. این نتایج با نتایج حاصل از تاثیر قارچ‌ریشه‌ها روی پژمردگی فوزاریومی میخک، لوبیا، گوجه فرنگی و خیار (Atakan & Ozkaya, 2021)، (Al-Askar & Rashad, 2010))، پژمردگی ورتیسلیومی توت فرنگی و پنبه (Sowik *et al.*, 2016) و پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه پسته (Behmanesh *et al.*, 2020; Shamsaddensaeed *et al.*, 2022) مطابقت داشت. همچنین در مطالعات مختلف اثرات مثبت قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار در غیاب بیمارگرها نیز روی ویژگی‌های رشدی، تغذیه‌ای و بیوشیمیایی درختان پسته (Fattahi *et al.*, 2021) و درخت عود (Rini *et al.*, 2020)گزارش شده که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد.

ریسه‌های خارجی قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار با گسترش در خاک اطراف ریشه و نفوذ به منافذ ریز خاک که ریشه‌های گیاه قادر به نفوذ در آنها نیستند (Marulanda *et al.*, 2003) باعث افزایش جذب آب و عناصر غذایی از خاک و انتقال آن‌ها به گیاهان شده (Atakan & Ozkaya, 2021; Rini *et al.*, 2020; Tarraf *et al.*, 2017) که به دنبال آن موجب بهبود وضعیت رشدی (وزن خشک اندام هوایی و ریشه، ارتفاع و سطح برگ) و افزایش فتوسنتز می‌شوند (Sheng *et al.*, 2008). افزایش غلظت کلروفیل کل و سطح برگ منجر به افزایش فتوسنتز و سنتز ترکیبات مختلفی مانند پرولین در گیاه شده که افزایش غلظت این مواد موجب افزایش تحمل گیاه به تنش‌های آبی ناشی از فعالیت *V. dahliae* می‌گردد (Wang *et al.*, 2012).

عنصر پتاسیم نقش مهمی در افزایش تحمل گیاهان به بیمارگرهای مختلف دارد (Shuman, 1994). این عنصر علاوه بر افزایش ضخامت دیواره سلولی، به همراه قندهای محلول و پرولین جزو مواد تنظیم پتانسیل اسمزی بوده که نقش زیادی در افزایش تحمل به تنش‌های زنده (بیمارگرها) و غیرزنده (شوری و خشکی) دارد (Hao *et al.*, 2005; Wu & Xia, 2006). تنظیم فشار اسمزی در ریشه و اندام هوایی گیاهان میکوریزی از جمله مکانیسم‌های پیشنهادی برای افزایش تحمل این گیاهان به آلودگی ناشی از*V. dahliae* می‌باشد. افزایش جذب سایر عناصر مانند فسفر، ازت و منیزیوم نیز باعث بهبود وضعیت فتوسنتز و تولید متابولیت‌ها و مواد غذایی مختلف در گیاهان شده و به این ترتیب موجب افزایش مقاومت گیاه در مقابل بیمارگرها می‌شوند (Wang *et al.*, 2012). فسفر یکی از عناصر غذایی مهم در ساختار فسفولیپیدها می‌باشد که در نفوذپذیری غشاء نقش دارد و افزایش فسفر سبب کاهش ترشحات ریشه گیاه میزبان و کاهش جذب بیماگر به سمت ریشه می‌شود (Declerck *et al.*, 2002).

نتایج مطالعات انجام شده در مورد تاثیر قارچ-ریشه‌های آربوسکولار روی پرولین متناقض است. افزایش رشد گیاه، میزان فتوسنتز و تولید کربوهیدرات و پروتئین در ریشه و اندام هوایی در اثر کلنیزاسیون قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار از جمله دلایل افزایش غلظت پرولین (Rajeswari, 2015) و افزایش غلظت یون پتاسیم و نقش مهم آن در تنظیم فشار اسمزی در گیاهان (Wang *et al.*, 2012) از جمله دلایل کاهش غلظت پرولین در گیاهان میکوریزی ذکر شده است (Amaral *et al.*, 2019). افزایش میزان فتوسنتز 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 قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار می‌باشد (Metwally, 2020). در تحقیق حاضر نشان داده شد که درصد ریشه‌های کلنیزه شده و کلنیزاسیون طول ریشه در حضور و غیاب بیمارگر در مقایسه با زمان شروع مایه‌زنی با بیمارگر (روز صفر) افزایش می‌یابد. کلنیزاسیون قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار در انتهای آزمایش در پایه احمدآقایی بدون اختلاف معنی‌دار و در پایه بادامی زرند بالاتر از میزان کلنیزاسیون قارچ‌ریشه‌ها در زمان شروع مایه‌زنی با بیمارگر بود که این موضوع نشان می‌داد کلنیزاسیون این عوامل بیوکنترل در انتهای آزمایش تحت تاثیر حضور بیمارگر قرار نگرفته است هرچند که در طول آزمایش و به‌خصوص در پایه احمدآقایی درصد کلنیزاسیون قارچ‌ریشه‌ها در حضور *V. dahliae* دارای یک روند کاهشی بود. این نتایج با نتایج مطالعات مختلف در رابطه با تاثیر بیمارگرها بر کلنیزاسیون قارچ‌ریشه ها مطابقت داشت (Garmendia *et al.*, 2004). رقابت میان بیمارگر و قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار برای فضا و یا منابع غذایی گیاه، از جمله مکانیسم‌هایی است که در کاهش کلنیزاسیون این قارچ‌ریشه‌ها در ریشه گیاهان در حضور بیمارگر حتی برای یک مدت زمان کوتاه موثر می‌باشد (Vos *et al.*, 2014; Tian *et al.*, 2021). برخی از گزارش‌ها نیز حاکی از کاهش درصد کلنیزاسیون قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار در حضور *Fusarium solani* در پسته می‌باشد (Salajegheh *et al.*, 2014).

قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار با تغییر در جمعیت میکروبی ریزوسفر و رقابت با آنها برای فضا و مواد غذایی، فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی میزبان و بهبود وضعیت رشدی و تغذیه‌ای می‌توانند باعث کاهش شدت و شاخص بیماری شوند (Fu *et al.*, 2015). تعاملات بیمارگرها و قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار تحت تاثیر گونه بیمارگر، رقم میزبان و گونه قارچ‌ریشه آربوسکولار است (Kapulnik *et al.*, 2010)، به همین دلیل تاخیر در ظهور بیماری در پایه پسته مقاوم (بادامی زرند) نسبت به پایه حساس (احمد آقایی) با نتایج Sowik *et al.*, در گیاه توت‌فرنگی مطابقت دارد (Sowik *et al.*, 2016).

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع نتایج تحقیق حاضر نشان داد که استفاده از مخلوط سه قارچ‌ریشه آربوسکولار ضمن بهبود ویژگی-های رشدی، تغذیه‌ای، بیوشیمیایی، می‌تواند باعث کاهش درصد کلنیزاسیون *V. dahliae* و شاخص بیماریزایی در نهال‌های پسته گردد، بنابراین استفاده از نهال‌های پسته مایه‌زنی شده با قارچ‌ریشه‌های آربوسکولار، یکی از روش‌های کاربردی جهت مدیریت پژمردگی ورتیسلیومی در باغ‌های پسته آلوده به *V. dahliae* می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از پژوهشکده پسته، بابت فراهم نمودن شرایط اجرای این تحقیق تقدیر و تشکر می گردد.

REFERENCES

1. Ahmadi, K., Ebadzadeh, H. D., Hatami, F., Hosseinpour, R., & Abdulshahi, H. (2020). Agricultural statistics of 2019. *Ministry of Agriculture*, 3, 158.
2. Al-Askar, A., & Rashad, Y. (2010). Arbuscular mycorrhizal fungi: a biocontrol agent against common. *Plant Pathology Journal*, 9(1), 31-38.
3. Amaral, J., Pinto, G., Flores- Pacheco, J. A., DÝez- Casero, J., Cerqueira, A., Monteiro, P., MartÝn- GarcÝa, J. (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.
4. Atakan, A., & Ozkaya, H. O. (2021). Induced resistance to Fusarium wilt in carnation with mixture of mycorrhizal fungi. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30(4 A), 4217-4227.
5. Bastías, D. A., Alejandra Martínez- Ghersa, M., Newman, J. A., Card, S. D., Mace, W. J., & Gundel, P. E. (2018). The plant hormone salicylic acid interacts with the mechanism of anti- herbivory conferred by fungal endophytes in grasses. *Plant, Cell & Environment*, 41(2), 395-405.
6. Bates, L. S., Waldren, R. P., & Teare, I. (1973). Rapid determination of free proline for water-stress

studies. *Plant and Soil*, 39(1), 205-207.
7. Behmanesh, Z., Alaei, H., Mohammadi, A. H., & Dashti, H. (2020). 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.
8. Boutaj, H., Chakhchar, A., Meddich, A., Wahbi, S., Alaoui-Talibi, E., Douira, A., El Modafar, C. (2020a). Bioprotection of olive tree from Verticillium wilt by autochthonous endomycorrhizal fungi. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(3), 349-357.
9. Boutaj, H., Meddich, A., Chakhchar, A., Wahbi, S., El Alaoui-Talibi, Z., Douira, A., El Modafar, C. (2020b). Arbuscular mycorrhizal fungi improve mineral nutrition and tolerance of olive tree to Verticillium wilt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53(13-14), 673-689.
10. Boutaj, H., Meddich, A., Wahbi, S., Moukhli, A., El Alaoui-Talibi, Z., Douira, A., El Modafar, C. (2019). Effect of Arbuscular Mycorrhizal Fungi on Verticillium wilt development of olive trees caused by *Verticillium dahliae*. *Research Journal of Biotechnology Vol*, 14, 8.
11. Bradstreet, R. B. (1954). Kjeldahl method for organic nitrogen. *Analytical Chemistry*, 26(1), 185-187.
12. Declerck, S., Risède, J.-M., Rufyikiri, G., & Delvaux, B. (2002). Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on severity of root rot of bananas caused by *Cylindrocladium spathiphylli*. *Plant Pathology*, 51(1), 109-115.
13. Epstein, L., Beede, R., Kaur, S., & Ferguson, L. (2004). Rootstock effects on pistachio trees grown in *Verticillium dahliae*-infested soil. *Phytopathology*, 94(4), 388-395.
14. Fattahi, M., Mohammadkhani, A., Shiran, B., Baninasab, B., Ravash, R., & Gogorcena, Y. (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, 109937.
15. Fotoohiyan, Z., Rezaee, S., Shahidi Bonjar, G. H., Mohammadi, A., & Moradi, M. (2015). Induction of Systemic Resistance by *Trichoderma harzianum* Isolates in Pistachio Plants in-Fected with *Verticillium dahliae*. *Journal of Nuts*, 6(02), 95-111.
16. Fradin, E. F., & Thomma, B. P. (2006). Physiology and molecular aspects of Verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo- atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7(2), 71-86.
17. Fu, X., Yang, F., Wang, J., Di, Y., Dai, X., Zhang, X., & Wang, H. (2015). Understory vegetation leads to changes in soil acidity and in microbial communities 27 years after reforestation. *Science of the Total Environment*, 502, 280-286.
18. Garmendia, I., Goicoechea, N., & Aguirreolea, J. (2004). Effectiveness of three *Glomus species* in protecting pepper *(Capsicum annuum* L.) against Verticillium wilt. *Biological Control*, 31(3), 296-305.
19. Giovannetti, M., & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist*,84(3), 489-500.
20. Hadizadeh, I., & Banihashemi, Z. (2005). Reaction of *Pistacia vera* cultivars to *Verticillium dahliae* the causal agent of vascular-wilt. *Plant Pathology*, 41(4), 561-581 [in farsi].
21. Hao, Z., Christie, P., Qin, L., Wang, C., & Li, X. (2005). Control of Fusarium wilt of cucumber seedlings by inoculation with an arbuscular mycorrhical fungus. *Journal of Plant Nutrition*, 28(11), 1961-1974.
22. Huang, J., Li, H., & Yuan, H. (2006). Effect of organic amendments on Verticillium wilt of cotton. *Crop Protection*, 25(11), 1167-1173.
23. Inderbitzin, P., Bostock, R. M., Davis, R. M., Usami, T., Platt, H. W., & Subbarao, K. V. (2011). Phylogenetics and taxonomy of the fungal vascular wilt pathogen *Verticillium*, with the descriptions of five new species. *PloS one*, 6(12), e28341.
24. Inderbitzin, P., & Subbarao, K. V. (2014). *Verticillium* systematics and evolution: how confusion impedes Verticillium wilt management and how to resolve it. *Phytopathology*, 104(6), 564-574.
25. Irigoyen, J., Einerich, D., & Sánchez- Díaz, M. (1992). Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*, 84(1), 55-60.
26. Jafary, H., Khanmohammadi, S., & Mehri, N. (2014). Detection of pathotypes of *Verticillium dahliae*, the causal agent of olive Verticillium wilt in olive orchards of Tarom using Nested-PCR technique. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, 2(2), 47-58.
27. Jamdar, Z., Mohammadi, A., & Mohammadi, S. (2013). Study of Antagonistic Effects of *Trichoderma* Species on Growth of *Verticillium dahliae*, the Causal Agent of Verticillium Wilt of Pistachio under Laboratory Condition. *Journal of Nuts*, 4(4), 53-56.
28. Kalra, Y. P., & Maynard, D. G. (1991). *Methods manual for forest soil and plant analysis* (Vol. 319). Du Service Canadien Des Forêts.

29. Kapulnik, Y., Zipori, I., Hazanovsky, M., Wininger, S., & Dag, A. (2010). Effect of AMF application on growth, productivity and susceptibility to Verticillium wilt of olives grown under desert conditions. *Symbiosis*, 52(2), 103-111.
30. Karagiannidis, N., Bletsos, F., & Stavropoulos, N. (2002). Effect of Verticillium wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings. *Scientia Horticulturae*, 94(1-2), 145-156.
31. Khrieba, M. I., Sharifnabi, B., & Zangeneh, S. (2019). Interaction between arbuscular mycorrhiza fungi (AMF) with *Verticillium dahliae* Kleb. on olive tree under greenhouse conditions. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 6(3), 185-191.
32. Kim, Y., Xiao, C., & Rogers, J. (2005). Influence of culture media and environmental factors on mycelial growth and pycnidial production of *Sphaeropsis pyriputrescens*. *Mycologia*, 97(1), 25-32.
33. Klosterman, S. J., Atallah, Z. K., Vallad, G. E., & Subbarao, K. V. (2009). Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. *Annual Review of Phytopathology*, 47, 39-62.
34. Kormanik, P. P., & McGraw, A. (1982). Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, Minnesota, 37–45.
35. Kowalska, B. (2021). Management of the soil-borne fungal pathogen–*Verticillium dahliae* Kleb. causing vascular wilt diseases. *Journal of Plant Pathology*, 103(4), 1185-1194.
36. Langendorf, B. (2017). *Arbuscular mycorrhizal fungi pre-colonisation for improving the growth and health of strawberry (Fragaria x ananassa)* University of York].
37. Lichtenthaler, H. K. (1987). [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In *Methods in Enzymology*, 148, 350-382. Elsevier.
38. Luo, X., Xie, C., Dong, J., Yang, X., & Sui, A. (2014). Interactions between *Verticillium dahliae* and its host: vegetative growth, pathogenicity, plant immunity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 6921-6932.
39. Marulanda, A., Azcon, R., & Ruiz- Lozano, J. M. (2003). Contribution of six arbuscular mycorrhizal fungal isolates to water uptake by *Lactuca sativa* plants under drought stress. *Physiologia Plantarum*, 119(4), 526-533.
40. Masson, P., Dalix, T., & Bussiere, S. (2010). Determination of major and trace elements in plant samples by inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 41(3), 231-243.
41. Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Pérez-Artés, E., & Jiménez-Díaz, R. M. (2002). Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology*, 108(1), 1-13.
42. 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*, 60(8), 712-721.
43. Mohammadi, A., & Banihashemi, Z. (2008). Effect of different levels of sodium chloride on Verticillium wilt disease of pistachio in water culture environment. *Isfahan University of Technology*, 12(45), 239-248[in farsi].
44. Mohammadi, A., Banihashemi, Z., & Maftoun, M. (2007). Interaction between salinity stress and Verticillium wilt disease in three pistachio rootstocks in a calcareous soil. *Journal of Plant Nutrition*, 30(2), 241-252.
45. Moral, J., López-Escudero, F., Roca, L., Blanco-López, M., & Trapero, A. (2010). First report of Verticillium wilt of Pistachio caused by *Verticillium dahliae* in spain. *Plant Disease*, 94(3), 382-382.
46. Morgan, D., Epstein, L., & Ferguson, L. (1992). Verticillium wilt resistance in pistachio rootstock cultivars: assays and an assessment of two interspecific hybrids. *Plant Disease*, 76(3), 310-313.
47. Norouzi, K., Jalil, K., & Youbert, G. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi and biological control of Verticillium-wilted cotton plants. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44(10), 933-942.
48. Pérez-Artés, E., García-Pedrajas, M. D., Bejarano-Alcázar, J., & Jiménez-Díaz, R. M. (2000). Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. *European Journal of Plant Pathology*, 106(6), 507-517.
49. Piliarová, M., Ondreičková, K., Hudcovicová, M., Mihálik, D., & Kraic, J. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi–their life and function in ecosystem. *Agriculture (Pol'nohospodárstvo)*, 65(1), 3-15.
50. Poveda Arias, J., & Baptista, P. (2021). Filamentous fungi as biocontrol agents in olive (*Olea europaea* L.) diseases: mycorrhizal and endophytic fungi. *Crop Protection*, 146(2021), 105672
51. Pozo, M. J., Jung, S. C., Martínez-Medina, A., López-Ráez, J. A., Azcón-Aguilar, C., & Barea, J.-M. (2013). Root allies: arbuscular mycorrhizal fungi help plants to cope with biotic stresses. In *Symbiotic Endophytes* (pp. 289-307). Springer.

52. Puri, K. D., Hu, X., Gurung, S., Short, D. P., Sandoya, G. V., Schild, M., Klosterman, S. J. (2021). *Verticillium klebahnii* and *V. isaacii* Isolates Exhibit Host-dependent Biological Control of Verticillium Wilt Caused by *V. dahliae*. *Phyto Frontiers™*, 1(4), 276-290.
53. 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 and Research*, 6, 57-65.
54. Raza, S., Akhter, A., Wahid, F., Hashem, A., & Abd_Allah, E. (2022). *Rhizophagus intraradices* and tomato-basil companionship affect root morphology and root exudate dynamics in tomato under Fusarium wilt disease stress. *Applied Ecology and Environmental Research*, 20(1), 235-249.
55. Rini, M. V., Susilowati, E., Riniarti, M., & Lukman, I. (2020). Application of *Glomus* sp. and a mix of *Glomus* sp. with *Gigaspora* sp. in improving the Agarwood (*Aquilaria malaccensis* Lamk.) seedling growth in Ultisol soil. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 449, 1-6.
56. Salajegheh, F., Mahdi, S., & Hamid, M. (2014). The effect of mycorrhizal fungus *Glomus* sp. on the growth and root rot disease of beans Pistachio caused by *Fusarium solani* in greenhouse conditions. *Journal of Soil Biology*, 2(2), 126-136 [in farsi].
57. Shaban, M., Miao, Y., Ullah, A., Khan, A. Q., Menghwar, H., Khan, A. H., Zhu, L. (2018). Physiological and molecular mechanism of defense in cotton against *Verticillium dahliae*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 125, 193-204.
58. Shamsaddensaeed, F., Radman, N., Mohammadi, A. H., Pirnia, M., & Taheri, A. H. (2022). The effect of arbuscular mycorrhizas, *Trichoderma harzianum* and their combination on Phytophthora root rot of pistachio seedlings cv. Momtaz: growth, nutritional and biochemical characteristics. *Applied Entomology and Phytopathology*, 89(2), 243-255.
59. Sheng, M., Tang, M., Chen, H., Yang, B., Zhang, F., & Huang, Y. (2008). Influence of arbuscular mycorrhizae on photosynthesis and water status of maize plants under salt stress. *Mycorrhiza*, 18(6), 287-296.
60. Shuman, S. (1994). Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(51), 32678-32684.
61. Singh, V., Naveenkumar, R., & Muthukumar, A. (2019). Arbuscular mycorrhizal fungi and their effectiveness against soil borne diseases. *Management*, 183, 199.
62. Sowik, I., Borkowska, B., & Markiewicz, M. (2016). The activity of mycorrhizal symbiosis in suppressing Verticillium wilt in susceptible and tolerant strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) genotypes. *Applied Soil Ecology*, 101, 152-164.
63. Tarraf, W., Ruta, C., Tagarelli, A., De Cillis, F., & De Mastro, G. (2017). Influence of arbuscular mycorrhizae on plant growth, essential oil production and phosphorus uptake of *Salvia officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 102, 144-153.
64. Temple, S. H., DeVay, J., & Forrester, L. L. (1973). Temperature effects upon development and pathogenicity of defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* in leaves of cotton plants. *Phytopathology*, 63, 953-958.
65. Usami, T., Momma, N., Kikuchi, S., Watanabe, H., Hayashi, A., Mizukawa, M., Ohmori, Y. (2017). Race 2 of *Verticillium dahliae* infecting tomato in Japan can be split into two races with differential pathogenicity on resistant rootstocks. *Plant Pathology*, 66(2), 230-238.
66. Vahabi, K., Reichelt, M., Scholz, S. S., Furch, A. C., Matsuo, M., Johnson, J. M., Oelmüller, R. (2018). *Alternaria brassicae* induces systemic jasmonate responses in Arabidopsis which travel to neighboring plants via a *Piriformsopora indica* hyphal network and activate abscisic acid responses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 626.
67. Vigo, C., Norman, J., & Hooker, J. (2000). Biocontrol of the pathogen *Phytophthora parasitica* by arbuscular mycorrhizal fungi is a consequence of effects on infection loci. *Plant Pathology*, 49(4), 509-514.
68. Wang, C., Li, X., & Song, F. (2012). Protecting cucumber from Fusarium wilt with arbuscular mycorrhizal fungi. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 43(22), 2851-2864.
69. Whipps, J. M. (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*, 82(8), 1198-1227.
70. Wu, Q.-S., & Xia, R.-X. (2006). Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology*, 163(4), 417-425.
71. Zhou, J., Chai, X., Zhang, L., George, T. S., Wang, F., & Feng, G. (2020). Different arbuscular mycorrhizal fungi colonizing on a single plant root system recruit distinct microbiomes. *Msystems*, 5(6), e00929-00920.