Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)

49(1), Spring, 2026

10.22055/ppr.2026.51861.1885

Efficacy of effective microorganisms, humic Acid, and *Peribacillus frigoritolerans* on reducing bacterial leaf blight of rice under field conditions

J. Hematzadeh[1], R. Rezaei[2]*, H. Chadegani[2], F. Ghaderi[2]

1. M.Sc. graduate of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Iran
2. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Yasouj University, Iran (rrezaei@yu.ac.ir)

Received: 17 February 2026 Revised: 3 June 2026 Accepted: 8 June 2026

Abstract

Background and Objective

Bacterial leaf blight of rice, caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo)*, is one of the most destructive and economically significant diseases of this globally strategic crop. The disease is widely distributed in major rice-growing regions and can cause severe yield losses, especially under warm and humid environmental conditions that favor rapid pathogen multiplication and spread. Given the essential role of rice in global food security, developing sustainable and effective management strategies for bacterial leaf blight remains a key priority in modern plant protection. Even though chemical control measures have traditionally been used to lower disease incidence, their repeated application is associated with limitations such as inconsistent efficacy, emergence of resistant pathogen strains, environmental contamination, and negative impacts on non-target beneficial microorganisms. Thus, increasing attention has been directed toward alternative approaches that boost plant defense capacity and promote biological suppression of pathogens. In this context, the present study aimed to ascertain the efficacy of natural growth stimulants and biological agents in the management of bacterial leaf blight under field conditions.

Materials and Methods

In this study, the effects of various treatments, including humic acid, effective microorganisms (EM), and the antagonistic bacterium *Peribacillus frigoritolerans*, were appraised on four rice cultivars (Fajr, Hashemi, Setayesh, and Shirudi) under natural field conditions. These cultivars represent commonly cultivated varieties with different levels of susceptibility and agronomic characteristics. The experiment was undertaken as a factorial arrangement based on a randomized complete block design with four replications to ensure reliable statistical comparison of treatment effects. The treatments were applied ten days after transplanting the seedlings to allow proper establishment of the plants. The pathogenic bacterium was inoculated seven days after treatment application to ascertain the preventive and protective effects of the applied treatments against subsequent pathogen challenge. The population dynamics of the bacterium within leaf tissues were measured on days 1, 5, 10, 15, and 20 post-inoculation to monitor bacterial colonization, multiplication, and persistence over time. Disease severity was assessed 30 days following inoculation based on the mean length of necrotic lesions on infected leaves, providing a quantitative indicator of disease development as well as host response.

Results

The results revealed that treatment efficacy varied depending on both cultivar and assessment time. The combined treatment of humic acid and EM consistently and significantly ($p \leq 0.01$) diminished the *Xoo* population and necrotic lesion length compared to the pathogen-inoculated control in the Fajr, Hashemi, and Setayesh cultivars. This reduction was sustained across multiple sampling intervals, suggesting a stable suppressive influence on bacterial growth within plant tissues. The combined application was therefore identified as the most effective treatment strategy among those appraised in this study. Humic acid treatment alone also exhibited significant efficacy in the Fajr and Hashemi cultivars, reflecting its potential role in stimulating plant growth, improving nutrient uptake, and enhancing defense-related physiological responses. EM treatment alone presented an inhibitory effect only at specific time points and primarily in the Setayesh cultivar, suggesting that its performance may depend on the host genotype or environmental conditions. The *P. frigoritolerans* treatment failed to control the disease significantly in any of the cultivars under the conditions of this experiment, as no meaningful reduction was observed in bacterial population or lesion length when compared to the inoculated control.

Discussion

The integrated application of humic acid and EM, as a sustainable and environmentally friendly strategy, presents high potential for managing bacterial leaf blight in susceptible rice cultivars. The enhanced effectiveness of the combined treatment may be attributed to ameliorated plant vigor, stimulation of host defense mechanisms, as well as favorable modulation of the rhizosphere microbial community, which together may limit pathogen establishment and disease progression under field conditions. Further, the synergistic interaction between these components may boost physiological resilience and improve overall plant performance during pathogen stress. This approach, by enhancing overall plant and rhizosphere health, can serve as a suitable alternative for lowering reliance on chemical methods in rice disease management programs and may contribute to more resilient as well as sustainable production systems in intensive rice-growing regions.

Keywords: Biotic stress, Plant health, Sustainable agriculture, Integrated disease management

Associate editor: S. Baghaee-Ravari (Ph.D.)

Citation: Hematzadeh, J., Rezaei, R., Chadegani, H. & Ghaderi, F (2026**).** Efficacy of effective microorganisms, humic Acid, and *Peribacillus frigoritolerans* on reducing bacterial leaf blight of rice under field conditions. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 49*(1), 147-164. https://doi.org/10.22055/ppr.2026.51861.1885

گیاه‌پزشکی (مجله علمی کشاورزی)
جلد ۴۹، شماره ۱، بهار ۱۴۰۵
10.22055/ppr.2026.51861.1885

کارآیی میکروارگانیسم‌های موثر، هیومیک اسید و باکتری *Peribacillus frigoritolerans* بر کاهش بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج در شرایط مزرعه

جعفر همت زاده[۱]، رسول رضائی[۲]*، حبیب‌اله چادگانی[۲]، فریبا قادری[۲]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران
۲- * **نویسنده مسوول**: دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۱/۲۸ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۵/۰۳/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۱۸

چکیده

بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج، ناشی از (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های این محصول راهبردی جهانی است. با توجه به محدودیت‌های روش‌های کنترل شیمیایی، این پژوهش با هدف ارزیابی کارایی محرک‌های رشد طبیعی و عوامل بیولوژیک در مدیریت این بیماری انجام شد. در این مطالعه اثر تیمارهای مختلف شامل هیومیک اسید، میکروارگانیسم‌های مؤثر (EM) و باکتری آنتاگونیست *Peribacillus frigoritolerans* بر چهار رقم برنج شامل ارقام فجر، هاشمی، ستایش، شیرودی به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی و در چهار تکرار در شرایط مزرعه ارزیابی شد. تیمارهای مورد آزمایش ۱۰ روز پس از انتقال نشاء، اعمال شدند و مایه‌زنی با باکتری *Xoo*، هفت روز بعد انجام شد. میزان جمعیت باکتری درون بافت برگ در روزهای ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ پس از مایه‌زنی و شدت بیماری بر اساس میانگین طول لکه نکروز روی برگ، ۳۰ روز پس از مایه‌زنی بیمارگر اندازه‌گیری شد. تیمار ترکیبی هیومیک اسید و EM به عنوان موثرترین روش، در سه رقم فجر، هاشمی و ستایش به طور پیوسته و معنی‌داری ($p\leq0.01$) باعث کاهش جمعیت *Xoo* و طول لکه نکروز نسبت به شاهد بیمارگر شد. تیمار هیومیک اسید به تنهایی نیز در ارقام فجر و هاشمی کارایی معنی‌داری داشت. تیمار EM در برخی زمان‌ها و در رقم ستایش اثر بازدارندگی نشان داد. تیمار باکتری *P. frigoritolerans* در هیچ یک از ارقام نتوانست بیماری را به طور معنی‌داری کنترل کند. کاربرد تلفیقی هیومیک اسید و EM به عنوان یک راهکار پایدار و سازگار با محیط‌زیست، پتانسیل بالایی برای کاهش معنی‌دار بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج در ارقام حساس دارد. این رویکرد می‌تواند با تقویت سلامت گیاه و ریزوسفر، جایگزین مناسبی برای کاهش وابستگی به روش‌های شیمیایی باشد.

کلیدواژه‌ها: تنش زیستی، سلامت گیاه، کشاورزی پایدار، مدیریت تلفیقی

دبیر تخصصی: دکتر ساره بقائی راوری

مقدمه

برنج با نام علمی *Oryza sativa* L به عنوان یکی از قدیمی‌ترین و مهم‌ترین غلات کشت شده در جهان، غذای اصلی بیش از نیمی از جمعیت کره زمین را تشکیل می‌دهد (Civáň & Brown, 2018; Qiu et al., 2025). این گیاه که منشأ آن به گونه وحشی *O. rufipogon* Griff بازمی‌گردد، ستون اصلی امنیت غذایی در بسیاری از کشورهای در حال توسعه، به ویژه در قاره آسیا است به طوری که حدود ۹۵ درصد از تولید جهانی آن در این منطقه متمرکز است (Rathna Priya et al., 2019). در ایران نیز برنج از جایگاه اقتصادی و فرهنگی ویژه‌ای برخوردار است و استان‌های شمالی کشور، به ویژه گیلان و مازندران، بیش از ۷۵ درصد از سطح زیر کشت و ۸۰ درصد از تولید ملی این محصول را به خود اختصاص داده‌اند. با افزایش مداوم تقاضا، حفاظت از این محصول در برابر عوامل خسارت‌زای زیستی از اولویت‌های تحقیقاتی محسوب می‌شود. در این میان، بیماری سوختگی باکتریایی برگ، که عامل آن باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae (Xoo)* است، به عنوان یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های برنج در دنیا شناخته می‌شود (Buddhachat et al., 2021). این باکتری که اولین بار در قرن نوزدهم در ژاپن شناسایی شد، امروزه در تمامی مناطق کشت برنج از جمله ایران حضور دارد (Sakthivel et al., 2001). باکتری *Xoo* یک بیمارگر آوندی تخصص‌یافته است که از طریق روزنه‌های آبی یا زخم‌ها به بافت میزبان نفوذ کرده و در فضای بین سلولی و سپس در آوندهای چوبی تکثیر می‌شود. تولید حجم زیادی از پلی‌ساکاریدهای برون‌سلولی [۱] و آنزیم‌های تخریب‌کننده بافت، باعث انسداد آوندها و ظهور علائم بیماری می‌شود. این علائم به صورت نوارهای آب‌سوخته از نوک و حاشیه برگ‌ها شروع می‌شود و به تدریج گسترش می‌یابد. قسمت‌های آب‌سوخته زرد و سپس سفید می‌شوند و در نهایت منجر به خشکیدگی کامل برگ و خسارت شدید به محصول می‌گردند (Nino-Liu et al., 2006). شیوع این بیماری می‌تواند ۶۰ تا ۷۰ درصد از عملکرد را کاهش دهد که تهدیدی جدی برای ثبات تولید برنج محسوب می‌شود (Wang et al., 2025). مدیریت پایدار این بیماری همواره با دشواری‌هایی همراه بوده است. اگرچه استفاده از ارقام مقاوم (Akbari et al., 2019) مؤثرترین روش کنترل بلندمدت است، اما تنوع ژنتیکی بالا و وجود سویه‌های متعدد از باکتری بیمارگر، دوام مقاومت را کاهش می‌دهد (Li et al., 2025). از سوی دیگر، کنترل شیمیایی متکی بر آنتی‌بیوتیک‌ها و ترکیبات مسی، به دلایلی از جمله ظهور سویه‌های مقاوم، مخاطرات زیست‌محیطی ناشی از باقیمانده سموم، هزینه بالا و نگرانی‌های مربوط به سلامت انسان و دام، نمی‌تواند به عنوان راهکاری پایدار و مطلوب تلقی شود (McManus et al., 2002: Islam et al., 2024). این محدودیت‌ها، محققان را به سمت جست‌وجو و توسعه راهکارهای جایگزین، سازگار با محیط‌زیست و ایمن سوق داده است (Teja et al., 2025). در این چارچوب، مهار زیستی با استفاده از میکروارگانیسم‌های مفید و کاربرد محرک‌های رشد طبیعی، به عنوان رویکردی امیدوارکننده مطرح شده‌اند (Gnanamanickam, 2009; Bonaterra et al., 2022). یکی از این ترکیبات، میکروارگانیسم‌های مؤثر [۲] (EM) است که شامل مجموعه‌ای از باکتری‌های اسیدلاکتیک، باکتری‌های فتوسنتزکننده و مخمرها می‌باشد. این میکروارگانیسم‌ها با سازوکارهای چندگانه‌ای مانند رقابت با عوامل بیماری‌زا، تولید مواد ضد میکروبی، بهبود ساختمان خاک، افزایش در دسترس بودن مواد غذایی و القای مقاومت سیستمیک در گیاه، نه تنها رشد گیاه را تسهیل می‌کند، بلکه توانایی آن را برای مقابله با تنش‌های زیستی از جمله بیماری‌ها افزایش می‌دهد (Szymanek et al., 2020). مطالعات نشان داده‌اند که کاربرد EM می‌تواند به بهبود سلامت خاک و کاهش بروز بیماری‌های خاک‌زاد و برگی کمک کند (Li et al., 2024). ترکیب دیگر، هیومیک اسید است، یک ترکیب پیچیده آلی که از تجزیه بقایای گیاهی و جانوری در خاک تشکیل می‌شود. این ماده

[۱] Extracellular polysaccharides

[۲] Effective microorganisms

با تأثیر مثبت بر ویژگی‌های فیزیکی (بهبود ساختمان و نفوذپذیری)، شیمیایی (افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی و بافری) و بیولوژیکی (تحریک فعالیت میکروارگانیسم‌های مفید) خاک، بستر مناسبی برای رشد ریشه فراهم می‌کند (Charehgani, 2020). در سطح فیزیولوژیک، هیومیک اسید جذب عناصر غذایی به ویژه فسفر و ریز مغذی‌ها را افزایش داده، فعالیت آنزیم‌های کلیدی، سنتز کلروفیل و نرخ فتوسنتز را تحریک می‌کند و با افزایش تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، مقاومت گیاه را در برابر تنش‌ها بهبود می‌بخشد (Dungait et al., 2012). این اثرات ترکیبی منجر به افزایش رشد رویشی و زایشی گیاه می‌شود. رویکرد دیگر، بهره‌گیری از باکتری‌های آنتاگونیست است که به طور طبیعی در فراریشه گیاهان حضور دارند. این باکتری‌ها با سازوکارهای مستقیم و غیرمستقیم از جمله تولید آنتی‌بیوتیک‌ها (مانند پیولوتئورین، دی استیل فوروگلوسینول)، آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی (کیتیناز، گلوکاناز، پروتئاز)، رقابت برای آهن از طریق سیدروفورها و القای مقاومت سیستمیک در میزبان، جمعیت و فعالیت بیمارگرها را سرکوب می‌کنند (Bardin et al., 2015). جنس‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* از شناخته‌شده‌ترین باکتری‌های آنتاگونیست به شمار می‌آیند (Tyagi et al., 2024). برای نمونه، کاربرد برخی سویه‌های *B. subtilis* و *P. fluorescens* توانسته است شدت بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج را به طور معنی‌داری کاهش دهد (Udayashankar et al., 2011; Shivalingaiah, & Umesha, 2013). گونه *Peribacillus frigoritolerans* که پیشتر در جنس *Bacillus*قرار داشت، نیز به دلیل توانایی تحمل شرایط سخت محیطی و دارا بودن پتانسیل آنتاگونیستی علیه طیفی از بیمارگرها، مورد توجه قرار گرفته است. شواهد جدید نشان می‌دهد که اثرات هم‌افزایی استفاده ترکیبی از عوامل بیوکنترل و محرک‌های رشد طبیعی مانند ترکیب هیومیک اسید، کیتوزان و *Bacillus* می‌تواند تأثیرات به مراتب قوی‌تری در تقویت رشد گیاه و سرکوب بیماری داشته باشد (Qiu et al., 2025). با توجه به اهمیت بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج، چالش‌های روش‌های کنترل متداول و پتانسیل قابل توجه عوامل بیولوژیک و محرک‌های طبیعی، این پژوهش با هدف کلی ارزیابی و مقایسه کارایی سه راهکار جایگزین شامل میکروارگانیسم‌های مؤثر، هیومیک اسید و باکتری آنتاگونیست *P. frigoritolerans* در مدیریت بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج طراحی شد. در راستای این هدف کلی، اثرات جداگانه و ترکیبی این تیمارها بر رشد گیاه برنج، شدت علائم بیماری ناشی از *X. oryzae* pv. *oryzae* و همچنین بیماری‌زایی این باکتری روی چهار رقم مختلف برنج مورد بررسی قرار گرفت تا کارآمدترین و مناسب‌ترین راهکار یا ترکیب راهکارها برای کنترل این بیماری شناسایی شود.

مواد و روش‌ها

تهیه و خالص‌سازی باکتری بیمارگر *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*

در این پژوهش، از باکتری *X. oryzae* pv. *oryzae* که در کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج نگهداری می‌شد، استفاده گردید. برای تهیه کشت تازه، ابتدا سوسپانسیون باکتری به روش کشت خطی روی محیط کشت آگار غذایی (NA)[1] کشت داده شد و پتری‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار گرفتند. به منظور اطمینان از خلوص کشت، پرگنه‌های رشد یافته بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی و مورفولوژیک اختصاصی مورد بررسی و تأیید قرار گرفتند. برای تأمین باکتری مورد نیاز در مراحل مختلف آزمایش، کشت خالص به‌طور مرتب روی محیط NA انجام و در دمای ۴ درجه سلسیوس برای استفاده کوتاه‌مدت نگهداری شد.

مواد تیمار و سوسپانسیون باکتری

از فرمولاسیون تجاری میکروارگانیسم‌های مؤثر که توسط شرکت امکان‌پذیر پارس نماینده انحصاری سازمان

[1] Nutrient Agar

EMRO[1] ژاپن در ایران ارائه می‌شود، استفاده گردید. این ترکیب مطابق دستورالعمل سازنده و در زمان مصرف آماده‌سازی شد. هیومیک اسید مورد نیاز از شرکت آریا سبز همت (یاسوج) تهیه شد. محلول اصلی با غلظت مشخص مطابق پروتکل استاندارد و با توصیه شرکت سازنده در آب مقطر تهیه و سپس به غلظت نهایی مورد استفاده در آزمایش رقیق گردید. از جدایه خالص *P. frigoritolerans* موجود در کلکسیون آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه یاسوج استفاده شد. سوسپانسیون این باکتری نیز مشابه روش ذکرشده برای باکتری *Xoo*، از کشت ۲۴ ساعته روی محیط NA تهیه و غلظت سلولی آن در 10^8 CFU/mL تنظیم گردید (OD=0.5).

تهیه و کشت بذرهای برنج

در این مطالعه، چهار رقم تجاری مهم برنج ایران شامل هاشمی، فجر، ستایش و شیرودی که از نظر سطح زیر کشت و میزان تولید دارای اهمیت اقتصادی هستند، از مؤسسه تحقیقات برنج کشور تهیه شدند. به منظور آماده‌سازی بذرها برای کشت، ابتدا بذرها به مدت ۳ دقیقه در محلول سدیم هیپوکلریت نیم درصد غوطه‌ور و سپس ، سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. در مرحله بعد، بذرهای ضدعفونی شده به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر در دمای اتاق خیسانده شدند تا فرآیند جوانه‌زنی تسریع گردد. پس از این مرحله، بذرها به طور یکنواخت در سینی‌های نشاء حاوی بستر مناسب کشت شامل کوکوپیت و پرلیت به نسبت ۲:۱ قرار داده شدند. سینی‌های کشت شده در اتاق رشد با شرایط کنترل‌شده (دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۵±۸۵ درصد، دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی) قرار گرفتند. پس از ۲۵ روز و در مرحله ۴ تا ۵ برگی تشاها به منظور ادامه مراحل آزمایش به مزرعه انتقال داده شدند.

آماده‌سازی مزرعه، انتقال نشاء، اعمال تیمارها و مایه‌زنی

مزرعه مورد استفاده در این پژوهش، واقع در منطقه سپیدار (عرض جغرافیایی ۳۰°۳۵′ شمالی و طول جغرافیایی ۵۱°۲۱′ شرقی) در ۳۰ کیلومتری شهر یاسوج استان کهگیلویه و بویراحمد قرار داشت. عملیات آماده‌سازی زمین با دو بار شخم و یک بار دیسک جهت نرم و یکنواخت کردن خاک آغاز شد. به منظور پیشگیری از آلودگی‌های قارچی خاک‌زی و اطمینان از سلامت اولیه بستر کشت، زمین با قارچ‌کش متالاکسیل-مانکوزب به میزان توصیه شده توسط شرکت سازنده تیمار شد. آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی به صورت فاکتوریل (رقم × تیمار) با چهار تکرار (بلوک) اجرا شد. هر بلوک به ۲۰ واحد (کرت) مجزا و یک اندازه تقسیم شد. نشاء هر رقم برنج به صورت دو خطی و با فاصله کاشت ۲۵ × ۲۰ سانتی‌متر (فاصله روی ردیف × فاصله بین ردیف‌ها) به صورت دستی در هر کرت (۵ کرت برای هر رقم) کشت شدند. ده روز پس از انتقال نشاءها به مزرعه و پس از اطمینان از استقرار کامل ریشه‌ها، پنج تیمار مختلف شامل آب مقطر (شاهد)، هیومیک اسید ۰/۶٪، ترکیب EM ۱۵٪، مخلوط هیومیک اسید و EM، سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست *P. frigoritolerans* با غلظت 10^8 CFU/mL اعمال شدند. ۵۰ میلی لیتر از هر یک از تیمارها با استفاده از بطری‌های پلاستیکی دهانه‌دار مستقیماً روی خاک اطراف ناحیه فراریشه ریخته شد. تیمارها جدا از چرخه آبیاری معمول مزرعه اعمال شدند. هفت روز پس از اعمال تیمارهای فوق (یعنی ۱۷ روز پس از انتقال نشاء)، مایه‌زنی با باکتری *Xoo* انجام شد. به این منظور، ۳۰ میلی لیتر سوسپانسیون باکتری با غلظت 10^8 CFU/mL روی هر گیاه محلول پاشی گردید.

تغییرات جمعیت باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در برگ پس از اعمال تیمارهای مورد آزمایش

به منظور بررسی تغییرات جمعیت باکتری بیمارگر درون برگ، شمارش باکتری در پنج بازه زمانی شامل ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز پس از مایه‌زنی انجام شد (روز اول معادل ۲۴ ساعت پس از مایه‌زنی در نظر گرفته شد). در هر زمان نمونه‌برداری، از هر کرت آزمایشی سه برگ دارای علائم

[1] EM Research Organization

اولیه به طور تصادفی جدا گردید. این برگ‌ها ابتدا به مدت ۳۰ ثانیه با آب جاری شستشو و سپس برای ضدعفونی سطحی، به مدت ۲۰ ثانیه در محلول سدیم هیپوکلریت ۰/۵ درصد غوطه‌ور شدند. در مرحله بعد، برای حذف باقی‌مانده ضدعفونی‌کننده، برگ‌ها دو بار با آب مقطر سترون شستشو داده شده و روی کاغذ صافی خشک شدند. سپس، یک گرم از نمونه‌ها در هاون چینی سترون همراه با ۱۰ میلی‌لیتر آب‌پپتون سترون ۰/۱ درصد، کاملاً له شدند تا عصاره بافتی حاصل شود. از این عصاره، سری رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه و از هر رقت، حجم ۱۰۰ میکرولیتر روی محیط کشت نوترینت آگار به روش کشت چمنی کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند و سپس پرگنه‌های زرد لعابی شمارش گردیدند. جمعیت باکتری بر حسب تعداد پرگنه تشکیل دهنده در هر گرم وزن تر بافت برگ (CFU/g) محاسبه و گزارش شد.

ارزیابی پیشرفت بیماری

ارزیابی پیشرفت بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج، ۳۰ روز پس از مایه‌زنی با *Xoo* انجام شد. معیار سنجش، اندازه‌گیری طول ناحیه نکروز (سوخته) روی برگ بر حسب سانتی‌متر بود (Jirapong et al., 2019). از هر کرت آزمایشی، ۵ بوته به صورت تصادفی انتخاب شد و از هر بوته، سه برگ دارای علائم (در مجموع ۱۵ برگ در هر تکرار) مورد بررسی قرار گرفت. طول ناحیه نکروز هر برگ با استفاده از کولیس دیجیتال با دقت ۰/۱ میلی‌متر اندازه‌گیری و ثبت گردید.

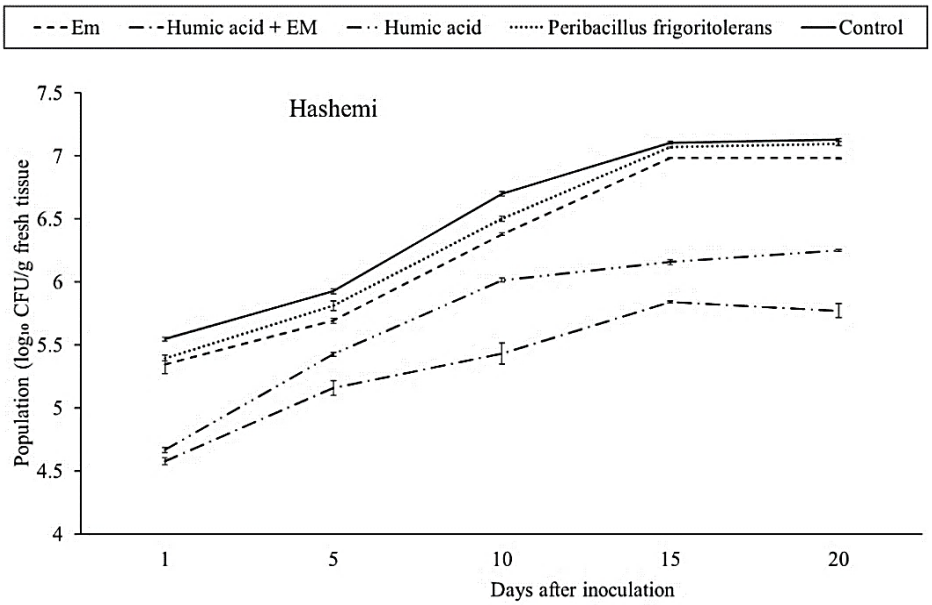
تحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از تمامی مراحل اندازه‌گیری با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نسخه ۹,۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. داده‌های شمارش باکتری ابتدا برای نرمال سازی توزیع و واریانس، تحت تبدیل لگاریتمی($Log_{10}(x+1)$) قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد.

نتایج

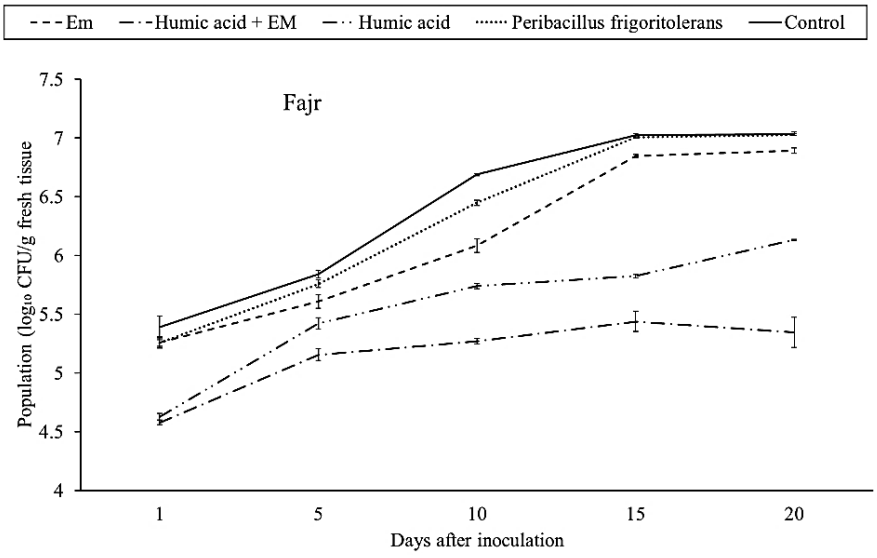
تغییرات جمعیت باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) در ارقام مختلف برنج

نتایج نشان داد که میانگین جمعیت باکتری Xoo در برگ ارقام برنج مورد بررسی در طول زمان افزایش یافت (شکل‌های ۱ تا ۴). در تمام ارقام مورد بررسی، تیمار ترکیبی هیومیک اسید با EM، به عنوان موثرترین تیمار در کاهش جمعیت باکتری در برگ، ارزیابی شد که در رقم هاشمی در روز یک، در رقم فجر در روز ۱ و ۱۵ و در رقم ستایش در روز ۱۰ پس از مایه‌زنی، با تیمار هیومیک اسید اختلاف معنی‌دار نداشت. اما در هر سه رقم مذکور در سایر زمانهای مورد بررسی، جمعیت باکتری به طور معنی‌داری از سایر تیمارها کمتر بود. در رقم شیرودی تیمار ترکیبی هیومیک اسید با EM، نیز کمترین جمعیت باکتری را موجب شد که در روز اول پس از مایه‌زنی تنها با تیمار باکتری آنتاگونیست اختلاف معنی‌دار داشت اما در سایر روزهای مورد بررسی به طور معنی‌داری از سایر تیمارها کمتر بود ($P<۰/۰۱$) (جدول ۱).



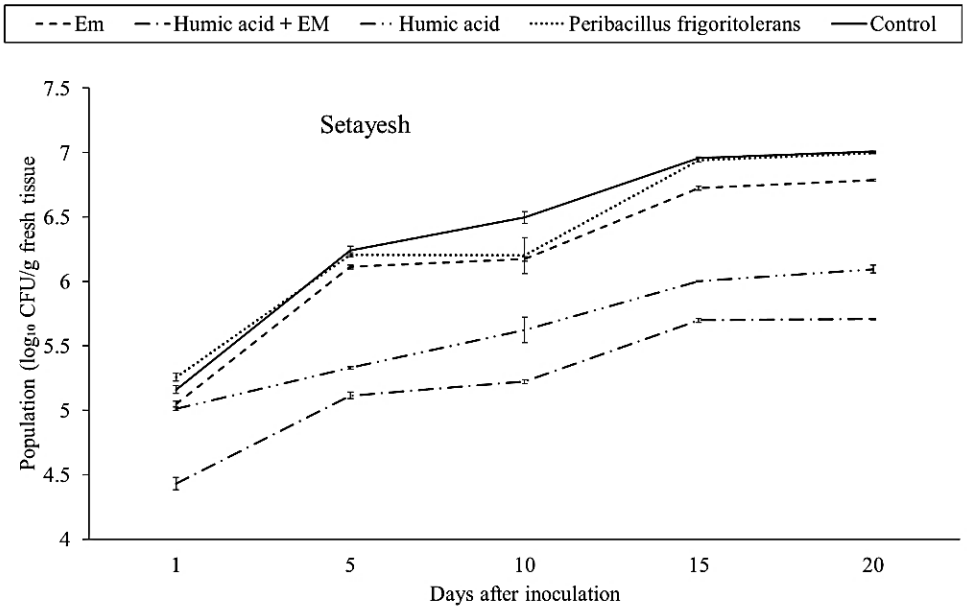
شکل ۱- تغییرات جمعیت باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در برگ برنج رقم هاشمی تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *Peribacillus frigoritolerans*، هیومیک اسید، میکروارگانیسم‌های موثر (EM)، ترکیب هیومیک اسید و EM و آب مقطر سترون (شاهد مثبت) در روزهای ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز بعد از مایه‌زنی بیمارگر.

Figure 1. Mean population dynamics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in leaves of the Hashemi rice cultivar at 1, 5, 10, 15, and 20 days post-inoculation, following treatment with the antagonistic bacterium *Peribacillus frigoritolerans*, humic acid, effective microorganisms (EM), and a combined humic acid-EM application



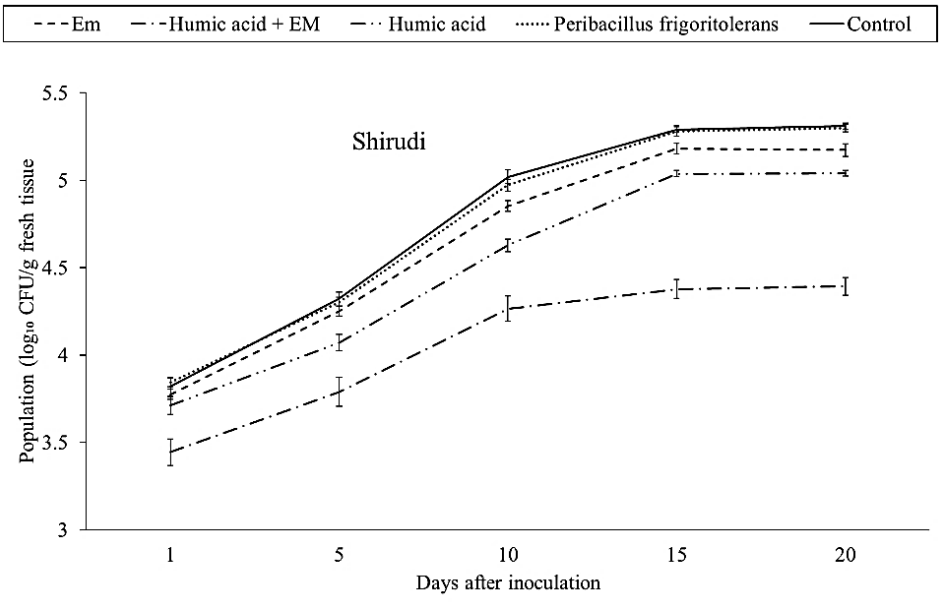
شکل ۲- تغییرات جمعیت باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در برگ برنج رقم فجر تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *Peribacillus frigoritolerans*، هیومیک اسید، میکروارگانیسم‌های موثر (EM)، ترکیب هیومیک اسید و EM و آب مقطر سترون (شاهد مثبت) در روزهای ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز بعد از مایه‌زنی بیمارگر.

Figure 2. Mean population dynamics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in leaves of the Fajr rice cultivar at 1, 5, 10, 15, and 20 days post-inoculation, following treatment with the antagonistic bacterium *Peribacillus frigoritolerans*, humic acid, effective microorganisms (EM), and a combined humic acid-EM application.



شکل ۳- تغییرات جمعیت باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در برگ برنج رقم ستایش تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *Peribacillus frigoritolerans*، هیومیک اسید، میکروارگانیسم‌های موثر (EM)، ترکیب هیومیک اسید و EM و آب مقطر سترون (شاهد مثبت) در روزهای ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز بعد از مایه‌زنی بیمارگر.

Figure 3. Mean population dynamics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in leaves of the Setayesh rice cultivar at 1, 5, 10, 15, and 20 days post-inoculation, following treatment with the antagonistic bacterium *Peribacillus frigoritolerans*, humic acid, effective microorganisms (EM), and a combined humic acid-EM application.



شکل ٤- تغییرات جمعیت باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در برگ برنج رقم شیرودی تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *Peribacillus frigoritolerans*، هیومیک اسید، میکروارگانیسم‌های موثر (EM)، ترکیب هیومیک اسید و EM و آب مقطر سترون (شاهد مثبت) در روزهای ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز بعد از مایه‌زنی بیمارگر.

Figure 4. Mean population dynamics of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in leaves of the Shirudi rice cultivar at 1, 5, 10, 15, and 20 days post-inoculation, following treatment with the antagonistic bacterium *Peribacillus frigoritolerans*, humic acid, effective microorganisms (EM), and a combined humic acid-EM application.

جدول ۱- مقایسه میانگین جمعیت باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* در برگ ارقام مختلف برنج در روزهای ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ روز بعد از مایه‌زنی و تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *Peribacillus frigoritolerans*، هیومیک اسید، میکروارگانیسم‌های موثر (EM) و ترکیب هیومیک اسید و EM. میانگین جمعیت هر باکتری در هر روز به صورت مجزا مقایسه شده است.

Table 1. Comparison of the mean population of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* among different rice cultivars leaves at 1, 5, 10, 15, and 20 days post-inoculation, following treatment with the antagonist *Peribacillus frigoritolerans*, humic acid, effective microorganisms (EM), and their combination (humic acid + EM). Means for the bacterial population were compared separately for each sampling day.

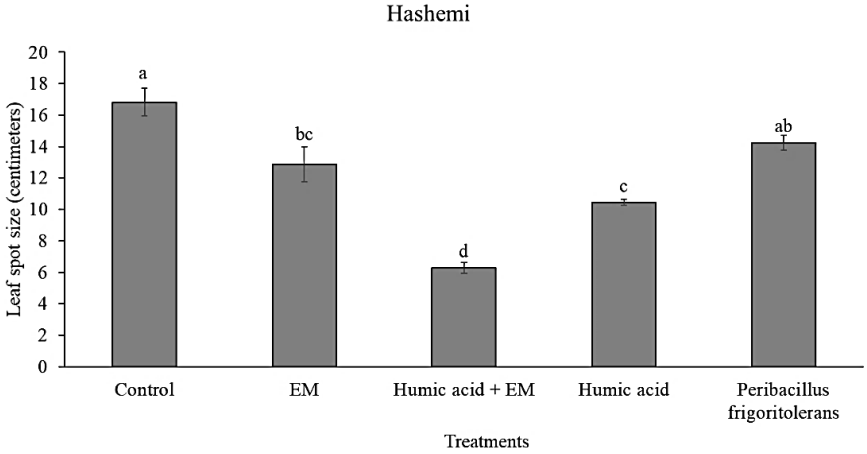
Cultivar	Treatments	Day 1	Day 5	Day 10	Day 15	Day 20
Hashemi	Control	5.55 ± (0.02) a	5.93 ± (0.02) a	6.7 ± (0.02) a	7.1 ± (0.01) a	7.13 ± (0.009) a
	Effective microorganisms	5.34 ± (0.07) b	5.69 ± (0.02) b	6.38 ± (0.01) b	6.96 ± (0.002) b	6.98 ± (0.004) b
	Humic acid + Effective microorganisms	4.58 ± (0.03) c	5.16 ± (0.06) d	5.43 ± (0.08) d	5.84 ± (0.008) d	5.77 ± (0.05) d
	Humic acid	4.67 ± (0.02) c	5.43 ± (0.02) c	6.02 ± (0.02) c	6.16 ± (0.02) c	6.25 ± (0.008) c
	Peribacillus frigoritolerans	5.4 ± (0.02) ab	5.81 ± (0.04) ab	6.5 ± (0.02) b	7.07 ± (0.007) a	7.1 ± (0.016) ab
Fajr	Control	5.39 ± (0.09) a	5.84 ± (0.03) a	6.69 ± (0.009) a	7.02 ± (0.01) a	7.037 ± (0.01) a
	Effective microorganisms	5.26 ± (0.05) a	5.61 ± (0.06) bc	6.084 ± (0.16) b	6.85 ± (0.01) a	6.89 ± (0.02) a
	Humic acid + Effective microorganisms	4.58 ± (0.02) b	5.16 ± (0.05) d	5.27 ± (0.02) d	5.44 ± (0.29) b	5.35 ± (0.12) c
	Humic acid	4.63 ± (0.03) b	5.42 ± (0.05) c	5.74 ± (0.02) c	5.83 ± (0.01) b	6.13 ± (0.006) b
	Peribacillus frigoritolerans	5.26 ± (0.03) a	5.76 ± (0.03) ab	6.45 ± (0.02) a	7.006 ± (0.01) a	7.03 ± (0.008) a
Setayesh	Control	5.2 ± (0.03) ab	6.24 ± (0.04) a	6. 5 ± (0.05) a	6.96 ± (0.006) a	7.007 ± (0.006) a
	Effective microorganisms	5.05 ± (0.02) b	6.11 ± (0.02) b	6.17 ± (0.02) ab	6.73 ± (0.01) b	6.77 ± (0.009) b
	Humic acid + Effective microorganisms	4.43 ± (0.05) c	5.12 ± (0.03) d	5.22 ± (0.01) c	5.7 ± (0.01) d	5.71 ± (0.005) d
	Humic acid	5.014 ± (0.02) b	5.33 ± (0.01) c	5.63 ± (0.21) bc	6.002 ± (0.005) c	6.1 ± (0.03) c
	Peribacillus frigoritolerans	5.26 ± (0.036) a	6.21 ± (0.01) a	6.20 ± (0.24) ab	6.94 ± (0.01) a	6.99 ± (0.006) a
Shirudi	Control	3.8 ± (0.05) ab	4.32 ± (0.04) a	5.02 ± (0.04) a	5.29 ± (0.02) a	5.31 ± (0.02) a
	Effective microorganisms	3.78 ± (0.03) ab	4.25 ± (0.03) ab	4.85 ± (0.03) ab	5.18 ± (0.03) ab	5.17 ± (0.04) ab
	Humic acid + Effective microorganisms	3.44 ± (0.15) b	3.79 ± (0.11) c	4.27 ± (0.11) c	4.38 ± (0.06) c	4.39 ± (0.05) c
	Humic acid	3.71 ± (0.05) ab	4.07 ± (0.05) b	4.63 ± (0.04) b	5.04 ± (0.02) b	5.04 ± (0.02) b
	Peribacillus frigoritolerans	3.84 ± (0.03) a	4.3 ± (0.03) a	4.97 ± (0.03) a	5.28 ± (0.03) a	5.3 ± (0.02) a

Data are shown as mean ± standard error. Means with different letters are significantly different (Duncan's test, $p < 0.01$).

ارزیابی پیشرفت بیماری

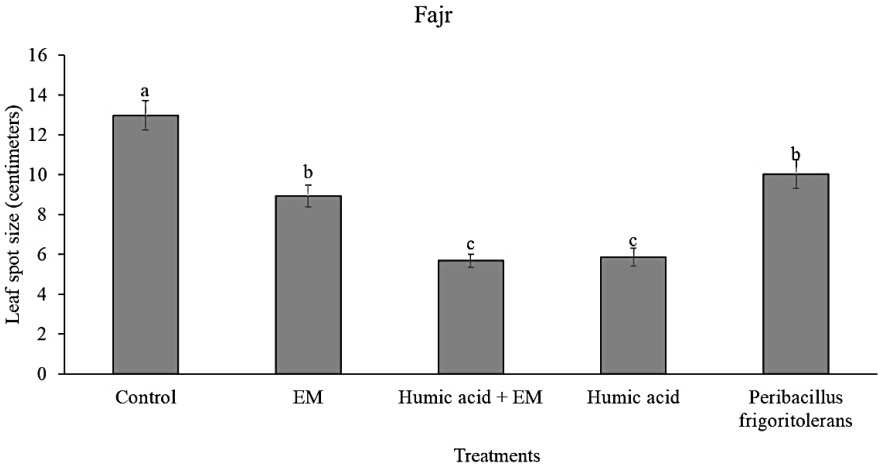
بررسی پیشرفت بیماری در رقم هاشمی نشان داد که بیشترین میانگین طول لکه حاصل از *Xoo* در تیمار شاهد می‌باشد که تنها با گیاهان تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *P. frigoritolerans* معنی‌دار نمی‌باشد و کمترین میانگین طول لکه در گیاهان تیمار شده با ترکیب هیومیک اسید و میکروارگانیسم‌های موثر مشاهده شد که به طور معنی‌داری از سایر تیمارها کمتر بود ($P <$ ۰/۰۱) (شکل ۵). در رقم فجر، بیشترین میانگین طول لکه در تیمار شاهد مشاهده شد که به طور معنی‌داری از سایر تیمارها بیشتر بود و کمترین میانگین طول لکه در گیاهان تیمار شده با ترکیب هیومیک اسید و میکروارگانیسم‌های موثر مشاهده شد که تنها با گیاهان تیمار شده با هیومیک اسید اختلاف معنی‌داری نداشت ($P <$ ۰/۰۱) (شکل ۶). همچنین، در رقم ستایش بیشترین میانگین طول لکه در تیمار شاهد دیده شد که به طور معنی‌داری از سایر تیمارها بیشتر بود و کمترین میانگین طول لکه در گیاهان تیمار شده با ترکیب هیومیک اسید و میکروارگانیسم‌های موثر مشاهده شد که مشابه با گیاهان تیمار شده با هیومیک اسید و نیز گیاهان تیمار شده با میکروارگانیسم‌های موثر بود ($P <$ ۰/۰۱) (شکل ۷). بیشترین میانگین طول لکه در رقم شیرودی در تیمار شاهد

مشاهده گردید که با گیاهان تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *P. frigoritolerans* و میکروارگانیسم‌های موثر تفاوت معنی‌دار نداشت و کمترین میانگین طول لکه در گیاهان تیمار شده با ترکیب هیومیک اسید و میکروارگانیسم‌های موثر مشاهده شد که با گیاهان تیمار شده با هیومیک اسید اختلاف معنی‌داری نداشت (P <۰/۰۱) (شکل ۸).



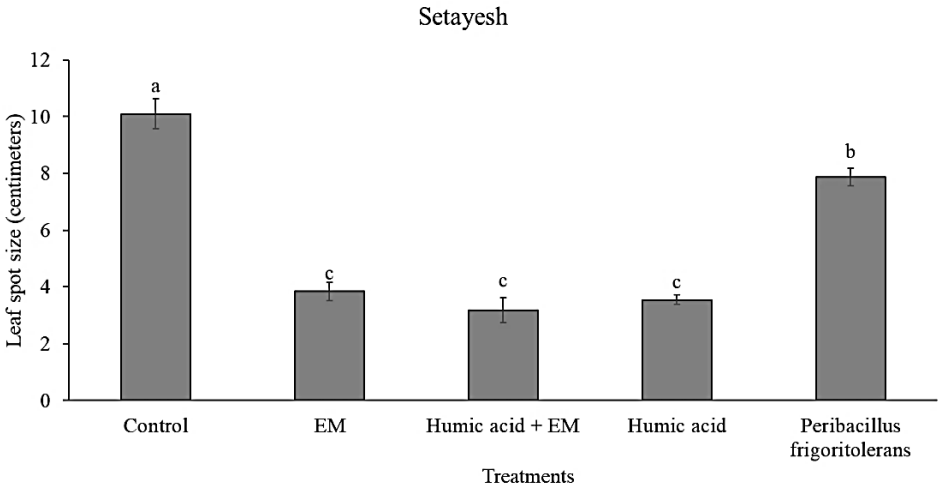
شکل ۵- میانگین طول لکه ناشی از باکتری Xanthomonas oryzae *pv.* oryzae روی برگ برنج رقم هاشمی تیمار شده با باکتری آنتاگونیست Peribacillus frigoritolerans، هیومیک اسید، میکروارگانیسم‌های موثر (*EM*) و ترکیب هیومیک اسید و *EM*. گیاهان کنترل با آب مقطر سترون تیمار شده‌اند. هر ستون نشان‌دهنده مقادیر میانگین چهار تکرار می‌باشد. میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک بر اساس مقایسه میانگین به روش چنددامنه‌ای دانکن هستند، تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد.

Figure 5. Mean lesion length of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) on leaves of the Hashemi rice cultivar treated with the antagonist *Peribacillus frigoritolerans*, humic acid, effective microorganisms (EM), and their combination (humic acid + EM). Control plants were treated with sterile distilled water. Each bar represents the mean value from two independent trials, each consisting of four replicates. Treatment means with different letters are significantly different according to Duncan's multiple-range test at P ≤ 0.01. Error bars indicate standard error of the mean.



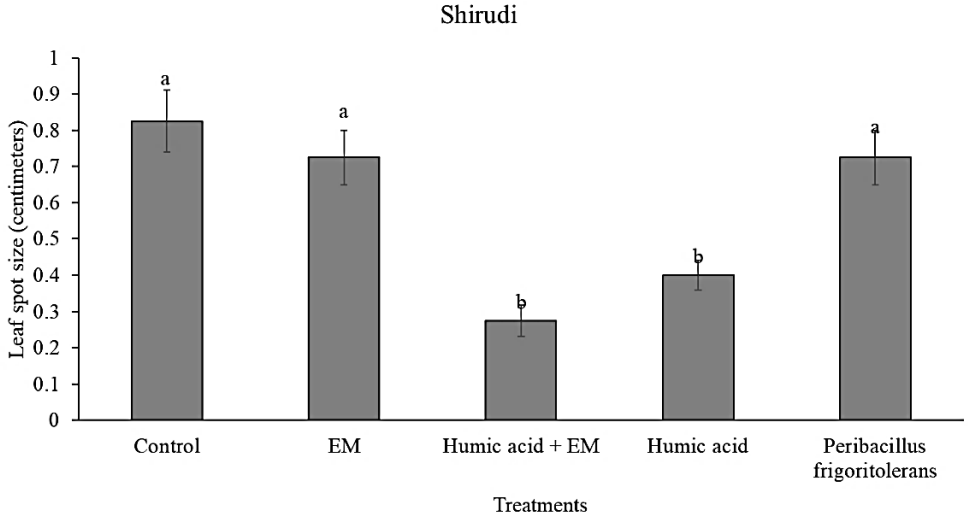
شکل ٦- میانگین طول لکه ناشی از باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* روی برگ برنج رقم فجر تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *Peribacillus frigoritolerans*، هیومیک اسید، میکروارگانیسم‌های موثر (EM) و ترکیب هیومیک اسید و EM. گیاهان کنترل با آب مقطر سترون تیمار شده‌اند. هر ستون نشان‌دهنده مقادیر میانگین چهار تکرار می‌باشد. میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک بر اساس مقایسه میانگین به روش چنددامنه‌ای دانکن هستند، تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد.

Figure 6. Mean lesion length of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) on leaves of the Fajr rice cultivar treated with the antagonist *Peribacillus frigoritolerans*, humic acid, effective microorganisms (EM), and their combination (humic acid + EM). Control plants were treated with sterile distilled water. Each bar represents the mean value from two independent trials, each consisting of four replicates. Treatment means with different letters are significantly different according to Duncan's multiple-range test at P ≤ 0.01. Error bars indicate standard error of the mean.



شکل ۷- میانگین طول لکه ناشی از باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* روی برگ برنج رقم ستایش تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *Peribacillus frigoritolerans*، هیومیک اسید، میکروارگانیسم‌های موثر (EM) و ترکیب هیومیک اسید و EM. گیاهان کنترل با آب مقطر سترون تیمار شده‌اند. هر ستون نشان‌دهنده مقادیر میانگین چهار تکرار می‌باشد. میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک بر اساس مقایسه میانگین به روش چنددامنه‌ای دانکن هستند، تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد.

Figure 7. Mean lesion length of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) on leaves of the Setayesh rice cultivar treated with the antagonist *Peribacillus frigoritolerans*, humic acid, effective microorganisms (EM), and their combination (humic acid + EM). Control plants were treated with sterile distilled water. Each bar represents the mean value from two independent trials, each consisting of four replicates. Treatment means with different letters are significantly different according to Duncan's multiple-range test at $P \leq 0.01$. Error bars indicate standard error of the mean.



شکل ۸- میانگین طول لکه ناشی از باکتری *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* روی برگ برنج رقم شیرودی تیمار شده با باکتری آنتاگونیست *Peribacillus frigoritolerans*، هیومیک اسید، میکروارگانیسم‌های موثر (EM) و ترکیب هیومیک اسید و EM. گیاهان کنترل با آب مقطر سترون تیمار شده‌اند. هر ستون نشان‌دهنده مقادیر میانگین چهار تکرار می‌باشد. میانگین‌هایی که دارای حرف مشترک بر اساس مقایسه میانگین به روش چنددامنه‌ای دانکن هستند، تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد ندارند. نوار خطا نشان‌دهنده خطای استاندارد می‌باشد.

Figure 8. Mean lesion length of bacterial blight (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) on leaves of the Shirudi rice cultivar treated with the antagonist *Peribacillus frigoritolerans*, humic acid, effective microorganisms (EM), and their combination (humic acid + EM). Control plants were treated with sterile distilled water. Each bar represents the mean value from two independent trials, each consisting of four replicates. Treatment means with different letters are significantly different according to Duncan's multiple-range test at $P \leq 0.01$. Error bars indicate standard error of the mean.

بحث

بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج، ناشی *X. oryzae* pv. *oryzae (Xoo)*، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های این محصول راهبردی در سطح جهان به‌شمار می‌رود و مدیریت پایدار آن به دلیل محدودیت‌های روش‌های شیمیایی، نیازمند توسعه راهکارهای جایگزین و سازگار با محیط‌زیست است (Kumar et al., 2020; Islam et al., 2024). پژوهش حاضر با هدف ارزیابی کارایی محرک‌های رشد طبیعی و عوامل بیوکنترلی شامل هیومیک اسید، میکروارگانیسم‌های مؤثر (EM) و باکتری آنتاگونیست *P. frigoritolerans* در مدیریت این بیماری انجام شد. نتایج به‌دست‌آمده نشان‌دهنده تفاوت‌های بارز در کارایی تیمارهای مورد آزمون است. درک سازوکارهای احتمالی این تفاوت‌ها می‌تواند نقشه راهی برای تدوین راهبردهای مدیریت تلفیقی کارآمد ارائه دهد. یافته‌های این پژوهش به وضوح نشان داد که کاربرد همزمان هیومیک اسید و EM مؤثرترین روش در کاهش اندازه جمعیت باکتری برگ و نیز شدت بیماری تحت شرایط مزرعه است. این اثربخشی برتر می‌تواند ناشی از سازوکارهای عملکردی هم‌افزا در این دو ماده باشد. هیومیک اسید، به عنوان یک اصلاح‌کننده طبیعی خاک و محرک رشد، از طریق بهبود ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و بیولوژیکی خاک، جذب عناصر غذایی و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی، وضعیت فیزیولوژیکی و سلامت عمومی گیاه را ارتقا می‌دهد (Sheteiwy et al., 2017). بهبود در وضعیت تغذیه‌ای گیاه، به ویژه در جذب بهتر نیتروژن، فسفر و پتاسیم که تحت تأثیر هیومیک اسید گزارش شده است، می‌تواند به سنتز ترکیبات دفاعی و افزایش تاب‌آوری گیاه در برابر تنش‌های زیستی کمک کند. بستر فراهم شده توسط هیومیک اسید، احتمالاً فعالیت میکروارگانیسم‌های سودمند موجود در کود زیستی EM را تقویت می‌کند. ترکیب EM حاوی مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌هاست که از طریق سازوکارهایی مانند رقابت برای اشغال جایگاه و منابع (مانند آهن)، تولید متابولیت‌های ضد میکروبی و القای مقاومت سیستمیک در گیاه عمل می‌کنند (Higa, 2000; Kawaharada et al., 2015). مطالعات نشان داده‌اند که میکروارگانیسم‌های موجود در EM می‌توانند با تولید ترکیبات ضدباکتریایی و آنزیم‌ها، به طور مستقیم علیه بیمارگرهای گیاهی از جمله *Xoo* فعالیت کنند (Shivalingaiah & Umesha, 2013; Yasmin et al., 2017). بنابراین، به نظر می‌رسد در تیمار ترکیبی مورد استفاده، هیومیک اسید با تقویت میزبان و ایجاد یک محیط مساعد در فراریشه، اثربخشی مستقیم میکروارگانیسم‌های EMرا افزایش می‌دهد. این همکاری دوگانه منجر به یک اثر هم‌افزایی قوی در مهار بیماری شده که با فلسفه مدیریت تلفیقی بیماری‌ها که بر استفاده همزمان از چند روش برای دستیابی به کنترلی پایدار تأکید دارد، کاملاً همسو است (Bardin et al., 2015). به نظر می‌رسد، ترکیب محرک‌های رشد با عوامل کنترل کننده زیستی می‌تواند یک راهکار امیدوارکننده برای غلبه بر ناپایداری احتمالی کاربرد تک‌عاملی عوامل بیولوژیک باشد. کاربرد ترکیبی هیومیک اسید، کیتوزان و *Bacillus subtilis* اثرات هم‌افزایی مطلوبی بر رشد گوجه‌فرنگی و کنترل بیماری‌های خاک‌زاد از قبیل *Fusarium* و *Ralstonia* داشته‌اند (Qiu et al., 2025). در خصوص کاربرد مستقل هیومیک اسید، نتایج حاکی از اثربخشی مثبت اما متغیر این تیمار در کاهش علائم بیماری بود. این تغییرپذیری در پاسخ می‌تواند به عوامل متعددی مرتبط باشد. هیومیک اسید از طریق بهبود ساختمان خاک و افزایش ظرفیت تبادل کاتیونی، در دسترس بودن عناصر غذایی را برای گیاه بهبود می‌بخشد (Dungait et al., 2012). همچنین، گزارش شده است که هیومیک اسید می‌تواند فعالیت آنزیم‌های کلیدی در مسیرهای دفاعی گیاه مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD) را تنظیم کند (Moghadam, 2015). با این حال، میزان و سازوکار جذب و انتقال اسیدهیومیک در گیاه و همچنین پاسخ‌های سیگنالی متعاقب آن، می‌تواند تحت تأثیر شرایط محیطی، مرحله رشدی گیاه و ویژگی‌های ژنتیکی رقم قرار گیرد (Asli & Neumann, 2010). بنابراین، ناپایداری نسبی مشاهده شده در کاربرد انفرادی هیومیک اسید در این پژوهش می‌تواند

بازتابی از همین وابستگی پاسخ به زمینه ژنتیکی و محیطی باشد و لزوم مطالعات بیشتر برای بهینه‌سازی دوز و زمان کاربرد آن را نشان می‌دهد. اثربخشی تیمار EM به تنهایی در این تحقیق الگوی متغیرتری را نشان داد، به طوری که تنها در برخی از زمان‌های اندازه‌گیری و در برخی ارقام توانست جمعیت باکتری را کاهش دهد. این ناسازگاری در نتایج با گزارش‌های برخی مطالعات دیگر همخوانی دارد (Daiss et al., 2008). چالش اصلی در کاربرد میکروارگانیسم‌های معرفی شده، استقرار و بقای آن‌ها در برابر جمعیت میکروبی بومی و بسیار رقابتی خاک است (Bajwa et al., 1995). موفقیت EM به توانایی آن در کلونیزه کردن ریزوسفر، رقابت برای منابع و حفظ فعالیت تحت شرایط محیطی خاص بستگی دارد. ممکن است در برخی مواقع، شرایط محیطی (مانند رطوبت خاک، دما) یا رقابت با میکروفلورای بومی، مانع از بروز کامل توانایی ضد میکروبی EM بشود. برای دستیابی به نتایج پایدارتر، معمولاً کاربردهای مکرر و بلندمدت EM برای تثبیت جمعیت آن در خاک توصیه می‌شود. همچنین، کیفیت و زنده‌مانی میکروارگانیسم‌ها در فرآورده تجاری EM می‌تواند عاملی تأثیرگذار باشد. با این وجود، مطالعات نشان داده است که کاربرد طولانی‌مدت EMدر مراتع تخریب شده آلپ، به طور قابل توجهی زیست‌توده میکروبی و غنای جامعه میکروبی خاک را بهبود بخشید، که دلالت برتوان این فرموله در اصلاح فراریشه دارد (Li et al., 2024). از یافته‌های قابل تأمل این پژوهش، عدم کارایی قابل توجه تیمار باکتری آنتاگونیست *P. frigoritolerans* در کنترل بیماری سوختگی باکتریایی برگ برنج تحت شرایط مزرعه می باشد. این نتیجه، با وجود موفقیت‌های گزارش شده برای سایر باکتری‌های آنتاگونیست مانند برخی سویه‌های *Bacillus* و *Pseudomonas* در کنترل بیماری‌های برنج (Filippi et al., 2011)، بر پیچیدگی و اختصاصی بودن برهمکنش‌ها در مهار زیستی تأکید می‌کند. فعالیت آنتاگونیستی یک سویه باکتریایی به عوامل متعددی از جمله توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی مؤثر علیه بیمارگر هدف (مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، سیدروفورها، آنزیم‌های تجزیه کننده)، قابلیت کلونیزاسیون کارآمد ریزوسفر، رقابت با جامعه میکروبی بومی و توانایی القای مقاومت سیستمیک در میزبان بستگی دارد (Bonaterra et al., 2022). ممکن است سویه *P. frigoritolerans* مورد استفاده در این تحقیق فاقد یک یا چند مورد از ویژگی‌های کلیدی ذکر شده برای مقابله با جدایه خاص *Xoo* بوده است. به عنوان مثال، سویه‌های مختلف *Pseudomonas* می‌توانند متابولیت‌های ثانویه متفاوتی تولید کنند که اثربخشی متفاوتی علیه *Xoo* دارند. به طور مشخص، در مطالعه یاسمین و همکاران (۲۰۱۷)، سویه *Pseudomonas aeruginosa* BRp3 جداسازی شده از فراریشه برنج، مجموعه‌ای از متابولیت‌های ضدباکتریایی شامل سیدروفورهای 1-hydroxy-phenazine، pyocyanin وpyochellin، رامنولیپیدها و الکیلکینولیدها را تولید می‌کند. این تنوع متابولیتی در مقایسه با سایر سویه‌ها، مبنایی برای تفاوت در میزان مهار رشد *Xoo* و القای آنزیم‌های دفاعی در گیاه برنج است (Yasmin et al., 2017). این یافته به وضوح نشان می‌دهد که نمی‌توان یک سویه باکتریایی را به عنوان یک پیشنهاد همه گیر برای مهار همه بیمارگرهای گیاهی در نظر گرفت و موفقیت در مهار زیستی مستلزم غربالگری و انتخاب سویه‌های بومی با کارایی اثبات شده و سازگار با شرایط منطقه است (Tyagi et al., 2024). همچنین، روش و زمان مایه‌زنی آنتاگونیست نیز می‌تواند در موفقیت آن نقش داشته باشد تا فرصت کافی برای استقرار پیش از حمله بیمارگر فراهم شود. در این زمینه، مطالعه‌ای، بر تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *Xoo* تأکید دارد، که خود لزوم تطابق عامل بازدارنده با جمعیت محلی بیمارگر هدف را برجسته می‌سازد (Boonsrangsom et al. 2025). در جمع‌بندی نهایی، این پژوهش بر پتانسیل رویکردهای تلفیقی که در آن تقویت میزبان از طریق محرک‌هایی مانند هیومیک اسید با اعمال فشار مستقیم بر بیمارگر ترکیب می‌شود، تأکید می‌کند. این راهبرد نه تنها می‌تواند کارایی کنترل بیماری را افزایش دهد، بلکه با بهبود حاصلخیزی خاک و سلامت اکوسیستم، از اصول کشاورزی پایدار حمایت می‌کند. با این حال، برای دستیابی به نتایج قابل اطمینان در سطح مزرعه، توجه به بستر اجرا ضروری است.

عواملی مانند نوع خاک، مدیریت زراعی تاریخچه دار، رقم کشت شده و شرایط اقلیمی می‌توانند بر پاسخ به تیمارها تأثیر بگذارند (Ritbamrung et al., 2025). بنابراین، توصیه می‌شود این گونه راهکارها پیش از گسترش در سطح وسیع، در شرایط مزرعه‌ای هر منطقه و برای ارقام محلی مورد ارزیابی و سازگاری مجدد قرار گیرند. پژوهش‌های آتی می‌توانند بر روی تعیین دوز و زمان‌بندی بهینه کاربرد تیمارهای ترکیبی، بررسی اثرات بلندمدت آن‌ها بر اجتماعات میکروبی خاک و عملکرد محصول، و نیز ادامه بررسی برای یافتن و بهینه‌سازی کاربرد سویه‌های بومی باکتری‌های آنتاگونیست مؤثر علیه *Xoo* متمرکز شوند. در نهایت، ادغام چنین راهکارهای زیستی و پایدار در تولید برنج، گامی ضروری به سوی کاهش وابستگی به نهاده‌های شیمیایی، حفظ سلامت محیط‌زیست و تضمین امنیت غذایی پایدار است.

سپاس‌گزاری

نویسندگان از حمایت‌های مادی و معنوی دانشگاه یاسوج قدردانی می‌نمایند.

REFERENCES

Akbari, M., Rezaei, R., & Charehgani, H. (2019). Evaluation of resistance in some rice cultivars to bacterial blight disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, *42*(3), 59-70. https://doi.org/10.22055/ppr.2019.15095

Asli, S., & Neumann, P. M. (2010). Rhizosphere humic acid interacts with root cell walls to reduce hydraulic conductivity and plant development. *Plant and Soil*, *336*, 313–322. https://doi.org/10.1007/s11104-010-0483-2

Bajwa, R., Javaid, A., & Tasneem, Z. (1995). Response of indigenous soil microflora to EM inoculation in Pakistan. *Biological Science*, *1*, 73–79.

Bardin, M., Ajouz, S., Comby, M., Lopez-Ferber, M., Graillot, B., Siegwart, M., & Nicot, P. C. (2015). Is the efficacy of biological control against plant diseases likely to be more durable than that of chemical pesticides? *Frontiers in Plant Science*, *6*, 566. https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00566

Bonaterra, A., Badosa, E., Daranas, N., Francés, J., Roselló, G., & Montesinos, E. (2022). Bacteria as biological control agents of plant diseases. *Microorganisms*, *10*(9), 1759. https://doi.org/10.3390/microorganisms10091759

Boonsrangsom, T., Boondech, A., Chansongkram, W., Suachaowna, N., Buddhachat, K., Rungrat, T., Jumpathong, J., Pongcharoen, P., Inthima, P., Aeksiri, N., Ratanasut, K., & Sujipuli, K. (2025). Molecular characterization and pathogenicity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* isolates from lower northern Thailand, the causal agent of rice bacterial blight. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *136*, 102550. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102550

Buddhachat, K., Ritbamrung, O., Sripairoj, N., Inthima, P., Ratanasut, K., Boonsrangsom, T., & Sujipuli, K. (2021). One-step colorimetric LAMP (cLAMP) assay for visual detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Crop Protection*, *150*, 105809. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2021.105809

Charehgani, H. (2020). Effect of wood vinegar, humic acid and Effective Microorganisms against *Meloidogyne javanica* on tomato. *Plant Pathology Science*, *9*(2), 73–84.

Civáň, P., & Brown, T. A. (2018). Role of genetic introgression during the evolution of cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Evolutionary Biology*, *18*, 57. https://doi.org/10.1186/s12862-018-1180-7

Daiss, N., Lobo, M. G., Socorro, A. R., Brückner, U., Heller, J., & Gonzalez, M. (2008). The effect of three organic pre-harvest treatments on Swiss chard (*Beta vulgaris* L. var. *cycla* L.) quality. *European Food Research and Technology*, *226*, 345–353. https://doi.org/10.1007/s00217-006-0543-2

Dungait, J. A., Cardenas, L. M., Blackwell, M. S., Wu, L., Withers, P. J., Chadwick, D. R., & Whitmore, A. P. (2012). Advances in the understanding of nutrient dynamics and management in UK agriculture. *Science of the Total Environment*, *434*, 39–50. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.004

Filippi, M. C. C., Da Silva, G. B., Silva-Lobo, V. L., Côrtes, M. V. C. B., Moraes, A. J. G., & Prabhu, A. S. (2011). Leaf blast (*Magnaporthe oryzae*) suppression and growth promotion by rhizobacteria on aerobic rice in Brazil. *Biological Control*, *58*(2), 160–166. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.04.006

Gnanamanickam, S. S. (2009). An overview of progress in biological control. In *Biological Control of Rice Diseases* (pp. 43–51). Springer.

Higa, T. (2000). What is EM technology. *EM World Journal*, *1*, 1–6.

Islam, T., Haque, M. A., Barai, H. R., Istiaq, A., & Kim, J. J. (2024). Antibiotic resistance in plant pathogenic bacteria: Recent data and environmental impact of unchecked use and the potential of biocontrol agents as an eco-friendly alternative. *Plants*, *13*(8), 1135. https://doi.org/10.3390/plants13081135

Jirapong, J., Phanchita, V., Thanapa, S., Kanuengnij, S., Phikul, L., Rungnapa, K., Jate, K., Arissara, S., Nattaya, P., Suphalaksana, L., Varapong, C. (2019). Identification of QTLs for Blast, Bacterial Blight, and Planthopper Resistance Using SNP-Based Linkage Maps from Two Recombinant Inbred Rice Lines. *American Journal of Plant Sciences*, *10*, 760-779.

Kawaharada, Y., Kelly, S., Nielsen, M. W., Hjuler, C. T., Gysel, K., Muszyński, A., & Stougaard, J. (2015). Receptor-mediated exopolysaccharide perception controls bacterial infection. *Nature*, *523*, 308–312. https://doi.org/10.1038/nature14611

Kumar, A., Gul, M. Z., Zeeshan, A., Bimolata, W., Qureshi, I. A., & Ghazi, I. A. (2013). Differential antioxidative responses of three different rice genotypes during bacterial blight infection. *Australian Journal of Crop Science*, *7*(12), 1893–1900.

Li, J., Wei, J., Shao, X., Yan, X., & Liu, K. (2024). Effective microorganisms input efficiently improves the vegetation and microbial community of degraded alpine grassland. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1330149. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1330149

Li, M., Shafique, M. S., Zhou, H., Wang, J., Liu, Y., Wang, C., Wang, Z., & Ji, Z. (2025). A new bacterial blight resistance gene *Xa50(t)* in the *Xa4* locus confers resistance against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in rice. *Frontiers in Plant Science*, *16*, 1657476. https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1657476

McManus, P. S., Stockwell, V. O., Sundin, G. W., & Jones, A. L. (2002). Antibiotic use in plant agriculture. *Annual Review of Phytopathology*, *40*(1), 443–465. https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120301.093927

Moghadam, H. R. T. (2015). Humic acid as an ecological pathway to protect corn plants against oxidative stress. *Biological Forum – An International Journal*, *7*(1), 46–53.

Nino-Liu, D. O., Ronald, P. C., & Bogdanove, A. J. (2006). *Xanthomonas oryzae* pathovars: Model pathogens of a model crop. *Molecular Plant Pathology*, *7*(5), 303–324. https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2006.00344.x

Qiu, C., Bao, Y., Lu, D., Yan, M., Li, G., Liu, K., Wei, S., Wu, M., & Li, Z. (2025). The synergistic effects of humic acid, chitosan and *Bacillus subtilis* on tomato growth and against plant diseases. *Frontiers in Microbiology*, *16*, 1574765. https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1574765

Rathna Priya, T., Eliazer Nelson, A. R. L., Ravichandran, K., & Antony, U. (2019). Nutritional and functional properties of coloured rice varieties of South India: A review. *Journal of Ethnic Foods*, *6*, 11. https://doi.org/10.1186/s42779-019-0017-3

Ritbamrung, O., Inthima, P., Ratanasut, K., Buddhachat, K., Chansongkram, W., Jumpathong, J., Sujipuli, K., & Boonsrangsom, T. (2025). Evaluating *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) infection dynamics in rice for distribution routes and environmental reservoirs by molecular approaches. *Scientific Reports*, *15*, 1408. https://doi.org/10.1038/s41598-025-85422-3

Saikia, K., & Bora, L. C. (2021). Exploring actinomycetes and endophytes of rice ecosystem for induction of disease resistance against bacterial blight of rice. *European Journal of Plant Pathology*, *159*, 67–79. https://doi.org/10.1007/s10658-020-02145-9

Sakthivel, N., Mortensen, C. N., & Mathur, S. B. (2001). Detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *56*, 435–441. https://doi.org/10.1007/s002530100641

Sheteiwy, M. S., Dong, Q., An, J., Song, W., Guan, Y., He, F., & Hu, J. (2017). Regulation of ZnO nanoparticles-induced physiological and molecular changes by seed priming with humic acid in *Oryza sativa* seedlings. *Plant Growth Regulation*, *83*(1), 27–41. https://doi.org/10.1007/s10725-017-0295-0

Shivalingaiah, U. S., & Umesha, S. (2013). *Pseudomonas fluorescens* inhibits the *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. *Canadian Journal of Plant Protection*, *1*(5), 119–123.

Szymanek, M., Dziwulska-Hunek, A., & Tanas, W. (2020). The influence of effective microorganisms on the soil properties and yield of selected crops. *Agriculture*, *10*(9), 400. https://doi.org/10.3390/agriculture10090400

Teja, B. S., Jamwal, G., Gupta, V., Verma, M., Sharma, A., Sharma, A., & Pandit, V. (2025). Biological control of bacterial leaf blight (BLB) in rice–A sustainable approach. *Heliyon*, *11*, e41769. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e41769

Tyagi, A., Tamang, T. L., Kashtoh, H., Mir, R. A., Mir, Z. A., Manzoor, S., et al. (2024). A review on biocontrol agents as sustainable approach for crop disease management: Applications, production, and future perspectives. *Horticulturae*, *10*, 805. https://doi.org/10.3390/horticulturae10080805

Udayashankar, A. C., Nayaka, S. C., Reddy, M. S., & Srinivas, C. (2011). Plant growth-promoting rhizobacteria mediate induced systemic resistance in rice against bacterial leaf blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biological Control*, *59*(2), 114–122. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.05.010

Wang, R., Ji, Z., Kou, Y., Yang, X., Huang, W., Sun, Z., et al. (2025). Occurrence and integrated control of major rice diseases in China. *New Plant Protection*, *2*, e70004.

Yasmin, S., Hafeez, F. Y., Mirza, M. S., Rasul, M., Arshad, H. M. I., Zubair, M., & Iqbal, M. (2017). Biocontrol of bacterial leaf blight of rice and profiling of secondary metabolites produced by rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* BRp3. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1895. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01895

Zhu, D., Wei, H., Guo, B., Dai, Q., Wei, C., Gao, H., & Huo, Z. (2017). The effects of chilling stress after anthesis on the physicochemical properties of rice (*Oryza sativa* L) starch. *Food Chemistry*, *237*, 936–941. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.039

© 2026 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/.