

Biocontrol of Fusarium crown and root rot of cucumber using selected endophytic bacteria under laboratory and greenhouse conditions

Jahanshir amini¹, Mohsen Saedpanah¹, Zahra Alijani¹, Kaivan Karimi^{✉2}



¹ Department of Plant Protection, Agriculture Faculty, Kurdisan University, Sanandaj, Iran

² Department of Plant Protection, Safiabad Agricultural Research and Education and Natural Resources center, Dezful. Iran

Corresponding author

✉ keivan_sa144@yahoo.com

Abstract

Keywords

Antagonistic activity,
Antifungal metabolites,
Cucumis sativus,
Endophytic prokaryotes,
Fusarium

Fusarium crown and root rot is one of the most important diseases affecting cucumber crop worldwide. In this study, the inhibitory potential of six selected endophytic bacterial strains including, *Staphylococcus sciuri* (MarR44), *Serratia rubidaea* (Mar61-01), *Bacillus atrophaeus* (DM6120), *Bacillus* sp. (MarG19), *Bacillus* sp. (MarH51), and *Bacillus* sp. (TN16) was evaluated to control this disease in cucumber, under laboratory and greenhouse conditions following a completely randomized design. Under laboratory conditions, the inhibitory effects of these six strains were significant compared to the control in dual-culture, volatile metabolites, non-volatile metabolites, and spore germination assays. In each assay, the bacterial strains *S. sciuri* (MarR44) with 56%, *S. rubidaea* (Mar61-01) with 75.8%, *S. rubidaea* (Mar61-01) with 11%, and *Bacillus* sp. (MarH51) with 76.53% exhibited the highest suppression of mycelial growth and spore germination of the pathogen, respectively. Greenhouse experiments using two methods of seed treatment and soil inoculation with endophytic bacterial strains in pathogen-infested soil demonstrated that the endophytic bacterial strains reduced disease incidence by over 60%. Furthermore, the bacterial strains significantly increased all growth parameters even in the presence of the pathogen as compared to control treatment in both methods. The findings indicated that the endophytic bacterial strains in this study possess considerable potential for suppressing Fusarium crown and root rot in cucumber.

Received: 13 June 2025

Revised: 28 August 2025

Accepted: 27 September 2025

Available online: 3 December 2025

Cite this article:

Amini J, Saedpanah M, Alijani Z, Karimi K, 2025. Biocontrol of Fusarium crown and root rot of cucumber using selected endophytic bacteria under laboratory and greenhouse conditions. *J Appl Res Plant Prot* 14 (4): 341–354.

<https://dx.doi.org/10.22034/ARPP.2025.20880>



Copyright© 2025 University of Tabriz, Published by the University of Tabriz.

This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)

مهار زیستی بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار با استفاده از باکتری‌های اندوفیت انتخابی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

جهانشیر امینی^۱، محسن ساعدپناه^۱، زهرا علیجانی^۱، کیوان کریمی^۲

^۱ گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

^۲ گروه گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد دزفول، دزفول، ایران

نویسنده مسئول: keivan_sa144@yahoo.com

دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۲۳ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۶/۰۶ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۷/۰۵

چکیده

بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی از مهم‌ترین بیماری‌های محصول خیار در سراسر جهان محسوب می‌شود. در این پژوهش پتانسیل مهار کنندگی شش استرین باکتریایی اندوفیت انتخابی شامل *Staphylococcus sciuri* (MarR44)، *Serratia rubidaea* (Mar61-01)، *Bacillus sp.* (MarG19)، *Bacillus sp.* (MarH51) و *Bacillus sp.* (TN16) در شرایط آزمایشگاه و گلخانه در قالب طرح کاملاً تصادفی جهت کنترل این بیماری مورد ارزیابی قرار گرفت. در شرایط آزمایشگاه توان بازدارندگی این شش استرین در روش‌های کشت متقابل، تاثیر متابولیت‌های فرار، تاثیر متابولیت‌های غیر فرار و تاثیر آن‌ها روی جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر در مقایسه با شاهد معنی‌دار بود به طوری که در هر آزمون به ترتیب استرین‌های *S. sciuri* (MarR44) با ۵۶٪، *S. rubidaea* (Mar61-01) با ۷۵/۸٪، *S. rubidaea* (Mar61-01) با ۱۱٪ و *Bacillus sp.* (MarH51) با ۷۶/۵۳٪ بیشترین تاثیر را در ممانعت از رشد میسلیومی و جوانه‌زنی اسپور بیمارگر داشتند. بررسی‌های گلخانه‌ای به دو روش بذرمال و مایه‌زنی خاک با استرین‌های باکتریایی اندوفیت در خاک مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر نشان داد که استرین‌های باکتریایی اندوفیت کارایی بیش از ۶۰ درصدی را در بازدارندگی بیماری از خود نشان دادند. همچنین بررسی تاثیر استرین‌های باکتریایی روی شاخص‌های رشدی گیاه خیار حتی در حضور قارچ بیمارگر نشان داد که در هر دو روش بذرمال و مایه‌زنی خاک شاخص‌های اندازه‌گیری شده در مقایسه با شاهد به طور معنی‌داری افزایش یافتند. نتایج این مطالعه نشان داد که استرین‌های باکتریایی اندوفیت مطالعه شده در این پژوهش از توان و پتانسیل بالقوه‌ای در بازدارندگی از بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار برخوردار می‌باشند.

کلمات کلیدی: *Cucumis sativus*، فعالیت آنتاگونیستی، فوزاریوم، متابولیت‌های ضد قارچی، پروکاریوت‌های اندوفیتی

مقدمه

محصول، عرضه آن بصورت خارج از فصل و محافظت از آن در برابر شرایط نامساعد محیطی، آفات و بیماری‌ها است (Ahmed 2010).

امروزه بیماری‌های گیاهی یکی از چالش‌های بزرگ در کشاورزی مدرن هستند که می‌توانند به طور قابل توجهی روی تولید محصولات زراعی و باغی تأثیر بگذارند. بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار که توسط گونه‌های مختلف جنس قارچی *Fusarium* ایجاد می‌شود، یک بیماری آوندی مخرب روی این محصول در سطح جهانی محسوب می‌شود. شایع‌ترین گونه‌های عامل پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* J.H. Owen (Leslie & Summerell 2006) و *F. solani* f. sp. *cucurbitae* W.C. Summerell (2006) است.

خیار (*Cucumis sativus* L.) متعلق به خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) به دلیل مصرف گسترده، کشت آسان و منافع اقتصادی برای کشاورزان و کسب و کارهای مرتبط، یک محصول با ارزش در سطح جهانی محسوب می‌شود (Liu et al. 2020). بر اساس آمار خوار و بار جهانی فائو، سطح زیر کشت خیار در سال‌های اخیر به طور مداوم در حال افزایش بوده است به طوری که سطح زیر کشت جهانی خیار به حدود ۲/۲ میلیون هکتار و تولید جهانی این محصول به حدود ۱۰۰ میلیون تن رسیده است (FAO 2023). خیار در فضای باز یا در گلخانه‌های محافظت شده کشت می‌شود. هدف از کشت گلخانه‌ای این

مانند ناحیه ریزوسفری خاک و سطوح خارجی یا داخلی بافت‌های گیاهی، یا تولید آنتی‌بیوتیک‌ها انجام می‌دهند (Alabouvette et al. 2009; Ahmed 2010). در این میان، باکتری‌های اندوفیت از جمله میکروارگانسیم‌های بالقوه در فرآیند مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی هستند که به طور طبیعی در بافت‌های گیاهی زندگی می‌کنند و نقش مهمی در بهبود سلامت گیاهان و مهار بیماری‌ها دارند. این باکتری‌ها می‌توانند با تولید متابولیت‌های ثانویه فرار و غیرفرار، آنزیم‌ها و ترکیبات ضد میکروبی، به طور طبیعی از گیاهان در برابر بیمارگرها محافظت کنند. علاوه بر این، باکتری‌های اندوفیت می‌توانند با تحریک سیستم ایمنی گیاه، مقاومت آن را در برابر بیماری‌ها افزایش دهند. همچنین، با تولید تنظیم‌کننده‌های رشد، تثبیت نیتروژن، افزایش حلالیت فسفات معدنی و تولید سیدروفور، فنوتیپ و رشد میزبان‌شان را تغییر می‌دهند و سبب بهبود و تحریک رشد گیاه و افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش‌های محیطی می‌شوند (Khodakaramian et al. 2017).

با توجه به اینکه بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار یکی از محدودیت‌های اصلی توسعه این محصول در مناطق کشت محسوب می‌شود و از طرفی، استفاده مکرر از قارچ‌کش‌های شیمیایی و ظهور مقاومت در میان جمعیت‌های بیمارگر از چالش‌های اصلی کنترل این بیماری محسوب می‌شود، بنابراین استفاده از باکتری‌های اندوفیت به عنوان ریزموجودات مفید در مهار زیستی این بیمارگر می‌تواند روشی مناسب و بهینه در مدیریت این بیماری در تلفیق با سایر روش‌های مدیریتی باشد. لذا در این تحقیق سعی گردید به بررسی نحوه عملکرد آنتاگونیستی باکتری‌های اندوفیت انتخابی بر روی عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

بیمارگر قارچی و استرین‌های باکتریایی

در این مطالعه پتاسیل مهار زیستی شش استرین باکتریایی اندوفیتی شامل (*Serratia*, *Staphylococcus sciuri* (MarR44), *Bacillus atrophaeus* (DM6120), *rubidaea* (Mar61-01), *Bacillus* sp. (MarG19), *Bacillus* sp. (MarH51) و *Fusarium* sp.) F3 در مقابل یک استرین قارچی (*Fusarium* sp.) F3 عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار مورد ارزیابی قرار گرفت. تمامی استرین‌های باکتریایی و قارچی از کلکسیون آزمایشگاه کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی

(Snyder & H.N. Hansen (Michielse & Rep 2009), *equiseti* (Corda) Sacc., Syll. Fung (Summerell et al. 2010), *F. proliferatum* (Matsush.) Nirenberg, Mitt. و Biol. Bundesanst. Land- Forstw (Seifert et al. 2003). هستند که گونه اولی بیشتر در ارتباط با پژمردگی خیار شناخته شده می‌باشد. این بیماری یکی از عوامل جدی محدودکننده تولید خیار است که در تمام مراحل رشدی گیاه خیار توانایی آلوده کردن آن را دارد. بیمارگر فوزاریوم از طریق نفوذ هیف‌های خود به بافت‌های آوندی میزبان و تولید زادمایه، ترشح آنزیم‌های هیدرولیتیک مرتبط با بیماری‌زایی و زهرابه در روند آلودگی به گیاهان میزبان آسیب می‌زند (Cha et al. 2016). این بیماری معمولاً منجر به کاهش تولید خیار به میزان ۱۰ تا ۳۰ درصد می‌شود و در موارد شدید، این کاهش می‌تواند به ۸۰ تا ۹۰ درصد نیز برسد (Yang et al. 2024).

روش‌های مختلفی برای مبارزه با بیمارگرهای خاکزاد از جمله *Fusarium* مطرح شده است. از روش‌های مهار فیزیکی می‌توان به آفتاب‌دهی خاک و ضدعفونی خاک با بخار و گرما اشاره کرد. در میان روش‌های زراعی استفاده از تناوب زراعی، رعایت اصول بهداشتی، استفاده از ارقام مقاوم و پیوند زدن گیاه حساس به ساقه‌های گیاهان مقاوم به بیماری می‌تواند باعث کاهش میزان بیماری شود (Ajillogba & Babalola 2013). همچنین مهار شیمیایی یکی دیگر از روش‌های مبارزه با بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار می‌باشد. برخی از این سموم شیمیایی، شامل پروکلراز، پروپیکونازول، تیابندازول، کاربندازیم، بنومیل، تیوفانات، فوبریدازول و همه بنزیمیدازول‌ها می‌باشند (Khan & Khan 2002). امروزه استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی به دلایل مختلف از جمله ماندگاری سموم روی محصولات کشاورزی و به خطر افتادن سلامت انسان، ایجاد نژادهای مقاوم بیمارگر به سموم شیمیایی، از بین بردن دشمنان طبیعی بیمارگر، تاثیر زیان‌آور روی موجودات زنده و کسانی که در تماس مستقیم با آنها هستند، کاهش تنوع زیستی و آسیب رساندن به محیط زیست، محدود شده است (Huang et al. 2011). بنابراین توجه به روش‌های جایگزین و پایدار برای مهار بیماری‌های گیاهی، به ویژه مهار زیستی، اهمیت بیشتری یافته است. سازوکارهای مهار زیستی پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار توسط ریز موجودات مفید بسیار پیچیده است. بیشتر مطالعاتی که قبلاً انجام شده، روی استفاده از فوزاریوم‌های غیر بیمارگر یا سایر آنتاگونیست‌ها متمرکز بوده‌اند که مهار زیستی را از طریق سازوکارهایی مانند رقابت برای مواد مغذی یا آهن، رقابت بر سر آشیانه‌های اکولوژیکی (Ecological niches)

در این روش استرین‌های باکتریایی (کشت ۲۴ ساعته) بصورت جداگانه در یک طرف تشتک پتری روی محیط PDA به صورت خطی کشت شدند و در طرف مقابل یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه قارچ بیمارگر قرار داده شد. در تیمار شاهد دیسک قارچ به تنهایی کشت گردید. تشتک‌های پتری در انکوباتور در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از گذشت هفت روز قطر کلنی قارچ اندازه‌گیری و با تیمار شاهد مقایسه شد. درصد بازدارندگی هر استرین با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Moreira et al., 2014).

$$\text{Inhibition percentage (IP)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

IP: درصد بازدارندگی، A: میانگین رشد قارچ در شاهد، B:

میانگین رشد قارچ در تیمار

بررسی اثرات ضد قارچی متابولیت‌های فرار

به منظور ارزیابی تاثیرات ضد قارچی ترکیبات فرار، استرین‌های باکتریایی بر روی محیط نوترینت آگار (NA, Merck, Germany) کشت گردید. همچنین یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه قارچ بیمارگر در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA (Merck, Germany) قرار داده شد. در شرایط سترون تشتک‌های پتری حاوی قارچ بیمارگر روی تشتک‌های پتری حاوی استرین‌های باکتریایی قرار گرفت و محل اتصال با پارافیلیم پوشانده شد. در تیمار شاهد، تشتک پتری حاوی قارچ بیمارگر بر روی محیط کشت NA فاقد زادمایه باکتری قرار داده شد. تشتک‌های پتری در انکوباتور در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری و پس از گذشت هفت روز قطر پرگنه قارچ اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه گردید. درصد بازدارندگی طبق فرمول ذکر شده در بالا محاسبه گردید (Gao et al. 2017).

بررسی اثرات ضد قارچی متابولیت‌های غیر فرار تولید شده بصورت نشست در آگار

ابتدا استرین‌های باکتریایی با جمعیت 10^8 cfu/ml درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۴۵ میلی‌لیتر محیط نوترینت برات (Nutrient Broth; NB, Merck, Germany) سترون کشت و به مدت ۴۸ ساعت بر روی دستگاه لرزاننده با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت در ۵۰۰۰ دور دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ، مایع رویی از فیلتر سرنگی قطر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد. به منظور بررسی تاثیر متابولیت‌های استخراج شده از هر استرین، از پتری‌های حاوی

دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان تهیه گردید. واکشت استرین‌های باکتری روی محیط نوترینت-آگار (Nutrient Agar; NA) به صورت کشت خطی به روش تک کلون انجام شد. سپس، در دمای ۲۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری گردید. واکشت استرین قارچی نیز روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) انجام شد و در دمای ۲۴ درجه سلسیوس به مدت هفت روز نگهداری شد.

شناسایی مولکولی جدا/یه قارچ بیمارگر

استخراج DNA ژنومی قارچ بیمارگر بر اساس روش مبتنی بر CTAB انجام گرفت (Möller et al. 1992). بخشی از ژن فاکتور بسط‌دهنده رونویسی ۱-آلفا (*tef 1-α*) با استفاده از آغازگرهای EF1 و EF2 (O'Donnell et al. 1998) تکثیر گردید. مخلوط واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر ماستر میکس (1x، شرکت سیناژن)، ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، یک میکرولیتر از هر آغازگر (0.2 μM) و ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (۵۰ نانو گرم) انجام گرفت. سپس، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شدند. برای تخمین اندازه قطعات DNA تکثیر شده از نشانگر اندازه‌های GeneRuler™ 100bp DNA ladder استفاده شد. الکتروفورز به مدت ۷۰ دقیقه در جریان ثابت ۸۰ ولت انجام گرفت. پس از انجام الکتروفورز، ژل‌ها توسط دستگاه Ultraviolet Transilluminator White/ مدل uvitek مشاهده و تصویربرداری شدند. محصول نهایی PCR جهت تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شد.

تجزیه و تحلیل‌های تبارشناختی

توالی‌های خام بعد از ویرایش با استفاده از نرم افزار MEGA ver. 7.0 با توالی‌های موجود در بانک داده‌های ژن NCBI با استفاده از ابزار جستجوی بلاست مقایسه شدند و توالی ژن متناظر در استرین‌های معتبر و مرجع جهت ترسیم تبارنما از بانک ژن اخذ گردید. بعد از هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها و تعیین مدل تکاملی با استفاده از نرم افزار MEGA7 ترسیم تبارنما با استفاده از روش حداکثر احتمال (ML) انجام شد. آنالیز اعتبارسنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار انجام گردید. استرین قارچی *F. nirenbergiae* Lombard & Crous (NRRL22902) به عنوان آرایه‌ی برون‌گروه مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون‌های مهار زیستی در شرایط آزمایشگاه

بررسی اثرات ضد قارچی در کشت متقابل

خاک زراعی، کود پوسیده دامی و پرلیت بود که به ترتیب با نسبت ۱:۱:۲ با هم مخلوط و دو مرتبه اتوکلاو شد. برای انجام این مرحله از آزمایش از گلدان‌های پلاستیکی استفاده شد و در هر گلدان یک عدد گیاهچه دارای دو برگ حقیقی جهت اعمال تیمارها کشت داده شد. در هر گلدان به ازای ۴۰۰ گرم خاک، ۴۰ گرم از زادمایه بیمارگر (۱۰ درصد وزنی) به یک سوم میانی گلدان اضافه شد. دو سوم تحتانی و فوقانی گلدان با مخلوط خاک زراعی، کود پوسیده دامی و پرلیت سترون پر شد. چهار میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر باکتری آنتاگونیست با جمعیت 1×10^8 cfu/ml به ازای هر ۴۰۰ گرم جرم گلدان به خاک در یک سوم سطح بالایی گلدان اضافه گردید. تیمارها در دمای 32 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. در تیمار شاهد سالم از خاک سترون استفاده شد. این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ۱۴ تیمار در چهار تکرار انجام شد. نحوه چیدمان تیمارها عبارت بودند از: شاهد آلوده (کنترل مثبت): گلدان‌های حاوی قارچ بیمارگر، شاهد سالم (کنترل منفی): گلدان‌های حاوی خاک سترون، تیمار باکتری‌های اندوفیت: گلدان‌های حاوی سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست، تیمار باکتری‌های اندوفیت + قارچ بیمارگر: گلدان‌های حاوی قارچ بیمارگر و سوسپانسیون باکتری آنتاگونیست، ارزیابی بیماری ۴۵ روز بعد از مایه‌زنی انجام شد. با استفاده از یک رتبه‌بندی ۱ تا ۵: (۱ = گیاه سالم ۲ = شروع پژمردگی و زردی برگ‌ها ۳ = پژمردگی خفیف، کوتاه ماندن گیاهان ۴ = پژمردگی اکثر برگ‌ها ۵ = پژمردگی کامل و مرگ بوته) (Chikh Rouhou et al. 2010). شاخص بیماری بر اساس فرمول زیر برای هر تکرار ارزیابی شد (Cao et al. 2012).

$$\text{شاخص بیماری (\%)} = \frac{\text{مجموع (رتبه گیاه)} \times (\text{تعداد گیاه رتبه})}{(\text{تعداد کل گیاه}) \times (\text{بالاترین رتبه}) \times 100}$$

تاثیر باکتری‌های اندوفیت بر شدت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار به روش مایه‌زنی بذور خیار مخلوط خاک حاوی خاک زراعی، کود پوسیده دامی و پرلیت بود به ترتیب با نسبت ۱:۱:۲ با هم مخلوط و دو مرتبه اتوکلاو شده و قبل از قرار دادن بذور با زادمایه قارچ بیمارگر به نسبت ده درصد وزنی مایه‌زنی شد. سپس بذور ضدعفونی شده به محلول کربوکسیل متیل سلولز ۰/۵ درصد و سوسپانسیون باکتری‌های آنتاگونیست با جمعیت 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر آغشته شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه روی دستگاه لرزاننده با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد و در گلدان‌ها کشت

محیط کشت PDA استفاده شد. یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه قارچ بیمارگر در مرکز هر قسمت قرار داده شد و به فواصل ۲۵ میلی‌متر از دیسک قارچ، سه چاهک پنج میلی‌متری در سه طرف دیسک ایجاد و ۱۵۰ میکرولیتر از عصاره فیلتر شده هر استرین باکتریایی در هر چاهک ریخته شد. در تیمار شاهد در چاهک، محیط کشت سترون اضافه گردید. پتری‌ها در انکوباتور در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری و پس از گذشت هفت روز قطر پرگنه قارچ بیمارگر در مقایسه با شاهد اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی طبق فرمول ذکر شده در بالا محاسبه گردید (Jangir et al. 2018).

بررسی اثرات ضد قارچی متابولیت‌های غیر فرار تولید شده روی جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر

یک میلی‌لیتر از متابولیت‌های غیر فرار فیلتر شده با پنج میلی‌لیتر محیط PDB حاوی سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر با غلظت اسپور 1×10^6 در هر میلی‌لیتر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه نگهداری شد. در تیمار شاهد محیط PDB حاوی سوسپانسیون اسپور بدون اضافه کردن متابولیت استفاده گردید. پس از گذشت ۲۴ ساعت میزان جوانه‌زنی ۱۰۰ اسپور به وسیله میکروسکوپ نوری ارزیابی گردید و درصد بازدارندگی طبق فرمول زیر محاسبه شد (Mohammadi et al. 2017; Saechow et al. 2018).

$$\text{Inhibition percentage (IP)} = \frac{A - B}{A} \times 100$$

IP: درصد بازدارندگی، A: تعداد اسپور جوانه‌زده در شاهد
B: تعداد اسپور جوانه‌زده در تیمار

آزمون مهار زیستی در شرایط گلخانه

به منظور انجام آزمون مهار زیستی در شرایط گلخانه، دو روش مایه‌زنی باکتری‌های اندوفیت به بذور خیار و مایه‌زنی سوسپانسیون باکتری‌های اندوفیت به خاک گلدان انجام گرفت. سوسپانسیون هر استرین باکتری با غلظت 1×10^8 سلول در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه شد. زادمایه بیمارگر نیز روی بذور گندم سترون مایه‌زنی شده و تهیه گردید.

تاثیر باکتری‌های اندوفیت بر شدت پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار به روش مایه‌زنی خاک گلدان خاک استفاده شده در آزمایش‌های گلخانه‌ای ترکیبی از

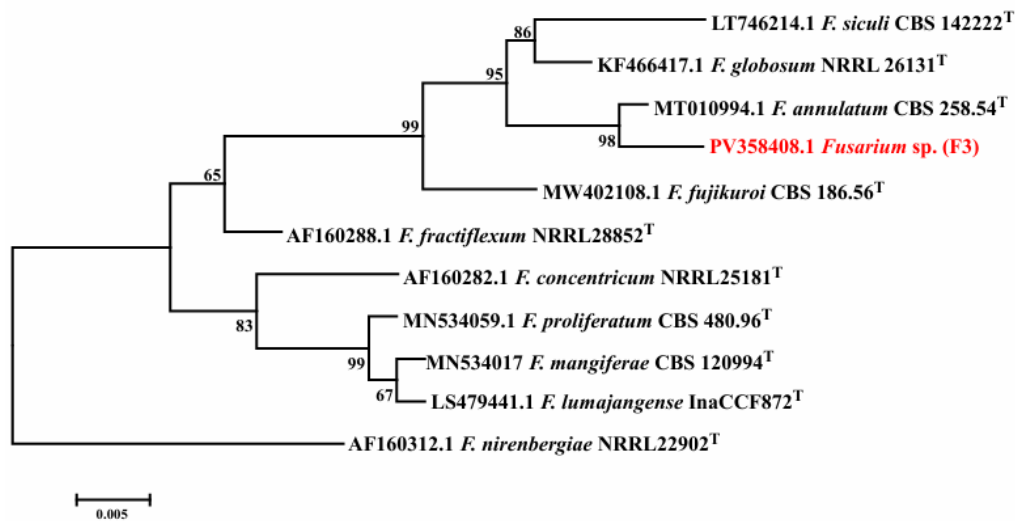
نتایج

استنباط تبارشناختی با استفاده از مدل تکاملی K2، جدایه قارچ بیمارگر در این مطالعه را با درصد اعتبارسنجی بالا در خوشه گونه کمپلکس *Fusarium fujikuroi* و به عنوان گونه خواهری گونه *Fusarium annulatum* قرار داد (شکل ۱). از آنجاییکه تعیین دقیق هویت گونه جدایه بیمارگر در این مطالعه نیازمند بررسی ژن‌های بیشتر می‌باشد جدایه بیمارگر فعلا بصورت *Fusarium sp. strain F3* در نظر گرفته می‌شود (شکل ۱).

گردید. تیمارها در دمای 22 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. این آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی شامل ۱۴ تیمار در ۴ تکرار انجام شد. رتبه‌بندی و ارزیابی شاخص بیماری مشابه قسمت مایه‌زنی خاک انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها یک بار و تیمارهای هر آزمایش در چهار تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا، تجزیه و تحلیل شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی توسط نرم‌افزار SAS v.8.3 در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.



شکل ۱. تبارنمای فیلوژنتیکی ترسیم شده با استفاده از ناحیه ژنی فاکتور بسط دهنده رونویسی آلفا (*tef*) ۱۱ آرایه بر اساس روش Likelihood Maximum در نرم افزار MEGA ver. 7.0. بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. گونه *Fusarium nirenbergiae* (NRRL22902) به عنوان گروه خارجی استفاده شده است. جدایه مورد مطالعه در این تحقیق بصورت F3 مشخص شده است. حرف T نشان دهنده استرین‌های تیپ می‌باشد.

Figure 1. A phylogenetic diagram drawn using the gene region of transcription enhancer factor alpha (*tef*) 11 taxa based on the Maximum Likelihood method in MEGA ver. 7.0. Numbers above each branch refer to bootstrap values out of 1000 repetitions. *Fusarium nirenbergiae* (NRRL22902) has been used as an outgroup. The isolate studied in this research is shown as F3. The letter T indicates the type strains.

Bacillus sp. (TN16) و *S. rubidaea* (Mar61-01) به ترتیب $53/7$ ، $53/7$ ، 48 ، $46/8$ و $33/5$ درصد بود (جدول ۱).

در آزمون تاثیر ترکیبات فرار باکتری‌های اندوفیت در مهار رشد پرگنه قارچ بیمارگر، استرین‌های *S. rubidaea* (Mar61-01) و *B. atrophaeus* (DM6120) با $75/8$ و $74/5$ درصد بیشترین تاثیر بازدارندگی را داشتند (جدول ۱). اثر بازدارندگی استرین‌های *S. sciuri* (MarR44)، *Bacillus sp.* (MarG19)، *Bacillus sp.* (TN16) و *Bacillus sp.* (MarH51) به ترتیب $65/5$ ، $65/5$ ، 45 و 40 درصد محاسبه گردید و تفاوت آماری معنی‌داری در مقایسه تیمارها با شاهد

بررسی اثرات ضد قارچی سویه‌های باکتریایی در شرایط آزمایشگاه

در آزمون کشت متقابل نتایج بررسی اثر بازدارندگی باکتری‌های اندوفیت بر میزان رشد پرگنه قارچ بیمارگر نشان داد که تمام استرین‌های باکتریایی مورد مطالعه به طور معنی‌داری در مهار رشد پرگنه قارچ بیمارگر تاثیرگذار بودند ($p < 0.05$). استرین *S. sciuri* (MarR44) با 56 درصد بیشترین تاثیر را در کاهش رشد پرگنه بیمارگر داشت. اثر بازدارندگی سایر استرین‌های باکتریایی شامل *Bacillus sp.* (MarG19)، *Bacillus sp.* (MarH51) و *B. atrophaeus* (DM6120) *Bacillus sp.* (MarH51)

بیانگر وجود تفاوت معنی‌دار تیمارها با شاهد بود (جدول ۱). همچنین در بررسی تاثیر متابولیت‌های غیرفرار استرین‌های باکتریایی بر جوانه زنی اسپور نتایج نشان داد که متابولیت‌های غیرفرار استرین *Bacillus sp.* (MarH51) با تاثیر ۷۶/۵۳ درصدی و متابولیت‌های غیرفرار دو استرین *Bacillus sp.* (TN16) و *B. atrophaeus* (DM6120) با تاثیر ۷۲/۴۵ درصدی بیشترین تاثیر را در جلوگیری از جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر داشتند و کمترین میزان مهارکنندگی متابولیت‌های غیر فرار در جوانه‌زنی اسپور مربوط به استرین *Bacillus sp.* (MarG19) با مهار ۳۰/۶ درصدی بود (جدول ۱).

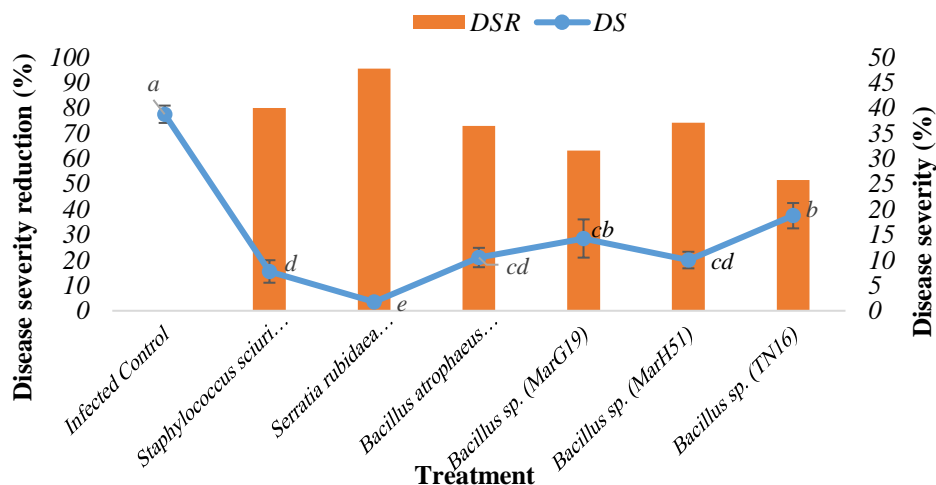
دیده شد ($p < 0.05$). در آزمون بررسی اثرات ضد قارچی متابولیت‌های غیر فرار، مهار رشد میسلومی قارچ بیمارگر نسبت به آزمون‌های دیگر کمتر بود به طوری که استرین‌های *S. rubidaea* (Mar61-01) و *Bacillus sp.* (MarG19) به ترتیب با ۱۱ و ۹/۴ درصد بیشترین تاثیر بازدارندگی را داشتند و کمترین میزان بازدارندگی مربوط به استرین *S. sciuri* (MarR44) با ۱/۹ درصد بود. درصد بازدارندگی استرین‌های *Bacillus sp.* (MarH51) و *B. atrophaeus* (DM6120) و *Bacillus sp.* (TN16) به ترتیب ۴/۱، ۲/۶ و ۲/۶ درصد محاسبه شد که مقایسه میانگین داده‌ها

جدول ۱. تاثیر باکتری‌های اندوفیت روی رشد میسلومی و جوانه‌زنی اسپور *Fusarium sp.* عامل پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار در آزمون‌های آزمایشگاهی (آزمون متقابل، متابولیت‌های فرار و متابولیت‌های خارج سلولی).

Table 1. Effect of endophytic bacteria on mycelial growth and spore germination of *Fusarium sp.* causing Fusarium crown and root rot of cucumber in in vitro assays (dual culture, volatile metabolites and extracellular metabolites).

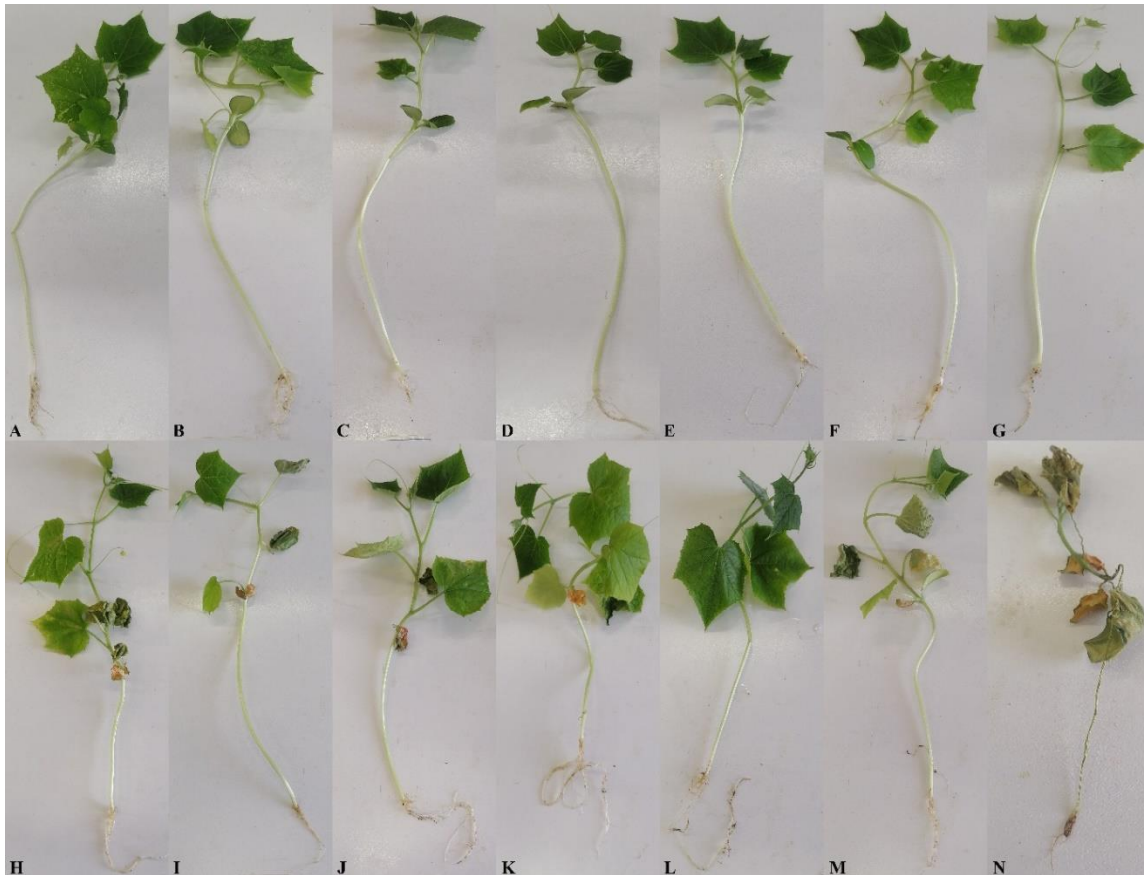
Treatments	Dual culture (cm)	Inhibition (%)	Volatile metabolites (cm)	Inhibition (%)	Extracellular metabolites (cm)	Inhibition (%)	Extracellular metabolites effect on spore germination (N)	Inhibition (%)
Control	8.65 ± 0.28 ^a	0	8.7 ± 0.41 ^a	0	8.83 ± 0.58 ^a	0	98.33 ± 0.88 ^a	0
Staphylococcus sciuri (MarR44)	3.8 ± 0.00 ^d	56	3 ± 0.2 ^d	65.5	8.66 ± 0.58 ^b	1.9	67 ± 1.73 ^b	31.6
Serratia rubidaea (Mar61-01)	5.75 ± 0.45 ^b	33.5	2.14 ± 0.25 ^e	75.8	7.86 ± 0.58 ^c	11	35 ± 2.89 ^c	64.3
Bacillus atrophaeus (DM6120)	4.5 ± 0.25 ^c	48	2.22 ± 0.16 ^e	74.5	8.6 ± 0.1 ^b	2.6	27 ± 1.73 ^d	72.45
Bacillus sp. (MarG19)	4 ± 0.82 ^c	53.7	4.78 ± 0.23 ^c	45	8 ± 0.00 ^d	9.4	68.66 ± 4.67 ^b	30.6
Bacillus sp. (MarH51)	4.6 ± 0.37 ^c	53.7	5.22 ± 0.23 ^b	40	8.46 ± 0.58 ^c	4.1	23 ± 2.08 ^d	76.53
Bacillus sp. (TN16)	4.52 ± 0.15 ^c	46.8	3 ± 0.29 ^d	65.5	8.6 ± 0.1 ^b	2.6	27 ± 4.58 ^d	72.45

Means with common letters are not significantly different from each other ($p \leq 0.05$ ANOVA followed by Tukey test).



شکل ۲. تاثیر باکتری‌های اندوفیت بر شاخص بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار ناشی از *Fusarium sp.* strain F3 در آزمون مایه‌زنی خاک در شرایط گلخانه. میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد ندارند. DS = شدت بیماری و DSR = کاهش شدت بیماری.

Figure 2. The effects of endophytic bacteria on disease index of Fusarium crown and root rot of cucumber caused by *Fusarium sp.* strain F3 in soil inoculation assay under greenhouse conditions. Means with common letters are not significantly different from each other ($p \leq 0.05$ ANOVA followed by Tukey test). DS = disease severity and DSR = disease severity reduction.



شکل ۳. تاثیر باکتری‌های اندوفیت بر رشد (ردیف بالا) و مهار زیستی بیمارگر *Fusarium* sp. strain F3 (ردیف پایین) در گیاه خیار در روش مایه‌زنی سوسپانسیون باکتری‌های اندوفیت به خاک در شرایط گلخانه. حرف P در تیمارها به معنای قارچ بیمارگر می‌باشد. (A) *Bacillus atrophaeus* (DM6120), (B) *Bacillus* sp. (MarG19), (C) *Bacillus* sp. (MarH51), (D) *Staphylococcus sciuri* (MarR44), (E) *Serratia rubidaea* (Mar61-01), (F) *Bacillus* sp. (TN16), (G) شاهد سالم، (H) *Bacillus atrophaeus* (DM6120) + P, (I) *Bacillus* sp. (MarG19) + P, (J) *Bacillus* sp. (MarH51) + P, (K) *Staphylococcus sciuri* (MarR44) + P, (L) *Serratia rubidaea* (Mar61-01) + P, (M) *Bacillus* sp. (TN16) + P, (N) شاهد آلوده.

Figure 3. The effect of endophytic bacteria on growth (top row) and the biocontrol of the pathogen *Fusarium* sp. strain F3 (bottom row) in cucumber plants in soil inoculation assay under greenhouse conditions. The letter P in the treatments denotes the pathogenic fungus. A) *Bacillus atrophaeus* (DM6120), B) *Bacillus* sp. (MarG19), C) *Bacillus* sp. (MarH51), D) *Staphylococcus sciuri* (MarR44), E) *Serratia rubidaea* (Mar61-01), F) *Bacillus* sp. (TN16), G) Healthy control, H) *Bacillus atrophaeus* (DM6120) + P, I) *Bacillus* sp. (MarG19) + P, J) *Bacillus* sp. (MarH51) + P, K) *Staphylococcus sciuri* (MarR44) + P, L) *Serratia rubidaea* (Mar61-01) + P, M) *Bacillus* sp. (TN16) + P, N) Infected control.

ساقه در مقایسه با تیمار بیمارگر (شاهد مثبت) شدند و مقایسه میانگین‌ها از نظر آماری در سطح پنج درصد معنی‌دار شد. دو استرین *S. sciuri* (MarR44) و *S. rubidaea* (Mar61-01) بیشترین تاثیر را بر افزایش طول ساقه داشتند که در مقایسه میانگین در سطح پنج درصد در یک گروه آماری قرار گرفتند. همچنین، نتایج نشان داد که طول ساقه در تیمارهای *Bacillus* sp. (MarH51) + P، *S. rubidaea* (Mar61-01) + P، *Bacillus* sp. (MarG19) + P و *S. sciuri* (MarR44) + P، *Bacillus* sp. (MarG19) نسبت به شاهد سالم کمتر و نسبت به شاهد آلوده بیشتر بود (جدول ۲).

تاثیر استرین‌های باکتری‌های اندوفیت در مهار بیماری به روش مایه‌زنی خاک

در این آزمون سوسپانسیون باکتری به خاک گلدان حاوی گیاهچه دارای دو برگ حقیقی آلوده به زادمایه قارچ بیمارگر اضافه شد. نتایج پس از گذشت ۴۵ روز نشان داد که همه استرین‌ها در مهار و کاهش شدت بیماری موفق بوده و اختلاف معنی‌داری را با تیمار بیمارگر (شاهد مثبت) نشان دادند. استرین *S. rubidaea* (Mar61-01) بیشترین مقدار بازدارندگی (۹۵/۴۸٪) را نشان داد (شکل ۲ و ۳).

در روش مایه‌زنی خاک تمامی تیمارها موجب افزایش طول

تمامی تیمارها نسبت به تیمارهای شاهد سالم و آلوده تاثیر مثبتی بر افزایش طول ریشه داشتند و از نظر آماری در سطح پنج درصد بین تیمارها تفاوت معنی‌دار مشاهده شد. در این میان

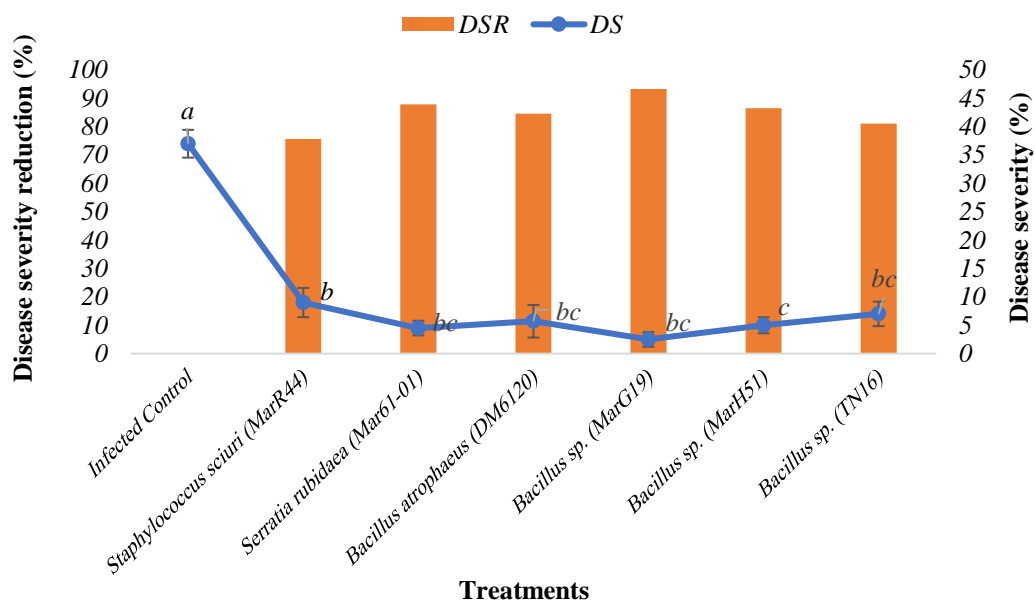
تیمار *S. sciuri* (MarR44) بیشترین تاثیر را نسبت به سایر تیمارها در افزایش طول ریشه نشان داد (جدول ۲).

جدول ۲. اثر باکتری‌های اندوفیت روی فاکتورهای رشدی گیاه خیار سالم و آلوده شده با بیمارگر *Fusarium* sp. strain F3 عامل پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار در آزمون مایه‌زنی خاک در شرایط گلخانه.

Table 2. Effect of endophytic bacteria on growth parameters of healthy and infected cucumber plants with *Fusarium* sp. strain F3 causing Fusarium crown and root rot of cucumber in soil inoculation assay under greenhouse conditions.

Treatments	Stem length (cm)	Root length (cm)	Stem wet weight (gr)	Root wet weight (gr)	Stem dry weight (gr)	Root dry weight (gr)
MarR44	33.25 ± 2.05 ^{abc}	6.5 ± 0.957 ^{gef}	1.89 ± 0.037 ^{cd}	0.102 ± 0.004 ^{cde}	0.06 ± 0.01 ^{cd}	0.003 ± 0.0004 ^e
Mar61-01	31 ± 0.91 ^{abcd}	15.5 ± 0.912 ^{ab}	3.59 ± 0.17 ^{ab}	0.167 ± 0.01 ^{bc}	0.287 ± 0.01 ^{bcd}	0.016 ± 0.002 ^{cde}
DM6120	36 ± 3.76 ^a	12.25 ± 0.853 ^{bc}	4.7 ± 0.51 ^a	0.292 ± 0.02 ^a	0.342 ± 0.02 ^b	0.015 ± 0.002 ^{cde}
MarG19	35.25 ± 1.97 ^a	11 ± 1.97 ^{dc}	3.7 ± 0.82 ^{ab}	0.132 ± 0.02 ^{cd}	0.66 ± 0.1 ^a	0.014 ± 0.002 ^{cde}
MarH51	34 ± 1.22 ^{ab}	8.6 ± 0.187 ^{de}	2.76 ± 0.079 ^{bc}	0.212 ± 0.01 ^b	0.282 ± 0.17 ^{bcd}	0.011 ± 0.0008 ^{cde}
TN16	28.75 ± 0.47 ^{abcd}	18.25 ± 1.1 ^a	3.76 ± 0.41 ^{ab}	0.22 ± 0.01 ^{ab}	0.337 ± 0.02 ^{bc}	0.022 ± 0.002 ^c
MarR44) + P	29 ± 1.68 ^{abcd}	7.97 ± 0.417 ^{def}	1.91 ± 0.11 ^{cd}	0.105 ± 0.01 ^{cde}	0.121 ± 0.01 ^{bcd}	0.017 ± 0.002 ^{cd}
Mar61-01 + P	27.25 ± 1.03 ^{bcd}	8 ± 1.47 ^{def}	1.73 ± 0.22 ^{cd}	0.13 ± 0.01 ^{cd}	0.118 ± 0.01 ^{bcd}	0.0095 ± 0.0002 ^{cde}
DM6120 + P	25.75 ± 0.85 ^{cde}	3.6 ± 0.521 ^g	0.9 ± 0.08 ^d	0.06 ± 0.004 ^{de}	0.056 ± 0.005 ^{cd}	0.02 ± 0.0006 ^{cd}
MarG19 + P	26.75 ± 0.62 ^{bcd}	4.75 ± 0.25 ^{gf}	1.2 ± 0.15 ^{cd}	0.1 ± 0.004 ^{cde}	0.06 ± 0.01 ^{cd}	0.003 ± 0.0004 ^e
MarH51 + P	23.75 ± 1.1 ^{ed}	5.57 ± 0.213 ^{gef}	1.03 ± 0.043 ^d	0.107 ± 0.004 ^{cde}	0.024 ± 0.004 ^d	0.069 ± 0.003 ^a
TN16 + P	24.25 ± 1.1 ^{ed}	4.72 ± 0.188 ^{gf}	1.31 ± 0.051 ^{cd}	0.117 ± 0.008 ^{cd}	0.072 ± 0.004 ^{bcd}	0.0085 ± 0.001 ^{cde}
Healthy control	24.12 ± 1.46 ^{ed}	3.45 ± 0.232 ^g	1.22 ± 0.09 ^{cd}	0.035 ± 0.006 ^e	0.047 ± 0.007 ^d	0.042 ± 0.007 ^b
Infected control	18.25 ± 0.43 ^e	4.07 ± 0.702 ^g	1.42 ± 0.43 ^{cd}	0.037 ± 0.01 ^e	0.112 ± 0.019 ^{bcd}	0.0067 ± 0.0004 ^{cd}

Means with common letters are not significantly different from each other ($p \leq 0.05$ ANOVA followed by Tukey test). *Staphylococcus sciuri* (MarR44); *Serratia rubidaea* (Mar61-01); *Bacillus atropheus* (DM6120); *Bacillus* sp. (MarG19); *Bacillus* sp. (MarH51) and *Bacillus* sp. (TN16). P = pathogen.



شکل ۴. تاثیر باکتری‌های اندوفیت بر شاخص بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار ناشی از *Fusarium* sp. strain F3 در آزمون مایه‌زنی بذر (بدرمال) در شرایط گلخانه. میانگین‌های دارای حروف مشترک از نظر آماری تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد ندارند. DS = شدت بیماری و DSR = کاهش شدت بیماری

Figure 4. The effects of endophytic bacteria on disease index of *Fusarium* crown and root rot of cucumber caused by *Fusarium* sp. strain F3 in seed inoculation assay (seed coating) under greenhouse conditions. Means with common letters are not significantly different from each other ($p \leq 0.05$ ANOVA followed by Tukey test). DS = disease severity and DSR = disease severity reduction.



شکل ۵. تاثیر استرین‌های باکتری‌های اندوفیت روی رشد (ردیف بالا) و مهار زیستی بیمارگر *Fusarium* sp. strain F3 (ردیف پایین) در گیاه خیار در روش پوشش دادن بذور خیار در شرایط گلخانه. حرف P در تیمارها به معنای قارچ بیمارگر می‌باشد. (A) *Serratia rubidaea* (Mar61-01) (B) *Bacillus atrophaeus* (DM6120) (C) *Bacillus* sp. (MarH51) (D) *Bacillus* sp. (MarG19) (E) *Staphylococcus sciuri* (MarR44) (F) *Bacillus* sp. (TN16) (G) شاهد سالم، (H) *Bacillus atrophaeus* (DM6120) + P (I) *Serratia rubidaea* (Mar61-01) + P (J) *Bacillus* sp. (MarH51) + P (K) *Bacillus* sp. (MarG19) + P (L) *Serratia rubidaea* (Mar61-01) + P (M) *Bacillus* sp. (TN16) + P (N) شاهد آلوده.

Figure 5. The effect of endophytic bacteria on growth (top row) and the biocontrol of the pathogen *Fusarium* sp. strain F3 (bottom row) in cucumber plants in seed inoculation assay (seed coating) under greenhouse conditions. The letter P in the treatments denotes the pathogenic fungus. A) *Bacillus atrophaeus* (DM6120), B) *Bacillus* sp. (MarG19), C) *Bacillus* sp. (MarH51), D) *Staphylococcus sciuri* (MarR44), E) *Serratia rubidaea* (Mar61-01), F) *Bacillus* sp. (TN16), G) Healthy control, H) *Bacillus atrophaeus* (DM6120) + P, I) *Bacillus* sp. (MarG19) + P, J) *Bacillus* sp. (MarH51) + P, K) *Bacillus* sp. (MarG19) + P, L) *Serratia rubidaea* (Mar61-01) + P, M) *Bacillus* sp. (TN16) + P, N) Infected control.

متعلق به دو تیمار *S. sciuri* (MarR44) و *Bacillus* sp. (MarH51) بود (جدول ۲).

تیمار *B. atrophaeus* (DM6120) بیشترین تاثیر را در افزایش وزن تر ریشه داشت. بقیه تیمارها در سطح بعد و در یک گروه قرار گرفتند. نتایج تاثیر تیمارها بر وزن خشک ریشه در جدول ۲ نشان داد که تمامی تیمارها در سطح پنج درصد بیشتر از شاهد آلوده و سالم سبب افزایش وزن خشک ریشه شدند. تیمار *S. sciuri* (MarR44) بیشترین و تیمار *B. atrophaeus*

تیمارهای *S. sciuri* (MarR44)، *S. rubidaea* (Mar61-01) و *B. atrophaeus* (DM6120) بیشترین تاثیر را نسبت به سایر تیمارها در افزایش وزن تر ساقه نشان دادند. همچنین تمامی تیمارها به استثنای تیمار *S. sciuri* (MarR44) + P نسبت به شاهد سالم و شاهد آلوده، تاثیر معنی‌داری در افزایش وزن تر ساقه گیاه داشتند. به علاوه، وزن خشک ساقه در تمامی تیمارها به جز *B. atrophaeus* (DM6120) و *Bacillus* sp. (MarG19) + P نسبت به تیمارهای شاهد افزایش یافت که بیشترین وزن

DM6120) کمترین تاثیر را روی وزن خشک داشتند (جدول ۲).
تاثیر استرین‌های باکتری‌های اندوفیت در مهار بیماری در روش بذر مال

نتایج این آزمایش نشان داد که همه استرین‌ها در مهار عامل بیماری عملکرد قابل قبول داشته و اختلاف معنی‌داری را با تیمار شاهد آلوده در سطح پنج درصد نشان دادند. در میان تیمارها استرین *Bacillus sp.* (MarG19) + P با ۹۳/۲۴ درصد و استرین *S. sciuri* (MarR44) + P با ۷۵/۶۷ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین بازدراندگی را در برابر بیمارگراز خود نشان دادند (شکل-های ۴ و ۵).
تیمارهای *S. rubidaea* (Mar61) - *S. sciuri* (MarR44) + P

جدول ۳. اثر باکتری‌های اندوفیت روی فاکتورهای رشدی گیاه خیار سالم و آلوده شده با بیمارگر *Fusarium sp.* strain F3 عامل پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار در آزمون مایه‌زنی بذر (بذر مال) در شرایط گلخانه.

جدول ۳. Effect of endophytic bacteria on growth parameters of healthy and infected cucumber plants with *Fusarium sp.* strain F3 causing Fusarium crown and root rot of cucumber in seed inoculation assay (seed coating) under greenhouse conditions.

Treatments	Stem length (cm)	Root length (cm)	Stem wet weight (gr)	Root wet weight (gr)	Stem dry weight (gr)	Root dry weight (gr)
MarR44	41.4 ± 2.9 ^{cd}	14.6 ± 0.979 ^{cd}	3.53 ± 0.404 ^e	0.426 ± 0.01 ^b	0.383 ± 0.008 ^{bcde}	0.016 ± 0.001 ^{bc}
Mar61-01	42.6 ± 4.3 ^{bcd}	8 ± 0.894 ^{gh}	4.43 ± 0.809 ^{de}	0.202 ± 0.02 ^b	0.366 ± 0.03 ^{bcde}	0.016 ± 0.001 ^{bc}
DM6120	54.6 ± 1.2 ^{ab}	16 ± 0.303 ^{cd}	6.12 ± 0.532 ^{cd}	0.306 ± 0.02 ^b	0.632 ± 0.02 ^{ab}	0.020 ± 0.002 ^{bc}
MarG19	41.2 ± 6 ^{cd}	17.4 ± 1.2 ^{bc}	7.55 ± 0.989 ^{bc}	0.572 ± 0.02 ^b	0.175 ± 0.04 ^e	0.017 ± 0.001 ^{bc}
MarH51	36.4 ± 1.86 ^d	12 ± 0.707 ^{ef}	4.2 ± 0.701 ^{de}	0.206 ± 0.011 ^b	0.684 ± 0.05 ^a	0.015 ± 0.001 ^{bc}
TN16	47.6 ± 2.5 ^{abcd}	11.3 ± 0.83 ^{efg}	5.16 ± 0.492 ^{cde}	0.224 ± 0.01 ^b	0.465 ± 0.03 ^{abc}	0.028 ± 0.01 ^{abc}
MarR44) + P	56.86 ± 0.64 ^a	22.4 ± 0.812 ^a	11.114 ± 0.128 ^a	1.164 ± 0.06 ^b	0.71 ± 0.07 ^a	0.048 ± 0.005 ^a
Mar61-01 + P	57.1 ± 1.34 ^a	20 ± 1 ^{ab}	10.88 ± 0.427 ^a	1.162 ± 0.06 ^b	0.528 ± 0.04 ^{abc}	0.034 ± 0.005 ^{ab}
DM6120 + P	49.9 ± 0.95 ^{abc}	13.26 ± 0.526 ^{de}	10.88 ± 0.553 ^a	6.358 ± 1.23 ^a	0.23 ± 0.01 ^{de}	0.012 ± 0.0003 ^{bc}
MarG19 + P	41 ± 2.8 ^{cd}	9.2 ± 0.374 ^{fg}	3.76 ± 0.304 ^{de}	0.416 ± 0.01 ^b	0.289 ± 0.06 ^{cde}	0.023 ± 0.002 ^{bc}
MarH51 + P	54.8 ± 0.86 ^{ab}	12.2 ± 0.374 ^{def}	9.09 ± 0.274 ^{ab}	1.484 ± 0.09 ^b	0.714 ± 0.009 ^a	0.028 ± 0.004 ^{abc}
TN16 + P	49.4 ± 0.87 ^{abc}	14.8 ± 0.374 ^{cde}	9.18 ± 0.215 ^{ab}	1.038 ± 0.04 ^b	0.601 ± 0.003 ^{ab}	0.029 ± 0.001 ^{abc}
Healthy control	42.6 ± 1.28 ^{bcd}	6.44 ± 0.186 ^h	3.28 ± 0.365 ^{ef}	0.436 ± 0.044 ^b	0.265 ± 0.15 ^{cde}	0.008 ± 0.0003 ^c
Infected control	13.8 ± 1.2 ^e	1.7 ± 0.561 ⁱ	0.91 ± 0.274 ^f	0.564 ± 0.186 ^b	0.129 ± 0.02 ^e	0.013 ± 0.001 ^{bc}

Means with common letters are not significantly different from each other ($p \leq 0.05$ ANOVA followed by Tukey test). *Staphylococcus sciuri* (MarR44); *Serratia rubidaea* (Mar61-01); *Bacillus atrophaeus* (DM6120); *Bacillus sp.* (MarG19); *Bacillus sp.* (MarH51) and *Bacillus sp.* (TN16). P = pathogen.

S. rubidaea (Mar61-01) + P بیشترین تاثیر را نسبت به سایر تیمارها در افزایش طول ریشه نشان داد (جدول ۳).

تاثیر باکتری‌های آنتاگونیست روی شاخص‌های رشدی گیاه خیار در روش بذر مال

تمامی تیمارها به استثنای *Bacillus sp.* (TN16) *Bacillus sp.* (MarH51) و *S. rubidaea* (Mar61-01) نسبت به شاهد سالم و شاهد آلوده تاثیر معنی‌داری بر افزایش وزن تر ساقه گیاه در سطح پنج درصد داشتند. تیمار *S. sciuri* (MarR44) + P بیشترین تاثیر را نسبت به سایر تیمارها در افزایش وزن تر ساقه نشان داد درحالی‌که وزن تر ساقه در تیمار *S. sciuri* (MarR44) نسبت به شاهد آلوده کمتر بود (جدول ۳).

در این آزمون تمامی تیمارها بجز تیمار *Bacillus sp.* (TN16) نسبت به شاهد سالم و شاهد آلوده، تاثیر معنی‌داری در سطح پنج درصد بر افزایش طول ساقه گیاه داشتند. تیمار *S. sciuri* (MarR44) + P بیشترین تاثیر را نسبت به سایر تیمارها در افزایش طول ساقه نشان داد. همچنین تمامی تیمارها به استثنای تیمارهای *Bacillus sp.* (MarH51) *Bacillus sp.* (TN16) و *S. sciuri* (MarR44) نسبت به شاهد سالم و شاهد آلوده تاثیر معنی‌داری را بر افزایش طول ریشه گیاه داشتند. تیمار

پژوهش نشان داد که این ترکیبات بیشتر در جلوگیری از جوانه‌زنی اسپور مؤثرند، موضوعی که با نتایج Cai et al. (2024) نیز مطابقت دارد. در آن مطالعه، *Paenibacillus polymyxa* با تولید ایتورین و فنجیسین، توانست جوانه‌زنی اسپور قارچ را تا ۶۰ درصد مهار کند. در پژوهش حاضر نیز استرین‌های *Bacillus atrophaeus* و *Bacillus sp.* (TN16)، *sp.* (MarH51) (DM6120) با توان بازدارندگی بیش از ۷۰ درصد در این زمینه عملکرد خوبی داشتند و این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده نقش مستقیم متابولیت‌های خاص در مراحل اولیه تهاجم قارچی باشد.

در آزمون‌های گلخانه‌ای نیز تأثیر استرین‌های باکتریایی در کاهش شدت بیماری به‌ویژه در دو روش بذر مال و مایه‌زنی خاک کاملاً مشهود بود (جدول‌های ۲ و ۳). در روش بذر مال، استرین *Bacillus sp.* (MarG19) با بازدارندگی بیش از ۹۰ درصد عملکرد برتری نسبت به سایر استرین‌ها داشت، این استرین همچنین در آزمون کشت متقابل رشد قارچ را به میزان ۵۳/۷ درصد مهار نمود. در حالی که در روش مایه‌زنی خاک، استرین *S. rubidaea* (Mar61-01) بیشترین تأثیر را در کنترل بیماری نشان داد که این نتیجه با فعالیت بالای ترکیبات فرآر این استرین (۷۵/۱۸) قابل تفسیر است. تفاوت در عملکرد استرین‌ها بسته به روش کاربرد می‌تواند ناشی از توانایی متفاوت آن‌ها در کلونیزه کردن ریشه، تولید مواد زیست‌فعال در خاک یا تعاملات متفاوت با میکروفلور خاک باشد (Adhikari et al. 2021; Cai et al. 2024). در این مطالعه؛ علاوه بر کنترل بیماری، استفاده از این استرین‌های باکتریایی باعث بهبود شاخص‌های رشدی گیاه خیار به‌ویژه افزایش وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و زیرزمینی و همچنین افزایش طول ریشه و ساقه در مقایسه با شاهد آلوده شد. این نتایج احتمالاً ناشی از توانایی استرین‌های اندوفیت در تولید هورمون‌های رشد گیاهی، جذب بهتر مواد مغذی و القای مقاومت سیستمیک در گیاه است. استرین *S. sciuri* (MarR44) در افزایش طول ساقه و وزن تر و خشک ریشه نسبت به سایر استرین‌ها عملکرد بالاتری از خود نشان داد که می‌تواند بیانگر ویژگی‌های محرک رشد قوی در این استرین باشد (Tan et al. 2024). یافته‌های این پژوهش با نتایج مطالعات پیشین در مورد نقش اندوفیت‌ها در کنترل بیماری‌های قارچی و بهبود رشد گیاهان مطابقت دارد (Alabouvette et al. 2009; Khodakaramian et al. 2017; Adhikari et al. 2021). مطالعه‌ای همسو استرین باکتریایی *P. polymyxa* hg18 سبب افزایش دو برابری وزن خشک و تر خیار شد (Cai et al. 2024).

از طرفی، تیمارهای *Bacillus sp.* (TN16)، *S. sciuri*، *Bacillus sp.* (MarR44) + P، *S. rubidaea* (Mar61-01) + P، *Bacillus sp.* (MarH51) + P نسبت به شاهد سالم و شاهد آلوده تأثیر معنی‌داری در سطح پنج درصد بر افزایش وزن خشک ساقه گیاه داشتند و از نظر آماری، تیمارهای *Bacillus sp.* (MarG19)+P، *Bacillus sp.* (MarH51)، *S. rubidaea* (Mar61-01)، *Bacillus sp.* (TN16)، *sp.* (MarG19)، *B. atrophaeus* (DM6120) و *S. sciuri* (MarR44) با شاهد‌های سالم و آلوده تفاوتی نداشتند. تیمار *B. atrophaeus* (DM6120) + P بیشترین تأثیر را نسبت به سایر تیمارها در افزایش وزن خشک ساقه نشان داد (جدول ۳).

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد که استرین‌های اندوفیت باکتریایی مورد بررسی در این مطالعه، توانمندی قابل توجهی در مهار بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار دارند (شکل‌های ۲ و ۳). یافته‌های ما با نتایج Xu et al. (2022) هم‌راستا بود؛ به‌طوری‌که در آن مطالعه مشخص شد که استرین باکتریایی اندوفیت *B. subtilis* YB-04 شدت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار را تا ۷۰ درصد کاهش می‌دهد. در پژوهش حاضر نیز استرین‌های *S. rubidaea* (Mar61-01) و *B. atrophaeus* (DM6120) عملکرد مشابهی را در مهار رشد میسلیمی (بالای ۷۰٪) نشان دادند که می‌تواند نتیجه تولید متابولیت‌های خارج سلولی و ترکیبات فرآر بازدارنده باشد.

متابولیت‌های فرآر به‌ویژه در استرین‌های *S. rubidaea* (Mar61-01) و *B. atrophaeus* (DM6120) نقش برجسته‌ای در کاهش رشد قارچ داشتند که این موضوع می‌تواند ناشی از تولید ترکیباتی مانند هیدروژن سیانید، آمونیاک یا ترکیبات آلی فرآر با خاصیت ضدقارچی باشد (جدول ۱). تأثیر متابولیت‌های فرآر این استرین‌ها در آزمایش‌ها بارز بود، چنانکه استرین باکتری *S. rubidaea* (Mar61-01) در شرایط گلخانه‌ای نیز بیشترین تأثیر را در کاهش شدت بیماری در روش مایه‌زنی خاک (مهار ۷۵/۴) داشت. نتایج مطالعه (Adhikari et al. 2021) نیز با یافته‌های این مطالعه همخوانی داشت، در آن مطالعه باکتری‌های اندوفیت جنس *Pseudomonas* با تولید متابولیت‌های فرآر و القای مقاومت سیستمیک، نقش کلیدی در سرکوب *F. oxysporum* عامل پژمردگی فوزاریومی خیار داشتند.

در رابطه با تأثیر متابولیت‌های غیر فرآر، یافته‌های این

اندوفیت می‌تواند به عنوان یک استراتژی مؤثر و پایدار در مدیریت زیستی بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه فوزاریومی خیار مد نظر قرار گیرد. استفاده از چنین عوامل زیستی نه تنها در کاهش مصرف قارچ‌کش‌های شیمیایی مؤثر است بلکه موجب ارتقای سلامت خاک و گیاه نیز خواهد شد.

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده دوم می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه کردستان انجام شده است.

References

- Adhikari M, Kim SW, Kim HS, Lee YS, 2021. Suppression of fusarium wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lactucae* and growth promotion on lettuce using bacterial isolates. *Journal of Microbiology & Biotechnology* 31: 1241.
- Ahmed GA, 2010. Controlling of fusarium wilt of cucumber by antagonistic bacteria. *Journal of Life Sciences* 4: 16–21.
- Ajillogba CF, Babalola OO, 2013. Integrated management strategies for tomato fusarium wilt. *Biocontrol Science* 18: 117–127.
- Alabouvette C, Olivain C, Migheli Q, Steinberg C, 2009. Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist* 184: 529–544.
- Cao Y, Xu Z, Ling N, Yuan Y, Yang X, et al., 2012. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing Fusarium wilt of cucumber. *Scientia Horticulture* 135: 32–39.
- Cha JY, Han S, Hong HJ, Cho H, Kim D, et al., 2016. Microbial and biochemical basis of a fusarium wilt suppressive soil. *ISME Journal* 10: 119–129.
- Chikh-Rouhou H, GONZÁLEZ-Torres R, Alvarez J M, 2010. Screening and morphological characterization of melons for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Race 1.2. *Horticultural Sciences* 45 (7): 1021–1025.
- O'Donnell K, Kistler HC, Cigelnik E, Ploetz RC, 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(5): 2044–2049.
- FAO, 2023. Statistics. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. [Accessed on 24 May 2025].
- Gao Z, Zhang B, Liu H, Han J, Zhang Y, 2017. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 105: 27–39.
- Huang R, Li GQ, Zhang J, Yang L, Che HJ, et al., 2011. Control of postharvest Botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology* 101: 859–869.
- Jangir M, Pathaka R, Sharma S, Sharmab S, 2018. Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biological Control* 123: 60–70.
- Khan MR, Khan SM, 2002. Effects of root-dip treatment with certain phosphate solubilizing microorganisms on the fusarial wilt of tomato. *Bioresource Technology* 85: 213–215.
- Khodakaramian N, Abdossi V, Modari P, 2017. Evaluation of endophytic bacterial strains isolated from healthy tomato for growth promoting and the ability of IAA production in majority isolated groups. *Agricultural Biotechnology* 8: 87–100.
- Leslie JF, Summerell BA, 2006. Fusarium laboratory workshops—A recent history. *Mycotoxin Research* 22(2): 73–74.
- Liu X, Pan Y, Liu C, Ding Y, Wang X, et al., 2020.

- Cucumber fruit size and shape variations explored from the aspects of morphology, histology, and endogenous hormones. *Plants* 9: 772.
- Michielse CB, Rep M, 2009. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology* 10(3): 311.
- Mohammadi P, Elif T, Recep K, Senol KM, 2017. Potential of some bacteria for biological control of postharvest citrus green mould caused by *Penicillium digitatum*. *Plant Protection Science* 53: 134–143.
- Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20(22): 6115–6116.
- Moreira RR, Nesi CN, De Mio LLM, 2014. *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control Glomerella leaf spot. *Biological Control* 72: 30–37.
- Saechow S, Thammasittirong A, Kittakoop P, Prachya S, Na-Ranong Thammasittirong SNR, 2018. Antagonistic activity against dirty panicle rice fungal pathogens and plant growth-promoting activity of *Bacillus amyloliquefaciens* BAS23. *Journal of Microbiology & Biotechnology* 28: 1527–1535.
- Seifert KA, Aoki T, Baayen RP, Brayford D, Burgess LW, et al., 2003. The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research* 107(6): 643–644.
- Summerell BA, Laurence MH, Liew EC, Leslie JF, 2010. Biogeography and phylogeography of *Fusarium*: a review. *Fungal Diversity* 44(1): 3–13.
- Tan Y, Du C, Xu L, Yue C, Liu X, et al., 2024. Endophytic bacteria from diseased plant leaves as potential biocontrol agents of cucumber *Fusarium* wilt. *Journal of Plant Pathology* 106(2): 553–563.
- Xu W, Yang Q, Yang F, Xie X, Goodwin PH, et al., 2022. Evaluation and genome analysis of *Bacillus subtilis* YB-04 as a potential biocontrol agent against fusarium wilt and growth promotion agent of cucumber. *Frontiers in Microbiology* 13: 885430.
- Yang F, Wang X, Jiang H, Yao Q, Liang S, et al., 2024. Mechanism of a novel *Bacillus subtilis* JNF2 in suppressing *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* and enhancing cucumber growth. *Frontiers in Microbiology* 15: 1459906.

