

بررسی کارایی باکتری‌های اندوفیت جدا شده از خیار در مهار زیستی بیماری پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه خیار

هاله قنادی^۱، رضا خاکک^{۲*} و اکبر شیرزاد^۳

- ۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران
- ۲- * نویسنده مسوول: دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران (khakvar@gmail.com)
- ۳- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۲۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۲

چکیده

پوسیدگی طوقه و ریشه خیار ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. radicans cucumerinum* یکی از بیماری‌های آوندی مهم و جدی در کشت‌های گلخانه‌ای ایران محسوب می‌شود. از استراتژی‌های جدید مدیریت این بیماری، مهار زیستی آن توسط باکتری‌های اندوفیت می‌باشد. پژوهش حاضر به منظور بررسی کارایی برخی باکتری‌های اندوفیت خیار در کنترل بیماری پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه خیار در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه انجام گرفت. در این تحقیق، ۱۴۰ جدایه باکتری اندوفیت از ریشه، ساقه، برگ، گل، میوه و بذر گیاهان سالم چند رقم رایج خیار جدا شد. جهت تعیین کارایی باکتری‌های اندوفیت در مهار زیستی از روش‌های کشت متقابل و نیز آزمون متابولیت‌های قابل نفوذ در آگار استفاده شد. چهارده جدایه از باکتری‌ها که خاصیت آنتاگونیستی قویتری نشان دادند، برای مطالعات بیشتر انتخاب شدند. پس از بررسی مکانیسم‌های موثر بر خاصیت آنتاگونیستی نظیر توان تولید آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد فرار، سیدروفور، اکسین، هیدروژن سیانید و آنزیم پروتئاز، هشت جدایه از این باکتری‌ها که پتانسیل بیشتری برای فعالیت مهار زیستی نشان دادند برای آزمایش در شرایط گلخانه انتخاب شدند. بر اساس نتایج گلخانه‌ای و مقایسه میانگین داده‌های حاصل، دو جدایه برتر انتخاب شدند. این دو باکتری بر اساس توالی ژن 16S rRNA و آزمون‌های بیوشیمیایی با احتمال ۹۸٪ به عنوان گونه‌های *Lysinibacillus mangiferihumi* و *Lysinibacillus fusiformis* شناسایی شدند.

کلیدواژه‌ها: مهار زیستی، *Fusarium oxysporum f. sp. radicans cucumerinum*، گلخانه، آنتاگونیست

مقدمه

قارچ *Fusarium* از پرآزارترین بیمارگرهای گیاهی قارچی می‌باشد که باعث ایجاد بیماری‌های مخربی مانند پژمردگی فوزاریومی و پوسیدگی طوقه و ریشه در محصولات زراعی می‌شود. پوسیدگی‌های فوزاریومی توسط *Fusarium oxysporum* Schltdl.: Fr. 1824. یا *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. (1881) ایجاد می‌شوند (Ajillogba and Babalola, 2013). بر اساس پایگاه داده MycoBank، فرم‌های اختصاصی مختلفی از گونه‌های فوزاریوم به‌عنوان عوامل پژمردگی فوزاریومی در خیار گزارش شده‌اند که از جمله آن‌ها می‌توان به *F. oxysporum* f. sp. *F. oxysporum* f. *radicis-cucumerinum* nov. sp. *niveum* (E.F. Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hansen 1940 *F. solani* f. sp. *cucurbitae* Snyder & H.N. Hansen 1954 و *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* J.H. Owen 1956 اشاره کرد (Zhai et al., 2021). خیار در تمامی مراحل رشد به این بیماری آلوده می‌شود. تاکنون روش‌های مختلفی جهت کنترل این بیماری استفاده شده است که از آن‌ها می‌توان به تغذیه مناسب و استفاده از فرم نیترا ته کودهای ازته (Younesi, et al., 2014)، کشت ارقام مقاوم یا متحمل، تناوب زراعی، استفاده از پیوندهای رویشی سالم (Qiu et al., 2012)، تعویض خاک، ضدعفونی خاک به‌وسیله آفتاب‌دهی یا بخار آب داغ و یا قارچ‌کش‌های تدخینی، ضدعفونی بذور (Parker, 1999)، استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی (Hibar et al., 2007) و زیستی (Abeyasinghe, 2006; Aeni, 2018) اشاره کرد. تهیه فرآورده‌های زیستی مشکل از آنتاگونیست‌ها و بررسی آن‌ها در کنترل بیماری‌های گیاهی و کاربردی نمودن این فرآورده‌ها در مدیریت بیماری‌های گیاهی از مسائلی هستند که باید مورد توجه قرار گیرند. طبق گزارش‌ها، باکتری‌های اندوفیت با تولید متابولیت‌های ثانویه و تنظیم‌کننده‌های رشد، تثبیت نیتروژن، حلالیت فسفات معدنی، تولید آنزیم ACC deaminase و تولید سیدروفور فتوتیپ و

رشد میزبان‌شان را تغییر می‌دهند و سبب بهبود و تحریک رشد گیاه و افزایش تحمل گیاه نسبت به تنش‌های محیطی می‌شوند (Bacon and Hinton, 2006; Ryan et al., 2008; Aeni and Khodakaramian, 2017). همچنین از طریق مکانیزم‌هایی نظیر رقابت با بیمارگرها بر سر مواد غذایی و آشیان‌های اکولوژیکی (Schisler et al., 1997)، تولید متابولیت‌ها (Doubou et al., 2002)، ایجاد مقاومت القایی سیستمیک و در پی آن افزایش دفاع میزبان، تولید عوامل ضد قارچی مثل آنزیم‌های تجزیه‌کننده و آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز تحریک مقاومت اکسایبی سیستمیک میزبان یا ایمنی باعث حفاظت گیاه در مقابل بیمارگرها می‌شوند (Klopper and Beauchamp, 1992; Chen et al., 1995; Leifert et al., 1995; Sessitsch, 2002; Bacon and Hinton 2006). لذا هدف از این پژوهش، بررسی فعالیت ضدقارچی باکتری‌های اندوفیت خیار علیه قارچ مهم بیمارگر خیار در ایران *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum* و انتخاب جدایه موثرتر جهت کنترل زیستی این بیماری در گلخانه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی باکتری‌های اندوفیت

گیاهان سالم ارقام مختلف خیار شامل نگین، دانژه ۹۸، دانژه ۱۹۵، ناگین (ناگن) و رقم بومی باسمنج پس از رسیدن به مرحله زایشی و تولید میوه، از مزارع منطقه باسمنج و نیز گلخانه‌های اطراف تبریز و باسمنج در سال زراعی ۹۷-۹۸ جمع‌آوری شدند.

اندام‌های مختلف گیاه خیار شامل برگ، ساقه، گل، میوه، بذر و ریشه ابتدا زیر جریان ملایم آب شسته شدند. سپس به تکه‌های بزرگ تقسیم شدند و با فرو بردن متوالی در اتانول ۷۰ درصد، هیپوکلریت سدیم ۰/۳ درصد و اتانول ۹۶ درصد ضدعفونی شدند. بافت‌های ضدعفونی شده به قطعات ریز تقسیم شدند و داخل چند میلی‌لیتر بافر

بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی در شرایط گلخانه

جهت تهیه مایه تلقیح جدایه قارچی بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum*، از روش (Tseng et al., 2008) با اندکی تغییرات استفاده شد. در این روش ۱۰۰ گرم بذور گندم شست و شو و داخل ارلن‌های ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس ۱۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید. ارلن‌ها در دو روز متوالی به فاصله ۲۴ ساعت، دو بار در اتوکلاو استریل شدند. سپس به وسیله دیسک‌های هشت میلی‌متری از کشت تازه جدایه *F. oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum* مایه‌زنی شده و به مدت یک ماه در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و در تاریکی قرار گرفتند و هفته‌ای دو بار جهت جلوگیری از توده‌ای شدن به هم زده شدند. در نهایت بعد از رشد کامل جدایه *Fusarium* روی بذور گندم، برای انجام مراحل بعدی به یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس انتقال داده شدند.

جهت تهیه بستر کشت، خاک زراعی استریل و پرلیت به نسبت یک به دو با هم مخلوط و در گلدان‌های ۱۵ سانتی متری توزیع شد. خاک هر گلدان به نسبت ۱۰ درصد وزنی با بذور گندم آلوده به مایه تلقیح قارچ بیمارگر مخلوط شد. جهت تهیه تیمار شاهد غیرآلوده، از گندم استریل استفاده گردید. گلدان‌ها به مدت ده روز در شرایط گلخانه نگهداری شدند و دو روز یک‌بار با آب استریل آبیاری شدند تا عامل بیماری در خاک مستقر و جهت انجام بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی علیه قارچ آماده گردند. جهت مایه‌زنی بذور با سوسپانسیون باکتری‌ها، ابتدا بذور خیار با هیپوکلریت سدیم ۰/۲٪ کلر فعال به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و با چهار بار شستشو در آب مقطر دو بار استریل هیپوکلریت آن زدوده شد، سپس بذور در سوسپانسیون اسپور باکتری‌ها با غلظت 10^8 cfu/ml به مدت نیم ساعت قرار گرفتند. برای تعیین غلظت باکتری‌ها در سوسپانسیون از دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل

منیزیم کلراید ۱۰ میلی‌مولار (pH= ۷/۰۳) له گردیدند. پس از گذشت ۱۰ دقیقه، سوسپانسیون حاصل و نیز تکه‌های له شده، بر روی محیط کشت آگار غذایی (NA) به صورت جداگانه کشت گردیدند و به مدت دو هفته در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Jasim et al., 2014). بعد از سپری شدن زمان فوق و رشد باکتری‌های اندوفیت، کلنی‌هایی که از نظر شکل و رنگ متفاوت بودند انتخاب شدند و جهت خالص‌سازی، دوباره به محیط کشت NA منتقل شدند. جهت ارزیابی صحت روش ضدعفونی، قطعاتی از بافت‌های گیاهی که به روش فوق ضدعفونی شده بودند در پنج میلی‌لیتر آب مقطر دوبار استریل فرو برده شدند و به مدت یک دقیقه تکان داده شدند. ۰/۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل روی محیط NA مایه‌زنی شد و در ۲۸ درجه سلسیوس جهت بررسی رشد میکروبی نگهداری شدند (Schulz et al., 1993).

بررسی آزمایشگاهی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های باکتریایی

به منظور انتخاب جدایه‌های باکتریایی مناسب دارای قدرت بازدارندگی، از روش کشت توام (Dual culture method) استفاده شد.

جهت بررسی مکانیسم‌های موثر در خاصیت آنتاگونیستی، از روش Fiddaman and Rossal (1993)، برای ارزیابی تأثیر بازدارندگی ترکیبات فرار جدایه‌های باکتری روش (Kraus and Loper, 1990)، برای بررسی تأثیر بازدارندگی متابولیت‌های قابل نفوذ در آگار (آنتی بیوتیک) از روش (Leifert et al., 1995)، در بررسی توان تولید سیدروفور به وسیله جدایه‌ها از روش (Alexander and Zuberer, 1991)، جهت بررسی تولید آنزیم پروتئاز روش مارهوفر (Maurhofer et al., 1995)، برای ارزیابی تولید سیانید هیدروژن روش (Alstrom 2001) و برای بررسی توان تولید اکسین از روش بنت و همکاران (Bent et al., 2000) استفاده گردید.

الکتروفورز و آشکارسازی باند مربوطه بر روی ژل آگارز، جهت شناسایی و تعیین توالی ناحیه 16S rRNA به شرکت توپاز ژن کاوش^۱ فرستاده شد. پس از دریافت نتایج حاصل از تعیین توالی ناحیه ژنومی مورد نظر، کروماتوگرام مربوط به هر یک از توالی‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Chromas Pro مشاهده و ویرایش گردید. مشابهت‌یابی توالی‌ها در بانک اطلاعات ژنومی NCBI انجام شد (Altschul et al., 1990). سپس درخت فیلوژنتیکی به روش neighbor-joining با استفاده از نرم‌افزار MEGA-X ترسیم شد.

آزمون‌های بیوشیمیایی جهت تایید نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست

آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل تست گرم، آزمون کاتالاز، آزمون اکسیداز، تولید یا عدم تولید رنگ‌دانه فلورسنت در محیط کشت King B، تست O/F یا رشد هوازی و غیرهوازی، آزمون هیدرولیز نشاسته، آزمون سترات و آزمون لوان انجام گردید (Schaad et al., 2005).

نتایج

بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum* توسط جدایه‌های باکتریایی اندوفیت

نتایج حاصل از تجزیه واریانس (جدول ۱) و مقایسه میانگین داده‌ها (جدول ۲) بیان‌گر آن بود که تنها ۱۴ جدایه از بین ۱۴۰ جدایه اندوفیت مورد آزمایش، بر علیه قارچ فوزاریوم طوقه و ریشه خیار بازدارندگی نشان دادند به طوری که بین جدایه‌ها از لحاظ توان بازدارندگی اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد وجود داشت. به منظور انتخاب جدایه‌های دارای بالاترین پتانسیل بازدارندگی، مکانیسم‌های مؤثر در خاصیت آنتاگونیستی در جدایه‌های دارای خاصیت آنتاگونیستی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. بر این اساس، هشت

(Hach D-3000) و طول موج ۶۵۰ نانومتر استفاده گردید. در تیمار شاهد، بذور درون کربوکسی‌متیل سلولز نیم درصد فاقد باکتری غوطه‌ور شدند. سپس بذور مایه‌زنی شده در گلدان‌هایی که قبلاً خاک آن‌ها با قارچ بیمارگر مایه‌زنی شده بود، کاشته شدند و در گلخانه با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد و دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی قرار گرفتند (Sharifi et al., 1996). این آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار شامل یک شاهد آلوده، یک شاهد غیرآلوده و هشت تیمار باکتریایی، در سه تکرار انجام شد. بعد از ۳۵ روز، گیاهچه‌ها برای ظهور علائم مورد بررسی و مورد امتیاز دهی قرار گرفتند. داده‌های جمع‌آوری شده وارد برنامه EXCEL-2016 شده و با استفاده از نرم‌افزار SPSS-16 ver. در سطح احتمال پنج و یک درصد مورد تجزیه تحلیل آماری قرار گرفتند.

شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست براساس ترادف ناحیه 16s rRNA

در ابتدا DNA جدایه‌های مورد نظر به روش Sambroo and Russell (2001) استخراج شد. سپس با استفاده از آغازگرهای عمومی مستقیم و معکوس 8F و 1492R به ترتیب با ترادف 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 3'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Boratyn et al., 2013) تکثیر ناحیه 16S rRNA صورت گرفت. واکنش PCR با اندکی تغییرات در برنامه اینترا و همکاران (Intra et al., 2011) صورت گرفت. بدین منظور، تکثیر ناحیه 16S rRNA در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر و با برنامه واسرشت‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه در یک تکرار، برنامه واسرشت‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه و ۴۵ ثانیه در ۳۵ تکرار و سرانجام مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه در یک تکرار انجام گردید. محصولات واکنش پس از انجام

**کنترل زیستی بیماری پوسیدگی فوزاریومی
طوقه و ریشه خیار در شرایط گلخانه**

مطابق نتایج حاصل از بررسی های گلخانه ای و جدول تجزیه واریانس (جدول ۳)، بین تیمارها اختلاف معنی داری در مقایسه میانگین شاخص پوسیدگی و میانگین ویژگی های رشدی مختلف مشاهده شد (جدول ۴).

جدایه اندوفیت که بیشترین تأثیر بازدارندگی توسط تولید ترکیبات فرار و آنتی بیوتیک داشتند و نیز دارای مقادیر بالای تولید سیدروفور، تولید اکسین و تولید آنزیم پروتئاز بودند برای بررسی توانایی کنترل زیستی در گلخانه انتخاب شدند (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس داده های مربوط به ارزیابی قدرت بازدارندگی از رشد *F. oxysporum f. sp. radices cucumerinum* توسط جدایه های آنتاگونیست در کشت متقابل

Table 1: Variance analysis of the inhibitory capability of antagonistic bacterial strains on the mycelial growth of *F. oxysporum f. sp. radices cucumerinum* in cross culture

Variability Sources	P-Value	Average of square	Degree of freedom	Sum of squares
Treatment	≤0.01	6.62912*	13	86.1785
error		0.75	14	10.5
Sum			27	96.6785

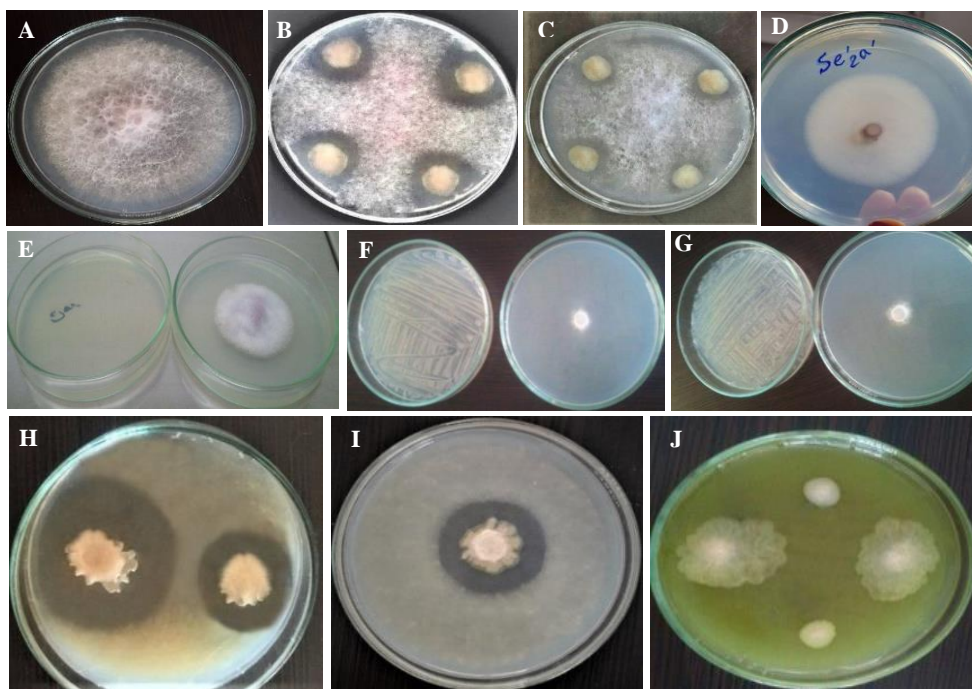
* Significant at 1%.

جدول ۲- مقایسه میانگین قدرت بازدارندگی از رشد جدایه *F. cucumerinum* *oxysporum f. sp. radices* توسط جدایه های آنتاگونیست در کشت متقابل

Table 2: Comparison of the mean inhibition of the mycelial growth of *F. oxysporum f. sp. radices cucumerinum* by antagonistic bacteria in cross-culture

Bacterial isolates	Distance of bacterial colonies and fungal mycelia(mm)	Inhibition percentage
Se1	8.5 ^a	58 ^a
Se2	5.5 ^{bc}	51 ^{bc}
Se3	5.4 ^{bcde}	49 ^{bcde}
R1	6.5 ^b	53 ^b
R2	4.5 ^{bcde}	49 ^{bcde}
R3	3 ^{def}	45 ^{def}
S1	4 ^{cdef}	48 ^{cdef}
S2	2.5 ^{ef}	44 ^{ef}
L1	3.5 ^{cdef}	47 ^{cdef}
L2	2.5 ^{ef}	44 ^{ef}
F1	5 ^{bcd}	50 ^{bcd}
F2	2.5 ^{ef}	44 ^{ef}
F3	3 ^{def}	45 ^{def}
F4	2 ^f	43 ^f

In each column numbers with the same letters are not significantly different at the level of 1% probability.



شکل ۱- میزان بازدارندگی از رشد جدایه *F. oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum* توسط جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست منتخب؛ نمونه شاهد (A و E)، کشت متقابل (B و C)، تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها (B و C). (F و G): تأثیر ترکیبات فرار. ارزیابی تولید آنزیم پروتئاز (H و I) و تولید سیدروفور (J) توسط جدایه‌های باکتریایی منتخب.

Figure 1. Growth inhibition rates of selected antagonist bacterial isolates against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum* (A and E), control sample (B and C), cross-culture, D and E: antibiotics effect, F and G: volatile compounds impact); H and I: evaluation of protease enzyme production, J: siderophore production by selected bacterial isolates.

جدول ۳- مقایسه میانگین شاخص پوسیدگی در بررسی‌های گلخانه‌ای

Table 3. Comparison of mean rot index in greenhouse assays

Treatments	Rot index
Infected control	3.8 ^a
Non-infected control	0.3 ^d
R ₁ + F	0 ^d
F ₁ + F	0.3 ^d
Se ₂ + F	0.3 ^d
Se ₁ + F	0 ^d
S ₁ + F	2.1 ^c
R ₂ + F	3.8 ^a
F ₂ + F	2.8 ^b
L ₁ + F	3.8 ^a

جدول ۴- مقایسه میانگین فاکتورهای رشدی جدایه‌های منتخب در بررسی‌های گلخانه‌ای

Table 4. Mean comparison of growth factors of selected strains in glasshouse assays

Treatment	Dry weight of (gr) leaves	Wet weight of (gr) leaves	Dry weight of (gr) stem	Wet weight (gr) of stem	Stem length (mm)	Dry weight of (gr) root	Wet weight (gr) of root	Root length (mm)
Infected control	0.0905 ^b	0.875 ^d	0.039 ^d	0.875 ^d	145 ^d	0.011 ^d	0.075 ^d	31.5 ^d
Non-infected control	0.155 ^a	1.95 ^b	0.069 ^{bc}	2 ^b	217.5 ^{bc}	0.0155 ^c	0.155 ^c	52.5 ^b
R ₁ + F	0.175 ^a	2.05 ^b	0.078 ^{ab}	2.675 ^a	232.5 ^b	0.0195 ^b	0.21 ^b	62.5 ^a
F ₁ + F	0.09 ^b	1.03 ^d	0.0625 ^c	1.4 ^c	212.5 ^c	0.0155 ^c	0.155 ^c	41.5 ^c
Se ₂ + F	0.155 ^a	1.595 ^c	0.071 ^{bc}	2.05 ^b	222.5 ^{bc}	0.0205 ^b	0.2 ^b	41 ^c
Se ₁ + F	0.185 ^a	2.94 ^a	0.0825 ^a	2.94 ^a	252.5 ^a	0.0245 ^a	0.25 ^a	63 ^a

In each column numbers with the same letters are not significantly different at the level of 1% probability.

بیوشیمیایی انجام گرفته در مورد هر دو گونه شناسایی شده، به تفکیک مورد ارزیابی قرار گرفت و بیان گر این بود که جدایه‌های باکتریایی مورد بررسی، هر دو متعلق به گروه باکتری‌های گرم مثبت جنس *Lyisinibacillus* هستند. در نتایج تست کاتالاز هر دو جدایه‌ی باکتریایی نتایج مشابه داشته و دارای فعالیت کاتالازی یکسان بودند ولی در مابقی آزمون‌های بیوشیمیایی دارای تفاوت‌هایی بودند. از جمله میزان فعالیت اکسیدازی و توانایی تجزیه سیترات در جدایه *L. fusiformis* strain R1 در مقایسه با جدایه *L. mangiferihumi* strain SE1 بالاتر بود در حالی که جدایه *L. mangiferihumi* strain SE1 در مقایسه با جدایه *L. fusiformis* strain R1 در آزمون لوان فعالیت مثبت نشان داد و همچنین جدایه *L. mangiferihumi* strain SE1 برخلاف جدایه *L. fusiformis* strain R1 توانایی هیدرولیز نشاسته از خود نشان داد که با ویژگی‌های گزارش شده با هر یک از گونه‌های مذکور مطابقت داشت و تمایز دو گونه را تأیید کرد (جدول ۵) (Schaad et al., 2005).

بر همین اساس، از میان چهار جدایه Se_1 ، Se_2 ، R_1 و F_1 که مهار زیستی قابل ملاحظه‌ای در مقابل جدایه بیمارگر داشتند، تنها دو جدایه‌ی Se_1 و R_1 با توجه به شاخص پوسیدگی و پژمردگی صفر و تأثیر بهینه آن‌ها در کنترل بیماری پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه خیار و همچنین نقش مثبت آن‌ها در افزایش رشد بوته‌ها به واسطه تولید اکسین برای شناسایی انتخاب شدند (شکل ۲ و ۳ و ۴).

شناسایی باکتری‌ها

در در واکنش PCR جدایه‌های منتخب با آغازگرهای 8F و 1492R ناحیه 16S rRNA به اندازه حدوداً ۱۴۰۰ جفت باز تکثیر (شکل ۵) و تعیین ترادف شد. توالی‌های بدست آمده با شماره دسترسی MW820028 برای جدایه R_1 و با شماره دسترسی MW820029 برای جدایه Se_1 در بانک جهانی ثبت گردیدند. مقایسه توالی نوکلئوتیدی این ناحیه ژنی با توالی‌های ثبت شده در بانک ژن (NCBI) نشان داد که جدایه‌های منتخب متعلق به گونه‌های *Lyisinibacillus mangiferihumi* strain SE1 شباقت ۹۷٪ و *Lyisinibacillus fusiformis* strain R1 با شباقت ۹۸٪ می‌باشند (شکل ۶). در نهایت، آزمون‌های



شکل ۲- تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست Se_1 ، F_1 ، Se_2 و R_1 (از راست به چپ) در بازدارندگی از پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه خیار

Figure 2. Effect of antagonistic bacterial strains Se_1 , F_1 , Se_2 , and R_1 (right to left) on the inhibition of the *Fusarium* rot disease of cucumber crown and roots



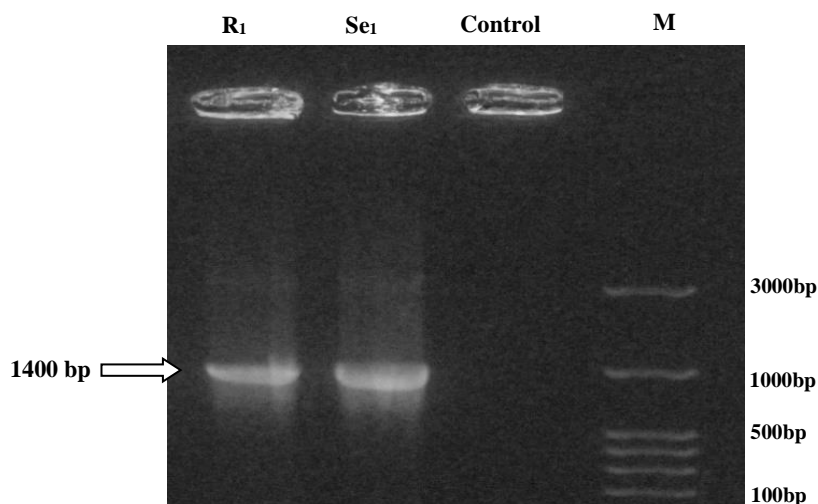
شکل ۳- تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست در بازدارندگی از پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه خیار در مقایسه با شاهد. از راست به چپ: نمونه شاهد آلوده، نمونه شاهد غیر آلوده، جدایه‌های آنتاگونیست R_1 و جدایه آنتاگونیست Se_1 به همراه جدایه قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum*

Figure 3. Inhibitory effect of antagonistic bacterial strains on the *Fusarium* rot of cucumber crown and roots, in comparison with the control; from right to left: positive control (infected), negative control (healthy), antagonist strains of R_1 and Se_1 together with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum*



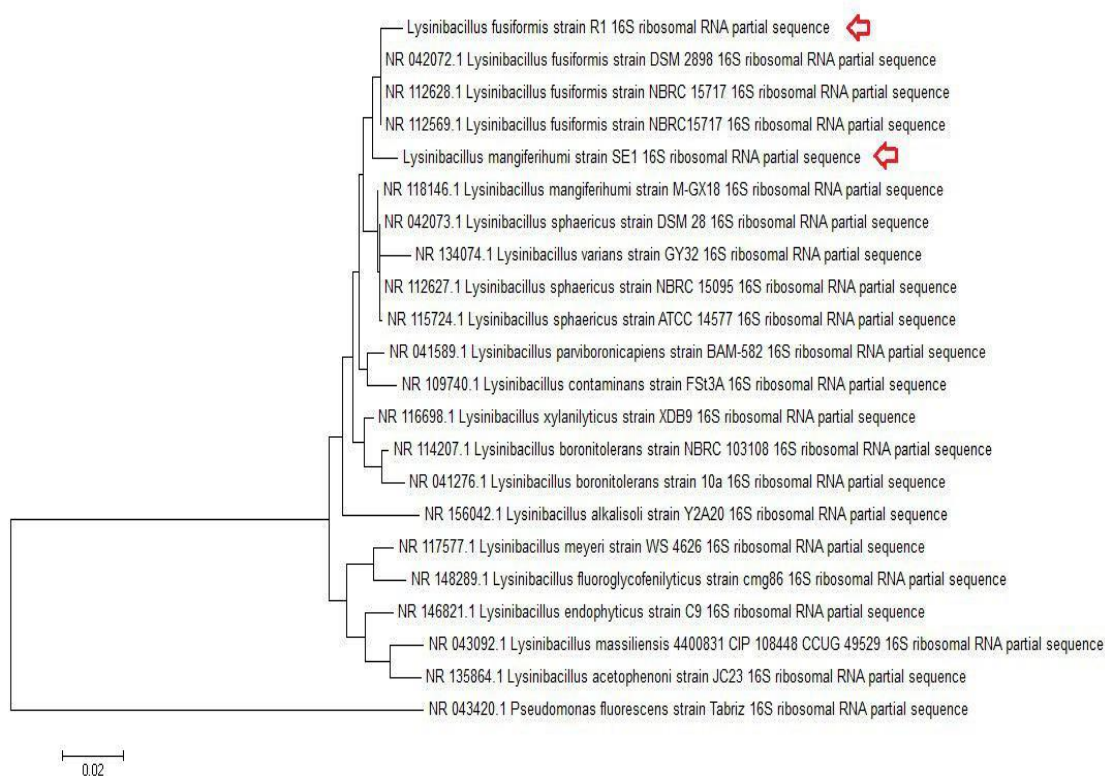
شکل ۴- تأثیر جدایه‌های آنتاگونیست در بازدارندگی از پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه خیار در مقایسه با شاهد. از راست به چپ: نمونه شاهد آلوده، نمونه شاهد غیر آلوده، جدایه‌های آنتاگونیست Se_1 و جدایه آنتاگونیست F_1 به همراه جدایه قارچ *F. oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum*

Figure 4. Inhibitory effect of antagonistic bacterial strains on *Fusarium* rot of cucumber crown and roots, in comparison with the control; from right to left: positive control (infected), negative control (healthy), antagonist strains of Se_1 and F_1 together with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum*



شکل ۵- محصول PCR جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست. (M نشان‌گر اندازه DNA، 1 kb، Control) چاهک شاهد، جدایه R₁ و جدایه Se₁ جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست

Figure 5. PCR products of antagonistic bacterial strains; M: DNA size marker of 1 kb; Control: control well; R₁ and Se₁ strains: antagonist bacterial strains



شکل ۶- تبارنمای رسم شده بر اساس ناحیه ژنی 16S rRNA با نرم‌افزار Mega-X. گونه *Pseudomonas fluorescens* به‌عنوان گروه خارجی استفاده شده است. جدایه‌های به‌دست آمده در این تحقیق با نام‌های: *Lysinibacillus mangiferihumi* strain Se₁ و *Lysinibacillus fusiformis* strain R₁ در درخت تبارزایی نشان داده شده است

Figure 6. Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences by Mega-X software; *Pseudomonas fluorescens* was used as external species; isolates obtained in the present study are depicted as *Lysinibacillus mangiferihumi* strain Se₁ and *Lysinibacillus fusiformis* strain R₁ in the phylogenetic tree

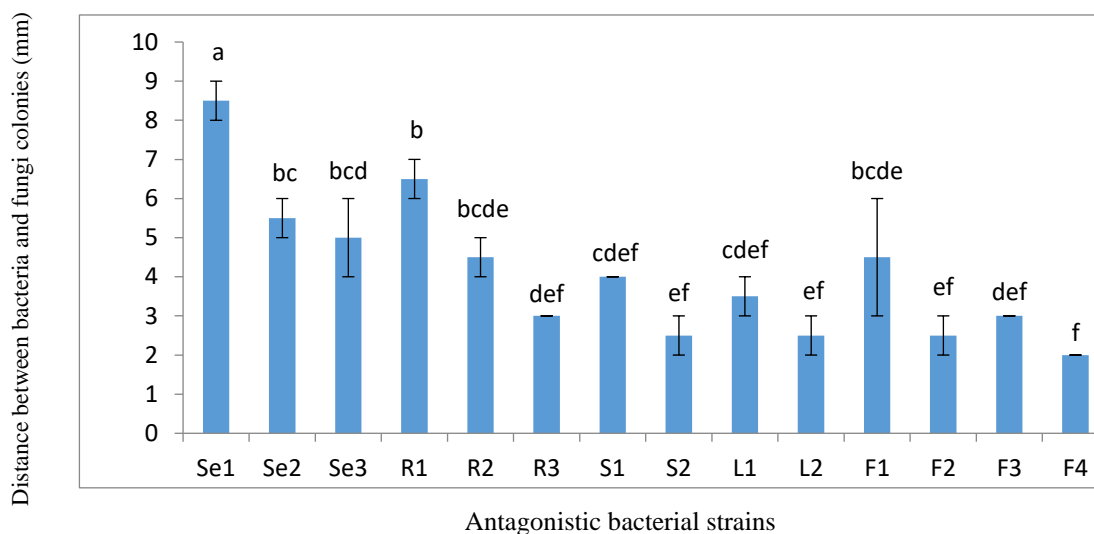
جدول ۵- آزمون‌های بیوشیمیایی روی دو باکتری *Lysinibacillus fusiformis* و *Lysinibacillus mangiferihumi*
Table 5. Biochemical assays on *Lysinibacillus fusiformis* and *Lysinibacillus mangiferihumi*

Biochemical assays	<i>Lysinibacillus mangiferihumi</i>	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>
Gram staining	+	+
Catalase assay	+	+
Oxidase assay	+	+
O/F assay	+	+
Citrate assay	+	+
Levan production test	+	-
Starch hydrolysis test	+	-
Pigment production	+	+

بحث

هدف از این تحقیق غربال‌گری جدایه‌های باکتریایی اندوفیت جداسازی‌شده از بوته‌های سالم ارقام مختلف خیار، اعم از نگین، دانه ۹۸، دانه ۱۹۵، ناگین (ناگن) و رقم بومی باسمنج و از نظر ویژگی‌های آنتاگونیستی به منظور رسیدن به جدایه‌های موثرتر با حداکثر قدرت آنتاگونیستی و ارزیابی کارایی آن‌ها در مهار زیستی عامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه خیار در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بود. از میان ۱۴ جدایه منتخب، هفت جدایه قدرت آنتی‌بیوز خوبی نشان دادند که در میان آن‌ها جدایه R₁ با درصد بازدارندگی نزدیک ۶۰٪ بهترین عملکرد را از خود نشان داد (شکل ۷). تشکیل هاله بازدارنده نشان‌گر نشأت محتویات سلولی و تخریب هیف‌های قارچ در اثر تولید آنزیم‌هایی مانند گلوکاناز یا کیتیناز می‌باشد که طی مکانیسم آنتی‌بیوز اتفاق می‌افتد (Widyastuti, 2003; He et al., 2009). این امر در رابطه با گونه‌های باکتریایی جنس *Lysinibacillus* نیز قبلاً ثابت گردیده است، به‌طوری‌که این باکتری‌ها مقادیر بیشتری از آنزیم‌های هیدرولیتیک را در مقایسه با باکتری‌های جنس *Bacillus* تولید می‌کنند (Naureen et al., 2017).

در بررسی‌های بیشتر در رابطه با مکانیسم‌های بازدارندگی هر یک از ۱۴ جدایه مذکور، ارزیابی نتایج حاصل از تأثیر متابولیت‌های فرار و همچنین آنتی‌بیوتیک تولید شده در بازدارندگی از رشد میسلومی، مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد بیشترین درصد بازدارندگی از رشد جدایه قارچی مربوط به جدایه Se₁ در گروه a با ۸۲٪ بازدارندگی در اثر تولید متابولیت فرار و ۵۷٪ بازدارندگی در نتیجه تولید آنتی‌بیوتیک و بعد از آن، جدایه R₁ با ۷۷٪ بازدارندگی در اثر متابولیت فرار و جدایه‌های S₁, R₂, Se₂ با میزان ۵۳٪ بازدارندگی در اثر تولید آنتی‌بیوتیک، در گروه b قرار گرفتند. بسیاری از اثرات مهار زیستی مانند ارتباطات درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای و بازدارندگی از رشد گیاهان، نماتدها و قارچ‌ها به ترکیبات فرار باکتری‌ها مرتبط می‌باشد (Insam and Seewald, 2010). همچنین، عوامل مهار زیستی باکتریایی با تولید متابولیت‌های خارج سلولی از قبیل آنتی‌بیوتیک‌ها (فنازین‌ها، پیرول‌ها، باکتریوسین‌ها) نقش اساسی در کاهش بیماری‌ها ایفا می‌کنند (Fravel, 1988; Weller, 1988). تحقیقات نشان داده است که جدایه‌های باکتری *Bacillus* به‌وسیله تولید آنتی‌بیوتیک باعث مهار بیماری می‌شوند (Liu et al., 2006).



شکل ۷- بررسی قدرت بازدارندگی از رشد جدایه *F. oxysporum f. sp. radialis cucumerinum* توسط جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست در کشت متقابل

Figure 7. Inhibitory capability of antagonistic bacteria against mycelium growth *F. oxysporum f. sp. radialis cucumerinum* in cross-culture

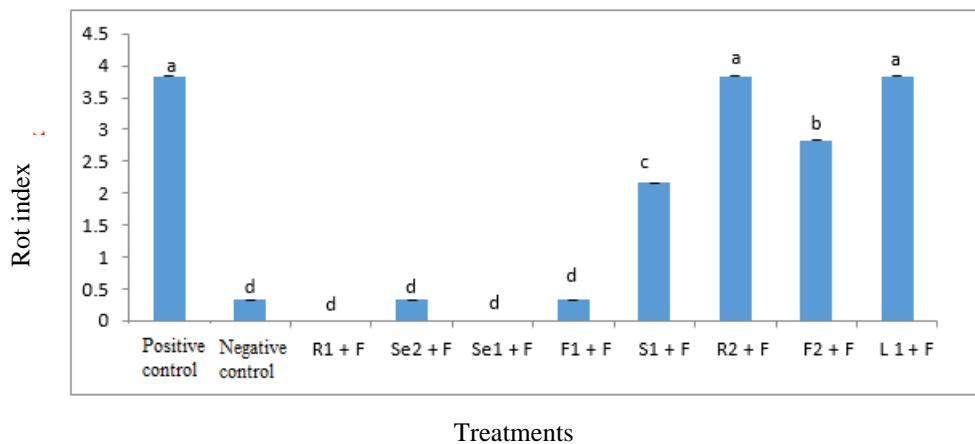
جنس *Lysinibacillus* علاوه بر خاصیت ضدقارچی علیه عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد، با ترشح فیتوهورمون و تحریک گیاهان، باعث افزایش جذب مواد غذایی توسط ریشه گیاه می‌شوند که نتایج گلخانه نیز باعث تقویت این مطلب می‌گردد، زیرا که باکتری به‌تنهایی موجب افزایش رشد گیاهان تیمار شده می‌شود که بیان‌گر بهبود رشد گیاه در اثر تلقیح با باکتری می‌باشد (El-Barougy et al., 2009; Naureen et al., 2017). همچنین طبق یافته‌های دیگر، خاصیت افزایش رشد گیاهان توسط باکتری *Lysinibacillus fusiformis* با بررسی تولید IAA در شرایط آزمایشگاهی به اثبات رسیده است (Hanh and Mongkolthananaruk, 2017). در ارزیابی تولید پروتئاز نیز مقایسه میانگین داده‌ها طی ۴۸ ساعت نشان داد جدایه R₁ با تشکیل هاله شفاف با متوسط قطر ۱۲ میلی‌متر و جدایه L₁ با متوسط قطر هاله ۱۱/۶۶ میلی‌متر، بیشترین تولید پروتئاز را داشتند و در گروه آماری a قرار گرفتند. این آنزیم‌ها دارای عملکرد کاتالیزوری می‌باشند که موجب هیدرولیز پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها و تبدیل آن‌ها به پلی‌پپتیدهای کوچک‌تر و یا اسیدآمین‌های آزاد می‌شوند (Alnahdi,

در بررسی ۷۲ ساعته توان تولید سیدروفور، بیشترین قطر هاله، مربوط به جدایه Se₁ و ۱۰ میلی‌متر بود که در گروه a قرار گرفت و بعد از آن جدایه R₂ در گروه b قرار گرفت. سیدروفورهای باکتریایی با تشکیل کمپلکس پایداری با آهن، آن‌را به‌صورت محلول و قابل دسترس برای باکتری‌های اندوفیت در می‌آورند و برای بیمارگرها غیرقابل دسترس می‌سازند و با تحریک سنتز سایر ترکیبات ضد میکروبی، موجب متوقف شدن رشد بیمارگرها و بهبود رشد گیاه می‌گردند (O'Sullivan and O'Gara, 1992; Leoni et al., 2002; Joseph et al., 2012). بنا به یافته‌های جدید در گونه‌های باکتریایی جنس *Lysinibacillus* در مقایسه با جنس *Bacillus* تولید میزان بالاتری سیدروفور ثابت گردیده است (Naureen et al., 2017). نتایج ارزیابی توان تولید اکسین نیز مطابق مقایسه میانگین داده‌ها، نشان داد جدایه R₁ با ۶۵/۷۲۴۸ میلی‌گرم در لیتر، در محیط کشت دارای ال-تریپتوفان و با ۵۹/۳۵۷۱۲ میلی‌گرم در لیتر در محیط بدون ال-تریپتوفان در گروه a و دارای بیشترین میزان تولید اکسین می‌باشد. ثابت شده است گونه‌های باکتریایی

حتی در مقایسه با شاهد غیر آلوده نیز، هر دو تیمار باکتریایی، بیشترین میزان رشد را در تمامی موارد نشان دادند و بعد از آن تیمارهای $F_1 + F$ و $Se_2 + F$ دارای تأثیر مهار زیستی به همراه افزایش رشد بودند. مطابق نتایج حاصل از مطالعات دیگر محققین نیز تأثیر گونه‌های باکتریایی *Lysinibacillus sphaericus* در افزایش قوه نامیه بذر و قدرت جوانه‌زنی و افزایش رشد طولی ساقه‌ها در شرایط گلخانه به اثبات رسیده است (Naureen et al., 2017). جدایه Se_1 علی‌رغم تولید اکسین پایین‌تر از جدایه R_1 ، موجب ارتقاء رشد گیاهچه‌های تیمار شده در شرایط گلخانه گردید، که این پدیده را می‌توان به تولید بالای ترکیبات فرار، آنتی‌بیوتیک و سیدروفور توسط این جدایه نسبت داد که در مجموع سبب افزایش رشد گیاه در کنار خاصیت مهار زیستی آن گردیده است که حاکی از این است افزایش رشد گیاه علاوه بر تولید اکسین، به فاکتورهای دیگری وابسته است.

2012). بر اساس بررسی‌های به عمل آمده، پروتازهای تولید شده توسط باکتری‌های جنس *Lysinibacillus* موجب کاهش بیماری‌زایی قارچ‌ها از طریق غیرفعال کردن آنزیم‌های هیدرولاز و توکسین‌های تولید شده از سوی قارچ‌های بیمارگر می‌شوند (Ahmad et al., 2014).

بر اساس نتایج گلخانه‌ای و مقایسه میانگین داده‌های حاصل از محاسبه شاخص پوسیدگی، دو تیمار $R_1 + F$ و $Se_1 + F$ با میزان شاخص پوسیدگی صفر، در مقایسه با شاهد غیر آلوده و همچنین بقیه تیمارها، بهترین تأثیر مهار زیستی را داشتند (شکل ۸). همچنین در بررسی فاکتورهای رشدی اعم از طول ریشه، وزن تر ساقه، وزن خشک ساقه و وزن خشک برگ، دو تیمار فوق در یک گروه قرار گرفتند و بیشترین میزان رشد را نشان دادند، ولی در مقایسه میانگین داده‌های حاصل از بررسی وزن تر ریشه، وزن خشک ریشه، وزن تر برگ و طول ساقه، تیمار $Se_1 + F$ بیشترین میزان رشد را در مقایسه با تیمار $R_1 + F$ نشان داد،



شکل ۸- میانگین شاخص پوسیدگی در بررسی‌های گلخانه‌ای

Figure 8. Average rot index in greenhouse assays

سپاس‌گزاری

نویسندگان از کارشناسان آزمایشگاه‌های باکتری‌شناسی و قارچ‌شناسی دانشگاه‌های تبریز و شهید مدنی بخصوص آقای مهندس حسین هاتف کمال تشکر و قدردانی را دارند.

بنا به اطلاعات موجود در مقالات منتشر شده، باکتری‌های شناسایی شده در این تحقیق، برای اولین بار در دنیا از بافت‌های گیاه خیار جداسازی شده‌اند و همچنین اثر آنتاگونیستی آن‌ها برای اولین بار در دنیا بر روی بیماری پوسیدگی فوزاریومی طوقه و ریشه خیار در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای به اثبات رسیده است.

REFERENCES

- Abeyasinghe, S. 2006. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum*, the causal agent of root and stem rot of *Cucumis sativus* by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Ruhuna Journal of Science*, 1: 24-31.
- Aeini, M., and Khodakaramian, G. 2017. Sugar beet seed-associated bacteria: their identification and effects on seed germination. *Journal of Sugar Beet*, 3: 103-115 (In Farsi with English abstract).
- Aeini, M., Khodakaramian, G., and Najafgholi, H.M. 2018. Sugar beet leaf culturable endophytic bacterial composition from the major sugar beet growing areas in the west of Iran. *Journal of Genetic Resource*, 4: 105-113.
- Ahmad, V., Iqbal, A.N., Haseeb, M., and Khan, M.S. 2014. Antimicrobial potential of bacteriocin producing *Lysinibacillus* jx416856 against foodborne bacterial and fungal pathogens, isolated from fruits and vegetable waste. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 27: 87-95.
- Ajilogba, C.F., and Babalola, O.O. 2013. Integrated management strategies for tomato *Fusarium* wilt. *Biocontrol science*, 18: 117-127.
- Alnahdi, H.S. 2012. Isolation and screening of extracellular proteases produced by new isolated *Bacillus* sp. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2: 71-74.
- Alexander, B., and Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils*, 12: 39-45.
- Alstrom, S. 2001. Characteristics of bacteria from oilseed rape in relation to their biocontrol activity against *Verticillium dahliae*. *Journal of Phytopathology*, 149: 57-64.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403-410.
- Bacon, C.W., and Hinton, D.M. 2006. Bacterial endophytes: the endophytic niche, its occupants, and its utility. *Plant-Associated Bacteria*, pp 155-194.
- Bent, E., Tuzan, S., Chanway, C.P., and Enebak, S. 2000. Alteration in plant growth and in root hormone levels of lodgepole pines inoculated with rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 793-800.
- Boratyn, G.M., Camacho, C., Cooper, P.S., Coulouris, G., Fong, A., Madden, T.L., Matten, W.T., McGinnis, S.D., Merezuk, Y., and Raytselis, Y. 2013. BLAST: a more efficient report with usability improvements. *Nucleic acids research*, 41: 29-33.
- Doumbou, C.L., Salove, M.K., Crawford, D.L., and Beaulieu, C. 2002. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. *Phytoprotection*, 82: 85-102.

El-Barougy, E., Awad, N.M., Turkey, A.sh., and Hamed, H.A. 2009. Antagonistic activity of selected strains of Rhizobacteria against *Macrophomina phaseolina* of soybean plants. American-Eurasian. Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 5: 337-347.

Fiddaman, P.J. and Rossall, S. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. Journal of Applied Bacteriology, 74: 119-126.

Hanh, H.T., and Mongkolthanaruk, W. 2017. Correlation of growth and IAA production of *Lysinibacillus fusiformis* UD 270. Journal of Applied and Physical Sciences, 3: 98-106.

He, R.L., Wang, G.P., Liu, X.H., Zhang, C.L., and Lin, F.C. 2009. Antagonistic bioactivity of an endophytic bacterium isolated from *Epimedium brevicornu* Maxim. African Journal of Biotechnology, 8: 191-195.

Hibar, K., Daami-Remddi, M., Ayed, F., and Mahjoub, M. 2007. *Fusarium* crown and root rot and its chemical control. International Journal of Agricultural Research, 2: 687-695.

Insam, H., and Seewald, M.S. 2010. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. Biology and fertility of soils, 46: 199-213.

Intra, B., Mungsuntisuk, I., Nihira, T., Igarashi, Y., and Panbangred, W. 2011. Identification of actinomycetes from plant rhizospheric soils with inhibitory activity against *Colletotrichum* spp., the causative agent of anthracnose disease. BMC research notes, 4: 1-9.

Jasim, B., Joseph, A.A., John, C.J., Mathew, J., and Radhakrishnan, E.K. 2014. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacteria from the rhizome of *Zingiber officinale*. 3 Biotech, 4: 197-204.

Joseph, B., Ranjan Patra, R., and Lawrence, R. 2012. Characterization of plant growth promoting rhizobacteria associated with chickpea (*Cicer arietinum* L.). International Journal of Plant Production, 1: 141-152.

Kloepper, J.W., and Beauchamp, C.J. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. Canadian Journal of Microbiology, 38: 1219-1232.

Kraus, J., and Loper, J.E. 1990. Biocontrol of Pythium damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens*. Plant Growth Promoting Rhizobacteria. The second international workshop on plant growth-promoting rhizobacteria, pp 75-177.

Leifert, C., Li, H., Chidburee, S., Hampson, S., Workman, S., Sigee, D., Epton, H.A.S., and Harbour, A. 1995. Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. Journal of Applied Bacteriology, 78: 97-108.

Leoni, L., Amborsi, C., Petrucca, A., and Visca, P. 2002. Transcriptional regulation of pseudobactin synthesis in the plant growth promoting *Pseudomonas* B10. FEMS Microbiology Letter, 208: 219-225.

Liu, Y.F., Chen, Z.Y., Zhang, J., Zhou, M.G., Song, F.P., and Liu, Y.Z. 2006. Bacisubin and antifungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B- 916. Peptides, 28: 553-559.

Maurhofer, M., Keel, C., Haas, D., and Defago, G. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. Plant Pathology, 44: 40-50.

Naureen, Z., Rehman, N.U., Hussain, H., Hussain, J., Gilani, S.A., Al Housni, S.K., Mabood, F., Khan, A.L., Farooq, S., Abbas, Gh., and Harrasi, A.A. 2017. Exploring the Potentials of *Lysinibacillus sphaericus* ZA9 for Plant Growth Promotion and Biocontrol Activities against Phytopathogenic Fungi. Frontiers Microbiology, 8: 1477.

O'sullivan, D.J., and O'Gara, F. 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. Microbiological reviews, 56: 662-676.

Parker, M. 1999. *Fusarium* root and stem rot of greenhouse in British Columbia-host range, epidemiology and disease control. Simon Fraser University, 146p.

Qiu, M., Zhang, R., Xue, C., Zhang, S., Li, S., Zhang, N., and Shen, Q. 2012. Application of bio-organic fertilizer can control *Fusarium* wilt of cucumber plants by regulating microbial community of rhizosphere soil. Biology and Fertility of Soils, 48: 807-816.

Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J., and Dowling, D.N. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. FEMS microbiology letters, 278: 1-9.
Sambrook, K.J., and Russell, D.W. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 502- 510.

Schaad, N.W., Jones, J.B., and Chun, W. 2005. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. APS press. 640 Pp.
Schisler, D.A., Slininger, P.J., and Bothast, R.J. 1997. Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. Phytopathology, 87: 177-183.

Schulz, B., Wanke, U., and Draeger, S. 1993. Endophytes from herbaceous and shrubs: effectiveness of surface sterilization method. Mycological Research, 97: 1447-1450.

Sessitsch, A., Howieson, J.G., Perret, X., Antoun, H., and Martinez-Romero, E. 2002. Advances in Rhizobium research. Critical Reviews in Plant Sciences, 21: 323-378.

Sharifi-Tehrani, A., Zals, M., Natsch, A., Moenne-Loccoz, Y., and Defago, G. 1996. Investigation on the effect of 22 strains of fluorescent Pseudomonads against *P. ultimum*. Proceeding 13th. Plant Protection Congress Karaj, Iran, 186.

Tseng, S.C., Liu, S.Y., Yang, H.H., Lo, C.T., and Peng, K.C. 2008. Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ETS 323 in response to *Rhizoctonia solani*. Journal of agricultural and food chemistry, 56: 6914-6922.

Widyastuti, S.M., 2003. Biological control of *Sclerotium rolfsii* damping off of Tropical Pine (*Pinus merkusii*) with three isolates of *Trichoderma* spp. Journal Biological Science, 3: 95-102.

Zhai, Y., Jiu-xiang, Z., Tai-meng, T., Jian-ping, X., Ai-rong, S., Xie-bin, Y., Ji-lie, L., Liang-bin, Z., and Lin W. 2021. Isolation and characterization of antagonistic *Paenibacillus polymyxa* HX-140 and its biocontrol potential against *Fusarium* wilt of cucumber seedlings. BMC microbiology, 21: 1-12.

Younesi, P., Etebarian, H., and Roustae, A. 2014. Study of interaction between plant nutrition and cucumber *Fusarium* wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*. Journal of Novel Researches on Plant Protection, 6: 308-297 (In Farsi with English abstract).



© 2021 Shahid Chamran University of Ahvaz, 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/>).

Investigating of efficacy of endophytic bacteria isolated from cucumber in biocontrol of *Fusarium* crown and root rot disease of cucumber

H. Ghanadi¹, R. Khakvar^{2*} and A. Shirzad³

1. Graduated M.Sc. student of Entomology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran
2. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran (khakvar@gmail.com)
3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran

(DOI): 10.22055/ppr.2021.16881

Received: 20 February 2021

Accepted: 14 June 2021

Abstract

Background and objectives

Cucumber crown and root rot, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum*, is one of its major destructive agents in the glasshouse planting in Iran. This disease is also known as the *Fusarium* damping-off. Several methods, such as chemical control and agronomic methods have been recommended so far to control this disease, but none of them has established effective control over this disease. One of the newly established strategies for the management of this disease is the biological control using endophytic bacteria, which live inside plants and can enhance plant growth by improving nutrient uptake and producing phytohormones. These bacteria can compete and control the population of other bacteria and plant pathogens within plants. This study evaluated the biocontrol capability of some selected cucumber endophytic bacteria over *Fusarium* crown and root disease.

Materials and methods

Endophytic bacteria were isolated from roots, stems, leaves, flowers, fruits, and seeds of different healthy cucumber cultivars including, Negin, Danje 98, Danje 195, Nagin and, Native Basmang. Bacterial strains were isolated from plant tissues using different culture media. In-vitro biological control assays, such as cross-culture and agar permeable metabolite assays, were performed to determine the biocontrol efficiency of endophytic bacteria against *F. oxysporum* f.sp. *radicis cucumerinum*. The bacterial strains with better results were chosen for glasshouse assay. Two isolates with significant biocontrol efficiency were selected for molecular identification. The 16srDNA barcoding was performed using universal primers for bacterial identification. Then, the sequencing results were analyzed using MEGA-X software, and phylogenic trees were drawn using the neighbor-joining method. The selected biochemical tests confirmed the molecular results.

Results and discussion

A total of 140 endophytic bacterial isolates were isolated and purified from roots, stems, leaves, flowers, fruits, and seeds of some common healthy cucumber cultivars. Based on initial cross-culture, 14 isolates out of 140 isolates showed significant antagonism properties in the cross-culture and agar permeable metabolite assays, which were selected for further studies. After evaluation of the effective mechanisms, their antagonistic properties, such as the production capability of antibiotics, volatile compounds, siderophore, auxins, hydrogen cyanide, and protease enzyme, eight isolates were selected as the most potential bacterial isolates for biocontrol activity in the greenhouse. Finally, two bacterial isolates were selected for molecular identification using 16srDNA barcoding. The sequencing results indicated that the two selected isolates with 98% similarity could belong to *Lysinibacillus mangiferihumi* and *Lysinibacillus fusiformis* species. The biochemical results confirmed the molecular results.

Keywords: *Biocontrol*, *Fusarium oxysporum f. sp. radicis cucumerinum*, *Antagonism*, *Glasshouse*