

# Evaluation of the efficacy of *Bacillus* isolates in the biocontrol of cucumber root rot caused by *Neocosmospora cucurbitae*

1. Sara Jalaee-Poutin-Nian<sup>ORCID</sup>: Ph.D. Student of Plant Pathology, Department of Crop Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
2. Esmat Mahdikhani-Moghaddam<sup>ORCID</sup>: Professor, Department of Crop Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
3. Sareh Baghaee-Ravari<sup>ORCID</sup>\*: Associate Professor, Department of Crop Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

\*Corresponding Author's Email Address: s.baghaee@um.ac.ir

## Article Type:

Original Research

Received: 13 August 2025

Revised: 16 December 2025

Accepted: 19 December 2025

**How to Cite:** Jalaee-Poutin-Nian, S., Mahdikhani-Moghaddam, E., & Baghaee-Ravari, S. (2024). Evaluation of the efficacy of *Bacillus* isolates in the biocontrol of cucumber root rot caused by *Neocosmospora cucurbitae*. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 60(4), 342-363.

DOI: 10.22034/IJPP.2025.2021864.494

## Abstract:

*Neocosmospora cucurbitae* (syn. *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*) is a significant soilborne pathogen affecting cucurbit plants, causing root, crown, and fruit rot. In this study, the efficacy of volatile and non-volatile compounds produced by eight *Bacillus* isolates against this pathogen was evaluated under laboratory and greenhouse conditions. In dual culture assays, isolate TR<sub>11</sub> (due to rapid growth) and isolate Ba<sub>15</sub> (due to the production of inhibitory compounds) exhibited the highest fungal growth inhibition (80.25% and 76.92%, respectively). In volatile compound assays, isolates Ba<sub>15</sub>, Ba<sub>19</sub>, and Ba<sub>1</sub> showed the greatest inhibitory effects. Similar results were observed in volatile compound assays conducted in Petri dishes containing field soil. Cell-free supernatants from isolates Ba<sub>15</sub> and Ba<sub>19</sub> caused the highest fungal growth inhibition *in vitro* (70.7% and 63.7%, respectively) and induced hyphal deformations including curling and fragmentation. Treatment with Ba<sub>15</sub> and the fungicide Iprodione-Carbendazim showed acceptable biocontrol efficacy against the pathogen under greenhouse conditions, with disease incidence of 66.7% and control efficacy of 33.4%. Additionally, Ba<sub>19</sub> and Ba<sub>15</sub> increased cucumber shoot length (42.8% and 26.3%, respectively) and root length (43.7% and 35.7%, respectively) compared to the infected control. Based on 16S rRNA gene phylogenetic analysis, isolates Ba<sub>15</sub> and TR<sub>11</sub> clustered with the *B. subtilis* group, while Ba<sub>19</sub> clustered with *B. cereus*. *Bacillus* sp. Ba<sub>15</sub>, employing biocontrol mechanisms (volatile and non-volatile metabolites), and *B. cereus* Ba<sub>19</sub>, as a plant growth promoter, represent promising candidates for controlling *Fusarium* root rot of cucumber caused by *N. cucurbitae*.

**Keywords:** Greenhouse, *Neocosmospora cucurbitae*, Biocontrol, Cucumber, Volatiles



© 2024 the authors. Published by Maher Publishing Institute. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

## Extended Abstract

### Introduction

The *Fusarium solani* species complex (FSSC) comprises pathogens of global distribution that cause economically significant diseases in a wide range of plants belonging to the legume, solanaceous, cucurbit, convolvulaceous, brassicaceous, and cereal families. A revised taxonomy for the genus *Fusarium*, based on multi-locus phylogenetic analysis, has been proposed. Within the FSSC, the genus *Neocosmospora* has been proposed as a taxonomic unit independent of *Fusarium sensu stricto*. Species within the genus *Neocosmospora* encompass both plant and human pathogens, and are commonly found in soil, plant debris, live plant material, air, and water. Furthermore, this genus has been isolated from over 500 plant hosts across more than 100 plant families. The fungal pathogen *Neocosmospora cucurbitae* (syn. *F. solani* f. sp. *cucurbitae*) has been identified as a significant disease agent in cucurbit crops. This pathogen induces symptoms including leaf wilting, reduced plant growth, the development of girdling necrotic lesions on the collar and stem, and ultimately, plant death. In fruits, symptoms manifest as a watery white rot that, darkens as the disease progresses. The management of diseases caused by the FSSC has consistently presented numerous challenges. Conventional control methods include the use of resistant cultivars, cultural practices, and chemical compounds. Despite limitations in developing resistant varieties, their cultivation is recognized as the most effective strategy, whereas chemical and cultural methods have typically achieved only limited success. Alongside the aforementioned methods, the application of environmentally compatible biocontrol agents within an integrated disease management framework is receiving particular attention. Given the significance of soil-borne fungal pathogens in cucumber cultivation, this study investigated the antagonistic ability of eight *Bacillus* isolates, with an emphasis on volatile compound production, to suppress the

growth of *N. cucurbitae* under both *in vitro* and greenhouse conditions.

### Methods and Materials

To evaluate the inhibitory effect of *Bacillus* isolates against the pathogen *Neocosmospora cucurbitae* (Nc), three assays consisting of dual culture, production of non-volatile antifungal compounds, and production of volatile antifungal compounds were employed. All assays were conducted in two separate experiments, arranged in a completely randomized design with nine treatments (individual *Bacillus* isolates Ba1, Ba2, Ba12, Ba15, Ba19, Tolr-MA, JR16, TR11 + Nc fungus, and an individual fungal control) and three replications. The percentage inhibition of pathogen growth was calculated for each isolate. Additionally, the inhibitory efficacy of volatile compounds produced by the isolates against Nc in soil conditions was investigated. The level of mycelial growth inhibition of *Neocosmospora cucurbitae* in the presence of antagonistic *Bacillus* isolates was also assessed. For the greenhouse trial, treatments were arranged in a completely randomized design with six treatments and three replications (each replication consisting of two seedlings). Treatments included three selected *Bacillus* isolates co-inoculated with the Nc pathogen, an infected control (*N. cucurbitae* alone), a healthy control (sterile distilled water), and a pathogen control treated with the fungicide iprodione-carbendazim (applied at a 1:1000 ratio through irrigation water to the root zone at two time points: 7 and 14 days). Pots were incubated at 25°C under a 14-hour light/10-hour dark photoperiod for 30 days. At the end of the greenhouse experiment, disease incidence, disease severity index, and control efficacy were evaluated. Moreover, the individual effects of the selected *Bacillus* isolates on improving cucumber growth parameters, including root and shoot length, as well as root and shoot fresh and dry weights, were measured. Morphological alterations in the fungus at the confrontation zone between isolates Ba15 and Ba19 and the *N. cucurbitae* pathogen were also examined. For the selected isolates, amplification and sequencing of the 16S

rRNA region were performed using PCR with the universal primers fD1 and rD1.

## Results and Discussion

Based on the results of the three assays (dual culture, production of non-volatile, and production of volatile antifungal compounds in Petri dish conditions) the selected *Bacillus* isolates from the present study were capable of controlling *Neocosmospora cucurbitae* (Nc) under laboratory conditions through the production of volatile and non-volatile secondary metabolites. The selected isolate Ba<sub>15</sub>, in the dual culture, non-volatile, and volatile compound assays, inhibited the growth of Nc by 92.76%, 39.96%, and 11.73%, respectively. For the isolate Ba<sub>19</sub>, the inhibitory effect on Nc growth from non-volatile compounds (93.84%) was greater than that from volatile compounds (34.51%). Furthermore, in the interaction between isolate TR<sub>11</sub> and the Nc pathogen, the growth inhibition by the antagonist in dual culture was higher (80.25%) than by bacterial volatile (41.82%) and non-volatile (50.6%) compounds. In soil conditions, isolates Ba<sub>15</sub>, Ba<sub>1</sub>, and Ba<sub>19</sub> each demonstrated over 70% inhibition of Nc growth. These differences are likely attributable to multiple factors, including the inherent variation in each isolate's capacity for volatile compound production, the influence of the soil environment on bacterial metabolism, and the potential interactions between volatile compounds and soil particles. Given that the natural soil environment also hosts other microorganisms, additional microbial interactions are also influential in this dynamic. Additionally, the cell-free supernatant of the three aforementioned isolates showed high inhibitory activity (over 60%) against Nc. Compounds present in the supernatant may inhibit fungal activity by affecting the structural integrity of the cell wall, contributing to mycelial degradation, and inactivating degrading enzymes and phytotoxins produced by the fungal pathogen. The metabolites produced by the two selected isolates, Ba<sub>15</sub> and Ba<sub>19</sub>, also affected the mycelial morphology of Nc, as reported in the literature, leading to cytoplasmic coagulation

and mycelial fragmentation. According to the greenhouse trial results of this study, the selected isolate Ba<sub>15</sub> performed similarly to the iprodione-carbendazim fungicide treatment in terms of the disease severity index and control efficacy against *N. cucurbitae*. Among the selected isolates tested in the greenhouse, isolate Ba<sub>19</sub> significantly increased cucumber stem length (42.8%) and root length (43.7%) compared to the infected control. Considering the persistence of the fungal pathogen *N. cucurbitae* in soil and the limitations of chemical methods, implementing integrated management strategies such as using *Bacillus* isolates with antagonistic and plant growth-promoting activity, alongside cultural practices and improved cultivation conditions, can represent an effective and sustainable approach to reducing disease damage. Based on the findings of this study, the isolates *Bacillus* sp. Ba<sub>15</sub> (with biocontrol mechanisms via volatile and non-volatile secondary metabolites) and *Bacillus cereus* Ba<sub>19</sub> (with plant growth promotion mechanisms) can be considered suitable candidates for further investigation at the field scale to validate these results for reducing cucumber root Fusarium rot caused by *N. cucurbitae*.

## Conflict of Interest

There is no conflict of interest in conducting the present study.

## Ethical Considerations

All ethical principles and standards were fully observed in the conduct of this research.

## Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to all those who contributed to the various stages of this study.

# ارزیابی کارایی جدایه های *Bacillus* در مهار زیستی پوسیدگی ریشه خیار ناشی از *Neocosmospora cucurbitae*

۱. سارا جلائی پوستین نیان<sup>1</sup>، دانشجوی دکتری بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران  
۲. عصمت مهدیخانی مقدم<sup>2</sup>، استاد گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران  
۳. ساره بقایی راوری<sup>3</sup>، دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران  
\*پست الکترونیک نویسنده مسئول: s.baghaee@um.ac.ir

## نوع مقاله:

## چکیده

پژوهشی اصیل

قارچ (*Neocosmospora cucurbitae* (syn. *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*) یکی از عوامل مهم بیماریزایی خاکزاد در گیاهان جالیزی است که باعث پوسیدگی ریشه، طوقه و میوه می‌شود. در این پژوهش، کارایی ترکیبات فرار و غیرفرار هشت جدایه باکتری *Bacillus* علیه این بیمارگر در شرایط آزمایشگاه و گلخانه ارزیابی شد. در کشت متقابل، جدایه TR<sub>11</sub> به دلیل رشد سریع و جدایه Ba<sub>10</sub> به دلیل تولید مواد بازدارنده، بیشترین مهار رشد قارچ (به ترتیب ۸۰/۲۵ و ۷۶/۹۲ درصد) را داشتند. در آزمون ترکیبات فرار، جدایه‌های Ba<sub>10</sub>، Ba<sub>19</sub> و Ba<sub>1</sub> بیشترین اثر بازدارندگی را نشان دادند. نتایج مشابهی در آزمون ترکیبات فرار در تشتک پتری حاوی خاک مزرعه نیز مشاهده شد. رونشین جدایه‌های Ba<sub>10</sub> و Ba<sub>19</sub> بیشترین مهار رشد قارچ را در آزمایشگاه ایجاد کردند (به ترتیب ۷۰/۷ و ۶۳/۷ درصد) و باعث تغییر شکل هیف شامل پیچ‌خوردگی و قطعه‌قطعه شدن شدند. تیمار Ba<sub>10</sub> و قارچکش ایپریدیون-کاربندازیم، با وقوع بیماری ۶۶/۷ درصد و راندمان کنترل ۳۳/۴ درصد، عملکرد قابل قبولی در مهار زیستی بیمارگر در شرایط گلخانه نشان دادند. همچنین، Ba<sub>10</sub> و Ba<sub>19</sub> به ترتیب باعث افزایش طول ساقه (۴۲/۸ و ۲۶/۳ درصد) و طول ریشه خیار (۴۳/۷ و ۳۵/۷ درصد) نسبت به شاهد آلوده شدند. بر اساس تجزیه و تحلیل تبارزایی ژن rRNA ۱۶S، جدایه‌های Ba<sub>10</sub> و TR<sub>11</sub> با گروه *B. subtilis* و Ba<sub>19</sub> با *B. cereus* در یک خوشه فرار گرفتند. جدایه های *Bacillus* sp. Ba<sub>10</sub> با سازوکار مهارزیستی (متابولیت‌های فرار و غیر فرار) و *Bacillus cereus* Ba<sub>19</sub> به عنوان افزایش دهنده رشد گیاه، گزینه‌های امیدبخشی برای کنترل پوسیدگی فوزاریومی ریشه خیار ناشی از *N. cucurbitae* می‌باشند.

تاریخ دریافت: ۲۲ مرداد ۱۴۰۴

تاریخ بازنگری: ۲۵ آذر ۱۴۰۴

تاریخ پذیرش: ۲۸ آذر ۱۴۰۴

نحوه استناددهی: جلائی پوستین نیان، سارا، مهدیخانی مقدم، عصمت، و بقایی راوری، ساره. (۱۴۰۳). ارزیابی کارایی جدایه های *Bacillus* در مهار زیستی پوسیدگی ریشه خیار ناشی از *Neocosmospora cucurbitae*. بیماری‌های گیاهی، ۶۰(۴)، ۳۴۲-۳۶۳

DOI:

10.22034/IJPP.2025.2021864.494



مجوز و حق نشر: © ۱۴۰۳ تمامی حقوق انتشار این مقاله متعلق به نویسنده است. انتشار این مقاله توسط انتشارات ماهر به صورت دسترسی آزاد مطابق با گواهی (CC BY 4.0) صورت گرفته است.

کلیدواژگان: گلخانه، *Neocosmospora cucurbitae*، مهار زیستی، ترکیبات فرار، خیار

## مقدمه

مجموعه گونه‌های *Fusarium solani* (FSSC)<sup>1</sup> شامل بیماری‌هایی با پراکنش جهانی است که باعث بروز بیماری‌های اقتصادی در طیف وسیعی از گیاهان متعلق به خانواده‌های بقولات، بادنجانیان، کدوئیان، نیلوفرپیچیان، چلیپائیان و غلات می‌شود (Krasnow et al., 2024). براساس تجزیه و تحلیل تبارشناسی چندجایگاه ژنی<sup>2</sup> در طبقه‌بندی جنس *Fusarium* بازنگری انجام شده است. جنس *Neocosmospora* به عنوان یک واحد تاکسونومیک مستقل از *Fusarium sensu stricto* در FSSC پیشنهاد شده است (Sandoval-Denis et al., 2019). گونه‌های جنس *Neocosmospora* دربرگیرنده بیماری‌های گیاهی و انسانی، معمولاً در خاک، بقایای گیاهی، موادگیاهی زنده، هوا و آب یافت می‌شوند. همچنین، این جنس از ۵۰۰ گیاه میزبان مختلف مربوط به بیش از ۱۰۰ خانواده گیاهی جداسازی شده است (Sandoval-Denis et al., 2019).

بیمارگر قارچی *Neocosmospora cucurbitae* (syn. *F. solani* f. *sp. cucurbitae*.) به عنوان یکی از عوامل بیماری‌زای مهم در گیاهان جالیزی شناسایی شده است که شامل جدایه‌های پوده‌زی و بیمارگر می‌باشد و محصولات مهم جالیزی نظیر خیار، هندوانه، خربزه، طالبی، کدو سبز و کدوتنبل را در تمام مراحل رشد آلوده می‌کند (Pérez-Hernández et al., 2020). این قارچ یک بیمارگر نیمه‌زیواپروور است که بسته به شرایط محیطی می‌تواند به صورت زیواپروور یا مرده پروور عمل کند و بر مبنای اختصاصیت میزبانی به دو نژاد تقسیم می‌شود، نژاد ۱ که توانایی آلوده‌سازی ریشه، طوقه و میوه گیاهان جالیزی را دارد و نژاد ۲ که عمدتاً میوه‌ها را مورد حمله قرار می‌دهد (Rezaee et al., 2018). این بیمارگر موجب پژمردگی برگ‌ها، کاهش رشد گیاه، ظهور ناحیه بافت مرده در طوقه و ساقه به صورت کمربندی

و در نهایت مرگ گیاه را موجب می‌گردد. در میوه‌ها نیز علائم به صورت پوسیدگی‌های سفید آبیکی ظاهر می‌شود که با پیشرفت بیماری تیره‌تر می‌شوند. شدت بیماری به رطوبت خاک و تراکم زادمایه اولیه بستگی دارد و از طریق تماس میوه با خاک آلوده نیز منتقل شود (Armengol et al., 2008). ایجاد زخم در ریشه توسط بیمارگرهای دیگر مانند نماتد *Meloidogyne spp.* ورود و استقرار این قارچ را تسهیل می‌نماید.

در داخل کشور، در سال ۲۰۰۹، نژاد ۱ این قارچ، از مزارع کدویان استانهای خراسان رضوی، شمالی و فارس براساس واکنش زنجیره‌ای پلیمرز اختصاصی (PCR)<sup>3</sup> و بیماری‌زایی، شناسایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با نشانگرهای مولکولی بررسی گردید (Alymanesh et al., 2009). در بررسی جدایه‌های عامل پوسیدگی ریشه، طوقه و ساقه در مزارع کدویان استان کرمانشاه، جدایه‌های این گونه بر مبنای شکل‌شناسی و هضم آنزیمی ناحیه ITS<sup>4</sup> شناسایی و از سایر گونه‌های فوزاریوم تفکیک شدند (Chehri et al., 2011). رضایی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۸، از نمونه‌های دارای علائم پوسیدگی ریشه و طوقه از گلخانه‌ها و مزارع خیار شاهرود، ورامین و جیرفت، جدایه‌های *F. solani* f. *sp. cucurbitae* (نژاد ۱) را با استفاده از ویژگی‌های شکل‌شناسی، بیماری‌زایی، توالی‌یابی ژن *tef1*<sup>5</sup> و PCR اختصاصی نژاد شناسایی نمودند (Rezaee et al., 2018). همچنین، در بررسی تبارشناسی چند جایگاه ژنی، شامل نواحی ITS، DNA ی ریبوزومی ۲۸S و *tef1* جنس *Neocosmospora* از مجموعه گونه‌های *F. solani* بدست آمده از مزارع خربزه پنج استان کشور معرفی شد که بیماری‌زایی روی طیف وسیعی از کدویان از جمله خیار را نشان دادند (Sabahi et al., 2023). مهار بیماری‌های ناشی از FSSC همواره با چالش‌های متعددی روبرو بوده است. روش‌های متداول مهار شامل استفاده از ارقام مقاوم، روش‌های زراعی

2- Internal Transcribed Spacer

5- transcription elongation factor

1 - *Fusarium solani* species complex

2- Multilocus Phylogenetic Analyses

1- Polymerase Chain Reaction

اسیدآمینوهای آزاد و همچنین باعث افزایش فاکتورهای رشدی گیاه و باردهی بوته می‌شود (El-Sharkawy & Abdelrazik, 2022).

با توجه به اهمیت حضور بیمارگرهای قارچی خاکزاد در کشت‌های خیار، در این پژوهش، توانایی آنتاگونیستی هشت جدایه از جنس *Bacillus* با تأکید بر تولید ترکیبات فرار در مهار رشد *N. cucurbitae* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه موردبررسی قرار گرفته است.

### مواد و روش‌های بررسی

#### تهیه و آماده‌سازی جدایه‌ها

هشت جدایه از جنس *Bacillus* از مجموعه کشت‌های زنده بخش بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد بصورت خالص تهیه و روی محیط کشت عمومی آگار غذایی (NA)<sup>1</sup> کشت شدند. همچنین، جدایه *Neocosmospora cucurbitae* (syn. *F. solani* f. sp. *cucurbitae*) نژاد یک (Rezaee et al., 2018) از مجموعه کشت‌های زنده آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه صنعتی شاهرود تهیه و برای استفاده روی محیط عصاره سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA)<sup>2</sup> کشت شد.

#### کارایی بازدارندگی جدایه‌های *Bacillus* از رشد قارچ بیمارگر

به منظور ارزیابی بازدارندگی جدایه‌های *Bacillus* در تعامل با بیمارگر *Neocosmospora cucurbitae* (Nc) از سه آزمون کشت متقابل، تولید ترکیبات غیرفرار و فرار ضدقارچی استفاده گردید. کلیه آزمون‌ها در دو آزمایش مجزا در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۹ تیمار (جدایه‌های انفرادی *Bacillus* شامل Ba1, Ba2, Ba12, Ba15, Ba19, Tolr-MA, JR16, TR11 + Nc و شاهد قارچ به تنهایی) و سه تکرار، انجام شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس تا زمانی که تشتک پتری شاهد توسط قارچ بیمارگر احاطه شده باشد، نگهداری شدند. در تیمارهای حاوی باکتری و شاهد

و استفاده از ترکیبات شیمیایی می‌باشند. با وجود محدودیت در تولید ارقام مقاوم، کشت این ارقام به عنوان موثرترین روش شناخته شده است، درحالیکه روش‌های شیمیایی و زراعی معمولاً موفقیت نسبی داشته‌اند (Borrero et al., 2006). در کنار روش‌های ذکرشده، بکارگیری ترکیبات زیستی سازگار با محیط زیست در روند مهار تلفیقی بیمارگرها، موردتوجه ویژه می‌باشد.

تقریباً نیمی از عوامل مهارزیستی تجاری در دسترس را محصولات مبتنی برگونه‌های *Bacillus* تشکیل می‌دهند (Cruz-Magalhães et al., 2022).

گونه‌های جنس *Bacillus* به دلیل تولید ترکیبات ضد میکروبی پایدار، قابلیت فرمولاسیون آسان و سازگاری با انواع مختلف خاک‌های کشاورزی و شرایط محیطی مختلف در منطقه ریزوسفریک توانسته‌اند نقش مهمی در مهارزیستی بیمارگرهای خاکزاد داشته باشند (Haas & Défago, 2005). اثرگذاری مواد ضد میکروبی جدایه *B. amyloliquefaciens* PT14 با فعالیت ضدقارچی در برابر گونه‌های بیمارگر *F. solani* و *F. oxysporum* و تغییر شدید در شکل‌شناسی کنیدیوم‌ها و ریشه‌های قارچ گزارش شده است (Kim et al., 2015). جدایه *B. simplex* 30VD-1 موثرترین فعالیت بازدارندگی را از طریق تولید کیتیناز، مواد فرار و سایر ترکیبات ضدقارچی در برابر بیمارگرهای قارچی نشان داده است (Khan et al., 2018). فرم تجاری جدایه *B. subtilis* PTS-394 علیه *F. solani* در فلفل، جمعیت بیمارگر را در خاک سرکوب و با تولیدات خود، مقاومت در گیاه گوجه‌فرنگی را برانگیخته است (Qiao et al., 2023). بررسی تاثیر *Trichoderma album*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescense* در مقابل *F. solani* عامل پوسیدگی ریشه نشان داد، جدایه *T. harzianum* با ۷۵/۱۷٪ بیشترین کاهش رشد در میسلیم بیمارگر را باعث می‌شود. همچنین براساس نتایج این بررسی، استفاده ترکیبی از جدایه‌ها منجر به افزایش قابل توجه کلروفیل کل، کارتنوئیدها، ترکیبات فنولی آزاد،

<sup>2</sup> - Potato Dextrose Agar

<sup>1</sup> - Nutrient Agar

بازه زمانی سه و پنج روز اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی از رابطه ۱ محاسبه گردید. در تیمار شاهد، تشنگ پتری حاوی قارچ بیمارگر در مقابل تشنگ پتری فاقد جدایه باکتری قرار داده شد.

همچنین، کارایی بازدارندگی مواد فرار تولیدی جدایه‌ها علیه قارچ NC در شرایط خاک نیز بررسی گردید. بدین منظور، رشد جدایه‌های *Bacillus* در محیط مایع تریپتون‌سویا انجام شد. سپس ۸ گرم از خاک مزرعه سترون همراه با ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط باکتری با غلظت ( $10^8$  CFU/ml) در تشنگ پتری ریخته و تشنگ پتری حاوی قارچ به‌طور وارونه روی تشنگ پتری حاوی باکتری قرار داده شد. درصد بازدارندگی از رشد قارچ NC بعد از شش روز بررسی گردید (Fernando et al., 2005).

#### جلوگیری از رشد میسلیم قارچ *Neocosmospora cucurbitae* در

##### حضور روشین *Bacillus* بازدارنده

ابتدا از کشت مایع شبانه هشت جدایه *Bacillus*، به کمک فیلتر سرنگی ۰/۲۲ میکرومتری روشین تهیه شد. روشین فاقد سلول با محیط PDA (۲۰ درصد V/V) مخلوط و به داخل تشنگ‌های پتری ریخته شد. قرص ۵ میلی‌متری از پرگنه قارچ NC در وسط تشنگ پتری قرار داده شد و درصد بازدارندگی از رشد ارزیابی شد. در تشنگ پتری شاهد منفی، بجای روشین باکتری از محیط مایع غذایی استفاده شد (Pan et al., 2015).

#### توان بازدارندگی جدایه‌های منتخب *Bacillus* در مقابل

##### قارچ *Neocosmospora cucurbitae* خیار در شرایط گلخانه

بذرهای خیار (رقم ناگین ۷۹۲) در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت یک دقیقه غوطه‌ور و سپس سه بار با آب مقطر سترون شست‌وشو شدند. سپس برای جوانه‌زنی در دمای ۲۸ درجه سیلسیوس قرار گرفتند. بذرهای جوانه زده به گلدان‌های یک کیلوگرمی حاوی مخلوطی از خاک زراعی، کوکوپیت، پیت ماس به نسبت ۱:۱:۲ منتقل شدند. محلول غذایی حاوی عناصر ماکرو NPK (۲۰-۲۰-۲۰) بصورت هفتگی به گلدان‌ها همراه با آبیاری

میزان رشد شعاعی قارچ اندازه‌گیری و طبق رابطه ۱ میزان درصد بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر برای هر جدایه محاسبه شد (Thanoon et al. 2024)

$$I = [(C - T) \div C] \times 100$$

در معادله فوق، I: درصد بازدارندگی، C: قطر پرگنه قارچ در تشنگ پتری شاهد و T: قطر پرگنه قارچ در تشنگ حاوی جدایه *Bacillus* می‌باشد.  
**کشت متقابل:** کشت شبانه هشت جدایه *Bacillus* در محیط مایع غذایی تهیه شد. از حاشیه فعال پرگنه پنج روزه قارچ NC، قرص ۵ میلی‌متری جدا و در مرکز تشنگ پتری جدید حاوی محیط کشت PDA منتقل شد. سپس از مخلوط باکتری، مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر ( $10^8$  CFU/ml) در دو سمت پرگنه قارچ با فاصله ۰/۵ سانتی‌متری از لبه تشنگ پتری ریخته شد (Ji et al., 2014). تشنگ‌های پتری با پارافیلیم بطور کامل بسته شده و به درون انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سیلسیوس منتقل شدند. بعد از شش روز، قطر پرگنه اندازه‌گیری شد. در تیمار شاهد نیز بجای مخلوط باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد. درصد بازدارندگی به کمک رابطه ۱ محاسبه گردید.

**تولید ترکیبات غیر فرار:** مخلوط هر جدایه باکتریایی به‌روش ذکرشده در بالا تهیه و روی محیط PDA پخش شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، با استفاده از کلروفورم، باکتری حذف و قرص فعال از پرگنه قارچ در مرکز هر تشنگ پتری قرارگرفت و تشنگ‌های پتری در دمای ۲۸ درجه سیلسیوس به مدت ۳ روز نگهداری شدند (Kraus & Loper, 1991). در نهایت قطر پرگنه قارچ اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی از رابطه ۱ محاسبه گردید.

**تولید ترکیبات فرار:** میزان ۱۰۰ میکرو لیتر از مخلوط هر باکتری در مرکز تشنگ پتری حاوی آگار غذایی لکه‌گذاری شد. به‌صورت همزمان تشنگ پتری PDA حاوی یک قرص فعال از پرگنه قارچ تهیه و با حفظ شرایط سترون، درپوش تشنگ‌های پتری حاوی قارچ بیمارگر و باکتری برداشته و تشنگ پتری حاوی قارچ به‌طور وارونه روی تشنگ پتری حاوی باکتری قرار داده شد (Fernando et al., 2005). سپس قطر پرگنه قارچ بیمارگر در دو

که در آن N: تعداد کل گیاهچه‌های خیار مورد ارزیابی مربوط به هر درجه بیماری (۰-۲)، T: تعداد کل گیاهچه‌های خیار.

همچنین، اثر انفرادی جدایه‌های *Bacillus* منتخب در بهبود فاکتورهای رشدی گیاه خیار شامل طول ریشه و بخش هوایی، وزن تر و خشک ریشه و بخش هوایی، در پایان آزمون گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

### اثر جدایه‌های *Bacillus* منتخب روی صفات ریخت‌شناسی قارچ

#### *Neocosmospora cucurbitae*

تغییرات ریخت‌شناسی قارچ در محل تلاقی بین جدایه‌های Ba19 و Ba15 و قارچ بیمارگر *N. cucurbitae* مورد بررسی قرار گرفتند. هر اسلاید میکروسکوپی با لایه‌ای نازک از PDA پوشانده شده و قارچ بیمارگر و سوسپانسیون باکتری روی اسلاید میکروسکوپی در فاصله‌ای نزدیک هم قرار گرفتند. اسلایدهای تهیه شده به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. اسلایدها به کمک اوانس بلو رنگ‌آمیزی شدند. تغییرات ایجاد شده توسط جدایه‌های *Bacillus* روی میسلیم‌های بیمارگر NC توسط میکروسکوپ نوری (Olympus .BX41) بررسی و عکسبرداری شدند.

### جداسازی DNA و شناسایی مولکولی جدایه‌های منتخب

استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNA (FAVORGEN, Yekta Tajhiz Azma) انجام شد. در این روش ابتدا جدایه‌ها در محیط آگار غذایی کشت و بعد از ۲۴ ساعت استخراج DNA طبق دستورالعمل شرکت سازنده کیت انجام شد. تکثیر ناحیه srRNA ۱۶ با استفاده از PCR با آغازگرهای عمومی fd1 و rd1 (Weisburg et al., 1991) در دستگاه ترموسایکلر Biometra (آلمان) و با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت. محصولات PCR برای خالص‌سازی و تعیین ترادف به همراه آغازگرهای رفت و برگشت

افزوده شد. پس از گذشت دو هفته (مرحله رشد دوبرگی حقیقی)، میزان ۱۵ میلی‌لیتر از مخلوط جدایه‌های منتخب *Bacillus* با غلظت  $10^8$  CFU/ml در اطراف ریشه‌های خیار ریخته شد. بعد از سه روز، گلدان‌ها با ۱۰ میلی‌لیتر از مخلوط قارچ *N. cucurbitae* ( $10^7$  اسپور در هر میلی‌لیتر) مایه‌زنی شدند (Du et al., 2022). تیمارهای مورد آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۶ تیمار و ۳ تکرار (هر تکرار شامل دو گیاهچه)، شامل سه جدایه منتخب *Bacillus* همراه با بیمارگر NC، شاهد آلوده (*N. cucurbitae*)، شاهد سالم (آب مقطر سترون) و تیمار بیمارگر NC با قارچکش اپیریدیون- کاربندازیم (به نسبت یک‌درهزار از طریق ریشه همراه با آب آبیاری در دوباره زمانی هفت و چهارده روزه) در نظر گرفته شدند. گلدان‌ها در در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تحت شرایط ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی به مدت ۳۰ روز انکوبه شدند. شدت بیماری با استفاده از درجه ۰-۲ تعریف شده توسط پرز-هرناندز و همکاران (Pérez-Hernández et al., 2020) ارزیابی شد:

0: برگ بدون علامت؛ 1: ظهور علائم شامل پژمردگی، زردی و کلروزبرگی، کاهش رشد، قهوه‌ای شدن آوندها؛ 2: پژمردگی کامل و مرگ گیاه

همچنین، میزان وقوع بیماری<sup>۱</sup>، شاخص شدت بیماری<sup>۲</sup> و راندمان کنترل<sup>۳</sup> بر اساس فرمول‌های زیر محاسبه گردید (Xu et al., 2022) . .

$$\text{Disease incidence} = [N1 + N2] \div T \times 100\%$$

$$\text{Disease Severity Index}$$

$$= [(0 \times N0) + (1 \times N1) + (2 \times N2)] \div T \times 2] \times 100$$

$$\text{Control efficacy} = (\text{DI of control} - \text{DI of treatment})$$

$$\div \text{DI of control} \times 100\%$$

<sup>3</sup>- Control Efficacy

<sup>1</sup>- Disease Incidence

<sup>2</sup>- Disease Severity Index

## نتایج

کارایی جدایه‌های باسیلوس در بازدارندگی از رشد قارچ (Nc)

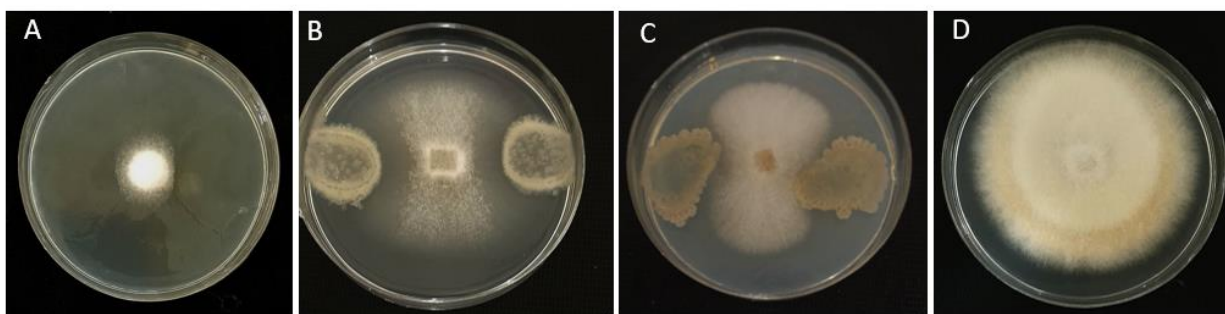
*Neocosmospora cucurbitae*

آزمون کشت متقابل: بر اساس آزمون کشت متقابل (شکل ۱)، درصد مهار رشد قارچ Nc در حضور هر یک از جدایه‌های *Bacillus* ارائه شده است (شکل ۲). درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر Nc در دامنه ۳۵/۳۸ تا ۸۰/۲۵ در بین تیمارهای باکتریایی متفاوت بود. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها و مقایسه میانگین‌ها بر پایه آزمون دانکن، جدایه‌ها را از نظر توان بازدارندگی در سه گروه آماری متمایز قرار داد. دو جدایه با میانگین بازدارندگی بیش از ۷۰ درصد (Ba15 و TR11) به ترتیب به میزان ۸۰/۲۵٪ و ۷۶/۹۲٪، بالاترین اثر بازدارندگی را نشان دادند. البته بازدارندگی جدایه TR11 به دلیل سرعت رشد بالای باکتری می‌باشد که اجازه رشد به قارچ بیمارگر را نداده است (شکل ۱A). جدایه‌های Ba19، Ba1 و JR16 در دامنه ۴۰ تا ۷۰ درصد بازدارندگی از رشد قارچ Nc را نشان داده و جدایه‌های باقی‌مانده با کمترین میزان بازدارندگی در گروه آماری C قرار گرفتند (شکل ۲).

به شرکت کدون ژنتیک (تهران) ارسال شدند. ترادف نوکلئوتیدی حاصل از توالی‌یابی ژن srRNA ۱۶ از نظر میزان همولوژی در BLAST با سایر جدایه‌های ثبت‌شده در بانک ژن مقایسه گردیدند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌ها و درخت حاصله با روش اتصال مجاور به‌وسیله نرم‌افزار MEGA 11 همراه با ۱۰۰۰ تکرار اترسیم گردید.

## تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری نتایج آزمون‌های سنجش زیستی توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ (USA, IL, Chicago SPSS Inc) انجام شد. بررسی تفاوت بین گروه‌های آماری با استفاده از آنالیز واریانس انجام شد. در مواردیکه نتیجه این تحلیل معنادار بود، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای مقایسه میانگین‌ها استفاده گردید. سطح معناداری در این مطالعه، کمتر و مساوی پنج درصد در نظر گرفته شد.

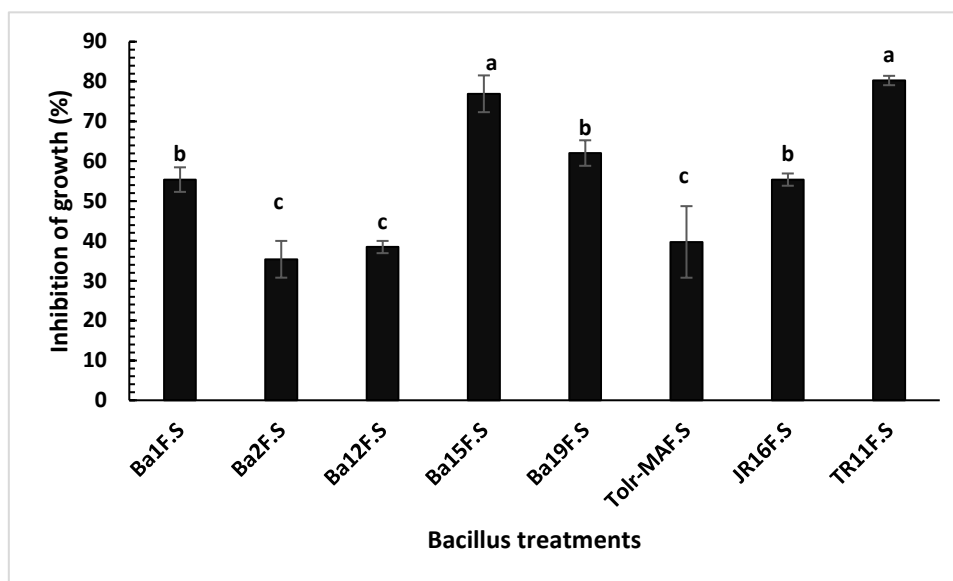


شکل ۱. توانایی بازدارندگی جدایه‌های *Bacillus* علیه قارچ بیمارگر *Neocosmospora cucurbitae* در محیط کشت PDA پس از ۶ روز. A: TR11، B:

Ba15، C: Ba1، D: شاهد (قارچ بیمارگر)

Fig 1. Inhibitory activity of *Bacillus* isolates against the pathogenic fungus, *Neocosmospora cucurbitae* on PDA medium after 6 days.

A: TR11، B: Ba15، C: Ba1، D: Control (pathogenic fungus).



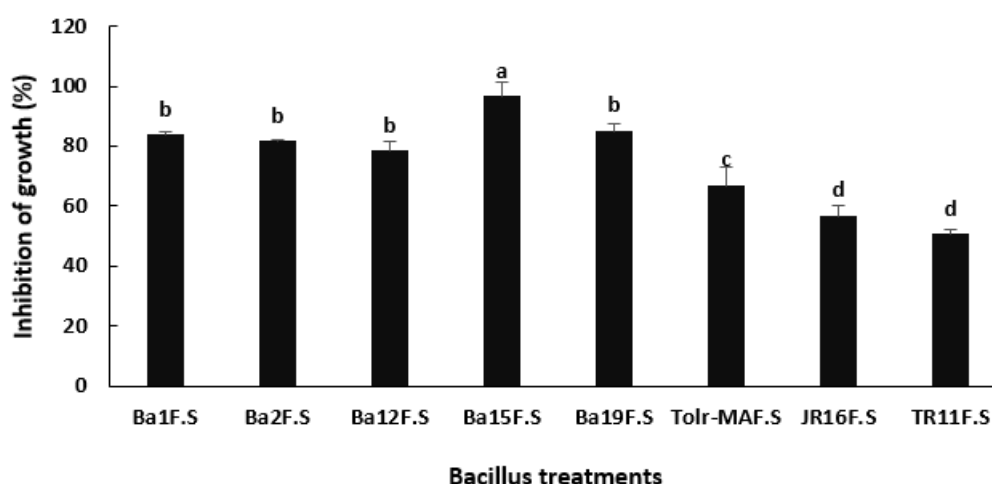
شکل ۲- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد قارچ *Neocosmospora cucurbitae* توسط جدایه‌های *Bacillus* روی محیط کشت PDA در آزمون

کشت متقابل بعد از شش روز و گروه بندی جدایه‌ها بر اساس آزمون دانکن (سطح  $P \leq 0.05$ ).

Fig 2. Comparison of the inhibition percentage mean of *Neocosmospora cucurbitae* growth by *Bacillus* isolates on PDA medium in the dual-culture assay after 6 days. Isolate grouping was done based on Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

رقابت رشدی بین جدایه TR11 و NC در کشت متقابل بسیار بالا بود، در حالیکه در این آزمون جدایه‌ی TR11، کمترین میزان تولید متابولیت غیرفرار را دارد (۵۰/۶۰٪). جدایه‌های Ba1، Ba2، Ba12 و Ba19 نیز مهار قابل توجهی (بیش از ۷۸٪) داشتند و از نظر آماری در یک گروه قرار گرفتند.

تولید ترکیبات غیرفرار ضدقارچی: در تیمار جدایه‌های مختلف *Bacillus*، پرگنه قارچ با تراکم بسیار اندک، رشد نمود (شکل ۳). درصد مهار رشد قارچ در بین جدایه‌ها در دامنه‌ی ۵۰/۶۰٪ تا ۹۶/۳۹٪ قرار داشت و بیشترین فعالیت آنتی‌بیوتیکی مربوط به جدایه Ba15 با ۹۶/۳۹٪ می‌باشد.



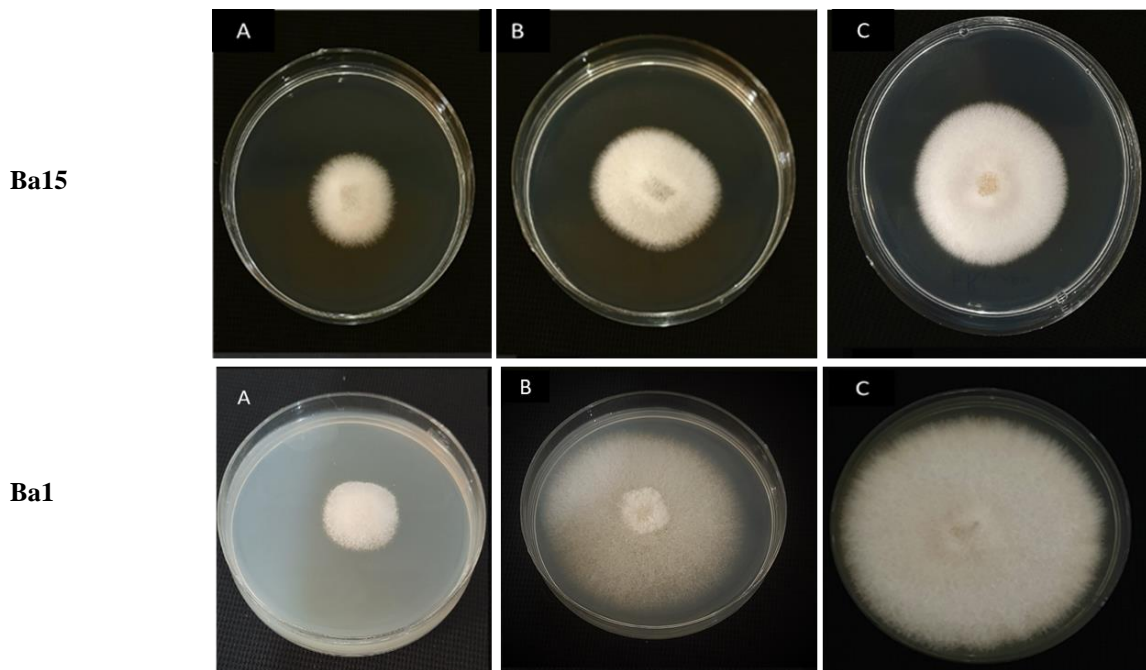
شکل ۳- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد قارچ *Neocosmospora cucurbitae* توسط جدایه‌های *Bacillus* روی محیط کشت PDA در آزمون

آنتی‌بیوتیک و گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس آزمون دانکن (سطح  $P \leq 0.05$ ).

**Fig 3. Comparison of the inhibition percentage mean of *Neocosmospora cucurbitae* growth by *Bacillus* isolates on PDA medium in the antibiotic assay, with isolate grouping based on Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).**

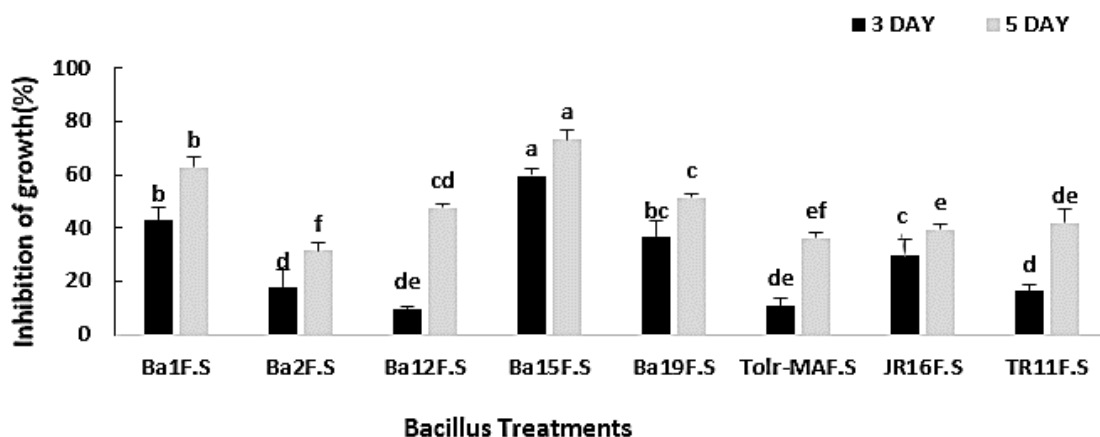
(۱۱/۷۳٪) رسید. به نظر می‌رسد، تجمع این ترکیبات در محیط باعث بهبود عملکردشان شده است. البته برخی جدایه‌ها مانند Ba2 و JR16 روند افزایشی کمتری داشتند که ممکن است به دلیل تفاوت در نوع یا پایداری ترکیبات فرار تولیدی آن‌ها باشد (شکل ۵).

ترکیبات فرار ضدقارچی: بر اساس شکل ۴ و ارزیابی تولیدات گازی باکتری در دو بازه ۳ و ۵ روزه، جدایه Ba15 بیشترین اثر مهارکنندگی (۴۵/۵۹٪) را در روز سوم داشت، درحالی‌که کمترین اثر مربوط به جدایه‌ی Ba12 با ۹/۴۵٪ بود. با گذشت زمان تا روز پنجم، تمام جدایه‌ها افزایش مشخصی در مهار قارچ نشان دادند، به طوری که Ba15 به بالاترین میزان



شکل ۴. بررسی ترکیبات فرار جدایه‌های *Bacillus* در بازدارندگی از رشد قارچ *Neocosmospora cucurbitae* روی محیط کشت PDA بعد از ۳ و ۵ روز. (A): روز سوم؛ (B): روز پنجم؛ C: شاهد (قارچ بیمارگر).

**Fig 4. Inhibitory activity of *Bacillus* isolate's volatiles against *Neocosmospora cucurbitae* on PDA medium after 3 and 5 days. (A) Day 3, (B) Day 5. C: Control (pathogenic fungus).**



شکل ۵. مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد قارچ *Neocosmospora cucurbitae* توسط ترکیبات فرار جدایه‌های *Bacillus* روی محیط کشت PDA و گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس آزمون دانکن (سطح  $P \leq 0.05$ ).

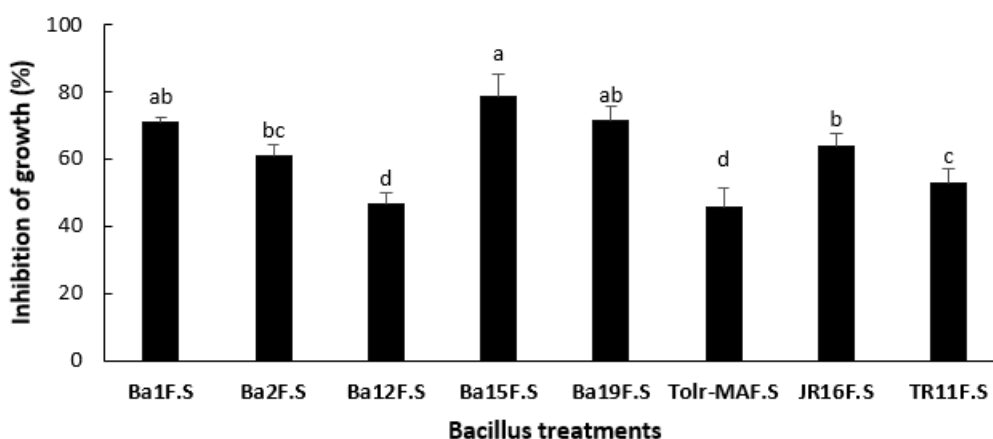
Fig 5. Comparison of the inhibition percentage mean of *Neocosmospora cucurbitae* growth by *Bacillus* isolates volatiles on PDA medium and isolate grouping based on Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).

مطالعه‌ی حاضر، در محیط پیچیده‌ای مانند خاک نیز توانایی تولید مقادیر قابل‌توجهی از ترکیبات فرار ضدقارچی را دارند. با توجه به آزمون طراحی‌شده، ترکیبات فرار تولیدشده توسط *Bacillus* می‌توانند در شرایط شبیه‌سازی شده مزرعه (وجود خاک زراعی) نیز اثر بازدارندگی خود را حفظ کنند.

بازدارندگی ترکیبات فرار تولیدشده توسط باکتری *Bacillus* علیه

قارچ *Neocosmospora cucurbitae* در خاک

در آزمایش حاضر، جدایه‌های Ba15 با ۷۸/۸۰٪، Ba1 با ۷۰/۸٪ و Ba19 با ۷۱/۲٪ بازدارندگی از رشد بیمارگر *N. cucurbitae*، عملکرد مناسبی از خود نشان دادند (شکل ۶). درحالی‌که جدایه Tolr-MA با ۴۵/۸ درصد کمترین میزان بازدارندگی را داشته است. براساس داده‌ها، جدایه‌های موفق

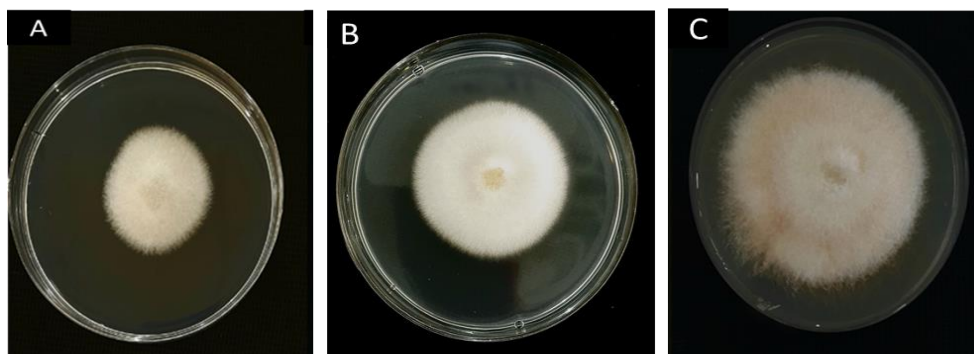


شکل ۶. مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد قارچ *Neocosmospora cucurbitae* توسط ترکیبات فرار جدایه‌های *Bacillus* روی محیط کشت PDA حاوی خاک سترون مزرعه بعد از هفت روز. A: Ba15، B: Ba19، C: شاهد (قارچ بیمارگر).

**Fig 6. Comparison of the inhibition percentage mean of *Neocosmospora cucurbitae* growth by *Bacillus* isolates on PDA medium in the sterile field soil volatile compounds assay, with isolate grouping based on Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).**

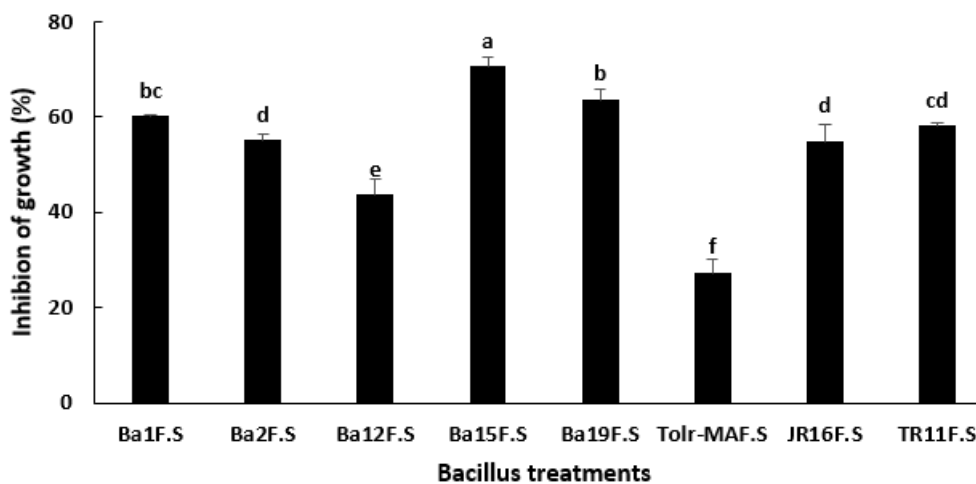
بوده است و پس از آن جدایه‌های Ba<sub>19</sub> با ۶۳/۶۶٪ و Ba<sub>1</sub> با ۶۰/۲٪ قرار دارند (شکل ۸). متابولیت‌های ضد میکروبی ترشح‌شده توسط *Bacillus* می‌توانند به تنهایی و بدون نیاز به حضور سلول‌های باکتریایی در محیط پایدار بوده و رشد بیمارگرهای قارچی را سرکوب نمایند.

بازدارندگی محلول رونشین *Bacillus* در برابر قارچ *Neocosmospora cucurbitae* محلول رونشین جدایه‌های *Bacillus* اثرات متفاوتی در مهار رشد قارچ بیمارگر Nc داشته‌اند (شکل ۷). جدایه Ba<sub>15</sub> با ۷۰/۶۶٪ مهار، موثرترین تیمار



شکل ۷. بررسی تاثیر رونشین فاقد سلول جدایه‌های *Bacillus* در بازدارندگی از رشد *Neocosmospora cucurbitae* روی محیط کشت PDA بعد از شش روز. A: Ba<sub>15</sub>; B: Ba<sub>19</sub>; C: شاهد (قارچ بیمارگر).

**Fig 7. Inhibitory activity of *Bacillus* isolates supernatant against *Neocosmospora cucurbitae* on PDA medium after 6 days. A: Ba<sub>15</sub>, B: Ba<sub>19</sub>, C: Control (pathogenic fungus).**



شکل ۸. مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد قارچ *Neocosmospora cucurbitae* توسط رونشین فاقد سلول جدایه‌های *Bacillus* روی محیط کشت PDA بعد از گذشت شش روز و گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ).

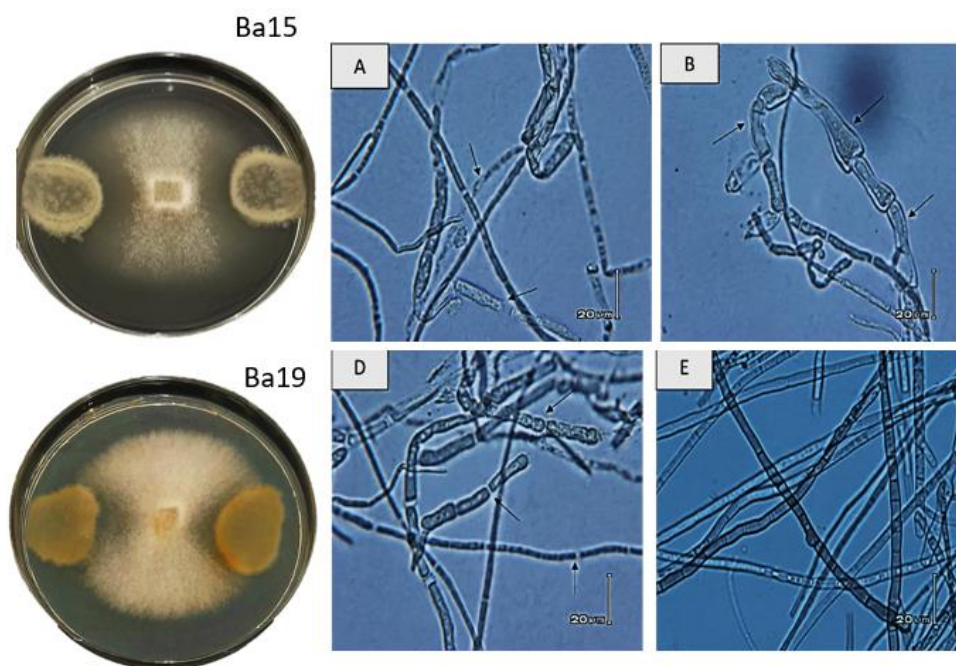
**Fig 8. Comparison of the inhibition percentage mean of *Neocosmospora cucurbitae* supernatant on PDA medium after 6 days, with isolate grouping based on Duncan's test ( $P \leq 0.05$ ).**

E-9). درحالی‌که در تیمارهای باکتریایی (Ba15 یا Ba19)، دیواره سلولی میسلیوم در بعضی مناطق نازک‌شده و یا تحلیل‌رفته است، میسلیوم دچار تغییرشکل، پیچ‌خوردگی و گاهی قطعه‌قطعه شده و سیتوپلاسم نیز منعقد شده است (شکل A-D-11).

اثر جدایه‌های *Bacillus* بر ریخت‌شناسی میسلیوم قارچ

### *Neocosmospora cucurbitae*

اثرگذاری دو جدایه‌ی Ba15 و Ba19 (توان بالاتر مهار زیستی بیمارگر) بر شکل‌شناسی میسلیوم قارچ NC بررسی شد (شکل ۹). میسلیوم‌های تیمار شاهد (قارچ به تنهایی) پس از گذشت ۴۸ ساعت تغییر شکلی نداشتند (شکل



شکل ۹. تصاویر میکروسکوپ نوری از تعامل جدایه‌های Ba15 و Ba19 جنس *Bacillus* روی ریخت‌شناسی *Neocosmospora cucurbitae* در

شرایط آزمایشگاهی بعد از گذشت ۴۸ ساعت. A: تخریب دیواره سلولی و انعقاد سیتوپلاسمی، B: تغییرشکل در میسلیوم، D: قطعه‌قطعه شدن میسلیوم، E: میسلیوم‌های قارچ بیمارگر (کنترل منفی)

**Fig 9. Light microscopy images of the interaction between Ba<sub>15</sub> and Ba<sub>19</sub> bacterial isolates and *Neocosmospora cucurbitae* after 48 hours. A: Cell wall degradation and cytoplasmic coagulation, B: Hyphal deformation, C: Hyphal cell wall thinning, D: Hyphal fragmentation, E: Pathogenic fungus mycelium**

بیماری ۱۰۰ و شدت بیماری ۹۱/۶۷ درصد)، کاهش معناداری در شاخص شدت بیماری نشان دادند. بر اساس جدول ۱ و شکل ۱۰، در بین تیمارهای مورد بررسی، جدایه Ba15 و قارچکش ایپریدیون-کاربندازیم، با وقوع بیماری ۶۶/۷٪، شدت بیماری ۳۳/۴٪ و راندامان کنترل ۳۳/۴٪ عملکرد قابل قبولی در مهار زیستی *N. cucurbitae* در شرایط گلخانه نشان دادند. کارایی کنترل زیستی تیمار Ba19 نصف تیمار Ba15 (۱۶/۶۷ درصد) ثبت گردید و

### آزمون گلخانه

باتوجه به بررسی‌های آزمایشگاهی انجام‌شده، سه جدایه‌ی *Bacillus* (Ba15، Ba19 و TR11) به‌عنوان جدایه‌های منتخب برای آزمون گلخانه انتخاب شدند. در گیاهان مایه‌زنی‌شده با آب مقطر سترون هیچگونه علائمی در گیاهچه‌ها مشاهده نشد (شکل ۱۰). تمامی تیمارها نسبت به شاهد آلوده (وقوع

تیمار TR<sub>11</sub> توانایی کنترل بیمارگر مطالعه حاضر را در شرایط گلخانه نداشت (جدول ۱). براساس جدول ۲، جدایه‌های Ba<sub>19</sub> و Ba<sub>15</sub> در مقایسه با شاهد آلوده به قارچ بیمارگر، به ترتیب به میزان ۴۲/۸ و ۲۶/۳ درصد افزایش در طول ساقه و به میزان ۴۳/۷ و ۳۵/۷ درصد افزایش در طول ریشه خیار را موجب شدند. همچنین، تیمار Nc + Ba<sub>19</sub> باعث افزایش ۳۰/۶ و ۴۰/۶ درصدی طول ساقه و ریشه در مقایسه با تیمار قارچکش + *N. cucurbitae* گردید. جدایه‌های بازدارنده Ba<sub>19</sub> و Ba<sub>15</sub> نیز وزن خشک ریشه و اندام هوایی را در بازه ۴۴/۵ تا ۵۲/۴ درصد در مقایسه با شاهد آلوده افزایش دادند (جدول ۲).

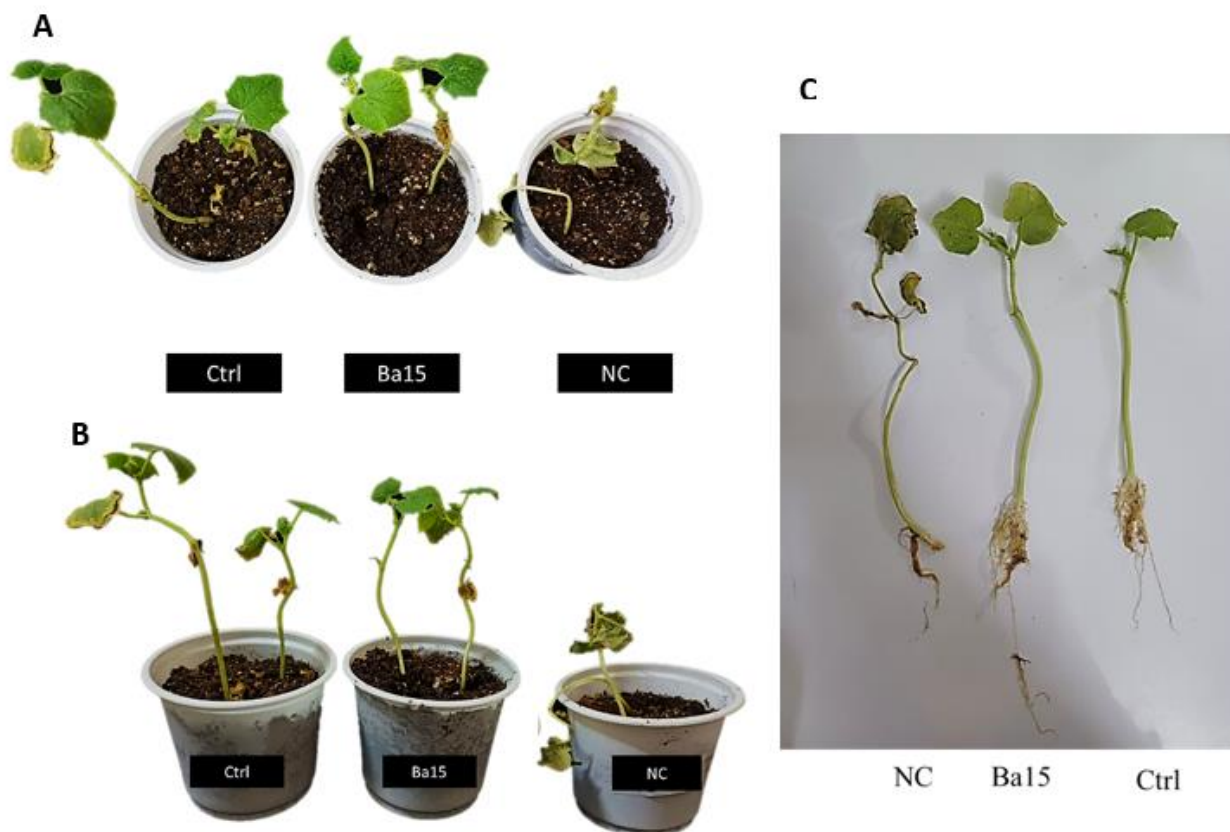
جدول ۱. میزان وقوع بیماری، شاخص شدت بیماری و اثربخشی مهارکنندگی جدایه‌های بومی منتخب *Bacillus* در تعامل با عامل پژمردگی

فوزاریومی ریشه‌ی خیار (Nc) (*Neocosmospora cucurbitae*) در گلخانه.

**Table 1. Disease incidence, disease severity index, and the control efficacy of selected *Bacillus* isolates against *Fusarium* wilt of cucumber root (*Neocosmospora cucurbitae*) (Nc) under greenhouse conditions.**

| Treatments*           | Disease incidence (%)  | Severity index (%)      | Control efficacy (%)    |
|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Healthy control       | 0 <sup>d**</sup>       | -                       | -                       |
| Infected control      | 100 <sup>a</sup>       | 91.67±0.36 <sup>a</sup> | -                       |
| Nc + Ba <sub>19</sub> | 83.4±0.12 <sup>b</sup> | 58.4±0.82 <sup>bc</sup> | 16.67±0.48 <sup>b</sup> |
| Nc + Ba <sub>15</sub> | 66.7±0.67 <sup>c</sup> | 33.4±0.08 <sup>c</sup>  | 33.4±1.21 <sup>a</sup>  |
| Nc + TR <sub>11</sub> | 100 <sup>a</sup>       | 66.7±1.04 <sup>b</sup>  | 0 <sup>c</sup>          |
| Nc+Fungicide          | 66.7±0.09 <sup>c</sup> | 33.4±0.58 <sup>c</sup>  | 33.4±0.77 <sup>a</sup>  |

\*The tested treatments were arranged with six treatments and three replications (each replication consisted of two seedlings). \*\*Different letters represent significant changes.



شکل ۱۰. مقایسه اثر جدایه *Ba15* بر کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی ریشه خیار با عامل *Neocosmospora cucurbitae* (Nc) در گلخانه. : (A) نمای بالای گلدان‌ها شامل تیمار شاهد آلوده (Nc)، تیمار با جدایه *Ba15* و شاهد سالم (Ctrl)؛ (B) نمای جانبی از همان تیمارها جهت مقایسه شدت علائم بیماری و رشد گیاهچه‌ها؛ (C) مقایسه وضعیت ریشه‌ها در تیمارهای مختلف که کاهش پوسیدگی ریشه در تیمار *Ba15* را نسبت به شاهد آلوده نشان می‌دهد.

**Fig 10. Evaluation of the effect of *Bacillus* sp. isolate Ba15 on the reduction of cucumber Fusarium wilt caused by *Neocosmospora cucurbitae* (Nc) under the greenhouse experiment. (A) Top view of pots showing the infected control (Nc), the Ba15-treated plant, and the healthy control (Ctrl); (B) Side view of the same treatments for comparison of disease symptoms and seedlings growth; (C) Root comparison among treatments, showing reduction of root rot in the Ba15 treatment compared to the infected control.**

جدول ۲. اثر جدایه‌های آنتاگونیست منتخب *Bacillus* روی ویژگی‌های رشدی خیار رقم ناگین ۷۹۲ آلوده به بیمارگر (*Neocosmospora*)

(*cucurbitae*) در مقایسه با شاهد آلوده، سالم و تیمار شیمیایی (ایپریدین-کاربندازیم)

**Table 2. The effect of selected antagonistic *Bacillus* isolates on cucumber cv. Nagene 792 growth parameters infected with *Neocosmospora cucurbitae*, compared with infected control, healthy control, and chemical treatment (iprodione-carbendazim).**

| Treatment        | Shoot                    | Shoot fresh                | Shoot dry                 | Root length(cm)          |                           |                           |
|------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                  | length(cm)               | weight(gr)                 | weight(gr)                |                          | Root fresh weight(gr)     | Root dry weight(gr)       |
| Healthy control  | 23.0 ± 1.2 <sup>a*</sup> | 15.2 ± 1.5 <sup>a</sup>    | 2.1 ± 0.2 <sup>a</sup>    | 18.5 ± 1.0 <sup>a</sup>  | 2.8 ± 0.3 <sup>a</sup>    | 0.45 ± 0.05 <sup>a</sup>  |
| Infected control | 14.0 ± 1.0 <sup>d</sup>  | 8.0 ± 0.9 <sup>e</sup>     | 1.0 ± 0.1 <sup>e</sup>    | 9.0 ± 0.8 <sup>e</sup>   | 1.2 ± 0.2 <sup>f</sup>    | 0.20 ± 0.03 <sup>e</sup>  |
| NC + Ba15        | 19.0 ± 1.0 <sup>b</sup>  | 12.0 ± 1.3 <sup>bc</sup>   | 1.8 ± 0.2 <sup>bc</sup>   | 14.0 ± 1.2 <sup>c</sup>  | 2.2 ± 0.3 <sup>c</sup>    | 0.38 ± 0.05 <sup>bc</sup> |
| NC + Ba19        | 24.5 ± 1.3 <sup>a</sup>  | 14.0 ± 1.5 <sup>ab</sup>   | 2.0 ± 0.2 <sup>ab</sup>   | 16.0 ± 1.5 <sup>b</sup>  | 2.5 ± 0.3 <sup>b</sup>    | 0.42 ± 0.05 <sup>ab</sup> |
| NC + TR11        | 15.0 ± 0.9 <sup>cd</sup> | 10.5 ± 1.2 <sup>cd</sup>   | 1.5 ± 0.2 <sup>cd</sup>   | 12.0 ± 1.0 <sup>d</sup>  | 1.8 ± 0.2 <sup>d</sup>    | 0.42 ± 0.05 <sup>ab</sup> |
| NC+Fungicide     | 17.0 ± 1.1 <sup>c</sup>  | 14.58 ± 1.29 <sup>ab</sup> | 2.09 ± 1.06 <sup>ab</sup> | 9.5 ± 2.12 <sup>ab</sup> | 1.96 ± 0.08 <sup>ab</sup> | 0.30 ± 0.04 <sup>cd</sup> |

\*In this assay, the mean and standard error of at least six measurements is reported. Different letters represent significant changes

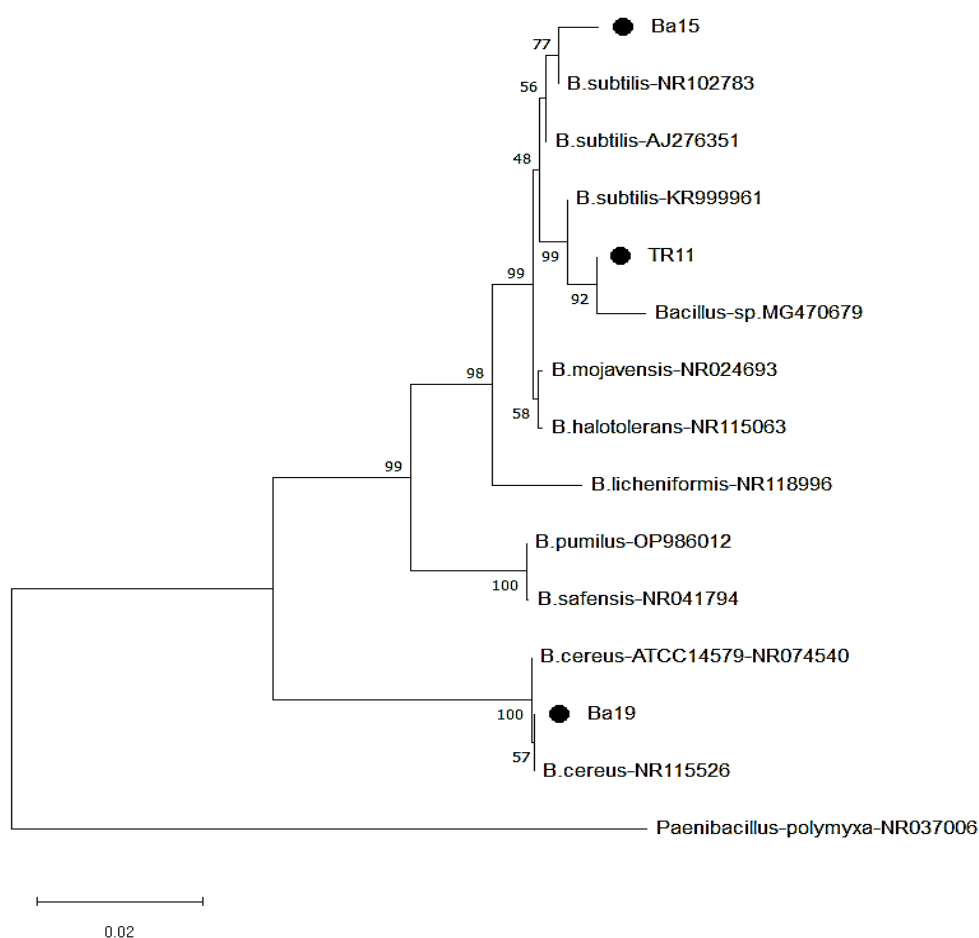
کلاستر قرار گرفت. جدایه‌های Ba15 و TR11 در کمپلکس گونه‌های *B.*

*Bacillus sp.* در نظر گرفته شدند (شکل ۱۱).

شناسایی مولکولی جدایه‌های *Bacillus* منتخب

در این مطالعه، براساس نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی ناحیه

16S rRNA جدایه‌ی Ba19 در کنار جدایه‌های استاندارد *B. cereus* در یک



شکل ۱۱- درخت فیلوژنتیکی مربوط به ژن 16SrRNA جدایه‌های *Bacillus* بازدارنده از رشد بیمارگر *Neocosmospora cucurbitae* به روش Neighbor-joining با اعتبارسنجی ۱۰۰۰. اعداد در محل‌های انشعاب نشان‌دهنده ضریب اطمینان درستی شاخه‌بندی برحسب درصد هستند. جدایه‌های مورد مطالعه با دایره توپر نشان داده شده است.

**Fig 11.** Phylogenetic tree of *Bacillus* isolates inhibiting the growth of the pathogen *Neocosmospora cucurbitae* constructed using the neighbor-joining method based on the 16SrRNA sequence with 1000 bootstrap replicates. The numbers at the branching points indicate the bootstrap confidence values (in percentage). Solid circles indicate the studied strains.

*Neocosmospora cucurbitae* (Nc) در شرایط آزمایشگاهی هستند.

جدایه‌ی منتخب Ba15 در کشت متقابل، تولید مواد غیرفرار و فرار به ترتیب ۷۶/۹۲٪، ۹۶/۳۹٪ و ۷۳/۱۱٪ مهار رشد قارچ Nc را موجب گردید. در تیمار Ba19، میزان بازدارندگی از رشد Nc درآزمون بررسی ترکیبات غیرفرار (۸۴/۹۳٪) در مقایسه با مواد فرار (۵۱/۳۴٪) باکتری بیشتر می‌باشد. همچنین،

## بحث

براساس نتایج سه آزمون کشت متقابل، تولید ترکیبات فرار و غیرفرار ضدقارچی در شرایط تشک‌های پتری، جدایه‌های منتخب *Bacillus* مطالعه‌ی حاضر به واسطه تولید متابولیت‌های ثانویه فرار و غیرفرار، قادر به کنترل

کارایی جدایه های *Bacillus* در تولید ترکیبات فرار در شرایط خاک و ممانعت از رشد بیمارگر NC متفاوت بود. جدایه‌های Ba1، Ba5، و Ba19 در شرایط خاک، بیش از ۷۰ درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر NC را نشان دادند. این تفاوت‌ها احتمالاً ناشی از عوامل متعددی مانند اختلاف در توانایی ذاتی هر جدایه در تولید ترکیبات فرار، تأثیر محیط خاک بر متابولیسم باکتری و امکان برهمکنش ترکیبات فرار با ذرات خاک است. البته با توجه به اینکه، محیط طبیعی خاک محل فعالیت سایر میکروارگانیسم نیز می‌باشد، سایر تعاملات نیز در این برهمکنش موثر است (Grahovac et al., 2023). در پاتوسیستم گیاهان کلزا، سویا - *Sclerotinia sclerotiorum*، ترکیبات فرار تولیدی توسط باکتریهای بازدارنده زیستی، رشد میسلیوم و جوانه‌زنی اسکروت قارچ بیمارگر را در شرایط خاک سرکوب نمودند (Fernando et al., 2005). ترکیبات فرار باکتری *B. halotolerans* نیز به‌طور قابل توجهی مانع رشد میسلیومی قارچ‌های بیمارگر مانند *F. graminearum* و *F. oxysporum* شده‌اند (Wang et al., 2024).

همچنین، محلول رونشین سه جدایه‌ی ذکر شده، بازدارندگی بالایی (بیش از ۶۰ درصد) در برابر قارچ NC نشان دادند. به‌نظر می‌رسد ترکیبات حاضر در محلول رونشین با تأثیر بر پیوستگی ساختاری دیواره سلولی، کمک به تخریب میسلیوم قارچ و غیرفعال کردن آنزیم‌های تجزیه‌کننده و زهرابه‌های گیاهی تولیدشده توسط قارچ بیمارگر، فعالیت قارچ را مهار کنند (Admassie et al., 2022). محلول رونشین باکتری *B. velezensis* A4 بازدارندگی قابل توجهی (بسته به غلظت) در برابر قارچ *Botrytis cinerea* نشان می‌دهد. متابولیت‌های موجود در رونشین این باکتری، با مهار جوانه‌زنی اسپورها و جلوگیری از رشد میسلیوم، موجب اختلال در چرخه‌ی زندگی بیمارگر می‌شوند. همچنین، این ترکیبات با تخریب ساختار دیواره سلولی قارچ و ایجاد آسیب اکسیداتیو ناشی از تجمع گونه‌های اکسیژن فعال، به سلول‌های قارچی آسیب می‌رسانند. از سوی دیگر، با کاهش بیان ژن‌های کلیدی مرتبط با

در تعامل جدایه‌ی TR11 با بیمارگر NC، رقابت رشدی باکتری آنتاگونیست در کشت متقابل، بازدارندگی بالاتری (۸۰/۲۵٪) را در مقایسه با بازدارندگی حاصل از ترکیبات فرار (۴۱/۸۲٪) و غیرفرار (۵۰/۶٪) باکتری نشان داد. اثرات بازدارندگی ترکیبات معمول فرار ضدقارچی *Bacillus* شامل کتون‌ها، الکل‌ها، اسیدهای کوتاه‌زنجیر، بنزوتیازول‌ها و ترکیبات گوگردی در سرکوب رشد بیمارگرهای قارچی گزارش شده است (Grahovac et al., 2023). متابولیت‌های ضدقارچی جدایه‌های *B. cereus* و *B. amyloliquefaciens* مکانیسم اصلی مهارزیستی عامل پژمردگی فوزاریومی کدویان معرفی شده است (Shanthi & Vittal, 2013). ترکیبات مؤثر تولیدی باکتری *B. mycooides* با مهار رشد قارچ *Fusarium oxysporum* در شرایط آزمایشگاهی و همچنین کاهش مرگ‌ومیر گیاهان در گلخانه، بازدارندگی خود را نشان داده است (Esmaeilzadeh-Hosseini, 2023). ترکیب فرار 6-methyl-2-heptanone به عنوان ماده شیمیایی فعال اصلی (۲۲/۲۷ درصد) تولیدشده توسط باکتری *B. subtilis* ZD01، باعث ایجاد ناهنجاری گسترده‌ای در سلول‌های هیف قارچ و کاهش قدرت جوانه‌زنی اسپورهای *Alternaria solani* شده است (Zhang et al., 2022). در برهمکنش‌های بین گیاه-بیمارگر قارچی، ترکیبات فرار *Bacillus* با سازوکارهای ممانعت از ورود قارچ به واسطه روزه‌ها، تخریب ساختارهای سلولی قارچ، اختلال در متابولیسم بیمارگر، سرکوب بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و فعال‌سازی مسیر مقاومت القایی سیستمیک در میزبان نقش آفرینی می‌کنند (Grahovac et al., 2023). در مطالعه‌ی حاضر، ترکیبات فرار جدایه‌های Ba15 و Ba19 مهار رشد NC را باعث شدند. احتمالاً این جدایه‌ها دارای مجموعه ترکیبات غنی از مواد فرار ضدقارچی هستند که می‌توانند منجر به آسیب چندگانه به قارچ شامل تخریب ساختاری میسلیوم، کاهش جوانه‌زنی و تضعیف ویژگی‌های بیماری‌زایی شوند.

*F. oxysporum* و *F. commune*، *graminearum* جلوگیری می‌کنند (Wang et al., 2024). گونه *B. amyloliquefaciens* در برهمکنش با قارچ بیمارگر *F. oxysporum*، الگوی انتشار مواد فرار خود را تغییر داده که می‌تواند به عنوان یک راهکار دفاعی هدفمند عمل نماید (Stocki et al., 2025). بر اساس نتایج آزمون گلخانه‌ای مطالعه حاضر، جدایه‌ی منتخب Ba15 از نظر شاخص شدت بیماری و راندمان کنترل بیمارگر *N. cucurbitae* مشابه با تیمار قارچکش اپیرییدیون-کاربندازیم عمل نموده است.

جدایه‌های باکتری‌های مفید جنس *Bacillus* علاوه بر توانایی مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی، نقش بهبوددهنده رشد میزبان گیاهی را نیز دارند. باکتری *B. velezensis* F9 علاوه بر مهار بیماری پژمردگی خیار، تأثیر قابل توجهی در بهبود شاخص‌های رشدی این گیاه نشان داده است. این باکتری با تولید ترکیبات مختلف از جمله اکسین، سیدروفور و نیز توانایی تثبیت نیتروژن، موجب تحریک رشد گیاه خیار شده است. نتایج آزمایش‌ها حاکی از آن است که کاربرد این جدایه‌ی باکتری منجر به افزایش ۲۰ تا ۶۰ درصدی ارتفاع گیاه، ۴۰ تا ۷۵ درصدی وزن تر و ۲۲ تا ۵۲ درصدی وزن خشک در مقایسه با گیاهان آلوده شده است. (Ta et al., 2024). در بررسی حاضر، در میان جدایه‌های منتخب استفاده‌شده برای گلخانه جدایه‌ی Ba19 موجب افزایش مشخص طول ساقه (۸/۴۲٪) و ریشه (۷/۴۳٪) خیار نسبت به شاهد آلوده گردید. این اثر می‌تواند ناشی از توانایی این باکتری در تولید شبه‌هورمون‌های گیاهی مانند اکسین و سیتوکینین باشد که در ایجاد سیستم ریشه‌ای با ساختار مناسب نقش دارد (Kilian et al., 2000). این ترکیبات با تحریک توسعه سیستم ریشه، جایگزینی ریشه‌های آسیب‌دیده و بهبود جذب آب و مواد مغذی، به افزایش رشد گیاه و وزن خشک آن منجر می‌شوند. از طرفی، باکتری‌های مفید با بهبود جذب عناصر، کارایی فتوسنتز را افزایش داده و در

بیماریزایی، توانایی قارچ در ایجاد آلودگی را تضعیف می‌کنند (Zhao et al., 2022).

لیپوپپتیدهای تولیدشده توسط *B. subtilis* مانند ایتورین، فنجیسین و سورفکتین توانایی ایجاد تغییرات ساختاری مشخصی را در FSSC دارند. این ترکیبات طبیعی با سازوکارهای چندگانه، بر ریخت‌شناسی و عملکرد قارچ تأثیر گذاشته و موجب بروز تغییرات بارزی در ساختار میسلیم‌های قارچی (کوتاه شدن قابل توجه میسلیم‌ها و ایجاد انشعاب‌های غیرطبیعی) شده که در نهایت به اختلال اساسی در رشد و گسترش کلنی قارچ منجر می‌شوند (Santos-Lima et al., 2023). متابولیت‌های تولیدشده توسط باکتری *B. amyloliquefaciens* جدایه BA-4 موجب ناهنجاری‌هایی از جمله تورم غیرعادی، تحلیل رفتن و انشعابات غیرطبیعی در میسلیم‌های *Fusarium* sp. شده‌اند (B. Li et al., 2024). همچنین، تولیدات جدایه *B. subtilis* V26 در تعامل با میسلیم‌های قارچ *Rhizoctonia solani* باعث واکنش‌شدن و نشت پروتوپلاست، قطعه‌قطعه شدن میسلیم و تخریب دیواره سلولی آن شده است (Khedher et al., 2015). تولیدات دو جدایه‌ی منتخب Ba15 و Ba19 نیز مطابق با منابع در ریخت‌شناسی میسلیم‌قارچ Nc اثر داشته و انعقاد سیتوپلاسمی و قطعه‌قطعه‌شدن میسلیم را موجب شدند.

جدایه‌های گونه‌های مختلف جنس *Bacillus*، گزینه مناسبی برای کنترل بیماری‌های ریشه‌ای با سازوکار چندگانه در شرایط گلخانه می‌باشند (Cruz-Magalhães et al., 2022). ترشح متابولیت‌های ثانویه ضد قارچی (آنزیم‌های هیدرولیتیک و آنتی‌بیوتیک‌های لیپوپپتیدی) توسط اعضای کلاستر *B. subtilis* می‌تواند عامل مهار مستقیم بیمارگر *F. solani* باشد (Rafiee et al., 2025). علاوه بر این، عوامل بازدارنده زیستی نیز توانایی تولید ترکیبات فرار معدنی و آلی مختلفی را برای تعامل با گیاهان و میکروارگانیسم‌های اطراف خود را دارند. ترکیبات فرار باکتری *B. halotolerans* به‌طور قابل توجهی از رشد میسلیمی قارچ‌های بیمارگر *F.*

پوسیدگی فوزاریومی ریشه خیار با عامل *N. cucurbitae* در مقیاس مزرعه جهت اعتبارسنجی نتایج حاضر، مورد بررسی قرار گیرند.

### تعارض منافع

در انجام مطالعه حاضر، هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

### موازین اخلاقی

در انجام این پژوهش تمامی موازین و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.

### تشکر و قدردانی

نگارندگان از دانشگاه فردوسی مشهد به خاطر حمایت مالی این پروژه با

کد ۳/۵۹۴۸۸ قدردانی مینمایند.

نهایت، عملکرد گیاه را در شرایط تنش بیماری، به‌طور غیرمستقیم ارتقا می‌دهد (C. Li et al., 2024).

با توجه به ماندگاری بیمارگر قارچی *N. cucurbitae* در خاک و محدودیت‌های روش‌های شیمیایی، به‌کارگیری راهبردهای مدیریت تلفیقی شامل استفاده از جدایه‌های *Bacillus* با فعالیت آنتاگونیستی و محرک رشد، در کنار روشهای بهداشت زراعی و بهبود شرایط کشت، می‌تواند رویکردی مؤثر و پایدار برای کاهش خسارت این بیماری باشد. با توجه به یافته‌های تحقیق حاضر، جدایه‌های *Bacillus sp. Ba15* با سازوکار مهارزیستی (متابولیت‌های ثانویه فرار و غیر فرار) و *Bacillus cereus Ba19* با سازوکار ارتقای رشد گیاه، می‌توانند به‌عنوان گزینه‌های مناسب برای کاهش بیماری

## References

- Admassie, M., Woldehawariat, Y., & Alemu, T. (2022). In vitro evaluation of extracellular enzyme activity and its biocontrol efficacy of bacterial isolates from pepper plants for the management of *Phytophthora capsici*. *BioMed Research International*, 1-12. [Link]
- Alymanesh, M. R., Falahatirastegar, M., Jafarpour, B., & Mahdikhanimoghadam, E. (2009). Genetic diversity in the fungus *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* race 1, the causal agent of root and crown rot of cucurbits in Iran, using molecular markers. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12, 836-843. [Link]
- Armengol, J., José, C., Moya, M., Júnior, R., Vicent, A., & García-Jiménez, J. (2008). *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* Race 1, a potential pathogen of grafted watermelon production in Spain. *EPPO Bulletin*, 38(2), 184-190. [Link]
- Borrero, C., Ordovás, J., Trillas, M. I., & Avilés, M. (2006). Tomato *Fusarium* wilt suppressiveness. The relationship between the organic plant growth media and their microbial communities as characterized by Biolog. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7), 1631-1637. [Link]
- Chehri, K., Salleh, B., Yli-Mattila, T., Reddy, K. R. N., & Abbasi, S. (2011). Molecular characterization of pathogenic *Fusarium* species in cucurbit plants from Kermanshah province, Iran. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 341-351. [Link]
- Cruz-Magalhães, V., Guimarães, R. A., Da Silva, J. C., De Faria, A. F., Pedroso, M. P., Campos, V. P., Marbach, P. A., de Medeiros, F. H., & De Souza, J. T. (2022). The combination of two *Bacillus* strains suppresses *Meloidogyne incognita* and fungal pathogens, but does not enhance plant growth. *Pest Management Science*, 78(2), 722-732. [Link]
- Du, J., Gao, Q., Ji, C., Song, X., Liu, Y., Li, H., & Liu, X. (2022). *Bacillus licheniformis* JF22 to control *Meloidogyne incognita* and its effect on tomato rhizosphere microbial community. *Frontiers in Microbiology*, 13, 863341. [Link]
- El-Sharkawy, E. E., & Abdelrazik, E. (2022). Biocontrol of *Fusarium* root rot in squash using mycorrhizal fungi and antagonistic microorganisms. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 32(1), 13. [Link]
- Esmailzadeh-Hosseini, S. A. (2023). The effect of *Bacillus mycooides* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*, the causal agent of root and stem rot of greenhouse cucumber. *Persian Journal*, 12(1), 1-10.
- Fernando, W. D., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S., & Savchuk, S. C. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), 955-964. [Link]
- Grahovac, J., Pajčin, I., & Vlajkov, V. (2023). *Bacillus* VOCs in the context of biological control. *Antibiotics*, 12(3), 581. [Link]
- Haas, D., & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *Pseudomonads*. *Nature Reviews Microbiology*, 3(4), 307-319. [Link]
- Khedher, S. B., Kilani-Feki, O., Dammak, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Remadi, M., & Tounsi, S. (2015). Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. *Comptes Rendus Biologies*, 338(12), 784-792. [Link]
- Kilian, M., Steiner, U., Krebs, B., Junge, H., Schmiereknecht, G., & Hain, R. (2000). FZB24® *Bacillus subtilis* - mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, 1(00), 1.
- Kim, Y. G., Kang, H. K., Kwon, K. D., Seo, C. H., Lee, H. B., & Park, Y. (2015). Antagonistic activities of novel peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* PT14 against *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(48), 10380-10387. [Link]

- Krasnow, C. S., Bhatta, U., Raphael, G., Quesada-Ocampo, L. M., & Ziv, C. (2024). A Diagnostic Guide for Fusarium Fruit Rot of Pumpkin and Winter Squash. *Plant Health Progress*, 25(4), 527-535. [Link]
- Kraus, J., & Loper, J. E. (1991). Biocontrol of Pythium damping-off of cucumber by *Pseudomonas fluorescens* PF-5: mechanistic studies [pyoluteorin, pyoverdine, siderophore]. *Bulletin OILB SROP*, 14(7), 1-10.
- Li, B., He, X., Guo, S., Li, D., Wang, Y., Meng, X., Dai, P., Hu, T., Cao, K., & Wang, S. (2024). Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* BA-4 and its biocontrol potential against Fusarium-related apple replant disease. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1370440. [Link]
- Li, C., Zeng, Q., Han, Y., Zhou, X., & Xu, H. (2024). Effects of *Bacillus subtilis* on cucumber seedling growth and photosynthetic system under different potassium ion levels. *Biology*, 13(5), 348. [Link]
- Pan, D., Mionetto, A., Tiscornia, S., & Bettucci, L. (2015). Endophytic bacteria from wheat grain as biocontrol agents of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol production in wheat. *Mycotoxin Research*, 31(3), 137-143. [Link]
- Pérez-Hernández, A., Rocha, L. O., Porcel-Rodríguez, E., Summerell, B. A., Liew, E. C., & Gómez-Vázquez, J. M. (2020). Pathogenic, morphological, and phylogenetic characterization of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* isolates from cucurbits in Almería Province, Spain. *Plant Disease*, 104(5), 1465-1476. [Link]
- Qiao, J., Zhang, R., Liu, Y., & Liu, Y. (2023). Evaluation of the Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* Wettable Powder on Pepper Root Rot Caused by *Fusarium solani*. *Pathogens*, 12(2), 225. [Link]
- Rafiee, F., Shahbazi, S., & Ramezani, R. (2025). Isolation and Identification of Native *Bacillus subtilis* Strains from Soil for Biocontrol of *Fusarium solani*-Induced Fungal Diseases. *Industrial Biotechnology*, 21(1), 73-80. [Link]
- Rezaee, S., Gharanjik, S., & Mojerlou, S. (2018). Identification of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races using morphological and molecular approaches. *Journal of Crop Protection*, 7(2), 161-170. [Link]
- Sabahi, F., Banihashemi, Z., Mirtalebi, M., Rep, M., & Cacciola, S. O. (2023). Molecular variability of the *Fusarium solani* species complex associated with *Fusarium* wilt of melon in Iran. *Journal of Fungi*, 9, 486. [Link]
- Sandoval-Denis, M., Lombard, L., & Crous, P. W. (2019). Back to the roots: A reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia*, 43, 90-185. [Link]
- Santos-Lima, D., de Castro Spadari, C., de Moraes Barroso, V., Carvalho, J. C. S., de Almeida, L. C., Alcalde, F. S. C., Ferreira, M. J. P., Sannomiya, M., & Ishida, K. (2023). Lipopeptides from an isolate of *Bacillus subtilis* complex have inhibitory and antibiofilm effects on *Fusarium solani*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(19), 6103-6120. [Link]
- Shanthi, A. T., & Vittal, R. R. (2013). Biocontrol potentials of plant growth promoting rhizobacteria against *Fusarium* wilt disease of cucurbit. *International Journal of Phytopathology*, 2(3), 155-161. [Link]
- Stocki, M., Stocka, N., Borowik, P., Dudzińska, M., Staszowska, A., Okorski, A., & Oszako, T. (2025). Use of Volatile Organic Compounds Produced by *Bacillus* Bacteria for the Biological Control of *Fusarium oxysporum*. *Forests*, 16(8), 1220. [Link]
- Wang, Y., Sun, Z., Zhao, Q., Yang, X., Li, Y., Zhou, H., Zhao, M., & Zheng, H. (2024). Whole-genome analysis revealed the growth-promoting and biological control mechanism of the endophytic bacterial strain *Bacillus halotolerans* Q2H2, with strong antagonistic activity in potato plants. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1287921. [Link]
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173(2), 697-703. [Link]
- Xu, W., Yang, Q., Yang, F., Xie, X., Goodwin, P. H., Deng, X., & Yang, L. (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. [Link]
- Zhang, D., Qiang, R., Zhao, J., Zhang, J., Cheng, J., Zhao, D., Fan, Y., Yang, Z., & Zhu, J. (2022). Mechanism of a Volatile Organic Compound (6-Methyl-2-Heptanone) Emitted from *Bacillus subtilis* ZD01 Against *Alternaria solani* in Potato. *Frontiers in Microbiology*, 12, 808337. [Link]