

اثر دو جدایه‌ی *Pseudomonas fluorescens* تولیدکننده‌ی DAPG در مه‌ار پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی خیار با عامل *Phytophthora drechsleri*

رباب اعزازی^۱، اکبر شیرزاد^۲، مسعود احمدزاده^۱

۱- پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۲- گروه بیماری‌شناسی، دانشگاه شهید مدنی (آذربایجان)، تبریز

مسئول مکاتبات: مسعود احمدزاده، پست الکترونیک: ahmadz@ut.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۰۴

۴۵-۵۶ (۱)

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۰۱

چکیده

Phytophthora drechsleri یکی از بیمارگرهای خاکزاد مهم در ایران محسوب می‌شود که منجر به بروز بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه روی خیار می‌شود. اخیراً مه‌ار زیستی این بیماری به‌وسیله ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه از جمله سودومونادهای فلورسنت به‌عنوان روش جایگزین برای قارچ‌کش‌های شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است. در پژوهش حاضر اثر آنتاگونیستی دو جدایه از *Pseudomonas fluorescens* (F117 و F133) تولیدکننده‌ی آنتی‌بیوتیک DAPG علیه بیمارگر *P. drechsleri* در شرایط آزمایشگاه با روش‌های مختلف و همچنین در گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه‌های مورد استفاده با دارا بودن مکانیسم‌های بیوکنترلی متعدد از قبیل آنتی‌بیوز، تولید سیدروفور، سیانید هیدروژن و همچنین تولید آنزیم‌های پروتاز، لپاز و حل‌کننده فسفات، به‌صورت مطلوبی توانستند در شرایط گلخانه و آزمایشگاه، بیماری یادشده را کنترل کنند.

واژه‌های کلیدی: بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی خیار، سودومونادهای فلورسنت، مه‌ار زیستی

مقدمه

(Lamour & Hausbeck, 2000). ارقام مقاوم خیار به این بیماری هنوز در دسترس نیست (Maleki et al., 2011; Shirzad et al., 2012). روش‌هایی از قبیل کاشت در روی پشته، مدیریت رطوبت مزرعه، استفاده از مالچ کاه، کاشت ارقام متحمل و استفاده از بعضی قارچ‌کش‌ها برای مبارزه با این بیماری مطرح هستند (Hwang & Kim, 1995). مصرف قارچ‌کش‌های سیستمیک برای کنترل این بیماری چندان کارساز نبوده و ضمن آلودگی محیط زیست، بروز مقاومت را نیز به‌دنبال دارد (Lamour & Hausbeck, 2000). به‌طور کلی کنترل این بیماری مشکل است و روش قطعی برای کنترل آن وجود ندارد (Hwang & Kim, 1995; Ristaino & Johnston, 1999). میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیه‌ی فراریشه زندگی می‌کنند گزینه‌ای مناسب برای استفاده در برنامه‌های مه‌ار زیستی هستند، زیرا فراریشه اولین خط دفاعی ریشه علیه بیمارگرهای خاکزی می‌باشد

پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه و طوقه یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های خیار در سراسر دنیا محسوب می‌شود (Erwin & Ribeiro, 1996; Ristaino & Johnston, 1999). *Phytophthora capsici* عامل اصلی این بیماری در دنیا محسوب می‌شود، در حالی که در ایران گونه‌ی *Phytophthora drechsleri* Tucker به‌عنوان عامل اصلی این بیماری شناخته شده است (Alavi & Strange, 1979; Mansoori & Banihashemi, 1982). عامل بیماری در خیار باعث گیاهچه‌میری، پوسیدگی ریشه و طوقه و در موارد شدید سبب ایجاد زخم روی ساقه، بلایت برگ و پوسیدگی میوه می‌شود (Alavi & Strange, 1982; Kreutzer et al., 1940). این بیمارگر، گیاهان حساس را در طول فصل رشدی مورد حمله قرار می‌دهد و زمستان را به‌صورت اسپور غیرفعال سپری می‌کند

کوتاه مدت، چند لوپ از باکتری رشد یافته بر روی محیط آگار مغذی به درون لوله‌های سرپوش دار حاوی پنج میلی‌لیتر محلول سولفات منیزیم یک دهم مولار منتقل گردید، لوله‌ها در یخچال ۴ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند (Weller & Cook, 1983).

تهیه و نگهداری بیمارگر

P. drechsleri 2 از آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران دریافت شد (Ghafelebashi et al., 2014)؛ برای نگهداری، چند قرص میسیلیومی از کشت تازه بیمارگر در لوله شیشه‌ای حاوی آب مقطر سترون قرار داده شده و پس از مسدود کردن درب لوله با پارافیم، لوله‌ها در یخچال نگهداری شدند (Ershad, 1992).

ردیابی ژن *phlD* با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

پس از استخراج DNA مطابق روش Wang و همکاران (2001)، واکنش PCR با استفاده از آغازگر مستقیم BPF2 (5'-ACCCACCGCAGCATCGTTTATGAGC-3') و آغازگر معکوس (5'-BPR4 CCGCCGGTATGGAAGATGAAAAAGTC-3') استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل TGRADIENT انجام گرفت. واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر بافر PCR (10X)، ۱/۲ میکرولیتر $MgCl_2$ ۲۵ میلی‌مول، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر ۱۰ پیکومول، ۰/۳ واحد از محلول *Taq* DNA Polymerase، ۰/۴ میکرولیتر *dntp*s ۱۰ میلی‌مولار و ۴ میکرولیتر DNA الگو در ۱۰/۱ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. برنامه حرارتی PCR به صورت یک چرخه واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت سه دقیقه و سپس ۳۵ چرخه با برنامه ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس، ۶۰ ثانیه در ۵۵ درجه‌ی سلسیوس و ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس، و در پایان یک چرخه ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت (McSpadden Gardener et al., 2001). محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد حاوی ۲ میکرولیتر محلول اتیدیوم بروماید به مدت ۶۰ دقیقه با ولتاژ ۷۵ ولت

(Weller, 1988). فراریشه غنی از عوامل میکروبی است و ریزوباکتری‌های کلنیزه کننده ریشه نقش برجسته‌ای در این مکان دارند (Schipper et al., 1987).

در میان باکتری‌های پروبیوتیک، باکتری‌های متعلق به دو جنس *Pseudomonas* و *Bacillus* از مهم‌ترین آنتاگونیست‌های بیمارگرهای گیاهی شناخته شده‌اند؛ سودومونادهای فلورسنت به دلایلی از قبیل تنوع تغذیه‌ای و اکولوژیکی بالا، استفاده از نیترات در شرایط کمبود اکسیژن، رشد سریع، کشت راحت و امکان دستکاری ژنتیکی آن‌ها در آزمایشگاه از عوامل مناسب برای آزمایش‌های مهار زیستی محسوب می‌شوند (Haas & Défago, 2005). هم‌چنین این گروه از میکروارگانسیم‌ها با دارا بودن قدرت رقابت بالا، تولید انواع آنتی‌بیوتیک‌ها و متابولیت‌هایی از قبیل ترکیبات کلاته کننده‌ی آهن (سیدروفور) و توانایی زیاد در تسخیر فراریشه بیشترین جمعیت میکروفلور خاک را تشکیل می‌دهند و سازگاری زیادی با شرایط فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی خاک دارند (De Wager et al., 1995; Marillery & Arango, 1990). با توجه به اهمیت بیماری مذکور و پتانسیل بالای سودومونادهای فلورسنت در مهار زیستی بیماری‌های گیاهی، در تحقیق حاضر توانایی کنترل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه‌ی خیار به وسیله دو جدایه از *Pseudomonas fluorescens* همراه با شناخت مکانیسم‌های مؤثر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه و نگهداری جدایه‌های بیوکنترل

جدایه‌های *P. fluorescens* F133 و *P. fluorescens* F117، از آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان دریافت شد. به منظور نگهداری بلند مدت، کشت ۱۶ تا ۲۴ ساعته در محیط NB به نسبت حجمی مساوی با گلیسرین (۸۷ درصد) سترون در درون ویال‌های اپندورف سترون مخلوط شده و در فریزر $20^{\circ}C$ - نگهداری شدند (McSpadden Gardener et al., 2000)، برای نگهداری

هاله‌ی نارنجی ایجاد شده در اطراف کلونی باکتری در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد (Alexander & Zuberer, 1991). برای اندازه‌گیری کمی میزان سیدروفور از روش اسپکتروفتومتری Csataneda و همکاران (2005) استفاده شد (Csataneda et al., 2005).

سیانید هیدروژن (HCN): از محیط TSB (Tryptic Soy Broth) حاوی ۴/۴ گرم گلایسین در هر لیتر محیط و کاغذ صافی آغشته به محلول معرف شامل اسید پیکریک ۰/۵٪ و کربنات سدیم ۲٪ استفاده شد. جمعیت یکسانی از هر جدایه در هر تشتک پتری کشت داده شد و پس از قرار دادن کاغذ صافی در قسمت داخلی درب تشتک‌های پتری با نوار پارافیلیم مسدود شدند. ۴۸ ساعت بعد از نگهداری به صورت وارونه در انکوباتور توانایی تولید سیانید هیدروژن از روی شدت تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به ارزیابی شد (Alstrom & Burns, 1989).

تولید پروتئاز: به منظور بررسی توانایی تولید آنزیم پروتئاز در جدایه‌های مورد آزمایش مطابق روش Maurhofer و همکاران (1995) از محیط SMA (Skim Milk Agar) و کشت نقطه‌ای باکتری‌ها روی این محیط استفاده شد؛ تشکیل هاله بی‌رنگ در اطراف کلونی باکتری‌ها نشانه فعالیت پروتئاز آن‌هاست (Maurhofer et al., 1995).

تولید لیپاز: محیطی شامل ۱۰ گرم پیتون، ۵ گرم کلرور سدیم، ۰/۱ گرم کلرور کلسیم، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب تهیه گردید. ۱۰ میلی‌لیتر توین ۸۰ را جداگانه سترون نموده، به محیط در حال سرد شدن قبل از توزیع در تشتک‌های پتری پتری‌دیش‌ها افزوده شد، سپس باکتری به صورت خطی در روی آن کشت داده شد. پس از ۴۸ ساعت وجود هاله رسوبی در اطراف کلونی باکتری، دلیل بر فعالیت لیپازی باکتری می‌باشد (Sierra, 1957).

بررسی توانایی انحلال فسفات معدنی: مطابق روش Sperber (1948) باکتری به صورت نقطه‌ای روی محیط کشت سترون (شامل ۱۰ گرم گلوکز، ۰/۵ گرم عصاره‌ی مخمر، ۰/۱ گرم کلرید کلسیم، ۰/۵ گرم فسفات کلسیم، ۰/۲۵ گرم سولفات منیزیم و ۱۵ گرم آگار) کشت داده شده

الکتروفورز و نتایج با استفاده از دستگاه Gel Documentation بررسی شد.

بررسی بازدارندگی از رشد *P. drechsleri* به وسیله‌ی جدایه‌های مورد استفاده

آزمون کشت متقابل (Dual culture) برای بررسی قدرت بازدارندگی جدایه‌ها از رشد بیمارگر در شرایط آزمایشگاه به روش Hagedorn و همکاران (1989) انجام شد (Hagedorn et al., 1989).

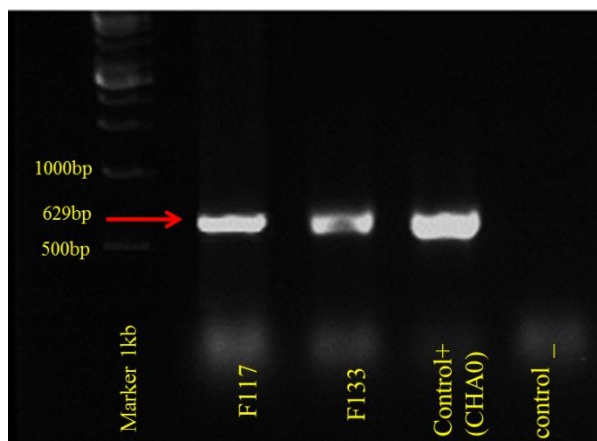
بررسی میزان بازدارندگی ترکیبات فرار و غیر فرار باکتری علیه *P. drechsleri* به ترتیب به روش پیشنهادی Fiddaman & Rossal (1993) و Kraus & Loper (1990) انجام شد. درصد کاهش رشد کلونی بیمارگر نسبت به شاهد، به عنوان معیاری جهت ارزیابی اثر ضد میکروبی مورد استفاده قرار گرفت.

تأثیر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های برون سلولی باکتری بر رشد میسیلیومی بیمارگر مطابق روش Teniola و همکاران (2005) با کمی تغییر به دست آمد. به طور خلاصه از کشت ۷۲ ساعته باکتری در محیط مایع NB، سلول‌های باکتری با استفاده از سانتریفوژ (۱۰۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه) از مایع رویی جدا شده و عصاره‌ی حاصل با عبور از فیلتر ۰/۲ میکرومتری سترون، فیلتر شد و در فالكون‌های سترون در یخچال نگهداری شدند. غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰٪ از عصاره برون سلولی حاصل در فلاسک‌های ارلن حاوی محیط کشت PDB تهیه شد. از سوی دیگر پنج دیسک میسیلیومی فعال به این محیط افزوده شد. پس از نگهداری به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس، میزان وزن میسیلیوم خشک اندازه‌گیری شد. در تیمار شاهد از آب مقطر استریل به جای عصاره‌ی باکتریایی استفاده شد (Teniola et al., 2005).

بررسی سایر مکانیسم‌های بیوکنترل توسط جدایه‌های باکتری

سیدروفور: برای بررسی تولید سیدروفور از محیط آبی‌رنگ (CAS) Chrome azurol-S مطابق روش Alexander & Zuberer (1991) استفاده شد. قطر

از ژن‌های مورد نیاز برای تولید آنتی‌بیوتیک ۴۰۲-دی‌اس-تیل‌فلوروگلوکوسینول (DAPG) (2,4-diacetylphloroglucinol) می‌باشد و به‌عنوان مارکر شناسایی سودومونادهای فلورسنت به کار می‌رود و حتی در تحقیقات فیلوژنتیکی نیز کاربرد دارد (McSpadden Gardener *et al.*, 2001).



شکل ۱- واکنش زنجیره‌ای پلیمرز جهت ردیابی ژن ستر کننده‌ی آنتی‌بیوتیک DAPG، تکثیر قطعه‌ای به طول ۶۲۹ جفت باز مربوط به ژن *phlD* در جدایه‌های F117 و F133 و همچنین در استرین CHA0 به‌عنوان شاهد مثبت.

Fig. 1. Polymerase chain reaction (PCR) tests for detection of gene involved in DAPG antibiotic production, amplification of 629-bp portion of *phlD* gene in F133 and F117 isolates and also in CHA0 strain as positive control.

بررسی بازدارندگی از رشد *P. drechsleri* به‌وسیله‌ی جدایه‌های مورد استفاده

در بررسی کشت متقابل، قدرت بازدارندگی هر یک از جدایه‌ها، بر اساس فاصله‌ای که بین حاشیه‌ی پرگنه باکتریایی و بیمارگر ایجاد شده بود، اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج جدول ۱ ($P < 0.264$) چنین استنباط می‌شود که دو جدایه از نظر میزان مهار بیمارگر تفاوتی نشان نمی‌دهند. اما از نظر اثر ضد میکروبی ترکیبات فرار در میزان کنترل *P. drechsleri*، نتایج این پژوهش، تفاوت معنی‌داری بین جدایه‌ها نشان داد ($P < 0.0001$)؛ جدایه F133 با ۵۳/۳۳٪، بازدارندگی بیشتری علیه بیمارگر نشان داد

و به انکوباتور منتقل شدند. پس از ۴۸ ساعت رویت هاله شفاف در اطراف کلونی باکتری نشان دهنده‌ی خاصیت حل‌کنندگی فسفات می‌باشد (Sperber, 1948).

بررسی تأثیر جدایه‌های مورد استفاده در کنترل *P. drechsleri* در شرایط گلخانه

به‌منظور بررسی کارایی جدایه‌ها در کنترل *P. drechsleri*، ابتدا بذور خیار رقم دومینوس ضد عفونی شده با محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ در گلدان‌های حاوی خاک سترون کاشته شد. مایه تلقیح بیمارگر با استفاده از لوبیای سفید سترون تهیه شد، همچنین مایه‌ی تلقیح باکتری نیز با جمعیت 1×10^8 CFU/ml آماده شده و پس از رسیدن گیاه به مرحله‌ی سه برگی، ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده پای هر گلدان ریخته شد، ۴۸ ساعت بعد مایه تلقیح بیمارگر با یک سوم خاک رویی مخلوط شد. آبیاری یک روز در میان انجام شد. پس از سه هفته درصد گیاهان سالم محاسبه شد (Shirzad *et al.*, 2012). این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با تیمارهای زیر انجام شد: شاهد غیر آلوده (فاقد زادمایه بیمارگر در گلدان)، شاهد آلوده (دارای زادمایه بیمارگر در گلدان) و دو تیمار مجزا شامل آغشته‌سازی خاک گلدان با سوسپانسیون جدایه‌های مورد استفاده همراه زادمایه بیمارگر.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS (V 16.0) انجام گرفت. به‌منظور مقایسه میانگین داده‌ها بعد از آزمون نرمال بودن داده‌ها و آزمون همگنی واریانس از آزمون تی مستقل استفاده شد.

نتایج

ردیابی ژن *phlD*: با استفاده از تکنیک PCR و با کمک دو آغازگر BPF2 و BPR4، قطعه DNA به‌طول تقریبی ۶۲۹ جفت باز از دسته ژنی *phlACBDEFGH* تکثیر شد؛ نتیجه ردیابی ژن نشان داد که دو جدایه‌ی *P. fluorescens* F117 و F133 و نیز استرین CHA0 *P. fluorescens* (شاهد مثبت) واجد این ژن هستند (شکل ۱). این ژن یکی

رشد بیمارگر جلوگیری کرد. در بررسی تأثیر ترکیبات غیرفرار جدایه‌ها پس از ۱۰ روز مطابق جدول ۲ مشخص شد که هر دو جدایه با تولید ترکیبات ضد میکروبی غیرفرار به‌طور کامل مانع از رشد *P. drechsleri* شده‌اند.

(جدول ۲). در بررسی تأثیر عصاره‌ی برون سلولی جدایه‌ها در جلوگیری از رشد میسلیومی بیمارگر بر اساس نتایج مندرج در جدول ۲ مشاهده شد که ترشحات مایع برون سلولی جدایه‌ها در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. drechsleri* در هر سه غلظت بسیار مؤثر بوده‌اند و عصاره‌ی برون سلولی هر دو جدایه در هر سه غلظت به‌طور کامل از

جدول ۱- آزمون تی مستقل مربوط به میزان بازدارندگی از رشد در شرایط *in vitro* (ترکیبات فرار و کشت متقابل) و گلخانه و همچنین تولید سیدروفور به‌وسیله‌ی دو جدایه F117 و F133.

Table 1. T independent test for growth inhibition *in vitro* (volatile metabolites and Dual culture assay) and greenhouse condition and also siderophore production by F117 and F133 isolates.

Type of variable	Levene's Test for Equality of Variances				t-test for Equality of Means		
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference
volatile metabolites	2.061	0.224	-79.865	4	0	-30.66**	0.389
Dual culture assay	0.003	0.96	-1.297	4	0.264	-2.29 ^{ns}	1.77
Greenhouse assay	0	1	3.491	4	0.025	2.85*	0.816
Average diameter of the orange halo (mm) in CAS medium	1.20	0.334	1.387	4	0.338	0.55 ^{ns}	0.4
pyoverdin production (Absorbance in 400nm)	0.098	0.77	-19.206	4	0	-0.14**	0.007

علامت **, * و ^{ns} به ترتیب بیان گر معنی دار بودن در سطح ۱٪، ۵٪ و عدم معنی داری می‌باشد.

^{ns}, **, *: Non significant and significant at 1 and 5% probability level, respectively.

جدول ۲- بازدارندگی از رشد میسلیوم *P. drechsleri* به‌وسیله‌ی دو جدایه F117 و F133 با مکانیسم‌های مختلف.

Table 2. Mycelial growth inhibition of *P. drechsleri* by different mechanisms by F133 and F117 isolates.

Bacterial isolates	<i>In vitro</i> % mycelial inhibition of <i>P. drechsleri</i>					
	Dual culture assay	volatile metabolites	Non-volatile metabolites	cell-free supernatants		
				%10	%25	%50
<i>P. fluorescens</i> F117	51.11	26.66	100	100	100	100
<i>P. fluorescens</i> F133	53.33	53.33	100	100	100	100

جدول ۳- مقایسه‌ی تولید سیدروفور، HCN و آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز و فسفاتاز به‌وسیله‌ی جدایه‌های F117 و *P. fluorescens* F133

Table 3. Comparison of production of siderophore, HCN, protease, lipase and phosphatase by *P. fluorescens* F133 and F117.

Bacterial isolates	Siderophore production		Scoring based on		Enzyme production	
	diameter of the orange halo (mm) (after 72h)	pyoverdin production Absorbance in 400nm	HCN production	Phosphates solubilization	Lipase	protease
<i>P. fluorescens</i> F117	35	0.58	4	+	+	+
<i>P. fluorescens</i> F133	33	0.72	4	+	+	+

تولید متابولیت‌های ضد میکروبی

به منظور بررسی و مقایسه تولید سیدروفور، قطر هاله‌ی نارنجی اطراف کلونی باکتری‌ها پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها محاسبه شد. نتایج حاصل (جدول ۱) نشان داد که میانگین سیدروفور تولید شده به وسیله هر دو جدایه از لحاظ آماری تفاوتی با هم ندارند ($P=0.338$). هر چند که قطر هاله‌ی نارنجی جدایه *P. fluorescens* F117 پس از ۷۲ ساعت بیشتر از جدایه‌ی F133 می‌باشد (جدول ۳). در ارزیابی تولید سیدروفور به روش اسپکتروفتومتری، مقدار تولید سیدروفور نوع پایوردین به صورت اختصاصی، اندازه‌گیری شد. مقایسه‌ی میانگین میزان جذب نوری سیدروفور تولید شده به وسیله‌ی جدایه‌ها تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها نشان داد (جدول ۱)، ملاحظه می‌شود که میزان سیدروفور پایوردین تولید شده به وسیله‌ی جدایه F133 بیشتر از F117 می‌باشد (جدول ۳). میزان تولید HCN با استفاده از معرف اسید پیکریک که بعد از واکنش با سیانید تغییر رنگ می‌دهد اندازه‌گیری شد؛ مطابق مقیاس نمره‌دهی، هر دو جدایه بیشترین تغییر رنگ را در کاغذ صافی ایجاد کرده و بالاترین میزان HCN را تولید کرده‌اند و تفاوتی با هم نشان ندادند (جدول ۳). از نظر تولید آنزیم‌های پروتئاز، لیپاز و حل‌کننده‌ی فسفات، مشاهده شد که هر دو جدایه قادر به تولید هر سه آنزیم می‌باشند.

بررسی تأثیر جدایه‌ها در کنترل *P. drechsleri*

در شرایط گلخانه

در بررسی بیماری‌زایی *P. drechsleri*، در تیمار شاهد علائم بدین شکل روی گیاهچه‌های خیار ظهور یافت که دو هفته بعد از مایه‌زنی، گیاه کم‌کم دچار پژمردگی و پوسیدگی طوقه و ریشه شد. ارزیابی میزان بیماری‌زایی بیمارگر مورد نظر، بر حسب تعداد گیاهچه‌های سالم در شاهد آلوده و شاهد سالم انجام شد. با توجه به نتایج جدول ۱ می‌توان گفت که دو جدایه در سطح احتمال پنج درصد با هم تفاوت دارند ولی هر دو باکتری مورد استفاده در این آزمایش به صورت معنی‌داری باعث کاهش شدت بیماری می‌شوند (جدول ۴).

جدول ۴- مقایسه‌ی درصد مهار بیماری پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه و طوقه‌ی خیار به وسیله‌ی جدایه‌های باکتریایی.

Table 4. Comparison of suppression of cucumber *Phytophthora* root and crown rot by bacterial isolates

Bacterial isolates	%healthy plants
<i>P. fluorescens</i> F117	93.75
<i>P. fluorescens</i> F133	90.9

بحث

با توجه به زیاد بودن میزان خسارت بیماری پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه و طوقه‌ی خیار، یافتن روشی مناسب برای کاهش خسارت ناشی از این بیماری بسیار ضروری می‌باشد. از طرفی به دلیل بروز مقاومت در بیمارگر مزبور نسبت به قارچ کش‌های سیستمیک، به کارگیری روش‌های مهار زیستی و کاربرد باکتری‌های پروبیوتیک گیاهی می‌تواند روش مناسبی برای کاهش خسارت این بیماری محسوب شود. کاربرد میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست از جمله سودومونادها، فلورسنت به عنوان جایگزین مناسب برای سموم شیمیایی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه محققان قرار گرفته و تاکنون با موفقیت‌های قابل توجهی همراه بوده است (Haas & Défago, 2005). در این تحقیق، دو جدایه از *P. fluorescens* توانستند از رشد *P. drechsleri* جلوگیری کنند؛ مقایسه‌ی روش‌های مختلف از نظر میزان بازدارندگی نشان می‌دهد که ترشحات مایع برون سلولی هر دو جدایه با بازدارندگی ۱۰۰٪، بسیار قوی‌تر از سایر روش‌ها عمل نموده است. نقش عصاره‌ی برون سلولی باکتری‌ها در بازداری از رشد بیمارگرها به خوبی مطالعه شده است؛ طبق تحقیقات Das و همکاران (2008)، عصاره‌ی برون سلولی فیلترشده جدایه‌های سودوموناس به طور مؤثری رشد میسلیوم قارچ *Macrophomina phaseolina* (عامل پوسیدگی زغالی سورگوم) و همچنین تولید و جوانه‌زنی میکراسکلروت را کاهش دادند (Das et al., 2008). کاهش رشد یا بازداری کامل از رشد بیمارگر به وسیله‌ی عصاره‌ی برون سلولی باکتری‌های آنتاگونیست در تحقیقات

در مه‌ار زیستی آن‌ها مطرح شده است (Keel & Defago, 1997). یکی از نقش‌های پروتئاز برون‌سلولی باکتری‌های خاک، تولید الیگوپپتید از پروتئین‌های محیطی و متعاقباً آزاد شدن ترکیبات با وزن مولکولی کم می‌باشد که به وسیله‌ی میکروفلور بومی جذب می‌شود و در نتیجه سبب افزایش بقای باکتری در خاک می‌شود (Sullivan *et al.*, 1991). دو جدایه مورد استفاده قابلیت تولید دو آنزیم مهم پروتئاز و لیپاز، را دارا می‌باشند. حل فسفات معدنی، یکی دیگر از ویژگی‌های این جدایه‌ها محسوب می‌شود؛ باکتری‌های حل‌کننده‌ی فسفات از جمله *Bacillus spp.*، *Pseudomonas spp.*، *Entrobacter spp.* و *Rhizobium spp.* با کمک آنزیم‌هایی مانند فسفاتنازهای خارج سلولی، فیتازها، فسفوناتازها و C-P lyases، فسفر قابل حل را از ترکیبات آلی خاک، آزاد می‌کنند (Vessy, 2003). آزاد شدن فسفر از فسفات معدنی موجود در خاک، به تولید برخی اسیدهای آلی نظیر گلوکونیک اسید و سیتریک اسید مربوط می‌شود که به وسیله‌ی بسیاری از میکروارگانیسم‌های خاک تولید می‌شود. گلوکونیک اسید و ۲-کتوگلوکونات، نقش مهمی در حل فسفات و قدرت مه‌ار کنندگی زیستی باکتری‌ها به خصوص سودوموناد‌های فلورسنت دارند (De Werra *et al.*, 2009). جهش‌یافتگانی از یک سودوموناس غیر فلورسنت به نام *Pseudomonas AN5* که گلوکونیک اسید تولید نمی‌کردند، قدرت مه‌ار بیماری پاختوره را از دست داده و ضمن اینکه دو آنتی‌بیوتیک مهم DAPG و فنازین را نیز تولید نکردند (Kaur *et al.*, 2006). تولید گلوکونیک اسید در استرین CHA0 برای اسیدی کردن محیط و حل فسفات ضروری می‌باشد (De Werra *et al.*, 2009). تولید HCN یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های کنترل بیمارگرها به وسیله‌ی سودوموناد‌های فلورسنت به‌شمار می‌رود (Voisard *et al.*, 1989). بین تولید سیانید هیدروژن در سودوموناد‌های آنتاگونیست و توانایی مه‌ار زیستی در آن‌ها همبستگی وجود دارد (Ellis *et al.*, 2000)؛ تأثیر مستقیم سیانید هیدروژن روی مسیر تنفسی در قارچ‌ها، مکانیسم اصلی نحوه‌ی تأثیر آن

نیک‌نژاد کاظم‌پور (۱۳۸۵)، فرزانه و همکاران (۲۰۱۲) و محققین دیگر گزارش شد (Farzaneh *et al.*, 2012; Niknejad Kazempour, 2006). مکانیسم اصلی بیوکنترل در سودوموناد‌های فلورسنت مربوط به تولید آنتی‌بیوتیک در این باکتری‌ها می‌باشد که به‌طور مستقیم روی فعالیت‌های حیاتی موجودات هدف اثر گذاشته باعث کنترل آن‌ها می‌شوند. تولید مواد آنتی‌بیوتیک به‌عنوان یک عامل مهم در کاهش بسیاری از بیمارگرهای ریشه شناخته شده است (Delany, *et al.*, 2000; Duffy & Defago, 1997; Harrison *et al.*, 1993; Shanahan *et al.*, 1992; Sharifi-Tehrani *et al.*, 1998). یکی از مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده به وسیله‌ی سودومونادها ترکیب ۲ و ۴-دی استیل فلوروگلوکوسینول (DAPG) می‌باشد که نقش آن در کنترل بسیاری از بیماری‌های گیاهی به‌اثبات رسیده است (Dowling & O'Gara, 1994; Keel *et al.*, 1992). جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش، واجد ژن تولید کننده این آنتی‌بیوتیک بسیار مهم هستند. ژن‌های کد کننده‌ی آنتی‌بیوتیک DAPG در میان سودوموناد‌های فلورسنت بسیار حفاظت شده هستند و در اکثر موارد، بین ردیابی ژن‌های سنتز کننده DAPG با تولید آن‌ها که با روش‌های HPLC اندازه‌گیری می‌شوند، همبستگی مثبتی وجود دارد (Mavrodi *et al.*, 2001). DAPG موجب ایجاد انواع بی‌نظمی و اختلال در نوک هیف *Pythium ultimum* می‌گردد که از جمله آن‌ها جمع شدگی غشای پلاسمایی، واکونله شدن و از هم پاشیدگی محتوای سلولی است (DeSouza *et al.*, 2003). این آنتی‌بیوتیک علاوه بر خاصیت ضد قارچی، دارای خواص ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد نماتدی، علف کشی و گیاهسوزی نیز می‌باشد (Meyer *et al.*, 2009). ترکیب DAPG اثرات قابل توجهی بر رشد گیاه دارد؛ در تعدادی از گیاهان، این ترکیب از رشد و جوانه‌زنی بذر ممانعت می‌کند و از طرفی در گیاهانی مثل نخودفرنگی سبب توسعه‌ی ریشه و تشکیل ریشه‌های فرعی می‌شود (Brazelton *et al.*, 2008).

تولید برخی آنزیم‌های تجزیه‌کننده‌ی دیواره‌ی سلولی به وسیله‌ی میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان یک مکانیسم احتمالی

ویژگی های بیوکنترلی مناسب، میزان کنترل رضایت بخشی در شرایط *in vitro* و گلخانه علیه بیمارگر *P. drechsleri* از خود نشان دادند. وجود مکانیسم های آنتاگونیستی متنوع، نقطه ی قوتی برای استفاده از آن ها به عنوان عوامل مهارکننده ی زیستی محسوب می شود و ضرورت انجام تحقیق بیشتر در خصوص فرمولاسیون مناسب جهت استفاده در برنامه مدیریت تلفیقی بیماری ها را آشکار می کند.

می باشد (Blumer & Haas, 2000). جدایه های مورد استفاده در این پژوهش، همه ویژگی های فوق را داشته و ضمن این که ظرفیت خوبی در تولید سیدروفور از خود نشان داد؛ در شرایط کمبود آهن، سیدروفور تولید شده به وسیله باکتری ها، ذخیره محدود آهن قابل دسترس در فراریشه را گرفته و آن را برای قارچ های بیمارگر غیر قابل دسترس کرده و در نتیجه رشد آن ها را محدود می کنند (Loper & Henkels, 1999). دو جدایه ی مورد بررسی با دارا بودن

References

- Alavi, A. & Strange, R.N. 1979. A baiting for isolating *Phytophthora drechsleri*, causal agent of crown rot of Cucumis species in Iran. Plant disease reporter, 63: 1084–1086.
- Alavi, A. & Strange, R.N. 1982. The relative susceptibility of some cucurbits to an Iranian isolate of *Phytophthora drechsleri*. Plant Pathology, 31: 221–227.
- Alexander, D.B. & Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagent evaluates siderophore production by rhizosphere bacteria Biology and Fertility of Soils, 12: 39-45.
- Alstrom, S. & Burns, R.G. 1989. Cyanid production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. Biology and Fertility of Soils, 7: 232-238.
- Blumer, C., Haas, D. 2000. Mechanism, regulation, and ecological role of bacterial cyanide biosynthesis. Archives of Microbiology, 173: 170-177.
- Brazelton J.N., Pfeufer, E.E., Sweat, T.A., Mcspadden Gardener, B.B. & Coenen, C. 2008. 2,4-Diacetylphloroglucinol alters plant root development. Molecular Plant-Microbe Interactions, 21: 1349–1358.
- Castaneda, G.C., Munoz, T.J.J. & VIDEA, J.R.P. 2005. A spectrophotometric method to determine the siderophore production by strains of fluorescent *Pseudomonas* in the presence of copper and iron. Microchemical Journal, 81: 35-40.
- Das, I.K., Indira, S., Annapurna, A. & Prabhakar, Seetharama, N. 2008. Biocontrol of charcoal rot in sorghum by fluorescent pseudomonads associated with the rhizosphere. Crop Protection, 27: 1407–1414.
- De Souza, J., Arnould, T., Deulvot, C., Lemanceau, P., Gianinazzi- Pearson, V. & Raaijmakers, J.M. 2003. Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: Cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. Phytopathology, 93: 966–975.
- De Wager, L.A., Van Der Bij, A.J., Dekker, L.C., Simons, M., Wijffelman, C.A. & Lugtenberg, B.J.J. 1995. Colonization of the rhizosphere of crop plants by plant beneficial pseudomonads. FEMS Microbiology Ecology, 17: 221-22.
- De Werra, P., Péchy-Tarr, M., Keel, C. & Maurhofer, M. 2009. Role of gluconic acid production in the regulation of biocontrol traits of *Pseudomonas fluorescens* CHA0. Applied and Environmental Microbiology, 75: 4162–4174.
- Delany, I., Sheehan, M.M., Fenton, A., Bardin, S., Aarons, S. & O'gara, F. 2000. Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4- diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of *phlF* as a transcriptional repressor. Microbiology, 146: 537-546.

- Dowling, D.N. & O'gara, F. 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnology*, 12: 133–144.
- Duffy, B.K. & Défago, G. 1997. Zinc improves biocontrol of Fusarium crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology*, 87: 1250-1257.
- Ellis, R.J., Timms-Wilson, T.M. & Bailey, M.J. 2000. Identification of conserved traits in fluorescent pseudomonads with antifungal activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 2(3): 247-284.
- Ershad, Dj. 1992. *Phytophthora* Species in Iran (Isolation, Purification, Identification). Agriculture Research Organization, pp. 217.
- Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K. 1996. *Phytophthora capsici*. Pages 262-268 in: *Phytophthora Diseases Worldwide*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Farzaneh, M., Shi, Z.Q., Ghassempour, A., Sedaghat, N., Ahmadzadeh, M., Mirabolfath M. & Javan-Nikkhah, M. 2012. Aflatoxin B1 degradation by *Bacillus subtilis* UTBSP1 isolated from pistachio nuts of Iran. *Food Control*, 23:100-106.
- Fiddaman, P.J. & Rossall, K. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 76: 395-405.
- Ghafelebashi, S.S., Jamali, F. & Ahmadzadeh, M. 2014. Study of some biological and biochemical properties of *Pseudomonas fluorescens* UTPF68, biocontrol agent against *Phytophthora drechsleri* on cucumber. *Biological Control of Pests & Plant Diseases*, 3 (2): 105-106. (In Persian with English summary).
- Haas, D. & Defago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature reviews, Microbiology*, 3: 307–319.
- Hagedorn, C., Gould, W.D. & Bardinelli, T.R. 1998. Rhizobacteria of cotton and their repression of seedling disease pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 2793–2797.
- Harrison, L.A., Letendre, L., Kovacevich, P., Pierson, E. & Weller, D.M. 1993. Purification of an antibiotic effective against *Gaeumanomyces graminis* var. *tritici* produced by a biocontrol agent *Pseudomonas aureofaciens*. *Soil Biology & Biochemistry*, 25: 215-221.
- Hwang, B.K. & Kim, C.H. 1995. Phytophthora blight of pepper and its control in Korea. *Plant Disease*, 79: 221–227.
- Kaur, R., Macleod, J., Foley, W. & Nayudu, M. 2006. Gluconic acid: An antifungal agent produced by *Pseudomonas* species in biological control of take-all. *Phytochemistry*, 67: 595–604.
- Keel, C. & Defago, G. 1997. Interactions between beneficial soil bacteria and root pathogens: mechanism and ecological impact. pp. 27-46. In: *Multitrophic Interactions in Terrestrial Systems*. Gange, A.C. & Brown, V.K. (eds.), Blackwell Scientific Publishers, London, England.
- Keel, C., Schnider, U., Maurhofer, M., Voisard, C., Laville, J., Burger, U., Wirthner, P., Haas, D. & Défago, G. 1992. Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: importance of the bacterial secondary metabolite 2, 4- diacetylphloroglucinol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5: 4–13.
- Kraus, J. & Loper, J.E. 1995. Characterization of a genomic region required for production of the antibiotic pyoluteorin by the biological control agent *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 849- 854.

- Kreutzer, W.A., Bodine, E.W. & Durrell, L.W. 1940. Cucurbit diseases and rot of tomato fruit caused by *Phytophthora capsici*. *Phytopathology*, 30: 972–976.
- Lamour, K.H. & Hausbeck, M. K. 2000. Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. *Phytopathology*, 90: 396–400.
- Loper, J.E. & Henkels, M.D. 1999. Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 5357-5363.
- Maleki, M., Mokhtarnejad, L. & Mostafae, S. 2011. Screening of rhizobacteria for biological control of cucumber root and crown rot caused by *Phytophthora drechsleri*. *The Plant Pathology Journal*, 27(1): 78-84.
- Mansoori, B. & Banihashemi, Z. 1982. Evaluating cucurbit seedling resistance to *Phytophthora drechsleri*. *Plant Disease*, 66: 373-376.
- Marilley, L. & Arango, M. 1990. Phytopathogenic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. *Applied Soil Ecology*, 13: 127-136.
- Maurhofer, M., Keel, C. & Defago, G. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 with enhanced production. *Plant Pathology*, 44: 40-50.
- Mavrodi, O.V., Mcspadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F., Weller D.M. & Thomashow, L.S. 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2, 4- diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 91: 35-43.
- Mcspadden Gardener, B.B., Mavrodi, D.V., Thomashow, L.S. & Weller, D.M. 2001. A rapid polymerase chain reaction based assay characterizing rhizosphere populations of 2,4- diacetylphloroglucinol producing bacteria. *Phytopathology*, 91: 44–54.
- Mcspadden Gardener, B.B., Schroeder, K.L., Kalloger, S., Raaijmakers, J.M., Thomashow, L.S. & Weller, D.M. 2000. Genotypic and phenotypic diversity of *phlD* containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 1939–1946.
- Meyer, S.L.F., Halbrendt, J.M., Carta, L.K., Skantar, A.M., Liu, T., Abdelnabby H.M.E. & Vinyard, B.T. 2009. Toxicity of 2,4-diacetylphloroglucinol (DAPG) to Plant-parasitic and Bacterial-feeding Nematodes. *Journal of Nematology*, 41(4): 274–280.
- Niknejad Kazempour, M. 2006. Effect of *Pseudomonas fluorescens* isolates on *Rhizoctonia solani* Kühn the Causal Agent of Sheath Blight on Rice. *Journal of Agricultural Sciences*, 12 (4): 729-744. (In Persian with English summary).
- O 'sullivan, M., Stephens P.M. & O'gara, F. 1991. Extracellular protease production by fluorescent *Pseudomonas* spp. and the colonization of sugarbeet roots and soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 23: 623-627.
- Ristaino, J.B. & Johnston, S.A. 1999. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora* blight on bell pepper. *Plant Disease*, 83: 1080–1088.
- Schippers, B., Bakker, A.W. & Bakker, A.H.M. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. *Phytopathology*, 25: 39-59.
- Shanahan, P., O' Sullivan, D.J., Simpson, P., Glennon, J.D., & O'Gara, F. 1992. Isolation of 2, 4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production: *Applied and Environmental Microbiology*, 58(1): 353-358.

- Sharifi-Tehrani, A., Zala, M., Natsch, A., Moënne-Loccoz, Y. & Defago, G. 1998. Biocontrol of soil-born fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *European Journal of Plant Pathology*, 104: 631-643.
- Shirzad, A., Fallahzadeh-Mamaghani, V. & Pazhouhandeh, M. 2012. Antagonistic potential of fluorescent pseudomonads and control of crown an root rot of cucumber caused by *Phytophthora drechsleri*. *The Plant Pathology Journal*, 28(1): 1-9.
- Sierra, G.A. 1957. Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23: 15–22.
- Sperber J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organism in the rhizosphere and soil. *Australian Journal of Agricultural Research*, 9: 781-778.
- Teniola, O.D., Addo, P.A., Brost, I.M., Farber, P., Jany, K.D., Alberts, J.F., Van Zyl, W.H., Steyn, P.S. & Holzapfel, W.H. 2005. Degradation of aflatoxin B(1) by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenivorans* sp. nov. DSM 44556(T). *International Journal of Food Microbiology*, 105: 111-117.
- Vessey, K.J. 2003. Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571 – 586.
- Voisard, C., Keel, C., Haas, D. & De'fago, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobitic conditions. *The EMBO Journal*, 8: 351-358.
- Wang, C., Ramette, A., Punjasarnwong, P., Zala, M., Natsch, A., Moenne-Loccoz, Y. & Defago, G. 2001. Cosmopolitan distribution of *phlD*-containing dicotyledonous crop-associated biocontrol pseudomonads of worldwide origin. *FEMS Microbiology Ecology*, 37: 105–116.
- Weller, D.M. & Cook, R.J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 78: 463-469.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 26: 379-407.

The effects of two DAPG-producing isolates of *Pseudomonas fluorescens* in controlling cucumber root and crown rot caused by *Phytophthora drechsleri*

Robab Ezazi¹, Akbar Shirzad², Masoud Ahmadzadeh¹

1. College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2. Department of Plant Protection, Shahid Madani (Azarbaijan) University, Tabriz, Iran

Corresponding author: Masoud Ahmadzadeh, email: ahmadz@ut.ac.ir

Received: Feb., 20, 2015

3 (1) 45-56

Accepted: July, 27, 2015

Abstract

Phytophthora drechsleri is an important soilborne plant pathogen in Iran that causes root and crown rot disease in cucurbits. Recently, the biological suppression of this disease by the application of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) such as fluorescent pseudomonads as an alternative method for chemical fungicides has been regarded. In the present study, antagonistic effects of two DAPG-producing isolates of *Pseudomonas fluorescens* "F117 and F133" against the pathogenic fungal agent (*P. drechsleri*) in *In vitro* and greenhouse with different methods were investigated. The results showed that these isolates by employing several biocontrol mechanisms such as antibiosis, production of siderophore and hydrogen cyanide as well as secretion of protease, lipase and phosphates solubilization enzymes showed an effective control against the disease causal agent in the laboratory and the greenhouse conditions.

Keywords: biological control, cucumber root and crown rot, fluorescent pseudomonads
