نشریه علمی زیست‌شناسی خاک / جلد ۱۱ / شماره ۲ / ۱۴۰۲/ص۱۳۹-۱۵۴
dx.doi.org/10.22092/sbj.2024.361318.245

تأثیر باکتری‌های محرک رشد بر رشد هیف‌های قارچ دکمه‌ای و کنترل عوامل بیماری‌زا در شرایط آزمایشگاهی

احمد اصغرزاده*، کبری ثقفی، الهام فتاحی فر، منوچهر جناقی و ندا علیزاده

دانشیار موسسه تحقیقات خاک و آب (سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی)، بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، کرج، ایران
a_asgharzadeh_2000@yahoo.com

دانش‌آموخته دکتری اصلاح نباتات، کارشناس آمار و پژوهش موسسه تحقیقات خاک و آب (سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی ، بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، کرج، ایران **saghafi.varesh@gmail.com**

دانش‌آموخته دکتری صنایع غذایی، معاون مدیرکل دفتر گلخانه، گیاهان زینتی و قارچ معاونت باغبانی وزارت جهاد کشاورزی ، تهران، ایران**elfa57food@yahoo.com**

کارشناس ارشد، مدیرعامل شرکت قارچ سحر، هشتگرد، کرج، ایران **sahsar63mashrom@gmail.com**

کارشناس بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی خاک، موسسه تحقیقات خاک و آب (سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی) ، کرج، ایران.
nena_twens@yahoo.com

«مقاله پژوهشی»

دریافت:۱۴۰۱/۱۱/۱۲ و پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۱

چکیده

در حال حاضر متوسط مقدار تولید قارچ دکمه‌ای در هر مترمربع ۱۷ تا ۲۰ کیلوگرم است، افزایش آن به ۲۲ تا ۲۷ کیلوگرم در مترمربع می‌تواند تولید این محصول را اقتصادی‌تر و در بازارهای جهانی رقابتی نماید. علاوه بر انتخاب ارقام پر محصول، یکی از راه‌های افزایش عملکرد، تسلط علمی بر فرآیندهای میکروبی تولید کمپوست و تغذیه مناسب قارچ با استفاده از انواع مکمل‌های زیستی، آلی و شیمیایی است. در این پژوهش از ۹ سویه برتر جنس سودوموناس، ۶ سویه *باسیلوس سوبتلیس* و ۵ سویه *باسیلوس تورنجینسیس* به‌عنوان باکتری‌های محرک رشد و زیست مهارگر استفاده شد. نتایج نشان داد، اگرچه اختلاف معنی‌داری بین سویه‌ها وجود نداشت اما همه سودوموناس‌ها توان تحریک رشد میسلیوم‌های قارچ دکمه‌ای را داشتند و در این میان سویه P8 از بیشترین توان محرک رشدی برخوردار بود. سویه‌های S1 و S6 *باسیلوس سوبتلیس* نیز به‌طور معنی‌داری رشد میسیلیوم‌های قارچ خوراکی را تحریک کردند. از میان سویه‌های *باسیلوس تورنجینسیس* نیز ایزوله‌های T2، T3 و T5جزو سویه‌های مؤثر در افزایش رشد میسیلیوم‌ها شناسایی شدند. سویه‌های S2، S5، T1 و T4 علاوه بر خواص زیست مهارگری قارچ‌های بیماری‌زا، اثرات مهارکنندگی بر رشد قارچ خوراکی بر روی پلیت حاوی PDA/NA + extract را نشان داده و باعث مهار رشد میسیلیوم‌های قارچ خوراکی شدند. بیشترین اثر زیست کنترلی برای سویه S3 بر روی قارچ تریکودرما و سویه S6 بر روی قارچ مایکوگون مشاهده گردید. حداکثر قطر هاله کلونی مهاری برای دو سویه مذکور برابر با ۲۰ میلی‌متر و کمترین اثر زیست کنترلی مربوط به سویه T5 بود. با توجه به صفات مفید و متفاوتی که گونه‌های دو جنس مورداستفاده از خود نشان دادند، به نظر می‌رسد استفاده از کنسرسیومی از باکتری‌ها به‌عنوان کود زیستی اثرات بسیار بیشتری در محصول قارچ دکمه‌ای داشته باشند.

کلمات کلیدی: باکتری‌های محرک رشد، کود زیستی، قارچ، هم‌افزایی رشد

* آدرس ایمیل نویسنده مسئول: a_asgharzadeh_2000@yahoo.com

مقدمه

بیشتر مطالعات بر روی قارچ‌ها و باکتری‌های مورداستفاده در بخش کشاورزی در محیط‌های استریل و به‌طور جداگانه و مستقل از هم انجام‌گرفته و به همین منوال نیز در حال انجام است. درحالی‌که در طبیعت، قارچ‌ها و باکتری‌ها و دیگر میکروارگانیسم‌ها در تماس نزدیک باهم بوده و اثرات متقابل خود را بر همدیگر اعمال می‌کنند. اثرات متقابل قارچ و باکتری که به‌طور خلاصه BFIs[1] نامیده می‌شود، در سال‌های اخیر بسیار موردتوجه قرارگرفته و عمق و وسعت یافته است. مطالعات اخیر نشان می‌دهد رفتار باکتری‌ها و قارچ‌ها در کنار هم نسبت به حالتی که به‌تنهایی رشد می‌کنند بسیار متفاوت است (فری کلت و همکاران، ۲۰۱۱، رابینسون و همکاران، ۲۰۲۱، تارکا و همکاران، ۲۰۰۹). در کشاورزی نوع اثرات متقابل قارچ‌ها و باکتری‌ها به شکل مضر و یا مفید و از سطح تماس فیزیکی ساده تا تغییرات فیزیولوژیک و تغییرات ژنی در هر دو طرف همکاری تغییر می‌نماید. گونه‌های مختلف باکتری‌های جنس سودوموناس به‌عنوان شناخته‌شده‌ترین باکتری‌ها در کشت قارچ خوراکی دارای اثرات متفاوتی بر رشد این قارچ هستند. *Pseudomonas tolaasii* میسیلیوم قارچ را آلوده می‌کند و بیماری لکه قهوه‌ای ناشی از این باکتری با تشکیل کلاهک‌ها ظاهر می‌شود. این بیماری یکی از بیماری‌های شایع در سالن‌های صنعتی و سنتی قارچ خوراکی در کشور است. تحقیقات انجام‌گرفته در سالن‌های تولید قارچ در کرج و تهران نشان می‌دهد که بیماری لکه قهوه‌ای[2] یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در این دو استان بوده و بیماری مایکوگون[3] و آلودگی به کپک سبز[4] و مومیایی شدن[5] در رتبه‌های بعدی قرار دارند (نمازی و همکاران ۱۳۹۴ و خباز و همکاران ۱۳۸۴). همچنین مطالعات نشان می‌دهد این بیماری را می‌توان با سویه‌های مناسب از گونه‌های *P. fluoresences* و *P. reactans* کنترل نمود (خباز، ۱۳۸۴و فری کلت و همکاران، ۲۰۱۱).

بیماری‌های ناشی از انواع سودوموناس‌ها اغلب توسط گونه‌های مناسبی از سودوموناس ازجمله *Pseudomonas fluorescens* وبه‌ویژه *Pseudomonas putida* و یا انواعی از باسیلوس‌های گرم مثبت قابل‌کنترل هستند (خباز، ۱۳۸۴و فری کلت و همکاران، ۲۰۱۱). به‌عبارتی‌دیگر، گونه‌های مختلف جنس سودوموناس در تماس با قارچ دکمه‌ای رفتارهای متفاوتی نشان می‌دهند. از گونه‌های بیماری‌زا، بی‌تأثیر تا باکتری مفید با اثرات افزایش محصول و کاهش اثرات مخرب دیگرگونه‌ها در بین آن‌ها وجود دارد. گونه *Pseudomonas putida* یکی از گونه‌های بسیار مؤثر در تولید قارچ دکمه‌ای و کنترل عوامل بیماری‌زا است (فری کلت و همکاران، ۲۰۱۱ و کرتاز و تای، ۲۰۱۸).

هرچند استفاده از انواع مکمل‌های رشد در مراحل مختلف تولید قارچ خوراکی از مرحله تولید کمپوست تا مرحله برداشت محصول، در تحقیقات سال‌های دهه ۶۰ ریشه دارد اما استفاده تجاری از پتانسیل انواع باکتری‌ها و قارچ‌های مفید به‌عنوان عوامل محرک رشد قارچ‌های خوراکی با اختصار MGP[6] در سال‌های اخیر عمومیت‌یافته است (کرتاز و تای، ۲۰۱۸). بر اساس دانش تولیدکنندگان و سوابق علمی و تقاضای بازار، مکمل‌های میکروبی می‌تواند همراه با انواع عناصر غذایی ماکرو و میکرو، ویتامین‌ها، انواع پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه عرضه شوند. استفاده منفرد و یا ترکیبی آن‌ها سبب افزایش کمی و کیفی محصول می‌گردد. در مراحل مختلف رشد قارچ خوراکی، انواع متفاوتی از مایه تلقیح قابل‌استفاده است. گونه‌هایی از جنس‌های *Paenibacillus*، *Bacillus*، *Azotobacter* و *Pseudomonas* به‌عنوان مایه تلقیح برای افزایش و تحریک رشد میسلیوم‌های قارچ‌های دکمه‌ای استفاده‌شده‌اند. این مایه تلقیح‌ها اغلب علاوه بر اثرات

[1] - Bacterial-Fungal Interactions
[2] - Brown Blotch
[3] - Mycogone
[4] - Green Mould
[5] - Mummy
[6] - Mushroom Growth Promoting fungi and bacteria

کودهای زیستی، عواملی برای کنترل زیستی قارچ‌های ساپروفیت و قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا در تولید قارچ‌های خوراکی نیز بوده‌اند (پایوپانونت و همکاران ۲۰۱۱، جادهاوو و همکاران ۲۰۱۴ و پارتیکشا و همکاران ۲۰۱۷).

بر اساس تحقیقات کرتاز و تای (۲۰۱۸) گونه‌هایی از جنس‌های *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Bradyrhizobium* می‌تواند در مراحل تولید کمپوست، در زمان تهیه بستر کشت، مراحل خاک‌دهی و حتی در مرحله تولید پین و تولید محصول بسیار مؤثر باشند. در این مطالعه بر تأثیر جنس سودوموناس و گونه پوتیدا در مرحله خاک‌دهی بیشتر تأکید شده است. فرمور و همکاران (۱۹۹۹) با نشان‌دار کردن کربن مورداستفاده باکتری نشان دادند زیست‌توده میکروبی تولیدشده در مراحل مختلف تولید کمپوست به‌عنوان منبع کربنی توسط قارچ استفاده می‌شود و قارچ دکمه‌ای این منبع را بر دیگر منابع ترجیح می‌دهد. وجود این منبع برای رشد قارچ ضروری است و بستر رشد را برای قارچ دکمه‌ای اختصاصی می‌کند. هر عاملی که سبب افزایش مقدار و کیفیت این منبع برای قارچ گردد، سبب افزایش رشد میسلیوم‌های قارچ و بیوماس آن و اختصاصی‌تر شدن آن برای رشد قارچ می‌شود (فرمور و همکاران، ۱۹۹۱). از سوی دیگر، حجم میسیلیوم، گستردگی، سرعت رشد و قدرت نفوذ آن در بستر کشت از فاکتورهای مهم در تصمیم تولیدکنندگان قارچ برای ورود سالن به مرحله زایشی است. هر عاملی که بتواند این مدت را کوتاه و سرعت رشد هیف‌های قارچ را افزایش دهد، ضمن افزایش بهره‌مندی قارچ از عناصر غذایی بستر، مقدار محصول و تعداد دوره‌های کشت در سالن را افزایش می‌دهد و این برای تولیدکنندگان ارزش اقتصادی قابل‌توجهی ایجاد می‌نماید (شاموگام و کورتز ۲۰۲۲، تاسیویلیوا و همکاران ۲۰۲۲، ساووبنووا و همکاران ۲۰۲۳).

برخلاف بعضی از قارچ‌های دارویی برای تولید قارچ دکمه‌ای نیازی به استریل کردن کمپوست نیست و پاستوریزه‌کردن کمپوست کفایت می‌نماید. پاستوریزاسیون قدرت رقابت هیف‌های قارچ را برای اشغال همه سطوح کمپوست افزایش می‌دهد. قارچ دکمه‌ای برای تولید اقتصادی به قدرت آنزیمی تعدادی از باکتری‌ها نیاز دارد. این فلور میکروبی نه‌تنها سبب تجزیه مواد سلولزی و همی سلولزی می‌شوند بلکه در آخر فاز II سبب حذف آمونیاک تولیدی می‌گردد که برای رشد و توسعه هیف‌های قارچ و تولید پین‌های مولد کلاهک ضروری است (شاموگام و کورتز ۲۰۲۲). این همکاری سبب تولید زیست‌توده میکروبی و ترکیب خاصی از اسید هیومیک و لیگنین می‌شود که بدون این همکاری، تولید این مواد ضروری مقدور نخواهد بود و در صورت استریل کردن کمپوست، رشد قارچ دکمه‌ای نیز بسیار کاهش خواهد یافت (ووس و همکاران ۲۰۱۷). شروع تولید اندام‌های زایشی (پین‌ها) فرایند بسیار پیچیده‌ای است که توسط چندین فاکتور محیطی و بیوشیمیایی و میکروبی کنترل می‌شود و هنوز به‌طور کامل شناخته‌نشده است. این فرایند ابعاد پنهان زیادی برای کشف دارد اما تاکنون معلوم شده است که با کاهش دما، رسیدن میسیلیوم‌ها به مرحله خاصی از رشد، افزایش هوادهی و کاهش CO_2 شروع می‌گردد. کاهش دما عامل مؤثری در تغییر فاز رشد میسیلیوم‌ها به فاز زایشی است ولی تعداد پین‌ها را مقدار کاهش CO_2 تعیین می‌کند (ایستوود و همکاران ۲۰۱۳). در مورد قارچ دکمه‌ای، استفاده از خاک‌پوششی برای تحریک تولید پین ضروری است. این خاک معمولاً علاوه بر شرایط فیزیکی خاص، باید حاوی میکروارگانیسم‌های مناسبی باشد (هاییس و همکاران، ۱۹۶۹). درصورتی‌که خاک‌پوششی استریل بوده و یا فاقد جمعیت مناسب از باکتری‌ها باشد، بهتر است با گونه مناسبی از باکتری‌های جنس سودوموناس تلقیح شود تا بتواند وظیفه خود را به‌درستی ایفا نماید. به نظر می‌رسد یکی از نقش‌های اصلی سودوموناس‌های تلقیح شده، تجزیه مواد مترشحه توسط هیف‌های قارچ باشد که برای ورود به مرحله زایشی حذف آن‌ها ضروری است. یکی از این ترکیبات 1-Octen-3-ol است که در اثر رشد هیف‌ها، در محیط ترشح‌شده و مانع از پین‌زایی می‌گردد. ماده

شناخته‌شده دیگری که به‌عنوان یک مهارگر عمل می‌کند، اتیلن مترشحه از هیف‌های در حال رشد است که باکتری‌ها با حذف این دو ماده سبب پین‌زایی در قارچ دکمه‌ای می‌شوند (نوبل و همکاران، ۲۰۰۹ و ناینکه و همکاران، ۲۰۲۲).

مطالعات زنگ و همکاران (۲۰۱۶) و ناینکه و همکاران (۲۰۲۲) نشان می‌دهد که استفاده از باکتری‌های *سودوموناس پوتیدا* با توان تولید مقدار مناسبی از ACC deaminase می‌تواند نقش مؤثری در فرایند پین‌زایی داشته باشد. یانگ و همکاران (۲۰۱۳) و کومار (۲۰۱۸) نیز نشان داده‌اند که استفاده از کودهای زیستی به‌صورت تک‌گونه‌ای و ترکیبی (*Bacillus Pseudomonas putida*, *megaterium*) می‌تواند عاملی برای افزایش محصول در تولید قارچ دکمه‌ای تا ۲۱۵ درصد باشد و افزایش سرعت تولید تا حصول محصول نیز تا ۲۶ روز گزارش‌شده است. علاوه بر باکتری‌ها، نقش قارچ ترموفیل(*Mycothermus thermophilus* (*Scytalidium thermophilum*، در مرحله رسیدگی کمپوست فاز II قارچ دکمه‌ای، برای انتخابی شدن کمپوست و افزایش محصول برای این قارچ به علت توان ایموبلیزه کردن آمونیاک بسیار مؤثر شناخته‌شده است (سانچز و همکاران، ۲۰۰۸، کوائو کاستیلو و همکاران، ۲۰۰۹ و نات ویگ و همکاران، ۲۰۱۵).

اگرچه تعداد زیادی مایه تلقیح و کود زیستی بر پایه انواع باکتری‌ها و قارچ‌ها در بخش کشاورزی تجاری شده است اما همچنان تحقیقات در این زمینه درحال‌توسعه است (فینکل و همکاران، ۲۰۱۷). تحقیق جاری نیز در راستای تکمیل دانش اثربخشی باکتری‌های محرک رشد بر رشد هیف‌های قارچ دکمه‌ای، کنترل زیستی عوامل بیماری‌زای قارچی در شرایط آزمایشگاهی و درنهایت استفاده به‌عنوان مکمل زیستی در تولید قارچ انجام‌گرفته است .

مواد و روش‌ها

انتخاب باکتری‌های مورد ارزیابی

در این پژوهش از گونه‌های مختلفی از باکتری‌های جنس سودوموناس استفاده گردید. این باکتری‌ها قبلاً در قالب طرح‌های پژوهشی از مناطق شور کشور جداسازی و جنس و گونه‌های آن‌ها شناسایی‌شده و ازنظر میزان تولید انواع مواد محرک رشد گیاه و مقاومت به شوری موردبررسی قرارگرفته بودند. انتخاب سویه‌های باکتری بر اساس نیاز به باکتری‌هایی با مشخصات ویژه مورداشاره برای تحریک رشد هیف‌های قارچ دکمه‌ای *Agaricus bisporos* و بر اساس اطلاعات مطالعه شده کلکسیون منتخب باکتری‌های سودوموناس بود. تعداد نه سویه از کلکسیون ۵۶تایی گونه‌های مختلف جنس سودوموناس انتخاب شدند که دو سویه از آن‌ها دارای تعیین توالی کامل ژنومی بودند (ثقفی و همکاران، ۲۰۱۹). همچنین در این پژوهش از گونه‌های باسیلوس سوبتلیس و باسیلوس تورنجینسیس موجود در کلکسیون موسسه تحقیقات خاک و آب با صفات زیست مهارگری استفاده گردید. تعداد شش سویه *باسیلوس سوبتلیس* و پنج ۵ سویه از گونه‌های مختلف *باسیلوس تورنجینسیس* انتخاب و پس از بازکشت در آزمایش‌ها هرکدام در سه تکرار بکار گرفته شدند.

تهیه محیط کشت

برای کشت انواع گونه‌های سودوموناس از محیط کشت کینگ‌بی آگار[1] (KB) شرکت هایمدیا[2] و برای کشت باسیلوس‌های اسپوردار موردبررسی از محیط کشت نوترینت آگار[3] (NA) و های‌کروم باسیلوس آگار[4] شرکت هایمدیا استفاده شد. برای کشت مایع این باکتری‌ها نیز از محیط کشت‌های بدون آگار محیط کشت‌های یادشده استفاده گردید. برای کشت هیف قارچ دکمه‌ای از سویه

[1] - King B Agar
[2] - Hi Media
[3] - Nutrient Agar (Cat. Number: 70148-500G, Merck)
[4] - HiChrome Bacillus Agar

معمول مورد کشت در سالن‌های قارچ *Agaricus bisporos*-A15 از کشت هفت‌روزه به ابعاد نیم سانتی‌متر مربع رشد یافته بر روی محیط کشت PDA[1] استفاده شد. همچنین برای کشت قارچ‌های بیماری‌زای مایکوگون (*Mycogone perniciosa*)، تریکودرما (*Trichoderma aggressivum*) و ورتیسیلیوم (*Lecanicillium fungicola*) از محیط کشت PDA[2] استفاده شد. برای انجام آزمایش‌ها نیز از یک برش نیم سانتی‌متر مربعی از کشت هفت روزه آن‌ها استفاده گردید.

تهیه مایه تلقیح

برای تهیه اینوکلوم[3] موردنیاز باکتری‌ها، ۲۰ میکرولیتر از محیط کشت مایع هر یک از باکتری‌ها، در ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث[4] تلقیح و یک شب در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند و برای انجام آزمایش‌ها در یخچال نگهداری شدند (جمعیت حدود CFU 10^7). همچنین اینولکوم قارچ دکمه‌ای و قارچ‌های بیماری‌زا نیز بر روی پلیت‌های حاوی PDA تهیه شدند و از قطعات رشد کرده آن‌ها به ابعاد ۵ میلی‌متر برای تلقیح استفاده شد. برای بررسی تأثیر عصاره کمپوست قارچ [5] بر رشد هیف‌های قارچ دکمه‌ای از محیط PDA حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره کمپوست استفاده شد.

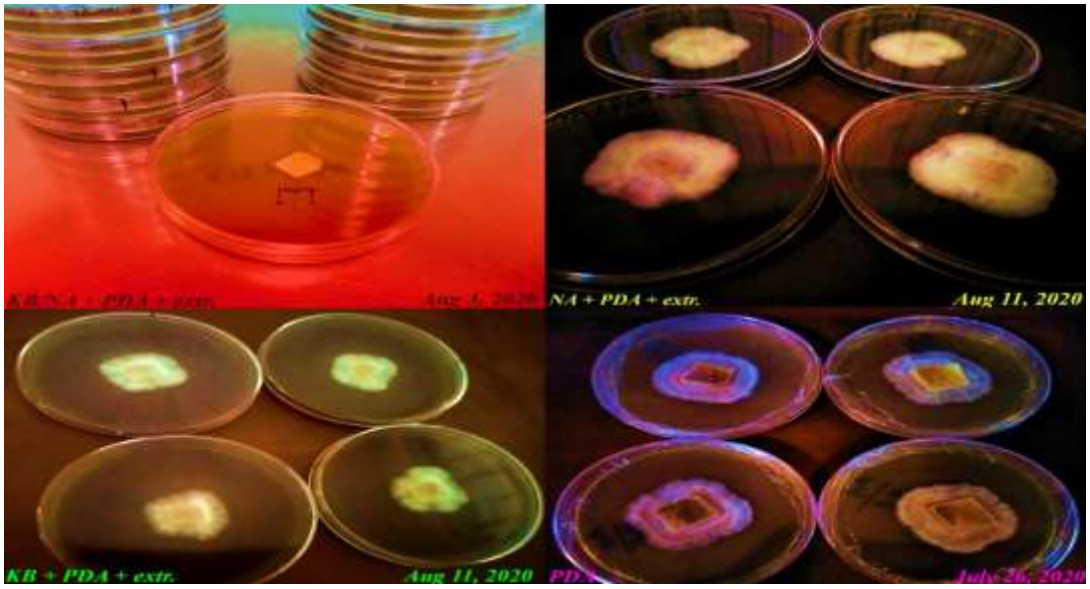
برای بررسی اثرات متقابل قارچ باکتر و باکتری – باکتری نیز از محیط کشت‌های دارای نصف محیط کشت اختصاصی قارچ و نصف حجم محیط کشت اختصاصی باکتری موردبررسی (در کشت‌های دارای قارچ، به همراه عصاره کمپوست قارچ) استفاده شد.

آزمایش‌ها، در سه تکرار انجام شدند و برای انجام آزمایش در وسط پلیت‌های حاوی محیط کشت مشترک قارچ و باکتری، برش نیم سانتی‌متر مربعی از محیط کشت رشد یافته قارچ قرار داده شد (کشت هفت روزه) و در هر چهار گوشه پلیت‌ها ۵ میکرولیتر از باکتری موردبررسی نقطه‌گذاری و در مدت زمان موردنیاز (۳ تا ۹ روز) در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و هاله‌های رشد و یا قطر هاله زیست مهارگری اندازه‌گیری شدند(Montealegre et al., 2003). با اندازه گیری قطر رشد دیسک پاتوژن و مقایسه آن با شاهد و با استفاده از فرمول: ۱۰۰ * (رشدشاهد / رشد قارچ-۱) = درصد بازدارندگی یا توان آنتاگونیستی سویه های جداسازی شده مورد ارزیابی قرار گرفت. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از این پژوهش با استفاده از نرم‌افزار GenStat14 در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) مورد تجزیه آماری قرار گرفت و نمودارها به کمک نرم‌افزار Excel و R ترسیم شدند.

نتایج

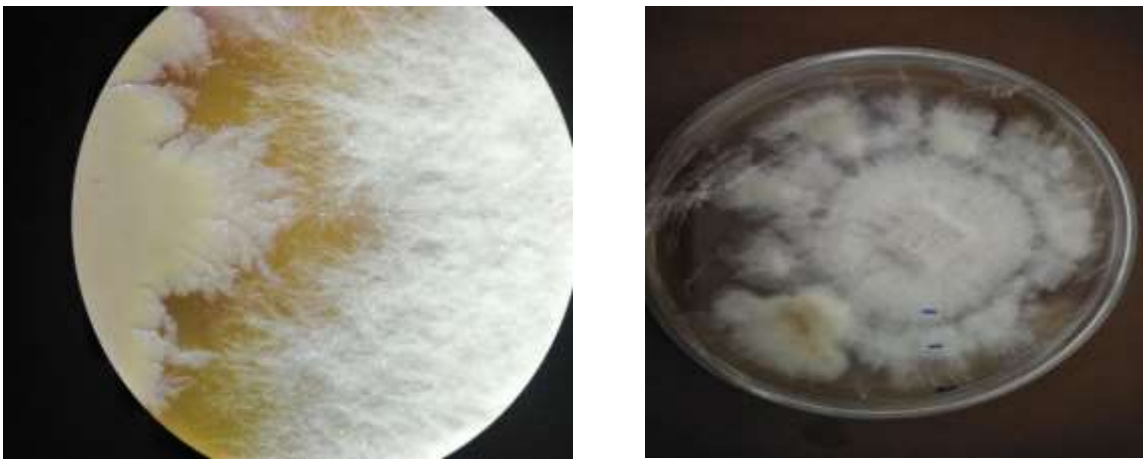
ابتدا به‌منظور انتخاب محیط کشت مناسب و اثرات منفی احتمالی محیط‌های کشت باکتری NA و KB در رشد هیف‌های قارچ دکمه‌ای در محیط کشت مشترک، ترکیبات مختلف این محیط‌های کشت در ترکیب با محیط کشت PDA با تیمارهای ترکیبی عصاره کمپوست قارچ و بدون عصاره کمپوست موردبررسی قرار گرفت. بعد از یک هفته کشت باکتری‌ها در محیط PDA، نتایج نشان داد، باکتری‌ها در این محیط کشت قادر به رشد نیستند. قارچ در محیط‌های کشت ترکیبی و PDA قادر به رشد بوده و افزودن عصاره کمپوست اثرات مثبت در رشد هیف‌های قارچ و رشد باکتری‌ها داشت. پس از یک هفته کل پلیت با هیف‌های فشرده قارچ دکمه‌ای پوشانده شد، در نتیجه در آزمایش‌های بعدی از این ترکیب در تهیه محیط کشت‌های موردنیاز استفاده شد (شکل ۱).

[1] - Potato Dextrose Agar (Cat. Number: 1101300500, Merck)
[2] - Potato Dextrose Agar (Cat. Number: 1101300500, Merck)
[3] - Inoculum
[4] - Nutrient Broth
[5] - Wheat + chicken manure + Calcium Carbonate, compost extract



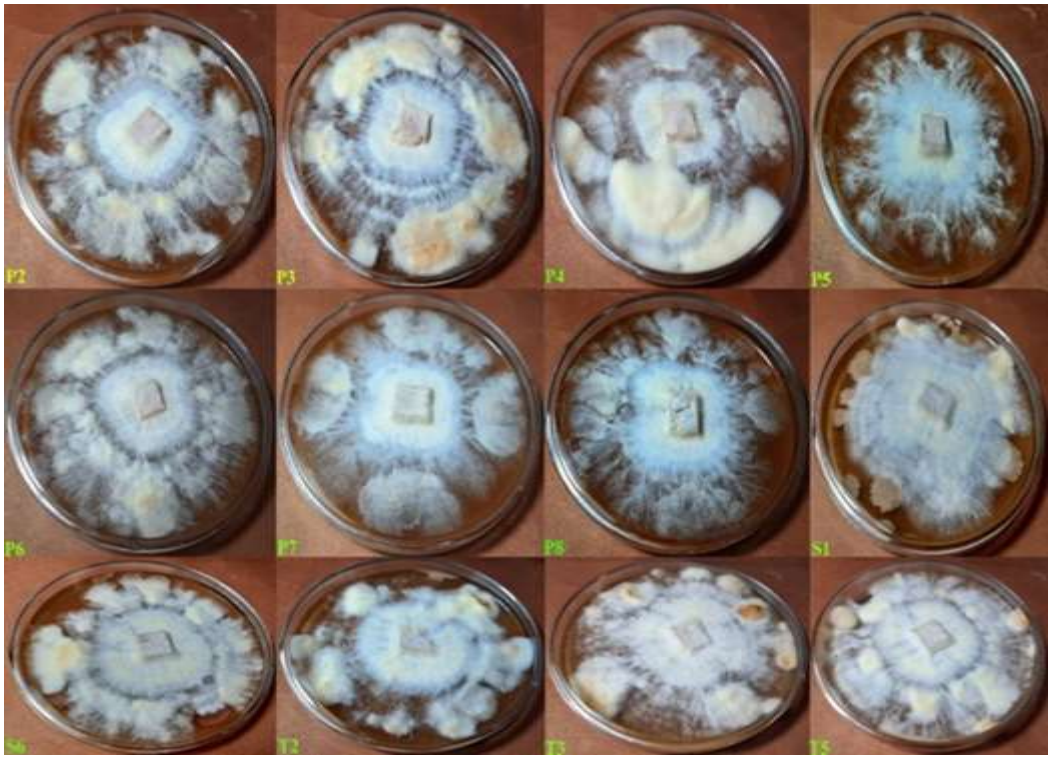
شکل ۱- انتخاب محیط کشت مناسب برای رشد بهینه قارچ و باکتری

پس از انتخاب محیط کشت مناسب، اثر باکتری‌های جداشده از ریزوسفر بر تحریک رشد میسیلیوم‌های قارچ دکمه‌ای *Agaricus bisporos*- A15 در پلیت مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد، از مجموع ۲۰ سویه باکتری منتخب از کلکسیون میکروبی بخش تحقیقات بیولوژی و بیوتکنولوژی موسسه تحقیقات خاک و آب، بیشترین صفت تحریک‌کنندگی رشد هیف‌های قارچ دکمه‌ای به باکتری‌های سودموناس تعلق یافت (شکل ۲ تا ۴). درواقع، همه سویه‌های منتخب بعد از پنج تا نه روز کاملاً با هیف‌های قارچ دکمه‌ای پوشیده شد. رشد هیف‌ها در سطح محل کلنی‌های باکتری‌ها به‌طور محسوسی بیش از دیگر بخش‌های پلیت بود و حرکت هیف‌های قارچ به محل کلنی‌های سودوموناس به‌طور مشهودی قابل‌ملاحظه بود (شکل ۲). به‌نظر می‌رسد حرکت هیف‌های قارچ به‌طرف کلنی‌های باکتری، به دلیل تبادلات بیوشیمیایی بین آن‌ها به روش شیمیوتاکتیک باشد. در محل‌های تلاقی باکتری‌ها و هیف‌های قارچ دکمه‌ای، قطره‌هایی(کپسول مانند) حاوی مواد چسبناک با رنگ روشن همانند قطره اشک قابل‌رؤیت بود که ماهیت این مواد مترشحه تاکنون شناخته‌نشده است.



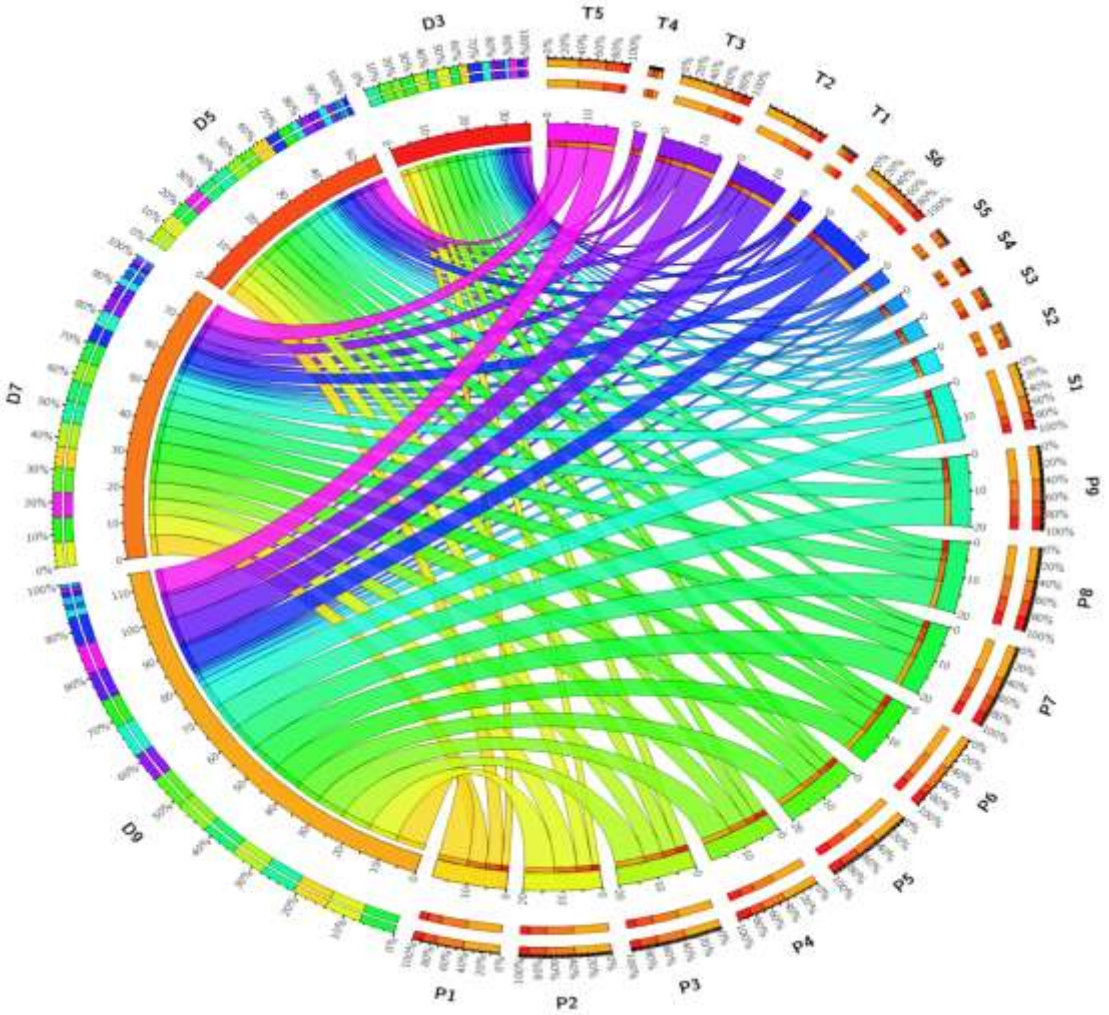
شکل ۲- اثر محرکی سودوموناس سویه P8 بر رشد هیف‌های قارچ دکمه‌ای (راست)، رشد هیف‌های قارچ به‌طرف کلنی باکتری P8 در محیط کشت مشترک (چپ)

تیمارهای سری S و T نیز دارای اثرات تحریک‌کنندگی بر رشد هیف‌های قارچ دکمه‌ای بودند ولی در مقایسه با گونه‌های باکتری‌های جنس سودوموناس در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. تجربه نشان داده است، گاهی نتایج حاصل از بررسی بر روی پلیت در شرایط سالن قارچ و یا شرایط شبیه‌سازی‌شده می‌تواند کمی متفاوت باشد، چون میکروارگانیسم‌ها در شرایط طبیعی ممکن است رفتار متفاوتی از خود بروز دهند. در(شکل۳) اثرات محرک رشدی هر جنس باکتری در طول نه روز به‌صورت تصویری به نمایش درآمده است.



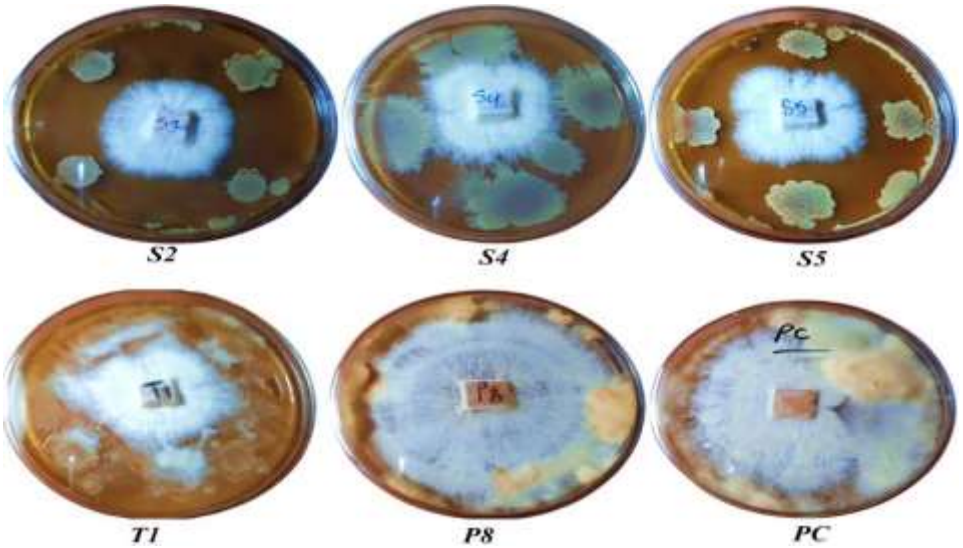
شکل ۳- اثرات محرک رشدی تعدادی از باکتری‌های منتخب سری T، S و P بر رشد هیف قارچ دکمه‌ای در نه روز پس از کشت

رشد هیف‌ها در مدت نه روز و در چهار بار اندازه‌گیری در روزهای سوم، پنجم، هفتم و نهم بر حسب میلی‌متر به‌صورت درصد نشان داده‌شده است (شکل ۴). در این بازه تیمارهای قارچ/باکتری، باکتری‌های جنس سودوموناس بیشترین اثر را برافزایش سرعت رشد هیف قارچ دکمه‌ای داشتند و توانستند به‌صورت حداکثری باعث افزایش رشد میسیلیوم‌های قارچ خوراکی شوند. سویه‌های سری S شامل S1 و S6 نیز ازجمله تیمارهای بسیار مؤثر بودند که به‌طور قابل قبولی رشد میسیلیوم‌های قارچ خوراکی را تحریک و باعث افزایش رشد قارچ شدند. از میان سویه‌های سری T، ایزوله‌های T2، T3 و T5 جزء سویه‌های مؤثر در افزایش رشد میسیلیوم‌های قارچ خوراکی شناسایی شدند که ارزش زیادی ازنظر علمی و تجاری دارد. ذکر این نکته ضروری است که سایر سویه‌ها شامل S2، S5، T1 و T4 اثرات مهارکنندگی بر رشد قارچ خوراکی داشتند و باعث مهار و عدم تحرک رشدی میسیلیوم‌های قارچ شدند (شکل ۴).



شکل ۴- رشد کلنی قارچ دکمه ای سویه A15 بر حسب میلی‌متر در مدت ۹ روز (اندازه‌گیری رشد هیف‌های قارچ در روزهای سوم D3، پنج D5، هفتم D7 و نهم D9)، تحت تاثیر حضور سویه‌های باکتریایی(P1تاP9 سویه های سودوموناس، S1 تا S6 سویه های باسیلوس سوبتلیس و T1 تا T5 سویه های باسیلوس تورنجینسیس) در مقایسه با سویه برتر P8 و شاهد بدون باکتری

اثر زیست مهارگری سویه‌های بازدارنده رشد میسیلیوم‌های قارچ خوراکی در مقایسه با یک تیمار سویه محرک رشد و کنترل (بدون اعمال تیمار باکتریایی) هفت روز پس از کشت موردبررسی قرار گرفت. میسیلیوم‌های قارچ در مجاورت با باکتری‌های هدف به دلیل صفات زیست مهارگری آن‌ها، رشد بسیار ضعیفی در مقایسه با تیمار شاهد و تیمارهایی با حداکثر رشد داشتند (شکل ۵). این باکتری‌ها باوجود قدرت زیست مهارگری بر روی قارچ‌های بیماری‌زا، در کشت قارچ دکمه‌ای استفاده نشدند، زیرا در این پژوهش هدف شناسایی باکتری‌های زیست مهارگری و انتخاب باکتری‌ها محرک رشد بود تا باکتری‌ها اثر منفی بر رشد هیف‌های قارچ خوراکی نداشته باشند.

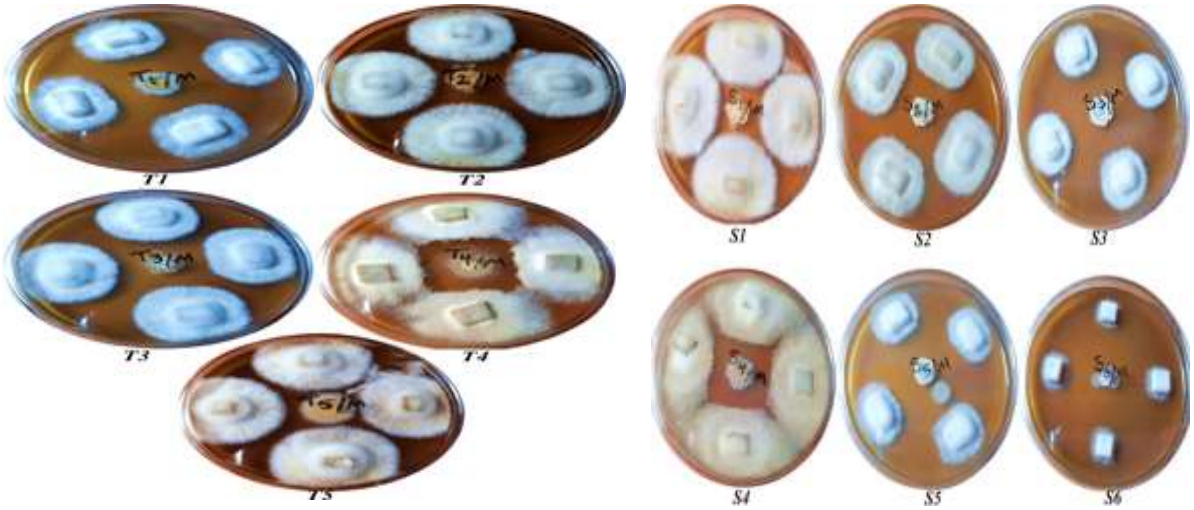


شکل ۵- عدم رشد میسیلیوم‌های قارچ دکمه‌ای *Agaricus bisporos*- A15 در مجاورت تعدادی از سویه‌های *B. subtilis* و سویه T1 *B. thuringiensis* در مقایسه با تیمار شاهد (PC) و تیمار مؤثر سودوموناس (P8) هفت روز پس از کشت

در مرحله دوم آزمایش، اثرات مهارکنندگی باکتری‌های موردبررسی بر روی عوامل معمول بیماری‌زای قارچ خوراکی شامل قارچ مایکوگون (*Mycogone perniciosa*)، تریکودرما (*Trichoderma aggressivum*) و ورتیسیلیوم (*Lecanicillium fungicola*) مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس یافته‌های بخش آزمایشگاهی، از بین نه سویه سودوموناس موردبررسی هشت سویه سودوموناس قادر به کنترل هیچ‌کدام از عوامل بیمارگر قارچی نبودند، تنها سویه P9 به‌صورت خیلی ضعیف اثرات مهارکنندگی بر روی قارچ ورتیسیلیوم از خود نشان داد که چندان قابل‌توجه نبود و لذا نتایج کمی آن در این مقاله آورده نشده است. نتایج تجزیه واریانس برای اثر بیوکنترلی ۲۰ سویه سری P (نه سویه)، S (شش سویه) و T (پنج سویه) در هر دو قارچ تریکودرما و مایکوگون نشان داد، تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد بین سویه‌ها وجود داشت و سویه‌های سری S و P به ترتیب ۷/۳ و ۳/۴ برابر در کنترل قارچ تریکودرما موفق‌تر از سویه‌های سری P عمل کرده‌اند. در حالی اثر سویه‌های سری S و P در بیوکنترل قارچ مایکوگون به ترتیب ۶/۷ و ۵/۶ برابر سویه‌های سری P بود. در ارزیابی اثر بیوکنترلی سویه‌ها در هر دو قارچ میانگین سویه‌های S از لحاظ آماری در کلاس برتر قرار گرفت و در کنترل قارچ‌های تریکودرما و مایکوگون به ترتیب ۲/۲ و ۱/۲ برابر از سویه‌های T موفق‌تر عمل نمود (جدول ۱ و شکل ۷الف و ب). بنابراین نتایج، سویه‌های باکتری سری P که دارای حداکثر اثرگذاری در تحریک رشد میسیلیوم‌های قارچ خوراکی بودند، قادر به کنترل سویه‌های بیمارگر نیستند. در حالی که سویه‌های سری S که اثرات تحریک‌کنندگی رشدی خیلی قابل‌توجهی از خود نشان نداده بودند، رشد قارچ‌های بیمارگر را به‌طور مؤثری کنترل نمودند (شکل ۶ و شکل ۷الف و ب). سویه‌های سری T نیز که در مقایسه با سویه‌های سری S دارای قدرت تحریک‌کنندگی رشد میسیلیوم قارچ دکمه‌ای در مرحله آزمایشگاهی بودند، اثرات متوسط تا قوی مهارکنندگی بر روی سه قارچ بیمارگر عامل بیماری‌های سالن قارچ از خود نشان دادند. به دلیل اینکه اغلب گونه‌های *باسیلوس تورنجینسیس* به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک لارو حشرات مطرح هستند، اثرات این باکتری‌ها در تحریک رشد هیف قارچ و اثرات زیست مهارگری آن‌ها قبلاً در مطالعات چندان موردتوجه قرار نگرفته بود و در این مطالعه برای اولین بار موردبررسی قرار گرفت. همچنان که به‌وضوح نشان داده شد، بیشترین اثرات بیوکنترلی سویه‌های سری S و T بر روی قارچ مایکوگون بود،

(شکل۶) این باکتری‌ها تا روز ۱۶ام آزمایش مقاومت خود را حفظ کردند و در کنترل قارچ تریکودرما و مایکوگون هیچ باکتری سری P موفق نبود (شکل ۷الف و ب). اثرات بیوکنترلی سویه P6 در مقایسه با سایر باکتری‌های موردبررسی بسیار محدود است. بیشترین اثر بیوکنترلی برای سویه S3 بر روی قارچ تریکودرما (شکل ۷الف) و سویه S6 بر روی قارچ مایکوگون (شکل ۷ب) مشاهده شد.

حداکثر قطر هاله کلونی مهاری برای دو سویه یادشده برابر با ۲۰ میلی‌متر در مدت ۱۶ روز بود. کمترین اثر بیوکنترلی در قارچ تریکودرما و مایکوگون به ترتیب مربوط به سویه‌های T3 و T5 بود (شکل ۷الف و ب).

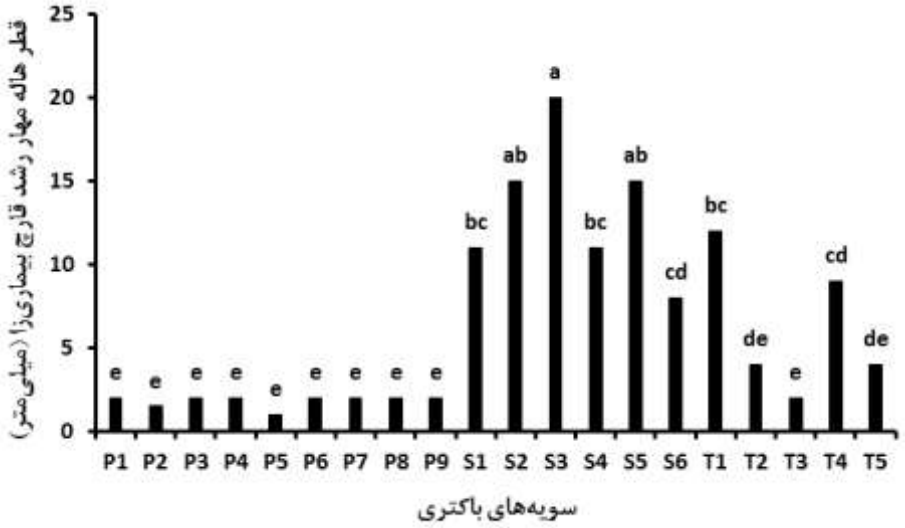


شکل ۶- تأثیر زیست‌مهارگری سویه‌های *B. subtilis* (راست) و *B. thuringiensis* (چپ) بر قارچ بیماری‌زای مایکوگون (*M. perniciosa*)

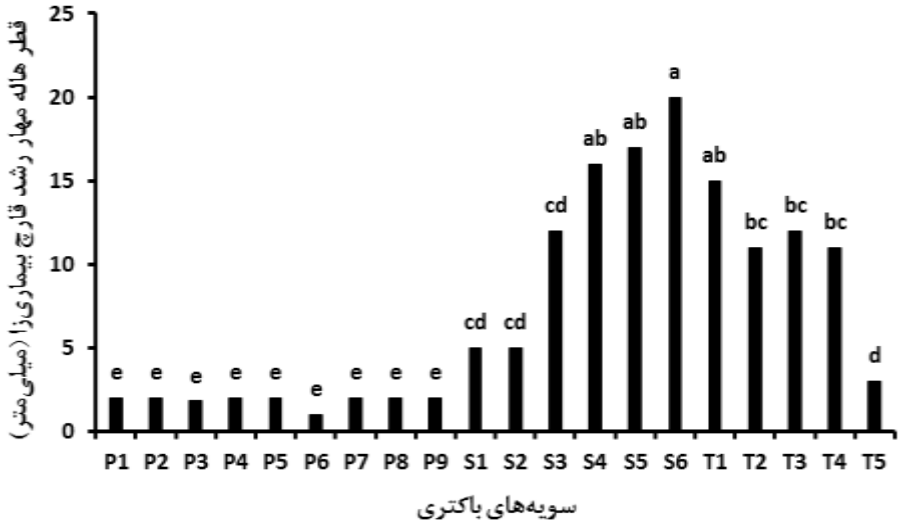
جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس اثرات کنترل بیولوژیک باکتری‌ها بر دو قارچ بیماری‌زای مایکوگون و تریکودرما

منابع تغییر	درجه آزادی	میانگین مربعات	
		تریکودرما	مایکوگون
جدایه باکتری	۱۹	۱۰۱/۵**	۱۱۹/۴**
خطا	۴۰	۱۲/۸	۲۱/۱
ضریب تغییرات (درصد)	-	۵/۵	۶/۲

(الف)

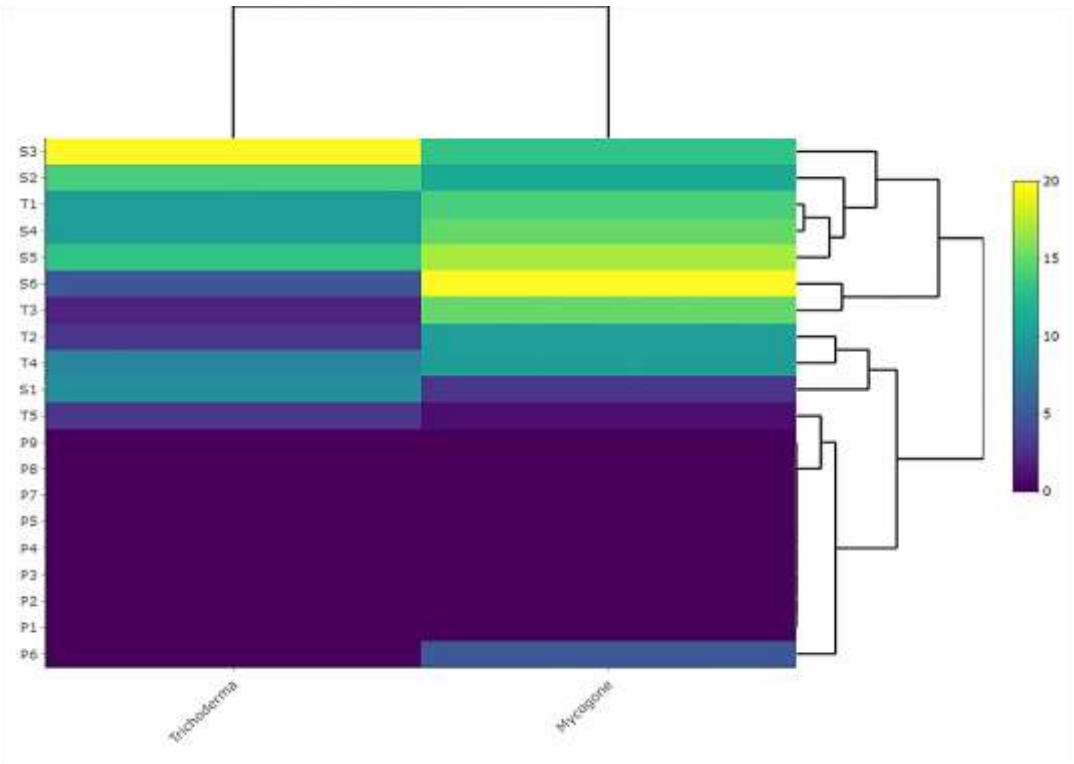


(ب)



شکل ۷ – اثرات زیست مهارگری باکتری‌ها پس از ۱۶ روز کشت بر قارچ بیماری‌زای تریکودرما (الف) و مایکوگون (ب)

حداکثر قطر هاله کلونی به تفکیک دو قارچ بیماری‌زا (تریکودرما و مایکوگون) و سویه‌های موردبررسی در دامنه ۰ تا ۲۰ میلی‌متر و گروه‌بندی آن‌ها در (شکل ۸) نشان داده‌شده است. درمجموع بر اساس نتایج به‌دست‌آمده به نظر می‌رسد، سویه‌های موردبررسی بیشترین اثر مهارگری را بر روی قارچ مایکوگون داشته و تنوع ژنتیکی سویه‌ها، میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در ساختار جمعیت آن‌ها و همچنین جمعیت احتمالی سویه‌ها می‌تواند به‌عنوان فاکتورهای تأثیرگذار در میزان ظهور اثرات بیوکنترلی باشد.



شکل ۸- اثرات بیوکنترلی سویه‌های موردبررسی بر روی دو عامل بیمارگر قارچی (مایکوگون و تریکودرما) پس از ۱۶ روز به تفکیک هر سویه (اطلاعات بر اساس قطر هاله/کلنی در واحد میلی‌متر است). سمت چپ سویه های باکتری مورداستفاده و در سمت راست اشل رنگی(بنفش تا زرد) که زرد بیشترین بیبوکنترلی به قطر هاله مهار ۲۰ میلی متر را نشان می‌دهد که اغلب باکتری‌های باسیلوس سوبتلیس در کلاستر موثر در کنترل مایکوگون و تریکودرما قرار گرفته‌اند و اغلب دارای رنگ روشن (زرد) هستند. در کلاستر بعدی باسیلوس تورنجینسیس و در کلاستر پایین سودوموناس ها قرار گرفته است

بحث و نتیجه‌گیری

تولید قارچ دکمه‌ای ناشی از فرایند بسیار پیچیده تعاملات زیستی، بیوشیمیایی، شیمیایی، فیزیکی و فیزیولوژیک در بستر کشت قارچ است. تولید آن از مراحل مختلف تهیه کمپوست تا رشد هیف در بستر کشت و خاک‌پوششی تحت تأثیر میکروارگانیسم‌ها قرار دارد. به‌همین دلیل بدون شناخت این عوامل مؤثر، امکان تولید قارچ دکمه‌ای وجود ندارد. به دلیل تأثیرات شدید فلور میکروبی بستر بر تولید قارچ دکمه‌ای، تولید آن در بستر کشت استریل ممکن نیست. درواقع محصول قارچ تولیدی حاصل تعاملات بین انواع مختلفی از باکتری‌ها، قارچ‌ها و اکتینومیست‌ها در محیط غنی از مواد آلی و عناصر غذایی است (فری کلت و همکاران، ۲۰۱۱ و کرتاز و تای، ۲۰۱۸). برای مطالعه این روابط پیچیده و چندجانبه، چاره‌ای جزء ساده‌سازی فرایندها در آزمایشگاه نیست و لذا در این تحقیق اثرات گونه‌های منتخبی از دو جنس سودوموناس و باسیلوس در شرایط آزمایشگاهی به بوته آزمایش گذاشته شد و معلوم شد که باکتری‌های مورداستفاده دارای پتانسیل متفاوتی بوده و در تعامل با قارچ و حتی در ارتباط با انواع باکتری‌ها نیز واکنش‌های قابل پیش‌بینی و گاهی غیرقابل‌پیش‌بینی از خود نشان می‌دهند. اگرچه تعداد معدودی از گونه‌های سودوموناس دارای پتانسیل بیماری‌زایی در کلاهک قارچ هستند ولی گونه‌های مفید

انتخاب‌شده عامل تحریک و افزایش رشد هیف و پین‌زایی بوده و عامل مؤثری برای افزایش رشد میسیلیوم و حتی کنترل بعضی از بیماری‌ها (به ویژه ناشی از دیگر گونه‌های بیماری‌زای سودوموناس) هستند (شاموگام و کورتر ۲۰۲۲، تاسیلویلوا و همکاران، ۲۰۲۲، سائوبنووا و همکاران، ۲۰۲۳). به نظر محققین، باکتری‌ها با افزایش رشد میسیلیوم‌ها و حجم آن‌ها، ضمن افزایش تجزیه مواد آلی موجود در بستر، دسترسی هرچه بیشتر به مواد غذایی را افزایش داده و بستر قارچ را برای قارچ اختصاصی می‌نمایند (سائوبنووا و همکاران، ۲۰۲۳). استفاده از کودهای زیستی به‌عنوان مایه تلقیح، ابزاری مؤثر برای مدیریت تولید در سالن‌های قارچ به شمار می‌آیند. به دلیل آمادگی بستر کشت قارچ برای رشد انواع قارچ‌های ساپروفیت فرصت‌طلب و گاهی بیماری‌ها، لازم است عوامل کنترل بیولوژیک قوی در کنار باکتری‌های محرک رشد برای مهار این آلودگی‌ها تدارک شده و همراه با باکتری‌های محرک رشد استفاده شوند (ناین که و همکاران، ۲۰۲۲ و بوچنر و همکاران، ۲۰۲۲). در غیر این صورت موفقیتی از مصرف مایه تلقیح‌های طراحی‌شده حاصل نخواهد شد. همچنان که در این تحقیق معلوم شد، باوجود محرک رشد بودن گونه‌های سودوموناس مورداستفاده، آن‌ها به‌طور مؤثری قادر به مهار زیستی قارچ‌های بیماری‌زا نبودند. همچنین معلوم گردید، بعضی از سویه‌های باسیلوس با پتانسیل قوی زیست‌مهارگری علیه قارچ‌های بیماری‌زا، داری پتانسیل محرک رشد برای تکمیل اثرات سودوموناس در بستر کشت قارچ دکمه‌ای نیز هستند. به دلیل دمای مناسب بستر کشت قارچ و بوی جلب‌کننده ناشی از مواد آلی در حال تجزیه (به‌ویژه به دلیل استفاده از کود مرغی به‌عنوان مکمل منبع نیتروژن و عناصر غذایی در تهیه کمپوست قارچ) و مواد متصاعد شده از رشد هیف‌های قارچی، همیشه حشرات کودزی و همچنین هیف‌خوار جلب بستر کشت می‌شوند. درصورتی‌که مایه تلقیح‌های کودهای زیستی عاملی برای کنترل این معضل داشته باشد، مایه تلقیح بسیار موفقی خواهد بود. نتایج این تحقیق نشان داد، از بین سویه‌های *B. subtilis* موردبررسی، سویه‌های S3، S6 و از بین سویه‌های *B. thuringiensis* سویه‌های T1، T2 و از بین جنس سودوموناس همه سویه‌ها به‌ویژه سویه‌های P9، P8، P7 و P6 می‌توانند کاندیدهای مناسبی برای حضور در مایه تلقیح ترکیبی (کنسرسیوم) در کشت قارچ باشند. این تحقیق نشان داد که گونه‌هایی از باکتری *باسیلوس تورنجینسیس* علاوه بر توان کنترل لارو حشرات (ایرانمنش و همکاران، ۱۳۸۹)، دارای توان تحریک رشد هیف‌های قارچ را داشته و قابلیت حضور در کنسرسیوم مایه تلقیح مخصوص قارچ خوراکی را دارد. حتی آن‌ها به‌عنوان باکتری محرک رشد نیز می‌توانند مورداستفاده قرار گیرند. برتری استفاده از کنسرسیوم باکتری‌ها به‌جای استفاده از تک سویه‌ها در انواع مایه تلقیح‌های تجاری به دلیل مزایای زیادی که دارد در بررسی‌های متعددی مورد تائید قرارگرفته است (رخزادی و همکاران، ۲۰۰۸، سینیواساگان و همکاران، ۲۰۲۱). البته برای اثبات نهایی نتایج حاصل از این پژوهش لازم است آزمایش در ابعاد بزرگ‌تر و در شرایط سالن‌های قارچ نیز تکرار و تائید گردد تا بتوان از این پتانسیل به‌عنوان مایه تلقیح کودزیستی در تولید قارچ دکمه‌ای در مقیاس صنعتی نیز بهره‌برداری نمود.

سپاسگزاری

این مقاله مستخرج از پروژه مشترک موسسه تحقیقات خاک و آب (سازمان تحقیقات،آموزش و ترویج کشاورزی) با تأمین اعتبار توسط شرکت قارچ سحر است. از حمایت‌های مالی شرکت قارچ سحر و حمایت‌های آزمایشگاهی و نیروی انسانی موسسه تحقیقات خاک و آب (بخش تحقیقات بیولوژی خاک) تشکر می‌گردد.

فهرست منابع

۱. ایرانمنش، ع.ر.، کرمی، م.، عبدالوند، ی. (۱۳۸۹). کنترل بیولوژیکی آفات گیاهی با استفاده از *Bacillus thuringiensis* و *Bacillus popilliae* به‌عنوان آفت‌کش زیستی. سیزدهمین همایش ملی بهداشت محیط. ۱۱ آبان ۱۳۸۹، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان.

۲. خبازجلفایی، ح.، محمدی گل‌تپه، ا.، رحیمیان، ح. (۱۳۸۴). جداسازی، انتخاب و ارزیابی باکتری‌های آنتاگونیست، در کنترل بیولوژیک بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی دکمه‌ای . بیماری‌های گیاهی، جلد ۴۱. ص ۵۵۹ -۵۴۳.

۳. نمازی، ز.، حسن‌زاده، ن.، رزمی، ج. (۱۳۹۴). اولویت‌بندی مبارزه با پاتوژن‌های تهدید کننده قارچ خوراکی دکمه‌ای *Agaricus bisporus* با استفاده از مدل AHP. سومین همایش ملی گیاهان دارویی و کشاورزی پایدار، ۲۱ خرداد ۱۳۹۴، دانشکده شهید مفتح، همدان.

4. Büchner, R., Vörös, M., Allaga, H., Varga, A., Bartal, A., Szekeres, A., Varga, S., Bajzát, J., Bakos-Barczi, N., Misz, A., Csutorás C., Hatvani L., Csaba Vágvölgyi C. and Kredics. L., 2022. Selection and Characterization of a Bacillus Strain for Potential Application in Industrial Production of White Button Mushroom (Agaricus bisporus). Agronomy. 12, 467. https://doi.org/10.3390/agronomy12020467
5. Coello-Castillo M.M., Sánchez, J.E., Royse, D.J. (2009). Production of *Agaricus bisporus*on substrates pre-colonized by *Scytalidium thermophilum* and supplemented at casing with protein-rich supplements. Bioresour Technol 100(19):4488–4492. https ://doi.org/10.1016/j.biort ech.2008.10.061
6. Eastwood DC, Herman B, Noble R, Dobrovin-Pennington A, Sreenivasaprasad S, Burton KS (2013). Environmental regulation of reproductive phase change in *Agaricus bisporus* by 1-octen-3-ol, temperature and CO2. Fung Genet Biol 55:54–66. https://doi.org/ 10.1016/j.fgb.2013.01.001
7. Fermor, T.R., Wood, D.A., Lincoln, S.P., and Fenlon, J.S. (1991). Bacteriolysis by *Agaricus bisporus*. Journal of General Microbiology, 137, 15-22
8. Finkel1, O. M., Castrillo. G., Paredes, S.H., Gonza´, I.S., and Dangl, J.L., (2017). Understanding and exploiting plant beneficial microbes. Current Opinion in Plant Biology, 38:155–163
9. Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M. and Sarniguet, A. (2011). Bacterial-Fungal Interactions: Hyphens between Agricultural, Clinical, Environmental, and Food Microbiologists. Microbiology and Molecular Biology Reviews. p. 583–6
10. Hayes WA (1968). Microbiological changes in composting wheat straw/horse manure mixtures. Mushroom Sci 7:173–186
11. Jadhav AC, Shinde DB, Nadre SB, Deore DS (2014). Quality improvement of casing material and yield in milky mushroom (*Calocybe indica*) by using biofertilizers and different substrates. In: Proceedings of 8th international conference on mushroom biology and mushroom products (ICMBMP8). ICAR-Directorate of Mushroom Research, Solan, India. pp 359–364
12. Jurak E, Punt AM, ArtsW, Kabel MA, Gruppen H (2015). Fate of carbohydrates and lignin during composting and mycelium growth of *Agaricus bisporus* on wheat straw based compost. PLoS One10(10):e0138909.https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138909

13. Kertesz MA and Thai M (2018). Compost bacteria and fungi that influence growth and development of *Agaricus bisporus* and other commercial mushrooms. Appl Microbiol Biotechnol 102:1639–1650. https ://doi.org/10.1007/s0025 3-018-8777-z
14. Kumar, B., Kumari, C., and Kumar, M., 2018. Effect of Bio-Fertilizers on Mycelial Growth and Physical Properties of White Button Mushroom *Agaricus bisporus* [(Lange) Imbach]. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.Vol. 7 Number 02. https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.702.267
15. Montealegre, J.R., Reyes, R., Pérez, L.M., Herrera, R., Silva, P., Besoain, Z., 2003. Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of Rhizoctonia solani in tomato. Electronic Journal of Biotechnology . DOI: 10.4067/S0717-34582003000200006
16. Natvig, DO, Taylor JW, Tsang A, Hutchinson MI, Powell AJ (2015). *Mycothermus thermophilus* gen. et comb. nov., a new home for the itinerant *thermophile Scytalidium thermophilum (Torula thermophila*). Mycologia 107(2):319–327. https ://doi.org/10.3852/13-399
17. Nienke, B., Margot, C., Koster, W€osten, H.A.B. 2022. Beneficial interactions between bacteria and edible mushrooms. Fungal Biology Reviews 39, 60-72
18. Noble R, Dobrovin-Pennington A, Hobbs PJ, Pederby J, Rodger A. (2009). Volatile C8 compounds and pseudomonads influence primordium formation of *Agaricus bisporus*. Mycologia 101(5):583–591. https://doi.org/10.3852/07-194
19. Payapanon A, Suthirawut S, Shompoosang S, Tsuchiya K, Furuya N, Roongrawee P, Kulpiyawati T, Somrith A (2011). Increase in yield of the straw mushroom (*Vovariella volvacea*) by supplement with *Paenibacillus* and *Bacillus* to the compost. J Faculty Agric Kyushu University 56:249–254
20. Pratiksha K, Narute TK, Surabhi S, Ganesh A, Sujoy S (2017). Effect of liquid biofertilizers on the yield of button mushroom. J Mycopathol Res .55:135–141
21. Robinson.A.J., House.G.L., Morales.D.P., Kelliher.J.M., Gallegos-Graves.L.V., LeBrun.E.S., Davenport.K.W., Palmieri.F., Lohberger.A., Bregnard.D., Estoppey.A., Buffi.M., Paul.C., Junier.T., Hervé.V., Cailleau.G., Lupini.S., Nguyen.H.N., Zheng.A.O., Gimenes.L. J, Bindschedller. S., Rodrigues.D.F., Werner.J.H., Young.J.D., Junier.P., and Chain.P.S.G., 2021. Widespread bacterial diversity within the bacteriome of fungi. COMMUNICATIONS BIOLOGY 4:1168. https://doi.org/10.1038/s42003-021-02693-y
22. Rokhzadi, A., Asgharzadeh, A., Darvish, F., Nour Mohammadi, G., Majidi, E., 2008. Influence of plant –promoting rhizobacteria on dry matter accumulation and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under field condition. American-Eurasian J.Agric.and Environ. Sci. 3(2) 253-257
23. Saghafi, K, Ahmadi, J., Asgharzadeh, A., Roknizadeh, H., Hosseini Mazinani, SM., 2019. Characterization of Pseudomonas fluorescens bacteria isolated from Olea europaea rhizosphere in Saline Soils. *Journal of Sol Biology* 7(1), 13-27.
24. Saubenova, M., Oleinikova, y., Sadanov, A., Yermekbay, Z., Bokenov, D., Shorabaev, Y. 2023. The input of microorganisms to the cultivation of mushrooms on lignocellulosic waste. AIMS Agriculture and Food, 8(1): 239–277. DOI: 10.3934/agrfood.2023014
25. Seenivasagan, R., Babalola, O.O. Utilization of Microbial Consortia as Biofertilizers and Biopesticides for the Production of Feasible Agricultural Product. 2021. Biology.10, 1111. https:// doi.org/10.3390/biology10111111
26. Shamugam, S., Kertesz, M.A. 2022. Bacterial interactions with the mycelium of the cultivated edible mushrooms Agaricus bisporus and Pleurotus ostreatus. Journal of Applied Microbiology, 134, 1–10, https://doi.org/10.1093/jambio/lxac018
27. Tarkka, M. T., A. Sarniguet, and P. Frey-Klett.(2009). Inter-kingdom encounters: Recent advances in molecular bacterium-fungus interactions. Curr. Genet. 55:233–243.

28. Tsivileva, O., Shaternikov, A., Ponomareva, E. 2022.Edible mushrooms could take advantage of the growth – promoting and biocontrol potential of azosperillum. PROCEEDINGS OF THE LATVIAN ACADEMY OF SCIENCES. Section B, Vol. 76, No. 2 (737), pp. 211–217. DOI: 10.2478/prolas-2022-0032
29. Vos AM, Heijboer A, Boschker HTS, Bonnet B, Lugones LG, Wosten HAB (2017). Microbial biomass in compost during colonization of *Agaricus bisporus*. AMB Express 7(1):7. https://doi.org/10.1186/s13568-016-0304-y
30. Young, L.S., Chu, J.N., Asif Hameed, A., and Young, C.C., (2013). Cultivable mushroom growth‐promoting bacteria and their impact on *Agaricus blazei* productivity. Pesq. Agropec. bras., Brasília, v.48, n.6, p.636-644, DOI: 10.1590/S0100-204X2013000600009
31. Zhang CH, Huang T, Shen CH, Wang XT, Qi YC, Shen JW, Song AD, Qiu LY, Ai YC (2016). Downregulation of ethylene production increases mycelial growth and primordia formation in the button culinary-medicinal mushroom, *Agaricus bisporus* Agarico mycetes). Int J Med Mushrooms 18(12):1131–1140. https://doi.org/10.1615/IntJMedMushrooms.v18.i12.80

Impact of plant growth-promoting bacteria on the growth of button mushroom hyphae and control of pathogenic factors under in vitro conditions

A. Asgharzadeh, K. Saghafi, E. Fattahifar, M. Jenaghi and N. Alizadeh

Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). **a_asgharzadeh_2000@yahoo.com**

Soil and Water Research Institute (SWRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO). **saghafi.varesh@gmail.com**

Greenhouse and Mushroom affairs; Deputy of Horticulture; Ministry of Agriculture Jahad, Iran. **elfa57food@yahoo.com**

Sahar Mushroom Company, Hashtgerd, Iran. **sahsar63mashrom@gmail.com**

Expert in Soil Biology and Biotechnology Research Department, Soil and Water Research Institute (Agricultural Education and Extension Research Organization), Karaj, Iran. **nena_twens@yahoo.com**

Received: February 1, 2024 and Accepted: January 31, 2024

Abstract

The current average yield of button mushrooms is 17 to 20 kilograms per square meter. Increasing this yield to 22 to 27 kilograms per square meter could significantly enhance the economic viability and global competitiveness of mushroom production. Achieving this improvement requires a comprehensive understanding of the microbial dynamics in compost production and the nuanced nutrition of mushrooms, utilizing biological, organic, and chemical enhancers. A recent study utilized nine leading strains of the Pseudomonas genus, six strains of *Bacillus subtilis*, and five strains of *Bacillus thuringiensis* to promote growth and biocontrol capabilities. While no significant differences were observed among the strains, all Pseudomonas strains were found to effectively stimulate button mushroom mycelium growth, with strain P8 exhibiting the most pronounced growth enhancement properties. Additionally, *Bacillus subtilis* strains S1 and S6 significantly boosted mycelium growth, and *Bacillus thuringiensis* strains T2, T3, and T5 supported mycelium growth. However, some strains (S2, S5, T1, and T4) inhibited button mushroom growth in certain mediums (PDA/NA + Extract medium). The most notable biocontrol effects were by strain S3 against the *Trichoderma* and strain S6 against the *Mycogone* fungus, each inhibiting growth with a maximum colony zone diameter of 20 millimeters, whereas strain T5 showed the least biocontrol effect. Given the beneficial and diverse effects exhibited by the species from the two genera studied, these findings suggest that employing a consortium of these bacteria as a biofertilizer could significantly enhance button mushroom production outcomes.

Keywords: Biofertilizer, Mushroom, Plant growth promoting bacteria (PGPR), Synergy

Corresponding author's email: **a_asgharzadeh_2000@yahoo.com**