نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، ص. ۲۸۶-۲۷۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No.2, Summer 2018, P. 273-286
ISSN: 2008 - 4730

بررسی تأثیرجدایه‌های باکتری *Pseudomonas putida* بر عملکرد قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)

مجتبی لطفی[۱]- محمد فارسی[۲*]- امین میرشمسی کاخکی[۳]- جواد جانپور[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۲/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۰۱

چکیده

القای تشکیل ساختار ته‌سنجاقی در قارچ *Agaricus bisporus* به طور خاص، با کاهش دما و غلظت دی‌اکسیدکربن در حضور باکتری‌های موجود در خاک پوششی از جمله باکتری *Pseudomonas putida* انجام می‌شود. این باکتری می‌تواند به عنوان محرک رشد بر روی عملکرد قارچ دکمه‌ای نیز تأثیر بگذارد. در این پژوهش ۸۱ جدایه باکتری از نمونه‌های خاک پوششی ۶ مزرعه پرورش قارچ خوراکی در سال ۱۳۹۴ جداسازی شد و در نهایت ۳۳ جدایه که به عنوان باکتری *P. putida* شناسایی شدند، به خاک پوششی قارچ دکمه‌ای تلقیح گردیدند. نتایج آزمون‌های مزرعه‌ای نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی نسبت به تیمار شاهد (بدون اعمال باکتری) تأثیر معنی‌داری بر روی وزن تر و تعداد قارچ دارند ($p\leq0.05$)؛ به طوری که بیشترین وزن تر قارچ مربوط به تیمار جدایه‌های P27 وP13 به ترتیب به میزان ۳۶۱/۶۳، ۳۴۲/۸ گرم (تیمار شاهد ۱۴۶/۳۹ گرم) و بیشترین تعداد قارچ مربوط به تیمار جدایه‌های P18 و P24 به ترتیب با ۲۱ و ۲۰/۸۳ عدد (تیمار شاهد ۸/۵۰ عدد) بر کیلوگرم کمپوست بود. در مرحله بعد توان تولید سیدروفور، توان تولید هورمون IAA، فعالیت آنزیم ACC دآمیناز و توانایی انحلال فسفات نامحلول در جدایه‌ها ارزیابی و رابطه هرکدام از آن‌ها با تعداد و وزن تر قارچ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین میزان تولید هورمون IAA و وزن تر قارچ (r=۰/۵۸) و همچنین بین تولید هورمون IAA و تعداد قارچ (r=۰/۵۰) همبستگی معنی‌دار و مثبتی وجود دارد. پس می‌توان نتیجه گرفت که تولید IAA توسط باکتری ممکن است عامل تأثیرگذاری بر روی عملکرد قارچ دکمه‌ای باشد.

واژه‌های کلیدی: باکتری محرک رشد، خاک پوششی، عملکرد، هورمون IAA

مقدمه

قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید با نام علمی *Agaricus bisporus* به دلیل داشتن ارزش غذایی بالا و خواص دارویی متعدد (۵ و ۵۲)، جایگاه ویژه‌ای را در سبد غذایی مردم جهان به خود اختصاص داده است، اما متأسفانه متوسط عملکرد تولید این قارچ در کشور پایین‌تر از متوسط عملکرد در دنیاست (۱۴). در سال‌های گذشته علاوه بر اصلاح قارچ‌های دیگر (۶)، تلاش‌هایی در جهت تولید نژادهای پرمحصول در قارچ *A. bisporus* در کشور انجام گرفته است؛ از جمله استفاده از نشانگرهای مولکولی (۲۲ و ۳۱)، جمع‌آوری و شناسایی گونه‌های وحشی (۴۹) و بهینه‌سازی روش‌های مولکولی (۲۸) که تا به امروز منجر به تولید سه نژاد هیبرید تجاری پرمحصول قارچ دکمه‌ای (۱۴) شده است.

برای افزایش عملکرد قارچ خوراکی دکمه‌ای، در کنار کارهای اصلاحی، استفاده از مکمل‌ها و کودهای زیستی می‌تواند تأثیر زیادی بر روی سودآوری پرورش قارچ خوارکی داشته باشد (۴۷). مهمترین ریزجاندارانی که در تولیدکود زیستی کاربرد دارند، باکتری‌های محرک رشد گیاه[5] (PGPR) از جمله سودوموناس‌ها می‌باشند (۴۶) که در خاک پوششی مورد استفاده در پرورش قارچ *A. bisporus* وجود داشته و میانکنش‌هایی با میسیلیوم این قارچ دارند (۴۴ و ۶۱) و جمعیت غالب را در خاک پوششی خصوصاً در مرحله پین‌دهی به خود اختصاص می‌دهند (۱۰ و ۵۰).

از بین گونه‌های مختلف باکتری *Pseudomonas*، گونه *P. putida* نسبت به گونه‌های دیگر تأثیر بیشتری بر روی رشد میسلیوم

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استادیار، گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*-نویسنده مسئول: Email: Farsi@um.ac.ir)
۴- عضو هیأت علمی گروه پژوهشی زیست‌فناوری قارچ‌های صنعتی، جهاد دانشگاهی خراسان رضوی

DOI: 10.22067/jhorts4.v32i2.62530

5- Plant Growth Promoting Bacteria

قارچ خوراکی دکمه‌ای دارد (۳۸). این باکتری در بقیه مراحل رشد قارچ از جمله میوه‌دهی نقشی اساسی ایفا می‌کند (۱۰) و باعث افزایش عملکرد، وزن خشک و محتوای نیتروژن و پروتئین در این قارچ می‌شود (۳۳، ۵۰ و ۶۷). باکتری *P. putida* به عنوان یک باکتری محرک رشد، به واسطه تولید هورمون اکسین (IAA)، انحلال فسفات نامحلول، کاهش سطح مواد ممانعت‌کننده رشد از جمله هورمون اتیلن و همچنین تولید سیدروفور برای مقابله با میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا میانکنش‌هایی با میزبان خود دارد (۵۱). این مکانیسم‌ها در میانکنش میسلیوم قارچ دکمه‌ای با باکتری *P. putida* نیز قابل بررسی است و می‌تواند عامل افزایش عملکرد قارچ دکمه‌ای باشد.

پژوهش‌های انجام شده نشان می‌دهد که باکتری‌های تولید کننده IAA باعث افزایش وزن تر، وزن خشک، میزان پروتئین و افزایش تعداد قارچ *A. bisporus* در واحد سطح و قطر کلاهک آن می‌شوند (۱۲). از طرفی، باکتری *P. putida* از طریق تولید هورمون IAA باعث القای رشد در گیاهانی مانند گوجه فرنگی (۲۳)، شلغم (۴۳)، ماش (۳۷) و نخود (۴۲) نیز شده است. دیگر هورمون‌های گیاهی شامل ایندول استیک اسید و نفتالن استیک اسید نیز رشد میسلیوم قارچ‌های *Pleurotus sajor-caju* (۵۳) و *Pellinus linteus* (۲۴) را افزایش داده‌اند.

انحلال فسفات نامحلول توسط باکتری‌های محرک رشد برای دسترسی قارچ به فسفات نیزمی‌تواند یکی از راه‌های احتمالی افزایش رشد قارچ توسط باکتری باشد (۶۷). گیتای و وانگ (۱۶) با بررسی تأثیر سه باکتری دارای قابلیت حل‌کنندگی فسفات، شامل *Azotobacter chroococcum*، *Bacillus megaterium* و *P. striata* بر روی رشد میسلیوم قارچ *A. bisporus*، گزارش کردند که تأثیر گونه *P. striata* نسبت به دو باکتری دیگر چشمگیرتر بوده و بیشترین وزن خشک و تر میسلیوم قارچ *A. bisporus* از تیمار همزمان سه باکتری بدست آمده است.

مکانیسم دیگری که باکتری *P.putida* از طریق آن می‌تواند باعث افزایش رشد و عملکرد میزبان خود شود، کاهش سطح اتیلن می‌باشد. اتیلن به عنوان یک مهار کننده تقسیم سلولی و سنتز DNA (۸)، در قارچ *A. bisporus* در دو فاز رویشی و زایشی تولید می‌شود (۶۴) و مسیر بیوسنتز آن در این قارچ همانند گیاهان عالی (۱۹)، به واسطه ۱-آمینوسیکلوپروپن-۱-کربوکسیلیک اسید (ACC) می‌باشد (۹).

چن و همکاران (۹) اتیلن را یکی از کاندیداهای مهار رشد قارچ *A. bisporus* دانسته و نشان دادند که باکتری‌های *P. putida* به واسطه آنزیم ACC دآمیناز، با کاهش میزان ACC و در نتیجه کاهش سطح اتیلن در قارچ *A. bisporus* باعث رشد هیف می‌شوند؛ در حالی که تیمار باکتری‌های موتانتی که ACC دآمیناز را به میزان خیلی کمی تولید می‌کردند، مهار رشد هیف را به دنبال داشت. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که اتیلن مهار کننده رشد قارچ *A. bisporus* می‌باشد و باکتری *P. putida* با جذب و مصرف پیش‌ساز اتیلن باعث افزایش رشد میسلیوم قارچ خوراکی می‌شود.

باکتری *P. putida* از طریق تولید سیدروفور با کنترل میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و تسهیل جذب آهن باعث حفظ کیفیت محصول و افزایش عملکرد در میزبان می‌شود (۴). افزودن آهن به محیط کشت *A. bisporus* باعث القای تشکیل ساختارهای ته‌سنجاقی در این قارچ می‌شود (۲۴). همچنین سیدروفورهای تولید شده توسط سودوموناس‌های فلورسنس باعث کنترل باکتری بیمارگر *P. tolaasii* و قارچ‌های پارازیت *Sepedonium* sp.، *Verticillium* sp.، *Cladobotryum* sp.، *Fusarium* sp. و *Neurospora* sp. می‌شوند و از این طریق عملکرد قارچ *A. bisporus* را افزایش می‌دهند (۲۷ و ۶۳).

بررسی مکانیسم‌های مؤثر در افزایش رشد و عملکرد قارچ دکمه‌ای از طرف باکتری‌های محرک رشد توسط عبادی و همکاران (۱۲) انجام گرفته است. ایشان تأثیر ۹۰ ایزوله باکتری محرک رشد گیاهی (۶۰ ایزوله رایزوبیوم و ۳۰ ایزوله باکتری *P. florescense*) بر روی ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ *A. bisporus* مورد بررسی قرار دادند و پس از تقسیم باکتری ها به پنج دسته (باکتری‌های تولید کننده IAA، باکتری‌های تولید کننده ACC دآمیناز، باکتری‌های دارای قابلیت حل‌کنندگی فسفات، باکتری‌های تولید کننده سیدروفور و باکتری‌هایی که دارای تمام ویژگی‌های فوق را با هم داشتند)، گزارش کردند که از بین ۹۰ ایزوله، بیشترین عملکرد مربوط به باکتری‌های تولید کننده IAA با افزایش ۱۲/۷ درصدی در وزن تازه قارچ در مقایسه با شاهد و بیشترین مقدار ماده خشک، بیشترین تعداد قارچ و بیشترین میزان پروتئین مربوط به باکتری‌های دارای تمام ویژگی‌ها بود.

با توجه به ضرورت افزایش سودآوری واحدهای تولید قارچ دکمه‌ای به واسطه افزایش عملکرد و همچنین تولید غذای سالم و ارگانیک، استفاده از کودهای زیستی می‌تواند به عنوان راهکاری مهم و کارآمد جهت رسیدن به اهداف فوق مورد توجه قرار گیرد. بنابراین افزایش مطالعات در زمینه مکانیسم‌های تأثیر باکتری *P. putida* بر روی رشد و عملکرد قارچ دکمه‌ای که منجر به شناسایی جدایه‌های برتر باکتری با پتانسیل استفاده به عنوان کود زیستی می‌شود، ضروری به نظر می‌رسد و می‌تواند در آینده جنبه تجاری نیز به خود بگیرد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری از خاک و جداسازی پرگنه‌های باکتری *Pseudomonas* از نمونه‌های خاک

شش نمونه خاک پوششی از مزرعه‌های پرورش قارچ خوراکی

دکمه‌ای در مشهد جمع‌آوری و پس از انتقال به آزمایشگاه، به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق با هواخشک گردید. به منظور جداسازی باکتری از روش سری رقت‌های متوالی (تا رقت 10^{-3}) استفاده شد. جهت غربال‌گری باکتری‌های جنس *Pseudomonas* از محیط کشت LB حاوی N–لوریل سارکوزین سدیم سالت و تری‌متوپریم استفاده گردید (۶۷).

شناسایی باکتری‌های *P. putida* با استفاده آغازگر اختصاصی

جهت شناسایی باکتری *P. putida* از بین باکتری‌های *Pseudomonas* غربال شده، از روش کلونی PCR استفاده شد و آغازگرهای اختصاصی ژن کد کننده زیرواحد B آنزیم DNA جیراز (*gyr*B) شامل آغازگر رفت (*gyr*B_F) با توالی ´۳–TCACCTCCGAGGAAACCAGCTTG-´۵ و آغازگر برگشت (*gyr*B_R) با توالی ´۳–TCTGTTGTGAACGCCCTGTC-´۵ مورد استفاده قرار گرفت (۲۶).

چرخه حرارتی و مواد مورد نیاز جهت انجام PCR شامل چهار دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۳۴ چرخه شامل ۳۰ ثانیه واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال آغازگر به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۲۰ ثانیه گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود. برای بررسی نیز ژل آگارز یک درصد تهیه شد. در مجموع از بین ایزوله‌های شناسایی شده به عنوان باکتری *P. putida*، بر اساس نتایج آزمون PCR، ۳۳ ایزوله برای انجام بقیه مراحل آزمایش انتخاب گردید.

ارزیابی عوامل محرک رشد باکتری *P. putida*

میزان تولید ایندول استیک اسید توسط جدایه‌ها، بر اساس روش گلیک‌من و دساکس (۲۰) تعیین گردید. منحنی استاندارد نیز به وسیله هورمون IAA در غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۳۰ میلی گرم بر لیتر تهیه شد. به منظور ارزیابی کیفی تولید سیدروفور توسط سویه‌های باکتریایی از آزمون کروم آزورول–سولفونات (CAS) استفاده شد (۵۹) و ضریب جذب هر نمونه کشت در طول موج ۶۳۰ نانومتر تعیین گردید. جهت تخمین کمی توانایی انحلال فسفات توسط جدایه‌ها، سوسپانسیون هر جدایه تهیه و به محیط کشت اسپربر مایع اضافه شد. پس از پنج روز شدت جذب نوری با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۳۰ نانومتر قرائت شد (۶۲) و مقدار فسفر محلول در محیط کشت در مقایسه با منحنی استاندارد که با استفاده از غلظت‌های صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میلی گرم بر لیتر KH_2PO_4 تهیه شد، محاسبه گردید. جهت ارزیابی میزان فعالیت آنزیم ACC دآمیناز از روش پنروز و گلیک (۴۵) استفاده شد و برای تهیه محلول‌های استاندارد از آلفا–کتوبوتیرات استفاده گردید. جهت اندازه‌گیری مقدار پروتئین عصاره جدایه‌های مورد آزمایش از روش برادفورد (۷) استفاده شد. منحنی استاندارد نیز به کمک محلول‌های استاندارد پروتئین آلبومین سرم گاوی و در غلظت‌های ۰/۱، ۰/۲، ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷ و ۰/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه گردید.

تیمار جدایه‌ها و پرورش قارچ دکمه‌ای

پس از تهیه کمپوست آماده و تلقیح شده با بذر قارچ دکمه‌ای، به میسلیوم قارچ اجازه داده شد تا به مدت ۱۶ روز در دمای ۲۴ تا ۲۵ درجه سانتیگراد و رطوبت ۶۷ درصد به طور کامل کمپوست را پر کند. سپس مقدار سه کیلوگرم از کمپوست وزن شد و به داخل کیسه‌های پرورش منتقل گردید. روز بعد سوسپانسیون باکتری در محلول نگهدارنده (۱۲) با غلظت 10^6CFU/mL تهیه و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون هر جدایه به یک کیلوگرم از خاک پوششی اضافه و به طور کامل مخلوط و به روی کمپوست منتقل گردید. دراین آزمایش جدایه‌های باکتری در قالب طرح کاملا تصادفی در دو تکرار تیمار داده شدند. ۱۸ روز پس از خاک‌دهی، قارچها قبل از بلوغ کامل یا به اصطلاح رایج، قبل از باز شدن برداشت شدند و پس از تمیز نمودن، وزن تر آن‌ها با استفاده از ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۱ تعیین گردید.

آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار JMP ۸ و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۰ انجام گرفت. برای آزمون مقایسات میانگین از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد استفاده گردید.

نتایج و بحث

فراوانی باکتری *P. putida* در نمونه‌های مورد بررسی

نتایج شناسایی مولکولی جدایه‌های جدا شده از شش نمونه خاک پوششی نشان داد که از بین ۸۱ جدایه مورد بررسی، در مجموع می‌توان ۵۲ جدایه را به عنوان باکتری *P. putida* معرفی کرد که این تعداد حدود ۶۴ درصد جمعیت جدایه‌ها را تشکیل می‌دهند. بیشترین ایزوله باکتری *P. putida* مربوط به نمونه خاک‌های شماره دو و شش (به ترتیب با ۸۶ و ۱۰۰ درصد) بود که در مرحله پین‌دهی جمع‌آوری شده بودند (جدول ۱). بقیه نمونه‌ها قبل از مرحله پین‌دهی یا حین اعمال آن‌ها بر روی کمپوست جمع‌آوری شده بودند. بر اساس جدول ۱ می‌توان نتیجه گرفت که بهترین مرحله جهت جداسازی باکتری *P. putida* از خاک پوششی، مرحله پین‌دهی می‌باشد. به دلیل اینکه در این مرحله جمعیت این باکتری در مقایسه با باکتری‌های دیگر افزایش می‌یابد و جدایه‌های جداشده به احتمال

بیشتری باکتری *P. putida* خواهند بود. ریاحی و همکاران (۵۰) بیشترین تعداد باکتری *Pseudomonas* را در مرحله پین‌دهی ثبت کردند. با توجه به اینکه ضرورت وجود باکتری *P. putida* جهت پین‌دهی قارچ *A. bisporus* به اثبات رسیده است (۱۰) نتایج فوق منطقی به نظر می‌رسد.

جدول ۱. وضعیت فلور میکروبی نمونه‌های خاک پوششی مورد استفاده در پرورش قارچ *A. bisporus* از نظر جمعیت باکتری *P. putida* موجود در آن‌ها

Table 1- The frequency of *P. putida* isolates in casing soil samples used for *A. bisporus* cultivation

نمونه خاک* Soil sample	تعداد جدایه جدا شده Number of isolates	تعداد جدایه *P. putida* Number of *P. putida* isolates (%)	تعداد جدایه انتخاب شده برای مرحله بعد Number of selected isolates for next steps	اسم جدایه‌ها انتخاب شده برای مرحله بعد Name of isolates in next steps
Sample 1	12	5 (42)	5	P1-P5
Sample 2	21	18 (86)	7	P6-P12
Sample 3	12	6 (50)	5	P13-P17
Sample 4	12	4 (33)	4	P18-P21
Sample 5	11	6 (55)	5	P22-P26
Sample 6	13	13 (100)	7	P27-P33
Total	81	52 (64)	33	

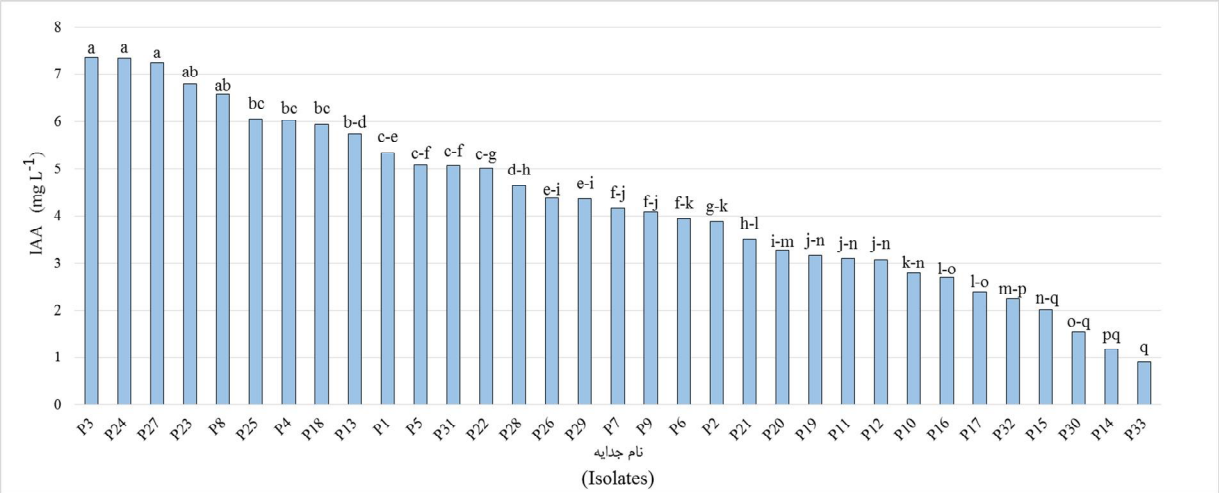
* نمونه‌های شماره دو و شش در مرحله پین‌دهی و بقیه نمونه‌ها قبل از مرحله پین‌دهی یا حین اعمال آن‌ها بر روی کمپوست جمع‌آوری شده بودند.

*Samples 6 and 2 were collected at pinning and other samples were collected befor pinning or time of application on the compost.

ارزیابی عوامل مؤثر بر رشد قارچ دکمه‌ای

بررسی توان تولید هورمون IAA

در این آزمون تمامی باکتری‌هایی که به عنوان *P. putida* شناسایی شدند، توانایی تولید IAA را داشتند. نتایج نشان داد که بین جدایه‌های مختلف در میزان تولید IAA، تفاوت معنی‌داری ($p\leq0.05$) وجود دارد (جدول ۲). در این بین، جدایه‌های P3، P24 و P27 به ترتیب با مقدار میانگین ۷/۳۷، ۷/۳۵ و ۷/۲۶ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین و جدایه‌های P33، P14 و P30 به ترتیب با مقدار میانگین ۰/۸۹، ۱/۱۹ و ۱/۵۴ میلی‌گرم بر لیتر کمترین میزان IAA را تولید کردند (شکل ۱). میانگین تولید IAA توسط جدایه‌های مورد بررسی ۴/۲۷ میلی‌گرم بر لیتر بود.



شکل ۱- مقایسه میانگین تولید هورمون IAA در جدایه‌های مختلف *P. putida* بر اساس آزمون مقایسه میانگین توکی ($p\leq0.05$)

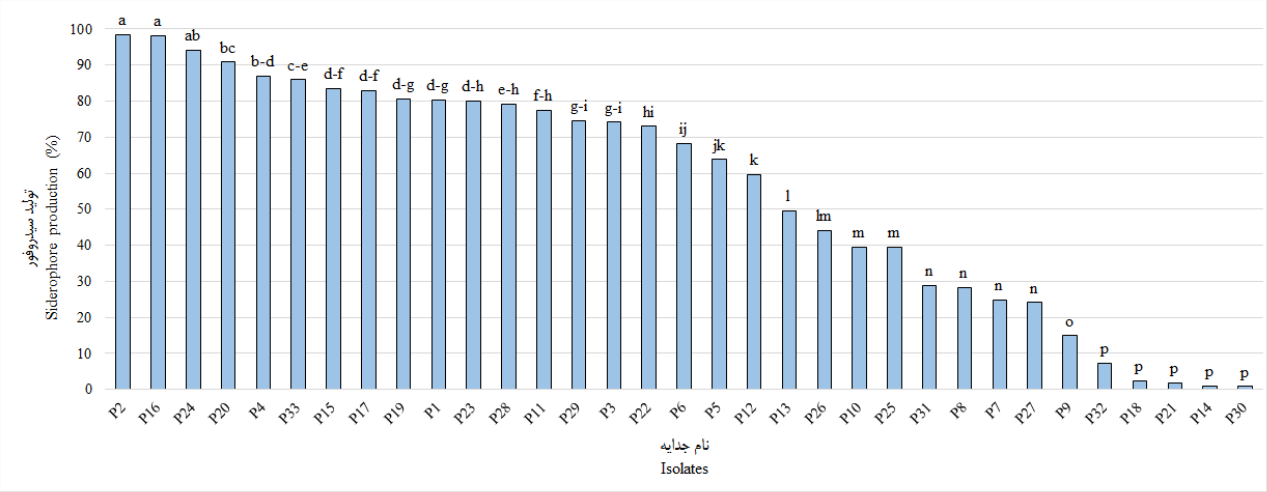
Figure 1- Mean comparison of means of IAA production of *P. putida* isolates based on Tukey's test ($p\leq0.05$)

تفاوت در تولید IAA توسط دیگر محققان نیز گزارش شده است. علی‌خانی و همکاران (۵) نیز با اندازه‌گیری توان تولید IAA در ۳۱۴ جدایه متعلق به جنس‌های مختلف رایزوبیومی ایران، گزارش کردند که ۲۲۰ جدایه توان تولید این هورمون را داشته و از نظر تولید IAA

بین آن‌ها تفاوت معنی‌داری وجود دارد. خاکی‌پور و همکاران (۳۲) نیز با استفاده از آنالیز HPLC نشان دادند که ۷۲ درصد از سویه‌های *P. putida* و *P. fluorescens* مورد بررسی، حداقل یکی از ترکیبات ایندولی اکسین از جمله IAA را تولید می‌کنند. ایشان بیان کردند که تولید هورمون اکسین یکی از اصلی‌ترین دلایل افزایش عملکرد ناشی از تلقیح این باکتری‌ها می‌باشد.

بررسی توان تولید سیدروفور

در این آزمایش توان تولید سیدروفور جدایه‌های مورد بررسی از ۰/۷۸ درصد تا ۹۸ درصد متغیر و معنی‌دار بود ($p\leq0.05$) (جدول ۲). در بین جدایه‌های مختلف، بیشترین میزان تولید سیدروفور مربوط به جدایه‌های P2 و P16 به ترتیب با ۹۸/۴۴ و ۹۸/۱۰ درصد و کمترین میزان تولید آن مربوط به جدایه P30 و P14 به ترتیب ۰/۵۹ و ۰/۷۸ درصد سیدروفور بود (شکل ۲). همه جدایه‌های مورد بررسی دارای توان تولید سیدروفور بودند. توانایی تولید سیدروفور توسط سویه‌های مختلفی از سودوموناس‌ها گزارش شده است (۱ و ۴۸). توان تولید سیدروفور از جمله ویژگی‌هایی است که بر اساس آن باکتری‌های دارای این خصوصیت را در گروه باکتری‌های محرک رشد گیاه قرار داده‌اند (۱۶ و ۵۵). سودوموناس‌های فلورسنس تولیدکننده سیدروفور موجود در خاک پوششی مانع جذب آهن توسط میکروارگانیسم‌های بیمارگرها شده و رشد قارچ خوراکی دکمه‌ای را بهبود می‌بخشند (۶۰). همچنین این باکتری‌ها باعث افزایش جذب آهن در گیاهانی مانند ذرت (۵۷)، ماش (۵۸)، گوجه‌فرنگی (۴۰) و آرابیدوپسیس (۶۵) و بهبود صفات کمی و کیفی در آنها شده‌اند.



شکل ۲- مقایسه میانگین تولید سیدروفور در جدایه‌های مختلف *P. putida* بر اساس آزمون مقایسه میانگین توکی ($p\leq0.05$)

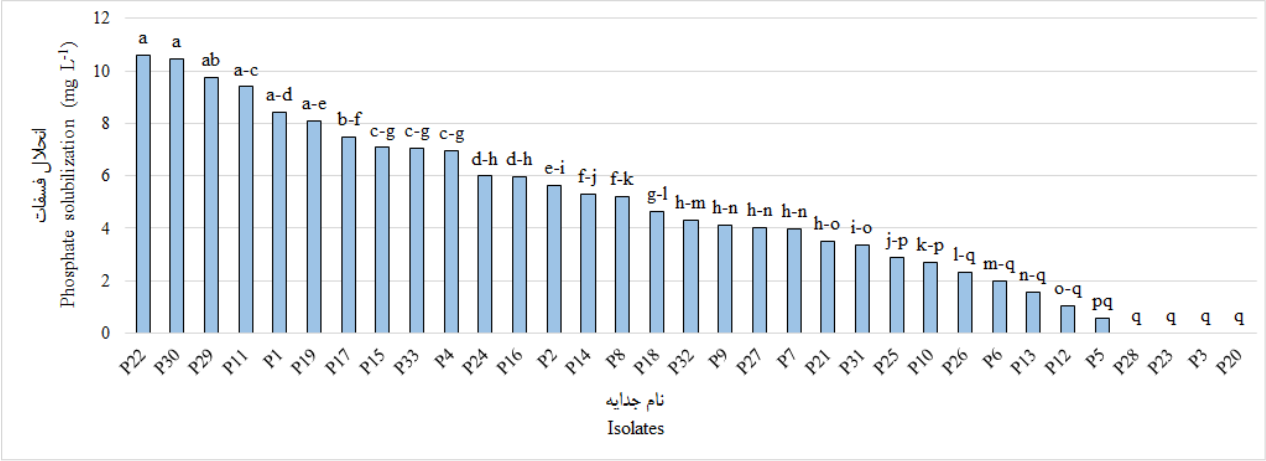
Figure 2- Mean comparison of siderophore production of *P. putida* isolates based on Tukey's test ($p\leq0.05$)

بررسی توان حل کنندگی فسفات معدنی در محیط اسپربر

مهمترین نقش فسفر در گیاهان تولید و انتقال انرژی می‌باشد (۱۳). به همین دلیل قابلیت حل‌کنندگی فسفات گونه *P. striata* وزن خشک و تر میسلیوم قارچ *A. bisporus* را افزایش می‌دهد (۱۸). همچنین کاهش سطح فسفات قابل دسترس قارچ دکمه‌ای، عملکرد آن کاهش می‌یابد (۶۶). تلقیح باکتری *P. putida* با ریشه گیاه کلزا (۳۵) و گوجه‌فرنگی (۴۱) طور معنی‌داری جذب فسفات و در نتیجه آن طول ریشه را در گیاه میزبان را افزایش می‌دهد.

تفاوت در میزان انحلال فسفات توسط جدایه‌های مورد بررسی، متغیر و معنی‌دار بود (جدول ۲). از ۳۳ جدایه مورد بررسی، ۲۸ جدایه توانایی انحلال فسفات نامحلول را داشتند که ۸۵ درصد جدایه‌ها راتشکیل می‌دادند. قدس علوی و همکاران (۱۷) نیز جدایه‌های دارای توان انحلال فسفات را ۷۷/۵ درصد کل جدایه‌های موجود در رایزوسفر گیاه سنبل‌الطیب گزارش کردند که در بین آن‌ها ، دو جدایه از جنس *Pseudomonas* دارای بیشترین توان انحلال فسفات نامحلول در محیط مایع اسپربر بودند. توانایی انحلال فسفات توسط جدایه‌های *P. fluorescens* توسط مقامی و همکاران (۳۶) نیز گزارش شده است. از بین جدایه‌های دارای توان انحلال فسفات، بیشترین میزان انحلال مربوط به جدایه‌های P22 و P30 به ترتیب با ۱۰/۵۹ و ۱۰/۴۵ میلی‌گرم بر لیتر و کمترین توان انحلال فسفات مربوط به جدایه P5 با ۰/۵۸ میلی‌گرم بر لیتر بود (شکل ۳). در ضمن جدایه‌های P3، P20، P23 و P28 توانایی انحلال فسفات را از خود نشان ندادند. متوسط میزان انحلال فسفات در بین جدایه‌های مورد بررسی نیز ۴/۷۶ میلی‌گرم بر لیتر بود. دی فرتاس و همکاران (۱۱) حلالیت سنگ فسفات را توسط باکتری *Bacillus* spp. طی ۱۵ روز مورد بررسی قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که باکتری‌های مورد

استفاده توان آزادسازی ۷/۵ تا ۲۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر فسفر را دارند. تومار (۶۳) مقدار فسفر محلول آزاد شده در طی ۱۴ روز در محیط مایع حاوی تری‌کلسیم‌فسفات تلقیح شده با باکتری‌های میله‌ای گرم منفی را برابر ۷۸/۸ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت گزارش نمود.



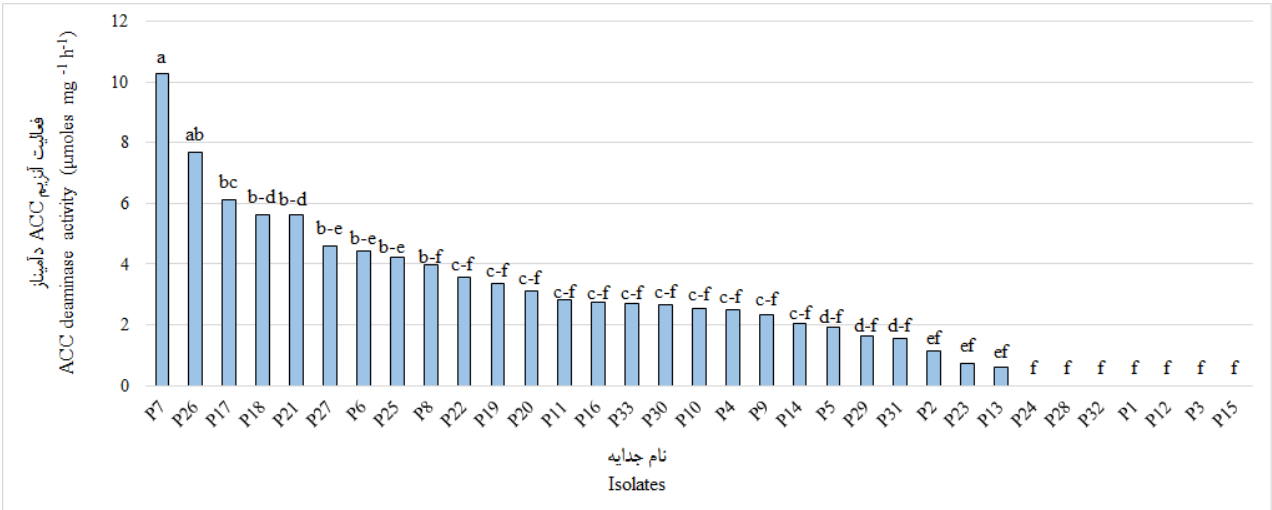
شکل ۳- مقایسه میانگین توانایی انحلال فسفات نامحلول در جدایه‌های مختلف *P. putida* بر اساس آزمون مقایسه میانگین توکی (p≤0.05)

Figure 3- Mean comparison of phosphate solubilization of *P. putida* isolates based on Tukey's test (p≤0.05)

بررسی میزان فعالیت آنزیم ACC دآمیناز

در این آزمایش فعالیت آنزیمی آنزیم ACC دآمیناز جدایه‌های مورد بررسی اندازه‌گیری شد و همانطورکه نتایج نشان می‌دهند، فعالیت ACC دآمیناز تولید شده توسط جدایه‌های مورد آزمایش متفاوت می‌باشد و در دامنه‌ای از ۰/۵۲ تا ۱۰/۲۷ میکرومول آلفا-کتوبوتیرات بر میلی‌گرم در ساعت متغیر است. تفاوت فعالیت آنزیمی در بین جدایه‌های مورد بررسی، در سطح پنج درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). در این آزمایش از مجموع ۳۳ جدایه، در ۲۷ جدایه فعالیت آنزیم ACC دآمیناز مشاهده شد که این تعداد جدایه، ۸۱/۸ جدایه‌ها را تشکیل می‌دادند (شکل ۴).

وجود آنزیم ACC دآمیناز در تعداد زیادی از باکتری‌های محرک رشد گیاه و همچنین تعدادی از مخمرها و قارچها گزارش شده است (۲۹ و ۵۶). باکتری *P. putida* با جذب و مصرف پیش‌ساز اتیلن به وسیله آنزیم ACC دآمیناز، اثر مهارکنندگی اتیلن بر روی تشکیل پریموردیا و رشد قارچ را تعدیل کرده و از این طریق باعث افزایش رشد قارچ *A. bisporus* می‌شود (۹).



شکل ٤- میانگین میزان فعالیت آنزیم ACC دآمیناز در جدایه‌های مختلف *P. putida* بر اساس آزمون مقایسه میانگین توکی (p≤0.05)

Figure 4- Mean comparison of ACC deaminase activity of *P. putida* isolates based on Tukey's test (p≤0.05)

جدول ۲- تجزیه واریانس چهار عامل محرک رشد در جدایه‌های مختلف *P. putida*

Table 2- ANOVA for four growth promoting factor in different isolates of *P. putida*

منبع تغییرات Source of variation	df	میانگین مربعات Mean square			df	میانگین مربعات Mean square
		تولید IAA IAA production	تولید سیدروفور Siderophore production	انحلال فسفات Phosphate solubilization		فعالیت ACC دآمیناز ACC deaminase activity
جدایه Isolates	32	11.578*	3444.05*	32.241*	32	12.248*
خطا Eror	66	0.131	4.91	0.61	33	0.976
Total	98				65	

*. نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

* The means are significantly different at the 0.5% level

بررسی‌ها نشان داده است که جدایه‌های رایزوبیومی بومی توان تولید ACC دآمیناز را دارند(۲، ۵۴، ۳۹). سقفی و همکاران (۵۴) گزارش کردند که از ۳۰ جدایه متحمل به شوری، ۲۵ جدایه (۷۸ درصد) توانستند از ACC به عنوان تنها منبع نیتروژن استفاده کنند. همچنین این توانایی در بین جدایه‌ها یکسان نبود. متشرعی و همکاران (۳۹) نیز از بین ۴۴۵ جدایه انتخاب شده و خالص شده از خاک‌های شمال کشور، ۹ جدایه را انتخاب و میزان فعالیت ACC دآمیناز آن‌ها را اندازه‌گیری کردند که همه جدایه‌ها دارای توان تولید ACC دآمیناز بودند.

بررسی اثر جدایه‌ها بر روی عملکرد قارچ دکمه‌ای

در این آزمایش ۳۳ ایزوله باکتری در دو تکرار به خاک پوششی اعمال گردید و تأثیر آن‌ها بر روی افزایش عملکرد نسبت به نمونه شاهد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی وزن و تعداد قارچ را در سطح ۵ درصد به طور معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد (بدون تیمار باکتری) افزایش دادند (جدول ۳). با این حال این افزایش وزن و تعداد قارچ، در بین جدایه‌های مختلف متغیر بود. بیشترین وزن قارچ مربوط به جدایه‌های P27، P13، P25 و P8 به ترتیب به میزان ۳۶۱/۶۳، ۳۴۲/۸، ۳۱۲/۴۳ و ۳۰۱/۴۶ گرم و کمترین وزن قارچ نیز مربوط به جدایه‌های P32، P12 و P30 به ترتیب با ۱۱۹/۶۱، ۱۳۳/۷۱ و ۱۴۰/۵۵گرم بر کیلوگرم کمپوست بود (شکل ۶). بیشترین تعداد قارچ نیز مربوط به جدایه‌های P18 و P24 به ترتیب با ۲۱ و ۲۰/۸۸ عدد و کمترین تعداد مربوط به جدایه‌های P32 و P30 به ترتیب با ۵/۵ و ۸/۳۳ عدد بر کیلوگرم کمپوست بود (شکل ۵).

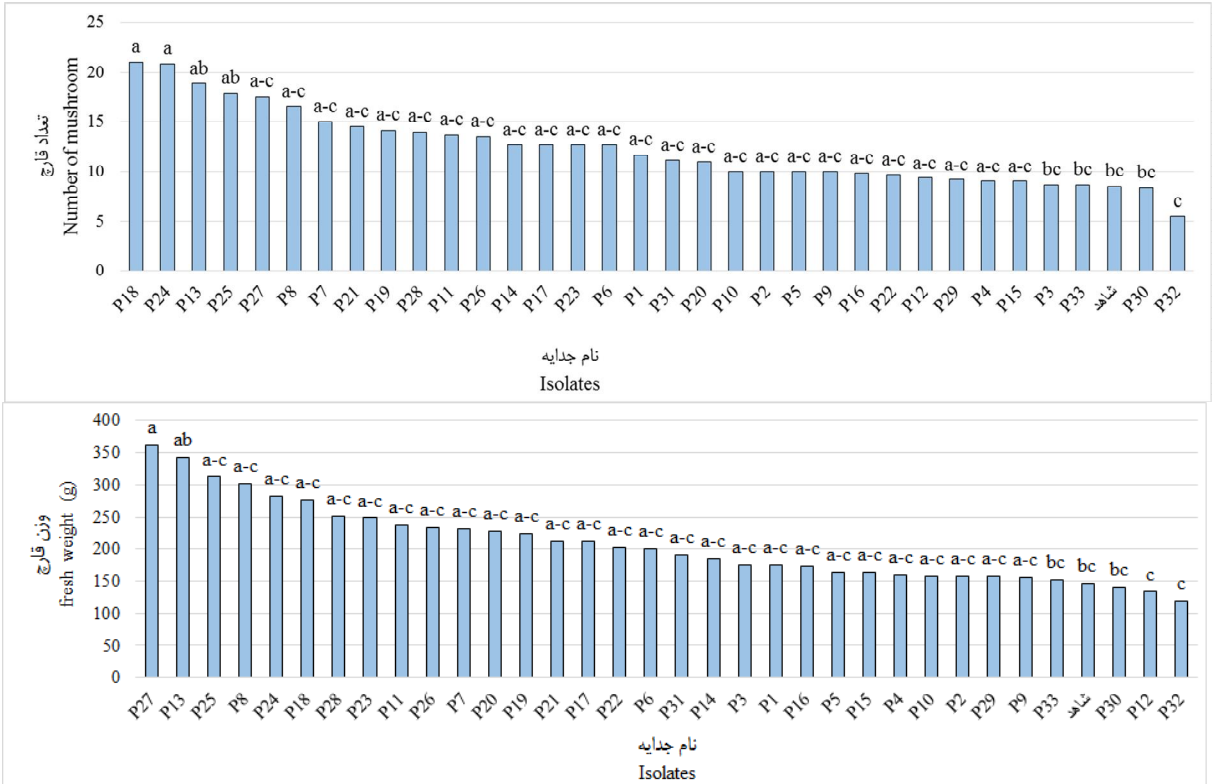
در این آزمایش تعدادی از جدایه‌ها نسبت به نمونه شاهد تأثیر منفی بر روی وزن و تعداد قارچ داشته و یا تأثیر معنی‌داری بر روی این دو صفت در قارچ *A. bisporus* نداشتند که می‌توانند به دلیل میانکنش بین قارچ دکمه‌ای و باکتری‌های تیمار داده شده و یا شرایط فیزیکی و شمیایی خاک پوششی باشد. از طرفی جدایه‌های P27 و P13 بیشترین تأثیر را بر روی عملکرد قارچ دکمه‌ای داشتند که می‌توانند در جهت افزایش عملکرد قارچ دکمه‌ای مورد آزمایش قرار گیرند. تفاوت در اثر جدایه‌های مختلف بر روی عملکرد قارچ دکمه‌ای می‌تواند نتیجه تفاوت در خصوصیات محرک رشدی آن‌ها باشد. افزایش وزن و تعداد قارچ و در نتیجه افزایش عملکرد قارچ دکمه‌ای *A. bisporus* در اثر تیمار باکتری‌های محرک رشد، خصوصاً باکتری *P. putida* توسط ریاحی و همکاران (۵۰)، زارع‌نژاد و همکاران (۶۷)، عبادی و همکاران (۱۲) و خلیلی و همکاران (۳۳) نیز گزارش شده است. زارع‌نژاد و همکاران (۶۷) با تیمار ۲۳ جدایه به خاک پوششی، گزارش کردند که سه جدایه Bt4، Fd8 و Ps7 به ترتیب با ۱۴، ۱۳/۵ و ۱۲ درصد، بیشترین تأثیر را در افزایش عملکرد قارچ دکمه‌ای *A. bisporus* نسبت به نمونه شاهد داشتند که این دو نژاد از گونه *P. putida* بودند.

رابطه بین فاکتورهای موثر بر رشد در باکتری و عملکرد قارچ دکمه‌ای

در این آزمایش ضریب همبستگی (r) بین عوامل محرک رشد در باکتری *P. putida* (شامل تولید هورمون IAA، تولید سیدروفور، انحلال فسفات و فعالیت آنزیم ACC دآمیناز) و صفات مربوط به عملکرد در قارچ دکمه‌ای *A. bisporus* (وزن و تعداد قارچ) تعیین گردید (جدول۴). تفسیر نتایج نشان می‌دهد که بین میزان تولید هورمون IAA و وزن و تعداد قارچ همبستگی معنی‌دار و مثبتی (به ترتیب ۰/۵۸ و ۰/۵۰) وجود دارد. در بین این دو صفت، وزن قارچ نسبت به تعداد قارچ هبستگی بالاتری با تولید هورمون IAA دارد. نتایج نشان می‌دهد که باکتری *P. putida* از طریق تولید IAA، هم در مرحله پین‌دهی (تعداد قارچ) و هم در مراحل پس از آن (وزن قارچ) بر روی رشد و عملکرد قارچ تأثیر می‌گذارد. تأثیر هورمون‌های محرک رشد به ویژه IAA بر تحریک رشد میسلیوم (۲۵)، سرعت جوانه‌زنی و

رشد هیف (۳۰)، قطر کلاهک (۳) و پروتئین قارچ (۴۸) در قارچ‌های مختلف نیز گزارش شده است. این محققین اظهار داشتند این هورمون از طریق تحریک طویل شدگی و تمایز سلولی باعث افزایش رشد قارچ می‌گردد.

نتایج به دست آمده با مطالعات دیگر نیز تطابق دارد. محمدی گل‌تپه و همکاران (۲۱) نیز بیان کردند که تولید IAA و تأثیر آن بر تحریک رشد میسلیوم جزء مکانیسم‌های موثر در افزایش رشد قارچ توسط باکتری‌های محرک رشد می‌باشد. عبادی و همکاران (۱۲) تأثیر باکتری‌های تولیدکننده IAA بر روی عملکرد قارچ خوراکی دکمه‌ای را بررسی کرده و نشان دادند که این باکتری‌ها باعث افزایش وزن تر، وزن خشک، میزان پروتئین و افزایش تعداد و قطر کلاهک قارچ می‌شوند و در نهایت نتیجه گرفتند که تولید IAA می‌تواند جزء مکانیسم‌های مؤثر در افزایش رشد قارچ توسط باکتری‌های محرک رشد باشد.



شکل ۵- مقایسات میانگین تأثیر جدایه‌های مختلف باکتری *P. putida* بر روی تعداد و وزن قارچ دکمه‌ای با استفاده از آزمون توکی (p≤0.05)

Figure 5- mean comparison of fresh weight and number of mushroom in *A. bisporus* in response to *P. putida* isolates inoculation based on Tukey's test (p≤0.05)

جدول ۳- تجزیه واریانس وزن تر و تعداد قارچ تحت تیمار جدایه‌های مختلف باکتری *P. putida* در قارچ دکمه‌ای

Table 3- ANOVA for fresh weight and number of mushroom in *A. bisporus* in response to *P. putida* isolates inoculation

منبع تغییرات Source of variation	df	میانگین مربعات Mean square	
		وزن تر قارچ Mushroom Fresh weight	تعداد قارچ Number of mushroom
جدایه Isolates	32	11.578*	3444.05*
خطا Eror	33	0.131	4.91
Total	65		

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

* The means are significantly different at the 0.5% level

جدول ٤- ضریب همبستگی (r) بین عوامل محرک رشد در باکتری *P. putida* و صفات مربوط به عملکرد در قارچ دکمه‌ای *A. bisporus*

Table 4- Correlation coefficient (r) between growth promoting factors in *P. putida* and fresh weight and number of mushroom in *A. bisporus*

	تولید IAA IAA production	تولید سیدروفور Siderophore production	انحلال فسفات Phosphate solubilization	فعالیت ACC دآمیناز ACC deaminase activity
وزن تر قارچ Fresh weight	0.58*	0.08	0.2	0.12
تعداد قارچ Number of mushroom	0.50*	0.05	0.06	0.21

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد

* The mean difference is significant at the 0.5 level

سه عامل دیگر شامل تولید سیدروفور، انحلال فسفات نا محلول و فعالیت آنزیم ACC دآمیناز همبستگی معنی‌داری با تعداد و وزن قارچ نشان ندادند. عبادی و همکاران (۱۲) نیز گزارش کردند که از بین باکتری‌های تولید کننده IAA، باکتری‌های تولید کننده ACC دآمیناز، باکتری‌های دارای قابلیت حل‌کنندگی فسفات، باکتری‌های تولید کننده سیدروفور بیشترین عملکرد مربوط به باکتری‌های تولید کننده IAA با افزایش ۱۲/۷ درصدی در وزن تازه قارچ در مقایسه با شاهد بود. البته ایشان نشان دادند که بیشترین مقدار ماده خشک، بیشترین تعداد قارچ و بیشترین میزان پروتئین مربوط به باکتری‌هایی بود که ویژگی‌های فوق را در سطح متوسطی داشتند، اما سینگ و همکاران (۶۰) گزارش کردند که از بین ۳۴ جدایه از سودوموناس‌های فلورسنس موجود در خاک پوششی، دو ایزوله به طور معنی‌داری تعداد ساختارهای ته‌سنجاقی و عملکرد قارچ دکمه‌ای را افزایش و دوره نمو اندام باردهی را هفت روز کاهش دادند. این جدایه‌ها دارای خاصیت بیوکنترلی قارچ‌های مختلف بیماری‌زا بودند و با کنترل بیماری‌زایی آن‌ها در بستر قارچ *A. bisporus*، عملکرد آن را افزایش دادند. تفاوت در نتایج به دست آمده می‌تواند نتیجه تفاوت در ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک پوششی مورد استفاده و یا نژاد قارچ مورد بررسی باشد. این تفاوت در نتایج در مورد تلقیح باکتری‌های محرک رشد به گیاهان زراعی نیز مشاهده شده است. خسروی (۳۴) وجود این تفاوت‌ها را عمدتاً ناشی از تنوع در نوع و ارقام گیاهی، ترکیبات خاک، حضور ریزجانداران بومی، مقدار رطوبت خاک و درک ناکافی سازوکارهایی می‌داند که باکتری محرک رشد به واسطه آن‌ها بر رشد گیاه مؤثر واقع می‌شود.

در پژوهش حاضر به طور کلی نتایج نشان داد که تیمار جدایه‌های مختلف باکتری *P.putida* به خاک پوششی باعث افزایش معنی‌دار عملکرد در قارچ خوراکی *A. bisporus* نسبت به نمونه شاهد می‌شود و یکی از عوامل افزایش عملکرد قارچ خوراکی توسط باکتری *P. putida*، تولید هورمون‌های مولد رشد به ویژه هورمون ایندول استیک اسید (IAA) می‌باشد که همبستگی معنی‌داری با عملکرد قارچ دکمه‌ای دارد و می‌تواند در آینده به عنوان یک فاکتور مهم در غربال باکتری‌های مؤثر بر رشد قارچ دکمه‌ای مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین در این آزمایش جدایه‌های P8، P13، P18، P24، P25 و P27 که بیشترین تأثیر را بر روی عملکرد قارچ *A. bisporus* داشتند، به عنوان جدایه‌های امیدبخشی معرفی می‌شوند که پتانسیل استفاده به عنوان کودهای زیستی را دارا می‌باشند.

منابع

1- Abbas-Zadeh P., Saleh-Rastin N., Asadi-Rahmani H., Khavazi K., Soltani A., Shoary-Nejati A.R., and Miransari M. 2010. Plant growth-promoting activities of fluorescent pseudomonads, isolated from the Iranian soils. Acta Physiologiae Plantarum, 32(2): 281-288.

2- Akhgar A.R., Arzanlou M., Bakker P.A.H.M., and Hamidpour M. 2014. Characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase containing *Pseudomonas* spp. in the rhizosphere of salt-stressed canola. Pedosphere, 24(4): 461-468.

3- Alam N., Amin S.M.R., and Sarker N.C. 2007. Efficacy of five different growth regulators on the yield and yield contributing attributes of *Pleurotus ostreatus* (Jacquin ex Fr.) Kummer. Bangladesh Journal of Mushroom, 1(1): 51-55.

4- Ali S.S., and Vidhale N.N. 2013. Bacterial siderophore and their application: a review. International Journal of Current Microbiology and Applied Science, 2(12): 303-312.

5- Alikhani H., Saleh Rastin N., and Bihamta M.R. 2007. An evaluation of auxin hormons and ACC deaminase production ability by Iranian soil rhizobial strains and the effect of superior strains applications on plant growth characteristics. Iranian Journal of Agricultural sciences (Journal of Agriculture), 38(4): 693-703. (In Parsian)

6- Bahrimi Teimoori B., Pourianfar H.R., Moeini M.J., and Janpoor J. 2014. Chemically and physically induced

mutagenesis in basidiospores of oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* var. *florida*. International Journal of Advanced Research, 2: 915-921.
7- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, 72: 248-258.
8- Burg S.P. 1973. Ethylene in plant growth. Proceedings of the National Academy of Sciences, 70(2): 591-597.
9- Chen S., Qiu C., Huang T., Zhou W., Qi Y., Gao Y., Shen J., and Qiu L. 2013. Effect of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase producing bacteria on the hyphal growth and primordium initiation of *Agaricus bisporus*. Fungal Ecology, 6(1): 110-118.
10- Colauto N.B., Fermor T.R., Eira A.F., and Linde G.A. 2016. *Pseudomonas putida* Stimulates Primordia on *Agaricus bitorquis*. Current Microbiology, 72(4): 482-488.
11- De Freitas j.R., Banerjee M.R., and Germida J.J. 1997. Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). Biology and Fertility of Soils, 24(4): 358-364.
12- Ebadi A., Alikhani H.A., and Rashtbari M. 2012. Effect of plant growth promoting bacteria (PGPR) on the morpho-physiological properties of button mushroom *Agaricus bisporus* in two different culturing beds. International Research Journal of Basic and Applied Sciences, 3: 203-212.
13- Ebrihimi Karim Abad R., Rasouli Sadaghyani M., and Barrin M. 2015. Phosphate solubilizing microorganisms as biofertilizer. Agriculture and Natural Resources Engineering Organization of Islamic Republic of Iran Quarterly. 13(47): 22-25. (In Persian)
14- Farsi M., Jalalzadeh B., and Malekzadeh Kh. 2009. The breeding and production of hybrid straians of white button mushroom. Proceeding of the 6th Iranian Horticultural Science Congress, 2-15 Jul. 2009. Rasht, I. R. Iran. (in Parsian)
15- Farsi M., and Pourian Far H. 2011. Cultivation and breeding of white button mushroom. Jahad Daneshgahi Publications, Mashhad. (in Parsian)
16- García-Fraile P., Menéndez E., and Rivas R. 2015. Role of bacterial biofertilizers in agriculture and forestry. AIMS Bioengineering, 2(3): 183–205.
17- Ghods-Alavi B.S., Soleymani M., Ahmadzadeh M., and Soleymani S. 2013. Ability of rhizobacteria of valerian in phosphate solubilization and their symbiotic efficiency. Journal of Science and Technology of Greenhouse Culture, 4(13): 61-72. (in Parsian with English abstract)
18- Gitay A.S., And Wange S.S. 2008. Effect of diazotroph and phosphate solubilizing bacteria on mycelial growth of button mushroom. Annals of Plant Physiology, 2: 282-283.
19- Glick B.R., Penrose D.M., and Li J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. Journal of Theoretical Biology, 190(1): 63-68.
20- Glickmann E., and Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 61(2): 793-796.
21- Goltapeh E.M., Danesh Y.R., Kamal S., and Varma, A. 2009. Biology and molecular approaches in genetic improvement of cultivated button mushroom (*Agaricus bisporus*). In Symbiotic Fungi: 403-421. Springer Berlin Heidelberg.
22- Gordan H.R., Mahmoudnia Meymand M., Zou Alali J., Khatamirad M., and Farsi M. 2008. A study of potential of AFLP markers to genetic fingerprinting of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. Journal of Plant Protection (Agricultural Science and Technology), 22(1): 27-36. (In Parsian with English abstract)
23- Gravel V., Antoun H., and Tweddell R.J. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Tricoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). Soil Biology and Biochemistry**,** 39:1968–1977.
24- Gülser C., and Pekşen A. 2003. Using tea waste as a new casing material in mushroom (*Agaricus bisporus* (L.) Sing.) cultivation. Bioresource Technology, 88(2): 153-156.
25- Guo X., Zou X., and Sun M. 2009. Effects of phytohormones on mycelial growth and exopolysaccharide biosynthesis of medicinal mushroom *Phellinus linteus*. Bioprocess and Biosystems Engineering, 32(5):701-707.
26- Hanning I., Jarquin R., Oleary A., and Slavik M. 2009. Polymerase Chain Reaction-based assays for the detection and differentiation of poultry significant Pseudomonads. Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology, 17(4): 490-502.
27- Henry M.B., Lynch J.M., and Fermor T.R. 1991. Role of siderophores in the biocontrol of *Pseudomonas tolaasii* by fluorescent pseudomonad antagonists. Journal of Applied Bacteriology, 70(2): 104-108.
28- Janpoor J., and Farsi M. 2013. Assessment of total RNA extraction from edible mushroom (*Agaricus bisporus*) With Three Current Methods. International Journal of Farming and Allied Sciences. 2(18): 662-664.
29- Jia Y.J., Ito H., Matsui H., and Honma M. 2000. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase induced by ACC synthesized and accumulated in *Penicillium citrinum* intracellular spaces. Bioscience, biotechnology and biochemistry, 64(2): 299-305.
30- Kaneko M., and Tanimoto E. 2009. Auxin-regulation of hyphal elongation and spore germination in arbuscular mycorrhizal fungus, *Gigaspora margarita*. In International Symposium "Root Research and Applications"

RootRAP, 2-4 Sep. 2009. International Society of Root Research., Boku–Vienna, Austria.
31- Kavousi H.R., Farsi M., and Shahriari F. 2008. Comparison of random amplified polymorphic DNA markers and morphological characters in identification of homokaryon isolates of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). Pakistan Journal of Biological Sciences, 11(14): 1771-1778.
32- Khaki Pour N., Khavazi K., and Akhgar A. 2012. Identification of indolic compounds synthesized by fluorescent Pseudomonads and their effect on Rapeseed growth. Iranian Journal of Soil Research (soil and water science). 26 (4): 416-423. (in Parsian)
33- Khalili H.R., Olfati J.A., and Fallahi A. 2013. Plant growth promoting rhizobacteria affect button mushroom yield and quality. Horticulture, Biology and Environment, 4(2): 83-89.
34- Khosravi H. 2013. Biofertilizers containing plant growth promoting rhizobacteria: strengths and weaknesses. Land Management Journal, 1(1): 33-46. (in Parsian).
35- Lifshitz R., Kloepper J.W., Kozlowski M., Simonson C., Carlson J., Tipping E.M., and Zaleska I. 1987. Growth promotion of canola (rapeseed) seedlings by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic conditions. Canadian Journal of Microbiology, 33(5): 390-395.
36- Maghami M., Olamaee M., Rasuli Sadaghiani M.H., and Dordipour E. 2014. Isolation and identification of *Psedomonas fluorescens* and evaluation of their plant growth promoting properties in soils Golestan province. Journal of Soil Management and Sustainable Production, 3(2): 251-264. (In Parsian with English abstract)
37- Mayak S., Tivosh T., and Glick B.R. 1999. Effect of wild type and mutant plant growth-promoting rhizobacteria on the rooting of mungbeen cuttings. Journal of Plant Growth Regulation, 18:49–53.
38- Mohammad A.O., and Sabaa A.E. 2013. Impact of some *Pseudomonas* spp. isolated from casing soil on the hyphal growth of *Agaricus bisporus*. Canadian Journal on Computing in Mathematics, Natural Sciences, Engineering and Medicine, 4 (1): 45-48.
39- Motesharrei Z., Mahmoodi H., Owlia P., and Salimi H. 2014. Study of ACC deaminase activity of Rhizobacteria isolated from soils of northern Iran. Biological Journal of Microorganisms, 11: 37-46. (in Parsian with English abstract).
40- Nagata T., Oobo T., and Aozasa, O. 2013. Efficacy of a bacterial siderophore, pyoverdine, to supply iron to *Solanum lycopersicum* plants. Journal of bioscience and bioengineering, 115(6): 686-690.
41- Pastor N., Rosas S., Luna V., and Rovera, M. 2014. Inoculation with *Pseudomonas putida* PCI2, a phosphate solubilizing rhizobacterium, stimulates the growth of tomato plants. Symbiosis, 62(3):157-167.
42- Patel D., Jha C.K., Tank N., and Saraf M. 2012. Growth enhancement of chickpea in saline soils using plant growth-promoting rhizobacteria. Journal of Plant Growth Regulation, 31: 53–62.
43- Patten C. L., and Glick B. R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology, 68:3795–3801.
44- Pecchia J., Cortese R., Albert I., and Singh M. 2014. Investigation into the microbial community changes that occur in the casing layer during cropping of the white button mushroom, *Agaricus bisporus*. In Proceedings of 8th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products (ICMBMP8), 19-22 Nov. 2014. New Delhi, India.
45- Penrose D. M., and Glick B.R. 2003. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiologia Plantarum, 118: 10-15.
46- Prathap M. 2015. A critical review on plant growth promoting rhizobacteria. Journal of Plant Pathology & Microbiology, 6(4).
47- Pratiksha K., Narute T.K., Surabhi S., Ganesh A., and Sujoy, S. 2017. Effect of liquid biofertilizers on the yield of button mushroom. Journal of Mycopathological Research, 55(2): 135-141.
48- Rasouli Sadaghiani H., Khavazi K., Rahimian H., Malakouti M. J., and Asadi Rahmani H. 2005. Population density and identification of fluorescens Pseudomonas associated with rhizosphere of Wheat. Journal of Soil and Water science, 26(3): 195-206. (in Parsian with English abstract)
49- Rezaeian S., Pourianfar H.R., and Janpoor J. 2016. Collection and identification of Iranian wild mushrooms: towards establishment of a mushroom bio-bank. International Journal of Advanced Research, 4(1):256-60.
50- Riahi H., Eskash A., and Shariatmadari Z. 2011, October. Effect of bacterial and cyanobacterial culture on growth, quality and yield of *Agaricus bisporus*. In Proceedings of the 7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products, 4-7 Oct. 2011. Arcachon, France.
51- Roca A., Pizarro-Tobías P., Udaondo Z., Fernández M., Matilla M.A., Molina-Henares M.A., Molina L., Segura A., Duque A., and Ramos J.L. 2013. Analysis of the plant growth-promoting properties encoded by the genome of the rhizobacterium *Pseudomonas putida* BIRD1. Environmental Microbiology, 15:780‑794.
52- Roupas P., Keogh J., Noakes M., Margetts C., and Taylor P. 2012. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. Journal of Functional Foods, 4(4): 687-709.
53- Rupak M., Sandipan Ch., Bishnu P. Ch., and Arun K. G. 2005. Enhancement of biomass production of edible mushroom *Pleurotus sajor-caju* grown in whey by plant growth hormones. Process Biochemistry, 40: 1241–1244.
54- Saghafi D., Ali Alikhani H., and Motesharezadeh B. 2014. Effectiveness of some native *Rhizobium* spp.

containing ACC-deaminase in amelioration of negative effects of stress ethylene on growth parameters in Oilseed rape (*Brassica napus* L.). Iranian Journal of Field Crop Science, 45(3): 367-376. (in Parsian)

55- Sayyed R.Z., Chincholkar S.B., Reddy M.S., Gangurde N.S., and Patel P.R., 2013. Siderophore producing PGPR for crop nutrition and phytopathogen suppression. p. 449-471. In D. K. Maheshwari (ed.) Bacteria in Agrobiology: Disease Management. Springer, Berlin, Heidelberg.

56- Shah S., Li J., Moffatt B.A., and Glick B. R. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. Canadian Journal of Microbiology, 44(9): 833-843.

57- Sharma A., and Johri B.N. 2003. Growth promoting influence of siderophore-producing Pseudomonas strains GRP3A and PRS9 in maize (*Zea mays* L.) under iron limiting conditions. Microbiological Research, 158(3):243-248.

58- Sharma, A., Johri, B.N., Sharma, A.K. and Glick, B.R., 2003. Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). Soil Biology and Biochemistry, 35(7): 887-894.

59- Silva-stenico M.E., Pacheco F.T.H., Rodrigues J.L.M., Carrilho E., and Tsai S. M. 2005. Growth and siderophore production of *Xylella fastidiosa* under iron-limited conditions. Microbiological Research, 160: 429-436.

60- Singh M., Singh R.P., Chaube H.S., and van Griensven L.J.L.D. 2000. Siderophore producing bacteria as potential biocontrol agents of mushroom diseases. Mushroom Science, 15: 577-585.

61- Siyoum N.A., Surridge K., van der Linde E.J., and Korsten L. 2015. Microbial succession in white button mushroom production systems from compost and casing to a marketable packed product. Annals of Microbiology, 66(1): 151-164.

62- Sperber J.I. 1958. The incidence of apatite-solubilizing organisms in the rhizosphere and soil. Australian Journal of Agricultural Research, 9: 778-781.

63- Tomar R. 1998. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and farmyard manure on the yield of blackgram (*Phaseolus mungo*). The Indian Journal of Agricultural Sciences, 68(2): 81-83.

64- Turner E.M., Wright M., Ward T., Osborne D.J., and Self R. 1975. Production of ethylene and other volatiles and changes in cellulase and laccase activities during the life cycle of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Microbiology, 91(1): 167-176.

65- Vansuyt G., Robin A., Briat J.F., Curie C., and Lemanceau P. 2007. Iron acquisition from Fe-pyoverdine by Arabidopsis thaliana. Molecular Plant-Microbe Interactions, 20(4): 441-447.

66- Yeo S. G., and Hayes W. A. 1981. Solubilisation and utilisation of phosphorus by *Agaricus bisporus* (Lange) Pilat. Mushroom Science, 11: 73-91.

67- Zarenejad, F., Yakhchali, B. and Rasooli, I. 2012. Evaluation of indigenous potent mushroom growth promoting bacteria (MGPB) on *Agaricus bisporus* production. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(1): 99-104.

Journal of Horticultural Science
Vol. 32, No.2, Summer 2018, P. 273-286
ISSN: 2008 - 4730

نشریه علوم باغبانی (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۲، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، ص. ۲۸۶-۲۷۳
شاپا: ۴۷۳۰ - ۲۰۰۸

Influence of *Pseudomonas putida* Isolateson the Yield of Edible White Button Mushroom Agaricusbisporus

M. Lotfi[1] - M. Farsi[2*] - A. Mirshamsi Kakhki[3] - J. Janpoor[4]

Received: 26-02-2017
Accepted: 22-05-2018

Introduction: Because of their high protein and mineral contents and low fat, calories and cholesterol, edible mushrooms such as *Agaricusbisporus* are an important part of the people diet in many countries, but in Iran, the yield of this mushroom is less than the average of yield in the world. Phase change from the vegetative to the reproductive stage and fruit body initiation of this mushroom depends on special physical, chemical and microbial properties of casing layer. Phase change is initiated by decreasing oftemperature and CO_2 concentration and presence of some bacteria (such as *Pseudomonas putida*) in the casing layer. It is believed that *P. putida* may cause this process and increase the yield of *A. bisporus* by siderophore and hormone-like compounds secretion, decreasing the level of ethylene via ACC deaminase activity and dissolution of insoluble phosphate. The objective of this work was to identify *P. putida* isolates as growthpromoting bacteria isolated from *A.bisporus* casing soil and to evaluate their effect on mushroom yield.

Materials and Methods: In this study, 81 individual bacterial isolates were collected by screening the casing layer of 6 edible mushroom farms. Luria Bertani (LB) medium supplemented with sodium lauroyl sarcosine (SLS) and trimethoprim were used for isolation of *Pseudomonas* bacteria by plating serial dilutions of each soil sample. Finally, using species-specific primers, 33 isolates that identified as *P. putida* were selected and were used toinoculate *A. bisporus*casing layer. Inoculations were performed in a completely-randomized design with two replicates. The harvesting began when buttons were fully-grown (but not yet open), and the number of mushrooms and fresh (wet) weight of them were recorded after harvesting of each flush. In the next experiment IAA and siderophore production ability, ACC deaminase production capacity and ability of dissolving of insoluble phosphate in isolates and the correlation between these factors and number and fresh weight of mushroom were evaluated. Analysis of the data was carried out using JMP 8. Means were compared using Tukey's test at $p\leq0.05$.

Results and Discussion: The results of this study showed that the best stage for collecting *P. putida* is pinning, because the maximum number of identified*P. putida*was recorded at this stage.Field experiment showed that different isolates have a significant effect on fresh weight and the number of mushrooms per kg compost compared to control ($p\leq0.05$), so that the highest fresh weight observed in treatment of P27 and P13 isolates with 361.63 and 342.8 gr/kg compost respectively and the highest number of mushroom observed in treatment of P18 and P24 isolates with 21 and 20.83 mushroom per kg of compost,respectively. Interestingly, in this study, some isolates showed negative or no effect on mushroom yield which could be due to the interaction between bacteria and *A. bisporus* strain and/or complex conditions of casing layer. Other results showed that there is a positive and significant correlation between IAA production ability in *P. putida*and fresh weight (r=0.58) and the number of mushrooms (r=0.50) in *A. bisporus*.Whereas there was no significant correlation between other factors and fresh weight and the number of mushrooms. IAA through promotion of cell elongation and differentiation increased mushroom growth and protein.This hormone is one of the needs of *A.bisporus* mushroom and it is very effective in growth and caused an increase in mushroom yield compared to other growth promoting factors.

Conclusions: In the present study, with the aim of investigation of the effect of *P. putida* on the yield of *A. bisporus* and determining the most effective factor in this process, collectedisolatesinoculated to *A. bisporus*casing layer and growth promoting factors in these isolates were evaluated. Results showed that the best stage for collecting *P. putida* is pinning. These bacteria havesignificant effects on fresh weight and the number of mushrooms.There is not significant correlation between other factors and fresh weight and the number of mushrooms. Based on the results, it could be said that the use of growth promoting bacteria in edible mushroom

1, 2 and 3- PhD Student, Professor and Assistant Professor Respectively, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Faculity of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

(*- Corresponding Author Email: Farsi@um.ac.ir)

4- Department of Industrial Fungal Biotechnology, Iranaian Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Mashhad branch, Iran

culturing could be resulted anincrease in mushroom yield and could be beneficial in production of healthy food. Finally, it could be said that *P. putida* isolates P27 and P13 may have the potential to act as a potential bio-fertilizer.

Keywords: Casing soil, Growth promoting bacteria, Indole-3-acetic acid, Yield