کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۱۰، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۰ (۱۵-۱) مقاله پژوهشی DOI: 10.22059/JBIOC.2022.331249.311

فعالیت ضدقارچی قارچ‌های درون‌زی جداشده از قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)، علیه برخی عوامل بیماری‌زای قارچی آن

کوثر شیرازی[۱]، محمد سالاری[۱]، محمد جوان‌نیکخواه[۲*]، مهدی پیرنیا[۱] و محمدرضا آصف[۳]
۱. دانشجوی دکتری، دانشیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲. استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکدگان پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران.
۳. استادیار پژوهش، بخش تحقیقات رستنیها، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۵/۳۱ - تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۱۰/۲۶)

چکیده

در این پژوهش، تاثیر قارچ‌های درون‌زی (mycoendobiont) جداشده از قارچ دکمه‌ای سفید علیه قارچ‌های *Mycogone perniciosa*، *Lecanicillium fungicula* و *Trichoderma harzianum*، به‌عنوان عوامل بیماری‌زای مهم آن، برای کاربرد جهت مهار زیستی و جایگزینی ترکیبات شیمیایی بررسی گردید. جدایه‌های درون‌زی از کلاهک، تیغه و ساقه اندام‌های کاملا سالم قارچ دکمه‌ای که از سالن‌های پرورش عمده کشت قارچ در کشور، جمع‌آوری‌شده بودند، جداسازی شدند. این جدایه‌ها ابتدا در آزمون کشت متقابل علیه جدایه‌های بیمارگر قارچ دکمه‌ای غربال و سپس از بین آنها جدایه‌های موثر برای آزمایش‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. اسپان قارچ دکمه‌ای با جدایه‌های منتخب تیمار شد و درصد وقوع بیماری ناشی از عوامل بیمارگر و نیز شاخص‌های رشدی، تعیین شدند. تمام جدایه‌های درون‌زی مورد آزمایش، توانایی محدود کردن و رقابت با بیمارگرها را داشتند و وقوع بیماری حباب‌تر (*M. perniciosa*) را به میزان ۲۱/۴۲ تا ۹۷/۶۱ درصد، بیماری حباب خشک (*L. fungicula*) را به میزان ۶۰/۶۳ تا ۹۶/۸۰ درصد و بیماری کپک سبز (*T. harzianum*) را به میزان ۶۴/۲۸ تا ۹۶/۹۳ درصد کنترل کردند. این آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار انجام شد. گونه‌های درون‌زی *Fusarium venenatum* و *Clonostachys rosea* بیشترین اثر بازدارندگی از رشد را در برابر هر سه بیمارگر نشان دادند. همچنین، جدایه *Scedosporium apiospermum* دارای اثر بازدارندگی از رشد در برابر دو قارچ بیمارگر *M. perniciosa* و *T. harzianum* بود. این پژوهش نشان داد که قارچ‌های درون‌زی قارچ دکمه‌ای می‌توانند به عنوان عوامل مهار زیستی و بهبود دهنده رشد قارچ دکمه‌ای با هدف کاربردی نمودن آنها مورد توجه قرار گیرند.

واژه های کلیدی: مهار زیستی، بیمارگر، همزیست، اسپان.

Antifungal activity of mycoendobiont fungi isolated from white button mushroom (*Agaricus bisporus*), against some its pathogenic fungi

Kowsar Shirazi[1], Mohammad Salari[1], Mohammad Jayan-Nikkhah[2*], Mahdi pirnia[1], Mohammad Reza Asef [3]
1. Ph.D. Student and Associate Professors of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Zabol University, Zabol, Iran.
2. Professor of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, Tehran University, Karaj, Iran.
3. Research Assistant Prof., Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.
(Received: August ,22, 2022- Accepted: January ,16, 2022)

Abstract

In this study, the effect of mycoendobiont fungi isolated from white button mushroom against *Mycogone perniciosa*, *Lecanicillium fungicula* and *Trichoderma harzianum*, as its important pathogens, was investigated for use in biological control and replacement of chemical compound. Isolates of mycoendobiont fungi were isolated from the cap, gills and stalk of healthy white button mushroom, collected from major mushroom growing farms in Iran. These isolates screened against aggressive strains mentioned above in dual culture tests and the most effective isolates were selected for greenhouse experiments. White button mushroom spawn was treated with the mycoendobiont fungi and disease incidence and growth parameters were measured. All mycoendobiont isolates tested were able to inhibit and compete with pathogens and controlled the incidence of wet bubble disease (*M. perniciosa*) from 21.42% to 97.61%, dry bubble disease (*L. fungicula*) from 60.63% to 96.80% and green mold disease (*T. harzianum*) from 64.28 to 96.93%. This test was performed in a completely randomized design with Three replications. Mycoendobiont isolates of *Fusarium venenatum* and *Clonostachys rosea* had the greatest inhibitory effect on the growth of all pathogens. In addition, *Scedosporium apiospermum* had a high growth inhibitory effect against *M. perniciosa* and *T. harzianum*. According to the results, mycoendobiont fungi of white button mushroom could be considered as the biocontrol agents and growth promoting with the aim of applying them in future.
Keywords: Biocontrol, pathogen, symbiosis, spawn

E-mail: jnikkhah@ut.ac.ir

مقدمه

قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید با نام علمی *Agaricus bisporus* (J.E. Lang) Imbach، به عنوان یکی از مهمترین انواع قارچ‌های خوراکی، جزء باصرفه‌ترین و اقتصادی‌ترین محصولات غذایی و دارویی می‌باشد که به دلیل کالری کم و محتوای بالای کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، فیبرهای غذایی، ترکیبات فنلی، اسیدهای چرب اشباع نشده، ویتامین‌ها و مواد معدنی منبع غذایی قابل توجهی برای انسان‌ها به‌حساب می‌آیند. این قارچ‌ها به صورت تجاری تولید می شوند و هنگام کاشت و داشت، همانند سایر محصولات کشاورزی مورد حمله عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرند (Largeteau and Savoie 2010, Fu *et al*. 2016). بیمارگرهای مختلف از جمله برخی قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها در چرخه تولید می‌توانند به قارچ‌های دکمه‌ای خسارت وارد کنند و باعث کاهش محصول شوند (Behnamian *et al*. 2016, Martinez-Arias *et al*. 2018). قارچ‌های بیماریزا در کشورهای مختلف، خسارت قابل توجهی را به پرورش‌دهندگان قارچ خوراکی وارد می‌کنند. در ایران، مقدار این خسارت برآورد نشده است، اما در مواردی مشاهده شده که در اثر حمله عوامل بیماریزای قارچی، عملکرد محصول ۵۰-۴۰ درصد کاهش یافته و یا کیفیت محصول به شدت پایین آمده و قابل عرضه به بازار نمی‌باشد (Mehrparvar *et al*. 2013). از مهمترین قارچ‌های بیماری‌زا می‌توان به عوامل بیماری‌های کپک سبز (*Trichoderma* spp.)، حباب‌تر *Mycogone perniciosa* (Magnus) Delacr.) و حباب خشک *Lecanicillium fungicula* (Preuss) Zare and (Gams) اشاره کرد. پس از تشکیل اندام باردهی، نشانه‌های بیماری کپک سبز اغلب به صورت ضایعات نکروزه قهوه‌ای دیده می‌شود (Largeteau and Savoi 2010). در بیماری حباب خشک، ممکن است شدت بیماری متفاوت باشد، نشانه‌ها به صورت توده‌های بی‌شکلی که در نهایت آب خود را از دست داده و خشک شده، با پایه‌های کج و ترک خورده و در نهایت لکه‌ها و زخم‌های بافت‌مرده دیده می‌شود (Berendsen *et al*. 2010)، از طرف دیگر، در بیماری حباب‌تر، یکی از مهمترین نشانه‌ها روی قارچ خوراکی، توسعه بافت مضمحل شده روی اندام بارده می‌باشد که در ابتدا سفید رنگ بوده و با گذشت زمان به رنگ قهوه‌ای در می‌آید و در شرایط رطوبت نسبی بالا، نقاط سوخته قهوه‌ای رنگ در سطح کلاهک شبیه به تومور ایجاد می‌شود (Mehrparvar *et al*. 2013).

پیشگیری از بیماری‌های قارچ دکمه‌ای، به رعایت بهداشت دقیق در سالن‌های پرورش قارچ بستگی دارد (Pecchia and Beyer 2013, Romain *et al*. 2005) اما استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی رایج‌ترین روش کنترل بیماری‌های قارچ خوراکی است، ولی سموم شیمیایی گران بوده و برای انسان و محیط زیست خطرناک هستند. علاوه بر آن، استفاده مستمر از قارچ‌کش‌های شیمیایی باعث ظهور سویه‌های مقاوم قارچ بیمارگر شده و اثربخشی آنها را کاهش داده و موجب اختلال در جامعه میکروبی، کاهش سلامت خاک، کاهش تنوع زیستی و برهم خوردن تعادل اکوسیستم می‌شوند (Romain *et al*. 2005, Park *et al*. 2009, Saha *et al*. 2012). در سال‌های اخیر، استفاده از قارچ‌کش‌های زیستی مبتنی بر عوامل میکروبی به‌عنوان یک جایگزین منطقی و ایمن به‌جای قارچ‌کش‌های شیمیایی، به‌خصوص برای مدیریت عوامل بیماری‌زای خاکزی در نظر گرفته شده است زیرا قارچ‌کش‌های زیستی از طریق عملکردهای مختلف توانایی آنتاگونیسم بیمارگرها را دارا هستند که می‌توانند در کنترل بیولوژیک بسیار کارآمد باشند (Chittihunsa *et al*. 2007, Saha *et al*. 2012, Solanki *et al*. 2013). قارچ‌های درون‌زی (mycoendobiont) به گروهی از قارچ‌ها گفته می‌شوند که تمام یا بخشی از چرخه زندگی خود را داخل بافت‌های میزبان قارچی به صورت همزیست سپری می‌کنند، بدون اینکه علائمی از بیماری بروز دهند. این رابطه همزیستی بین قارچ‌ها رخ می‌دهد، یعنی هر دو شریک همزیست، قارچ هستند (Honegger 1996). قارچ‌های درون‌زی همزیست، به میسیلیوم‌های میزبان قارچی خود، در جذب مواد مغذی کمک می‌کنند و با افزایش مقاومت و بهبود

رشد میزبان، مانع از رشد بیمارگرها و محافظت از آن می‌شوند (Fazio *et al.* 2009). قارچ‌های درون‌زی منبع غنی از متابولیت‌های فعال هستند که پتانسیل استفاده از این متابولیت‌ها در پزشکی، کشاورزی و صنعت وجود دارد، به طوری‌که شناسایی و استفاده از آنها رو به افزایش است (Bacon and White 2000, Kovacic and Pustijanac 2017).

تاکنون پژوهشی درباره مهار زیستی بیماری‌های مختلف قارچ دکمه‌ای در دنیا و ایران با استفاده از قارچ‌های درون‌زی انجام نشده است. از این‌رو، پژوهش حاضر با هدف بررسی فعالیت ضدقارچی برخی قارچ-های درون‌زی جداسازی شده از قارچ دکمه‌ای سفید، علیه سه عامل بیماری‌زای مهم در سالن‌های پرورش قارچ دکمه‌ای انجام گردید.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های قارچ دکمه‌ای

با هدف دستیابی به قارچ‌های درون‌زی قارچ دکمه‌ای، در طی بهار و تابستان سال ۱۳۹۸، نمونه‌برداری از سالن‌های پرورش قارچ خوراکی از سراسر ایران انجام شد. نمونه‌برداری از قارچ‌های سالم و بدون هیچگونه علائم بیماری صورت گرفت و نمونه‌ها با ثبت مشخصات مکان جمع‌آوری، به یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس منتقل شدند (Royse and Wilkinson 2015).

جداسازی قارچ‌های درون‌زی

جداسازی قارچ‌های درون‌زی طی حداکثر ۴۸ ساعت پس از نمونه برداری و انتقال به آزمایشگاه، براساس روش رویز و ویلکینسون (Royse and Wilkinson 2015) انجام شد. قطعات حدود نیم سانتی‌متری بافت اندام باردهی قارچ دکمه‌ای سالم و نارس پس از ضدعفونی سطحی با محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده با یک درصد ماده مؤثر، روی محیط کشت آب-آگار دو درصد (WA) که حاوی آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین و پنی‌سیلین به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر بود، کشت و در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی به‌مدت ده روز نگهداری شدند. ریسه‌های قارچی که از قطعات قارچ کشت داده شده، رشد کرده بودند، به محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (potato dextrose agar-PDA, Merck, Germany) منتقل شدند و سپس خالص‌سازی جدایه‌های قارچ درون‌زی به‌روش نوک ریسه و تک اسپور انجام شد.

بررسی اثر آنتاگونیستی قارچ‌های درون‌زی

برای انجام آزمون، از جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر حباب‌تر (*Mycogone perniciosa*)، حباب خشک (*Lecanicillium fugicula*) و کپک سبز (*Trichoderma harzianum*) که از کلکسیون قارچ‌های زنده موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور دریافت گردید، در شرایط آزمایشگاه و گلخانه استفاده شد.

آزمون کشت متقابل

این آزمون به‌روش دنیس و وبستر (Dennis and Webster 1971) انجام شد. در یک طرف تشتک پتری به قطر نُه سانتی‌متر، به‌فاصله دو سانتی‌متری از حاشیه تشتک، یک قرص پنج میلی‌متری از هر یک از جدایه‌های قارچ‌های بیمارگر و در طرف دیگر با همان فاصله از حاشیه تشتک، یک قرص به قطر پنج میلی‌متر از هر یک از جدایه‌های قارچ درون‌زی قرار داده شد. در تیمارهای شاهد جدایه‌های گونه‌های بیمارگر با همان شرایط بالا قرار گرفت و به جای قرص میسیلیوم قارچ درون‌زی، یک قرص پنج میلی‌متری از محیط کشت بدون قارچ در طرف دیگر قرار داده شد و سپس تشتک‌ها به مدت چهارده روز در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری گردیدند. شعاع پرگنه‌ها در روز چهاردهم برای محاسبات آماری اندازه‌گیری شد و درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی با فرمول $[(R_1-R_2)/R_1]\times100$ محاسبه شد که در آن R_1 شعاع پرگنه در شاهد و R_2 شعاع پرگنه در تیمار است (Lahlali and Higri 2010). این آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی و با

سه تکرار انجام شد. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت پذیرفت.

بررسی اثر جدایه‌های برتر در کنترل بیمارگر

جدایه‌های قارچی درون‌زی که در آزمون کشت متقابل در آزمایشگاه، بیشترین اثر بازدارندگی را روی رشد میسلیومی سه قارچ بیمارگر *M. porniciosa*، *L. fungicola* و *T. harzianum* نشان داده بودند و هاله بازدارندگی ایجاد کردند، برای آزمون گلخانه‌ای (در شرایط *In vivo*) انتخاب شدند. جهت انجام این آزمایش، به ازای هر کیلو کمپوست دو گرم اسپان در هر کیسه قرار داده شد و در اتاقک کشت قارچ خوراکی، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۵ درصد نگهداری شدند. پس از دو هفته که میسلیوم قارچ خوراکی تمام سطح کمپوست را پوشاند و سطح کمپوست به رنگ سفید درآمد، خاک پوششی به قطر سه سانتیمتر اضافه شد و سطح خاک پوششی آبیاری گردید. در این آزمایش از دو روش برای مایه زنی قارچ‌های درون‌زی استفاده شد.

الف) تیمار اسپان با قارچ‌های درون‌زی اسپورزا: ابتدا از کشت دَه روزه قارچ‌های درون‌زی اسپورزا روی محیط‌کشت PDA، توسط لام گلبول‌شمار (هموسیتومتر)، سوسپانسیون اسپور با غلظت ۱×۱۰^{۸} اسپور در هر میلی‌لیتر تهیه شد و به اسپان‌های قارچ-دکمه‌ای اضافه گردید و به مدت ۲۴ساعت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس قرص پنج میلی‌متری هر کدام از قارچ‌های بیمارگر *M. porniciosa*، *L. fungicola* و *T. harzianum* بصورت جداگانه در دَه میلی‌لیتر از این مخلوط به مدت ۴۸ ساعت غوطه‌ور شدند و در نهایت به کمپوست اضافه گردید (Santos *et.al.* 2017).

ب) تیمار اسپان با قارچ‌های درون‌زی بدون اسپور: ابتدا از کشت هفت روزه هرکدام از قارچ‌های بیمارگر روی محیط‌کشت PDA، سوسپانسیون اسپور با غلظت ۱×۱۰^{۸} اسپور در هر میلی‌لیتر (مطابق روش اشاره شده در بالا) تهیه شد و به اسپان‌های قارچ دکمه‌ای اضافه گردید. اسپان‌های تلقیح شده با هر کدام از قارچ‌های بیمارگر، در کنار پرگنه‌های چهار روزه و در حال رشد قارچ‌های درون‌زی، در محیط کشت PDA به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند و سپس در کیسه‌های حاوی کمپوست کاشته شدند (Itako *et al*. 2008).

تیمارهای آزمایش به صورت زیر بودند.

- اسپان‌های مایه‌زنی شده با هر کدام از قارچ‌های بیمارگر به صورت جداگانه، به‌علاوه هر یک از قارچ‌های درون‌زی انتخابی
- اسپان‌های مایه‌زنی شده با هر کدام از قارچ‌های درون‌زی انتخابی
- اسپان‌های مایه‌زنی شده با بیمارگرها و ضدعفونی شده با قارچ‌کش پروکلراز
- اسپان‌های مایه‌زنی شده با بیمارگرها به تنهایی (شاهد آلوده)
- اسپان‌های مایه‌زنی نشده نه با بیمارگرها و نه با قارچ‌های درون‌زی (شاهد سالم)

پس از ۲۱ روز، درصد وقوع بیماری با شمارش تعداد قارچ‌های دکمه‌ای سالم و بیمار کشت شده تعیین و میزان کنترل بیماری برای هر تیمار محاسبه گردید. میزان کنترل بیماری با فرمول $[D_1 - D_2 / D_1]\times100$ محاسبه شد که در آن D_1 درصد وقوع بیماری در شاهد آلوده و D_2 درصد وقوع بیماری در تیمار است. این آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی و با پنج تکرار (هر تکرار شامل ۱۲۰ اسپان) انجام شد. داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.1 تجزیه و تحلیل شدند. گروه‌بندی تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

بررسی تاثیر جدایه‌های درون‌زی روی رشد قارچ‌های دکمه‌ای

به منظور بررسی اثر تیمار اسپان با جدایه‌های درون‌زی روی رشد قارچ دکمه‌ای، ۱۲۰ اسپان در کیسه حاوی کمپوست سترون کاشته شد. کیسه‌ها در شرایط ذکر شده در بالا نگهداری شدند و وزن تر و وزن خشک قارچ دکمه‌ای برای هر تیمار بعد از ۲۱ روز اندازه‌گیری شد. جهت ارزیابی وزن تر و تعداد

قارچ‌های دکمه‌ای، کلیه قارچ‌های دکمه‌ای از سطح هر بستر به طور مجزا جمع‌آوری و قارچ‌های سالم برای هر بستر به‌طور مجزا توزین و شمارش شدند. برای اندازه‌گیری وزن خشک قارچ دکمه‌ای هر تیمار، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۱۰۵ درجه سلسیوس در آون نگهداری و سپس توزین شدند. تمامی آزمایشات با سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا شد.

شناسایی قارچ‌های درون‌زی مؤثر

قارچ‌های درون‌زی که در آزمایش گلخانه مؤثرتر بودند، مورد شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی قرار گرفتند. ابتدا میزان رشد روزانه جدایه‌ها روی محیط‌کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد. سپس، خصوصیات ریخت‌شناختی قارچ‌ها شامل ظاهر پرگنه (رنگ سطح و پشت پرگنه، شکل و سرعت رشد پرگنه) و خصوصیات میکروسکوپی بررسی شد. به این منظور، برای جنس *Fusarium* از محیط‌کشت برگ میخک-آگار (Carnation leaf agar (CLA)) و محیط‌کشت ساکارز-نیترات-آگار (SNA)، برای جنس‌های *Alternaria* و *Ulocladium* از محیط‌کشت سیب‌زمینی-هویج-آگار (PCA) برای جنس‌های *Penicillium* و *Aspergillus* از محیط‌کشت CYA و برای سایر جنس‌های قارچی از محیط‌کشت عمومی PDA و عصاره مالت (Malt Extract Agar) و محیط کشت اختصاصی (عصاره قارچ دکمه‌ای-مالت -آگار) استفاده شد. همه کشت‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از انجام بررسی‌های ریخت‌شناختی و شناسایی قارچ‌ها براساس کلیدهای شناسایی و توصیف‌های قارچی معتبر (Sivanesan1984، Woudenberg *et al*. 2013، Crous *et al*. 2006، Hibbett *et al*. 2016، Lucking *et al*. 2020 و Sagita *et al*. 2021)، برای تأیید شناسایی ریخت‌شناختی و یا برای قارچ‌های عقیم که شناسایی ریخت‌شناختی آنها ممکن نبود، شناسایی مولکولی انجام گردید.

برای بررسی مولکولی، استخراج DNA ژنومی به‌روش ژانگ و استفنسون انجام گرفت (Zhong and Steffenson 2001). ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از nrDNA با ترکیب آغازگرهای عمومی ITS1 و ITS4 فزون‌سازی شد (White *et al*. 1990). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در شرایط واسرشتگی مقدماتی (۹۵ درجه سلسیوس، پنج دقیقه) و در ادامه در ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی (۹۴ درجه سلسیوس، یک دقیقه)، اتصال آغازگرها (۵۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه) و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه انجام گردید. قطعه ژنومی فزون‌سازی شده، برای توالی سنجی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. تخلیص و تعیین توالی توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام شد. بعد از دریافت فایل‌ab1 قطعات تعیین توالی شده، کروماتوگرام مربوط به توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Finch TV 1.4 مشاهده و ارزیابی شد. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0 اصلاح و استخراج شدند.

نتایج

جداسازی قارچ‌های درون‌زی

تعداد ۳۱۰ جدایه قارچی درون‌زی از اندام‌های مختلف قارچ دکمه‌ای سفید از سالن‌های پرورش قارچ خوراکی در سراسر ایران جداسازی و خالص‌سازی شد. تمام ۳۱۰ جدایه قارچی بدست آمده برای مطالعات آزمایشگاهی انتخاب شدند و بعد از غربالگری اولیه براساس خصوصیات ریخت شناختی (شامل رنگ سطح و رنگ پشت پرگنه، شکل و سرعت رشد پرگنه و سایر مشخصات میکروسکوپی)، ۳۰ جدایه قارچ درون‌زی از بین آنها به‌عنوان نماینده انتخاب شدند.

اثر آنتاگونیستی قارچ‌های درون‌زی

در کشت متقابل، توانایی قارچ‌های درون‌زی مورد بررسی در بازدارندگی از رشد قارچ *M. perniciosa*، پس از چهارده روز از۹/۰۴ تا ۹۴/۵۷ درصد متغیر بود (جدول ۱). با توجه به گروه‌بندی انجام شده با آزمون

دانکن در سطح یک درصد، بیشترین میزان تفاوت نسبت به شاهد برای جدایه‌های KS-S32، KS-C22، KS-S58 وKS-C39 با درصد بازدارندگی ۹۴/۵۷، ۸۹/۴۴، ۸۵/۶۵ و ۷۹/۱۴ درصد از قارچ *M. perniciosa* است. توانایی قارچ‌های درون‌زی مورد بررسی در بازدارندگی از رشد قارچ *L. fungicola* پس از چهارده روز، از ۹ تا ۹۶ درصد متغیر بود (جدول ۱). با توجه به گروه‌بندی انجام شده توسط آزمون دانکن در سطح یک درصد، بیشترین میزان تفاوت نسبت به شاهد در جدایه‌های KS-S32، KS-C22 و KS-C132 با درصد بازدارندگی ۹۶، ۹۲/۶۵ و ۸۷/۱۳ درصد از قارچ *L. fungicola* است. توانایی قارچ‌های درون‌زی مورد بررسی در بازدارندگی از رشد قارچ *T. harzianum* پس از چهارده روز، از ۶ تا ۹۵ درصد متغیر بود (جدول ۱). با توجه به گروه‌بندی انجام شده توسط آزمون دانکن در سطح یک درصد، بیشترین میزان تفاوت نسبت به شاهد در جدایه‌های KS-S32، KS-C22، KS-C210 و KS-S58 با درصد بازدارندگی ۹۵، ۹۳/۹۳، ۸۹/۱۱ و ۸۶/۱۱ درصد از قارچ *T. harzianum* است. مقایسه میانگین تیمارهای آزمایش نشان داد که رشد میسلیومی و درصد ممانعت از رشد برای هر سه قارچ بیمارگر با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

تاثیر جدایه‌های برتر در کنترل بیماری در گلخانه

بررسی فعالیت مهار زیستی جدایه‌های برتر قارچ‌های درون‌زی در شرایط گلخانه نشان داد که جدایه‌های درون‌زی KS-S32، KS-C22، KS-S58، KS-C39، KS-C103، KS-C68 و KS-S210 پتانسیل بیشتری برای کنترل قارچ بیمارگر *M. perniciosa* (عامل بیماری حباب‌تر) داشته و درصد وقوع بیماری در حضور این جدایه‌ها به ترتیب ۲، ۳، ۴، ۷، ۹، ۱۰ و ۱۰ درصد، بود. جدایه‌های درون‌زی KS-S32، KS-C22 و KS-C103 توانایی بالایی در کنترل قارچ بیمارگر *L. fungicola* (عامل بیماری حباب خشک) داشتند و درصد وقوع بیماری در حضور این جدایه‌ها به ترتیب ۳، ۷ و ۱۰ درصد، بود. جدایه‌های درون‌زی KS-C22، KS-S32، KS-S58، KS-C103، KS-C39، KS-G80 و KS-S210 قابلیت بالایی برای کنترل قارچ بیمارگر *T. harzianum* (عامل بیماری کپک سبز) از خود نشان دادند و درصد وقوع بیماری در حضور این جدایه‌ها به ترتیب ۳، ۳، ۳، ۷، ۹، ۹ و ۱۰ درصد، بود. درصد وقوع بیماری در شاهد بیمار بدون حضور قارچ درون‌زی برای بیماری حباب‌تر، ۸۴ درصد، برای بیماری حباب خشک، ۹۴ درصد و برای بیماری کپک‌سبز، ۹۸ درصد بود. درصد وقوع بیماری برای شاهد تیمار نشده، برای بیماری حباب‌تر، ۲۵ درصد، برای بیماری حباب خشک، ۲۵ درصد و برای بیماری کپک سبز ۳۲ درصد بود که وجود بیماری در شاهد تیمار نشده، به‌دلیل وجود احتمالی سایر بیمارگرها در کمپوست است.

درصد وقوع بیماری در حضور قارچ‌کش برای بیماری حباب‌تر ۱۵ درصد، برای بیماری حباب خشک ۱۵ درصد و برای بیماری کپک سبز ۲۰ درصد بود. از بین دوازده جدایه قارچ درون‌زی مورد آزمایش، دو جدایه درون‌زی KS-S32 و KS-C103، پتانسیل بسیار خوبی در کنترل بیمارگرها داشتند و هر سه بیماری حباب‌تر، حباب خشک و کپک سبز را کنترل کردند. نتایج تجزیه واریانس درصد وقوع بیماری‌های حباب‌تر، حباب خشک و کپک‌سبز در گلخانه نشان داد که اثر تیمار روی این صفت در سطح یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمارها از نظر تاثیر روی وقوع بیماری در سطح یک درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند (جدول ۲).

تاثیر جدایه‌های درون‌زی قارچی روی رشد قارچ دکمه‌ای

تاثیر جدایه‌های درون‌زی روی رشد قارچ دکمه‌ای، ۲۱ روز پس از کاشت اسپان‌های قارچی تیمار شده در کیسه‌های حاوی کمپوست، با اندازه‌گیری میزان بازدهی قارچ دکمه‌ای، وزن تر و وزن خشک اندام بارده مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه‌های KS-C22، KS-S32 و KS-C103 میزان بازدهی قارچ دکمه‌ای را نسبت به اسپان‌هایی که با جدایه‌های

درون‌زی تلقیح نشده بودند، افزایش دادند (جدول۲). نتایج تجزیه واریانس شاخص‌های رشد شامل میزان بازدهی قارچ دکمه‌ای، وزن تر و وزن خشک اندام بارده در گلخانه نشان داد که اثر هریک از تیمارها روی همگی این صفات در سطح یک درصد معنی‌دار است.

نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان دادند که تیمارها از نظر تاثیر روی همه شاخص‌های رشدی مذکور در سطح یک درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند (جدول۲). جداسازی مجدد قارچ‌های درون‌زی در این مرحله در محیط WA انجام شد و حضور مجدد همان گونه‌های مایه‌زنی شده بصورت درون‌زی در قارچ دکمه‌ای اثبات شد.

شناسایی قارچ‌های درون‌زی موثر

دوازده جدایه موثر قارچ درون‌زی که در آزمون گلخانه بیشترین درصد بازدارندگی رشد در برابر هر سه بیماری حباب‌تر، حباب خشک و کپک سبز داشتند، با توجه به بررسی‌های ریخت شناسی و مولکولی، شناسایی شدند. گونه‌های قارچی درون‌زی شناسایی شده همراه با سایر مشخصات هر جدایه شامل درصد کنترل بیماری، خاستگاه هر جدایه، مکان جداسازی و شماره دسترسی در بانک ژن (مربوط به ناحیه rDNA-ITS) در جدول ۳ نمایش داده شده است.

جدول۱- تاثیر قارچ‌های درون‌زی جداسازی شده از قارچ دکمه‌ای سفید روی رشد میسیلیومی قارچ‌های بیمارگر *Mycogone perniciosa* (عامل حباب‌تر)، *Lecanicillium fungicula* (عامل حباب خشک) و *Trichoderma harzianum* (عامل کپک‌سبز) با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در نرم افزار SAS 9.1.

Table 1. Effect of mycoendobiont fungi isolated from white button mushroom on mycelial growth of *Mycogone perniciosa*, *Lecanicillium fungicula* and *Trichoderma harzianum* by using Duncan's multiple range test in SAS 9.1 software.

Pathogen	*Mycogone perniciosa*		*Lecanicillium fungicula*		*Trichoderma harzianum*	
Treatment	Mycelial growth (mm)	Inhibition (%)	Mycelial growth (mm)	Inhibition (%)	Mycelial growth (mm)	Inhibition (%)
Control	92.00 a	-	97.00 a	-		99.00 a
KS-C7	22.00 t	73.86 de	19.89 rs	69.33 gh	34.56 op	62.79 ij
KS-C22	12.00 y	89.44 ab	6.90 yz	92.65 b	7.20 yz	93.93 ab
KS-C31	39.20 p	58.30 hij	21.00 r	67.98 h	18.00 w	80.00 f
KS-C39	18.90 v	79.14 cd	37.00 m	47. 00 l	20.87 uv	78.65 fg
KS-C40	20.20 tu	75.40 cde	65.46 efg	22.14 qr	41.78 mn	50.50 lm
KS-C48	28.12 rs	65.36 f	84.00 c	10.10 wx	47.00 l	46.33 mn
KS-C55	52.00 l	45.60 mn	17.00 st	71.56 efg	54.39 ij	38.00 op
KS-C62	89.12 b	9.04 yz	42.00 l	41.00 lm	62.33 gh	29.00 r
KS-C68	70.27 ef	19.10 st	67.90 f	20.20 rs	74.74 ef	20.23 tu
KS-C69	65.00 g	27.00 qr	89.12 bc	9.97 xy	80.60 d	15.19 vw
KS-C87	48.00 m	47.25 lmn	90.00 b	9.00 y	94.00 b	9.90 y
KS-C103	46.76 mn	49.00 lmn	34.34 mn	49.74 kl	12.40 wx	85.85 cd
KS-C104	71.65 def	18.10 stu	14.90 t	72.35 ef	29.79 r	69.00 h
KS-C132	75.00 de	15.50 v	7.40 y	87.13 c	14.14 wx	82.33 ef
KS-C210	28.60 rs	65.33 f	74.00 e	17.17 tu	9.00 y	89.11 c
KS-C285	29.12 r	64.00 f g	27.00 o	56.99 j	28.94 r	69.44 h
KS-C303	62.02 h	35.01 nop	47.90 jk	38.13mn	37.00 o	57.13 k
KS-G9	87.04 bc	9.78 y	70.13 ef	19.87 t	44.44 lm	49.00 m
KS-G11	58.00 ijk	40.00 no	12.90 u	77.00 e	77.00 e	32.03 q

KS-G18	42.00 n	50.67 klmn	10.87 v	78.18 de	67.00 g	26.07 rs
KS-G80	55.33 jk	42.10 n	32.13 n	50.12 jk	77.60 de	17.17 v
KS-G111	32.00 q	61.33fgh	49.00 j	37.00 n	97.22 ab	6.00 z
KS-G222	40.13 no	55.00 ij	76.67de	16.92 tuv	23.23 tu	74.00 g
KS-G307	36.66 pq	59.67 gh	9.90 vw x	79.20 de	88.00 c	13.87 x
KS-S4	82.50 c	13.00 x	9.00 wx	83.70 d	70.87 efg	23.55 t
KS-S32	9.00 z	94.57 a	6.00 z	96.00 a	6.00 z	95.00 a
KS-S50	79.00 d	14.19 vwx	55.78 hi	30.11 op	32.00 pq	64.00 h i
KS-S58	15.00 wx	85.65 bc	59.65 h	27.00 q	10.90 wxy	86.11 cd
KS-S210	69.90 f	20.13 s	79.45 d	12.71 w	38.90 no	54.33 kl
KS-S243	60.21 hi	33.40 opq	94.33 ab	7.90 z	51.07 ijk	40.76 o

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Values followed by the same letter are not statistically significantly different ($P \leq 0.01$).

جدول ۲- تاثیر جدایه‌های قارچ‌های درون‌زی روی شیوع بیماری‌های حباب‌تر، حباب خشک و کپک سبز در قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)، میزان بازدهی، وزن تر و وزن خشک قارچ دکمه‌ای سفید در شرایط گلخانه با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در نرم افزار SAS 9.1.

Table 2. Effect of mycoendobiont fungi on incidence of wet bubble disease, dry bubble disease and green mold disease, yield, fresh weight and dry matter under greenhouse conditions by using Duncan's multiple range test in SAS 9.1 software.

Pathogen	*Mycogone perniciosa*				*Lecanicillium fungicula*				*Trichoderma harzianum*			
Treatment	Disease Incidence (%)	Number of mushroom (g)	Mushroom fresh weight (g)	Mushroom dry matter (g)	Disease Incidence (%)	Number of mushroom (g)	Mushroom fresh weight (g)	Mushroom dry matter (g)	Disease Incidence (%)	Number of mushroom (g)	Mushroom fresh weight (g)	Mushroom dry matter (g)
Inoculated control	84.00 a	14.00 e	1.00 d	0.07 d	94.00 a	20.00 d	0.93 f	0.05 f	98.00 a	14.00 d	1.16 e	0.20 e
Non-inoculated control	25.00 bc	42.00 bc	4.20 bc	0.75 c	25.00 d	35.00 c	2.70 e	0.45 e	32.00 b	50.00 b	3.50 cd	0.73 c
Prochloraz	15.00 cd	60.00 ab	4.20 bc	0.75 c	15.00 e	70.00 ab	3.00 de	0.57 d	20.00 c	75.00 ab	3.00 de	0.67 d
KS-C22	3.00 e	90.00 a	5.50 a	0.94 a	7.00 f	90.00 a	4.80 ab	0.88 a	3.00 f	94.00 a	4.50 b	0.84 b
KS-C39	7.00 de	38.00 c	4.50 b	0.80 b	14.00 e	50.00 b	3.90 c	0.68 c	9.00 de	55.00 b	4.10 b	0.80 b
KS-C68	10.00 d	65.00 ab	4.59 ab	0.80 b	15.00 e	60.00 ab	4.70 ab	0.80 ab	10.00 de	55.00 b	4.30 b	0.81 b
KS-C87	12.00 cd	34.00 c	4.36 bc	0.75 c	22.00 d	35.00 c	4.40 b	0.72 b	12.00 d	35.00 c	3.98 c	0.78 bc
KS-C103	9.00 d	78.00 ab	5.00 a	0.90 a	10.00 ef	90.00 a	4.65 ab	0.78 b	7.00 e	85.00 ab	4.36 b	0.81 b
KS-C104	18.00 c	40.00 bc	4.72 ab	0.88 b	37.00 c	40.00 c	4.19 bc	0.70 b	15.00 d	35.00 c	3.50 cd	0.73 c
KS-C285	12.00 cd	53.00 b	4.50 b	0.80 b	25.00 d	50.00 b	3.90 c	0.68 c	9.00 de	55.00 b	3.88 c	0.75 c
KS-C303	66.00 b	18.00 de	4.00 c	0.73 c	54.00 b	25.00 cd	3.50 cd	0.62 c	35.00 b	25.00 cd	3.22 d	0.70 cd
KS-G9	20.00 bc	25.00 d	4.10 bc	0.75 c	15.00 e	35.00 c	3.20 d	0.59 cd	15.00 d	40.00 bc	3.00 de	0.68 d
KS-S32	2.00 e	95.00 a	5.65 a	0.96 a	3.00 f	92.00 a	5.00 a	0.90 a	3.00 f	97.00 a	5.10 a	0.90 a
KS-S58	4.00 de	40.00 c	4.44 b	0.77 c	12.00 e	50.00 b	3.75 c	0.65 c	3.00 f	75.00 ab	4.10 b	0.80 b
KS-S210	10.00 d	42.00 bc	4.50 b	0.80 b	22.00 d	70.00 ab	4.33 b	0.72 b	10.00 d	70.00 ab	4.00 bc	0.80 b

در هر ستون میانگین‌هایی که دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Values followed by the same letter are not statistically significantly different ($P \leq 0.01$).

جدول ۳- مشخصات جدایه‌های قارچ‌های درون‌زی مؤثر در کنترل قارچ‌های بیماریزای قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) در شرایط گلخانه.

Table 3. Characteristics of effective mycoendobiont fungi isolated from white button mushroom (*Agaricus bisporus*) to control of its fungal pathogens in greenhouse condition.

Isolate	Species	Host origion	Sampling origion	Efficacy of *Mycogone perniciosa* (%)	Efficacy of *Lecanicillium fungicula* (%)	Efficacy of *Trichoderma harzianum* (%)	Accession Number
KS-C22	*Clonostachys rosea*	Cap	Birjand	96.42	92.55	96.93	MZ209286
KS-C39	*Paecilomyces maximus*	Cap	Esfahan	91.66	85.10	90.81	MZ226441
KS-C68	*Aspergillus ustus*	Cap	Zanjan	88.09	84.04	89.79	MZ339215
KS-C87	*Cladosporium allicinum*	Cap	Malard	87.71	76.59	87.75	MZ230372
KS-C103	*Curvularia inaequalis*	Cap	Dezful	89.28	89.36	92.85	OK117928
KS-C104	*Penicillium chrysogenum*	Cap	Kermanshah	78.57	60.63	84.69	MZ226442
KS-C285	*Epicoccum nigrum*	Cap	Hamedan	85.71	73.40	90.81	MZ724665
KS-C303	*Cephalotrichum purpureofuscum*	Cap	Tabriz	21.42	42.55	64.28	MZ339216
KS-G9	*Alternaria alternata*	Gill	Sari	76.19	84.04	84.69	MZ344146
KS-S32	*Fusarium venenatum*	Stalk	Mashhad	97.61	96.80	96.93	MZ343574
KS-S58	*Scedosporium apiospermum*	Stalk	Gorgan	95.23	87.23	96.93	MZ230371
KS-S210	*Chaetomium atrum*	Stalk	Kerman	88.09	76.59	89.79	MZ339214

بحث

نتایج این پژوهش نشان داد، همه جدایه‌های درون‌زی مورد آزمایش، دارای اثر بازدارندگی در برابر قارچ‌های بیمارگر بودند و جدایه های KS-C22 و KS-S32 بیشترین اثر بازدارندگی را در برابر هر سه بیمارگر داشتند. همچنین، جدایه KS-S58 اثر بازدارندگی بیشتری در برابر دو قارچ بیمارگر *M. perniciosa* و *T. harzianum* داشت ولی در برابر قارچ *L. fungicula* تاثیر قابل توجهی از خود نشان نداد.

همه دوازده جدایه قارچ‌های درون‌زی مورد آزمایش، وقوع بیماری حباب‌تر را به میزان ۲۱/۴۲ تا ۹۷/۶۱ درصد و وقوع بیماری حباب خشک را به میزان ۶۰/۶۳ تا ۹۶/۸۰ درصد و وقوع بیماری کپک سبز را به میزان ۶۴/۲۸ تا ۹۶/۹۳ درصد در گلخانه کنترل کردند که با اثر قارچ‌کش شیمیایی اختلاف معنی دار نداشتند. بیشترین مقدار کنترل برای هر سه بیماری حباب‌تر، حباب خشک و کپک سبز مربوط به گونه‌های درون‌زی *Fusarium venenatum* و *Clonostachys rosea* به ترتیب با ۹۷/۶۱ و ۹۶/۴۲ درصد برای بیماری حباب‌تر و ۹۲/۵۵ تا ۹۶/۸۰ درصد برای بیماری حباب خشک و ۹۶/۹۳ تا ۹۶/۹۳ درصد برای بیماری کپک سبز بود. همچنین، گونه *Scedosporium apiospermum* نیز با ۹۶/۹۳ درصد بازدارندگی توانست بیماری کپک سبز را کنترل کند. به این ترتیب سه جدایه درون‌زی *Fusarium venenatum*، *Clonostachys rosea* و *Scedosporium apiospermum* به‌عنوان جدایه‌های برتر در این پژوهش گزارش شدند.

گونه *Clonostachys rosea* از سراسر جهان گزارش شده و در انواع مختلف زیستگاه‌ها وجود دارد و به‌عنوان یک مایکوپارازیت قدرتمند، توانایی کنترل بیولوژیک زیادی را در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی گیاهان، نماتدها و حشرات به نمایش می‌گذارد. این رفتار براساس فعال‌سازی مکانیسم‌های متعددی مانند آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلول، تولید متابولیت‌های ثانویه ضد قارچ و القای سیستم‌های

دفاعی در گیاه است (Sun *et al*. 2020). قارچ *C. rosea* توانایی درون‌زی شدن را در بافت‌های مختلف گیاهان به نمایش گذاشته و از شاخه و برگ گیاه شمعدانی و ریشه خیار به صورت اندوفیت جداسازی شده است (Chatterton and Punja 2015, Chatterton and punja 2012).

گونه *Fusarium venenatum*، قارچی ساکن خاک، غیر بیماری‌زا و اندوفیت است که بطور معمول در صنعت تخمیر بصورت تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد و یک عامل بیوکنترل برای مهار رشد گونه‌های بیماری‌زای *Fusarium* گزارش شده است (MCCallum *et al*. 2004). در این تحقیق نیز بیشتر از ۹۶ درصد در گلخانه در مقابل هر سه بیماری قارچ دکمه‌ای موجب کنترل شده است.

گونه‌های مختلف قارچ *Paecilomyces* sp. در مطالعات فراوان، کنترل کننده آفات و نماتد مولد گره ریشه می‌باشد (Yazid *et al*. 2020)، در تحقیق حاضر نیز، قارچ درون‌زی *Paecilomyces maximus*، کنترل کننده هر سه بیماری مورد آزمایش، در قارچ دکمه‌ای بوده است.

قارچ *Aspergillus ustus* هم به‌عنوان عامل بیماری‌زا در گیاهان شناخته می‌شود (Kucuk and Kivance 2008) و هم اثر آنتاگونیستی برخی از سویه‌های آن در برابر قارچ‌های بیمارگر *Penicillium chrysogenum* و *Aspergillus tamarii* در زیتون گزارش شده است (Gharsallah *et al*. 2020)، همچنین برخی از سویه‌های آن با تولید فیتوهورمون موجب القای مقاومت سیستمیک در گیاه آرابیدوپسیس در برابر قارچ نکروتروف *Botrytis cinerea* و باکتری همی‌بیوتروف *Pseudomonas syringae* می‌شود (Salsa-Marina 2011). در این آزمایش، بیشتر از ۸۰ درصد موجب کنترل هر سه بیماری قارچ دکمه‌ای در گلخانه شد.

سویه‌های مختلف قارچ *Cladosporium* sp. در مطالعات مختلف به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک و همچنین به‌عنوان اندوفیت‌های مفید کنترل کننده بیماری‌های گیاهی معرفی شده‌اند (Kohl *et al*. 2018, Abdallah Chaibub *et al*. 2020). در پژوهش حاضر، قارچ *Cladosporium allicinum* از کلاهک قارچ خوراکی دکمه‌ای جداسازی شد و بیشتر از ۷۵ درصد در گلخانه موجب کنترل هر سه بیماری قارچ‌خوراکی دکمه‌ای شد. براساس اطلاعات ما، این اولین گزارش از این گونه به‌عنوان قارچ درون‌زی و عامل کنترل بیولوژیک بیماری در قارچ خوراکی دکمه‌ای است. سویه‌های مختلف قارچ *Penicillium chrysogenum* در مطالعات مختلف به‌عنوان عامل آنتاگونیست روی بیمارگرهای گیاهی و نماتدها گزارش شده است (Jackson *et al*. 1994, Sikandar *et al*. 2020) و بصورت اندوفیت و عامل کنترل بیولوژیک نیز از گیاهان مختلف جداسازی و گزارش شده است (Meng *et al*. 2011). در آزمایش حاضر، جدایه قارچی *Penicillium chrysogenum* توانست هر سه بیماری قارچ دکمه‌ای را کنترل کند.

قارچ *Cephalotrichum purpureofuscum* تاکنون به عنوان عامل بیوکنترل معرفی نشده است و این اولین گزارش از این گونه به‌عنوان قارچ درون‌زی و عامل کنترل بیماری است که موجب کنترل هر سه بیماری بین ۲۱ تا ۶۴ درصد گردید.

قارچ *Alternaria alternata* در بسیاری از گزارشات عامل بیماری لکه برگی با دامنه میزبانی فراوان معرفی شده است (Ghosh *et al*. 2016, Tozlu *et al*. 2018). این گونه بصورت اندوفیت نیز از گیاهان (میزبان‌های) مختلف از جمله گیاه داروئی *Pinus tabulaeformis* جداسازی شده است (Dong Guo *et al*. 2004). این قارچ از گیاه داروئی *Ephorbia larica* بصورت اندوفیت جداسازی شده و دارای فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ بیمارگر *Fusarium* sp. می‌باشد (Al-Rashdi *et al*. 2020). در پژوهش حاضر نیز، جدایه قارچی *Alternaria alternata* بیشتر از ۷۵ درصد در گلخانه در مقابل هر سه بیماری قارچ دکمه‌ای موجب کنترل شده است.

قارچ *Epicoccum nigrum* به عنوان قارچ اندوفیت و عامل کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی از جمله بیماری *Monilia* spp. در هلو و شلیل، *Sclerotinia*

sclerotiorum در آفتابگردان و *Pythium* در پنبه معرفی شده است (Pancher *et al*. 2012, Favaro *et al*. 2011). این گونه در ایران از گیاهان سویا، جو، انگور وحشی و غیره توسط ارشاد جداسازی شد (Ershad 2009). همچنین، این گونه به عنوان قارچ اندوفیت از درختان گیلاس جداسازی شد (Haddadderafshi *et al*. 2011). قارچ *E. nigrum* به عنوان قارچ اندوفیت برای اولین بار از درختان شلیل و زردآلو توسط هاشم‌لو و همکاران گزارش شده است (Hashemloo *et al*. 2013). در پژوهش حاضر نیز، جدایه قارچی *Epicoccum nigrum* بیش از ۷۳ درصد در گلخانه در مقابل هر سه بیماری قارچ دکمه‌ای موجب کنترل شده است.

قارچ *Curvularia inaequalis* در بسیاری از گزارشات به عنوان قارچ اندوفیت و عامل کنترل بیولوژیک معرفی شده است (Arinze *et al*. 2008, Ravindra *et al*. 2008). این گونه برای اولین بار در ایران به عنوان اندوفیت از گیاهان دارویی بادرشبو، پونه و نعنا فلفلی در شهرستان ارومیه گزارش شد (Nori 2016). در پژوهش حاضر، این گونه از کلاهک قارچ خوراکی دکمه‌ای جداسازی شد و بیشتر از ۸۹ درصد در گلخانه موجب کنترل هر سه بیماری قارچ‌خوراکی دکمه‌ای شد. گونه‌های *Sedosporium* sp. عوامل بیماری‌زای فرصت طلب هستند و باعث عفونت‌های مختلف در انسان می‌شوند و گونه *Scedosporium apiospermum* از خاک مناطقی از مراکش، بانکوک، مکزیک، اتریش و هلند گزارش شده است (Mouhajir *et al*. 2020) و تاکنون از گیاهان جداسازی نشده است. این قارچ بیشتر از ۸۷ درصد در گلخانه در مقابل هر سه بیماری قارچ دکمه‌ای موجب کنترل شد.

تعداد زیادی از گونه‌های *Chaetomium* این قابلیت را دارند که به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک به وسیله رقابت برای بستر و مواد غذایی، مایکوپارازیتیسم، آنتی‌بیوز و یا بصورت ترکیبی از این مکانیسم‌ها، موجب جلوگیری از رشد قارچ‌های بیمارگر شوند (Zhang and Yung 2007). گونه‌های این قارچ این قابلیت را دارند که با تولید متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان آلکالوئیدها، اثرات بیماری‌های قارچی را در میزبان کاهش دهند (Zhao *et al*. 2017). گونه *C. atrum* به‌عنوان قارچ ریزوپلان (rhizoplane) و ریزوسفر (rhizosphere) عمل می‌کند، با ریشه‌های گیاه همزیستی برقرار می‌کند و فقط در صورت محدودیت شدید منابع و رقابت بین گونه‌های خاص، بیماری‌زا می‌شود (Violi *et al*. 2007, Blumenstein *et al*. 2015)، در پژوهش حاضر نیز، جدایه قارچی *C. atrum* بیش از ۷۶ درصد در گلخانه در مقابل هر سه بیماری قارچ دکمه‌ای موجب کنترل شده است.

قابل ذکر است که این اولین گزارش از تمامی گونه‌های موجود در این پژوهش به عنوان قارچ‌های درون‌زی جداسازی شده از قارچ دکمه‌ای و عامل بیوکنترل بیماری‌های حباب‌تر، حباب خشک و کپک سبز در قارچ دکمه‌ای در ایران و جهان می‌باشد. قارچ‌های درون‌زی علاوه بر القای مقاومت در برابر بیماری‌ها و تنش‌های محیطی در میزبان، با مکانیسم‌های مختلف موجب افزایش رشد و عملکرد محصول هم می‌شوند که این موضوع در این پژوهش نیز نمایش داده شده است. می‌توان امیدوار بود که در آینده با انجام مطالعات تکمیلی، سویه‌های قارچی درون‌زی معرفی شده در این پژوهش بتواند برای مدیریت بیماری‌های مهم قارچ خوراکی مورد استفاده واقع شود و از خسارت آنها در سالن‌های پرورش قارچ خوراکی بکاهد.

سپاسگزاری

از مساعدت‌های صمیمانه و ارزشمند گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران، دانشگاه سوانسی و دانشگاه ریدینگ انگلستان، به‌خاطر فراهم کردن امکانات آزمایشگاهی و تحقیقاتی جهت پیشبرد این پژوهش، تقدیر و تشکر می‌شود.

REFERENCES

Abdallah Chaibub A, Sousa TP, Oliveira MIS, Arriel-Elias MT, Araujo LG, Filippi MCC (2020) Efficacy of *Cladosporium cladosporioides* C24G as a multifunctional agent in upland rice in

agroecological systems International Journal of Plant Production. Published online, DOI 10.1007/s42106-020-00097-2.

Al-Rashdi FKH, Al-Sadi AM, Al-Riyamy BZ, Maharachchikumbura SSN, Al-Ruqaishi HK, Velazhahan R (2020) *Alternaria alternata* and *Neocosmospora* sp. from the medicinal plant *Euphorbia larica* exhibit antagonistic activity against *Fusarium* sp., a plant pathogenic fungus. All Life Journal 13(1): 223-232.

Arinze AE, Umechuruba CL, Ibiam OFA (2008) A survey of seed-borne fungi associated with seeds of rice (*Oryzae sativa* L.) in storage and the field in afikpo north local government area of ebonyi state. Scientia Africana 7(2): 73- 80

Bacon CW, White JF (2000) Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. Microbial Endophytes 10(1): 237-261.

Behnamian M, Najafi Z, Davari M, Dezhsetan S (2016) Antifungal activity of medicinal plant essential oils against Mycogone perniciosa, causal agent of wet bubble and their effects on button mushroom. Biological Control of Pests and Plant Diseases 6(1): 111-119.

Berendsen R, Baars JJP, Kalkhove SIC, Lugones LG, Wosten HAB, Bakker PAHM (2010) Lecanicillium fungicola: causal agent of dry bubble disease in white-button mushroom. Molecular Plant Pathology 11(5): 585-595.

Blumenstein K, Alberectsen BR, Martin JA, Hultberg M, Sieber TN, Helander M, Witzell J (2015) Nutritional niche overlap potentiates the use of endophytes in biocontrol of a tree disease BioControl 60(5): 655-667.

Chatterton S, Punja ZK (2012) Colonization of geranium foliage by *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, a biological control agent of botrytis grey mould. Botany 90(1): 1-10.

Chatterton S, Punja Z.K (2015) Factors influencing colonization of cucumber roots by *Clonostachys rosea* f. *catenulata*, a biological disease control agent. Biocontrol Science and Technology 20(1): 37-55.

Chittihunsa T, Bangeekhan E, Wongsamitkul N, Subsomboon T (2007) Screening of *bacillus* spp. suppresing the infection of *Trichoderma* sp. in mushroom cultivation. Current Applied Science and Technology 7(1): 19-27.

Crous PW, Slippers B, Wingfield MJ, Rheeder J, Marasas WFO, Philips AJL, Alves A, Burgess T, Barber P, Groenewald JZ (2006) Phylogenetic lineages in the Botryosphaeriaceae. Studies in Mycology 55(1): 235-253.

Dennis C, Webster J (1971) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. production of non-volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Soc 57(4): 25-39.

Dong Guo L, Xu L, Zheng WH, Hyde KD (2004) Genetic variation of *Alternaria alternata*, an endophytic fungus isolated from *Pinus tabulaeformis* as determined by random amplified microsatellites (RAMS). Fungal Diversity 16(2): 53-67.

Ershad D (2009) Fungi of Iran. Iranian R esearch Institute of Plant Protection, Tehran, Iran. pp. 531. (In Persian)

Favaro LCL, Melo FLD, Aguilar-Vildoso CI, Arau´jo WL (2011) Polyphasic is of Intraspecific Diversity in *Epicoccum nigrum* Warrants Recclassification into Separate Species. Plos One 6(8): 1-18.

Fazio AT, Bertoni MD, Adler MT, Ruiz LB, Rosso ML, Muggia L, Hager A, Stocker-Worgotter E, Maier MS (2009) Culture studies on the mycobiont isolated from Parmotrema reticulatum (Taylor) Choisy: metabolite production under different conditions. Mycological Progress 8(4): 359-365.

Fu Y, Wang X, Li D, Liu Y, Song B, Zhang C, Wang Q, Chen M, Zhang Z, Li Y (2016) Identification of resistance to wet bubble disease and genetic diversity in wild and cultivated strains of *Agaricus bisporus*. International Journal of Molecular Science 17(10): 1-12.

Gharsallah H, Ksentini L, Naayma S, Taieb KH, Abdelhedi N, Schuster C, Triki MA, Ksantini M, Leclerque A (2020) Identification of fungi in Tunisian olive orchards: characterization and biological control potential. BMC Microbiology 20(1): 1-13.

Ghosh R, Barman S, Khatun J, Mandal NC (2016) Biological control of *Alternaria alternata* causing leaf spot disease of *Aloe vera* using two strains of rhizobacteria. Biological Control 97(1): 102-108.

Haddadderafshi N, Halász K, Pósa T, Péter G, Hrotkó K, Gáspár L, Lukács N (2011) Diversity of endophytic fungi isolated from cherry (*Prunus avium*). Journal of Horticulture Forestry and Biotechnology 15(2): 1-6.

Hashemloo E, Jamali- Zavareh AH, Ghosta Y (2013) Isolation and identification of endophytic fungi from stone fruit trees in West Azerbaijan province. Proceedings of the 1th Iranian Mycological Congress, 3-5 Sep, Rasht, Iran, p. 42. (In Persian)

Hibbett D, Abarenkov K, Koljalg U, Opik M, Chai B, Cole JR, Wang Q, Crous PW, Robert VARG, Helgason T, Herr JR, Kirk PM, Lueschow S, O'Donnell K, Nilsson RH, Oono R, Schoch CL, Smyth C, Walker DM, Porras-Alfaro A, Taylor JW, Geiser DM (2016) Sequence-based classification and identification of fungi. Mycologia 108(6):1049–1068.

Honegger R (1996) Structural and functional aspects of mycobiont-photobiont relationships in lichens compared with mycorrhizae and plant pathogenic interactions. Journal of Plant Pathology 7(4): 157-176.

Itako AT, Schwan-Estrada KRF, Junior JBT, Stangarlin JR, Da Silva Cruz ME (2008) Antifungal activity and protection of tomato plants by extracts of medicinal plants. Tropical Plant Pathology 33(3): 241-244.

Jackson AJ, Walters DR, Marshall G (1994) Evaluation of *Penicillium chrysogenum* and its antifungal extracts as potential biological control agents against *Botrytis fabae* on faba beans. Mycol. Res 98 (10): 1117-1126.

Kohl J, Scheer C, Holb IJ, Masny S, MMolhoek W (2018) Toward an integrated use of biological control by *Cladosporium cladosporioides* H39 in apple scab (*Venturia inaequalis*) management. Plant Disease 99(4): 535- 543.

Kovacic I, Pustijanac E (2017) Parasites and endobiotic fungi in digestive gland cryosections of the mussel *Mytilus galloprovincialis* in the Northern Adriatic, Croatia. Oceanological and Hydrobiological Studies 46(4): 414-420.

Kucuk C, Kivanc M (2008) Mycoparasitism in the biological control of *Gibberella zeae* and *Aspergillus ustus* by *Trichoderma harzianum* Strains. Journal of Agricultural Technology 4(2): 49-55.

Lahlali R, Hijri M (2010) Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. FEMS Microbiology Letters 311(2): 152-159.

Largeteau ML, Savoie JM (2010) Microbially induced diseases of *Agaricus bisporus*: biochemical mechanisms and impact on commercial mushroom production. Applied Microbiology and Biotechnology 86(1): 63-73.

Lucking R, Aime MC, Robbertse B, Miller AN, Ariyawansa HA, Aoki T, Cardinali G, Crous PW, Druzhinina IS, Geiser DM, Hawksworth DL, Hyde KD, Irinyi L, Jeewon R, Johnston PR, Kirk PM, Malosso E, May TW, Meyer W, Opik M, Robert V, Stadler M, Thines M, Vu D, Yurkov A M, Zhang N, Schoch CL (2020) Unambiguous identification of fungi: where do we stand and how accurate and precise is fungal DNA barcoding? IMA Fungus 11(14): 2-32.

Martinez-Arias C, Macaya-sanz D, Witzell J (2018) Enhancement of *Populus alba* tolerance to *Venturia tremulae* upon inoculation with endophytes showing in vitro biocontrol potential. European Journal of Plant Pathology 153(4): 1031-1042.

McCallum BD, Tekauz A, Gilbert J (2004) Barrage zone formation between vegetatively incompatible *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates. Phytopathology 94(5): 432-437.

Mehrparvar M, Mohammadi Goltapeh1 E, Safaei N (2013) Resistance of Iranian *Lecanicillium fungicola* to benzimidazole and ergosterol demethylation inhibiting fungicides. Journal of Agricultural Science and Technology 15(2): 389-395.

Meng L, Sun P, Tang H, Li L, Draeger S, Schulz B, Krohn K, Hussain H, Zhang W, Yi Y (2011) Endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, a new source of hypocrellins. Biochemical Systematics and Ecology 39(10):163-165.

Mouhajir A, PoirierI W, Angebault C, Rahal E, Bouabid RH, Bougnoux ME, Kobi A, Zouhair R, Bouchara JP, Giraud S (2020) *Scedosporium* species in soils from various biomes in Northwestern Morocco. PLOS ONE 15(2): 1-15.

Nori M (2016) Isolation and Identification of Endophytic Fungi from medicinal plants of Dracocephalum, Mentha and Peppermint in Urmia. M.Sc., University of Urmia, Iran. (In Persian)

Pancher M, Ceol M, Corneo PE, Longa CMO, Pertot SYI Campisano A (2012) Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. Applied and Enviromental Microbiology 78(12): 4308-4317.

Park WS, Choi HW, Han SS, Shin DB, Shim HK., Lee SW, Lim CK, Lee YH (2009) Control of bakanae disease of rice by seed soaking into the mixed solution of Procholraz and Fludioxnil. Research in Plant Disease 15(2): 94-100.

Pecchia J, Beyer D (2013) Pest management on US commercial mushroom farms. Outlooks on Pest Management 24(1): 28-29.

Ravindra N, Kharwar RN, Verma VC, Strobel G, Ezra D (2008) The endophytic fungal complex of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. Current Science 95(2): 228-233.

Romain AC, Godefroid D, Nicolas J (2005) Monitoring the exhaust air of a compost pile with an e nose and comparison with GC-MS data. Sensors and Actuators B: Chemical 106(1): 317-324.

Royse DJ, Wilkinson V (2015) Care and handling of cultures of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*). Plant Patology Journal 12(1): 1-7.

Sagita R, Quax WJ, Haslinger K (2021) Current state and future directions of genetics and genomics of endophytic fungi for bioprospecting efforts. Front Bioengineering and Biotechnology 9(1): 1-28.

Saha P, Roy D, Manna S, Adhikari B, Sen R, Roy S (2012) Durability of transesterified jute geotextiles. Geotextiles and Geomembranes 35(3):69-75.

Salas-Marina MA, Silva-Flores MA, Cervantes-Badillo MG, Rosales-Saavedra MT, Islas-Osuna MA, Casas-Flores S (2011) The plant growth-promoting fungus *Aspergillus ustus* promotes growth and induces resistance against different lifestyle pathogens in *Arabidopsis thaliana.* J. Microbiol. Biotechnol. 21(7): 686-696.

Santos TLD, Belan LL, Zied DC, Dias ES, Alves E (2017) Essential oils in the control of dry bubble disease in white button mushroom. Crop Protection 47(5): 1-7.

Sikandar A Zhang M, Wang Y, Zhu X, Liu X, Fan H, Xuan Y, Chen L, Duan Y (2020) In vitro evaluation of *Penicillium chrysogenum* Snef1216 against *Meloidogyne incognita* (root-knot nematode). Scientific Reports 10(1):8342.

Sivanesan A (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. Mycological Papers 158, pp. 261.

Solanki SK, Krivova NA, Haigh JD (2013) Solar Activity and Climate. Annu. Rev. Astron. Astrophys 51(1): 1-85.

Sun ZB, Li SD, Ren Q, Xu JL, Lu olar X, Sun MH (2020) Biology and applications of Clonostachys rosea. Journal of Applied Microbiology 129(3): 486-495.

Tozlu E, Tekiner N, Kotan R, Ortucu S (2018) Investigation on the biological control of *Alternaria alternata.* Indian Journal of Agricultural Sciences 88(8): 1241-1247.

Violi HA, Menge JA, Beaver RJ (2007) *Chaetomium elatum* (Kunze: ChaetomiaCeae) as a root-colonizing fungus in avocado: is it a mutualist, cheater, commensalistic associate, or pathogen? American Journal of Botany 94(4): 690-700.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JV (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.), and PCR Protocols: a guide to methods and applications. 315-322. Academic Press, New York, USA.

Woudenberg JHC, Groenewald JZ, Binder M, Crous PW (2013) *Alternaria* redefined. Studies in Mycology 75(1): 171-212.

Yazid SNE, Jinap S, Ismail SI, Magan N, Samsudin NIP (2020) Phytopathogenic organisms and mycotoxigenic fungi: Why do we control one and neglect the other? A biological control perspective in Malaysia. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 19(2): 643-669.

Zhang H, Yang Q (2007) Expressed sequence tags-based identification of genes in the biocontrol agent *Chaetomium cupreum*. Applied Microbiology and Biotechnology 74(3): 650-658.

Zhao S, Zhang Y, Yan W, Cao L, Xiao Y, Ye Y (2017) Chaetomium globosum CDW7, a potential biological control strain and its antifungal metabolites. FEMS Microbiology Letters 364(3): 1-6.

Zhong S, Steffenson BJ (2001) Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. Phytopathology 91(5): 469-476.