



مقاله پژوهشی

بررسی مولکولی میکروفلور باکتریایی همراه و درون‌زی قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*)الهام موسوی جعفری پور^۱، مژده دوستی^{۲،۳}، رضا صادقی^۴، نرگس فلاحي چرخابی^۵، مسعود احمدزاده^۶

۱- دانشجوی دکتری، گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشکده فناوری کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۲- دانش‌آموخته دوره کارشناسی ارشد، گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشکده فناوری کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۳- بخش تحقیق و توسعه شرکت رازفدک مهرشهر، کرج، ایران

۴- دانشیار، گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشکده فناوری کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

۵- استادیار، گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشکده فناوری کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران (falahicharkhabi@ut.ac.ir)

۶- استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران (ahmadz@ut.ac.ir)
(تاریخ دریافت: ؛ تاریخ پذیرش:)

چکیده

قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) به دلیل داشتن ارزش غذایی بالا و خواص دارویی متعدد، جایگاه ویژه‌ای را در سبد غذایی مردم جهان به خود اختصاص داده است، از این رو کشت این منبع غذایی مفید در جهان هر روز گسترده‌تر می‌شود. در بررسی عوامل باکتریایی ایجادکننده بیماری لکه‌قهوه‌ای روی قارچ خوراکی در استان البرز از قارچ‌های دارای علائم بیماری و برای جداسازی عوامل باکتریایی بیوکنترل علیه بیماری لکه‌قهوه‌ای از قارچ‌های سالم نمونه‌برداری شد. از نمونه‌های آلوده ۶۱ جدایه باکتریایی به‌دست آمد، نتایج نشان داد که ۱۹ جدایه در قارچ خوراکی بیماری‌زا بودند و روی قارچ خوراکی علائم تغییر رنگ در حاشیه‌های جانبی و سطح کلاهک، لکه‌های وسیع، آبکی و فرورفته و لکه‌های ریز سوزنی شکل و قهوه‌ای روی کلاهک و نکروزه بخش میانی و پایه قارچ خوراکی ایجاد کردند. از قارچ‌های سالم ۹ جدایه باکتری جداسازی شد که روی قارچ خوراکی بیماری‌زا نبودند و چهار جدایه به عنوان جدایه‌های درون‌زی منتخب به منظور ارزیابی توانایی مکانیسم‌های بازدارندگی (تولید هورمون اکسین سیدروفور و تولید آنزیم‌های فیتاز، پروتئاز، لیپاز، لسیتیناز، سلولاز و کیتیناز) بررسی شدند. آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی برای شناسایی باکتری‌های بیماری‌زا و درون‌زی انجام شد. بر اساس بررسی ترادف‌های نوکلئوتیدی ژن 16S rRNA باکتری‌های بیمارگر در جنس‌های بیمارگر *Ewingella*، *Chryseobacterium*، *Pseudomonas*، *Brucella* و *Klebsiella* و باکتری‌های غیربیمارگر درون‌زی در گونه‌های *Bacillus velezensis*، *Bacillus*، *Kocuria rhizophila*، *Bacillus wiedmannii* قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: لکه قهوه‌ای، قارچ خوراکی، *Pseudomonas tolaasii*Molecular analysis of the bacterial microflora associated with and endofungal of *Agaricus bisporus*Elham Mousavi Jafaripour¹, Mozhdeh Doosti^{2,3}, Reza Sadeghi⁴, Nargues Falahi Charkhabi⁵, Masoud Ahmadzadeh⁶

1- Ph.D. Student, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Agricultural Technology, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran

2- M.Sc. graduate, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Agricultural Technology, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran

3- Department of Research and Development, Razh Fadak Mehrshahr Company, Karaj, Iran

4- Associate Professor, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Agricultural Technology, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran

5- *Corresponding Author: Assistant Professor, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Agriculture, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran (falachicharkhabi@ut.ac.ir)

6- *Corresponding Author: Professor, , Department of Plant Protection, College of Agriculture, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran (ahmadz@ut.ac.ir)

Abstract

White button mushroom (*Agaricus bisporus*) has a special place in the food basket of the people worldwide because of its high nutritional value and medicinal properties. Therefore, its cultivation is expanding in the world. In order to identify the bacterial species associated with brown spot disease symptomatic samples were collected from edible mushrooms farms in Alborz province. including color change in the lateral margins and surface of the cap, wide spots, watery and sunken on the surface of the cap, small needle-shaped and brown spots on the cap and necrosis of the middle part and the base of edible mushroom. In addition, healthy mushrooms were sampled to isolate biocontrol bacterial agents. Sixty-one bacterial isolates were isolated among which 19 isolated were pathogenic in edible mushrooms. Nine isolates were isolated from healthy mushrooms that were not pathogenic on edible mushrooms and their inhibition mechanisms were investigated. Biochemical and molecular tests were performed to identify pathogenic bacteria and endophytes. Based on the 16S rDNA sequence analysis bacterial isolates were classified into the pathogenic genera including *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Ewingella*, *Brucella* and *Klebsiella* and non-pathogenic genera including *Bacillus velezensis*, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus wiedmannii*.

Keywords: brown spot disease, edible mushroom, *Pseudomonas tolaasii*

از جنس سودموناس یا جنس‌های دیگری از باکتری‌ها عامل این بیماری معرفی شدند. از جمله این باکتری‌ها می‌توان به *Serratia* و *Pontoa*، *P. reactans*، *P. costantini*، *P. agarici* اشاره کرد (Munsch et al. 2002; Godfrey et al. 2001; Iacobellis and Lo Cantore 2003; Abuzaid et al., 2012; Osdaghi et al., 2020).

هدف از این تحقیق شناسایی عوامل ایجادکننده بیماری لکه قهوه‌ای باکتریایی در قارچ خوراکی بود. از سویی به دلیل این که کنترل عوامل بیماری‌زا در بستر قارچ خوراکی مستلزم مصرف سموم بسیار زیادی است و این کار سلامت این محصول مهم را به مخاطره می‌اندازد. در این مطالعه شناسایی عوامل بیوکنترلی باکتریایی نیز برای کنترل بیماری لکه قهوه‌ای باکتریایی بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی

در پاییز و زمستان سال ۱۳۹۹ از قارچ‌های دارای علائم تغییر رنگ بافت از کرم تا قهوه‌ای و سیاه، از خط تولید سالن‌های تولیدکننده قارچ خوراکی شرکت راژفدک مهرشهر در استان البرز نمونه‌برداری شد. نمونه‌های آلوده در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران پردیس منابع طبیعی کرج منتقل شدند. جداسازی از قارچ‌های با لکه‌های کرم تا قهوه‌ای و سیاه روی سطح کلاهک و ساقه انجام شد (Hamidzadeh et al., 2020). قطعاتی از مرز سالم و آلوده جداسازی و در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی سطحی شدند. قطعات پس از شست و شو با آب مقطر سترون، در آب سترون خرد شدند. بعد از ۳۰ دقیقه، یک قطره از سوسپانسیون حاصل به کمک لوب سترون در محیط کشت

مقدمه

قارچ‌های خوراکی یکی از محصولات پروتئینی مهم هستند که برای قرن‌ها قسمتی از رژیم غذایی بشر بوده‌اند و منبع عالی برای بعضی از اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها و مواد معدنی هستند (Tao et al., 2006). باکتری‌ها و تغییرات بیوشیمیایی ناشی از آنزیم‌های تولیدی آن‌ها می‌توانند در طول نگهداری موجب فساد قارچ شوند (Jiang et al., 2012). قارچ دکمه‌ای سفید بیشترین سطح زیرکشت قارچ خوراکی در ایران را به خود اختصاص داده‌است (Farsi & Pourianfar, 2011). ایران با تولید حدود ۱۸۰ هزار تن محصول قارچ رتبه هفتم تولید جهان را داراست (FAO, 2021). در حال حاضر قارچ خوراکی در اکثر استان‌های کشور تولید می‌شود و استان البرز یکی از قطب‌های بزرگ تولید قارچ در کشور است. با وجود ارزش اقتصادی و غذایی این محصول ارزشمند تولید این محصول و میزان تولید آن دچار مخاطراتی از جمله بیماری‌هایی مانند لکه قهوه‌ای باکتریایی است (Gea et al., 2005). این بیماری در مراحل تولید و هم در بحث ذخیره‌سازی باعث تخریب بافت قارچ شده، از بازار پسندی آن می‌کاهد و آن را برای مصرف نامطلوب می‌سازد (Cole & Skelrop 1986). بیماری لکه قهوه‌ای باعث ایجاد زخم‌های قهوه‌ای تیره و فرورفته در کلاهک یا ساقه قارچ می‌شود که محصول را غیرقابل بازاریابی می‌نماید. گاهی بیماری ناشی از این باکتری‌ها به شکل اپیدمی در آمده و می‌توانند از یک کشت به کشت دیگر گسترش و انتشار پیدا کنند (Navarro et al., 2018 & Sivanesan, 2003). در ابتدا عامل اصلی این بیماری باکتری *Pseudomonas tolaasii* معرفی شد (Palleroni, 1993 & Tolass,

۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون روی کاغذ صافی ریخته شد. سپس از سوسپانسیون 10^8 CFU mL⁻¹ کشت تازه هر یک از جدایه‌ها، مقدار ۳۰ میکرولیتر روی کلاهک قارچ قرار داده شد و درب ظرف به وسیله پارافیل مسدود و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت چهار تا پنج روز نگهداری شدند. تغییر رنگ و ظهور علائم آلودگی در مقایسه با شاهد بررسی شد (Akhlaghi et al., 2016). از آب مقطر سترون به عنوان شاهد استفاده شد (Khabaz Jolfaei et al., 2002).

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی تمامی جدایه‌های بیماری‌زا بررسی شد. آزمون تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط King's B^۱، به روش Schaad و همکاران (۲۰۰۱)، آزمون گرم با حلالیت در پتاس (KOH) سه درصد به روش Suslow و همکاران (۱۹۸۲)، آزمون رشد هوازی و بی‌هوازی به روش Hugh و Leifson (۱۹۵۳) و آزمون سینترات بر اساس روش Harly (۲۰۰۵) انجام پذیرفت. آزمون اکسیداز با قرار دادن گستره ای از باکتری روی کاغذ صافی آغشته به محلول یک درصد تترامیتیل پارافنیل دی آمین دی هیدروکلراید انجام شد (Kovacs, 1956). آزمون خط سفید بر اساس روش Rainey و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها و فراوانی

استخراج DNA ژنومی به روش لیز قلیایی انجام شد. سپس ژن 16S rRNA جدایه‌های انتخاب شده تکثیر و توالی‌یابی شد. برای تکثیر ژن رمز کننده 16S rRNA از آغازگرهای 10F (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAG-3' (O'Neill et al., 1992) و 1507R (5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAG-3') استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) در حجم ۲۰ میکرولیتر و غلظت نهایی ۱۰ پیکومول از هر کدام از آغازگرها، ۱۰ میکرولیتر مخلوط واکنش (Ampliqon, Denmark) 2x Master mix RED و دو میکرولیتر از DNA ژنومی انجام شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Eppendorf, Germany) انجام شد. واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازی DNA ژنومی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، به مدت یک دقیقه؛ اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۹ درجه سلسیوس، به مدت یک دقیقه؛ گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه انجام شده و در پایان گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه انجام شد (Rademaker et al., 1997).

محصول PCR با دو میکرولیتر بافر بارگذاری مخلوط و پس از تهیه ژل آگارز یک درصد در بافر TBE، نمونه‌ها در چاهک‌ها بارگذاری شدند. دستگاه الکتروفورز به منبع تأمین نیروی برق با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت متصل شد. رنگ‌آمیزی با استفاده از محلول اتیدیوم بروماید با غلظت

کینگز بی^۱ کشت شد. تثبتک‌های پتری سه روز در دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس تک پرکنه‌ها روی محیط آگار غذایی خالص‌سازی و تکثیر شد.

جهت جداسازی باکتری‌های اندوفیت ۵۰ عدد قارچ که از نظر ظاهری سالم و دارای کیفیت بالایی بودند، از خط تولید فلش یک شرکت راژفدک مهر شهر جمع آوری شد. سپس کلاهک و ساقه‌های قارچ به قطعات کوچک و مساوی تقسیم شده و در هیپوکلریت سدیم یک درصد برای ۳ دقیقه ضدعفونی شده و ۳ مرحله با آب مقطر سترون شستشو و بعد از خشک شدن روی محیط کشت آگار مغذی (NA) (۲ قرار داده شدند. در روشی دیگر یک گرم از قارچ در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته شد و روی شیکر به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت (Hamidizadeh et al., 2020). سپس غلظت‌های مختلف به روش سری رقت تهیه شد و تا به دست آوردن رقت 10^{-6} ادامه یافت. سپس با استفاده از پیت پاستور یک قطره از سوسپانسیون با رقت‌های 10^{-6} و 10^{-5} روی محیط کشت NA به طور جداگانه ریخته شد و با لوپ سترون به صورت مخطط کشت و به انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس برای مدت پنج روز نگهداری شد. پس از بررسی ویژگی‌های فنوتیپی متفاوت، جدایه‌های مورد نظر از بین پرکنه‌ها انتخاب و خالص‌سازی شدند و برای انجام مراحل بعدی در آب مقطر سترون و در دمای پنج درجه سلسیوس نگهداری شدند (Schaad et al., 2001). همچنین نمونه‌ها برای نگهداری طولانی مدت در گلیسرول ۱۵ درصد در فریزر -70° درجه سلسیوس نگهداری شدند.

الکتروفورز پروتئین‌های محلول سلولی باکتری‌ها

الکتروفورز پروتئین‌های استخراج شده در ژل پلی اکریل آمید تخت عمودی بر مبنای روش اصلاح شده لاملی و استنلی (۱۹۷۰) انجام شد. در این روش، ژل جدا کننده پایینی با غلظت ۱۲ درصد اکریل آمید و ژل مترکم کننده بالایی با غلظت پنج درصد اکریل آمید تهیه شد. داخل تانک به اندازه کافی بافر ریخته شد. به نحوی که ژل کاملاً با بافر تماس داشته باشد. پس از تهیه ژل، توسط سرنگ انسولین از هر نمونه ۴۰ میکرولیتر در چاهک‌های ژل ریخته شد و الکتروفورز به کمک جریان ۱۰۰ ولتی و جریان ثابت در بافر تانک انجام شد. پس از گذشت حدود ۱۲ ساعت هنگامی که رنگ برم فنل بلو به دو سانتیمتری انتهای ژل رسید، از منبع تغذیه جدا شد. شیشه‌ها از دستگاه جدا شده و در محلول رنگ‌آمیزی قرار داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در محلول رنگ‌آمیزی ۱/۰ درصد کوماسی برلیانت بلو روی شیکر با سرعت ۳۰-۴۰ دور در دقیقه رنگ‌آمیزی شد. سپس ژل از محلول رنگ خارج و در محلول رنگ‌بری روی شیکر برای یک ساعت قرار داده شد. ژل پس از رنگ‌بری جهت نگهداری به محلول اسید استیک ۱۰ درصد منتقل و در یخچال نگهداری شد (Rodrigues Navvaro et al., 2000).

آزمون بیماری‌زایی

جهت آزمون بیماری‌زایی از کلاهک‌های سالم و یک دست قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید سالم استفاده شد. کلاهک‌ها در ظرف سترون قرار داده شدند. برای تأمین رطوبت مقدار

² Nutrient agar

¹ King's B

نکروزه بخش میانی و پایه کلاهک قارچ، (E و F) لکه‌های ریز قهوه‌ای رنگ روی کلاهک قارچ.

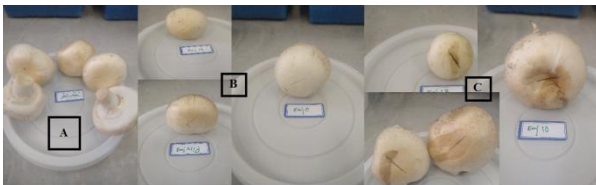
Figure 1- Different symptoms of bacterial spot on collected edible mushroom samples (A, B, D, G) wide brown and watery and sunken spots on the surface or margin of the cap, (C) necrosis of the middle part and the base of the mushroom cap, (F, E) small brown spots on the mushroom cap.

جداسازی

سه روز پس از کشت سوسپانسیون اولیه باکتری‌ها و ظهور پرگنه‌ها، کشت مجدد و خالص‌سازی انجام شد. و در نهایت تعداد ۶۱ جدایه از نمونه‌های دارای علائم آلودگی به بیماری لکه قهوه‌ای روی قارچ خوراکی به دست آمد. پرگنه‌های این باکتری‌ها دارای رنگ‌های سفید کدر، سفید روغنی، زرد براق، زرد روشن، نارنجی براق، شیری تا بی رنگ و شفاف بودند. به علاوه ۹ جدایه از بافت‌های سالم قارچ خوراکی به دست آمد. این باکتری‌ها دارای پرگنه‌هایی به رنگ‌های شیری، سفید شفاف، نارنجی و کرم بودند.

آزمون بیماری‌زایی

از ۶۱ جدایه به دست آمده از نمونه‌های قارچ خوراکی دارای علائم لکه قهوه‌ای، ۱۹ جدایه روی قارچ خوراکی بیماری‌زا بودند که برای انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. علائم روی قارچ‌های تلقیح شده با باکتری‌های بیماری‌زا به صورت لکه‌های قهوه ای تا سیاه و در برخی موارد به صورت فرورفته و چروکیده مشاهده شد. شدت علائم بروز بیماری‌زایی در این ۱۹ جدایه روی قارچ خوراکی و همین طور مدت زمان لازم برای بروز علائم روی قارچ از ۲۴ تا ۴۸ ساعت متفاوت بود (شکل ۲).



شکل ۲- آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های باکتری‌های بیماری‌زا روی قارچ خوراکی، (A) شاهد (آب مقطر سترون)، (B) باکتری‌های بدون علائم و (C) باکتری‌های بیماری‌زا مثبت دارای علائم بیماری در محل مایه‌زنی.

Figure 2- Pathogenicity test of pathogenic bacteria isolates on edible mushrooms, (A) control (sterile distilled water), (B) bacteria without symptoms and (C) positive pathogenic bacteria with disease symptoms at the inoculation site.

الگوی پروتئین‌های محلول سلولی

از ۹ جدایه باکتری‌ها جدا شده از کلاهک و ساقه قارچ‌های خوراکی سالم، پروتئین محلول سلولی استخراج و مقایسه

یک میلی گرم در لیتر قرار گرفت (Sigmon & Larcom, 1996). عکس‌برداری در دستگاه Gel document (Uvitec/DM 500) انجام شد.

توالی‌یابی توسط شرکت پیشگام (تهران، ایران) انجام شد. بعد از دریافت فایل قطعات DNA تعیین توالی شده، کروماتوگرام مربوط به توالی‌ها با استفاده از نرم افزار Pro Chromas نسخه ۱/۷/۶ و نرم افزار Editseq نسخه ۵/۰۱ مشاهده و با استفاده از نرم افزار Bioedit v7.0.5.3 ویرایش و در بانک ژن BLAST شدند (Altschul et al., 1997). توالی حاصل با برنامه BLAST در پایگاه Basic Local Alignment Search Tool (NCBI) با سایر جدایه‌های ثبت شده مقایسه و بررسی شد. برای ارزیابی توالی‌های نوکلئوتیدی متعلق به جدایه‌های مورد بررسی و ترسیم تبارنامی تبارزایی آن‌ها، از نرم‌افزار MEGAX استفاده شد (Kumar et al., 2018). در نهایت برای تجزیه و تحلیل داده‌ها و ارزیابی توالی نوکلئوتیدی نواحی ژنی جدایه‌های مختلف و ترسیم تبارنامی آن‌ها از روش Neighbor-Joining استفاده شد (Saito and nie, 1987).

نتایج

نمونه‌برداری و علائم شناختی

در پاییز و زمستان ۱۳۹۹، ۷۵ نمونه با علائم تغییر رنگ روی کلاهک و علائم قهوه‌ای شدن (به طوری که ۲۰ درصد کلاهک یا اندام کلی قارچ را فرا گرفته باشد) روی قارچ سفید دکمه‌ای از خط تولید شرکت رازفدک مهرشهر واقع در استان البرز (مهرشهر کرج) جمع‌آوری شد. علائم شامل لکه زرد و فرورفته در حاشیه‌های جانبی و سطح کلاهک، لکه‌های وسیع قهوه‌ای و آبکی و فرورفته در سطح کلاهک، لکه‌های ریز سوزنی شکل و قهوه‌ای روی کلاهک، نکروزه بخش میانی و پایه کلاهک قارچ، تک لکه‌های سیاه رنگ و بزرگ روی سطح کلاهک قارچ خوراکی و لکه‌های ریز قهوه‌ای رنگ روی کلاهک قارچ بودند (شکل ۱).



شکل ۱- علائم مختلف لکه باکتریایی روی نمونه‌های جمع‌آوری شده قارچ خوراکی (A، B، D، G) لکه‌های وسیع قهوه‌ای و آبکی و فرورفته در سطح یا حاشیه کلاهک، (C)

C	EMJ40, EMJ50
D	EMJ1, EMJ47, EMJ48, EMJ52

ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

مطالعات فنوتیپی روی ۱۹ جدایه بیماری‌زا و چهار جدایه منتخب (OP104187-OP104190-OP104184-OP104192) از باکتری‌های اندوفیت (بر اساس الگوی باندي پروتئين‌هاي محلول) بررسی شد. در آزمون‌هاي مربوط به مکانيسم‌هاي بيوکنترلي در مورد جدایه‌هاي اندوفيت جداسازي شده، نمونه EMJ45 بهترین فعالیت و عملکرد را نشان داد، به طوري که در همه آزمون‌ها فعالیت بالايي در مکانيسم‌ها نشان داد که گواه قابلیت‌هاي بالقوه این جدایه به عنوان اندوفيت است. آزمون‌هاي شناسايي مربوط به جدایه‌هاي بیماری‌زا این باکتری‌ها گرم منفي بودند و قابلیت توليد رنگدانه فلورسنت روی محیط Kings B را داشتند. تنها جدایه EMJ69 خط سفید را در مقابل باکتری *P. tolaasii* در کشت مقابل این باکتری در آزمون White line نشان داد (شکل ۴، جدول ۲ و ۳).

شناسايي مولکولي و فراواني

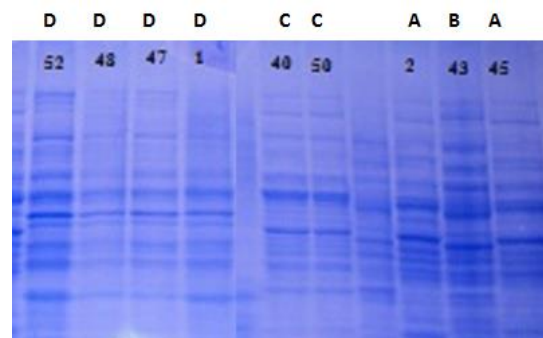
ژن ۱۶S rRNA جدایه‌هاي بیماری‌زا و اندوفيت قارچ خوراكي تکثير و توالي‌يابي شد. توالي‌هاي حدود ۱۳۰۰ نوکلئوتيدي حاصل در بانک داده NCBI ثبت شد (جدول ۵). آناليز توالي جدایه‌هاي بیماری‌زا نشان داد که توالي ژن ۱۶S rRNA جدایه‌هاي EMJ20، EMJ20، EMJ17، EMJ9، EMJ5، EMJ20، EMJ58 و EMJ64 با توالي متناظر در جدایه *Pseudomonas tolaasii* DSM 19342^T، ۷۰-۹۹/۱۰۰ درصد همساني دارد. به علاوه توالي ژن ۱۶S rRNA جدایه‌هاي EMJ22 و EMJ39 با همساني ۹۹/۷۷ تا ۹۹/۸۵ درصدی با توالي همين ژن در جدایه *Pseudomonas paracarnis* V5/DAB/2/5^T، در درخت فیلوژني کنار این جدایه قرار گرفت. توالي ژن ۱۶S rRNA در جدایه EMJ19، ۹۹/۷۷ درصد همساني با توالي ژن متناظر در جدایه *Pseudomonas koreensis* DSM 16610^T نشان داد و در درخت فیلوژني با این جدایه در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۵A).

توالي ژن ۱۶S rRNA جدایه‌هاي EMJ26، EMJ16، EMJ13، EMJ29 و EMJ27 به گونه جدیدی از جنس *Chryseobacterium* تعلق دارند (شکل ۵B). برای توصیف گونه باید ژنوم کامل آن توالي‌يابي شود یا آزمون هیبریداسيون DNA-DNA انجام شود.

توالي ژن ۱۶S rRNA جدایه‌هاي EMJ30 و EMJ56 با توالي متناظر در جدایه *Ewingella americana* CIP 81.94^T، ۹۹/۷۹ درصد همساني داشت و این جدایه‌ها در درخت فیلوژني در کنار جدایه تيپ *E. americana* قرار گرفتند. به علاوه، توالي این ژن در جدایه EMJ3 با ۹۹/۷۹ درصد همساني با توالي متناظر در جدایه *Klebsiella pneumoniae* DSMZ 30104^T در درخت فیلوژني در کنار این جدایه قرار گرفت (شکل ۵C).

شد. نتایج نشان داد که جدایه‌ها از نظر الگوي پروتئين‌هاي محلول در چهار گروه قرار گرفتند. چهار جدایه از بين ۹ جدایه بر اساس تفاوت الگوي باندي پروتئيني در آزمون استخراج پروتئين انتخاب شدند. گروهبندي بر اساس قرارگيري باندهاي پروتئيني در ژل اکریلاميد به ترتيب گروه و جدایه‌هاي هم گروه شامل A (EMJ2 و EMJ45)، B (EMJ43)، C (EMJ40 و EMJ50) و D (EMJ48، EMJ52، EMJ47 و EMJ1) بودند. از هر گروه یک نماینده برای انجام آزمون‌هاي بيوشيميائي مربوط به توانايي توليد متابوليت‌هاي مربوط به مکانيسم‌هاي بازدارندگي و شناسايي مولکولي انتخاب شدند. نتایج الگوي پروتئين‌هاي محلول سلولي جدایه‌هاي باکتریايي جدا شده از کلاهک و ساقه قارچ‌هاي خوراكي آلوده در ژل پلي اکریل امید در جدول ۱ و نمونه‌اي از ژل اکریل امید این آزمون در شکل ۳ نمایش داده شده است.

در گام بعدي توليد متابوليت‌هاي مؤثر در مکانيسم‌هاي بازدارندگي این چهار جدایه در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۳- الگوي پروتئين‌هاي محلول باکتری‌هاي جداسازي شده از قارچ خوراكي (*Agaricus bisporus*) پس از الکتروفورز در ژل اکریل امید و رنگ‌آمیزی با استفاده از کوماسی بلو.

Figure 3. Protein pattern of soluble proteins of bacterial strains isolated from *Agaricus bisporus* after polyacrylamide gel electrophoresis separation and staining Coomassie Brilliant Blue.

جدول ۱- گروهبندي باکتری‌هاي جدا شده از قارچ خوراكي (*Agaricus bisporus*) بر اساس الگوي باندهاي پروتئين‌هاي محلول سلولي

Table 1- Grouping of bacteria isolated from *Agaricus bisporus* based on the pattern of cellular soluble protein bands

Grouping based on the pattern of cellular soluble protein bands	Isolates with similar pattern of cellular soluble protein bands
A	EMJ2, EMJ45
B	EMJ43

در کنار این گونه قرار گرفت (شکل ۵D). به علاوه، جدایه EMJ43 با همسانی ۱۰۰ درصدی در توالی همین ژن با جدایه *Bacillus altitudinis* 41KF2b^T در یک گروه قرار گرفتند. جدایه EMJ45 با همسانی ۹۹/۷۹ درصدی در ژن 16S rRNA با جدایه *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169^T در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۵D).

به علاوه، توالی ژن rRNA ۱۶S جدایه EMJ52 با جدایه *Kocuria rhizophila* TA68^T (Y16264)، ۹۹/۷۹ درصد شباهت دارد.

آنالیز توالی ژن 16S rRNA جدایه‌های اندوفیت نشان داد که جدایه EMJ40 با ۹۹/۸۶ درصد همسانی با توالی ژن متناظر در *Bacillus velezensis* NRRL B-41580^T در درخت فیلوژنی

جدول ۲- تولید متابولیت های مؤثر در مکانیسم های بازدارندگی جدایه‌های اندوفیت در شرایط آزمایشگاه

Table 2- Production of effective metabolites in the inhibition mechanisms of endophyte isolates in laboratory conditions

Code	Species	Chitinase production	Cellulase production	Lecitinase production	Lipase production	Protease production	Phytase production	Auxin production	Siderophore production
EMJ45	<i>Bacillus wiedmannii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
EMJ52	<i>Kocuria rhizophila</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
EMJ40	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-	-	+	-	+	-	-
EMJ43	<i>Bacillus altitudinis</i>	-	-	+	+	+	ND	+	+

جدول ۳- نتایج مربوط به آزمون‌های بیوشیمیایی و بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب بیماری‌زا و اندوفیت

Table 3- The results of biochemical and pathogenicity tests of all selected pathogenic and endophyte strains

Isolate code	Pathogenicity test	Gram reaction	Citrate	Oxidase	Catalase	Fluorescent pigmentation	White line reaction
EMJ3	+	-	+	-	ND	-	-
EMJ5	+	-	+	ND	+	+	-
EMJ9	+	-	+	ND	+	+	-
EMJ14	+	-	+	ND	+	+	-
EMJ16	+	-	ND	-	+	-	-
EMJ17	+	-	+	ND	+	+	-
EMJ19	+	-	+	+	+	+	-
EMJ20	+	-	+	ND	+	+	-
EMJ22	+	-	+	+	+	+	-
EMJ26	+	-	ND	-	+	-	-
EMJ27	+	-	ND	-	+	-	-
EMJ29	+	-	ND	-	+	-	-
EMJ30	+	-	ND	-	+	-	-
EMJ39	+	-	+	+	+	+	-
EMJ40	-	+	-	+	+	-	-
EMJ43	-	+	-	+	+	-	-
EMJ45	-	+	-	+	+	-	-
EMJ52	-	+	ND	-	+	-	-
EMJ56	+	-	ND	-	+	-	-
EMJ58	+	-	+	ND	+	+	-
EMJ64	+	-	+	ND	+	+	-
EMJ69	+	-	+	ND	+	+	+

<i>Pseudomonas koreensis</i>	
<i>Chryseobacterium sp.</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Ewingella americana</i>	
<i>Bacillus velezensis</i>	باکتری‌های غیربیمارگر
<i>Bacillus altitudinis</i>	درون‌زی
<i>Bacillus wiedmannii</i>	
<i>Kocuria rhizophila</i>	

جدول ۵- شماره دسترسی توالی‌های ژن 16S rRNA ثبت‌شده در پایگاه داده NCBI

Table 5- Accession number related to 16S rRNA gene sequence registered in NCBI database

Species	Isolate	Accession number
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	EMJ5	OP104195
	EMJ9	OP104196
	EMJ14	OP104200
	EMJ17	OP104202
	EMJ20	OP104204
	EMJ64	OP104208
	EM20	OP104185
<i>Pseudomonas paracarnis</i>	EMJ58	OP104186
	EMJ22	OP104205
<i>Pseudomonas koreensis</i>	EMJ39	OP104209
	EMJ19	OP104203
<i>Chryseobacterium sp.</i>	EMJ13	OP104199
	EMJ16	OP104201
	EMJ26	OP104206
	EMJ29	OP104207
	EMJ27	OP104189
<i>Bacillus velezensis</i>	EMJ40	OP104187
<i>Bacillus altitudinis</i>	EMJ43	OP104190
<i>Bacillus wiedmannii</i>	EMJ45	OP104192
<i>Ewingella americana</i>	EMJ30	OP104191
	EMJ56	OP104188
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EMJ3	OP104193
<i>Kocuria rhizophila</i>	EMJ52	OP104184



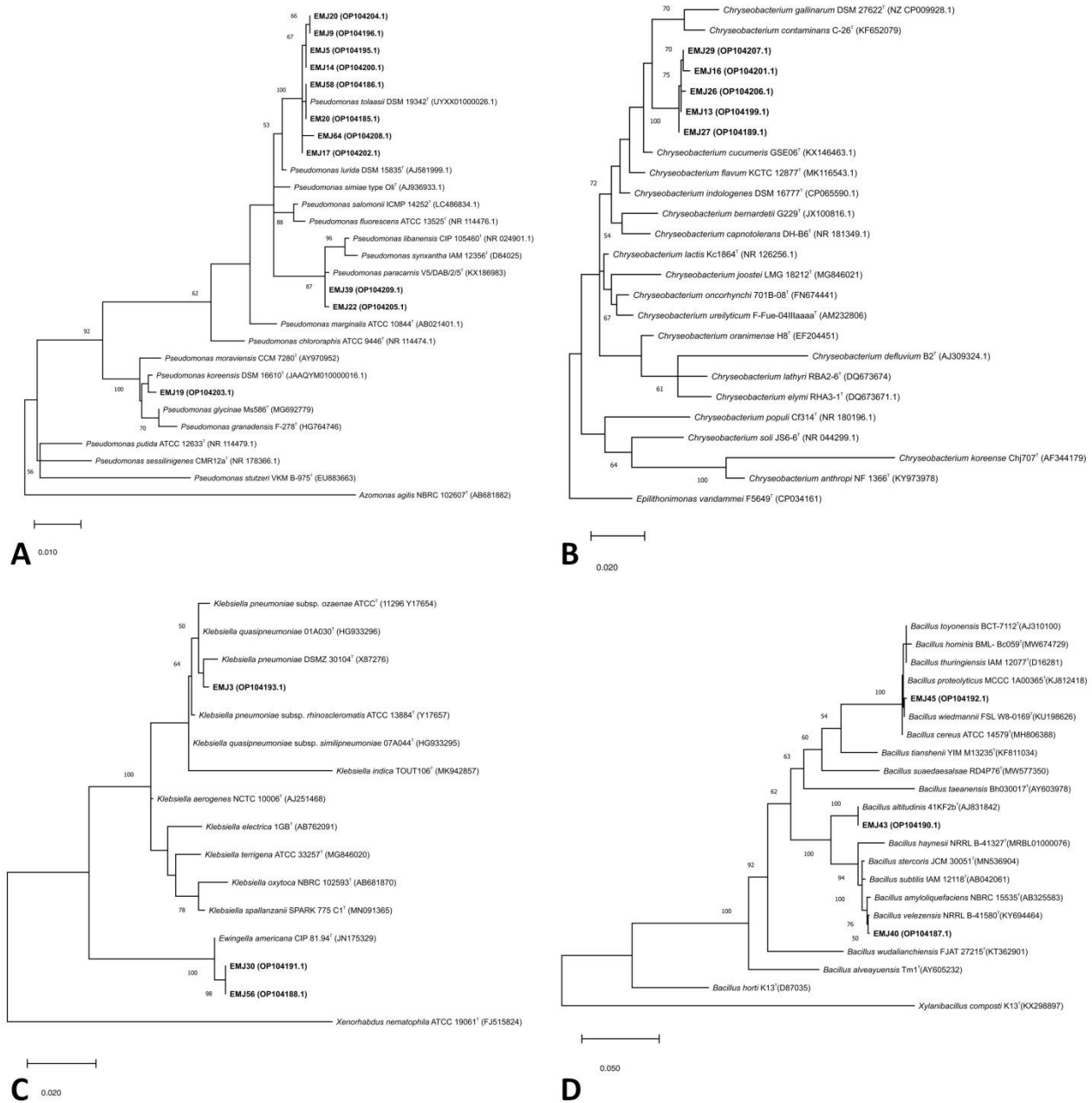
شکل ۴- کشت مقابل جدایه EMJ69 (*Pseudomonas reactant*) در مقابل باکتری *Pseudomonas tolaasii* روی محیط کشت King's B در آزمون white line

Figure 4- Cultivation against isolate EMJ69 (*Pseudomonas reactant*) against *Pseudomonas tolaasii* bacteria on King's B culture medium in test white line

جدول ۴- جنس باکتری‌های بیمارگر و مفید قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*)

Table 4. Pathogenic and beneficial bacteria genera in edible mushroom (*Agaricus bisporus*)

<i>Pseudomonas tolaasii</i>	باکتری‌های بیمارگر
<i>Pseudomonas paracarnis</i>	



شکل ۵. درخت فیلوژنی مربوط به مقایسه توالی ژن rRNA ۱۶S جدایه‌های بیماری‌زای قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*) (A، B و C) و جدایه‌های اندوفیت (D) به روش Maximum Likelihood با استفاده از مدل Hasegawa-Kishino-Yano، gamma distribution و invariant site اساس کمترین مقدار Bayesian information criterion (BIC). مقادیر بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار در درخت آمده است.

Figure 5. Maximum likelihood phylogenetic tree based on partial sequence of 16S rRNA gene showing the taxonomic position of isolates pathogenic on *Agaricus bisporus* (A, B and C) and endophytes (D). The tree was constructed using the Hasegawa-Kishino-Yano (HKY+ G+ I) based on the lowest Bayesian information criterion (BIC) score. Bootstrap values calculated for 1,000 replications are indicated.

کلاهدک و پایه کلاهدک قارچ خوراکی متغیر است و به عنوان یکی از عوامل بیماری‌زا روی قارچ خوراکی از ایران نیز گزارش شده است (Hamidizade et al., 2023). این اولین گزارش از آلودگی بستر کشت قارچ خوراکی به این باکتری در استان البرز است.

گونه‌های *Chryseobacterium* که در طبیعت دوشاخه هستند، عمدتاً در خاک و آب یافت می‌شوند. مطالعات زیست‌محیطی نشان داده‌اند که این موجودات می‌توانند در منابع آب شهری تصفیه‌شده با کلر زنده بمانند، اغلب حوضچه‌ها و شیرهای آب را استعمار کرده و مخازن بالقوه برای عفونت‌ها در محیط‌های بیمارستانی ایجاد می‌کنند. در سایر محیط‌های بالینی، کرایوباکتری‌ها به عنوان عوامل ایجاد کننده مننژیت، باکتری‌می، پنومونی، اندوکاردیت، عفونت‌های پوست و بافت نرم، عفونت‌های چشمی و سایر عفونت‌ها توصیف شده‌اند. در درجه اول بیمارگرهای فرصت طلب، عمدتاً نوزادان و میزبان‌های نقص ایمنی را از همه گروه‌های سنی آلوده می‌کنند (Hoque et al., 2001).

باکتری *Klebsiella pneumoniae* گرم منفی، غیر متحرک، تخمیر کننده لاکتوز، بی‌هوازی اختیاری، میله‌ای شکل است. اگرچه در فلور طبیعی دهان، پوست و روده یافت می‌شود، اما در صورت تنفس می‌تواند تغییرات مخربی در ریه‌های انسان و حیوانات ایجاد کند، به‌ویژه در آئول‌ها که منجر به ایجاد خلط ژله‌ای رنگی، قهوه‌ای یا زرد می‌شود (Ryan et al., 2004). در محیط بالینی، مهم‌ترین عضو از جنس *Klebsiella* از *Enterobacteriaceae* است. گونه *K. oxytoca* و *K. rhinoscleromatis* نیز در نمونه‌های بالینی انسانی شناسایی شده‌اند. در سال‌های اخیر، گونه‌های *Klebsiella* به بیمارگرهای مهم در عفونت‌های بیمارستانی تبدیل شده‌اند. به طور طبیعی در خاک وجود دارند و حدود ۳۰ درصد سویه‌ها می‌توانند نیترژن را در شرایط بی‌هوازی تثبیت کنند (Rostgate, 1998). به عنوان یک دیازوتروف آزاد، سیستم تثبیت نیترژن آن بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است، و مورد توجه کشاورزی است، زیرا *K. pneumoniae* نشان داده است که باعث افزایش عملکرد در محصولات کشاورزی می‌شود (Riggs et al., 2001).

در این پژوهش جدایه‌های باکتریایی بیوکنترل به باکتری‌های *Bacillus wiedmannii*، *Bacillus velezensis*، *Kocuria rhizophila* و *Bacillus altitudinis* شناسایی شد. اعضای جنس *Kocuria* از طیف گسترده‌ای از منابع طبیعی، از جمله پوست پستانداران، خاک، ریزوسفر، غذاهای تخمیر شده، نمونه‌های بالینی، آب شیرین و رسوبات دریایی جدا شدند. با توجه به اندازه ژنوم نسبتاً کوچک آن در میان اکتینومیست‌ها، این بسیار شگفت‌انگیز است که نشان می‌دهد هر گونه این باکتری با محیط اکولوژیکی مربوطه سازگار است (Kovács et al., 1999). همچنین این عامل یک باکتری فرصت طلب در بیماری‌های انسانی است و ایجاد کننده

هدف از انجام این پژوهش شناسایی عوامل بیماری‌زای باکتریایی بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی بود. در این تحقیق، نمونه‌برداری از شرکت رازفک مهرشهر (مهرشهر کرچ) انجام شد. علائم بیماری در قارچ خوراکی به صورت متفاوت در رنگ، شدت علائم از فرورفته تا سطحی و مکان و وسعت لکه‌ها مشاهده شدند که با علائم گزارش شده از پژوهش‌های پیشین مطابقت داشت (Navarro et al., 2018). نتایج استخراج پروتئین جدایه‌هایی که از قارچ سالم و بدون آلودگی جدا شده بودند، روی ژل اکریل آمید نشان داد که اندوفیت‌های جداسازی شده از قارچ خوراکی سالم در چهار گروه پروتئینی با توجه به تفاوت در الگوی بانندی قرار می‌گیرند و از هر گروه یک نماینده برای آزمون‌های شناسایی و بیوکنترلی انتخاب شد. همچنین از بین جدایه‌ها ۲۳ باکتری بیماری‌زا بر اساس آزمون بیماری‌زایی روی قارچ خوراکی انتخاب و مورد آزمون‌های بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی قرار گرفتند. برای جدایه‌های بیماری‌زا و اندوفیت آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی شامل تست گرم، کاتالاز، اکسیداز، تولید رنگدانه فلورسنت، آزمون وایت لاین و سیترات انجام شد. نتایج نشان داد که جدایه‌های بیماری‌زا عامل ایجاد لکه قهوه‌ای روی قارچ خوراکی شامل جنس‌های *Pseudomonas*، *Klebsiella*، *Chryseobacterium* و *Ewingella* هستند که بیشترین فراوانی در بین گونه‌های سودوموناس برای ایجاد لکه روی قارچ خوراکی بود. باکتری *Pseudomonas tolaasii* به عنوان عامل بیماری لکه قهوه‌ای در قارچ خوراکی شناخته می‌شود، سایر گونه‌های سودوموناس از جمله *P. reactans* نیز هر چند به روشی متفاوت علائم بیماری را ایجاد می‌کنند (Coraiola et al., 2006). این گونه‌های سودوموناس باعث ایجاد لکه‌های قهوه‌ای و فساد قارچ تازه می‌شوند (Pourbagher et al., 2023). گونه‌های دیگر سودوموناس شناسایی شده در این تحقیق شامل *Pseudomonas koreensis* و *Pseudomonas libanensis* به عنوان سودوموناس‌های محرک رشد PGPR در گیاهان معرفی شده‌اند (Ma et al., 2019; Kwon et al., 2003; Macleod et al., 2015). این گونه‌ها برای اولین بار به عنوان یک عامل بیماری‌زا روی قارچ خوراکی برای بیماری لکه قهوه‌ای معرفی می‌شوند که اثر منفرد این باکتری‌ها در ایجاد بیماری لکه قهوه‌ای روی قارچ خوراکی یا اثر سینرژیستی آن با سایر عوامل باکتریایی به ویژه گونه‌های سودوموناس برای ایجاد بیماری روی قارچ خوراکی مستلزم تحقیقات بیشتر در آینده است. گونه *Ewingella americana* به عنوان عامل نکروز داخلی پایه کلاهدک در قارچ خوراکی معرفی شده است و همچنین در انسان توانایی ایجاد بیماری دارد (Hassan et al., 2012; Inglis et al., 1996). جدایه‌های *E. americana* از نظر تهاجمی در کلاهدک‌ها و نوک‌های قارچ متفاوت‌اند، به طوری که علائم مربوط به این باکتری از زرد تیره تا قهوه‌ای تیره روی

فعالیت ضد قارچی (Lu et al., 2017) هستند و به عنوان عوامل محافظت کننده زیستی (Budiharjo et al., 2017) محرک‌های رشد گیاه (Kumaravel et al., 2018) و در نهایت برای کاربردهای کنترل زیستی (Sunar et al., 2015) مورد استفاده قرار می‌گیرند. باکتری *Bacillus wiedmannii* گرم مثبت تولیدکننده اسپور است که پروتئین‌های آفت کش متنوعی تولید می‌کند (Lazarte et al., 2018).

تأثیر این باکتری‌های مفید جداسازی شده در این مطالعه بر کنترل بیماری لکه قهوه‌ای در قارچ خوراکی ناشناخته است، امید است در تحقیقات آینده اثر این باکتری‌های مفید بیوکنترل بر مهار این بیماری و باکتری‌های مولد بیماری روی قارچ خوراکی را مورد مطالعه قرار شود. در دهه‌های اخیر، روش‌های تکثیر بر مبنای PCR جهت شناسایی باکتری‌ها معرفی شده اند که هدف بیشتر آنها ژن 16S rRNA است که در بیشتر باکتری‌های واقعی، این ژن با تغییرات بسیار اندکی حفظ شده است و حاوی نواحی حفظ‌شده‌ای بین باکتری‌های یک گونه است از این رو ما در این مطالعه از توالی ژن 16S rRNA که در ژنوم تمام باکتری‌ها و با حفظ‌شدگی بالا موجود است و وجود تمام انواع باکتری‌ها را نشان می‌دهد، استفاده شد تا بتواند بطور کلی باکتری‌های عامل لکه قهوه‌ای در قارچ خوراکی را افتراق دهد. همچنین این ژن به عنوان استاندارد برای تاکسونومی و شناسایی باکتری‌ها استفاده می‌شود. این قسمت ژنومی سریع‌تر و ساده‌تر توالی‌یابی می‌شود و حاوی اطلاعات ژنتیکی کافی برای شناسایی پروکاریوت‌ها می‌باشد (Saravoltaz et al., 2003; Jaton, 1992).

سپاسگزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از شرکت رازفدک مهرشهر که ما را در انجام و ارتقای کیفی این پژوهش (به لحاظ مالی و معنوی) یاری دادند، اعلام کنند.

References

- ABOU-ZEID M. A. 2012. Pathogenic variation in isolates of *pseudomonas* causing the brown blotch of cultivated mushroom, *agaricus bisporus*. Brazilian Journal of Microbiology. 1137-1146 ISSN 1517-8382.
- ABRIOUEL, H., C. M. A. P. FRANZ, N. B. OMAR, and A. GÁLVEZ. 2011. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiol. Rev. 35:201-232. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x.
- AKHLAGHI, M., TARIGHI, S., FARSI, M. & TAHERI, P. 2016. Identification and investigation of some virulence factors of *Pseudomonas tolaasii* isolated from mushroom in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology, 51 (4), 366-412. (In Persian with abstract in English)
- ALIKHANI H., SALEH RASTIN N., and BIHAMTA M.R. 2007. An evaluation of auxin hormones and ACC

حالت سینرژیستی در بیماری‌های باکتریایی انسان را ایجاد می‌کند (Becker et al., 2008). هنوز اطلاعات کاملی درباره ویژگی‌های بیوکنترلی این باکتری روی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی وجود ندارد و مستلزم تحقیقات بیشتر روی ابعاد مختلف این باکتری و مکانیسم‌های آن است. گونه‌های باسیلوس گاهی اوقات فعالیت ضد میکروبی گسترده‌ای دارند که می‌تواند شامل باکتری‌های گرم مثبت، باکتری‌های گرم منفی، مخمرها و سایر قارچ‌ها باشد، از این رو به عنوان عوامل زیستی مهم بیوکنترلی تحقیقات گسترده‌ای روی گونه‌های آن و مکانیسم‌های بیوکنترلی آن‌ها در گذشته صورت پذیرفته است (Abriouel et al., 2011). گونه *B. velezensis* اولین بار در سال ۲۰۰۵ توسط Ruiz-García و همکاران شناسایی شد. این باکتری به عنوان عامل آنتاگونیست فعال شناخته شده است که اثر ترکیبات ضد میکروبی متنوع آن علیه بیمارگرهای گیاهی به اثبات رسیده است (Rabbee et al. 2019). همچنین این باکتری محرک رشد گیاه است و همین‌طور بر اساس خواص آن، به عنوان یک پروبیوتیک در خوراک دام هم استفاده می‌شود (Chen et al., 2018 & Chen et al., 2019). به طور کلی یافته‌های تحقیقاتی اخیر در مورد *B. velezensis* نشان داده اند که این باکتری قادر به تولید مواد ضد میکروبی، ترکیبات آلی فرار، القای مقاومت به بیماری و ارتقا رشد و عملکرد گیاه است (Rabbee et al., 2023). در سال‌های اخیر، *B. velezensis* به عنوان یک عامل بالقوه کنترل زیستی در بسیاری از کشورها محبوبیت پیدا کرده است. توانایی‌های این باکتری در تولید متابولیت‌های ضد میکروبی، ترکیبات آلی فرار، القای مقاومت به بیماری و تأثیر این باکتری بر رشد و عملکرد گیاه در تحقیقات گذشته دانشمندان بررسی شده است (Rabbee et al., 2023). گونه *Bacillus altitudinis* ابتدا از لوله‌های برودتی که برای جمع‌آوری نمونه‌های هوا از ارتفاعات استفاده می‌شد، جدا شد و به همین دلیل نام آن به‌وجود آمد (Palanichamy et al., 2012). جدایه‌های این گونه دارای خواص آنتی باکتریال (Galaviz-Silva et al., 2018) و

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 Persian with abstract in English)

- AL-TAWFIQ, J.A. 2006. *Brucella* Epididymo-orchitis: A consideration in endemic area. International braz j urol, 32, pp.313-315.
- ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHAEFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. AND LIPMAN, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databasesearch programs. Nucleic Acids Research, 25, 3389-3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389
- BECKER, K., RUTSCH, F., UEKÖTTER, A., KIPP, F., KÖNIG, J., MARQUARDT, T., PETERS, G. and VON EIFF, C. 2008. *Kocuria rhizophila* adds to the emerging spectrum of micrococcal species involved in

- human infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 46 (10), pp.3537-3539. DOI: 10.1128/JCM.00823-08.
- BLOCH ET AL. 1997. *Chryseobacterium meningosepticum*: an emerging pathogen among immunocompromised adults. Report of 6 cases and literature review. *Medicine (Baltimore)*76:30-41. DOI: 10.1097/00005792-199701000-00003.
- BRAVO, A., LIKITVIVATANAVONG, S., GILL, S.S. and SOBERÓN, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect biochemistry and molecular biology*, 41 (7), pp.423-431. DOI: 10.1016/j.ibmb.2011.02.006.
- BUDI HARJO, A., H. JEONG, D. WULANDARI, S. LEE, AND C.-M. RYU. 2017. Complete genome sequence of *Bacillus altitudinis* P-10, a potential bioprotectant against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, isolated from rice rhizosphere in Java, Indonesia. *Genome Announc.* 5: e01388-17. DOI: 10.1128/genomeA.01388-17.
- CANTORE P. L., LAZZARONI S., CORAIOLA M., DALLA M., CAFARCHIA C., EVIDENTE A. and IACOBELLIS S. 2006. Biological Characterization of White Line-Inducing Principle (WLIP) Produce by *Pseudomonas reactans* NCPPB1311. *Molecular Plant-Microbe.* 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1731. DOI: 10.1094/MPMI-19-1113
- CANTORE, P. L. & IACOBELLIS, N. S. 2003. First report of brown discoloration of *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas agarici* in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea*, 43 (1), 35-38. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1731.
- CEUPPENS, S., BOON, N., & UYTENDAELE, M. 2013. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS microbiology ecology*, 84(3), 433-450. DOI: 10.1111/1574-6941.12110.
- CHEN, L.; HENG, J.; QIN, S.; BIAN, K. A. 2018. comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. *PLoS ONE*, 13, e0198560. DOI: 10.1371/journal.pone.0198560.
- CHEN, L.; SHI, H.; HENG, J.; WANG, D.; BIAN, K. 2019. Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. *Microbiol. Res.*, 218, 41-48. DOI: 10.1016/j.micres.2018.10.002
- COLE, A. L. J. and SKELLERUP, M. V. 1986. ultrastructure of the interaction of *agaricus Agaricus bisporus* and *pseudomonas tolaasii*. Printed in Great Britain. *Trans. Br. mycology. Soc.* 87 (2).
- CORAIOLA, M., CANTORE, P.L., LAZZARONI, S., EVIDENTE, A., IACOBELLIS, N.S. and DALLA SERRA, M. 2006. WLIP and tolaasin I, lipodepsipeptides from *Pseudomonas reactans* and *Pseudomonas tolaasii*, permeabilise model membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758 (11), pp.1713-1722. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.06.023
- FARSI M. and POURIANFAR H. 2011. Cultivation and breeding of the white button mushroom. 2th ed. Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Mashhad. P 15-28. (In Persian with abstract in English)
- GALAVIZ-SILVA, L., J. M. IRACHETA-VILLARREAL, and Z. J. MOLINA-GARZA. 2018. *Bacillus* and *Virgibacillus* strains isolated from three Mexican coasts antagonize *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 365. 10.1093/femsle/fny202.
- GODFREY S. A. C., MARSHALL, J. W. and KLENA J. D. 2001. Genetic characterization of *Pseudomonas* "NZ17"- a novel pathogen that results in a brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *Journal of Applied Microbiology* 91:412-420. 10.1046/j.1365-2672.2001.01398.x.
- HAMIDIZADE, M., TAGHAVI, S.M., MOALLEM, M., AEINI, M., FAZLIARAB, A., ABACHI, H., HERSCHLAG, R.A., HOCKETT, K.L., BULL, C.T. and OSDAGHI, E., 2023. *Ewingella americana*: An Emerging Multifaceted Pathogen of Edible Mushrooms. *Phytopathology*®, 113 (2), pp.150-159. 10.1094/PHTO-08-22-0299-R.
- HAMIDIZADEH, M., et al. 2020. Bacterial Brown Pit a new disease of adible mashrooms caused by *Mycetocola* sp. *Plant Dis.* 140:1445-1454. 10.1094/PDIS-10-19-2176-RE.
- HASSAN, S., AMER, S., MITTAL, C. and SHARMA, R. 2012. *Ewingella americana*: an emerging true pathogen. Case reports in infectious diseases. DOI: 10.1155/2012/730720.
- HONEY, R.M., GELFAND, M. and MYERS, N.H. 1957. Chronic *brucella pyelonephritis* with calcification: short review of the literature and report of a case.
- HOQUE, S. N., J. GRAHAM, M. E. KAUFMANN, and S. TABAQCHALI. 2001. *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* outbreak associated with colonization of water taps in a neonatal intensive care unit. *J. Hosp. Infect.*47:188-192.
- HUGH, R. and LEIFSON, E. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gramnegative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 66: 24-26. DOI: 10.1128%2Fjb.66.1.24-26.1953
- INGLIS, P.W., BURDEN, J.L. and PEBERDY, J.F. 1996. Evidence for the association of the enteric bacterium *Ewingella americana* with internal stipe necrosis of *Agaricus bisporus*. *Microbiology*, 142 (11), pp.3253-3260. DOI: 10.4489%2FMYCO.2009.37.1.062
- JATON K. 1992. Development of polymerase chain reaction assay for detection of listeria monocytogenese in clinical cerebrospinal fluid samples. *J Clin Microbial*; 30(80): 1931-1936. DOI: 10.1128/jcm.30.8.1931-1936.1992.
- JIANG, T., FENG, L., ZHENG, X. 2012. Effect of chitosan coating enriched with thyme oil on postharvest quality and shelf life of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 188-196. DOI: 10.1021/jf202638u. Epub 2011 Dec 15.
- Khabaz H., Rahimian H. 2002. Brown blotch disease of cultivated mushroom in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 38:1-10. (In Persian with abstract in English).

- Kovács, G., Burghardt, J., Pradella, S., Schumann, P., Stackebrandt, E. and Máriaiget, K. 1999. *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Typha angustifolia*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 49 (1), pp.167-173. DOI: 10.1099/00207713-49-1-167.
- KOVACS, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature, London, 178: 703. DOI: 10.1038/178703a0.
- KUMARAVEL, S., S. THANKAPPAN, S. RAGHUPATHI, and S. UTHANDI. 2018. Draft genome sequence of plant growth-promoting and drought-tolerant *Bacillus altitudinis* FD48, isolated from rice phylloplane. Genome Announc. 6: e00019-18. 10.1128%2FgenomeA.00019-18.
- KWON, S.W., KIM, J.S., PARK, I.C., YOON, S.H., PARK, D.H., LIM, C.K. and GO, S.J. 2003. *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 53 (1), pp.21-27. DOI: 10.1099/ijs.0.02326-0.
- Laemmli, U.K. 1970. "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". Nature 227:680-685. DOI: 10.1038/227680a0.
- LAZARTE JN, LOPEZ RP, GHIRINGHELLI PD, BERON CM. 2018. *Bacillus wiedmannii* biovar *thuringiensis*: a specialized mosquitocidal pathogen with plasmids from diverse origins. Genome Biol Evol 10:2823-2833. DOI: 10.1093/gbe/evy211.
- MACLEOD, K., RUMBOLD, K. and PADAYACHEE, K., 2015. A systems approach to uncover the effects of the PGPR *Pseudomonas koreensis* on the level of drought stress tolerance in *Helianthus annuus*. Procedia Environmental Sciences, 29, pp.262-263. DOI: 10.1016/j.proenv.2015.07.200.
- MAMA, Y., LÁTR, A., ROCHA, I., FREITAS, H., VOSÁTKA, M. and OLIVEIRA, R.S. 2019. Delivery of inoculum of *Rhizophagus irregularis* via seed coating in combination with *Pseudomonas libanensis* for cowpea production. Agronomy, 9 (1), p.33.
- MUNSCH, P. and ALATOSSAVA, T. 2002 Several *pseudomonads*, associated with cultivated mushrooms *Agaricus bisporus* or *Pleurotus* sp., are hemolytic. Microbiol. Res. 157, 1-5. DOI: 10.1078/0944-5013-00159.
- MUNSCH, P., ALATOSSAVA, T., MARTTINEN, N., MEYER, J.M., CHRISTEN, R. and GARDAN, L. 2002. *Pseudomonas constantinii* sp. nov., another causal agent of brown blotch disease, isolated from cultivated mushroom sporophores in Finland. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52, 1973-1983. DOI: 10.1099/00207713-52-6-1973
- NAVARRO, M. J., GEA, F. J. & GONZALEZ, A. J. 2018. Identification, incidence and control of bacterial blotch disease in mushroom crops by management of environmental conditions. Scientia Horticulturae, 229, 10-18.
- OSDAGHI E, MARTINS S, RAMOS-SEPULVEDA L, VIEIRA FR, PECCHIA J, BEYER DM, et al. 2019. 100 Years since Tolaas: Bacterial Blotch of Mushrooms in the 21st Century. Plant Dis.;103 (11):2714-32. DOI: 10.1094/pdis-03-19-0589-fe
- PALLERONI, N. J. 1993. *Pseudomonas* classification. Antonie van Leeuwenhoek, 64 (3), 231-251. DOI: 10.1007/bf00873084
- POURBAGHER, R., ABBASPOUR-FARD, M.H., SOHBATZADEH, F., ROHANI, A. and POURBAGHER, M. 2023. Effect of plasma-activated water generated by surface DBD on inactivation of pathogens *Pseudomonas tolaasii* and *Lecanicillium fungicola* and enhancement of storage quality of button mushroom. Journal of Food Process Engineering, 46 (5), p.e14312. DOI: 10.1111/jfpe.14312
- RABBEE, M.F., HWANG, B.S. and Baek, K.H. 2023. *Bacillus velezensis*: A Beneficial Biocontrol Agent or Facultative Phytopathogen for Sustainable Agriculture. Agronomy, 13 (3), p.840. DOI: 10.3390/agronomy13030840.
- RABBEE, M.F.; ALI, M.S.; CHOI, J.; HWANG, B.S.; JEONG, S.C.; BAEK, K. 2019. *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. Molecules, 24, 1046. DOI: 10.3390/molecules24061046
- Rademaker, J.L.W. and De Bruijn, F.J. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-pcr genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis chapter 10, p. 151-171. In: Caetano-Anollés, G., and Gresshoff P.M. (Eds.). DNA markers: protocols, applications and overviews. J. Wiley & Sons, inc., USA.
- RAINEY P. B., BRODEY, C. L. and JOHNSTONE, K. 1992. Identification of a gene cluster encoding three highmolecular-weight proteins, which is required for synthesis of tolaasin by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. Molecular Microbiology 8:643-652. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1993.tb01608.x
- RIGGS PJ, CHELIUS MK, INIGUEZ AL, KAEPLER SM, TRIPLETT EW. 2001. "Enhanced maize productivity by inoculation with diazotrophic bacteria". Australian Journal of Plant Physiology. 29 (8): 829-836.
- RODRIGUES, C., PASSET, V., RAKOTONDRAO, A. and BRISSE, S., 2018. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and related phylogroups by MALDI-TOF mass spectrometry. Frontiers in microbiology, 9, p.3000. 10.3389%2Ffmicb.2018.03000
- RYAN KJ, RAY CG, EDS. 2004. *Sherris Medical Microbiology* (4th ed.). McGraw Hill. ISBN 978-0-8385-8529-0.
- SARAVOLTAZ L.D, MANZOR O, VANDORVELDE N, PAWLAK J, BELIAN B. 2003. Broad- range bacterial polymerase chain reaction for early detection of bacterial meningitis. Clin Infect Dis; 36: 40-45. DOI: 10.1086/345438.
- SCHAAD, N.W., JOENS, J.B. and CHUN, W. 2001 "Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria". A.P.S. USA, PP.373.

- SIVANESAN, D. 2003. Diversity among bacterial causing blotch disease on the commercial Mushroom *Agaricus bisporus*. MSc Thesis. Brock University, Canada.
- SUNAR, K., P. DEY, U. CHAKRABORTY, and B. Chakraborty. 2015. Biocontrol efficacy and plant growth promoting activity of *Bacillus* J. Food Prot., Vol. 84, No. 8 *B. altitudinis* phylogeny and antilisterial activity 1331 *altitudinis* isolated from Darjeeling hills, India. J. Basic Microbiol. 55:91-104. DOI: 10.1002/jobm.201300227.
- SUSLOW, T.V., SCHROTH, M.N. and ISAKA, M. 1982. Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72: 917-918. DOI: 10.1094/Phyto-72-917.
- TAO, F., ZHANG, M., HANGQING, Y., JINCAI, S. 2006. Effect of different storage condition on chemical and physical properties of white mushrooms after vacuum cooling. Journal of food engineering, 77, 545-549.
- TOLASS A. G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushrooms. Phytopathology 5: 51-54.