آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۹۰، شماره ۱، شهریور ۱۴۰۱
Applied Entomology and Phytopathology
Vol. 90, No. 1, Sep. 2022
DOI: 10.22092/JAEP.2022.357763.1433

مقاله پژوهشي

بررسي مولكولي ميكروفلور باكتريايي همراه و درونزي قارچ دكمه‌اي سفيد (*Agaricus bisporus*)

الهام موسوي جعفري‌پور[۱]، مژده دوستي[۲و۳]، رضا صادقي[۴]، نرگس فلاحي چرخابي[۵]✉ ، مسعود احمدزاده [۶]✉

۱- دانشجوي دكتري، گروه حشره‌شناسي و بيماري‌هاي گياهي، دانشكده فناوري كشاورزي، دانشكدگان كشاورزي و منابع طبيعي، دانشگاه تهران
۲- دانش‌آموخته دوره كارشناسي ارشد، گروه حشره‌شناسي و بيماري‌هاي گياهي، دانشكده فناوري كشاورزي، دانشكدگان كشاورزي و منابع طبيعي، دانشگاه تهران
۳- بخش تحقيق و توسعه شركت راژفدک مهرشهر، كرج، ايران
۴- دانشيار، گروه حشره‌شناسي و بيماري‌هاي گياهي، دانشكده فناوري كشاورزي، دانشكدگان كشاورزي و منابع طبيعي، دانشگاه تهران
۵- استاديار، گروه حشره‌شناسي و بيماري‌هاي گياهي، دانشكده فناوري كشاورزي، دانشكدگان كشاورزي و منابع طبيعي، دانشگاه تهران (falahicharkhabi@ut.ac.ir**)**
۶- استاد، گروه گياهپزشكي، دانشكده كشاورزي، دانشكدگان كشاورزي و منابع طبيعي، دانشگاه تهران (ahmadz@ut.ac.ir**)**

(تاريخ دريافت: ؛ تاريخ پذيرش:)

چكيده

قارچ خوراكي دكمه‌اي سفيد (*Agaricus bisporus*) به دليل داشتن ارزش غذايي بالا و خواص دارويي متعدد، جايگاه ويژه‌اي را در سبد غذايي مردم جهان به خود اختصاص داده است، از اين رو كشت اين منبع غذايي مفيد در جهان هر روز گسترده‌تر مي‌شود. در بررسي عوامل باكتريايي ايجادكننده بيماري روي قارچ خوراكي در استان البرز از قارچ‌هاي داراي علائم بيماري و براي جداسازي عوامل باكتريايي بيوكنترل عليه بيماري لكه‌قهوه‌اي از قارچ‌هاي سالم نمونه‌برداري شد. از نمونه‌هاي آلوده ٦١ جدايه باكتريايي به‌دست آمد، نتايج نشان داد كه ١٩ جدايه در قارچ خوراكي بيماري‌زا بودند و روي قارچ خوراكي علائم تغيير رنگ در حاشيه‌هاي جانبي و سطح كلاهک، لكه‌هاي وسيع، آبكي و فرورفته و لكه‌هاي ريز سوزني شكل و قهوه‌اي روي كلاهک و نكروزه بخش مياني و پايه قارچ خوراكي ايجاد كردند. از قارچ‌هاي سالم ٩ جدايه باكتري جداسازي شد كه روي قارچ خوراكي بيماري‌زا نبودند و چهار جدايه به عنوان جدايه‌هاي درونزي منتخب به منظور ارزيابي توانايي مكانيسم‌هاي بازدارندگي (توليد هورمون اكسين سيدروفور و توليد آنزيم هاي فيتاز، پروتئاز، ليپاز، لسيتيناز، سلولاز و كيتيناز) بررسي شدند. آزمون‌هاي بيوشيميايي و مولكولي براي شناسايي باكتري‌هاي بيماري‌زا و درونزي انجام شد. بر اساس بررسي ترادف‌هاي نوكلوئوتيدي ژن 16S rRNA باكتري‌هاي بيمارگر در جنس‌هاي بيمارگر *Pseudomonas*، *Chryseobacterium*، *Ewingella*، *Brucella* و *Klebsiella* و باكتري‌هاي غيربيمارگر درونزي در گونه‌هاي *Bacillus velezensis*، *Kocuria rhizophila*، *Bacillus altitudinis,Bacillus wiedmannii* قرار گرفتند.

واژه‌هاي كليدي: لكه قهوه‌اي، قارچ خوراكي، *Pseudomonas tolaasii*

Molecular analysis of the bacterial microflora associated with and endofungal of *Agaricus bisprus*

Elham Mousavi Jafaripour[1], Mozhdeh Doosti[2,3], Reza Sadeghi[4], Nargues Falahi Charkhabi[5]✉ , Masoud Ahmadzadeh[6]✉

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 Mehrashahr 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 (falahicharkhabi@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, it's 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*

مقدمه

قارچ‌هاي خوراكي يكي از محصولات پروتئيني مهم هستند كه براي قرن‌ها قسمتي از رژيم غذايي بشر بوده‌اند و منبع عالي براي بعضي از اسيدهاي آمينه، ويتامين‌ها و مواد معدني هستند (Tao et al., 2006). باكتري‌ها و تغييرات بيوشيميايي ناشي از آنزيم‌هاي توليدي آن‌ها مي‌توانند در طول نگهداري موجب فساد قارچ شوند (Jiang et al., 2012). قارچ دكمه‌اي سفيد بيشترين سطح زيركشت قارچ خوراكي در ايران را به خود اختصاص داده‌است (Farsi & Pourianfar, 2011). ايران با توليد حدود ۱۸۰ هزار تن محصول قارچ رتبه هفتم توليد جهان را داراست (FAO, 2021). در حال حاضر قارچ خوراكي در اكثر استان‌هاي كشور توليد مي‌شود و استان البرز يكي از قطب‌هاي بزرگ توليد قارچ در كشور است. با وجود ارزش اقتصادي و غذايي اين محصول ارزشمند توليد اين محصول و ميزان توليد آن دچار مخاطراتي از جمله بيماري‌هايي مانند لكه قهوه‌اي باكتريايي است (Gea et al., 2005). اين بيماري در مراحل توليد و هم در بحث ذخيره‌سازي باعث تخريب بافت قارچ شده، از بازارپسندي آن مي‌كاهد و آن را براي مصرف نامطلوب مي‌سازد (Cole & Skelrop 1986). بيماري لكه قهوه‌اي باعث ايجاد زخم‌هاي قهوه‌اي تيره و فرورفته در كلاهک يا ساقه قارچ مي‌شود كه محصول را غيرقابل بازاريابي مي‌نمايد. گاهي بيماري ناشي از اين باكتري‌ها به شكل اپيدمي در آمده و مي‌توانند از يک كشت به كشت ديگر گسترش و انتشار پيدا كنند (Navarro et al., 2018 & Sivanesan, 2003). در ابتدا عامل اصلي اين بيماري باكتري *Pseudomonas tolaasii* معرفي شد (Palleroni, 1993& Tolass, 1915& Pain,1919) اما با مطالعات بيشتر، گونه‌هاي ديگري از جنس سودموناس يا جنس‌هاي ديگري از باكتري‌ها عامل اين بيماري معرفي شدند. از جمله اين باكتري‌ها مي‌توان به *P. agarici*، *P. costantini*، *P. reactans*، *Pontoea* و *Serratia* اشاره كرد (Munsch et al.2002; Godfrey et al. 2001; Iacobellis and Lo Cantore 2003; Abuzaid et al., 2012; Osdaghi et al., 2020).

هدف از اين تحقيق شناسايي عوامل ايجادكننده بيماري لكه قهوه‌اي باكتريايي در قارچ خوراكي بود. از سويي به دليل اين كه كنترل عوامل بيماري‌زا در بستر قارچ خوراكي مستلزم مصرف سموم بسيار زيادي است و اين كار سلامت اين محصول مهم را به مخاطره مي‌اندازد. در اين مطالعه شناسايي عوامل بيوكنترلي باكتريايي نيز براي كنترل بيماري لكه قهوه‌اي باكتريايي بررسي شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداري و جداسازي

در پاييز و زمستان سال ۱۳۹۹ از قارچ‌هاي داراي علائم تغيير رنگ بافت از كرم تا قهوه‌اي و سياه، از خط توليد سالن‌هاي توليدكننده قارچ خوراكي شركت راژفدک مهرشهر در استان البرز نمونه‌برداري شد. نمونه‌هاي آلوده در پاكت‌هاي كاغذي به آزمايشگاه كنترل بيولوژيک دانشگاه تهران پرديس منابع طبيعي كرج منتقل شدند. جداسازي از قارچ‌هاي با لكه‌های كرم تا قهوه‌اي و سياه روي سطح كلاهک و ساقه انجام شد (Hamidizadeh et al., 2020). قطعاتي از مرز سالم و آلوده جداسازي و در محلول هيپوكلريت سديم ۰/۵ درصد ضدعفوني سطحي شدند. قطعات پس از شست وشو با آب مقطر سترون، در آب سترون خرد شدند. بعد از ۳۰ دقيقه، يک قطره از سوسپانسيون حاصل به كمک لوپ سترون در محيط كشت

کینگز بی[1] کشت شد. تشتک‌هاي پتري سه روز در دماي ۲۶ درجه سلسیوس نگهداري شدند. سپس تک پرگنه‌ها روی محیط آگار غذايي خالص‌سازی و تکثیر شد.

جهت جداسازي باکتري‌هاي اندوفيت ۵۰ عدد قارچ که از نظر ظاهري سالم و داراي کيفيت بالايي بودند، از خط تولید فلش یک شرکت راژفدک مهر شهر جمع آوري شد. سپس کلاهک و ساقه‌هاي قارچ به قطعات کوچک و مساوي تقسيم شده و در هيپوکلريت سديم يک درصد براي ۳ دقيقه ضدعفوني شده و ۳ مرحله با آب مقطر سترون شستشو و بعد از خشک شدن روي محيط کشت آگار مغذي (NA)[2] قرار داده شدند. در روشي ديگر يک گرم از قارچ در ۵۰ ميلي‌ليتر آب مقطر ريخته شد و روي شيکر به مدت ۳۰ دقيقه قرار گرفت (Hamidizadeh et al., 2020). سپس غلظت‌هاي مختلف به روش سري رقت تهيه شد و تا به دست آوردن رقت 10^{-5} ادامه يافت. سپس با استفاده از پيپت پاستور يک قطره از سوسپانسيون با رقت‌هاي 10^{-6} و 10^{-5} روي محيط کشت NA به طور جداگانه ريخته شد و با لوپ سترون به صورت مخطط کشت و به انکوباتور با دماي ۲۶ درجه سلسيوس براي مدت پنج روز نگهداري شد. پس از بررسي ويژگي‌هاي فنوتيپي متفاوت، جدايه‌هاي مورد نظر از بين پرگنه‌ها انتخاب و خالص سازي شدند و براي انجام مراحل بعدي در آب مقطر سترون و در دماي پنج درجه سلسيوس نگهداري شدند (Schaad et al., 2001). همچنين نمونه‌ها براي نگهداري طولاني مدت در گليسرول ۱۵ درصد در فريزر ۷۰- درجه سلسيوس نگهداري شدند.

الکتروفورز پروتئين‌هاي محلول سلولي باکتري‌ها

الکتروفورز پروتئين‌هاي استخراج شده در ژل پلي اکريل آميد تخت عمودي بر مبناي روش اصلاح شده لاملي و استنلي (۱۹۷۰) انجام شد. در اين روش، ژل جدا کننده پايينی با غلظت ۱۲ درصد اکريل آميد و ژل متراکم کننده بالايي با غلظت پنج درصد اکريل آميد تهيه شد. داخل تانک به اندازه کافي بافر ريخته شد. به نحوي که ژل کاملاً با بافر تماس داشته باشد. پس از تهيه ژل، توسط سرنگ انسولين از هر نمونه ۴۰ ميکروليتر در چاهک‌هاي ژل ريخته شد و الکتروفورز به کمک جريان ۱۰۰ولتي و جريان ثابت در بافر تانک انجام شد. پس از گذشت حدود ۱۲ساعت هنگامي که رنگ برم فنل بلو به دو سانتيمتري انتهاي ژل رسيد، از منبع تغذيه جدا شد. شيشه‌ها از دستگاه جدا شده و در محلول رنگ‌آميزي قرار داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت در محلول رنگ‌آميزي ۱/۰ درصد کوماسي برليانت بلو روي شيکر با سرعت ۴۰-۳۰ دور در دقيقه رنگ‌آميزي شد. سپس ژل از محلول رنگ خارج و در محلول رنگ‌بري روي شيکر براي يک ساعت قرار داده شد. ژل پس از رنگ‌بري جهت نگهداري به محلول اسيد استيک ۱۰ درصد منتقل و در يخچال نگهداري شد (Rodrigues Navvaro et al., 2000).

آزمون بيماري‌زايي

جهت آزمون بيماريزايي از کلاهک‌هاي سالم و يک دست قارچ خوراکي دکمه‌اي سفيد سالم استفاده شد. کلاهک‌ها در ظرف سترون قرار داده شدند. براي تأمين رطوبت مقدار ۱۰۰ ميکروليتر آب مقطر سترون روي کاغذ صافي ريخته شد. سپس از سوسپانسيون 10^8 CFU mL^{-1} کشت تازه هر يک از جدايه‌ها، مقدار ۳۰ ميکروليتر روي کلاهک قارچ قرار داده شد و درب ظرف به وسيله پارافيلم مسدود و در دماي ۲۸ درجه سلسيوس به مدت چهار تا پنج روز نگهداري شدند. تغيير رنگ و ظهور علائم آلودگي در مقايسه با شاهد بررسي شد (Akhlaghi et al., 2016). از آب مقطر سترون به عنوان شاهد استفاده شد (Khabaz Jolfaei et al., 2002).

بررسي ويژگي‌هاي فنوتيپي و بيوشيميايي

ويژگي‌هاي مورفولوژيکي، فيزيولوژيکي و بيوشيميايي تمامي جدايه‌هاي بيماري‌زا بررسي شد. آزمون توليد رنگدانه فلورسنت روي محيط King's B، به روش Schaad و همکاران (۲۰۰۱)، آزمون گرم با حلاليت در پتاس (KOH) سه درصد به روش Suslow و همکاران (۱۹۸۲)، آزمون رشد هوازي و بي هوازي به روش Hugh و Leifson (۱۹۵۳) و آزمون سيترات بر اساس روش Harly (۲۰۰۵) انجام پذيرفت. آزمون اکسيداز با قرار دادن گستره اي از باکتري روي کاغذ صافي آغشته به محلول يک درصد تترامتيل پارافنيل دي آمين دي هيدروکلراید انجام شد (Kovacs, 1956). آزمون خط سفيد بر اساس روش Rainey و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد.

شناسايي مولکولي جدايه‌ها و فراواني

استخراج DNA ژنومي به روش ليز قلیایي انجام شد. سپس ژن 16S rRNA جدايه‌هاي انتخاب شده تکثير و توالي‌يابي شد. براي تکثير ژن رمز کننده 16S rRNA از آغازگرهاي 10F (5′-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAG-3′) و 1507R (5′-TACCTTGTTACGACTTCACCCCAG-3′) (O'Neillet al., 1992) استفاده شد. واکنش زنجيره‌اي پليمراز (PCR) در حجم ۲۰ ميکروليتر و غلظت نهايي ۱۰ پيکومول از هر کدام از آغازگرها، ۱۰ ميکروليتر مخلوط واکنش (Ampliqon, Denmark) 2x Master mix RED و دو ميکروليتر از DNA ژنومي انجام شد. واکنش در دستگاه ترموسايکلر اپندورف (Eppendorf, Germany) انجام شد. واسرشته‌سازي اوليه در دماي ۹۵ درجه سلسيوس به مدت پنج دقيقه صورت گرفت. سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشته‌سازي DNA ژنومي در دماي ۹۵ درجه سلسيوس، به مدت يک دقيقه؛ اتصال آغازگرها به رشته الگو در دماي ۵۹ درجه سلسيوس، به مدت يک دقيقه؛ گسترش رشته جديد در دماي ۷۲ درجه سلسيوس به مدت دو دقيقه انجام شده و در پايان گسترش نهايي در دماي ۷۲ درجه سلسيوس به مدت پنج دقيقه انجام شد (Rademaker et al., 1997).

محصول PCR با دو ميکروليتر بافر بارگذاري مخلوط و پس از تهية ژل آگارز يک درصد در بافر TBE، نمونه‌ها در چاهک‌ها بارگذاري شدند. دستگاه الکتروفورز به منبع تأمين نيروي برق با ولتاژ ثابت ۸۰ ولت متصل شد. رنگ‌آميزي با استفاده از محلول اتيديوم بروماید با غلظت

[1] King's B

[2] Nutrient agar

يك ميلي گرم در ليتر قرار گرفت (Sigmon & Larcom, 1996). عكس‌برداري در دستگاه Gel document (Uvitec/DM 500) انجام شد.
توالي‌يابي توسط شركت پيشگام (تهران، ايران) انجام شد. بعد از دريافت فايل قطعات DNA تعيين توالي شده، كروماتوگرام مربوط به توالي‌ها 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 ويرايش و در بانک ژن BLAST شدند (Altschul et al., 1997). توالي حاصل با برنامه BLAST در پايگاه Basic Local Alignment Search Tool) اطلاعاتي NCBI با ساير جدايه‌هاي ثبت شده مقايسه و بررسي شد. براي ارزيابي توالي‌هاي نوكلئوتيدي متعلق به جدايه‌هاي مورد بررسي و ترسيم تبارنماي تبارزايي آن‌ها، از نرم‌افزار MEGAX استفاده شد (Kumar et al., 2018). در نهايت براي تجزيه و تحليل داده‌ها و ارزيابي توالي نوكلوتيدي نواحي ژني جدايه‌هاي مختلف و ترسيم تبارنماي آن‌ها از روش Neighbor-Joining استفاده شد (Saito and nie, 1987).

نتايج

نمونه‌برداري و علائم شناختي

در پاييز و زمستان ۱۳۹۹، ۷۵ نمونه با علائم تغيير رنگ روي كلاهک و علائم قهوه‌اي شدن (به طوري كه ۲۰ درصد كلاهک يا اندام كلي قارچ را فرا گرفته باشد) روي قارچ سفيد دكمه‌اي از خط توليد شركت راژفدک مهرشهر واقع در استان البرز (مهرشهر كرج) جمع‌آوري شد. علائم شامل لكه زرد و فرورفته در حاشيه‌هاي جانبي و سطح كلاهک، لكه‌هاي وسيع قهوه‌اي و آبكي و فرورفته در سطح كلاهک، لكه‌هاي ريز سوزني شكل و قهوه‌اي روي كلاهک، نكروزه بخش مياني و پايه كلاهک قارچ، تک لكه‌هاي سياه رنگ و بزرگ روي سطح كلاهک قارچ خوراكي و لكه‌هاي ريز قهوه‌اي رنگ روي كلاهک قارچ بودند (شكل ۱).

شكل ۱- علائم مختلف لكه باكتريايي روي نمونه‌هاي جمع‌آوري شده قارچ خوراكي (A، B، D و G) لكه‌هاي وسيع قهوه‌اي و آبكي و فرورفته در سطح يا حاشيه كلاهک، (C) نكروزه بخش مياني و پايه كلاهک قارچ، (E و F) لكه‌هاي ريز قهوه‌اي رنگ روي كلاهک قارچ.

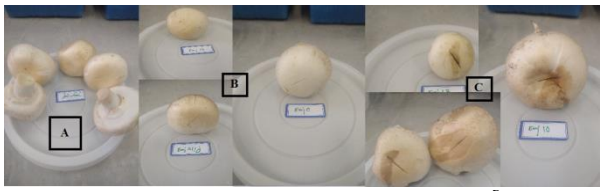
Figure 1- Different symptoms of bacterial spot on collected edible mushroom samples (A, B, D, G) wide brown and watery and sunken spots on the surface or margin of the cap, (C) necrosis of the middle part and the base of the mushroom cap, (F, E) small brown spots on the mushroom cap.

جداسازي

سه روز پس از كشت سوسپانسيون اوليه باكتري‌ها و ظهور پرگنه‌ها، كشت مجدد و خالص‌سازي انجام شد. و در نهايت تعداد ۶۱ جدايه از نمونه‌هاي داراي علائم آلودگي به بيماري لكه قهوه‌اي روي قارچ خوراكي به دست آمد. پرگنه‌هاي اين باكتري‌ها داراي رنگ‌هاي سفيد كدر، سفيد روغني، زرد براق، زرد روشن، نارنجي براق، شيري تا بي رنگ و شفاف بودند. به علاوه ۹ جدايه از بافت‌هاي سالم قارچ خوراكي به‌دست آمد. اين باكتري‌ها داراي پرگنه‌هايي به رنگ‌هاي شيري، سفيد شفاف، نارنجي و كرم بودند.

آزمون بيماري‌زايي

از ٦١ جدايه به‌دست آمده از نمونه‌هاي قارچ خوراكي داراي علائم لكه قهوه‌اي، ۱۹ جدايه روي قارچ خوراكي بيماري‌زا بودند كه براي انجام آزمون‌هاي بيوشيميايي و شناسايي مولكولي مورد بررسي قرار گرفتند. علائم روي قارچ‌هاي تلقيح شده با باكتري‌هاي بيماري‌زا به صورت لكه‌هاي قهوه اي تا سياه و در برخي موارد به صورت فررفته و چروكيده مشاهده شد. شدت علائم بروز بيماري‌زايي در اين ۱۹ جدايه روي قارچ خوراكي و همين طور مدت زمان لازم براي بروز علائم روي قارچ از ٢٤ تا ٤٨ ساعت متفاوت بود (شكل ۲).



شكل ۲- آزمون بيماري‌زايي جدايه‌هاي باكتري بيماري‌زا روي قارچ خوراكي،(A) شاهد (آب مقطر سترون)، (B) باكتري‌هاي بدون علائم و (C) باكتري‌هاي بيماري‌زا مثبت داراي علائم بيماري در محل مايه‌زني.

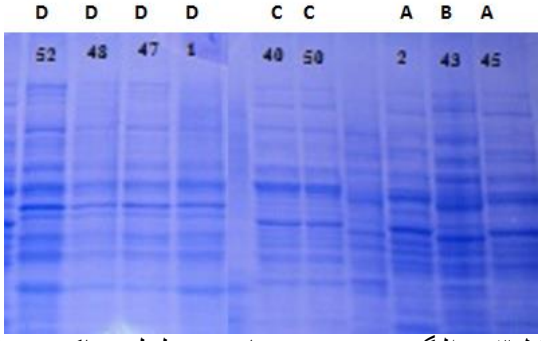
Figure 2-Pathogenicity test of pathogenic bacteria isolates on edible mushrooms, (A) control (sterile distilled water), (B) bacteria without symptoms and (C) positive pathogenic bacteria with disease symptoms at the inoculation site.

الگوي پروتئين‌هاي محلول سلولي

از ۹ جدايه باكتري جدا شده از كلاهک و ساقه قارچ‌هاي خوراكي سالم، پروتئين محلول سلولي استخراج و مقايسه

شد. نتایج نشان داد که جدایه‌ها از نظر الگوي پروتئین‌هاي محلول در چهار گروه قرار گرفتند. چهار جدایه از بین ۹ جدایه بر اساس تفاوت الگوي باندي پروتئيني در آزمون استخراج پروتئین انتخاب شدند. گروه‌بندي بر اساس قرارگيري باندهاي پروتئيني در ژل اکریلامید به ترتیب گروه و جدایه‌هاي هم گروه شامل A (EMJ45 و EMJ2)، B (EMJ43)، C (EMJ40 و EMJ50) و D (EMJ52، EMJ48، EMJ1 و EMJ47) بودند. از هر گروه یک نماینده براي انجام آزمون‌هاي بیوشیمیایي مربوط به توانایي تولید متابولیت‌هاي مربوط به مکانیسم‌هاي بازدارندگي و شناسایي مولکولي انتخاب شدند. نتایج الگوي پروتئین‌هاي محلول سلولي جدایه‌هاي باکتریایي جدا شده از کلاهک و ساقه قارچ‌هاي خوراکي آلوده در ژل پلي اکریل آمید در جدول ۱ و نمونه‌اي از ژل اکریل آمید این آزمون در شکل ۳ نمایش داده شده است.

در گام بعدي تولید متابولیت‌هاي مؤثر در مکانیسم‌هاي بازدارندگي این چهار جدایه در شرایط آزمایشگاه مورد بررسي قرار گرفت.



شکل۳- الگوي پروتئین‌هاي محلول باکتري‌هاي جداسازي شده از قارچ خوراکي (*Agaricus bisporus*) پس از الکتروفورز در ژل اکریل آمید و رنگ‌آمیزي با استفاده از کوماسي 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 باکتري‌هاي جدا شده از قارچ خوراکي (*Agaricus bisporus*) بر اساس الگوي باندهاي پروتئین‌هاي 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
C	EMJ40, EMJ50
D	EMJ1, EMJ47, EMJ48, EMJ52

ویژگي‌هاي فنوتیپي و بیوشیمیایي

مطالعات فنوتیپي روي ۱۹ جدایه بیماري‌زا و چهار جدایه منتخب (OP104187-OP104190-OP104184-OP104192) از باکتري‌هاي اندوفیت (بر اساس الگوي باندي پروتئین‌هاي محلول) بررسي شد. در آزمون‌هاي مربوط به مکانیسم‌هاي بیوکنترلي در مورد جدایه‌هاي اندوفیت جداسازي شده، نمونه EMJ45 بهترین فعالیت و عملکرد را نشان داد، به طوري که در همه آزمون‌ها فعالیت بالایي در مکانیسم‌ها نشان داد که گواه قابلیت‌هاي بالقوه این جدایه به عنوان اندوفیت است. آزمون‌هاي شناسایي مربوط به جدایه‌هاي بیماري‌زا این باکتري‌ها گرم منفي بودند و قابلیت تولید رنگدانه فلورسنت روي محیط Kings B را داشتند. تنها جدایه EMJ69 خط سفید را در مقابل باکتري *P. tolaasii* در کشت مقابل این باکتري در آزمون White line نشان داد (شکل۴، جدول ۲ و ۳).

شناسایي مولکولي و فراواني

ژن ۱۶S rRNA جدایه‌هاي بیماري‌زا و اندوفیت قارچ خوراکي تکثیر و توالي‌یابي شد. توالي‌هاي حدود ۱۳۰۰ نوکلئوتیدي حاصل در بانک داده NCBI ثبت شد (جدول ۵). آنالیز توالي جدایه‌هاي بیماري‌زا نشان داد که توالي ژن S ۱۶rRNA جدایه‌هاي EMJ5، EMJ9، EMJ17، EMJ20، EM20، 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 EMJ39 و EMJ22 با همساني ۹۹/۷۷ تا ۹۹/۸۵ درصدي با توالي همین 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 EMJ13، EMJ16، EMJ26، EMJ27 و EMJ29 به گونه جدیدي از جنس *Chryseobacterium* تعلق دارند (شکل ۵B). براي توصیف گونه باید ژنوم کامل آن توالي‌یابي شود یا آزمون هیبریداسیون 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 تیپ *E. americana* قرارگرفتند. 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).

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

آناليز توالي ژن 16S rRNA جدايه‌هاي اندوفيت نشان داد كه جدايه EMJ40 با ۹۹/۸۶ درصد همساني با توالي ژن متناظر در *Bacillus velezensis* NRRL B-41580^T در درخت فيلوژني در كنار اين گونه قرار گرفت (شكل ۵D). به علاوه، جدايه EMJ43 با همساني ۱۰۰ درصدي در توالي همين ژن با جدايه *Bacillus altitudinis* 41KF2b^T در يک گروه قرار گرفتند. جدايه EMJ45 با همساني ۹۹/۷۹ درصدي در ژن 16S rRNA با جدايه *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169^T در يک گروه قرار گرفتند (شكل ۵D).

جدول ۲- توليد متابوليت هاي مؤثر در مكانيسم هاي بازدارندگي جدايه‌هاي اندوفيت در شرايط آزمايشگاه

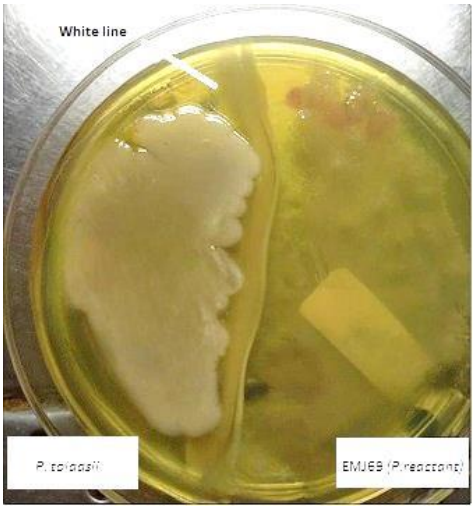
Table 2- Production of effective metabolites in the inhibition mechanisms of endophyte isolates in laboratory conditions

Code	Species	Chitinase production	Cellulase production	Lecitinase production	Lipase production	Protease production	Phytase production	Auxin production	Siderophore production
EMJ45	*Bacillus wiedmannii*	+	+	+	+	+	+	+	+
EMJ52	*Kokuria rhizophila*	-	-	+	+	+	+	+	+
EMJ40	*Bacillus velezensis*	-	-	-	+	_	+	-	-
EMJ43	*Bacillus altitudinis*	-	-	+	+	+	ND	+	+

جدول ۳- نتايج مربوط به آزمون‌هاي بيوشيميايي و بيماري‌زايي جدايه‌هاي منتخب بيماري‌زا و اندوفيت

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	+	+	+



شکل ۴- کشت مقابل جدایه EMJ69 (*Pseudomonas reactant*) در مقابل باکتري *Pseudomonas tolaasii* روي 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 باکتري‌هاي بیمارگر و مفید قارچ خوراکي (*Agaricus bisporus*)

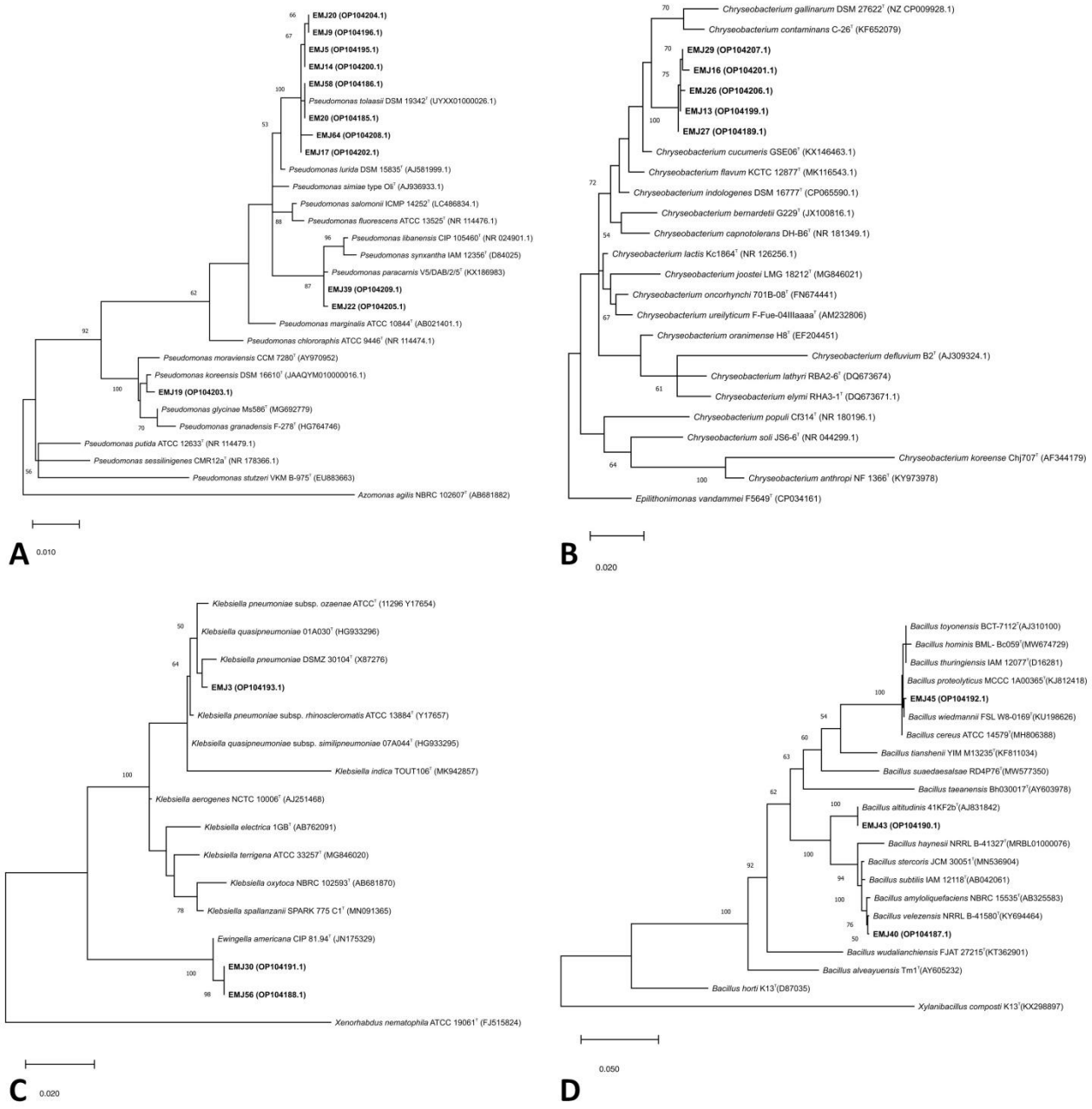
Table 4. Pathogenic and beneficial bacteria genera in edible mushroom (*Agaricus bisporus*)

باکتري‌هاي بیمارگر	*Pseudomonas tolaasii* *Pseudomonas paracarnis*
باکتري‌هاي غیربیمارگر درون‌زي	*Pseudomonas koreensis* *Chryseobacterium sp.* *Klebsiella pneumoniae* *Ewingella americana*
	Bacillus velezensis *Bacillus altitudinis* *Bacillus wiedmannii* *Kocuria rhizophila*

جدول ۵- شماره دسترسي توالي‌هاي 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
Pseudomonas tolaasii	EMJ5	OP104195
	EMJ9	OP104196
	EMJ14	OP104200
	EMJ17	OP104202
	EMJ20	OP104204
	EMJ64	OP104208
	EM20	OP104185
	EMJ58	OP104186
Pseudomonas paracarnis	EMJ22	OP104205
	EMJ39	OP104209
Pseudomonas koreensis	EMJ19	OP104203
***Chryseobacterium* sp.**	EMJ13	OP104199
	EMJ16	OP104201
	EMJ26	OP104206
	EMJ29	OP104207
	EMJ27	OP104189
Bacillus velezensis	EMJ40	OP104187
Bacillus altitudinis	EMJ43	OP104190
Bacillus wiedmannii	EMJ45	OP104192
Ewingella americana	EMJ30	OP104191
	EMJ56	OP104188
Klebsiella pneumoniae	EMJ3	OP104193
Kocuria rhizophila	EMJ52	OP104184



شکل ۵. درخت فیلوژنی مربوط به مقایسه توالی ژن ۱٦S rRNAجدایه‌های 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 siteبر 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 HasegawaKishino-Yano (HKY+ G+ I) based on the lowest Bayesian information criterion (BIC) score. Bootstrap values calculated for 1,000 replications are indicated.

بحث

هدف از انجام این پژوهش شناسایي عوامل بیماري‌زاي باکتریایي بیماري لکه قهوه‌اي قارچ خوراکي بود. در این تحقیق، نمونه‌برداري از شرکت راژفدک مهرشهر (مهرشهر کرج) انجام شد. علائم بیماري در قارچ خوراکي به صورت متفاوت در رنگ، شدت علائم از فرورفته تا سطحي و مکان و وسعت لکه‌ها مشاهده شدند که با علائم گزارش شده از پژوهش‌هاي پیشین مطابقت داشت (Navarro et al., 2018). نتایج استخراج پروتئین جدایه‌هایي که از قارچ سالم و بدون آلودگي جداشده بودند، روي ژل اکریل آمید نشان داد که اندوفیت‌هاي جداسازي شده از قارچ خوراکي سالم در چهار گروه پروتئیني با توجه به تفاوت در الگوي باندي قرار مي‌گیرند و از هر گروه یک نماینده براي آزمون‌هاي شناسایي و بیوکنترلي انتخاب شد. همچنین از بین جدایه‌ها ۲۳ باکتري بیماري‌زا بر اساس آزمون بیماري‌زایي روي قارچ خوراکي انتخاب و مورد آزمون‌هاي بیوشیمیایي و شناسایي مولکولي قرارگرفتند. براي جدایه‌هاي بیماري‌زا و اندوفیت آزمون‌هاي بیوشیمیایي و مولکولي شامل تست گرم، کاتالاز، اکسیداز، تولید رنگدانه فلورسنت، آزمون وایت لاین و سیترات انجام شد. نتایج نشان داد که جدایه‌هاي بیماري‌زا عامل ایجاد لکه قهوه‌اي روي قارچ خوراکي شامل جنس‌هاي *Pseudomonas*، *Ewingella*، *Chryseobacterium*، *Klebsiella* هستند که بیشترین فراواني در بین گونه‌هاي سودوموناس براي ایجاد لکه روي قارچ خوراکي بود. باکتري *Pseudomonas tolaasii* به عنوان عامل بیماري لکه قهوه‌اي در قارچ خوراکي شناخته مي‌شود، سایر گونه‌هاي سودوموناس از جمله *P. reactans* نیز هر چند به روشي متفاوت علائم بیماري را ایجاد مي‌کنند (Coraiola et al., 2006). این گونه‌هاي سودوموناس باعث ایجاد لکه‌هاي قهوه‌اي و فساد قارچ تازه مي‌شوند (Pourbagher et al., 2023). گونه‌هاي دیگر سودوموناس شناسایي شده در این تحقیق شامل *Pseudomonas koreensis* و *Pseudomonas libanensis* به عنوان سودوموناس‌هاي محرک رشد PGPR در گیاهان معرفي شده‌اند (Ma et al., 2019; Kwon et al., 2003; Macleod et al., 2015). این گونه‌ها براي اولین بار به عنوان یک عامل بیماري‌زا روي قارچ خوراکي براي بیماري لکه قهوه‌اي معرفي مي‌شوند که اثر منفرد این باکتري‌ها در ایجاد بیماري لکه قهوه‌اي روي قارچ خوراکي یا اثر سینرژیستي آن با سایر عوامل باکتریایي به ویژه گونه‌هاي سودوموناس براي ایجاد بیماري روي قارچ خوراکي مستلزم تحقیقات بیشتر در آینده است. گونه *Ewingella americana* به عنوان عامل نکروز داخلي پایه کلاهک در قارچ خوراکي معرفي شده است و همچنین در انسان توانایي ایجاد بیماري دارد (Hassan et al., 2012; Inglis et al., 1996). جدایه‌هاي *E. americana* از نظر تهاجمي در کلاهک‌ها و نوک‌هاي قارچ متفاوت اند، به طوري که علائم مربوط به این باکتري از زرد تیره تا قهوه‌اي تیره روي کلاهک و پایه کلاهک قارچ خوراکي متغیر است و به عنوان یکي از عوامل بیماري‌زا روي قارچ خوراکي از ایران نیز گزارش شده است (Hamidizade et al., 2023). این اولین گزارش از آلودگي بستر کشت قارچ خوراکي به این باکتري در استان البرز است.

گونه هاي *Chryseobacterium* که در طبیعت دوشاخه هستند، عمدتاً در خاک و آب یافت مي‌شوند. مطالعات زیست‌محیطي نشان داده‌اند که این موجودات مي‌توانند در منابع آب شهري تصفیه‌شده با کلر زنده بمانند، اغلب حوضچه‌ها و شیرهاي آب را استعمار کرده و مخازن بالقوه براي عفونت‌ها در محیط‌هاي بیمارستاني ایجاد مي‌کنند. در سایر محیط‌هاي بالیني، کرایزوباکتري‌ها به عنوان عوامل ایجاد کننده مننژیت، باکتریمي، پنومواني، اندوکاردیت، عفونت‌هاي پوست و بافت نرم، عفونت‌هاي چشمي و سایر عفونت‌ها توصیف شده اند. در درجه اول بیمارگرهاي فرصت طلب، عمدتاً نوزادان و میزبان‌هاي نقص ایمني را از همه گروه‌هاي سني آلوده مي‌کنند (Hoque et al., 2001).

باکتري *Klebsiella pneumoniae* گرم منفي، غیر متحرک، تخمیر کننده لاکتوز، بي هوازي اختیاري، میله‌اي شکل است. اگرچه در فلور طبیعي دهان، پوست و روده یافت مي‌شود، اما در صورت تنفس مي‌تواند تغییرات مخربي در ریه‌هاي انسان و حیوانات ایجاد کند، به‌ویژه در آلوئول‌ها که منجر به ایجاد خلط ژله‌اي رنگي، قهوه‌اي یا زرد مي‌شود (Ryanetet al., 2004). در محیط بالیني، مهم‌ترین عضو از جنس *Klebsiella* از *Enterobacteriacae* است. گونه *K. oxytoca* و *K. rhinoscleromatis* نیز در نمونه‌هاي بالیني انساني شناسایي شده‌اند. در سال‌هاي اخیر، گونه هاي *Klebsiella* به بیمارگرهاي مهم در عفونت‌هاي بیمارستاني تبدیل شده اند. به طور طبیعي در خاک وجود دارند و حدود ۳۰ درصد سویه‌ها مي‌توانند نیتروژن را در شرایط بي‌هوازي تثبیت کنند (Rostgate, 1998). به عنوان یک دیازوتروف آزاد، سیستم تثبیت نیتروژن آن بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است، و مورد توجه کشاورزي است، زیرا *K. pneumoniae* نشان داده است که باعث افزایش عملکرد در محصولات کشاورزي مي‌شود (Riggs et al., 2001).

در این پژوهش جدایه‌هاي باکتریایي بیوکنترل به باکتري‌هاي *Kocuria rhizophila*، *Bacillus velezensis*، *Bacillus wiedmannii* و *Bacillus altitudinis* شناسایي شد. اعضاي جنس *Kocuria* از طیف گسترده اي از منابع طبیعي، از جمله پوست پستانداران، خاک، ریزوسفر، غذاهاي تخمیر شده، نمونه‌هاي بالیني، آب شیرین و رسوبات دریایي جدا شدند. با توجه به اندازه ژنوم نسبتاً کوچک آن در میان اکتینومیست‌ها، این بسیار شگفت‌انگیز است که نشان مي‌دهد هر گونه این باکتري با محیط اکولوژیکي مربوطه سازگار است (Kovács et al., 1999). همچنین این عامل یک باکتري فرصت طلب در بیماري‌هاي انساني است و ایجاد کننده

حالت سینرژیستي در بیماري‌هاي باکتریایي انسان را ایجاد مي‌کند (Becker et al., 2008). هنوز اطلاعات کاملي درباره ویژگي‌هاي بیوکنترلي این باکتري روي باکتري‌هاي بیماري‌زاي گیاهي وجود ندارد و مستلزم تحقیقات بیشتر روي ابعاد مختلف این باکتري و مکانیسم‌هاي آن است. گونه‌هاي باسیلوس گاهي اوقات فعالیت ضد میکروبي گسترده اي دارند که مي‌تواند شامل باکتري‌هاي گرم مثبت، باکتري‌هاي گرم منفي، مخمرها و سایر قارچ‌ها باشد، از این رو به عنوان عوامل زیستي مهم بیوکنترلي تحقیقات گسترده‌اي روي گونه‌هاي آن و مکانیسم‌هاي بیوکنترلي آن‌ها در گذشته صورت پذیرفته است (Abriouel et al., 2011). گونه *B. velezensis* اولین بار در سال ۲۰۰۵ توسط Ruiz-García و همکاران شناسایي شد. این باکتري به عنوان عامل آنتاگونیست فعال شناخته شده است که اثر ترکیبات ضدمیکروبي متنوع آن علیه بیمارگرهاي گیاهي به اثبات رسیده است (Rabbee et al. 2019). همچنین این باکتري محرک رشد گیاه است و همین طور بر اساس خواص آن، به عنوان یک پروبیوتیک در خوراک دام هم استفاده مي‌شود (Chen et al., 2018 & Chen et al., 2019). به طور کلي یافته‌هاي تحقیقاتي اخیر در مورد *B. velezensis* نشان داده اند که این باکتري قادر به تولید مواد ضد میکروبي، ترکیبات آلي فرار، القاي مقاومت به بیماري و ارتقا رشد و عملکرد گیاه است (Rabbee et al., 2023). در سال‌هاي اخیر، *B. velezensis* به عنوان یک عامل بالقوه کنترل زیستي در بسیاري از کشورها محبوبیت پیدا کرده است. توانایي‌هاي این باکتري در تولید متابولیت‌هاي ضد میکروبي، ترکیبات آلي فرار، القاي مقاومت به بیماري و تأثیر این باکتري بر رشد و عملکرد گیاه در تحقیقات گذشته دانشمندان بررسي شده است (Rabbee et al., 2023). گونه *Bacillus altitudinis* ابتدا از لوله‌هاي برودتي که براي جمع‌آوري نمونه‌هاي هوا از ارتفاعات استفاده مي‌شد، جدا شد و به همین دلیل نام آن به‌وجود آمد (Palanichamy et al., 2012). جدایه‌هاي این گونه داراي خواص آنتي باکتریال (Galaviz-Silva et al., 2018) و فعالیت ضد قارچي (Lu et al., 2017) هستند و به عنوان عوامل محافظت کننده زیستي (Budiharjo et al., 2017)، محرک‌هاي رشد گیاه (Kumaravel et al., 2018) و در نهایت براي کاربردهاي کنترل زیستي (Sunar et al., 2015) مورد استفاده قرار مي‌گیرند. باکتري *Bacillus wiedmannii* گرم مثبت تولیدکننده اسپور است که پروتئین هاي آفت کش متنوعي تولید مي‌کند (Lazarte et al., 2018).

تاثیر این باکتري‌هاي مفید جداسازي شده در این مطالعه بر کنترل بیماري لکه قهوه‌اي در قارچ خوراکي ناشناخته است، امید است در تحقیقات آینده اثر این باکتري‌هاي مفید بیوکنترل بر مهار این بیماري و باکتري‌هاي مولد بیماري روي قارچ خوراکي را مورد مطالعه قرار شود. در دهه‌هاي اخیر، روش‌هاي تکثیري بر مبناي PCR جهت شناسایي باکتري‌ها معرفي شده اند که هدف بیشتر آنها ژن 16S rRNA است که در بیشتر باکتري‌هاي واقعي، این ژن با تغییرات بسیار اندکي حفظ شده است و حاوي نواحي حفظشده‌اي بین باکتري‌هاي یک گونه است از این رو ما در این مطالعه از توالي ژن 16S rRNA که در ژنوم تمام باکتري‌ها و با حفظشدگي بالا موجود است و وجود تمام انواع باکتري‌ها را نشان مي‌دهد، استفاده شد تا بتواند بطور کلي باکتري‌هاي عامل لکه قهوه‌اي در قارچ خوراکي را افتراق دهد. همچنین این ژن به عنوان استانداردي براي تاکسونومي و شناسایي باکتري‌ها استفاده مي‌شود. این قسمت ژنومي سریع‌تر و ساده‌تر توالي‌یابي مي‌شود و حاوي اطلاعات ژنتیکي کافي براي شناسایي پروکاریوت‌ها مي‌باشد (Saravoltaz et al., 2003; Jaton, 1992).

سپاسگزاري

نویسندگان بر خود لازم مي‌دانند مراتب تشکر صمیمانه خود را از شرکت راژفدک مهرشهر که ما را در انجام و ارتقاي کیفي این پژوهش (به لحاظ مالي و معنوي) یاري 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 hormons and ACC deaminase production ability by Iranian soil rhizobial strains and the effect of superior strains applications on plant growth characteristics. Iranian Journal of Agricultural sciences (Journal of Agriculture), 38 (4): 693-703. (In 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.

BUDIHARJO, 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., & UYTTENDAELE, 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. my cology. 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/PHYTO-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 Màrialigeti, 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 costantinii* 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, KAEPPLER 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., RAKOTONDRASOA, 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 amony bacterial causing blotch disease on the commercial Mushroom *Agaricus bisporus*. MSc Thesis. Brook 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 1331altitudinis 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.