

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

۱، ۳، ۴- دانشجوی دکتری، دانشیار، استادیار، گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشکده فناوری کشاورزی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران؛ ۲- مدیر بخش تحقیق و توسعه شرکت راژفادک مهرشهر، کرج، البرز، ایران ۵- استاد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشکده‌گان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، ایران
(تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۴۰۳؛ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۳)

چکیده

قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) با ارزش غذایی بالا و خواص دارویی جایگاه ویژه‌ای در سبد غذایی مردم جهان دارد. برای بررسی عوامل باکتریایی بیماری لکه‌قهوه‌ای قارچ خوراکی در استان البرز از قارچ‌های دارای علائم بیماری و برای جداسازی عوامل باکتریایی بیوکترول علیه بیماری لکه‌قهوه‌ای از قارچ‌های سالم نمونه‌برداری شد. از نمونه‌های آلوده ۶۱ جدایه باکتریایی به دست آمد که ۱۹ جدایه بیماری‌زا بود و سبب ایجاد لکه‌های بزرگ و فرورفته و لکه‌های قهوه‌ای در سطح کلاهک و پایه قارچ خوراکی شدند. از قارچ‌های سالم ۹ جدایه غیربیماری‌زا جدا شد و جهت ارزیابی توان بازدارندگی جدایه‌ها، تولید هورمون اکسین، سیدروفور و آنزیم‌های فیتاز، پروتاز، لیپاز، لسیتیناز، سلولاز و کیتیناز چهار جدایه درون‌زی بررسی شد. شناسایی جدایه‌های بیماری‌زا و درون‌زی با آزمون‌های بیوشیمیایی و مولکولی انجام شد. بر اساس ترادف توالی 16S rDNA باکتری‌های بیمارگر در جنس‌های *Pseudomonas*، *Chryseobacterium*، *Ewingella*، *Brucella* و *Klebsiella* و باکتری‌های درون‌زی گونه‌های *Bacillus velezensis*، *Kocuria rhizophila*، *Bacillus wiedmannii*، *Bacillus altitudinis* بودند.

واژه‌های کلیدی: قارچ خوراکی، لکه قهوه‌ای، *Pseudomonas tolaasii*Molecular analysis of the bacterial microflora associated with and endofungal of *Agaricus bisporus*E. MOUSAVI JAFARIPOUR¹, M. DOUSTI², R. SADEGHI³, N. FALAH CHARKHABI⁴, M. AHMADZADEH⁵

1, 3, 4. Ph.D. Student, M.Sc. Graduate, Associate Professor, Assistant Professor, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Agriculture, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran; 2. Research and Development Manager, Razh fadak Company, Mehrshahr, Karaj, Alborz, Iran. 5. Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran

Abstract

White button mushroom (*Agaricus bisporus*) has a special place in the food basket worldwide because of its high nutritional value and medicinal properties. To identify bacterial species associated with brown spot disease of edible mushrooms symptomatic samples were collected from Alborz province farms. Moreover, healthy mushrooms were sampled to isolate biocontrol bacterial agents. Sixty-one bacterial isolates were isolated from symptomatic samples among which 19 isolates induced wide, watery and sunken spots on the surface of the cap and necrosis of the middle part and the base of edible mushroom. Nine non-pathogenic isolates were isolated from healthy mushrooms among which four isolated were selected for auxin hormone, siderophore and production of phytase, protease, lipase, lecithinase, cellulase and chitinase enzymes production assays. Biochemical and molecular tests were performed to identify pathogenic and endofungal bacteria. Based on the 16S rDNA sequence analysis isolates were classified into the pathogenic genera including *Pseudomonas*, *Chryseobacterium*, *Ewingella*, *Brucella* and *Klebsiella* and endofungal species including *Bacillus velezensis*, *Kocuria rhizophila*, *Bacillus wiedmannii*.

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

✉ falahicharkhabi@ut.ac.ir

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 بازارپسندی 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 می‌تواند از یک کشت به کشت دیگر گسترش و انتشار پیدا کند (Navarro et al., 2018 & Sivanesan, 2003). در ابتدا عامل اصلی این بیماری باکتری *Pseudomonas tolaasii* معرفی شد (Palleroni, 1993 & Tolass, 1915 & Pain, 1919) اما با مطالعات بیشتر، گونه‌های دیگری از جنس *Pseudomonas* یا جنس‌های دیگری از باکتری‌ها عامل این بیماری معرفی شدند. از جمله این باکتری‌ها می‌توان به *P. costantini*، *P. agarici* و *P. reactans* (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 (Hamidizadeh 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 لوپ سترون در محیط کشت کینگز بی (King's B) کشت شد. تشنگ‌های پتری سه روز در دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس تک پرگنه‌ها 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 جمع‌آوری 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

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 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 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 به‌وسیله پارافیلیم 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 به‌عنوان 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، 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 بی هوازی به روش Hugh و Leifson (۱۹۵۳) و آزمون سیترات بر اساس روش Harly (۲۰۰۵) انجام پذیرفت. آزمون اکسیداز با قرار دادن گستره‌ای 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

روی محیط کشت آگار مغذی (NA) (Nutrient agar) قرار داده شدند. در روشی دیگر یک گرم از قارچ در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد و روی شیکر به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت (Hamidizadeh et al., 2020). سپس غلظت‌های مختلف به‌روش سری رقت تهیه شد و تا به دست آوردن رقت 10^{-5} ادامه یافت. سپس با استفاده از پیت پاستور یک قطره از سوسپانسیون با رقت‌های 10^{-6} و 10^{-5} روی محیط کشت NA به‌طور جداگانه ریخته شد و با لوپ سترون به‌صورت 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 پرگنه‌ها 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 پلی‌اکریل 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 متراکم کننده بالایی با غلظت پنج درصد اکریل آمید تهیه شد. داخل تانک به اندازه کافی بافر ریخته شد. به‌نحوی 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 ۴۰-۳۰ دور در دقیقه رنگ‌آمیزی شد. سپس ژل از محلول رنگ خارج و در

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 تبارنمای 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 (به‌طوری که ۲۰ درصد کلاهک یا اندام کلی قارچ را فرا گرفته باشد) روی قارچ سفید دکمه‌ای از خط تولید شرکت راژفدک 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) نکروزه بخش میانی و پایه کلاهک قارچ، (E و F) لکه‌های ریز قهوه‌ای رنگ روی کلاهک قارچ

Fig. 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

آغازگرهای 10F (-5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCAG-3') و 1507R (3'-5'-TACCTTGTTACGACTTCACCCAG-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 2x Master mix RED (Ampliqon, Denmark) 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 یک میلی گرم در لیتر قرار گرفت (Sigmon & Larcom, 1996). عکس‌برداری در دستگاه Gel document (Uvitec/DM 500) انجام شد.

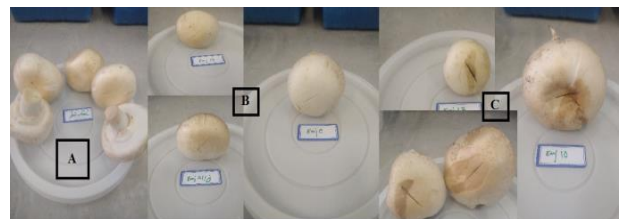
توالی‌یابی توسط شرکت پیشگام (تهران، ایران) انجام شد. بعد از دریافت فایل قطعات DNA تعیین توالی شده، کروماتوگرام مربوط به توالی‌ها با استفاده از نرم افزار Pro Chromas نسخه ۱.۷.۶ و نرم افزار Editseq نسخه ۵.۰۱ مشاهده و با استفاده از نرم افزار Bioedit v7.0.5.3 ویرایش و در بانک ژن BLAST شدند (Altschul et al., 1997). توالی حاصل با برنامه BLAST در پایگاه Basic Local Alignment Search Tool اطلاعاتی NCBI با سایر جدایه‌های ثبت شده مقایسه و بررسی شد. برای ارزیابی توالی‌های نوکلئوتیدی متعلق به جدایه‌های مورد بررسی و ترسیم تبارنمای تبارزایی

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 بی‌رنگ 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

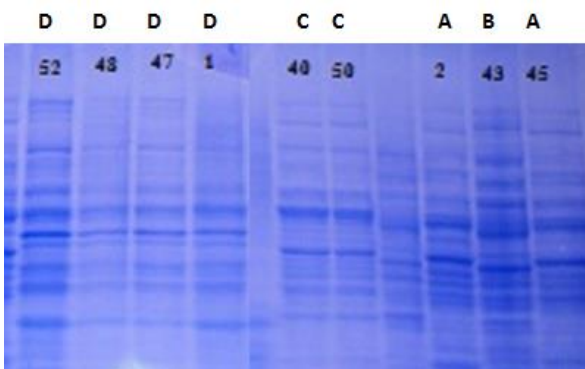
از ۶۱ جدایه به دست آمده از نمونه‌های قارچ خوراکی دارای علائم لکه قهوه‌ای، ۱۹ جدایه روی قارچ خوراکی بیماری‌زا بودند که برای انجام آزمون‌های بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. علائم روی قارچ‌های تلقیح شده با باکتری‌های بیماری‌زا به صورت لکه‌های قهوه‌ای تا سیاه و در برخی موارد به صورت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



شکل ۲- آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های باکتری بیماری‌زا روی قارچ خوراکی، (A) شاهد (آب مقطر سترون)، (B) باکتری‌های بدون علائم و (C) باکتری‌های بیماری‌زا مثبت دارای علائم بیماری در محل مایه‌زنی
Fig. 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 باکتری جدا شده از کلاهک و ساقه قارچ‌های خوراکی سالم، پروتئین محلول سلولی استخراج و مقایسه شد. نتایج نشان داد که جدایه‌ها از نظر الگوی پروتئین‌های محلول در چهار گروه قرار گرفتند. چهار جدایه از بین ۹ جدایه بر اساس تفاوت الگوی باندی پروتئینی در آزمون استخراج پروتئین انتخاب شدند. گروه‌بندی بر اساس قرارگیری باندهای پروتئینی در ژل اکریلامید به ترتیب گروه و جدایه‌های 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 برای انجام آزمون‌های بیوشیمیایی مربوط به توانایی تولید متابولیت‌های مربوط به مکانیسم‌های بازدارندگی و شناسایی مولکولی انتخاب شدند. نتایج الگوی پروتئین‌های محلول سلولی جدایه‌های باکتریایی جدا شده از کلاهک و ساقه قارچ‌های خوراکی آلوده در ژل پلی اکریل آمید در جدول ۱ و نمونه‌ای از ژل اکریل آمید این آزمون در شکل ۳ نمایش داده شده است. در گام بعدی تولید متابولیت‌های مؤثر در مکانیسم‌های بازدارندگی این چهار جدایه در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۳- الگوی پروتئین‌های محلول باکتری‌های جداسازی شده از قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*) پس از الکتروفورز در ژل اکریل آمید و رنگ‌آمیزی با استفاده از کوماسی بلو

Fig. 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- گروه‌بندی باکتری‌های جدا شده از قارچ خوراکی *Agaricus bisporus* بر اساس الگوی باندهای پروتئین‌های محلول سلولی
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

ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

مطالعات فنوتیپی روی ۱۹ جدایه بیماری‌زا و چهار جدایه منتخب (EMJ40، EMJ43، EMJ45 و EMJ52) از باکتری‌های اندوفیت (بر اساس الگوی باندهای پروتئین‌های محلول) بررسی شد. در آزمون‌های مربوط به مکانیسم‌های بیوکنترلی در مورد جدایه‌های اندوفیت جداسازی شده، نمونه EMJ45 بهترین فعالیت و عملکرد را نشان داد، به طوری که در همه آزمون‌ها فعالیت بالایی در مکانیسم‌ها نشان داد که گواه قابلیت‌های بالقوه این جدایه به عنوان اندوفیت است. آزمون‌های شناسایی مربوط به جدایه‌های بیماری‌زا این باکتری‌ها گرم منفی بودند و قابلیت تولید 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).

شناسایی مولکولی و فراوانی

ژن rRNA ۱۶S جدایه‌های بیماری‌زا و اندوفیت قارچ خوراکی تکثیر و توالی‌یابی شد. توالی‌های حدود ۱۳۰۰ نوکلئوتیدی حاصل در بانک داده NCBI ثبت شد (جدول ۵). آنالیز توالی جدایه‌های بیماری‌زا نشان داد که توالی ژن rRNA ۱۶S جدایه‌های EMJ5، EMJ9، EMJ17، EMJ20، EM20، EMJ58 و EMJ64 با توالی متناظر در جدایه *Pseudomonas tolaasii* DSM 19342^T ۷۰-۹۹/۱۰۰ درصد همسانی دارد. به علاوه توالی ژن rRNA ۱۶S جدایه‌های

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

توالی ژن rRNA ۱۶S جدایه‌های EMJ30 و EMJ56 با توالی متناظر در جدایه *Ewingella americana* CIP 81.94^T ۹۹/۷۹ درصد همسانی داشت و این جدایه‌ها در درخت فیلوژنی در کنار جدایه تیپ *E. americana* قرار گرفتند. به علاوه، توالی این ژن در جدایه EMJ3 با ۹۹/۷۹ درصد همسانی با توالی متناظر در جدایه *Klebsiella pneumoniae* DSMZ 30104^T در درخت فیلوژنی در کنار این جدایه قرار گرفت (شکل ۵C). به علاوه، توالی ژن rRNA ۱۶S جدایه EMJ52 با جدایه *Kocuria rhizophila* TA68^T (Y16264) ۹۹/۷۹ درصد شباهت دارد.

آنالیز توالی ژن rRNA 16S جدایه‌های اندوفیت نشان داد که جدایه EMJ40 با ۹۹/۸۶ درصد همسانی با توالی ژن متناظر در *Bacillus velezensis* NRRL B-41580^T 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 rRNA 16S با جدایه *Bacillus wiedmannii* FSL W8-0169^T در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۵D).

جدول ۲- تولید متابولیت های مؤثر در مکانیسم های بازدارندگی جدایه های 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	Lectinase production	Lipase production	Protease production	Phytase production	Auxin production	Siderophore production
EMJ45	<i>Bacillus wiedmannii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
EMJ52	<i>Kokuria rhizophila</i>	-	-	+	+	+	+	+	+
EMJ40	<i>Bacillus velezensis</i>	-	-	-	+	-	+	-	-
EMJ43	<i>Bacillus altitudinis</i>	-	-	+	+	+	ND	+	+

جدول ۳- آزمون های بیوشیمیایی و بیماری زایی جدایه های منتخب بیماری زا و اندوفیت

Table 3. 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	+	+	+

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>	
<i>Pseudomonas paracarnis</i>	
<i>Pseudomonas koreensis</i>	Pathogenic bacteria
<i>Chryseobacterium sp.</i>	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
<i>Ewingella americana</i>	
<i>Bacillus velezensis</i>	
<i>Bacillus altitudinis</i>	Endofungal bacteria
<i>Bacillus wiedmannii</i>	
<i>Kocuria rhizophila</i>	



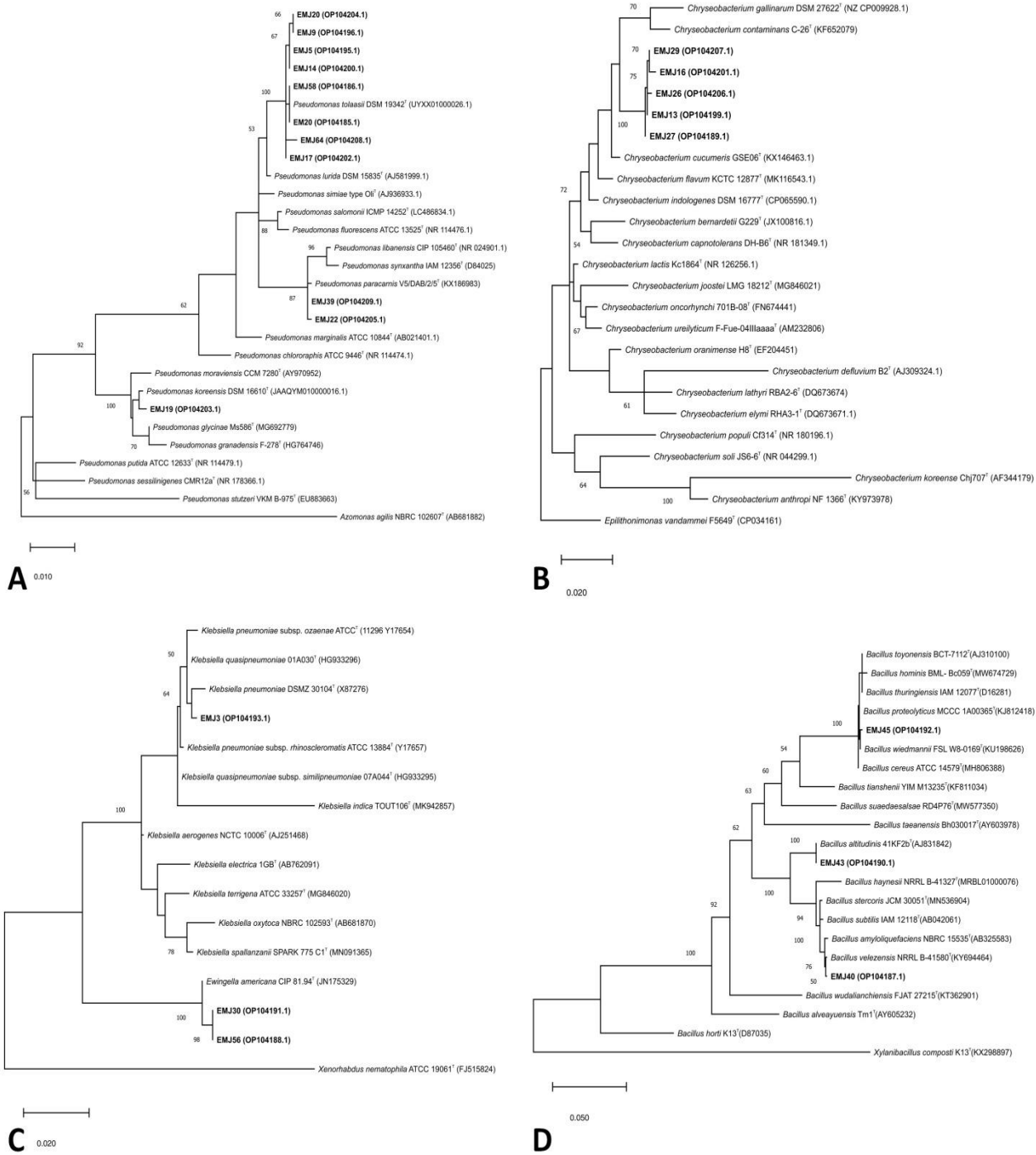
شکل ۴- کشت متقابل جدایه EMJ69 (*Pseudomonas reactans*) در مقابل باکتری

Pseudomonas tolaasii روی محیط کشت King's B در آزمون white line
Fig. 4. Cultivation against isolate EMJ69 (*Pseudomonas reactans*) against *Pseudomonas tolaasii* bacteria on King's B culture medium in test white line

جدول ۵- شماره دسترسی توالی‌های ژن 16S rRNA ثبت شده 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
	EMJ58	OP104186
	EMJ22	OP104205
<i>Pseudomonas paracarnis</i>	EMJ39	OP104209
	EMJ19	OP104203
<i>Pseudomonas koreensis</i>	EMJ13	OP104199
	EMJ16	OP104201
	EMJ26	OP104206
<i>Chryseobacterium sp.</i>	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 ۵- درخت فیلوژنی مربوط به مقایسه توالی ژن rRNA 16S 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 و gamma distribution invariant site بر اساس کمترین مقدار Bayesian information criterion (BIC). مقادیر بوت استرپ با ۱۰۰۰ تکرار در درخت آمده است.

Fig. 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.

بحث

هدف از انجام این پژوهش شناسایی عوامل بیماری‌زای باکتریایی بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی بود. در این تحقیق، نمونه‌برداری از شرکت راژفدک مهرشهر (مهرشهر کرج) 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 امید نشان داد که اندوفیت‌های جداسازی شده از قارچ خوراکی سالم در چهار گروه پروتئینی با توجه به تفاوت در الگوی باندی قرار می‌گیرند و از هر گروه یک نماینده برای آزمون‌های شناسایی و بیوکنتری 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 سترات انجام شد. نتایج نشان داد که جدایه‌های بیماری‌زا عامل ایجاد لکه قهوه‌ای روی قارچ خوراکی شامل جنس‌های *Pseudomonas*، *Klebsiella*، *Chryseobacterium*، *Ewingella* فراوانی در بین گونه‌های سودوموناس برای ایجاد لکه روی قارچ خوراکی بود. باکتری *Pseudomonas tolaasii* به‌عنوان عامل بیماری لکه قهوه‌ای در قارچ خوراکی شناخته می‌شود، سایر گونه‌های سودوموناس از جمله *P. reactans* نیز هر چند به‌روشی 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 libanensis* و *Pseudomonas korensis*

به‌عنوان 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 به‌عنوان 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 به‌ویژه گونه‌های سودوموناس برای ایجاد بیماری روی قارچ خوراکی مستلزم تحقیقات بیشتر در آینده است. گونه *Ewingella americana* به‌عنوان عامل نکروز داخلی پایه کلاهک 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 کلاهک‌ها و نوک‌های قارچ متفاوت اند، به‌طوری که علائم مربوط به این باکتری از زرد تیره تا قهوه‌ای تیره روی کلاهک و پایه کلاهک قارچ خوراکی متغیر است و به‌عنوان 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 آلوده کرده و معادن بالقوه برای عفونت‌ها در محیط‌های بیمارستانی ایجاد می‌کنند. در سایر محیط‌های بالینی، کرایزوباکتری‌ها به‌عنوان عوامل ایجاد کننده مننژیت، باکتری، 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).

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 به‌عنوان 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 به‌عنوان 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 همین طور بر اساس خواص آن، به‌عنوان یک پروبیوتیک در خوراک دام هم استفاده می‌شود (Chen *et al.*, 2018 & Chen *et al.*, 2019). به‌طور کلی یافته‌های تحقیقاتی اخیر در مورد *B. velezensis* نشان داده‌اند 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* به‌عنوان 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 *B. altitudinis* ابتدا از لوله‌های برودتی که برای جمع‌آوری نمونه‌های هوا از ارتفاعات استفاده می‌شد، جدا شد و به‌همین دلیل نام آن به‌وجود آمد (Palanichamy *et al.*, 2012). جدایه‌های این گونه دارای خواص آنتی باکتریال (Galaviz-Silva *et al.*, 2018) و فعالیت ضد قارچی (Lu *et al.*, 2017) هستند و به‌عنوان 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

باکتری *Klebsiella pneumoniae* گرم منفی، غیر متحرک، تخمیر کننده لاکتوز، بی هوازی 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 کیسه‌های هوایی (alveolus) که منجر به ایجاد خلط زله‌ای رنگی، قهوه‌ای یا زرد می‌شود (Ryanet *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.

به‌طور طبیعی در خاک وجود دارند و حدود ۳۰ درصد سویه‌ها می‌توانند نیتروژن را در شرایط بی‌هوازی تثبیت کنند (Rostgate, 1998). به‌عنوان یک دیازوتروف (Diazotroph) آزاد، سیستم تثبیت نیتروژن 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 velezensis*، *Bacillus altitudinis* و *Bacillus wiedmannii* 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 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

که در ژنوم تمام باکتری‌ها و با حفظ‌شدگی بالا موجود است و وجود تمام انواع باکتری‌ها را نشان می‌دهد، استفاده شد تا بتواند به‌طور کلی باکتری‌های عامل لکه قهوه‌ای در قارچ خوراکی را از هم تفکیک کند. همچنین این ژن به‌عنوان 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; Jatou, 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 (به‌لحاظ 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 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.
- 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 تکثیری بر مبنای PCR جهت شناسایی باکتری‌ها معرفی شده‌اند 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

- 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., & 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. 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 Microbiology Letters* 365. doi: 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. doi: 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. doi: 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 Disease.* 140:1445-1454. doi: 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. *Journal of Hospital. 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%2FFMYCO.2009.37.1.062
- JATON K. 1992. Development of polymerase chain reaction assay for detection of listeria monocytogenese in clinical cerebrospinal fluid samples. *Journal of Clinical Microbiology* 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 Märialigeti, 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. doi: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/ij.s.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 *Rhizoglyphus 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. *International Journal of Systematic and Evolutionary* 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 Disease*;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., RAKOTONDROSOA, 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/fmicb.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. *Clinical Infectious Diseases*; 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 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.