

## شناسایی و بررسی برخی فاکتورهای بیماریزایی جدایه‌های *Pseudomonas tolaasii*

جدا شده از قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید در ایران

مهدی اخلاقی<sup>۱</sup>، سعید طریقی<sup>۲\*</sup>، محمد فارسی<sup>۳</sup> و پریسا طاهری<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۸/۱۰)

### چکیده

بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) در سال‌های اخیر به عنوان یک بیماری شایع در سالن‌های پرورش قارچ ایران، ایجاد مشکل نموده است. علائم بیماری به صورت، لکه‌های کوچک قهوه‌ای، سوختگی قهوه‌ای و کلاهک‌های پوسیده که حالت لزج و چسبناکی دارند مشاهده می‌شود. باکتری *Pseudomonas tolaasii* به عنوان عامل اصلی ایجاد لکه قهوه‌ای مطرح می‌باشد. اما در منابع همیشه بیش از یک میکروارگانیسم به عنوان عامل لکه قهوه‌ای در نظر گرفته می‌شود. نمونه برداری از کلاهک قارچ‌های دارای علائم مشکوک از استان‌های البرز، خراسان رضوی، تهران، سمنان و قزوین در سال ۱۳۹۰ صورت پذیرفت. آزمونهای مختلف بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی، تغذیه‌ای و تکثیر ناحیه یک کیلو بازی از ۱۶S rDNA با استفاده از آغازگرهای رفت و برگشت (Ps-F, Ps-R) مشخص نمود که جدایه متعلق به جنس *Pseudomonas* و گونه *Pseudomonas tolaasii* هستند. آزمون اثبات بیماریزایی جدایه‌ها بر روی کلاهک قارچ تکمه‌ای درجات مختلفی از شدت بیماریزایی را در بین جدایه‌ها نشان داد. با بررسی برخی از فاکتورهای بیماریزایی مشخص گردید، جدایه‌هایی که بیشترین توان بیماریزایی را دارند از قدرت تولید سیدروفور پایووردین بالاتری برخوردار می‌باشند. در هیچ یک از جدایه‌ها، ارتباط مستقیمی بین تولید سایر فاکتورهای بیماریزایی باکتری‌ها از جمله تولید بیوفیلیم، تولید تولاسین، تحرک و تولید سیگنال *Pseudomonas quinolone signal* (PQS) مشاهده نشد. نتایج این تحقیق نشان داد که در باکتری *Pseudomonas tolaasii*، همانند اغلب سودوموناس‌ها، PQS وجود دارد اما نقش واقعی آن مشخص نیست.

کلیدواژه: سودوموناس، قارچ خوراکی، PQS، ایران

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: starighi@um.ac.ir

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.
۳. استاد گروه بیوتکنولوژی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

## Identification and investigation of some virulence factors of *Pseudomonas tolaasii* isolated from mushroom in Iran

M. Akhlaghi<sup>1\*</sup>, S. Tarighi<sup>1\*\*</sup>, M. Farsi<sup>2</sup>, and P. Taheri<sup>1</sup>

(Received: 23.1.2013; Accepted: 1.11.2015)

### Abstract

In recent years brown blotch of cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) has been observed as a prevalent disease in Iran. The disease symptoms of the cultivated agaric include brown blotch, brown pit spots, rotting, weeping and drippy gill. *Pseudomonas tolaasii* has been cited as the causal agent of bacterial blotch, but much controversy exists regarding the involvement of this bacterium alone or blotch may be caused by more than one organism. In 2011, the diseased samples of mushroom were collected from Khorasan Razavi, Alborz, Tehran, Semnan, Ghazvin and Golestan provinces. Strains which were pathogenic on the cap of mushroom (pileus) were selected for further analysis. Biochemical, physiological and nutritional tests together with amplification of 1Kb region of 16S rDNA using Ps forward and reverse primers showed that all strains belong to *Pseudomonas tolaasii*. The isolated strains displayed different degrees of pathogenicity on mushroom. The presence of different virulence factors were evaluated among the strains. The results indicated that those strains which showed enhanced pyoverdinin production had higher pathogenicity on agaric caps. There was no correlation between the existence of other virulence factors such as biofilm formation, motility, or PQS production and pathogenicity. Our results indicated that in *P. tolaasii* similar to other Pseudomonads, PQS exists but the actual role of this signal is not so clear. PQS dependent quorum sensing in *P. tolaasii* could not affect pathogenicity of this bacterium, thus most of the virulence determinants in this bacterium should be PQS independent.

**Keywords:** *Pseudomonas*, *Agaricus bisporus*, PQS, Iran

\* Part of M.Sc. Thesis of The First Author Submitted to Faculty of Agriculture.

\*\* Corresponding author's E-mail: starighi@um.ac.ir

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

2. Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

## مقدمه

فاکتورهای زیادی برای ایجاد بیماری در میزبان خود استفاده می‌کند. تولید سیدروفورها، بیوفیلیم، پلی ساکاریدهای خارج سلولی و توکسین‌ها و توانایی تحرک در باکتری‌ها نمونه‌هایی از ویژگی‌های مهم در بیماری‌زایی می‌باشند. در اکثر موارد تولید این فاکتورهای بیماری‌زایی تحت تاثیر پدیده‌ای به نام سنجش جمعیت (احساس حد نصاب) یا Quorum sensing (QS) اتفاق می‌افتد (Tarighi & Taheri 2011). دو گروه از سیگنال‌ها در این پدیده نقش اساسی ایفا می‌کنند. گروه اول هموسرین لاکتون‌ها (Homoserine lactone) (HSL) می‌باشند که در باکتری‌های گرم منفی از جمله سودوموناس‌ها وجود دارند. این گروه تعداد زیادی از فاکتورهای بیماری‌زایی را در سودوموناس‌ها از جمله تولید بیوفیلیم، تولید پلی ساکاریدهای خارج سلولی، تحرک و تولید آلجینات کنترل می‌کنند. وجود این پدیده در *P. aeruginosa* و *P. syringae* به اثبات رسیده است (Eberal 1999, Fuqua et al. 2001, Quiñones et al. 2005). در سودوموناس‌ها، به خصوص *P. aeruginosa*، سیگنال دیگری به نام Quinolone signal یا PQS وجود دارد. این سیگنال با کنترل بیان ژنهای دخیل در سنتز هموسرین لاکتون‌ها و فاکتورهای بیماری‌زایی، نقشی کلیدی ایفا می‌کند (Diggle et al. 2004, Mc Grath et al. 2006). وجود این سیگنال در برخی از گونه‌های سودوموناس از قبیل *P. putida* و *P. fluorescens* به اثبات رسیده است. در برخی دیگر از سودومونادها نیز وجود ژنهای بیوسنتز کننده PQS ردیابی گردیده است اما سیگنال PQS یافت نشده است (Reen et al. 2011, Tarighi & Taheri 2011). با توجه به اهمیت نقش PQS در تنظیم تولید تعداد زیادی از فاکتورهای بیماری‌زایی و تولید هموسرین

انسان از بدو پیدایش در جستجوی غذا بوده است و احتمالاً قارچ‌ها یکی از اولین محصولات بوده‌اند که به عنوان غذا جلب توجه کرده‌اند. عوامل بیماری‌زا نقش مهمی در کاهش کمیت و کیفیت محصولات غذایی بازی می‌کنند. قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) بیشترین سطح زیر کشت قارچ خوراکی در ایران را به خود اختصاص داده است (Pourianfar 2011). بیماری لکه قهوه‌ای (Brown spot) در *A. bisporus* نه تنها بازار پسندی محصول را کاهش می‌دهد بلکه از لحاظ ایجاد خسارت اقتصادی مهم ارزیابی می‌شود. بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی برای اولین بار توسط تولاس (Tolaas 1915) و سپس پین (Paine 1919) توصیف گردید اما در سال‌های بعد عامل این بیماری به صورت مشروح توصیف و *Pseudomonas tolaasii* معرفی گردید (Wong et al. 1982). این بیماری اولین بار در سال ۱۳۷۴ از استان‌های مرکزی و شمالی ایران گزارش شد (Mohammadi & Pourjam 1995, Rahimian & Zarei 1995). باکتری *P. tolaasii* به عنوان مهمترین عامل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی در جهان و ایران مطرح می‌باشد. خباز و رحیمیان (Khabaz & Rahimian 2002) جدایه‌های ایرانی *P. tolaasii* را از لحاظ بیماری‌زایی و شدت علائم در چهار گروه قرار دادند. همچنین خباز و همکاران (Khabaz et al. 2005) چندین جدایه بومی از باکتری *P. fluorescens* که دارای خاصیت آنتاگونیستی بر علیه *P. tolaasii* بودند را به عنوان عوامل بیولوژیک کاهنده شدت بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی معرفی نمودند. این باکتری مانند دیگر سودومونادهای بیماری‌زا از

*reactans* خط رسوبی سفید تشکیل دادند به عنوان *P. tolaasii* انتخاب و جدا شدند.

### بررسی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها

آزمون‌های تولید رنگدانه فلورسنت با استفاده از محیط کشت KB، اکسیداز به روش کواکز (Kovacs 1956)، کاتالاز به روش للیوت و استد (Lelliott & Stead 1987)، آرژنین دی هیدرولاز به روش تورنلی (Thornly 1960)، ایجاد فوق حساسیت در توتون به روش کلمنت و همکاران (Klement *et al.* 1964)، استفاده از سوربیتول، بنزوات، مانیتول و ام-تارتاریک اسید بر روی جدایه‌ها صورت پذیرفت. آزمون گرم با حلالیت در پتاس (KOH) سه درصد به روش ساسلو و همکاران (Suslow *et al.* 1982) انجام شد. سایر آزمون‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد باکتری شناسی انجام گردید (Schaad *et al.* 2005).

### شناسایی ملکولی جدایه‌ها

برای تشخیص جدایه‌ها از آغازگرهای Ps-for و Ps- rev (شرکت سیگما) طراحی شده بر اساس ناحیه S<sup>+</sup>RNA ۱۶ سودوموناس‌ها استفاده شد. آغازگر Ps-for دارای توالی 5'-GGTCTGAGAGGA-3' و توالی آغازگر Ps-rev به صورت 3'-TTAGCTCCACCTCGCGGC-5' بود (Widmer *et al.* 1996). برای استخراج DNA، هر جدایه روی محیط آگار غذایی حاوی عصاره مخمر کشت شد و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت سوسپانسیون با باکتری با غلظت تقریبی ۱۰<sup>۸</sup> CFU/ml (جذب نوری با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر معادل یک)

لاکتونها و نبودن اطلاعاتی در مورد وجود یا عدم وجود این سیگنال در *P. tolaasii*، سعی گردید تا وجود این سیگنال در این باکتری ردیابی و نیز ارتباط بین این سیگنال و تولید فاکتورهای موثر در بیماریزایی *P. tolaasii* تعیین گردد.

### مواد و روش‌های بررسی

نمونه برداری و جداسازی *P. tolaasii* از بافت آلوده کلاهک قارچ تکمه‌ای

از فروردین تا شهریور ماه ۱۳۹۰ از سالن‌های کشت و پرورش قارچ خوراکی استان‌های خراسان رضوی، تهران، البرز، سمنان و قزوین بازدید و از کلاهک‌هایی که دارای علائم لکه قهوه‌ای و پوسیدگی نرم بودند نمونه برداری به عمل آمد. نمونه‌ها در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. جداسازی باکتری از قسمت کلاهک و پایه‌های قارچ‌های مشکوک به آلودگی باکتریایی با استفاده از محیط کشت King's B (KB) (King *et al.* 1954) صورت پذیرفت. سوسپانسیون حاصل از قرار دادن قطعات خورد شده قارچ‌های آلوده در آب مقطر استریل بر روی محیط کشت KB مخطط شد و تشتک‌های کشت شده در دمای ۲۸°C به مدت ۲۴ ساعت نگه داشته شدند. پس از رشد پرگنه‌ها، با توجه به رنگ و شکل هر پرگنه، تک پرگنه‌ها انتخاب و به محیط KB منتقل و در ۴°C تا زمان استفاده، نگهداری شدند (Godfrey *et al.* 2001).

### آزمون ایجاد خط رسوبی سفید (White line test)

این آزمون به روش کانتور و همکاران انجام شد (Cantore *et al.* 2006). جدایه‌هایی که با جدایه *P.*

محصول PCR توسط شرکت بیونیر ( Bioneer, Seoul, South Korea) انجام شد.

### آزمون اثبات بیماریزایی در شرایط آزمایشگاه

در آزمون بیماریزایی از کلاهک‌های سالم و جوان قارچ خوراکی تکمه‌ای سفید تهیه شده از مرکز پرورش قارچ خوراکی دانشگاه فردوسی مشهد، استفاده شد. ابتدا کلاهک‌ها با استفاده از اتانول ۹۶٪ به مدت ۳۰ ثانیه ضد عفونی سطحی شدند و سپس در ۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون سلولهای باکتری با غلظت  $10^8$  CFU/ml × ۱ فرو برده و پس از ۳۰ ثانیه خارج گردیدند به نحوی که سطح کلاهک‌ها از لایه نازکی از سوسپانسیون پوشیده شدند. کلاهک قارچ‌هایی که به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند در آب مقطر استریل فرو برده شد. قارچ‌های مایه زنی شده در دمای ۲۸ °C به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند. باکتری عامل بیماری مجدداً از لکه‌های ایجاد شده جداسازی گردید. گروه بندی بر اساس میزان تغییر رنگ، شدت پوسیدگی نرم و زمان ظهور علائم ایجاد شده توسط جدایه ها صورت پذیرفت.

### سنجش تولید بیوفیلم

در شرایط استریل درون چاهک‌های بشقابک‌های میکروتیتری ۹۶ خانه‌ای ( Microtiter plate, SPL Life Sciences, Pocheonsi, South Korea)، ۳۵۰ میکرولیتر از محیط کشت LB مایع استریل ریخته شد و به آن ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه با غلظت سلولی  $10^8$  CFU/ml × ۱ اضافه شد. برای هر جدایه سه تکرار به کار برده شد و محیط کشت استریل تنها به عنوان شاهد انتخاب شد. بشقابک‌ها در دمای ۲۸ °C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. پس از تخلیه محتویات

تهیه شد. سلول‌های باکتری به مدت ۲۰ دقیقه در آب جوش لیز، و سپس به مدت ۳ دقیقه در ۷۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. غلظت تقریبی DNA محلول رونشین در جدایه‌های مختلف به روش اسپکتروفوتومتری در طول موج ۲۶۰ نانومتر تخمین زده شد ( Green & Sambrook 2012). غلظت DNA هر جدایه به حدود ۱۰۰ ng/μl تنظیم شد و در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۲۵ μl انجام گردید که شامل ۱/۵ mM MgCl<sub>2</sub>، ۰/۵ μM از هر آغازگر، ۱/۲۵ U dNTPs، ۰/۵ mM Taq DNA Polymerase GENETBIO, Daejeon, South Korea) و بافر 10X PCR به مقدار ۲/۵ μl بود. به مخلوط فوق ۱ μl از نمونه DNA ژنومی با غلظت ۱۰۰ ng/μl اضافه شد. چرخه حرارتی برای تکثیر DNA با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ °C به مدت ۴ دقیقه آغاز و سپس ۳۰ چرخه شامل واسرشته سازی DNA در دمای ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۸ °C به مدت ۱ دقیقه، گسترش طول در دمای ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و در آخر یک بسط انتهایی در دمای ۷۲ °C به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر بیومترا (Biomtera, Gottingen, Germany) انجام شد (Widmer et al. 1997).

ژل آگارز ۱ درصد تهیه و محصولات PCR به همراه مارکر یک کیلوبازی (تهیه شده از شرکت Fermentas) در چاهک‌های آن بارگذاری و به مدت ۱ ساعت با ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند. رنگ آمیزی ژل آگارز با رنگ جایگزین اتیدیوم بروماید با نام DNA green viewer انجام شد و عکسبرداری از ژل با استفاده از دستگاه Gel Documentation صورت گرفت. توالی یابی

### آزمون همولیز گلبول های قرمز (اریتروسیت‌ها) توسط تولاسین جدایه‌ها

روش رینی و همکاران (Rainey *et al.* 1993) برای انجام این آزمون استفاده شد. محیط کشت آگار غذایی (NA) حاوی ۵ درصد خون گاو، تهیه شد و سپس از کشت ۴۸ ساعته جدایه‌ها روی این محیط قرار داده شد. تشتک‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در  $28^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. قطر هاله شفاف در اطراف کلنی باکتری‌ها، نشانگر مقدار تولاسین تولید شده توسط هر جدایه بود.

### آزمون سنجش میزان تحرک جدایه‌ها

برای انجام این آزمون از روش کینشرف (Kinscherf *et al.* 1999) با کمی تغییرات استفاده گردید. دیسک‌های کاغذی به سوسپانسیون کشت تازه باکتری‌ها آغشته و سپس بر روی محیط نیمه جامد KB (۰.۷ درصد آگار) قرار گرفتند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای  $28^{\circ}\text{C}$  نگهداری شدند. قطر حرکت جدایه‌ها بیانگر قدرت تحرک آنها بود.

### ردیابی مقدار (PQS) *Pseudomonas quinolone* signal در جدایه‌ها

استخراج PQS به روش دیگل (Diggle *et al.* 2006) انجام شد. باکتری‌ها در محیط کشت مایع لوریا برتانی (Luria Bertani, LB) به مدت ۲۴ ساعت رشد داده شدند. سپس محیط کشت حاوی باکتری‌ها به مدت ۵ دقیقه در  $7000 \times$  دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی حاصل، از فیلتر میلی‌پور  $0.22 \mu\text{m}$  میکرومتر عبور داده شد. محلول فیلتر شده (۳ میلی لیتر) با هم حجم خود محلول اسیدی اتیل استات (به هر ۱۰۰ میلی لیتر اتیل استات یک

بشقابک از محیط کشت حاوی باکتری، چاهک‌ها با استفاده از رنگ کریستال ویوله ۱۰ درصد (در اتانول ۵۰ درصد) به مدت ۲ ساعت رنگ آمیزی شدند. پس از تخلیه رنگ و شستشوی چاهک‌ها با آب مقطر استریل، بیوفیلم تولید شده توسط هر جدایه با میکروسکوپ بزرگنمایی  $40\times$  عکس برداری شد. همچنین جهت سنجش کمی مقدار بیوفیلم تولید شده چاهک‌ها با اتانول ۹۶ درصد (۳۵۰ میکرولیتر) شستشو داده شدند. جذب محلول رنگی هر چاهک در طول موج  $570 \text{ nm}$  بیانگر مقدار بیوفیلم تولید شده توسط هر جدایه بود (Maddula *et al.* 2008).

### سنجش تولید پایووردین در جدایه‌ها

برای اندازه گیری میزان سیدروفور تولیدی جدایه‌ها از روش اسپکتروفتومتری استفاده شد. هر یک از جدایه‌ها در محیط کشت کاز آمینواسید (حاوی ۵ گرم پودر Casamino (Merck, Dremstadt, Germany) acid،  $0.9 \text{ g}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$  و  $0.25 \text{ g}$   $\text{MgSO}_4$  در یک لیتر آب مقطر) (Cornelis *et al.* 1992) مایه زنی شدند. کشت‌ها درون شیکر-انکوباتور (Shaker-incubator) در  $28^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت قرار گرفتند. پس از سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون باکتری به مدت ۳ دقیقه در  $5000 \times$  دور در دقیقه سلول‌های باکتری حذف شده و فاز رویی (Supernatant) حاصل از فیلترهای میلی پور با اندازه روزنه  $0.22 \mu\text{m}$  میکرومتر عبور داده شد. مقدار جذب محلول در طول موج  $405 \text{ nm}$  بیانگر مقدار پایووردین تولید شده بود (Dao *et al.* 1999).

جدول ۱. خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *Pseudomonas tolaasii*، جدا شده از قارچ‌های خوراکی (*Agaricus bisporus*) با علائم لکه قهوه‌ای در استان‌های قزوین، سمنان، تهران و خراسان رضوی.

**Table 1. Phenotypic characters of *Pseudomonas tolaasii* strains, isolated from brown blotch-affected mushrooms in Ghazvin, Semnan, Tehran and Khorasan Razavi provinces**

Isolates	Diffusible Fluorescent pigment	Oxidase	Catalase	Arginine dehydrolyase	Growth at 37 °C	Potato rot	Tobacco HR	Mannitol	Benzoate	Sorbitol	M-Tartrate	Origin
Gh3	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Ghazvin
Se5	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Semnan
Ga6A	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Garmsar
Pa17	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Pakdasht
Sa10	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Safadasht
Sa11	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Safadasht
Ma13	+	+	+	+	-	-	-	V	-	+	+	Mashhad
Ni16B	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Nishabour
Te17A	+	+	+	+	-	-	-	+	-	V	+	Tehran
Te17B	+	+	+	+	-	-	-	+	-	V	+	Tehran
Da18	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Damghan
Se20	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	Semnan

+: More than 80percent of the isolates showed positive reaction

-: More than 80 percent of the isolates showed negative reaction

V: Between 21 to 79 percent of isolates showed positive reaction

+: بیش از ۸۰ درصد جدایه‌ها واکنش مثبت نشان دادند

-: بیش از ۸۰ درصد جدایه‌ها واکنش منفی نشان دادند

V: بین ۲۱ تا ۷۹ درصد جدایه‌ها واکنش مثبت نشان دادند

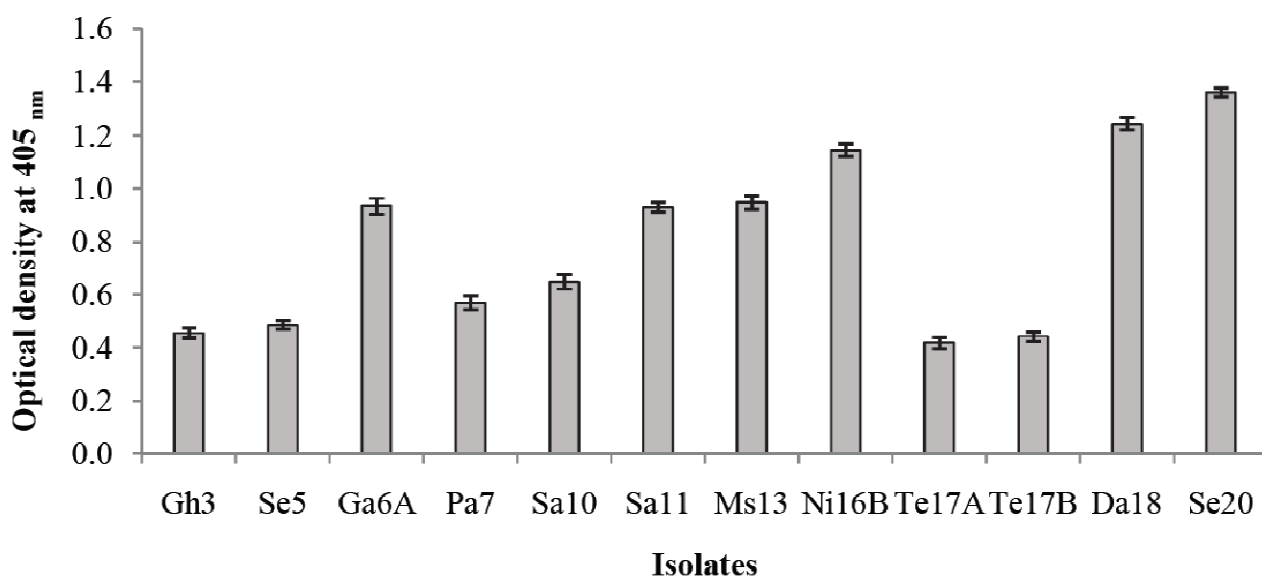
سیلیکاژل (ظرف حدود چهار ساعت)، صفحه از تانک خارج گردید و زیر نور ماوراء بنفش با طول موج ۳۶۵ نانومتر، لکه‌های فلورسانت رویت شده به موازات نمونه استاندارد به منزله وجود PQS قلمداد شدند (Pesci et al. 1999).

## نتایج

### جداسازی، انتخاب و شناسایی گونه *P. tolaasii*

از میان باکتری‌های فلورسنت جدا شده بر روی محیط KB، جدایه‌هایی که قادر به ایجاد رسوب سفید در تقابل با *P. reactants* KACC10099 بودند جهت شناسایی دقیق‌تر انتخاب شدند. بر اساس واکنش منفی گرم، تولید

میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال اضافه شد) مخلوط گردید و به مدت ۱ دقیقه به شدت با دست تکان داده شد. پس از تشکیل دو فاز جداگانه، فاز حلال از محیط کشت جدا، و تحت شرایط خلاء به روش روتوری اوپوریتور (Rotary evaporator) به مدت ۶ ساعت خشک گردید. PQS استخراج شده در یک میلی لیتر متانول خالص حل شد. به منظور ردیابی و تخمین مقدار PQS تولید شده، ۲۰ μl از محلول PQS استخراج شده در متانول بر روی صفحه‌های کروماتوگرافی لایه نازک (سیلیکاژل G با ضخامت ۰/۲۵ میلی متر و طول صفحه ۲۰ سانتی متر) منتقل گردید. کروماتوگرافی با استفاده از حلال دی کلرومتان و متانول (نسبت حجمی ۹۵ : ۵) انجام شد. با نزدیک شدن حلال به انتهای صفحه



شکل ۱. مقایسه مقدار پایووردین تولید شده توسط استرین های *P. tolaasii* جدا شده از کلاهک های قارچ

Figure 1: Comparison of pyoverdinin production by *P. tolaasii* isolated from mushroom caps

گندیدگی در بافت قارچ خوراکی شد. سه جدایه Da18، Ni16B، Ga6A موجب تغییر رنگ کلاهک به قهوه‌ای تیره و ایجاد لکه‌های قهوه‌ای کوچک در سطح کلاهک گردید که با اتصال آنها به هم کلاهک حالت لزج پیدا کرد. سایر جدایه‌ها باعث پوسیدگی سفید و نرم توأم با تصاعد بوی گندیدگی شدید شدند.

#### سنجش میزان تولید پایووردین در جدایه‌ها

هر یک از ۱۲ جدایه مقادیر مختلفی سیدروفور بر اساس میانگین جذب نوری در طول موج ۴۰۵ نانومتر تولید کردند. جدایه‌های Se20 ( $1/35 \pm 0/25$ )، Da18 ( $1/27 \pm 0/43$ ) و Ni16B ( $1/17 \pm 0/33$ ) بیشترین مقدار سیدروفور و جدایه‌های Te17A ( $0/41 \pm 0/22$ )، Te17B ( $0/45 \pm 0/25$ ) و Gh3 ( $0/47 \pm 0/23$ ) کمترین مقدار سیدروفور را تولید کردند (شکل ۱).

#### آزمون سنجش بیوفیلم

جدایه‌های Gh3 و Ga6A بیشترین توانایی تشکیل

رنگدانه فلورسانت، تولید اکسیداز و کاتالاز، مثبت بودن واکنش آرژنین دی هیدرولاز، عدم رشد در  $37^{\circ}\text{C}$ ، ناتوانی در لهانیدن سیب زمینی، عدم ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون، استفاده از منابع کربنی مانیتول، سوربیتول، ام-تارتاریک اسید و عدم استفاده از بنزوات، جدایه‌ها در گونه *P. tolaasii* جای گرفتند (جدول ۱) (Schaad et al. 2005). بخشی از ژن 16S rDNA توسط آغازگرهای اختصاصی PsR و PsF در تمامی جدایه‌ها تکثیر شد. مقایسه توالی قطعه تکثیر شده در جدایه Se20 (جدا شده از کلاهک قارچ خوراکی با علائم پوسیدگی از شهرستان سمنان)، به عنوان نماینده جدایه‌ها، با توالی گونه‌های سودوموناس موجود در ژن بانک همولوژی ۱۰۰ درصد آن را با گونه *P. tolaasii* نشان داد.

#### اثبات بیماریزایی

جدایه‌ها بر روی کلاهک‌های قارچ تکمه‌ای سفید حالات مختلفی از علائم بیماری را نشان دادند. جدایه Se20 باعث پوسیدگی قهوه‌ای و نرم توأم با بوی



شرقی کشور نشان دهنده حضور باکتری *P. tolaasii* به عنوان عامل اصلی ایجاد کننده لکه قهوه‌ای و پوسیدگی باکتریایی کلاهک قارچ در ایران می‌باشد. گونه‌های دیگری مانند *P. reactants* نیز در بین جدایه‌ها وجود داشتند که در این تحقیق به دلیل توانایی بیماری‌زایی کم مورد بررسی قرار نگرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده از سه گونه سودوموناس شامل *P. reactants*، *P. tolaasii* و *P. gingeri* که به دفعات از روی کلاهک های آلوده قارچ در سراسر دنیا گزارش شده‌اند (Godfrey et al. 2001)، گونه *P. tolaasii* تنها گونه‌ای بود که از تمام مناطق نمونه برداری شده یافت شد. تولید خط (رسوب) سفید ایجاد شده توسط تمامی جدایه‌ها در برابر باکتری سفید ایجاد شده توسط تمامی جدایه‌ها در برابر باکتری *P. reactants* KACC10099 بیانگر تشخیص صحیح جدایه‌ها بود (Cantore et al. 2006). تکثیر اختصاصی قطعه‌ای از ناحیه 16SrDNA با وزن ملکولی یک کیلو باز در تمامی جدایه‌ها نشان داد که همگی جدایه‌ها متعلق به یک گونه هستند. توالی‌یابی اسیدهای نوکلئیک قطعه تکثیر شده در یکی از جدایه‌ها (Se20)، همولوژی ۱۰۰٪ را با گونه *P. tolaasii* نشان داد. با توجه به اینکه تنوع در بیماری‌زایی جدایه‌ها مشاهده شد لذا فاکتورهای مختلفی که معمولاً در بیماری‌زایی سودوموناس‌ها اهمیت دارند مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات انجام شده بر روی *P. tolaasii* نشان داده است که بین بیماری‌زایی و نوع و میزان سیدروفور تولیدی توسط باکتری فوق یک ارتباط مستقیم وجود دارد (Munsch et al. 2000)، نتایج ما بیانگر تایید این نظریه بود، به طوری که جدایه‌ها با بیشترین توان تولید پایوردین، بالاترین توان بیماری‌زایی را از خود نشان دادند. البته در این تحقیق فقط یکی از سیدروفورهای جنس سودوموناس مورد بررسی قرار داده شد. یکی از مهمترین سیستم‌هایی که در بیماری‌زایی

یوفیلیم را داشتند. جدایه‌های Ni16B و Te17B کمترین مقادیر در تشکیل بیوفیلیم را دارا بودند. اختلاف معنی داری در بین جدایه‌های باکتری در تشکیل بیوفیلیم مشاهده شد. حتی برای برخی از جدایه‌ها که از یک منطقه جمع آوری شده بودند نیز اختلاف معنی دار بود (شکل ۲).

### سنجش تولید تولاسین و میزان تحرک

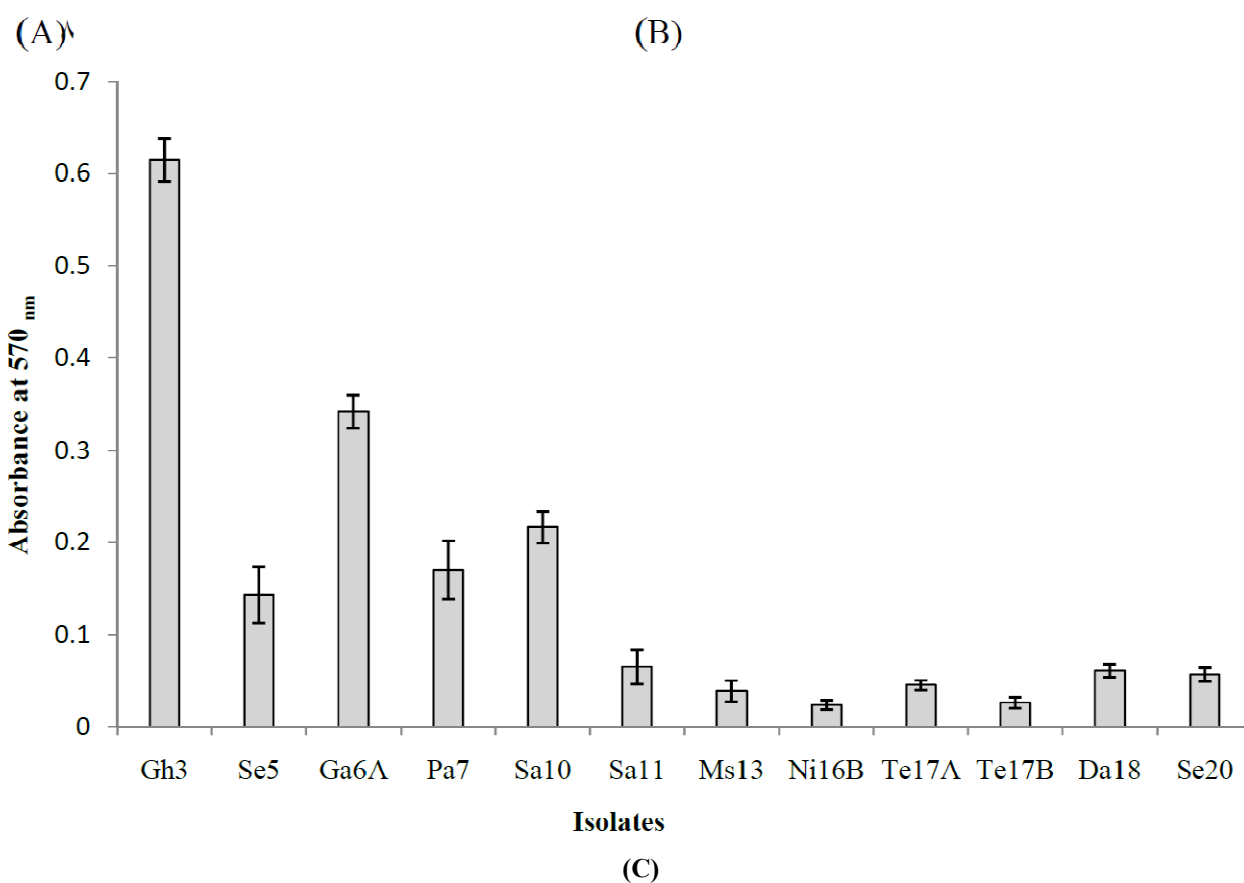
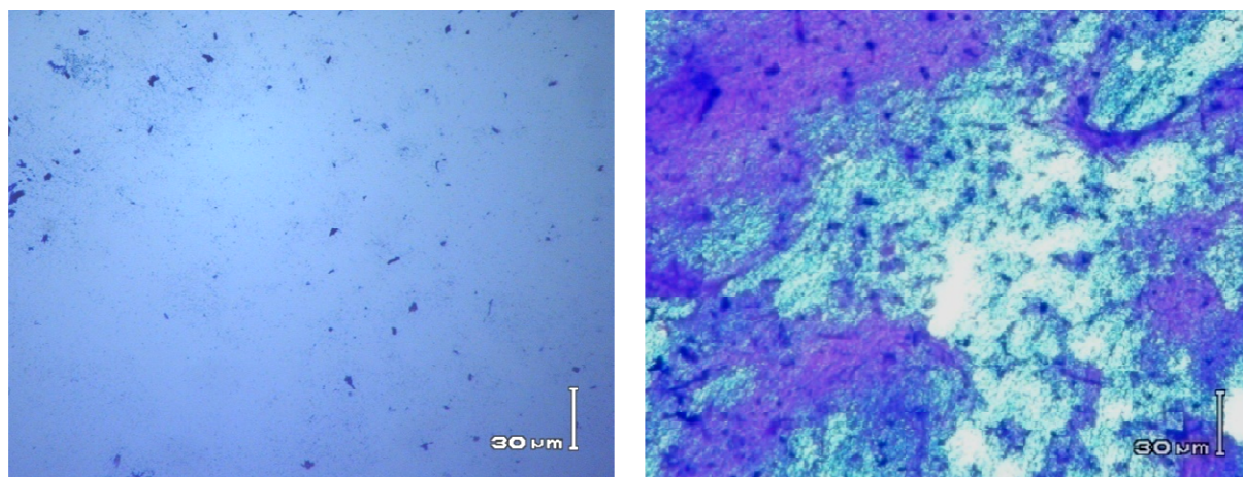
توانایی تولید تولاسین بر اساس قطر هاله شفاف ایجاد شده در اطراف کلنی باکتریها سنجیده شد (شکل ۳). جدایه‌های Ga6A، Ni16B، Da18، Se20 توانستند گلوبول‌ها را به شدت همولیز کنند. به جز Ga6A سه جدایه دیگر از توانایی تحرک بالایی نیز برخوردار بودند. کمترین مقدار تولید تولاسین در جدایه‌های Te17A، Pa7 و Se5 مشاهده شد. بیشترین میزان تحرک متعلق به جدایه‌های Ni16B و Te17A، Te17B، Da18، Se20 بود (شکل ۳ و ۴).

### ردیابی و تعیین کمی مقدار PQS در بین جدایه‌ها

تمامی جدایه‌ها قادر به تولید PQS بودند اما هیچ گونه تفاوتی در مقدار PQS تولید شده در بین جدایه‌ها مشاهده نشد. بنابراین جدایه‌های باکتری *P. tolaasii* به دست آمده از قارچ خوراکی در مناطق مرکزی و شمال شرقی ایران قادر به تولید PQS بودند (شکل ۵). این اولین گزارش از ردیابی PQS در باکتری *P. tolaasii* می‌باشد.

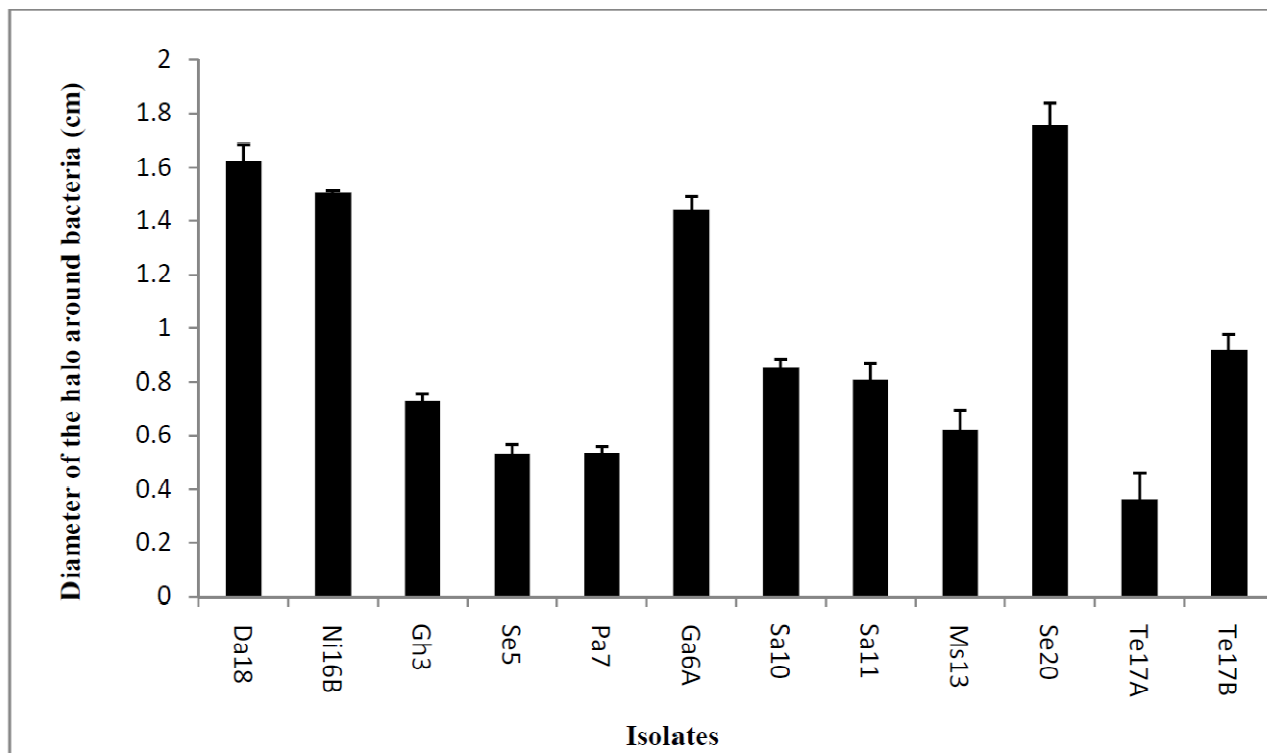
### بحث

آزمونهای مختلف فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای انجام شده بر روی باکتری‌های جدا سازی شده از قارچ خوراکی تکمه‌ای در مناطق مرکزی و شمال



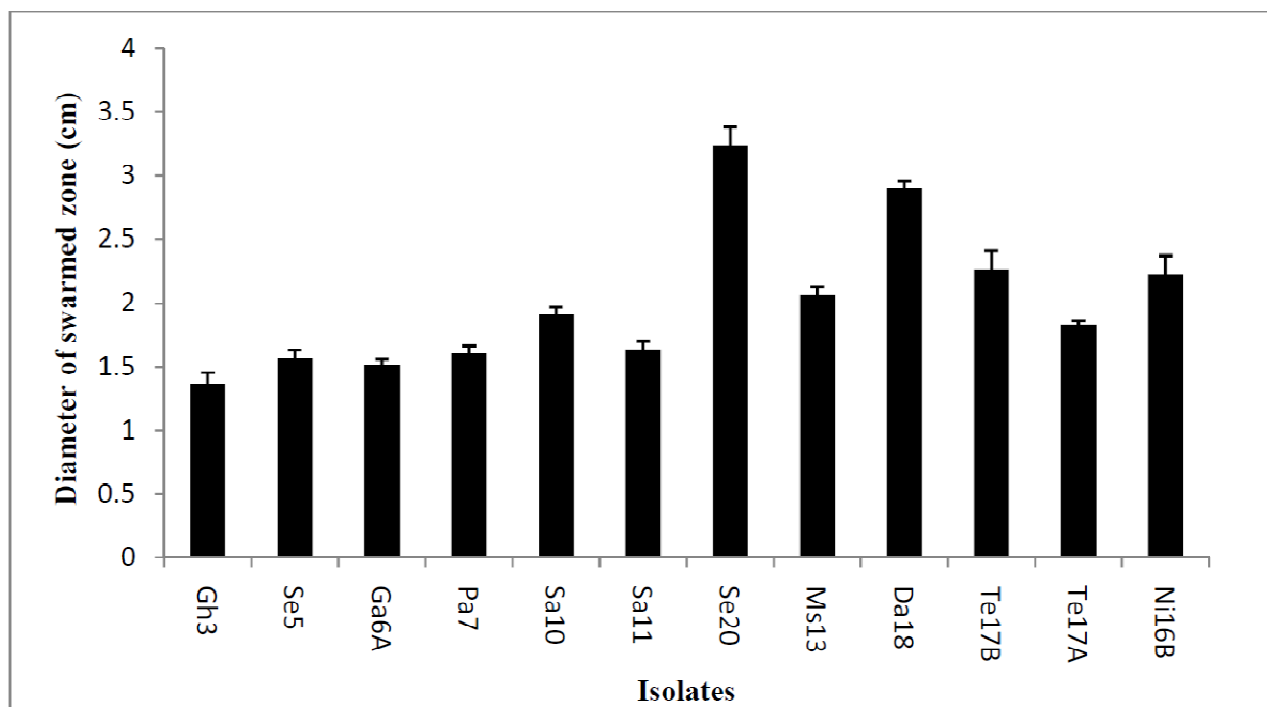
شکل ۲. نقوش میکروسکوپی از تولید بیوفیلم در چاهک‌های بشقابک‌های میکروتیتری. الف، عدم تولید بیوفیلم ب، تولید زیاد بیوفیلم ج، مقایسه کمی مقدار بیوفیلم تولید شده در بین جدایه‌ها

Figure 2. Microscopic pattern of biofilm formation in microtiter plate wells. A, no biofilm formation and B, high biofilm formation. C, Comparison of the level of biofilm formation among isolates.



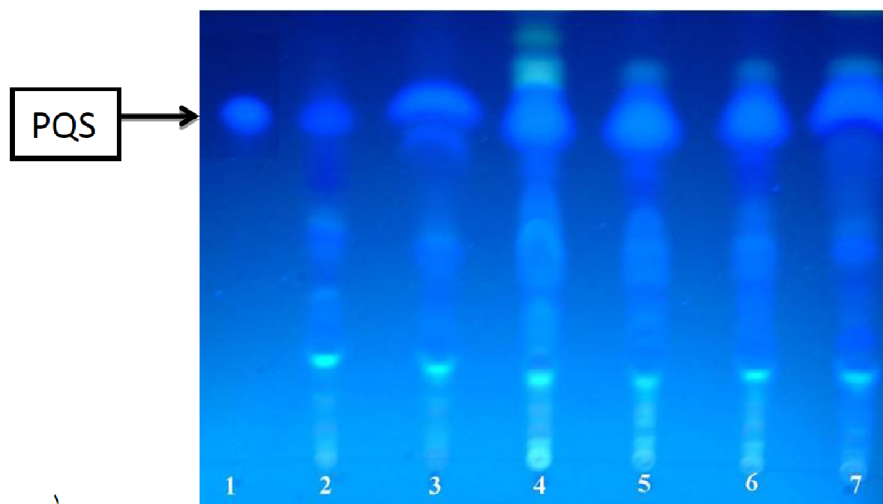
شکل ۳- مقایسه توانایی همولیز اریتروسیت توسط تولاسین تولید شده به وسیله جدایه‌های *P. tolaasii*

Figure 3. Comparison of erythrocyte homolysis by tolaasin produced by *P. tolaasii* isolates.



شکل ۴- سنجش تحرک در جدایه‌های *P. tolaasii* جدا شده از کلاهک‌های قارچ خوراکی.

Figure 4. The swarming motility assay in *P. tolaasii* isolated from mushroom caps.



شکل ۵. ردیابی PQS در جدایه‌های *P. tolaasii*. ۱. PQS استاندارد، ۲. PQS استخراج شده از باکتری *P. aeruginosa*، ۳. Gh3، ۴. Pa7، ۵. Sa10، ۶. Se20، ۷. Te17B.

Figure 5. PQS detection in *P. tolaasii* isolates. 1. standard PQS; 2. PQS extracted from *P. aeruginosa*; 3. GH3; 4. Pa7; 5. Sa10; 6. Se20; 7. Te17B.

جمله *P. syringae* برخی از ژنهای مربوط به ساخت این سیگنال یافت شده‌اند اما PQS تاکنون جداسازی نشده است (Tarighi & Taheri 2011). در این تحقیق مشخص شد که گونه *P. tolaasii* قادر به تولید PQS می‌باشد اما مقدار آن در جدایه‌های مختلف، تفاوت واضحی را نشان نداد. از طرف دیگر با توجه به یافته‌هایی که در *P. aeruginosa* وجود دارد، تولید بیوفیلم ارتباط مستقیمی با مقدار PQS تولید شده دارد (Diggle et al. 2003, Kong et al. 2009)، اما در این تحقیق مشخص شد که اگر چه PQS در جدایه‌ها به یک مقدار تقریباً مساوی تولید شده است، اما درجات مختلفی از تولید بیوفیلم در میان جدایه‌ها وجود دارد. همچنین جدایه‌های *P. tolaasii* درجات مختلفی از بیماریزایی را نشان دادند که هیچ رابطه‌ای بین بیماریزایی، تولید بیوفیلم و مقدار PQS، بین جدایه‌ها مشاهده نشد. با این حال جدایه‌هایی که تولاسین بیشتری تولید کردند خسارت

باکتری‌ها نقش به‌سزایی دارد سیستم احساس حد نصاب یا سنجش جمعیت (Quorum sensing) است. حضور دو گروه از سیگنال‌ها یعنی هموسرین لاکتونها و PQS این پدیده را کنترل می‌نماید. با توجه به اهمیت PQS در سودوموناسها و اینکه هیچ گزارشی مبنی بر حضور و نقش این سیگنال در بیماریزایی *P. tolaasii* وجود نداشت، ردیابی و نقش این سیگنال مورد توجه قرار گرفت. PQS در باکتری *P. aeruginosa* که جدایه تیپ جنس سودوموناس می‌باشد به عنوان سیگنال اصلی در کنترل تولید و بیان هموسرین لاکتون‌ها است. همانطور که از نام PQS (*Pseudomonas quinolone* signal) بر می‌آید، انتظار می‌رود این سیگنال در تمام گونه‌های سودوموناس عمومیت داشته باشد، اما تحقیقات چندانی بر روی حضور یا عدم حضور آن و نقش این سیگنال در سودوموناس‌ها (به غیر از *P. aeruginosa*) صورت نگرفته است. در برخی از سودوموناس‌ها از

تولید آلجینات و بیماریزایی وجود دارد (Quinones *et al.* 2005). بنابراین به نظر می‌رسد که PQS در *P. tolaasii* نمی‌تواند نقش مهمی را در بیماریزایی باکتری ایفا کند و فاکتورهای متعدد دیگری که در بیماریزایی باکتری دخیل هستند، مستقل از PQS و یا همان سیستم احساس حد نصاب وابسته به PQS عمل می‌کنند.

شدیدتری روی کلاهک قارچ خوراکی تولید نمودند. همچنین ارتباط مستقیمی بین جدایه‌هایی که بیوفیلم کمتری تولید می‌کردند با تحرک مشاهده شد. به طوری که جدایه‌های با بیوفیلم کمتر تحرک بیشتری را نشان دادند. در باکتری *P. syringae* نیز رابطه معکوسی بین تولید سیگنال‌های وابسته به پدیده احساس حد نصاب و

## منابع

- 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) Produced by *Pseudomonas reactans* NCPPB1311. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19:1113-1120.
- Cornelis P., Anjaiah V., Koedam N., Delefosse P., Jacques P. and Neirinckx L. 1992. Stability, frequency and multiplicity of transposon insertions in the pyoverdine region in the chromosomes of different fluorescent pseudomonads. *Journal of General Microbiology* 138:1337-1343.
- Dao K. H., Hamer E., Clark C. L. and Harshman L. G. 1999. Pyoverdine production by *Pseudomonas aeruginosa* exposed to metals or an oxidative stress agents. *Ecological Applications* 9:441-448.
- Diggle S. P., Cornelis P., Williams P. and Cámara M. 2006. 4-quinolone signaling in *Pseudomonas aeruginosa*: old molecules, new perspectives. *International Journal of Medical Microbiology* 296:83-91.
- Diggle S. P., Winzer K., Chhabra S. R., Worrall K. E., Cámara M. and Williams P. 2003. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule moderates the production of rhl-dependent quorum sensing phenotypes and promotes biofilm development. *Molecular Microbiology* 50:29-43.
- Eberal L. 1999. N-acyl homoserinelactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *Systematic and Applied Microbiology* 22:493-506.
- Farsi M. and Pourianfar H. 2011. Cultivation and breeding of the white button mushroom. 2<sup>th</sup> ed. Iranian Academic Center for Education, Culture and Research, Mashhad. P 15-28
- Fuqua C., Parsek M. R. and Greenberg E. P. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annual Review of Genetics* 35:439-468
- 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.
- Green M. R. and Sambrook J. 2012. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4<sup>th</sup> ed., Sinauer Inc., USA. 2451 p.
- Khabaz H., Rahimian H. 2002. Brown blotch disease of cultivated mushroom in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 38:1-10.
- Khabaz H., Mohammadi G. E., Rahimian H. 2005. Isolation, selection and investigation of bacterial antagonists in biological control of brown blotch of cultivated mushroom. *Iranian Journal of Plant Pathology* 164:543-551.
- King E. O., Ward M. K. and Raney D. E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44:301-307.
- Kinscherf T. G., and Willis D. K. 1999. Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but not the acylhomoserine lactone biosynthetic gene *ahlI*. *Journal of Bacteriology* 181:4133-4136.
- Klement Z. G., Farkas L. and Lovrekovich L. 1964. Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology* 54: 474-477.
- Kong W., Liang H., Shen L. and Duan K. 2009. Regulation of type III secretion system by RhI and PQS quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Microbiologica Sinica* 49:1158-1164.

- Kovacs N. 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature* 178:703
- Lelliott R. A. and Stead D. E. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Disease of Plants*. Blackwell Scientific Publications 216 pp.
- Maddula V. S. R. K., Pierson E. A. and Pierson L. S. 2008. Altering the ratio of phenazines in *Pseudomonas chlororaphis*. effects on biofilm formation and pathogen inhibition. *Journal of Bacteriology* 18:1587-1597.
- McGrath S., Wade D. S. and Pesci E. C. 2004. Dueling quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa* control the production of the *Pseudomonas quinolone* signal (PQS). *FEMS Microbiology Letters* 230:27-34
- Mohammadi E. and Pourjam E. 1995. Bacterial brown blotch of cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) in Iran. *Proceeding of 12<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress* p. 389
- Munsch P., Geoffroy V., Alatossava T. and Meyer J. M. 2000. Application of siderotyping for characterization of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas reactants* isolates associated with brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4834-4841.
- Paine S. G. 1919. Studies in bacteriosis: A brown blotch disease of cultivated mushroom. *Annals of Applied Biology* 5:206-219.
- Pesci E.C. Milbank J. B., Pearson J. P, McKnight S., Kende A.S., Greenberg E., and Iglewski B. H. 1999. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96: 11229-11234
- Quiñones B., Dulla G., and Lindow S. E. 2005. Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:682-693.
- Rahimian H., and Zarei A. 1995. Bacterial brown blotch of cultivated mushroom in Mazandaran. *Proc. 12<sup>th</sup> Plant Protection Congress*. Iran, P. 372
- Rainey P. B., Brodey, C. L. and Johnstone, K. 1993. Identification of a gene cluster encoding three high-molecular-weight proteins, which is required for synthesis of tolaasin by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Molecular Microbiology* 8:643-652.
- Reen F. J., Mooij, M. J., Holcombe L. J., McSweeney, C. M., McGlacken, G. P., Morrissey J. P., and O'Gara, F. 2011. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS), and its precursor HHQ, modulate interspecies and interkingdom behaviour. *FEMS Microbiol Ecol* 77:413-28.
- Schaad N. W., Jones J. B. and Chun W. 2005. *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria* 3<sup>rd</sup> ed., The American Phytopathology Society Press, St Paul, Minnesota, USA. 373pp.
- Suslow T.V., Schroch M.N. and Isaka M. 1982. Application of rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* 72:917-918.
- Thornly M. J. 1960. The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal of Applied Bacteriology* 23:37-53.
- Tarighi S. and Taheri P. 2011. Different aspects of bacterial communication signals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27:1267-1280
- Tolass A. G. 1915. A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 5: 51-54.
- Widmer F., Ramon J. and Patrick M. 1997. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA gene of the genus *Pseudomonas* (Sensu Stricto) in environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 98:2545-2553.
- Widmer F., Seidler R. J. and Watrud L. S. 1996. Sensitive detection of transgenic plant marker gene persistence in soil microcosms. *Molecular Ecology* 5:603-613.
- Wong W. C., Fletcher J. T., Unsworth B. A. and Preece T. F. 1982. A note on ginger blotch, a new bacterial disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of Applied Microbiology* 52:43-48.