

ویژگی‌های ریخت‌شناسی، فنوتیپی و بیماری‌زایی عوامل مولد لکه باکتریایی قارچ دکمه‌ای در استان چهارمحال و بختیاری

روح الله محمدی اشکفتکی^۱، فاطمه یوسفی کوپائی^{۲*} و سیده فاطمه نوربخش شورابی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۲/۲۴)

چکیده

بیماری لکه باکتریایی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) است که باعث کاهش بازارپسندی محصول می‌شود. تحقیق حاضر به منظور بررسی و شناسایی عوامل مولد لکه باکتریایی در چند مرکز پرورش قارچ استان چهارمحال و بختیاری انجام گرفت. از قارچ‌های دارای علائم لکه‌های کرم تا قهوه‌ای و سیاه در کلاهک و ساقه نمونه برداری شد و جداسازی باکتری انجام گرفت. ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها بررسی شد. آزمون بیماری‌زایی روی بلوک‌های جدا شده از کلاهک قارچ، روی کلاهک سالم و نیز با تزریق در ساقه قارچ انجام گرفت. تعدادی از جدایه‌های بیماری‌زا بر مبنای خصوصیات فنوتیپی و ردیابی با جفت آغازگر اختصاصی Pt1A/ID در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز به‌عنوان *Pseudomonas tolaasii* شناسایی شدند. سایر جدایه‌های بیماری‌زا بر مبنای خصوصیات فنوتیپی، بیماری‌زایی در ساقه و ترادف بخشی از ناحیه 16S rDNA به‌عنوان *Ewingella americana* شناسایی شدند. جدایه‌های *P. tolaasii* بر اساس آزمون‌های بیماری‌زایی در دو گروه مجزای بیماری‌زای شدید و بیماری‌زای خفیف یا غیربیماری‌زا قرار گرفتند. جدایه‌های این دو گروه از نظر بعضی خصوصیات فنوتیپی مانند رنگ و فرم پرگنه، ایجاد واکنش فوق حساسیت در شمعدانی و توانایی له کردن ورقه‌های سیب‌زمینی متفاوت بودند. بر اساس اطلاعات نگارندگان، تحقیق حاضر اولین توصیف جدایه‌های غیر/کم بیماری‌زای *P. tolaasii* در ایران و اولین گزارش *E. americana* از استان چهارمحال و بختیاری می‌باشد.

کلیدواژه: لکه باکتریایی، *Pseudomonas tolaasii*، *Agaricus bisporus*، تست بیماری‌زایی

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: F_yousefi2005@yahoo.com و yousefi@sku.ac.ir

۱. دانش‌آموخته مقطع کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شهرکرد.

۲. استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه شهرکرد.

۳. دانش‌آموخته رشته گیاهپزشکی دانشگاه شهرکرد.

Morphological, phenotypic and pathogenicity characters of the bacteria causing blotch on button mushroom in Chaharmahal-o-Bakhtiary province

R. Mohammadi Eshkaftaki¹, F. Yousefi Kopaei^{2*}, and S.F. Nourbakhsh Shourabi³

(Received: 23.9.2019; Accepted: 13.5.2020)

Abstract

Bacterial blotch is one of the most important diseases of white button mushrooms (*Agaricus bisporus*) which results in consumer demand loss at the marketplace. The main aim of this study was identification of bacteria causing blotches in some mushroom cultivation centers of Chaharmahal-o-Bakhtiari province. Mushrooms with cream to brown or black blotches on caps and stems were collected and bacterial isolation was done. The phenotypic characteristics of isolates were investigated. Pathogenicity tests were performed on excised tissue blocks, on intact caps and by injection to stipe of *A. bisporus*. Some of pathogenic isolates were identified as *Pseudomonas tolaasii* based on phenotypic characters and detection by Pt1A/1D primer sets in PCR. The others were identified as *Ewingella americana* based on phenotypic characters, pathogenicity on stipe and the partial sequence of 16S rDNA region. Based on pathogenicity tests, *P. tolaasii* isolates were divided in two distinct groups: high pathogenic and low/non-pathogenic. These two groups differed in some phenotypic characters such as type and color of colony, HR on geranium and potato rot test. To the authors' knowledge, it is the first description of low/non- pathogenic isolate of *P. tolaasii* and the first report of *E. americana* from Chaharmahal-o-Bakhtiari province.

Keywords: Bacterial blotch, *Pseudomonas tolaasii*, *Agaricus bisporus*, Pathogenicity test

*Corresponding author's E-mail: yousefi@sku.ac.ir

1. Graduated student in plant pathology, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

2. Assistant professor in plant pathology, Plant protection Department, College of Agriculture, Shahrekord University, Shahrekord, Iran.

3. Graduated student in plant protection, Shahrekord university, Shahrekord, Iran.

مقدمه

ایران *P. tolaasii* اولین بار از مناطق شمالی و مرکزی ایران از قارچ دکمه‌ای گزارش شد (Rahimian et al. 1995). سپس این بیماری‌گر از روی قارچ جنس *Scleroderma* sp. در جنگل‌های مازندران گزارش گردید (Rahimian & Zarei 1996). از آن پس این بیماری در نقاط مختلف کشور معرفی شده است (Ansari Dezpholi et al. 2012, Mohammadi & Khabbaz jolfaei & Rahimian 2002, Pourjam 1995).

باکتری *Ewingella americana* Grimont et al. 1984 یک گونه از خانواده Yersiniaceae است (Adeolu et al. 2016) که اولین بار در سال ۱۹۸۳ توسط گریمونت و همکاران توصیف شد (Grimont et al. 1983). این باکتری به عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب از نمونه‌های انسانی و حیوانی نیز جدا شده است و می‌تواند به عفونت خون (Devreese et al. 1992) و چشم (Heizmann et al. 1991) منجر شود. در قارچ خوراکی این باکتری به عنوان عامل نکروز داخلی ساقه معرفی شده است. علائم این بیماری به صورت قهوه‌ای شدن مرکز ساقه قارچ‌ها ظاهر می‌شود که گاهی به بافت داخلی کلاهک نیز توسعه می‌یابد (Reyes et al. 2004). این باکتری روی قارچ *A. bisporus* ابتدا از انگلستان (Inglis & Peberdy 1997) و بعد از اسپانیا (Reyes et al. 2004)، نیوزلند (Braithwaite et al. 2005)، کره (Lee et al. 2009) و مصر (Madbouly et al. 2014) گزارش شده است. در ایران اطلاعات کمی در مورد شیوع انتروباکتریاسه در مراکز پرورش قارچ در دسترس است، بیشتر مطالعات روی سودومونادها متمرکز شده است و *E. americana* فقط از کردستان گزارش شده است (Aslani et al. 2018).

با توجه به عدم وجود اطلاعات در زمینه وضعیت آلودگی مراکز پرورش قارچ استان چهارمحال و بختیاری به

مصرف قارچ‌های خوراکی به دلیل اثرات سودمند آن بر سلامت انسان و تمایل مردم به ارزش تغذیه‌ای آن رو به رشد است. قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) (J.E. Lange) Imbach, 1946)) بیشترین سطح زیرکشت قارچ خوراکی در ایران را به خود اختصاص داده است. یکی از بیماری‌های باکتریایی مهم قارچ خوراکی، لکه قهوه‌ای (Brown blotch) است که در تمام مناطق عمده کشت قارچ جهان وجود دارد و از مهم‌ترین عوامل بیماری‌گر محسوب می‌شود (Cole & Skelrop 1986). علائم بیماری به صورت لکه‌های کرم رنگ یا قهوه‌ای روی کلاهک و ساقه مشاهده می‌شود. در صورت پیشرفت بیماری لکه‌ها تیره‌تر و فرورفته می‌شوند. لکه‌ها سطحی‌اند و به دو یا سه میلیمتری سطح زیرین کلاهک محدود می‌شوند و ممکن است به هم متصل شوند و کل سطح کلاهک را بپوشانند (Soler-Rivas et al. 1999). آلودگی در دمای چهار درجه سلسیوس (شرایط یخچال) نیز به تدریج گسترش یافته و باعث تیره شدن، پلاسیدگی، لزجی و یا چسبندگی سطوح کلاهک و پایه می‌شود (Wells et al. 1996). این بیماری علاوه بر قارچ دکمه‌ای، انواع دیگر قارچ‌های خوراکی متعلق به جنس‌های *Lentinula*, *Pleurotus* و *Flammulina* را نیز آلوده می‌کند (Soler-Rivas et al., 1999). باکتری *Pseudomonas tolaasii* Paine 1919 به عنوان عامل اصلی ایجاد لکه قهوه‌ای مطرح می‌باشد؛ اما در منابع همیشه بیش از یک میکروارگانیسم به عنوان عامل لکه باکتریایی قارچ خوراکی معرفی می‌شود که از جمله می‌توان به *P. gingerii* Preece and Wong 1982، *P. reactans* و *P. costantinii* Munsch et al. 2002 (Munch et al. 2002, Wells et al. 1996) اشاره نمود. در

کشت KB، تولید رنگدانه زرد روی محیط کشت YDC، رشد در شرایط هوازی و بی‌هوازی، اکسیداز، کاتالاز، آرژنین دهیدرولاز، لیپاز، تولید لوآن، قدرت لهاندن ورقه-های سیب‌زمینی، واکنش فوق حساسیت روی شمع‌دانی، مصرف قندها (سوربیتول، مانیتول و لاکتوز)، تحمل نمک سه، چهار و شش درصد، حساسیت به جت‌تامایسین، تولید گاز از گلوکز، رشد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و احیای نیترات طبق روشهای معمول باکتری شناسی انجام شد (Schaad et al. 2001).

آزمون بیماری‌زایی

جهت اثبات بیماری‌زایی، جدایه‌ها در ابتدا روی بلوک‌های جدا شده از قارچ مایه‌زنی شدند. بدین منظور، ابتدا کف پتری‌های شیشه‌ای با کاغذ صافی پوشانده شد. در هر پتری یک لام شیشه‌ای قرار داده شد و در آن سترون شدند. از کشت ۲۴ ساعته جدایه‌ها در محیط NA، سوسپانسیون با کدوری معادل ۰/۵ مک‌فارلند (تقریباً 10^8 CFU/ml) در آب مقطر سترون تهیه شد. از بافت کلاهک، بلوک‌هایی با مساحت تقریباً یک سانتی‌متر مربع تهیه شد. بدین صورت که با چاقوی استریل لایه سطحی کلاهک کنار زده شد و از بافت‌های داخلی قطعه‌ای تقریباً مکعب شکل جدا شد. قطعات جدا شده در پتری روی لام قرار داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هر جدایه در سه تکرار روی سطح بلوک‌های قارچی پخش شد (Khabaz Jolfaei et al., 2002). جهت تامین رطوبت، سطح کاغذ صافی مرطوب شد و دور تا دور پتری با پارافیلیم مسدود شد. با توجه به اینکه شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی بلوک‌های جدا شده از بافت قارچ متفاوت بود؛ بیماری‌زایی جدایه‌ها روی کلاهک کامل نیز بررسی شد. به این منظور در حدود ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون

بیماری لکه قهوه‌ای (و سایر باکتری‌های بیماری‌زا)، تحقیق حاضر به منظور بررسی وقوع آلودگی در این مراکز و نیز جهت شناسایی باکتری (یا باکتری‌های) عامل بیماری انجام گرفت.

مواد و روشها

نمونه‌برداری، جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها

طی تابستان ۱۳۹۶ تا بهار ۱۳۹۷، از چندین مرکز پرورش قارچ واقع در چند شهر استان چهارمحال و بختیاری شامل شهرکرد، چوبین، وردنجان و فارسان بازدید به عمل آمد و از قارچ‌های دارای علائم تغییر رنگ بافت از کرم تا قهوه‌ای و سیاه نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شدند. در زمان جداسازی، در تعدادی از نمونه‌ها علاوه بر لکه روی سطح کلاهک و ساقه، نکرور مرکز ساقه نیز مشاهده شد. جداسازی عامل بیماری طبق روش معمول جداسازی باکتری‌ها انجام گرفت. به‌طور خلاصه، قطعاتی از مرز سالم و آلوده جدا و در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضد عفونی سطحی شدند. قطعات پس از شست و شو با آب مقطر سترون، در مقداری آب سترون ریز شدند. پس از گذشت سی دقیقه مقداری از سوسپانسیون حاصله روی محیط کشت آگار مغذی (NA) کشت شد. تمام انواع پرگنه‌های ظاهر شده روی محیط کشت انتخاب و خالص‌سازی شدند. جدایه‌ها (۳۵ جدایه) در آب مقطر سترون و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

جهت شناسایی جدایه‌ها، آزمون‌های مختلف فنوتیپی و بیوشیمیایی شامل گرم، تولید رنگدانه فلورسنت در محیط

معکوس و دو میکرولیتر محلول دی‌ان‌ای تهیه شد. در تیوب شاهد به جای دی‌ان‌ای از آب مقطر سترون استفاده شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf A G, Germany) انجام شد. برنامه دمایی مورد استفاده شامل چهار دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل سه مرحله‌ی واسرشت‌سازی، هم‌جوشی و گسترش هر کدام به مدت یک دقیقه به ترتیب با دمای ۹۴، ۶۳ و ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت ۱۰ دقیقه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. محصول PCR در ژل آگارز حاوی اتیدیوم بروماید بارگذاری و به مدت سی دقیقه در ۷۰ ولت الکتروفورز شد. جهت تخمین اندازه قطعه تکثیر شده نشانگر ۱۰۰ جفت بازی DNA (شرکت سیناژن) همزمان با نمونه در ژل بارگذاری شد. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل در دستگاه UV transluminator مشاهده و عکسبرداری شد.

تکثیر و تعیین ترادف ناحیه‌ی 16S rDNA: جهت

شناسایی جدایه‌های بیماری‌زایی که بی‌هوازی اختیاری بودند و با جفت‌آغازگر Pt-1A/1D نیز ردیابی نشدند و بر این اساس به جنس سودوموناس تعلق نداشتند، بخشی (حدود ۱۵۰۰ جفت باز) از ناحیه‌ی 16S rDNA تعیین ترادف شد. به این منظور ابتدا استخراج دی‌ان‌ای انجام شد. سپس قطعه مورد نظر با اجرای واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از جفت‌آغازگر عمومی 27F و 1492R به ترتیب با ترادف 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (Islam et al. 2016) تکثیر شد. غلظت مواد در هر واکنش مشابه موارد ذکر شده در اجرای PCR با جفت‌آغازگر Pt1A/1D بود. برنامه دمایی مورد استفاده شامل چهار دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و سپس

باکتری (تقریباً 10^8 CFU/ml) بدون ایجاد زخم روی سطح کلاهک پخش شد (Khabaz Jolfaei et al., 2002). در گوشه‌ی هر ظرف حاوی کلاهک‌های مایه‌زنی شده، پنبه سترون مرطوب قرار داده شد و ظروف در کیسه‌های نیلونی قرار داده شدند. لازم به ذکر است مایه‌زنی کلاهک‌ها در مرحله بلوغ و قبل از بازشدن تیغه‌ها انجام شد. بیماری‌زایی جدایه‌ها روی ساقه قارچ نیز بررسی شد. بدین منظور سوسپانسیون باکتری (تقریباً 10^8 CFU/ml) تهیه شده از کشت جوان باکتری با سرنگ به داخل ساقه قارچ خوراکی تزریق شد (Inglis et al. 1996). در این آزمون نیز کف ظرف حاوی قارچ‌های مایه‌زنی شده با کاغذ صافی پوشش داده شد. جهت تامین رطوبت نیز در هر ظرف پنبه سترون مرطوب قرار داده شد. در هر سه آزمون بیماری‌زایی مایه‌زنی نمونه‌های شاهد با آب مقطر سترون انجام شد و نمونه‌های مایه‌زنی شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. علایم حاصل از مایه‌زنی ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد بررسی شد.

شناسایی مولکولی جدایه‌های بیماری‌زا

ردیابی با آغازگرهای اختصاصی: کلیه جدایه‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از جفت‌آغازگر Pt1A/1D مورد آزمون قرار گرفتند. آغازگرهای مذکور به ترتیب با ترادف 5'-ATCCCTTCGGCGTTTACCT G-3' و 3'-CAAAGTAACCCTGCTTCTGC-5' ژن لازم برای تولید تولاسین را تکثیر و بنابراین به طور اختصاصی جدایه‌های *P. tolaasii* را ردیابی می‌کنند (Lee et al. 2002). استخراج دی‌ان‌ای به روش جوشاندن سوسپانسیون باکتری انجام شد. مخلوط واکنش با حجم ۲۰ میکرولیتر و حاوی غلظت IX از مخلوط آماده (Master Mix) تهیه شده از شرکت سیناکلون)، ده پیکومول از هر آغازگر مستقیم و

جدول ۱. مشخصات باکتری‌های جدا شده از قارچ دکمه‌ای از چند مرکز پرورش استان چهارمحال و بختیاری

Table 1. The characteristics of isolates recovered from button mushroom in some cultivation centers of Chaharmahal-o-Bakhtiari province

Number	Code of isolate	Locality (city/cultivation center)	Time of sampling
1	M1	Choobin	Jul-2017
2	M2	Choobin	Jul-2017
3	M3	Choobin	Jul-2017
4	M4	Choobin	Jul-2017
5	M5	Vardanjan	Jul-2017
6	M6	Vardanjan	Jul-2017
7	M8	Vardanjan	Jul-2017
8	M10	Vardanjan	Jul-2017
9	M11	Vardanjan/	Jul-2017
10	Kh3	Farsan/ khosravi	Feb-2018
11	Kh4	Farsan/ khosravi	Feb-2018
12	Kh5	Farsan/ khosravi	Feb-2018
13	Kh6	Farsan/ khosravi	Feb-2018
14	Kh7	Farsan/ khosravi	Feb-2018
15	Kh8	Farsan/ khosravi	Feb-2018
16	Kh9	Farsan/ khosravi	Feb-2018
17	N4	Shahrekd/Negin Fasl	Feb-2018
18	Z4	Farsan/Zardkooh	Feb-2018
19	Z6	Farsan/Zardkooh	Feb-2018
20	Z7	Farsan/Zardkooh	Feb-2018
21	Z8	Farsan/Zardkooh	Feb-2018
22	Z9	Farsan/Zardkooh	Feb-2018
23	Z10	Farsan/Zardkooh	Feb-2018

کد، محل و زمان نمونه برداری ذکر شده است.

آزمون‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی

جدایه‌های بیماری‌زا (جدایه‌هایی که در آزمون بیماری-زایی سبب تغییر رنگ سطح بلوک‌های جدا شده از بافت قارچ شدند) بر اساس ویژگی‌های ظاهری پرگنه و نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی در دو گروه (I و II) قرار گرفتند. این دو گروه از نظر واکنش در آزمون‌های اکسیداز، رشد در شرایط بی‌هوازی، تولید رنگدانه فلورسنت روی محیط King's B، آرژنین دی‌هیدرولاز، هیدرولیز نشاسته و ژلاتین، تولید لیپاز و رشد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس متفاوت بودند (جدول ۲). جدایه‌های گروه I (۱۶ جدایه)

۳۰ چرخه سه مرحله‌ای شامل یک دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای واسرشت‌سازی، چهل ثانیه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس برای هم‌جوشی و یک دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای گسترش و در نهایت ۱۰ دقیقه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. محصول واکنش برای تعیین ترادف به شرکت Microsynth سوئیس ارسال شد. نتایج حاصل از تعیین ترادف با استفاده از نرم افزار Bioedit v7.0.5.3 ویرایش شد و با مقایسه ترادف‌های حاصل از خوانش رفت و برگشت، توالی برایند به دست آمد. توالی حاصل با برنامه BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) در پایگاه اطلاعاتی NCBI با سایر جدایه‌های ثبت شده مقایسه و بررسی شد. جهت واکاوی فیلوژنتیکی چند ترادف مشابه با ترادف جدایه تحقیق حاضر (جدایه M10) از بانک ژن گرفته شد. ترادف‌های مذکور با استفاده از برنامه‌ی MUSCLE (www.ebi.ac.uk/tools/msa/muscle) هم‌ردیف‌سازی شدند. درخت فیلوژنتیکی با روش neighbor joining (NJ) در برنامه MEGA v.10.1.7 ترسیم شد. ترادف سویه تیپ *Escherichia coli* (با شماره دسترسی X80725.1) به عنوان گروه خارجی استفاده شد. اعتبار شاخه‌ها با آزمون Bootstrap با ۱۰۰ تکرار به دست آمد.

نتایج

نمونه برداری و جداسازی

در مجموع از ۱۰۰ جدایه جمع‌آوری شده از سالن‌های پرورش قارچ خوراکی، با در نظر گرفتن خصوصیات ظاهری پرگنه از قبیل رنگ، اندازه، میزان تحذب، حاشیه و قوام، ۳۵ جدایه به عنوان نماینده برای ادامه کار انتخاب شد. در جدول ۱ مشخصات جدایه‌های بیماری‌زا از قبیل

سیب‌زمینی متفاوت بودند و بر این اساس در دو زیرگروه I-a (پنج جدایه) و I-b (۱۱ جدایه) قرار گرفتند. جدایه‌های زیرگروه I-a در شمعدانی واکنش فوق حساسیت ایجاد کردند و قدرت پکتولیتیکی داشتند در حالی که واکنش جدایه‌های I-b در این دو آزمون منفی بود. علاوه بر این پرگنه‌های زیرگروه I-a سفید رنگ و بسیار چسبنده بودند و مدت ماندگاری آنها روی محیط آگار غذایی حداکثر یک ماه بود در حالی که پرگنه‌های زیر گروه I-b به رنگ کرم و با چسبندگی کم بودند و روی محیط آگار غذایی نزدیک به شش ماه زنده می‌ماندند. جدایه‌های گروه II (هفت جدایه شامل کدهای M1, M2, M4, M6, M10, M11 و Kh9)، بی‌هوازی اختیاری، اکسیداز منفی و فاقد رنگدانه فلورسنت بودند و کلونی آنها سفید رنگ بود. ویژگی‌های بیوشیمیایی جدایه‌های دو گروه I و II در جدول ۲ ذکر شده است.

آزمون بیماری‌زایی

تعدادی از جدایه‌ها (۱۲ جدایه) هیچ تغییر رنگی در سطح بلوک جدا شده از بافت قارچ ایجاد نکردند و به عنوان غیربیماری‌زا تلقی شدند. سایر جدایه‌ها (۲۳ جدایه) باعث تغییر رنگ سطح بلوک‌های قارچی شدند که به صورت لکه‌هایی در سطح بلوک مشاهده شد (شکل ۱). این جدایه‌ها به عنوان جدایه‌های بیماری‌زا در نظر گرفته شدند و بیماری‌زایی آنها روی کلاهک سالم و ساقه بررسی شد. شدت تغییر رنگ حاصل از مایه‌زنی این جدایه‌ها در بلوک‌های قارچی در مقایسه با شاهد در سه سطح زیاد، متوسط و کم مشاهده شد (شکل ۱) و بر این اساس جدایه‌ها در سه گروه قرار گرفتند. نکته قابل توجه تطابق و همخوانی گروه بندی جدایه‌ها بر مبنای ویژگی بیماری‌زایی با گروه‌بندی بر مبنای ویژگی‌های فنوتیپی بود. جدایه‌های

جدول ۲. ویژگی‌های فنوتیپی گروه‌های مختلف سویه‌های باکتریایی جدا شده از قارچ دکمه‌ای دارای علائم لکه‌باکتریایی از مراکز پرورش قارچ خوراکی استان چهارمحال و بختیاری (جدایه‌های گروه I-a, I-b و II به ترتیب به‌عنوان جدایه‌های بیماری‌زای *Pseudomonas tolaasii*، جدایه‌های کم بیماری‌زا یا غیربیماری‌زای *P. tolaasii* و *Ewingella americana* شناسایی شدند)

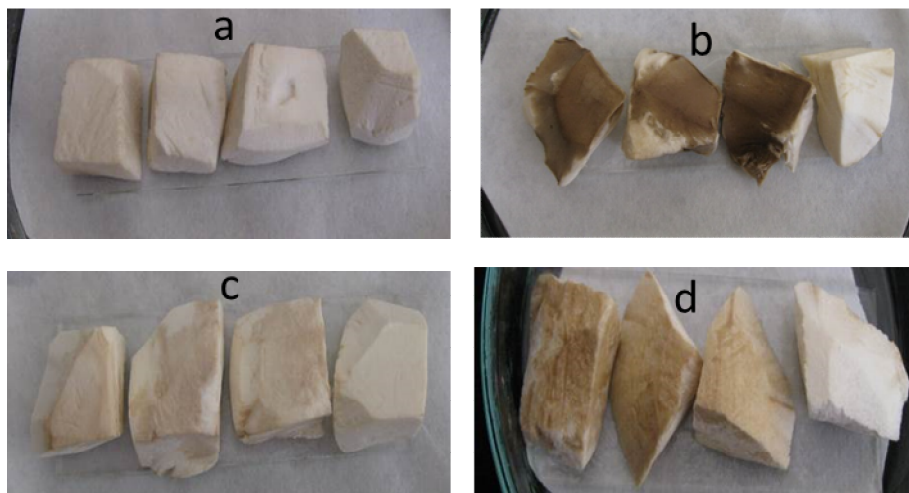
Table 2. Phenotypic characteristics of different groups of bacterial strains, isolated from button mushroom with bacterial blotch symptoms in mushroom cultivation centers of Chaharmahal-o-Bakhtiari Province (The isolates of group I-a, I-b and II were later identified as pathogenic strains of *Pseudomonas tolaasii*, non/low pathogenic strains of *Pseudomonas tolaasii* and *Ewingella americana*, respectively)

Test	Group		
	I-a	I-b	II
Gram reaction	-	-	-
Growth aerobically	+	+	+
Growth anaerobically	-	-	+
Fluorescent pigment on King's B	+	+	-
Yellow pigment on YDC	-	-	-
Oxidase	+	+	-
Catalase	+	+	+
Arginine dehydrolase	+	+	-
Levan formation	-	-	-
Potato rot	+	-	-
Hypersensitivity reaction on geranium	+	-	-
Gelatin hydrolysis	+	+	-
Starch hydrolysis	+	+	-
Utilization of sorbitol	+	+	+
Utilization of manitol	+	+	+
Utilization of lactose	+	+	+
Utilization of glycerol	+	+	+
Sensitivity to gentamicin 10 µg	+	+	+
Tolerane of 3% NaCl	+	+	+
Tolerane of 4% NaCl	+	+	+
Tolerane of 6% NaCl	+	+	+
Lipase	+	+	-
Growth at 37°C	-	-	+
Gas production from glucose	-	-	-

+ : واکنش مثبت، - : واکنش منفی

+ : positive reaction, - : negative reaction

از نظر رنگ و ویژگی‌های پرگنه، ایجاد واکنش فوق حساسیت در شمعدانی و توانایی له کردن ورقه‌های



شکل ۱. علائم حاصل از مایه‌زنی بلوک‌های قارچ *Agaricus bisporus* با انواع باکتری‌های جدا شده از قارچ‌های دارای علائم لکه باکتریایی (۴۸ ساعت بعد از مایه‌زنی): a: مایه‌زنی با جدایه غیربیماری‌زا b: مایه‌زنی با جدایه‌ی گروه I-a (*Pseudomonas tolaasii*) با بیماری‌زایی شدید c: مایه‌زنی با جدایه‌ی گروه I-b (*Pseudomonas tolaasii*) غیر/کم بیماری‌زا d: مایه‌زنی با جدایه‌ی گروه II (*Ewingella americana*). در هر تصویر بلوک سمت راست به عنوان شاهد منفی با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده است.

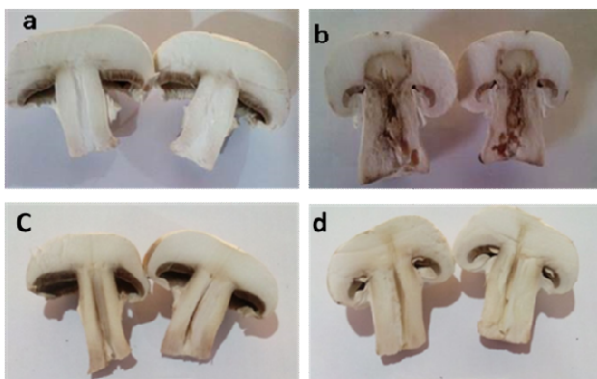
Fig 1. Symptoms on excised tissue blocks of *Agaricus bisporus* elicited by inoculation of bacterial strains isolated from blotched mushroom samples (48 hours after inoculation)- a: inoculated by nonpathogenic strain. b: inoculated by a strain of group I-a (high pathogenic *Pseudomonas tolaasii*). c: inoculated by a strain of group I-b (non/low-pathogenic *Pseudomonas tolaasii*). d: inoculated by a strain of group II (*Ewingella americana*). In each picture, the right block has been inoculated by sterile distilled water as a negative control

در تزریق جدایه‌ها در ساقه‌ی قارچ، جدایه‌های گروه II منجر به نکروز و قهوه‌ای شدن مرکز ساقه شدند. درحالی- که جدایه‌های گروه I (هر دو زیرگروه) در ساقه غیربیماری‌زا بودند و در محل تزریق تغییر رنگ بسیار جزئی ظاهر شد (شکل ۳).

شناسایی مولکولی

ردیابی با آغازگرهای اختصاصی: در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با استفاده از جفت‌آغازگر Pt-1A/1D، در تمام جدایه‌های گروه I قطعه‌ی مورد انتظار (تقریباً ۴۵۰ جفت‌بازی) تکثیر شد. این قطعه در هیچ کدام از جدایه‌های گروه II ردیابی نشد (شکل ۴). بر مبنای خصوصیات بیوشیمیایی نیز تعلق جدایه‌های گروه I به جنس *Pseudomonas* تایید شده بود. همچنین با توجه به

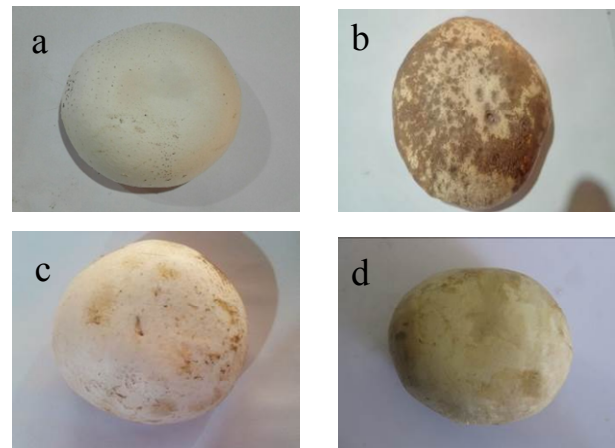
زیرگروه I-a باعث تغییر رنگ شدید (قهوه‌ای تیره) و سریع (در کمتر از ۲۴ ساعت) بلوک جدا شده از بافت قارچ (و کلاهک) شدند. جدایه‌های زیرگروه I-b در سطح بلوک جدا شده از بافت قارچ تغییر رنگ جزئی ایجاد کردند و روی کلاهک سالم غیربیماری‌زا بودند یا تغییر رنگ بسیار جزئی ایجاد نمودند. تغییر رنگ حاصل از جدایه‌های گروه II در بلوک قارچی حدواسط تغییر رنگ ایجاد شده توسط جدایه‌های دو زیرگروه I-a و I-b بود. این گروه در سطح کلاهک منجر به تغییر رنگ بسیار جزئی شدند. لازم به ذکر است زمان ظهور علائم در جدایه‌های I-b و II بیش از ۲۴ ساعت (از ۳۰ تا ۴۸ ساعت) بود. شکل‌های ۱ و ۲ به ترتیب علائم حاصل از مایه‌زنی جدایه‌ها بر بلوک جدا شده از بافت قارچ و کلاهک را نشان می‌دهند.



شکل ۳. ساقه‌های قارچ *Agaricus bisporus* مایه‌زنی شده با سویه‌های باکتریایی جدا شده از قارچ‌های دارای علائم لکه باکتریایی، ۴۸ ساعت بعد از مایه‌زنی. a: شاهد (مایه‌زنی شده با آب مقطر سترون). b: مایه‌زنی با جدایه گروه II (*Ewingella americana*) با علائم واضح از نکروز و قهوه‌ای شدن بافت‌های داخلی. c: مایه‌زنی با جدایه زیرگروه I-a (*Pseudomonas tolaasii*) با بیماری‌زایی شدید). d: مایه‌زنی با جدایه زیرگروه I-b (*Pseudomonas tolaasii*) غیر/کم بیماری‌زا).

Fig 3. Stipes of *Agaricus bisporus* inoculated by bacterial strains isolated from mushrooms with bacterial blotch symptoms, 48 hours after inoculation. a: negative control inoculated by sterile distilled water b: inoculated by isolate belonging to group II (*Ewingella americana*) showing clear internal browning of the tissue c: inoculated by isolate belonging to subgroup I-a (high pathogenic *Pseudomonas tolaasii*) d: inoculated by isolate belonging to subgroup I-b (non or low pathogenic *Pseudomonas tolaasii*)

(bmit/ ثبت شد. مقایسه ترادف این قطعه با ترادف‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان داد، این ترادف بیشترین تشابه (بیش از ۹۹/۹ درصد) را با ترادف مربوط به ژن 16S rRNA باکتری *Ewingella americana* (به طور مثال شماره‌های دسترسی: MG334385.1، KY126990.1، KY126989.1) دارد. با در نظر گرفتن نتایج حاصل از تعیین ترادف ناحیه 16S rDNA و نیز بر اساس نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی و بیماری‌زایی جدایه‌های

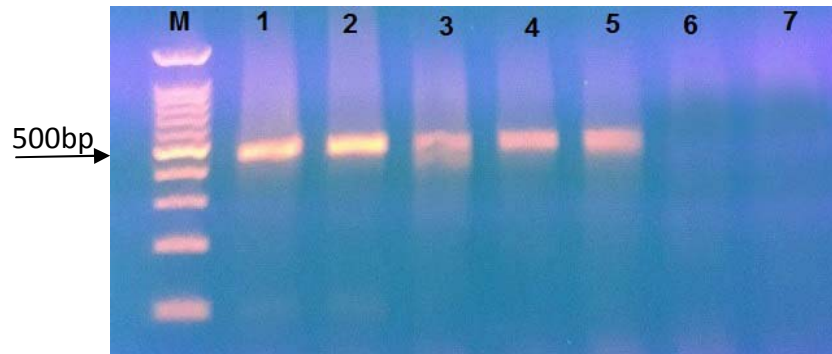


شکل ۲. علائم حاصل از مایه‌زنی کلاهک‌های قارچ *Agaricus bisporus* با سویه‌های باکتریایی جدا شده از قارچ‌های دارای علائم لکه باکتریایی (۴۸ ساعت بعد از مایه‌زنی). a: شاهد مایه‌زنی شده با آب مقطر b: مایه‌زنی با جدایه‌ای از گروه I-a (*Pseudomonas tolaasii*) با بیماری‌زایی شدید) c: مایه‌زنی با جدایه‌ای از گروه I-b (*Pseudomonas tolaasii*) غیر/کم بیماری‌زایی شدید). d: مایه‌زنی با جدایه‌ای از گروه II (*Ewingella americana*)

Fig 2. Symptoms on caps of *Agaricus bisporus* elicited by inoculation of bacterial strains isolated from blotched mushroom samples (48 hours after inoculation). a: negative control inoculated by sterile distilled water. b: inoculated by a strain of group I-a (high pathogenic *Pseudomonas tolaasii*). c: inoculated by a strain of group I-b (non/low-pathogenic *Pseudomonas tolaasii*). d: inoculated by a strain of group II (*Ewingella americana*).

اینکه جدایه‌های گروه II قادر به تخمیر گلوکز در شرایط بی‌هوازی بودند؛ مشخص شده بود که این جدایه‌ها غیرسودوموناس هستند. این جدایه‌ها علاوه بر تخمیر بی‌هوازی گلوکز در سایر مشخصات فنوتیپی مانند اکسیداز، آرژنین دی‌هیدرولاز و... نیز از جدایه‌های گروه I متفاوت بودند (جدول ۲).

تعیین ترادف قطعه 16Ss rDNA: بخشی از ناحیه 16S rDNA از یکی از جدایه‌های گروه II (جدایه M10) تعیین ترادف شد و با شماره دسترسی MK334665 در بانک ژن <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/su>



شکل ۴. نقوش الکتروفورزی محصولات PCR تکثیر شده از باکتری‌های جدا شده از قارچ خوراکی با استفاده از جفت‌آغازگر Pt-1A/1D. راهک M: نشانگر مولکولی ۱۰۰ bp، راهک‌های ۱-۳: جدایه‌های زیرگروه I-a (*Pseudomonas tolaasii*) با بیماری‌زای شدید)، راهک‌های ۴ و ۵: جدایه‌های زیر گروه I-b (*Pseudomonas tolaasii*) غیر/کم بیماری‌زا)، راهک ۶: جدایه گروه II (*Ewingella americana*). راهک ۷: کنترل منفی (آب مقطر).

Fig 4. Electrophoresis pattern of PCR products amplified from bacterial strains isolated from cultivated mushrooms using primer set Pt-1A/Pt-1D1. Lane M: 100bp DNA marker, Lanes 1-3: isolates of group I-a (high pathogenic isolates of *Pseudomonas tolaasii*). Lanes 4-5: isolates of group I-b (non/low-pathogenic isolates of *Pseudomonas tolaasii*). Lanes 6: isolates of group II (*Ewingella americana*). Lanes 7: negative control (distilled water)

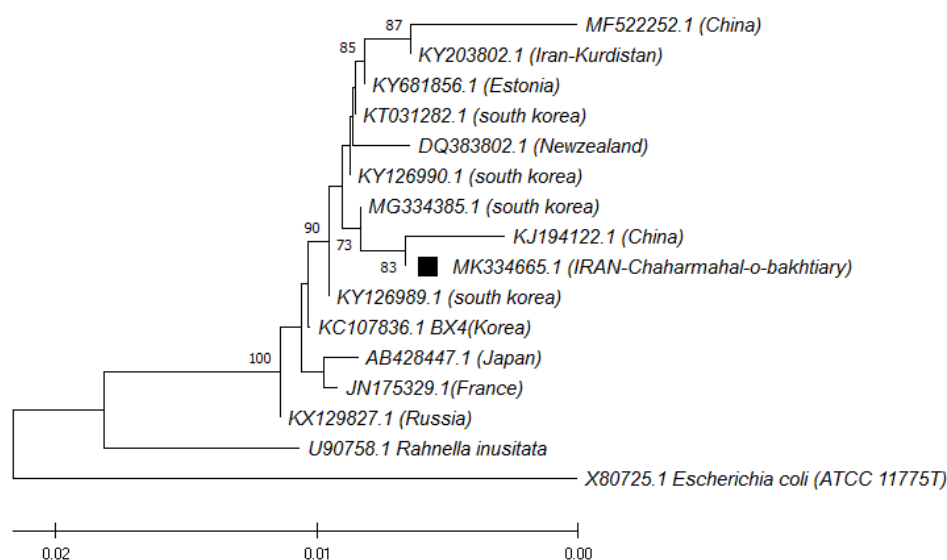
عنوان *P. tolaasii* و هفت جدایه به عنوان *E. americana* شناسایی شدند. دوازده جدایه نیز غیربیماری‌زا بودند و روی بلوک جدا شده از بافت قارچ هیچ گونه تغییر رنگی ایجاد نکردند. خصوصیات فنوتیپی سویه‌های بیماری‌زای *P. tolaasii* جدا شده در تحقیق حاضر با خصوصیات فنوتیپی جدایه‌های *P. tolaasii* توصیف شده از سایر مناطق ایران (مناطق مرکزی و شمالی) و بعضی مناطق دنیا از جمله مصر، اسپانیا و بلژیک از نظر تولید رنگدانه فلورسنت، تولید اکسیداز و کاتالاز، عدم تولید لوآن، مثبت بودن واکنش آرژنین دهیدرولاز، عدم رشد در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و استفاده از منابع کربنی مانیتول و سوربیتول، گلیسرول و لاکتوز مطابقت دارد ولی از نظر دو آزمون فوق‌حساسیت و قدرت لهاندن ورقه‌های سیب‌زمینی متفاوت هستند (Abouzeid *et al.* 2012, Akhlaghi *et al.* 2015, Ansari dezpholi *et al.* 2012, González *et al.* 2009, Goor *et al.* 1986, Khabbaz & Rahimian

گروه II به عنوان *E. americana* (Enterobacteriales) تشخیص داده شدند.

با استفاده از ترادف ناحیه 16s rDNA مربوط به جدایه‌های *E. americana* مختلف که از بانک ژن اخذ شد، درخت فیلوژنتیکی با روش neighbor joining (NJ) رسم شد (شکل ۵). نتایج بیانگر شباهت و نزدیکی جدایه‌های مختلف به یکدیگر است. جدایه تحقیق حاضر با شماره دسترسی Mk334665.1 دارای نزدیکترین ارتباط فیلوژنتیکی با جدایه چین (KJ1994122.1) و جدایه کره جنوبی (MG334385.1) است.

بحث

هدف از تحقیق حاضر بررسی عوامل مولد لکه باکتریایی در چند مرکز پرورش قارچ خوراکی واقع در استان چهارمحال و بختیاری بود. از ۳۵ جدایه انتخاب شده، براساس آزمون‌های فنوتیپی و مولکولی ۱۶ جدایه به



شکل ۵. درخت فیلوژنی ایجاد شده به روش Neighbor-joining بر اساس ترادف بخشی از ناحیه 16s rDNA جدایه‌های باکتری *Ewingella americana*. اعداد نزدیک محل انشعاب هر شاخه میزان آزمون اعتبارسنجی از ۱۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. جدایه تحقیق حاضر (MK334665.1) با علامت ■ نمایش داده شده است. باکتری *Escherichia coli* (ATCC11775T) به عنوان گروه خارجی استفاده شده است. ترادف مربوط به گونه *Rhanella insuitata* از اعضای خانواده Yersiniaceae نیز در رسم درخت استفاده شده است.

Fig 5. Phylogenetic distance tree constructed by the neighbor-joining method, comparing the 16S rDNA sequences of *Ewingella americana* isolates. Bootstrap values are shown as percentages of 100 replicates at the branch point. The isolate recovered in this study (MK334665.1) has been indicated by ■. *Escherichia coli* (ATCC11775T) was included as out-group. The sequence of *Rhanella insuitata* from Yersiniaceae was also used

از لحاظ خصوصیات فنوتیپی در دو زیرگروه I-a و I-b قرار گرفتند که این دو زیرگروه از نظر شدت بیماری‌زایی نیز متفاوت بودند. خبازجلفائی و رحیمیان (Khabbaz & Jolfaei & Rahimian 2002) جدایه‌های *P. tolaasii* جدا شده از استان‌های مرکزی و شمالی را بر مبنای شدت علائم در چهار گروه قرار دادند ولی بین این چهار گروه تفاوت فنوتیپی مشخصی مشاهده نکردند. یعنی برخلاف تحقیق حاضر، گروه‌بندی جدایه‌ها بر مبنای خصوصیات فنوتیپی به گونه‌ای که با گروه‌بندی بر مبنای شدت بیماری‌زایی همخوانی داشته باشد ممکن نبود.

کلونی‌های *P. tolaasii* وقتی روی محیط King's B یا PAF (Pseudomonas Agar F) کشت می‌شوند، بعد از

واکنش جدایه‌های کشور ترکیه مانند جدایه‌های تحقیق حاضر در دو آزمون لهندن ورقه‌های سیب‌زمینی و فوق حساسیت (در توتون) مثبت گزارش شده است (Basim & Basim 2018). در بعضی دیگر از خصوصیات فنوتیپی نیز بین جدایه‌های استان چهارمحال و بختیاری و جدایه‌های سایر مناطق اختلافی مشاهده شد. به طور مثال این جدایه‌ها با جدایه‌های بلژیک در آزمون‌های تحمل نمک طعام شش درصد، هیدرولیز نشاسته و حساسیت به جنتامایسین (Goor et al. 1986) و با جدایه‌های مناطق شمالی و مرکزی ایران در آزمون هیدرولیز نشاسته متفاوت بودند (Khabbaz jolfaei & Rahimian 2002). جدایه‌های *P. tolaasii* پژوهش حاضر

را دقیقاً معادل واریانت فنوتیپی گزارش شده در منابع معرفی نمود.

علت اصلی بروز علائم بیماری لکه باکتریایی تولید یک توکسین لیپودپسی‌پتیدی به نام تولاسین توسط *P. tolaasii* می‌باشد (Brodey et al. 1991) ولی توانایی جذب و اتصال *P. tolaasii* به ریشه *A. bisporus* نیز در مراحل اولیه‌ی توسعه‌ی بیماری مهم هستند (Grewal et al. 1995). تیپ وحشی *P. tolaasii* و واریانت فنوتیپی آن از نظر توانایی جذب (شیمی‌گرایی) به تراوشات ریشه‌ی قارچ *A. bisporus* و اتصال به آن تفاوت قابل توجهی نشان داده اند (Grewal & Rainey 1991, Rainey 1991). از آن جایی که در تحقیق حاضر وجود ژن مربوط به تولید تولاسین در سویه‌های غیر/کم بیماری‌زا (جدایه‌های زیرگروه I-b) با آزمون PCR تایید شد، احتمالاً در این جدایه‌ها به دلایلی از قبیل ضعف در جذب یا اتصال جدایه‌ها به ریشه قارچ یا عدم توانایی نفوذ در بافت سالم یا دلایل ناشناخته دیگر بیان این ژن صورت نمی‌گیرد یا تا حد زیادی کاهش می‌یابد. در مطالعه‌ی صورت گرفته توسط اخلاقی و همکاران (Akhlaghi et al. 2015) بین میزان تولید سیدروفور پایورودین و شدت بیماری‌زایی رابطه مستقیم مشاهده شد؛ بنابراین ممکن است دو زیرگروه I-a و I-b علاوه بر سطح تولید تولاسین، از نظر میزان تولید سیدروفور نیز متفاوت باشند. در آزمون بیماری‌زایی، جدایه‌های زیرگروه I-b منجر به تغییر رنگ بافت بلوک جدا شده از قارچ شدند اما در کلاهک سالم تغییر رنگ ایجاد نکردند یا باعث تغییر رنگ جزئی شدند؛ لذا باتوجه به اینکه در تهیه بلوک قارچی لایه سطحی بافت کلاهک حذف شد، احتمالاً این جدایه‌ها در نفوذ به بافت سالم ناتوان هستند و در صورت وجود زخم در ساقه یا کلاهک سویه‌های غیربیماری‌زا قادر به نفوذ در بافت و

گذشت چند روز به دو فرم ظاهر می‌شوند: فرم صاف (smooth) یا تیپ وحشی که بیماری‌زا است و دارای پرگنه‌های گرد با سطح صاف و حاشیه یکنواخت، سفید مایل به زرد، مات، کوچک به قطر یک تا دو میلی‌متر، محدب و غیرفلورسنت است و قدرت بیماری‌زایی دارد و فرم ناصاف یا خشن (rough) یا واریانت فنوتیپی که غیربیماری‌زا است و دارای پرگنه‌های با شکل نامنظم، سطح گرانوله و حاشیه‌ی موج‌دار، زرد مایل به سبز، شفاف، تخت با قطر چهار تا شش میلی‌متر و فلورسنت است و به صورت سکتور در حاشیه پرگنه‌های صاف ظاهر می‌شود. از نظر خصوصیات بیوشیمیایی تفاوت واریانت فنوتیپی و تیپ وحشی عدم توانایی تولید تولاسین، عدم هیدرولیز کازئین، توانایی تولید رنگدانه فلورسنت و حرکت سریع‌تر در واریانت فنوتیپی گزارش شده است (Cutri et al. 1984, Grewal et al. 1995). گور و همکاران (Goor et al. 1986) در بین جدایه‌های *P. tolaasii* جدا شده از بلژیک چند سویه غیربیماری‌زا گزارش نمودند. ایشان از نظر خصوصیات فنوتیپی اصلی اختلاف فاحشی بین سویه‌های بیماری‌زا و غیربیماری‌زا مشاهده نکرده و نیز عنوان نمودند که تمام سویه‌های غیربیماری‌زا به صورت پرگنه واریانت در حین کشت مجدد (sub-culturing) فرم‌های بیماری‌زا حاصل شدند. سویه‌های غیر/کم بیماری‌زای تحقیق حاضر از نظر ویژگی‌هایی ظاهری پرگنه مانند رنگ و مات یا شفاف بودن پرگنه با واریانت فنوتیپی توصیف شده در منابع تفاوت دارند. از طرفی این سویه‌ها در اولین کشت که به منظور جداسازی باکتری از بافت بیمار انجام شد، روی سطح محیط کشت ظاهر شدند و در طول تحقیق حتی یک مورد ظهور سکتور در پرگنه‌های مورد بررسی مشاهده نشد. با توجه به موارد اشاره شده، بعید است که بتوان سویه‌های غیر/کم بیماری‌زای تحقیق حاضر

بروز علائم اندک باشند.

ژن *pheN* به عنوان عامل کنترل‌کننده قابلیت بیماری‌زایی و تغییر فرم *P. tolaasii* از حالت بیماری‌زا به غیربیماری‌زا معرفی شده است. این ژن کدکننده‌ی پروتئینی با فعالیت سنسورکینازی است که نسخه‌برداری سایر ژن‌ها مانند ژن‌های دخیل در تولید سیدروفور، تولید تولاسین، تحرک و... را در پاسخ به شرایط محیطی تنظیم می‌کند. بیان این ژن بستگی به شرایط محیطی دارد به‌طوری‌که فقدان مواد غذایی و نیز تولید ترکیبات تنظیمی توسط باکتری (autoregulator) منجر به کاهش بیان این ژن و ظهور واریانت‌های غیربیماری‌زا می‌شود. نوآرایی (rearrangement) دی ان ای و مضاعف شدن (duplication) یک عنصر ۶۶۱ جفت‌بازی در جایگاه *pheN* با تغییر در چهارچوب خوانش منجر به تولید پروتئین ناکارا و در نتیجه ظهور واریانت‌های فنوتیپی می‌شود (Han et al. 1997). تغییر فرم از تیپ وحشی به واریانت فنوتیپی برگشت پذیر است و بنابراین امکان تغییر فرم غیربیماری‌زا به بیماری‌زا وجود دارد (Grewal et al. 1995). البته همیشه کاهش بیماری‌زایی سویه‌ها به ژن *pheN* نسبت داده نشده است؛ به طور مثال مامون و همکاران (Mamoun et al. 1997) علت کاهش بیماری‌زایی در یک سویه خودبخود جهش یافته‌ی *P. tolaasii* را به عدم وجود یک مولکول دی ان ای خارج کروموزومی در سویه موتانت نسبت دادند. وارد کردن این فاکتور خارج کروموزومی به سویه موتانت منجر به افزایش مقدار تولید تولاسین و بازیابی بیماری‌زایی شد. بر طبق گزارش ایشان سویه‌ی وحشی و سویه‌ی موتانت از نظر ژن *pheN* تفاوتی نداشتند. صرف‌نظر از اینکه علت ظهور سویه‌های غیر/کم بیماری‌زا در مراکز مورد بررسی تحقیق حاضر چه باشد، این نکته قابل توجه است که در این بررسی علی‌رغم

بیشتر بودن تعداد سویه‌های غیر/کم بیماری‌زای جدا شده از هر مرکز نسبت به سویه‌های بیماری‌زا، درصد بالای وقوع بیماری در مراکز مورد بررسی (بر اساس مشاهدات نگارندگان) بیانگر این موضوع است که وجود سویه‌های غیربیماری‌زای *P. tolaasii* در سالن‌های پرورش قارچ تهدیدی برای محصول محسوب می‌شود و امکان تغییر این جدایه‌ها به فرم بیماری‌زا در شرایط طبیعی وجود دارد.

باکتری *E. americana* به عنوان عامل نکروز داخلی ساقه قارچ خوراکی معرفی شده است. ایجاد نکروز شدید مرکز ساقه توسط این باکتری به فعالیت کیتینولیتیک آن نسبت داده شده است. در مرکز ساقه قارچ کیتین به خوبی شکل نگرفته است و به همین دلیل مرکز ساقه به آنزیم کیتیناز بیشتر حساس است (Inglis & Peberdy 1997). در تحقیق حاضر، تعدادی از قارچ‌های نمونه‌برداری شده علاوه بر لکه‌های سطحی، در قسمت مرکز ساقه علائم تیپیک سیاه‌شدگی داشتند که از آنها باکتری *E. americana* جدا شد. خصوصیات فنوتیپی توصیف شده برای جدایه‌های *E. americana* در تحقیق حاضر از نظر واکنش منفی در آزمون لیپاز و آرژنین دهیدرولاز، مصرف منابع کربنی مانیتول و لاکتوز، عدم تولید گاز از گلوکز و عدم هیدرولیز ژلاتین با خصوصیات توصیف شده توسط ریز و همکاران (Reyes et al. 2004) مطابقت داشت. نتایج واکاوی فیلوژنتیکی بر مبنای ترادف ژن 16S rRNA بیانگر شباهت و نزدیکی جدایه‌های *E. americana* با منشا و میزبان مختلف به یکدیگر است. با توجه به شباهت زیاد 16S rDNA در بین جدایه‌ها، پیشنهاد می‌شود جهت آشکارسازی اختلاف بین جدایه‌ها واکاوی فیلوژنتیکی بر مبنای ژنهای کمترحفاظت شده انجام شود.

به طور کلی براساس نتایج تحقیق حاضر به نظر می‌رسد عامل اصلی بروز خسارت در مراکز پرورش قارچ استان

در مراکز پرورش قارچ خوراکی مطرح است؛ اکثر محققین برای جداسازی عامل بیماری از محیط king's B که یک محیط انتخابی برای جنس سودوموناس است، استفاده می‌کنند و در بین پرگنه‌های رشد یافته، فقط پرگنه‌های فلورسنت را انتخاب می‌کنند؛ بنابراین حضور باکتری *E. americana* نادیده گرفته می‌شود. لذا پیشنهاد می‌شود محققین در زمان جداسازی، جدایه‌های غیرفلورسنت را نیز انتخاب نمایند و بیماری‌زایی جدایه‌ها را روی بلوک قارچی، روی کلاهک و روی ساقه مورد آزمون قرار دهند تا وضعیت وجود سویه‌های غیربیماری‌زای *P. tolaasii* و نیز *E. americana* در سایر مراکز مشخص شود.

چهارم‌حال و بختیاری باکتری *P. tolaasii* باشد؛ ولی تاثیر جدایه‌های *E. americana* نیز نباید نادیده گرفته شود و باید مورد بررسی بیشتر قرار بگیرد. در ایران اطلاعات کمی در مورد شیوع انتروباکتریاسه در مراکز پرورش قارچ در دسترس است و بیشتر مطالعات روی سودومونادها متمرکز شده است؛ به‌طوری‌که *E. americana* فقط از کردستان گزارش شده است (Aslani et al. 2018) و تحقیق حاضر دومین گزارش این باکتری از ایران و اولین گزارش از استان چهارم‌حال و بختیاری می‌باشد. احتمالاً *E. americana* در سایر مناطق کشور نیز وجود دارد ولی از آن جایی که *P. tolaasii* به‌عنوان عامل اصلی خسارت‌زا

منابع

- Abou-Zeid M. A. 2012. Pathogenic variation in isolates of *Pseudomonas* causing the brown blotch of cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (3): 1137-1146.
- Adeolu M., Alnajjar S., Naushad S. and Gupta R. S. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66: 5575-5599.
- Akhlaghi M., Tarighi S., Farsi M. and Taheri P. 2015. Identification and investigation of some virulence factors of *Pseudomonas tolaasii* isolated from mushroom in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51(4) 399-412 (In Persian with English summary).
- Ansari Dezfooli N., Hasanzadeh N., Rezaee B. and Ghasemi A. 2012. Antibacterial Activity and Chemical Compositions of *Chamaemelum nobile* Essential Oil/Extracts against *Pseudomonas tolaasii*, the Causative Agent of Mushroom Brown Blotch. *Annals of Biological Research* 3 (6):2602-2608.
- Aslani M. A., Harighi B. and Abdollahzadeh J. 2018. Screening of endofungal bacteria isolated from wild growing mushrooms as potential biological control agents against brown blotch and internal stipe necrosis diseases of *Agaricus bisporus*. *Biological Control* 119: 20-26.
- Basim E. and Basim H. 2018. Characterization of *Pseudomonas tolaasii* isolates, causing brown blotch disease of mushroom (*Agaricus bisporus*). *International Journal of Agriculture and Biology* 20(12):2721-2730.
- Braithwaite M., Pay J. M. and Eade K. 2005. First record of *Ewingella americana* on cultivated mushrooms in New Zealand. In *Proceeding and Abstract of the 15th Biennial Australasian Plant Pathology Conference*. p. 96.
- Brodey C., Rainey P. B., Tester M. and Johnstone K. 1991. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 4:407-411.
- Cole A. L. J. and Skellrup M. 1986. Ultrastructure of interaction of *Agaricus bisporus* and *Pseudomonas tolaasii*. *Transaction of the British Mycological Society* 87(2): 314-316.
- Cutri S. S., Macauley J. B. and Roberts, W. P. 1984. Characteristics of pathogenic non-fluorescent (smooth) and non-pathogenic fluorescent (rough) forms of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas gingeri*. *Journal of Applied Bacteriology* 51: 291-298.
- Devreese K., Claeys G. and Verschraegen G. 1992. Septicemia with *Ewingella americana*. *Journal of Clinical Microbiology* 30(10): 2746-2747.

- González A. J., González-Varela G. and Gea F. J. 2009. Brown blotch caused by *Pseudomonas tolaasii* on cultivated *Pleurotus eryngii* in Spain. *Plant Disease* 93(6): 667.
- Goor M., Vantomme R., Swings J., Gillis M., Kersters K. and Deley J. 1986. Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. *Journal of General Microbiology* 132: 2249-2264.
- Grewal S. I., Han B. and Johnstone K. 1995. Identification and characterization of a locus which regulates multiple functions in *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *Journal of Bacteriology* 177(16): 4658-4668.
- Grewal S. I. S and Rainey P. B. 1991. Phenotypic variation of *Pseudomonas putida* and *P. tolaasii* affects the chemotactic response to *Agaricus bisporus* mycelial exudate. *Microbiology* 137(12): 2761-2768.
- Grimont P. A. D., Farmer J. J., Grimont F., Asbury M. A., Brenner D. J. and Deval C. 1983. *Ewingella americana* gen. nov., sp. nov., a new Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. In *Annales De l'Institut Pasteur/Microbiologie*. 134: 39-52.
- Han B., Pain A. and Johnstone K. 1997. Spontaneous duplication of a 661bp element within a two component sensor regulator gene causes phenotypic switching in the colonies of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of mushrooms. *Molecular Microbiology* 25:211-218.
- Heizmann W. R. and Michel R. 1991. Isolation of *Ewingella americana* from a patient with conjunctivitis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 10(11): 957-959.
- Inglis P. W. and Peberdy J. F. 1997. Production and purification of a chitinase from *Ewingella americana*, a recently described pathogen of the mushroom, *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiology Letters*. 157(1): 189-194.
- 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: 3253-3260.
- Inglis P. W. and Peberdy J. F. 1996. Isolation of *Ewingella americana* from the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Current Microbiology* 33: 334-337.
- Islam S., Akanda A. M., Prova A., Islam M. T. and Hossain M. M. 2016. Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from cucumber rhizosphere and their effect on plant growth promotion and disease suppression. *Frontiers in Microbiology* 6: 1-12.
- Khabaz Jolfaei H. and Rahimian H. 2002. Brown blotch disease of cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 38: 1-10 (In Persian with English summary).
- Lee C. J., Jhune C. S., Cheong J. C., Yun H. S. and Cho W. D. 2009. Occurrence of internal stipe necrosis of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*) caused by *Ewingella americana* in Korea. *Mycobiology* 37(1): 62-66.
- Lee H. I., Jeong K. S. and Cha J. S. 2002. PCR assays for specific and sensitive detection of *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of mushrooms. *Letters in Applied Microbiology* 35(4): 276-280.
- Madbouly A. K., El-Shatoury E. H. and Abouzeid M. A. 2014. Etiology of stipe necrosis of cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*) in Egypt. *Phytopathologia Mediterranea* 53(1): 124-129.
- Mamoun M., Moquet F., Laffitte J. and Olivier J. M. 1997. *Pseudomonas tolaasii*: extra-genomic factor mediates toxin production and efficiency. *FEMS Microbiology Letters*: 153: 215-219.
- Mohammadi Goltape E. and Pourjam E. 1995. Bacterial brown blotch of cultivated mushroom in Iran. *Proceeding of 12th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran*. P. 389.
- Munsch P., Alatosava, T., Martinen 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 Microbiology* 52: 1973-1983.
- Rainey P. B. 1991. Phenotypic variation of *Pseudomonas putida* and *P. tolaasii* affects attachment to *Agaricus bisporus* mycelium. *Journal of General Microbiology* 137: 2769-2779.
- Rahimian H. and Zarei A. 1995. Bacterial brown blotch of cultivated mushroom in Mazandaran. *Proceedings of 12th Plant Protection Congress, Karaj, Iran*. P. 372.
- Rahimian H. and Zarei A. 1996. Association of *Pseudomonas* species with basidiocarp collapse of *Scleroderma*. *Plant Disease*. 32: 41.
- Schaad N. W., Jones J. B. and Chun W. 2001. Laboratory guid for identification of plant pathogenic bacteria.

- American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 373p.
- Soler-Rivas C., Jolivet S., Arpin N., Olivier J. M. and Wichers H. J. 1999. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. FEMS Microbiology Reviews 23(5): 591-614.
- Wells J. M., Sapers G. M., Fett W. F., Butterceld J. E., Jones J. B., Buzar H. and Miller F. C. 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans* and *P. gingeri*. Phytopathology 86(10): 1098-1103.