

## سنجش کارایی آزمون‌های فنوتیپی و روش rep-PCR در تفکیک جغرافیایی سویه‌های عامل لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی، *Pseudomonas tolaasii*، در استان فارس

محمدعلی رضانی<sup>۱</sup>، گیلدا نجفی پور\*<sup>۲</sup>، کاوس ایازپور<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۴، ش.ص ۴۱-۱۷، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۲/۳۰)

### چکیده

عامل ایجاد کننده‌ی لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی (*Pseudomonas tolaasii*)، (Brown Blotch)، است که در بسیاری از نقاط دنیا مشاهده می‌شود. طی سال‌های ۹۶ و ۹۷ از سال‌های پرورش قارچ در مناطق مختلف استان فارس (جهرم، شیراز، لار، سپیدان، کازرون، نیریز و آباده) نمونه برداری صورت گرفت و به آزمایشگاه منتقل شد. در مجموع ۱۰۰ جدایه از مناطق مذکور به دست آمد. تمامی جدایه‌ها به منظور بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای و نیز وجود ژن تولاسین با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PT1A و PT1D1 مورد بررسی قرار گرفتند. سویه‌های مورد بررسی میله‌ای شکل، گرم منفی و هوازی اجباری بوده و آزمون‌های اکسیداز و آرژنین دی هیدرولاز آن‌ها مثبت بود. همچنین توانایی ایجاد لهدیگی در ورقه‌های سیب زمینی، تولید لوان، هیدرولیز نشاسته و فوق حساسیت روی توتون (HR)<sup>۳</sup> برای تمامی جدایه‌ها منفی ارزیابی شد. در بررسی تنوع ژنوتیپی باکتری، با استفاده از روش rep-PCR مشخص شد که با استفاده از آغازگرهای مذکور، جدایه‌های مناطق مختلف استان فارس به شش یا هفت گروه متمایز تقسیم می‌شوند. کلاسترهای ایجاد شده در بسیاری موارد، با پراکنش جغرافیایی جدایه‌ها هماهنگی نسبی داشت. نتایج نشان داد آزمون rep-PCR بوسیله‌ی هر یک از آغازگرهای سه گانه‌ی REP، ERIC و BOX بطور انفرادی می‌تواند بطور مشخصی جدایه‌های مناطق مختلف استان را بر اساس منطقه جغرافیایی از یکدیگر تفکیک نماید. همچنین مقایسه بین گروه‌های ایجاد شده بر اساس آزمون بیماری‌زایی روی قارچ دکمه‌ای و کلاسترهای ایجاد شده در آزمون rep-PCR نشان داد که کلاسترهای ایجاد شده در آزمون rep-PCR بر اساس بیماری‌زایی با یکدیگر مشابه می‌باشند.

**واژه‌های کلیدی:** *Pseudomonas tolaasii*، استان فارس، rep-PCR، لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی.

<sup>۱</sup> - دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی

<sup>۲</sup> - استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه گیاهپزشکی، جهرم، ایران

\*- نویسنده مسئول مقاله: [gildanajafipour@gmail.com](mailto:gildanajafipour@gmail.com)

<sup>۳</sup> - Hypersensitive reaction

## مقدمه

بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی، اولین بار به وسیله تولاس، شناسایی و نام *P. tolar* برای آن پیشنهاد گردید (Tolass, 1915). در سال ۱۹۷۹ ونگ و پرس، مجدداً بیماری توصیف و نام عامل بیماری به عنوان *P. tolaasii* تایید شد. همچنین آن‌ها دو آزمون اختصاصی جهت شناسایی *P. tolaasii* شامل لهیدگی سریع کلاهک روی بلوک و تولید خط سفید را پیشنهاد نمودند (Wong and Preece, 1979). این بیماری تاکنون از مناطق مختلف دنیا گزارش شده و بررسی‌های مختلفی روی آن انجام شده است (Kim et al., 2007; Wong and Preece, 1982; Wong and Preece, 1980; Khabaz Jolfaei and Rahimian, 2003; Gonzales, 2006; Yangche et al., 1999; Wells et al., 1996; Wong and Preece, 1985). کیم و همکاران در سال ۲۰۰۷ عامل بیماری در کره جنوبی را *P. tolaasii* معرفی و راه‌های کنترل بیولوژیک این بیماری در کره جنوبی را بررسی کردند (Kim et al., 2010). در سال ۱۹۹۹ در پژوهشی در کره، یانگ چی و همکاران مشاهده نمودند بین *P. tolaasii* جدا شده از مراکز کشت قارچ در کره جنوبی و دیگر گونه‌های *Pseudomonas* از نظر ژنتیکی اختلاف وجود دارد؛ اما بین جدایه‌ها بر اساس آزمون rep-PCR اختلاف ژنتیکی وجود ندارد (Yangeche et al., 1999). از طرف دیگر یافته‌های مونش و همکاران در فنلاند نشان داد، سویه‌های *P. tolaasii* از لحاظ ژنوتیپی و براساس آزمون rep-PCR با یکدیگر متفاوتند و این تفاوت‌ها با تنوع فنوتیپی مشاهده شده در بین آنها منطبق است (Munsch et al., 2002). خباز جلفایی و رحیمیان، راه‌های مقابله با بیماری لکه قهوه‌ای را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که این بیماری در شرایط یخچال گسترش نمی‌یابد (Khabaz Jolfaei and Rahimian, 2003). علاوه بر این، آنها طی تحقیقات خود در مازندران این بیماری را به طور گسترده ارزیابی نموده و عامل بیماری لکه قهوه‌ای در شمال کشور را *Pseudomonas tolaasii* معرفی و عامل بیماری را، تنها بر اساس شدت علائم، به چهار گروه دسته بندی کردند (Khabaz Jolfaei and Rahimian, 2003). در مطالعه‌ای دیگر، تجلی پور و همکاران، ۵۵ سویه از استان تهران را بررسی نموده و آنها نیز، براساس شدت بیماری‌زایی و نوع علائم، سویه‌های مذکور را در چهار دسته قرار دادند (Tajalipour et al., 2015).

با توجه به نکات فوق مشخص می‌گردد که تلاش‌هایی که تاکنون در جهت دستیابی به گروه بندی احتمالی سویه‌های مولد بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی انجام شده، عمدتاً بر شدت بیماری‌زایی متمرکز بوده است. در مطالعه حاضر تلاش شده نمونه‌هایی از مناطق مختلف جغرافیایی در استان فارس بررسی شده و روشن گردد که آیا می‌توان با استفاده از آزمون‌های فنوتیپی و آغازگرهای سه گانه‌ی rep-PCR دسته بندی خاصی برای این سویه‌ها ارائه نمود یا خیر و آیا دسته بندی احتمالی ناشی از هر یک از این دو روش، با یکدیگر و نیز با پراکنش جغرافیایی سویه‌های مذکور منطبق است یا خیر.

## مواد و روش‌ها

طی سال‌های ۹۶ و ۹۷ از سالن‌های پرورش قارچ دکمه‌ای واقع در شهرهای مختلف استان فارس شامل شیراز، جهرم، لار، سپیدان، کازرون، نی‌ریز و آباده بازدید و از قارچ‌هایی با علائم لکه قهوه‌ای بر روی کلاهک و پایه نمونه برداری شد. جهت جداسازی، نمونه‌ها با جریان آب روان به مدت پنج دقیقه شستشو شده، به مدت ۵ ثانیه در آب ژاول ۷۰٪ ضد عفونی و بلافاصله با آب مقطر سترون شسته شدند. سپس نمونه‌ها خشک شده، از بین بافت آلوده و سالم قطعه کوچکی انتخاب و به قطعاتی با ابعاد تقریبی دو میلی‌متر مربع تقسیم شد. نمونه‌ها در لوله آزمایش حاوی ۴ml آب مقطر سترون منتقل و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دمای اتاق روی دستگاه تکان دهنده قرار داده شد. سپس یک یا دو لوپ از هر سوسپانسیون، روی محیط کشت آگار مغذی به صورت مخطط کشت شده و در دمای ۲۷°C درون انکوباتور قرار داده شدند. پس از گذشت ۴۸-۲۴ ساعت، تک پرگنه‌هایی

به رنگ‌های کرم، شفاف، زرد و یا بی رنگ جدا سازی و خالص شدند. پرگنه‌های خالص به لوله حاوی محیط آگار غذایی منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس پارافین مایع سترون با حجم تقریبی ۱-۲ میلی لیتر روی سطح محیط کشت ریخته شده و لوله‌ها در یخچال نگهداری شد. سویه‌های خالص، با استفاده از روش‌های استاندارد باکتری شناسی از نظر خصوصیات فیزیولوژیکی، استفاده از قندها، الکل‌ها، اسیدهای آلی و سایر آزمون‌های معمول باکتری شناسی مورد بررسی قرار گرفتند (Fahy & Persly, 1983; Schaad et al., 2001).

جهت انجام آزمون اثبات بیماری‌زایی، ابتدا قارچ‌های فاقد علامت، با آب معمولی و سپس با آب مقطر سترون شستشو شد. سپس مرکز کلاهک با سوسپانسیون باکتری به غلظت  $10^4$  CFU ml<sup>-1</sup> به میزان ۲۰-۳۰ ul تلقیح و در محیط مرطوب نگهداری شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، جدایه‌هایی که قادر به تغییر رنگ کلاهک قارچ، به همراه فرورفتگی بودند، به‌عنوان جدایه‌های بیماری‌زا تلقی شدند (Cantore and Lacobellis, 2004; Wong and Preece, 1979).

### بررسی خصوصیات ژنوتیپی جدایه‌ها

#### آماده‌سازی سوسپانسیون باکتریایی

سوسپانسیونی از باکتری با غلظت  $10^8$  cfu (OD<sub>600</sub>=1) تهیه و به مدت ده دقیقه جوشانده شده و بلافاصله به مدت یک دقیقه روی یخ قرار گرفت. سپس پنج دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۰۰۰g شده و از فاز رویی به طور مستقیم در PCR استفاده شد (Yaish, 2006).

#### ردیابی بیمارگر با آغازگرهای اختصاصی

جهت شناسایی *P. tolaasii* آغازگرهای *PTIA*، *PTID1* (فزا پروژه، ایران) تهیه شد. این آغازگرها ژن تولاسین را تکثیر می‌کنند (جدول ۱). مخلوط واکنش (Master mix) برای هر واکنش در حجم نهایی ۲۵ ul در تیوب‌های سترون ۰/۲ میلی لیتری به شرح جدول ۲-۳ (سیناژن، ایران) تهیه شد. به هر تیوب ۱ ul از سوسپانسیون جوشانده باکتری اضافه و با استفاده از آغازگر اختصاصی *PTIA* و *PTID1*، واکنش زنجیره‌ای پلی مرز انجام شد (جداول ۲ و ۳).

جدول ۱- مشخصات آغازگر اختصاصی *PTIA*، *PTID1*

منبع	توالی	آغازگرها
Lee et al., 2002	ATCCCTTCGGCGTTTACCTG	PT-1A
Lee et al., 2002	CAAAGTAACCCTGCTTCTGC	PT-1D1

جدول ۲- اجزای واکنش PCR در یک مخلوط واکنش ۲۵ میکرولیتری

مقدار بر حسب (ul)	نوع ماده
۱۷/۹	ddH <sub>2</sub> O
۲/۵	10X PCR Buffer
۰/۷	MgCl <sub>2</sub> (50mM)
۰/۵	dNTPs(25mM)
۰/۶	Primer 1(10 pmol)
۰/۶	Primer2(10 pmol)
۰/۲	Taq DNA polymerase(5U/ml)

جدول ۳- چرخه دمایی استفاده شده در واکنش PCR تشخیصی *P. tolaasii*

مرحله	دما (سانتیگراد)	زمان	تعداد سیکل
واسرشت سازی اولیه (Initial denaturation)	۹۵	۴ دقیقه	۱ سیکل
واسرشت سازی (Denaturation)	۹۴	۱ دقیقه	۳۵ سیکل
اتصال آغازگر (Annealing)	۶۰	۱ دقیقه	۳۵ سیکل
بسط (Extention)	۷۲	۲ دقیقه	۳۵ سیکل
بسط نهایی (Final extention)	۷۲	۱۰ دقیقه	۳۵ سیکل

### آزمون rep-PCR

برای بررسی تنوع ژنتیکی *P. tolaasii* از روش rep-PCR استفاده شد (Versalovic et al., 1991). براین اساس آغازگرهای REP1R، REP2I، ERIC1R، ERIC2 و BOXA1R برای تکثیر قطعات، بین نواحی حفاظت شده مورد استفاده قرار گرفتند (Versalovic et al., 1994). ترادف آغازگرهای مورد استفاده در واکنش rep-PCR، چرخه دمایی و میزان مواد مورد استفاده به ترتیب در جداول ۴، ۵ و ۶ آمده است. لازم به ذکر است که ترادف BOX تنها دارای یک آغازگر می‌باشد؛ به همین دلیل و به منظور ثابت ماندن حجم نهایی واکنش، به جای حجم آغازگر دوم از آب مقطر سترون استفاده شد.

جدول ۴- ترادف آغازگرهای مورد استفاده در rep-PCR

منبع	ترادف	آغازگر
Versalovic et al. 1994	5'-CTACggCAAaggCgACgCTgACg-3'	BOX A1R
Versalovic et al. 1991	5'-ATgTAAgCTCCTggggATTAC-3'	ERIC 1R
Versalovic et al. 1991	5'-AAgTAAgTgACTggggTgAgCg-3'	ERIC 2
Versalovic et al. 1991	5'-IIIIcGICgICATCIggC-3'	REP 1R
Versalovic et al. 1991	5'-ICgICTTATCIggCCTAC-3'	REP 2I

جدول ۵- چرخه دمایی استفاده شده در واکنش rep-PCR

مرحله	دما (C°)	زمان	چرخه (سیکل)
واسرشته شدن اولیه	۹۵	۲ min	۱
	۹۴	۳ sec	
	۹۲	۳۰ sec	
جفت شدن آغازگر	۴۴ (REP)		
	۵۲ (ERIC)	۱	۳۵
	۵۳ (Box)		
امتداد	۶۵	۸	
	۶۵	۸	۱

جدول ۶ - مواد استفاده شده در هر واکنش rep-PCR (در مورد آغازگر BOX تنها یک آغازگر استفاده شد)

نوع ماده‌ی مصرفی	مقدار ماده‌ی مصرف شده در هر واکنش ۲۵ میکرولیتری
بافر PCR $\times 10$	۲/۵ $\mu\text{L}$
$\text{MgCl}_2$	۰/۷۵ $\mu\text{L}$
آغازگر Forward	۱۰۰ pmol
آغازگر Reverse	۱۰۰ pmol
dNTPs	۰/۵ $\mu\text{L}$
سوسپانسیون جوشانده باکتری	۲ $\mu\text{L}$
آنزیم Taq پلی مراز DNA	۰/۲۵ $\mu\text{L}$

پس از پایان PCR و به منظور مشاهده قطعات تکثیر شده، محصولات آزمون، الکتروفورز شدند. در آزمون PCR تشخیصی، ژل آگاروز ۱ درصد و در آزمون rep-PCR، ژل آگاروز ۱/۵ درصد تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. مقدار ۵-۸ میکرولیتر از محصول PCR با ۲-۳ میکرولیتر بافر بارگذاری (بروموفنول بلو ۰/۲۵ درصد، گلیسرول ۳۰ درصد) مخلوط و در چاهک‌های ژل ریخته شدند. سپس ولتاژ دستگاه در ۷۵ ولت تنظیم و به مدت ۴۵ دقیقه برای PCR تشخیصی و ۱ ساعت برای rep-PCR الکتروفورز شدند. پس از پایان زمان الکتروفورز، ژل با استفاده از صفحه UV transilluminator بررسی و با استفاده از دستگاه Gel Documentation عکسبرداری شد. سپس با کمک مارکر مولکولی DNA molecular weight 100bp Ladder که همراه نمونه‌ها در ژل بارگذاری شده بود، وزن مولکولی قطعات تکثیر شده اندازه‌گیری شد.

### آنالیز داده‌های فنوتیپی و ژنوتیپی

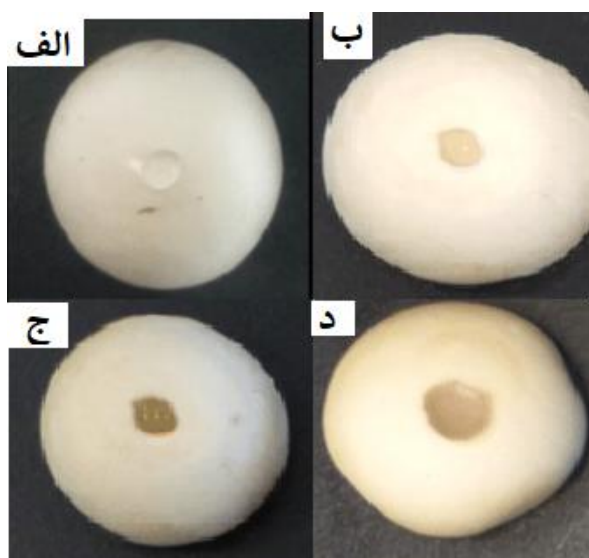
با استفاده از نرم افزار NTsys-pc Version 2.02 فاصله ژنتیکی جدایه‌ها ترسیم گردید. فاصله یا شباهت ژنتیکی بین افراد براساس مارکرهای مولکولی وجود و یا عدم نوار در ژل تعیین شد. تجزیه خوشه‌ای براساس روش مراتبی (Hierarchical Technique) انجام و برای بررسی فاصله واقعی میان کلاسترها از روش Unweighted Pair-group method using Arithmetic Average (UPGMA) و ضریب تشابه (Simple Matching (SM) استفاده گردید (Rohlf, 2000). خصوصیات فنوتیپی به صورت کدهای صفر (برای خصوصیات منفی) و یک (برای خصوصیات مثبت) و مشخصات ژنوتیپی بر اساس rep-PCR به صورت کدهای صفر (برای عدم باند) و یک (برای وجود باند) در این نرم‌افزار تعریف گردید. این نرم‌افزار توانایی تحلیل داده‌ها و رسم دندروگرام (نمودار شاخه درختی) را داراست. درصد تشابه بین جدایه‌های موجود در گروه‌ها، براساس کلیه خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی انجام گرفته در این تحقیق، محاسبه گردید (Rohlf, 2000).

## نتایج

نمونه برداری از قارچ خوراکی دکمه‌ای طی سال‌های ۹۶ و ۹۷ از مراکز کشت شهرستان‌های استان فارس (جهرم، شیراز، لار، سپیدان، کازرون، نی‌ریز و آباده) انجام شد. در مجموع ۵۶ جدایه بعنوان *P. tolaasii* شناسایی شدند (جدول ۷). کلیه جدایه‌ها گرم منفی و هوازی بوده و در آزمون‌های اکسیداز، آرژنین دی هیدرولیز، لیپاز، لسیتیناز، آسکولین، تولید اسید از قندهای مانیتول، سوربیتول، فروکتوز، آرابینوز و گالاکتوز واکنش مثبت نشان دادند. همچنین توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی، تولید لوان، هیدرولیز نشاسته و فوق حساسیت روی توتون (HR)، تولید  $H_2S$  از سیستئین، احیای ساکارز (RSS)، احیای نترات و تولید اسید از قندهای تری هالوز، مانوز، لاکتوز و آرابیتول منفی ارزیابی شد. بر این اساس تمامی ایزوله‌ها به‌عنوان *P. tolaasii* شناسایی شدند. سایر نتایج در جدول ۸ آورده شده است.

## اثبات بیماری‌زایی

پنجاه و شش جدایه‌ی *P. tolaasii* جهت اثبات بیماری‌زایی باکتری بر روی برش‌های قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج به‌دست آمده، مشخص نمود که این سویه‌ها از لحاظ شدت بیماری‌زایی و علائم با یکدیگر متفاوت بوده و بر این اساس می‌توان سه گروه متمایز را مشاهده نمود (جدول ۹ و شکل ۱)؛ علائم در گروه اول (بیماری‌زایی اندک) شامل شش جدایه به‌صورت سوختگی ملایم و رنگ پریدگی مختصر مشاهده شد (شکل ۱. ب) در گروه دوم (بیماری‌زایی متوسط) شامل ۱۹ جدایه، تغییر رنگ قابل ملاحظه در محل تلقیح، بدون فرورفتگی ظاهر شد (شکل ۱. ج) و در گروه سوم شامل ۳۱ جدایه، علائم شدید شامل تغییر رنگ و فرورفتگی در محل تلقیح نمایان شد (شکل ۱. د).



شکل ۱- نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی که با توجه به شدت علائم از یکدیگر تفکیک شده اند: الف، آب مقطر سترون (شاهد)؛ ب. علائم بیماری‌زایی در گروه اول شامل سوختگی ملایم و رنگ پریدگی مختصر (علائم کم)؛ ج. علائم گروه دوم با تغییر رنگ قابل ملاحظه و بدون فرورفتگی (علائم متوسط)؛ د. در گروه سوم (علائم شدید) شامل تغییر رنگ و فرورفتگی در محل تلقیح

### آنالیز عددی ویژگی‌های فنوتیپی *Pseudomonas tolaasii*

در آنالیز عددی ۵۶ جدایه‌ی *P. tolaasii* به دست آمده از مناطق مختلف استان فارس، با استفاده از نرم افزار *NtSYS-PC* گروه‌هایی با شباهت بیش از ۹۰٪ درصد ایجاد شد (شکل ۲). جدایه‌ها از نظر خصوصیات فنوتیپی شباهت چشم‌گیری با یکدیگر داشتند. اختلاف ایجاد شده در دندروگرام، تنها بخاطر تفاوت‌های اندک در برخی خصوصیات بیوشیمیایی بود.

جدول ۷- مشخصات جدایه‌های مورد استفاده در پژوهش حاضر

شماره ردیف	محل نمونه برداری	میزبان	کد جدایه
۱	چهرم	قارچ دکمه‌ای	J1
۲	چهرم	قارچ دکمه‌ای	J2
۳	چهرم	قارچ دکمه‌ای	J3
۴	چهرم	قارچ دکمه‌ای	J4
۵	چهرم	قارچ دکمه‌ای	J5
۶	چهرم	قارچ دکمه‌ای	J6
۷	چهرم	قارچ دکمه‌ای	J7
۸	چهرم	قارچ دکمه‌ای	J8
۹	چهرم	قارچ دکمه‌ای	J9
۱۰	شیراز	قارچ دکمه‌ای	SH1
۱۱	شیراز	قارچ دکمه‌ای	SH2
۱۲	شیراز	قارچ دکمه‌ای	SH3
۱۳	شیراز	قارچ دکمه‌ای	SH4
۱۴	شیراز	قارچ دکمه‌ای	SH5
۱۵	کازرون	قارچ دکمه‌ای	K1
۱۶	کازرون	قارچ دکمه‌ای	K2
۱۷	کازرون	قارچ دکمه‌ای	K3
۱۸	کازرون	قارچ دکمه‌ای	K4
۱۹	کازرون	قارچ دکمه‌ای	K5
۲۰	کازرون	قارچ دکمه‌ای	K6
۲۱	کازرون	قارچ دکمه‌ای	K7
۲۲	کازرون	قارچ دکمه‌ای	K8
۲۳	کازرون	قارچ دکمه‌ای	K9
۲۴	لار	قارچ دکمه‌ای	L1
۲۵	لار	قارچ دکمه‌ای	L2
۲۶	لار	قارچ دکمه‌ای	L3
۲۷	لار	قارچ دکمه‌ای	L4
۲۸	لار	قارچ دکمه‌ای	L5
۲۹	لار	قارچ دکمه‌ای	L6
۳۰	لار	قارچ دکمه‌ای	L7
۳۱	نیریز	قارچ دکمه‌ای	N1
۳۲	نیریز	قارچ دکمه‌ای	N2
۳۳	نیریز	قارچ دکمه‌ای	N3
۳۴	نیریز	قارچ دکمه‌ای	N4
۳۵	نیریز	قارچ دکمه‌ای	N5

ادامه ی جدول (۷)

کد جدایه	میزبان	محل نمونه برداری	شماره
N6	قارچ دکمه ای	نیریز	۳۶
N7	قارچ دکمه ای	نیریز	۳۷
N8	قارچ دکمه ای	نیریز	۳۸
N9	قارچ دکمه ای	نیریز	۳۹
A1	قارچ دکمه ای	آباده	۴۰
A2	قارچ دکمه ای	آباده	۴۱
A3	قارچ دکمه ای	آباده	۴۲
A4	قارچ دکمه ای	آباده	۴۳
A5	قارچ دکمه ای	آباده	۴۴
A6	قارچ دکمه ای	آباده	۴۵
A7	قارچ دکمه ای	آباده	۴۶
A8	قارچ دکمه ای	آباده	۴۷
A9	قارچ دکمه ای	آباده	۴۸
S1	قارچ دکمه ای	سپیدان	۴۹
S2	قارچ دکمه ای	سپیدان	۵۰
S3	قارچ دکمه ای	سپیدان	۵۱
S4	قارچ دکمه ای	سپیدان	۵۲
S5	قارچ دکمه ای	سپیدان	۵۳
S6	قارچ دکمه ای	سپیدان	۵۴
S7	قارچ دکمه ای	سپیدان	۵۵
S8	قارچ دکمه ای	سپیدان	۵۶



جدول ۸- خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی و بیماری‌زایی جدایه‌های *P. tolaasii* جدا شده از مناطق مختلف استان فارس

کد جدایه نام آزمون	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	SH1	SH2	SH3	SH4
تولید رنگدانه فلورسنت روی <b>KB</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
بیماری‌زایی قارچ تکمه‌ای	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ایجاد حفره روی قارچ	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
تغییر رنگ قارچ به قهوه‌ای	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
رنگ آمیزی گرم	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
هوای بی‌هوای ( <b>OF</b> )	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید لوان	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
اکسیداز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
آرژنین دی هیدرولیز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
نشاسته	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لیپاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لهانیدن ورقه های سبب زمینی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
فوق حساسیت توتون ( <b>HR</b> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ژلاتین دی هیدرولیز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید نیترات	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۲-کتوگلوکونات	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
لسیتیناز	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
تولید <b>H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
آسکولین	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سیترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز تونین ۸۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
احیای ساکارز ( <b>RSS</b> )	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
تولید اسید از:													
مانیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سوکروز	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
سلوبیوز	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سوربیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
فروکتوز	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
آرابینوز	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
آرابیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تری هالوز	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
گالاکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
مانوز	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
لاکتوز	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
رامنوز	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+

ادامه جدول (۸)

کد جدایه نام آزمون	SH5	K1	K2	K3	K4	K5	K6	K7	K8	K9	L1	L2	L3
<b>KB</b> تولید رنگدانه فلورسنت روی	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
بیماریزایی قارچ تکمهای	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ایجاد حفره روی قارچ	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
تغییر رنگ قارچ به قهوه‌ای	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
رنگ آمیزی گرم	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
هوازی/بی هوازی (OF)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید لوآن	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
اکسیداز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
آرژنین دی هیدرولیز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
نشاسته	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لیپاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لهانیدن ورقه های سیب زمینی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
فوق حساسیت توتون (HR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ژلاتین دی هیدرولیز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید نیترات	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۲-کیتوگلوکونات	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
لسیتیناز	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
تولید H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
آسکولین	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سیترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز توئین ۸۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
احیای ساکارز (RSS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
تولید اسید از:													
مانیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سوکروز	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
سلوبیوز	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سوربیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
فروکتوز	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
آرابینوز	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
آرابیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تری هالوز	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
گالاکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
مانوز	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
لاکتوز	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
رامنوز	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+

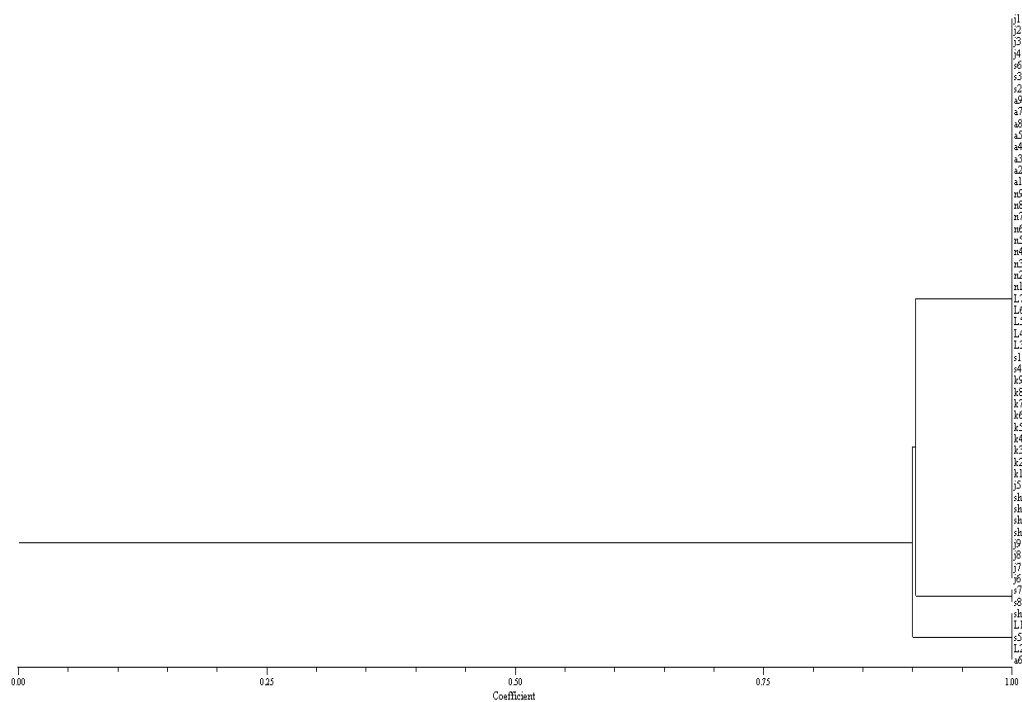
کد جدایه نام آزمون	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	L4	L5	L6	L7
<b>KB</b> تولید رنگدانه فلورسنت روی	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
بیماریزایی قارچ تکمه ای	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ایجاد حفره روی قارچ	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
تغییر رنگ قارچ به قهوه‌ای	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
رنگ آمیزی گرم	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
هوازی/بی هوازی (OF)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید لوآن	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
اکسیداز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
آرژنین دی هیدرولیز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
نشاسته	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لیپاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لهانیدن ورقه های سیب زمینی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
فوق حساسیت توتون (HR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ژلاتین دی هیدرولیز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید نیترات	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۲-کتوگلوکونات	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
لسیتیناز	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
تولید H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
آسکولین	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سیترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز توئین ۸۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
احیای ساکارز (RSS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
تولید اسید از:													
مانیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سوکروز	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
سلوبیوز	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سوربیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
فروکتوز	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
آرابینوز	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
آرابیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تری هالوز	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
گالاکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
مانوز	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
لاکتوز	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
رامنوز	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+

ادامه جدول (۸)

کد جدایه نام آزمون	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	S1	S2	S3	S4
تولید رنگدانه فلورسنت روی <b>KB</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
بیماریزایی قارچ تکمه ای	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ایجاد حفره روی قارچ	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
تغییر رنگ قارچ به قهوه‌ای	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
رنگ آمیزی گرم	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
هوازی بی هوازی (OF)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید لوآن	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
اکسیداز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
آرژنین دی هیدرولیز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
نشاسته	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
لیپاز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
لهانیدن ورقه های سیب زمینی	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
فوق حساسیت توتون (HR)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ژلاتین دی هیدرولیز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تولید نیترات	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
۲-کیتوگلوکونات	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
لسیتیناز	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
تولید <b>H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
آسکولین	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
سیترات	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
هیدرولیز توئین ۸۰	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
احیای ساکارز (RSS)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
تولید اسید از:													
مانیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سوکروز	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+
سلوبیوز	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
سوربیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
فروکتوز	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
آرابینوز	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
آرابیتول	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
تری هالوز	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
گالاکتوز	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-
مانوز	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-
لاکتوز	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
رامنوز	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+

جدول ۹- دسته بندی ۵۶ جدایه ی *P. tolaasii* بر اساس علائم ایجاد شده روی کلاهک قارچ دکمه‌ای (*A. bisporus*)

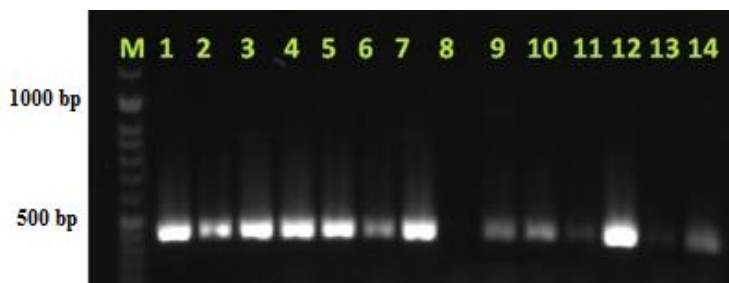
شدت علائم کم	شدت علائم متوسط		شدت علائم زیاد	
S4	A2	G2	L1	G1
S5	A3	G3	L2	G4
L6	A4	S7	S1	G5
L7		S8	S2	G6
N5		SH1	S3	G7
A6		SH2	S6	G8
		SH3	N1	G9
		SH4	N2	K1
		L3	N3	K2
		L4	N4	K3
		L5	A5	K4
		N6	A7	K5
		N7	A8	K6
		N8	A9	K7
		N9	SH5	K8
		A1		K9



شکل ۲- دندروگرام رسم شده بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی ۵۶ جدایه *Pseudomonas tolaasii* جدا شده از قارچ‌های خوراکی در استان فارس. مشخصات جدایه ها در جدول ۷ آمده است

## ردیابی بیمارگر با استفاده از آغازگر اختصاصی

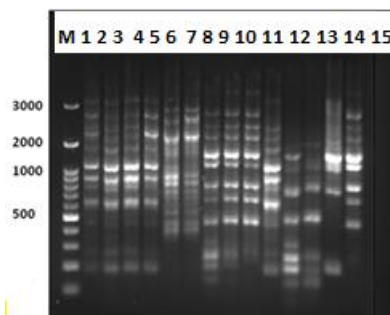
پنجاه و شش جدایه که بر اساس آزمون‌های مختلف فنوتیپی، بیوشیمیایی و تغذیه‌ای به عنوان *P. tolaasii* تشخیص داده شده بودند با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی PT1A و PT1D1 در آزمون PCR قطعه‌ای DNA با اندازه تقریبی ۴۹۹ جفت باز را سنتز کردند (شکل ۳).



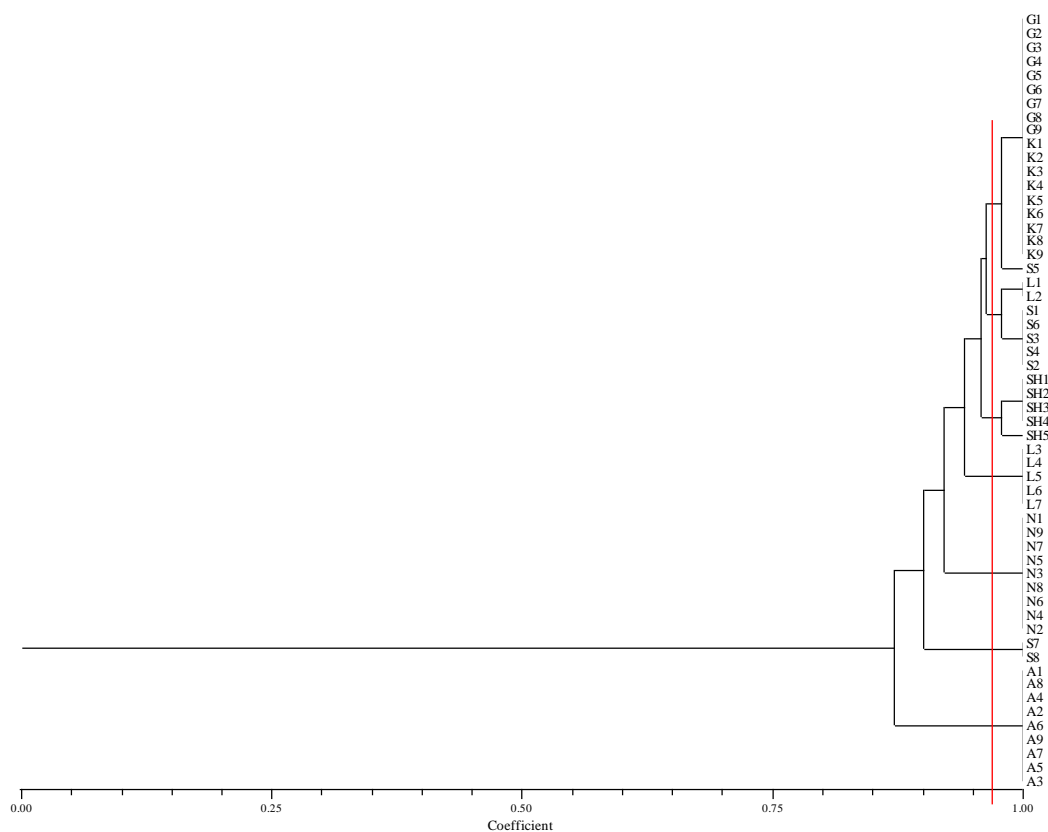
شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR تشخیصی در جدایه‌های مختلف *Pseudomonas tolaasii* (مارکر ۱۰۰ جفت بازی)؛ ۱-۱۴ جدایه‌های مناطق مختلف استان فارس: لاین ۱، J1؛ لاین ۲، J2؛ لاین ۳، J3؛ لاین ۴، J4؛ لاین ۵، L2؛ لاین ۶، L6؛ لاین ۷، SH1؛ لاین ۸، کنترل منفی (*P. syringae*)؛ لاین ۹، SH2؛ لاین ۱۰، N5؛ لاین ۱۱، N6؛ لاین ۱۲، N8؛ لاین ۱۳، S7 و لاین ۱۴، S8

### آزمون rep-PCR

در این آزمون از سه آغازگر REP، ERIC و BOX استفاده شد (Versalovic et al., 1994). در آزمون rep-PCR با استفاده از آغازگر REP، قطعاتی با وزن‌های مولکولی مختلف سنتز شد (شکل ۴). آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار Ntsys-pc، جدایه‌های مناطق مختلف استان فارس را در سطح ۹۷٪ از یکدیگر جدا و به هفت گروه تقسیم نمود. گروه اول شامل تمامی جدایه‌های جهرم و کازرون و یک جدایه از سپیدان (S5) بود. در این گروه، دو زیر گروه مشاهده شد، زیر گروه اول نه جدایه از جهرم (G1, G2, G3, G4, G5, G6, G7, G8, G9) و نه جدایه از کازرون (K1, K2, K3, K4, K5, K6, K7, K8, K9) و زیر گروه دوم تنها شامل یک جدایه از سپیدان (S5) بود. گروه دوم شامل دو زیر گروه بود، زیر گروه اول شامل دو جدایه‌ی لار (L1 و L2) و زیر گروه دوم شامل پنج جدایه از سپیدان (S1, S2, S3, S4, S6). گروه سوم شامل جدایه‌های شیراز، گروه چهارم شامل اغلب جدایه‌های لار (L3, L4, L5, L6, L7)، گروه پنجم شامل جدایه‌های نیریز، گروه شش شامل دو جدایه‌ی سپیدان (S1 و S2) و گروه هفت دربرگیرنده جدایه‌های آباده بود (شکل‌های ۴ و ۵).

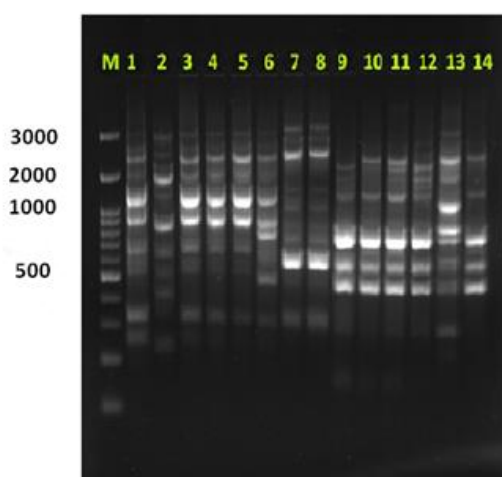


شکل ۴- نقوش الکتروفورزی محصول PCR در جدایه‌های مختلف *Pseudomonas tolaasii* با استفاده از آغازگر REP. M؛ مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ ۱-۱۴ جدایه‌های مناطق مختلف استان فارس: ۱ تا ۴، جدایه‌های جهرم؛ ۵-۶ جدایه‌های لار؛ ۷ تا ۹، جدایه‌های شیراز؛ ۱۰-۱۲، جدایه‌های نیریز؛ ۱۳-۱۴، جدایه‌های سپیدان؛ ۱۵، کنترل منفی



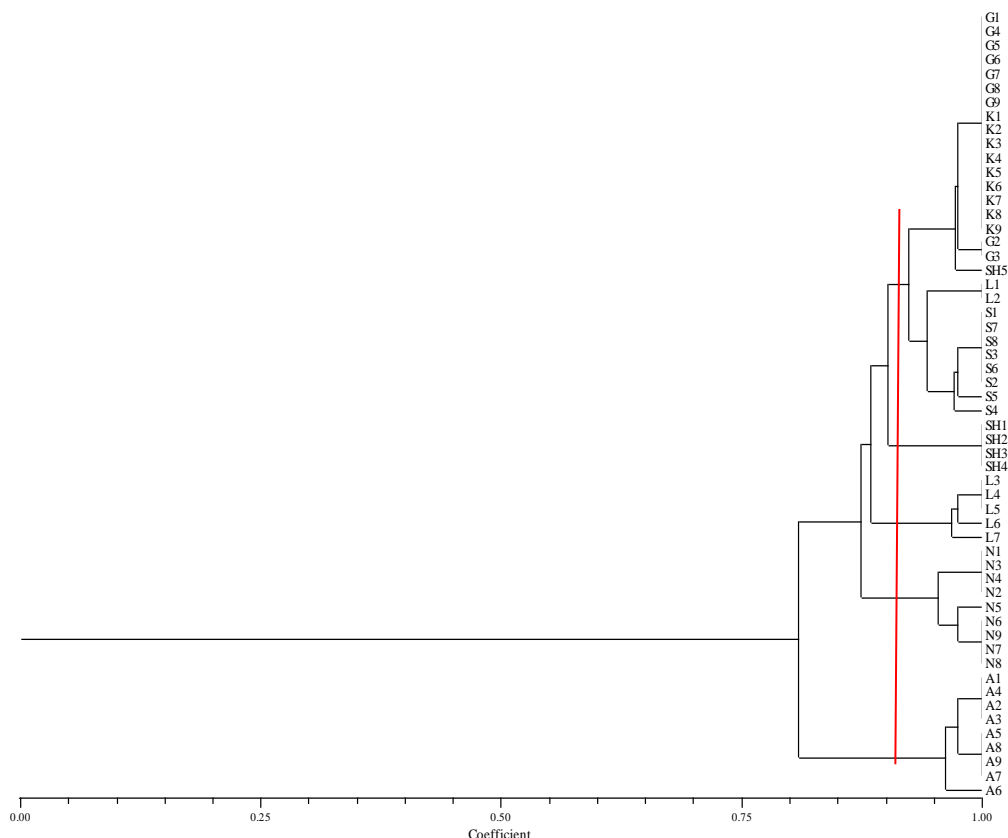
شکل ۵- دندروگرام رسم شده براساس نقوش الکتروفورز محصول PCR متعلق به جدایه‌های مختلف *Pseudomonas tolaasii* با استفاده از آغازگر REP. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۷ آمده است

در آزمون rep-PCR، با استفاده از آغازگرهای ERIC1R و ERIC2، قطعاتی از DNA با وزن‌های مولکولی مختلف سنتز شد (شکل ۶).



شکل ۶- نقوش الکتروفورزی محصول PCR در جدایه‌های مختلف *Pseudomonas tolaasii* با استفاده از آغازگرهای ERIC2 و ERIC1R؛ M؛ مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ ۱-۱۴ جدایه‌های مناطق مختلف استان فارس؛ ۱ تا ۲، جدایه‌های لار؛ ۳-۶ جدایه‌های چهارم؛ ۷ و ۸ جدایه‌های شیراز؛ ۹ تا ۱۲، جدایه‌های آباده؛ ۱۳ تا ۱۴ جدایه‌های نیریز

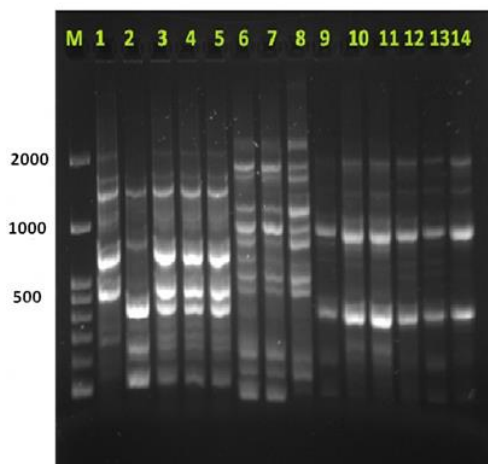
در آنالیز نرم افزاری داده‌های حاصل از آزمون ERIC-PCR، جدایه‌های مناطق مختلف استان فارس، در سطح ۹۶٪ از یکدیگر جدا شده و به شش گروه مجزا تقسیم بندی شدند. گروه اول شامل سه زیر گروه بود، زیر گروه اول شامل اغلب جدایه‌های چهارم (G1,G4,G5,G6,G7,G8,G9) و تمامی جدایه‌های کازرون (K1,K2,K3,K4,K5,K6,K7,K8,K9)، زیر گروه دوم شامل دو جدایه از چهارم (G2 و G3) و زیر گروه سوم شامل یک جدایه از شیراز (SH5) بود. گروه دوم شامل کلیه جدایه‌های سپیدان و دو جدایه از لار (L1,L2) بود. لازم به ذکر است جدایه‌های سپیدان و لار در دو زیر گروه متمایز از یکدیگر قرار داشتند. گروه سوم شامل اغلب جدایه‌های شیراز (SH1,SH2,SH3,SH4) بود. گروه چهارم شامل کلیه جدایه‌های لار، گروه پنجم شامل کلیه جدایه‌های نیریز و گروه ششم دربرگیرنده تمامی جدایه‌های آباده بود (شکل ۷).



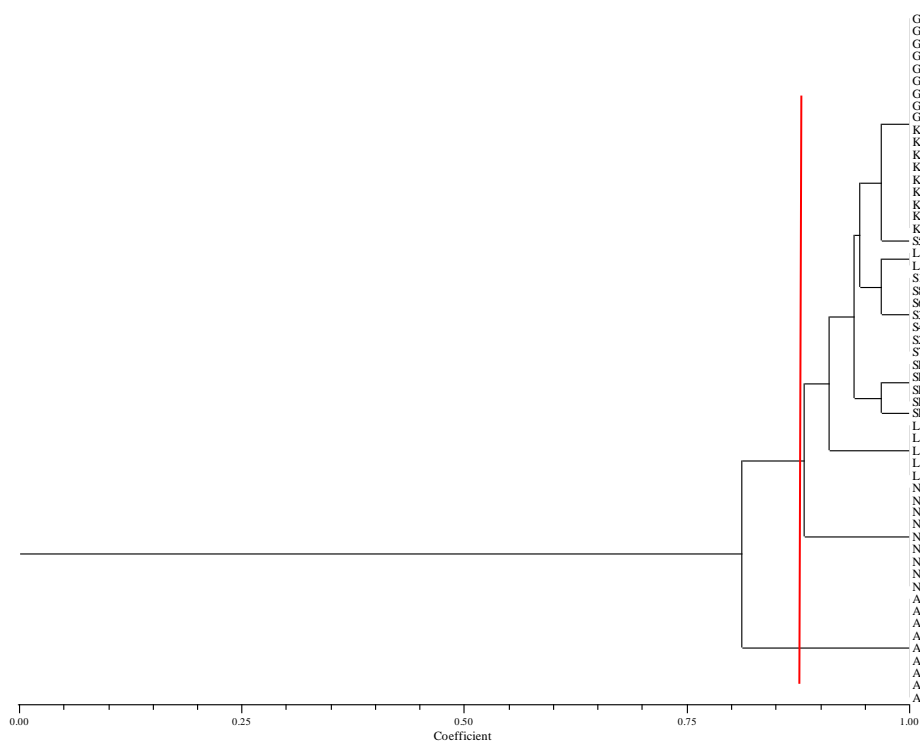
شکل ۷- دندروگرام رسم شده براساس نقوش الکتروفورز محصول PCR متعلق به جدایه‌های مختلف *Pseudomonas tolaasii* با استفاده از آغازگر ERIC

در آزمون rep-PCR و با استفاده از آغازگر BOX جدایه‌های مناطق مختلف استان فارس در سطح ۹۵٪ از یکدیگر جدا شده و در شش گروه تقسیم بندی شدند. گروه اول شامل تمامی جدایه‌های چهارم و کازرون و یک جدایه از سپیدان (S5) بود. این گروه شامل دو زیر گروه بود که زیر گروه اول شامل کلیه جدایه‌های چهارم (G1,G2,G3,G4,G5,G6,G7,G8,G9) و کازرون (K1,K2,K3,K4,K5,K6,K7,K8,K9) بود. زیر گروه دوم تنها شامل یک جدایه از سپیدان (S5) بود. گروه دوم شامل کلیه جدایه‌های شیراز بود. گروه سوم نیز شامل دو زیر گروه بود، زیر گروه اول شامل دو جدایه از لار (L1,L2) و زیر گروه دوم دربرگیرنده اغلب جدایه‌های سپیدان (S1,S2,S3,S4,S6,S7,S8) بود. گروه چهارم شامل اغلب جدایه‌های لار (L3,L4,L5,L6,L7) می بود. گروه پنجم شامل تمامی جدایه‌های نیریز، و گروه ششم جدایه‌های آباده را دربر می‌گرفت (شکل های ۸ و ۹).





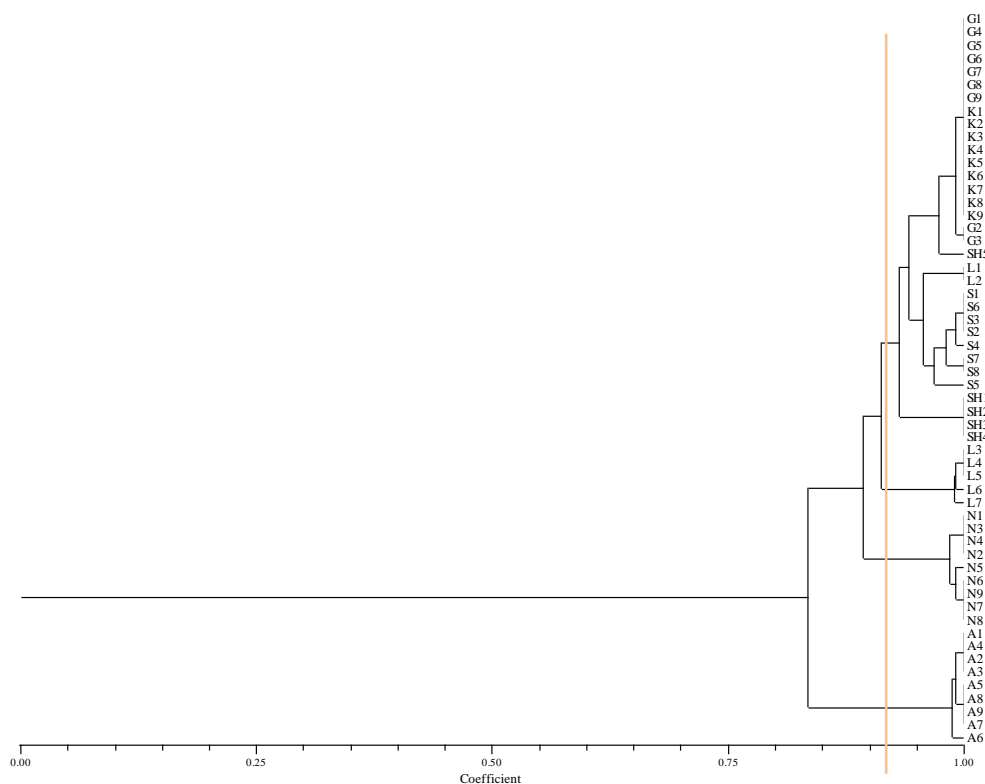
شکل ۸- نقوش الکتروفورزی محصول PCR در جدایه‌های مختلف *Pseudomonas tolaasii* با آغازگر BOX؛ M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی؛ ۱-۱۴ جدایه‌های مناطق مختلف استان فارس؛ ۱ و ۲، جدایه‌های جهرم؛ ۳-۵ جدایه‌های لار؛ ۸- 6 جدایه‌های شیراز؛ ۹-۱۴ جدایه‌های نیریز



شکل ۹- دندروگرام رسم شده براساس نقوش الکتروفورزی محصول PCR متعلق به جدایه‌های مختلف *Pseudomonas tolaasii* با استفاده از آغازگر BOX. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۷ آمده است

آنالیز ترکیبی آغازگرهای سه گانه در rep-PCR نشان داد، جدایه‌های مناطق مختلف استان فارس در سطح تشابه ۹۵٪، به هفت گروه تقسیم‌بندی می‌شوند. گروه اول دربرگیرنده سه زیر گروه بود، زیرگروه اول شامل اغلب جدایه‌های جهرم (G1, G4, G5, G6, G7, G8, G9) و تمامی جدایه‌های کازرون، زیر گروه دوم شامل دو جدایه از جهرم (G2 و G3) و زیر گروه سوم شامل یک جدایه از شیراز (SH5) بود. گروه دوم شامل دو جدایه از لار (L2 و L1) بود گروه سوم شامل: اغلب جدایه‌های سپیدان

گروه چهارم شامل اغلب جدایه‌های شیراز (S1,S2,S3,S6,S7,S8) بود. گروه پنجم شامل اغلب جدایه‌های لار (L3,L4,L5,L6,L7) بود. گروه شش شامل جدایه‌های نیریز، و گروه هفتم دربرگیرنده کلیه جدایه‌های آباده بود (شکل ۱۰).



شکل ۱۰- دندروگرام رسم شده براساس نقوش الکتروفورز محصول PCR متعلق به جدایه‌های مختلف *Pseudomonas tolaasii* با استفاده از آغازگرهای BOX، ERIC، RE. مشخصات جدایه‌ها در جدول ۷ آمده است

## بحث

طی سال‌های ۱۳۹۷-۱۳۹۶، در بازدیدهایی که از سالن‌های مختلف پرورش قارچ دکمه‌ای به عمل آمد، قارچ‌های مختلف با علائم ظاهری مشکوک به آلودگی به *P. tolaasii* جمع آوری و به آزمایشگاه دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم منتقل شدند. نمونه برداری از شهرستان‌های مختلف استان فارس (شیراز، جهرم، کازرون، سپیدان، آباده، لار و نیریز) به عمل آمد. از بافت‌های مورد بررسی ۵۶ جدایه گرم منفی و هوازی اجباری جدا شد. کلیه جدایه‌ها در آزمون‌های اکسیداز، آرژنین دی هیدرولیز، لیپاز، لسیتیناز، آسکولین، تولید اسید از قندهای مانیتول، سوربیتول، فروکتوز، آرابینوز و گالاکتوز واکنش مثبت نشان دادند. همچنین توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی، تولید لوان، هیدرولیز نشاسته، ایجاد فوق حساسیت روی توتون (HR)، تولید  $H_2S$  از سیستین، احیای ساکارز (RSS)، احیای نیترات و تولید اسید از قندهای تری‌هالوز، مانوز، لاکتوز و آرابیتول منفی ارزیابی شد. براین اساس تمامی ایزوله‌ها به‌عنوان *P. tolaasii* شناسایی شدند. این یافته‌ها با نتایج بدست آمده توسط سایر پژوهندگان تطابق دارد (Goor et al., 1986؛ Khabaz Jolfaei and Rahimian, 2003). پژوهندگان مختلف، واکنش این باکتری در آزمون‌های اکسیداز، آرژینین دی هیدرولاز و ژلاتین را مثبت و آزمون‌های لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی، احیای نیترات، رشد در ۴۱ درجه سانتیگراد و تولید لوان را منفی ارزیابی کردند (Najafi Pour et al., 2014؛ Khabaz Jolfaei and Rahimian, 2003). (Kashi, 2012؛ Hassanzadeh, N. 1996؛ Goltepe and Porjam, 2011).

نتایج آزمون‌های فنوتیپی نشان داد که کلیه جدایه‌ها از لحاظ خصوصیات فنوتیپی نسبتاً یکنواخت بوده و تنها اختلافات اندکی در برخی خصوصیات تغذیه‌ای یا بیوشیمیایی داشتند. از آنجایی که تفاوت‌های مذکور در میان جدایه‌های حاصل از یک منطقه‌ی خاص مشابه نبودند، به همین دلیل نمی‌توان از آنها به عنوان ملاکی جهت تمایز جدایه‌ها به گروه‌های مختلف استفاده کرد.

در آنالیز داده‌های مرتبط با خصوصیات فنوتیپی از نرم‌افزار Ntsyspc استفاده شد. در این نرم افزار داده‌ها به صورت صفر (برای واکنش منفی) و یک ( برای واکنش مثبت) مورد ارزیابی قرار گرفتند. با توجه به آنالیز عددی ویژگی‌های فنوتیپی ۵۶ جدایه‌ی به‌دست آمده از قارچ‌های دکمه‌ای متعلق به مناطق مختلف استان فارس، جدایه‌ها بیش از ۹۰٪ درصد با یکدیگر شباهت نشان دادند. در بررسی‌های فنوتیپی حداقل میزان شباهت بین افراد یک گونه بالاتر از ۸۰٪ است (Swings & Hayward, 1990) و از آنجا که جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش، به یک گونه تعلق داشتند، شباهت بیش از ۹۰٪ جدایه‌ها با یکدیگر دور از انتظار نبود.

در آزمون اثبات بیماری‌زایی بین ۳-۲ روز پس از تلقیح، علائم در قارچ‌های دکمه‌ای مورد آزمون ظاهر شد. در قارچ‌ها واکنش مثبت به صورت بروز لکه‌های زرد کم رنگ، بدون بو و قهوه‌ای شکلاتی همراه با فرو رفتگی‌های عمیق و نیمه عمیق و یا بدون عمق، در محل تلقیح بود. در بعضی موارد که علائم شدیدتر بوده و ترشح مواد لزج نیز دیده می‌شد. کلیه‌ی جدایه‌ها توانایی ایجاد آلودگی روی میزبان خود را داشتند، ولی از لحاظ شدت بیماری‌زایی و علائم متفاوت بودند. این نتیجه با نتایج سایر محققین تطابق دارد (Goor et al., 1986; Mottaghi, H. 2005; Khabaz Jolfaei and Rahimian, 2003; Goor and Preece, 1979; Mosivand et al., 2009; Najafi Pour and Taghavi, 2011).

در مطالعه حاضر با استفاده از آزمون بیماری‌زایی و شدت علائم ایجاد شده روی کلاهک‌های مورد بررسی جدایه‌ها به سه گروه مجزا تقسیم شدند. خباز و رحیمیان نیز مشاهده نمودند که علیرغم تشابه زیاد جدایه‌ها در خصوصیات فنوتیپی، شدت بیماری‌زایی آنها روی کلاهک قارچ دکمه‌ای با یکدیگر متفاوت است (Khabaz Jolfaei and Rahimian, 2003). آن‌ها بر همین اساس جدایه‌ها را به چهار گروه متمایز تقسیم بندی کردند.

پنجاه و شش جدایه که بر اساس مجموعه خصوصیات افتراقی آزمون‌های باکتری‌شناسی، به عنوان *P.tolaasii* تشخیص داده شده بودند، در آزمون تشخیصی PCR، با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی PT1A و PT1D1، قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۴۹۹ bp را تولید کردند، اما سایر جدایه‌ها قادر به تکثیر چنین قطعه‌ای نبودند. این نتیجه تاییدی بر وجود ژن تولاسین (pheN) در جدایه‌های *P.tolaasii* مورد مطالعه می باشد. مطالعات مختلف نشان داده ژن تولاسین در سویه‌های مختلف *P.tolaasii* وجود دارد (Raala, et al., 2010; Lee et al., 2002; Malcolm, 1981; Rainey et al., 1991; Baral et al., 1995; Nair & Fahy, 1973). اما میزان بیان آن توسط عوامل محیطی مختلف مانند اسیدیته، دمای محیط و وجود یون‌های دو ظرفیتی تغییر می‌کند (Grewal et al., 1995, Rainey et al., 1991)؛ بنابراین ممکن است تفاوت در شدت علائم ایجاد شده در جدایه‌های مورد مطالعه، مربوط به ساختار ژنتیکی آنها در ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی و بویژه سطح تولید تولاسین می باشد.

در مطالعه حاضر جهت بررسی خصوصیات ژنوتیپی باکتری، از روش rep-PCR استفاده شد. rep-PCR ابزار ارزشمندی جهت مطالعه تنوع در میان باکتری‌هاست. بررسی‌های مختلف مشخص نموده که روش فوق می‌تواند به عنوان یک تکنیک مطلوب و قابل اعتماد در بررسی تنوع درون جمعیت پاتووارها مورد استفاده قرار گیرد. این کار با تکیه بر چند شکلی است که پس از الکتروفورز در سطح سویه‌ها مشاهده می‌شود (Rademaker and De Bruijn, 1998). یکی از مهمترین مزایای این روش آن است که برای اغلب باکتری‌های گرم منفی و برخی باکتری‌های گرم مثبت قابل اجراست، بدون آن‌که اطلاعاتی از ژنوم باکتری در دسترس باشد (Fermor and Lynch, 1986; Rademaker and De Bruijn, 1998; Beelman et al., 2003). یانگ چی و همکاران

در کره جنوبی به منظور جداسازی سودوموناس‌های مختلف از جمله *P. tolaasii*، *P. syringae* و دیگر سودوموناس‌ها از یکدیگر، از روش rep-PCR استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند که با بکارگیری از این روش می‌توان به خوبی افراد این جنس را از یکدیگر تفکیک کرد. علاوه بر این آن‌ها نتیجه گیری کردند که این روش می‌تواند به عنوان یک روش سریع و قابل اعتماد برای بررسی تنوع ژنتیکی در میان جدایه‌های *P. tolaasii* با دیگر سودومونادها تلقی گردد (Yangche et al., 1999).

نتایج به‌دست آمده در پژوهش حاضر نشان داد با استفاده از آغازگرهای سه گانه‌ی REP، ERIC و BOX، جدایه‌های مناطق مختلف استان فارس به شش یا هفت گروه متمایز تقسیم می‌شوند. کلاسترهای ایجادشده در بسیاری موارد، با پراکنش جغرافیایی جدایه‌ها هماهنگی نسبی داشت. یافته‌های این تحقیق نشان داد در آزمون rep-PCR، بوسیله‌ی هر یک از آغازگرهای سه‌گانه‌ی REP، ERIC و BOX بطور انفرادی می‌توان تا حد زیاد و قابل قبولی جدایه‌های مناطق مختلف استان را بر اساس منطقه جغرافیایی از یکدیگر تفکیک نمود. به‌عنوان مثال با استفاده از هر یک از سه آغازگر مذکور به تنهایی، جدایه‌های نی ریز و لار بطور کامل و اغلب جدایه‌های سایر مناطق استان در کلاسترهای جداگانه قرار می‌گرفتند.

در آنالیز ترکیبی داده‌ها نیز نتایج مشابهی به دست آمد؛ به گونه‌ای که هفت گروه مجزا با تشابه ۹۵٪ مشاهده شد. در کلاستر اول کلیه جدایه‌های چهارم و کازرون، در کلاستر دوم تنها دو جدایه از لار، در گروه‌های سوم تا پنجم به ترتیب اغلب جدایه‌های سپیدان، شیراز و لار و نهایتاً در گروه‌های ششم و هفتم تمام جدایه‌های نیریز و آباد قرار گرفتند. این نتیجه با یافته‌های برخی محققین مغایرت و با برخی دیگر تطابق دارد. یانگ چی و همکاران در مطالعه‌ای با استفاده از rep-PCR نشان دادند بین جدایه‌های مختلف *P. tolaasii* اختلاف ژنوتیپی کمی وجود دارد ممکن است علت این مغایرت، تفاوت در تعداد جدایه‌ها و مکان‌های مورد بررسی در دو مطالعه‌ی مذکور باشد. در مطالعه حاضر شش نمونه از اقلیم‌های مختلف استان فارس با تنوع آب و هوایی موردبررسی قرار گرفت؛ در صورتی که در مطالعه یانگ چی و همکاران، تنها چهار نمونه که از چهار منطقه‌ی مختلف به‌دست آمده بود، به‌عنوان نماینده، مورد استفاده قرار گرفته بود (Yangche et al., 1999). در مطالعه‌ای دیگر با استفاده از روش rep-PCR مشخص شد که این شناساگر مولکولی قادر است *P. tolaasii* را از *P. reactans* جداسازی کرده و اختلافات ژنوتیپی را به خوبی نشان دهد (Tajalipour et al., 2015).

مقایسه بین گروه‌های ایجاد شده بر اساس آزمون بیماری‌زایی روی قارچ دکمه‌ای و کلاسترهای ایجاد شده در آزمون rep-PCR نشان داد که کلاسترهای ایجاد شده در آزمون rep-PCR بر اساس بیماری‌زایی با یکدیگر هماهنگ می‌باشند. به‌عنوان مثال با استفاده از آغازگر ERIC، جدایه‌ها در سطح تشابه ۹۵٪ به هفت گروه مجزا تقسیم شدند. گروه اول با سه زیر گروه متمایز بود، که دو زیرگروه اول و دوم در گروه بندی براساس شدت علائم، در گروهی با بیماری‌زایی شدید قرار گرفتند؛ درحالی‌که زیر گروه سوم در گروهی با شدت بیماری‌زایی متوسط قرار گرفت.

همچنین کلاستر دوم، در گروه بندی بر اساس شدت علائم، در گروهی با بیماری‌زایی شدید قرار گرفت. گروه سوم شامل جدایه‌های سپیدان بود که سه زیر گروه در آن مشاهده می‌شد. در زیر گروه اول (S1, S2, S3, S6) علائم را با شدت زیاد و یا متوسط (S7 و S8) نشان دادند. جدایه‌ی زیر گروه دوم و سوم (S4, S5) علائم را با شدت کم نشان دادند. کلاستر چهارم علائم را با شدت متوسط نشان دادند. کلاستر پنجم شامل سه زیر گروه بود. گروه اول (L3, L4, L5) علائم را با شدت متوسط و زیر گروه‌های دوم (L6) و سوم (L7) علائم را با شدت کم نشان دادند. گروه شش شامل کلیه جدایه‌های نیریز با سه زیر گروه بود. زیر گروه اول (N1, N2, N3, N4) علائم را با شدت زیاد، نشان می‌دادند. زیر گروه دوم (N5) با شدت کم و زیر گروه سوم (N6, N7, N8, N9) علائم را با شدت متوسط نشان دادند. گروه هفتم شامل تمامی جدایه‌های آباد با سه زیر گروه متمایز بود، زیر گروه اول (A1, A2, A3, A4) علائم را با شدت متوسط، زیر گروه دوم (A5, A7, A8, A9) علائم را با شدت زیاد و زیر گروه سوم (A6) علائم را با شدت کم نشان دادند. البته در مورد دندروگرام ERIC توجه به این نکته ضروری است که با استفاده از

این مارکر هم نشان دهنده‌ی بعضی استثنائات است. برای مثال جدایه‌های L6 و L7 متعلق به لار، هردو علائم خفیفی نشان دادند اما با این روش، در دو زیر گروه متفاوت با سطح تشابه ۹۷ درصد قرار گرفتند. این گروه بندی، با گزارش خباز جلفایی و رحیمیان در سال ۱۳۸۱ متفاوت است؛ زیرا آنها دسته‌بندی خود را براساس بیماری‌زایی به چهارگروه تقسیم‌بندی کردند (Khabaz Jolfaei and Rahimian, 2003) ولی در این پژوهش که ملاک دسته‌بندی شناساگر مولکولی rep-PCR و بیماری‌زایی بود، این باکتری به سه گروه دسته بندی شد.

با توجه به یافته‌های این تحقیق، بنظر می‌رسد جدایه‌های مناطق مختلف استان، با مناطق تحت پرورش خود سازگاری نسبی یافته‌اند. ممکن است علت این امر نحوه‌ی تهیه‌ی کمپوست باشد. از آنجا که اینوکولوم اولیه این باکتری بیشتر در کمپوست مورد استفاده جهت تولید قارچ توسعه می‌یابد و کمپوست نیز به‌طور محلی در همان منطقه تهیه می‌شود، لذا سویه‌های هر منطقه با شرایط خاص آن منطقه سازگاری نسبی یافته‌اند. علاوه بر این نحوه‌ی آماده سازی کمپوست و اسپان قارچ در مراکز مختلف، متفاوت می باشد، که این امر نیز می‌تواند تفاوت در جدایه‌های توسعه یافته در هر منطقه را توضیح دهد. از طرف دیگر، شباهت ژنوتیپی برخی از جدایه‌ها دور از انتظار نیست و گسترش باکتری ممکن است از طریق کمپوست آلوده یا اسپان آلوده از مناطق مجاور رخ داده باشد. همچنین وقوع تفاوت‌های ژنتیکی در جدایه‌های یک منطقه ممکن است ناشی از وجود جمعیت‌هایی باشد که به‌واسطه وقوع جهش، در پاره‌ای از ویژگی‌ها از جمله وجود ژن (pheN)، سطح تولید تولاسین و نهایتاً بیماری‌زایی متفاوتند.

## References:

1. Beelman RD, Royse D. and Chikthimmah, N. 2003. Bioactive components in *Agaricus bisporus*. Medicinal Mushrooms 5: 321-337.
2. Fahy PC, and Hyward AC. 1983. Media and methods for isolation and diagnostic tests Plant Bacterial Disease, a Diagnostic Guide. Academic Press.
3. Fermor TR, and Lynch JM. 1986. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*: screening isolation and characterization of bacterial antagonistic to the pathogen (*Pseudomonas tolaasii*). Journal of Applied Bacteriology 65:179-187.
4. 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.
5. Goltepe A, Porjam A. 2011. Principles of Edible Mushroom Cultivation, Tarbiat Modarres University, 722 pages.
6. Grewal SI, Han B, and Johnston 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: 4658-4668.
7. Hassanzadeh N. 1996. Principles of plant bacteriology methods. Scientific Publishing Center of Islamic Azad University. 641 pages.
8. Kashi AK. 2012. Cultivation of edible mushrooms. Publications of the Ministry of Agricultural Jihad, 455 pp.
9. Khabaz Jolfaei H, and Rahimian H. 2003. Brown spot of Iranian edible mushroom. Iranian Journal of Plant Pathology 38: 1-10.
10. Kim BS, and Park EW. 1987. Effect of leaf blast and panicle blast on grain yield of rice. Phytopathology 77: 17-77 (Abstr.).
11. Lee HL, Jeong KS, and Cha JS. 2002. PCR assays for specific and sensitive detection of *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of mushrooms. Letters in Applied Microbiology 35: 276-80.
12. Malcolm HD. 1981. A toxin associated with bacterial blotch of mushrooms. Mushroom Science XI: 325-329.
13. Marques ASA, Marchaison A, Gardan L, and Samson S. 2008. BOX-PCR-based identification of bacterial species belonging to *Pseudomonas syringae* - *P. viridiflava* group. Genetics and Molecular Biology 31: 106-115.
14. Mosivand M, Rahimian H, and Shams-Bakhsh M. 2009. Phenotypic and genotypic relatedness among *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains isolates from sugarcane, stone fruit and wheat. Iranian Journal of Plant Pathology 45:75-85.
15. Mottaghi H. 2005. Button Mushroom. Sepehr Publications, 352 pp.

16. Munsch P; Johnstone K, and Alatossava T. 2002. Evidence for genotypic differences between the two siderovars of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiology Research* 157: 93–102.
17. Nair NG, and Fahy PC. 1973. Toxin production by *Pseudomonas tolaasii* paine. *Australian Journal of Biological Science* 26: 509-512.
18. Najafi Pour G, and Taghavi SM. 2011. Comparison of *P. syringae* pv. *syringae* from different hosts based on pathogenicity and BOX-PCR. *Iranian Journal of Agricultural Sciences and Technology* 13: 431-442.
19. Najafi Pour G, Jamali E, and Ayazpour K. 2015. Phenotypic and Genotypic Characterization of *Erwinia amylovora* in Pome Fruit Orchards in Isfahan Province. *Journal of Applied Researches in Plant Protection* 4: 177-195.
20. Najafi Pour G, Hasani S, and Taghavi SM 2014. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas savastanoi* isolated from winter jasmine, using BOX-PCR, in Shiraz. *Journal of Microbial World* 13: 6-17.
21. Preece TF. 1979. Bacterial blotch research at Leeds university makes progress: two tests for the identification of *Pseudomonas tolaasii* in the laboratory. *Mushroom Journal* 83:473-474.
22. Raal A, Kaur H, Orav A, Arak E, and Kalias T. 2010. Content and composition of essential oils in some Asteraceae species. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences* 60: 55–63.
23. Schaad NW, Jones JB, and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. The American Phytopathological Society Press.
24. Tajalipour SH, Hassanzadeh N, Heydari A, and Khabbaz Jolfaee H. 2015. Study on genetic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas reactans*, associated with mushroom brown blotch disease employing ERIC and BOX-PCR techniques. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 8: 398-405.
25. Tolass AG. 1915. A bacterial disease of cultivated mushrooms. *Phytopathology* 5: 51-54.
26. Wells JM, Sapers GM, Fett WF, Butterfield JE, Jones JB, Bouzar H, and Miller FC. 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans*, and *P. gingeri*. *Phytopathology* 86: 109-1104.
27. Wong WC, and Preece TF. 1979. Identification of *Pseudomonas tolaasii*: the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. *Journal of Applied Bacteriology* 47:401-407.
28. Wong WC, and Preece TF. 1980. *Pseudomonas tolaasii* in mushroom crops: a note on primary and secondary sources of the bacterium on a commercial farm in England. *Journal of Applied Bacteriology* 49: 305-314.

29. Wong WC, and Preece TF. 1982. *Pseudomonas tolaasii* in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) crops: number of the bacterium and symptom development on mushrooms grown in various environments after artificial inoculation. *Journal of Applied Bacteriology* 53: 87-96.
30. Wong WC, Fletcher JF, Unswopih BA, and Preece TF. 1982. A note on ginger blotch, a new bacterial disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Journal of Applied Bacteriology* 52:43-48.
31. Wong WC, and Preece TF. 1985. *Pseudomonas tolaasii* in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) crops: effects of sodium hypochlorite on the bacterium and on blotch disease severity. *Journal of Applied Bacteriology* 58: 259-267.



## Efficiency of phenotypic tests and the rep-PCR method in geographically separating the causal agent of mushroom brown spot, *Pseudomonas tolaasii*, in Fars Province

M.A Ramazani<sup>1</sup>, G. Najafi Pour<sup>2\*</sup>, K. Ayazpour<sup>2</sup>

### Abstract

Brown Blotch, caused by *Pseudomonas tolaasii*, is a common disease in mushroom farms. It leads to the formation of dark brown or chocolate spots on the cap and base of mushrooms, ultimately reducing both their quality and quantity. In 2017-2018, samples were collected and transported to the laboratory in plastic bags. Initially, 100 gram-negative isolates were identified as *Pseudomonas tolaasii*. These isolates underwent physiological, biochemical, and nutritional characterization, as well as testing for the presence of the tolaasin gene using specific primers (PT1D1 and PT1A). All strains were rod-shaped, gram-negative, obligate aerobic, and tested positive for oxidase and arginine dehydrolase. Additionally, they produced fluorescent pigment on KB medium. Levan production and starch hydrolysis were positive in all isolates, while the tobacco hypersensitive reaction (HR) was negative. In this study, the geographical diversity of *P. tolaasii* was evaluated using the rep-PCR method. Three primers (BOX, ERIC, and REP) were employed. The results indicated that these primers allowed for the division of isolates from different regions of the Fars province into six or seven distinct groups. Clusters based on geographical distribution exhibited relative similarity among the isolates. The rep-PCR results demonstrated that REP, ERIC, and BOX primers individually produced satisfactory outcomes, separating isolates based on their geographical origins. Furthermore, comparisons between groups were made using a pathogenicity test on mushroom caps, revealing synchronization among clusters created by rep-PCR in terms of pathogenicity.

Keywords: *Pseudomonas tolaasii*, Fars province, phenotypic and genotypic characteristics, rep-PCR, Brown Blotch.

---

<sup>1</sup> - Former B.S. student of Plant Protection Department, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

<sup>2</sup> - Assistant Professor, Department of Plant Pathology, Jahrom branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

\*Corresponding author: [gildanajafipour@gmail.com](mailto:gildanajafipour@gmail.com)