

مطالعه‌ی تاثیر برخی متابولیت‌های تولید شده توسط *Pseudomonas tolaasii* و باکتری‌های همراه روی قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*)

شادی تجلی پور^{1*}، نادر حسن زاده²، اصغر حیدری³، حسین خباز جلفایی⁴

تاریخ دریافت: 93/10/13 تاریخ پذیرش: 94/2/27

چکیده

در این تحقیق به بررسی برخی متابولیت‌های *Pseudomonas tolaasii* عامل لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی دکمه‌ای و نیز *Pseudomonas reactans* باکتری همراه قارچ خوراکی دکمه‌ای، پرداخته شد. خصوصیات شاخص *P. Tolaasii* شامل ایجاد لکه قهوه‌ای و نقاط فرو رفته روی کلاهک قارچ خوراکی دکمه‌ای *A. bisporus*، تولید تولاسین، همولیزاریتروسیت‌ها، تولید رسوب سفید رنگ در برابر باکتری *P. reactans* است. در مطالعه‌ی حاضر تأثیر *P. Tolaasii* و متابولیت حاصل از آن بر میزان رشد میسلیموم *Agaricus bisporus* مورد بررسی قرار گرفت. پس از استخراج ترکیبات ناخالص متابولیتی یا White Line Inducing Principle (WLIP)، تولید شده توسط *P. reactans* و نیز توکسین تولاسین، آزمون‌های متعددی جهت بررسی تأثیر متقابل و غیرمستقیم این ترکیبات انجام گرفت. همچنین ژن *rpoB* متعلق به جدایه بیماری‌زای *Pseudomonas sp. p2* که از قارچ مذکور جداسازی شده بود با استفاده از جفت پرایمر LAPS27 و LAPS تکثیر، تعیین توالی و در بانک ژن NCBI ثبت گردید. تأثیر ترکیب WLIP ناخالص حاصل از *P. reactans* Pt 5 و جدایه استاندارد *P. reactans* NCPPB1311 بر بلوک‌های *A. bisporus* و سیب‌زمینی بطور جداگانه مورد بررسی قرار گرفت. در زیست‌سنجی‌های مختلف مشاهده شد بلوک‌های قارچ مایه‌زنی شده با توکسین بیماری‌زاترین استرین بومی *P. tolaasii* Pt 6 تولید علائم لکه قهوه‌ای تیره و نقاط کمی فرو رفته نمودند. برعکس، در برابر ترکیب WLIP استرین *P. reactans* Pt 5 تغییر رنگ جزئی و خفیف بود. از یافته‌های مهم دیگر، بکارگیری همزمان تیمار *P. reactans* A6 و ترکیب تولاسین هر دو جدایه بومی و استاندارد بر بلوک قارچ بود که منجر به توقف علائم آشکار قهوه‌ای شدن ناشی از تولاسین شد و با خاصیت بازدارندگی خود، موجب مهار فعالیت تولاسین گردید. این نتایج نشان‌دهنده اهمیت باکتری‌های همراه در بازداری رشد و توقف بیماری‌زایی باکتری *P. tolaasii* است.

واژه‌های کلیدی: قارچ دکمه‌ای سفید، لکه قهوه‌ای، *Pseudomonas tolaasii*، *Pseudomonas reactans*، *Agaricus bisporus*.

¹ - دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران.

² - دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

³ - دانشیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران، ایران.

⁴ - مربی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، تهران، ایران.

* - نویسنده مسئول مقاله: sh_tajalli_pour@yahoo.com

مقدمه

پرورش قارچ دکمه‌ای سفید *Agaricus bisporus* در صدر تولید قارچ‌های پرورشی جهان قرار دارد. در گروه بیماری‌های قارچ خوراکی، باکتری‌های بیماریزا به علت مساعد بودن شرایط محیطی سالن پرورش با رطوبت نسبی بالای 80 درصد و دمای 16-25°C جایگاه ویژه‌ای از نظر میزان خسارت دارند. به علت وجود این شرایط ویژه در سالن‌های پرورش قارچ، برخی باکتری‌ها، به سرعت تکثیر یافته و با اپیدمی شدن بیماری، کمیت و به خصوص کیفیت محصول دچار افت محسوسی می‌گردند (Fermor and Lynch, 1988).

از مهمترین بیماری‌های باکتریایی، بیماری لکه قهوه‌ای است. این بیماری اولین بار در سال 1915 میلادی توسط تولاس شناسایی و به نام *Pseudomonas tolaasii* Paine نامگذاری گردید (Geels, 1995). خصوصیات بیماری و عامل آن اولین بار در سال 1919 توسط پین ارائه گردید (Paine, 1919). در سال 1979 باکتری توسط ونگ و پریس توصیف و عامل بیماری یک سودوموناس فلورسنت معرفی گردید (Wong et al., 1982). بلمن و همکاران تأثیر جمعیت‌های باکتریایی را روی فساد پس از برداشت کلاهک‌های تازه بررسی نموده و طی آن مشاهده کردند تلقیح کلاهک با جمعیت بالای *P. tolaasii* موجب اضمحلال شدید کلاهک‌ها می‌گردد (Beelman et al., 1989). علائم بیماری لکه قهوه‌ای ابتدا به صورت لکه‌ها یا بلاچ‌های زرد کم‌رنگ، سپس به رنگ قهوه‌ای شکلاتی بر روی کلاهک ظاهر می‌شود. با گذشت زمان این لکه‌ها روی کلاهک و حتی پایه قارچ به شکل فرورفته (Pit) درآمده و حالت لزج پیدا می‌کنند. لکه‌ها در صورت فراهم بودن شرایط مساعد از نظر حرارت و رطوبت به سرعت گسترش یافته، بتدریج به هم پیوسته و نهایتاً تمام کلاهک را در بر می‌گیرند. در صورت شدت آلودگی، بیماری در انبار و حتی در حین حمل و نقل موجب از هم پاشیدگی و لهیدگی سریع کلاهک می‌گردد (Wells et al., 1996; Wong et al., 1982).

باکتری عامل بیماری لکه قهوه‌ای، *P. tolaasii*، در مقابل *Pseudomonas reactans* ایجاد رسوب سفید رنگی می‌نماید که نتیجه یک تعامل اختصاصی بین ترکیبات تولید شده قابل انتشار توسط *P. reactans* به نام WLIP (White Line Inducing Principle) و توکسین تولاسین قابل حل در آب، تولید شده توسط *P. tolaasii*، می‌باشد (Andolfi et al., 2008). ترکیب WLIP، بطور بالقوه دارای خاصیت بازدارندگی در برابر قهوه‌ای شدن ناشی از تولاسین *P. tolaasii* در قارچ‌های خوراکی است (Soler-Rivas, 1998). لازم به ذکر است که یکی از مهمترین مکانیسم‌های بروز علائم لکه قهوه‌ای یا بلاچ، تولید توکسین تولاسین است که توسط فرم بیماریزای *P. tolaasii* تولید می‌شود. استخراج این توکسین اولین بار توسط نیر و فهی صورت گرفت (Nair and Fahy, 1973). وزن مولکولی آن نسبتاً کم، در برابر گرما پایدار و در دامنه pH بین 3-9 روی بافت‌های کلاهک قارچ فعال می‌گردد. از نظر ساختاری این توکسین از نوع لیپودپسی پپتید است که منحصراً توسط *P. tolaasii* تولید می‌شود (Grewal et al., 1995). خواص بیولوژیکی و طیف فعالیت تولاسین در سال 1991 توسط راینی و همکاران مورد بررسی قرار گرفت (Rainey et al., 1991). با مطالعات فراساختاری مشخص شده است که غشای پلاسمایی و غشاء واکوئل، توسط تولاسین، دچار گسیختگی می‌شوند که در مورد جهش‌یافته‌های باکتری مذکور این امر صدق نمی‌کند. بیشترین تأثیر

تولاسین علیه تعدادی از بازیدیومیست‌ها و باکتری‌های گرم مثبت است. تولاسین موجب مهار رشد باکتری‌های گرم منفی مانند باکتری *Escherichia coli* نیز می‌گردد (Grewal et al., 1995).

در ایران، تحقیقات مختلفی روی این باکتری انجام شده است. این بیماری اولین بار از بخش‌های شمال و مرکز کشور گزارش شد (رحیمیان و همکاران، 1995). در سال‌های بعد بیماری به صورت اپیدمیک در مهمترین مراکز پرورش قارچ خوراکی در قسمت‌های مختلف کشور مشاهده گردید (خباز جلفایی و رحیمیان، 2002). همچنین خصوصیات فنوتیپی *P. tolaasii* (خباز جلفایی و رحیمیان، 2002؛ تجلی پور و همکاران، 2012) و شناسایی *P. tolaasii* براساس تکثیر ناحیه ژنی ITS1 با استفاده از جفت آغازگر PTOF و PTOR (Tajalipour et al., 2015) نیز مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از این پژوهش بررسی نقش تولاسین تولید شده توسط *P. tolaasii* در بیماریزایی و نیز نقش متابولیت‌های جدایه‌های *P. reactans* در بیماریزایی و یا مهار بیماری لکه قهوه‌ای است.

مواد و روش‌ها

آزمون بیماریزایی جدایه‌های *P. tolaasii* بر روی کلاهک بریده و کامل *A. bisporus*

از چهارده جدایه‌ی *P. tolaasii* که قبلاً جداسازی و تعیین خصوصیت شده بود (Tajalipour et al., 2014, 2015)، سوسپانسیونی با غلظت 10^8 cfu/ml تهیه و به صورت مجزا بر کلاهک‌های بافت بریده و کلاهک‌های کامل *A. bisporus* مایه‌زنی شد. همه تیمارها از جمله تیمار شاهد (آب مقطر سترون) دارای چهار تکرار بودند. بعد از 48-72 ساعت، علائم بیماری یادداشت‌برداری و جدایه‌ها از نظر شدت بیماریزایی بررسی شدند (Obradovic et al., 2008; Ercolani, 1970; Nair, 2004).

آزمون بیماریزایی جدایه‌های *P. reactans* و دو جدایه *Pseudomonas sp.* بر روی بلوک‌های *A. bisporus*

در این آزمون ابتدا قطعات مکعبی شکل از کلاهک قارچ دکمه‌ای، *A. bisporus*، در اندازه‌های $2 \times 2/5 \text{cm}^3$ تهیه گردید. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر از 15 جدایه‌ی *P. reactans* و نیز از سایر جدایه‌های *Pseudomonas sp.* مشکوک به بیماریزایی، سوسپانسیونی به غلظت 10^8 cfu/ml تهیه شد. پس از آن یک قطره از هر سوسپانسیون روی بلوک‌های قارچ دکمه‌ای مایه‌زنی شد. برای هر جدایه چهار تکرار و چهار بلوک نیز به عنوان شاهد (تیمار با آب مقطر سترون) در نظر گرفته شد. بلوک‌های مایه‌زنی شده در دمای 25°C و رطوبت نسبی بالا (85%) نگهداری شدند. پس از 24-48 ساعت بلوک‌ها از نظر تغییر رنگ و تشکیل یا عدم تشکیل حفره (Pit) مورد بازبینی و یادداشت‌برداری قرار گرفتند (Nair and Fahy, 1972).

آزمون ایجاد خط رسوبی سفید (White line test) و همولیز اریتروسیت‌ها

در این آزمون جدایه‌های *P. tolaasii* و *P. reactans*، *Pseudomonas sp.* با دو جدایه استاندارد *P. reactans* NCPPB1311 و NCPPB2192 مورد بررسی قرار گرفتند. هر دو گونه *P. tolaasii* و *P. reactans* به دلیل تولید تولاسین در *P. tolaasii* و ترکیبات تولید شده در *P. reactans* قادر به همولیز اریتروسیت‌ها می‌باشند. طبق روش مانس و الاتوساوا برای بررسی فعالیت همولیتیکی از محیط کشت Blood Agar Base (BAB) استفاده

شد (Munsch and Alatosava, 2002). از *P. fluorescens* در هر دو آزمون به عنوان شاهد منفی استفاده شد. پتری‌ها در دمای 25°C به مدت 24 تا 48 ساعت انکوبه شدند. بعد از گذشت دوره انکوباسیون، جدایه‌ها از نظر قطر هاله‌ی همولیز شده قیاس شدند.

اثر 6 Pt *P. tolaasii* بر میسلیموم *A. bisporus*

اثر جدایه 6 Pt *P. tolaasii* بر میزان رشد میسلیموم *A. bisporus* مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور یک قرص پنج میلی‌متری از میسلیموم قارچ تازه‌ی *A. bisporus* در پتری حاوی محیط‌های کشت (PDA) Potato Dextrose Agar و Malt Extract Agar (MEA) به فاصله دو سانتی‌متر از حاشیه پتری قرار داده شد. بعد از 48 ساعت یک لوپ از کشت 24 ساعته جدایه 6 Pt *P. tolaasii* به صورت یک خط مستقیم با فاصله دو سانتی‌متری از آن کشت شد. پس از گذشت هفت روز قطر کلنی قارچ اندازه‌گیری و طبق فرمول زیر تأثیر احتمالی جدایه‌های باکتریایی روی رشد قارچ، مورد ارزیابی قرار گرفت (خباز جلفایی و همکاران، 2005).

$$100 \times \frac{\text{قطر کلنی قارچ در تیمار باکتری - قطر کلنی قارچ در تیمار شاهد}}{\text{قطر کلنی قارچ در تیمار شاهد}} = \text{درصد بازدارندگی}$$

شناسایی جدایه *Pseudomonas sp.* بیماریزا بر اساس روش‌های مولکولی

DNA متعلق به دو جدایه *Pseudomonas sp.* که بیماریزایی آن‌ها مشخص گردیده بود، به روش لیز کلیایی (Alkaline lysis) استخراج شد (Radermaker and Bruijn, 1997). DNA حاصله با استفاده از جفت آغازگر LAPS27 و LAPS تکثیر یافته و ژن *rpoB* آنها مورد بررسی قرار گرفت.

LAPS: 5'-TGGCCGAGAACCAGTCCGCGT-3'

LAPS27: 5'-CGGCTTCGTCCAGCTT GTTCAG-3'

استخراج توکسین ناخالص و ترکیب ناخالص WLIP

توکسین تولاسین در *P. tolaasii* و ترکیب خاصی از *P. reactans* به نام (White Line Inducing) WLIP (Principle) به روش باسارلو استخراج گردید (Bassarrello et al., 2004; Lo Cantore et al., 2006). برای این منظور از بین جدایه‌های *P. tolaasii* NCPPB2192، جدایه استاندارد *P. tolaasii* و از بین جدایه‌های بومی بیماریزاترین جدایه با کد 6 Pt *P. tolaasii* جهت استخراج تولاسین انتخاب شدند. از چهار گروه *P. reactans* به دست آمده نیز جدایه بومی 5 Pr *P. reactans* از گروه *P. reactans* دارای علائم متوسط و جدایه استاندارد *P. reactans* NCPPB1311 جهت استخراج ترکیب لیپودپسی پپتید WLIP انتخاب گردیدند. به منظور جداسازی و تعامل این دو ترکیب در جدایه 6 Pt *P. tolaasii* و در جدایه 5 Pr *P. reactans* اقدام به استخراج تولاسین و اثبات بیماریزایی آن و ترکیب WLIP شد. در این روش ابتدا پنج ارلن 500 میلی‌لیتری تهیه و داخل هر کدام مقدار 150 میلی‌لیتر محیط کشت King's B (KB) بدون آگار اضافه گردید. محیط کشت KB بدون باکتری، بعنوان شاهد در نظر گرفته شد. پس از اتوکلاو، از کشت 24 ساعته جدایه‌ها سوسپانسیونی با رقت 10^8 cfu/ml به میزان 1/5 میلی‌لیتر تهیه و در زیر هود تحت شرایط سترون به هر ارلن با کد مربوطه اضافه گردید. ارلن‌ها به مدت 48 ساعت روی

شیکر دورانی با دمای 25°C و دور 180rpm قرار داده شدند. سپس محیط‌های کشت هر ارلن در تیوپ‌های استریل اولترا سانتریفیوژ با دور 20000g و دمای 4°C به مدت 15 دقیقه سانتریفیوژ شدند. از سطح رویی مایع سانتریفیوژ شده به مقدار یک میلی‌لیتر مایع حاوی توکسین برداشته و در تیوپ یا فالكون سترون ریخته شد. تیوپ‌ها در فریزر -20°C جهت آزمون‌های بعدی نگهداری شدند (Bassarello et al., 2004; Lo Cantore et al., 2006).

آزمون‌های اثبات وجود توکسین در جدایه‌های منتخب

الف- اثر توکسین ناخالص *P. tolaasii* Pt 6 و ترکیب استخراج شده از *P. reactans* Pr 5 بر بلوک قارچ *A. bisporus*

به این منظور، بلوک‌هایی از *A. bisporus* در اندازه‌های $2 \times 2/5 \text{ cm}^3$ تهیه گردید. سپس پنج میکرولیتر از یک میلی‌لیتر متابولیت استخراج شده (1:200) بدون رقیق سازی، بر روی بلوک‌ها هر یک به طور جداگانه و با چهار تکرار مایه‌زنی شد. بلوک‌های شاهد با آب مقطر سترون و محیط کشت KB فاقد باکتری تیمار شدند. بلوک‌ها در دمای 25°C و رطوبت 85 درصد نگهداری شدند. نتایج قهوه‌ای شدن و بازدارندگی بعد از گذشت 24-48 ساعت بررسی شدند (Lo Cantore et al., 2006).

اثر آنتاگونیستی *P. reactans* A6 بر تولاسین حاصل از جدایه‌ها

جدایه بومی *P. reactans* A6 (JX491485) که قبلاً از کلاهک قارچ *A. bisporus* جداسازی و خاصیت آنتاگونیستی آن روی *P. tolaasii* اثبات شده بود (Tajalipour et al., 2015) به همراه $5\mu\text{l}$ تولاسین به طور همزمان، بر بلوک قارچ مایه‌زنی گردید و پس از 24-48 ساعت از نظر علایم بررسی شد. ایجاد لکه قهوه‌ای و در صورت وجود نقاط فرورفته بر کلاهک قارچ به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته می‌شود (Tsukamoto et al., 2002).

ب- اثر تولاسین ناخالص و ترکیب WLIP ناخالص بر بلوک‌های سیب زمینی

قطعاتی از برش‌های غده سیب‌زمینی در پتری‌های سترون مرطوب قرار داده شدند. سپس به مقدار $5\mu\text{l}$ از سوسپانسیون حاوی $5\mu\text{l}$ توکسین باکتری و WLIP هر یک بطور جداگانه بر سطح برش‌های سیب زمینی مایه‌زنی شد. نتایج بعد از گذشت 24 تا 48 ساعت بررسی و یادداشت‌برداری شد (Shirata et al., 1995; Tsukamoto et al., 2002).

اثر آنتاگونیستی *P. reactans* A6 بر تولاسین حاصل از جدایه‌ها

در این آزمون جدایه *P. reactans* A6 و تولاسین هر دو جدایه بومی *P. tolaasii* Pt 6 و استاندارد *P. tolaasii* NCPPB2192 به طور همزمان بر بلوک‌های سیب زمینی مایه‌زنی شدند (Tsukamoto et al., 2002).

پ- زیست سنجی اثر تولاسین ناخالص بر *Rhizoctonia solani*

طبق روش باسارلو و همکاران (Bassarello et al., 2004) در پتری‌های حاوی محیط کشت PDA و MEA یک قرص پنج میلی‌متری از قارچ *R. solani* در میان هر پتری قرار داده شد. پس از شروع رشد اولیه میسلیم، یک چاهک کوچک در فاصله دو سانتی‌متری از میسلیم *R. solani* ایجاد شده و $5\mu\text{l}$ از تولاسین به چاهک اضافه گردید. در پتری شاهد، داخل چاهک با محیط کشت فاقد باکتری پر شد. بعد از 48 تا 72 ساعت پتری‌ها از نظر میزان هاله بازدارندگی مورد بررسی قرار گرفتند.

ت- سنجش تولاسین ناخالص بر *Escherichia coli*

مطابق با روش باسارلو و همکاران (Bassarrello et al., 2004) در حاشیه پتری‌های حاوی دو محیط کشت NA و KB چاهک ایجاد شد. به همه چاهک‌ها به جز تیمار شاهد، تولاسین به مقدار 5µl اضافه گردید. پس از 30 دقیقه سطح پتری‌ها با باکتری *Escherichia coli* با غلظت 10⁷ cfu/ml اسپری شد. نتایج آزمون بعد از 24 تا 48 ساعت از نقطه نظر هاله‌ بازدارندگی مورد بازبینی قرار گرفت.

نتایج

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های *P. tolaasii* بر روی کلاهک بریده و کامل قارچ *A. bisporus* پس از گذشت 48 تا 72 ساعت جدایه‌ها از نظر بیماری‌زایی و ایجاد علائم به چهار گروه طبقه‌بندی گردیدند (جدول 1) و بیماری‌زاترین جدایه *P. tolaasii* Pt 6 جهت آزمون‌های بعدی مورد بررسی قرار گرفت (شکل 1).

جدول 1- گروه‌بندی استرین‌های *P. tolaasii* بر اساس علائم بیماری و شدت بیماری‌زایی روی قارچ *A. bisporus*

گروه	میزبان	تعداد جدایه	شدت علائم	توصیف
1	<i>A. bisporus</i>	1	بسیار شدید	حفره‌های بسیار عمیق به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه، حتی سیاه‌شدگی پایه و لزج شدن و بدشکلی کل قارچ
2	<i>A. bisporus</i>	6	شدید	حفره‌های عمیق، لکه‌های قهوه‌ای تیره همراه با لزجی سطح کلاهک
3	<i>A. bisporus</i>	5	متوسط	عمق حفره‌ها متوسط، کلاهک با لکه‌هایی به رنگ قهوه‌ای روشن
4	<i>A. bisporus</i>	2	ضعیف	حفره‌های کمی فرورفته به رنگ زرد مایل به کرم



شکل 1- علائم بیماری روی کلاهک کامل، کلاهک بریده قارچ *A. bisporus* بروز علائم لکه قهوه‌ای و نقاط فرو رفته توسط عامل *P. tolaasii* Pt 6 در مقایسه با شاهد منفی (NC).

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های *P. reactans* و دو جدایه *Pseudomonas sp.* بر روی بلوک‌های *A. bisporus* در این آزمون پس از گذشت 24 تا 48 ساعت از تلقیح بلوک‌های *A. bisporus* با سوسپانسیون جدایه‌های *P. reactans*، بلوک‌ها از لحاظ علائم بیماری بر سطح خود بررسی شدند. از این گروه تعدادی از جدایه‌ها ایجاد لکه قهوه‌ای خفیف تر از علائم لکه قهوه‌ای حاصل از *P. tolaasii* نمودند و تعدادی با بیماری متوسط و خفیف و تعدادی هم فاقد علائم بیماری بودند. دو جدایه انتخابی *Pseudomonas sp. p1* ایجاد لکه‌های زردرنگ و جدایه *Pseudomonas sp. p2* ایجاد لکه‌های زرد رنگ به همراه نقاط فرو رفته (Pit) بر روی بلوک *A. bisporus* نمودند که پس از مدتی لکه‌ها تیره‌رنگ شدند.

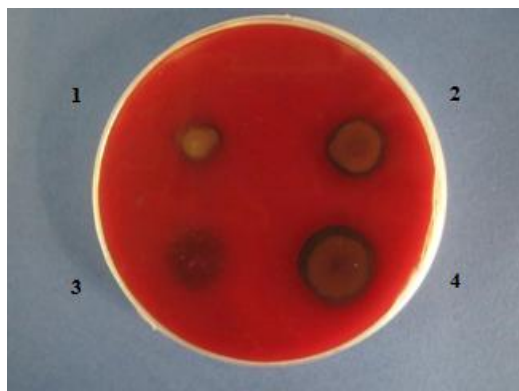
آزمون ایجاد خط رسوبی سفید (White line test) و همولیز اریتروسیت‌ها

جدایه‌هایی که در مقابل *P. reactans* NCPPB1311 رسوب سفیدرنگ ایجاد نمودند، وایت لاین مثبت بوده و با توجه به نتایج آزمون‌های دیگر جدایه‌ها به نام *P. tolaasii* تشخیص داده شدند. همچنین جدایه‌هایی که در مقابل *P. tolaasii* NCPPB2192 رسوب سفید رنگ ایجاد کردند با تکمیل آزمون‌های تشخیصی، آزمون لوپات (Lelliott and Stead, 1987; Lo Cantore and Iacobellis, 2004) تولید پیگمان فلورسنت روی محیط KB، همولیز اریتروسیت‌ها (Schaad et al., 2001; Lelliott and Stead, 1987; Tajalipour et al., 2015) بعنوان *P. Reactans* تشخیص داده شدند. جدایه‌های بومی *P. reactans* Pr 5 و *P. tolaasii* Pt 6 نیز در مقابل هم ایجاد رسوب سفید رنگ نمودند (شکل 2).



شکل 2- آزمون خط رسوبی سفید (وایت لاین) ایجاد شده توسط دو جدایه *P. tolaasii* و *P. reactans* در برابر یکدیگر. سه خط موازی که جدایه 1، *P. tolaasii* Pt 6 در مقابل خط مستقیم جدایه *P. reactans* NCPPB1311 ایجاد وایت لاین نموده است. دو جدایه 2 و 3 به ترتیب مربوط به جدایه‌های *Pseudomonas sp. p2* و *P. fluorescence* Pf 23 وایت لاین منفی می‌باشند.

همچنین دو جدایه *Pseudomonas sp. p1* و *Pseudomonas sp. p2* در مقابل هیچ یک از جدایه‌های استاندارد ایجاد رسوب نکرده و وایت لاین منفی بودند. علاوه بر این اغلب جدایه‌ها به جز دو جدایه *Pseudomonas sp. p1* و *Pseudomonas sp. p2* قادر به همولیز سلول‌های خونی اریتروسیت‌ها و ایجاد هاله بازدارندگی در اطراف کلونی خود بودند (شکل 3). تنوع در اندازه قطر هاله شفاف بین گونه‌های *P. tolaasii* و *P. reactans* کاملاً مشهود بوده و جدایه‌های *P. reactans* هاله‌های شفاف بزرگتری را نسبت به جدایه‌های *P. tolaasii* ایجاد نمودند.



شکل 3- همولیز سلول‌های خونی اریتروسیت‌ها روی محیط کشت BAB توسط باکتری‌های *P. tolaasii* و *P. reactans*. به ترتیب اعداد، تیمارها عبارتند از 1) *Pseudomonas sp. p2* 2) *P. tolaasii* Pt 6 3) *P. fluorescens* Pf 23 4) *P. reactans* Pr 5 (Negative Control) و 5) *P. reactans* Pr 5.

اثر باکتری بیمارگر بر میسلیم قارچ *A. bisporus*

از آنجا که این آزمون به صورت کار مقایسه‌ای در دو تکرار انجام شد. پس از گذشت هفت روز قطر کلنی قارچ اندازه‌گیری و طبق فرمول درصد بازدارندگی تأثیر احتمالی جدایه‌های باکتریایی روی رشد قارچ، مورد ارزیابی قرار گرفت و میانگین بازدارندگی‌های هر تیمار بررسی و درصد بازدارندگی‌های هر تیمار با هم مقایسه گردید. بنابراین اثر جدایه نماینده *P. tolaasii* Pt 6 بر رشد میسلیم *A. bisporus* در مقایسه با شاهد نشان داد که *P. tolaasii* موجب کاهش رشد میسلیمی قارچ *A. bisporus* شد (جدول 2). به طور کلی در مبحث بازدارندگی میسلیمی، بازدارندگی باکتری عامل لکه قهوه‌ای صرفاً عامل تعیین کننده نمی‌باشد زیرا تعدادی از جدایه‌های آنتاگونیست هم این بازدارندگی را از خود نشان می‌دهند اما جهت رشد زایشی قارچ مفید می‌باشند.

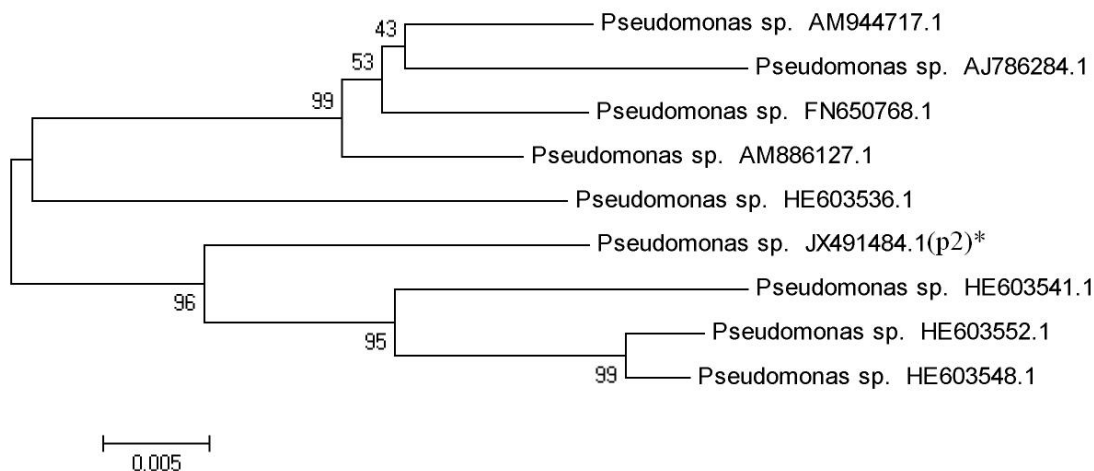
جدول 2- میزان بازدارندگی از رشد میسلیمی *A. bisporus* توسط جدایه *P. tolaasii* نسبت به شاهد .

تیمار	میانگین قطر کلونی در محیط کشت PDA (mm)	میانگین قطر کلونی در محیط کشت MEA (mm)	میزان درصد بازدارندگی در محیط کشت PDA (mm)	میزان درصد بازدارندگی در محیط کشت MEA (mm)
Negative control (dH2O)	4	4/3	ND	ND
<i>P. tolaasii</i> Pt 6	2/70	2/75	32/5	36/04

ND: Not defined

شناسایی دو جدایه *Pseudomonas* sp. بیماریزا بر اساس روش‌های مولکولی

توالی یک جدایه از *Pseudomonas* sp. بیماریزا در بانک ژن NCBI با کد p2 و با شماره JX491484 ثبت گردید. دندروگرام جدایه p2 استرین p2 ippbc در ارتباط با تعدادی از توالی‌های ثبت شده در بانک ژن NCBI با استفاده از نرم افزار Mega5 (Tamura et al., 2007) و با روش Neighbor-Joining ترسیم شد (شکل 4).



شکل 4- درخت فیلوژنتیکی جدایه p2 *Pseudomonas* sp. با استفاده از نرم افزار Mega5 به روش Neighbor-joining. اعداد ذکر شده در محل انشعاب، نتایج اعتبارسنجی را براساس 1000 تکرار نشان می‌دهند.

آزمون‌های اثبات وجود توکسین در جدایه‌های منتخب

الف- اثر توکسین ناخالص *P. tolaasii* Pt 6 و جدایه استاندارد و ترکیب استخراج شده از *P. reactans* Pr 5 و

جدایه استاندارد بر بلوک قارچ *A. bisporus*

پس از گذشت 24 تا 48 ساعت از زمان مایه‌زنی بلوک‌ها، بلوک‌های مایه‌زنی شده با تولاسین استرین *P.*

Tolaasii Pt 6 دارای علایم لکه قهوه‌ای تیره و نقاط کمی فرو رفته شدند و در مقابل ترکیب WLIP استرین *P.*

reactans Pr 5 تغییر رنگ خفیفی ایجاد نمود. همچنین علایم حاصل از توکسین جدایه استاندارد *P. tolaasii*

NCPB2192 نیز علائم لکه قهوه‌ای با نقاط فرورفته ایجاد نمود و ترکیب حاصل از جدایه استاندارد *P. reactans* NCPB1311 ایجاد لکه قهوه‌ای خفیف نمود. تیمار شاهد فاقد علائم بر بلوک‌ها بود.

ب- اثر آنتاگونیستی *P. reactans* بر تولاسین حاصل از جدایه‌ها

جدایه *P. reactans* A6 که پیشتر خاصیت آنتاگونیستی آن بر *P. tolaasii* اثبات شده بود (Tajalipour et al., 2014) به همراه تولاسین به طور همزمان بر بلوک قارچ مایه‌زنی شد و پس از 24-48 ساعت از علائم شدید لکه قهوه‌ای جلوگیری نمود. بکارگیری هر دو ترکیب *P. reactans* A6 و تولاسین هر دو جدایه بومی و استاندارد به طور همزمان از علائم آشکار قهوه‌ای شدن ناشی از تولاسین جلوگیری نمود.

پ- زیست سنجی اثر تولاسین ناخالص بر قارچ *Rhizoctonia solani*

در پتری‌های حاوی محیط کشت PDA و MEA حاوی قارچ *R. Solani*، بعد از گذشت پنج روز از شروع رشد میسلیوم در پتری حاوی تولاسین، تولاسین از رشد میسلیوم به میزان سه میلی‌متر جلوگیری نمود و درصد بازدارندگی نسبت به شاهد 37/5 درصد بود. در پتری شاهد که داخل چاهک آن از محیط کشت فاقد باکتری پر شده بود هیچ گونه بازدارندگی موجب نشد.

ت- سنجش تولاسین ناخالص بر باکتری *Escherichia coli*

پس از گذشت 24 تا 48 ساعت از اسپری باکتری *Escherichia coli* به پتری‌های حاوی تولاسین، تولاسین به میزان یک و نیم میلی‌متر در برابر باکتری بازدارندگی نشان داد. پتری شاهد فاقد بازدارندگی بود.

بحث

در حال حاضر بیماری لکه قهوه‌ای برای تولیدکنندگان این محصول مشکل مهمی محسوب می‌شود. با توجه به بافت نرم و حفظ ظاهر سفید قارچ، کنترل این باکتری با سموم معمول مخاطره‌آمیز بوده که همین مسئله مدیریت این بیماری را با چالش بزرگی روبرو کرده است. باکتری مزبور این توانایی را دارد که برای بقاء در محیط‌های نامطلوب مسیرهای بیوشیمیایی خود را تغییر دهد (Nair and Fahy, 1972). یکی از مهمترین متابولیت‌های شناخته شده آن تولاسین به عنوان توکسین خارج سلولی است که فقط توسط فرم بیماریزای *P. tolaasii* تولید می‌شود و هنگامی که به طور مستقیم روی قارچ خوراکی قرار بگیرد باعث ایجاد علائم بیماری لکه قهوه‌ای یا بلاچ باکتریایی می‌شود (Nair and Fahy, 1973).

در این مطالعه علاوه بر شناسایی دو جدایه *Pseudomonas* sp. بیماریزا مطابق با روش‌های معمول چون صفات بیوشیمیایی، ایجاد خط رسوبی سفید (White line test) و همولیز اریتروسیت‌ها، از روش PCR برای تکثیر ژن *rpoB* با استفاده از جفت آغازگر LAPS27 و LAPS استفاده گردید. در پی آن، توالی جدایه *Pseudomonas* sp. بیماریزا با کد p2 و با شماره JX491484 در بانک ژن NCBI ثبت گردید. علاوه بر این‌ها در این تحقیق سعی گردید جدایه‌های *P. tolaasii* و توکسین به دست آمده از آن روی بلوک‌های قارچ و میسلیوم *A. bisporus* بررسی و نتایج اثر مستقیم پاتوژن و متابولیت استخراج شده آن بطور کیفی مورد مقایسه قرار گیرد. از دیگر زیست سنجی‌های

تکمیلی می‌توان به سنجش تولاسین ناخالص علیه باکتری *Escherichia coli* و قارچ *Rhizoctonia solani* اشاره نمود.

براین اساس جدایه‌های *P. tolaasii* از لحاظ شدت بیماری‌زایی و ظهور علائم روی میزبان *A. bisporus* در چهار گروه طبقه‌بندی شدند. سپس متابولیت شناخته شده آن مورد ردیابی و شناسایی قرار گرفت. طبق منابع موجود، بیماری‌زایی باکتری *P. tolaasii* به سبب تولید توکسین تولاسین می‌باشد (Grewal et al., 1995). اما احتمال داده شد که تفاوت در نوع و شدت علائم ایجاد شده توسط جدایه‌های چهار گروه مذکور به سبب اختلاف در ساختار ژنتیکی آن‌ها از نظر بیماری‌زایی و به ویژه میزان تولید تولاسین باشد.

در بررسی حاضر وقتی بلوک‌های قارچ با تولاسین استرین Pt 6 *P. tolaasii* مایه‌زنی شدند پس از 24 تا 48 ساعت علائم لکه قهوه‌ای تیره و نقاط کمی فرو رفته (pitting) در سطح بلوک‌ها مشاهده شد. علائم مشابه نیز توسط جدایه استاندارد *P. tolaasii* NCPPB2192 ایجاد گردید. آزمون مذکور یک آزمون شناخته شده برای تشخیص تولاسین است. غلظت توکسین در ایجاد علائم بیماری بسیار تعیین کننده می‌باشد. به طوری که کاربرد $10 \mu\text{gml}^{-1}$ از تولاسین باعث ایجاد حفره و کاربرد $30 \mu\text{g ml}^{-1}$ باعث قهوه‌ای شدن بافت و ایجاد حفره پس از 16 ساعت می‌شود (Hutchison and Johnstone, 1993). این علائم اثرات ماکروسکوپی و قابل مشاهده عمل مستقیم تولاسین بر بافت هیفی قارچ است (Brodey et al., 1991). فعالیت تولاسین نیز روی بلوک‌های سیب زمینی توسط شیراتا و همکاران انجام گرفت که نشان داد که سیاه‌شدگی بلوک ناشی از تاثیر تولاسین است (Shirata et al., 1995) در اینجا نیز تیره شدن بلوک‌های سیب زمینی را ناشی از این عامل دانستیم.

از طرفی، ترکیب WLIP می‌تواند منجر به غیرفعال کردن تولاسین شود (Soler-Rivas et al., 1999). باکتری *P. reactans* به علت تولید مواد و متابولیت‌های ضدباکتریایی دارای پتانسیل بازدارندگی علیه *P. tolaasii* بوده و می‌تواند بروز لکه قهوه‌ای را روی قارچ خوراکی به طور محسوسی کاهش دهد (Grewal and Hand, 1992; Soler-Rivas et al., 1999). در این بررسی نیز وقتی آزمون مشابهی انجام گرفت مشاهده شد که بلوک‌های قارچ در مقابل ترکیب WLIP استرین Pr 5 *P. reactans* تغییر رنگ خفیفی ایجاد نمودند و در برابر ترکیب حاصل از جدایه استاندارد *P. reactans* NCPPB1311 ایجاد لکه قهوه‌ای خفیف نمودند. در این بررسی بکارگیری هر دو ترکیب *P. reactans* A6 و تولاسین هر دو جدایه بومی و استاندارد به طور همزمان از علائم آشکار قهوه‌ای شدن ناشی از تولاسین جلوگیری نمود.

از مشخصات بارز استرین *Pseudomonas* sp. p2، ایجاد لکه‌های کم‌رنگ و نقاط فرورفته بر بلوک‌های قارچ بدون ایجاد وایت لاین بود. در مطالعات مشابه در نیوزیلند مشخص شد گونه دیگری از این جنس باکتری به نام *Pseudomonas* NZ17 دارای ویژگی مشابه بوده است و در این باکتری تولید وایت لاین مثبت بوده و روی بلوک قارچ ایجاد زخم‌های قهوه‌ای می‌نمود (Godfrey et al., 2001).

از آنجائی که تولاسین موجب مهار رشد تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و تعدادی از بازیدیومیست‌ها می‌شود و تعداد زیادی از این باکتری‌ها و قارچ‌های شاخص تاکنون معرفی شده‌اند (Lo Cantore et al., 2006). در این بررسی سعی گردید از باکتری *E. coli* و قارچ *R. solani* به عنوان بیوسنسور استفاده شود (Grewal et al., 1995).

نتایج تا حدودی مشابه بود و دلیل عدم انطباق کامل نتایج ناخالص بودن تولاسین مورد بررسی بوده است. با توجه به گستردگی نقش متابولیت‌های باکتریایی، این بررسی تنها مقدمه‌ای بر نقش و بررسی توکسین تولاسین و ترکیب WLIP بوده و نیازمند تحقیقات گسترده‌تر است.

References

1. Andolfi A, Alessio Cimmino A, Lo Cantore P, Iacobellis NS and Evidente A. 2008. Bioactive and structural metabolites of *Pseudomonas* and *Burkholderia* species causal agents of cultivated mushrooms diseases. *Perspectives Medicinal Chemistry* 2: 81–112.
2. Bassarello G, Lazzaroni S, Bifulco G, Lo Cantore P, Iacobellis NS, Riccio R, Gomes-Paloma L and Evidente A. 2004. Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy* 67: 811–816.
3. Beelman RB, Guthrie BD and Royse DJ. 1989. Influence of bacterial populations on postharvest deterioration of fresh mushrooms. *Mushroom Science* 12: 655–665.
4. Brodey CL, Rainey PB, 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 Interactions* 4: 407–411.
5. Ercolani GL. 1970. Primi risultati di osservazioni sulla maculatura batterica dei funghi coltivati (*Agaricus bisporus* (Lange) Imbach) in Italia: di *Pseudomonas tolaasii* Paine. *Phytopathology Mediterranea* 9: 59–61.
6. Fermor TR and Lynch JM. 1988. 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.
7. Geels FP. 1995. *Pseudomonas tolaasii* control by kaisugamycin in cultivated mushrooms (*Agaricus bisporus*). *Journal of Applied Bacteriology* 79: 38–42.
8. Godfrey SAC, Marshall JW and Klena JD. 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.
9. Grewal PS and Hand P. 1992. Effects of bacteria isolated from a *saprophagous rhabditid* nematode *Caenorhabditis elegans* on the mycelial growth of *Agaricus bisporus*. *Journal of Applied Bacteriology* 72: 173–179.
10. Grewal SIS, 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: 4658–4668.
11. Han B, Pain A, Smith J, Grewal S and Johnstone K. 1995. Regulation of phenotypic variation and toxin synthesis in *Pseudomonas tolaasii*. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology* 25: 105–106.
12. Hutchison ML and Johnstone K. 1993. Evidence for the involvement of the surface active properties of the extracellular toxin tolaasin in the manifestation of brown blotch disease symptoms by *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 42: 373–384.

13. Khabbaz-Jolfaee H and Rahimian H. 2002. Brown blotch disease of cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 38: 1–2 (In Persian).
14. Khabbaz-Jolfaee H, Mohammadi Goltapeh H and Rahimian HA. 2005. Isolation, screening and evaluation of the efficacy of potentially antagonistic bacteria for the biocontrol of brown blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Iranian Journal of Plant Pathology 41: 543–559.
15. Kwon S-W, Kim S-H and Go S-J. 2000. PCR assays for detection of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas agarici*. Microbiology 28: 89–92.
16. Lo Cantore P, Lazzaroni S, Coraiola M, Dalla Serra, M, Cafarchia C, Evidente A and Iacobellis NS. 2006. Biological characterization of white line inducing principle (WLIP) produced by *Pseudomonas reactans* NCPPB1311. Molecular Plant-Microbe Interaction 19: 1113–1120.
17. Munsch P and Alatossava T. 2002. Several Pseudomonads, associated with the cultivated mushrooms *Agaricus bisporus* or *Pleurotus* sp., are hemolytic. Microbiology Research 157: 311–315.
18. Nair NG and Fahy PC. 1972. Bacteria antagonistic to *Pseudomonas tolaasii* and their control of brown blotch of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. Journal of Applied Bacteriology 35: 439–442.
19. Nair NG and Fahy PC. 1973. Toxin production by *Pseudomonas tolaasii* Paine. Australian Journal of Biological Sciences 26: 509–512.
20. Nair NG. 2004. First report of brown discoloration of *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas agarici* in southern Italy. Phytopathologia Mediterranea 43: 35–38.
21. Obradovic A, Gasic K and Ivanovic M. 2008. Bacterial diseases of *Agaricus bisporus* in Serbia. Biomedical and Life Sciences. pp. 427–430, In M Fatmi, A Collmer, NS Iacobellis, J Mansfield, J Murillo, NW Schaad, M Ullrich (eds). *Pseudomonas syringae* Pathovars and Related Pathogens - Identification, Epidemiology and Genomics. Wallingford: Springer Science + Business Media.
22. Paine SG. 1919. Studies in bacteriosis. II: A brown blotch disease of cultivated mushrooms. Annals of Biology 5: 206–219.
23. Rademaker JLW and de Bruijn FJ. 1997. Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. In: Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (eds.): DNA markers: Protocols, Applications and Overviews, J. Wiley & Sons, USA. Chapter 10 p. 151-171.
24. Rahimiyan C, Zarei A and Okhovatian C. 1995. Mushroom brown blotch in Mazandaran. Paper presented at: 12th Iranian Plant Protection Congress; 2–7 September; Tehran, Iran.
25. Rainey PB, Brodey CL and Johnstone K. 1991. Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. Physiological and Molecular Plant Pathology 39: 57–70.
26. Schaad NW, Jones JB and Chun W. 2001. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3rd ed. St. Paul: American Phytopathological Society Press, 398 p.
27. Shirata A, Sugaya K, Takasugi M and Monde K. 1995. Isolation and biological activity of toxins produced by a Japanese strain of *Pseudomonas tolaasii*, the pathogen of bacterial rot of cultivated oyster mushroom. Annals of the Phytopathological Society of Japan 61: 493–502.

28. Soler-Rivas C, Jolivet S, Arpin N, Oliver JM and Wichers HJ. 1999. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. FEMS Microbiology Review 23: 591–614.
29. Soler-Rivas C. 1998. Molecular aspects of the bacterial blotch disease of *Agaricus bisporus* [PhD]. [Lyon (France)]: University Claude-Bernard Lyon 1.
30. Tajalipour Sh, Hassanzadeh N, Heydari A and Khabbaz-Jolfaee H. 2012. Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas tolaasii*, the causal agent of brown blotch disease on button mushroom (*Agaricus bisporus*). Paper presented at: 19th Iranian Plant Protection Congress; 31 July–3 August; Tehran, Iran.
31. Tajalipour Sh, Hassanzadeh N, Heydari A and Khabbaz-Jolfaee H. 2015. Study on genetic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas reactans* bacteria associated with mushroom brown blotch disease employing ERIC and BOX-PCR techniques. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 8: 398–405.
32. Tajalipour Sh, Hassanzadeh N, Khabbaz-Jolfaee H, Heydari A and Ghasemi A. 2014. Biological control of mushroom brown blotch disease using antagonistic bacteria Biocontrol Science and Technology 24: 473–484.
33. Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution 24: 1596–1599.
34. Tsukamoto T, Murata H and Shirata A. 2002. Identification of Non-Pseudomonad bacteria from fruit bodies of wild Agaricales Fungi that detoxify tolaasin produced by *Pseudomonas tolaasii*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry 66: 2201–2208.
35. 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: 1098–1104.
36. 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.
37. Wong WC and Preece TF. 1982. *Pseudomonas tolaasii* in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) crops: numbers of the bacterium and symptom development on mushrooms grown in various environments after artificial inoculation. Journal of Applied Bacteriology 53: 87–96.

Study on the effect of certain metabolites produced by *Pseudomonas tolaasii* and associated bacteria on *Agaricus bisporus*

Sh. Tajalipour^{*1}, N. Hassanzadeh², A. Heydari³, H. KHabbaz Jolfaee⁴

Abstract

In this research some metabolites of *Pseudomonas tolaasii* the causal agent of mushroom bacterial blotch disease and *Pseudomonas reactans* associated with it were investigated. Characteristic features of *P. tolaasii* included brown pit formation on button mushroom caps, tolaasin production, lysis of erythrocytes, and white line induction in agar plate in presence of *Pseudomonas reactans*. Further, the metabolites of *P. tolaasii* and mushroom-associated bacteria were extracted and their effects were evaluated against the blocks of the mushroom *A. bisporus*. It was noticed that the strains of *P. reactans* also produced a lipodepsipeptide, WLIP. Certain complementary tests were also conducted to confirm the presence of these compounds in products extracted. The *rpoB* gene of a pathogenic strain of *Pseudomonas* sp. p2 isolated from the same mushroom was amplified using the primer pair of LAPS and LAPS27 and sequenced and deposited in Genebank at NCBI. Effect of impure WLIP of the strain *P. reactans* Pr 5 and standard strain of *P. reactans* NCPPB1311 were examined on blocks of *A. bisporus* and potato tubers. In bioassays, the tolaasin of strain *P. tolaasii* Pt 6 created both brown blotch and slight pitting symptoms. Whereas, WLIP of the *P. reactans* Pr 5 could only induce slight discoloration. Another important finding was that simultaneous application of *P. reactans* A6 in combination with tolaasins of *P. tolaasii* Pt 6 or *P. tolaasii* NCPPB2192 resulted in suppression of brown blotch symptoms on treated blocks with *P. tolaasii*. Results indicate the importance of associated bacteria in suppression of disease by *P. tolaasii*.

Key words: *Agaricus bisporus*, brown blotch, *Pseudomonas reactans*, *Pseudomonas tolaasii*, white botton mushroom

¹- Former MSc Student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²- Associated professor, Department of Plant Pathology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³- Associated professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

⁴- Research Instructor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran.

*Corresponding author: sh_tajalli_pour@yahoo.com