

## مقاله تحقیقی

## بررسی اثرات بازدارندگی برخی پپتیدهای حشرات علیه باکتری *Pseudomonas tolaasii* عامل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ سفید دکه ای

افسانه مسلمی مهنی<sup>۱</sup>، محمد رهنمائی‌ان<sup>۲</sup>، نادر حسن زاده<sup>۳</sup>، حمید فروتن فر<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- بخش شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه فیلیس، ماربورگ، آلمان.

۳- استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی و فرآورده های آرایشی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

مسئول مکاتبات: محمد رهنمائی‌ان، ایمیل: rahnamaeian@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۵

۱۲۳-۱۱(۱)۱۰۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۴/۰۴

### چکیده

باکتری *Pseudomonas tolaasii* عامل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی از مهمترین عوامل محدودکننده تولید این محصول می‌باشد که تاثیر مستقیمی بر کاهش کیفیت محصول دارد. باتوجه به عدم وجود راه حل مناسب در مدیریت این بیماری با کاربرد سموم شیمایی و آنتی بیوتیک‌ها، که اثرات ناخواسته سمیت و مقاومت میکروبی را در پی دارند، تحقیقات گسترده‌ای در زمینه شناسایی ترکیبات ضدباکتری طبیعی و سازگار با سلامت محصول، در حال انجام است. در تحقیق حاضر نیز بدین منظور، پس از جداسازی و شناسایی گونه بیمارگر باکتری *Pseudomonas tolaasii* با روشهای معمول آزمایشگاهی، اثرات ضد باکتریایی ده پپتید حاصل از گونه‌های مختلف حشرات، نظیر پروانه سکروپیا، مورچه مرمیسیا، مورانه، زنبور عسل اروپایی، مگس میوه مدیترانه‌ای، مگس اسطبل و مگس گوشت، علیه این بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی از رشد به میزان ۵۰٪ (MIC) مقادیر حداقل غلظت کشندگی (MBC) پپتیدهای مورد نظر علیه باکتری بیمارگر به روش تست الایزا به دست آمد. برای تایید نتایج MBC محتوی میکروپلیت‌ها مجدد کشت شدند. جهت ارزیابی شدت و کیفیت علائم بیماری در محیط آزمایشگاهی، سطح بلوک‌های قارچ با غلظت 1mM از پپتیدهای موثر پوشانیده شد و سپس با سوسپانسیون باکتری حاوی  $10^8$  cfu/ml مایه زنی شدند. پپتیدها با توجه به نوع بروز علائم در شش گروه متفاوت (B0-B1-B2-B3-B—B5) قرار گرفتند. سطوح مختلف شدت بروز علائم بیماری، از شاخص بدون علامت (B0) تا شاخص علائم پوسیدگی قهوه‌ای همراه با نقاط فرورفته (B5) مورد ارزیابی قرار گرفت. مقادیر MIC نشان داد که پپتیدهای Cecropin A (پروانه سکروپیا)، Scal-stomoxyn (مگس اسطبل)، Lser-Cecropin1 (مگس گوشت) در غلظت‌های متفاوتی سبب کاهش رشد حداقل ۵۰٪ جمعیت باکتری *P. tolaasii* شدند. کمترین مقدار MBC نیز در پپتید Cecropin A در غلظت  $6.25 \mu\text{M}$  مشاهده شد. در نتایج بررسی کیفیت و شدت بروز علائم، پپتید Cecropin A در سطح B0، بطور کامل کلاهک قارچ را در شرایط آزمایشگاهی علیه باکتری *P. tolaasii* محافظت نمود و از بروز علائم بیماری جلوگیری کرد. پس از آن پپتید Scal-stomoxyn با ایجاد لکه‌های مختصر زرد رنگ در سطح شاخص B1 قرار گرفت و تا حدودی مانع پیشرفت علائم بیماری شد. پپتیدهای Spinigerin (مورانه)، Ceratotoxin (مگس میوه مدیترانه‌ای)، Formaein-1 (مورچه مرمسیا)، Metchnikowin1 (مگس سرکه)، Apidaecin Ia (زنبور عسل اروپایی) و Metchnikowin-2 (مگس سرکه) نیز با ایجاد لکه‌های قهوه‌ای پوسیده در سطح B4 قرار گرفتند. شدیدترین سطح بروز علائم نیز در شاخص (B5)

پوسیدگی قهوه‌ای همراه با نقاط فرورفته بر روی کلاهک قارچ بود که تنها در نمونه شاهد مثبت حاوی محیط کشت و باکتری مشاهده شد. تمامی آزمایشات در ۳ تکرار انجام شد و آنالیز آماری با روش تجزیه واریانس و مقایسه میانگین‌های مقادیر MIC و MBC به روش دانکن انجام شد. وفق نتایج این مطالعه، می‌توان از پپتیدهای ضد میکروبی با منشا حشرات به ویژه Cecropin ها در کاهش بیماری لکه قهوه‌ای قارچ سفید دکمه‌ای بهره برد.

واژه‌های کلیدی: *Pseudomonas tolaasii*، قارچ خوراکی، پپتیدهای ضد میکروبی، Cecropin

## مقدمه

پپتیدهای ضد میکروبی (Antimicrobial peptides) نیز عوامل ضد میکروبی طبیعی جدیدی هستند که اخیراً مورد توجه محققان قرار گرفته‌اند. این ملکولها اجزاء مهم سیستم ایمنی ذاتی گونه‌های زیستی محسوب می‌شوند (Hancock, 2001) و شبه پروتئین‌هایی هستند که طی مراحل پیچیده واکنشهای فشرده‌سازی سنتز پپتیدهای غیر ریوزومی بزرگ (Non Ribosomal peptides) ساخته می‌شوند. وزن ملکولی اکثر آنها کمتر از 10 KDa می‌باشد. دارای بار و خاصیت آبدوستی و موثر بر غشاء سلولی‌اند. پپتیدهای ضد میکروبی بر اساس طول و ساختار دوبعدی و چند بعدی وجود یا عدم وجود پل دی سولفید طبقه بندی می‌شوند (Koehbach & Craik, 2019; Lei et al., 2019). این پپتیدها از منابع مختلفی نظیر گیاهان (Barbosa, 2009)، میکروارگانیسم‌هایی نظیر باکتری‌ها و قارچ‌ها (Cao et al., 2018); تخم مرغ (Memarpoor-yazd, 2012)، انسان (Zhang et al., 2017) جداسازی شده‌اند. حشرات پپتیدهای مشابهی را بعنوان بخشی از واکنش‌های سیستم ایمنی ترشح می‌کنند. از مزیت پپتیدهای ضد میکروبی اخیر، تاثیر سریع آنها بر عوامل میکروبی است (Taguchi et al., 2009). از پپتیدهای ضد میکروبی بدست آمده از حشرات، می‌توان به سکروپین (Hoffman et al., 1993) (Cecropin)، استوموکسین (Stomoxyn)، اسپینجیرین (Spinigerin) (Eteves et al., 2009; Kulkerni et al., 2011)، سارکوتوکسین IA (Sarcotoxin IA) (Matsuyama & Not, 1990) و پپتیدهای دیگری که از حشراتی نظیر مگس گوشت (*Sarcophaga peregrina* (flesh fly)) اشاره نمود (Matsuyama & Not, 1990). بسیاری از ارگانیسم‌ها از این پپتیدها به عنوان بخشی از سیستم دفاعی اولیه در مقابل عوامل بیماری‌زا استفاده می‌کنند و این پپتیدها آینده

قارچ سفید دکمه‌ای *Agaricus bisporus* L. دارای ارزش غذایی و مقادیر بالایی از پروتئین است (Shahriari et al., 2018). یکی از عوامل محدودکننده تولید این محصول در ایران، بیماری لکه قهوه‌ای باکتریایی با عامل *Pseudomonas tolaasii* است (Farsi & Pourianfar, 2011). این بیماری نه تنها بازاریبندی محصول را کاهش می‌دهد، بلکه از لحاظ اقتصادی نیز خسارت بالایی حدود ۴۰٪ ایجاد می‌کند (Namazi et al., 2016). عامل این بیماری ابتدا توسط تولاس (Tolaas, 1915) و سپس پین (Paine, 1919) جداسازی و در دهه‌های بعدی به دقت شناسائی و طبقه‌بندی شد (Wong et al., 1982). در ایران، باکتری *P. tolaasii* اول بار در سال ۱۳۷۴ از استانهای مرکزی و شمالی ایران از سالن‌های پرورش قارچ گزارش شد (Rahimian & Zarei, 1995) با توجه به عدم وجود سموم تخصصی در کنترل این بیماری و روشهای معمول غیرتخصصی در کنترل این بیماری نظیر کاربرد ترکیبات ضد عفونی کننده عمومی چون هیپوکلریت سدیم (Wong & Preece, 2008) و یا تغییر محیط بسته‌بندی، کاهش پلی فنل اکسیدازها، استفاده از پوشاننده‌های قابل خوردن و خنک کردن سطح قارچ، تحقیقات جدیدی برای یافتن روشهای نوین کنترل بیماری، نظیر کاربرد اسانس‌های گیاهی (Soković et al, 2006)، عصاره‌های گیاهی (Tajalipour et al., 2015)، ترکیبات فرار تولید شده از باکتری‌های اندوفیت (Ghasemi et al, 2021)، آنتاگونیست‌های باکتریایی (Negus et al., 2017) و نیز باکتریوفاژها (Merabishvili et al., 2018; Wittebole et al., 2014) رو به افزایش است.

در حوزه گیاه پزشکی، تحقیقات محدودی در رابطه با کاربرد پپتیدهای ضد میکروبی علیه باکتری‌های گیاهی انجام شده است از جمله بررسی خاصیت باکتری کشی پپتید-LL hCAP18/ 37. با منشا انسانی علیه *carotovorum* *Pectobacterium* (Holásková *et al.*, 2018) و یا پپتید Melittin حاصل از زنبور عسل علیه باکتری *Xanthomonas oryzae* (Shi *et al.*, 2016) و پپتید Tannins علیه *Ralstonia solanacearum*, (Vu *et al.*, 2017). در دهه‌های اخیر گزارشاتی مبنی بر بررسی خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی پپتیدها خصوصا پپتیدهای سنتزی و تولید گیاهان تراریخته مقاوم به عوامل بیماری‌زای گیاهی رو به افزایش است (Tang *et al.*, 2023). در ایران نیز تحقیقاتی در این زمینه انجام شده است نظیر استفاده از پپتید Dermaseptin B1 موجود در ریشه های موئن توتون تراریخته که از رشد باکتری‌های بیمارگر گیاهی *Erwinia amylovora*، *Pectobacterium carotovorum* و *Xanthomonas citri* جلوگیری نمود (Alibakhshi *et al.*, 2018). بررسی نتایج کاربرد پپتیدهای سنتزی و گیاهان تراریخته حاوی پپتید، می‌تواند برای کاهش بیماری‌های گیاهی امیدوار کننده باشد.

در تحقیق حاضر نیز عملکرد ده پپتید ضد میکروبی با منشا حشرات برای نخستین بار در ایران با هدف کنترل بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی در شرایط آزمایشگاهی، مورد مطالعه و ارزیابی قرار گرفت.

### مواد و روش

**جداسازی و شناسایی جدایه باکتری بیمارگر *P. tolaasii***

نمونه‌های قارچ خوراکی مشکوک به پوسیدگی باکتریایی در پاکت‌های کاغذی از محل‌های پرورش قارچ دکمه‌ای به آزمایشگاه منتقل شد. جداسازی باکتری از قسمت کلاهک و پایه‌های قارچ پس از ضد عفونی سطحی بر روی محیط کشت افتراقی کینگ ب (King's B, Merck) در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انجام شد (King *et al.* 1954).

### ۱- آزمون‌های تشخیص باکتری *P. tolaasii*

روشنی در تولید دارو و غذا و صنعت کشاورزی و دامداری خواهند داشت (Huan *et al.*, 2020). در بخش پزشکی از برخی پپتیدهای شناخته شده بعنوان داروهای موثر بر مکانیسم ایمنی، داروی ضد تومور و بعنوان عوامل خنثی سازی سموم داخلی بدن، استفاده می‌شود. (Gomes *et al.*, 2020).

مزیت اصلی (Antimicrobial peptides) AMPs به عنوان سموم گیاهی، توانایی سلولهای یوکاریوتی در هضم آنها و نیمه عمر بسیار کوتاه آنها به علت وجود پپتیدآزهای فراوان در بدن پستانداران است. این پپتیدها بر اساس نوع و مشخصات فیزیکوشیمیایی، توانایی وسیعی در ممانعت از رشد باکتری‌ها دارند و به همین دلیل، در صورت تعیین رویکردهای هدفمند، می‌توان از آنها بهره برد (Szymczak *et al.*, 2023, Rahnamaeian & Vilcinskas 2015).

اگر چه مکانیسم عمل دقیق پپتیدهای ضد میکروبی متغیر است، اما طبق بررسی‌های متعدد، تعداد زیادی از این پپتیدها به طور انتخابی یا غیرتخصصی غشاء سلولی را تخریب می‌کنند و به نظر می‌رسد ترکیب ساختاری آمفی پاتیکی پپتیدها نقش مهمی در این مکانیسم دارد. گروه‌های فسفولیپیدی غشای سلولی در پراکنش بار پپتیدها و در واکنش پپتید و غشاء نقش مهمی دارند (Guidotti *et al.*, 2017). پپتیدهای ضد میکروبی عموماً بر اساس تشخیص میزان اسیدیته فسفولیپیدهای سطح غشاء باکتریایی ایفای نقش می‌کنند (Hitchner *et al.*, 2019). پپتیدهای ضد میکروبی بر لیپوزوم‌های فسفاتیدیل گلیسرول موجود در غشاء باکتری تاثیر می‌گذارند. این در حالیست که بر لیپوزوم‌های فسفاتیدیل سرین موجود در غشاء سلول پستانداران، کمتر موثرند (Shai, 1999). با توجه به اینکه گستردگی این اطلاعات در پایگاه داده‌های جهانی روزانه رو به افزایش است، اما هنوز مکانیسم عمل آنها به طور کامل شناخته نشده است. اخیراً کاربرد همزمان نانو ذرات نقره به همراه پپتید ضد میکروبی موجب افزایش خاصیت ضد باکتری و کاهش سمیت نقره شده است (Gao *et al.*, 2020) و این موید خاصیت سینرژیستی پپتیدها با کاربرد همزمان سایر عوامل ضد میکروبی است.

پس از شستشوی قارچهای خوراکی سالم با آب دیونیزه و خشک کردن آنها، سوسپانسیون ایزوله‌های باکتریایی با غلظت  $1 \times 10^8$  cfu/ml به سطح قطعات کلاهیك قارچ مایه‌زنی شدند و سپس پتری‌ها در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت بالای ۷۰٪ در پتری نگهداری شدند و نتایج پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت بررسی شد (Schaad et al., 2001).

### ۳- تهیه پتیدها

پتیدها به شکل لیوفیلیزه از موسسه استخراج مواد طبیعی در هانوفر آلمان دریافت شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. مشخصات دقیق پتیدها در جدول ۱ درج شده است.

### ۴- آزمون‌های تعیین خواص ضد میکروبی پتیدها

-تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد ۵۰٪ (MIC) یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری تازه کشت شده به نه میلی‌لیتر محیط کشت (Luria Broth) LB شرکت Merck آلمان افزوده شد و به مدت ۱۵ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس آنکوبه شد. سپس با استفاده از روش سری رقت‌ها، سوسپانسیونی به غلظت نهایی  $1 \times 10^5$  cfu/ml باکتری تهیه شد. پتیدها نیز به روش سری رقت‌ها در هشت غلظت مختلف ( $200 \mu\text{M}$ ،  $100 \mu\text{M}$ ،  $50 \mu\text{M}$ ،  $25 \mu\text{M}$ ،  $12.5 \mu\text{M}$ ،  $6.25 \mu\text{M}$ ،  $3.12 \mu\text{M}$ ،  $1.56 \mu\text{M}$ ) تهیه شدند. پس از انتقال سوسپانسیون باکتری به حجم  $80 \mu\text{l}$  به میکروپلیت‌ها، حجم  $20 \mu\text{l}$  نیز از غلظت‌های مختلف هر پتید به هر چاهک مجزا اضافه شد. میکروپلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس آنکوبه شدند و میزان جذب هر چاهک در  $620 \text{nm}$  و  $490 \text{nm}$  با دستگاه الیزا ریدر (BioTek Inc., Winooski, USA) بدست آمد و نتایج با تیمارهای شاهد مقایسه گردید. هر تیماری دارای ۳ تکرار بود. از سری رقت‌های سیپروفلوکساسین ( $10 \mu\text{g/ml}$ ) نیز به عنوان شاهد استفاده گردید (Ghaffari et al., 2016).

### -آزمون‌های فنوتیپی

شناسایی خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها طبق کتاب راهنمای باکتری‌شناسی شاد انجام شد (Schaad et al., 2001). آزمون‌های کلیدی نظیر واکنش گرم، تولید پیگمان فلورسنت، تحمل به نمک طعام ۲٪، آزمون‌های کاتالاز، آرژنین دی‌هیدرولیز، هیدرولیز نشاسته، واکنش ایندول، تولید  $\text{H}_2\text{S}$ ، اکسیداز، استفاده از نیترات، مصرف منابع کربن، آزمون لوان، تولید اسید از ساکاروز، هیدرولیز کازئین انجام شد و واکنش جدایه‌ها نسبت به آزمون‌ها ثبت شد.

### -آزمون القاء تشکیل خط سفید White Line Inducing Principle (WLIP)

بدین منظور ابتدا کشت یک روزه سویه باکتری بیمارگر در فواصل دو تا سه سانتیمتر از سویه *P. reactans* NCPPB 1311 روی محیط کشت KB در پتری و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس کشت داده شدند. پس از گذشت ۷۲ ساعت، تشکیل یا عدم تشکیل خط سفید در حاشیه کلنی‌ها مورد بررسی قرار گرفتند. در این آزمون اختصاصی تشخیصی ایزوله‌های *P. tolaasii*، جدایه‌هایی که در تعامل با جدایه *P. reactans* رسوب سفید تشکیل دادند بعنوان *P. tolaasii* شناسائی شدند (Wong & Prece, 1979).

### ۲- آزمون‌های بیماری‌زایی

#### -آزمون فوق حساسیت (Hypersensitive Reaction)

برای اطمینان از بیماری‌زایی بودن سویه‌های جدا شده، تست فوق حساسیت (HR) روی گیاه توتون انجام شد، بدین ترتیب که سوسپانسیونی از باکتری جدا شده با رقت تقریبی  $1 \times 10^8$  cfu/ml در آب مقطر سترون تهیه و  $100 \mu\text{l}$  از آن توسط سرنگ به برگ‌های زیرین گیاهچه توتون تزریق شد. نتایج پس از ۷۲ ساعت یادداشت برداری شد (Schaad et al., 2001).

### -آزمون اثبات بیماری‌زایی روی کلاهیك قارچی خوراکی

جدول ۱- مشخصات پپتیدهای مورد مطالعه شامل نام، منشأ، توالی و وزن ملکولی

Table 1. Peptide names, sources, sequences and weights (Da).

Number	Insect	Peptide Name	Sequence	Wight (Da)
P1	<i>Hyalophora cecropia</i>	Cecropin A	KWKLFKKIEKVGQNIRDGIKAGPAVAVVGGATQIAK*-NH2	4005
P4	<i>Ceratititis capitata</i>	Ceratotoxin	SIGSAFKKALPVAKKIGKAALPIAKAALP	2861
P5	<i>Stomoxys calcitrans</i>	Scal-stomoxyn	RGFrkHFNKLVKKVKHTISETAHVAKDTAVIAGSGAAVVAAT*-NH2	4416
P6	<i>Pseudacanthotermes spiniger</i>	Spinigerin	HVDKKVADKVLKQLRIMRLLTRL	3001
P7	<i>Apis mellifera</i>	Apidaecin Ia	GNNRPVYIPQPRPPHPRI	2108
P9	<i>Myrmecia gulosa</i>	Formaecin-1	GRPNPVNNKPTPHPRL	1794
P16	<i>D. melanogaster</i>	Metchnikowin-1	HRHQGFIFDTRPSFNPQPRPGPIY	3026
P17	<i>D. melanogaster</i>	Metchnikowin-2	HRRQGFIFDTRPSFNPQPRPGPIY	3045
P33	<i>Lucilia sericata</i>	Lser-Cecropin1	GWLKKIGKKIERVGGHTRDATIQITIGVAQQAANVAATLKG	4256
P36	<i>Lucilia sericata</i>	Lser-Cecropin3	GWLKKIGKKIERVGGHTRDATIQVLGVAQQAANVAATARG	4242

خوراکی، مقدار 20µl از پپتیدهای مورد نظر اضافه و پس از جذب پپتید در سطح کلاهک، مقدار ۵ µl از سوسپانسیون باکتری با غلظت  $1 \times 10^8$  cfu/ml افزوده شد و به مدت ۴۸ ساعت در پتری‌های سترون و مرطوب (۷۰٪) با دمای ۲۸ درجه سلسیوس آنکوبه شدند. همه تیمارها دارای ۳ تکرار بودند. نتایج با شاهد منفی و سیپروفلوکساسین به صورت چشمی مقایسه و درجه بازدارندگی بر اساس میزان آلودگی بلوک‌های قارچ در جدول ۴ و بر اساس روش (Godfrey et al., 2001; LoCantore & Iacobellis, 2004) مقایسه شد.

### ۶- روش آنالیز آماری

محاسبات آماری تعیین مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی به روش تجزیه و تحلیل واریانس در سطوح ۱٪ و ۵٪ از طریق مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد.

### نتایج

#### ۱- نتایج جداسازی و شناسایی ایزوله‌های باکتری

##### *P. tolaasii*

نتایج آزمون‌های فنوتیپی

### ۵- بررسی کیفیت/شدت علائم بیماری

تعیین حداقل غلظت کشنده باکتری MBC رنگ تری فینیل تترازولیوم کلراید (TTC) به میزان ۴۰µl با غلظت ۵mg/ml به میکروپلیت‌های آزمایش قبل اضافه و پس از ۲۰ دقیقه آنکوبه کردن در آنکوباتور شیکردار و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، نمونه‌ها بار دیگر در طول موج ۴۹۰nm توسط دستگاه الیزا ریدر خوانش شدند. رنگ قرمز نشان دهنده وجود باکتری زنده در چاهک‌ها بود. سپس برای بدست آوردن حداقل غلظت کشندگی (MBC) پپتیدها از چاهک‌های حاوی غلظت‌های مختلف پپتید بر روی محیط کشت LB جامد (Luria Broth- Agar) کشت شد و حداقل غلظت کشندگی که در آن باکتری فاقد رشد بود، ثبت شد (Samiei et al, 2019).

### ۵- بررسی کیفیت/شدت علائم بیماری

ابتدا قارچ‌های سفید دکه‌ای سالم از بازار تهیه شد و پس از گذشت ۲۴ ساعت از نگهداری آنها در شرایط مساعد رشد باکتری، سطوح آنها با آب مقطر سترون بطور کامل ۳ بار شستشو و با کاغذ صافی سترون خشک شدند. سپس قطعات ۱-۲ cm از کلاهک قارچ توسط اسکالپل سترون شده تهیه شد. روی سطح هر یک از بلوکهای قارچ

پس از جداسازی ایزوله باکتری، شناسایی گونه آن از طریق بررسی نتایج اجمالی بدست آمده از آزمونهای تشخیص فنوتیپی در جدول ۲ مورد ارزیابی قرار گرفت.

آزمون القاء تشکیل خط سفید White Line Inducing Principle (WLIP)

با بررسی حاشیه کلنی های باکتری پس از ۷۲ ساعت، خط سفیدی در مرز بین کلونی های دو باکتری مشاهده شد که تعلق این سویه باکتری را به گونه *P. tolaasii* اثبات کرد. بطور کلی طبق بررسی نتایج جدول ۲ و نتایج آزمون القاء تشکیل خط سفید می توان نتیجه گرفت که ایزوله منتخب با مشخصات استاندارد این گونه *P. tolaasii* مطابقت دارد.

جدول ۲- خصوصیات فنوتیپی کلیدی *Pseudomonas tolaasii* جدا شده از قارچ های خوراکی آلوده.

Table 2. Key phenotypic characteristic of *Pseudomonas tolaasii* isolated from infected edible mushrooms.

Test	Reaction	Test	Reaction
Gram staining	-	Hydrolysis of starch	-
Production of sulfur hydroxide from cysteine	-	Fluorescent pigment production	-
Arginine dihydrolase	+	Nitrate consumption	-
Utilization of carbon sources	+	Oxidase	+
Leven test	-	Tolerance of NaCl 2%	+
Nitrate reductase	+	Acid from sucrose	-
Indole test	+	Casein hydrolysis	+

پس از گذشت ۴۸ ساعت با بررسی علایم ایجاد شده بر روی بلوک های کلاهک قارچ، طیف وسیعی از بروز علایم شامل لکه های قهوه ای، قهوه ای پوسیده و نقاط فرورفته پوسیده، مشاهده شد که علایم معمول بیماری لکه قهوه ای قارچ خوراکی می باشد (شکل ۲).

## ۲- نتایج آزمون های بیماری زایی

### نتایج آزمون فوق حساسیت

در آزمون فوق حساسیت هیچ علایمی از نکروز پس از گذشت ۷۲ ساعت از عمل تزریق باکتری در برگهای توتون مشاهده نشد. (شکل ۱)

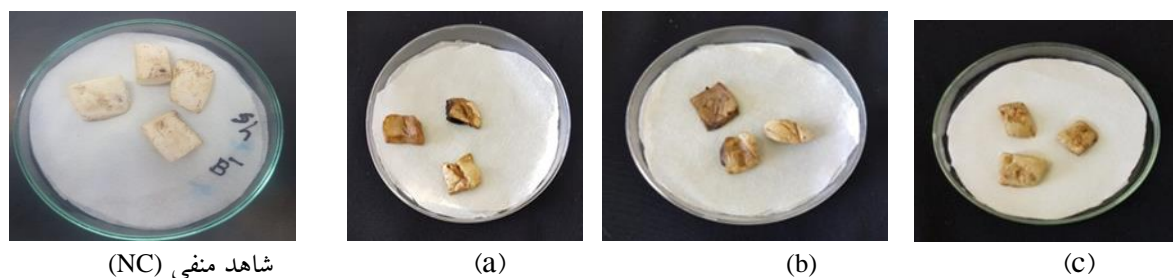
نتایج آزمون اثبات بیماری زایی باکتری *P. tolaasii*



شکل ۱- نتایج آزمون فوق حساسیت مبنی بر عدم بروز علایم نکروز بر روی برگهای توتون مایه زنی شده با سوسپانسیون سویه باکتری *P. tolaasii*. سمت راست: گیاه توتون قبل از تزریق، سمت چپ: گیاه توتون پس از تزریق با باکتری *Pseudomonas tolaasii*

Fig. 1. No hypersensitivity reaction was observed on tobacco leaves inoculated with *Pseudomonas tolaasii* suspension





شکل ۲- نتایج آزمون اثبات بیماری زایی بر روی قطعات کلاهک قارچ خوراکی با تلقیح سوسپانسیون باکتری *P. tolaasii* به سطح برشهای قارچ خوراکی. سمت چپ: علائم بیماری شامل لکه‌های زرد تا قهوه‌ای (a)، قهوه‌ای پوسیده (b) لکه‌های فرورفته قهوه‌ای (c) و سمت راست: شاهد منفی فاقد علائم بیماری (NC).

Fig. 2. Pathogenicity test on cap pieces of edible mushrooms inoculated by bacterial suspension of *P. tolaasii*. Negative control (NC): lack of disease symptoms. Positive reactions: yellow to brown spots (a), brown decay (b) and brown sunken symptoms (c).

### نتایج تعیین حداقل غلظت کشنده باکتری MBC

در نتایج آماری تجزیه واریانس مقادیر MBC پیتیدها اختلاف معنی‌داری حدود ۰.۰۵ مشاهده شد و تایید نتایج ارزیابی پس از افزودن رنگ TTC، و کشت محتوی میکروپلیت‌های بیرنگ یا کمرنگ، نشان داد که پیتید Cecropin A در تمامی غلظت‌ها بجز غلظت  $1.56 \mu\text{M}$  پیتید Scal-stomoxyn در غلظت‌های بیش از  $25 \mu\text{M}$  بطور کامل از رشد باکتری جلوگیری نمود و از نظر عملکردی، مشابه نمونه شاهد منفی (آب مقطر سترون بدون حضور باکتری) بودند.

### نتایج بررسی کیفیت و شدت علائم بیماری

پیتیدهای حاصل از حشرات اثرات متفاوتی را بر روی بلوک‌های قارچ خوراکی از عدم ایجاد علائم بیماری تا ایجاد لکه‌های زرد و قهوه‌ای و یا تولید نقاط فرو رفته و پوسیدگی ایجاد نمودند که سطوح آلودگی با توجه به شاخص‌های مقایسه‌ای در جدول شماره ۴ آمده است. شکل ۴ نیز مقایسه موردی شدت بروز علائم بیماری برخی پیتیدها را نشان می‌دهد.

### ۳- تهیه پیتیدها

پودر لیفولیز پیتیدها از فریزر خارج شد و پس از حل کردن مقدار مشخص پیتیدها برحسب وزن ملکولی آنها در ۱CC آب مقطر دوبار سترون، محلول ۱mM از پیتیدها در لوله‌های اپندولف ۲CC تهیه شد و برای آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت.

### ۴- نتایج آزمون‌های تعیین خواص ضد میکروبی

#### پیتیدها

نتایج تعیین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد ۵۰٪ (MIC) نتایج آماری تجزیه واریانس مقادیر MIC، نشان داد بین پیتیدهای مورد استفاده در غلظت‌های مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح اطمینان ۹۹٪-۹۵٪ وجود دارد (جدول و شکل ۳). پیتید Cecropin A در تمامی غلظت‌ها بجز غلظت  $1.56 \mu\text{M}$  و پیتید Scal-stomoxyn در تمامی غلظت‌ها و پیتیدهای Lser-Cecropin1 و Lser-Cecropin3 نیز در غلظت‌های بیش از  $25 \mu\text{M}$  از رشد حداقل ۵۰٪ جکعیت باکتری جلوگیری نمودند. پیتید Ceratotoxin هیچ تاثیری بر کاهش یا افزایش جمعیت باکتری نشان نداد اما سایر پیتیدها افزایش جمعیت مختصری را نسبت به نمونه شاهد مثبت نشان دادند.

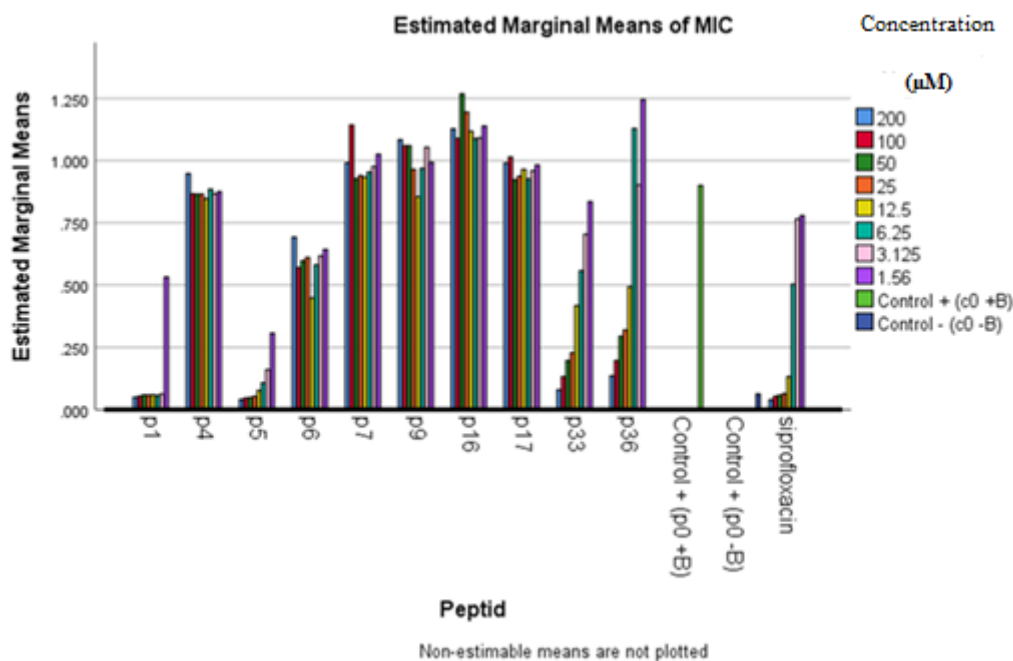
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس مقایسه میانگین‌های MIC در پپتیدهای مختلف به روش آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ و ۹۹٪.

Table 3. ANOVA table for MIC BY Concentration Peptide

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	36.479*	89	0.410	21.191	0.000
Intercept	81.866**	1	81.866	4232.436	0.000
Concentration	1.859*	7	0.266	13.732	0.000
Peptide	22.465*	10	2.247	116.146	0.000
Concentration * Peptide	4.277*	70	0.061	3.159	0.000
Error	2.437	126	0.019		
Total	120.031	216			
Corrected Total	38.916	215			

تک ستاره (\*) موید تاثیر سطح معنی داری ۵٪ و با اطمینان تاثیر ۹۵٪ و دو ستاره (\*\*) موید سطح معنی داری ۱٪ با اطمینان تاثیر ۹۹٪ است.

A single star (\*) indicates a significance level of 5% and with a confidence of 95% and Two stars (\*\*) reveals a significance level of 1% with a confidence of 99%.



شکل ۳- نمودار مقایسه میانگین MIC پپتیدها در غلظت‌های مختلف نسبت به تیمارهای شاهد‌های مثبت (باکتری) و منفی (آب مقطر سترون) و آنتی بیوتیک Ciprofloxacin. پپتیدها شامل: P6، P5(Scal-stomoxyn)، P4(Ceratotoxin)، p1(Cecropin A)، P33(Lser·P17(Metchnikowin-2)، P16(Metchnikowin-1)، P9(Formaecin-1)، P7(Apidaecin Ia)، (Spinigeri) و P36(Lser-Cecropin3) و Cecropin1).

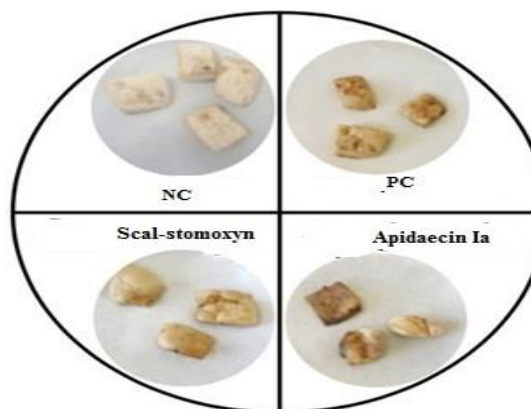
Fig. 3. Comparison chart of the average MIC of peptides at different concentrations with positive and negative controls and Ciprofloxacin. Peptides include: p1: Cecropin A, P4: Ceratotoxin, P5: Scal-stomoxyn, P6: Spinigerin, P7: Apidaecin Ia, P9: Formaecin-1, P16, Metchnikowin-1, P17: Metchnikowin-2, P33: Lser-Cecropin1 and P36: Lser-Cecropin3.



جدول ۴- سطوح و کیفیت علائم بیماری بر روی کلاهک قارچ خوراکی در اثر تیمار با پپتیدهای مختلف.

Table 4. Levels and quality of disease symptoms on edible mushroom caps using peptides derived from insects

Peptide samples	Treatments	Symptoms	Level
Negative Control (1)	distilled water without bacteria	no-symptoms	<b>B0</b>
Ciprofloxacin (Negative Control 2)	Ciprofloxacin (10 µg/ml) + bacteria (1×10 <sup>8</sup> 1cfu/ml)	no-symptoms	<b>B0</b>
p1	Cecropin A(1mM) + bacteria (1×10 <sup>8</sup> 1cfu/ml)	no-symptoms	<b>B0</b>
p5	Scal-stomoxyn (1mM) + bacteria (1×10 <sup>8</sup> 1cfu/ml)	non-sign to yellow lesions	<b>B1</b>
p33	Lser-Cecropin1(1mM) + bacteria (1×10 <sup>8</sup> 1cfu/ml)	brown lesions-yellow	<b>B2</b>
p36	Lser-Cecropin3(1mM) + bacteria (1×10 <sup>8</sup> 1cfu/ml)	brown lesions	<b>B3</b>
p7	Apidaecin Ia(1mM) + bacteria (1×10 <sup>8</sup> 1cfu/ml)	brown lesions and rotting	<b>B4</b>
P16	Metchnikowin-1(1mM) +bacteria (1×10 <sup>8</sup> 1cfu/ml)	brown lesions and rotting	<b>B4</b>
P17	Metchnikowin-2(1mM) +bacteria (1×10 <sup>8</sup> 1cfu/ml)	brown lesions and rotting	<b>B4</b>
P6	Spinigerin (1mM) +bacteria (1×10 <sup>8</sup> 1cfu/ml)	brown lesions and rotting	<b>B4</b>
P9	Formaecin(1mM) + bacteria (1×10 <sup>8</sup> 1cfu/ml)	brown lesions and rotting	<b>B4</b>
P4	Ceratotoxin(1mM) + bacteria (1×10 <sup>8</sup> 1cfu/ml)	brown lesions and rotting	<b>B4</b>
Positive Control	distilled water+bacteria (1×10 <sup>8</sup> cfu/ml)	sunken brown lesions	<b>B5</b>



شکل ۴- مقایسه شدت بروز علائم بیماری بر روی بلوک‌های قارچ خوراکی تیمار شده با پپتیدهای Apidaecin Ia و Scal-stomoxyn در مقایسه با تیمارهای شاهد منفی: آب مقطر سترون (NC) و شاهد مثبت: (باکتری *P. tolaasii*)

Fig. 4. Comparing the amount and quality of disease symptoms of, Apidaecin Ia and Scal-stomoxyn to control treatments includes: NC: Negative Control (treatment of blocks with sterile distilled water), PC: positive control (treatment of blocks with *Pseudomonas tolaasii* bacteria)

## بحث

بیماری لکه باکتریایی قارچ خوراکی با شیوع جهانی، مهمترین بیماری اقتصادی این محصول می‌باشد (Osdaghi *et al.*, 2019) و راهکار دقیق و موثری برای کنترل این بیماری وجود ندارد با توجه به این نکته، در تحقیق حاضر خاصیت ضدباکتریایی ده پپتید حاصل از حشرات برای کنترل باکتری *P. tolaasii* مورد ارزیابی قرار گرفت. با توجه به شکل نمودار ۳، پپتیدهای Cecropin A، Lser-Cecropin1، stomoxyn و Spinigerin در تمامی غلظت‌ها نسبت به شاهد مثبت (باکتری بیمارگر) اثر بازدارندگی موثری بر رشد باکتری *Pseudomonas tolaasii* داشتند. پپتیدهای Ceratotoxin، Formaeicin-1، Metchnikowin-1، Metchnikowin-2 و Apidaecin Ia در تمامی غلظت‌ها نه تنها هیچ تاثیری بر کاهش رشد باکتری نداشتند بلکه در مورد پپتیدهای Formaeicin-1، Metchnikowin-1، Metchnikowin-2 و Apidaecin Ia تا حدودی افزایش رشد باکتری نسبت به تیمار مثبت مشاهده گردید. در مورد پپتید Lser-Cecropin3، این پپتید در تمامی غلظت‌های بیش از  $12.5 \mu\text{M}$  بازدارندگی از رشد حداقل ۵۰٪ جمعیت باکتری را نشان داد اما در غلظت‌های ( $1.56 \mu\text{M}$ ،  $3.12 \mu\text{M}$ ،  $6.25 \mu\text{M}$ ) افزایش رشد قابل ملاحظه ای نسبت به شاهد مثبت نشان داد. حداقل غلظت بازدارندگی پپتید Cecropin A در غلظت  $3.12 \mu\text{M}$  و پپتید Scal-stomoxyn در غلظت  $12.5 \mu\text{M}$  و پپتید Lser-Cecropin1 در غلظت  $200 \mu\text{M}$  بر روی رشد باکتری *P. tolaasii* بود. مقادیر MBC برای پپتید Cecropin A برابر با  $6.25 \mu\text{M}$  و برای پپتید Scal-stomoxyn برابر با  $25 \mu\text{M}$  و برای پپتید Lser-Cecropin1 بیش از  $200 \mu\text{M}$  بود. پپتید Cecropin A در بررسی آزمایشگاهی کیفیت بروز علائم بیماری با حداکثر تاثیر در سطح B0 بطور کامل کلاهک را محافظت نمود و پس از آن Scal-stomoxyn در سطح B1 بدون علائم یا با ایجاد لکه‌های مختصرزرد رنگی قرار گرفت.

سطح تاثیر پپتید Lser-Cecropin1 برابر با شاخص B2 و ایجاد لکه‌های زرد-قهوه‌ای و پپتید Lser-Cecropin3 با

بروز علائم لکه‌های قهوه‌ای در سطح B3 قرار گرفت و پپتیدهای Ceratotoxin، Formaeicin-1، Metchnikowin-1 و Apidaecin Ia در سطح B2 و Metchnikowin-2 علاوه بر ایجاد لکه‌های قهوه‌ای باعث پوسیدگی بلوک‌های قارچ خوراکی شدند و در سطح B4 قرار گرفتند. در هیچ کدام از پپتیدها علائم فرورفتگی (pit) در کلاهک قارچ مشاهده نگردید و تنها در نمونه شاهد مثبت پوسیدگی قهوه‌ای همراه با نقاط فرورفته دیده شد که از نوع B5 بود.

با توجه تحقیقات محدود در کاربرد پپتیدهای ضد میکروبی علیه باکتری‌های گیاهی و کاربرد محدودتر پپتیدهای حاصل از حشرات، به‌عنوان عوامل ضدباکتریایی گیاهی (Tang *et al.*, 2023) منابع محدودی برای مقایسه و بحث وجود دارد. اخیراً تحقیقی برای ارزیابی اثر ضدباکتریایی پپتید طبیعی  $\epsilon$ -PL حاصل از تخمیر صنعتی باکتری *Streptomyces albulus* no. 346 (Liu *et al.*, 2020) علیه باکتری *P. tolaasii* انجام شده است، نتایج آن نشان داد پپتید  $\epsilon$ -PL از رشد باکتری فوق در غلظت  $150-200 \text{ mg/L}$  جلوگیری نمود (Song *et al.*, 2024)، و این درحالی است که پپتیدهای Cecropin A و Scal-stomoxyn بکار رفته در تحقیق حاضر، به ترتیب در غلظت‌های  $3.12 \mu\text{M}$  و  $25 \mu\text{M}$  از رشد باکتری مذکور جلوگیری کردند و ظرفیت بازدارندگی بالاتری برای مهار باکتری فوق از خود نشان دادند. مقدار MIC پپتید Melittin حاصل از زنبور عسل علیه باکتری *Xanthomonas oryzae* (Shi *et al.*, 2016) برابر با  $10 \mu\text{M}$  بود و مقدار MIC پپتید Tannins علیه *Ralstonia solanacearum* (Vu *et al.*, 2017) برابر  $250-78 \mu\text{g/mL}$  با که در مقابسه با مقدار MIC در پپتید Cecropin A از قدرت باکتری کشی کمتری برخوردارند.

در رابطه با نحوه مکانیسم عمل Cecropin A حاصل از *Hyalophora cecropia* گزارشات متعددی عنوان شده است. این پپتید در واکنش علیه باکتری *Pseudomonas aeruginosa*، با فسفولیپیدهای غشای سلولی واکنش داده است (Lee & Zhang, 2015) و با مکانیسم دیگری، مقدار NADPH و سطح گلوکاتایون کاهش داده و موجب تحریک استرس اکسیداتیو شده است (Durell *et al.*, 1992). با توجه

بیولوژیکی با منشا طبیعی شوند. در تحقیق حاضر پپتیدهای ضد میکروبی موثر بر کاهش جمعیت باکتری *Pseudomonas tolaasii* در مقادیر کم و گاهی کمتر از مقادیر آنتی بیوتیکها ظاهر شدند. اگر چه استخراج، خالص سازی و توالی یابی ملکولی پپتیدها، کاری زمانبر و دقیق می باشد. اما کاربردهای آنتی این ملکولها در کنترل میکروبها بسیار نویدبخش است. زیرا تاکنون هیچ موردی از عوارض جانبی مصرف آنها و یا ایجاد مقاومت فیزیولوژیکی و ژنتیکی در آنها گزارش نشده است. اگر این ملکولها (پپتیدهای ضد میکروبی) بعنوان دارو یا سموم گیاهی مصرف شوند پایداری موثرتری در برابر مقاومت میکروبی خواهند داشت و از سوی دیگر چون پپتیدهای ضد میکروبی برگرفته از طبیعت می باشند، اثرات سوء و ناخواسته کمتری بر محیط زیست خواهند داشت و می توان از آنها به عنوان سموم انتخابی نیز استفاده نمود.

### سپاسگزاری

در نهایت از همکاری بخش مرکز تحقیقات علوم دارویی و فراورده های آرایشی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرمان که در فراهم آوردن شرایط و امکانات آزمایشگاهی مساعدت نمودند، تشکر و قدردانی می گردد.

به موارد فوق، به نظر می رسد مکانیسم ضد میکروبی Cecropin A علیه باکتری *P. tolaasii*، واکنش با فسفولیپیدهای غشای سلولی باشد که این پیش بینی نیازمند مطالعات تکمیلی بیشتری در این خصوص می باشد. Stomoxyn نیز ساختار مشابهی با سکروپینها دارد و فعالیتی مشابه سکروپینها بر روی غشای سلول باکتری دارند (Landon et al., 2006). یک سکروپین شامل قسمت آمفی پاتیک کاتیونی و ماریچهای هیدروفوبیک در قسمت انتهایی C می باشد. قسمت انتهایی C در استموکسین مشخص نشده است و به نظر می رسد هر دو پپتید، از طریق مکانیسم فرش مانند منافذی را در سطح غشاء ایجاد می کنند (Landon et al., 2006). پپتیدهای کاتیونی به لیپوپلی ساکاریدهای با بار منفی متصل شده و منجر به جابجایی یونهای دو ظرفیتی موجود در ساختار بیرونی و درونی غشاء می شوند (Cytrynska & Zdybicka-Barabas, 2015).

### نتیجه گیری

با توجه به مراتب فوق می توان چنین نتیجه گیری کرد که پپتیدهای ضد میکروبی افق جدیدی را در کنترل باکتری های گیاهی، خواهد گشود و شاید در آینده ای نزدیک بتوان از این پپتیدها در صنعت دارو و کشاورزی بهره بیشتری برد و با شناخت فرم و ساختار ملکولی آنها، سنتز و تولید انبوه آنها مد نظر قرار گیرد و منجر به تولید نسل جدیدی از سموم

### References

- Alibakhshi, A., Nazarian Firouzabadi, F. & Ismaili, A. 2018. Expression and antimicrobial activity analysis of a Dermaseptin B1 antibacterial peptide in tobacco hairy roots, *Journal of Plant Protection*, 41(3): 87–97. [magiran.com/p1903376](http://magiran.com/p1903376).
- Barbosa, P.P., Del Sarto, R.P., Silva, O.N., Franco, O.L. & Grossi-de-Sa, M.F. 2011. Antibacterial peptides from plants: what they are and how they probably work. *Biochemistry Research International*, 2011:250349. doi: 10.1155/2011/250349. Epub 2011 Mar 3. PMID: 21403856; PMCID: PMC3049328.
- Cao, J., de la Fuente-Nunez, C., Ou, R.W., Torres, M.D.T., Pande, S. G., Sinskey A.J. & Lu, T.K. 2018. Yeast-based synthetic biology platform for antimicrobial peptide production. *ACS Synthetic Biology*, 7: 896–902. 10.1021/acssynbio.7b00396.
- Cantore, P.L., Lazzaroni, S., Coraiola, M., Dalla, M., Cafarchia, C., Evidente A. & Iacobellis S. 2006. Biological Characterization of White Line-Inducing Principle (WLIP) Produced by *Pseudomonas reactans* NCPPB1311. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19: 1113–1120.
- Cytryńska, M. & Zdybicka-Barabas, A. 2015. Defense peptides: recent developments, *Biomolecular Concepts*, 6(4): 237–251.
- Durell, S.R., Raghunathan, G. & Guy, H.R. 1992. Modeling the ion channel structure of cecropin. *Biophysical Journal*, 63: 1623–1631.
- Esteves, E., Fogaca, A.C., Maldonado, R., Silva, F.D., Manso, P.P., PelajoMachado, M., Valle, D. & Daffre, S. 2009. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: cellular localization and

- temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. *Developmental & Comparative Immunology*, 33: 913–919
- Farsi, M. & Pourianfar, H. 2011. *Cultivation and breeding of the white button mushroom* (2th ed). Jahad Daneshgahi Publications, Iran.
- Gao, J.Na.H., Zhong, R., Yuan, M., Guo, J., Zhao, L., Wang, Y., Wang, L. & Zhang, F. 2020. One step synthesis of antimicrobial peptide protected silver nanoparticles: The core–shell mutual enhancement of antibacterial activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 186:110704. doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.110704. Epub 2019 Dec 3. PMID: 31841775
- Ghaffari, M., Mahdavi, O.M. & Baghbani, A.F. 2016. Antimicrobial activity and synergistic effect of *Mentha pulegium* L. essential oil and ciprofloxacin on *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections. *Iranian Journal of Biological Sciences*, 10(4): 31–39
- Ghasem, I.S., Harighi, B., Mojarrab, M. & Azizi, A. 2021. Response of *Pseudomonas tolaasii*, the causal agent of mushroom brown blotch disease to the volatile compounds produced by endofungal bacteria. *BioControl*, 66: 421–432. <https://doi.org/10.1007/s10526-020-10071-6>.
- Godfrey, S.A., Harrow, S.A., Marshall, J.W. & Klena, J.D. 2001. Characterization by 16S rRNA sequence analysis of pseudomonads causing blotch disease of cultivated *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, 67(9):4316–23. doi: 10.1128/AEM.67.9.4316–4323.2001. PMID: 11526038; PMCID: PMC93162.
- Gomes, D., Santos, R.S., Soares, R., Reis, S., Carvalho, S., Rego, P.C., Peleteiro, M., Tavares, L. & Oliveira, M. 2020. Pexiganan in Combination with Nisin to Control Polymicrobial Diabetic Foot Infections. *Antibiotics*, 9(3): 128. doi: 10.3390/antibiotics9030128. PMID: 32244862; PMCID: PMC7148459.
- Guidotti, G., Brambilla, L. & Rossi, D. 2017. Cell–penetrating peptides: from basic research to clinics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 38: 406–424. 10.1016/j.tips.2017.01.003
- Hancock, R.E. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, 1(3): 156–64. doi: 10.1016/S1473–3099(01)00092–5. PMID: 11871492.
- Hitchner, M.A., Santiago–Ortiz, L.E., Necelis, M.R., Shirley, D.J., Palmer, T.J., Tarnawsky, K.E., Vaden, T.D. & Caputo, G.A. 2019. Activity and characterization of a pH–sensitive antimicrobial peptide. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, 1861:182984. 10.1016/j.bbamem. 2019.05.006
- Hoffmann, J.A., Hetru, C. & Reichhart, J.M. 1993. The humoral antibacterial response of *Drosophila*. *FEBS Letter*, 325: 63–66.
- Holásková, E., Galuszka, P., Mičúchová, A., Šebela, M., Öz, M.T., Frébort, I. 2018. Molecular farming in barley: development of a novel production platform to produce human antimicrobial peptide LL–37. *Biotechnology Journal*, 13, 1700628. doi: 10.1002/biot.201700628
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H. & Yi, H. 2020. Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Frontiers in Microbiology*, 16(11): 582779. doi:10.3389/fmicb.2020.582779. PMID: 33178164; PMCID: PMC7596191.
- Koehbach, J. & Craik, D.J. 2019. The vast structural diversity of antimicrobial peptides. *Trends in Pharmacological Sciences*, 40: 517–528. 10.1016/j.tips.2019.04.012
- King, E.O., Ward, M.K. & Raney, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44: 301–307.
- Kulkarni, M.M., Barbi, J., McMaster, W.R., Gallo, R.L., Satoskar, A.R. & McGwire, B.S. 2011. Mammalian antimicrobial peptide influences control of cutaneous *Leishmania* infection. *Cellular Microbiology*, 13: 913–923
- Landon, C., Meudal, H., Boulanger, N., Bulet, P. & Vovelle, F. 2006. Solution structures of stomoxyn and spinigerin, two insect antimicrobial peptides with an alpha–helical conformation. *Biopolymers*, 5; 81(2): 92–103. doi: 10.1002/bip.20370. PMID: 16170803.
- Lee, J. & Zhang, L. 2015. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 6(1): 26–41. doi: 10.1007/s13238–014–0100–x. Epub 2014 Sep 25. PMID: 25249263; PMCID: PMC4286720.
- Lei, J., Sun, L., Huang, S., Zhu, C., Li, P., He, J., Mackey, V., Coy, D.H. & He, Q. 2019. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *American Journal of Translational Research*, 11: 3919–3931.
- Lin, X. & Sun, D. 2019. Research advances in browning of button mushroom (*Agaricus bisporus*) affecting factors and controlling methods. *Trends in Food Science & Technology*, 90: 63–75. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.05.007>Get rights and content
- Liu, H., Chen, J., Xia, Z., An, M. & Wu, Y. 2020. Effects of  $\epsilon$ -poly- l -lysine on vegetative growth, pathogenicity and gene expression of *Alternaria alternata* infecting *Nicotiana tabacum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 163: 147–153
- Lo Cantore, P. & Iacobellis, N.S. 2004. First report of brown discoloration of *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas agarici* in southern Italy. *Phytopathology*, 43: 35–38

- Matsuyama, K. & Natori, S. 1990. Mode of action of sapecin, a novel antibacterial protein of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Journal of biochemistry (Tokyo)*, 108: 128–132
- Memarpoor–Yazdi, M., Zare–Zardini, H. & Asoodeh, A. 2013. A Novel Antimicrobial Peptide Derived from the Insect *Paederus dermatitis*, *Int J Pept Res Ther*, 19: 99–108.
- Merabishvili, M., Pirnay, J.P. & De Vos, D. 2018. Guidelines to Compose an Ideal Bacteriophage Cocktail. Pages 99–110 in: *Bacteriophage Therapy Methods in Molecular Biology*. J. Azeredo and S. Sillankorva, eds. Vol1693. Humana Press, New York.
- Munsch, P., Johnstone, K. & Alatosava, T. 2002. Evidence for genotypic differences between the two siderovars of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *Microbiological Research*, 157(2): 93–102. doi: 10.1078/0944–5013–00141. PMID: 12002406.
- Namazi, Z., Hasanzadeh, N. & Razmi, J. 2016. *Kocuria sp.* a potential antagonist of brown blotch caused by *Pseudomonas tolaasii*. *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 8(1): 159–166.
- Negus, D., Moore, C., Baker, M., Raghunathan, D., Tyson, J. & Sockett, R.E. 2017. Predator versus pathogen: How does predatory *Bdellovibrio bacteriovorus* interface with the challenges of killing Gram–negative pathogens in a host setting? *Annual Review of Microbiology*, 71: 441–457.
- Osdaghi, E., Martins, S.J., Sepulveda, L.R., Vieira, F.R. & Pecchia, J.A., Beyer D.M., Bell, T.H, Yang Y, Hockett K.L & Bull, C.T. 2019. 100 Years Since Tolaas: Bacterial Blotch of Mushrooms in the 21st Century. *Plant Disease*, 103: 2714–2732. <https://doi.org/10.1094/PDIS–03–19–0589–FE>.
- Rahnamaeian, M. & Vilcinskas, A. 2015. Short antimicrobial peptides as cosmetic ingredients to deter dermatological pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99:8847–8855. <https://doi.org/10.1007/s00253–015–6926–1>.
- Rahimian, H. & Zarei, A. 1995. Bacterial brown blotch of cultivated mushroom in Mazandaran. *Proc. 12<sup>th</sup> Plant Protection Congress, Karaj, Iran, P. 372*
- Samiei, A., Tabatabaei Yazdi, F., Alizadeh, B.B. & Mazaheri, T.M. 2019. Extraction, identification of chemical compounds and antimicrobial activity of purple basil essential oil on food–born pathogenic bacteria and its comparison with vancomycin and gentamicin antibiotics. *Food Science and Technology*, 16(6): 347–356
- Schaad, N.W., Jones, B.J. & Chun, W. 2001. *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3rd ed. St. Paul (MN): American Phytopathological Society.
- Shariari, F., Tanhaeian, A., Akhlaghi, M. & Nazifi, N. 2018. Comparison of antimicrobial activity of essential oils and plant extracts with recombinant peptide in controlling of some pathogens of cultivated white button mushrooms. *Journal of Horticultural Science*, 32(4): 615–628. (In Persian with English summary).
- Shai, Y. 1999. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha–helical antimicrobial and cell non–selective membrane–lytic peptides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*. 1462(1–2):55–70. doi: 10.1016/s0005–2736(99)00200–x. PMID: 10590302.
- Shi, W., Li, C., Li, M., Zong, X., Han, D. & Chen, Y. 2016. Antimicrobial peptide melittin against *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*, the bacterial leaf blight pathogen in rice. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5059–5067. doi: 10.1007/s00253–016–7400–4
- Soković, M. & van Griensven, L.J. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology*, 116: 211–224 <https://doi.org/10.1007/s10658–006–9053–0>
- Song, R., Wang, X., Jiao, L., Jiang, H., Yuan, S., Zhang, L., Shi Z, Fan, Z. & Meng, D. 2024. Epsilon–poly–L–lysine alleviates brown blotch disease of postharvest *Agaricus bisporus* mushrooms by directly inhibiting *Pseudomonas tolaasii* and inducing mushroom disease resistance. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 199: 105759.
- Szymczak, P., Możejko, M., Grzegorzec, T., Jurczak, R. Bauer, M., Neubauer, D., Sikora, K., Michalski, M., Sroka, J., Setny, P., Kamysz, W. & Szczurek, E. 2023. Discovering highly potent antimicrobial peptides with deep generative model HydrAMP. *Nature Communications*, 14: 1453 <https://doi.org/10.1038/s41467–023–36994–z>.
- Taguchi, S., Mita, K., Ichinohe, K. & Hashimoto, S. 2009. Targeted engineering of the antibacterial peptide apidaecin, based on an in vivo monitoring assay system. *Applied and Environmental Microbiology*, 75: 1460–1464.
- Tajalipour, Sh., Hasanzadeh, N., Heydari, A. & Jolfaee, H. 2015. Study on the effect of certain metabolites produced by *Pseudomonas tolaasii* and associated bacteria on *Agaricus bisporus*. *Research in Plant Pathology*, 3(3): 43–56.
- Tajalipour, Sh., Hasanzadeh, N., Heydari, A. & Jolfaee, H. 2016. 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*, P: 43–56.
- Tang, R., Tan, H., Dai, Y., Li, L., Huang, Y., Yao, H., Cai, Y. & Yu, G. 2023. Application of antimicrobial peptides in plant protection: making use of the overlooked merits. *Front. Plant Sci.* 14: 1139539. doi: 10.3389/fpls.2023.1139539



- Vu, T.T., Kim, H., Tran, V.K., Vu, H.D., Hoang, T.X., Han, J.W., Choi, Y.H., Jang, K.S, Choi, G.J & Kim, J.C. 2017. Antibacterial activity of tannins isolated from *Sapium baccatum* extract and use for control of tomato bacterial wilt. PloS One 12, e181499. doi: 10.1371/journal.pone.0181499
- Wittebole, X., De Roock, S. & Opal, S.M. 2014. A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. Virulence, 5: 226–235.
- Wong, W.C. & Preece, T.F. 1979. Identification of *Pseudomonas tolaasii* the white line in agar and mushroom tissue blocks rapid pitting tests. Journal of Applied Bacteriology, 47: 401–407.
- Wong, W.C., Fletcher J.T., Unsworth B.A. & Preece, T.F. 1982. A note on ginger blotch, a new bacterial disease of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. Journal of Applied Bacteriology, 52(1): 43–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1982.tb04371.x>
- Wong, W.C. & Preece, T.F. 2008. *Pseudomonas tolaasii* in cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) crops: effects of sodium hypochlorite on the bacterium and on blotch disease severity. Journal of Applied Microbiology. 58. 259 – 267. 10.1111/j.1365-2672.1985.tb01459. x.
- Zhang, F., Cui, X., Fu, Y., Zhang, J., Zhou, Y., Sun Y., Wang, X., Li, Y., Liu, Q. & Chen, T. 2017. Antimicrobial activity and mechanism of the human milk-sourced peptide Casein201. Biochemical and Biophysical Research Communications, 485 698–704. 10.1016/j.bbrc.2017.02.108



## Effect of some Antibacterial Peptides Against *Pseudomonas tolaasii* the causal agent of brown blotch in White button mushroom

Afsaneh Moslemi Mehni<sup>1</sup>, Mohammad Rahnamaeian<sup>2</sup>, Nader Hassanzadeh<sup>3</sup>, Hamid Forootan Far<sup>4</sup>

1.,3. Ph. D student, Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. School of Pharmacy, Philipps University of Marburg, Marburg, Germany.

4. Professor, Pharmaceutical Sciences and Cosmetic Products Research Center, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

Corresponding author: Mohammad Rahnamaeian, email: rahnamaeian@gmail.com

Received: Jun., 24, 2024

11(1) 109–123

Accepted: Sep., 15, 2024

### Abstract

One of the most important factors limiting the production of edible mushrooms is the brown spot disease caused by the bacteria *Pseudomonas tolaasii*, which has a direct effect on reducing the quality and commercial effect of product. Due to the lack of an effective solution to control of this disease and the impossibility of using chemical poisons and antibiotics because of their unviassing effect on product health and bacterial resistant, new research is being done to identify antibacterial compounds of natural origin. With this approach, in this research, the antibacterial effects of ten peptides obtained from insects like Cecropia moth, Mediterranean fruit fly, Stable fly, Termites, Western honey bee, Red bull ant, Common fruit fly, Common green bottle fly were investigated against this disease. The values of the minimum inhibitory concentration (MIC) 50% and the minimum lethal concentration (MBC) of the desired peptides against pathogenic bacteria were obtained by ELISA method. The MBC values of peptides were also determined by re-treating the contents of the microplates. Also, to determine of disease severity, the caps of mushrooms were covered by peptides (1Mm) before inoculating with pathogenic bacteria ( $10^8$  cfu/ml). Then, the severity of disease symptoms was evaluated with six standard scale levels (B0–B1–B2–B3–B4–B5), where B0 indicates no infection and B5 showing brown and sunken symptoms (B5). MIC values of Cecropin A (Cecropia moth), Scal–stomoxyn (Stable fly), Lser–Cecropin1 (Common green bottle fly) peptides in different concentrations were effective on the growth of *P. tolaasii*. The lowest amount of MBC was observed in Cecropin A peptide equal to 6.25  $\mu$ M. Also, the results showed that Cecropin A peptide completely protected the mushroom cap at B0 level, and then Scal–stomoxyn peptide was placed at B1 index level with no occurrence or formation of pale–yellow spots. Peptides Spinigerin, Ceratotoxin (Mediterranean fruit fly), Formaecin–1 (Red bull ant), Metchnikowin–1 (Common fruit fly), Apidaecin Ia (Western honey bee) and Metchnikowin–2 (Common fruit fly) was also placed in B4 level infection by causing brown spots and decay. Brown rot symptoms with sunken spots on the mushroom cap were observed only in the positive control sample, which had the most severe quality level of symptoms (B5). The antimicrobial peptide Cecropin A completely inhibited *P. tolaasii* and the use of Scal–stomoxyn on the mushroom cap partially prevented the progress of the disease

All experiments were performed in 3 replicates and the accuracy of MIC and MBC values was evaluated by comparing the means through analysis of variance. According to the results of this study, the capacity of insect antimicrobial peptides, especially Cecropins, can be used to control the brown spot of edible button mushrooms.

**Keywords:** Antibacterial peptides, Mushroom, *Pseudomonas tolaasii*, Cecropine