کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورۀ ۷، شمارۀ ۲،پاییز و زمستان ۱۳۹۷ (۱۰۳-۹۳)
DOI: 10.22059/jbioc.2019.276448.261

تأثیر بیان ژن *aiiA* بر تحرک و آنزیم‌های بیماری‌زایی باکتری *Pectobacterium carotovorum* عامل پوسیدگی نرم باکتریایی

اسماعیل محمودی[1]* و صمد جعفری[2]
۱. استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران
۲. دانش‌آموخته کارشناس ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز، شیراز، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۲- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۰)

چکیده

حدنصاب احساس (**Quorum sensing**) یک مکانیسم تنظیم‌کننده است که توسط ***Pectobacterium carotovorum*** برای تنظیم بیان ژن‌ها و تولید فاکتورهای بیماری‌زایی استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر باکتری‌های مختلفی از خاک جداسازی شده‌اند که می‌توانند مولکول‌های پیام‌رسان باکتری‌ها به‌ویژه اسیل هموسرین لاکتون (**AHL**) را تجزیه و در حدنصاب احساس باکتری‌ها اختلال ایجاد کنند. در این پژوهش اثر ژن مولد آنزیم لاکتوناز (***aiiA***) از باکتری‌های ***Bacillus* sp. DMS133** و ***Bacillus* sp. A24** روی تحرک و تولید آنزیم‌های بیماری‌زایی باکتری ***P. carotovorum* EMPCC** مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت‌های حرکت شناوری (**Swimming**)، توده‌ای (**Swarming**) و حرکت ناگهانی (**Twitching**) در پکتوباکتریوم‌های موتانت و دارای ژن ***aiiA*** (جدایه‌های**EMPCC/aiiA1** و **EMPCC/aiiA2**) نسبت به باکتری تیپ وحشی (جدایه **EMPCC**) به شدت کاهش پیدا کرد. در آزمون اندازه‌گیری آنزیم‌های بیماری‌زایی نیز حضور **AHL** لاکتوناز در باکتری موتانت باعث کاهش چشم‌گیر مقدار آنزیم‌های پکتیناز، سلولاز و پروتئاز شد. به‌طوری‌که میانگین تولید این آنزیم‌ها نسبت به باکتری فاقد ژن ***aiiA*** تا بیش از بیست برابر کاهش نشان داد. تحرک و تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی گیاه از فاکتورهای مهم بیماری‌زایی پکتوباکتریوم‌ها هستند. حضور ژن ***aiiA*** لاکتوناز در این باکتری باعث تجزیه شدن مولکول‌های پیام‌رسان و در نتیجه، اختلال در فعالیت‌های وابسته به **QS** به‌ویژه فاکتورهای بیماری‌زایی در ***P. carotovorum*** شده است.

واژه‌های کلیدی: *Bacillus* sp.، بیان ژن *aiiA*، فاکتورهای بیماری‌زایی، پوسیدگی نرم.

The effect of *aiiA* gene on motility and enzymatic properties of *Pectobacterium carotovorum*, the causal agent of bacterial soft rot

Esmaeil Mahmoudi[1*], Samad Jafari[2]
1. Assistant Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Arghavanieh, Isfahan, Iran
2. Gratuated M.Sc. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran,
(Received: February 21, 2019 - Accepted: April 9, 2019)

ABSTRACT

Quorum sensing (QS) is a regulatory mechanism used by *Pectobacterium carotovorum* for the genes expression and the production of virulence determinants. Recently, some soil inhabiting bacteria were isolated that degraded bacterial signaling molecules such as Acyl homoserine lacton (AHL). The *aiiA* gene is responcible for AHL lactonase enzymes in *Bacillus* species. In this research the effects of *aiiA* genes from *Bacillus* sp. DMS133 and *Bacillus* sp. A24 were evaluated on the motility properties and enzyme production in *P. carotovorum*. The results revealed that swimming, swarming and twitching motilities were significantly reduced in *aiiA* mutant *pectobacteria* (EMPCC/aiiA1 and EMPCC/aiiA2 strains) in comparison with the wild type EMPCC strain. The expression of *aiiA* genes in mutant *Pectobacteria* significanlty inhibited production of pectinase, protease and cellulase enzymes. According as the means of enzymes production in EMPCC twenty time more than mutant EMPCC/aiiA1 and EMPCC/aiiA2 strains. Motility and plant cellwall degradation enzymes are two most virulence determinants in *Pectobacterium*, which are regulated by AHL mediated quorum sensing. Heterologous production of AiiA lactonase enzyme in *Pectobacterium* causes degradation of signaling molecules and decreases accumulation of them around the bacterium. As a result, the quorum sensing and related phenotypes are inhibited in *P. carotovorum*.

Key words: *Bacillus* sp., heterologus expression, soft rot, virulence determinant.

* Corresponding author E-mail: : e.mahmoudi@khuisf.ac.ir

تازه‌های تحقیق

در این پژوهش ژن *aiiA* لاکتوناز (مختل کننده حدنصاب احساس) از دو جدایه مختلف باکتری *Bacillus sp.*، جدایه DME133 از مزارع سیب‌زمینی داخل کشور و جدایه A24 از خارج از کشور، به منظور اختلال در حدنصاب احساس باکتری بیماری‌زای گیاهی *Pectobacterium carotovorum* و کاهش فعالیت‌های بیماری‌زایی آن به‌ویژه تولید آنزیم‌های پکتیناز، پروتئاز و سلولاز استفاده شد. در این پژوهش برای اولین بار مقایسه اثر ژن‌های *aiiA* مختل‌کننده حدنصاب احساس بر مقدار تولید آنزیم‌های بیماری‌زایی پکتوباکتریوم‌ها به صورت کمی اندازه‌گیری می‌شود. نتایج نشان می‌دهد که تولید آنزیم‌های پکتیناز، سلولاز و پروتئاز در پکتوباکتریوم‌های موتانت با حضور AiiA لاکتوناز کاهش شدید و بسیار معنی‌دار نسبت به پکتوباکتریوم تیپ وحشی داشته است. همچنین حضور ژن *aiiA* باعث اختلال در تحرک این باکتری‌ها و در نتیجه کاهش آن شده است.

مقدمه

بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی از مهم‌ترین و فراوان‌ترین بیماری‌های باکتریایی است. در این بیماری مقدار زیادی آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلول گیاهی توسط باکتری‌های مولد بیماری تولید شده که باعث لهیدگی و پوسیدگی نرم بافت‌های گیاهی می‌شوند. گونه‌های مختلف جنس پکتوباکتریوم به‌ویژه *Pectobacterium carotovorum* (Jones, 1901) Waldee 1945 از شناخته‌شده‌ترین عوامل ایجاد پوسیدگی نرم باکتریایی هستند. این باکتری دامنه میزبانی بسیار وسیعی دارد و طیف بسیار وسیعی از محصولات کشاورزی را در مناطق معتدل و نیمه گرمسیری آلوده می‌کند (Gardan *et al.* 2003, Toth *et al.* 2003). آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلول گیاهی از مهم‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی گونه‌ها و زیرگونه‌های پکتوباکتریوم هستند. مکانیسم‌های دیگری همچون، تحرک، تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی، هارپین‌ها و پروتئین‌های شبیه Nep-1 در گسترش و بیماری‌زایی این باکتری‌ها نقش مهمی دارند (Barras *et al.* 1994, Toth *et al.* 2003). باکتری‌های پوسیدگی نرم با تولید این آنزیم‌ها ترکیبات دیواره سلولی گیاه در دیواره اولیه، ثانویه و تیغه میانی را تجزیه می‌کنند. ترکیبات حاصل از تجزیه، به عنوان منبع انرژی و غذا مورد استفاده باکتری قرار می‌گیرد (Collmer and Keen 1986, Barras *et al.* 1994). یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های شناخته‌شده در باکتری‌های پوسیدگی نرم، پکتینازها هستند که باعث شکسته شدن پکتین دیواره سلولی و تیغه میانی گیاه می‌شوند. جنس پکتوباکتریوم چندین نوع از پکتینازها را تولید می‌کند که به وسیله ژن‌های جداگانه کد می‌شوند (Perombelon 2002). گروه دیگری از آنزیم‌ها، سلولازها هستند که فعالیت اندوگلوکانازی داشته و سلولز موجود در دیواره اولیه و ثانویه سلول گیاه میزبان را می‌شکنند. آنزیم سلولز به تنهایی برای بیماری‌زایی لازم نیست اما همراه با دیگر آنزیم‌ها در شدت بیماری پوسیدگی نرم اثر گذار است. پروتئازها هم با نقش کمتری در این باکتری‌ها یافت شده‌اند (Toth *et al.* 2003). تولید فاکتورهای بیماری‌زایی در پکتوباکتریوم‌ها (بویژه آنزیم‌ها، هارپین‌ها و آنتی بیوتیک کارباپنم) توسط سیستم حدنصاب احساس (Quorum sensing) وابسته به مولکول‌های پیام‌رسان آسیل هموسرین لاکتون نوع 3-oxo-C6 HSL و C8-HSL (AHL) کنترل می‌شوند (Whitehead *et al.* 2001, Barnard and Salmond 2007). آنزیم AHL لاکتوناز حلقه هموسرین لاکتون در مولکول‌های پیام‌رسان را هیدرولیز و هموسرین تولید می‌کنند که خاصیت انتقال پیام ندارد. فعالیت لاکتونازی در بسیاری از باکتری‌های خاکزی از جمله باسیلوس، اسیدوباکتر، آرتروباکتر گزارش شده است (Chen *et al.* 2013, Mahmoudi *et al.* 2011). زمانی که ژن مولد آنزیم لاکتوناز و عامل تجزیه کننده AHL در باکتری‌های بیماری‌زای

گیاهی همانند پکتوباکتریوم بیان می‌شود، تجمع مولکول‌های پیام‌رسان در محیط این باکتری به شدت کاهش می‌یابد که نتیجه آن اختلال و کاهش در فعالیت‌هایی است که توسط حدنصاب احساس کنترل می‌شوند (Mahmoudi *et al.* 2013, Hosseinzadeh *et al.* 2017). از آن‌جایی که تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی در پکتوباکتریوم و همچنین فعالیت‌های فنوتیپی این باکتری مانند تحرک و شناگری توسط QS کنترل و تنظیم می‌شوند، لذا کاهش در تولید و تجمع مولکول‌های پیام‌رسان در محیط باکتری به دلیل فعالت لاکتونازی ژن *aiiA* در باکتری‌های پکتوباکتریوم موتانت می‌تواند به طور مستقیم مقدار و کیفیت آنزیم‌های بیماری‌زایی و ویژگی‌های رفتاری تحرک و شناگری باکتری را تحت تاثیر قرار دهد. لذا پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر ژن ضد حدنصاب احساس *aiiA* بر تحرک باکتری *P. carotovorum* و همچنین میزان تولید آنزیم‌های بیماری‌زایی (پکتیناز، سلولاز و پروتئاز) در این باکتری انجام شد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها و محیط‌های کشت مورد استفاده

ژن *aiiA* مسئول تولید آنزیم لاکتوناز و تجزیه کننده AHL پیش از این توسط محمودی و همکاران (Mahmoudi *et al.* 2013) از باکتری *Bacillus* sp. DMS133 جداسازی، توالی‌یابی و در باکتری *Pectobacterium carotovorum* EMPCC کلون شده بود. در این پژوهش از باکتری‌های *P. Carotovorum* EMPCC/aiiA1 حامل ژن *aiiA* از باکتری باسیلوس جدایه داخل کشور، *P. carotovorum* EMPCC/aiiA2 حامل ژن *aiiA* از باکتری *Bacillus sp.* A240 جدایه خارج کشور (مرکز بین المللی مهندسی ژنتیک و بیوتکنولوژی، ایتالیا) (Reimmann *et al.* 2002) و *P. carotovorum* EMPCC باکتری تیپ وحشی و فاقد ژن به عنوان کنترل منفی، استفاده شد که قبل از انجام آزمایشات، ابتدا وجود ژن مورد نظر توسط آغازگرهای اختصاصی در واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی (PCR) در باکتری‌های مورد بررسی تایید شد. آغازگرهای aiiA-7F و aiiA-7R منجر به تکثیر ژن *aiiA* با اندازه ۷۸۴ bp از باکتری موتانت می‌شوند (قاب خواندنی باز ژن ۷۵۰bp است) (Mahmoudi *et al.* 2013).

حرکت توده‌ای (Swarming)

ابتدا ظروف پتری حاوی محیط کشت آگار غذایی غنی‌شده با نیم درصد (وزنی- حجمی) گلوکز به مدت نیم ساعت زیر هود لامینار قرار گرفتند تا رطوبت سطحی آنها از بین برود. سپس هر دو باکتری موتانت EMPCC/*aiiA*1 و EMPCC/aiiA2 و همچنین باکتری غیر موتانت EMPCC به صورت نقطه‌ای روی محیط‌کشت مایه‌زنی شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای سی درجه سلسیوس نگهداری شدند. قطر هاله تشکیل شده روی محیط به عنوان میزان حرکت توده‌ای باکتری اندازه‌گیری شد (Murray *et al.* 2010).

حرکت شناوری (Swimming)

سنجش حرکت سطحی سلول‌های باکتری در محیط نیمه جامد تریپتون (یک درصد تریپتون، ۰/۵ درصد کلرید سدیم، ۰/۳ درصد آگار) انجام شد. ظرف‌های پتری حاوی محیط‌کشت با کلونی‌های تازه باکتری‌های مورد بررسی و توسط خلال دندان سترون مایه‌زنی شدند. به منظور جلوگیری از خشک شدن، ظروف پتری درون کیسه پلاستیکی در بسته و در دمای سی درجه سلسیوس نگهداری شدند. بعد از دوازده تا چهارده ساعت، قطر ناحیه مه (hazy) به عنوان میزان شناگری باکتری‌ها اندازه‌گیری شد (Murray *et al.* 2010).

حرکت ناگهانی (Twitching)

این آزمون در محیط کشت جامد SOBG (Super Optimal Broth and Glycerol) حاوی ۰/۰۵ درصد NaCl، ۳۳/۵ میکرومولار KCl، ۴/۸۶ میلی‌مولار

$MgSO_4$، نیم درصد عصاره مخمر و دو درصد تریپتون به همراه پنجاه میلی‌لیتر گلیسرول چهل درصد انجام شد که با ۱/۲ درصد آگار جامد شده بود. آلوده‌سازی پلیت‌های توییچ (حدود سه میلی‌متر ضخامت) خیلی آرام و با استفاده از خلال دندان تیز انجام شد به نحوی که اینوکولوم باکتری به کف پلیتها رسیده باشد. ناحیه مه حرکت ناگهانی در محل تماس محیط‌کشت با کف پلیت بعد از ۴۸ ساعت در سی درجه سلسیوس اندازه‌گیری شد (Murray *et al.* 2010).

تولید آنزیم پکتیناز

برای بررسی میزان تولید این آنزیم در باکتری‌های مورد بررسی، ابتدا باکتری‌ها در محیط کشت مایع نوترینت براث به مدت ۴۸ ساعت در ۲۷ درجه سلسیوس کشت شدند. سپس به مدت ده دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شد. رونشین برای اندازه‌گیری مقدار آنزیم خارج سلولی پکتیناز خام استفاده شد. مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از رونشین با ۰/۸ میلی‌لیتر بافر استات سدیم (۰/۱ مولار، pH 5.2) و یک میلی‌لیتر پکتین ۰/۳ درصد (w/v) به عنوان سوبسترا برای پکتیناز استفاده شد. مخلوط واکنش برای بیست ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس در بنماری متحرک انکوبه شد. واکنش آنزیمی با اضافه کردن ۱/۵ میلی لیتر دی-نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) خاتمه یافته و به حمام آب جوش برای ده دقیقه منتقل شد. لوله‌های شاهد تحت شرایط یکسان با استفاده از ۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر به جای محلول خام آنزیم تهیه شد. چگالی نوری (OD) هر مخلوط واکنش در ۵۴۰ نانومتر در برابر شاهد حاوی یک میلی‌لیتر پکتین ۰/۳ درصد (w/v)، یک میلی‌لیتر بافر و ۱/۵ میلی‌لیتر DNS برای فعالیت پکتیناز اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت پکتیناز به صورت مقداری آنزیمی تعریف شد که یک میکرومول گلوکز را تحت شرایط بالا آزاد کند (Kashyap *et al.* 2000).

تولید آنزیم پروتئاز

برای بررسی میزان آنزیم پروتئاز هر سه باکتری مورد بررسی در محیط کشت مایع لوریا برتانی به مدت ۴۸ ساعت و دمای ۲۷ درجه سلسیوس کشت شدند. دو محیط کشت برای تولید پروتئاز استفاده شد. یکی از آنها حاوی (گرم بر لیتر): گلوکز ۰/۱، پپتون ۱، عصاره مخمر ۰/۰۲، $MgSO_4$ ۰/۰۱، $CaCl_2$۰/۰۱، K_2HPO_4 ۰/۰۵ (pH 7.0)، و محیط کشت دیگر حاوی (گرم بر لیتر): گلوکز ۱، پپتون ۰/۵، عصاره مخمر ۰/۳، $MgCl_2$ ۰/۰۲، $CaCl_2$ ۰/۰۴ (pH 7.0) بود. گلوکز جداگانه سترون و به ظرف حاوی محیط مایع بعد از سردشدن اضافه شد. سپس کشت شب‌مانده از هر باکتری با غلظت OD_{600}= 0.3 به صورت یک درصد به محیط تولید آنزیم مایه‌زنی شد (۱۵۰ میلی‌لیتر در ارلن پانصد میلی‌لیتر) و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور شیک‌شونده با دمای ۳۷ درجه سلسیوس و سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه نگهداری شد. در نهایت کشت‌ها به مدت ده دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شد و رونشین برای تعیین فعالیت پروتئولیتیک استفاده شد. فعالیت پروتئاز کل با استفاده از سوبسترای کازئین با اندکی تغییر در روش آنسون اندازه‌گیری شد. یک میلی‌لیتر از رونشین با یک میلی‌لیتر بافر فسفات حاوی دو درصد کازئین مخلوط شد و برای ده دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. واکنش با اضافه کردن دو میلی‌لیتر تری کلرو استیک اسید ۰/۴ مولار متوقف شد. بعد از سی دقیقه نگهداری در دمای اتاق، رسوب با سانتریفیوژ حذف و چگالی نوری در ۶۶۰ نانومتر تعیین شد. نمودار استاندارد با استفاده از محلول‌های ۶۰-۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تیروزین با استپکتوفوتومتر در جذب نوری ۶۶۰ نانومتر رسم شد. یک واحد فعالیت پروتئاز به صورت مقدار آنزیمی تعریف شد که یک میکروگرم بر میلی‌لیتر تیروزین را تحت شرایط آزمایشگاهی بالا تولید کند (Sevinc and Demirkan 2011). از ماده ۱-نیتروزو۲-نفتول به عنوان معرف تیروزین برای تهیه نمودار استاندارد استفاده شد.

تولید آنزیم سلولاز

جهت بررسی تاثیر ژن لاکتوناز بر میزان تولید آنزیم سلولاز، باکتری‌های مورد بررسی در محیط نوترینت براث آگار به‌مدت ۴۸ ساعت و دمای ۲۷ درجه سلسیوس کشت شدند. سپس محیط‌های مایع حاوی باکتری به‌مدت ده دقیقه در ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شدند. رونشین برای اندازه‌گیری مقدار آنزیم خارج سلولی خام استفاده شد. مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از رونشین با ۰/۸ میلی‌لیتر بافر استات سدیم (۰/۱ مولار، pH 5.2) و یک میلی‌لیتر کربوکسی متیل سلولز (CMC-Na) به عنوان سوبسترای سلولاز، مخلوط شد. مخلوط واکنش برای بیست ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس در بنماری متحرک نگهداری شد. واکنش آنزیمی با اضافه کردن ۱/۵ میلی‌لیتر دی-نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) خاتمه یافته و به حمام آب جوش برای ده دقیقه منتقل شد. لوله‌های شاهد تحت شرایط یکسان با استفاده از ۰/۲ میلی‌لیتر آب مقطر به جای آنزیم خام تهیه شد. چگالی نوری (OD) هر مخلوط واکنش در ۵۴۰ نانومتر در برابر شاهد حاوی یک میلی‌لیتر CMC-Na یک درصد (w/v)، یک میلی‌لیتر بافر و ۱/۵ میلی‌لیتر DNS برای فعالیت سلولاز، اندازه‌گیری شد. یک واحد فعالیت سلولاز به صورت مقداری آنزیمی تعریف شد که یک میکرومول گلوکز را تحت شرایط بالا تولید می‌کند (Li *et al*. 2012).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

کلیه آزمون‌های فوق در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SAS v.9.4 و مقایسه میانگین‌ها با آزمون ال-اس-دی در سطح پنج درصد انجام گرفت.

نتایج

اثر ژن *aiiA* لاکتوناز بر انواع تحرک (شناوری، توده‌ای و ناگهانی) باکتری *P. carotovorum*

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۱) نشان می‌دهد که اثر ژن *aiiA* بر هر سه نوع حرکت (شناوری، توده‌ای و ناگهانی) باکتری‌های مورد بررسی، معنی‌دار بوده وجود این ژن در باکتری پکتوباکتریوم باعث کاهش معنی‌دار حرکت‌های باکتری شده است. بر اساس آزمون مقایسه میانگین‌ها (شکل ۱)، قطر هاله در هر سه نوع تحرک در باکتری‌های موتانت پکتوباکتریوم جدایه‌های EMPCC/aiiA1 و EMPCC/aiiA2 نسبت به پکتوباکتریوم تیپ وحشی EMPCC کمتر بوده و در یک گروه آماری قرار دارند.

جدول ۱- اثر ژن ضدحدنصاب احساس *aiiA* بر انواع تحرک باکتری *Pectobacterium carotovorum*

Table 1- Effetc of anti-quorum sensing gene *aiiA* on the motility of *Pectobacterium carotovorum*

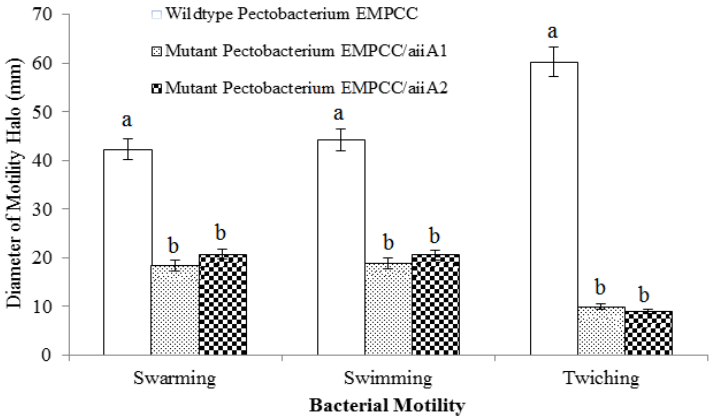
sources	df	Swarming	Swimming	Twitching
aiiA gene	2	691.94**	803.40**	3435.08**
Error	9	9.52	12.74	4.31

**- معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**- Significant at P<0.01

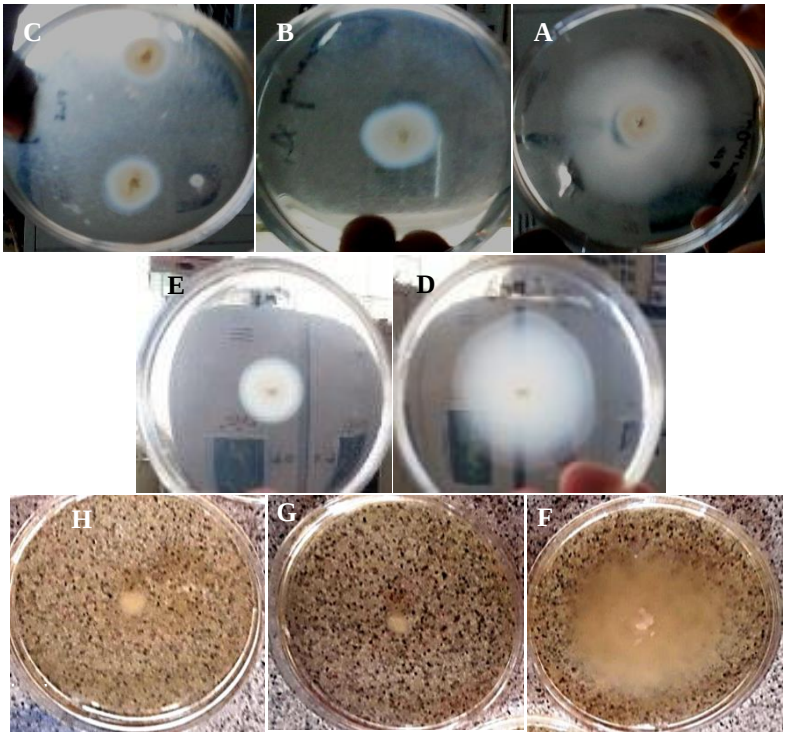
هرچند که در آزمون‌های حرکت شناوری و ناگهانی، ژن *aiiA* جداشده از باکتری *Bacillus sp.* DMS133 اثر بهتری در کاهش این فعالیت‌ها در باکتری‌های موتانت نسبت به ژن جداشده از باکتری *Bacillus sp.* A24 داشته است، اما از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین آنها در سطح پنج درصد مشاهده نشد. در این آزمون‌ها بیشترین تاثیر ژن *aiiA* بر تحرک ناگهانی (Twitching) مشاهده شد. به‌طوری‌که در باکتری تیپ وحشی EPMCC قطر هاله تحرک ۶۰/۲۵ میلی‌متر بود که حدود شش

برابر بیشتر از باکتری‌های موتانت حاوی ژن لاکتوناز است (شکل ۲).



شکل ۱- اثر ژن‌های *aiiA* بر انواع تحرک باکتری *Pectobacterium carotovorum*. میانگین‌های دارای حرف مشترک براساس آزمون ال اس دی فاقد تفاوت معنی‌دار درسطح پنج درصد می‌باشند.

Fig 1- Effect of *aiiA* genes on the motility of *Pectobacterium carotovorum*. Means with the same letter are not significantly different based on LSD test at P<0.05.



شکل ۲- کاهش تحرک باکتری *P. carotovorum* موتانت با ژن‌های *aiiA* (۲۴ ساعت بعد از کشت). A، B، C: قطر هاله حرکت توده‌ای (Swarming) به ترتیب در پکتوباکتریوم تیپ وحشی EMPCC- پکتوباکتریوم موتانت EMPCC/aiiA1 و پکتوباکتریوم موتانت EMPCC/aiiA2؛ D، E: قطر هاله حرکت شناوری (Swimming) به ترتیب در پکتوباکتریوم تیپ وحشی EMPCC و پکتوباکتریوم موتانت EMPCC/aiiA1؛ F، G، H: قطر هاله حرکت ناگهانی (Twitching) به ترتیب در پکتوباکتریوم تیپ وحشی EMPCC- پکتوباکتریوم موتانت EMPCC/aiiA1 و پکتوباکتریوم موتانت EMPCC/aiiA2. خط مقیاس برای تمام تصاویر: ۱۰ میلی‌متر.

Fig. 2- *Pectobacterium carotovorum* with reduced mobility cloned using *aiiA* genes (after 24 hr of culturing). A, B, C: diameter of swarming motility halo in wildtype *P. carotovorum* EMPCC, mutant EMPCC/aiiA1 and mutant EMPCC/aiiA2, respectively; D, E: diameter of swimming motility halo in wildtype *P. carotovorum* EMPCC and mutant EMPCC/aiiA1 recpectively; F, G, H: diameter of twitching motility halo in wildtype *P. carotovorum* EMPCC, mutant EMPCC/aiiA1 and mutant

EMPCC/aiiA2 respectively. Bars in all pictures: 10mm.

اثر ژن *aiiA* بر تولید آنزیم‌های بیماری‌زایی در پکتوباکتریوم

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۲) نشان می‌دهد که اثر ژن لاکتوناز بر میزان تولید آنزیم پکتیناز پکتوباکتریوم‌های مورد بررسی معنی‌دار بوده و وجود ژن *aiiA* در باکتری باعث کاهش تولید این آنزیم شده است. مقایسه میانگین‌ها (شکل ۳) نشان می‌دهد که تولید آنزیم پکتیناز در باکتری‌های موتانت EMPCC/aiiA1 وEMPCC/aiiA2 نسبت به باکتری تیپ وحشی EMPCC کاهش چشمگیری داشته به‌طوری‌که در باکتری تیپ وحشی فاقد ژن مختل کننده حدنصاب احساس (*aiiA*) ۸۲۲/۱۶ واحد آنزیم و در باکتری‌های موتانت به ترتیب ۵۱/۸۵ و ۴۵/۵۲ واحد آنزیم تولید شده است. ژن *aiiA* حاصل از باکتری *Bacillus sp.* A24 اثر بهتری نسبت دیگر ژن *aiiA* در مهار تولید آنزیم پکتیناز پکتوباکتریوم نشان داد؛ هرچند که این اثر در سطح پنج درصد معنی‌دار نشده است.

جدول ۲- اثر ژن *aiiA* بر تولید آنزیم‌های بیماری‌زایی باکتری *Pectobacterium carotovorum*

Table 2- Effetc of *aiiA* gene on the virulence associated enzymes of *Pectobacterium carotovorum*

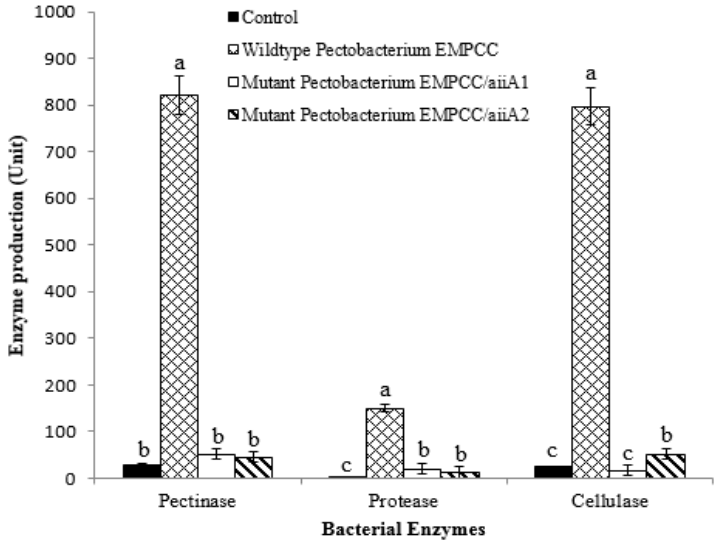
Sources	df	Pectinase	Perotease	Cellulase
aiiA gene	3	2.62**	3.20**	3.08**
Error	12	0.09	0.10	0.08

**- معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**- Significant at P<0.01

براساس جدول تجزیه واریانس (جدول ۲)، وجود ژن *aiiA* در پکتوباکتریوم بر میزان تولید تیروزین در آزمون پروتئاز اثر گذاشته و بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد مشاهده شد. مقایسه میانگین‌ها (شکل ۳) نشان می‌دهد که در باکتری‌های موتانت حامل ژن AHL لاکتوناز تولید تیروزین به شدت کاهش پیدا کرده است. از آنجایی که تولید تیروزین رابطه مستقیم با تولید آنزیم پروتئاز دارد و به عنوان شاخص تولید آنزیم استفاده می‌شود، نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان می‌دهد که وجود ژن *aiiA* باعث سرکوب تولید این آنزیم در باکتری‌های موتانت شده است. نکته قابل توجه اینکه میزان تولید آنزیم پروتئاز در پکتوباکتریوم‌های موتانت حامل هر دو نوع ژن *aiiA* حدود ده برابر کمتر از پکتوباکتریوم تیپ حشی بوده است که قابلیت بالای آنزیم لاکتوناز در سرکوب تولید این آنزیم را نشان می‌دهد. نتایج به‌دست آمده از تجزیه واریانس (جدول ۲) اثر ژن کدکننده لاکتوناز در باکتری‌های موتانت پکتوباکتریوم بر میزان تولید آنزیم سلولاز در سطح یک درصد اثر معنی‌دار داشته و حضور این ژن در پکتوباکتریوم باعث تغییر روند تولید آنزیم سلولاز شده است. نمودار مقایسه میانگین‌ها (شکل ۳) نشان می‌دهد که تولید آنزیم سلولاز در باکتری‌های حامل ژن *aiiA* به شدت کاهش یافته است. به‌طوری‌که در پکتوباکتریوم تیپ وحشی تولید این آنزیم بیش از چهل برابر بیشتر از باکتری‌های موتانت بوده است. همچنین نتایج مقایسه میانگین‌ها بیانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین دو نوع ژن لاکتوناز در کاهش تولید آنزیم سلولاز در سطح پنج درصد می باشد. ژن‌های *aiiA* باکتری *Bacillus* sp. DMS133 و *aiiA* باکتری *Bacillus* sp. A24 به ترتیب تاثیر حدود چهل و شانزده برابری در کاهش تولید آنزیم سلولاز را نشان دادند و در آزمون ال-اس-دی در

سطح پنج درصد در گروه‌های مختلف آماری قرار گرفتند.



شکل ۳- اثر ژن‌های *aiiA* لاکتوناز بر تولید آنزیم‌های بیماری‌زایی (پکتینار، پروتئاز و سلولاز) باکتری *P. carotovorum*. میانگین‌های دارای حرف مشترک براساس آزمون ال اس دی فاقد تفاوت معنی‌دار درسطح پنج درصد می‌باشند.

Fig. 3- Effect of *aiiA* lactonase genes on the production of virulence associated enzymes (pectinase, protease and cellulase) of *Pectobacterium carotovorum*. Means with the same letter are not significantly different based on LSD test at P<0.05.

بحث و نتیجه‌گیری

ژن *aiiA* مسئول سنتز بزرگترین خانواده آنزیم‌های تجزیه کننده مولکول‌های AHL، یعنی AHL لاکتوناز می باشد و در بسیاری از جنس‌های باکتریایی مانند باسیلوس، آرتروباکتر و مزوریزوبیوم مورد شناسایی قرارگرفته است (Zheng *et al.* 2006, Faure and Dessaux 2007). ناحیه قاب خواندنی باز این ژن شامل ۷۵۰ نوکلئوتید است که یک پروتئین فعال با ۲۵۰ اسید آمینه کد می‌کند (Dong *et al.* 2000). این ژن از باکتری‌های *Bacillus* sp. DMS133 (Mahmoudi *et al.* 2013) و *Bacillus* sp. A24 (Reimmann *et al.* 2002) جداسازی و در باکتری *P. carotovorum* EMPCC همسانه‌سازی و بیان شد. در این پژوهش تاثیر وجود ژن *aiiA* لاکتوناز بر انواع تحرک و شناگری پکتوباکتریوم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که انواع تحرک از قبیل سطحی، شناگری، خزیدن و حرکت عمقی، که از فعالیت‌های مهم بیماریزایی پکتوباکتریوم‌ها هستند، در اثر حضور ژن لاکتوناز دچار اخلال شده و نسبت به باکتری فاقد ژن *aiiA* کاهش چشمگیری پیدا کرده است. فعالیت‌های شناگری پکتوباکتروم تحت کنترل سیستم حدنصاب احساس است و از آنجایی که تولید آنزیم AHL لاکتوناز در داخل پکتوباکتریوم موتانت باعث کاهش مولکول‌های پیام‌رسان در محیط باکتری می‌شود (Mahmoudi *et al.* 2013, Sobhanipour *et al.* 2017)، لذا فعالیت‌های وابسته به QS نیز به‌خاطر کاهش این مولکول‌ها تحت تاثیر قرار گرفته و در نتیجه کاهش یافته یا متوقف می‌شوند. توانایی تحرک و جابه‌جایی یکی از فاکتورهای افزایش قدرت رقابت یک میکروارگانیسم در محیط طبیعی است. با کاهش تحرک، باکتری‌های بیمارگر قدرت تهاجمی خود را از دست داده و در نتیجه از شدت بیماری‌زایی کمتری برخوردار می شوند. نتایج آزمون بیماری‌زایی در باکتری *P. carotovorum* موتانت روی غده‌های

سیب‌زمینی نیز همین امر را اثبات می‌کند. حسین‌زاده و همکاران بیان کردند که ژن حضور *aiiA* لاکتوناز در باکتری *Dickeya chrysanthemi* باعث کاهش شناگری و تحرک سطحی این باکتری می‌شود. همچنین مطالعات RT-PCR روی این باکتری موتانت نشان‌دهنده کاهش بیان ژن‌های بیماری‌زایی به‌ویژه ژن‌های مولد آنزیم‌های هیدرولیزکننده می‌باشد (Hosseinzadeh *et al.* 2017). آنزیم AHL-لاکتوناز یک آنزیم بسیار قوی در تجزیه مولکول‌های پیام‌رسان AHL گزارش شده است که با شکستن حلقه لاکتون در مولکول‌های پیام‌رسان نوع AHL، خاصیت پیام‌رسانی آنها را غیرفعال می‌کند و در نتیجه از آن برای کنترل بیماری‌های باکتریایی گیاهان استفاده می‌شود. این کار اولین بار با کلون کردن ژن *aiiA* از باکتری *Bacillus* sp. در باکتری بیماریزای گیاهی *Ewrinia carotovora* (Dong *et al.* 2000) و سپس در گیاهان توتون و سیب‌زمینی انجام شد (Zhu *et al.* 2008, Mahmoudi and Naderi 2017). تولید آنزیم AHL-لاکتوناز توسط گیاهان مهندسی ژنتیکی‌شده و عوامل بیوکنترل، سیستم QS باکتری‌ها را مختل کرده و سبب کاهش بیماری‌زایی باکتری‌های بیمارگر روی میزبان و افزایش مقاومت میزبان می‌شود (Mahmoudi and Naderi 2017).

از دیگر اهداف این پژوهش اندازه‌گیری مقدار آنزیم‌های پکتیناز، پروتئاز و سلولاز در باکتری‌های موتانت پکتوباکتریوم با ژن *aiiA* و مقایسه اثر حضور این ژن نسبت به باکتری‌های تیپ وحشی بود. نتایج بیانگر کاهش شدید و چشمگیر تولید آنزیم‌های مورد بررسی در پکتوباکتریوم‌های موتانت نسبت به باکتری فاقد ژن می‌باشد. تولید آنزیم‌های پکتیناز، پروتئاز و سلولاز در *P. carotovorum* تیپ وحشی نسبت به جدایه‌های موتانت با ژن *aiiA* به طور میانگین بیش از بیست برابر مشاهده شد و اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد نشان دادند. بین نوع ژن *aiiA* در تولید آنزیم‌های پکتیناز و پروتئاز اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد و فقط در تولید آنزیم سلولاز بود که دو نوع ژن *aiiA* اثر متفاوت و معنی‌دار در تولید این آنزیم توسط جدایه‌های موتانت پکتوباکتریوم نشان دادند. همان‌گونه که در منابع نیز ذکر شده است آنزیم‌های گروه پروتئاز نقش بسیار کمی در بیماری‌زایی پکتوباکتریوم‌ها دارند (Toth *et al.* 2003)، در این پژوهش نیز کمترین میزان آنزیم تولید شده در پکتوباکتریوم تیپ وحشی EMPCC، آنزیم پروتئاز بود.

ژن *aiiA* استفاده‌شده در *P. carotovorum* EMPCC/aiiA1از یک جدایه باسیلوس به نام *Bacillus* sp. DMS133 جداشده از ریزوسفر سیب‌زمینی مزارع داخل کشور ایران می باشد که از نظر توالی نوکلئوتیدها ۹۳ درصد شباهت با ناحیه کدشونده دیگر ژن *aiiA* استفاده شده در این پژوهش (ژن *aiiA* از باکتری *Bacillus* sp. A24 جداشده از ریزوسفر سیب‌زمینی مزارع خارج از کشور) دارد. مقایسه توالی اسیدهای آمینه این دو ژن با یکدیگر نیز نشان میدهد که در بعضی جایگاه‌ها به‌ویژه سرین و پرولین با یکدیگر اختلاف دارند (Mahmoudi *et al.* 2013). این تفاوت در توالی‌ها در ساختار ثانویه آنزیم‌ها اثر گذاشته و احتمالا روی اختصاصیت، شدت فعالیت آنزیمی و ترجیح سوبستراهای آنزیم AiiA لاکتوناز نیز تاثیر می‌گذارد (Reimmann *et al.* 2002, Mahmoudi *et al.* 2013). در این پژوهش فعالیت این دو ژن اثر یکسانی در تحرک باکتری‌های مورد بررسی و همچنین تولید آنزیم‌های بیماری‌زایی، به استثنای آنزیم سلولاز، داشتند. نتایج انتقال ژن *aiiA* به باکتری‌های بیماری‌زا و گیاهان مانند سیب‌زمینی و توتون به منظور کاهش بیماری‌زایی و خسارت باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی در شرایط آزمایشگاهی موفقیت‌آمیز بوده و در مواردی به‌طور کامل مانع از بیماری‌زایی بیمارگرهای مورد بررسی شده است (Dong *et al.* 2000, Hosseinzadeh *et al.* 2017, Mahmoudi and Naderi 2017). تمام این آزماش‌های بیوکنترلی و تراریختی با رویکرد اختلال در حدنصاب احساس انجام شده است که

یک رویکرد نوین و به نظر کارآمد در کنترل بیولوژیکی باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی می‌باشد. اما باید توجه داشت که اختلال در حدنصاب احساس در طبیعت همواره مناسب نیست. یکی از چالش‌های پیش روی این روش در محیط طبیعی و مزرعه، تأثیر عوامل مختل کننده QS (quencher) روی موجودات مفید خاک است که از سیستم QS برای تنظیم فعالیت‌های خود و به‌خصوص فعالیت آنتاگونیستی استفاده می‌کنند (Sperandio 2007, Qian *et al.* 2010). با این حال هدف قرار دادن سیستم حدنصاب احساس باکتری‌ها چه از طریق باکتری‌های تجزیه کننده AHL و چه از طریق بیان ژن‌های مختل کننده QS، می‌تواند کارآمدترین روش مبارزه با باکتری‌های بیماری‌زا باشد. در بیوکنترل بیمارگرهای انسانی، حیوانی و گیاهی و به‌خصوص باکتری‌هایی که به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند یا بیماری‌هایی که با روش‌های شیمیایی و دارو درمانی قابل معالجه نیستند، این تکنیک‌ها و روش‌های نوین می‌توانند آینده علوم میکروبیولوژی، داروشناسی و بیماری‌شناسی گیاهی و انسانی را تحت تاثیر قرار دهند.

REFERENCES

Barnard AM, Salmond GP (2007) Quorum sensing in *Erwinia* species. Anal and Bioanal Chemistry. 387:415-23.

Barras F, Gijsegem F, Chatterjee AK (1994) Extracellular enzymes and pathogenesis of soft-rot *Erwinia*. Annual Review of Phytopathology 32:201-234.

Chen F, Gao Y, Chen X, Yu Z, Li X (2013) Quorum quenching enzymes and their application in degrading signal molecules to block quorum sensing-dependent infection. International Journal of Molecular Sciences. 14: 17477-17500.

Collmer A, Keen NT (1986) The role of pectic enzymes in plant pathogenesis. Annual Review of Phytopathology. 24:383-409.

Dong YH, Xu JL, Li XZ, Zhang LH (2000) AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of Erwinia carotovora. Procceding on National Academy Sciences of USA. 97:3526–3531

Dong YH, Wang LH, Xu JL, Zhang HB, Zhang XF, Zhang LH (2001) Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature 411:813-7.

Faure D, Dessaux Y. 2007. Novel biocontrol strategies directed at *Pectobacterium carotovorum*. European Journal of Plant Pathology 119:353–365

Gardan L, Gouy C, Christen R, Samson R (2003) Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavasculorum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53: 381-391.

Hosseinzadeh S, Shams-Bakhsh M, Sadeghizadeh M (2017) Attenuation and quantitation of virulence gene expression in quorum-quenched *Dickeya chrysanthemi*. Archives of Microbiology. 199 (1): 51-61.

Kashyap DR, Chandra S, Kaul A, Tewari R **(2000) Production, purification and characterization of pectinase from a** *Bacillus* ***sp.*** **DT7. World Journal of Microbiology and Biotechnology** 16: 277–282, 2000.

Li WMJ, Vico I, Whitaker BD, Gaskins VL, Janisiewicz WJ (2012) Application of the 2-Cyanoacetamide method for spectrophotometric assay of cellulose enzyme activity. Plant Pathology Journal. 11(1): 38-41

Mahmoudi E, Ahamadi A, Seyed-Tabatabaei BE, Ghobadi A, Akhavan Hassanzadeh N, Venturi V (2011) An Novel AHL-degrading rhizobcterium quenches the virulence of *Pectobacterium atrosepticum* on potato plant. Journal of Plant Pathology. 93 (3): 587-594.

Mahmoudi E, Naderi D, Venturi V (2013) AiiA lactonase disrupts *N*-acylhomoserine lactone and attenuates quorum sensing related virulence in *Pectobacterium carotovorum* EMPCC. Annals of Microbiology. 63: 691-697.

Mahmoudi E, Naderi D (2017) Expression of *aiiA* gene in potato and its effect on the control of bacterial soft rot disease**.** Journal of Plant Protection, 40 (2): 13-26. (In Persian)

Murray TS, Ledizet M, Kazmierczak BI (2010) **Swarming motility, secretion of type 3 effectors**

and biofilm formation phenotypes exhibited within a large cohort of Pseudomonas aeruginosa **clinical isolates. Journal of Medical Microbiology**. 59: 511–520

Perombelon MCM (2002) Potato diseases caused by soft rot erwinias: an overview of pathogenesis. Plant Pathology. 51:1-12.

Qian GL, Fan JQ, Chen DF, Kang YJ, Han B, Hu BS, Liu FQ (2010) Reducing *Pectobacterium* virulence by expression of an N-acyl homoserine lactonase gene *Plpp-aiiA* in *Lysobacter enzymogenes* strain OH11. Biological Control. 52: 17–23.

Reimmann C, Ginet N, Michel L, Keel C, Michaux P, Krishnapillai V, Zala M, Heurlier K, Triandafillu K, Harms H, Defago G, Haas D (2002) Genetically programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Microbiology. 148: 923-932.

Sevinc N, Demirkan E (2011) Production of Protease by *Bacillus* sp. N-40 Isolated from Soil and Its Enzymatic Properties. Journal of Biology and Environmental Sciences. 5(14): 95-103

Sobhanipour A, Behboudi K, Mahmoudi E (2017) Bioassay for interference of AHL-dependent gene regulation in *Pectobacterium atrosepticum* and modulation of LuxI and LuxR by N-acylhomoserine lactone degrading rhizobacteria. Biological Control of Pest and Plant Diseases. 6(1): 11-26. (In Persian)

Sperandio V. 2007. Novel approaches to bacterial infection therapy by interfering with bacteria to bacteria signaling. Expert Review of AntiInfection Therapy 5:271–276

Toth IK, Bell KS, Holeva MC, Birch PRJ (2003) Soft-rot *Erwinae*: from genes to genomes. Molecular Plant Pathology 4:17-30.

Whitehead NA, Barnard AM, Slater H, Simpson NJ, Salmond GP (2001) Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiological Review 25:365–404

Zheng HM, Zhong ZT, Lai X, Chen WX, Li SP, Zhu J (2006) A LuxR/LuxItype quorum sensing system in a plant bacterium, *Mesorhizobium tianshanense*, controls symbiotic nodulation. Journal of Bacteriology. 188: 1943–1949.

Zhu H, Shen YL, Wei DZ, Zhu JW (2008) Cloning andcharacterizations of the Serratia marcescensmetK andpfsgenes involved inAI-2-dependent quorum-sensing system. Molecular and Cellular Biochemistry. 315: 25–30.