بیان تراژن *aiiA* در سیب‌زمینی و اثر آن بر کنترل بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی

اسماعیل محمودی[۱]* و داود نادری[۲]

۱- [G]**نویسنده مسوول:** استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، خوراسگان، ایران (e.mahmoudi@khuisf.ac.ir)

۲- استادیار باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، خوراسگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۰۱/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۹/۲۰

چکیده

حدنصاب حسگری مکانیسم ارتباط سلولی همراه با تولید مولکول‌های کوچک پیام‌رسان مانند اسیل هموسرین لاکتون در جمعیت باکتری‌هاست که وظایف مهمی مانند تحرک، تولید آنتی‌بیوتیک، تولید رنگدانه، تشکیل بیوفیلم و تولید فاکتورهای بیماری‌زایی را در باکتری‌ها تنظیم می‌کند. در سال‌های اخیر ژن‌های مختلفی در باکتری‌های آنتاگونیست شناسایی شده‌اند که عامل تجزیه مولکول‌های پیام‌رسان باکتری‌ها به‌ویژه اسیل هموسرین لاکتون بوده و در حدنصاب حسگری باکتری‌ها اختلال ایجاد می‌کنند. در این پژوهش ژن *aiiA* مربوط به باکتری *Bacillus* sp. DMS133 توسط آغازگرهای اختصاصی aiiA-7F و aiiA-7R از همسانه محتوای این ژن تکثیر شد. به‌منظور بررسی اثر ژن *aiiA* در گیاه سیب‌زمینی، دستواره حاوی ژن *aiiA* تحت پروموتور دائمی CaMV35S در ناقل دوگانه pBI121 تهیه شد. این دستواره با روش شوک دمایی به استرین *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 منتقل و در روش کشت گره و میانگره در محیط کشت تغییر یافته MLS به گیاه سیب‌زمینی رقم اگریا انتقال یافت. در آزمون زیست‌سنجی، گیاهان تراریخته مایه‌زنی شده با سوسپانسیون باکتری *Pectobacterium carotovorum*، شدت بسیار پایینی از علائم بیماری پوسیدگی نرم را بعد از پنج روز در مقایسه با گیاه شاهد نشان دادند. این گیاهان تا چهار روز بعد از مایه‌زنی همچنان سالم و بدون علائم رشد کردند. به نظر می‌رسد که بیان AiiA لاکتوناز در سیب‌زمینی باعث بروز مقاومت در مراحل ابتدای شروع بیماری پوسیدگی نرم شده است اما با ادامه یافتن شرایط وقوع بیماری، گیاهان تراریخته نیز دچار آلودگی شدند و مراحل اولیه بیماری را به‌صورت علائم زردی و کم رشدی بدون پوسیدگی نرم نشان دادند.

کلید واژه‌ها: لاکتوناز، سیب‌زمینی، مقاومت به پوسیدگی نرم، Bacillus sp. DMS133

مقدمه

پوسیدگی نرم باکتریایی یکی از مهم‌ترین و فراوان‌ترین بیماری‌های باکتریایی است که به گیاهان دارای بافت ذخیره‌ای (همچون سیب‌زمینی، هویج، پیاز و تربچه)، سبزیجات با ساقه و برگ‌های آبدار (کرفس، کاهو، اسفناج و کلم)، گیاهان زینتی از جمله دیفن باخیا، سیکلامن، سنبل و همچنین سبزیجات دارای میوه گوشتی (گوجه‌فرنگی، بادمجان، خیار و کدو) حمله می‌کند (Agrios, 2005). در این بیماری مقدار زیادی آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلول گیاهی توسط باکتری‌های بیمارگر تولید شده و باعث پوسیدگی نرم و لهیدگی بافت‌های گیاهی می‌شود. پکتینازها مهم‌ترین آنزیم‌هایی هستند که در توسعه بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی نقش دارند. این آنزیم‌ها با تجزیه پکتین دیواره سلولی و تیغه میانی گیاه به زیر واحدهای کوچک‌تر، آن‌ها را به داخل سلول باکتری منتقل کرده و به‌عنوان

منبع غذایی مورد استفاده قرار می‌دهند (Agrios, 2005).

گونه‌های مختلف جنس پکتوباکتریوم بسیاری از محصولات جهان را تحت تأثیر قرار می‌دهند و در نواحی استوایی تا معتدل پراکنش دارند (Toth and Brich, 2006). گونه‌ی *Pectobacterium carotovorum* دامنه میزبانی بسیار وسیعی دارد و طیف بسیار وسیعی از محصولات کشاورزی را هم در مناطق معتدل و هم مناطق نیمه گرمسیری آلوده می‌سازد (Gardan et al., 2003؛ Toth et al., 2003).

باکتری‌ها دارای ارتباطات پیچیده بین سلولی هستند و از این طریق، رفتارهای دسته‌جمعی و هماهنگ درون جمعیت بروز می‌دهند. این پدیده که حدنصاب حسگری یا Quorum Sensing (QS) نامیده می‌شود، نتیجه‌ی تولید و انتقال مولکول‌های کوچک پیام‌رسان، به نام خود القاء شونده یا کورومون، بین سلول‌های باکتری‌هاست. حدنصاب حسگری فعالیت‌های مهمی مانند تولید آنتی‌بیوتیک، تحرک و شناگری، تولید بیوفیلم، تولید و ترشح فاکتورهای بیماری‌زایی و انتقال ژن را در باکتری‌های تنظیم می‌کند (Smith et al., 2006؛ Williams et al., 2007). در باکتری بیماری‌زای گیاهی *P. carotovorum*، تولید فاکتورهای بیماری‌زایی مانند آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی و هارپین‌ها از طریق مکانیسم حدنصاب حسگری وابسته به مولکول‌های سیگنالی از نوع اسید هموسرین لاکتون (3-Oxo-C_6-HSL و C_8-HSL) تنظیم بیان می‌شود (Barnard and Salmond, 2007؛ Whitehead et al., 2001).

از آنجا که مصرف بی‌رویه سموم مسی و آنتی‌بیوتیک‌ها علیه بیماری‌های باکتریایی باعث بروز نژادهای مقاوم عوامل بیماری‌زا شده است، استفاده از کنترل بیولوژیک می‌تواند راه‌گشای مشکلات پیش روی مبارزه با بیمارگرهای گیاهی باشد (Koh et al., 2013). یکی از جدیدترین مکانیسم‌های شناخته شده در این زمینه، توانایی برخی از باکتری‌های آنتاگونیست در تولید ترکیباتی است که قادر به سرکوب حدنصاب حسگری هستند. اصطلاح Quorum Quenching برای توصیف تمام فرایندهایی به کار می‌رود که بر ضد حدنصاب حسگری عمل می‌کنند (Dong et al., 2001). اختلال در حدنصاب حسگری با مکانیسم‌های مختلفی انجام می‌شود که شایع‌ترین آن‌ها، تجزیه آنزیمی مولکول‌های سیگنال‌دهنده درگیر توسط باکتری‌های آنتاگونیست است (Cirou et al., 2010). فراوان‌ترین آنزیم تجزیه‌کننده مولکول‌های سیگنال‌دهنده، آنزیم AiiA لاکتوناز است که با تجزیه مولکول اسید هموسرین لاکتون، خاصیت پیام‌رسانی این مولکول را از بین برده و مانع برقراری ارتباط بین باکتری‌های تولیدکننده آن می‌شود. ژن *aiiA* مسئول تولید آنزیم لاکتوناز و تجزیه‌کننده AHL در باکتری‌های جنس *Bacillus* و بسیاری دیگر از باکتری‌ها است (Faure and Dessaux, 2007).

یکی از استراتژی‌های سرکوب QS از طریق توانایی گیاه در تجزیه مولکول‌های سیگنالی با تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده AHL می‌باشد (Lade et al., 2014؛ Uroz et al., 2009). با مهندسی ژنتیک می‌توان شرایطی فراهم کرد که از همان ابتدای حضور بیمارگر روی میزبان، گیاه یا دفاع فعال انجام دهد یا از انجام فعالیت‌های اجتماعی بیمارگر جلوگیری نماید و در سیستم تنظیمی حدنصاب حسگری آن اختلال ایجاد کند. Fray (2002) و Toth and Brich (2006) گیاهان تراریخت توتون و سیب‌زمینی تولید کردند که توانایی تولید مقدار زیادی مولکول‌های سیگنال‌دهنده از نوع C_6-HSL یا 3-O-C_6HSL داشتند. به همین ترتیب ژن *Yen1* از *Yerssinia enterocolitica* و ژن *exp1* از *P. carotovorum* وارد گیاه سیب‌زمینی و توتون شد. هر چند که توتون تراریخت حاوی ژن *exp1*، مقاومت بالایی نسبت به پوسیدگی نرم نشان داد اما سیب‌زمینی‌های تراریخت حاوی ژن *Yen1* حساسیت بالا، حتی در غلظت پایین سلولی، به بیمارگر از خود نشان دادند. از طرف دیگر گیاهان تراریخت دیگری تولید شده که ژن تولیدکننده آنزیم تجزیه‌کننده AHL را در خود بیان می‌کنند. ژن کدکننده آنزیم لاکتوناز از باسیلوس *aiiA*،

در گیاه توتون و کلم بیان شده است (Dong et al., 2000؛ Koh et al., 2013). پروتئین‌های قابل حل در آب این گیاهان خاصیت تجزیه‌کنندگی 3-O-C_6HSL را نشان دادند که بیانگر بیان ژن *aiiA* در این گیاهان بود. زمانی که این گیاهان تراریخت با *P. carotovorum* مایه‌کوبی شدند، مقاومت نسبی نسبت به بیمارگر از خود نشان دادند.

هدف از انجام این پژوهش انتقال ژن *aiiA* (عامل تجزیه‌کننده مولکول‌های AHL) به گیاه سیب‌زمینی و بررسی توانایی آن در ایجاد مقاومت به باکتری *P. carotovorum* عامل بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها و پلاسمیدهای مورد استفاده

باکتری‌های *Pectobacterium carotovorum*، *Agrobacterium tumefaciens* نژاد LBA4404 و *Escherichia coli* DH5α حامل ژن *aiiA* از آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان و پلاسمید بیانی pBI121 حامل ژن گزارشگر *gus* از آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی اصفهان تهیه شدند.

تکثیر ژن *aiiA* از باکتری باسیلوس

ژن *aiiA* مسئول تولید آنزیم لاکتوناز و تجزیه‌کننده AHL در باکتری *Bacillus* sp. DMS133 است. این ژن با اندازه ۷۸۴ جفت باز قبلاً توسط Mahmoudi et al. (2013) جداسازی و در ناقل pTZ57R/T وارد و در باکتری *E. coli* DH5α همسانه‌سازی و سپس توالی‌یابی شد. در این پژوهش ژن تولیدکننده آنزیم لاکتوناز (*aiiA*) توسط آغازگرهای اختصاصی با استفاده پلاسمید جداسازی شده از همسانه فوق تکثیر شد:

aiiA-7F: 5'-ACGTCTCGAGGATCCAT*ATGACGATAAAGAAGCTT*
aiiA-7R: 5'-GCAGGATCCGTCGA*CTATATATATTCAGGGAA*

به دلیل این‌که این ژن قرار است در ناقل بیانی pBI121 همسانه‌سازی و در گیاه سیب‌زمینی بیان شود، توالی تشخیص و برش آنزیم‌های *Sac*I و *BamH*I در بالادست توالی آغازگرهای aiiA-7F و aiiA-7R قرار داده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرازی توسط آنزیم دی‌ان‌آ پلیمراز *pfu* در ۲۱ سیکل با شرایط دمایی: واسرشت‌سازی اولیه ۳ دقیقه در دمای ۹۵ °C، واسرشت‌سازی ۱ دقیقه در دمای ۹۵ °C، اتصال ۱ دقیقه در دمای ۵۰ °C، تکثیر ۱ دقیقه در دمای ۷۲ °C و تکثیر نهایی ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ °C انجام شد (Mahmoudi et al., 2013). در نهایت محصول واکنش روی ژل یک درصد آگارز تفکیک و بعد از مشاهده قطعه با اندازه ۷۸۴ جفت باز، این قطعه توسط کیت استخراج دی‌ان‌آ از ژل خالص‌سازی شد.

ساخت دستواره pBI121-aiiA (همسانه‌سازی ژن *aiiA* در پلاسمید pBI121)

در این آزمایش از پلاسمید pBI121 استفاده شد. این پلاسمید حاوی ژن گزارشگر *gus* (تحت پروموتر دائمی CaMV35S و ترمیناتور *nos*) و ژن گزینشگر *npt*II (با پروموتر و ترمیناتور nos) می‌باشد. برای آماده‌سازی ژن *aiiA* و قرار دادن آن در پلاسمید pBI121-KA، ابتدا با استفاده از آنزیم‌های *BamH*I و *Sac*I، ژن *aiiA* برش داده شد تا دو انتهای ژن مورد نظر جهت تلفیق در پلاسمید آماده شوند. سپس توسط همین آنزیم‌ها، ژن گزارشگر *gus* از پلاسمید pBI121 خارج گردید و واکنش اتصال بین pBI121 و ژن *aiiA* به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۰ °C انجام شد تا دستواره pBI121-aiiA حاصل شود. در مخلوط واکنش اتصال، ۴۰۰ نانوگرم پلاسمید برش یافته، یک میکروگرم ژن *aiiA* برش یافته، ۲ واحد آنزیم T4 دی‌ان‌آ لیگاز، ۱/۵ میکرولیتر بافر آنزیم ۱۰X و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل (تا حجم ۱۵ میکرولیتر) استفاده شد. بعد از اتمام واکنش اتصال و به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم، نمونه‌ها در دمای ۶۵ °C به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. در نهایت دستواره pBI121-aiiA با روش شوک حرارتی (Sambrook et al., 2001) به باکتری مستعد *A. tumefaciens* نژاد LBA4404 انتقال یافت. با

رشد همسانه‌ها روی محیط LB حاوی ۳۰ و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامیسین، انتقال پلاسمید یا دستواره (پلاسمید حاوی ژن مورد نظر) به باکتری تأیید شد. جهت اطمینان از وجود دستواره در اگروباکتریوم، استخراج پلاسمید در مقیاس کم انجام شد و از طریق واکنش PCR با آغازگرهای aiiA7F و aiiA7R وجود ژن و با آغازگرهای pBINN- 5'GAACAAGATGGATTGCACG و pBINP- 5'GAAGAACTCGTCAAGAAGG از نواحی درونی ژن *nptII*، (ژن ایجادکننده مقاومت به آنتی‌بیوتیک کانامایسین) وجود پلاسمید pBI121 تأیید گردید.

کشت بافت و مواد گیاهی

ریز غده‌های (مینی تیوبر) گیاه سیب‌زمینی رقم اگریا از دانشگاه اصفهان- گروه زیست‌شناسی تهیه شد. این رقم در شرایط آزمایشگاهی از طریق کشت جوانه (گره) و در محیط کشت موراشیگ اسکوگ تکثیر گردید. گیاهان در دمای ۲۲±۲°C و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی با شدت نور ۲۵۰۰ لوکس و هشت ساعت تاریکی رشد نمودند و هر چهار هفته یک‌بار در محیط MS واکشت می‌شدند.

انتقال دستواره‌ی pBI121-aiiA به گیاه سیب‌زمینی

به‌منظور انتقال ژن با واسطه‌گری اگروباکتریوم به گیاه سیب‌زمینی، از روش ریز نمونه گره و میانگره در محیط MLS تغییر یافته (اجزاء محیط: نمک‌های ماکرو و میکرو محیط MS، ویتامین‌های محیط MS، سولفات آدنین ۱۶ mg/l، Zeatin riboside ۱ mg/l، BAP ۰/۰۵ mg/l، ساکارز ۳۰ g) استفاده شد. تک کلونی باکتری اگروباکتریوم تومفسینس نژاد LBA4404 حاوی دستواره pBI121-aiiA در محیط LB مایع حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین، به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۲۸°C کشت گردید و با سرعت ۱۸۰ دوردر دقیقه تکان داده شد. مقدار دو میلی‌لیتر از باکتری رشد یافته به ۵۰ میلی‌لیتر محیط LB مایع جدید اضافه و در ۲۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۸°C گشت گردید تا OD_{600} سوسپانسیون باکتری به ۰/۶-۰/۷ برسد. سپس لوله‌های فالکون محتوی سوسپانسیون باکتری در ۴۰۰۰ دور در دقیقه (۱۷۰۰ g) به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند. فاز رویی به‌طور کامل حذف و رسوب باکتری در محیط کشت MS مایع حل گردید تا سوسپانسیون اگروباکتریوم به‌دست آید.

از گیاه سیب‌زمینی چهار هفته‌ای، قطعه‌های یک تا یک و نیم سانتی‌متری (به‌طوری‌که هر قطعه شامل یک گره باشد) جدا گردید. این قطعات توسط سوزن زخمی شده و به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون اگروباکتریوم قرار گرفتند. سپس ریزنمونه‌ها با کاغذ صافی خشک شده و به مدت دو تا سه روز در محیط MLS جامد و دمای ۲۶°C در تاریکی نگهداری شدند. بعد از این مدت ریزنمونه‌ها در آب (حاوی آنتی‌بیوتیک سفاتوکسیم) شسته شده و در محیط MLS جامد حاوی آنتی‌بیوتیک‌های (۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) در دمای ۲۲°C و شرایط ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار گرفتند تا جوانه‌هایی به طول پنج تا شش سانتی‌متر از آن‌ها خارج شود. پس از آن جوانه‌ها به محیط MS جامد حاوی آنتی بیوتیک‌های (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) منتقل شدند تا گیاه تراریخت ظاهر گردد.

تأیید مولکولی گیاهان تراریخت

به‌منظور تأیید انتقال ژن از طریق PCR، واکنش PCR با آغازگرهای aiiA7F و aiiA7R روی DNA ژنومی استخراج شده از گیاهان تراریخت و شاهد صورت گرفت. جهت بررسی بیان ژن *aiiA* در گیاهان تراریخت سیب‌زمینی، واکنش RT-PCR انجام شد. بدین منظور ابتدا توسط کیت استخراج RNA (شرکت Roche)، RNA کل گیاهان تراریخت و غیرتراریخت، استخراج و پس از تیمار با DNase، cDNA آن‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن و طبق روش گفته شده در همان کیت، ساخته شد. در مرحله بعد واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن *aiiA* روی cDNA حاصل از گیاهان تراریخت و غیر تراریخت، انجام شد.

ارزیابی واکنش گیاهان تراریخت با pBI121-aiiA نسبته به باکتری *Pectobacterium carotovorum* عامل پوسیدگی نرم

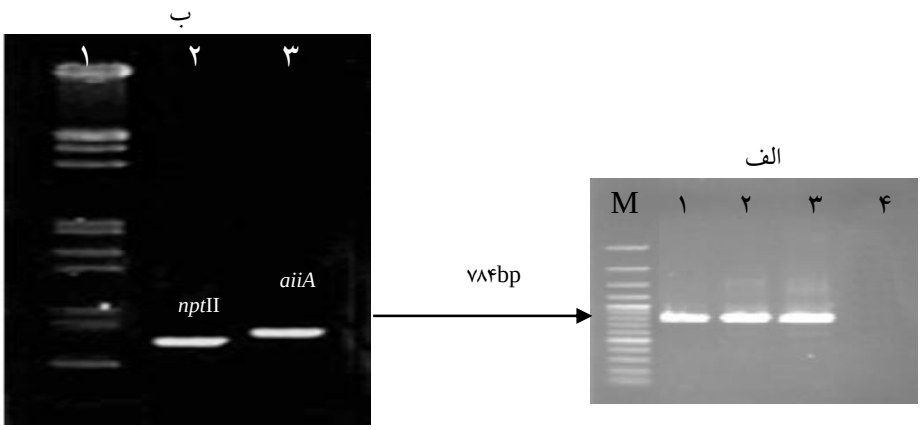
گیاهان تراریخت در شرایط مناسب بیماری (دمای ۳۰ °C و رطوبت نسبی ۹۰ درصد) در انکوباتور گیاهی قرار داده شدند و ۵ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری *P. carotovorum* با رقت 10^6 CFU/ml توسط سرنگ درجه ۳۰ (سرنگ تزریق انسولین) به محل اتصال دمبرگ به ساقه سیب‌زمینی مایه‌زنی شدند. سپس گیاهان آلوده شده به مدت ۵-۳ روز با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی ۸ وساعت تاریکی در انکوباتور گیاهی نگهداری شدند و میزان پیشرفت بیماری بر اساس بروز علائم پوسیدگی نرم بررسی شد. در این ارزیابی تغییر رنگ و زرد شدن برگ‌ها، پژمردگی و میزان پوسیدگی نرم در محل تزریق به‌صورت چشمی مورد بررسی قرار گرفت. گیاهان فاقد ژن *aiiA* به‌عنوان شاهد استفاده شدند.

نتایج

فعالیت تجزیه‌کنندگی مولکول‌های سیگنال‌دهنده در باکتری *Bacillus* sp. DMS133 مربوط به تولید آنزیم لاکتوناز است که قبلاً توسط Mahmoudi et al. (2013) به اثبات رسیده است. همان‌طور که در شکل ۱-الف مشاهده می‌شود ژن *aiiA* با اندازه ۷۸۴ جفت باز توسط آغازگرهای aiiA-7F و aiiA-7R و آنزیم *pfu* پلیمراز تکثیر شد.

انتقال pBI121-aiiA به *Agrobacterium tumefaciens* و تأیید وجود دستواره‌ها در باکتری از طریق PCR

دستواره مورد نظر از طریق شوک حرارتی به باکتری *A. tumefaciens* LB4404 انتقال یافت و بعد از سه روز انکوباسیون پتری‌دیش‌ها در دمای ۲۸ °C، کلونی‌های اگروباکتریوم تراریخت روی محیط کشت مشاهده شد. جهت تأیید تراریختی باکتری‌ها و وجود ژن مورد نظر در آن‌ها، از طریق PCR با آغازگرهای aiiA-7R و aiiA-7F ژن *aiiA* به طول ۷۸۴ جفت باز، همچنین جهت تأیید پلاسمید pBI121 در آن‌ها ژن *nptII* نیز با آغازگرهای pBINN و pBINP به طول ۷۵۰ جفت باز تکثیر گردید (شکل ۱ ب).



شکل ۱- الف: تکثیر ژن *aiiA* توسط آنزیم *Pfu* DNA پلیمراز در باکتری *Bacillus* sp. DMS133. M : نشانگر اندازه ۱۰۰bp plus؛ ۱ و ۲: باسیلوس DMS_{133}، ۳: *E.coli* DH5α حاوی ژن *aiiA* از باکتری باسیلوس A24 و ٤: چاهک فاقد DNA الگو. ب: تکثیر ژن‌های *aiiA* (۷۸٤ bp) و *nptII* (۷۵۰ bp) در اگروباکتریوم حاوی دستواره (ژل آگارز ۱ درصد TAE)؛ ۱- نشانگر اندازه III (Fermentas Co.)؛ ۲- ژن *nptII* از pBI121، ۳- ژن *aiiA* مربوط به کلون‌های اگروباکتریوم رشد یافته روی محیط کشت LB حاوی کانامیسین و دارای دستواره pBI121-aiiA

Figure 1- A: PCR amplification of *aiiA* gene by *pfu* DNA polymerase; M: Ladder 100 bp, 1and 2: *Bacillus* sp. DMS133, 3: *Escherichia coli* DH5α containing *aiiA* gene from *Bacillus* A24, 4: Blank, well without DNA template. B: Amplifying *aiiA* and *nptII* genes from transformed *A. tumefaciens* (1% agarose gel, TAE buffer); M: Ladder III (Fermentas Co.), 1: *nptII* gene from pBI121, 2: *aiiA* gene from pBI121-aiiA

کشت بافت سیب‌زمینی و انتقال دستواره pBI121-aiiA به آن

گیاه سیب‌زمینی رقم اگریا از طریق کشت گره و میانگره (ساقه‌های سیب‌زمینی برش یافته به طول دو سانتی‌متر حاوی یک یا دو گره) روی محیط کشت MLS تغییر یافته تکثیر گردید و بعد از چهار هفته برای انتقال ژن آماده شد. ریزنمونه‌ها پس از تلقیح با اگروباکتریوم به محیط انتخابی (۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) تغییر یافته MLS انتقال یافتند. در این محیط، مقدار هورمون BAP ده برابر بیشتر از محیط MLS بود. جوانه‌های دوم و سوم از محل گره‌ها رشد نمودند و پس از دو هفته روی میانگره‌ها کالوس زیادی تشکیل شد. کالوس‌ها برای باززایی به محیط کشت MLS تغییر یافته انتخابی انتقال یافتند و پس از چهار هفته کالوس‌ها، جوانه زدند و ساقه‌ها پدیدار شدند (شکل ۲ الف، ب، ج). در نهایت برای ریشه‌زایی ساقه‌ها به محیط کشت MS انتخابی (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم) منتقل شدند. تعداد زیادی از آن‌ها ریشه داده و به گیاهان کامل تبدیل شدند که با تأیید مولکولی PCR، تراریخت بودن آن‌ها ثابت شد.

تأیید مولکولی گیاهان سیب‌زمینی تراریخت از طریق PCR

بدین منظور ابتدا DNA کل گیاهان تراریخت و شاهد غیرتراریخت استخراج گردید و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی aiiA7F و aiiA7R ژن *aiiA* با اندازه ۷۸۴ جفت باز در روش PCR تکثیر گردید (شکل ۲ ی). این موضوع نشان‌دهنده آن است که حداقل یک نسخه از ژن *aiiA* در ژنوم گیاهان تراریخت، جای گرفته است. همچنین با انجام واکنش PCR با آغازگرهای ژن *nptII* روی DNA گیاهان تراریخت، انتقال ژن‌های *aiiA* در پلاسمید pBI121-aiiA به گیاهان سیب‌زمینی تأیید شد و نوار ۷۵۰ نوکلئوتیدی روی ژل آگارز مشاهده گردید. جهت بررسی رونویسی ژن انتقال یافته به سیب‌زمینی، RNA کل گیاهان تراریخت و شاهد استخراج و پس از ساخت cDNA آن‌ها، واکنش PCR با آغازگرها aiiA7R و aiiA7F در گیاهان تراریخت و شاهد انجام گرفت. استخراج RNA کل و ساخت cDNA توسط کیت (شرکت Roche) انجام شد. تکثیر قطعات DNA به طول ۷۸۴ نشان‌دهنده وجود RNA ژن *aiiA* در گیاهان تراریخت می‌باشد و انجام عمل نسخه‌برداری را در آن‌ها تأیید می‌کند (شکل ۲ د).

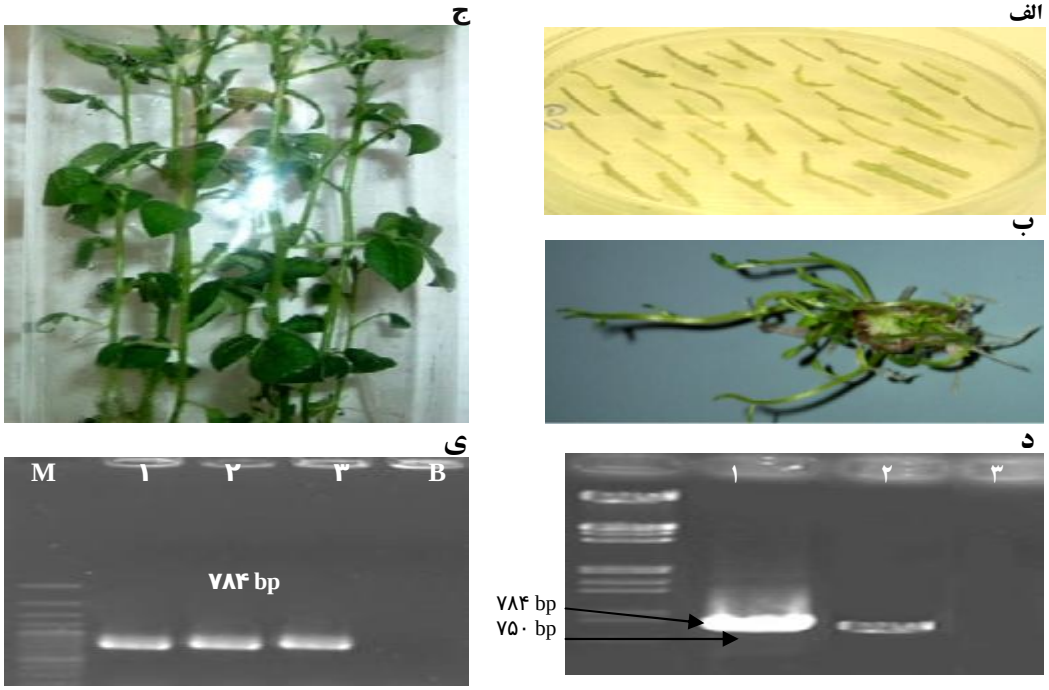
تأیید فیزیولوژیکی گیاهان تراریخت در شرایط بیماری

به‌منظور بررسی تاثیر ژن تجزیه کننده مولکول‌های سیگنال‌دهنده باکتری بر واکنش‌های گیاه سیب‌زمینی در برابر عامل بیماری‌زای پوسیدگی نرم، گیاهان تراریخت با ژن *aiiA* در آزمون تست بیماری‌زایی با باکتری *P. carotovorum* آلوده شدند. در شرایط مناسب بیماری (دمای ۳۰°C و رطوبت نسبی ۹۰-۸۰ درصد) گیاهان تراریخت و شاهد مایه‌زنی شده با باکتری، به مدت یک هفته در انکوباتور گیاهی با دوره ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. ۲۴ ساعت بعد از مایه‌زنی گیاهان شاهد (غیرتراریخت) با باکتری علائم زردی، پژمردگی و سوختگی نوک برگ‌ها ظاهر شد که با گذشت زمان، علائم پوسیدگی نرم در محل آلودگی مشاهده شد. این گیاهان ۷۲ ساعت بعد از آلوده‌سازی به‌طور کامل دچار مرگ شدند و از بین رفتند. ولی در گیاهان تراریخت ظهور علائم بیماری با سرعت بسیار کمتری شروع شد. این گیاهان در ۴ روز بعد از آلوده‌سازی هیچ‌گونه علائم بیماری پوسیدگی نرم را نشان ندادند. اما با گذشت زمان به تدریج علائم زردی و پژمردگی در آن‌ها ظاهر شد. این گیاهان به مدت یک هفته نگهداری شدند و بعد از این مدت دچار مرگ شدند. گیاهان شاهد تراریخت و غیر تراریخت مایه‌زنی شده با آب مقطر استریل بعد از یک هفته همچنان به رشد خود ادامه دادند و هیچگونه علائم کم رشدی و

زردی نشان ندادند. با توجه به نتایج این تحقیق به نظر می‌رسد که ژن *aiiA* در گیاهان تراریخت سیب‌زمینی مسئول مقاومت نسبی سیب‌زمینی در برابر عامل پوسیدگی نرم بوده است و بیان این ژن در گیاه سیب‌زمینی باعث جلوگیری از بیان اولیه ژن‌های بیماری‌زایی پکتوباکتریوم در زمان آلودگی شده است.

بحث

آنزیم AiiA لاکتوناز یک متالوهیدرولاز از خانواده بتالاکتاماز و یکی از آنزیم‌های مهم در تجزیه مولکول‌های سیگنال‌دهنده و مختل‌کننده حدنصاب حسگری باکتری‌هاست (Jafra et al., 2006). این آنزیم توسط ژن *aiiA* تولید و عامل تجزیه‌کننده مولکول‌های اسیل هموسرین لاکتون باکتریایی است و تاکنون در بسیاری از جنس‌های باکتریایی مانند *Bacillus*، *Arthrobacter* و *Mesorhizobium* مورد شناسایی قرارگرفته است (Faure and Dessaux, 2007). توالی کدشونده به پروتئین (ORF) این ژن شامل ۷۵۰ نوکلئوتید است که یک پروتئین فعال با ۲۵۰ اسید آمینه کد می‌کند (Dong et al., 2000). در این مطالعه، این قطعه ژنی از همسانه حاوی این ژن تکثیر شد (Mahmoudi et al., 2013).



شکل ۲- ریزنمونه‌های سیب‌زمینی آلوده شده با باکتری *A. tumefaciens* LB4404 حامل دستواره pBI121-aiiA روی محیط کشت MLS تغییر یافته حاوی ۵۰ میلی‌گرم‌درلیتر کانامیسین. الف و ب: کشت گره و میانگره، تشکیل کالوس روی میانگره و جوانه‌زدن کالوس‌ها؛ ج: باززایی کالوس‌های تراریخت سیب‌زمینی با pBI121-aiiA. د: تأیید واکنش انتقال pBI121-aiiA و تکثیر ژن‌های *aiiA* و *nptII* توسط آغازگرهای اختصاصی. M: نشانگر اندازه ۱۰۰bp؛ ۱- ژن *aiiA*؛ ۲- ژن *nptII*، ۳- گیاه شاهد. ی: واکنش RT-PCR روی نمونه‌های سیب‌زمینی تراریخت با pBI121-aiiA و تکثیر ژن *aiiA* (ژل آگارز ۱ درصد TAE)؛ M: نشانگر اندازه ۱۰۰bp؛ ۱، ۲ و۳- ژن *aiiA* تکثیر شده در واکنش RT-PCR گیاه تراریخت ٤- گیاه شاهد

Figure 2- Inoculated potato explants with *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 harboring pBI121/aiiA on modified MLS medium containing 50 mg/l Kanamycin. A and B: culturing node and internode explants and callus formation; C: regeneration of transformed potato explants with pBI121-aiiA; D: confirmation of transgenic potato plants and amplification of *aiiA* and *nptII* genes by specific PCR primers, M: Ladder (Fermentas Co.); 1: *aiiA* gene, 2: *nptII*; B: non transgenic plant; E: RT-PCR results on transgenic plants (Agarose gel 1%, TAE buffer); M: DNA Ladder 100bb, 1-3: *aiiA* gene from transformed potatoes, B: non transgenic potato plant

یکی از اهداف مهم این پژوهش، بررسی امکان بیان ژن *aiiA* در گیاه سیب‌زمینی و تأثیر آن بر بیماری‌زایی باکتری پکتوباکتریوم روی گیاهان تراریخت سیب‌زمینی می‌باشد. بدین منظور ژن *aiiA* در پلاسمید pBI121 همسانه‌سازی شد و با روش شوک حرارتی به باکتری *Agrobacterium tumefaciens* نژاد LB4404 منتقل شد. سپس از طریق کشت بافت گره و میانگره سیب‌زمینی در محیط تغییر یافته MLS به گیاه سیب‌زمینی انتقال یافت. نتایج مولکولی در ردیابی و تکثیر ژن *aiiA* از طریق استخراج DNA کل گیاه، استخراج RNA و انجام RT-PCR در سیب‌زمینی‌های تراریخت بیانگر استقرار این ژن در گیاهان تراریخته و بیان آن می‌باشد. در آزمون بیماری‌زایی، گیاهچه‌های تراریخت چهار هفته‌ای سیب‌زمینی با سوسپانسیون باکتری *P. carotovotum* با غلظت 10^6 CFU/ml مایه‌زنی شدند و به مدت یک هفته در شرایط مناسب بیماری نگهداری شدند. در این آزمایش، گیاهچه‌های غیرتراریخت سیب‌زمینی بلافاصله بعد از آلوده‌سازی علائم بیماری را نشان دادند و دچار مرگ شدند اما گیاهچه‌های تراریخت با ژن *aiiA* در ابتدای آلودگی در برابر بیماری مقاومت کرده و در ۴ روز اول آلوده سازی هیچ‌گونه علائمی از بیماری را نشان ندادند. اما با گذشت زمان با افزایش جمعیت باکتری بیماری‌زا در بافت‌ها آلوده، علائم بیماری ظاهر شدند و گیاهان تراریخت با سرعت کمتر و در مدت زمان طولانی‌تری دچار مرگ شدند.

فرایند بیماری‌زایی باکتری *P. carotovorum* و تولید علائم بیماری، وابسته به تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی می‌باشد که توسط سیستم حدنصاب حسگری کنترل می‌شوند (Mahmoudi et al., 2011؛ Toth et al., 2003). در ابتدای مرحله بیماری‌زایی که جمعیت این باکتری پایین است، حجم کمتری از این آنزیم‌ها تولید می‌شود که باعث دستیابی بیمارگر به مواد غذایی و تکثیر سریع آن می‌شود. بیان ژن *aiiA* در سلول‌های محل آلودگی در گیاهان تراریخت موجب تولید آنزیم AHL لاکتوناز می‌شود. این آنزیم باعث تجزیه مولکول‌های سیگنال‌دهنده باکتری در محل آلودگی و خاموشی سیستم حدنصاب حسگری آن می‌شود (Lade et al., 2014). همین امر از تولید آنزیم‌های پوسیدگی نرم در ابتدای آلودگی جلوگیری می‌کند. آنزیم لاکتوناز یک آنزیم داخل سلولی است که توسط سیستم‌های تراوشی باکتری تولیدکننده به خارج از سلول منتقل شده و فعالیت خارج سلولی خود را انجام می‌دهد (Liu et al., 2011). گیاهان برخلاف باکتری‌ها فاقد سیستم تراوشی هستند و به نظر می‌رسد آنزیم لاکتوناز تولید شده در گیاه تراریخت به راحتی نتواند به فضای بین سلول گیاه منتقل شود. به همین دلیل تولید لاکتوناز در سیب‌زمینی تراریخت به‌طور کامل باعث ایجاد مقاومت به پوسیدگی نرم نمی‌شود.

هرچند که انتقال ژن مختل‌کننده حدنصاب حسگری به گیاه سیب‌زمینی به‌طور کامل موجب مقاومت گیاهان تراریخت به عامل پوسیدگی نرم نشد اما حضور این ژن باعث تاخیر فرایندهای بیماری‌زایی در گیاهچه‌های مورد بررسی در این پژوهش شد. باکتری *P. carotovorum* از عوامل مهم پوسیدگی نرم در بخش‌های ذخیره‌ای بخصوص غده‌های سیب‌زمینی می‌باشد. به نظر می‌رسد حضور آنزیم لاکتوناز در این غده‌های حاصل از گیاهان تراریخت بتواند مانع از گسترش پوسیدگی نرم در انبار شود که البته صحت این امر نیاز به انجام آزمایش تکمیلی روی غده‌های تراریخت دارد.

سپاس‌گزاری

این پژوهش با حمایت‌های مالی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان) و در قالب طرح پژوهشی انجام گرفته است که بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی این واحد قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. Academic Press, San Diego, CA. P. 976.

Barnard, A.M., and Salmond, G.P. 2007. Quorum sensing in *Erwinia* species. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387: 415-423.

Cirou, A., Uroz, S., Chapelle, E., Latour, N.O., Faure, D., and Dessaux, Y. 2010. Quorum sensing as a target for novel biocontrol strategies directed at *Pectobacterium*. Recent Development and Management of Plant Disease, 1: 121-131.

Dong, Y.H., Wang, L.H., Xu, J.L., Zhang, H.B., Zhang, X.F., and Zhang, L.H. 2001. Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. Nature, 411: 813-817.

Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z., and Zhang, L.H. 2000. AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. Proceeding of National Academy Science of USA, 97: 3526-3531.

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

Fray, R.G. 2002. Altering plant-microbe interaction through artificially manipulating bacterial quorum sensing. Annals of Botany, 89: 245-253.

Gardan, L., Gouy C., Christen, R., and 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.

Jafra, S., Jalink, H., Vander-Schoor, R., and Vander-Wolf, J.M. 2006. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *Carotovorum* strains show diversity in production of and response to *N*-acyl homoserine lactones. Journal of Phytopathology, 154: 729-739.

Koh, Y.J., Park, J.I., Ahmed, N.U., Jung, H.J., Kang, K.K., Hur, Y.K., Lim, Y.P., and Nou, I.S. 2013. Enhancement of resistance to soft rot (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) in transgenic *Brassica rapa*. European Journal of Plant Pathology, 136: 317-322.

Lade, H., Paul, D., and Kweon, J.H. 2014. *N*-Acyl Homoserine Lactone-mediated quorum sensing with special reference to use of quorum quenching bacteria in membrane biofouling control. BioMed Research International, 24: 1-25.

Liu, X., Jia, J., Popat, R., Ortori, C.A., Li, J., Diggle, S.P., Gao, K., and Camara, M. 2011. Characterization of two quorum sensing systems in the endophytic *Serratia plymuthica* strain G3: differential control of motility and biofilm formation according to life-style. BMC Microbiology, 11: 26-38.

Mahmoudi, E., Hasanzadeh, N., Sayed-Tabatabaei, B.E., and Venturi, V. 2011. Virulence attenuation of *Pectobacterium carotovorum* using N-acylhomoserin lactone degrading bacteria isolated from potato rhizosphere. The Plant Pathology Journal, 27: 242-248.

Mahmoudi, E., Naderi, D., and 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.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. P. 876.

Smith, D., Wang, J.H., Swatton, J.E., Davenport, P., Price, B., Mikkelsen, H., Stickland, H., Nishikawa, K., Gardiol, N., Spring, D.R., and Welch, M. 2006. Variations on a theme: diverse N-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing mechanisms in gram-negative bacteria. Science Progress, 89: 167-211.

Toth, I.K., and Birch, P.R. 2006. Rotting softly and stealthily. Current Opinion of Plant Biology, 8: 424-429.

Toth, I.K., Bell, K.S., Holeva, M.C., and Birch, P.R.J. 2003. Soft-rot *Erwina*: from genes to genomes. Molecular Plant Pathology, 4: 17-30.

Uroz, S., Dessaux, Y., and Oger, P. 2009. Qourum sensing and Qourum quenching: the Yin and Yang of bacterial communicatio. Chemical and Bio Chemical, 10: 205-216.

Whitehead, N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J., and Salmond, G.P. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiological Review, 25: 365-404.

Williams, P., Winzer, K., Chan, W.C., and Camara, M. 2007. Look who’s talking: communication and quorum sensing in the bacterial world. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 362: 1119-1134.

Expression of *aiiA* gene in potato and its effect on the control of bacterial soft rot disease

E. Mahmoudi[1]* and D. Naderi[2]

1. ***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Khorasgan, Iran (e.mahmoudi@khuisf.ac.ir)
2. Assistant Professor, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasgan) Branch, Khorasgan, Iran

Received: 19 April 2016 Accepted: 10 December 2016

Abstract

Quorum sensing is a unique cell-cell communication of bacteria with production of diffusible small signal molecules such as acyl-homoserine lactones (AHLs). This phenomenon regulates the important functions including motility, antibiotic and pigment production, biofilm formation and production of virulence determinants in many bacteria. A potential *aiiA* homologue gene from *Bacillus* sp. DMS133 was PCR-amplified using specific PCR primers aiiA-7 F and aiiA-7R. To study the effect of *aiiA* expression in the potato plant, the *aiiA* gene was sub-cloned into binary vector, pBI121, under the control of the constitutive CaMV35S promoter to give pBI121/aiiA. The resulting plasmid was heat/shock transformed into *Agrobacterium tumefaciens* LB4404 and introduced into potato explants through the node and internode culture in modified MLS medium. In bioassay, the modified genetically potato plants were inoculated with *Pectobacterium carotovorum* suspension at 10^6 CFU. The results suggested that the expression of AiiA lactonase in the potato plant caused moderate resistance against soft rot bacterium. Transgenic plants showed slightly soft rot disease symptoms at five days after inoculation, while the wild type plant showed severe symptoms. Four days after inoculation, transgenic plants still grew a healthy and without symptoms, and after this period, they showed yellowing with low growth symptoms. It seems that lactonase expression in potato causes resistance against the beginning stage of bacterial infections. However, with continuing disease conditions, transgenic plants also suffered infection and the early stage symptoms (without soft rot) of disease was observed.

Keywords: Lactonase, Potato, Resistance to soft rot, Bacillus sp. DMS133