

## بررسی ارتباط برخی از فاکتورهای بیماری‌زایی با توان هسته یخ در استرین‌های *Pseudomonas syringae* جدا شده از درختان میوه هسته‌دار

الهه طاهری<sup>۱</sup>، سعید طریقی<sup>۲\*</sup> و پرینا طاهری<sup>۳</sup>

۱ و ۲. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیاران، گروه گیاه‌پزشکی،

دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۲۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۸/۲۷)

### چکیده

پدیده حد نصاب احساس یکی از پدیده‌های کنترل‌کننده تولید فاکتورهای مؤثر در بیماری‌زایی برخی از باکتری‌ها است، اما ارتباط توانایی ایجاد هسته یخ در باکتری *P. syringae* که یکی از فاکتورهای مؤثر در تشدید بیماری است، با این پدیده مشخص نشده است. به منظور بررسی آن، در بهار ۱۳۹۲، ۲۴۸ نمونه (شامل برگ و شکوفه) از سرشاخه درختان میوه هسته‌دار استان خراسان رضوی، جمع‌آوری شد. باکتری‌های مولد هسته یخ، شناسایی شدند و از میان آنها جدایه‌های متعلق به گونه *P. syringae* با استفاده از آزمون‌های لوبات (LOPAT) تشخیص داده شدند. از میان فاکتورهای مؤثر بر بیماری‌زایی سه فاکتور تحرک، حساسیت به پراکسید هیدروژن و تولید پایووردین بررسی شدند. میزان تحرک در جدایه‌هایی که قدرت هسته یخ زیادی داشتند، به‌طور معناداری بیشتر از جدایه‌هایی بود که به عنوان هسته یخ ضعیف، شناسایی شدند. اختلاف معناداری در رابطه با حساسیت به پراکسید هیدروژن و تولید پایووردین در میان جدایه‌های قوی و ضعیف هسته یخ، مشاهده نشد. هموسرین لاکتون موجود در شش جدایه انتخاب شده از *P. syringae*‌های مربوط به گروه‌های مختلف هسته یخ، جداسازی و با استفاده از بیوسنسور *Chromobacter violaceum* CV026، روی صفحه کروماتوگرافی (Thin-layer Chromatography) ردیابی شدند. نتایج ما ارتباط مستقیمی بین قدرت هسته یخ و میزان تولید هموسرین لاکتون‌ها را در باکتری *P. syringae* نشان داد و ثابت کرد جدایه‌هایی که تحرک بیشتری دارند، قدرت هسته یخ بیشتری نیز دارند.

**واژه‌های کلیدی:** باکتری، پدیده حد نصاب احساس، هسته یخ، هموسرین لاکتون.

### مقدمه

سطوح برگی حاوی توده عظیمی از جمعیت‌های باکتریایی‌اند که اپی‌فیت نامیده می‌شوند. بیشتر باکتری‌های بیمارگر گیاهی مثل *P. syringae* قبل از ایجاد بیماری، سطح گیاه را کلنیزه می‌کنند (Beattie & Lindow, 1995; Lindow & Brandl, 2003; Hirano & Upper, 2000). احتمال ایجاد بیماری روی

گیاهان با اندازه جمعیت اپی‌فیتی باکتری‌های بیمارگر ارتباط نزدیکی دارد (Kennedy et al., 1992). دیگر باکتری‌های مضر مثل باکتری‌های مولد هسته یخ نیز در سطح گیاهان به فراوانی حضور دارند. از طرفی، باکتری‌های غیر هسته یخ می‌توانند با رقابت مانع افزایش جمعیت باکتری‌های مولد هسته یخ شوند (Lindow & Brandl, 2003). بنابراین فاکتورهای مؤثر

خاموشی سری خاصی از ژن‌ها می‌شود (Von-Bodman *et al.*, 2003; Elasmri *et al.*, 2001; Pierson *et al.*, 1998b)، اغلب این ژن‌ها در بیماری‌زایی در فاز اپی‌فیتی باکتری‌ها روی گیاهان سالم (Quinones *et al.*, 2004; 2005) و ارتباط بین باکتری و گیاه (Morello *et al.*, 2004; Pierson *et al.*, 1998a;b) دخیل هستند.

هنگامی که جمعیت‌های باکتریایی برای زندگی در یک نیچ اکولوژیک بیش از حد زیاد شود، سیستم Quorum sensing به سلول‌های باکتری اجازه می‌دهد به واسطه حرکت توده‌ای (Swarming) منتشر گردند (Whitehead *et al.*, 2001). با توجه به بررسی‌هایی که روی باکتری *P. aeruginosa* انجام گرفته، در محلی که میزان آهن فراوان باشد، حرکت توده‌ای (Swarming) کاهش می‌یابد. در نتیجه، در شرایطی که مواد غذایی کم باشد، یا در دسترس نباشد، تولید بیوسورفاکتانت‌ها و Swarming تحریک می‌شود. در این حالت باکتری ترجیح می‌دهد به جای استقرار و تشکیل بیوفیلم، حرکت کند و نیچ اکولوژیک دیگری با مواد غذایی مناسب‌تر پیدا کند (Deziel *et al.*, 2003; Shrouf *et al.*, 2006). Redfield (2002)، بیان کرد که تنظیم حرکت به واسطه مولکول‌های سیگنال می‌تواند اثبات کند که درک ساختارهای فیزیکی محیط مفیدتر از درک حضور دیگر باکتری‌ها است. به‌طور کلی، وجود تحرک در باکتری‌ها فاکتور بسیار مهمی است، زیرا برخی جدایه‌ها بدون این ویژگی قادر به ایجاد بیماری و نفوذ به میزبان نیستند.

در شرایط کمبود آهن بیشتر میکروارگانیسم‌ها سیدروفور و گیرنده‌های آهن را در سطح غشای سلولی تولید می‌کنند (Loper & Neilands, 1986; Buyer, 1991). گونه‌های سودوموناس معمولاً سیدروفورهای فلورسنت سبز مایل به زرد (پایوردین یا سودوباکتین) تولید می‌کنند که قادرند آهن را در مناطقی که فراوانی آن بسیار اندک است، جذب کنند (Loper & Buyer, 1991). معمولاً میزان آهن روی بیشتر گیاهان ناچیز است (Loper & Lindow, 1994) و پایوردین می‌تواند با دریافت این عنصر از محیط، مانع رشد سلول‌های اطراف شود؛ در نتیجه به عنوان

بر اندازه این جمعیت‌های باکتریایی در تعیین سلامت گیاهان اهمیت زیادی دارند.

گرچه باکتری‌ها میکروارگانیسم‌هایی تک‌سلولی‌اند، اغلب رفتارهای گروهی نشان می‌دهند. در بیوفیلیم‌ها، سلول‌های منفرد موجود در قسمت‌های مختلف، ممکن است فعالیت‌های متفاوتی داشته باشند. در نتیجه، این نظریه شکل می‌گیرد که جمعیت‌های موجود در بیوفیلیم ممکن است مرحله تکاملی بین ارگانیسم‌های تک‌سلولی تخصص‌نیافته و ارگانیسم‌های چندسلولی باشد که سلول‌های تخصص‌یافته‌ای را ایجاد کرده‌اند (McLean *et al.*, 1997). بیان رفتارهای باکتریایی اغلب در اثر پدیده حد نصاب احساس یا Quorum sensing (QS) است که به عنوان فرایند معمول در باکتری‌ها شناسایی می‌گردد و در زیستگاه‌های مختلف مثل درون یا سطح گیاهان انجام می‌گیرد (Pierson *et al.*, 1998a; Whitehead *et al.*, 2001; Toth *et al.*, 2004). QS سیستمی است که به باکتری‌ها این امکان را می‌دهد تا وضعیت جمعیت خودشان را احساس کنند (Nealson & Hastings, 1979).

باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی از مولکول‌های سیگنال مختلفی برای احساس میزان جمعیت خودشان استفاده می‌کنند. عملکردهای سلولی نیز به واسطه این مولکول‌های کوچک در ارتباطات سلول به سلول تنظیم می‌شوند (Camilli & Bassler, 2006). برخی از خصوصیات باکتری‌ها، مثل تولید آنتی‌بیوتیک، تولید سیدروفور، تشکیل رنگ‌دانه، تحرک، تولید پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی (EPS)، بیماری‌زایی و نیز برخی رفتارهای دیگر، در کنترل مکانیسم QS اند. با افزایش جمعیت باکتری، غلظت مولکول‌های سیگنال وابسته به QS نیز افزایش می‌یابد (Ren *et al.*, 2005; Toth *et al.*, 2004; Whitehead *et al.*, 2001; Pierson *et al.*, 1998a). معمول‌ترین سیگنالی که سلول‌های باکتری‌های گرم منفی تولید می‌کنند (AHLs) *N*-acyl homoserine lactones نام دارد (VonBodman *et al.*, 2003; Whitehead *et al.*, 2001; Pierson *et al.*, 1998b). با افزایش جمعیت باکتری‌ها مقدار AHLs افزایش می‌یابد و موجب تحریک تنظیم‌کننده‌های رونویسی و بیان یا حتی

Quinones *et al.*, 2004; Dumenyo *et al.*, 1998; )  
 GacA و AefR. هر دو پروتئین Kitten *et al.*, 1998  
 به عنوان فعال‌کننده‌های سیستم AhIR شناخته  
 شده‌اند (Quinones *et al.*, 2004).

ایجاد اختلال در ژن *ahII* به دلیل ایجاد تغییرات  
 در تولید بیوسورفکتانت‌ها و اثراتی که روی بیان  
 ژن‌های *gacA* و *gacS* گذاشت، موجب تغییر  
 مرفولوژی کلنی‌های *P. syringae* بر روی آگار جامد  
 شد (Kinscherf & Willis, 1999). گزارش شده است  
 که QS اثری بر تولید فاکتورهای بیماری‌زایی،  
 پروتئازهای خارج سلولی یا ایجاد توکسین  
 سیرینگومایسین (Syringomycin) ندارد (Kinscherf  
 & Willis, 1999; Dumenyo *et al.*, 1998). به علاوه،  
 موتانت *ahII* بیماری‌زایی روی باقلا و تحرک را از بین  
 نمی‌برد (Kinscherf & Willis, 1999). توانایی ایجاد  
 هسته یخ در برخی از باکتری‌ها یکی از فاکتورهای  
 بیماری‌زایی است که با افزایش دمای یخ‌زدگی فضای  
 بین سلولی در دماهایی که معمولاً یخ‌زدگی اتفاق  
 نمی‌افتد، موجب ایجاد زخم و پلاسمولیز سلول‌ها  
 می‌شود و بدین ترتیب، شرایط نفوذ بیشتر پاتوژن را  
 فراهم می‌آورد. این ویژگی‌ها در برخی از باکتری‌ها از  
 قبیل *P. aeruginosa* و *Pantoea agglomerans*  
 به‌طور مستقیم توسط AHL کنترل می‌شوند (Nejad  
 & Ramstedt, 2006). Quinones *et al.* (2005)،  
 نشان دادند که سیستم AhIR و AefR میزان تولید  
 EPS، تحمل به استرس اکسیداتیو و نابودی بافت‌ها را  
 به‌طور مثبت، ولی میزان تحرک را به‌طور منفی کنترل  
 می‌کند. به علاوه، این کمپلکس تنظیمی موجب  
 کاهش یا افزایش لکه‌های آب سوخته روی غلاف باقلا  
 می‌شود و علائم بیماری روی برگ‌ها به شرایط  
 محیطی بستگی دارد. محققان حضور مولکول‌های  
 سیگنال وابسته به سیستم احساس حد نصاب را در  
 باکتری‌های مولد هسته یخ به اثبات رساندند (Nejad  
 & Ramstedt, 2006; Shepherd & Lindow, 2009)،  
 اما نقش QS در باکتری *P. syringae* در کنترل صفات  
 مرتبط با بیماری‌زایی و ایجاد هسته یخ هنوز کاملاً  
 واضح نیست. با توجه به اینکه هیچ‌گونه تحقیقی در  
 زمینه ارتباط بین توانایی ایجاد هسته یخ با میزان

یک عامل رقابتی، از اهمیت ویژه‌ای در این جنس  
 برخوردار است (Loper & Buyer, 1991; Duffy &  
 Efago, 1997).

واکنش‌های دفاعی گیاه در برابر بیمارگرهای  
 باکتریایی، اغلب موجب تولید سریع گونه‌های اکسیژن  
 فعال می‌شود که این عمل انفجار اکسیداتیو نام دارد.  
 $H_2O_2$  نقش‌های مختلفی در سلول گیاهی ایفا می‌کند.  
 مانع نفوذ میکروارگانیسم‌ها به گیاه می‌شود، به  
 واکنش‌های تجزیه‌ای پراکسیداز داخل و بین سلولی  
 کمک می‌کند، بین ترکیبات ساختمانی دیواره و  
 لیگنین پیوند برقرار می‌کند و دیواره سلولی را محکم  
 می‌گرداند. در برابر میکروارگانیسم‌ها سد دفاعی ایجاد  
 می‌کند تا گیاه پاسخ‌های دفاعی را تنظیم کند. به‌طور  
 کلی،  $H_2O_2$  یک مولکول قابل پخش در غشای  
 بیولوژیک و سیگنال بین سلولی است که پاسخ‌های  
 دفاعی را فعال می‌کند (Gara *et al.*, 2003). در نتیجه  
 داشتن آنزیم کاتالاز از مزایای شایان توجه باکتری‌ها  
 برای غلبه بر سیستم دفاعی گیاه و بیماری‌زایی است.

سیستم QS در *P. syringae* تا حد زیادی مشابه  
 دیگر باکتری‌های گرم منفی است. تولید سیگنال  
 AHL در *P. syringae* که 3-oxo-hexanoyl-  
 homoserine lactone (3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL) نام دارد، با  
 افزایش بیان ژن‌های سنتزکننده *ahII* و ژن  
 تنظیم‌کننده *ahlR* افزایش می‌یابد (Quinones *et al.*,  
 1998; Dumenyo *et al.*, 2004). پروتئین AhII  
 موجب تولید سیگنال AHL، از S-adenosylmethionin  
 (SAM) می‌شود. با افزایش غلظت سلول‌ها، پروتئین  
 AhIR کمپلکس پایداری را با سیگنال 3-oxo-C<sub>6</sub>-  
 HSL تشکیل می‌دهد و بیان ژن *ahII* و به تبع آن،  
 تولید بیشتر سیگنال رخ می‌دهد. سیستم AhIR تحت  
 تأثیر دیگر پروتئین‌های تنظیمی نیز قرار می‌گیرد  
 (Quinones *et al.*, 2004; Dumenyo *et al.*, 1998; )  
 1998). پروتئین AefR تنظیم‌کننده  
 مهمی برای سیستم QS در *P. syringae* است  
 (Quinones *et al.*, 2004). AefR برای رونویسی ژن  
*ahII* مورد نیاز است و سطح تولید 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL را  
 بالا می‌برد. GacA تنظیم‌کننده دیگری است که اثر  
 مشابهی روی فرایند تحریک تولید سیگنال دارد

باکتری‌های خالص‌شده، سوسپانسیون تهیه گردید و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

#### آزمون هسته یخ

بعد از اتمام نمونه‌برداری و جداسازی، به منظور شناسایی عوامل مولد هسته یخ، غلظت‌های مساوی از سوسپانسیون باکتری تازه رشد کرده تهیه شدند ( $10^8$ ) سلول در هر میلی‌لیتر) و در دمای ۵- تا ۷- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. از آب مقطر استریل به عنوان شاهد منفی استفاده شد. باکتری‌هایی که پس از ۳۰ دقیقه در مقایسه با شاهد یخ زدند، به عنوان هسته یخ مثبت جداسازی شدند (Schaad *et al.*, 2001).

#### شناسایی جنس و گونه سودومونادهاى جدا شده

آزمون تولید رنگ فلورسنت، با استفاده از محیط KB صورت گرفت و جدایه‌های سبز رنگ فلورسنت که متعلق به جنس *Pseudomonas* بودند، انتخاب شدند. در ادامه، آزمون‌های لویات برای تفکیک گونه *syringae* از دیگر گونه‌های این جنس انجام گرفت. آزمون لپانیدن سیب‌زمینی (پکتیناز) و آرژنین دی هیدرولاز به روش (Schaad *et al.*, 2001)، اکسیداز به روش Kovacs (1956)، کاتالاز به روش Lelliot & Stead (1987)، تولید لوان با استفاده از محیط کشت آگار غذایی حاوی ۵٪ سوکروز (Fahy & Persley, 1983) و واکنش فوق حساسیت به روش (Klement *et al.*, 1964) روی برگ‌های شمعدانی انجام گرفت.

#### مقایسه قدرت هسته یخ‌زایی در میان جدایه‌ها

برای مقایسه قدرت‌ها، از کشت تازه باکتری در آب مقطر استریل سری رقت تهیه شد و چهار رقت  $10^9$ ،  $10^8$ ،  $10^7$  و  $10^6$  از باکتری‌ها در دمای ۵- تا ۷- درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. باکتری‌هایی که در کمترین زمان  $10^6$  یا  $10^7$  سلول در هر میلی‌لیتر از آنها یخ زد، به عنوان هسته یخ قوی و باکتری‌هایی که  $10^8$  یا  $10^9$  سلول در هر میلی‌لیتر آنها یخ زد، به عنوان هسته یخ ضعیف در نظر گرفته شدند.

تولید هموسرین لاکتون‌ها، یا دیگر فاکتورهای بیماری‌زایی در باکتری *P. syringae* انجام نشده است، تحقیق حاضر به منظور روشن ساختن ارتباط میان این رفتارها و مقدار تولید سیگنال صورت گرفت.

#### مواد و روش‌ها

##### جمع‌آوری نمونه

به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های مولد هسته یخ متعلق به گونه *P. syringae*، در بهار سال ۱۳۹۲، ۲۴۸ نمونه از برگ و شکوفه درختان زردآلو، آلبالو، گیلاس، آلو، هلو، شلیل، بادام و گوجه سبز موجود در مناطق عمده زیر کشت این درختان در استان خراسان رضوی (مشهد، طرقله (کنگ و نقندر)، شانديز، زشک، اخلمد، چناران و نیشابور) جمع‌آوری گردید. برای این منظور از هر منطقه ۲ باغ (دارای مدیریت و بدون مدیریت) و در هر باغ به‌طور کاملاً تصادفی سرشاخه‌های ۴ درخت از هر گونه (۲ درخت دارای علائم شانکر و ۲ درخت بدون علائم) انتخاب شدند. نمونه‌ها داخل پاکت کاغذی قرار گرفتند و برای بررسی به آزمایشگاه منتقل شدند.

##### جداسازی سودومونادها روی محیط King's medium B

برای جداسازی این باکتری‌ها، سرشاخه‌های حاوی برگ و شکوفه انتخاب شدند. سپس با استفاده از قیچی سترون نمونه‌ها به قطعات کوچک‌تر خرد و در ۲۰۰ ml آب مقطر استریل به همراه ۲ قطره توئین ۲۰ (Tween 20) به مدت ۱ ساعت بر روی شیکر تکان داده شدند. از سوسپانسیون به‌دست‌آمده سری رقت تهیه شد و  $25 \mu\text{l}$  از هر رقت، بر روی محیط KB کشت گردید. پتری دیش‌ها ۴۸ ساعت داخل انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

##### خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها

از میان باکتری‌هایی که قادر به تولید رنگ‌دانه فلورسنت بودند، به‌طور تصادفی ۶۸۰ جدایه برای آزمون‌های بیشتر انتخاب شدند. برای اطمینان از خلوص باکتری‌های جدا شده، هر تک کلنی مجدداً روی محیط کشت آگار غذایی (NA) مخطط شد. از

Nurtient Broth (NB) به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور شیکر ۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند. هنگامی که غلظت سلول‌های باکتری افزایش یافت، سوسپانسیون باکتری ( $OD_{600nm} > 1$ ) با سرعت ۷۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. فاز رویی از فیلتر  $0.2 \mu m$  عبور داده شد و به میزان ۰/۱ حجم آن اسید کلریدریک، اضافه گردید. محلول به دست آمده به مدت ۲۴ ساعت دیگر، در انکوباتور شیکر با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس به نسبت ۳۰:۷۰ با دی کلرومتان مخلوط گردید. پس از تکان دادن محلول به مدت یک دقیقه، با تشکیل دو فاز در این مرحله، فاز زیری که حاوی سیگنال بود، جداسازی و طی مدت ۴۸ ساعت، زیر هود خشک گردید. سیگنال‌های استخراج شده در  $500 \mu l$  محلول استونیتریل ۵۰٪ در داخل آب مقطر، حل و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (McClellan *et al.*, 1997).

برای ردیابی هموسرین لاکتون‌ها، از روش Thin-layer Chromatography (TLC) به همراه بیوسنسور *Chromobacter violaceum* CV026. اهدایی پروفیسور کامارا از دانشگاه ناتینگهام انگلستان استفاده شد (McClellan *et al.*, 1997).  $40 \mu l$  از هر نمونه روی صفحه (پلیت) TLC فعال شده (سیلیکاژل G با ضخامت  $0.25$  میلی‌متر) بارگذاری شد. کروماتوگرافی با استفاده از حلال متانول- آب (نسبت حجمی ۶۰-۴۰) انجام گرفت. مولکول‌های سیگنال بر اساس قطبیت متفاوتی که داشتند، در سطح صفحه حرکت کردند و از یکدیگر تفکیک شدند. به واسطه حضور باکتری سنسور و تولید رنگ و یولاسین (violacein) توسط آن، باندها در سطح صفحه قابل رؤیت شدند.

### نتایج و بحث

شناسایی *P. syringae* های مولد هسته یخ، ۷۰ از میان جدایه‌های فلورسنت مولد هسته یخ، ۷۰ جدایه که واکنش اکسیداز، آرژنین دی هیدرولاز و لپانیدن سیب‌زمینی در آنها منفی بود، ولی قادر به ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون بودند، به عنوان *P. syringae* در نظر گرفته شدند (جدول ۱). باکتری

### بررسی میزان حرکت توده‌ای (Swarming)

برای این منظور سوسپانسیونی از کشت تازه باکتری‌ها تهیه گردید. پس از یکسان‌سازی غلظت‌ها به روش اسپکتروفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر ( $OD_{600nm} = 1$ )، دیسک‌های کاغذی به قطر شش میلی‌متر سترون، به سوسپانسیون جدایه‌ها آغشته و در مرکز پتری دیش حاوی محیط KB با آگار ۰/۴٪ قرار داده شدند (Chow *et al.*, 2011). آزمون در سه تکرار برای هر جدایه انجام گرفت. میزان تحرک در جدایه‌ها بعد از ۲۴ ساعت بر حسب سانتی‌متر، محاسبه و ثبت گردید.

### بررسی میزان حساسیت به پراکسید هیدروژن

برای مقایسه میزان تولید آنزیم کاتالاز در میان جدایه‌ها از آزمون حساسیت به پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) استفاده شد. برای این منظور، ابتدا  $20 \mu l$  از سوسپانسیون کشت تازه باکتری‌ها (غلظت‌های یکسان  $OD_{600nm} = 1$ ) در سطح پتری دیش پخش شد و پس از خشک شدن آن، دیسک‌های کاغذی سترون شش میلی‌متری آغشته به  $3\% H_2O_2$  در مرکز پتری دیش قرار گرفتند (Lelliot & Stead, 1987). آزمون برای هر جدایه در ۳ تکرار انجام گرفت. قطر هاله بازدارندگی بعد از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد.

### بررسی میزان تولید سیدروفور پایوردین

جدایه‌ها در ۵ ml از محیط Casamino acids (۵ گرم CAA،  $1/5$  گرم  $K_2HPO_4$  و  $0.25$  گرم  $MgSO_4$  در لیتر) مایه‌زنی شدند. پس از ۲۴ ساعت رشد در انکوباتور شیکر ۲۸ درجه سانتی‌گراد،  $1 ml$  از سوسپانسیون باکتری‌ها در محیط فوق به میکروتیوپ سترون منتقل و در دور ۷۰۰۰ rpm به مدت پنج دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی از فیلترهای میلی‌پور  $0.22 \mu m$  عبور داده شد و سپس میزان نور جذبی پایوردین موجود در فاز رویی به دست آمده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۴۰۵ nm ثبت گردید (Munsch *et al.*, 2000).

### استخراج و ردیابی هموسرین لاکتون‌ها به روش TLC

برای این منظور جدایه‌های منتخب، در ۵۰ ml محیط

### بررسی میزان تحرک

۴۳ عدد از باکتری‌های *P. syringae* جداسازی شده، قدرت زیاد و ۲۷ عدد از آنها توانایی کمی در تشکیل هسته یخ داشتند. باکتری‌ها بر اساس میزان تحرک، به سه دسته تحرک زیاد ( $\leq 3/32$  سانتی‌متر)، تحرک متوسط ( $3/32-1/66$  سانتی‌متر) و تحرک پایین ( $\geq 1/66$  سانتی‌متر)، تقسیم شدند (شکل ۱). در میان جدایه‌هایی که قدرت هسته یخ آنها زیاد بود، ۴۱٪ حرکت زیادی داشتند و طی مدت ۲۴ ساعت در کل سطح پتری دیش شش سانتی‌متری پخش شدند، ۳۲٪ تحرک متوسط داشتند و ۲۷٪ آنها کم تحرک بودند، اما در مقایسه با این جدایه‌ها، ۴۰٪ از جدایه‌هایی که قدرت هسته یخ پایینی داشتند، حرکت کمتری از خود نشان دادند، ۳۸٪ تحرک متوسط داشتند و ۲۲٪ آنها دارای تحرک زیاد بودند. با مقایسه دو قدرت هسته یخ، مشاهده شد که اختلاف در میان این دو گروه معنادار بوده و می‌توان گفت باکتری‌هایی که هسته یخ قوی هستند، میزان تحرک زیادتری نیز دارند (شکل ۳-الف) (جدول ۱).

### بررسی میزان حساسیت به پراکسید هیدروژن

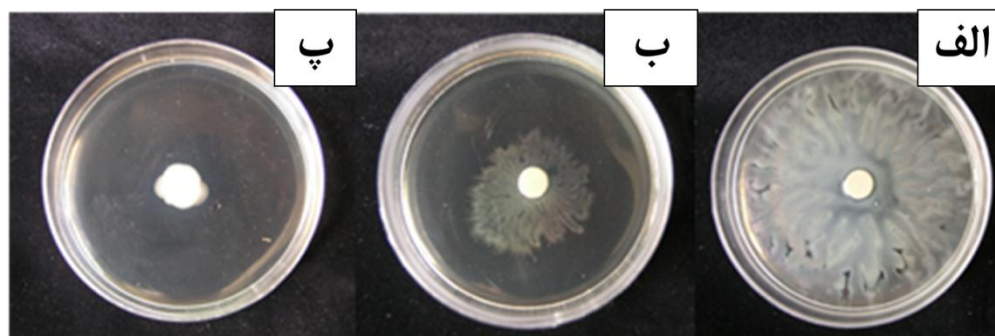
در این آزمون نیز تنوع زیادی میان جدایه‌ها مشاهده شد. نتایج نشان داد هم باکتری‌های هسته یخ قوی و هم ضعیف، به  $H_2O_2$  حساسند. جدایه‌ها بر این اساس، به سه گروه تقسیم شدند: حساسیت زیاد (قطر هاله بازدارندگی  $\leq 1/53$  سانتی‌متر)، حساسیت متوسط ( $1/53-0/78$  سانتی‌متر) و حساسیت کم (قطر هاله بازدارندگی  $\geq 0/78$  سانتی‌متر) (شکل ۲) (جدول ۱).

*P. syringae* به عنوان فراوان‌ترین گونه باکتریایی مولد هسته یخ، از همه نواحی و همه میزبان‌ها جداسازی شد. این نتایج با نتایج Lindow et al. (1982)، مطابقت داشت.

### مقایسه قدرت هسته یخ‌زایی

در تعدادی از جدایه‌ها طی مدت زمان کوتاهی، همه رقت‌ها یخ زدند. بر اساس نتایج Feil et al. (2005)، باکتری‌ها پروتئین‌های ضد یخ نیز تولید می‌کنند که به داخل محیط کشت ترشح و با نشست روی بلورهای یخ از رشد آنها جلوگیری می‌کنند و دمایی را که برای رشد و فعالیت آنها مورد نیاز است را کاهش می‌دهند. با توجه به تنوع در میزان قدرت تشکیل هسته یخ در میان جدایه‌ها، این امکان وجود دارد که فنوتیپ INA و قدرت آن، به واسطه پروتئین‌های ضد یخ تنظیم شده باشند، یا اینکه تعداد تکرارها در بخش مرکزی توالی پروتئین هسته یخ بر قدرت آنها اثر گذاشته باشد (Garnham et al., 2011).

جدایه‌های SHC1, CA11, NA4, CA8, CP1, CA9 و ZS3, ZA2, CN1 به عنوان هسته یخ بسیار قوی شناسایی شدند، به طوری که در مدت زمان کمتر از ۱۰ دقیقه تا رقت  $10^6$  سلول در هر میلی‌لیتر (کمترین رقت مورد نیاز برای ایجاد هسته یخ) آنها منجمد گردید. باکتری‌های CA1, ZC2, MN1 و ZC4 قدرت بسیار پایینی داشتند و تنها رقت  $10^9$  سلول در هر میلی‌لیتر آنها قبل از شاهد منجمد گردید. توانایی ایجاد هسته یخ همه جدایه‌ها در جدول ۱ ذکر شده است.



شکل ۱. میزان تحرک در جدایه‌های بررسی شده.

الف) تحرک زیاد، ب) تحرک متوسط، پ) تحرک کم

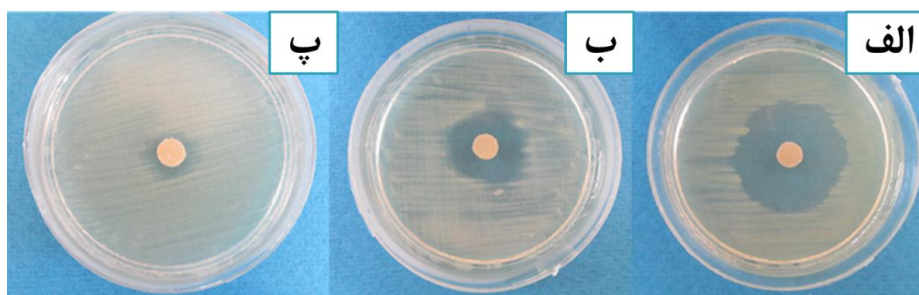
جدول ۱. نتایج آزمون‌های قدرت هسته یخ، حساسیت به H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>، میزان تحرک اسوارمینگ (Swarming) و تولید پایووردين در جدایه‌های *P. syringae*. (از جدایه‌هایی که به‌صورت پررنگ نشان داده شده‌اند، هموسرین لاکتون استخراج گردید). آنالیز آماری به روش LSD و با نرم‌افزار jmp8 انجام گرفت.

جدایه‌ها	قدرت INA	حساسیت	تحرک	پایووردين	جدایه‌ها	قدرت INA	حساسیت	تحرک	پایووردين
CP1	۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۴±۰/۰۶ef	۴/۹۳±۰/۰۷a	۰/۲۸±۰/۰۲qrs	CP2	۱۰ <sup>۸</sup>	۰/۸۷±۰/۰۷kl	۴/۹۷±۰/۰۳a	۰/۶۵±۰/۰۳hijkl
CP5	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۰۳±۰/۰۳u	۳/۰۳±۰/۰۹gf	۰/۱۲±۰/۰۶x	CA3	۱۰ <sup>۸</sup>	۰/۶۷±۰/۰۹mno	۱/۶±۰/۰۶ml	۰/۲۶±۰/۰۲qrstu
ZC3	۱۰ <sup>۸</sup>	۰/۶۳±۰/۰۹nop	۱/۳۷±۰/۰۷nm	۰/۱۴±۰/۰۲vwx	CA5	۱۰ <sup>۹</sup>	۰/۰۷±۰/۰۷tu	۲/۵۳±۰/۰۹ij	۰/۴۴±۰/۰۲p
MN5	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۰۷±۰/۰۷tu	۳/۱±۰/۱fed	۰/۱۹±۰/۰۴rstuvw	CP4	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۵۸±۰/۰۴op	۱/۳۳±۰/۰۹no	۰/۲۵±۰/۰۲qrstuv
CP6	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۰۶±۰/۰۶op	۴/۸±۰/۱ab	۰/۱۱±۰/۰۶x	CP7	۱۰ <sup>۸</sup>	۰/۴۷±۰/۰۲pq	۲/۳۳±۰/۰۹jk	۱/۲۸±۰/۱۶a
NA3	۱۰ <sup>۸</sup>	۱/۸۳±۰/۰۹bc	۰/۵±۰/۰۶ut	۰/۲۱±۰/۰۳qrstuvw	CP8	۱۰ <sup>۹</sup>	۱/۸±۰/۱۲bc	۳/۰۷±۰/۰۷fe	۰/۶۹±۰/۰۳fghi
CC1	۱۰ <sup>۸</sup>	۱/۹±۰/۰۶b	۴/۹۳±۰/۰۷a	۰/۲۳±۰/۰۹qrstuvw	MP1	۱۰ <sup>۷</sup>	۱/۸۳±۰/۰۹bc	۴/۵۷±۰/۰۳b	۰/۸۹±۰/۰۶de
CA8	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۰۳±۰/۰۳u	۴/۹۷±۰/۰۳a	۰/۴۷±۰/۰۴nop	ZP1	۱۰ <sup>۹</sup>	۰/۶۳±۰/۰۹nop	۱/۳۷±۰/۰۹nm	۱/۰۳±۰/۰۴b
CA6	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۰۷±۰/۰۷tu	۱/۳۳±۰/۰۳on	۰/۱۲±۰/۰۲fghi	CA2	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۶۳±۰/۰۲nop	۳/۲±۰/۱۲fed	۱/۰۲±۰/۰۵bc
CS1	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۵۳±۰/۰۳op	۰/۷۷±۰/۰۷srq	۰/۶۶±۰/۰۲hijk	CA4	۱۰ <sup>۹</sup>	۰/۱±۰/۰۶stu	۴/۱±۰/۱c	۱/۱۷±۰/۰۹a
NA4	۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۹۷±۰/۰۹b	۲/۶۷±۰/۰۹ih	۰/۴۶±۰/۰۳op	SHC2	۱۰ <sup>۸</sup>	۱/۱±۰/۰۶ihj	۰/۶۷±۰/۰۷qrst	۰/۹۴±۰/۰۳bcd
MP2	۱۰ <sup>۹</sup>	۰/۱۳±۰/۰۹rstu	۲/۶۳±۰/۰۹ih	۰/۲۷±۰/۰۲qrst	ZC2	۱۰ <sup>۹</sup>	۱/۷±۰/۰۶cd	۰/۸۷±۰/۰۳pqr	۰/۱۵±۰/۰۳uvwx
CA7	۱۰ <sup>۷</sup>	۱/۵±۰/۰۶e	۳/۰۷±۰/۰۷fe	۰/۱۳±۰/۰۱wx	CA1	۱۰ <sup>۹</sup>	۰/۰۸±۰/۰۴tu	۰/۳۳±۰/۰۹u	۰/۷۱±۰/۰۳fghi
CPR2	۱۰ <sup>۷</sup>	۲/۲۳±۰/۱۵a	۴/۹۳±۰/۰۷a	۰/۶۸±۰/۰۱fghij	ZA2	۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۲۷±۰/۱۵fg	۴/۹±۰/۱a	۰/۵۱±۰/۰۲nop
CPR4	۱۰ <sup>۷</sup>	۱/۴±۰/۰۶ef	۱/۸۳±۰/۰۹i	۰/۱۶±۰/۰۲tuvwx	CPR1	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۵۷±۰/۰۷op	۰/۷۳±۰/۰۹qrst	۱/۰۳±۰/۰۹b
MPR3	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۸۷±۰/۰۷kl	۱/۳±۰/۱on	۰/۲۹±۰/۰۱qr	CPR3	۱۰ <sup>۹</sup>	۰/۶۵±۰/۰۳mnop	۲/۳±۰/۱jk	۰/۱۲±۰/۰۵wx
MS2	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۱±۰/۰۶stu	۱/۶±۰/۰۶ml	۰/۲۱±۰/۰۲qrstuvw	MPR4	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۰۸±۰/۰۴tu	۰/۶±۰/۱۲st	۱±۰/۰۳bcd
MS3	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۳±۰/۰۶qr	۴/۹۳±۰/۰۷a	۰/۱۳±۰/۰۱wx	MPR5	۱۰ <sup>۹</sup>	۰/۰۸±۰/۰۴tu	۴/۹۳±۰/۰۷a	۰/۷۱±۰/۰۳fghi
MS4	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۰۷±۰/۰۷tu	۴/۹۳±۰/۰۷a	۰/۱۴±۰/۰۱uvwx	ZS2	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۱۹±۰/۰۲rstu	۰/۹±۰/۰۶pq	۰/۳±۰/۰۳q
ZC6	۱۰ <sup>۹</sup>	۰/۳±۰/۰۶qr	۳/۲۳±۰/۱۵fed	۰/۲۸±۰/۰۱qrs	ZS3	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۳۲±۰/۰۱qr	۴/۹±۱a	۰/۷۷±۰/۰۱fg
MN2	۱۰ <sup>۷</sup>	۱/۵۳±۰/۰۳de	۱/۱±۰/۱po	۰/۱۷±۰/۰۱stuvw	ZC4	۱۰ <sup>۹</sup>	۰/۵۵±۰/۰۳op	۰/۸۳±۰/۰۹qrs	۰/۱۸±۰/۰۱stuvw
MN3	۱۰ <sup>۹</sup>	۱/۱۷±۰/۰۹ghi	۴/۹±۰/۰۶a	۰/۱۶±۰/۰۱tuvwx	ZC7	۱۰ <sup>۸</sup>	۰/۰۳±۰/۰۳u	۰/۹±۰/۰۶pq	۰/۱۸±۰/۰۳rstuvw
MN4	۱۰ <sup>۷</sup>	۱/۱۳±۰/۰۹ghi	۴/۹۳±۰/۰۷a	۰/۲۳±۰/۰۱qrstuvw	ZC8	۱۰ <sup>۸</sup>	۰/۰۵±۰/۰۵tu	۲/۱۷±۰/۱۷k	۰/۲۵±۰/۰۳qrstuv
MN7	۱۰ <sup>۹</sup>	۱/۳۷±۰/۰۹ef	۲/۸±۰/۰۶hg	۰/۶۲±۰/۰۱ijklm	MN1	۱۰ <sup>۹</sup>	۰/۸۷±۰/۰۳kl	۰/۷۷±۰/۰۷qrs	۰/۱۹±۰/۰۲rstuvw
CA11	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۹±۰/۰۶jkl	۴/۹۳±۰/۰۷a	۰/۶۷±۰/۰۲ghijk	MN9	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۰۷±۰/۰۷tu	۱/۳۳±۰/۰۹no	۰/۱۴±۰/۰۲vwx
MPR6	۱۰ <sup>۹</sup>	۰/۰۳±۰/۰۳u	۳/۳۳±۰/۰۹d	۰/۵±۰/۰۱nop	MN10	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۰۳±۰/۰۳u	۲/۳±۰/۱jk	۰/۲۱±۰/۰۲qrstuvw
ZS1	۱۰ <sup>۸</sup>	۱/۲۳±۰/۱۵fgh	۴/۹۳±۰/۰۹a	۰/۱۷±۰/۰۲stuvw	CAL2	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۵۵±۰/۰۵op	۱/۴۷±۰/۰۷mn	۰/۷۸±۰/۰۴ef
MPR1	۱۰ <sup>۸</sup>	۰/۶۳±۰/۰۹nop	۱/۷۳±۰/۱۲i	۰/۵۴±۰/۰۳lmnop	CA10	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۸۲±۰/۰۲lm	۰/۸۳±۰/۰۹qrs	۰/۹۲±۰/۰۲cd
KC3	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۲۳±۰/۰۳rst	۲/۳±۰/۱kj	۰/۵۳±۰/۰۱mnop	NEPR1	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۰۷±۰/۰۲tu	۱/۳۳±۰/۰۹no	۰/۵۸±۰/۰۱jklmn
CP10	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۸±۰/۰۶lmn	۰/۸±۰/۱srq	۰/۳۱±۰/۰۲q	ZC5	۱۰ <sup>۷</sup>	۰/۲۸±۰/۰۲qrs	۴/۹۳±۰/۰۷a	۱/۰۵±۰/۰۶b
MPR7	۱۰ <sup>۷</sup>	۱/۰۷±۰/۰۷hij	۴/۸±۰/۱۲ab	۰/۶۶±۰/۰۲hijk	CAL1	۱۰ <sup>۹</sup>	۱/۳۷±۰/۰۹ef	۳/۱±۰/۱def	۰/۱۱±۰/۰۶x
SHC1	۱۰ <sup>۶</sup>	۲/۳±۰/۱۵a	۴/۹۳±۰/۰۷a	۰/۶۸±۰/۰۱fghij	CA9	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۰۳±۰/۰۳u	۳/۲۳±۰/۱۵def	۰/۵۶±۰/۰۳klmno
CN1	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۱±۰/۰۶stu	۴/۹۷±۰/۰۳a	۰/۱۲±۰/۰۲fghi	ZA1	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۸±۰/۰۶lmno	۰/۶۳±۰/۰۹rst	۰/۱۲±۰/۰۶x
MN8	۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۰۷±۰/۰۷hij	۴/۶±۰/۱b	۰/۷۴±۰/۰۱fgh	MN6	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۰۷±۰/۰۴tu	۱/۲۳±۰/۱۵no	۰/۱۷±۰/۰۴tuvwx
CP9	۱۰ <sup>۹</sup>	۱/۰۳±۰/۰۹ijk	۲/۷۷±۰/۱۵hi	۰/۲۲±۰/۰۴qrstuvw	AC1	۱۰ <sup>۶</sup>	۰/۰۴±۰/۰۴u	۲/۳±۰/۱۲de	۰/۲۱±۰/۰۳qrstuvw

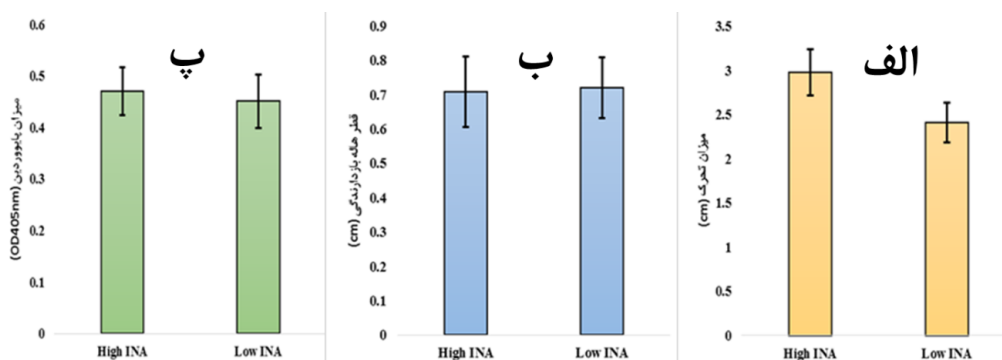
۱۱٪ حساسیت زیادی نشان دادند. با بررسی این فاکتور در دو گروه هسته یخ قوی و ضعیف، مشخص گردید که اختلاف بین آنها معنادار نبوده و میزان حساسیت در هسته یخ‌های قوی به مقدار ناچیزی کمتر از انواع هسته یخ ضعیف، محاسبه گردید (شکل ۳-ب). میزان تولید

در میان ۴۳ جدایه‌ای که هسته یخ قوی بودند، ۶۰٪ باکتری‌ها حساسیت کمی به پراکسید هیدروژن داشتند، ۲۷٪ حساسیت متوسط و ۱۳٪ حساسیت زیاد داشتند. در ۲۷ جدایه‌ای که به عنوان هسته یخ ضعیف تفکیک شدند، ۵۵٪ حساسیت کم، ۳۴٪ حساسیت متوسط و

آنزیم کاتالاز در میان جدایه‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. باکتری‌های هسته یخ قوی حساسیت کمتری نسبت به باکتری‌های هسته یخ ضعیف داشتند. داده‌ها بسیار نزدیک بود و اختلاف معنادار مشاهده نشد.



شکل ۲. میزان حساسیت به  $H_2O_2$  در میان جدایه‌های بررسی شده. (الف) حساسیت زیاد (ب) حساسیت متوسط (پ) حساسیت کم

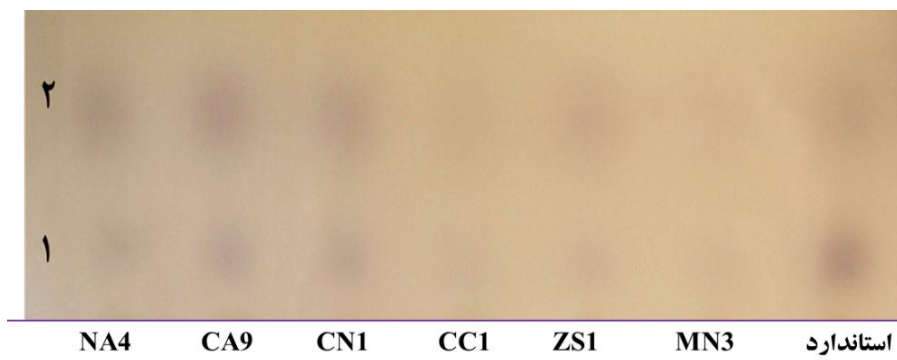


شکل ۳. مقایسه سه فاکتور مؤثر در بیماری‌زایی میان دو قدرت هسته یخ‌زدگی. (الف) میزان تحرک، (ب) میزان حساسیت به  $H_2O_2$ ، (پ) میزان تولید سیدروفور پاپوور دین

**بررسی تولید هموسرین لاکتون‌ها در *P. syringae***  
شش جدایه با هدف بررسی اثر هموسرین لاکتون‌ها بر قدرت هسته یخ و دیگر فاکتورهای مؤثر در سازگاری باکتری (که در تحقیق حاضر بررسی شدند) انتخاب شدند. در این آزمایش جدایه‌هایی که هسته یخ قوی بودند (NA4، CA9، CN1) با جدایه‌هایی که قدرت ضعیفی داشتند (ZS1، CC1، MN3) مقایسه شدند. نتایج نشان داد سه جدایه NA4، CA9، CN1 هموسرین لاکتون بیشتری تولید کردند (شکل ۴). حداقل غلظت یخ‌زدگی در همه آنها  $10^6$  cfu/ml بود. در حالی که در جدایه‌های CC1، MN3 و ZS1 قدرت هسته یخ و تولید هموسرین لاکتون پایین بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که ارتباط مستقیمی میان قدرت هسته یخ و میزان تولید هموسرین لاکتون‌ها در باکتری *P. syringae* وجود دارد.

**بررسی میزان تولید سیدروفور پاپوور دین**  
جدایه‌ها بر اساس تولید سیدروفور به دو گروه تقسیم شدند. در گروه اول میزان تولید پاپوور دین، کم ( $\geq 0.695$ ) و در گروه دوم، زیاد ( $> 0.695$ ) بود. درباره جدایه‌هایی که هسته یخ قوی بودند، ۷۲٪ در گروه اول و ۲۸٪ در گروه دوم قرار گرفتند. درباره جدایه‌هایی که هسته یخ ضعیفی داشتند، ۷۷٪ در گروه اول و ۲۳٪ در گروه دوم قرار گرفتند.  
این نتایج نشان داد، میزان پاپوور دین در جدایه‌هایی که قدرت تشکیل هسته یخ زیادی داشتند، کمی بیشتر از جدایه‌های با قدرت ضعیف‌تر بود؛ اما مقایسه دو گروه اختلاف معناداری را در رابطه با تولید پاپوور دین نشان نداد (شکل ۳-پ). این نتایج با یافته‌های Kozloff *et al.* (1983)، مطابقت داشت. این محققان اثر شایان توجهی از ترکیبات کلات آهن و تغییرات pH بین ۵ تا ۹ روی هسته یخ مشاهده نکردند.





شکل ۴. صفحه TLC و سیگنال‌های HSLs موجود در *P. syringae* دو نوع سیگنال مشاهده شد: (۱) C<sub>6</sub>-HSL و (۲) 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL

است) رخ می‌دهد. همچنین تولید پایووردين در این موتانت‌ها افزایش می‌یابد. بیان این ژن (*pspL*) تحت کنترل سیستم حد نصاب احساس است و همولوگ آن در *P. aeruginosa* وجود دارد.

با توجه به اینکه جدایه‌های به‌کاررفته در این تحقیق از روی درختان میوه هسته‌دار جدا شده‌اند و تنوع زیادی از نظر ژنتیکی دارند، بنابراین دلیل این مغایرت می‌تواند به علت بومی بودن و تفاوت‌های ژنتیکی این جدایه‌ها باشد. دربارهٔ باکتری *P. syringae* pv. *tabaci* مشاهده شده که موتانت‌هایی که قادر به تولید پایووردين نبودند، توانایی کمی در تولید AHLs داشتند که هر دو برای بیماری‌زایی در توتون ضروری‌اند (Taguchi et al., 2010). در این باکتری، رابطهٔ مستقیمی میان این فاکتورها شناسایی گردید.

#### نتیجه‌گیری کلی

در بسیاری از باکتری‌های بیمارگر گیاهی، افزایش سطح بیان سیگنال AHL به واسطهٔ افزایش جمعیت، منجر به بیان برخی از فاکتورهای بیماری‌زایی و متابولیت‌های ثانویه می‌شود که به‌طور غیرمستقیم کلنیزاسیون موفقیت‌آمیز گیاه میزبان را به همراه دارد. نقش تولید سیگنال AHL در بیان رفتارهای وابسته به غلظت سلولی که در سازگاری اپی‌فیتی یا تهاجم *P. syringae* دخیل‌اند، به‌طور کامل مشخص نشده است. از میان فاکتورهایی که در سازگاری اپی‌فیتی و بیماری‌زایی مؤثرند، در این تحقیق حرکت از نوع توده‌ای Swarming، حساسیت به H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> و میزان تولید

در رابطه با حساسیت به پراکسید هیدروژن، مشاهده گردید، جدایه‌هایی که کمترین میزان حساسیت را نشان دادند (CA9، CN1)، هموسرین لاکتون بیشتری تولید کردند. این داده‌ها رابطهٔ عکس میان این سیگنال و حساسیت به پراکسید هیدروژن را نشان دادند. این نتایج با یافته‌های Quinones et al. (2005) و Tarighi & Taheri (2011)، مطابقت داشت. این محققان با ایجاد موتاسیون در ژن *ahII* اثبات کردند که میزان حساسیت به پراکسید هیدروژن افزایش می‌یابد. جدایه‌های CN1، CC1، ZS1 و MN3 تحرک زیادی داشتند. در دو جدایهٔ CA9 و NA4 به‌ترتیب، میزان تحرک کم و متوسط بود. بررسی این نتایج رابطهٔ عکس میان میزان هموسرین لاکتون و تحرک اسوارمینگ را نشان داد که مطابق گزارش‌های محققان دیگر بود (Quinones et al., 2005; Tarighi & Taheri, 2011).

در رابطه با میزان تولید سیدروفور پایووردين، در میان جدایه‌های بررسی‌شده، کمترین میزان تولید مربوط به جدایهٔ MN3 بود که کمترین میزان هموسرین لاکتون را داشت. از طرفی، جدایهٔ CN1 بیشترین میزان پایووردين را تولید کرد که سیگنال نسبتاً زیادی از این باکتری ردیابی گردید. با توجه به این داده‌ها، رابطهٔ مستقیمی میان میزان این سیگنال و تولید سیدروفور پایووردين مشاهده شد. این نتایج با یافته‌های Tarighi (2011)، مغایرت داشت. این محقق نشان داد با ایجاد موتاسیون در ژن (*Psyr-1712*) *pspL* کاهش چشمگیری در تولید سیگنال 3-oxo-C<sub>6</sub>-HSL (که تنها سیگنال شناخته‌شده در *P. syringae*

توان هسته یخ ضعیف، نتایج معکوس مشاهده گردید. مقایسه میانگین‌ها در رابطه با میزان تحرک اختلاف معناداری میان این دو گروه نشان داد.

نتایج بررسی مقدار تولید هموسرین لاکتون‌ها در گونه *P. syringae* تا حدی ارتباط مستقیم بین این مولکول‌های سیگنال را با قدرت هسته یخ جدایه‌ها نشان داد. درباره دیگر فاکتورهای بررسی‌شده، با افزایش میزان هموسرین لاکتون‌ها حساسیت به پراکسید هیدروژن و تحرک، کاهش یافته بود و میزان تولید سیدروفور پایووردین افزایش نشان داد. این در حالی بود که جدایه‌های با قدرت هسته یخ بیشتر تحرک زیادی را از خود نشان می‌دادند. اگر چه نتایج ما به‌طور کیفی نشان داد که ارتباط مستقیمی بین مقدار تولید هموسرین لاکتون‌ها و توانایی ایجاد هسته یخ در *P. syringae* وجود دارد، با این حال تحقیقات بیشتر برای یافتن ارتباط کمی بین غلظت سلولی و مقدار تولید هموسرین لاکتون‌ها با استفاده از روش‌های دقیق‌تری مثل HPLC لازم و ضروری است.

سیدروفور پایووردین بررسی شد. تحرک در *P. Syringae* موجب می‌شود که باکتری از فاز ای‌فیتی حرکت کند و خود را به روزه‌ها یا زخم‌های گیاه برساند، بنابراین هر چه تحرک در باکتری بیشتر باشد، سطح وسیع‌تری را می‌تواند آلوده کند. یکی از فاکتورهای دفاعی اولیه گیاهان در برابر حمله بیمارگرها، تولید پراکسید هیدروژن ( $H_2O_2$ ) است که به علت داشتن خاصیت میکروب‌کشی موجب از بین بردن بیمارگرها می‌شود. بنابراین هرچه بیمارگرها نسبت به  $H_2O_2$  مقاومت بیشتری نشان دهند، توانایی بیشتری در آلوده‌سازی میزبان خواهند داشت. سیدروفورها با گرفتن آهن محیط به نفع بیمارگر موجب می‌شوند که آهن از دسترس میکروب‌های دیگر و میزبان خارج شود و در نتیجه، یکی از فاکتورهای مؤثر در بیماری‌زایی بیمارگرها محسوب می‌شوند. در باکتری‌هایی که قدرت هسته یخ زیادی داشتند، تحرک و میزان تولید پایووردین افزایش یافت، در حالی که حساسیت به پراکسید هیدروژن کم شده بود. درباره جدایه‌های با

## REFERENCES

1. Beattie, G.A. & Lindow, S.E. (1995). The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. *Annual Review of Phytopathology*, 33, 145-172.
2. Camilli, A. & Bassler, B.L. (2006). Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*, 311, 1113-1116.
3. Chow, S., Kevin, G., Jiang, L. & Nassour, A. (2011). Salicylic acid affects swimming, twitching and swarming motility in *P. aeruginosa*, resulting in decreased biofilm formation. *Journal of experimental microbiology and immunology*, 15, 22-29.
4. Deziel, E., Lepine, F., Milot, S. & Villemur, R. (2003). *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting Swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acid (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology*, 149, 2005-2013.
5. Duffy, B.K. & Efago, G.D. (1997). Zinc improves biocontrol of Fusarium crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology*, 87, 1250-1257.
6. Dumenyo, C.K., Mukherjee, A., Chun, W. & Chatterjee, A.K. (1998). Genetic and physiological evidence for the production of N-acyl homoserine lactones by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and other fluorescent plant pathogenic *Pseudomonas* species. *European Journal of Plant Pathology*, 104, 569-582.
7. Elasri, M., Delorme, S., Lemanceau, P., Stewart, G., Laue, B., Glickman, E., Oger, P.M. & Dessaux, Y. (2001). Acyl-homoserine lactone production is more common among plant-associated *Pseudomonas* spp. than among soilborne *Pseudomonas* spp. *Applied Environmental Microbiology*, 67, 1198-1209.
8. Fahy, P.C. & Persley, C.J. (1983). *Plant Bacterial Disease A Diagnostic Guide*. Academic Press Sidney. Australia.
9. Feil, H., Feil, W.S., Chain, P., Larimer, F., Dibartolo, G. & Copeland, A. (2005). Comparison of the complete genome sequences of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and pv. *tomato* DC3000. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102, 11064-11069.
10. Garnham, C.P., Campbell, R.L., Walker, V.K. & Davies, P.L. (2011). Novel dimeric  $\beta$ -helical model of an ice nucleation protein with bridged active sites. *BMC Structural Biology*, 11, 36.
11. Gara, L.D., Pinto, M.C. & Tommasi, F. (2003). The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 863-870.

12. Hirano, S.S. & Upper, C.D. (2000). Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae*-a pathogen, ice nucleus, and epiphyte. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 3, 624-653.
13. Kennedy, B.S., Nielsen, M.T., Severson, R.F., Sisson, V.A., Stephenson, M.K. & Jackson, D.M. (1992). Leaf surface chemicals from *Nicotiana* affecting germination of *Peronospora tabacina* (Adam) sporangia. *Journal of Chemical Ecology*, 18, 1467-1479.
14. Kinscherf, T.G. & Willis, D.K. (1999). Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene *ahlI*. *Journal of Bacteriology*, 181, 4133-4136.
15. Kitten, T., Kinscherf, T.G., McEvoy, J.L. & Willis, D.K. (1998). A newly identified regulator is required for virulence and toxin production in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Microbiology*, 28, 917-929.
16. Klement, Z., Farkas, G.L. & Lovrekovich, H. (1964). Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in the tobacco leaf. *Phytopathology*, 54, 474-477.
17. Kovacs, N. (1956). Identification of *Pseudomonas pyocyana* by the oxidase reaction. *Nature*, 178, 703-708.
18. Kozloff, L.M., Schofield, M.A. & Lute, M. (1983). Ice nucleating activity of *P. syringae* and *Erwinia herbicola*. *Journal of Bacteriology*, 153, 222-231.
19. Lelliott, R.A. & Stead, D.E. (1987). *Methods for the Diagnosis of Bacterial disease of plants*. Blackwell Scientific Publication. Oxford. Boston.
20. Lindow, S.E., Arny, D.C. & Upper, C.D. (1982). Bacterial ice nucleation: A factor in frost injury to plants. *Plant Physiology*, 70, 1084-1089.
21. Lindow, S.E. & Brandl, M.T. (2003). Microbiology of the phyllosphere. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 1875-1883.
22. Loper, J.E. & Lindow, S.E. (1994). A biological sensor for iron available to bacteria in their habitats on plant surfaces. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 1934-1941.
23. Loper, J.E. & Buyer, J.S. (1991). Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 4, 5-13.
24. McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, L., Taylor, A., Chhabra S.R., Camara, M., Daykin, M., Lamb, J., Swift S., Bycroft, B.W., Stewart, G. & Williams, P. (1997). Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of *N*-acylhomoserine lactone. *Microbiology*, 143, 3703-3711.
25. McLean, R.J., Whiteley, M., Stickler, D.J. & Fuqua, W.C. (1997). Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 154, 259-263.
26. Morello, J.E., Pierson, E.A. & Pierson, L.S. (2004). Negative crosscommunication among wheat rhizosphere bacteria: effect on antibiotic production by the biological control bacterium *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Applied Environmental Microbiology* 70, 3103-3109.
27. Munsch, P., Geoffroy, V.A., Alatosava, T. & Meyer, J.M. (2000). Application of siderotyping for characterization of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas reactans* isolates associated with brown blotch disease of cultivated mushrooms. *Applied Environmental Microbiologist*, 66, 4834-4841.
28. Neilson, K.H. & Hastings, J.W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological Review*, 43, 496-518.
29. Neilands, J.B. & Leong, S.A. (1986). Siderophores in relation to plant growth and disease. *Annual Review Plant Physiology*, 37, 187-208.
30. Nejad, P. & Ramstedt, M. (2006). Presence of quorum-sensing mediated gene regulation in pathogenic Ice-Nucleation-Active (INA) bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1373-1375.
31. Pierson, E.A., Wood, D.W., Cannon, J.A. & Blachere, F.M. (1998a). LSP: interpopulation signaling via *N*-acyl-homoserine lactones among bacteria in the wheat rhizosphere. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 11, 1078-1084.
32. Pierson, L.S., Derek, W.W. & Pierson, E.A. (1998b). Homoserine lactone-mediated gene regulation in plant-associated bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 36, 207-225.
33. Quinones, B., Pujol, C.J. & Lindow, S.E. (2004). Regulation of AHL production and its contribution to epiphytic fitness in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 17, 521-531.
34. Quinones, B., Dulla, G. & Lindow, S.E. (2005). Quorum sensing regulates exopolysaccharide production, motility, and virulence in *Pseudomonas syringae*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 18, 682-693.
35. Redfield, R.J. (2002). Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiology*, 10, 365-370.

36. Ren, D., Zuo, R. & Wood, T.K. (2005). Quorum-sensing antagonist (5Z)-4bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone influences siderophore biosynthesis in *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 66, 689-695.
37. Schaad, N.W., Jones, J.B. & Chun, C. (2001). *Laboratory Guide for identification of plant pathogenic bacteria*. 3rd ed. St Paul, Minnesota, American Phytopathological Society Press.
38. Shepherd, R.W. & Lindow, S.E. (2009). Two dissimilar N-acyl-homoserine lactone acylases of *Pseudomonas syringae* influence colony and biofilm morphology. *Applied Environmental Microbiology*, 75, 45-53.
39. Shrout, J.D., Chopp, D.L., Just, C.L., Hentzer, M., Givskov, M. & Parsek, M.R. (2006). The impact of quorum sensing and swarming motility on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation is nutritionally conditional. *Molecular Microbiology*, 62, 1264-1277.
40. Taguchi, F., Suzuki, T., Inagaki, Y., Toyoda, K., Shiraishi, T. & Ichinosa, Y. (2010). The siderophore pyoverdine of *Pseudomonas syringae* pv. *Tabaci* 6605 is an intrinsic virulence factor in host tobacco infection. *American Society for Microbiology*, 192, 117-126.
41. Tarighi, S. (2007). The role of quorum sensing in physiology and pathogenicity of *Pseudomonas syringae*. *First Congress of Biotechnology and their Usages*, Mashhad. (In farsi).
42. Tarighi, S. & Taheri, P. (2011). The role of a periplasmic gluconolactonase (PpgL)-like protein in *Pseudomonas syringae* pv. *Syringae* B728a. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27, 1303-1311.
43. Toth, I.K., Newton, J.A., Hyman, L.J., Lees, A.K., Daykin, M., Ortori, C., Williams, P. & Fray, R.G. (2004). Potato plants genetically modified to produce N-acylhomoserine lactones increase susceptibility to soft rot *Erwinia*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 17, 880-887.
44. Von Bodman, S.B., Bauer, W.D. & Coplin, D.L. (2003). Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 455-482.
45. Whitehead, N.A., Barnard, A.M.L., Slater, H., Simpson, N.J.L. & Salmond, G.P.C. (2001). Quorum-sensing in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Review*, 25, 365-404.

## **An investigation on the correlation of some virulence factors with ice nucleation activity in *Pseudomonas syringae* strains isolated from stone fruit trees**

**Elaheh Taheri<sup>1</sup>, Saeed Tarighi<sup>2\*</sup> and Parissa Taheri<sup>2</sup>**

1, 2. Former M.Sc. Student and Associate Professors, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

(Received: Apr. 13, 2015 - Accepted: Aug. 18, 2015)

### **ABSTRACT**

The quorum sensing is a phenomenon which controls the production of virulence factors in some bacteria. But the correlation between the ice nucleation activities which is one of the most important virulence factor in *P. syringae* with this system is unknown. In order to investigate that, in spring of 2013, 248 samples (including leaves and flowers) were collected from twigs of stone fruit trees in Khorasan Razavi province. Ice nucleation active bacteria, were identified and among them the *P. syringae* isolates were distinguished by LOPAT tests. Among virulence factors three of them such as swarming motility, susceptibility to hydrogen peroxide and pyoverdine production were studied. The swarming motility of the isolates with high ice nucleation activity were significantly more than those isolates which indicated low ice nucleation activity. There was no significant difference in susceptibility to hydrogen peroxide and pyoverdine production between high and low ice nucleation active isolates. The production of homoserine lactones in six selected *P. syringae* belonged to the different groups of ice nucleation activity were extracted and detected using *Chromobacter violaceum* CV026 which was overlaid on Thin-layer chromatography plates. Our results indicated direct correlation between ice nucleation activity and the amount of homoserine lactone production and confirmed that the hypermotile isolates have high ice nucleation activity.

**Keywords:** bacteria, homoserine lactone, ice nucleation, quorum sensing.