

## شناسایی برخی از ژن‌های دخیل در بیماریزایی استرین بومی باکتری *Erwinia amylovora* با استفاده از روش جهش‌زایی تصادفی

مسعود صاحبی<sup>۱</sup>، سعید طریقی<sup>۲\*</sup> و پریسا طاهری<sup>۳</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۷/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۱۸)

### چکیده

باکتری گرم منفی *Erwinia amylovora* عامل بیماری آتشک، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های درختان دانه‌دار به شمار می‌رود. هدف این مطالعه ایجاد بانک جهش یافته‌های ترانسپوزونی در باکتری *E. amylovora* به منظور شناسایی ژن‌های دخیل در بیماریزایی باکتری بود. از ترانسپوزون mini-Tn5 lacZ1 برای ایجاد کتابخانه جهش‌زایی ترانسپوزونی در استرین بومی *E. amylovora* استفاده شد. از بین ۱۵۰۰ پرگنه جهش یافته، دو پرگنه که دارای قدرت بیماریزایی کمتری بر روی میوه‌های گلابی نارس بودند انتخاب شدند. نتایج تعیین توالی DNA جهش یافته‌های منتخب نشان دهنده وقوع الحاق ترانسپوزون در یک ژن از خانواده تنظیم کننده بیانی *araC* و یک ژن از گروه non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) بود. این تحقیق نشان دهنده تأثیر ژن تنظیم کننده بیانی *araC* و ژن NRPS در بیماریزایی باکتری *E. amylovora* می‌باشد. بررسی‌های بیشتری برای پی بردن به نقش این دو ژن در فیزیولوژی و پر آزاری باکتری *E. amylovora* مورد نیاز است.

کلیدواژه: آتشک، ترانسپوزون، *araC*، NRPS.

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: starighi@um.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.
۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.
۳. دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.

## Identification of some genes involved in pathogenicity of an *Erwinia amylovora* native strain by random mutagenesis method

M. Sahebi<sup>1</sup>, S. Tarighi<sup>2\*</sup>, and P. Taheri<sup>3</sup>

(Received: 13.10.2018; Accepted: 9.3.2019)

### Abstract

*Erwinia amylovora* is a gram-negative bacterium that causes fire blight, an important disease in pome fruit trees. The aim of this study was to generate a transposon mutant library using mini-Tn5 lacZ1, in an *Erwinia amylovora* native isolate for identification of some virulence associated genes in this strain. Among 1500 mutated colonies, two colonies which indicated less virulence on immature pear fruits were selected for further analysis. The DNA sequencing results of the two selected mutants showed a transposon insertion in an *araC* family transcriptional regulator gene and an insertion in nonribosomal peptide synthetase (*NRPS*). This study demonstrated that the *araC* transcriptional regulator and the *NRPS* genes are required for full virulence of *E. amylovora*. More studies are necessary to identify the role of these genes in physiology and virulence of *E. amylovora*.

**Keywords:** *araC*, Fire blight, *NRPS*, Transposon

---

\*Corresponding author's E-mail: starighi@um.ac.ir

1. PhD student in Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad..

2. Associate Professor in Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

3. Associate Professor in Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

## مقدمه

باکتری *E. amylovora* دو نوع از پلی ساکاریدهای خارج سلولی شامل هتروپلی ساکارید آمیلووران و هوموپلی ساکارید لوان را سنتز می‌کند. لوان یک هوموپلیمر از دنباله‌های فروکتوز است که به‌وسیله آنزیم لوان سوکراز سنتز می‌شود. جهش یافته‌هایی که میزان لوان کمتری تولید می‌کردند بیماریزای کمتری در مقایسه با تیپ وحشی داشتند (Gross et al. 1992)، هر چند سوبه‌هایی در طبیعت شناسایی شده است که با وجود کاهش تولید لوان قدرت بیماریزایی خود را حفظ کرده‌اند (Bereswill et al. 1997). از طرف دیگر پلی ساکارید آمیلووران ممکن است دارای نقش‌های گوناگونی در باکتری باشد زیرا که جهش یافته‌هایی که فاقد توانایی تولید آمیلووران هستند، قدرت بیماریزایی خود را کاملاً از دست می‌دهند. علاوه بر این در باکتری *E. amylovora* ارتباط مستقیمی بین میزان تولید آمیلووران و شدت بیماریزایی وجود دارد (Gross et al. 2015). مطالعات اخیر نشان دهنده نقش ضروری آمیلووران در تشکیل بیوفیلم باکتری در آوند چوبی میزبان بوده و موجب حفاظت باکتری در برابر شرایط تنش می‌شود (Ordax et al 2010).

نقش بیوفیلم در بیماریزایی باکتری عامل بیماری آتشک به درستی مشخص نشده است، اما نشان داده شده جهش یافته‌هایی که توانایی تشکیل بیوفیلم در آن‌ها کاهش یافته بود قادر به کلونیزه کردن آوندهای چوبی گیاه میزبان نبودند و این در حالی است که کلونیزه کردن آوندهای چوبی برای حرکت سیستمیک باکتری در گیاه میزبان ضروری است. (Pique et al 2015). نتایج نشان داده است سیدروفور دارای نقش مهمی در باکتری *E. amylovora* در کسب آهن در روند بیماریزایی است و علاوه بر آن موجب نشت الکترولیت از سلول‌های گیاه میزبان می‌شود. بر این اساس تاکنون دو نقش مهم برای سیدروفور در فرآیند

بیماری آتشک (Fire blight) ابتدا در سال ۱۷۸۰ میلادی بر روی گیاهان خانواده گل‌سرخیان مشاهده و در سال ۱۸۸۴ میلادی به‌عنوان یک بیماری باکتریایی در گیاهان شناخته شد. (Van der Zwet & Keil 1979). این بیماری هم‌اکنون به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های باکتریایی گیاهان در سرتاسر جهان و از جمله خاورمیانه و ایران شناخته می‌شود (Norelli et al. 2003). باکتری *Erwinia amylovora* (Burrill) عامل بیماری آتشک، در طبیعت قادر به آلوده کردن شکوفه‌ها، میوه‌ها، ساقه‌های رویشی و بافت‌های چوبی است و منجر به سوختگی شکوفه، میوه و ساقه می‌شود (Eastgate 2000). معمولاً سوختگی شکوفه‌ها اولین علامت بیماری در ابتدای بهار است که متعاقب آن موجب آلودگی میوه‌های جوان می‌گردد (Thomson 1986).

باکتری *E. amylovora* یک بیمارگر آوندی نکرُوژنیک با شدت بیماری بالا است. از جمله فاکتورهای مؤثر بر بیماریزایی این باکتری سیستم ترشحی نوع سوم، پلی-ساکاریدهای خارج سلولی مانند آمیلووران و لوان، آنزیم پروتئاز، سیدروفور دسفری آگزامین و ژن‌های مشارکت کننده در متابولیسم سوربیتول و گلوکز هستند (Gross et al. 2015).

در باکتری *E. amylovora* خوشه ژنی *hrp* روی جزیره بیماریزایی شماره یک باکتری قرار دارد که چیزی در حدود ۶۰ کیلوباز است (Kim & Beer 2001). خوشه ژنی *hrp* در این باکتری به سه زیرناحیه تقسیم می‌شود که شامل منطقه *hrp/hrc*، منطقه افکتور *Hrc* و الیستوتورها (HEE) و منطقه آنزیم‌های وابسته به *Hrp* (HAE) است (Oh et al. 2005).

در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و یک چرخه امتداد نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Bereswill et al. 1992). پس از انجام واکنش PCR محصولات حاصل روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند. برای اطمینان از تشخیص گونه باکتری، تعیین توالی نوکلئوتیدی توسط شرکت بایونیر (Bioneer) کره جنوبی انجام شد.

### E. ایجاد جهش ترانسپوزونی در استرین ایرانی *amylovora*

به منظور ایجاد موتاسیون تصادفی از سویه باکتری *Escherichia coli* cc118  $\lambda$ pir که حامل ترانسپوزون mini Tn-5 lacZ1 روی پلاسمید PUT خود بود به عنوان باکتری دهنده (Donor) استفاده شد. قطعه ترانسپوزون حامل ژن معرف *lacZ* و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین بود (Lorenzo et al. 1990)، همچنین از باکتری *E. coli* HB101 که حامل پلاسمید pRK6001 بود، به عنوان باکتری کمکی (Helper) استفاده شد. انتقال ترانسپوزون به صورت کانجوگیشن سه عضوی (Triparental mating) روی محیط کشت جامد انجام شد. برای غربالگری، توده کانجوگیت شده در آب مقطر سترون سوسپانسیون و روی محیط انتخابی حداقل (M9) دارای گلوکز ۰/۲ درصد حاوی آنتی بیوتیک کانامایسین (۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) پخش شد (Bellemann & Geider 1992). محیط‌های کشت به مدت ۴۸-۷۲ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شد. پرگنه‌های ترنس کانجوگیت شده *E. amylovora* که به دلیل دریافت ترانسپوزون روی محیط انتخابی رشد کرده بودند جداسازی شدند.

بیماریزایی باکتری عامل بیماری آتشک تعیین شده است (Pique et al. 2015).

هدف این مطالعه ایجاد بانک جهش یافته‌های ترانسپوزونی در استرین بومی باکتری *E. amylovora* UMG3 جدا شده از گلابی به منظور شناسایی برخی از ژن‌های دخیل در بیماریزایی باکتری بود.

### مواد و روش‌ها

#### جداسازی و شناسایی استرین‌های باکتری

به منظور جداسازی استرین‌های باکتری *E. amylovora*، در بهار سال ۱۳۹۵ از گیاهان آلوده سیب، گلابی و به نمونه‌هایی تهیه و در یخچال نگهداری شدند. قسمت‌های آلوده گیاهان شامل برگ، شاخه و میوه در هاون چینی سترون و درون آب مقطر دو بار سترون بخوبی کوبیده و یک لوپ کامل از سوسپانسیون حاصل روی محیط نوترینت آگار به صورت چند ضلعی کشت و تشتک‌های پتری به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شد. پرگنه‌های شیری رنگ رشد یافته روی محیط کشت جهت خالص سازی و شناسایی برداشته شدند. برای شناسایی استرین‌های باکتری از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس استفاده شد. بدین منظور از آغازگرهای اختصاصی پلاسمید pEA29 شامل آغازگر A (5'-CGGTTTTTAACGCTGGG-3') و آغازگر B (3'-GGGCAAATACTCGCATT-) استفاده شد (Bereswill et al. 1992). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس به صورت یک چرخه واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت چهار دقیقه و سی چرخه شامل واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در ۵۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، امتداد

## آزمون بیماری‌زایی جهش‌یافته‌ها

به منظور مقایسه قدرت بیماری‌زایی جهش یافته‌ها با تیپ وحشی باکتری *E. amylovora*، از آزمون بیماری‌زایی روی میوه‌های نارس گلابی رقم قوسی استفاده شد. میوه‌های گلابی بوسیله اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سپس برای خشک شدن در زیر هود میکریولوژی قرار داده شدند. از کشت شب گذران باکتری‌ها غلظتی به میزان  $1 \times 10^8$  CFU/ml تهیه و سپس ۲ میکرولیتر از سوسپانسیون هر باکتری بداخل چاهک‌هایی که قبلاً توسط چوب پنبه سوراخ کن سترون روی میوه گلابی ایجاد شده بود، ریخته شد. میوه‌ها به مدت یک هفته درون ژرمیناتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۰ درصد نگهداری شدند (Zhao et al. 2009). روی هر میوه تعداد پنج چاهک تعبیه شد که یک چاهک برای تیپ وحشی باکتری *E. amylovora* و چهار چاهک برای جهش یافته‌های ترانسپوزونی بود. قطر و عمق ناحیه نکروزه یا لهیده شده توسط جهش یافته‌ها بر روی گلابی‌ها در مقایسه با تیپ وحشی باکتری نشانگر قدرت بیماری‌زایی استرین‌ها بود (Zhao et al. 2009).

## شناسایی و ردیابی ترانسپوزون در جهش یافته‌ها

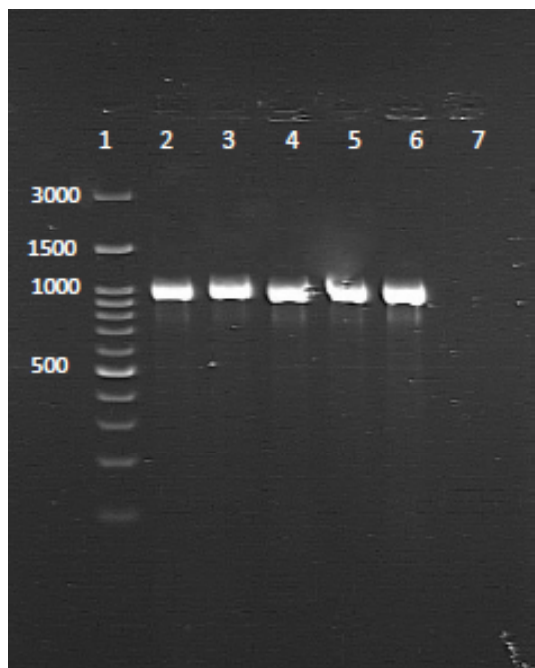
به منظور اطمینان یافتن از انتقال ترانسپوزون به استرین بومی باکتری *E. amylovora*، جهش یافته‌ها روی محیط نوترینت آگار حاوی X-gal و IPTG جهت رؤیت تولید رنگ آبی توسط باکتری‌های جهش یافته کشت داده شدند (Sambrook & Russell 2002). با توجه به توالی قطعه ترانسپوزون (با شماره دسترسی AF498082.1 در پایگاه NCBI) آغازگرهایی اختصاصی برای ژن *lacZ* (-) 5' / 3'-TCAACATCAGCCGCTACAG- و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین (AGCCATTACGCTCGT- 5' /

3'-CATC) در این تحقیق با نرم‌افزار Primer Premier 5 طراحی شد (Lalitha 2000)، که ناحیه‌ای را به اندازه ۱۱۹۰ جفت باز روی قطعه ترانسپوزون تکثیر می‌کرد. واکنش PCR بصورت یک چرخه واسرشته سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه و سی چرخه شامل واسرشته سازی در ۹۴ درجه سلسیوس برای مدت یک دقیقه، اتصال آغازگرها در ۵۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، امتداد در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و یک چرخه امتداد نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR به وسیله آنزیم برشگر *HindIII* (تهیه شده از شرکت فرمتاز) و مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. محصول PCR و نمونه حاصل از هضم آنزیمی روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شد (Berry et al. 2009).

## انجام واکنش زنجیره‌ای پلی مرز معکوس (IPCR) برای شناسایی محل قرار گرفتن ترانسپوزون در ژنوم جهش یافته‌ها

برای شناسایی ناحیه الحاق شده ترانسپوزون روی ژنوم باکتری‌های جهش یافته از واکنش IPCR (Inverse PCR) استفاده شد. واکنش IPCR نوعی از واکنش زنجیره‌ای پلی-مرز است که می‌توان در آن بواسطه مشخص بودن توالی خاصی از ژنوم، نواحی ناشناخته اطراف را تکثیر و مورد تعیین توالی قرار داد. در این شیوه ابتدا ژنوم توسط یک آنزیم برشگر هضم و خطی می‌شود، سپس توسط آنزیم لیگاز بصورت حلقوی درآمده و در واکنش IPCR تکثیر می‌شود (Martin & Mohn 1999).

بدین منظور ابتدا DNA باکتری استخراج (Leach et al. 1990) و سپس مقدار ۱۵۰ نانوگرم از DNA بوسیله آنزیم



شکل ۱- محصول PCR تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای A و B پلاسمید pEA29 باکتری *Erwinia amylovora*. چاهک ۱: DNA مارکر یک کیلوبازی (فرمتناز)، چاهک‌های ۲ تا ۶: استرین‌های *E. amylovora*، چاهک ۷: کنترل منفی

**Fig 1. PCR products amplified with A and B primers of pEA29 plasmid of *Erwinia amylovora*. Lane1: GeneRuler™ 3 kb DNA Ladder (Fermentas), lanes 2 to 6: *E. amylovora* strains, lane7: Negative control**

(Bereswill *et al.* 1992) (شکل ۱). یکی از استرین‌های جدا شده از گلابی با نام *E. amylovora* UMG3 که شدت بیماریزایی بسیار بالایی داشت برای انجام جهش‌زایی ترانسپوزونی انتخاب شد. بنابراین برای اطمینان بیشتر از تشخیص گونه این استرین، محصول PCR بدست آمده از تکثیر با آغازگرهای A و B تعیین توالی شد. نتیجه نشان دهنده شباهت ۱۰۰ درصدی استرین UMG3 با استرین آمریکایی *E. amylovora* ATCC 49946 جدا شده از میزبان گلابی (با شماره دسترسی FN666575.1 در پایگاه NCBI) بود.

برشگر *psfI* (تهیه شده از شرکت فرمتناز) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده هضم و بعد به‌وسیله آنزیم T4 DNA *ligase* (تهیه شده از شرکت تاکارا) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده به‌صورت حلقوی درآمد (Martin & Mohn 1999). از آغازگرهای IPF (5' -) و IPR (3' -) (GTGCTGCAAGGCGATTAAG- 3' -) طراحی شده در این تحقیق با نرم افزار Primer Premier 5، که روی ناحیه ترانسپوزون قرار داشتند برای واکنش IPCR استفاده شد. واکنش IPCR به‌صورت یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت پنج دقیقه، سی چرخه شامل واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه، اتصال در ۵۳ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه، امتداد در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت دو دقیقه و یک چرخه امتداد نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (Ochman *et al.* 1988). بخشی از محصول PCR برای تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت بایونیر (Bioneer) کره جنوبی ارسال و نتایج بوسیله نرم افزار بلاست (McGinnis & Madden 2004) در پایگاه داده‌ای NCBI بررسی شد.

## نتایج

### شناسایی استرین‌های باکتری

تعداد ۲۸ استرین باکتری از گیاهان گلابی، به و سیب از نواحی مختلف شهر مشهد جمع‌آوری شدند. از این تعداد ۱۸ استرین مربوط به گلابی، شش استرین مربوط به درخت به و چهار استرین مربوط به سیب بود. تکثیر قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی توسط آغازگرهای A و B نشان‌دهنده تعلق تمامی استرین‌ها به گونه *E. amylovora* بود.



شکل ۲- علائم ایجاد شده به وسیله باکتری *Erwinia amylovora* روی میوه‌های نارس گلابی رقم قوسی هشت روز پس از مایه‌زنی. (A) تیپ وحشی باکتری، (B) جهش یافته UMG3-10D، (C) جهش یافته UMG3-61A.

**Fig 2. Symptoms of *Erwinia amylovora* on immature pear fruits of Ghowsi cultivar at 8 days post inoculation. (A) Wild-type, (B) UMG3-10D mutant, (C) UMG3-61A mutant.**

تمامی جهش یافته‌ها به دلیل دریافت ترانسپوزون قابلیت رشد روی محیط کشت حاوی کانامایسین را داشتند. نتایج بررسی نشان داد که جهش یافته‌های *E. amylovora* به- دلیل دارا بودن ترانسپوزون حامل ژن *lacZ* توانایی استفاده از x-gal را داشته و پرگنه‌های باکتری روی محیط کشت حاوی x-gal، آبی رنگ می‌شدند. علاوه بر این در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با آغازگرهای اختصاصی ژن‌های *lacZ* و *km*، قطعه‌ای به اندازه ۱۱۹۰ جفت باز تکثیر شد. در هضم آنزیمی محصول PCR بوسیله آنزیم برشگر *HindIII* دو باند در اندازه‌های ۲۷۰ و ۹۲۰ جفت باز به- دست آمد که با توالی قطعه ترانسپوزون مطابقت داشت (شکل ۳). برای شناسایی ناحیه الحاق شده ترانسپوزون (شکل ۳) mini-Tn5 *lacZ1* بر روی ژنوم دو باکتری جهش یافته منتخب که کمترین شدت بیماریزایی را داشتند از واکنش PCR (Inverse PCR) استفاده شد. محصول PCR مربوط

#### ایجاد جهش و انتخاب جهش یافته‌های برتر

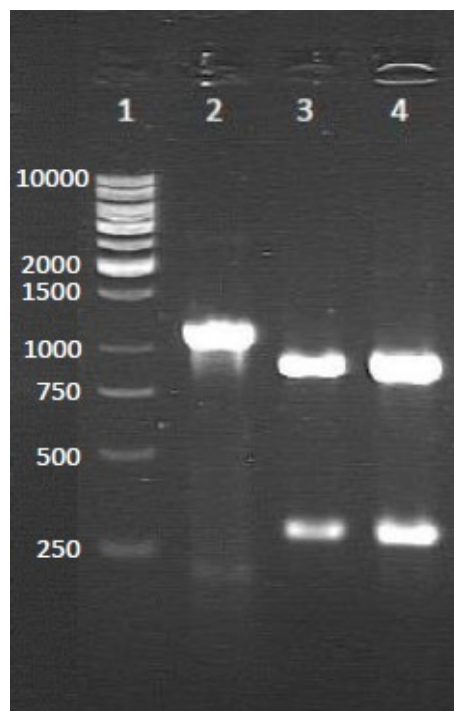
پس از انجام کانجوگیشن سه عضوی در استرین *E. amylovora* UMG3، تعداد ۱۵۰۰ پرگنه جهش یافته جداسازی و به صورت یک کتابخانه جهش یافته نگهداری شدند. آزمون بیماریزایی روی میوه‌های گلابی نارس رقم قوسی برای تمامی جهش یافته‌ها انجام شد. دو جهش یافته UMG3-10D و UMG3-61A که کمترین شدت بیماریزایی را در مقایسه با تیپ وحشی نشان دادند (شکل ۲) انتخاب گردیدند. قطر ناحیه نکروزه روی میوه نارس گلابی در تیپ وحشی و جهش یافته‌های UMG3-10D و UMG3-61A به ترتیب برابر با ۳۵، ۱۰ و ۱۷ میلی‌متر بود. ردیابی محل قرار گرفتن ترانسپوزون در ژنوم جهش یافته‌های منتخب بر خلاف استرین وحشی (*E. amylovora* UMG3)،

*AraC* و لوکوس ژنی EAM 2971 مربوط به یک ژن از از گروه *non-ribosomal peptide synthetase (NRPS)* ها هستند.

### بحث

در سالیان اخیر استفاده از عناصر قابل انتقال از جمله ترانسپوزون‌ها به ابزاری مناسب برای ایجاد جهش در باکتری‌ها تبدیل شده است. ترانسپوزون‌ها به دلیل قابلیت جابجایی روی ژنوم و همچنین قابلیت انتقال افقی بین باکتری‌ها دارای کاربرد فراوانی در این زمینه هستند (Martiel 2002). ویژگی عناصر قابل انتقال در باکتری‌ها، آن‌ها را به ابزاری مناسب برای کاربردهای مختلف مانند شناسایی و بررسی عملکرد ژن‌های مختلف تبدیل کرده است. استفاده از فرآیند انتقال ترانسپوزون در گیاهانی مانند *Caenorhabditis elegans* و مگس سرکه نیز موفقیت آمیز بوده است (Ford & Olson 1998). ترانسپوزون‌ها علاوه بر ایجاد اختلال در بیان ژن به دلیل دارا بودن نشانگرهای ویژه از جمله ژن‌های مقاومت به آنتی بیوتیک باعث بروز صفات فنوتیپی جدید نیز می‌شوند که شناسایی جهش یافته‌های حاصل از الحاق ترانسپوزونی را آسان می‌سازند (Layer et al. 2013).

استفاده از جهش ترانسپوزونی در باکتری *E. amylovora* نیز مورد استفاده قرار گرفته است. ایجاد کتابخانه جهش یافته‌های ترانسپوزونی نشان داد که جهش یافته‌ای در ژن *waaL* نسبت به پراکسید هیدروژن حساسیت بیشتری داشته است. این ژن در بیوستز لیپوبلی ساکارید نقش دارد. جهش یافته ژن *waaL* همچنین دارای کاهش شدت بیماریزایی بود (Berry et al. 2009). راموس و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که ایجاد جهش ترانسپوزونی در ژن *argD* باکتری عامل بیماری آتشک منجر به کاهش



شکل ۳- محصول PCR ناحیه اطراف ترانسپوزون در موتانت‌ها. چاهک ۱: DNA مارکر یک کیلوبازی (فرمتاز)، چاهک ۲: محصول PCR با اندازه ۱۱۹۰ جفت باز، چاهک‌های ۳ و ۴: قطعه‌های ۹۲۰ و ۲۷۰ جفت‌بازی بدست آمده پس از برش با آنزیم

### *HindIII*

Fig 3. PCR product of transposon flanking region in the mutants. Lane1: GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas), lane2: PCR product with 1190 bp size, lanes3,4: 920 bp and 270 bp obtained fragments after digestion with *HindIII*

به دو جهش یافته *E. amylovora* UMG3-10D و *E. amylovora* UMG3-61A برای تعیین توالی نوکلئوتیدی انتخاب شدند. توالی‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار بلاست در پایگاه NCBI بررسی شد. نتایج نشان‌دهنده شباهت ۹۹ درصدی توالی جهش یافته *E. amylovora* UMG3-10D و شباهت ۹۸ درصدی توالی جهش یافته *E. amylovora* UMG3-61A با لوکوس ژنی EAM 2961 و شباهت ۹۸ درصدی توالی جهش یافته *E. amylovora* UMG3-61A با لوکوس ژنی EAM 2971 در استرین آمریکایی *E. amylovora* ATCC 49946 بود. لوکوس ژنی EAM 2961 مربوط به یک ژن تنظیم‌کننده بیانی متعلق به خانواده



بیماری‌زایی باکتری در گیاه سیب و میوه‌های نارس گلابی می‌شود. نتایج آنان نشان داد که جهش یافته‌های *argD* قادر به تأمین آرژنین مورد نیاز خود از گیاه سیب و میوه‌های گلابی نیستند (Ramos et al. 2014). ایجاد جهش ترانسپوزونی نشان داد که ژن *rpoN* در باکتری *E. amylovora* علاوه بر کاهش قدرت بیماری‌زایی باکتری بر روی القای واکنش فوق حساسیت در گیاه توتون نیز دخیل است (Ramos et al. 2013).

در مطالعه حاضر با استفاده از ترانسپوزون mimi-Tn5 lacZ1 که بر روی پلاسمید PUT باکتری *E. coli* cc118 قرار داشت برای ایجاد کتابخانه جهشی در استرین بومی باکتری *E. amylovora* UMG3 استفاده شد. نتایج تعیین توالی نشان‌دهنده وقوع جهش در یک ژن تنظیم کننده بیانی از خانواده *AraC* در جهش یافته *E. amylovora* UMG3-10D و یک ژن از گروه non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) در جهش یافته *E. amylovora* UMG3-61A بود.

ژن‌های گروه non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) دارای نقش‌های گوناگونی در باکتری‌ها هستند از جمله نقش‌های این گروه از ژن‌ها می‌توان از دخیل بودن آنان در سنتز متابولیت‌های ثانویه مانند توکسین‌ها، سیدروفور، آنتی بیوتیک‌ها و رنگدانه‌ها را نام برد. این گروه از ژن‌ها در میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌ها و قارچ‌ها دارای پراکندگی هستند (Wang et al. 2014). نقش این ژن‌ها در بیماری‌زایی میکروارگانیسم‌ها به اثبات رسیده است. نتایج نشان دهنده اهمیت و نقش این ژن‌ها در سنتز سیدروفور و لیپوپپتید در باکتری *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Etcheagaraya et al. 2004)، تولید سیدروفور، جذب آهن و تحمل به پراکسید هیدروژن در قارچ‌های آسکومیست (Oide et al. 2006) بوده است. بررسی‌ها نشان داده است که ژن‌های NRPS در باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* در سنتز توکسینی موسوم به مانگوتوکسین نقش داشته و در بیماری‌زایی باکتری روی انبه دخیل است (Arrebola et al. 2007)، در قارچ *Trichoderma virens* نشان داده شده است که یک

تنظیم کننده‌های بیانی خانواده *AraC* یکی از بزرگترین گروه‌های تنظیم کننده در باکتری‌ها هستند. این تنظیم کننده‌ها در فرآیندهای مختلف سلولی از جمله متابولسیم کربن، پاسخ به تنش‌ها و بیماری‌زایی نقش دارند. در حالت کلی پروتئین‌های این گروه دارای حدود ۳۰۰ اسیدآمینو بوده و از دو دامنه شامل انتهای آمینی که مسئول ایجاد اتصال با لیگاند است و حفظ‌شدگی کمتری دارد و انتهای کربوکسیلی که با داشتن ساختار helix-turn-helix (HTH) مسئول اتصال به DNA هدف بوده و حفظ‌شدگی بالایی دارد تشکیل شده‌اند (Yang et al. 2011). نقش تنظیم کننده‌های بیانی *AraC* در بیماری‌زایی تعدادی از باکتری‌ها مطالعه شده است. نتایج یک پژوهش در باکتری *E. amylovora* نشان داد که چهار ژن همولوگ شامل *rob*

شد. آزمون بیماریزایی انجام شده بر روی میوه‌های نارس گلابی رقم قوسی نشان دهنده کاهش شدت بیماریزایی در جهش یافته‌های ترانسپوزونی ژن‌های مذکور در مقایسه با تیپ وحشی باکتری بود. بررسی‌های بیشتری برای مشخص شدن نقش ژن‌های مزبور در فیزیولوژی و روند بیماریزایی باکتری *E. amylovora* مورد نیاز است.

ژن از گروه NRPS بر روی قدرت کلونیزه کردن ریشه گیاه میزبان توسط قارچ مذکور اثرگذار است ( Mukherjee et al. 2012 ).

در این تحقیق با ایجاد جهش‌زایی ترانسپوزونی نقش ژن‌هایی از خانواده تنظیم کننده بیانی *araC* و همچنین گروه NRPS در بیماریزایی باکتری *E. amylovora* روشن

## منابع

- Anderson E.S., Paulley J.T. and Roop R.M. 2008. The AraC-like transcriptional regulator DhbR is required for maximum expression of the 2,3-Dihydroxybenzoic Acid biosynthesis genes in *Brucella abortus* in response to iron deprivation. *Journal of Bacteriology* 190:1338-1342.
- Arrebola E., Cazorla M.F., Romero D., Perez-Garcia A. and de Vicente A. 2007. A nonribosomal peptide synthetase gene (*mgoA*) of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* is involved in Mangotoxin biosynthesis and is required for full virulence. *Molecular Plant and Microbe Interaction* 20:500-509.
- Bellemann P. and Geider K. 1992. Localization of transposon insertions in pathogenicity mutants of *Erwinia amylovora* and their biochemical characterization. *Journal of General Microbiology* 138:931-940.
- Bereswill S., Jock S., Aldridge P., Jansen J.D. and Geider K. 1997. Molecular characterization of natural *Erwinia amylovora* strains deficient in levan synthesis. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 51:215-225.
- Bereswill S., Pahl A., Bellemann P., Zeller W. and Geider K. 1992. Sensitive and species-specific detection of *Erwinia amylovora* polymerase chain reaction analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3522-3526.
- Berry M.C., McGhee G.C., Zhao Y. and Sundin G.W. 2009. Effect of a *waaL* mutation on lipopolysaccharide composition, oxidative stress survival, and virulence in *Erwinia amylovora*. *FEMS Microbiology* 291:80-87.
- Brook S.J. and Russell D.W. 2002. Molecular cloning: a laboratory manual. Science press, Beijing.
- Eastgate J.A. 2000. *Erwinia amylovora*: the molecular basis of fire blight disease. *Molecular Plant Pathology* 1:325-329.
- Etchegaraya A., Silva-Stenicoa M.E., Moona D.H. and Tsaia S.M. 2004. In silico analysis of nonribosomal peptide synthetases of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: identification of putative siderophore and lipopeptide biosynthetic genes. *Microbiological research* 159:425-437.
- Ford S. and Olson B.H. 1998. Methods for detecting genetically engineered microorganisms in the environment. *Advance Microbe Ecology* 10:45-79.
- Frota C.C., Papavinasundaram K.G., Davis E.O. and Colston M.J. 2004. The AraC family transcriptional regulator Rv1931c plays a role in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* 72:5483-5486.
- Gross M., Geier G., Rudolph K. and Geider K. 1992. Levan and levansucrase synthesized by the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Physiology and Molecular Plant Pathology* 40:371-381.
- Gross D.C., Lichens-Park A. and Kole C. 2015. Genomics of plant-associated bacteria. Springer press 238 pp.
- Kim J.F. and Beer S.V. 2001. Molecular basis of the Hrp pathogenicity of the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*: a type III protein secretion system encoded in a pathogenicity island. *Plant Pathology Journal* 17:77-82.
- Lalitha S. 2000. Primer premier 5. Biotech Software and Internet Report 1:270-272.
- Layer A., Barbour E., Azhar E., El Sahabi A.A. and Qadri I. 2013. Transposable elements in *Escherichia coli* antimicrobial resistance. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 4:415-423.
- Leach J.E., White F.F., Rhoads M.L. and Leung H. 1990. A repetitive DNA sequence differentiates *Xanthomonas*

- campestris* pv. *oryzae* from other pathovars of *Xanthomonas campestris*. *Molecular Plant and Microbe Interaction* 3:238-246.
- Lorenzo V.D., Herrero M., Jakubzik U. and Timmis K.M. 1990. Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *Journal of Bacteriology* 172:6568-6572.
- Martiel J.L. 2002. Transposable elements and fitness of bacteria. *Theoretical Population Biology* 61:509-518.
- Martin J.J.V. and Mohn W.W. 1999. An alternative inverse PCR (IPCR) method to amplify DNA sequences flanking Tn5 transposon insertions. *Journal of Microbiological Methods* 35:163-166.
- McGinnis S. and Madden T.L. 2004. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. *Nucleic Acids Research* 32:20-25.
- Mukherjee P.K., Buensanteai N., Moran-Diez M.E., Druzhinina I.S. and Kenerley C.M. 2012. Functional analysis of non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) in *Trichoderma virens* reveals a polyketide synthase (PKS)/NRPS hybrid enzyme involved in the induced systemic resistance response in maize. *Microbiology* 158:155-165.
- Norelli J.L., Jones A.L. and Aldwinckle H.S. 2003. Fire blight management in the twenty-first century: using new technologies that enhance host resistance in apple. *Plant Disease* 87:756-765.
- Ochman H., Gerber A.S. and Hartl D.L. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* 120:621-625.
- Oh C.S., Kim J.F. and Beer S.V. 2005. The *Hrp* pathogenicity island of *Erwinia amylovora* and identification of three novel genes required for systemic infection. *Molecular Plant Pathology* 6:125-138.
- Oide S., Moeder W., Krasnoff S., Gibson D., Haas H., Yoshioka K. and Turgeon B.G. 2006. NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic *Ascomycetes*. *The Plant Cell* 18:2836-2853.
- Ordax M., Marco-Noales E., Lopez M.M. and Biosca E.G. 2010. Exopolysaccharides favor the survival of *Erwinia amylovora* under copper stress through different strategies. *Research in Microbiology* 161:549-555.
- Pique N., Galbis-Minana D., Merino S. and Tomas J.M. 2015. Virulence factors of *Erwinia amylovora*: a review. *International Journal Molecular Sciences* 16:12836-12854.
- Pletzer D., Schweizer G. and Weingarta H. 2014. AraC/XylS family stress response regulators Rob, SoxS, PliA, and OpiA in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora*. *Journal of Bacteriology* 17:3098-3110.
- Ramos L.S., Lehman B.L., Peter K.A. and McNellisa W.T. 2014. Mutation of the *Erwinia amylovora argD* gene causes arginine auxotrophy, nonpathogenicity in apples, and reduced virulence in pears. *Applied and Environmental Microbiology* 80:6739-6749.
- Ramos L.S., Lehman B.L., Sinn J.P., Pfeufer E.E., Halbrecht N.O. and Mcnellis T.W. 2013. The fire blight pathogen *Erwinia amylovora* requires the *rpoN* gene for pathogenicity in apple. *Molecular Plant Pathology* 14:838-843.
- Sambrook J. and Russell D.W. 2002. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd., Science press, Beijing. 461-471.
- Thomson S.V. 1986. The role of the stigma in fire blight infections. *Phytopathology* 76:476-482.
- Van der Zwet T. and Keil H.L. 1979. Fire blight: a bacterial disease of rosaceous species. United States Department of Agriculture Handbook. 510 pp.
- Wang H., Fewer D.P., Holm L., Rouhiainen L. and Sivonen K. 2014. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *PNAS* 111:9259-9264.
- Yang J., Tauschek M. and Robins-Browne R.M. 2011. Control of bacterial virulence by AraC-like regulators that respond to chemical signals. *Cell press* 19:128-135.
- Zhao Y., Wang D., Nakka S., Sundin G.W. and Korban S.S. 2009. Systems level analysis of two-component signal transduction systems in *Erwinia amylovora*: role in virulence, regulation of amylovoran biosynthesis and swarming motility. *BMC Genomics* 10:245. 1:16.
- Zheng R., Feng X., Wei X., Pan X., Liu C., Song R., Jin Y., Bai F., Jin S., Wu W. and Cheng Z. 2018. PutA is required for virulence and regulated by PruR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology* 9: 1-12.