کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۵، شمارهٔ ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۵ (۱۶۲-۱۵۱)
DOI: 10.22059/jbioc.2016.60150

تأثیر باکتری‌های بازدارنده سیستم حدنصاب احساس بر بیماریزایی *Pectobacterium carotovorum* عامل پوسیدگی نرم سیب‌زمینی

۱. عادله سبحانی‌پور؛ ۲. کیوان بهبودی*؛ ۳. اسماعیل محمودی؛ ٤. محسن فرزانه
۱ و ۲. دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۳. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان و قطب علمی ترانسژنز، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان
٤. استادیار، پژوهشکده گیاهان و مواد دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، اوین
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/۱۲/۱۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/٤/٦)

چکیده

باکتری *Pectobacterium carotovorum* یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماریزای سیب‌زمینی در دنیا است. بیان تعدادی از ژن‌هایی که در تولید فاکتورهای بیماریزایی در این باکتری دخیل هستند با سیستم حدنصاب احساس تنظیم می‌شود. در *P. carotovorum* مولکول‌های سیگنال دخیل در این سیستم از نوع AHLs می‌باشند. در این تحقیق ۱۲۸۰ جدایه باکتری از ریزوسفر گیاهان مختلف میزبان این بیمارگر از مناطق مختلف ایران جدا شد. برای غربال آنها از جهت توان غیرفعال‌سازی AHLs از CV026 *Chromobacterium violaceum* و pSB401 *Escherchia coli* به‌عنوان گزارشگر استفاده شد. ٦۹ جدایه به میزان بسیار زیاد قادر به تجزیه AHL بودند. اندازه‌گیری میزان تجزیه AHL با روش HPLC نشان داد که در برخی جدایه‌ها هیچ میزانی از C6-HSL ردیابی نشد و به‌طور کامل توسط آنتاگونیست‌ها تجزیه شده بود. توانایی این جدایه‌های انتخابی از نظر کاهش لهیدگی غده سیب‌زمینی بررسی شد. ٤۰ جدایه توانستند بیش از ۵۰ درصد کاهش در لهیدگی غده ایجاد کنند. توانایی ١٦ جدایه برتر آنها برای کاهش پوسیدگی ساقه نیز آزمایش شد که جدایه‌های *Bacillus toyoensis* 2L، *Escherchia coli* 1M و *Acinetobacter calcoaceticus* 32P بیش از ۷۰ درصد پوسیدگی ساقه را کاهش دادند. استرین‌ها با توالی‌یابی ناحیه 16srDNA شناسایی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که مداخله در سیستم حدنصاب احساس باکتری *P.carotovorum* می‌تواند به‌عنوان یک هدف خوب برای توسعه روش کنترل بیولوژیک این بیماری مطرح باشد.

کلیدواژگان: CV026، pSB401، Quorum Sensing، کنترل بیولوژیک.

The effect of quorum quenching bacteria on pathogenicity of *Pectobacterium carotovorum* causal agent of potato soft rot

Adeleh Sobhanipour[1], Keivan Behboudi[2*], Esmaeil Mahmoudi[3] and Mohsen Farzaneh[4]
1, 2. Ph. D. Student and Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan and Transgenesis Center of Excellence, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran
4. Assistant Professor, Medicinal Plants Research Institute, Department of Agriculture, Shahid Beheshti University, Iran
(Received: Mar. 8, 2016 - Accepted: Jun. 26, 2016)

ABSTRACT

Pectobacterium carotovorum is one of the most important bacterial pathogens of potato in the world. The expression of numerous genes including those involved in the production of virulence determinants in this bacterium are regulated by quorum sensing (QS). The signal molecules involved in QS in *P. carotovorum* belong to the group of N-acyl homoserine lactones (AHLs). Recently, several soil bacteria were found to degrade AHLs, thereby interfering with the QS system. In this research, 1280 bacterial strains were isolated from potato rhizosphere in Iran. For the screening of isolates for AHL-inactivating, *Chromobacterium violaceum* CV026 and *Escherchia coli* pSB401 was used as biosensors. The 69 isolates have highly AHL-degrading potential. The AHL degradation measurement by HPLC showed that residue of C6-HSL was not detected in some isolates that means completely degradation of it by antagonists. The screened isolates tested for protect potato tubers against soft rot. 40 strains reduced tuber soft rot more than 50 percent. 16 of the best isolates were used for inhibition of stem tissue maceration. *Bacillus toyoensis* 2L, *Escherchia coli* 1M and *Acinetobacter calcoaceticus* 32P reduced stem maceration more than 70 percent. These strains were identified by 16s rDNA sequencing. These results showed that interference with *P. carotovorum* quorum sensing system can be considered as an attractive target for development of biological control method of this disease.

Keywords: biological control, Quorum Sensing, CV026, pSB401.

* Corresponding author E-mail: behbodi@ut.ac.ir Tel: +98 912 307 8378

مقدمه

کشاورزی مدرن به شدت بر استفاده از مواد شیمیایی شامل کودهای غیر آلی و آفت‌کش‌ها وابسته است که اثر شدیدی بر اکولوژی خاک داشته و منجر به تغییر یا کاهش پروبیوتیک‌های گیاهی در میکروفلور خاک، تغییر فون و فلور میکروبی و در نتیجه افزایش یا کاهش تعداد زیادی از واکنش‌های زنجیره‌ای مؤثر بر حاصلخیزی خاک می‌شود (Lo 2010). به‌علاوه تجمع سموم در بافت‌های گیاهی و حیوانی مشکلات فراوانی را از نظر بهداشت و سلامتی جامعه ایجاد کرده است. لذا در راهکارهای جدید، تأکید بر استفاده کمتر اما بهتر آفت‌کش‌ها و استفاده از روش‌های جایگزین از جمله اصلاح زیستی خاک‌های آلوده، مصرف آفت‌کش‌های زیستی، نانوآفت‌کش‌ها، آفت‌کش‌های ارگانیک و عوامل کنترل زیستی است (Kalia and Gosal 2011). گزارشات زیادی نشان می‌دهد که مقاومت باکتری‌ها به تعداد زیادی از آنتی‌بیوتیک‌ها سبب کاهش پتانسیل استفاده از مواد و روش‌های شیمیایی شده است و لذا نیاز به یک روش جایگزین برای کنترل آنها به خوبی احساس می‌شود (Czajkowski and Jafra 2009, Varga *et al*. 2011). در باکتری‌های گرم منفی سیستم کروم سنسینگ یا حدنصاب احساس (QS) ۱ وابسته به مولکول پیام‌رسان AHL۲ نقش بسیار مهمی در تنظیم فاکتورهای بیماریزایی ایفا می‌کند (Amaral and Molnar 2012, Morohoshi *et al*. 2012). در این راستا خاموشی کروم سنسینگ (QQ)۳ با آنزیم‌های تجزیه‌کننده مولکول سیگنال AHL یک روش امیدوارکننده در توسعه شیوه‌های ضدباکتریایی است (Czajkowski and Jafra, 2009, Varga *et al*. 2011). سیستم QS نوعی از فرایند تصمیم‌گیری باکتری‌هاست که برای هماهنگ کردن رفتارها و تنظیم بیان ژن بر اساس تراکم محلی جمعیت استفاده می‌شود (Zheng *et al*. 2006). در مقابل، چندین ترکیب شیمیایی و نیز تعدادی باکتری خاکزی قادرند با تجزیه AHL در QS سایر باکتری‌ها دخالت کنند که این پدیده به اختصار QQ نامیده می‌شود (Park *et al*. 2008). لذا می‌توان از این میکروارگانیسم‌ها برای کنترل و یا کاهش خسارت بیماری‌های باکتریایی گیاهان استفاده کرد (Hong *et al*. 2012, Galloway *et al*. 2012). باکتری *Pectobacterium carotovorum* عامل ایجاد خسارت اقتصادی در طیف وسیعی از گونه‌های مهم گیاهی است (Czerwicka *et al*. 2011). این باکتری عامل بیماری مهم سیب‌زمینی به نام پوسیدگی نرم است و هر ساله خسارت زیادی به این محصول در سراسر جهان وارد می‌کند (Kroner *et al*. 2012). در این باکتری مکانیسم QS وابسته به مولکول پیام‌رسان C6-HSL تولید آنزیم‌های پکتولیتیک، که عوامل تأثیرگذار اصلی و مهم برای پوسیدگی نرم هستند را تنظیم می‌کند (Barnard and Salmond 2007). لذا دخالت در سیستم QS یک روش قدرتمند در کنترل این بیمارگر است (Uroz *et al*. 2009). استفاده از گیاهان تراریخت و یا باکتری‌هایی که به‌طور طبیعی مولکول‌های AHLها را تخریب یا تجزیه می‌کنند برای کنترل تعدادی از بیماری‌های باکتریایی گیاهان نتایج بسیار خوبی داشته است (Reimmann *et al*. 2002, Lin *et al*. 2003, Mahmuodi *et al*. 2011). با توجه به مطالب فوق هدف این تحقیق جداسازی و شناسایی باکتری‌های ریزوسفر سیب‌زمینی با توانایی تجزیه مولکول‌های پیام‌رسان AHL و اخلال در تولید فاکتورهای بیماریزایی *P. carotovorum* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده

باکتری بیمارگر *Pectobacterium carotovorum* از آزمایشگاه موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه شد. استرین‌های گزارشگر *Chromobacterium violaceum* CV026 و *Escherichia coli pSB401* به ترتیب از CNRS [۴] فرانسه و دانشگاه ناتینگهام انگلستان تهیه و به‌عنوان استرین‌های اندیکاتور برای ردیابی AHL استفاده شد. این نشانگرهای زیستی با تولید رنگ بنفش (CV026) و یا تابش نور (*pSB401*) وجود AHLs در محیط را نشان می‌دهند. ریزوباکتری‌های مورد آزمایش نیز از خاک ریزوسفر گیاهان مختلف میزبان این بیمارگر

1. Quorum Sensing (QS)
2. Acyl Homoserine Lacton (AHL)
3. Quorum Quenching (QQ)
4. Centre national de la recherche scientifique.

در نقاط مختلف ایران به روش سری رقت جدا شد (Krzyzanowska *et al*. 2012).

بررسی کیفی توان غیر فعال‌سازی C6-HSL سنتزی توسط ریزوباکتری‌ها

در این تحقیق از ۶۷ نمونه خاک تهیه‌شده از مناطق مختلف، بیش از ۱۲۸۰ جدایه باکتریایی جداسازی شد. این جدایه‌ها در دو مرحله متمایز و جداگانه غربال شدند. از آنجا که وجود خاصیت آنتاگونیستی و بازدارندگی از رشد در جدایه‌ها تفسیر نتایج را مشکل می‌کند و مشخص نیست که عدم تولید AHL به‌خاطر خاصیت QQ بوده است یا به دلیل کاهش رشد باکتری بیمارگر، لذا در مرحله اول جدایه‌هایی که خاصیت آنتی‌بیوز علیه باکتری بیمارگر و هر یک از گزارشگرها نشان می‌دادند، حذف شدند (Mahmoudi *et al*. 2011). در مجموع ۴۲ جدایه دارای خاصیت آنتاگونیستی تشخیص داده شد. ضمناً ۱۹ جدایه یافت شد که خودشان نیز AHL تولید می‌کردند. سپس در مرحله دوم، غربال ۱۲۱۹ جدایه باقیمانده با استرین گزارشگر *C. violaceum* CV026 و مولکول ان‌هگزانیل هموسرین لاکتون یعنی C6-HSL (ساخت کمپانی سیگما)، که پیام‌رسان دخیل در QS باکتری *P. carotovorum* است، به‌عنوان پیام‌رسان هدف انجام شد. ابتدا هر ریزوباکتری در محیط کشت مایع LB[1] حاوی ۲۵ میکرومولار C6-HSL کشت شده و بعد از ۱۶ ساعت سلول‌های باکتری با ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ rpm و عبور فاز رویی از فیلتر ۰/۲ میکرون حذف شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر یک از سوسپانسیون‌های به‌دست‌آمده به‌طور جداگانه به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد و ۵۰۰ میکرولیتر نیز از سوسپانسیون یک درصد کشت ۱۶ ساعته گزارشگر CV026 به هر میکروتیوب اضافه شد. شاهد منفی شامل استرین گزارشگر به همراه آب مقطر استریل و شاهد مثبت شامل گزارشگر به همراه فاز رویی محیط حاوی AHL تلقیح نشده بود. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. میکروتیوب‌ها ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس درون شیکر انکوباتور (۱۰۰ دور در دقیقه) نگهداری شد. سپس ظهور یا عدم وجود رنگ بنفش در هر ویال بررسی شد و فقط استرین‌هایی که تولید رنگ بنفش را به‌طور کامل متوقف کرده بودند برای ادامه کار انتخاب شدند (Molina *et al*. 2003).

بررسی کمی‌توان غیر فعال‌سازی C6-HSL سنتزی توسط ریزوباکتری‌ها

توانایی تجزیه C6-HSL توسط ریزوباکتری‌هایی که در مرحله قبل به صورت کیفی غربال و انتخاب شده بودند، در این مرحله با استفاده از گزارشگر *E. coli* pSB401 به‌صورت کمی و دقیق‌تر بررسی شد. در این آزمایش از غلظت‌های ۵ و ۲۵ و ۵۰ میکرومولار AHL استفاده شد. آماده‌سازی ریزوباکتری‌ها مثل روش قبل انجام شد و ۵۰ میکرولیتر از محلول حاصل از فیلتر کردن هر نمونه به حفره‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای منتقل شد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون یک درصد کشت ۱۶ ساعته گزارشگر به هر حفره اضافه و پلیت روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس در زمان‌های ۲ و ۴ و ۱۶ ساعت پس از تلقیح، میزان نور ساطع شده از هر حفره توسط دستگاه فلورومتر[2] اندازه‌گیری شد. شاهد منفی شامل استرین گزارشگر به همراه آب مقطر سترون و شاهد مثبت شامل گزارشگر به همراه فاز رویی محیط حاوی AHL تلقیح نشده بود. درصد کاهش نور نسبت به شاهد برای هر تیمار با استفاده از فرمول ۱ محاسبه شد (Krzyzanowska *et al*. 2012). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

$$\text{درصد کاهش نور} = \frac{\text{شدت نور در شاهد مثبت} - \text{شدت نور در تیمار}}{\text{شدت نور در شاهد مثبت}} \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

بررسی عدم بیماریزایی ریزوباکتری‌های انتخابی

طبق روش شاد و همکاران ریزوباکتری‌ها به برگ شمعدانی و برش‌های غده سیب‌زمینی تلقیح و به ترتیب بروز علایم فوق حساسیت روی برگ و لهیدگی غده بررسی شد. جدایه‌های فاقد علایم برای بررسی‌های بعدی انتخاب شدند (Shaad *et al*. 2001).

1. Luria-Bertani (LB)

2. FLx800, BioTek.

بررسی ممانعت از تولید آنزیم‌های پکتولیتیک در *P. carotovorum* روی غده‌های سیب‌زمینی

پس از شستشو و ضد عفونی سطحی غده‌های سیب‌زمینی (رقم دایفلا، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال) و سپس خشک کردن آنها، در دو نقطه از هر غده تلقیح انجام شد. سوسپانسیون باکتری‌های بیمارگر و آنتاگونیست با غلظت $۱۰^{۶}$ باکتری در میلی لیتر تهیه شد. یک نقطه با ۲۰ میکرولیتر سوسپانسیون *P. carotovorum* به تنهایی و نقطه دیگر با نسبت مساوی از بیمارگر و استرین‌های ریزوباکتری که خاصیت QQ نشان داده بودند (به‌جز آنهایی که در آزمایش قبل فوق حساسیت و یا لهیدگی ایجاد کرده بودند) تلقیح شد. در تیمار شاهد از آب مقطر سترون به‌جای سوسپانسیون باکتری‌ها استفاده شد. غده‌ها در اتاقک مرطوب (با رطوبت نسبی بالای ۹۰ درصد) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سه روز پس از تلقیح، غده‌ها از وسط برش خورد و قطر ناحیه پوسیده اندازه‌گیری شده و بر اساس پیشرفت و توسعه لهیدگی در بافت‌ها میزان پوسیدگی تخمین زده شد. سپس درصد کاهش پوسیدگی بافت‌های غده با استفاده از فرمول ۲ محاسبه شد (Yangi *et al*. 2013). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار برای هر تیمار انجام شد.

$$\text{درصد کاهش پوسیدگی} = \frac{\text{میزان پوسیدگی در تیمار} - \text{میزان پوسیدگی در شاهد آلوده}}{\text{میزان پوسیدگی در شاهد آلوده}} \times ۱۰۰ \qquad (۲)$$

بررسی توان بازداری از بیماری پوسیدگی نرم ساقه در گیاه سیب‌زمینی

غده‌های سیب‌زمینی پس از شستشو و ضدعفونی سطحی در گلدان کاشته و در شرایط گلخانه با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. بعد از شش هفته گیاهچه‌ها با سوسپانسیون حاوی حدوداً $۱۰^{۶}$ سلول در میلی‌لیتر باکتری بیمارگر و ریزوباکتری‌های تجزیه‌کننده AHL تلقیح شدند. ساقه‌های سیب‌زمینی در پنج سانتی‌متری بالای طوقه با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون بیمارگر به تنهایی، بیمارگر به همراه ریزوباکتری‌ها و ریزوباکتری‌ها به تنهایی با استفاده از سرنگ درجه ۳۰ (سرنگ انسولین) تلقیح شدند. در تیمار شاهد از آب مقطر سترون به جای سوسپانسیون باکتریایی استفاده شد. محل تزریق با روغن معدنی پوشانده شد. پس از انکوباسیون به مدت چهار روز در ۳۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۰ درصد، اندازه بافت پوسیده ساقه اندازه‌گیری و شدت توسعه آن در ساقه تخمین زده شد. سپس درصد کاهش پوسیدگی بافت‌های ساقه با استفاده از فرمول ۲ محاسبه شد. آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با هشت تکرار برای هر تیمار انجام شد (Zhu *et al*. 2006).

شناسایی جدایه‌های انتخابی

برای شناسایی جدایه‌های باکتریایی، پس از استخراج DNA ژنومی با استفاده از کیت استخراج DNA باکتریایی (شرکت Molecular Biological System Transfer، ایران، تهران) ناحیه کدکننده 16srDNA با استفاده از پرایمرهای pA و pH تکثیر شد (Edwards *et al*. 1989). سیکل دمایی و شرایط PCR طبق روش محمودی و همکاران انجام شد. محصول PCR توالی‌یابی[1] و حداقل ۱۰۰۰ bp از هر توالی با توالی‌های موجود در پایگاه NCBI مقایسه شد. آزمایش‌های فیزیولوژیکی نظیر رنگ‌آمیزی گرم و بررسی مورفولوژی سلول باکتری نیز انجام شد (Mahmoudi *et al*. 2011).

تعیین میزان تجزیه C6-HSL با روش HPLC

این آزمایش طبق روش موروهوشی و همکاران با کمی تغییر انجام شد. ۱۶ ساعت پس از کشت آنتاگونیست‌ها در محیط حاوی C6-HSL با غلظت ۲۵ میکرومولار، AHL باقیمانده در محیط با استفاده از اتیل استات استخراج شد. پس از تبخیر فاز آلی، هر نمونه در ۲۰۰ میکرولیتر از بافر ستون (آب/ استونیتریل) حل شد. سیستم HPLC مدل Agilent 1100 ساخت کشور آمریکا، مجهز به آشکارساز UV و ستون C18 (Cosmosil 5C18-AR, column 250 mm × 4.6 mm, Japan)، به همراه شیر تزریق با لوپ ۲۰ میکرولیتر، و

1. BigDye Terminator and ABI Prism 3700 Genetic Analyzer (Macrogene, World Meridian Venture Center, Korea).

همچنین سیستم پردازش اطلاعات کامپیوتری با نرم‌افزار Agilent Chemstation مورد استفاده قرار گرفت. از فاز متحرک آب: استونیتریل: متانول (با نسبت حجمی ۲۹:۱۷:۵۴) با سرعت جریان یک میلی‌متر در دقیقه بهره گرفته شد و نتایج در طول موج ۲۰۰ نانومتر بررسی و اندازه‌گیری شدند (Morohoshi *et al*. 2008).

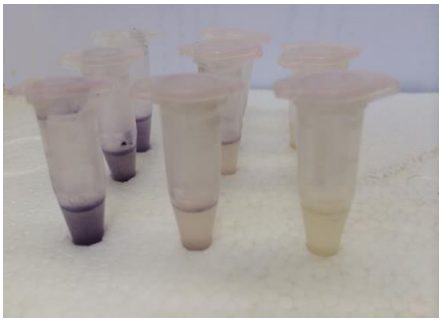
تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

به منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها برای پارامترهای مورد مطالعه از نرم‌افزار SAS 9.1 استفاده شد و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه دانکن در سطح پنج درصد صورت گرفت.

نتایج و بحث

غربال استرین‌های تجزیه‌کننده C6-HSL:

در مجموع از ۶۷ نمونه خاک جمع‌آوری شده از ریزوسفر گیاهان مختلف میزبان *P. carotovorum* از مناطق مختلف کشور شامل چابهار، جاسک، ایرانشهر، میناب، رودان، باهوکلات، دشتیاری، بندرعباس، جیرفت، دزفول، اندیمشک، شوش، شوشتر، تهران، هشتگرد، کرج، شاهرود، دامغان و بجنورد، تعداد ۱۲۸۰ جدایه باکتری جدا و خالص‌سازی شد. ۶۱ جدایه به علت تولید AHL توسط خودشان و یا بازداری از رشد بیمارگر یا باکتری‌های گزارشگر کنار گذاشته شدند. ۱۲۱۹ جدایه باقیمانده از نظر توانایی تجزیه C6-HSL با استفاده از گزارشگر CV026 و مقایسه با آن به صورت کیفی بررسی شدند.



شکل ۱. غربال جدایه‌های باکتریایی از نظر توانایی تجزیه C6-HSL با استفاده از گزارشگر CV026.

Figure 1. Screening of bacterial isolates for C6-HSL degradation activity by using of CV026 biosensor.

در این تحقیق از مولکول C6-HSL استفاده شد. زیرا این نوع از AHL توسط باکتری *P.carotovorum* تولید می‌شود (Czajkowski and Jafra 2009). بر این اساس ۶۹ جدایه از باکتری‌های مورد بررسی باعث سرکوب کامل تولید رنگ بنفش در نشانگر زیستی CV026 و ۴۵ جدایه نیز تولید رنگ ویولاسئین را تا حد زیادی کاهش دادند که این امر بیانگر تجزیه مولکول پیام‌رسان C6-HSL توسط این باکتری‌ها و اختلال در پدیده QS باکتری اندیکاتور است (شکل ۱). فقط ۶۹ جدایه‌ای که به‌طور کامل تولید ویولاسئین و رنگ بنفش را متوقف کرده بودند برای ادامه بررسی‌ها انتخاب شدند. توانایی باکتری‌های آنتاگونیست در تجزیه مولکول‌های AHL غالباً مرتبط با تولید آنزیم‌های مختلفی نظیر لاکتونازها و آسیلازها می‌باشد (Kalia 2013, Romero 2012).

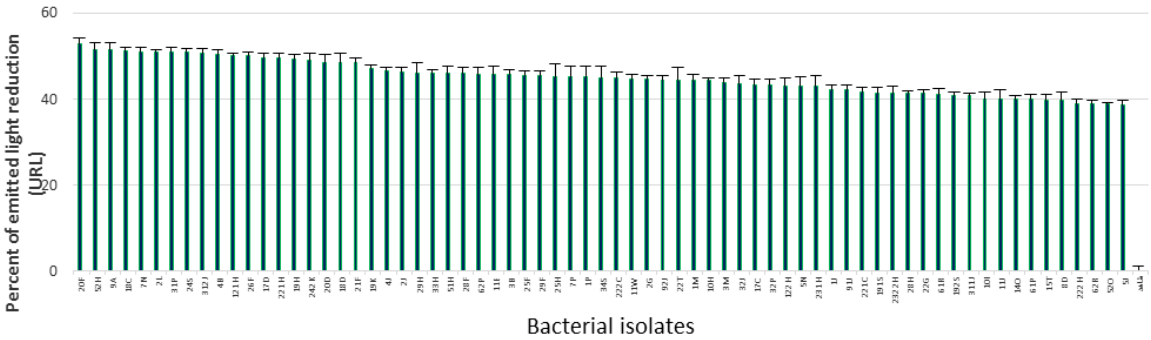
بررسی کمی‌توان غیرفعال‌سازی C6-HSL سنتزی توسط ریزوباکتری‌ها

توانایی هر ۶۹ جدایه موفق در مرحله قبل از نظر تجزیه C6-HSL به‌طور دقیق‌تر با استفاده از نشانگر زیستی *E. coli* pSB401 بررسی شد. شدت نور حاصله بر حسب URL از هر حفره با دستگاه فلورومتر در زمان‌های ۲ و ۱۶ و ۲۰ ساعت پس از تلقیح و برای سه غلظت ۵ و ۲۵ و ۵۰ میکرومولار از مولکول سیگنال اندازه‌گیری شد و درصد کاهش نور نسبت به شاهد با استفاده از فرمول ۱ محاسبه شد. در تمام نه حالت مورد بررسی بین شاهد با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار در سطح پنج درصد مشاهده شد و تمامی جدایه‌ها تابش نور در *E. coli* pSB401 را کاهش دادند که باز هم نشانگر تجزیه AHL خارجی توسط آنتاگونیست های انتخابی مورد آزمایش است (شکل ۲).

شناسایی جدایه‌های انتخابی

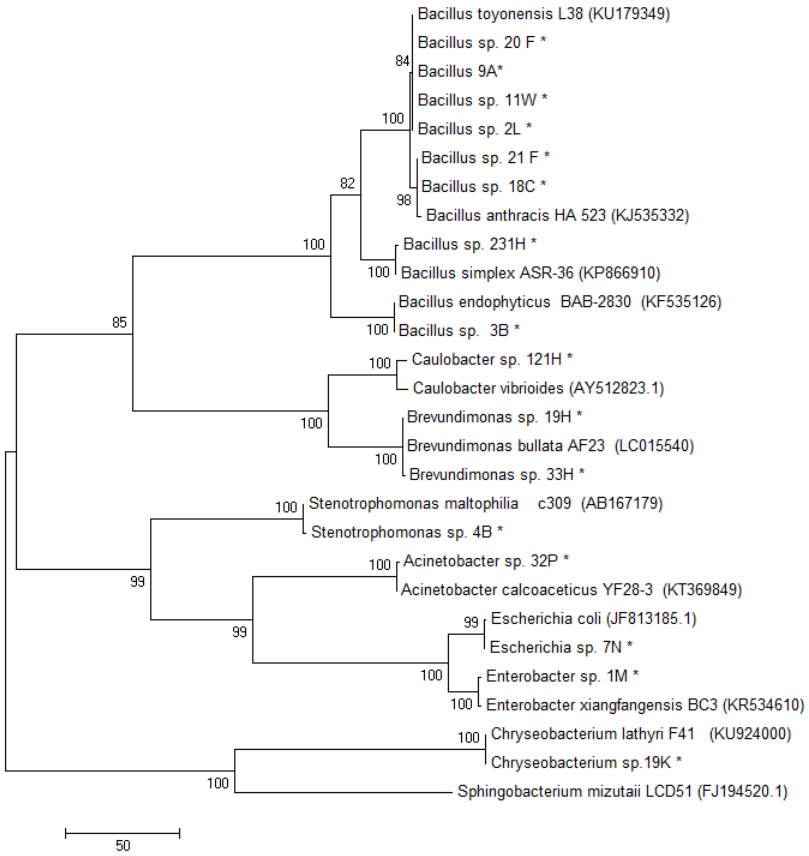
جدایه‌هایی که در شرایط گلخانه بررسی شده بودند، بر اساس توالی ناحیه 16s rDNA مورد شناسایی قرار گرفتند. تمامی توالی‌ها ۱۰۰-۹۰درصد شباهت با جنس‌های شناخته شده و توالی‌های موجود در پایگاه NCBI نشان دادند. بر این اساس با احتمال حداقل ۹۹ درصد جدایه 4B با گونه *Stenotrophomonas*

maltophilia، جدایه 19K با گونه *Chryseobacterium lathyri*، جدایه 32P با گونه *Acinetobacter calcoaceticus*، جدایه 7N با گونه *E. coli*، جدایه 1M با گونه *Enterobacter xiangfangensis*، دو جدایه 33H و 19H با گونه *Brevundimmonas bullata*، جدایه 121H با گونه *Caulobacter vibrioides*، جدایه‌های 21F و 18C با گونه *Bacillus anthracis*، جدایه‌های 9A، 11W، 2L و 20F با گونه *Bacillus toyoensis*، جدایه 231H با گونه *Bacillus simplex* و جدایه 3B با گونه *Bacillus endophyticus* شباهت نشان دادند (شکل ۳).



شکل ۲. تأثیر آنتاگونیست‌ها بر نورافشانی وابسته به AHL گزارشگر *E. coli* pSB401 (غلظت ۵۰ میکرومولار C6-HSL).

Figure 2. The effect of antagonists on AHL-triggered luminescence of *E.coli* pSB401 biosensor (50 µM C6-HSL).

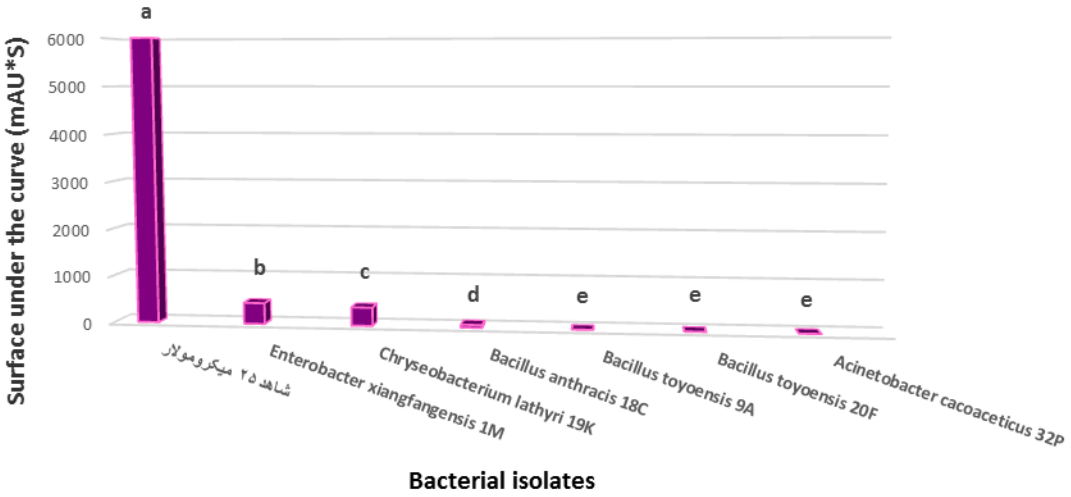


شکل ۳. درخت فیلوژنی نشان‌دهنده ارتباط توالی ژن 16S rDNA باکتری‌های آنتاگونیست و نزدیک‌ترین استرین‌های هر جدایه است. مقادیر Bootstrap از ۱۰۰۰ محاسبه نشان داده شده است. باکتری Sphingobacterium mizutaii LCD51 به‌عنوان outgroup استفاده شد.

Figure 3. Phylogenetic tree showing the relationship between the 16S rDNA gene sequences of antagonistic bacteria and closest strains for each isolate. Bootstrap analyses were made with 1000 cycles. The *Sphingobacterium mizutaii* LCD51 used as outgroup.

تعیین میزان تجزیه C6-HSL توسط آنتاگونیست‌ها با روش HPLC

شش جدایه باکتری در این بررسی استفاده شد که همه آنها در سطح پنج درصد با شاهد تفاوت معنی‌دار نشان دادند. در سه جدایه یعنی *Acinetobacter* calcoaceticus 32P، *Bacillus toyoensis* 20F و *B. toyoensis* 9A هیچ مقداری از C6-HSL ردیابی نشد که نشانگر تجزیه کامل آن توسط این دو آنتاگونیست است (شکل ۴). موروهوشی و همکاران با انتقال ژن آسیلازی *aac* به باکتری *Shewanella oneidensis* هیچ مقداری از C10-HSL در روش HPLC مشاهده نکردند که نشانگر تجزیه کامل آن توسط آنزیم آسیلاز این باکتری است (Morohoshi *et al*. 2008). آنزیم لاکتوناز QsdH استخراج شده از استرین 1A01261 باکتری *Pseudoalteromonas byunsanensis* به‌طور کامل COC8-HSL را با غلظت ۵ میکرومولار تجزیه کرد و هیچ اثری از این ماده در نتایج حاصل از روش HPLC مشاهده نشد (Huang *et al*. 2012).



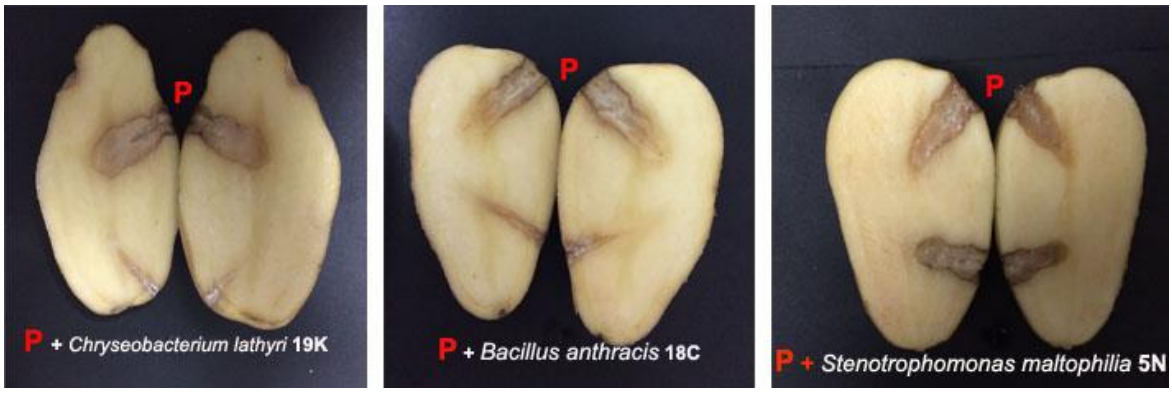
شکل ۴. تعیین میزان تجزیه غلظت ۲۵ میکرومولار C6-HSL توسط آنتاگونیست‌ها با روش HPLC.
حروف مختلف نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار هستند (P<۰/۰۵).

Figure 4. HPLC analysis of 25 µM C6-HSL degradation by antagonists.
Different letters indicate a significant difference (P<0.05).

بررسی ممانعت از تولید آنزیم‌های پکتولیتیک در *P. carotovorum* روی غده‌های سیب‌زمینی

قبل از اقدام به بررسی توان تمامی ۶۹ جدایه در کنترل پوسیدگی ناشی از *P. carotovorum* روی سیب‌زمینی، از غیر بیماریزا بودن خود آنها اطمینان حاصل شد. هیچ جدایه‌ای قادر به ایجاد فوق حساسیت روی برگ شمعدانی نبود. اما پنج جدایه روی برش‌های غده سیب‌زمینی لهیدگی ایجاد کردند که برای ادامه کار از آنها استفاده نشد. توانایی باکتری‌های پکتولیتیک در ایجاد بیماری غالباً ناشی از تولید و ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلول نظیر پکتینازها و سلولازهاست (Barras *et al*. 1994, Hugouvieux *et al*. 1996). این عمل تحت یک جریان پیچیده تنظیم می‌شود که شامل حدنصاب حسگری وابسته به AHL یا همان QS است. در نتیجه ژن‌های دخیل در بیماریزایی این باکتری‌ها بیان نمی‌شوند مگر زمانی که یک تراکم آستانه‌ای از سلول‌های باکتریایی مولد AHLs وجود داشته باشند (Pirhonen *et al*. 1993, Nasser *et al*. 1998, Liu *et al*. 2008). توانایی آنتاگونیست‌های باکتریایی در مختل کردن مکانیسم QS باکتری *P. carotovorum* منجر به کاهش تولید و ترشح آنزیم‌های پکتولیتیک و در نتیجه، کاهش لهیدگی بافت‌های گیاهان می‌شود (Dong *et al*. 2000, Uroz *et al*. 2003, Jafra *et al*. 2006, Qian *et al*. 2009). نتایج این پژوهش نیز نشان داد که تجزیه AHL یک مکانیسم توانمند در کنترل بیولوژیک *P. carotovorum* است. به‌طور کلی چهار جدایه از ۶۴ جدایه با شاهد آلوده در یک گروه

قرار گرفتند و تأثیری بر کنترل بیماری نداشتند. اما ۶۰ جدایه دیگر در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌دار با شاهد نشان دادند. هرچند که میزان تأثیر و کارایی این ۶۰ جدایه نیز با یکدیگر بسیار متفاوت بود (شکل ۵).



شکل ۵. تأثیر متفاوت ریزوباکتری‌های تجزیه کننده AHL بر بیماریزایی *P. carotovorum* در بافت‌های غده سیب‌زمینی. قسمت بالایی هر غده (P) با بیمارگر به تنهایی و قسمت پایینی غده با بیمارگر به همراه آنتاگونیست‌ها تلقیح شده است.

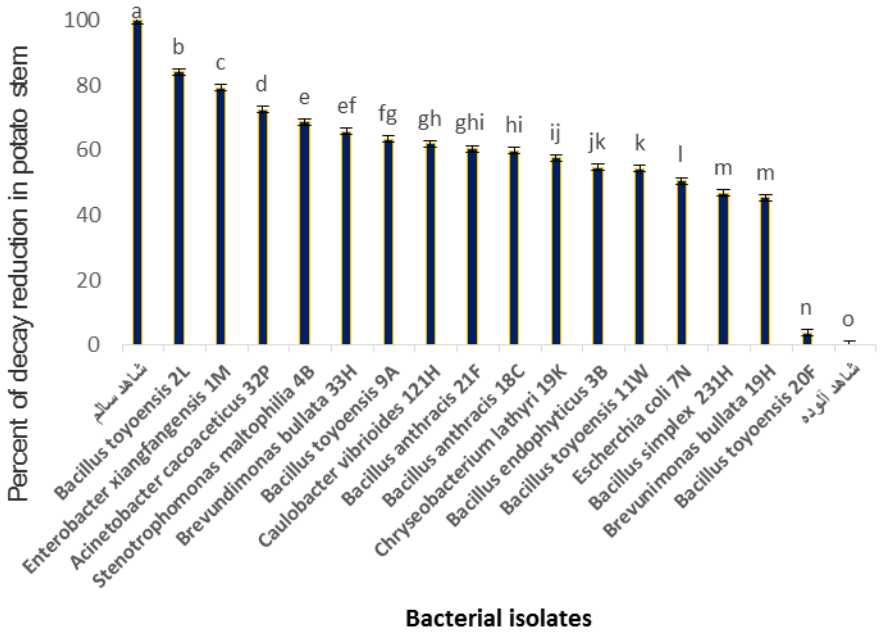
Figure 5. different biocontrol activity of AHL-degrading rhizobacteria against pathogenicity of *P. carotovorum* on potato tuber tissues. The top of each tuber (P) inoculated with pathogen alone and the beneath co-inoculated with pathogen along antagonists.

مولینا و همکاران با انتقال ژن *aiiA* به یک سودوموناس فلورسنت توانستند میزان لهیدگی روی غده سیب‌زمینی را تا حدود صفر کاهش دهند. سویه وحشی این سودوموناس هیچ اثری روی میزان لهیدگی نداشت. این محققین حتی خاصیت درمان‌کنندگی نیز برای باکتری ترنسفورم شده گزارش کرده‌اند و زمانی که آنتاگونیست دو روز پس از بیمارگر تلقیح شد، توقف در پیشرفت پوسیدگی مشاهده شد. آنها مهم‌ترین دلیل قابل قبول برای کاهش فعالیت پروتئازی در *P. carotovorum* وقتی همراه با *Pseudomonas flourescens* حامل ژن *aiiA* به غده‌ها تلقیح می‌شود را بیان ژن مذکور دانسته‌اند (Molina *et al.* 2003). به هرحال در این تحقیق ۴۰ جدایه بیش از ۵۰ درصد سبب کاهش لهیدگی بافت‌های غده سیب‌زمینی در اثر بیمارگر شدند. گرچه همه آنها در آزمایشات قبلی توانایی بسیار بالایی در تجزیه AHL نشان داده بودند. اما این توانایی در شرایط آزمایشگاهی برای همه جدایه‌ها متضمن کارایی روی بافت‌های غده نبود که با یافته‌های سایر پژوهشگران مطابقت داشت. در یک تحقیق شش جدایه باکتریایی که از ریزوسفر گیاهان مختلف میزبان *Pectobacterium* spp. و *Dickeya* spp. جداسازی شده بودند، توانستند در شرایط آزمایشگاهی با تجزیه AHL به میزان ۹۰ الی ۱۰۰ درصد تابش نور را در *E. coli* pSB401 کاهش دهند. اما استفاده از همین جدایه‌ها برای کنترل پوسیدگی غده سیب‌زمینی چنین نتایجی را به دنبال نداشت و میزان پوسیدگی را به همین نسبت کاهش نداد (Krzyanowska *et al.* 2012).

توان بازداری از بیماری پوسیدگی نرم ساقه در گیاه سیب‌زمینی

از بین تمام ۶۴ استرین مورد بررسی، ۱۶ جدایه که تا حد قابل قبولی (بیش از ۶۵ درصد) پوسیدگی غده را در مقایسه با شاهد کاهش داده و تا حدی خواص فیزیولوژیک و بیوشیمیایی متفاوتی داشتند برای بررسی در شرایط گلخانه انتخاب شدند. نتایج نشان داد که جدایه *Bacillus toyoensis* 20F با چهار درصد کاهش میزان پوسیدگی ساقه، ضعیف‌ترین جدایه بود و میزان آلودگی در آن خیلی زیاد بود. اما جدایه‌های *Bacillus toyoensis* 2L، *Acinetobacter calcoeceticus* 32P، *Enterobacter xiangfangensis* 1M، *Stenotrophomonas maltophilia* 4B و *Brevundimonas bullata* 33H بیش از ۶۵ درصد میزان آلودگی را در مقایسه با شاهد آلوده کاهش دادند. ۹ جدایه دیگر تأثیر متوسط تا ضعیف داشتند، اما در

سطح پنج درصد با شاهد آلوده تفاوت معنی‌دار نشان دادند (شکل ۶). محمودی و همکاران نیز با استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده AHL کاهش چشمگیری در لهیدگی غده و ساق سیاه سیب‌زمینی در اثر *P. atrosepticum* مشاهده کردند (Mahmoudi *et al.* 2011). در تحقیق حاضر با توجه به این‌که ۱۶ تا از موفق‌ترین جدایه‌ها از نظر کنترل لهیدگی غده برای بررسی در شرایط گلخانه و روی بافت ساقه انتخاب شده بودند، اما همگی آنها قادر به کنترل کامل لهیدگی ساقه نبودند. این عدم شباهت در عملکرد روی بافت‌های مختلف گیاهی با نتایج تحقیقاتی که قبلاً توسط سایر پژوهشگران انجام شده است، مطابقت داشت. مثلا در یک تحقیق استفاده از ۱۸ استرین باکتری آنتاگونیست برای کنترل *Dickeya* sp. نتایج متفاوتی را روی بافت‌های غده سیب‌زمینی و برگ کاسنی نشان داد (Krzyanowska *et al.* 2012). دلیل تفاوت در کارایی روی غده با ساقه در تحقیق حاضر شاید تفاوت در منابع غذایی در دسترس و حضور متابولیت‌های مختلف در بافت‌های گیاهی باشد. نتایج تحقیقات وان و همکاران نشان داد که ترکیبات مختلف سلولی بر افزایش تولید فاکتورهای بیماریزایی توسط بیمارگر مؤثر است (Van *et al.* 2008). به‌علاوه دسترسی به منابع کربن و یون‌ها نیز می‌تواند تولید ترکیبات ضد میکروبی توسط آنتاگونیست‌ها از جمله سودوموناس‌ها تحت تأثیر قرار دهد (Duffy *et al.* 1999). به هرحال عوامل زیادی در محیط طبیعی تعامل بین آنتاگونیست‌ها و بیمارگرها را تحت تأثیر قرار می‌دهند. کثرت این عوامل تأثیرگذار سبب می شود که پیش‌بینی کارایی عوامل بیوکنترل در شرایط مختلف بسیار مشکل باشد و نتایج متفاوتی را در شرایط گوناگون ظاهر کنند.



شکل ۶. کاهش میزان پوسیدگی ساقه سیب‌زمینی توسط آنتاگونیست‌ها.
حروف مختلف نشانگر وجود تفاوت معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).
Figure 6. Reduction of stem rot of potato by antagonists.
Different letters indicate a significant difference between treatments (P<0.05).

به‌طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که گرچه برخی جدایه‌ها در تمام مراحل مورد بررسی بسیار خوب و توانمند جلوه کردند، اما در مورد برخی دیگر تفاوت چشمگیری در توانایی تجزیه AHL با کارایی آنها در کاهش پوسیدگی غده و بوته سیب‌زمینی وجود داشت. مثلا جدایه *Bacillus toyoensis* 9A که در بررسی تجزیه AHL توسط دو نشانگر زیستی مختلف بسیار قوی شناخته شده و در بازداری از لهیدگی روی غده نیز نتایج خیلی خوبی نشان داده بود، اما روی بوته سیب‌زمینی تأثیر کمتری بر کاهش پوسیدگی نرم ساقه

نشان داد. این موضوع همان‌طور که قبلاً گفته شد می‌تواند به‌دلیل تأثیر و حساسیت بافت‌های مختلف گیاهی، مواد و عناصر غذایی مختلف در بافت‌ها و یا شرایط مختلف محیطی باشد که عملکرد یک آنتاگونیست را در شرایط گوناگون به شدت تحت تأثیر قرار می‌دهد (Van *et al*. 2008). مطالعه و تحقیق برای کشف و شناسایی این عوامل تأثیرگذار و تلاش برای برطرف کردن این موانع بسیار ضروری است.

علاوه بر آن نیاز به بررسی برای یافتن فرمولاسیونی که به حفظ توانایی‌های میکروارگانیسم در شرایط مختلف کمک کرده و به‌علاوه پایداری و بقای آن را نیز تضمین کند، به شدت احساس می‌شود. هم‌چنین باید تأثیر استفاده از مخلوطی از آنتاگونیست‌ها نیز مورد مطالعه قرار گیرد. با توجه به پیشرفت فزاینده قانون حفاظت تلفیقی گیاهان در اکثر کشورهای دنیا، استراتژی‌های جدید نیازمند جایگزین‌هایی از جمله کنترل بیولوژیک برای عوامل شیمیایی هستند. در تحقیقات مولینا و همکاران، توانایی تجزیه AHL در کنترل بیماری‌های باکتریایی گیاهان، مشابه و یا حتی بهتر از تولید فنازین و DAPG در برخی آنتاگونیست‌ها نظیر *P. chlororaphis* PCL1391 گزارش شده است (Molina *et al*. 2003). البته لازم به ذکر است که تولید برخی آنتی‌بیوتیک‌ها نظیر فنازین در باکتری‌های آنتاگونیست تحت تنظیم و کنترل سیستم QS وابسته به AHL می‌باشد (Chin *et al*. 2001). لذا استفاده همزمان از باکتری‌های تجزیه‌کننده AHL با این نوع آنتاگونیست‌ها می‌تواند منجر به کاهش تولید آنتی‌بیوتیک‌ها و در نتیجه کاهش کارایی بیوکنترلی برخی از آنتاگونیست‌های دیگر شود و در استفاده و به کارگیری عوامل تجزیه‌کننده AHL باید این موضوع را مدنظر قرار داد. به‌هرحال عوامل دارای قدرت کنترل پوسیدگی نرم که در این تحقیق با غربالگری‌های مختلف انتخاب شدند، نوید بخش حفاظت غده‌های سیب‌زمینی علیه استرین‌های *P. carotovorum* هستند. همان‌طور که گفته شد به این دلیل که کارایی عوامل بیوکنترل غالباً بسته به شرایط آزمایش متفاوت است، نتایجی که در این‌جا گزارش شده است باید در مزرعه و روی ارقام مختلف سیب‌زمینی نیز بررسی شود. تحقیقات در جهت شناسایی و تعیین توانایی آنتاگونیست‌های انتخابی در کلنیزه‌کردن ریزوسفر سیب‌زمینی و پایداری و بقای آنها در خاک نیز باید انجام شود. ضمنا نقطه اثر و مکانیسم آنتاگونیست‌های انتخابی علیه بیمارگرهای عامل پوسیدگی نرم نیازمند تحقیقات بیشتر به‌ویژه توجه به روابط پیچیده بین باکتری‌ها و گیاهان مختلف میزبان است. در مورد میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده AHLs یک اقدام مهم قبل از معرفی آنها به خاک، بررسی تأثیر آنها روی سایر باکتری‌های مفید خاک است که در مورد باکتری‌های انتخاب شده در این تحقیق نیز بسیار ضروری است.

REFERENCES

Amaral L, Molnar J (2012) Inhibitors of efflux pumps of gram-negative bacteria inhibit quorum sensing. Open Journal of Pharmacology 12-20.

Barnard AM, Salmond GP (2007) Quorum sensing in *Erwinia* species. Analytical and Bioanalytical Chemistry 387: 415-423.

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

Chin-A-Woneng TFC, van den Broek D, de Voer G, van der Drift KM, Tuinman S, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJJ, Blomberg GV (2001) Phenazin-1-carboxamide production in the biocontrol strain *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is regulated by multiple factors secreted into the growth medium. Molecular Plant-Microbe Interactions 14: 969-979.

Czajkowski R, Jafra S (2009) Quenching of acyl homoserine lactones-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. Acta Biochimica Polonica 56: 1-16.

Czerwicka M, Marszewska K, Bychowska A, Dziadziuszko H, Brzozowski K, Łojkowska E, Stepnowski P, Kaczynski Z (2011) Chemical structure of the O-polysaccharide isolated from *Pectobacterium atrosepticum* SCRI 1039. Carbohydrate Research 346: 2978–2981.

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

Edwards U, Rogall T, Blocker H, Bottger EC (1989) Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. Nucleic Acids Research 17(19): 7843-7853.

Galloway WRJD, Hodgkinson TJ, Bowden S, Welch M, Spring DR (2012) Applications of small molecule .activators and inhibitors of quorum sensing in Gram-negative bacteria. Trends in Microbiology 20(9): 449-458.

Hong KW (2012) Quorum quenching revisited – from signal decays to signalling confusion. Sensors 12: 4661-4696.

Huang W, Lin Y, Yi S, Liu P, Shen J (2012) QsdH, a Novel AHL Lactonase in the RND-Type Inner Membrane of Marine *Pseudoalteromonas byunsanensis* Strain 1A01261. PLoS ONE 7(10): 46587. doi:10.1371/journal.pone.0046587.

Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Nasser W, Reverchon S (1996) Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. Annual Review of Microbiology 50: 213-257.

Jafra S, Przysowa J, Czajkowski R, Michta A, Garbeva P, van der Wolf JM (2006) Detection and characterization of *N*-acyl homoserine lactone-degrading bacteria from the potato rhizosphere. Canadian Journal of Microbiology 52: 1006-1015.

Kalia A, Gosal S K (2011) Effect of pesticide application on soil microorganisms. Archives of Agronomy and Soli Science 57(6): 569-596.

Kalia VC (2013) Quorum sensing inhibitors: An overview. Biotechnology Advances 31: 224-245.

Kröner A, Marnet N, Andrivon D, Val F (2012) Nicotiflorin, rutin and chlorogenic acid: phenylpropanoids involved differently in quantitative resistance of potato tubers to biotrophic and necrotrophic pathogens. Plant Physiology and Biochemistry 57: 23-31.

Krzyanowska D M, Potrykus M, Golanowska M, Polonis K, Gwizdek-Wisniewska A, Lojkowska E, Jafra S (2012) Rhizosphere Bacteria as Potential Biocontrol Agents Against Soft Rot Caused by Various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp. Strains. Journal of Plant Pathology 94 (2): 367-378.

Lin YH, Xu JL, Hu J, Wang LH, Ong SL, Leadbetter JR, Zhang LH (2003) Acyl-homoserine lactone acylase from *Ralstonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. Molecular Microbiology 47: 849-860.

Liu H, Coulthurst SJ, Pritchard L, Hedley PE, Ravensdale M, Humphris S, Burr T, Takle G, Brurberg MB, Birch PRJ, Salmond GPC, Toth IK (2008) Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. PLo- SPathogen 4: e1000093.

Lo C (2010) Effect of pesticides on soil microbial community. Journal of Environmental Science and Health 45:348-359.

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

Molina L, Constantinescu F, Michel L, Reimmann C, Duffy B, Défago G (2003) Degradation of pathogen quorum sensing molecules by soil bacteria: a preventive and curative biological control mechanism. FEMS Microbiology Letters 45: 71-81.

Morohoshi T, Nakazawa S, Ebata A, Kato N, Ikeda T (2008) Identification and Characterization of N-Acylhomoserine Lactone-Acylase from the Fish Intestinal Shewanella sp. Strain MIB015. Bioscience of Biotechnology and Biochemistry 72: 1-7.

Morohoshi T, Tominaga Y, Someya N, Ikeda T (2012) Complete genome sequence and characterization of the N-acylhomoserine lactone-degrading gene of the potato leaf-associated *Solibacillus silvestris*. Journal of Bioscience and Bioengineering 113(1): 20-25.

Nasser W, Bouillant M L, Salmond G, Reverchon S (1998) Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* expI-expR locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules. Molecular Microbiology 29: 1391-1405.

Park SJ, Park SY, Ryu CM, Park SH, Lee JK (2008) The Role of AiiA, a quorum-quenching enzyme from *Bacillus thuringiensis*, on the Rhizosphere Competence. Journal of Microbiology and Biotechnology 18(9): 1518-1521.

Pirhonen M, Flego D, Heikinheimo R, Palva ET (1993) A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. European Molecular Biology Organization Journal 12(6): 2467-2476.

Qian GL, Fan JQ, Chen DF, Kang YJ, Han B, Hu SH, Liu FQ (2009) Reducing *Pectobacterium* virulence by expression of an *N*-acyl homoserine lactonase gene PIpp- *aiiA* in *Lysobacter enzymogenes* strain OH11. Biological Control 52: 17-23.

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

Romero M, Acuña L, Otero A (2012) Patents on quorum quenching: interfering with bacterial communication as a strategy to fight infections. Recent Patents Biotechnology 6: 2-12.

Schaad NW, Jones JB, Chun W (2001) Laboratory guide for identification of palnt pathogenic bacteria. 3ed. The American Phytopathological Society, USA.

Uroz S, Angelo-Picard C, Carlier A, Elasri M, Sicot C, Petit A, Oger P, Faure D, Dessaux Y (2003) Novel bacteria degrading N-acylhomoserine lactones and their use as quenchers of quorum-sensing-regulated functions of plantpathogenic bacteria. Microbiology 149: 1981-1989.

Uroz, S., Dessaux, Y. and Oger, P (2009) Quorum sensing and quorum quenching: the Yin and Yang of bacterial communication. Biochemistry 10: 205-216.

Van Gijsegem F, Wlodarczyk A, Cornu A, Reverchon S, Hugouvieux-Cotte-Pattat N (2008) Analysis of the LacI family regulators of *Erwinia chrysanthemi* 3937, involvement in the bacterial phytopathogenicity. Molecular Plant-Microbe Interaction 21: 1471-1481

Varga GZ, Szabo MA, Hohmann J, Schelz Z, Szegedi E, Amaral L, Molnár J (2011) Effect of phenothiazines and related compounds on quorum sensing regulated functions. Lett Drug Discovery Design 8: 133-7.

Yangui T, Sayadi S, Dhouib A (2013) Sensitivity of *Pectobacterium carotovorum* to hydroxytyrosol-rich extracts and their effect on the development of soft rot in potato tubers during storage. Crop Protection 53: 52-57.

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

Zhu CG, Yu ZN, Sun M (2006) Restraining *Erwinia* virulence by expression of N-acyl homoserine lactonase gene pro3A-aiiA in *Bacillus thuringiensis* subsp. *leesis*. Biotechnology and Bioengineering 95: 526-532.