

بررسی دخالت در تنظیم ژنی وابسته به حدنصاب احساس در *Pectobacterium atrosepticum* و تغییر فعالیت LuxI و LuxR توسط ریزوباکتری‌های تجزیه‌کننده ان-اسیل هموسرین لاکتون

۱. عادلہ سبحانی‌پور؛ ۲. کیوان بهبودی*؛ ۳. اسماعیل محمودی
۱. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان
۲. 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 ترانسژن،
دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۱۱)

چکیده

سیستم حدنصاب احساس (Quorum sensing) یک سیستم ارتباطی است که به باکتری‌ها اجازه می‌دهد تا تراکم جمعیتشان را از طریق تولید و ردیابی مولکول‌های پیام‌رسان بسنجند. در باکتری‌های گرم منفی این مولکول‌ها شامل ان-اسیل هموسرین لاکتون‌ها (AHLs) است که توسط پروتئین‌های سازنده (LuxI) ساخته می‌شود و سپس به بیرون از سلول ترشح شده و به پروتئین‌های گیرنده (LuxR) در باکتری‌های مجاور متصل می‌شوند و رونویسی از ژن‌های هدف را کم یا زیاد می‌کنند. تأثیر ۶۶ ریزوباکتری تجزیه‌کننده AHL بر تغییر فعالیت و کارایی LuxI/LuxR و یا بازدارندگی از سنتز AHL با استفاده از سیستم انتشار در آگار و *Chromobacterium violaceum* CV026 به‌عنوان گزارشگر مورد ارزیابی قرار گرفت. جدایه *Pectobacterium atrosepticum* SRI1043 نیز به‌عنوان مولد AHL استفاده شد. برای بررسی توانایی بازدارندگی از فعالیت LuxI، جدایه مولد AHL در نزدیکی باکتری‌های خاموش‌کننده و باکتری گزارشگر دورتر از آن قرار گرفت. برای بررسی بازدارندگی از فعالیت LuxR، جای استرین‌های مولد AHL و گزارشگر عوض شد. هر دو خاصیت ممانعت از فعالیت LuxI و LuxR در ۲۱ جدایه مشاهده شد. این جدایه‌ها بر اساس تست‌های بیوشیمیایی و بررسی توالی 16srDNA در جنس‌های *Bacillus*، *Citrobacter*، *Brevundimonas*، *Bordetella*، *Acinetobacter*، *Stenotrophomonas*، *Pseudomonas* و *Escherichia* قرار گرفتند. برای بررسی دخالت در تنظیم ژنی وابسته به AHL در *P. atrosepticum*، باکتری‌های آنتاگونیست با فاصله کمی از بیمارگر کشت شد و کاهش تولید آنزیم پروتئاز با مشاهده کاهش هاله شفاف اطراف این بیمارگر روی محیط کشت شیر خشک بدون چربی-آگار (SMA) مشخص شد. پنج جدایه تا حد زیادی تولید پروتئاز را کاهش دادند.

کلیدواژگان: AHL، CV026، حدنصاب احساس.

Bioassay for interference of AHL-dependent gene regulation in *Pectobacterium atrosepticum* and modulation of LuxI and LuxR by N-acylhomoserine lactone degrading rhizobacteria

Adeleh Sobhanipour¹, Keivan Behboudi^{2*} and Esmail Mahmoudi³

1. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Damghan Branch, Islamic Azad University, Iran
2. Associate Professor, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Iran and Transgenesis Center of Excellence, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan
(Received: Nov. 6, 2016 - Accepted: Jan. 30, 2017)

ABSTRACT

Quorum sensing is a communication system that allows bacteria to monitor their population density through the production and sensing of signal molecules. In Gram-negative bacteria, signal molecules include acyl-homoserine lactones (AHLs) which are synthesized by the protein synthases (LuxI). The synthesized signaling molecules are secreted out of the cell and bind with receptor proteins (LuxR) of neighboring bacterial and decrease or increase the rate of transcription in target genes. The effect of the 66 AHL-degrading rhizobacteria (quencher) on modulation of LuxI/LuxR activity and inhibition of AHL synthesis was determined using an agar diffusion double streak assay and the *Chromobacterium violaceum* CV026 biosensor system. The isolate *Pectobacterium atrosepticum* SRI1043 used as AHL-producer. To test for potential LuxI inhibition, the AHL-producer isolate was placed in close proximity to the test quencher bacteria and the AHL biosensor strain placed distantly. In order to test for LuxR inhibition, the location of the AHL-producer and biosensor strains was reversed. Both LuxI and LuxR modulation was observed in 21 isolates. These isolates were identified as genera *Bacillus*, *Brevundimonas*, *Citrobacter*, *Bordetella*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas* and *Escherichia* using biochemical tests and 16s rDNA sequencing. Bioassay for interference of AHL-dependent gene regulation in *P. atrosepticum* performed on Skim Milk Agar medium and antagonistic bacteria cultured near the pathogen and the reduction of protease production by this pathogen was evaluated by the reduction of clear zone in the agar. Five isolates reduced the protease production significantly.

Keywords: AHL, CV026, Quorum Sensing.

تازه‌های تحقیق

در این تحقیق ۲۱ جدایه تجزیه‌کننده AHL و در عین حال واجد توانایی اختلال در عملکرد LuxI و LuxR یافت شد. برخی از این جدایه‌ها نظیر *Acinetobacter* sp. 5N دارای توانایی بالا برای هر سه نوع مکانیسم تجزیه آنزیمی AHL، دخالت در کارایی LuxI و دخالت در کارایی LuxR می‌باشند که نتیجه بسیار ارزشمندی است و کارایی آنتاگونیست را در شرایط مختلف بیشتر تضمین می‌کند.

مقدمه

باکتری‌ها مکانیسم‌هایی را برای تنظیم و هماهنگی بین ژن‌هایشان در پاسخ به تراکم جمعیت خود دارا هستند. این مکانیسم که از طریق تولید و ردیابی مولکول‌های پیام‌رسان به نام خودالقاگر رخ می‌دهد، سیستم حدنصاب احساس (Quorum Sensing or QS) نام دارد (Bassler and Losick 2006). تا کنون چندین کلاس از پیام‌رسان‌های QS شناسایی شده‌اند که ان-اسیل هموسرین‌لاکتون‌ها (AHLs) شناخته شده‌ترین آن‌ها در باکتری‌های گرم منفی هستند. غلظت پیام‌رسان‌های تولیدی در محیط اطراف باکتری به نوعی بازتاب تراکم جمعیت سلول‌های باکتری است. هر سلول باکتری یک سطح پایه‌ای از مولکول‌های پیام‌رسان QS را توسط پروتئین سازنده یعنی LuxI تولید می‌کند. وقتی جمعیت باکتری به یک تراکم خاص برسد، مولکول‌های پیام‌رسان کم‌کم تجمع یافته و به یک غلظت آستانه می‌رسند. سپس این مولکول‌ها، گیرنده‌های خاص خود در سلول‌های باکتری مجاور را فعال می‌کنند. این گیرنده‌ها که توسط پروتئین Lux R ساخته می‌شوند، قادرند پس از فعال شدن به واسطه اتصال به AHL، بیان یکسری ژن‌ها را تغییر داده موجب بروز رفتارهایی شوند که در مواجهه با شرایط محیطی خاص برای باکتری‌ها مفیدند (Antunes et al. 2010). سیستم QS در باکتری‌ها بیان بسیاری از ژن‌های مسئول تشکیل بیوفیلم، نورافشانی زیستی، تولید رنگدانه‌ها، سیدروفور، آنتی‌بیوتیک، بیماری‌زایی، انتقال پلاسمید و تحرک را فعال می‌کند (Chen et al. 2013). در باکتری‌های گرم منفی QS وابسته به AHL نقش بسیار مهمی در تنظیم

تولید عوامل بیماری‌زایی ایفا می‌کند. مثلاً تولید آنزیم‌های خارج سولی در *Pectobacterium carotovorum* و *P. atrosepticum*، تولید فاکتورهای بیماری‌زایی در *Pseudomonas aeruginosa*، انتقال پلاسمید بیماری‌زایی در *Agrobacterium tumefaciens* و تولید توکسین در *Burkholderia glumae*، تشکیل بیوفیلم در *P. fluorescens* و *P. aeruginosa* و تولید آنتی‌بیوتیک در *P. aureofaciens* با این سیستم تنظیم می‌شوند (Qian et al. 2010). کاربرد بیوتکنولوژیکی تجزیه‌کننده‌های AHL به‌عنوان یک روش نوین و امیدوارکننده برای مبارزه با باکتری‌های مضر نظر محققان را به خود جلب کرده است و استفاده از استراتژی خاموشی حدنصاب احساس که به اختصار QQ نامیده می‌شود، یک روش جایگزین و امیدوارکننده در مبارزه با این بیماری‌ها است (Park et al. 2008, Czajkowski and Jafra 2009, Qian et al. 2009). امروزه مشخص شده است که علاوه بر تجزیه خودالقاگرها، توانایی غیر فعال‌سازی و جلوگیری از تولید یا پاسخ‌دهی به آن‌ها نیز می‌تواند در کنترل آلودگی‌های باکتریایی در انسان، حیوان و گیاه مؤثر باشد (Krzyanowska et al. 2012).

سیستم QS به چندین روش مختل می‌شود: ۱- بازدارندگی از بیوسنتز AHL (تأثیر بر فعالیت و کارایی LuxI)، ۲- تجزیه مولکول‌های AHL توسط لاکتوناژها و یا آسیلازهای باکتریایی، ۳- استفاده از مولکول‌های کوچک برای اشغال کردن پروتئین گیرنده AHL یا غیرفعال‌سازی آن (تأثیر بر فعالیت و کارایی LuxR) و ۴- ترکیباتی که تجزیه فاکتورهای رونویسی وابسته به AHL را القا و تسریع می‌کنند (Amaral and Molnar 2012). تا کنون ریزوباکتری‌های مختلفی از جنس و گونه‌های مختلف گرم مثبت و گرم منفی به‌عنوان عوامل تولیدکننده آنزیم‌های تجزیه‌کننده AHLs گزارش شده‌اند که قادرند در رفتارهای باکتریایی تحت تنظیم QS اختلال ایجاد کنند (Galloway et al. 2012, Hong et al. 2012). باکتری *P. atrosepticum* عامل بیماری ساق سیاه سیب‌زمینی، برای تولید فاکتورهای بیماری‌زایی شامل آنزیم‌های

مواد و روش‌ها

میکروارگانیزم‌های مورد استفاده

سویه استاندارد SRI1043 باکتری بیمارگر *Pectobacterium atrosepticum* از آزمایشگاه موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه شد. مولکول‌های پیام‌رسان سیستم QS این باکتری که از نوع C8-HSL است از شرکت سیگما (St. Louis, Missouri, United States) خریداری شد. سویه گزارشگر *violaceum Chromobacterium CV026* از CNRS^۲ فرانسه تهیه و به‌عنوان شاخص برای ردیابی AHL استفاده شد. این باکتری در حضور AHL خارجی، آنتی‌بیوتیک بنفش رنگ ویولاسئین را تولید می‌کند و لذا می‌تواند نشان‌دهنده حضور و یا عدم حضور AHL‌ها در محیط باشد. ریزوباکتری‌های مورد آزمایش نیز از خاک ریزوسفر سیب‌زمینی در نقاط مختلف ایران با روش سری رقت جدا شد (Schaad et al. 2001). در مجموع ۱۲۸۱ استرین با این روش جدا شد.

انتخاب جدایه‌های باکتریایی تجزیه‌کننده C8-HSL

در مرحله اول، غربال جدایه‌ها با سویه گزارشگر *C. violaceum CV026* و مولکول C8-HSL به‌عنوان AHL هدف انجام گرفت. از آن‌جا که مولکول‌های AHL به شرایط قلیایی حساسند، تمام بررسی‌ها در محیط کشت مایع لورین برتانی^۳ با اسیدیته ۶/۵ انجام شد (Yates et al. 2002). به منظور یافتن توانایی تجزیه AHL، ابتدا هر ریزوباکتری در محیط مایع حاوی ۲۵ میکرومولار C8-HSL کشت و بعد از ۱۶ ساعت سلول‌های باکتری با ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و سپس عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون حذف شدند (Morohoshi et al. 2009). پس از آن برای بررسی AHL باقیمانده در محیط، ۲۰ میکرولیتر از محیط فیلتر شده هر ریزوباکتری به دیسک‌های کاغذی استریل اضافه شد. دیسک‌ها در معرض هوا و زیر هود خشک شده و روی سطح محیط کشت نوترینت آگار قرار داده شد که قبلاً با ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون *C. violaceum* یک درصد کشت ۱۶ ساعته گزارشگر

مخرب، هارپین‌ها، و آنتی‌بیوتیک کارباپنم^۱ از QS وابسته به مولکول پیام‌رسان C8-HSL استفاده می‌کند (Von Bodman et al. 2003, Barnard and Salmon 2007). پژوهش‌های زیادی نشان داده که تجزیه AHL یک مکانیسم توانمند در کنترل بیولوژیک پکتوباکتریوم‌ها است. مولینا و همکاران (۲۰۰۳) با انتقال ژن *aiiA* به استرین *Pseudomonas fluorescens* P3 توانستند میزان لهیدگی روی غده سیب‌زمینی را تا حدود ۱۰۰ درصد کاهش دهند. در حالی که سویه وحشی این باکتری هیچ اثری روی میزان لهیدگی نداشت. کاهش چشمگیر میزان پوسیدگی ناشی از *Pectobacterium* spp. روی سیب‌زمینی، کلم چینی و کاکتوس توسط آنتاگونیست‌های تجزیه‌کننده AHL توسط محققین دیگری نیز گزارش شده است (Dong et al. 2010, Qian et al. 2010, Cirou et al. 2011). سیب‌زمینی چهارمین ماده غذایی مهم در دنیاست و تقریباً در تمام مناطق شمالی کره زمین، هر جا که سیب‌زمینی کشت شود می‌توان درجات مختلفی از آلودگی به ساق‌سیاه باکتریایی را مشاهده نمود که در صورت فراهم بودن شرایط خسارت وسیعی را در مزرعه و انبار ایجاد خواهد کرد. در مزرعه علائم اصلی بیماری شامل سیاه و پوسیده شدن قاعده و قسمت‌های پایینی ساقه و سرانجام از پافتادن و مرگ بوته است. غده‌های حاصل از بوته‌های آلوده، چه در انبار و چه در مزرعه به‌عنوان منبع آلودگی عمل کرده و سبب پراکنش بیماری خواهند شد. این غده‌ها دچار پوسیدگی نرم و سیاه رنگ شده و بوی بدی دارند (van der Wolf and De Boer 2007). با توجه به اهمیت غذایی محصول سیب‌زمینی و پراکنش وسیع بیماری ساق سیاه روی آن، هدف از این تحقیق یافتن باکتری‌های آنتاگونیست با توانایی بالا و به‌خصوص چند جانبه برای دخالت در سیستم QS این باکتری در نظر گرفته شد. یعنی آنتاگونیست‌هایی که علاوه بر داشتن آنزیم‌های تجزیه‌کننده AHL، توانایی جلوگیری از ساخته شدن آن‌ها و یا جلوگیری از ساخت و یا غیرفعال کردن پروتئین‌های گیرنده مولکول‌های AHL این باکتری را نیز داشته باشند.

2. Centre national de la recherches scientifique
3. LB

2. Carbapenem antibiotic

بررسی دخالت در فعالیت پروتئین‌های LuxI و LuxR
تأثیر ریزوباکتری تجزیه‌کننده AHL که در مرحله قبل انتخاب شده بودند بر تغییر فعالیت و کارایی AHL و یا بازداری از سنتز آن با استفاده از خاصیت انتشار در آگار و CV026 *C. violaceum* به‌عنوان گزارشگر مورد ارزیابی قرار گرفت. جدایه *P. atrosepticum* نیز به‌عنوان مولد AHL استفاده شد. برای بررسی توانایی دخالت در فعالیت LuxI، جدایه مولد AHL در نزدیکی باکتری‌های تجزیه‌کننده و باکتری گزارشگر کمی دورتر از آن روی محیط نوترینت آگار کشت شد. برای بررسی دخالت در فعالیت LuxR، جای سویه‌های مولد AHL و گزارشگر عوض شد و سویه گزارشگر که فقط حامل ژن‌های سازنده LuxR است (و فاقد ژن‌های سازنده LuxI می‌باشد) در مجاورت باکتری‌های تجزیه‌کننده کشت شد (Chenia 2013). هر تیمار در سه تکرار انجام شد.

تأثیر بر تنظیم ژنی وابسته به AHL در *P. atrosepticum*
باکتری *P. atrosepticum* به‌صورت خطی روی محیط کشت^۱ SMA کشت داده شد. سپس هر یک از ریزوباکتری‌های مورد آزمایش به‌طور جداگانه در فاصله حدود ۶-۷ میلی‌متر از آن کشت شد. بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در ۳۰ درجه سلسیوس، تولید آنزیم پروتئاز توسط *P. atrosepticum* با سنجش نسبی هاله شفاف اطراف کلونی آن در مقایسه با شاهد، ارزیابی شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. اگر هاله شفاف وجود نداشت و یا خیلی کمتر از شاهد بود، نتیجه خوب و اگر هاله شفاف وجود داشت اما کمتر از شاهد بود، نتیجه متوسط در نظر گرفته شد (Molina et al. 2003).

بررسی وجود ژن لاکتوناژی *aiiA* در جدایه‌های انتخابی
به این منظور ابتدا یک تک کلونی از هر جدایه تکثیر شده و سپس DNA آن با استفاده از کیت استخراج DNA باکتریایی (شرکت Molecular Biological System Transfer، ایران، تهران) استخراج شد. وجود ژن *aiiA* که مولد آنزیم لاکتوناژ AiiA می‌باشد در تمام جدایه‌ها با روش PCR و استفاده از آغازگر اختصاصی این ژن یعنی *aiiA*-7F/7R ردیابی شد. توالی آغازگر مستقیم به‌صورت

CV026 اسپری پاشی شده بود. برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. در شاهد از محیط کشت مایع حاوی C8-HSL تلقیح نشده با ریزوباکتری‌ها برای افزودن به دیسک‌های کاغذی استفاده شد. تشتک‌های پتری ۲۴ ساعت در ۳۰ درجه سلسیوس درون انکوباتور نگهداری شده و سپس توانایی جدایه‌های باکتریایی در تجزیه AHL، با سنجش میزان رنگ حاصله در اطراف هر دیسک و به‌صورت نمره‌دهی از صفر تا دو (صفر: بدون اثر یا ضعیف، یک: اثر متوسط و دو: اثر قوی) صورت گرفت (Packiavathy et al. 2012).

توانایی تجزیه AHL طبیعی

ابتدا برای اثبات توانایی باکتری بیمارگر *P. atrosepticum* *SCR11043* در تولید C8-HSL، از سویه گزارشگر *C. violaceum* CV026 استفاده شد. به این ترتیب که هر دو باکتری در فاصله یک سانتی‌متری از هم به‌صورت خطی کشت داده شد و پس از ۲۴ ساعت وجود رنگ بنفش در سویه گزارشگر به‌عنوان معیاری از تولید C8-HSL طبیعی توسط بیمارگر در نظر گرفته شد. سپس به‌عنوان منبع تولید C8-HSL طبیعی در محیط کشت LB با اسیدیته ۶/۵ کشت داده شده و ۱۸ ساعت درون شیکرانکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس و سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت. برای جداسازی C8-HSL از محیط کشت، سلول‌های باکتری با ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کردن در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه و بعد عبور از فیلتر ۰/۲ میکرون، حذف شدند. محلول حاصل دو بار با حجم مساوی از اتیل‌استات اسیدی (حاوی یک درصد اسید استیک) مخلوط و فاز رویی که حاوی C8-HSL بود جدا و سپس در معرض هوا و زیر هود خشک شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر اتیل‌استات اسیدی به آن اضافه و به‌عنوان منبع AHL طبیعی از نوع C8-HSL استفاده شد. این نوع AHL به روش قبلی به محیط کشت اضافه و توانایی ریزوباکتری‌های انتخابی در مرحله قبل برای تجزیه C8-HSL طبیعی نیز بررسی شد (Molina et al. 2003). برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد.

حدود ۱۳۰۰ جدایه باکتری از خاک ریزوسفر سیب‌زمینی در مزارعی که علائم آلودگی به *P. atrosepticum* در آن‌ها مشاهده شده بود، جدا شد. توانایی تجزیه C8-HSL که توسط این باکتری بیمارگر برای تنظیم تولید پکتینازها ترشح می‌شود، با استفاده از گزارشگر CV026 در ریزوباکتری‌ها بررسی شد. باکتری‌های پکتولیتیک با تولید و ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلول نظیر پکتینازها و سلولازها روی گیاه میزبان خود بیماری ایجاد می‌کنند و تولید و ترشح این آنزیم‌ها در آن‌ها با سیستم QS وابسته به مولکول‌های پیام‌رسان یا همان AHLs کنترل می‌شود (Hugouvieux et al. 1996, Liu et al. 2008). باکتری‌هایی که توانایی تجزیه AHLها را دارند مانع تولید رنگدانه بنفش توسط استرین گزارشگر CV026 می‌شوند. این گزارشگر در حضور AHLهای خارجی آنتی‌بیوتیک بنفش رنگ و یولاسئین را تولید می‌کند و لذا به‌عنوان حسگر AHL در محیط استفاده می‌شود (McClellan et al. 1997). بر این اساس در ۶۶ جدایه از ریزوباکتری‌های مورد آزمایش، توانایی بالای تجزیه C8-HSL مشاهده شد که مانع تولید رنگدانه بنفش در گزارشگر شدند و ۴۵ جدایه نیز تولید رنگدانه را به‌میزان زیادی کاهش دادند که نشانگر تجزیه ضعیف‌تر C8-HSL است (شکل ۱). تمام این جدایه‌ها در سطح ۵ درصد با شاهد تفاوت معنی‌دار داشتند.

توانایی تجزیه AHL طبیعی

توانایی تمامی ۱۱۱ جدایه انتخابی در مرحله قبل، از نظر تجزیه C8-HSL طبیعی که از باکتری *P. atrosepticum* استخراج شده بود نیز بررسی شد و به‌جز جدایه ۲۲۲H، نتایج کاملاً مشابه با C8-HSL سنتزی ود و تمامی جدایه‌ها قادر به تجزیه C8-HSL استخراج شده از باکتری *P. atrosepticum* نیز بودند. این نتیجه نشان می‌دهد که اکثر این باکتری‌های مورد آزمایش قادرند ساختارهای مختلف C8-HSL را تجزیه کرده و در صورت مساعد بودن شرایط در سیستم QS باکتری *P. atrosepticum* اختلال ایجاد کنند. در تحقیقات سایر محققین نیز توانایی تجزیه هر دو نوع AHL طبیعی و سنتزی توسط آنتاگونیست‌های مورد بررسی کاملاً مشابه گزارش شده است (Mahmoudi et al. 2011, Zamani).

5'-ATGGGATCCATGACAGTAAAGAAGCTTTAT-3' و توالی آغازگر معکوس به‌صورت 5'-GTCGAATTCCTCAACAAGATACTCCTAATG-3' بود (Dong et al. 2002). ضمناً از باکتری *Escherichia coli* DH5α که حاوی پلاسمید pME6863 حامل ژن *aiiA* می‌باشد (Mahmoudi et al. 2011) به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محصول PCR پس از بررسی روی ژل آگارز یک درصد، به‌وسیله شرکت ماکروژن^۱ با هر دو آغازگر مستقیم و معکوس تعیین توالی گردید. برای به‌دست آوردن توالی رشته جامع^۲ و نهایی از توالی‌های به‌دست آمده از دو جهت مستقیم و معکوس، از نرم‌افزار DNAMAN استفاده شد. توالی حاصل برای بلاست در بانک ژن^۳ (NCBI) مورد بررسی قرار گرفت.

شناسایی ریزوباکتری‌های انتخابی

تمام ۲۱ آنتاگونیستی که هم توانایی تجزیه AHL و هم ممانعت از فعالیت یا تغییر کارایی پروتئین‌های LuxI و یا LuxR را داشتند با انجام یکسری از آزمون‌های بیوشیمیایی (Schaad et al. 2001) و نیز تکثیر ناحیه 16s rDNA با استفاده از جفت آغازگر 27F/1492R و سپس تعیین توالی آن تا سطح جنس شناسایی شدند. شرایط مورد استفاده در این واکنش PCR طبق روش ادوارد و همکاران تنظیم شد (Edwards et al. 1989). محصول واکنش PCR به‌وسیله شرکت ماکروژن با هر دو آغازگر مستقیم و معکوس تعیین توالی گردید. توالی‌های مستقیم و معکوس به‌دست آمده به‌وسیله نرم‌افزار DNA MAN مرتب‌سازی شده و توالی رشته جامع به‌دست آمد و این توالی برای بلاست در بانک ژن (NCBI) مورد استفاده قرار گرفت.

بحث و نتیجه‌گیری

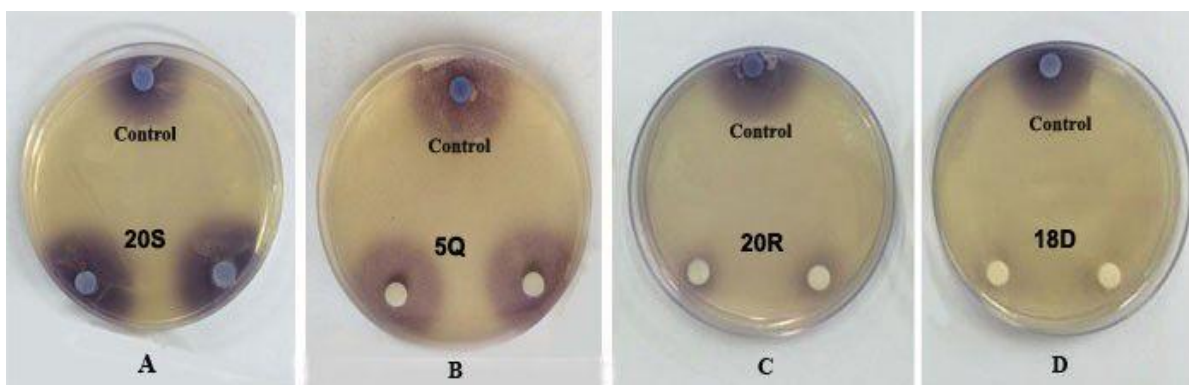
انتخاب باکتری‌های تجزیه‌کننده AHL

سیستم‌های QS طیف وسیعی از اعمال سلولی و فیزیولوژیک از جمله تشکیل و فعال‌سازی بسیاری از آنزیم‌های مخرب و بیماریزا در عوامل بیماریزای حیوانی و گیاهی را تنظیم می‌کنند. در ابتدای شروع این تحقیق،

1. Macrogen, World Meridian Venture Center, Korea
2. Concensus
3. National Center of Biotechnology Information

فقط قادر به شناسایی و تجزیه ساختار طبیعی این مولکول است. چرا که غلظت فیزیولوژیک C8-HSL در این بیمارگر تقریباً ۱۰ میکرومولار است (Czajkowski *et al.* 2011). حال آنکه در این پژوهش از غلظت ۲۵ میکرومولار برای نوع سنتزی استفاده شد.

جدایه ۲۲۲H توانایی بالایی در تجزیه C8-HSL طبیعی داشت. در حالی که این توانایی برای نوع سنتزی این مولکول ضعیف‌تر بود. در این رابطه باید گفت این جدایه احتمالاً توانایی تجزیه C8-HSL را فقط در غلظت طبیعی و فیزیولوژیک آن داراست و یا این که



شکل ۱. غربال جدایه‌های باکتریایی از نظر توانایی تجزیه C8-HSL با استفاده از گزارشگر CV026

(A: بی‌تأثیر، B: ضعیف، C: متوسط، D: قوی)

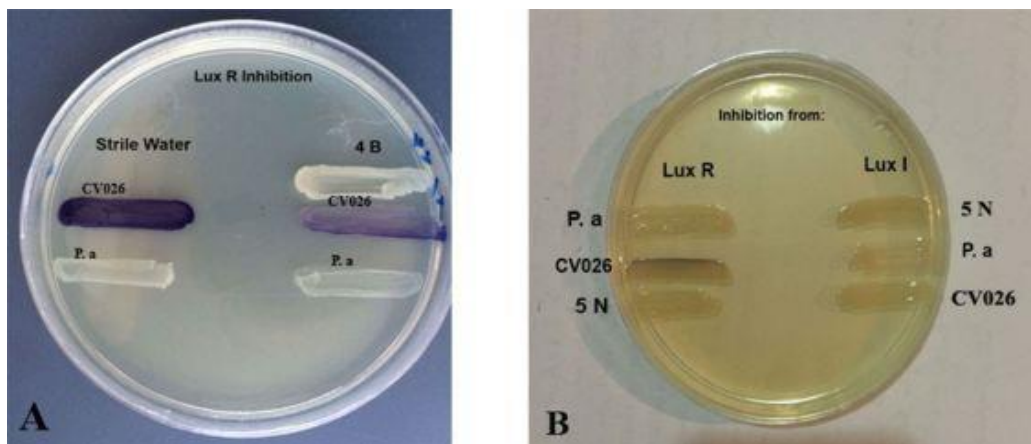
Figure 1. Screening of bacterial isolates for C8-HSL degradation activity by using of CV026 biosensor (A: ineffective, B: poor, C: medium, D: strong)

یافت شد که البته میزان این تأثیر بین جدایه‌ها کاملاً متفاوت بود. این نتایج در راستای یافته‌های حاصل از مطالعه تأثیر برخی عصاره‌های گیاهی بر عملکرد و فعالیت LuxI/LuxR علاوه بر تجزیه AHL است که این توانایی مضاعف را مرتبط با داشتن ترکیبات مختلف مؤثر بر QS و یا ترکیباتی با طیف تأثیر وسیع گزارش کرده‌اند (Rasmussen and Givskov 2006, Vattem *et al.* 2007, Mihalik *et al.* 2008, Higgins *et al.* 2010, Cheina 2013). طبق اطلاعات ما وجود این دو نوع خاصیت به‌طور هم‌زمان، تا کنون در میکروارگانیسم‌ها گزارش نشده و محدود به عصاره‌های گیاهی می‌باشد و در این تحقیق برای اولین بار باکتری‌هایی گزارش می‌شود که هم دارای توانایی تجزیه AHL و هم مداخله در فعالیت LuxI/LuxR هستند. در تحقیقات راسموسن و همکاران، ۵۲ جدایه قارچ *Penicillium sp.* روی مختل کردن QS و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتری *P. aeruginosa* بررسی شدند. نتایج نشان داد که برخی از جدایه‌ها قادر به تجزیه AHL نبودند، اما پروتئین LuxR را غیرفعال کردند (Rasmussen *et al.* 2005). در تحقیق دیگری ۱۶۸ باکتری جدا شده از فیلوسفر توتون

بررسی دخالت در فعالیت پروتئین‌های LuxI و LuxR
در یک سیستم QS وابسته به AHL نظیر آنچه در باکتری‌های گرم منفی وجود دارد، پروتئین LuxI سازنده مولکول پیام‌رسان یعنی AHL است. بسیاری از ترکیبات طبیعی به‌خاطر شباهت ساختاری خود با AHL و در نتیجه رقابت در اتصال به پروتئین گیرنده و یا با تسریع در روند تجزیه پروتئین‌های گیرنده، سبب دخالت در نحوه فعالیت AHL و در نتیجه بر هم زدن سیستم QS می‌شوند (Chenia 2013). با هدف یافتن آنتاگونیست‌هایی که علاوه بر داشتن آنزیم‌های تجزیه‌کننده AHLs، دارای توانایی ممانعت در سنتز AHL (توسط پروتئین LuxI) و یا پاسخ به AHL (توسط پروتئین LuxR) نیز باشند، از سیستم انتشار در آگار استفاده شد. از ۱۱۱ جدایه، ۱۷ جدایه توانایی تغییر و نوسان در عملکرد LuxI و ۹ جدایه تغییر در عملکرد کارایی LuxR را نشان دادند که با کاهش تولید رنگ بنفش توسط گزارشگر در مقایسه با شاهد مشخص شد. پنج جدایه نیز روی هر دوی LuxI/LuxR تأثیر گذار بودند (شکل ۲). در پژوهش حاضر در مجموع ۲۱ جدایه دارای توانایی دخالت در فعالیت پروتئین‌های LuxI/LuxR

ارزشمند است. به‌خصوص با توجه به کثرت عواملی که در محیط طبیعی روی فعالیت و کارایی آنتاگونیست‌ها تأثیر گذار هستند، داشتن توانایی‌های متعدد برای یک آنتاگونیست امکان بی‌تأثیر شدن آن را در برخی شرایط خاص خیلی کاهش می‌دهد و کارایی آن را در شرایط مختلف بیشتر تضمین می‌کند.

واجد توانایی اختلال در QS باکتری *P. carotovorum* شناخته شد. مطالعات نشان داد ۶۲ جدایه از آن‌ها فاقد قدرت تجزیه آنزیمی بوده و از سایر مکانیسم‌های اختلال در QS بهره می‌جویند (Ma et al. 2013). یافتن آنتاگونیست‌هایی با توانایی‌های چند جانبه برای خاموش کردن سیستم حدنصاب احساس یک اقدام بسیار



شکل ۲. تأثیرات مختلف جدایه‌های باکتریایی در کاهش کارایی LuxI و LuxR. (A) تأثیر ضعیف استرین 4B و (B) تأثیر خوب روی LuxI و متوسط روی LuxR توسط استرین 5N (P. a: *P. atrosepticum*, CV026: *C. violaceum* CV026)

Figure 2. different activity of bacterial isolates on decreased operation of LuxI and LuxR. (A) poor activity of 4B strain and (B) good activity of 5N strain on LuxI and medium activity on LuxR (P. a: *P. atrosepticum*, CV026: *C. violaceum* CV026)

آلودگی کافی نیست، برای بیمارگر ضروری می‌باشد (Martins et al. 1999). باکتری‌های مورد آزمایش با توانایی تجزیه مولکول AHL توانستند در جریان بیان ژن مذکور اختلال ایجاد کنند که در نهایت به کاهش تولید آنزیم پروتئاز منجر شده و لذا توانایی بیمارگر در تجزیه پروتئین موجود در محیط SMA در مقایسه با شاهد کاهش یافت. بررسی‌های انجام شده توسط مولینا و همکاران نیز نشان داده بود که وقتی *Bacillus* با *Pectobacterium carotovorum* استرین pME6863 حامل ژن لاکتونازی *aiiA* به صورت متقابل کشت شد، تولید آنزیم پروتئاز به شدت کاهش یافت. اما وقتی همین آزمایش با استرین *Bacillus* sp. A24 فاقد پلاسمید مذکور انجام شد هیچ تغییری در قطر هاله شفاف اطراف *P. carotovorum* ایجاد نشد و یافته‌های مذکور ثابت کرد که تنها عامل مؤثر بر کاهش تولید پروتئاز، تجزیه AHL توسط آنزیم لاکتونازی *AiiA* است (Molina et al. 2003).

تأثیر بر تنظیم ژنی وابسته به AHL در *P. atrosepticum* این آزمایش نیز برای تشخیص توانایی تجزیه AHL و دخالت در بیان ژن‌ها توسط آنتاگونیست‌ها انجام شد. وقتی باکتری *P. atrosepticum* روی محیط SMA رشد کرد، ترشح اگزوپروتئاز رخ داد که به صورت وجود هاله شفاف اطراف کلونی باکتری بروز کرد. وقتی آنتاگونیست‌ها در مجاورت بیمارگر کشت شد، در برخی از جدایه‌های آنتاگونیست این توانایی کاهش هاله شفاف اطراف بیمارگر خیلی چشمگیر بود که نشانگر دخالت زیاد در فعالیت پروتئازی *P. atrosepticum* است (جدول ۱). تولید اگزوپروتئاز در این باکتری توسط یک چرخه وابسته به AHL کنترل می‌شود که البته تحت تنظیم دو نوع سیستم QS از نوع AI2/LuxS و AHL/LuxR است (Lee et al. 2013). نقش اصلی پروتئازها تجزیه و خنثی کردن پروتئین‌های دفاعی میزبان طی اولین ساعات آلودگی است. ممانعت از این مکانیسم مقاومت گیاهی در مراحل اولیه آلودگی، یعنی زمانی که ساخت فاکتورهای بیماریزایی برای استقرار

جدول ۱. جدایه‌های باکتریایی مؤثر بر کاهش تولید پروتئاز توسط *P. atrosepticum*Table 1. Effective bacterial isolates on reduction of protease production by *P. atrosepticum*

Antagonistic isolate	Effect	Antagonistic isolate	Effect	Antagonistic isolate	Effect	Antagonistic isolate	Effect
14O	good	11E	good	52H	Good	1M	good
1J	good	32P	fair	4J	Fair	121H	fair
221C	fair	2322H	fair	2J	Fair	25H	fair

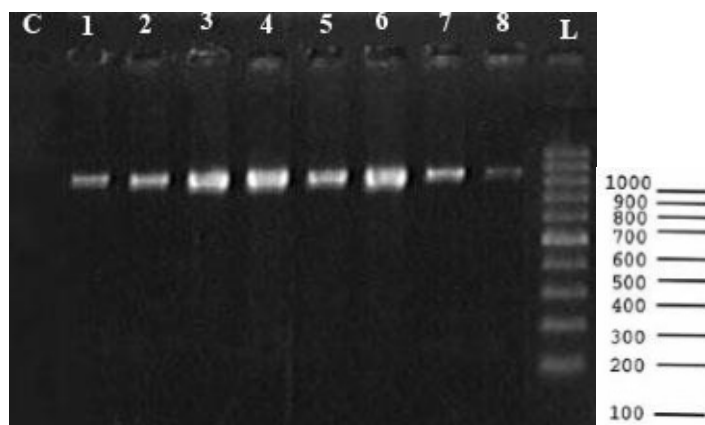
در کارایی LuxR می‌باشند که نتیجه بسیار ارزشمندی است.

شناسایی جدایه‌های انتخابی

۲۱ جدایه انتخابی در مراحل قبل با توالی‌یابی ناحیه 16srDNA و نیز نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی در سطح جنس شناسایی شدند. این جدایه‌ها متعلق به جنس‌های *Bordetella*, *Citrobacter*, *Brevundimonas*, *Bacillus* و *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* و *Escherchia* بود.

بررسی وجود ژن لاکتوناژی *aiiA* در جدایه‌های انتخابی

نتایج حاصل از تکثیر ژن *aiiA* با روش PCR و توالی‌یابی محصول PCR با هر دو آغازگر مستقیم و معکوس نشان داد که این ژن در تمامی ۱۲ جدایه *Bacillus* sp., *Acinetobacter* sp. 31P، *Enterobacter* sp. 32P و نیز در جدایه *Chryseobacterium* sp. 19K وجود داشت (شکل ۳). با این نتایج مشخص شد که برخی از جدایه‌های مورد آزمایش نظیر *Acinetobacter* sp.5N دارای هر سه نوع مکانیسم تجزیه آنزیمی AHL، دخالت در کارایی LuxI و دخالت



شکل ۳. ردیابی ژن لاکتوناژی *aiiA* (حدود 800 bp) در جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از پرایمر *aiiA-7F/aiiA-7R* (کنترل منفی، 1: شاهد مثبت (استرین *[E. coli DH5α]*، 2-8: استرین‌های *Bacillus* sp.، *L*: 100 bp DNA ladder).
Figure 3. Detection of *aiiA* lactonase gene (about 800 bp) in experimental isolates by *aiiA-7F/aiiA-7R* primers (C: negative control, 1: positive control [*E. coli* DH5α], 2-8: *Bacillus* sp. strains, L: 100 bp DNA ladder)

سیستم QS یک باکتری بیمارگر را به روش‌های مختلفی می‌توان مختل کرد که تجزیه آنزیمی مولکول‌های پیام‌رسان، رایج‌ترین این شیوه‌هاست. اما اختلال در تولید AHL از طریق LuxI و اختلال در اتصال آن به پروتئین گیرنده LuxR نیز از جمله روش‌های دیگر خاموش کردن QS است (Amral and Monlar 2012). در این تحقیق ۲۱ جدایه واجد توانایی اختلال در عملکرد LuxI و LuxR یافت شد که نتیجه بسیار

نتیجه‌گیری کلی

با هدف کنترل و کاهش بیماری‌زایی *P. atrosepticum* روی سیب‌زمینی، در این تحقیق به جداسازی ریزوباکتری‌های تجزیه‌کننده C8-HSL پرداخته شد. استفاده از دو نوع AHL طبیعی و سنتزی در این تحقیق نشان داد که در بیشتر جدایه‌ها هیچ تفاوتی از این نظر وجود نداشت که نشانگر توانایی تجزیه غلظت‌ها و ساختارهای مختلف C8-HSL در این جدایه‌هاست.

مفید خاک نیز تحت تنظیم QS است، لذا استفاده از باکتری‌های تجزیه‌کننده AHL ممکن است تأثیر منفی بر زندگی این آنتاگونیست‌ها داشته باشد که در این رابطه باید در هر منطقه بررسی‌های لازم از این نظر صورت گرفته و سپس برای عرضه و معرفی استرین‌های آنتاگونیست به خاک تصمیم‌گیری نمود. در هر صورت یافتن میکروارگانیسم‌هایی با توانایی برهم زدن QS باکتری‌های بیماریزای گیاهی گرچه اقدامی مفید و روشی نوین و امیدوارکننده است، اما مستلزم تحقیقات همه جانبه است تا بتوان آن‌ها را با اطمینان به محیط زیست عرضه نمود.

با توجه به این که در این تحقیق به آنتاگونیست‌هایی دست یافتیم که دارای بیش از یک مکانیسم برای خاموش کردن سیستم QS باکتری *P. atrosepticum* بودند، امید می‌رود که استفاده از آن‌ها بدون داشتن اثرات ناخواسته، نتایج خوبی را در شرایط مزرعه و یا حتی روی سایر بیمارگرهای باکتریایی که بیماریزایی‌شان متکی بر سیستم QS است نیز نشان دهد. ضمناً گزارش جنس‌های جدید باکتریایی با توانایی خاموشی سیستم QS دریچه‌ای برای آغاز تحقیقات جدید روی این جنس‌ها است.

سپاسگزاری

از زحمات پروفیسور Yves Dessaux برای ارسال استرین گزارشگر، دکتر Bassam Edvan برای ارسال مولکول سیگنال، پروفیسور Miguel Camara برای راهنمایی در انجام کار و آقای مهندس قاسمی در موسسه گیاهپزشکی کشور برای اهدای استرین باکتری بیمارگر، همکاری معاونت پژوهشی و آقایان مهندس محمدحسن شمسی و مهندس مسعود عباسی مسئولین آزمایشگاه‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، تشکر و قدردانی می‌گردد.

ارزشمندی است و حاکی از وجود آنتاگونیست‌هایی با توانایی‌های چند جانبه برای مختل کردن QS است که همان‌طور که قبلاً ذکر شد کارایی آنتاگونیست‌ها در شرایط محیطی مختلف را بیشتر تضمین می‌کند. یافتن آنتاگونیست‌هایی با خاصیت بازدارندگی از آنزیم پروتئاز نیز اقدام ارزشمند دیگری بود. چرا که پروتئازها نیز یکی دیگر از عوامل بیماریزایی پکتوباکتریوم‌ها بوده و در کنار پکتینازها، در ایجاد بیماری و شکستن مقاومت گیاه میزبان دخیل هستند (Lee et al. 2013). درصد بالا و تنوع زیاد باکتری‌های QQ جدا شده در این تحقیق نشان می‌دهد که QQ می‌تواند یک استراتژی متداول برای باکتری‌های خاک جهت بقا در میکروفلور ریزوسفر باشد. البته پس از اثبات توانمندی یک آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه، اولین قدم سنجش کارایی آن در مزرعه و شرایط طبیعی است. توانایی رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها، تحمل شرایط مختلف فیزیکی و شیمیایی خاک، تحمل خشکی، بقا و پایداری طولانی مدت در خاک و علاوه بر این‌ها بیان ژن‌های مرتبط با بیوکنترول و فعال بودن محصولات این ژن‌ها در شرایط طبیعی بر کارایی یک آنتاگونیست در طبیعت بسیار تأثیرگذار است و قطعاً قبل از معرفی یک میکروارگانیسم به‌عنوان یک آنتاگونیست کاربردی باید بررسی‌های مذکور نیز به‌عمل آید. همچنین یافتن فرمولاسیون مناسبی از آنتاگونیست که به حفظ و یا تقویت توانایی‌های ذکر شده در بالا کمک کند بسیار مهم و ارزشمندی است. در رابطه با آنتاگونیست‌های دارای خاصیت QQ، مساله مهم دیگری که باید مورد مطالعه قرار گیرد بحث عدم تأثیر آن‌ها بر میکروارگانیسم‌های مفید و غیر هدف می‌باشد. از آن‌جا که تعدادی از اعمال حیاتی و نیز ضد میکروبی باکتری‌های آنتاگونیست و

REFERENCES

- Amaral L, Molnar J (2012) Inhibitors of efflux pumps of Gram-negative bacteria inhibit Quorum Sensing. Open Journal of Pharmacology 2 (2): 1-14.
- Antunes LCM, Ferreira RBR, Buckner MMC, Finlay BB (2010) Quorum sensing in bacterial virulence. Microbiology 156: 2271-2282.
- Barnard AM, Salmond GP (2007) Quorum sensing in *Erwinia* species. Analytical and Bioanalytical Chemistry 387: 415-423.
- Bassler BL, Losick R (2006) Bacterially speaking. Cell Journal 125: 237-246.
- Cirou A, Raffoux A, Diallo S, Latour X, Dessaux Y, Faure D (2011) Gamma-caprolactone stimulates growth of quorum-quenching *Rhodococcus* populations in a large scale hydroponic system for culturing *Solanum tuberosum*. Research in Microbiology 162: 945-950.

- Czajkowski R, Jafra S** (2009) Quenching of acyl-homoserine lactone-dependent quorum sensing by enzymatic disruption of signal molecules. *Acta Biochimica Polonica* 56(1): 1-16.
- Czajkowski R, Perombelon MCM, van Veen JA, van der Wolf JM** (2011) Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species. A review *Plant Pathology* 60(6): 999-1013.
- Chen F, Gao Y, Chen X, Yu Z, Li X** (2013) Quorum Quenching Enzymes and Their Application in Degrading Signal Molecules to Block Quorum Sensing-Dependent Infection. *International Journal of Molecular Sciences* 14: 17477-17500
- Chenia HY** (2013) Anti-Quorum Sensing Potential of Crude *Kigelia Africana* Fruit Extracts. *Sensors* 13: 2802-2817.
- 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.
- Dong YH, Gusti AR, Zhang Q, Xu JL, Zhang LH** (2002) Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied Environmental Microbiology* 68: 1754-1759.
- 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.
- Higgins CA, Bell T, Delbederi Z, Feutren-Burton S, McClean B, O'Dowd C, Watters W, Armstrong P, Waugh D, van den Berg H** (2010) Growth inhibitory activity of extracted material and isolated compounds from the fruits of *Kigelia pinnata*. *Planta Medica journal* 76: 1840-1846.
- Hong KW** (2012) Quorum quenching revisited-from signal decays to signalling confusion. *Sensors* 12: 4661-4696.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat N, Condemine G, Nasser W, Reverchon S** (1996) Regulation of pectinolysis in *Erwinia chrysanthemi*. *Annual Review of Microbiology* 50: 213-257.
- 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.
- Liu H, Coulthurst SJ, Pritchard L, Hedley PE, Ravensdale M, Humphris S, Burr T, Takle G, Brurberg MB, Birch PRJ, Salmund GPC, Toth IK** (2008) Quorum sensing coordinates brute force and stealth modes of infection in the plant pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *PLoS Pathogen*. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000093.
- Ma A, Lv D, Zhuang X, Zhuang G** (2013) Quorum quenching in culturable phyllosphere bacteria from Tobacco. *International Journal of Molecular Science* 14: 14697-14619.
- Mahmoudi E, Ahamadi A, Seyed-Tabatabaei BE, Ghobadi A, Akhavan Hassanzadeh N, Venturi V** (2011) An Novel AHL-Degrading Rhizobacterium Quenches The Virulence Of *Pectobacterium atrosepticum* On Potato Plant. *Journal of Plant Pathology* 93(3): 587-594.
- Martins ML, Souza VN, Moraes JRE, Moraes FR, Costa AJ** (1999) Comparative evaluation of the susceptibility of cultivated fishes to the natural infection with *Myxosporean parasites* and tissue changes in the host. *Brazilian Journal of Biology* 59: 263-269.
- McClean KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GS, Williams P** (1997) Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143: 3703-3711.
- Mihalik K, Chung DW, Crixell SH, McLean RJC, Vattam DA** (2008) Quorum sensing modulators of *Pseudomonas aeruginosa* characterized in *Camellia sinensis*. *Asian Journal of Traditional Medicines* 3: 12-23.
- Molina L, Constantinescu F, Michel L, Reimann C, Duffy B, Defago 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, Someya N, Ikeda T** (2009) Novel N-Acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolate from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum quenching properties. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 73: 2124-2127.
- Packiavathy IASV, Palani Agilandswari, Khadar SM, Pandian SK, Ravi AV** (2012) Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Research International* 45: 85-92.

- 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.
- Rasmussen TB, Skindersoe ME, Bjarnsholt T, Phipps RK, Christensen KB, Jensen PO** (2005) Identity and effects of quorum-sensing inhibitors produced by *Penicillium* species. *Microbiology* 151: 1325-40.
- Rasmussen TB, Givskov M** (2006) Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology* 296: 149-161.
- Schaad NW, Jones JB, Chun W** (2001) Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 3^{ed}, the American Phytopathological Society, USA.
- Qian GL, Fan JQ, Chen DF, Kang YJ, Han B, Hu BS, Liu FQ** (2010) Reducing *Pectobacterium* virulence by expression of an N-acyl homoserine lactonase gene *Plpp-aiiA* in *Lysobacter enzymogenes* strain OH11. *Biological Control* 52: 17-23.
- Van der Wolf JM, De Boer SH** (2007) Bacterial pathogens of potato. In: Vreugdenhil D, ed *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspective*. Delft, The Netherlands: Elsevier, 595-617.
- Vattem DA, Mihalik K, Crixell SH, McLean RJC** (2007) Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia* 78: 302-310.
- Von Bodman SB, Bauer WD, Coplin DL** (2003) Quorum sensing in plant-pathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 41: 455-482.
- Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, Goldner M, Dessaux Y, Camara M, Smith H, Williams P** (2002) N-Acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 70: 5635-5646.
- Zamani M, Behboudi K, Ahmadzadeh M** (2013) Quorum quenching by *Bacillus cereus* U29: a double-edged sword in biological control of plant diseases. *Biocontrol Science and Technology* 23(5): 555-573.