تغییرات فنوتیپی ایجاد شده توسط جهش خود به خودی و ترانسپوزونی در باکتری *سودومناس تولاسی* (*Pseudomonas tolaasii*)

مینا مرادیان، سعید طریقی* و پریسا طاهری

ایران، مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

چکیده

از میان انواع قارچهای خوراکی، قارچ تکمه ای سفید، بیشترین سطح زیر کشت را در اغلب نقاط جهان دارد. باکتری *سودومناس تولاسی* (*Pseudomonas tolaasii*) عامل مهم ایجاد بیماری لکه قهوه ای قارچ خوراکی می باشد که بازارپسندی این محصول را به شدت کاهش می دهد. با توجه به اینکه به واسطه اعمال جهش چهارچوب خوانش ژنوم تغییر کرده و فاکتورهای مؤثر در شدت بیماریزایی مانند قبل تولید نمی شوند، هدف این پژوهش بررسی بیشتر نقش این فاکتورها بعد از انجام جهش و مقایسه خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی جهش یافته ها با سویه وحشی بود. در تحقیق حاضر، یک جدایه با توان بیماریزایی بیشتر انتخاب و از دو فرآیند جهش خود به خودی و جهش به وسیله قطعه ترانسپوزون (mini Tn5)، جهت اعمال تغییر ژنتیکی استفاده شد. از میان فاکتورهای مؤثر در شدت بیماریزایی این باکتری، اثر جهشها بر تولید پایووردین، تولاسین، ایجاد خط سفید و میزان تحرک جدایه ها بررسی گردید. بر اساس داده های به دست آمده، مشخص گردید که میان تولید پایووردین، تولاسین و تشکیل خط سفید با بیماریزایی باکتری رابطه مستقیمی وجود دارد، در حالی که ارتباط معنی داری میان تحرک در جهش یافته ها با بیماریزایی آنها یافت نشد. مطالعات بیشتر جهت شناسایی ژنهای دخیل در این فرآیند ها، در حال انجام است.

واژه های کلیدی: پایووردین، تحرک، تولاسین، جهش، خط سفید

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۵۱۰۵۰۵۶۰ ، پست الکترونیکی: starighi@um.ac.ir

مقدمه

باکتریها به علت شرایط مناسب سالنهای کشت و پرورش قارچ خوراکی نظیر رطوبت نزدیک به ۸۰ درصد و دمای بین ۱۶ تا ۲۵ درجه سانتی گراد، بیشترین اهمیت را در مقایسه با سایر بیماریهای این محصول، به خود اختصاص داده اند. باکتری *سودومناس تولاسی* (*Pseudomonas tolaasii*) عامل مهم واصلی ایجاد بیماری لکه قهوه ای (Brown blotch) در قارچ خوراکی تکمه ای (*Agaricus bisporus*) می باشد (۱۶). در برخی منابع، تعدادی از میکروارگانیسم ها به همراه هم به عنوان عامل این بیماری در نظر گرفته می شوند. بیماری لکه قهوه ای در این قارچ موجب کاهش بازارپسندی و افزایش خسارت اقتصادی می گردد (۲۰). پس از حمله باکتری و شروع بیماریزایی، قارچ میزبان عکس العمل نشان می دهد. در واقع تغییر رنگ بافت کلاهک به قهوه ای به دلیل تولید رنگدانه های شبه ملانین است که قارچ خوراکی تکمه ای برای جلوگیری از رشد این پاتوژن تولید می کند (۲۱). لکه های قهوه ای طویل شده، به یکدیگر می پیوندند و سپس نواحی آلوده با ماده ای چسبناک پوشیده می شوند. در این مرحله بوی ماهی گندیده به مشام می رسد. بندرت، ممکن است کل اندام باردهی به رنگ قهوه ای مایل به قرمز درآمده و از آن

آب خارج شود. اندامهای باردهی جوان به وسیله ماده ای شفاف و براق یا شیشه مانند پوشیده می شوند و از رشد باز می ایستند (۵).

جدایه های بیماریزای گونه تولاسی قادر به تولید نوعی لیپودپسی پپتید (از ترکیبات لیپوپپتیدهای حلقوی) به نام تولاسین می باشند که در پیشرفت بیماری و توسعه لکه ها نقش دارند (۱۷). لازم به ذکر است که جدایه های بیماریزای باکتری*سودوموناس ری اکتانس* (*Pseudomonas reactans*) که در کنار *سودوموناس تولاسی* (*Pseudomonas tolaasii*) باعث ایجاد لکه قهوه ای می گردند، تولید یک ماده خارج سلولی به نام القاء کننده تشکیل خط سفید (White Line Inducing Principle (WLIP)) می کنند که آن هم نوعی لیپودپسی پپتید است. ولی محل زنجیره های آمینواسیدی، تعداد و نوع آنها با تولاسین متفاوت می باشد. در سنجشهای ضد میکروبی که برای مقایسه اثر های ضد میکروبی خط سفید و تولاسین صورت گرفت، مشاهده شد که هر دو ترکیب، مانع رشد قارچ خوراکی می گردند و همچنین این اثر بازدارندگی را بر روی باکتریهای گرم مثبت نیز دارند. لازم به ذکر است که WLIP نسبت به تولاسین توان کمتری در تغییر بافتها دارد (۱۷).

طی مطالعات انجام شده توسط سولر و همکاران، به نظر می رسد از توکسین تولاسین، آنزیم پروتئاز آزاد می شود، سپس به واسطه آن، آنزیمهای تیروزیناز فعال می گردند که مرتبط با مکانیسم قهوه ای شدن می باشند. تیروزینازها به طور طبیعی در سلول وجود دارند که به صورت نهفته و خاموش می باشند. اگر این آنزیمها فعال شوند، موجب اکسید شدن ترکیبات فنولی می گردند که در نهایت، تولید ترکیبات شبه ملانین قهوه ای رنگ می نمایند (۲۱). در شرایط کمبود آهن بیشتر میکروبها تولید سیدروفور و گیرنده های آهن در سطح غشای سلولی می کنند (۱۱ و ۱۵).

به طور کلی به هر گونه جهش که در آن جهش با تبادل یک قطعه ترانسپوزون صورت نگرفته باشد، جهش خود به خودی گویند. بیشتر جهشهای خود به خودی عبارتند از: جایگزینی باز، حذف باز و نوآرایی کروموزوم که برای مورد اخیر، حالات حذف، جفت شدن، واژگونی و یا انتقال، محتمل می باشد (۱۹). طی تحقیقات انجام شده گونه *سودوموناس تولاسی* (*Pseudomonas tolaasii*) قادر است بر اثر کشتهای متوالی، در محیطهای کشت مایع نظیر کینگز ب (King's B) یا *سودوموناس* اف (*Pseudomonas* F) در دمای ۲۲ تا ۳۰ درجه سانتی گراد به طور خود به خودی، جدایه های جهش یافته تشکیل دهد. این در حالی است که وقوع این نوع از جهش در دمای ۱۷ تا ۲۰ درجه سانتی گراد به طرز قابل توجهی کاهش یافته و بخشهای باقیمانده نسبتاً بزرگ و مقاوم باکتری حتی پس از ۲۰ روز بعد از تلقیح در محیط دیده می شوند (۱۵). پرگنه باکتریهای جهش یافته بر خلاف والدین اولیه شان که کدر و تیره هستند، بسیار شفاف می باشند. در ضمن جدایه های جهش یافته، پرگنه موکوئیدی و جدایه های والدی پرگنه زبری را تشکیل می دهند.

ترانسپوزون Tn5 به عنوان یک عامل سودمند در ایجاد جهش در انواع باکتریهای گرم منفی به اثبات رسیده است. بر اساس تحقیقات انجام شده، امروزه شمار زیادی از مینی ترانسپوزون های مشتق شده از Tn5 ساخته شده اند که فرآیند ایجاد جهش به واسطه وارد کردن این قطعاتDNA خارجی به باکتریها، تسهیل می گردد. به طور کلی مینی ترانسپوزون ها از ژنهای اختصاصی مقاومت به آنتی بیوتیکهای کانامایسین، کلرامفنیکول، استرپتومایسین، اسپکتینومایسین و تتراسایکلین، تشکیل شده اند که این جایگاهها همان مارکر های انتخابی می باشند. همچنین در ساختار این مینی ترانسپوزون ها یک جایگاه کلونینگ واحد به نام Not1 وجود دارد. علاوه بر این در ترانسپوزون، ژنهای *lacz*، *phoA*، *luxAB*، *xylE* هم وجود دارند که این

ژنها فاقد پیش برنده یا پروموتور هستند و فقط در جهت دهی اتصالات اپران به ژنوم نقش دارند (۷).

هدف از این تحقیق یافتن فاکتورهای مؤثر در بیماریزایی باکتری *سودو موناس تولاسی* *Pseudomonas tolaasii* بود. برای این منظور از دو روش جهش خود به خودی وجهش زایی با ترانسپوزون استفاده شد. به واسطه فرآیند جهش و وارد کردن قطعه ترانسپوزون، چهارچوب خوانش ژنوم تغییر کرده و فاکتورهای مؤثر در بیماریزایی به صورت سابق تولید نمی شوند. مقایسه خصوصیات فنوتیپی وژنوتیپی جهش یافته ها با سویه وحشی فاکتورهای مؤثر در بیماریزایی این باکتری را روشن ترکرد.

مواد و روشها

انتخاب بهترین جدایه جهت ایجاد جهش: با توجه به اینکه هدف از این مطالعه، یافتن فاکتورهای مؤثر در بیماریزایی باکتری *سودوموناس تولاسی* (*Pseudomonas tolaasii*) بود، لذا با انجام آزمونهای سنجش میزان تحرک، تولید سیدروفور پایووردین، حساسیت به آنتی بیوتیک، تولید همولایزین، تولید خط سفید و ایجاد علائم قهوه ای و پوسیدگی در کلاهک قارچ تکمه ای بر روی جدایه های *سودوموناس تولاسی* (*Pseudomonas tolaasii*) شناسایی شده توسط اخلاقی و همکاران، یک جدایه با توان بیماریزایی بالا انتخاب گردید تا فرآیند جهش بر روی آن اعمال گردد (۳).

ایجاد جهش خود به خودی (Spontaneous mutation): برای انجام این جهش از روش موراتا و همکاران استفاده گردید (۱۵). جدایه هایی که بیماریزایی بیشتر و مشهود تری داشتند و ضمناً رنگدانه فلورسنت بیشتری تولید می کردند، برای ایجاد سویه های جهش یافته کم بیماریزا و یا غیر بیماریزا، انتخاب شدند.

ایجاد جهش با pUT*mini Tn5*: ابتدا در لوله آزمایش حاوی یک میلی لیتر محیط کشت LB (لوریا برتانی) مایع از باکتری*شریشیا کلی* (*Escherichia coli*) سویهcc118mini Tn5 که مقاوم به آنتی بیوتیک تتراسایکلین بود، کشت کرده و لوله در گرمخانه شیکردار ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. همزمان باکتری *سودوموناس تولاسی* (*Pseudomonas tolaasii*) که مقاوم به آنتی بیوتیک آمپی سیلین بود، در لوله آزمایش حاوی یک میلی لیتر محیط LB مایع کشت و در گرمخانه شیکردار۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. از هر سوسپانسیون باکتری مقدار ۲۵ میلی‌لیتر برداشته و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل دو بار و هر بار با مقدار ۲۵ میلی‌لیتر محیط LB مایع با استفاده از سانتریفیوژ در سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه شستشو گردید. رسوب حاصل در مقدار ۲/۵ میلی‌تر محیط LB مایع حل شد. از هر سوسپانسیون مقدار ۵۰۰ میکرولیتر برداشته و در یک میکروتیوب جدید با یکدیگر ترکیب شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون به دست آمده روی محیط LB مایع به صورت لکه‌ای کشت و به مدت ۸ ساعت در دمای ۳۰ درجه قرار داده شد. پس از گذشت ۸ ساعت باکتریهای رشد یافته از روی محیط جامد برداشته و در یک میلی‌لیتر محیط LB مایع حل گردید. مقدار ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون در ظروف پتری حاوی محیط کشت انتخابی حاوی آنتی بیوتیکهای تتراسایکلین و آمپی سیلین پخش شده و ظروف پتری در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۴). پس از پیدایش کلنیهای جهش یافته بر روی این محیط کشتهای حاوی آنتی بیوتیک، تک کلونها در چاهکهای پلیت الایزا حاوی محیط کازامینواسید (Casaminoacid (CAA)) و آنتی بیوتیک تتراسایکلین کشت شدند و ۲۴ ساعت در گرمخانه شیکردار، نگهداری گردیدند. سپس کلونیهایی که قادر به رشد بر روی محیط حاوی تتراسایکلین بودند، انتخاب شدند. رشد کلنیها در محیط مذکور، گواه بر دریافت قطعه ترانسپوزون بود. جدایه هایی که پایووردین کمتری در این محیط ایجاد کرده

بودند (خانه های کم رنگ پلیت الایزا) جهت بررسیهای بیشتر سایر فاکتورهای مؤثر در بیماریزایی و مقایسه با سایر جدایه ها، انتخاب شدند.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از روش گرین و سمبروک استفاده شد (۱۰). از جهش یافته ها و سویه وحشی در سه میلی لیتر محیط مایع حاوی تتراسایکلین، کشت ۲۴ ساعته تهیه شد. ۱/۵ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری با چگالی نوری یک واحد در طول موج ۶۰۰ نانومتر، به مدت ۱۰ دقیقه و دور در دقیقه ۹۰۰۰، سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل در ۷۰۰ میکرولیتر بافر لیز حل گردید. ۳۰ میکرولیتر ازسدیم دو دسیل سولفات (۲۰ درصد) به محلول اضافه شد و پس از مخلوط کردن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس به میزان ۰/۲۵ حجم محلول، کلروفوم اضافه کرده و در ۱۳۴۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از این مرحله سه فاز مجزا از هم تشکیل شدند. فاز شفاف رویی را به میکروتیوب دیگری منتقل و سپس هم حجم آن، ایزوپروپانول سرد به محلول اضافه شد و به آهستگی مخلوط گردیدند. پس از سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۴۰۰ دور، رسوب حاصل با اتانول مطلق یا ۷۰ درصد شستشو داده شد و در ۱۳۰۰۰ دور به مدت هفت دقیقه سانتریفیوژ گردید. برای از بین رفتن اتانول باقی مانده در رسوب DNA، میکروتیوب به مدت ۲۰ دقیقه در ترموبلاک ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از خشک شدن کامل اتانول، رسوب DNA در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار استریل حل و در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

الکتروفورز: به منظور کسب اطمینان از استخراج صحیح **DNA** و شکسته نشدن آن، از روش الکتروفورز استفاده گردید. به این ترتیب که **DNA** استخراج شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد در بافر **TBE 1X**در ولتاژ ۹۹ ولت، به مدت ۴۰ دقیقه بارگذاری شد. برای رنگ آمیزی ژل از ماده گرین ویوور به میزان ۱۰ میکرولیتر در لیتر استفاده شد. لازم به ذکر است به منظور بررسی خالص بودن **DNA** استخراج شده و عاری بودن آن از آلودگیهای کربوهیدراتی و پروتئینی، نسبت میزان جذب نوردر $\mathbf{A_{260}}$ به میزان جذب نور در $\mathbf{A_{280}}$ نیز اندازه گیری گردید.

تشخیص وجود ترانسپوزون به روشPCR (واکنش زنجیره ای پلیمراز): به منظور ردیابی ترانسپوزون در جهش یافته و مقایسه با سویه وحشی، فرآیند PCR با استفاده از دو آغازگر اختصاصی که برای قطعه ترانسپوزون طراحی شده اند، انجام گردید. آغازگر رفت $Lux\ A_1$ با توالی ´5- GTGCGTCTTCTGCTTGTCGAAC-3´ و آغازگر برگشت $Lux\ A_2$ با توالی ´5- GTGCTTATCAGCCACCTGAGCT-3´ مورد استفاده قرار گرفتند. به میزان یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۱/۵ میکرولیتر $Mgcl_2$، ۰/۵ میکرولیتر دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرازو سه میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده، صورت گرفت. چرخه حرارتی برای آغازگرها با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت چهار دقیقه آغاز و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، امتداد در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک سیکل امتداد نهایی در دمای ۶۸ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر مدل بیومترا آلمان انجام شد. پس از اتمام واکنش PCR، محصول آن با استفاده از الکتروفورز افقی در دستگاه آشکارساز ژل، رؤیت شد.

آزمون اثبات بیماریزایی جهش یافته ها: به منظور مقایسه و بررسی جهش یافته های غیر بیماریزا و یا کم بیماریزا، این آزمون به روش گاندی انجام شد (۸). ابتدا کلاهکهای سالم قارچ با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سپس

به وسیله یک اسکالپل سترون، برش هایی در کلاهک قارچ ایجاد گردید و قارچها درون یک ظرف دربسته که در کف آن کاغذ صافی مرطوبی قرار داشت، گذاشته شدند. سوسپانسیونی با غلظت 10^8 CFU/ml (واحد تشکیل دهنده پرگنه در هر میلی لیتر) از هر جهش یافته تهیه و مقدار۵۰ میکرولیتر از آن درون حفره های ایجاد شده بر روی کلاهک قارچ، ریخته شد. سپس ظروف، در گرمخانه۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری گردیدند. جهش یافته هایی که توانایی ایجاد بیماری و تولید علائم بر روی کلاهک قارچ را نداشتند برای بررسیهای بیشتر انتخاب شدند.

بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی جهش یافته ها (آزمون ارزیابی تولید پایووردین): برای انجام این آزمون مطابق روش مونچ و همکاران عمل گردید (۱۲). به این ترتیب که از محیط کشت مایع با مقدار کم آهن به نام کازامینواسید استفاده شد. جهت کسب نتیجه بهتر، از نمک K_2HPO_4 به میزان ۱/۵گرم در لیتر و$MgSO_4$ به میزان ۰/۲۵ گرم در لیتر نیز استفاده گردید.

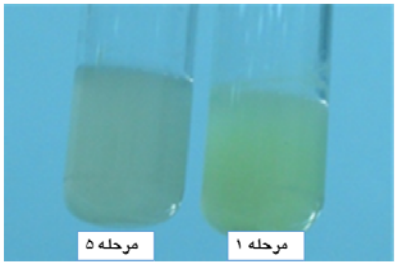
آزمون القاء تشکیل خط سفید(WLIP): برای اجرای این آزمون از روش ونگ و پریس استفاده شد (۲۲). بدین منظور ابتدا سویه های جهش یافته در فواصل دو تا سه سانتیمتر از *سودوموناس ری اکتانس*(*Pseudomonas reactans*)، روی محیط کینگز ب کشت داده شدند. جهت کسب اطمینان، یک پتری شاهد که در آن دو جدایه *سودوموناس تولاسی* (*Pseudomonas tolaasii*) (سویه وحشی) و*سودوموناس ری اکتانس* (*Pseudomonas reactans*) به صورت متقابل کشت شده بودند نیز در نظر گرفته شد. بعد از گذشت ۷۲ ساعت و نگهداری در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد، تشکیل و یا عدم تشکیل خط سفید در حاشیه کلنیها، مثبت یا منفی بودن واکنش را نشان داد.

آزمون همولیز اریتروسیت (سلول خونی) توسط تولاسین: در این آزمون از روش رینی و همکاران استفاده شد (۱۸). ابتدا میزان ۸۰ میلی لیتر محیط آگار غذایی پس از اتوکلاو با چهار میلی لیتر خون گاو مخلوط گردید و محیط حاصل در پتری ریخته شد. سپس از سوسپانسیون تازه سویه وحشی و جهش یافته های منتخب، به میزان دو میکرولیتر بر روی این محیط قرار داده شد. پتریها به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۲۸ درجه سانتی گراد نگه داری شدند. ظهور هاله ای شفاف در اطراف کلنیها، نشانگر تولید تولاسین بود و در نتیجه تجزیه و همولیز اریتروسیت ارزیابی گردید.

آزمون سنجش میزان تحرک: جهت سنجش میزان تحرک از روش چو و همکاران استفاده شد (۶). دیسکهای کاغذی به سوسپانسیون کشت تازه باکتریها آغشته و بر روی محیط کینگز ب دارای ۱ درصد آگار قرار گرفتند. پتریها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

نتایج

ردیابی جهش یافته ها در *سودوموناس تولاسی* (*Pseudomonas tolaasii*): در روش جهش خود به خودی، پس از کشتهای متوالی بر روی محیط کشت کینگز ب مایع، برخی از پرگنه ها که تغییراتی در فنوتیپشان روی محیط کشت مشاهده شد، جهت انجام آزمونهای بیشتر انتخاب شدند. در این روش، مشخص شد در جدایه هایی که در مرحله پنج، رنگدانه فلورسنت کمتری نسبت به مرحله یک تولید کرده بودند (شکل ۱)، جهش در آنها اتفاق افتاده است. به منظور ردیابی جهش یافته های ایجاد شده توسط ترانسپوزون از آغازگرهای *luxA1* و *luxA2* استفاده شد. تکثیر ناحیه ۹۰۰ جفت بازی ناحیه ترانسپوزون بیانگر قرار گرفتن ترانسپوزون در ژنوم *P. tolaasii* بود. همچنین مقاومت جهش یافته های ایجاد شده توسط ترانسپوزون به آمپی سیلین، انجام موفق جهش زایی را تایید کرد.



شکل۱- مقایسه کاهش میزان رنگدانه فلورسنت در مرحله ۱ و مرحله ۵ فرآیند جهش.

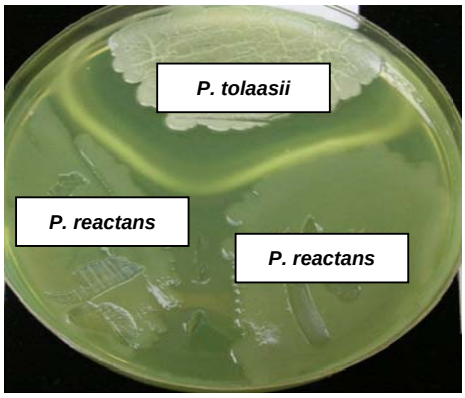
بیماریزایی جهش یافته ها: جهشهای خود به خودی ایجاد شده، موجب بروز علائم متفاوتی بر روی کلاهک قارچ خوراکی شدند (شکل ۲). جهش یافته های SM20، SM10، SM9، SM13 و SM14 علائم خفیف تری نسبت به سویه وحشی، بر روی کلاهک قارچ خوراکی ایجاد کردند. درجاتی از تغییر رنگ و بو، در جهش یافته ها در مقایسه با سویه وحشی دیده شد (شکل ۲). جهش یافته های SM10 وSM20 از تیپ-ب و جهش یافته های SM9 ، SM13 و SM14 مربوط به تیپ ج بودند.

شکل۲- علائم ایجاد شده توسط جهش یافته ها و سویه وحشی بر روی کلاهک قارچ خوراکی. الف) پوسیدگی قهوه ای وخشک ایجاد شده توسط سویه وحشی ب) علائم خفیفی ازبیماری ایجاد شده توسط برخی از جهش یافته ها ج) عدم بروز علائم توسط جهش یافته ها

همچنین در جهش یافته هایی که به روش جهش با ترانسپوزون به دست آمدند نیز علائم کاهش در نوع و رنگ پوسیدگی، قطر پوسیدگی و بوی پوسیدگی مشاهده گردید. نوع علائم در سویه وحشی و جهش یافته های TM F_2-4 از تیپ الف، در جهش یافته های TM C_2-1، TM F_6-1، TM A_5-1، TM G_{11}-4، TM C_3-4 و TM A_3-4 از تیپ ب و در جهش یافته های TM H_4-4، TM E_3-1، TM E_4-4، TM A_8-1، TM D_2-1، TM A_{10}-4، TM C_4-1، TM E_5-4، TM B_5-1 و TM H_4-1 از تیپ ج بودند (شکل ۲، جدول ۱). مدت ظهور علائم در جدایه های TM E3-1، TM A8-1، TM F6-1، TM D2-1، TM C4-1، TM B5-1و TM H4-1 بسیار بیشتر از سایر جهش یافته ها بوده و کمترین بیماریزایی را نشان دادند.

بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی جهش یافته ها (ارزیابی تولید پایووردین): در این آزمون از میان جهش یافته های ایجاد شده به روش جهش خود به خودی، جهش یافته های SM20 وSM10 و از میان جهش یافته های ایجاد شده به روش ترانسپوزون، انواع TM E_3-1، TM A_8-1 و TM H_4-1 کمترین مقادیر پایووردین را تولید نمودند. نتایج حاصل، نشان دادند که قدرت بیماریزایی و میزان پایووردین تولید شده در جهش یافته ها ارتباط مستقیمی دارند و ایجاد جهش، موجب کاهش تولید این سیدروفور در جهش یافته ها گردید. لازم به ذکر است جهش یافته هایی که به لحاظ کد علائم بیماریزایی با سویه وحشی یکسان بودند، میزان تولید پایووردین کمتری نسبت به سویه وحشی داشتند ولی مدت زمان ظهور علائم در این جهش یافته ها نسبت به سویه وحشی بیشتر بود (جدول ۱).

القای تشکیل خط سفید (WLIP): در این آزمون کلیه جهش یافته های حاصل از هر دو روش، فاقد توان تولید خط سفید بودند و فقط سویه وحشی (شاهد) قادر به ایجاد این خط در مقابل *Pseudomonas reactans* بود (شکل ۳).



شکل۳- تشکیل خط سفید رنگ در سویه وحشی.

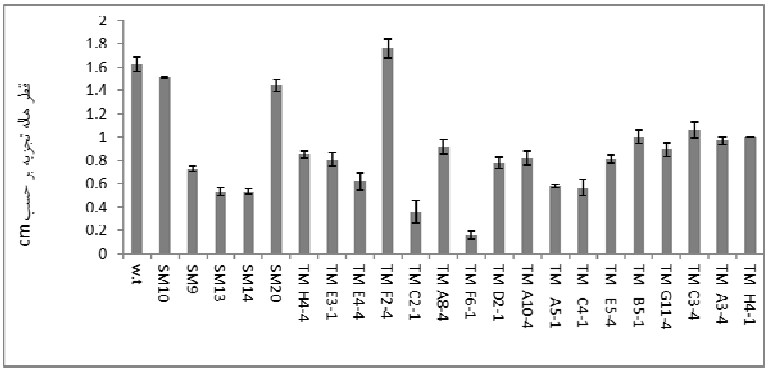
جدول ۱- نتایج آزمونهای فیزیولوژیکی جهش یافته ها.

نام جهش یافته	تیپ علائم	تولید پایووردین (بر اساس میزان جذب نوردر nm۶۰۰)	مدت زمان ظهور علائم (ساعت)	تولید خط سفید	سنجش میزان تحرک (cm)	توانایی همولیز اریتروسیت (cm)
W.T.	الف	۱/۶۸ ± ۰/۳۱	۲۴	+	۱/۳ ± ۰/۰۸	۱/۶۲ ± ۰/۰۶
SM10	الف	۱/۰۲ ± ۰/۰۱	۳۰	_	۱/۵۶ ± ۰/۰۶	۱/۵۰ ± ۰
SM9	ب	۱/۵۶ ± ۰/۰۶	۲۷	_	۱/۵۱ ± ۰/۰۴	۰/۷۳ ± ۰/۰۲
SM13	ب	۱/۵۱ ± ۰/۱۵	۲۶	_	۱/۶۰ ± ۰/۰۶	۰/۵۳ ± ۰/۰۳
SM14	ب	۱/۶۶ ± ۰/۱۹	۲۸	_	۱/۹۱ ± ۰/۰۵	۰/۵۳ ± ۰/۰۲
SM20	الف	۰/۹۵ ± ۰/۰۴	۳۵	_	۱/۶۴ ± ۰/۰۶	۱/۴۴ ± ۰/۰۵
TM H_4-4	ج	۱/۰۳ ± ۰/۰۴	۴۸	_	۳/۲۳ ± ۰/۱۴	۰/۸۵ ± ۰/۰۲
TM E_3-1	ج	۰/۸۵ ± ۰/۱۷	۵۰	_	۲/۰۶ ± ۰/۰۶	۰/۸۱ ± ۰/۰۵
TM E_4-4	ج	۱/۳۰ ± ۰/۱۴	۴۴	_	۲/۹ ± ۰/۰۵	۰/۶۲ ± ۰/۰۷
TM F_2-4	الف	۱/۰۹ ± ۰/۰۷	۴۵	_	۲/۲۶ ± ۰/۱۴	۱/۷۵ ± ۰/۰۸
TM C_2-1	ب	۱/۴۱ ± ۰/۰۸	۴۰	_	۱/۸۳ ± ۰/۰۳	۰/۳۶ ± ۰/۰۹
TM A_8-1	ج	۰/۷۴ ± ۰/۰۷	۷۲	_	۲/۲۳ ± ۰/۱۴	۰/۹۱ ± ۰/۰۶
TM F_6-1	ب	۰/۷۹ ± ۰/۱۴	۶۰	_	۲/۴۶ ± ۰/۰۸	۰/۱۶ ± ۰/۰۳
TM D_2-1	ج	۰/۹۳ ± ۰/۱۳	۶۸	_	۱/۴۶ ± ۰/۰۸	۰/۷۸ ± ۰/۰۴
TM A_{10}-4	ج	۱/۳۱ ± ۰/۰۴	۳۷	_	۲/۰۳ ± ۰/۰۳	۰/۸۲ ± ۰/۰۶
TM A_5-1	ب	۱/۰۳ ± ۰/۰۲	۴۰	_	۳/۴۶ ± ۰/۰۳	۰/۵۸ ± ۰/۰۱
TM C_4-1	ج	۰/۸۹ ± ۰/۱	۷۰	_	۱/۷۱ ± ۰/۰۴	۰/۵۶ ± ۰/۰۶
TM E_5-4	ج	۱/۱۷ ± ۰/۱	۳۸	_	۲/۲۳ ± ۰/۱۴	۰/۸۱ ± ۰/۰۳
TM B_5-1	ج	۰/۹۶ ± ۰/۰۵	۶۹	_	۲/۴۶ ± ۰/۰۳	۱ ± ۰/۰۵
TM G_{11}-4	ب	۱/۳ ± ۰/۱۲	۳۴	_	۳/۲ ± ۰/۱۵	۰/۸۹ ± ۰/۰۵
TM C_3-4	ب	۱/۰۲ ± ۰/۰۵	۵۵	_	۲/۱۶ ± ۰/۰۸	۱/۰۶ ± ۰/۰۷
TM A_3-4	ب	۱/۰۶ ± ۰/۰۴	۴۵	_	۲/۰۳ ± ۰/۰۳	۰/۹۶ ± ۰/۰۳
TM H_4-1	ج	۰/۷۳ ± ۰/۱۳	۷۲	_	۲/۴ ± ۰/۰۵	۱ ± ۰

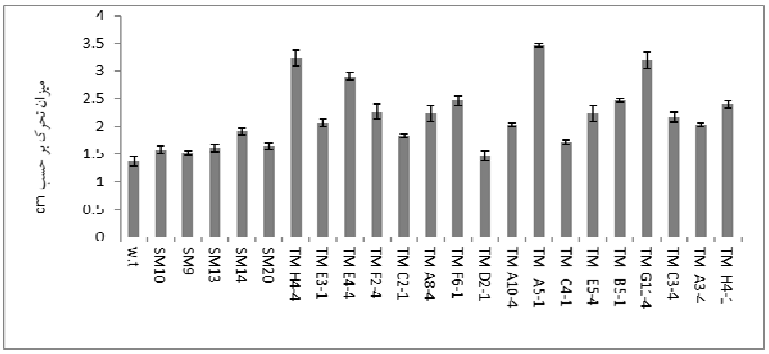
همولیز اریتروسیت (سلول خونی) توسط تولاسین: به منظور مقایسه توانایی سویه وحشی وجهش یافته های منتخب در تولید تولاسین و در نتیجه به دنبال آن میزان همولیز اریتروسیت، این آزمون صورت پذیرفت. نتایج آن حاکی از قدرت کمتر گونه های جهش یافته حاصل از هر دو روش جهش زایی، در همولیز سلول خونی نسبت به گونه غیر جهش یافته بود. توانایی همولیز بر اساس قطر هاله شفاف ایجاد شده در اطراف کلنی باکتری سنجیده شد (شکل ۴). در این آزمون بیشترین توانایی همولیز اریتروسیت متعلق به جهش یافته F_2-4TM و کمترین توانایی در جهش یافتهTMF_6-1 بود. لازم به ذکر است، جهش یافته هایی که تیپ علائم مشابه با سویه وحشی ایجاد کردند، همانند سویه وحشی قطر هاله همولیز نسبتاً بالایی داشتند و در نتیجه قادر بودند تولاسین بیشتری نسبت به سایر جهش یافته ها ایجاد نمایند.

سنجش میزان تحرک جهش یافته ها: در این آزمون جهش یافته های حاصل از روش ترانسپوزون، توانایی تحرک بیشتری نسبت به سویه وحشی از خود نشان دادند. در جهش یافته های ایجاد شده به روش جهش خود به خودی، افزایش تحرک نسبت به سویه وحشی به میزان کمتری دیده شد. به نظر می رسد که در روش ترانسپوزون،

جهش یافته هایی ایجاد گردیدند که در یک منطقه از ژنوم با اختلال فیزیولوژیکی مواجه شدند، ولی در مورد جهش یافته های به دست آمده از روش خود به خودی احتمال می رود در نقاط مختلف ژنوم جهش اتفاق افتاده و منجر به حفظ یا تغییر کمتر تحرک باکتری شده باشد (شکل ۵).



شکل ۴- مقایسه توانایی همولیز اریتروسیت توسط تولاسین در جهش یافته ها و سویه وحشی



شکل ۵- مقایسه میزان تحرک جهش یافته ها با جدایه وحشی.

بحث

طبق تحقیقات راپلی و راث، جدایه های مختلف *سودوموناس تولاسی* (*Pseudomonas tolaasii*) جدا شده از نقاط مختلف جهان در شدت بیماریزایی با یکدیگر تفاوت دارند (۱۹). این مسئله می تواند به دلیل جهشهایی باشد که در ژنوم این باکتری اتفاق افتاده است. نتایج حاصل از این پژوهش، مشابه یافته های موراتا و همکاران بود که نشان دادند قدرت بیماریزایی و میزان پایووردین تولید شده در جهش یافته ها با یکدیگر ارتباط مستقیمی دارند و ایجاد جهش موجب کاهش تولید این سیدروفور در جهش یافته ها می گردد (۱۴). گونه های سودوموناس معمولاً تولید سیدروفور های فلورسنت سبز مایل به زرد (پایووردین یا سودوباکتین) می نمایند که قادر هستند آهن را در مناطقی که فراوانی آن بسیار اندک است جذب کنند (۱ و ۱۱). سیدروفور پایووردین به چند دلیل در سودوموناس ها حائز اهمیت است: اول اینکه تولید سیدروفور در مقایسه با سایر میکروارگانیسم ها از مقدار و تنوع بیشتری برخوردار است، دوم اینکه سودوموناس ها می توانند از سیدروفور سایر میکروارگانیسم ها از طریق گیرنده های غیر اختصاصی به نفع خودشان استفاده کنند، در حالی که سایر میکروارگانیسم ها قادر به استفاده از سیدروفور سودوموناس ها نیستند و سوم اینکه ثابت تجمع در آنها زیاد می باشد به طوری که در سودوموناس ها $۱۰^{۲۴}$ بوده و در سایر میکروارگانیسم ها $۱۰^{۱۰}$ است. هر چه ثابت تجمع بیشتر باشد میل ترکیبی سیدروفور برای ترکیب با آهن بیشتر خواهد بود (۹). لذا می توان نتیجه

گرفت که چرا جهش یافته ها با تولید سیدروفور کمتر بیماریزایی کمتری را نیز نشان می دهند.

طبق نتایج به دست آمده، کلیه جهش یافته ها فاقد توان تولید خط سفید بودند این موضوع بر اساس یافته های ونگ و پریس، دال بر عدم توانایی جهش یافته ها در تولید لیپودپسی پپتید WLIP بود (۲۲). همان طور که ذکر گردید جهش یافته ها در همولیز اریتروسیت نیز توانایی کمتری داشتند که مطابق تحقیقات رینی و همکاران حاکی از آن است که این جهش یافته ها توکسین تولاسین کمتری نسبت به سویه وحشی تولید کردند (۱۹). تولاسین یکی از پپتیدهای سمی ترشح شده توسط باکتری است که همانند سایر پپتیدهای سمی قادر به از بین بردن سلولهای خونی می باشد (۲). رینی و همکاران نشان دادند که به وسیله لیز کردن یک اریتروسیت یا سلول خونی می توان طیف فعالیت تولاسین را سنجید. همولیز ایجاد شده بر اثر توکسین تولاسین بسیار وابسته به دز تولاسین می باشد. آنها نشان دادند که تولاسین تولید شده توسط سویه وحشی می تواند باعث سوراخ کردن و ایجاد حفره در قارچ خوراکی و همچنین لیز کردن اریتروسیت گردد، ولی تولاسین تولید شده توسط جهش یافته ها توانایی لیز کردن اریتروسیت و ایجاد حفره در قارچ خوراکی را ندارند.

موراتا و ماگا نشان دادند که یکی از جدایه های باکتری *سودوموناس تولاسی* *Pseudomonas tolaasii*، جدایه PT814، عامل بیماری لکه قهوه ای در قارچ *پلوروتوس اوستراتوس* *Pleurotus ostreatus*، توانایی تولید توکسینهای خارج سلولی نظیر Tox1، Tox2، Tox3،Tox4 را داراست و علائم بارز بیماری را نشان می دهد. ایجاد جهش با استفاده از ترانسپوزون *mini*-Tn5 *km1* باعث تولید جهش یافته هایی شد که توانایی تولید توکسین را نداشتند. این جهش یافته ها به شدت در توانایی ایجاد بیماری بلاچ ضعیف بودند (۱۳).

به طور کلی می توان گفت، در این تحقیق فرآیند جهش منجر به ایجاد جهش یافته هایی شد که به لحاظ توانایی بیماریزایی، شدت و سرعت ظهور علائم و تولید عوامل مؤثر در بیماریزایی ضعیف بودند. با توجه به اینکه در این مطالعه جهش یافته هایی پر تحرک با بیماریزایی کم ایجاد شد، شاید بتوان با کلونیزه کردن سطوح اندامهای باردهی قارچ توسط این جهش یافته ها و ایجاد رقابت، از رشد و فعالیت سویه های بیماریزا جلوگیری کرد. با توجه به اثرات تخریبی تولاسین بر روی قارچهای خوراکی، بازدارنده های تولاسین (نظیر یونهای فلزی دو ظرفیتی) می توانند به منظور حمایت قارچ در برابر آلودگیهای شدید استفاده شوند. بکار بردن ارقامی که فاقد جایگاههای دریافت محرکهای آنزیم تیروزیناز هستند نیز توصیه می گردد. علاوه بر موارد فوق لازم به ذکر است که، در رابطه با این بیماری نباید نقش شرایط محیطی را نادیده گرفت. بیماری اغلب اوقات در بهار، تابستان و پاییز، زمانی که رطوبت نسبی و دمای هوای بیرون به اندازه کافی بالا باشد رخ می دهد. تهویه ناکافی پس از آبیاری موجب می شود که سطح قارچها برای مدت طولانی مرطوب بماند، که این امر موجب گسترش بیماری می شود. در نتیجه روشهای پیشگیری اقتصادی ترین روش جهت جلوگیری از بروز و انتشار این باکتری می باشند.

منابع

۱- طهماسبی، ف.، لکزیان، ا.، خاوازی، ک.، پاکدین پاریزی، ع. (۱۳۹۳). جداسازی، شناسایی و ارزیابی تولید سیدروفور در باکتریهای سودوموناس و تأثیر آن بر رشد ذرت در محیط آبکشت. مجله پژوهش های سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، دور ۲۷، شماره ۱، صفحه ۷۵-۸۷

۲- هوشمند، ک.، آسوده، ا. (۱۳۹۵). بررسی اثرسمیت پپتید GL-9 بر سلولهای A549 و سلولهای خونی انسانی و حیوانی. مجله پژوهش های سلولی مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)، دور ۲۹ ، شماره ۴، صفحه ۴۶۳-۴۷۳

3- Akhlaghi, M., Tarighi, S., Farsi, M., Taheri, P. (2015). Identification and investigation of some virulence factors of *Pseudomonas tolaasii* isolated from mushroom in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology. 51: 399-412.

4- Berg, G., Trevors, J.T. (1990). Bacterial conjugation between *Escherichia coli* and *Pseudomonas* spp. Donor and recipient cells in soil. Journal of Industrial Microbiology. 5:79-84.

5- Botelho, G.R. (2006). Fluorescent Pseudomonads associated with the rhizosphere of crops. Journal of Microbiology. 37: 401-416.

6- Chow, S., Gu, K., Jiang, L., Nassour, A. (2011). Salicylic acid affects swimming, twitching and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*, resulting in decreased biofilm formation. Journal of experimental microbiology and immunology. 15: 22-29.

7- Delorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U., Timmis, K.N. (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.

8- Gandy, D.G. (1968). A technique for screening bacteria causing brown blotch of cultivated mushrooms. Glasshouse Crops Research Institute. 12:150-154.

9- Gould, W.D. (1990). Biological control of plant root disease by bacteria. In: Nakas P, Hagedron C, editor. Biotechnology of plant microbe interaction. 22:287-317.

10- Green, M.R., Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. NewYork: Cold spring Harbor laboratory press.

11- Loper, J.E., Buyer, J.S. (1991). Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. Molecular Plant-Microbe Interaction. 4:5-13.

12- Munsch, P., Geoffroy, V.A., Alatossava, T., Meyer, J.M. (2000). Application of siderotyping for characterization of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas reactans* isolates associated with brown blotch disease of cultivated mushrooms. Applied Environmental Microbiology. 66: 4834-4841.

13- Murata, H., Magae, Y. (1996). Toxin production in a mushroom pathogenic bacterium, *Pseudomonas tolaasii* strain PT814 is activated by signals present in a host, *Pleurotus ostreatus*, and accumulating in the medium in the course of bacterial growth. Journal of mushroom biology and mushroom products. 66: 4834-4841.

14- Murata, H., Tsukamoto, T., Shirata, A. (1998). *RtpA*, a gene encoding a bacterial two-component sensor kinase, determines pathogenic traits of *Pseudomonas tolaasii*, the causal agent of brown blotch disease of a cultivated mushroom, *Pleurotus ostreatus*. Mycoscience. 39: 261-271.

15- Neilands, J.B., Leong, S.A. (1986). Siderophores in relation to plant growth and disease. Annual Review Plant Physiology. 37: 187-208.

16- Nicola, S. (2011). Recent advances on bacterial disease of cultivated mushroom. 7th international conference on mushroom biology and mushroom products. 43-89.

17- Nutkins, J.C., Mortishire-smith, R.J., Packman, L.C., Brodey, C.L., Rainey, P.B. (1991). Structure determination of tolaasin, an extra cellular lipodepsipeptide produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii* Paine. Journal of American Chemistry Society. 113:2661-2627.

18- RaineyPaul, B., BrodeyCathrine, L., Johnstone, K. (1991). Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin, produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. Journal of physiological molecular plant pathology. 39: 57-70.

19- RappleyeChad, A., RothJohn, R. (1997). Transposition without transposase: a spontaneous mutation in bacteria. Journal of bacteriology. 179:2047-2052.

20- Sivannesan, D. (2003). Diversity among bacterial causing blotch disease on the commercial mushroom. New York. Brook Univ. APS press.

21- Soler, C., Rivas, R., Jolivet, S., Arpin, N., Olivie, J.M., Wichers, H.J. (1999). Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bispours*. FEMS microbiology review. 23:591-614.

22- Wong, W.C., Prece, T. F. (1979). Identification of *Pseudomonas tolausii* the white line in agar and mushroom tissue block rapid pitting tests. Journal of Applied Bacteriology. 47:401-407.

Phenotypic alterations caused by spontaneous and transposon mutagenesis in *Pseudomonas tolaasii*

Moradian M., Tarighi S. and Taheri P.

Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, I.R. of Iran

Abstract

Among different kinds of edible mushrooms, white button mushroom is the most cultivated in the majority parts of the world. *Pseudomonas tolaasii* is the important causal agent of brown blotch bacterial disease of mushroom that reduces its marketing. To consider the fact that by applying mutations, open reading frame of genes will change and important virulence factors cannot be produced as before. The aims of this investigation were further study on the role of these factors and compare the characteristics of phenotypic and genotypic alterations in mutants with the wild type strain. In this research, one isolate with intense pathogenicity factors was selected and the genome of that was altered by the use of spontaneous and transposon (mini Tn5) mutagenesis procedure. Among virulence factors in this bacterium, the effect of mutations on the production of pyoverdine, tolaasin, white line inducing principle and the motility of isolates were studied. The results of this investigation suggest the direct correlation between the production of pyoverdine, tolaasin and white line inducing principle with the bacterial pathogenesis. On the other hand, no logical correlation was found in motility of the mutants with their pathogenicity. Further studies to identify the genes that are related to this process, are carrying out.

Key words: Motility, Mutation, Pyoverdine, Tolaasin, White line.