

تغییرات فنوتیپی ایجاد شده توسط جهش خود به خودی و ترانسپوزونی در باکتری سودو

موناس تولاسی (*Pseudomonas tolaasii*)

مینا مرادیان، سعید طریقی* و پرینا طاهری

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

تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۱/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۱۰

چکیده

از میان انواع قارچ‌های خوراکی، قارچ تکمه‌ای سفید، بیشترین سطح زیر کشت را در اغلب نقاط جهان دارد. باکتری سودوموناس تولاسی (*Pseudomonas tolaasii*) عامل مهم ایجاد بیماری لکه قهوه‌ای قارچ خوراکی می‌باشد که بازارپسندی این محصول را به شدت کاهش می‌دهد. با توجه به اینکه به واسطه اعمال جهش چهارچوب خوانش ژنوم تغییر کرده و فاکتورهای مؤثر در شدت بیماریزایی مانند قبل تولید نمی‌شوند، هدف این پژوهش بررسی بیشتر نقش این فاکتورها بعد از انجام جهش و مقایسه خصوصیات فنوتیپی و ژنوتیپی جهش یافته‌ها 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 پایوردین، تولاسین، ایجاد خط سفید و میزان تحرک جدایه‌ها بررسی گردید. بر اساس داده‌های به دست آمده، مشخص گردید که میان تولید پایوردین، تولاسین و تشکیل خط سفید با بیماریزایی باکتری رابطه مستقیمی وجود دارد، در حالی که ارتباط معنی‌داری میان تحرک در جهش یافته‌ها با بیماریزایی آنها یافت نشد. مطالعات بیشتر جهت شناسایی ژنهای دخیل در این فرآیندها، در حال انجام است.

واژه‌های کلیدی: پایوردین، تحرک، تولاسین، جهش، خط سفید

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

مقدمه

موجب کاهش بازارپسندی و افزایش خسارت اقتصادی می‌گردد (۲۰). پس از حمله باکتری و شروع بیماریزایی، قارچ میزبان عکس‌العمل نشان می‌دهد. در واقع تغییر رنگ بافت کلاهک به قهوه‌ای به دلیل تولید رنگدانه‌های شبه ملانین است که قارچ خوراکی تکمه‌ای برای جلوگیری از رشد این پاتوژن تولید می‌کند (۲۱). لکه‌های قهوه‌ای طولی شده، به یکدیگر می‌پیوندند و سپس نواحی آلوده با ماده‌ای چسبناک پوشیده می‌شوند. در این مرحله بوی ماهی‌گندیده به مشام می‌رسد. بندرت، ممکن است کل اندام باردهی به رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز درآمده و از آن

باکتریها به علت شرایط مناسب سالنهای کشت و پرورش قارچ خوراکی نظیر رطوبت نزدیک به ۸۰ درصد و دمای بین ۱۶ تا ۲۵ درجه سانتی‌گراد، بیشترین اهمیت را در مقایسه با سایر بیماریهای این محصول، به خود اختصاص داده‌اند. باکتری سودوموناس تولاسی (*Pseudomonas tolaasii*) عامل مهم اصلی ایجاد بیماری لکه قهوه‌ای (Brown blotch) در قارچ خوراکی تکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) می‌باشد (۱۶). در برخی منابع، تعدادی از میکروارگانیسم‌ها به همراه هم به عنوان عامل این بیماری در نظر گرفته می‌شوند. بیماری لکه قهوه‌ای در این قارچ

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 می‌باشد (۱۹). طی تحقیقات انجام شده گونه *Sudomonas tolaasii* قادر است بر اثر کشتهای متوالی، در محیط‌های کشت مایع نظیر کینگز ب (King's B) یا *Sudomonas* اف (*Pseudomonas* F) در دمای ۲۲ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد به طور خود به خودی، جدایه‌های جهش یافته تشکیل دهد. این در حالی است که وقوع این نوع از جهش در دمای ۱۷ تا ۲۰ درجه سانتی‌گراد 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 می‌شوند (۱۵). پرگنه باکتری‌های جهش یافته بر خلاف والدین اولیه شان که کدر و تیره هستند، بسیار شفاف می‌باشند. در ضمن جدایه‌های جهش یافته، پرگنه موکوئیدی و جدایه‌های والدی پرگنه زبری را تشکیل می‌دهند.

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 ترانسپوزون‌های مشتق شده از Tn5 ساخته شده‌اند که فرآیند ایجاد جهش به واسطه وارد کردن این قطعات DNA خارجی به باکتری‌ها، تسهیل می‌گردد. به طور کلی مینی ترانسپوزون‌ها از ژنهای اختصاصی مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های کانامایسین، کلرامفنیکول، استرپتومایسین، اسپکتینومایسین و تتراسایکلین، تشکیل شده‌اند که این جایگاه‌ها همان مارکرهای انتخابی می‌باشند. همچنین در ساختار این مینی ترانسپوزون‌ها یک جایگاه کلونینگ واحد به نام NotI وجود دارد. علاوه بر این در ترانسپوزون، ژنهای *xyIE* *duxAB* *phoA* *dacZ* هم وجود دارند که این

آب خارج شود. اندام‌های باردهی جوان به وسیله ماده‌ای شفاف و براق یا شیشه‌مانند پوشیده می‌شوند و از رشد باز می‌ایستند (۵).

جدایه‌های بیماری‌زای گونه تولاسی قادر به تولید نوعی لیپودپسی پتید (از ترکیبات لیپوپپتیدهای حلقوی) به نام تولاسین می‌باشند که در پیشرفت بیماری و توسعه لکه‌ها نقش دارند (۱۷). لازم به ذکر است که جدایه‌های بیماری‌زای باکتری *Sudomonas* ری اکتانس (*Pseudomonas reactans*) که در کنار *Sudomonas* تولاسی باعث ایجاد لکه قهوه‌ای می‌گردند، تولید یک ماده خارج سلولی به نام القاء کننده تشکیل خط سفید (White Line Inducing Principle (WLIP)) می‌کنند که آن هم نوعی لیپودپسی پتید است. ولی محل زنجیره‌های آمینواسیدی، تعداد و نوع آنها با تولاسین متفاوت می‌باشد. در سنجه‌های ضد میکروبی که برای مقایسه اثرهای ضد میکروبی خط سفید و تولاسین صورت گرفت، مشاهده شد که هر دو ترکیب، مانع رشد قارچ خوراکی می‌گردند 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 می‌رسد از توکسین تولاسین، آنزیم پروتئاز آزاد می‌شود، سپس به واسطه آن، آنزیم‌های تیروزیناز فعال می‌گردند که مرتبط با مکانیسم قهوه‌ای شدن می‌باشند. تیروزینازها به طور طبیعی در سلول وجود دارند که به صورت نهفته و خاموش می‌باشند. اگر این آنزیم‌ها فعال شوند، موجب اکسید شدن ترکیبات فنولی می‌گردند که در نهایت، تولید ترکیبات شبه ملانین قهوه‌ای رنگ می‌نمایند (۲۱). در شرایط کمبود آهن بیشتر میکروارگانیسم‌ها تولید سیدروفور و گیرنده‌های آهن در سطح غشای سلولی می‌کنند (۱۱) و (۱۵).

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 *Sودو مونا س تولاسی Pseudomonas tolaasii* بود. برای این منظور از دو روش جهش خود به خودی و جهش 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 و ژنوتیپی جهش یافته ها با سویه وحشی فاکتورهای مؤثر در بیماریزایی این باکتری را روشن تر کرد.

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 پایوردین، 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 مشهودتری 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 pUTmini Tn5: ابتدا در لوله آزمایش حاوی یک میلی لیتر محیط کشت LB (لوریا برتانی) مایع

از باکتری/شریشیا کلی (*Escherichia coli*) سویه cc118mini 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 شیکردار ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. از هر سوسپانسیون باکتری مقدار ۲۵ میلی لیتر برداشته و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل دو بار و هر بار با مقدار ۲۵ میلی لیتر 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 میلی تر 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 لکه ای 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 میلی لیتر 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 الیزا 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 کلنیا در محیط مذکور، گواه بر دریافت قطعه ترانسپوزون بود. جدایه هایی که پایوردین کمتری در این محیط ایجاد کرده

بودند (خانه‌های کم‌رنگ پلیت‌الایزا) جهت بررسی‌های بیشتر سایر فاکتورهای مؤثر در بیماری‌زایی و مقایسه با سایر جدایه‌ها، انتخاب شدند.

استخراج DNA: برای استخراج DNA از روش گرین و سمبروک استفاده شد (۱۰). از جهش یافته‌ها و سویه وحشی در سه میلی‌لیتر محیط مایع حاوی تتراسایکلین، کشت ۲۴ ساعته تهیه شد. ۱/۵ میلی‌لیتر 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 از سدیم دو دسیل سولفات (۲۰ درصد) به محلول اضافه شد و پس از مخلوط کردن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد 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 IX در ولتاژ ۹۹ ولت، به مدت ۴۰ دقیقه بارگذاری شد. برای رنگ آمیزی ژل از ماده

گرین ویور 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 نور در A₂₆₀ به میزان جذب نور در A₂₈₀ نیز اندازه‌گیری گردید.

تشخیص وجود ترانسپوزون به روش PCR (واکنش زنجیره ای پلیمرز): 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 شده‌اند، انجام گردید. آغازگر رفت Lux A₁ با توالی 5'-GTGCGTCTTCTGCTTGTCGAAC-3' و آغازگر برگشت Lux A₂ با توالی 5'-GTGCTTATCAGCCACCTGAGCT-3' مورد استفاده قرار گرفتند. به میزان یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۱/۵ میکرولیتر MgCl₂، ۰/۵ میکرولیتر دنوکسی نوکلئوتید تری فسفات، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq پلیمرز سه میکرولیتر از نمونه DNA استخراج شده، صورت گرفت. چرخه حرارتی برای آغازگرها با واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار دقیقه آغاز و سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت سازی DNA در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، امتداد در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک سیکل امتداد نهایی در دمای ۶۸ درجه سانتی‌گراد 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 یافته‌ها: به منظور مقایسه و بررسی جهش یافته‌های غیر بیماری‌زا و یا کم‌بیماری‌زا، این آزمون به روش گاندی انجام شد (۸). ابتدا کلاهکهای سالم قارچ با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سپس

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 یافته‌های 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 هاله‌ای 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 یافته‌ها در سودوموناس تولاسی
(*Pseudomonas tolaasii*): در روش جهش خود به خودی، پس از کشتهای متوالی بر روی محیط کشت کینگز ب مایع، برخی از پرگنه‌ها که تغییراتی در فنوتیپشان روی محیط کشت مشاهده شد، جهت انجام آزمونهای بیشتر انتخاب شدند. در این روش، مشخص شد در جدایه‌هایی که در مرحله پنچ، رنگدانه فلورسنت کمتری نسبت به مرحله یک تولید کرده بودند (شکل ۱)، جهش در آنها اتفاق افتاده است. به منظور ردیابی جهش یافته‌های 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 یافته‌های ایجاد شده توسط ترانسپوزون به آمپی سیلین، انجام موفق جهش زایی را تایید کرد.

به وسیله یک اسکالپل سترون، برش‌هایی 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 مقدار ۵۰ میکرولیتر از آن درون حفره‌های ایجاد شده بر روی کلاهک قارچ، ریخته شد. سپس ظروف، در گرمخانه ۲۸ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری گردیدند. جهش یافته‌هایی که توانایی ایجاد بیماری و تولید علائم بر روی کلاهک قارچ را نداشتند برای بررسیهای بیشتر انتخاب شدند.

بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی جهش یافته‌ها (آزمون ارزیابی تولید پایورودین): 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 کازامینوآسید استفاده شد. جهت کسب نتیجه بهتر، از نمک K_2HPO_4 به میزان ۱/۵ گرم در لیتر و $MgSO_4$ به میزان ۰/۲۵ گرم در لیتر نیز استفاده گردید.

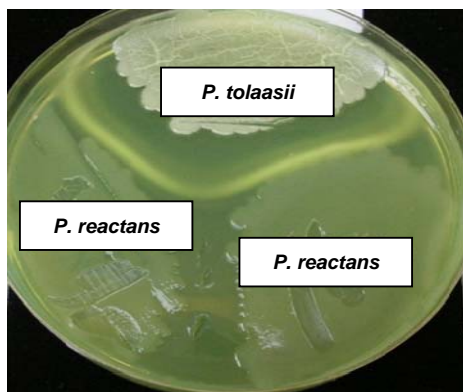
آزمون القاء تشکیل خط سفید (WLIP): برای اجرای این آزمون از روش ونگ و پریس استفاده شد (۲۲). بدین منظور ابتدا سویه‌های جهش یافته در فواصل دو تا سه سانتیمتر از سودوموناس ری اکتانس (*Pseudomonas reactans*)، روی محیط کینگز ب کشت داده شدند. جهت کسب اطمینان، یک پتری شاهد که در آن دو جدایه سودوموناس تولاسی (*Pseudomonas 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

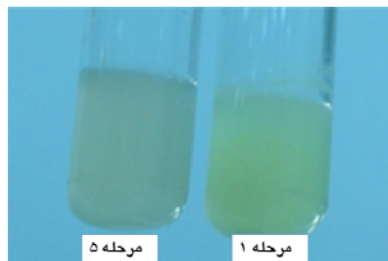
۲، جدول ۱). مدت ظهور علائم در جدایه های TM E3-1، TM B5-، TM C4-1، TM D2-1، TM F6-1، TM A8-1 و TM H4-1 بسیار بیشتر از سایر جهش یافته ها بوده و کمترین بیماریزایی را نشان دادند.

بررسی خصوصیات فیزیولوژیکی جهش یافته ها (ارزیابی تولید پایوردین): در این آزمون از میان جهش یافته های ایجاد شده به روش جهش خود به خودی، جهش یافته های SM20 و SM10 و از میان جهش یافته های ایجاد شده به روش ترانسپوزون، انواع TM E3-1، TM A8-1 و TM H4-1 کمترین مقادیر پایوردین را تولید نمودند. نتایج حاصل، نشان دادند که قدرت بیماریزایی و میزان پایوردین 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 پایوردین 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).



شکل ۳- تشکیل خط سفید رنگ در سویه وحشی.



شکل ۱- 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، SM9، SM10، 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 و SM20 از تیپ-ب و جهش یافته های SM9، SM13 و SM14 مربوط به تیپ ج بودند.



شکل ۲- علائم ایجاد شده توسط جهش یافته ها و سویه وحشی بر روی کلاهک قارچ خوراکی. الف) پوسیدگی قهوه ای و خشک ایجاد شده توسط سویه وحشی ب) علائم خفیفی از بیماری 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 F2- 4 از تیپ الف، در جهش یافته های TM C2- 1، TM A3- 1، TM C3- 4، TM G11- 4، TM A5- 1، TM F6- 1، 1 از تیپ ب و در جهش یافته های TM E3- 1، TM H4- 4، TM C4- 1، TM A10- 4، TM D2- 1، TM A8- 1، TM E4- 4، TM B5- 1، TM E5- 4 و TM H4- 1 از تیپ ج بودند (شکل

جدول ۱- نتایج آزمونهای فیزیولوژیکی جهش یافته‌ها.

نام جهش یافته	تیپ علائم	تولید پایورددین (بر اساس میزان جذب نوردر ۶۰۰nm)	مدت زمان ظهور علائم (ساعت)	تولید خط سفید	سنجش میزان تحرک (cm)	توانایی همولیز اریتروسیت (cm)
W.T.	الف	$1/68 \pm 0/31$	۲۴	+	$1/3 \pm 0/08$	$1/62 \pm 0/06$
SM10	الف	$1/02 \pm 0/01$	۳۰	-	$1/56 \pm 0/06$	$1/50 \pm 0$
SM9	ب	$1/56 \pm 0/06$	۲۷	-	$1/51 \pm 0/04$	$0/73 \pm 0/02$
SM13	ب	$1/51 \pm 0/15$	۲۶	-	$1/60 \pm 0/06$	$0/53 \pm 0/03$
SM14	ب	$1/66 \pm 0/19$	۲۸	-	$1/91 \pm 0/05$	$0/53 \pm 0/02$
SM20	الف	$0/95 \pm 0/04$	۳۵	-	$1/64 \pm 0/06$	$1/44 \pm 0/05$
TM H ₄ -4	ج	$1/03 \pm 0/04$	۴۸	-	$3/23 \pm 0/14$	$0/85 \pm 0/02$
TM E ₃ -1	ج	$0/85 \pm 0/17$	۵۰	-	$2/06 \pm 0/06$	$0/81 \pm 0/05$
TM E ₄ -4	ج	$1/30 \pm 0/14$	۴۴	-	$2/9 \pm 0/05$	$0/62 \pm 0/07$
TM F ₂ -4	الف	$1/09 \pm 0/07$	۴۵	-	$2/26 \pm 0/14$	$1/75 \pm 0/08$
TM C ₂ -1	ب	$1/41 \pm 0/08$	۴۰	-	$1/83 \pm 0/03$	$0/36 \pm 0/09$
TM A ₈ -1	ج	$0/74 \pm 0/07$	۷۲	-	$2/23 \pm 0/14$	$0/91 \pm 0/06$
TM F ₆ -1	ب	$0/79 \pm 0/14$	۶۰	-	$2/46 \pm 0/08$	$0/16 \pm 0/03$
TM D ₂ -1	ج	$0/93 \pm 0/13$	۶۸	-	$1/46 \pm 0/08$	$0/78 \pm 0/04$
TM A ₁₀ -4	ج	$1/31 \pm 0/04$	۳۷	-	$2/03 \pm 0/03$	$0/82 \pm 0/06$
TM A ₅ -1	ب	$1/03 \pm 0/02$	۴۰	-	$3/46 \pm 0/03$	$0/58 \pm 0/01$
TM C ₄ -1	ج	$0/89 \pm 0/1$	۷۰	-	$1/71 \pm 0/04$	$0/56 \pm 0/06$
TM E ₅ -4	ج	$1/17 \pm 0/1$	۳۸	-	$2/23 \pm 0/14$	$0/81 \pm 0/03$
TM B ₅ -1	ج	$0/96 \pm 0/05$	۶۹	-	$2/46 \pm 0/03$	$1 \pm 0/05$
TM G ₁₁ -4	ب	$1/3 \pm 0/12$	۳۴	-	$3/2 \pm 0/15$	$0/89 \pm 0/05$
TM C ₃ -4	ب	$1/02 \pm 0/05$	۵۵	-	$2/16 \pm 0/08$	$1/06 \pm 0/07$
TM A ₃ -4	ب	$1/06 \pm 0/04$	۴۵	-	$2/03 \pm 0/03$	$0/96 \pm 0/03$
TM H ₄ -1	ج	$0/73 \pm 0/13$	۷۲	-	$2/4 \pm 0/05$	1 ± 0

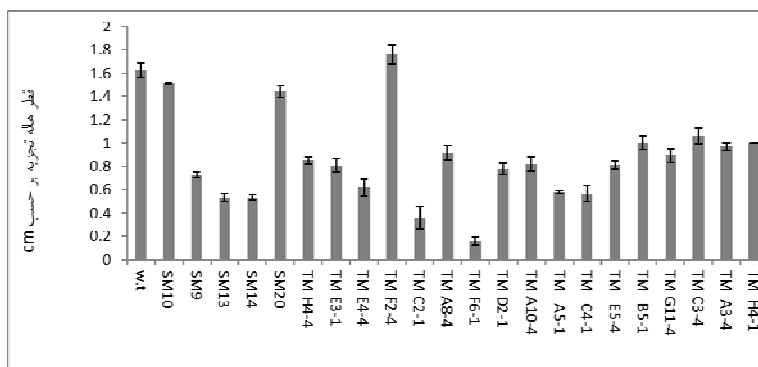
جهش یافته‌هایی که تیپ علائم مشابه با سویه وحشی ایجاد کردند، همانند سویه وحشی قطر هاله همولیز نسبتاً بالایی داشتند و در نتیجه قادر بودند تولاسین بیشتری نسبت به سایر جهش یافته‌ها ایجاد نمایند.

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

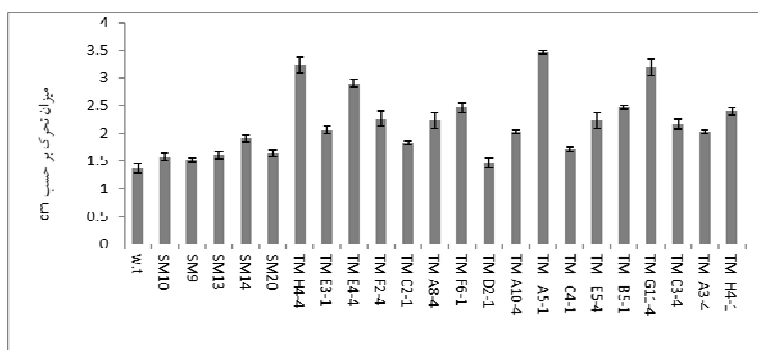
همولیز اریتروسیت (سلول خونی) توسط تولاسین: به منظور مقایسه توانایی سویه وحشی و جهش یافته‌های منتخب در تولید تولاسین و در نتیجه به دنبال آن میزان همولیز اریتروسیت، این آزمون صورت پذیرفت. نتایج آن حاکی از قدرت کمتر گونه‌های جهش یافته حاصل از هر دو روش جهش زایی، در همولیز سلول خونی نسبت به گونه غیر جهش 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 F₂-4TM و کمترین توانایی در جهش یافته TMF₆-1 بود. لازم به ذکر است،

می رود در نقاط مختلف ژنوم جهش اتفاق افتاده و منجر به حفظ یا تغییر کمتر تحرک باکتری شده باشد (شکل ۵).

جهش یافته‌هایی ایجاد گردیدند که در یک منطقه از ژنوم با اختلال فیزیولوژیکی مواجه شدند، ولی در مورد جهش یافته‌های به دست آمده از روش خود به خودی احتمال



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



شکل ۵- مقایسه میزان تحرک جهش یافته‌ها با جدایه وحشی.

را در مناطقی که فراوانی آن بسیار اندک است جذب کنند (۱ و ۱۱). سیدروفور پایووردین به چند دلیل در سودوموناس‌ها حائز اهمیت است: اول اینکه تولید سیدروفور در مقایسه با سایر میکروارگانیسم‌ها از مقدار و تنوع بیشتری برخوردار است، دوم اینکه سودوموناس‌ها می‌توانند از سیدروفور سایر میکروارگانیسم‌ها از طریق گیرنده‌های غیر اختصاصی به نفع خودشان استفاده کنند، در حالی که سایر میکروارگانیسم‌ها قادر به استفاده از سیدروفور سودوموناس‌ها نیستند و سوم اینکه ثابت تجمع در آنها زیاد می‌باشد به طوری که در سودوموناس‌ها 10^{24} بوده و در سایر میکروارگانیسم‌ها 10^{10} است. هر چه ثابت تجمع بیشتر باشد میل ترکیبی سیدروفور برای ترکیب با آهن بیشتر خواهد بود (۹). لذا می‌توان نتیجه

بحث

طبق تحقیقات راپلی و راث، جدایه‌های مختلف سودوموناس تولاسی (*Pseudomonas tolaasii*) جدا شده از نقاط مختلف جهان در شدت بیماری‌زایی با یکدیگر تفاوت دارند (۱۹). این مسئله می‌تواند به دلیل جهش‌هایی باشد که در ژنوم این باکتری اتفاق افتاده است. نتایج حاصل از این پژوهش، مشابه یافته‌های موراتا و همکاران بود که نشان دادند قدرت بیماری‌زایی و میزان پایووردین تولید شده در جهش یافته‌ها با یکدیگر ارتباط مستقیمی دارند و ایجاد جهش موجب کاهش تولید این سیدروفور در جهش یافته‌ها می‌گردد (۱۴). گونه‌های سودوموناس معمولاً تولید سیدروفورهای فلورسنت سبز مایل به زرد (پایووردین یا سودوباکتین) می‌نمایند که قادر هستند آهن

جهش با استفاده از ترانسپوزون *mini-Tn5 kmI* باعث تولید جهش یافته‌هایی شد که توانایی تولید توکسین را نداشتند. این جهش یافته‌ها به شدت در توانایی ایجاد بیماری بلاچ ضعیف بودند (۱۳).

به طور کلی می‌توان گفت، در این تحقیق فرآیند جهش منجر به ایجاد جهش یافته‌هایی 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 یافته‌هایی پر تحرک با بیماریزایی کم ایجاد شد، شاید بتوان با کلونیزه کردن سطوح اندامهای باردهی قارچ توسط این جهش یافته‌ها و ایجاد رقابت، از رشد و فعالیت سویه‌های بیماریزا جلوگیری کرد. با توجه به اثرات تخریبی تولاسین بر روی قارچهای خوراکی، بازدارنده‌های تولاسین (نظیر یونهای فلزی دو ظرفیتی) می‌توانند به منظور حمایت قارچ در برابر آلودگیهای شدید استفاده شوند. بکار بردن ارقامی که فاقد جایگاههای دریافت محرکهای آنزیم تیروزیناز هستند نیز توصیه می‌گردد. 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 می‌دهد. تهیه ناکافی پس از آبیاری موجب می‌شود که سطح قارچها برای مدت طولانی مرطوب بماند، که این امر موجب گسترش بیماری می‌شود. در نتیجه روشهای پیشگیری اقتصادی ترین روش جهت جلوگیری از بروز و انتشار این باکتری می‌باشند.

گرفت که چرا جهش یافته‌ها با تولید سیدروفور کمتر بیماریزایی کمتری را نیز نشان می‌دهند.

طبق نتایج به دست آمده، کلیه جهش یافته‌ها فاقد توان تولید خط سفید بودند این موضوع بر اساس یافته‌های ونگ و پریس، دال بر عدم توانایی جهش یافته‌ها در تولید لیپودپسی پپتید WLIP بود (۲۲). همان طور که ذکر گردید جهش یافته‌ها در همولیز اریتروسیت نیز توانایی کمتری داشتند که مطابق تحقیقات رینی و همکاران حاکی از آن است که این جهش یافته‌ها 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 می‌باشد (۲). رینی و همکاران نشان دادند که به وسیله لیز کردن یک اریتروسیت یا سلول خونی می‌توان طیف فعالیت تولاسین را سنجید. همولیز ایجاد شده بر اثر توکسین تولاسین بسیار وابسته به دز تولاسین می‌باشد. آنها نشان دادند که تولاسین تولید شده توسط سویه وحشی می‌تواند باعث سوراخ کردن و ایجاد حفره در قارچ خوراکی و همچنین لیز کردن اریتروسیت گردد، ولی تولاسین تولید شده توسط جهش یافته‌ها توانایی لیز کردن اریتروسیت و ایجاد حفره در قارچ خوراکی را ندارند.

موراتا و ماگا نشان دادند که یکی از جدایه‌های باکتری *Sodomonas tolaasii*، جدایه PT814، عامل بیماری لکه قهوه‌ای در قارچ پلوروتوس *Pleurotus ostreatus*، توانایی تولید توکسینهای خارج سلولی نظیر Tox1، Tox2، Tox3، Tox4 را داراست و علائم بارز بیماری را نشان می‌دهد. ایجاد

منابع

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

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

- 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. New York: 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., Alatosava, T., Meyer, J.M. (2000). Application of siderotyping for characterization of *Pseudomonas tolaasii* and *Pseudomonas reactans* isolates associated with brown blotch disease of cultivated mushrooms. Applied Environmental 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 bisporus*. FEMS microbiology review. 23:591-614.
- 22- Wong, W.C., Prece, T. F. (1979). Identification of *Pseudomonas tolaasii* 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.