Shahid Bahonar University of Kerman
Agricultural Biotechnology Journal
Iranian Biotechnology Society
Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Isolation, cloning and sequencing of the *aiiA* gene from *Paenibacillus polymyxa*

Faezeh Khoshbakhtlou

M.Sc. Student, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. E-mail: faezehkoshbakhtlou@gmail.com.

Maghsoud Pazhouhandeh

*Corresponding author. Associate Professor, Department of Plant, Cell and Molecular Biology, Faculty of Natural Science, University of Tabriz, Iran. E-mail: pazhouhandeh@tabrizu.ac.ir

Akbar Shirzad

Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran. E-mail: ashirzad98@yahoo.com

Abstract

Objective

The *aiiA* gene encodes a metalloenzyme known as lactonase, which hydrolyzes acyl-homoserine lactone (AHL) molecules and thereby inhibits the quorum sensing (QS) system in Gram-negative bacteria—a system that plays a central role in their pathogenicity. Various forms of this enzyme have been identified across multiple bacterial genera. The enzyme features a conserved motif essential for metal ion binding and enzymatic activity. A well-characterized example exists in the *Bacillus* genus, where the gene is 750 base pairs long and encodes a 250-amino acid protein. *Paenibacillus*, formerly classified within *Bacillus*, is recognized as a plant growth-promoting bacterium with potent antagonistic activity against plant pathogens, making it a valuable candidate for biotechnological applications.

Materials and Methods

In this study, specific primers were designed to detect the presence of the *aiiA* gene in a bacterial isolate exhibiting traits associated with the *Paenibacillus* genus. The gene was amplified via PCR and subsequently cloned into the pBluescript II KS (+) plasmid using the restriction enzymes *Sma*I and *Bam*HI. The recombinant plasmid was confirmed through PCR and enzymatic digestion, after which the construct was submitted for sequencing.

Results

Sequencing analysis revealed that the cloned *aiiA* gene was 756 base pairs in length. BLAST results indicated over 99% similarity with the *aiiA* sequences found under NCBI accession numbers NZ_CP009909.1 and NZ_CP025957.1, confirming a close relationship between the isolate and *Paenibacillus polymyxa*. Distance-based analysis and phylogenetic tree construction based on the gene sequence further supported this classification. Moreover, the presence of a conserved domain related to the β-lactamase protein family within the predicted motif of the gene provided additional evidence of its functional role as a lactonase capable of disrupting quorum sensing signals. Structural analysis of the predicted protein reinforced these findings.

Conclusions

This study successfully cloned the *aiiA* gene, highlighting its potential application in developing transgenic plants resistant to bacterial pathogens. Additionally, the sequencing and phylogenetic analyses enabled precise molecular identification of the isolate, which was closely related to *P. polymyxa*. The isolate's high potential as a biocontrol agent suggests it could play a key role in sustainable management strategies for bacterial diseases in plants.

Key words: Antagonist, Antibiotic resistance, Biocontrol, Lactonase, Quorum quenching

Paper Type: Research Paper

Citation: Khoshbakhtlou, F., Pazhouhandeh, M., & Shirzad, A. (2025). Isolation, cloning and sequencing of the *aiiA* gene from *Paenibacillus polymyxa*. *Agricultural Biotechnology Journal,* 17(4), 1-26.

Agricultural Biotechnology Journal, 17(4), 1-26. DOI: 10.22103/jab.2025.25426.1721

Received: May 20, 2025. Received in revised form: July 10, 2025.

Accepted: July 11, 2025. Published online: November 30, 2025.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

Introduction

Quorum sensing (QS) is a cell-density-dependent regulatory system in Gram-negative bacteria that coordinates collective behaviors, including virulence, biofilm formation, and production of extracellular enzymes. QS signals in Gram-negative phytopathogens are typically N-acyl homoserine lactones (AHLs), and many important plant pathogens rely on QS to regulate pathogenicity. Disrupting these signals through "quorum quenching" (QQ) provides a promising non-antibiotic strategy for disease control. The *aiiA* gene encodes an AHL-lactonase (a metalloenzyme) that hydrolyzes the lactone ring of AHLs, thereby inactivating the QS signal

without affecting bacterial growth. Originally identified in *Bacillus* spp. (e.g. *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. subtilis*), *aiiA*-type lactonases have demonstrated biotechnological potential: for instance, potato and tobacco plants expressing *aiiA* remained largely symptom-free when challenged with high densities of bacterial pathogens. Members of *Paenibacillus* (formerly *Bacillus*) are well-known plant-growth-promoting bacteria that produce antimicrobial compounds and can protect plants against pathogens. A *Paenibacillus polymyxa* strain (NR1) was recently reported to carry an *aiiA* homolog, suggesting quorum-quenching capacity in this genus. In this study, we investigated a native *aiiA* gene from a *Paenibacillus*-like isolate (designated Gs) obtained from the rhizosphere. This isolate exhibited strong antagonism toward several Gram-negative phytopathogens, suggesting it might produce QS-inhibiting enzymes. The objectives were to amplify the *aiiA* gene, clone it into plasmid pBluescript II SK(+), confirm and sequence the insert, and perform phylogenetic and structural analyses of the encoded lactonase.

Materials and Methods

Strain Gs was isolated in 2023 from rhizosphere soil and identified by standard morphological and biochemical tests as a *Paenibacillus* sp. (Gram-positive, catalase-positive, oxidase-positive, etc.). Gs was cultured on Nutrient Agar at 28 °C. Genomic DNA was extracted from Gs cells using the CTAB/NaCl method (Wilson, 2001), with lysozyme/phenol-chloroform purification. DNA quality was checked by agarose gel electrophoresis. Specific primers targeting *aiiA* were designed based on conserved sequences in *Paenibacillus* (Table 1). The primers included *EcoR*I/*Bam*HI (forward) and *EcoR*I/*Sma*I (reverse) sites for cloning. PCR was carried out with Phusion high-fidelity DNA polymerase under optimized conditions (initial denaturation 94 °C, 5 min; 35 cycles of 92 °C for 20 s, 58 °C for 20 s, 72 °C for 45 s; final extension 72 °C, 10 min). The 20 µL reaction contained template DNA, primers (10 µM each), dNTPs, $MgCl_2$, buffer, and polymerase (Phusion). The amplified product was checked on a 1% agarose gel. The PCR product (~756 bp) and the vector pBluescript II SK(+) were separately digested with *Bam*HI and *Sma*I (sites present in the primer extensions). Digested fragments were gel-purified (Low-Melting-Point agarose) and ethanol-precipitated. Ligation was performed overnight at 16 °C with T_4 DNA ligase (Thermo). The ligation mix was transformed by electroporation into competent *E. coli* TOP_{10} cells (2500 V, 5 ms). Transformants were recovered in LB medium and plated on LB agar with ampicillin (100 µg/mL). White (ampicillin-resistant) colonies appeared after ~14 h. Insert presence was verified by colony PCR using *aiiA*-specific primers and by restriction digest of plasmid DNA. A correctly sized amplicon (~750 bp) confirmed the *aiiA* insert. The recombinant plasmid from a positive clone was treated with RNase, purified, and submitted for bidirectional Sanger sequencing (BioMagic Gene). Sequence reads were assembled and trimmed. The *aiiA* insert (756 bp) was compared to GenBank using BLASTn. Homologous sequences were

aligned and a phylogenetic tree was constructed in MEGA7 using the Maximum Like hood method with Maximum Composite Likelihood distances. The deduced amino acid sequence was analyzed for conserved motifs and domains using the Pfam database and MOTIF Search. A three-dimensional protein model was generated using SWISS-MODEL, with model quality assessed by GMQE and sequence identity to known lactonases.

Results

PCR amplification of Gs genomic DNA produced a single product of ~750 bp, consistent with the expected *aiiA* gene size. Cloning into pBluescript II SK(+) and colony PCR confirmed the presence of the insert; restriction digestion of the plasmid yielded fragments of the predicted sizes. Sequencing of the insert revealed a 756-bp open reading frame encoding a 251-amino acid protein. BLAST analysis showed >99% nucleotide identity of this sequence to *P. polymyxa aiiA* genes (GenBank NZ_CP009909.1 and NZ_CP025957.1). The top BLAST hit was *P. polymyxa* strain CF05 (*aiiA*) with 97.47% identity and 100% coverage; the second was *P. polymyxa* strain HY96-2 (*aiiA*) with 99.21% identity. These results indicate that isolate Gs is closely related to *P. polymyxa*. Phylogenetic analysis of *aiiA* sequences placed Gs in a clade with *P. polymyxa* HY96-2, confirming its genetic proximity to this species. Nucleotide and amino-acid alignments of the Gs *aiiA* gene with that of *P. polymyxa* HY96-2 showed very high similarity. Motif analysis of the translated sequence identified a conserved metallo-β-lactamase domain (Lactamase_β family) characteristic of AHL-lactonases. Specifically, the hallmark "HxHxDH" motif (metal-binding histidines and aspartate) typical of *aiiA*-type enzymes was present. Structural modeling supported these findings: the SWISS-MODEL predicted structure (Model 01) covers the full protein (residues 1-251) with a GMQE score of 0.97 and 94.82% identity to a *P. polymyxa* lactonase template (AlphaFold template E3E7J1.1.A). The model clearly displays a Zn^{2+} binding site in the active site, underscoring the enzyme's metal-dependent lactonase activity. These data collectively confirm that the cloned gene encodes a functional AHL-lactonase.

Conclusions

We report the successful cloning and characterization of an *aiiA* (AHL-lactonase) gene from a *Paenibacillus polymyxa*-related isolate. The gene's sequence and phylogeny place it firmly within the *P. polymyxa* group, and the conserved β-lactamase-like domain and Zn-binding motif indicate its potential to quench quorum sensing. This work provides a molecular basis for exploiting Gs and its *aiiA* gene in agricultural biotechnology. For example, expression of *aiiA* in transgenic plants has been shown to suppress QS-dependent bacterial diseases. Similarly, the Gs strain itself, as a *Paenibacillus* (a recognized plant-growth promoter and biopesticide), could be developed as a biocontrol agent in crop protection. Overall, the high sequence conservation and

enzyme characteristics of Gs *aiiA* support its practical use in sustainable management of phytopathogens through quorum-quenching strategies.

Author Contributions

Conceptualization: Shirzad A, co-director of research and supervision and project administration: Shirzad A and Pazhouhandeh M, Methodology: Pazhouhandeh M, Software: Khoshbakhtlou F, Validation: Pazhouhandeh M, Formal analysis: Pazhouhandeh M, Investigation: Khoshbakhtlou F; Resources: Khoshbakhtlou F, Data curation: Khoshbakhtlou F and Pazhouhandeh M, Writing-original draft preparation: Khoshbakhtlou F and Pazhouhandeh M and Shirzad A, Writing-review and editing: Pazhouhandeh M and Shirzad A, Visualization: Khoshbakhtlou F, Pazhouhandeh M and Shirzad A, Funding acquisition: Pazhouhandeh M and Shirzad A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Data Availability Statement

The datasets generated during the current investigate are not publicly, but are available from the corresponding author upon reasonable request, subject to approval by the relevant institutional review board.

Acknowledgements

The authors express their gratitude to all participants who contributed to this study. We also acknowledge the research staff at Shahid Madani University of Azerbaijan for their technical support.

Ethical Considerations

This investigation was performed in accordance with the ethical principles outlined in the Declaration of Helsinki. All procedures were approved by the Institutional Review Board of Shahid Madani University of Azerbaijan, Iran. The authors confirm that no data fabrication, falsification, plagiarism, or other research misconduct occurred during the study.

Funding

This study was funded by Shahid Madani University of Azerbaijan, Iran. The funding body had no role in the study design, data collection, analysis, interpretation, or writing of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸
دانشگاه شهید باهنر کرمان
انجمن بیوتکنولوژی ایران

جداسازی، همسانه‌سازی و توالی‌یابی ژن *aiiA* از باکتری *Paenibacillus polymyxa*

فائزه خوشبختلو

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. رایانامه: faezehkoshbakhtlou@gmail.com

مقصود پژوهنده

*نویسنده مسئول: دانشیار، گروه زیست شناسی گیاهی، سلولی و مولکولی، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، ایران. رایانامه: pazhouhandeh@tabrizu.ac.ir

اکبر شیرزاد

دانشیار، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران. رایانامه: ashirzad98@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۳۰ تاریخ دریافت فایل اصلاح شده نهایی: ۱۴۰۴/۰۴/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۰

چکیده

هدف: ژن *aiiA* کدکننده متالوآنزیمی به نام لاکتوناز است که با هیدرولیز اسیل هموسرین لاکتون، منجر به مهار سیستم کروم سنسینگ در باکتری‌های گرم‌منفی می‌شود؛ سیستمی که نقش کلیدی در بیماری‌زایی این باکتری‌ها ایفا می‌کند. انواع مختلفی از این آنزیم در باکتری‌های گوناگون شناسایی شده است. نوعی از این آنزیم دارای موتیف محافظت‌شده‌ای است که در اتصال یون‌های فلزی و فعالیت آنزیمی نقش دارد. نمونه‌ای از این آنزیم در جنس *Bacillus* مشاهده شده است که ژن مربوط به آن با ۷۵۰ جفت باز، پروتئینی با ۲۵۰ اسیدآمینه را کد می‌کند. باکتری *Paenibacillus* که پیش‌تر در جنس *Bacillus* طبقه‌بندی می‌شد، به‌عنوان یک باکتری محرک رشد با فعالیت آنتاگونیستی مؤثر علیه بیمارگرهای گیاهی، از پتانسیل بالای بیوتکنولوژیکی برخوردار است.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، جهت بررسی حضور ژن *aiiA* در یک جدایه باکتری با ویژگی‌های مرتبط با جنس *Paenibacillus*، آغازگرهای اختصاصی این ژن طراحی شدند و پس از تکثیر، محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های برشی *Sma*I و *Bam*HI در پلاسمید pBluescript II KS (+) همسانه‌سازی شد. پس از تأیید صحت پلاسمید نوترکیب و وجود ژن، با استفاده از PCR و آنزیم برشی، نمونه جهت توالی‌یابی ارسال گردید.

نتایج: بر اساس نتایج توالی‌یابی، طول ژن *aiiA* در این جدایه معادل ۷۵۶ جفت باز بود. نتایج Blast نشان داد که این توالی شباهتی بیش از ۹۹ درصد با توالی‌های شماره‌ی دسترسی NZ_CP009909.1 و NZ_CP025957.1 در پایگاه داده NCBI

دارد که نشان‌دهنده نزدیکی این جدایه به گونه *P. polymyxa* می‌باشد. نتایج محاسبه ضریب فاصله و ترسیم درخت فیلوژنتیکی براساس توالی این ژن نیز این قرابت را تأیید کرد. علاوه‌بر این شناسایی دامنه متعلق به خانواده β-Lactamase در موتیف پیشنهادی ژن مذکور، نشان‌دهنده نقش این ژن به‌عنوان یک آنزیم لاکتوناز و توانایی آن در مهار سیگنال‌دهی سیستم کروم سنسینگ می‌باشد. تحلیل ساختار پیشنهادی پروتئین کدشده توسط این ژن نیز نتایج مذکور را تأیید می‌کند.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش، ضمن انتقال و همسانه‌سازی موفق ژن *aiiA* به‌منظور استفاده در تولید گیاهان مقاوم به باکتری‌های بیماری‌زا، امکان شناسایی مولکولی دقیق جدایه مورد بررسی را نیز فراهم کرد. شناسایی این جدایه به‌عنوان باکتری نزدیک به گونه *P. polymyxa*، بیانگر پتانسیل بالای آن در کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی است. بر این اساس، این جدایه می‌تواند به‌عنوان یک عامل زیستی مؤثر در راهکارهای پایدار مدیریت بیماری‌های باکتریایی گیاهان مورد بهره‌برداری قرار گیرد.

کلید واژه‌ها: آنتاگونیست، بیوکنترل، سیستم رفع حد نصاب، لاکتوناز، مقاومت به آنتی‌بیوتیک

نوع مقاله: پژوهشی.

استناد: خوشبختلو فائزه، پژوهنده مقصود، شیرزاد اکبر (۱۴۰۴) جداسازی، همسانه‌سازی و توالی‌یابی ژن *aiiA* از باکتری *Paenibacillus polymyxa*. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی*، ۱۷(۴)، ۱-۲۶.

Publisher: Shahid Bahonar University of Kerman & Iranian Biotechnology Society.

مقدمه

مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دلیل استفاده گسترده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند تغییرات عمده‌ای در فیزیولوژی باکتری‌ها ایجاد کرده و پیچیدگی‌های جدیدی در فرآیندهای درمانی به وجود آورد. این مسئله ضرورت کشف یا توسعه راهکارهای جدید برای کنترل بیماری‌های باکتریایی را آشکار می‌سازد (Martinez et al., 2009; Sundin et al., 2016). در این راستا، توجه به روش‌های غیرشیمیایی و استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیستی به‌عنوان یک راهکار مناسب در کاهش آسیب‌های ناشی از بیماری‌های باکتریایی افزایش یافته است. باکتری‌های گروه *Paenibacillus* و *Bacillus*، به‌عنوان باکتری‌های محرک رشد گیاهان (PGPB[1]) شناخته می‌شوند که علاوه بر افزایش رشد گیاهان، با تولید متابولیت‌های ضدمیکروبی می‌توانند به‌طور طبیعی از گیاهان در برابر بیماری‌های باکتریایی و قارچی محافظت کنند (Grady et al., 2016; Langendries and Goormachtig, 2001). یکی از مهمترین ویژگی‌های این باکتری تجزیه مولکول‌های سیگنال‌دهنده مربوط به سیستم پیام رسان Quorum Sensing (QS) در باکتری‌های گرم منفی به عنوان منابع غذایی و انرژی می‌باشد (Leadbetter and Greenberg, 2000). در باکتری‌های گرم

[1] Plant growth promoting rhizobacteria

منفی مولکول‌های سیگنال از نوع Acyl homoserine lactone (AHL) می‌باشد. تولید عوامل بیماری‌زا به‌دلیل انرژی‌بر بودن، فقط زمانی مقرون به‌صرفه و مؤثر است که در جمعیت‌های پرتراکم و در زمان مناسب فعال شود. سیستم QS با تنظیم رفتارهای جمعی باکتری‌ها، از جمله بیماری‌زایی، تشکیل بیوفیلم و تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک نقش کلیدی در هماهنگی فعالیت‌های جمعی باکتری‌های گرم منفی دارد (Helman and Chernin, 2015; Papenfort and Bassler, 2016). مطالعات نشان داده‌اند که حداقل ده باکتری مهم بیماری‌زای گیاهی، برای کنترل و تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی، به سیستم QS متکی هستند (Baltenneck et al., 2021). مکانیسم QS برای اولین بار توسط نلسون و همکاران (Nealson et al., 1970) در پدیده زیست‌تابی مربوط به باکتری *Vibrio fischeri* مشاهده شد. با وجود تنوع در این سیستم، مکانیسم کلی آن به این صورت است که هر سلول باکتریایی همواره سطح پایه‌ای از مولکول‌های سیگنال دهنده خارج سلولی به نام خودالقاگر Autoinducers (AIs) منتشر می‌کند که میزان غلظت آن در محیط تابعی از تراکم سلولی بوده و از این طریق توانایی سرشماری جمعیت را به باکتری می‌دهد. با افزایش جمعیت باکتری میزان خودالقاگر در محیط افزایش یافته و زمانی که غلظت آن به حد آستانه رسید، گیرنده‌های پروتئینی غشایی یا سیتوپلاسمی باکتری، این مولکول‌ها را تشخیص داده و باعث تغییر در تنظیم بیان ژن‌های تحت کنترل این سیستم می‌شوند. بنابراین، سیستم حدنصاب یک مکانیسم تنظیم بیان ژن وابسته به تراکم است (Fuqua and Greenberg, 1998; Papenfort and Bassler, 2016). سیگنال‌ها توسط پروتئین LuxI تولید و توسط گیرنده پروتئینی LuxR دریافت می‌شود. یکی از پیامدهای دریافت مولکول‌های سیگنال، مربوط به افزایش بیان ژن سنتز خودالقاگر می‌باشد. به همین دلیل این سیگنال‌ها را خودالقاگر می‌نامند (Sifri, 2008; Eberl, 1999). نخستین بار Dong و همکاران کاربرد اختلال در پدیده QS جهت کنترل بیماری‌های باکتریایی را مطرح کردند (Dong et al., 2000). این اختلال می‌تواند با هدف قرار دادن مراحل مختلف تولید، انتشار، تجمع یا شناسایی خودالقاگرها انجام شود (Rasmussen and Givskov, 2006; Papenfort and Bassler, 2016). که تحت عنوان سیستم Quorum quenching (QQ) شناخته می‌شود (Dong et al., 2001). سیگنال‌دهی سیستم QSرا می‌توان به صورت فعال یا غیرفعال به دو روش آنزیمی و شیمیایی خاتمه داد. در روش شیمیایی، تحت شرایط قلیایی AHL به سرعت هیدرولیز می‌شود (Churchill and Chen, 2011). روش آنزیمی نیز با استفاده از آنزیم‌های تجزیه‌کننده AHL رخ می‌دهد. این آنزیم‌ها شباهتی به آنتی‌بیوتیک‌ها ندارند، آن‌ها هیچ سمیتی نداشته و تاثیری در کمیت رشد باکتری نمی‌گذارند. مکانیسم عمل این آنزیم‌ها به این صورت است که مولکول‌های سیگنال موجود در محیط را هیدرولیز کرده و تنها باعث تغییر در رفتار جمعی باکتری می‌شوند. این آنزیم‌ها بر اساس مکانیسم اثر خود می‌توانند AHL را غیرفعال کنند. یک از انواع این آنزیم‌ها، آنزیم لاکتوناز است که حلقه لاکتونی AHL را هیدرولیز می‌کند (Dong et al., 2002; Garge and Nerurkar, 2016; Bergonzi et al., 2018). این ژن در باکتری‌های گروه *Bacillus* مثل *B. thuringiensis* و *B. cereus*، *B. mycoides*، *B. anthracis*، *B. subtilis* و *B. velezensis* یافت می‌شود (Dong et al., 2000; Dong et al., 2002; Lee et al., 2002; Zhu et al., 2003; Ulrich, 2004; Pan et al., 2008; Ayyappan and Bhaskaran, 2022). پژوهش‌های انجام شده نشان

از موفقیت این آنزیم در مهار سیستم حدنصاب باکتری *Pectobacterium carotovora* از طریق کاهش تولید آنزیم پکتولیتیک و در نتیجه کاهش علائم بیماری دارد. در پژوهشی با بررسی اثر ژن *aiiA* روی تحرک باکتری و آنزیم‌های بیماری‌زای *P. carotovora*، با تولید سویه نوترکیب از *P. carotovora* دارای ژن *aiiA* ثابت کردند که وجود این ژن و بیان آن باعث کاهش انواع تحرک و کاهش تولید آنزیم‌های بیماری‌زایی در این پاتوژن می‌شود (Mahmoudi and Jafari, 2018). تولید گیاه تراریخته حاوی ژن *aiiA* نیز از جمله کاربردهای بیوتکنولوژیکی آن می‌باشد. Dong و همکاران طی پژوهشی با انتقال و بیان ژن *aiiA* در گیاه سیب زمینی و تنباکو نشان دادند که با وجود تلقیح با تراکم بالایی از جمعیت پاتوژن، گیاهان تراریخته آلوده علائم قابل توجهی نشان نمی‌دهند (Dong et al., 2001). گیاهان تراریخته اکالیپتوس و سیب‌زمینی حاوی ژن *aiiA*، با مهار سیستم QS به ترتیب علیه بیمارگرهای *Pectobacterium carotovorum* و *Ralstonia solanasearum* در کاهش شاخص بیماری موفق بوده‌اند (Ouyang and Li, 2016). تلقیح باکتری *B. cereus* علیه بیمارگر *Pseudomonas syringae* به مرکبات در شرایط آزمایشگاهی باعث کاهش حدنصاب پاتوژن به دلیل دارا بودن ژن *aiiA* شد (Akbari Kiarood et al., 2020). این ژن در کنترل بیمارگر *E. amylovora* نیز مؤثر بوده است. تلقیح *E. amylovora* روی گیاه تراریخته حاوی ژن *aiiA* باعث کاهش میزان تولید پلی‌ساکارید خارجی باکتری، حساسیت بیشتر به پراکسید هیدروژن و کاهش علائم بیماری روی برگ‌های سیب شد (Molina et al., 2005). ژن *aiiA* از باکتری سویه *Paenibacillus polymyxa* NR1 برای اولین بار توسط Chen و همکارانش گزارش شده است (Chen et al., 2018). فعالیت آنتاگونیستی قوی یک جدایه بنام Gs در آزمایشگاه علیه چندین باکتری گرم منفی دارای سیستم تنظیم ژن QS نظیر *P. carotovorum* و *E. amylovora*، احتمال وجود آنزیم‌های مختل کننده حد نصاب را در این باکتری مطرح می‌کند. با توجه به نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی، این جدایه متعلق به جنس *Paenibacillus* در نظر گرفته شد. هدف این پژوهش، علاوه بر شناسایی دقیق مولکولی این جدایه Gs، بررسی وجود ژن *aiiA* در آن، جداسازی و همسانه سازی این ژن از باکتری به منظور استفاده بیوتکنولوژیک در ایجاد گیاهان تراریخته مقاوم به باکتری‌ها و همچنین بررسی فیلوژنی توالی‌های آن در این جدایه آنتاگونیستی است. بدین منظور ژن *aiiA* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی تکثیر گردید. پس از همسانه‌سازی ژن در ناقل مناسب و تایید صحت آن، توالی‌یابی ژن انجام شد تا به بررسی توالی و ویژگی‌های فیلوژنتیکی آن پرداخته شود.

مواد و روش‌ها

باکتری استفاده شده در پژوهش و شرایط کشت و نگهداری: در این پژوهش از جدایه Gs که در سال ۱۴۰۲، به عنوان یکی از موثرترین جدایه‌ها از میان ۱۵۰ جدایه باکتریایی بدست آمده از خاک ریزوسفری گیاهان، استفاده شد. برای کشت این باکتری از محیط کشت عمومی Nutrient Agar (NA) استفاده گردید و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت نگه‌داری

شد. باکتری‌ها در محلول $MgSO_4$ ۱/۰ مولار در دمای چهار درجه سانتی‌گراد و در گلیسرول ۴۰ درصد برای نگه‌داری طولانی مدت در دمای منفی۸۰ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی: آزمون‌های باکتری‌شناسی شامل رنگ‌آمیزی گرم، تولید اسید و گاز از گلوکز، آزمون کاتالاز، آزمون اکسیداز، تحمل به شوری، دمای بهینه رشد، توانایی کاهش نیترات، استفاده از سیترات، هیدرولیز اوره، تحرک و رشد در شرایط بی‌هوازی بر اساس روش‌های استاندارد انجام گرفت (Schaad et al., 2001; Vos et al., 2011).

طراحی آغازگرها و انجام واکنش PCR جهت جداسازی ژن *aiiA*: آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق برای تکثیر ژن *aiiA* طراحی شدند. به دلیل شباهت فیزیولوژیک و بیولوژیک این باکتری به جنس *Paenibacillus* آغازگرهای مرتبط با استفاده از توالی‌های موجود در پایگاه داده NCBI و نرم‌افزار APE طراحی شده و سپس توسط شرکت BioMagic Gene سنتز گردیدند. آغازگر طراحی شده دارای سایت برشی برای همسانه‌سازی ژن تکثیر شده در ناقل pBluescript II SK(+) بود.

جدول ۱. توالی آغازگرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن *aiiA*

Table 1. Primer sequences used for amplification of the *aiiA* gene

نام ژن Gene name	نام آغازگر Primer name	توالی آغازگر Primer sequence	طول قطعه تکثیر شده Amplicon size(bp)
aiiA	FaiiA *EcoR*I-*Bam*HI	5’AAGAATTCGGATCCATGATTAACAAATTGTACTGGTTA3’	756
	RaiiA *EcoR*I-*Sma*I	5’AAGAATTCCCCGGGTTATTTGTATTGTGGATATACCG3’	

استخراج DNA باکتری: ژنوم باکتری با استفاده از روش CTAB/NaCl استخراج شد (Wilson, 2001). در این روش بعد از جمع‌آوری کلنی‌های باکتری از روی محیط کشت، ۳۰۰ میکرولیتر بافر CTAB/NaCl و پودر شیشه به تیوب استریل افزوده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه ترمومیکسر Eppendorf قرار گرفت. بعد از خالص‌سازی به روش فنول/کلروفرم، DNA استخراج شده با اتانول رسوب داده و در نهایت در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد.

واکنش PCR: واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر، شامل ۱۳ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲ میکرولیتر PCR Buffer×10، ۱ میکرولیتر $MgCl_2$ با غلظت ۲۵ Mm، ۱ میکرولیتر dNTP با غلظت ۱۰ Mm، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ µM، ۱ میکرولیتر DNA با غلظت ۱ µg/µl و ۰/۲ میکرولیتر آنزیم Phusion DNA Polymerase (NEB) با غلظت ۵ U/µl انجام شد. تکثیر ژن موردنظر در دستگاه ترموسایکلر مدل Biometra T-Gradient با شرایط دمایی به صورت زیر انجام شد. واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و سپس با ۳۵ چرخه به شرح، واسرشت سازی

۹۲ درجه سانتی‌گراد ۲۰ ثانیه و اتصال آغازگر ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و گسترش ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه ادامه پیدا کرد. در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. نتیجه واکنش PCR با استفاده از ژل آگارز ۱درصد و رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید بررسی شد.

تهیه سلول‌های شایسته باکتری برای الکتروپوراسیون: برای تراریزش، از باکتری *E. coli* سویه TOP_{10} استفاده شد. ابتدا باکتری در محیط کشت Luria-Bertani (LB) جامد کشت شده و سپس یک کلنی در محیط LB مایع پیش کشت شد. پس از رسیدن کشت اصلی به OD_{600}=0.5، باکتری‌ها سانتریفیوژ شده و پس از شستشوی سلول‌ها با آب استریل سرد، در گلیسرول ۱۰ درصد به حالت سوسپانسیون درآمدند و به دمای منفی۷۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند.

همسانه‌سازی ژن *aiiA* در ناقل pBluescript II SK (+): ناقل pBluescript II SK (+) برای همسانه‌سازی و توالی‌یابی این ژن استفاده شد. ناقل و ژن مدنظر با آنزیم‌های برشی *Bam*HI و *Sma*I که به ترتیب در ابتدای آغازگرهای رفت و برگشت تعبیه شده بودند، برش یافتند. واکنش برش آنزیمی در حجم ۱۰۰ میکرولیتر در دو تیوب جداگانه برای ژن و پلاسمید تهیه شد. ابتدا در انکوباتور با دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم *Sma*I به مدت ۲ ساعت و پس از اضافه کردن آنزیم *Bam*HI مجددا ۲ ساعت دیگر در ۳۷ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور نگهداری شد. جهت انجام واکنش لیگاسیون لازم است تا محصولات برش آنزیمی خالص شوند. در همین راستا این محصولات روی ژل آگارز از نوع Low Melting Point (LMP) یک درصد بارگذاری و الکتروفورز انجام شد. باند مربوط به ژن با اندازه تقریبی ۷۵۰ جفت‌باز و باند مربوط به پلاسمید حدود ۳۰۰۰ جفت باز از روی ژل برش یافته و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه همراه با ورتکس کوتاه و متناوب حرارت داده شد. سپس بافر LMP به مقدار سه برابر حجم به تیوب‌ها اضافه گردید و مجدداً به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. در مرحله بعد فنل به نسبت یک برابر حجم روی آن اضافه و به مدت ۵ دقیقه به صورت متناوب و کوتاه ورتکس شد. سپس سانتریفیوژ با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انجام گرفت و فاز رویی به تیوب جدید منتقل شد. در نهایت خالص‌سازی به روش فنول/کلروفرم انجام و رسوبات در ۳۰ میکرولیتر آب حل شد.

واکنش لیگاسیون و تراریزش به *E. coli*: پس از خالص‌سازی محصولات برش آنزیمی، واکنش لیگاسیون با استفاده از آنزیم T_4 DNA Ligase در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انجام شد. در ادامه ۲ میکرولیتر از محصول لیگاسیون به ناقل به ۵۰ میکرولیتر سلول شایسته *E. coli* سویهTOP_{10} اضافه گردید و سپس انتقال پلاسمید نوترکیب به روش الکتروپوراسیون با ولتاژ ۲۵۰۰ ولت و زمان ۵ میلی‌ثانیه با دستگاه الکتروپوراتور Eppendorf صورت گرفت. بلافاصله پس از تراریزش، باکتری‌ها در محیط LB مایع به مدت یک ساعت در انکوباتور شیکر در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۸۰ دور در دقیقه جهت ترمیم باکتری نگهداری شدند. سپس در محیط جامد LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین کشت داده شدند.

تایید صحت همسانه‌سازی و ارسال برای توالی‌یابی: بعد از رشد کلنی‌های مقاوم به آمپی‌سیلین، تایید صحت همسانه‌سازی با انجام واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *aiiA* روی باکتری‌های رشد کرده، انجام شد. جهت اطمینان از درستی همسانه‌سازی ژن در ناقل مد نظر، استخراج پلاسمید انجام و سپس PCR با آغازگرهای ژن و پلاسمید به صورت ترکیبی نیز انجام شد. تیمار RNase روی پلاسمید نوترکیب تایید شده در حجم ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از ۱۰ میکرولیتر بافر TE و ۴۰ میکرولیتر DNA پلاسمید و ۱ میکرولیتر آنزیم RNase انجام شد. پس از نیم ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، خالص‌سازی DNA با استفاده از کلروفورم انجام شد. بعد از انجام واکنش RNase روی پلاسمید حاوی ژن *aiiA*، محصول واکنش RNase جهت توالی‌یابی در دو جهت سنس و آنتی‌سنس به شرکت BioMagic Gene ارسال شد. نتایج توالی یابی بعد از اصلاح مطابق فایل کروموگرام توالی‌ها، در برنامه BLAST بررسی شد. توالی‌های مشابه از NCBI دریافت و به کمک نرم افزار Mega7 درخت فیلوژنتیکی آن‌ها ترسیم شد. با پیشبینی اسیدآمینه مربوطه، ساختار پیشنهادی پروتئین توسط ابزار Expasy - SIB Swiss Institute of Bioinformatics بررسی شد.

نتایج و بحث

بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی: روی جدایه آنتاگونیست مورد مطالعه ابتدا تست‌های مختلف اولیه انجام گردید تا مطابق نتایج آن‌ها جنس باکتری شناخته شود. نتایج این تست‌ها در جدول ۲ آمده است.

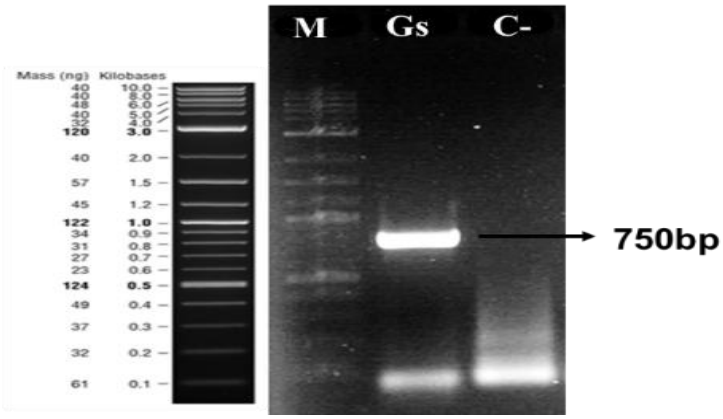
جدول ۲. نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برای شناسایی جدایه باکتری

Table 2. The results of biochemical tests for identification of bacterial isolates

Results نتایج	Biochemical tests آزمون‌های بیوشیمیایی
+	Gram reaction گرم
+	Oxidase اکسیداز
+	Catalase کاتالاز
	Hydrolyze of هیدرولیز:
+	Casein کازئین
+	Urea اوره
+	Strach نشاسته
30	Optimal growth temperature (◦C) دمای بهینه رشد (درجه سانتی‌گراد)
+	Acid and gas production in glucose تولید اسید و گاز در گلوکوز
	Growth in NaCl رشد در محیط کشت حاوی نمک:
-	7%
-	5%
+	2%
+	Nitrate reduction کاهش نیترات
-	Utilization of citrate توانایی مصرف سیترات
F	Oxidative fermentation glucose اکسیداسیون–تخمیر
+	Motility تحرک

*F: بی هوازی اختیاری. (+) و (–) به ترتیب به معنی مثبت بودن و منفی بودن واکنش هستند.

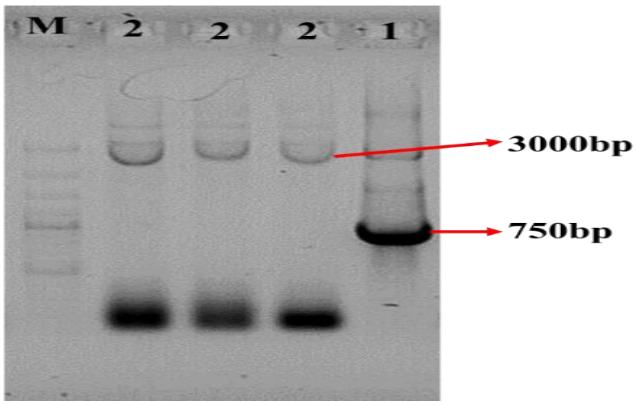
تکثیر و تایید وجود ژن *aiiA* با واکنشPCR: بعد از استخراج DNA از جدایه باکتریایی، واکنش PCR جهت جداسازی و تکثیر ژن *aiiA* با استفاده از آغازگرهای طراحی شده انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت. حضور باندی با اندازه‌ی تقریبی ۷۵۰ جفت‌باز در جدایه Gs وجود ژن *aiiA* را تایید کرد (شکل ۱).



شکل ۱. الکتروفورز ژل آگارز محصول PCR. M) نشانگر NEB با وزن مولکولی1KB، Gs) محصول PCR ژن *aiiA* باکتری جدایه Gs حاکی از وجود این ژن می‌باشد، C-) کنترل منفی

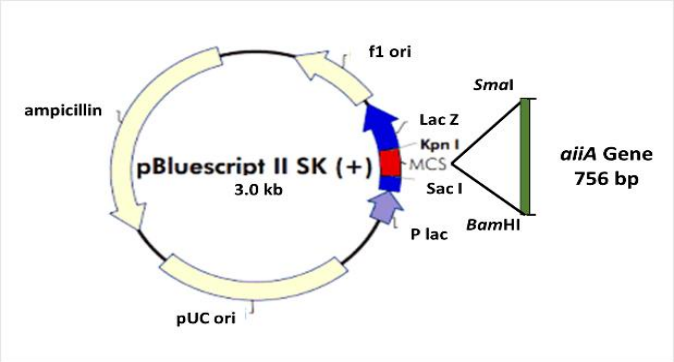
Figure 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR product. M) DNA marker; Gs) PCR product of the aiiA gene from Gs bacterium; C−) Negative control

همسانه‌سازی ژن *aiiA* در پلاسمید pBluescript II SK(+): محصول PCR ژن *aiiA* و ناقل pBluescript II SK(+) بعد از خالص‌سازی و آماده‌سازی برای همسانه‌سازی به‌طور جداگانه، با آنزیم‌های *Bam*HI و *Sma*I تیمار شد. نتایج ژل الکتروفورز، موفقیت برش را تایید کرد (شکل ۲). نقشه ژنومی پلاسمید نوترکیب حاوی ژن *aiiA* در شکل ۳ آمده است.



شکل ۲. الکتروفورز واکنش برش آنزیمی. M) مارکر، 1) برش آنزیمی ژن *aiiA*، 2) برش آنزیمی پلاسمید pBluescript II SK(+)

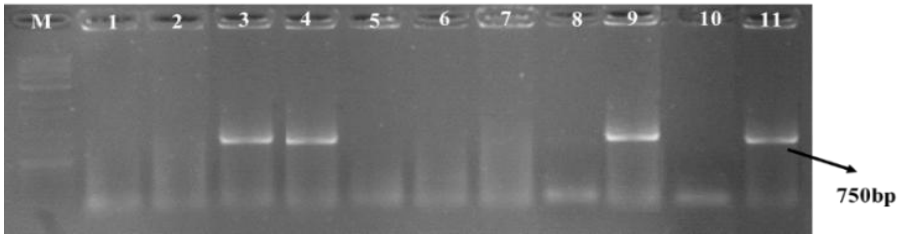
Figure 2. Electrophoresis of the restriction digestion reaction. M) DNA marker; 1) Restriction digestion of the *aiiA* gene; 2) Restriction digestion of the (+)pBluescript II SK plasmid



شکل۳. نقشه ژنومی پلاسمید نوترکیب (+) pBluescript II SK حاوی ژن *aiiA*

Figure 3. Genomic map of the recombinant plasmid pBluescript II SK (+) containing the *aiiA* gene

پلاسمید نوترکیب پس از لیگاسیون با استفاده از روش الکتروپوراسیون به سلول‌های شایسته انتقال یافت. رشد کلنی‌های سفید روی محیط کشت انتخابی حاوی آمپی‌سیلین بعد از ۱۴ ساعت نشان دهنده موفقیت‌آمیز بودن تراریزش بود. صحت همسانه‌سازی با استفاده از روش PCR on colony مورد بررسی و تایید قرار گرفت (شکل ۴).

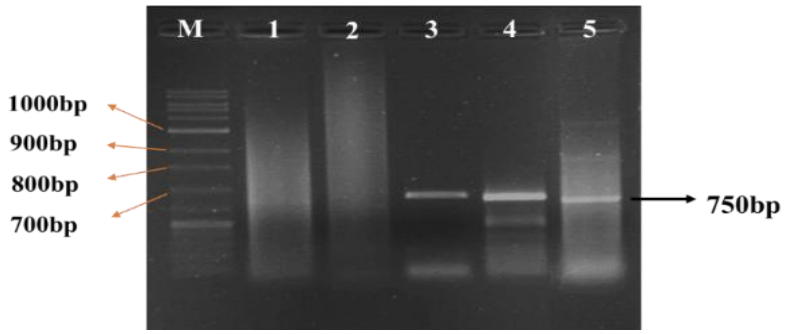


شکل٤-نتیجه الکتروفورز محصول PCR on colony با آغازگرهای اختصاصی ژن *aiiA* روی کلنی‌های رشد کرده روی محیط کشت انتخابی حاوی آمپی‌سلین. M) مارکر، ۳، ٤، ۹ و ۱۱) محصول PCR کلنی‌های حاوی ژن *aiiA*

Figure 4. Electrophoresis result of colony PCR using *aiiA* gene-specific primers on colonies grown on selective medium containing ampicillin. M) DNA marker; Lanes 3, 4, 9, and 11) PCR products of colonies harboring the *aiiA* gene

بعد از استخراج و خالص سازی پلاسمید نوترکیب از کلنی‌های رشد کرده در محیط کشت انتخابی، جهت اطمینان بیشتر از نوترکیب بودن پلاسمید از روش PCR با آغازگرهای پلاسمید و ژن به صورت ترکیبی استفاده شد، به این صورت که PCR با آغازگرهای T3 و FaiiA و با آغازگرهای T7 و RaiiA استفاده شد که نتایج PCR در شکل ۵ آمده است.

آنالیزهای نتیجه توالی‌یابی و ترسیم درخت فیلوژنتیکی: نتایج Blast توالی‌یابی مربوط به جدایه Gs، حضور ژن *aiiA* با شباهت بسیار بالا به سویه‌های *P. polymyxa* (با درجات شباهت ۹۸–۹۷ درصد)، همراه با گزارش‌هایی از حضور این ژن در گونه‌های *Paenibacillus*، نشان می‌دهد که جدایه Gs احتمالاً متعلق به این گونه است. بالاترین درصد تطابق مربوط به سویه *P. polymyxa* strain CF05 (شماره دسترسی: NZ_CP009909.1) با ۹۷/۴۷ درصد شباهت و پوشش توالی ۱۰۰ درصد و سویه *P. polymyxa*-HY96-2 (شماره دسترسی: NZ_CP025957.1) با ۹۹/۲۱ درصد در رتبه دوم قرار گرفت. اگرچه با توجه به این‌که ژن *aiiA* یک ژن عملکردی است و برای شناسایی قطعی گونه‌ها معمولاً از ژن‌های حفاظت‌شده‌ای مانند S rRNA ۱۶ استفاده می‌شود، با این حال این نتایج می‌تواند به عنوان یک قرینه برای نزدیک بودن این جدایه به گونه‌ی *P. polymyxa* در نظر گرفته شود چرا که بررسی‌های مربوطه نشان از اختصاصیت این ژن در اعضای بین جنس‌های مختلف می‌باشد (شکل ۶).



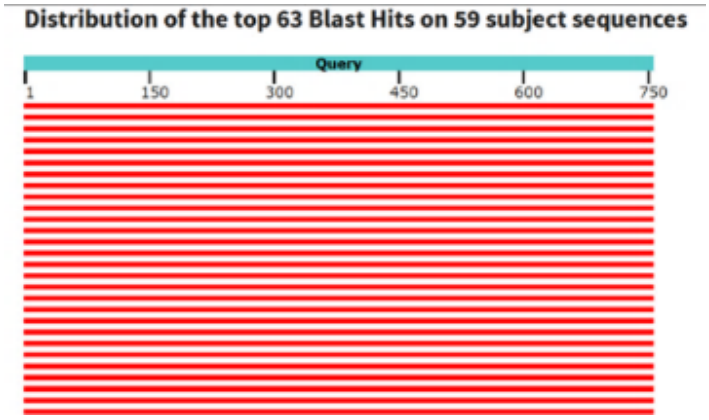
شکل۵- الکتروفورز پلاسمید نوترکیب خالص‌سازی شده مربوط به یکی از کلنی‌های ترنس‌ژنیک. چاهک M) مارکر، چاهک ۱ و ۲) محصول PCR پلاسمید نوترکیب با آغازگرهای T3 وFaiiA، چاهک ۳ و ٤) محصول PCRپلاسمید نوترکیب آغازگرهای T7 وRaiiA، چاهک ۵) محصول PCR پلاسمید نوترکیب با آغازگر اختصاصی ژن *aiiA*

Figure 5. Electrophoresis of the purified recombinant plasmid from one of the transgenic colonies. M) DNA marker; 1 and 2) PCR product of the recombinant plasmid using T3 and FaiiA primers; 3 and 4) PCR product of the recombinant plasmid using T7 and RaiiA primers; 5) PCR product of the recombinant plasmid using *aiiA* gene-specific primers

نتایج حاصل از تحلیل فیلوژنتیکی بر پایه توالی ژنی مشابه نشان داد که جدایه Gs در تبارنمای حاصل، قرابت ژنتیکی نزدیکی با جدایه *P. polymyxa* HY96-2 دارد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از روش (MCL) Maximum Composite Likelihood در نرم‌افزار MEGA7 به‌دست آمد و نشان‌دهنده ارتباط تکاملی قابل توجه بین این دو جدایه بود. همچنین درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس توالی ژن *aiiA* جدایه مورد نظر با سایر توالی‌های *aiiA* از جنس‌های مختلف، نشان داد که توالی جدایه مورد بررسی، شباهت بالایی با ژن *aiiA* مربوط به *P. polymyxa* داشته و در نزدیکی آن قرار می‌گیرد. (شکل ۷).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Paenibacillus polymyxa strain CF05 genome	Paenibacillus pol...	1375	1375	100%	0.0	99.47%	5762608	CP009909.1
Paenibacillus polymyxa strain MEZ6 chromosome, complete genome	Paenibacillus pol...	1363	1363	100%	0.0	99.21%	5769542	CP086373.1
Paenibacillus polymyxa strain HY96-2 chromosome, complete genome	Paenibacillus pol...	1363	1363	100%	0.0	99.21%	5745779	CP025957.1
Paenibacillus polymyxa T1-8 DNA, complete genome	Paenibacillus pol...	1363	1363	100%	0.0	99.21%	5751119	AP027908.1
Paenibacillus polymyxa strain PJH16 chromosome, complete genome	Paenibacillus pol...	1363	1363	100%	0.0	99.21%	5746138	CP137742.1
Paenibacillus polymyxa strain R 6.14 chromosome, complete genome	Paenibacillus pol...	1363	1363	100%	0.0	99.21%	5745819	CP097766.3
Paenibacillus polymyxa strain S3 chromosome, complete genome	Paenibacillus pol...	1352	1352	100%	0.0	98.94%	5740272	CP102865.1
MAG: Paenibacillus sp. DP01 chromosome, complete genome	Paenibacillus sp. ...	1352	1352	100%	0.0	98.94%	5762972	CP173059.1
Paenibacillus polymyxa strain L29 chromosome, complete genome	Paenibacillus pol...	1347	1347	100%	0.0	98.81%	5715459	CP184725.1
Paenibacillus polymyxa strain KN-03 chromosome, complete genome	Paenibacillus pol...	1336	1336	100%	0.0	98.54%	5922010	CP036496.1
Paenibacillus polymyxa strain 2020 chromosome, complete genome	Paenibacillus pol...	1336	1336	100%	0.0	98.54%	5916219	CP049598.1
Paenibacillus polymyxa ATCC 842 chromosome, complete genome	Paenibacillus pol...	1336	1336	100%	0.0	98.54%	5921998	CP024795.1
Paenibacillus polymyxa strain DSM 36 chromosome, complete genome	Paenibacillus pol...	1336	1336	100%	0.0	98.54%	5916392	CP049783.1

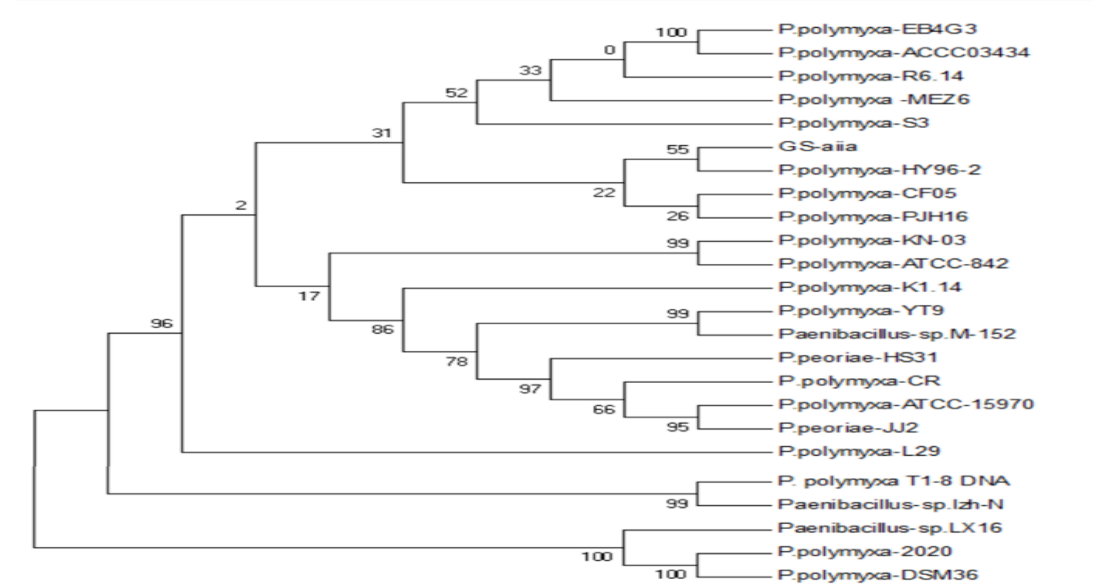
الف (A)



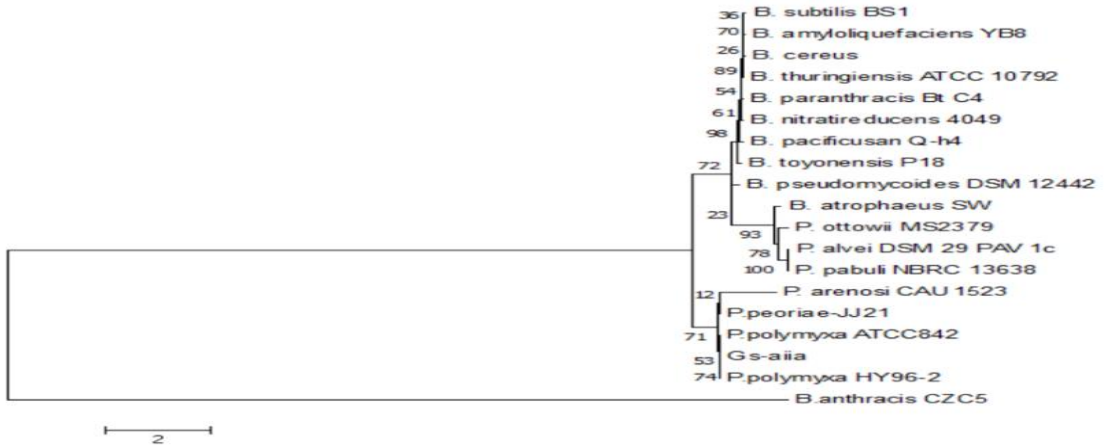
ب (B)

شکل ٦. شکل الف) BLAST توالی ژن *aiiA*؛ بیشترین شباهت با گونه‌های *P. polymyxa* مشاهده شد و شکل ب) Query Coverage در میان ٦٣ نتیجه برتر BLAST مربوط به توالی ژن *aiiA*؛ بیشتر توالی‌ها دارای پوشش کامل هستند. تمام ٦٣ جدایه مربوط به جنس *Paenibacillus* می‌باشند

Figure 6. A) Top BLAST hits for the *aiiA* gene show the highest similarity with species of *P. polymyxa*. B) Query coverage across the top 63 BLAST hits for the *aiiA* gene, where the majority of sequences exhibit full-length coverage. All 63 isolates belong to the genus *Paenibacillus*, underscoring the specificity and conservation of the *aiiA* sequence within this genus



الف (A)

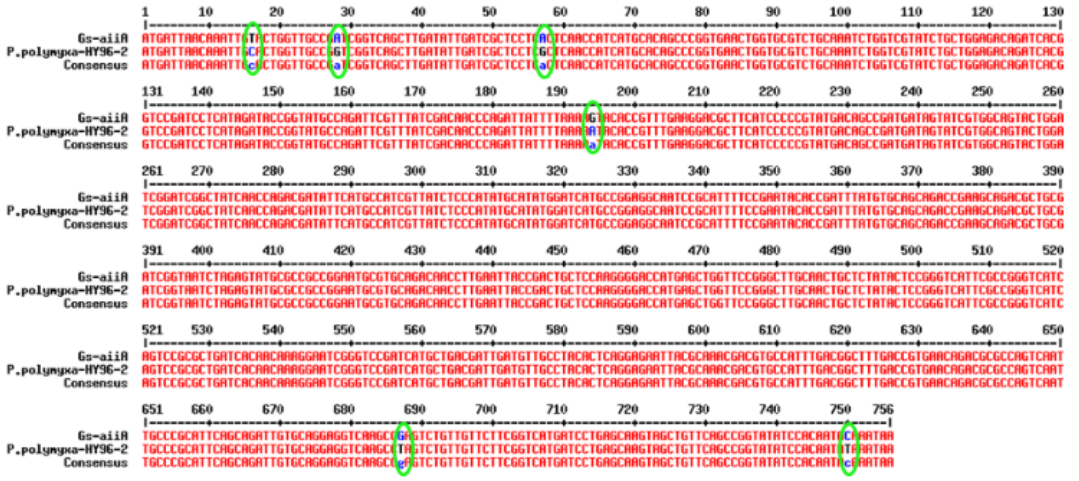


ب (B)

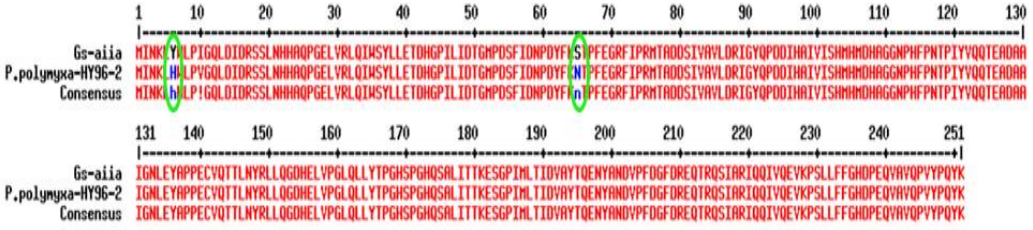
شکل ۷. درخت فیلوژنتیکی حاصل از هم‌ترازی توالی ژن *aiiA* جدایه Gs با توالی‌های بدست آمده از NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA با روش Maximum Like hood. الف) درخت ترسیم شده با توالی‌های مشابه توالی ژن *aiiA* جدایه Gs، این جدایه را با *P. polymyxa*-HY96-2 با بوتسترپ بالای ۵۰ به عنوان گروه خواهری معرفی شدند و ب) درخت ترسیم شده حاصل از بررسی توالی ژن *aiiA* جدایه Gs با توالی این ژن در گونه‌های دیگر نشان داد، Gs و *P. polymyxa* ATCC842 (شماره دسترسی: NZ_CP024795) و *P.polymyxa* HY96-2 با بوتسترپ بالای ۷۰ در یک کلاد قرار گرفته و به طور کامل جدا از جنس *Bacillus* قرار گرفتند

Figure 7. Phylogenetic tree derived from the alignment of the *aiiA* gene sequence of strain Gs with NCBI-derived sequences using MEGA software by the Maximum Like hood method A) The tree constructed with sequences similar to the *aiiA* gene of strain Gs indicates that this strain forms a sister group to *P. polymyxa* HY96-2 bootstrap support above 50 and B) The phylogenetic analysis of the *aiiA* gene sequence of strain Gs alongside those from other species shows that Gs, *P. polymyxa* ATCC842 (Accession number: NZ_CP024795) , and *P. polymyxa* HY96-2 cluster within the same clade with bootstrap support above 70, and are completely separated from the genus *Bacillus*

هم‌ترازی توالی نوکلئوتیدی و اسیدآمینه‌ای مربوط به ژن *aiiA* از جدایه‌ی Gs با باکتری *P. polymyxa*-HY96-2 نشان‌دهنده شباهت بالای این دوجدایه به هم بود. اسیدآمینه‌های کد شده توسط ژن *aiiA* جدایه‌ی Gs با استفاده از نرم‌افزار APE پیش‌بینی شد (شکل ۸).



الف (A)

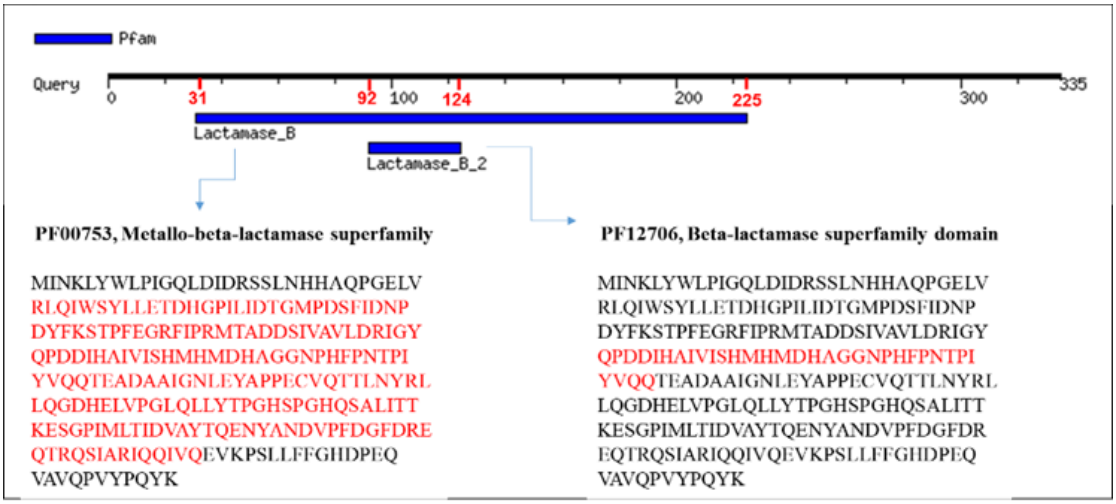


ب (B)

شکل ۸. الف) هم‌ترازی نوکلئوتیدی ژن *aiiA* جدایه‌ی Gs با توالی همان ژن از باکتری *P. polymyxa*-HY96-2 با استفاده از سایت MultAlin. این هم‌ترازی نشان می‌دهد که ژن *aiiA* در جدایه‌ی Gs شباهت بالایی به توالی گزارش شده از باکتری *P. polymyxa*-HY96-2 دارد و ب) هم‌ترازی اسیدآمینه‌ای ژن *aiiA* جدایه‌ی Gs با توالی همان ژن از باکتری *P. polymyxa*-HY96-2 با استفاده از سایت MultAlin. این هم‌ترازی نشان می‌دهد که اسیدآمینه‌ای که ژن *aiiA* را در جدایه‌ی Gs کد می‌کند شباهت بالایی به توالی گزارش شده از باکتری *P. polymyxa*-HY96-2 دارد

Figure 8. A) Nucleotide alignment of the *aiiA* gene from isolate Gs with the corresponding gene sequence from *P. polymyxa*-HY96-2 using the MultAlin tool. This alignment shows that the *aiiA* gene in isolate Gs has a high similarity to the reported sequence from *P. polymyxa*-HY96-2 and B) Amino acid alignment of the *aiiA* gene product from isolate Gs with the corresponding protein sequence from *P. polymyxa*-HY96-2 using the MultAlin tool. This alignment indicates that the amino acid sequence encoded by the *aiiA* gene in isolate Gs is highly similar to the reported sequence from *P. polymyxa*-HY96-2

پس از پیش‌بینی توالی اسیدآمینه‌ای ژن مذکور، تحلیل این توالی با استفاده از ابزار Motif Search و پایگاه داده Pfam نشان داد که پروتئین رمزگذاری‌شده توسط ژن *aiiA* در جدایه‌ی Gs دارای یک دامنه عملکردی متعلق به خانواده β-Lactamase است (شکل ۹). این دامنه یکی از ویژگی‌های شناخته‌شده‌ی پروتئین‌های دارای فعالیت آنزیمی لاکتوناز به‌شمار می‌رود که توان بالقوه در شکستن پیوندهای لاکتونی موجود در مولکول‌های سیگنال QS ، از جمله AHLs، را دارا می‌باشند. شناسایی این دامنه ساختاری در پروتئین مذکور می‌تواند مؤید نقش آن به‌عنوان یک آنزیم لاکتوناز و توانایی آن در مهار سامانه‌های سیگنال‌دهی بین باکتریایی باشد.

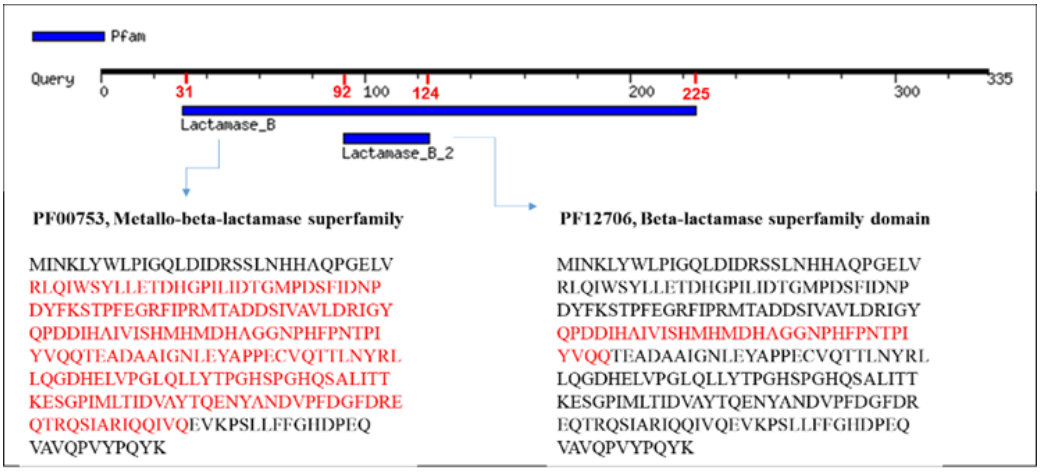


شکل ۹. تحلیل موتیف پروتئین مربوط به ژن *aiiA* جدایه‌ی Gs با ابزار Motif Search پیش‌بینی و با استفاده از پایگاه داده .Pfam توالی اسیدآمینه‌ای دارای یک دامنه متعلق به خانواده β-Lactamase است که مربوط به فعالیت آنزیمی-β لاکتامازها می‌باشد

Figure 9. Motif analysis of the *aiiA* protein from isolate Gs using the Motif Search tool and the Pfam database. The amino acid sequence contains a domain belonging to the β-Lactamase family, which is associated with the enzymatic activity of β-lactamases

نتایج بررسی ساختار سه بعدی پیشنهادی مربوط به پروتئین ژن *aiiA* با استفاده از ابزار Expasy - SIB Swiss Institute of Bioinformatics به روش SWISS MODEL نشان داد که محصول این ژن، لاکتونازی با خاصیت QQ متعلق به *P. polymyxa* است. مدل پیش‌بینی‌شده (Model 01) دامنه کامل پروتئین (۱ تا ۲۵۱ اسیدآمینه) را پوشش می‌دهد، با ۰/۹۷= GMQE، شباهت توالی ۹۴/۸۲ درصد و هم‌پوشانی کامل (۱۰۰درصد) با قالب مرجع است .همچنین،محل اتصال Zn^{2+} در مدل منتقل شده و محل اتصال آن در ساختار (Model 02) مشاهده و بررسی شده است، که اهمیت بیولوژیکی این لاکتوناز را برجسته می‌کند (شکل ۱۰). نتایج بررسی ساختار سه بعدی پیشنهادی مربوط به پروتئین ژن *aiiA* با استفاده از ابزار Expasy - SIB Swiss Institute of Bioinformatics به روش SWISS MODEL نشان داد که محصول این ژن، لاکتونازی با خاصیت QQ متعلق به *P. polymyxa* است. مدل پیش‌بینی‌شده (Model 01) دامنه کامل پروتئین (۱ تا ۲۵۱ اسیدآمینه) را پوشش

می‌دهد، با GMQE =۰.۹۷، شباهت توالی ۹۴٫۸۲ درصد و هم‌پوشانی کامل (۱۰۰درصد) با قالب مرجع است .همچنین،محل اتصال Zn^{2+} در مدل منتقل شده و محل اتصال آن در ساختار (Model 02) مشاهده و بررسی شده است، که اهمیت بیولوژیکی این لاکتوناز را برجسته می‌کند (شکل ۱۱).



شکل ۱۰. تحلیل موتیف پروتئین مربوط به ژن *aiiA* جدایه‌ی Gs با ابزار Motif Search پیش‌بینی و با استفاده از پایگاه دادهPfam. توالی اسیدآمینه‌ای دارای یک دامنه متعلق به خانواده β-Lactamase است که مربوط به فعالیت آنزیمی β-Lactamase می‌باشد

Figure 10. Motif analysis of the *aiiA* protein from isolate Gs using the Motif Search tool and the Pfam database. The amino acid sequence contains a domain belonging to the β-Lactamase family, which is associated with the enzymatic activity of β-lactamases

نتیجه‌گیری: در این پژوهش آغازگرهای ویژه برای ژن *aiiA* طراحی شده و با استفاده از PCR همسانه سازی و توالی‌یابی کامل این ژن از سویه Gs انجام گرفت. یافته‌های این تحقیق نشان می‌دهد که ژن *aiiA* از سویه بومی *Paenibacillus polymyxa*(سویه Gs) به‌طور دقیق شناسایی شده است. صحت فرآیند همسانه‌سازی ما با همخوانی بالای دنباله توالی Gs با ژن‌های شناخته‌شده *aiiA* از سایر سویه‌ها تأیید می‌شود؛ برای نمونه، توالی نوکلئوتیدی *aiiA* سویه *P. polymyxa*-HY96-2 و *P. polymyxa*-CF05 نیز بیش از ۹۹ درصد با Gs همپوشانی دارد. همچنین آنالیز فیلوژنتیک ژن *aiiA* نشان می‌دهد که توالی Gsدر کنار لاکتونازهای گونه‌های مختلف *Paenibacillus* قرار می‌گیرد. در کل، این داده‌ها نشان می‌دهند که ژن *aiiA* جدایه Gsبه درستی شناسایی شده و ساختار آن مشابه آنزیم‌های کشف‌شده قبلی است (Lei et al., 2015; Luo et al., 2018).

(A)الف

(B)ب

شکل ۱۱. الف) ساختار سه‌بعدی پیش‌بینی‌شده پروتئین ژن *aiiA* از ایزوله Gs با استفاده از ابزار - Expasy SIB Swiss Institute of Bioinformatics به روش SWISS-MODEL از جهات مختلف ب)مدل‌های مورد استفاده برای پیش‌بینی ساختار پروتئین مورد نظر بر پایه قالب E3E7J1.1.A از پایگاه AlphaFold DB ساخته شده است؛ پروتئین مربوطه یک لاکتوناز با خاصیت QQ متعلق به *P. polymyxa* می‌باشد. مدل پیش‌بینی‌شده (Model 01) دامنه کامل پروتئین (۱ تا ۲۵۱ اسیدآمینه) را پوشش می‌دهد، با GMQE=۰/۹۷، شباهت توالی ۹۴/۸۲ درصد و هم‌پوشانی کامل (۱۰۰درصد) با قالب مرجع است. وجود محل اتصال فلز Zn^{2+} نیز در مدل دو قابل مشاهده است

Figure 11. A) Predicted three-dimensional structure of the *aiiA* gene product from isolate Gs, generated using the Expasy - SIB Swiss Institute of Bioinformatics tool via the SWISS-MODEL approach, shown from different perspectives. B) The models used for protein structure prediction were based on the E3E7J1.1.A template from the AlphaFold DB database. The corresponding protein is a quorum-quenching (QQ) lactonase belonging to *P. polymyxa*. The predicted model (Model 01) covers the full length of the protein (1–251 amino acids), with a GMQE score of 0.97, sequence identity of 94.82%, and 100% structural coverage with the reference template. The Zn^{2+} metal-binding site is also visible in the model

زنجیره اسیدآمینه‌ای ژن، موتیف‌های محافظت‌شده متالو-β-لاکتاماز با الگوی «HxHxDH» را حفظ کرده که در لاکتونازهای *aiiA* شناخته‌شده دیده شده است و اتصال یون‌های فلزی (Zn^{2+}) نقش کلیدی در فعالیت آنزیمی دارد. این موتیف مطابق الگوی گزارش‌شده در باکتری‌هایی از جمله *B. subtilis* و *B. thuringiensis* و *B. cereus* است (Badarau and Page, 2006; Momb et al., 2008; Na et al., 2019; Anandan and Vittal, 2019). پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی و بررسی موتیف نشان می‌دهد که آنزیم Gs نیز ساختاری متالوآنزیمی با محل اتصال یون روی دارد که در تمام لاکتونازهای مشابه کاملاً حفظ شده است. از نظر کارکرد، آنزیم لاکتوناز توانایی هیدرولیز طیف وسیعی از مولکول‌های AHL را دارد و بر این اساس عملکرد QQ مؤثری از خود نشان می‌دهد (Pan et al., 2008). عملکرد آنتاگونیستی این آنزیم در جدایه Gs نیز مطابق گزارش‌های قبلی قابل انتظار است؛ برای مثال، آنزیم *aiiA* استخراج شده از *B. cereus* فعالیت پکتینازی *P. carotovorum* را به‌شدت کاهش داده است (Kachhadia et al., 2022). با تلقیح همزمان باکتری *P. carotovora* با سویه نوترکیب *E. coli* حاوی ژن *aiiA* با سطح بیان بالا، میزان تولید AHL و علائم پوسیدگی حاصل از *P. carotovora* کاهش می‌یابد (Lee et al., 2002). مدل ترنس‌ژنیک *E. amylovora* که ژن *aiiA* باکتری *Bacillus* sp. A24 در آن بیان می‌شود، تولید پلی‌ساکاریدهای خارجی، تحمل به پراکسید هیدروژن و شدت علائم بیماری روی برگ سیب به‌طور چشمگیری کاهش یافته است (Molina et al., 2005). به همین ترتیب این آنزیم با هیدرولیز حلقه لاکتون AHL، کنترل بیماری‌های تحت تنظیم سیستم QS تسهیل می‌شود. با توجه به نتایج روشن، سویه Gs و آنزیم *aiiA* آن می‌تواند به‌عنوان عامل بیوکنترل علیه پاتوژن‌های گیاهی عمل کند. نهایتاً، یافته‌های این مطالعه چشم‌اندازی کاربردی در کنترل بیماری‌های باکتریایی گرم منفی دارد. نشان داده شده است که بیان ژن *aiiA* در گیاهان تراریخته می‌تواند مقاومت آن‌ها را در برابر بیماری‌های باکتریایی مبتنی بر QS بهبود بخشد (Dong et al., 2001; Ouyang & Li, 2016). بر این اساس، مطالعه حاضر می‌تواند به‌عنوان زیرساختی علمی برای کاربرد عملی این ژن در بیوتکنولوژی کشاورزی مورد استفاده قرار گیرد؛ به‌طور مثال برای ساخت گیاهان مقاوم به بیماری یا توسعه سویه‌های کنترل بیولوژیک جدید. علاوه بر این، *P. polymyxa* به‌عنوان یک عامل رشد دهنده گیاهی و Biopesticide مهم شناخته شده است، بنابراین سویه Gs قابلیت توسعه به عنوان باکتری سودمند در کشاورزی را داراست. از طرفی به‌طور کلی، شواهد مولکولی و بیوآنزیمی حاصل، پایداری و صحت نتایج را تقویت کرده و اهمیت بیولوژیکی *aiiA* در این جدایه جدید را تأیید می‌کنند. مزیت‌های روش‌شناسی و شباهت یافته‌ها به مطالعات پیشین نشانه‌ی اعتبار بالای داده‌های این تحقیق است.

سپاسگزاری: از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به خاطر حمایت مالی در اجرای پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

منابع

محمودی اسماعیل، جعفری صمد (۲۰۱۸) تأثیر بیان ژن *aiiA* بر تحرک و آنزیم‌های بیماری‌زایی باکتری *Pectobacterium carotovorum*عامل پوسیدگی نرم باکتریایی. کنترل بیولوژیک آفات و بیماری های گیاهی ۷، ۹۳-۱۰۳. https://doi.org/10.22059/jbioc.2019.276448.261

References

Akbari Kiarood, S. L., Rahnama, K., Golmohammadi, M., & Nasrollanejad, S. (2020). Quorum-quenching endophytic bacteria inhibit disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* in Citrus cultivars. *Journal of Basic Microbiology, 60*(9), 746-757. https://doi.org/10.1002/jobm.202000038

Anandan, K., & Vittal, R. R. (2019). Quorum quenching activity of AiiA lactonase (KMMI17) from endophytic *Bacillus thuringiensis* KMCL07 on AHL-mediated pathogenic phenotype in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbial Pathogenesis, 132*, 230-242. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.05.015

Ayyappan, S. V., & Bhaskaran, K. (2022). Extracellular lactonase-mediated quorum quenching by a novel *Bacillus velezensis*. *FEMS Microbiology Letters, 369*(1). https://doi.org/10.1093/femsle/fnac095

Badarau, A., & Page, M. I. (2006). The variation of catalytic efficiency of *Bacillus cereus* metallo-β-lactamase with different active site metal ions. *Biochemistry, 45*(35), 10654-10666. https://doi.org/10.1021/bi0609341

Baltenneck, J., Reverchon, S., & Hommais, F. (2021). Quorum sensing regulation in phytopathogenic bacteria. *Microorganisms, 9*(2). https://doi.org/10.3390/microorganisms9020239

Bergonzi, C., Schwab, M., Naik, T., Daudé, D., Chabrière, E., & Elias, M. (2018). Structural and biochemical characterization of AaL, a quorum quenching lactonase with unusual kinetic properties. *Scientific Reports, 8*(1), 11262. https://doi.org/10.1038/s41598-018-28988-5

Chen, J., Liu, X., Min, Y., & Yang, Z. (2018). Construction of gene engineering bacteria of *Paenibacillus polymyxa* NR1 and functional analysis for aiiA gene expression. *Chinese Journal of Biological Control, 34*(3), 398. https://doi.org/10.16409/j.cnki.2095-039x

Churchill, M. E. A., & Chen, L. (2011). Structural basis of acyl-homoserine lactone-dependent signaling. *Chemical Reviews, 111*(1), 68-85. https://doi.org/10.1021/cr1000817

Dong, Y. H., Wang, L. H., Xu, J. L., Zhang, H. B., Zhang, X. F., & Zhang, L. H. (2001). Quenching quorum-sensing-dependent bacterial infection by an N-acyl homoserine lactonase. *Nature, 411*(6839), 813-817. https://doi.org/10.1038/35081101

Dong, Y. H., Xu, J. L., Li, X. Z., & Zhang, L. H. (2000). AiiA, an enzyme that inactivates the acyl-homoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97*(7), 3526-3531. https://doi.org/10.1073/pnas.97.7.3526

Dong, Y.-H., Gusti, A. R., Zhang, Q., Xu, J.-L., & Zhang, L.-H. (2002). Identification of quorum-quenching N-acyl homoserine lactonases from *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology, 68*(4), 1754-1759. https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1754-1759.2002

Eberl, L. (1999). N-acyl homoserine-lactone-mediated gene regulation in gram-negative bacteria. *Systematic and Applied Microbiology, 22*(4), 493-506. https://doi.org/10.1016/S0723-2020(99)80001-0

Fuqua, C., & Greenberg, E. P. (1998). Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Current Opinion in Microbiology, 1*(2), 183-189. https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80009-X

Garge, S. S., & Nerurkar, A. S. (2016). Attenuation of quorum sensing regulated virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* through an AHL lactonase produced by *Lysinibacillus* sp. Gs50. *PLOS ONE, 11*(12), e0167344. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167344

Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z.-C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories, 15*(1), 203. https://doi.org/10.1186/S12934-016-0603-7

Helman, Y., & Chernin, L. (2015). Silencing the mob: disrupting quorum sensing as a means to fight plant disease. *Molecular Plant Pathology, 16*(3), 316-329. https://doi.org/10.1111/MPP.12180

Kachhadia, R., Kapadia, C., Datta, R., Jajda, H., Danish, S., & Glick, B. R. (2022). Cloning and characterization of AiiA, an acyl-homoserine lactonase from *Bacillus cereus* RC1 to control soft rot causing pathogen *Lelliottia amnigena* RCE. *Archives of Microbiology, 204*(11), 665. https://doi.org/10.1007/S00203-022-03271-4

Langendries, S., & Goormachtig, S. (2021). *Paenibacillus polymyxa*, a Jack of all trades. *Environmental Microbiology, 23*(10), 5659-5669. https://doi.org/10.1111/1462-2920.15450

Leadbetter, J. R., & Greenberg, E. P. (2000). Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *Journal of Bacteriology, 182*(24), 6921-6926. https://doi.org/10.1128/JB.182.24.6921-6926.2000

Lee, S. J., Park, S.-Y., Lee, J.-J., Yum, D.-Y., Koo, B.-T., & Lee, J.-K. (2002). Genes encoding the N-acyl homoserine lacton-degrading enzyme are widespread in many subspecies of *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology, 68*(8), 3919-3924. https://doi.org/10.1128/AEM.68.8.3919-3924.2002

Lei, M., Lu, P., Jin, L., Wang, Y., Qin, J., Xu, X., Zhang, L., & Wang, Y. (2015). Complete genome sequence of *Paenibacillus polymyxa* CF05, a strain of plant growth-promoting rhizobacterium with elicitation of induced systemic resistance. *Genome Announcements, 3*(2). https://doi.org/10.1128/genomeA.00198-15

Luo, Y., Cheng, Y., Yi, J., Zhang, Z., Luo, Q., Zhang, D., & Li, Y. (2018). Complete genome sequence of industrial biocontrol strain *Paenibacillus polymyxa* HY96-2 and further analysis of its biocontrol mechanism. *Frontiers in Microbiology, 9*, 1520. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01520

Mahmoudi, E., Jafari, S. (2018). The effect of *aiiA* gene on the motility and enzymatic properties of *Pectobacterium carotovorum*, the causal agent of bacterial soft rot. *Journal of Biological control of pests and plant diseases, 7,* 93-103. https://doi.org/10.22059/jbioc.2019.276448.261. (In Persian)

Martinez, J. L., Fajardo, A., Garmendia, L., Hernandez, A., Linares, J. F., Martínez-Solano, L., & Sánchez, M. B. (2009). A global view of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews, 33*(1), 44-65. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00142.x

Molina, L., Rezzonico, F., Défago, G., & Duffy, B. (2005). Autoinduction in *Erwinia amylovora*: evidence of an acyl-homoserine lactone signal in the fire blight pathogen. *Journal of Bacteriology, 187*(9), 3206-3213. https://doi.org/10.1128/JB.187.9.3206-3213.2005

Momb, J., Wang, C., Liu, D., Thomas, P. W., Petsko, G. A., Guo, H., Ringe, D., & Fast, W. (2008). Mechanism of the quorum-quenching lactonase (AiiA) from *Bacillus thuringiensis*. 2. Substrate modeling and active site mutations. *Biochemistry, 47*(29), 7715-7725. https://doi.org/10.1021/bi8003704

Na, H., Namgung, B., Song, W. S., & Yoon, S. (2019). Structural and biochemical analyses of the metallo-β-lactamase fold protein YhfI from *Bacillus subtilis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 519*(1), 35-40. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.106

Nealson, K. H., Platt, T., & Hastings, J. W. (1970). Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *Journal of Bacteriology, 104*(1), 313-322. https://doi.org/10.1128/JB.104.1.313-322.1970

Ouyang, L. J., & Li, L. M. (2016). Effects of an inducible aiiA gene on disease resistance in *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis*. *Transgenic Research, 25*(4), 441-452. https://doi.org/10.1007/S11248-016-9940-X

Pan, J., Huang, T., Yao, F., Huang, Z., Powell, C. A., Qiu, S., & Guan, X. (2008). Expression and characterization of aiiA gene from *Bacillus subtilis* BS-1. *Microbiological Research, 163*(6), 711-716. https://doi.org/10.1016/j.micres.2007.12.002

Papenfort, K., & Bassler, B. L. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology, 14*(9), 576-588. https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.89

Rasmussen, T. B., & Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology, 296*(2-3), 149-161. https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2006.02.005

Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria* (3rd ed.). American Phytopathological Society.

Sifri, C. D. (2008). Healthcare epidemiology: quorum sensing: bacteria talk sense. *Clinical Infectious Diseases, 47*(8), 1070-1076. https://doi.org/10.1086/592072

Sundin, G. W., Castiblanco, L. F., Yuan, X., Zeng, Q., & Yang, C.-H. (2016). Bacterial disease management: challenges, experience, innovation and future prospects: Challenges in bacterial molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology, 17*(9), 1506-1518. https://doi.org/10.1111/MPP.12436

Ulrich, R. L. (2004). Quorum quenching: enzymatic disruption of N-acyl-homoserine lactone-mediated bacterial communication in *Burkholderia thailandensis*. *Applied and Environmental Microbiology, 70*(10), 6173-6180. https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.6173-6180.2004

Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., & Whitman, W. B. (2011). *Bergey's manual of systematic bacteriology: Volume 3: The Firmicutes* (Vol. 3). Springer Science & Business Media. https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5

Wilson, K. (2001). Preparation of genomic DNA from bacteria. *Current Protocols in Molecular Biology, 56*(1), 2-4. https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0204s56

Zhu, C.-G., Sun, M., & Yu, Z.-N. (2003). Expression of gene aiiA carrying the promoter of gene cry3Aa in *Bacillus thuringiensis*. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao = Chinese Journal of Biotechnology, 19*(4), 397-401. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15969053/