



Study Flagellum and *fliC* of the Causative Bacterial Agent of Saffron Corm Rot Disease *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, A Strategy in the Identification and Prevention of Disease Spread

Mohammad Ramezani Kaporchali¹, Mohammad Reza Safarnezhad², Abolghasem Ghasemi³ and Naser Farrokhi^{4*}

Article type:

Research Article

Article history:

Submitted: 15 May 2022

Revised: 11 August 2022

Accepted: 18 September 2022

Available Online: 18 October 2022

How to cite this article:

Ramezani Kaporchali, M., Safarnezhad, M.R., Ghasemi, A., Farrokhi, N. 2022. Study Flagellum and *fliC* of the Causative Bacterial Agent of Saffron Corm Rot Disease *Burkholderia gladioli* pv. *gladioli*, A Strategy in the Identification and Prevention of Disease Spread. *Saffron Agronomy & Technology*, 10(3): 261-270.

DOI: 10.22048/jsat.2022.342484.1461

Abstract

Burkholderia gladioli pv. *gladioli* (*Bgg*) is the causative agent of saffron bacterial rot. Accurate identification methods will play an important role in disease control management. Flagellum is the main commodity of the bacteria that facilitates its movement. Furthermore, it is of particular importance in colonization and pathogenicity. The *fliC* gene is one among five other genes encoding flagellin. In this study, the flagellin genes of 11 bacterial species were selected, and the phylogenetic tree analysis divided them into plant and animal bacteria groups. Electron microscope images were taken from the bacterial flagella and its length was up to nine microns with 400-600 nm in diameter; as observed in both Lophotrichous and Monotrichous forms. *fliC* was amplified and analyzed for the first time by polymerase chain reaction for the two isolates of a bacterial pathogen of saffron. Specific primers were designed and used to separate *Bgg* from other bacteria and helped in distinguishing the infected saffron corms from the healthy ones. Electron microscopy of the flagellum was illustrative of different types of *Bgg*. Investigating and studying the *fliC* gene can be useful in the diagnosis of the causative agent of saffron corm rot disease.

Keywords: *Burkholderia gladioli*, Electron microscopy, flagella, flagellin, phylogenetic tree

1 –Graduate Student in Agricultural Biotechnology, Department of Plant Biology & Biotechnology, Faculty of Life Sciences and Bioechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

2 –Associate Professor, Agricultural Education and Extension Research Organization, Iranian Plant Protection Research Institute, Tehran, Iran

3 –Assistant Professor, Agricultural Education and Extension Research Organization, Iranian Plant Protection Research Institute, Tehran, Iran

4– Associate Professor, Department of Cell & Molecular Biology, Faculty of Life Sciences and Biotechnology, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran

Corresponding author: n_farrokhi@sbu.ac.ir





مقاله پژوهشی

مطالعه تاژک و ژن *fliC* باکتری عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران *Burkholderia gladioli pv. gladioli* *pv. gladioli*، راهبردی در شناسایی باکتری و پیشگیری از گسترش بیماری

محمد رمضانی کپورچالی^۱، محمدرضا صفرنژاد^۲، ابولقاسم قاسمی^۳ و ناصر فرخی^{۴*}

تاریخ دریافت: ۲۵ اردیبهشت ۱۴۰۱

تاریخ بازنگری: ۲۰ مرداد ۱۴۰۱

تاریخ پذیرش: ۲۷ شهریور ۱۴۰۱

رمضانی کپورچالی، م.، صفرنژاد، م.ر.، قاسمی، ا.، و فرخی، ن. ۱۴۰۱. مطالعه تاژک و ژن *fliC* باکتری عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران *Burkholderia gladioli pv. gladioli*، راهبردی در شناسایی باکتری و پیشگیری از گسترش بیماری. زراعت و فناوری زعفران، ۱۰(۳): ۲۶۱-۲۷۰.

چکیده

باکتری *Burkholderia gladioli pv. gladioli* (*Bgg*) عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران از بیماری‌های شایع این گیاه است. روش‌های شناسایی دقیق نقش مهمی در مدیریت کنترل بیماری خواهند داشت. تاژک، وسیله اصلی حرکت در باکتری‌ها است و از اهمیت خاصی در کلونیزاسیون، استقرار و بیماری‌زایی برخوردار است. ژن *fliC* یکی از پنج ژن کدکننده فلاژلین می‌باشد. در این مطالعه، ژن‌های فلاژلین یازده گونه باکتریایی انتخاب شدند که با آنالیز فیلوژنتیکی در گروه‌های باکتری‌های گیاهی و جانوری جای گرفتند. تصاویر میکروسکوپی الکترونی از تاژک طول آن را حداکثر ۹ میکرون با قطری معادل ۶۰۰-۴۰۰ نانومتر به دو شکل لوفوتریش و مونوتریش نشان داد. ژن *fliC* برای اولین بار به کمک PCR در دو جدایه باکتری جدا شده از گیاه زعفران تکثیر و مورد بررسی قرار گرفت. پرایمرهای اختصاصی طراحی شده بطور مؤثری توانستند این باکتری را از سایر گونه‌های دیگر تفکیک نمایند و به سرعت بنه‌های آلوده‌ی زعفران را از بنه‌های سالم تشخیص دهند. با استفاده از تصاویر میکروسکوپی الکترونی، تاژک از منظر نوع آرایش در دو جدایه باکتری جدا شده از گیاه زعفران مورد بررسی قرار گرفت. بررسی و مطالعه ژن *fliC* می‌تواند در تشخیص عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران مفید واقع شود.

کلمات کلیدی: بورخولدريا گلا دیولی، تاژک، درخت فیلوژنتیکی، فلاژلین، میکروسکوپی الکترونی.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی، گروه علوم و فناوری زیستی گیاهی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- دانشیار سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران

۳- استادیار سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران

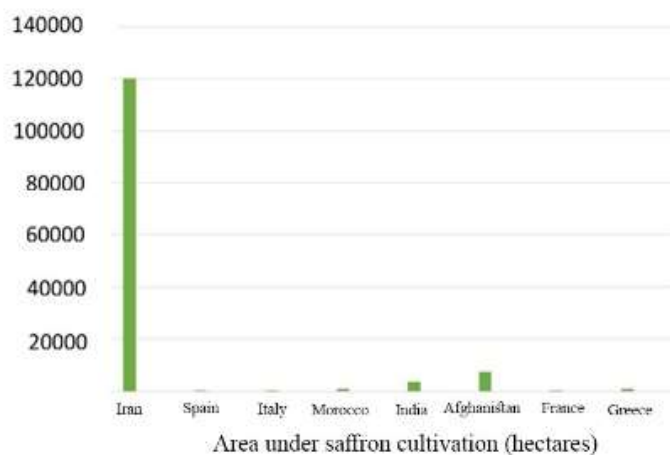
۴- دانشیار گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم و فناوری زیستی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

(* نویسنده مسئول: n_farrokhi@sbu.ac.ir)

مقدمه

عملکرد و کاهش تعداد ساقه‌ی گل‌دهنده، پیشگیری از گسترش عوامل بیماری‌زا می‌باشد. از بیماری‌های مهم زعفران، پوسیدگی باکتریایی بنه (با نام‌های پوسیدگی خشک/ قهوه‌ای/ ریشه بنفش/ مسی/ پایه، یا سوختگی و زردی) است که ممکن است اگر به هنگام شناسایی و مدیریت نگردد به بحرانی جدی در آینده‌ی نزدیک بدل شود (Sua' rez-Moreno et al., 2012).

زعفران *Crocus sativus*، دارای خواص کم نظیر درمانی و شادی‌آور است که اغلب به صورت ادویه مورد استفاده قرار می‌گیرد. ایران رتبه اول در تولید زعفران با سهم تولید تقریبی ۹۰ درصدی از بازار جهانی است (شکل ۱). با توجه به اهمیت این محصول، یکی از راهکارهای عملی برای جلوگیری از افت



شکل ۱- سطح زیر کشت زعفران در کشورهای بزرگ تولید کننده

Figure 1- Area under saffron cultivation in large producing countries (Gupta et al., 2021).

شناسایی عوامل بیماری‌زا مفید بوده است. تاژک باکتری در استقرار (کلونیزاسیون) و بیماری‌زایی آن بسیار اهمیت دارد. ژن *fliC* از مجموع پنج ژن کد کننده فلاژلین است که نقش اصلی در حرکت باکتری و استقرار آن دارد و از نظر ایمنی بخشی (القای ایمنی در سلول‌های میزبان) نیز مورد توجه است (Ham et al., 2011).

تاژک‌ها، رشته‌های مارپیچی به طول چند میکرون هستند که با حرکت دورانی بر گرفته از انرژی حاصل از هیدرولیز آدونوزین تری فسفات در حرکت باکتری مؤثر هستند، علاوه بر این تاژک‌ها عامل انگیزش سیستم ایمنی گیاه از طریق اپی‌توپ‌هایی

پوسیدگی بنه توسط باکتری *Burkholderia gladioli* ایجاد می‌شود. این باکتری می‌تواند از طریق بنه‌های آلوده به سایر نقاط دنیا منتقل شود و نام ایران را در بازارهای جهانی خدشه دار سازد. جنس *Burkholderia* طیف وسیعی از گونه‌ها را شامل می‌شود و می‌تواند عامل بیماری‌زای انسانی، حیوانی و گیاهی، گونه‌های فرصت‌طلب و همزیست‌های تثبیت‌کننده ازت باشد. بررسی‌های فیلوژنتیک مولکولی، قدرت جداسازی همزیست‌های حقیقی از عوامل بیماری‌زا و فرصت‌طلب بورخولدریا را دارد (Sua' rez-Moreno et al., 2012). نشانگرهای مولکولی DNA در تشخیص و

استان خراسان رضوی بدست آمد. جدایه‌های *Bgg* در موسسه‌ی گیاهپزشکی کل کشور از بنه‌های آلوده گیاه زعفران جدا شد و روی محیط کشت LB جامد (پپتون ۱۰، عصاره‌ی مخمر ۵، سدیم کلرید ۱۰ و آگار ۱۵ گرم در لیتر) رشد و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت تکثیر شد و تک پرگنه (کلون) جدا سازی شد. دو جدایه (جدایه‌های ۱۵ و ۱۶) به شدت بیماری‌زا از نمونه‌های آلوده‌ی زعفران جداسازی شدند.

شناسایی باکتری با استفاده از میکروسکوپ الکترونی SEM و TEM

محیط کشت مایع (۱۰۰ میکرولیتر) حاوی باکتری به مدت ۱۶ ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس روی فویل آلومینیومی استریل ریخته و کاملاً خشک شد. فویل به مدت ۲۴ ساعت در محلول گلو تار آلدهید دو درصد قرار گرفت. برای آگیری نمونه به ترتیب فویل در الکل‌های ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درصد قرار داده شد و بلافاصله نمونه‌ها مورد تصویربرداری قرار گرفت (Grossart et al., 2000).

طراحی آغازگرهای اختصاصی برای ژن فلاژلین باکتری *Bgg*

برای طراحی آغازگر، ابتدا تمام توالی‌های نوکلئوتیدی فلاژلین (NCBI) با استفاده از نرم افزار مگا ۷ به روش ClustalW هم‌ردیف شدند و مناطق حفاظت شده برای طراحی پرایمر شناسایی شد. در دو انتهای پرایمرهای اختصاصی ژن فلاژلین سایت‌های برشی (خط زیر سایت‌های برشی به ترتیب *XhoI* و *SaII* برای پرایمرهای پیشرو و پسرو) تعبیه شد. توالی پرایمر پیشرو 5

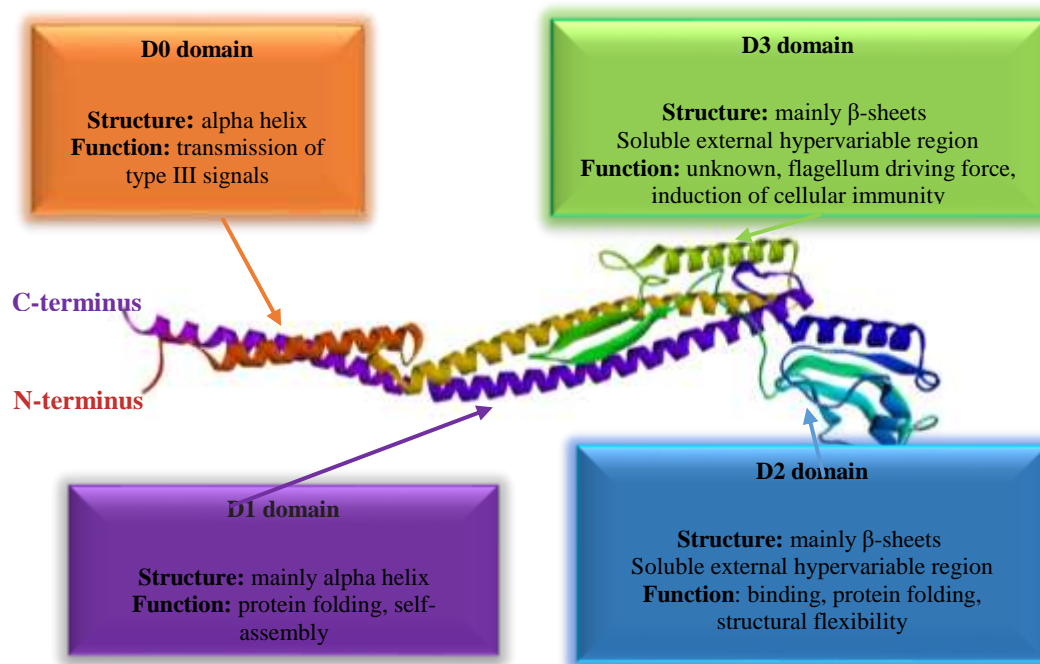
AGTCGACA ACTCGGAATCAATACCAAC
 3' و توالی پرایمر پسرو 5
 ACTCGAGCTGCAGGAGCTTCAGGAC 3'
 بود.

مانند *flg22* نیز هستند (Rossez et al., 2015). رشته تازک از هزاران مونومر پروتئینی فلاژلین تشکیل شده است که ساختار آن از یک هسته پلیمریزه محافظت شده و یک منطقه متغیر محلول تشکیل شده است که توسط سیستم ترش‌حی نوع III در سطح باکتری شکل می‌گیرند (Paradis et al., 2017). تازک‌ها علاوه بر نقش خود در تحرک، چسبندگی و تهاجم به سلول‌های اپی‌تلیال، در تشکیل بیوفیلم‌ها و القای پاسخ‌های التهابی در میزبان نیز نقش دارند (Arora et al., 2000). مولکول فلاژلین باکتریایی دارای چهار دامنه ساختاری به نام‌های D0، D1، D2 و D3 (شکل ۲) می‌باشد. منطقه متغیر پروتئین فلاژلین، دامین‌های D2 و D3، عناصر ساختاری را در تماس با محیط خارج سلولی تشکیل می‌دهند و باعث ایجاد اپی‌توپ‌های خاص سروتیبی می‌شوند (Beatson et al., 2006). این واقعیت باعث شده است که مناطق کدکننده‌ی فلاژلین‌ها به عنوان نشانگرهای فیلوژنتیک، به ویژه در تجزیه و تحلیل درون گونه‌ای انتخاب شوند (Overly, 2003).

در این مطالعه برای اولین بار با استفاده از ژن کدکننده فلاژلین (*fliC*) به عنوان یک نشانگر مولکولی، تشخیص بیماری پوسیدگی بنه زعفران بررسی شد و جدایی آن از سایر گونه‌های باکتری *Burkholderia* به شیوه‌ی فیلوژنتیکی صورت گرفت تا بتوان بنه‌های سالم را از آلوده جدا و مانع از گسترش بیماری به سایر نقاط دنیا شد. بررسی میکروسکوپی تازک باکتری در این جنس بیانگر تفاوت‌های آرایشی و ساختاری تازک در جدایه‌های مختلف این گونه بود که منجر به ثبت تصاویری جدید از این دو جدایه شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص سازی جدایه‌های باکتری
 نمونه‌های گیاهی از مزارع آلوده‌ی شهرستان تربت حیدریه



شکل ۲- بهترین مدل از ساختار سوم پروتئین فلاژلین که با استفاده از نرم افزار Chimera X و به روش α -Fold پیش بینی شده است. این پروتئین مونومر تازک باکتری *Bgg* عامل ایجاد بیماری پوسیدگی زعفران می باشد. هزاران پروتئین از این مونومر به یکدیگر متصل شده و تازک باکتری را تشکیل می دهند. در شکل ساختار و عملکرد دامین های اصلی پروتئین فلاژلین را مشاهده می کنید.

Figure 2- The best model of the third structure of flagellin protein, which is predicted using Chimera X software and α -Fold method. This monomeric protein is the flagellum of *Bgg* that causes saffron rot disease. Thousands of proteins from this monomer bind together to form bacterial flagella. You can see the structure and function of the main domains of the flagellin protein.

از دستگاه ژل داک و نور ماورای بنفش انجام شد.

در یافت توالی *fliC* در گونه های مختلف و رسم نمودار فیلوژنی

توالی های نوکلئوتیدی ژن فلاژلین در باکتری های *Bgg* (به طول ۱۱۵۲ نوکلئوتید با شماره دسترسی CP022213.1)، *B. mallei* (به طول ۱۱۶۴ نوکلئوتید با شماره دسترسی AF098793.1)، *B. glumae* (به طول ۱۱۵۲ نوکلئوتید با شماره دسترسی AB110834.1)، *B. pseudomallei* (به طول ۱۱۶۴ نوکلئوتید با شماره دسترسی U82287.1)، *B. thailandensis* (به طول ۱۱۴۹ نوکلئوتید با شماره دسترسی AF081500.1، Ngamdee et al., 2015)، *B. cenocepacia* (به طول ۱۱۵۲ نوکلئوتید با شماره دسترسی KC763156.1)، *Xanthomonas citri* pv. *Phaseoli1* (به

تکثیر ژن فلاژلین *Bgg* با واکنش زنجیره ای پلیمرز

باکتری لیز شده (۰/۱ میکرولیتر) برای واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجم ۸ میکرولیتر با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *fliC* (۰/۱ میکرولیتر از هر یک) و ۴ میکرولیتر مسترمیکس (تهیه شده از شرکت کالازیست) انجام شد. ترمو سایکلر با ۹۴ درجه سانتی گراد: ۱۰ دقیقه آغاز شد و به دنبال آن ۳۵ واکنش زنجیره ای پلیمرز (۹۴ درجه سانتی گراد: ۳۰ ثانیه، ۶۴ درجه سانتی گراد: ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد: ۸۰ ثانیه) انجام گرفت و پس از یک سیکل ۷۲ درجه سانتی گراد: ۱۰ دقیقه قطعه ی ۱۱۰۰ نوکلئوتیدی ژن *fliC* تکثیر شد. به منظور آشکار سازی توالی تکثیری از دستگاه الکتروفورز و ژل آگارز ۱ در صد استفاده شد. رنگ آمیزی ژل با استفاده از اتیدیوم بروماید ۱ میکروگرم در میکرولیتر انجام و عکس برداری از ژل با استفاده

طول ۵۸۵ نوکلئوتید با شماره دسترسی CP021001.1)، X. *citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans*2 (به طول ۵۸۵ نوکلئوتید با شماره دسترسی CP021018.1)، *Pseudomonas koreensis* به طول ۴۷۷ نوکلئوتید با شماره دسترسی CP027706.1 و *P. fluorescens* (به طول ۴۷۷ نوکلئوتید با شماره دسترسی CP000094.2) در قسمت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (http://www.pondr.com) داده و نتایج بدست آمده مورد بررسی قرار گرفت (Xue et al., 2010).

نتایج و بحث

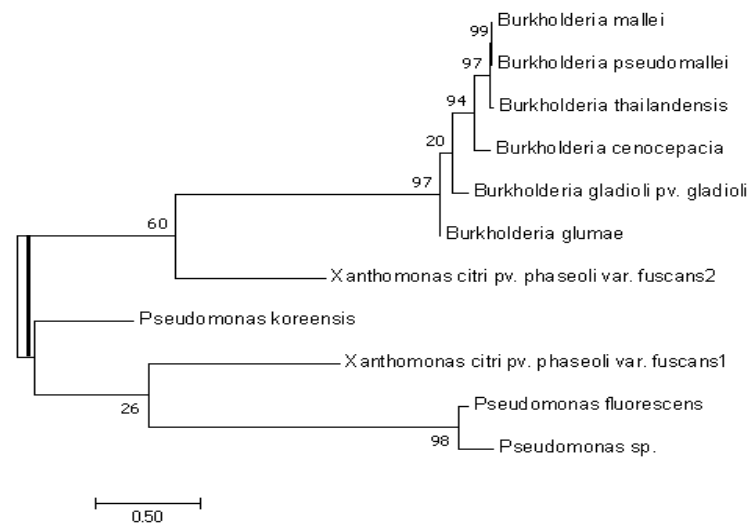
توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی (۳۸۴ اسید آمینه و نقطه ایزوالکتریک ۴/۷۶) *fliC* در *Bgg* از پایگاه داده NCBI بدست آمد. تعداد ۱۱ سویه مختلف باکتری انتخاب شدند و با استفاده از پایگاه NCBI، و ابزار BLASTp توالی کامل ژن *fliC* آنها بدست آمد و همردیف سازی این ژن‌ها و رسم درخت فیلوژنی انجام شد (شکل ۳). درخت فیلوژنی بر مبنای ژن *fliC* به خوبی توانست میزان خویشاوندی جنس‌ها و گونه‌های مختلف را بسنجد. این درخت دو شاخه اصلی دارد و بر اساس آن سویه‌های مختلف که در یک کلاد قرار دارند قابل مشاهده می‌باشند که به اصطلاح به آنها تاکسون‌های خواهری می‌گویند. با انجام زنجیره‌ای پلیمرز قطع‌ه حدود ۱۱۰۰ نوکلئوتیدی ژن *fliC* دو جدایه ۱۵ و ۱۶ تکثیر شد (شکل ۴). در حالی که در حالت کنترل منفی، باکتری *B. cenocepacia* و *P. fluorescens* هیچ باندی روی ژل مشاهده نشد. با توجه به نتایج بدست آمده از ژل الکتروفورز، آغازگرهای طراحی شده تنها بیمارگرهای (پاتوژن) گیاهی جنس *Burkholderia* را شناسایی کردند. با توجه به شباهت ژنتیکی بین جنس‌های بورخولدریا و سودوموناس، با استفاده از نشانگر مولکولی اختصاصی مبتنی بر ژن *fliC* می‌توان بین این دو جنس و همچنین درون جنس *Burkholderia* نیز تفکیک ایجاد کرد تا به شناسایی گونه‌های مختلف پرداخت. جدایی بیمارگرهای انسانی-حیوانی از بیمارگرهای گیاهی بر اساس آنالیز فیلوژنی روشن است (جدول ۱) باکتری‌های *Bgg* و *B. glumae* جزء بیمارگرهای گیاهی هستند که قرابت معناداری با هم داشته‌اند. جنس‌های *Burkholderia* به تازگی از جنس *Pseudomonas* جدا شده است و این دو جنس شباهت ساختاری، ژنتیکی، بیماری‌زایی و

طول ۵۸۵ نوکلئوتید با شماره دسترسی CP021001.1)، X. *citri* pv. *phaseoli* var. *fuscans*2 (به طول ۵۸۵ نوکلئوتید با شماره دسترسی CP021018.1)، *Pseudomonas koreensis* به طول ۴۷۷ نوکلئوتید با شماره دسترسی CP027706.1 و *P. fluorescens* (به طول ۴۷۷ نوکلئوتید با شماره دسترسی CP000094.2) در قسمت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) (http://www.pondr.com) داده و نتایج بدست آمده مورد بررسی قرار گرفت (Xue et al., 2010).

دریافت و حدود ۵۰۰ نوکلئوتید مشابه و مشترک از هر سویه انتخاب (Local multiple sequence alignment) و برای آنالیز فیلوژنی استفاده گردید. اطلاعات مربوط به خواص فیزیکی شیمیایی پروتئین فلاژلین در *Bgg* شامل تعداد اسیدآمینه، و اندازه تئوریک pI با استفاده از ابزار ProtParam (http://www.expasy.org/tools/protparref.html) محاسبه شدند. همردیف سازی چندگانه طول کامل پروتئین‌های فلاژلین مورد بررسی و سپس درخت فیلوژنی با استفاده از نرم افزار MEGA7 و حداکثر درست‌نمایی (MLE) رسم گردید. جهت بررسی و صحت تکرارپذیری درخت ترسیم شده، از آزمون بوت استرپ با ۱۰۰۰۰ تکرار استفاده شد.

پیش بینی ساختار سوم پروتئین فلاژلین

برای تعیین ساختار سوم پروتئین فلاژلین *Bgg* از مدل سازی همولوژیک استفاده شد. پیش بینی ساختار سوم پروتئین پس از دریافت توالی اول با فرمت FASTA از Uniprot با استفاده از نرم‌افزار کایمرا ایکس بر اساس آلفا فولد (مبتنی بر هوش مصنوعی و الگوریتم‌های ژنتیکی) انجام شد (Yang et al., 2006, Eswar et al., 2012). به منظور پیش بینی ساختار کلی پروتئین و مشخص نمودن مناطقی از پروتئین که دارای ساختار سوم منظم و یا نامنظم است توالی اسیدآمینه فلاژلین *Bgg* و *B. pseudomallei* به سایت PONDR



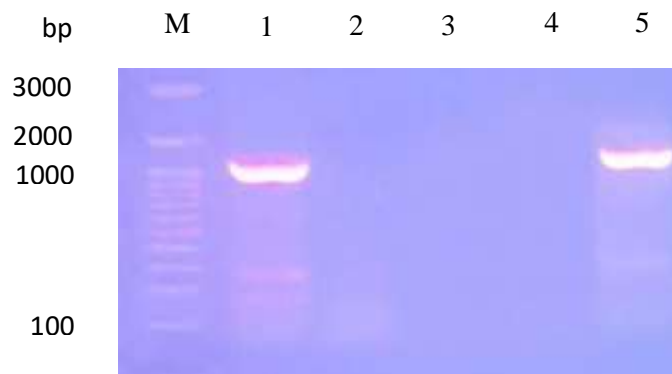
شکل ۳- درخت فیلوژنی ۱۱ سویه‌ی مختلف بر اساس توالی بخش مشترک از ژن فلاژلین ایجاد شده با روش حداکثر درست‌نمایی (MLE) در نرم افزار MEGA7.0

Figure 3- Phylogenetic tree of 11 different strains based on the sequence of the common part of the flagellin gene created by the maximum likelihood (MLE) method in MEGA7.0 software.

آمینواسیدها و محور Y، PONDNR Score می‌باشد. بخش‌هایی از پروتئین که دارای PONDNR Score بالای ۰/۵ است نشان دهنده مناطقی فاقد ساختار منظم است (شکل ۵). با استفاده از این آنالیز، تفاوت ساختاری ژن *fliC* بین دو گونه‌ی *gladioli* (بیمارگر گیاهی) و *pseudomallei* (بیمارگر انسانی-حیوانی) بررسی شد و با استفاده از نتایج بدست آمده از ponder روشی شد که ساختار سوم پروتئین *B. pseudomallei* و بیمارگر گیاهی *Bgg* بسیار به یکدیگر شباهت دارند و تولید آنتی‌بادی اختصاصی بر علیه پروتئین فلاژلین باکتری *Bgg* احتمالاً بتواند به عنوان نشانگر پروتئینی اختصاصی برای هر دو گونه عمل کند. بنابراین این مطالعه راه را برای آنالیزهای پزشکی و کشاورزی باز نمود تا در شناسایی و پیشگیری از عوامل بیماری‌زای انسانی و گیاهی که امنیت غذایی و سلامت انسان را به خطر می‌اندازند، اقدامات لازم صورت گیرد و کیت‌های تشخیص مولکولی دقیق بر مبنای ژن و پروتئین فلاژلین تولید شود.

مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارند (Yabuuchi et al., 1992); آنالیز فیلوژنی مبتنی بر ژن *fliC* در تفکیک این دو جنس قابل قبول ظاهر شد. در مطالعه‌ای که به مقایسه فیلوژنتیکی ژن *fliC* با ژن‌های rDNA در تفکیک گونه‌ها پرداخته بود، نتیجه‌گیری شد که ژن *fliC* دقت بیشتری در مطالعات فیلوژنی دارد (Borrayo et al., 2013). طبق این مطالعه، می‌توان با اطمینان بالا نتیجه‌گیری کرد که ژن فلاژلین در طبقه‌بندی بین گونه‌ای می‌تواند موفق ظاهر شود.

به منظور اهمیت این پروتئین در سویه‌های بیماریزا، در این مطالعه با بررسی مناطق منظم و نامنظم این دو گونه و پیش‌بینی ساختار سوم پروتئین فلاژلین در *Bgg* مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری در ویژگی‌های ساختاری این پروتئین بین بیمارگرهای انسانی و گیاهی جنس *Burkholderia* وجود ندارد. از اینرو مناطق فاقد ساختار منظم در دو گونه‌ی *Bgg* و *B. pseudomallei* با هم مقایسه شدند. محور X شماره



شکل ۴- تکثیر ژن فلاژلین جدایه‌های ۱۵ و ۱۶ از باکتری *Bgg* به ترتیب در چاهک‌های شماره‌ی ۱ و ۵ (به طول ۱۱۰۰ نوکلئوتید). چاهک M مارکر DNAbiotech ۱۰۰-۳۰۰۰ نوکلئوتیدی می‌باشد. چاهک ۲ باکتری *P. fluorescens* می‌باشد که باندی تکثیر نشده است. چاهک ۳ کنترل منفی واکنش می‌باشد. چاهک شماره‌ی ۴ باکتری *B. cenocepacia* می‌باشد که باندی تکثیر نشده است.

Figure 4- Amplification of the flagellin gene of isolates 15 and 16 of the *Bgg* bacterium in wells 1 and 5, respectively (length 1100 nucleotides). Well M marker DNAbiotech is 100-3000 nucleotides. Well 2 is a bacterium of *P. fluorescens* that is not amplified band. Well, 3 is a negative reaction control. Well, number 4 is the bacterium *B. cenocepacia*, which is not an amplified band.

محلول‌های تثبیت کننده، بیشتر باکتری‌هایی که تصویربرداری شدند تاژک خود را در حین آماده سازی از دست دادند. در شکل ۶ تصاویر تاژک جدایه‌های ۱۵ و ۱۶ باکتری *Bgg* قابل مشاهده می‌باشد. آرایش تاژک جدایه ۱۵ از نوع لوفوتریش (Lophotrichous) می‌باشد (پنل D شکل ۶). در این نوع آرایش، چندین تاژک در یک سمت باکتری قرار دارند. سویه ۱۶ دارای آرایش مونوتریش (Monotrichous) است (پنل‌های E و F شکل ۶).

در این نوع آرایش یک تاژک منفرد در یک سمت باکتری قرار دارد. با توجه به تفاوت آرایش تاژک در جدایه‌های مختلف می‌توان به این نتیجه رسید که تصاویر میکروسکوپ الکترونی می‌تواند در تفکیک دقیق جدایه‌های مختلف یک گونه رهنمون باشد.

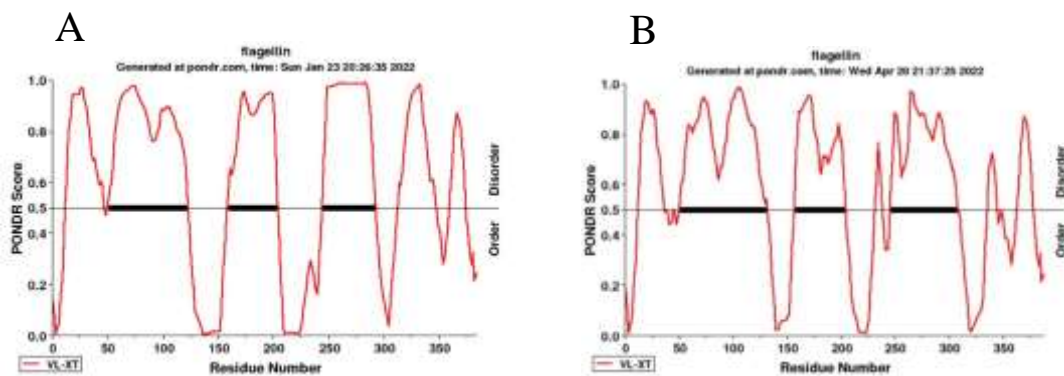
شناسایی تاژک و نوع آرایش آن به روش میکروسکوپی برای بهبود درک پدیده‌های سلولی مرتبط با زائده‌های سطحی، تصاویر جامع و واضحی از زائده‌های سطحی مورد نیاز است. این بررسی تنها متمرکز روی تاژک باکتری بورخولدریا گلادیولی بود و به سایر زائده‌های سطحی این باکتری پرداخته نشد. با استفاده از یک روش تغییر یافته برای فیکس کردن باکتری‌ها، تصویربرداری از تاژک این باکتری برای اولین بار در ایران صورت گرفت. براساس تصاویر میکروسکوپی SEM و TEM، طول تاژک این باکتری در حالت بالغ آن، ۳ برابر طول بدنه‌ی آن است (شکل ۶).

طول بدنه‌ی این باکتری بر اساس میزان تکامل آن متفاوت است، اما به طور معمول بین ۱ تا ۳ میکرون و قطر آن بین ۴۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر متغیر است. تمام باکتری‌های تصویربرداری شده دارای تاژک بودند، اما به دلیل حساسیت بالای تاژک به

جدول ۱- تفکیک بیماری‌گرهای گیاهی و انسانی-حیوانی

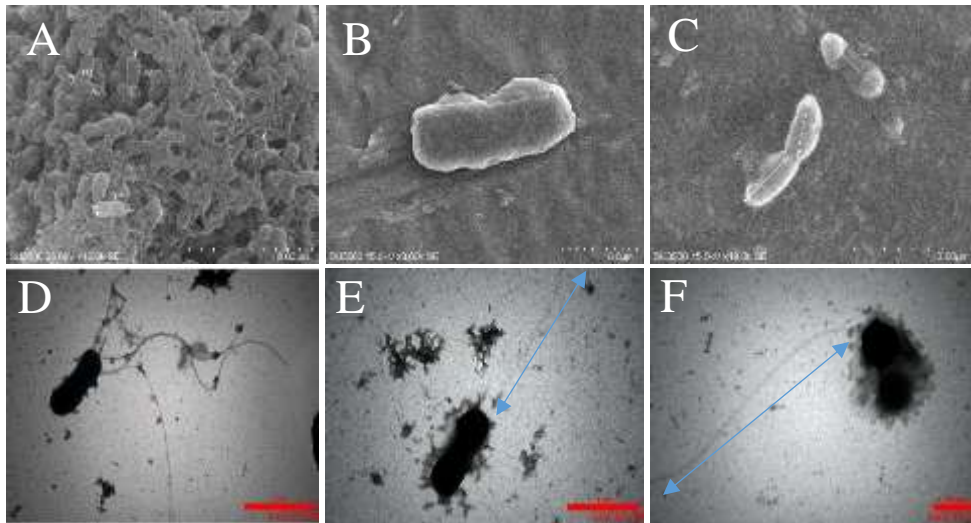
Table 1- Separation of plant and human-animal pathogens

نوع بیمارگر Kind of pathogen	نام بیمارگر Name of pathogen	نقش بیمارگر Role of pathogen
بیمارگر گیاهی Plant pathogen	<i>Burkholderia gladioli</i> pv. <i>Gladioli</i>	همزیست و گرم منفی، بیمارگر گیاه زعفران Symbiotic and Gram-negative pathogen of saffron plant
	<i>Burkholderia glumae</i>	خاکزی، بیمارگر گیاه برنج Terrestrial, rice plant pathogen
	<i>pseudomonas koreensis</i>	همزیست و خاکزی Terrestrial, Symbiotic
	<i>pseudomonas fluorescens</i>	خاکزی و آبی، بیمارگر گیاه خیار و گوجه Terrestrial and aquatic, cucumber and tomato plant pathogen
بیمارگر انسانی - حیوانی Human-animal pathogen	<i>xanthomonas campestris</i> pv. <i>Phaseoli</i> var. <i>fuscans</i> 1,2	گرم منفی، بیمارگر گیاهی، عامل بیماری سوختگی در لوبیا Gram-negative, plant pathogen, cause of bean blight disease
	<i>Burkholderia thailandensis</i>	خاکزی و گرم منفی، بیمارگر انسان و حیوان Terrestrial and gram-negative, pathogenic for humans and animals
	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	گرم منفی، بیمارگر گیاهی و انسانی Gram-negative, plant and human pathogen
	<i>Burkholderia mallei</i>	گرم منفی، عامل بیماری فیروز کیستیک Gram-negative, the causative agent of cystic fibrosis
	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	گرم منفی، عامل بیماری فیروز کیستیک Gram-negative, the causative agent of cystic fibrosis
	<i>pseudomonas</i> sp.	گرم منفی، عامل عفونت در مجاری ادراری و تنفسی Gram-negative, the cause of infection in the urinary and respiratory tracts



شکل ۵- پیش بینی بخش‌هایی از پروتئین فلاژلین با استفاده از سرور PONDR که فاقد ساختار سوم منظم است. A: ساختار سوم منظم و نامنظم پروتئین فلاژلین در باکتری *Bgg*. B: ساختار سوم منظم و نامنظم پروتئین فلاژلین در باکتری *B.pseudomallei*.

Figure 5- Prediction of portions of flagellin protein using a PONDR server that lacks a third regular structure. A: The third regular and irregular structure of the flagellin protein in *Bgg*. B: The flagellin protein third regular and irregular structure in *B.pseudomallei*.



شکل ۶- تصاویر میکروسکوپ الکترونی جدایه‌های *Bgg*. تصاویر A تا C مربوط به SEM و تصاویر D تا F مربوط به TEM می‌باشد. در پنل‌های A تا C شکل کلی و اندازه‌ی جدایه ۱۵ با ۱ تا ۱/۵ میکرومتر طول بدنه به نمایش در آمده است. پنل A، بیوفیلم تشکیل شده از باکتری به نمایش گذاشته شده است. در پنل D تازک لوفوتریش سویه ۱۵ *Bgg* با استفاده از میکروسکوپ TEM دیده می‌شود. در پنل‌های E و F نمای کلی و کامل تازک باکتری جدایه ۱۶ با طولی حدود ۶ میکرومتر قابل مشاهده است. تفاوت آرایش تازک دو جدایه بیماریزا *Bgg* قابل رویت است.

Figure 6- Electron microscope images of *Bgg* isolates. Images (A to C) are related to SEM, and images D to F are related to TEM. The general shape and size of the isolator 15 with 1 to 1.5 μm body length are displayed in panels A to C. Panel A, a biofilm composed of bacteria, is displayed. In panel D, a 15 *Bgg* Lophotrichous flagellum can be seen using a TEM microscope. In panels E and F, a complete view of the flagella of isolate 16 with a length of about 6 micrometers can be seen. The difference in flagella arrangement of the two pathogenic isolates *Bgg* can be seen.

نتیجه‌گیری

طبقه‌بندی بین گونه‌ای و درون گونه‌ای جنس بورخولدریا مؤثر واقع شود (آزمایش انجام شده به صورت محدود و با یازده جنس و گونه انجام شده و نتیجه‌گیری کلی با صراحت امکان پذیر نمی‌باشد). نتیجه‌ی مهمی که در این مطالعه به آن رسیدیم نشان داد که تکثیر این ژن در سویه‌های نزدیک *Bgg* نمی‌تواند این سویه‌ها را از هم تفکیک کند. برای تفکیک سویه‌های نزدیک علاوه بر مطالعات مولکولی (مانند PCR)، نیاز به مطالعات سلولی مانند تصویربرداری الکترونی و یا توالی‌یابی کل ژنوم می‌باشد. با استفاده از تصاویر الکترونی تفاوت آرایش تازکی بین دو جدایه بیماریزا باکتری *Bgg* (جدایه ۱۵ و جدایه ۱۶) قابل رویت می‌باشد. با توجه به قدرت و شدت بیشتر بیماریزایی در جدایه ۱۵ (نتایج نشان داده نشده است)، می‌توان به این نتیجه رسید که آرایش لوفوتریش تازک در این جدایه که باعث متمایز شدن آن از جدایه ۱۶ می‌شود؛ شاید یکی از عوامل اصلی تفاوت در شدت

امروزه امنیت غذایی بشر به دلیل گسترش عوامل بیماریزایی گیاهی (به طور عمد یا غیر عمد) در معرض خطر می‌باشد. این مطالعه برای برنامه‌های ایمنی زیستی و جلوگیری از خطرات بیولوژیک آینده که می‌تواند محصول زعفران را در معرض خطر قرار دهد، مورد نیاز است. چراکه زعفران یکی از محصولات استراتژیک ایران بوده و پیشگیری از خطرات آینده می‌تواند جایگاه ایران را در بازارهای جهانی حفظ کند. ژن *fliC* در باکتری *Bgg* در مطالعه حاضر بررسی گردید. آنالیز ساختار ژن و دامنه پروتئین‌ها، خواص بیوشیمیایی، و درخت فیلوژنتیک نشان داد که ژن *fliC* دارای ۴ دامنه حفاظت شده است که می‌تواند در مطالعات فیلوژنی بسیار مؤثر واقع شود. ژن فلاژلین در باکتری *Bgg* به عنوان یک نشانگر مولکولی دقیق می‌تواند گونه‌های بیماریزای گیاهی را از حیوانی-انسانی تفکیک کرده و در

موضوع باید تحقیقات تکمیلی بیشتری صورت پذیرد.

بیماریزایی این دو جدایه نیز باشد که برای اثبات دقیق این

منابع

- Arora, S.K., Dasgupta, N., Lory, S., and Ramphal, R. 2000. Identification of two distinct types of flagellar cap proteins, *FliD*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity Journal* 68: 1474-1479.
- Beatson, S.A., Minamino, T., and Pallen, M.J. 2006. Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends Microbiology* 14 (4): 151-155.
- Borrayo, E., Martinez-Pena, M.D., Morales-Valencia, J.A., Cortes-Cruz, M., and Arteaga-Garibay, R. 2013. Flagellin complete sequence as an inter-specific molecular phylogenetic marker among bacteria. *African Journal of Microbiology Research* 7 (8): 701-703.
- Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.Y., Sali, A. 2006. Comparative protein structure modeling using Modeller. *Current Protocols in Bioinformatics* 15 (1): 5-6.
- Grossart, H.P., Steward, G.F., Martinez, J., and Azam, F. 2000. A simple, rapid method for demonstrating bacterial flagella. *Applied and Environmental Microbiology* 66 (8): 3632-3636.
- Gupta, V., Sharma, A., Rai, P.K., Gupta, S.K., Singh, B., Sharma, S.K., and Sharma, R. 2021. Corm rot of saffron: epidemiology and management. *Agronomy* 11 (2): 339.
- Ham, J.H., Melanson, R.A., and Rush, M.C. 2011. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? *Molecular Plant Pathology* 12 (4): 329-339.
- Ngamdee, W., Tandhavanant, S., Wikraiphath, C., Reamtong, O., Wuthiekanun, V., Salje, J., and Chantratita, N. 2015. Competition between *Burkholderia pseudomallei* and *B. thailandensis*. *BMC Microbiology* 15 (1): 1-15.
- Overly, K. 2003. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species detected in small mammals and ticks in Florida. *Osprey Journal of Ideas and Inquiry* 3: 38-47.
- Paradis, G., Chevance, F.F., Liou, W., Renault, T.T., Hughes, K.T., Rainville, S., and Erhardt, M. 2017. Variability in bacterial flagella re-growth patterns after breakage. *Scientific Reports* 7 (1): 1-10.
- Rossez, Y., Wolfson, E.B., Holmes, A., Gally, D.L., and Holden, N.J. 2015. Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS Pathogens* 11 (1): e1004483.
- Sua'ez-Moreno, Z.R., Caballero-Mellado, J., Coutinho, B.G., Mendoc, A., Previato, L., James, E.K. 2012. Common features of environmentally and potentially beneficial plant-associated *Burkholderia*. *Microbial Ecology* 63: 249-266.
- Xue, B., Dunbrack, R.L., Williams, R.W., Dunker, A.K., and Uversky, V.N. 2010. PONDR-FIT: a meta predictor of intrinsically disordered amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804 (4): 996-1010.
- Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., and Arakawa, M. 1992. Proposal of *Burkholderia*. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. *Microbiology and Immunology* 36 (12): 1251-1275.
- Yang, Z., Lasker, K., Schneidman-Duhovny, D., Webb, B., Huang, C.C., Pettersen, E.F., and Ferrin, T.E. 2012. UCSF Chimera, MODELLER, and IMP: an integrated modeling system. *Journal of Structural Biology* 179 (3): 269-278.