

Potensi *Quorum Quenching* Bakteri Filosfer dan Rizosfer terhadap *Dickeya dadantii* (Quorum Quenching Potential of Phyllosphere and Rhizosphere Bacteria against *Dickeya dadantii*)

Taruna D. Satwika¹, Iman Rusmana², dan Alina Akhdiya³

¹Program Studi Mikrobiologi, Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti Kampus, IPB Darmaga, Bogor 16680 Indonesia

²Departemen Biologi, FMIPA, Institut Pertanian Bogor, Jl. Meranti Kampus IPB Darmaga, Bogor 16680 Indonesia

Telp. (0251) 8622833; Faks. (0251) 8622833; E-mail: irusmana@ipb.ac.id

³Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumber Daya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111 Indonesia

Diajukan: 4 Juli 2017; Direvisi: 6 September 2017; Diterima: 23 Oktober 2017

ABSTRACT

Virulence genes expression of *Dickeya dadantii* and other soft rot bacteria (SRB) is regulated by quorum sensing process using acyl-homoserine lactone (AHL) as signal molecules. Pathogenicity of the bacterium can be inhibited by quorum quenching (QQ) activity of AHL-lactonase producing bacteria. The aims of this research were to isolate and characterize the potential of rhizosphere and phyllosphere bacteria as quorum quencher against *D. dadantii*. The bacteria were isolated from either leaves or rhizosphere soil samples of a variety of crops from Sukabumi, Tegal, Kupang, and Wonosobo. Eight of seventy-nine bacterial isolates showed QQ activity against bioindicator *Chromobacterium violaceum*. Hypersensitive response bioassay conducted on tobacco plants showed six (KT2, KT9, KT10, KUT1, TKF2, and WKF3) of eight isolates did not cause hypersensitive response. These isolates were able to suppress the virulence of *D. dadantii* on potato tubers. The 16S rRNA of these isolates had the highest similarity with *Bacillus cereus*, *B. aryabhatai*, *B. acidiceler*, and *Micrococcus aloeverae*. *B. cereus* KT9 and *B. aryabhatai* TKF2 have the AHL-lactonase gene (*aiiA*). This is the first report of QQ activity of *M. aloeverae*, *B. aryabhatai*, and *B. acidiceler*. The existence of the *aiiA* gene from *B. aryabhatai* also had not been reported before. This study provides new information about QQ activity of the three bacteria and their potency as a quorum quencher against *D. dadantii*.

Keywords: AHL-lactonase, biocontrol, *Dickeya dadantii*, quorum quenching.

ABSTRAK

Eksresi gen-gen virulensi pada *Dickeya dadantii* diatur oleh proses *quorum sensing* menggunakan asil-homoserin lakton (AHL) sebagai molekul sinyal. Patogenisitas bakteri tersebut dapat dihambat oleh aktivitas *quorum quenching* (QQ) bakteri-bakteri penghasil AHL-laktonase. Tujuan penelitian ini adalah mengisolasi dan mengarakterisasi bakteri penghasil AHL-laktonase asal rizosfer dan filiosfer yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai *quorum quencher* untuk *D. dadantii*. Isolasi bakteri dilakukan dari sampel daun dan sampel tanah rizosfer beberapa komoditas tanaman asal Sukabumi, Tegal, Kupang, dan Wonosobo. Sebanyak 8 dari 79 isolat bakteri yang diperoleh menunjukkan aktivitas QQ terhadap bioindikator *Chromobacterium violaceum*. Bioasai respons hipersensitif (*hypersensitive response*) yang dilakukan pada tanaman tembakau menunjukkan enam (KT2, KT9, KT10, KUT1, TKF2, and WKF3) dari delapan isolat tersebut tidak menimbulkan respons hipersensitif. Keenam isolat tersebut mampu menekan virulensi *D. dadantii* pada umbi kentang. Sekuen 16S rRNA enam isolat tersebut memiliki kemiripan tertinggi dengan *Bacillus cereus*, *B. aryabhatai*, *B. acidiceler*, dan *Micrococcus aloeverae*. *B. cereus* KT9 and *B. aryabhatai* TKF2 terdeteksi memiliki gen penyandi AHL-laktonase (*aiiA*). Ini merupakan laporan yang pertama tentang aktivitas QQ pada spesies *M. aloeverae*, *B. aryabhatai*, and *B. acidiceler*. Keberadaan gen *aiiA* pada *B. aryabhatai* juga belum pernah dilaporkan sebelumnya. Penelitian ini memberikan informasi baru tentang aktivitas QQ ketiga isolat tersebut dan potensinya sebagai *quorum quencher* untuk *D. dadantii*.

Kata kunci: AHL-laktonase, biokontrol, *Dickeya dadantii*, *quorum quenching*.

PENDAHULUAN

Quorum sensing (QS) merupakan bentuk komunikasi antarsel bakteri dalam memberikan informasi kepadatan sel sebagai cara untuk meregulasi ekspresi gen-gen tertentu. Bakteri Gram-negatif patogenik melakukan QS menggunakan asil-homoserin lakton (AHL) sebagai senyawa sinyal untuk mengaktifkan faktor-faktor virulensinya (LaSarre dan Federle 2013). *Dickeya dadantii* merupakan fitopatogen penyebab busuk lunak dan layu pada berbagai tumbuhan, di antaranya *Pelargonium capitatum*, *Ananas comosus*, *Dianthus* spp., *Euphorbia pulcherrima*, *Ipomoea batatas*, *Musa* spp., *Philodendron* spp., *Saintpaulia ionantha*, *Zea mays*, dan *Chrysanthemum* (Liu et al. 2016; Samson et al. 2005; Végh et al. 2014). Fitopatogen ini melakukan QS menggunakan senyawa 3-Oxo-C6-HSL untuk meregulasi ekspresi gen-gen penyandi faktor virulensi seperti enzim pektat liase (Nasser et al. 1998). Di Indonesia, *D. dadantii* juga dilaporkan menyerang dan menyebabkan busuk lunak pada tanaman anggrek (Muharam et al. 2012).

Upaya pengendalian patogen tanaman umumnya dilakukan dengan mengaplikasikan pestisida. Pestisida sintetik bersifat tidak spesifik sehingga penggunaannya berdampak negatif bagi organisme non-target dan lingkungan. Penggunaan antibiotik juga merupakan upaya pengendalian yang menjanjikan, namun penggunaannya pada skala lapangan tidak diperbolehkan karena dapat memicu berkembangnya resistensi bakteri patogen tanaman, hewan, atau manusia (Czajkowski et al. 2011).

Strategi alternatif yang dapat digunakan untuk mengendalikan serangan patogen adalah dengan memanfaatkan mekanisme *quorum quenching* (QQ). Mekanisme tersebut merupakan mekanisme pencegahan atau penghambatan QS. Mekanisme QQ dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu degradasi dan inaktivasi molekul sinyal QS, penghambatan biosintesis molekul sinyal QS, serta penghambatan deteksi molekul sinyal QS (LaSarre dan Federle 2013). Inaktivasi molekul AHL melumpuhkan ekspresi gen-gen virulensi. Mekanisme pengendalian penyakit tanaman menggunakan bakteri penghasil AHL-laktonase lebih aman dibanding dengan penggunaan senyawa antimikroba, seperti antibiotik dan pestisida, karena tidak menimbulkan tekanan seleksi. Tekanan seleksi akan memicu mekanisme adaptasi bakteri patogen sehingga akan lebih resisten terhadap senyawa antimikroba pada generasi selanjutnya (White dan Finan 2009).

Rizosfer merupakan habitat berbagai bakteri dengan kemampuan QQ. Bakteri-bakteri rizosfer yang

diketahui memiliki aktivitas QQ di antaranya *Acinetobacter* sp., *Burkholderia* sp., *Klebsiella* sp., *Bacillus aquimaris*, *B. marisflavi*, *B. altitudinis*, dan *B. axarquiensis* (Chan et al. 2011; Fitriyah et al. 2015). Beberapa bakteri filofosfer juga telah dilaporkan memiliki aktivitas QQ, di antaranya *Agrobacterium larrymoorei*, *B. silvestris*, *B. cereus*, *Lysinibacillus fusiformis*, dan *Microbacterium testaceum* (Ma et al. 2013; Morohoshi et al. 2009). Beberapa bakteri yang memiliki aktivitas QQ dilaporkan dapat mengendalikan patogenisitas *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* pv. *glycines*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *P. carotovorum*, dan *D. dadantii* secara *in vitro* dan *in planta* (Akhdiya et al. 2017; Khoiri et al. 2017; Sari et al. 2016). Laporan-laporan tersebut mengindikasikan bahwa bakteri penghasil AHL-laktonase memiliki potensi sebagai *quorum quencher* atau agen biokontrol fitopatogen *D. dadantii*. Namun, informasi mengenai potensi bakteri rizosfer dan filofosfer penghasil AHL-laktonase di Indonesia masih terbatas. Penelitian ini bertujuan mengisolasi dan mengarakterisasi bakteri penghasil AHL-laktonase asal rizosfer dan filofosfer yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai *quorum quencher* untuk *D. dadantii*.

BAHAN DAN METODE

Sampel Daun dan Tanah Rizosfer, Bakteri, dan Kondisi Pengulturrannya

Sampel daun dan/atau tanah rizosfer yang digunakan sebagai bahan isolasi bakteri diambil dari tanaman jarak pagar (*Jatropha curcas*), kacang tanah (*Arachis hypogaea*), kacang tunggak (*Vigna unguiculata*), bawang daun (*Allium fistulosum*), dan kentang (*Solanum tuberosum*) di Jawa Barat (Sukabumi), Jawa Tengah (Tegal dan Wonosobo), dan Nusa Tenggara Timur (Kupang) (Tabel 1). Daun diambil bersama-sama dengan cabang tempat tumbuhnya, kemudian dimasukkan ke dalam kantong plastik bersih dan diberi label. Sampel daun segera dimasukkan ke dalam wadah berpendingin selama transportasi dan sebelum diisolasi bakterinya. *Chromobacterium violaceum* yang digunakan sebagai bioindikator merupakan koleksi Dr. Alina Akhdiya, sedangkan *D. dadantii* merupakan koleksi Dr. Iman Rusmana. Pengulturan dan inkubasi kedua bakteri tersebut dilakukan dengan menggunakan media *nutrient agar* (NA) atau *nutrient broth* (NB). Kultur cair diinkubasi pada suhu kamar (28°C±1°C) sambil digoyang menggunakan *shaker* pada kecepatan 75 rpm sampai tercapai nilai rapat optis kultur yang telah ditentukan.

Isolasi Bakteri Filosfer dan Rizosfer

Isolasi bakteri tanah dilakukan dengan metode cawan sebar pada media NA. Sebanyak 1 g sampel tanah disuspensikan dalam 9 ml larutan NaCl 0,85%. Suspensi diencerkan secara serial sampai pengenceran 10^{-8} . Sebanyak 0,1 ml suspensi dari tiga pengenceran terakhir disebar pada media NA, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Isolasi bakteri filosfer dilakukan dengan metode cawan sebar pada media *Kings's B agar*. Sebanyak 5 g daun direndam di dalam 45 ml larutan garam fisiologis (NaCl 0,85%) steril. Pengenceran sampel dilakukan secara serial hingga 10^{-4} . Sebanyak 0,1 ml suspensi dari tiga pengenceran terakhir disebar pada media *Kings's B agar*. Koloni-koloni bakteri yang tumbuh dan menunjukkan ciri morfologis yang berbeda dimurnikan dengan metode gores kuadran pada media yang sama.

Bioasai untuk Deteksi Aktivitas QQ Isolat Bakteri terhadap *C. violaceum*

Isolat bakteri yang telah mumi ditumbuhkan pada media *Luria-Bertani broth* (LB) dan di-shaker selama ± 18 jam (hingga nilai OD_{600} -nya mencapai 0,8). Kultur disentrifugasi dengan kecepatan $16.000 \times g$ selama 10 menit. Supernatan diambil dan disaring menggunakan *syringe filter* 0,22 μm . Sebanyak 100 μl filtrat supernatan diteteskan pada *paper disk* steril, kemudian diletakkan pada permukaan media *Luria-Bertani agar* (LA) semi padat yang telah diinokulasi dengan kultur *C. violaceum* ($OD_{600} = 0,8$) 1% (v/v) dan diinkubasi pada suhu kamar selama 24 jam. Media LB yang diteteskan pada *paper disk* steril digunakan sebagai kontrol negatif. Aktivitas degradasi AHL ditunjukkan dengan adanya zona tidak berwarna ungu di sekitar *paper disk*.

Uji Potensi Patogenisitas Isolat Bakteri Pendegradasi AHL terhadap Tanaman

Tanaman tembakau (*Nicotiana tabacum*) ditumbuhkan sampai umur 2 bulan. Isolat bakteri terpilih dan *D. dadantii* masing-masing ditumbuhkan pada media NB. Kultur diinkubasi hingga nilai OD_{600} -nya mencapai 0,8. Uji hipersensitivitas dilakukan dengan mengikuti prosedur yang dipublikasikan oleh Zou et al. (2006). Infeksi suspensi bakteri (0,5 ml) ke tanaman tembakau dilakukan dengan menggunakan *syringe* tanpa jarum (infiltrasi). Sebagai kontrol negatif, daun diinfiltrasi dengan 0,5 ml NB steril, sedangkan sebagai kontrol positif daun diinfiltrasi dengan 0,5 ml suspensi *D. dadantii*. Setiap perlakuan diulang tiga kali. Gejala nekrotik yang muncul pada jaringan daun diamati pada hari kedua setelah perlakuan.

Uji Penghambatan Patogenisitas *D. dadantii* secara *In Vitro*

Uji penghambatan patogenisitas secara *in vitro* dilakukan dengan menggunakan umbi kentang (*Solanum tuberosum*). Umbi kentang dibersihkan dengan air mengalir dan dikeringkan dengan lap bersih. Umbi kentang yang telah kering direndam di dalam larutan alkohol 70% selama 2 menit. Selanjutnya, umbi kentang direndam di dalam akuades steril selama 2 menit dan dipaparkan dengan sinar UV selama 15 menit. Umbi kentang ditusuk dengan tusuk gigi steril sampai kedalaman 5 mm, kemudian dilapisi isolat bakteri terpilih. Pelapisan dilakukan dengan cara mengguling-gulingkan umbi kentang di dalam cawan berisi kultur cair isolat bakteri ($OD_{600} = 0,8$). Selanjutnya, kentang dikeringanginkan di dalam *laminar flow cabinet*. Sebanyak 10 μl kultur isolat *D. dadantii* ($OD_{600} = 0,8$) diteteskan pada lubang bekas tusukan. Sebagai kontrol positif kentang ditusuk dan ditetesi kultur *D. dadantii* tanpa dibalur dengan kultur isolat terpilih, sedangkan sebagai kontrol negatif kentang ditusuk dan ditetesi media NB steril tanpa dibalur dengan kultur isolat terpilih terlebih dahulu. Setiap perlakuan diulang tiga kali. Umbi kentang kemudian diinkubasi di dalam kotak plastik selama 24 jam pada suhu kamar. Setelah inkubasi, kentang dibelah menjadi dua bagian tepat di bagian tengah lubang bekas tusukan, kemudian dilakukan pengukuran lebar dan kedalaman jaringan yang membusuk. Tingkat keparahan busuk lunak diukur berdasarkan luas daerah yang mengalami busuk lunak.

Uji Antibiosis Isolat Bakteri Pendegradasi AHL

Kultur isolat bakteri terpilih ($OD_{600} = 0,8$) disentrifugasi pada $16.000 \times g$ selama 10 menit. Supernatan disterilisasi menggunakan filter berdiameter pori-pori 0,22 μm . Sebanyak 15 μl filtrat diteteskan pada *paper disk* steril, kemudian diletakkan pada permukaan media NA yang telah disebari kultur *D. dadantii* ($OD_{600} = 0,8$). *Paper disk* steril yang ditetesi 15 μl media NB steril digunakan sebagai kontrol negatif, sedangkan *paper disk* yang mengandung ampisilin 400 ppm sebagai kontrol positif. Setiap perlakuan diulang dua kali. Inkubasi dilakukan pada suhu kamar selama 24 jam. Aktivitas antibiosis ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar *paper disk*.

Karakterisasi Morfologis Isolat Bakteri Pendegradasi AHL

Isolat bakteri QQ terpilih dikarakterisasi berdasarkan morfologi koloni dan sel. Karakterisasi morfologis koloni dilakukan dengan mengamati karakter koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media NA,

seperti ukuran, bentuk, elevasi, warna, dan tepi. Selain karakterisasi morfologis, isolat-isolat yang terpilih juga ditentukan reaksi Gram-nya dengan teknik pewarnaan Gram.

Identifikasi Bakteri Pendegradasi AHL Berdasarkan Gen 16S rRNA

Isolasi DNA bakteri dilakukan mengikuti prosedur standar *Presto™ Mini gDNA Bacteria Kit* (Geneaid, AS). Amplifikasi gen 16S rRNA dilakukan dengan menggunakan primer 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') dan 1387R (5'-GGCGCGWGTGTACAAGGC-3') (Marchesi et al. 1998). Konsentrasi akhir reaksi PCR terdiri atas *GoTaq® Green Ready Mix* (Promega, AS) 1×, primer masing-masing 0,5 µM, 10 ng DNA genom, dan *nuclease free water* sampai volume 50 µl. Tahapan PCR yang dilakukan, yaitu pradenaturasi pada 94°C selama 5 menit, denaturasi pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 55°C selama 30 detik, *elongasi* pada 72°C selama 30 detik, dan *elongasi* akhir pada 72°C selama 7 menit. Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus. Produk PCR dimigrasikan pada gel agarosa 1% selama 45 menit pada 80 V. Visualisasi DNA dilakukan dengan menggunakan *UV transilluminator* dengan pewarnaan Etbr. Penentuan urutan nukleotida dilakukan dengan mengirimkan DNA hasil amplifikasi ke perusahaan penyedia jasa sekuensing. Hasil sekuensing kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak (*software*) *SeqTrace*. Sekuen yang diperoleh diujarkan dengan data pada *GenBank®* menggunakan program *Basic Local Alignment Search Tool-nucleotide* (BLASTn) dari situs *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) melalui <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Konstruksi pohon filogenetik dilakukan dengan metode *neighbor-joining* (NJ) menggunakan perangkat lunak MEGA 6.0. Topologi konstruksi pohon filogenetik dievaluasi menggunakan analisis *bootstrap* 1.000 pengulangan.

Deteksi Gen Penyandi AHL-laktonase

Amplifikasi gen penyandi AHL-laktonase (*aiiA*) dilakukan dengan menggunakan primer spesifik gen *aiiA*, yaitu *aiiAF* (5'-ATCGGATCCATGACAGTAAAGAAGCTTATTTTCG-3' dan *aiiAR* (5'-GTCTGAATTCCTCAAC AAGATACTCCTAATGATGT-3' (Dong et al. 2000). Konsentrasi akhir reaksi PCR terdiri atas *GoTaq® Green Ready Mix* (Promega, AS) 1×, primer masing-masing 0,5 µM, 10 ng DNA genom, dan *nuclease free water* sampai volume 50 µl. Tahapan PCR yang dilakukan, yaitu pradenaturasi pada 94°C selama 5 menit, denaturasi pada 95°C selama 30 detik, *annealing* pada 55°C selama 30 detik, *elongasi* pada

72°C selama 30 detik, dan *elongasi* akhir pada 72°C selama 7 menit. Proses amplifikasi dilakukan sebanyak 30 siklus. Produk PCR dimigrasikan pada gel agarosa 1% selama 45 menit pada 80 V. Visualisasi DNA dilakukan dengan menggunakan *UV transilluminator* dengan pewarnaan Etbr. Penentuan urutan nukleotida dilakukan dengan mengirimkan DNA hasil amplifikasi ke perusahaan penyedia jasa sekuensing. Hasil sekuensing kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak *SeqTrace*. Sekuen yang diperoleh diujarkan dengan data pada *GenBank®* menggunakan program *BLAST nucleotide to six-frame translation-protein* (BLASTx) dari situs NCBI.

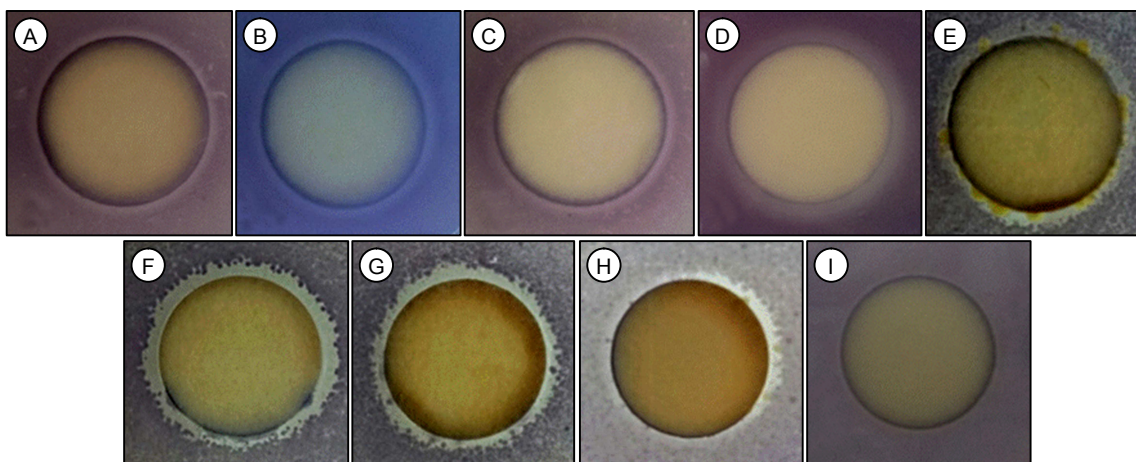
HASIL DAN PEMBAHASAN

Aktivitas QQ Isolat Bakteri terhadap *C. violaceum*

Sebanyak 79 isolat bakteri berhasil diisolasi dari 8 sampel filosfer dan 8 sampel rizosfer, 8 isolat bakteri di antaranya menunjukkan potensinya untuk menginaktivasi senyawa sinyal yang dihasilkan oleh *C. violaceum* sebagai bioindikator (Gambar 1). Enam isolat berasal dari rizosfer dan hanya dua isolat berasal dari filosfer. Diameter zona tidak ungu yang dihasilkan delapan isolat tersebut antara 14–17 mm (Tabel 1). Diameter zona tidak ungu terbesar dihasilkan oleh isolat WKF3, sedangkan diameter zona terkecil dimiliki oleh isolat KT9.

Terbentuknya zona tidak ungu tersebut disebabkan oleh kegagalan proses QS dari sel-sel *C. violaceum* di sekitar *paper disk* yang mengandung supernatan kultur isolat-isolat bakteri. Gagalnya proses QS tersebut dapat diakibatkan oleh terdegradasinya *N-hexanoyl homoserine lactone* (HHL) yang merupakan senyawa sinyal untuk proses QS *C. violaceum* oleh enzim pendegradasi AHL yang dieksresikan ke dalam kultur isolat-isolat yang diuji. Terhambatnya proses QS menyebabkan sel-sel *C. violaceum* di sekitar *paper disk* tidak mampu mengaktifkan proses ekspresi gen penyandi pigmen *violacein* yang berwarna ungu (Song et al. 2012).

Penggunaan *C. violaceum* sebagai bioindikator pada proses penapisan bakteri pendegradasi AHL telah banyak dilaporkan sebelumnya (Chong et al. 2012; Christianto dan Yogiara 2011). Penggunaannya sebagai bioindikator lebih mudah dilakukan karena tidak membutuhkan penambahan substrat dan perubahan pigmentasi mudah diamati.



Gambar 1. Aktivitas degradasi AHL delapan isolat bakteri (supernatan) menggunakan *Chromobacterium violaceum* sebagai bioindikator. A = KT9, B = KUT1, C = STB1a, D = WKF3, E = KT10, F = THR1, G = TKF2, H = KT2, I = media LB steril (kontrol negatif).

Tabel 1. Asal isolat bakteri dan aktivitasnya dalam mendegradasi AHL.

Kode isolat	Asal isolat	Diameter zona tidak ungu (mm)	Indeks degradasi AHL
KT2	Rizosfer jarak pagar (<i>Jatropha curcas</i>), Kupang	15	0,154
KT10	Rizosfer jarak pagar (<i>J. curcas</i>), Kupang	16	0,231
THR1	Rizosfer kacang tanah (<i>Arachis hypogaea</i>), Tegal	16	0,231
TKF2	Filosfer kacang tunggak (<i>Vigna unguiculata</i>), Tegal	15	0,154
KT9	Rizosfer jarak pagar (<i>J. curcas</i>), Kupang	14	0,077
STB1a	Rizosfer bawang daun (<i>Allium fistulosum</i>), Sukabumi	15	0,154
KUT1	Rizosfer jarak pagar (<i>J. curcas</i>), Kupang	15	0,154
WKF 3	Filosfer kentang (<i>Solanum tuberosum</i>), Wonosobo	17	0,308

Potensi Patogenisitas Isolat Bakteri Pendegradasi AHL terhadap Tanaman

Selain memiliki potensi dalam mengendalikan patogen tanaman, kandidat agen biokontrol tidak boleh bersifat patogenik terhadap tanaman inang (Santoyo et al. 2012). Seleksi isolat yang diduga bersifat fitopatogenik dilakukan dengan uji hipersensitivitas terhadap tanaman tembakau. Enam dari delapan isolat yang diuji tidak memberikan respons hipersensitif pada daun tembakau (Gambar 2). Isolat yang menunjukkan hasil positif pada uji hipersensitivitas pada tembakau berpotensi sebagai fitopatogen sehingga tidak dipilih untuk pengujian lebih lanjut.

Mekanisme patogen dalam memicu respons hipersensitif dan patogenisitas antara lain diatur oleh gen-gen *hypersensitive reaction and pathogenicity (hrp)*. Gen-gen tersebut dimiliki oleh bakteri Gram-negatif fitopatogenik (Zhu et al. 2000). Respons hipersensitif pada tumbuhan ditunjukkan dengan adanya gejala bercak kuning atau cokelat pada daun tembakau yang menandakan kematian sel-sel pada jaringan yang diinfeksi dengan patogen. Kematian jaringan yang terinfeksi merupakan mekanisme tanaman untuk menghambat pertumbuhan dan perkembangan patogen. Ketiadaan respons hipersensitif

pada jaringan daun tembakau yang diinfeksi dengan isolat-isolat bakteri mengindikasikan bahwa isolat-isolat tersebut non fitopatogenik.

Aktivitas QQ Isolat Bakteri terhadap *D. dadantii* secara *In Vitro*

Busuk lunak disebabkan oleh aktivitas pektat liase yang diproduksi oleh *D. dadantii* melalui regulasi QS. Umbi kentang yang diinokulasi dengan *D. dadantii* tanpa perlakuan isolat *quorum quencher* menunjukkan gejala busuk lunak paling parah, sedangkan umbi kentang yang dibalut dengan isolat-isolat *quorum quencher* sebelum diinokulasi dengan *D. dadantii* menunjukkan gejala busuk lunak yang lebih ringan (Gambar 3). Hasil tersebut membuktikan bahwa enam isolat *quorum quencher* tersebut berpotensi untuk digunakan sebagai pengendali virulensi *D. dadantii*.

Aktivitas QQ tertinggi ditunjukkan oleh isolat KT2, sedangkan aktivitas terendah ditunjukkan oleh isolat WKF3 (Gambar 4). Perbedaan hasil penghambatan busuk lunak pada umbi kentang tersebut dapat disebabkan oleh faktor internal, seperti kemampuan produksi enzim, kecepatan tumbuh bakteri, stabilitas, dan efektivitas enzim yang berbeda pada setiap isolat.

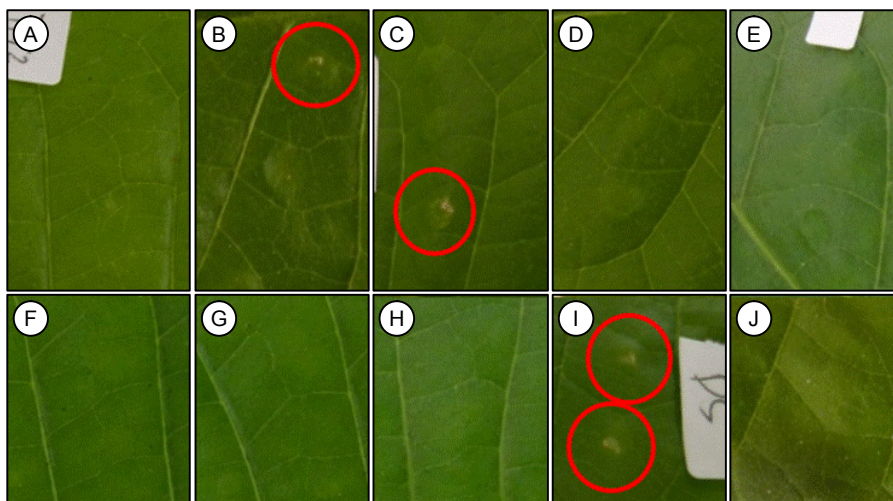
Penghambatan juga dipengaruhi oleh faktor eksternal, yaitu kondisi lingkungan. Sakr et al. (2013) melaporkan bahwa AHL-laktonase dari *B. weihenstephanensis* P65 aktif pada pH 6–9 dan suhu 28–50°C.

Hasil berbeda ditunjukkan oleh AHL-laktonase dari *B. thuringiensis* SGT3g yang aktif pada rentang pH lebih asam, yaitu 5–8 (Sari et al. 2016). Beberapa isolat *Bacillus* sp. juga dilaporkan memiliki aktivitas QQ optimum pada suhu 25–60°C, namun ada juga yang memiliki aktivitas QQ pada rentang suhu lebih luas, yaitu 15–70°C (Sakr et al. 2014). Hal ini menunjukkan bahwa aktivitas QQ suatu isolat bergantung pada kesesuaian antara enzim yang dihasilkannya (faktor internal) dan lingkungan tempat tumbuhnya (faktor eksternal).

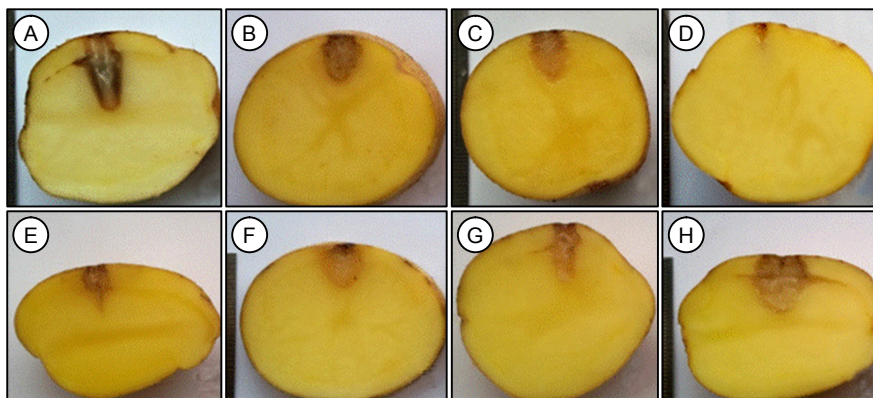
Uji Antibiosis Isolat Bakteri Pendegradasi AHL

Selain QQ, kemampuan antibiosis suatu bakteri terhadap *D. dadantii* juga dapat memengaruhi gejala pembusukan kentang. Namun, berdasarkan hasil uji antibiosis, keenam isolat terpilih tersebut tidak bersifat antibiosis terhadap fitopatogen ini. Hal ini ditunjukkan dengan tidak adanya zona jernih di sekitar *paper disk* yang mengandung cairan kultur bebas sel dari isolat-isolat terpilih tersebut (Gambar 5). Hasil negatif pada uji antibiosis tersebut membuktikan bahwa penghambatan pembusukan kentang tersebut disebabkan oleh aktivitas QQ isolat terpilih.

Bakteri pendegradasi AHL mampu menghambat proses QS secara enzimatik. Beberapa enzim yang telah diketahui mampu mendegradasi dan menginaktivasi molekul AHL adalah AHL-laktonase, AHL-asilase, oksidoreduktase, dioksigenase, dan kinase



Gambar 2. Uji hipersensitivitas tembakau dengan isolat-isolat bakteri pendegradasi AHL. A = TKF2, B = STB1a, C = THR1, D = WKF3, E = KT9, F = KT10, G = KT2, H = KUT1, I = *Dickeya dadantii*, J = NB steril (kontrol negatif). Lingkaran merah menunjukkan jaringan nekrotik yang disebabkan oleh respons hipersensitif.



Gambar 3. Maserasi jaringan umbi kentang setelah diinokulasi dengan *D. dadantii* dan dibalur dengan isolat bakteri *quorum quencher* terpilih. A = *D. dadantii* (kontrol positif), B = media NB steril (kontrol negatif), C = isolat KT2 + *D. dadantii*, D = isolat KT9 + *D. dadantii*, E = isolat KT10 + *D. dadantii*, F = isolat KUT1 + *D. dadantii*, G = isolat TKF2 + *D. dadantii*, H = isolat WKF3 + *D. dadantii*.

(Chowdhary et al. 2008; Dong et al. 2000; Pustelny et al. 2009; Romero et al. 2008; Yin et al. 2010). Aktivitas QQ bakteri penghasil AHL-laktonase terhadap patogenisitas *D. dadantii* pada kentang dan anggrek juga pernah dipublikasikan berturut-turut oleh Sari et al. (2016), Khoiri et al. (2017), dan Akhdiya et al. (2017). Menurut Molina et al. (2003), kemampuan bakteri *quorum quencher* dalam mengendalikan penyakit tanaman dapat disetarakan, bahkan berpotensi lebih baik dibanding dengan bakteri penghasil antibiotik *phenazine* dan *2,4-diacetylphloroglucinol*. Oleh karena itu, bakteri *quorum quencher* layak untuk dipertimbangkan sebagai salah satu alternatif agen biokontrol penyakit tanaman.

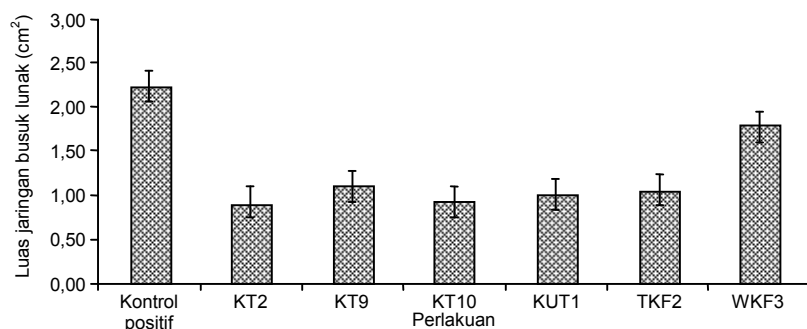
Karakteristik Morfologis Isolat Bakteri Pendegradasi AHL

Keenam isolat bakteri terpilih memiliki karakter morfologis koloni yang bervariasi ketika ditumbuhkan

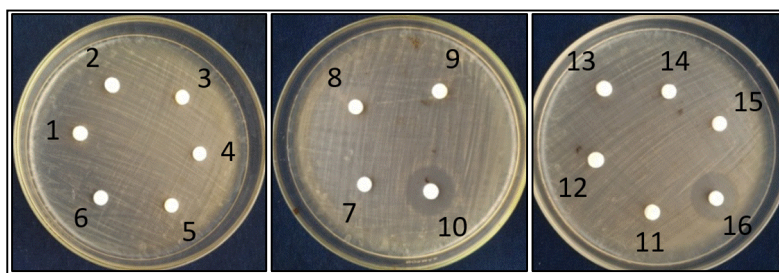
pada media NA (Tabel 2). Hasil pewarnaan Gram menunjukkan keenam isolat terpilih termasuk ke dalam kelompok bakteri Gram-positif. Tiga isolat di antaranya memiliki sel berbentuk batang, sedangkan tiga isolat lainnya memiliki sel berbentuk kokus (Tabel 2).

Identifikasi Bakteri Pendegradasi AHL Berdasarkan Gen 16S rRNA

Analisis gen 16S rRNA menunjukkan bahwa isolat KUT1, KT2, dan KT10 memiliki kemiripan tertinggi dengan *M. aloeverae*, isolat KT9 dengan *B. cereus*, isolat TKF2 dengan *B. aryabhatai*, dan isolat WKF3 dengan *B. acidicer* (Tabel 3). Pohon filogenetik menunjukkan bahwa isolat-isolat tersebut membentuk dua kelompok. Isolat KT2, KT10, dan KUT1 termasuk ke dalam kelompok *Micrococcus*, sedangkan isolat KT9, TKF2, dan WKF3 termasuk ke dalam kelompok *Bacillus* (Gambar 6). Beberapa orang pe-



Gambar 4. Pengaruh QQ enam isolat bakteri terpilih terhadap luas maserasi jaringan umbi kentang oleh *D. dadantii*.



Gambar 5. Uji aktivitas antibiosis isolat *quorum quencher* terhadap *D. dadantii*. 1 dan 9 = isolat WKF3, 2 dan 11 = isolat KT2, 3 dan 12 = isolat KUT1, 4 dan 13 = isolat KT10, 5 dan 14 = isolat KT9, 6 dan 7 = media NB steril, 8 dan 15 = isolat TKF2, 10 dan 16 = ampisilin 400 ppm.

Tabel 2. Karakter morfologis enam isolat *quorum quencher* terpilih.

Kode isolat	Morfologi koloni					Bentuk sel	Gram
	Bentuk	Warna	Evaluasi	Tepi	Ukuran (mm)		
TKF2	Bulat	Putih	<i>Umbonate</i>	<i>Entire</i>	1-3	Batang	+
WKF3	Bulat	Krem	<i>Umbonate</i>	<i>Entire</i>	1-3	Batang	+
KT9	Tidak beraturan	Krem	Cembung	<i>Undulate</i>	2-7	Batang	+
KT2	Bulat	Kuning	Cembung	<i>Entire</i>	1	Kokus	+
KT10	Bulat	Kuning	Cembung	<i>Entire</i>	1	Kokus	+
KUT1	Bulat	Kuning	Cembung	<i>Entire</i>	1	Kokus	+

neliti telah mempublikasikan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa *Bacillus* merupakan genus bakteri pendegradasi AHL yang umum ditemukan pada rizosfer dan filosfer (Fitriyah et al. 2015; Ma et al. 2013). Aktivitas degradasi AHL oleh *B. cereus* telah dilaporkan sebelumnya oleh Khoiri et al. (2017), namun aktivitas degradasi AHL pada *B. aryabhatai* dan *B. acidicer* belum pernah dilaporkan. Aktivitas degradasi AHL oleh *M. yunnanensis* juga telah dipublikasikan oleh Kim et al. (2014), namun aktivitas degradasi AHL oleh spesies *M. aloeverae* juga belum pernah dilaporkan. Hasil tersebut menunjukkan bahwa hasil penelitian ini memberikan informasi baru tentang aktivitas QQ oleh *B. aryabhatai*, *B. acidicer*, dan *M. aloeverae*.

Deteksi Gen Penyandi AHL-laktonase

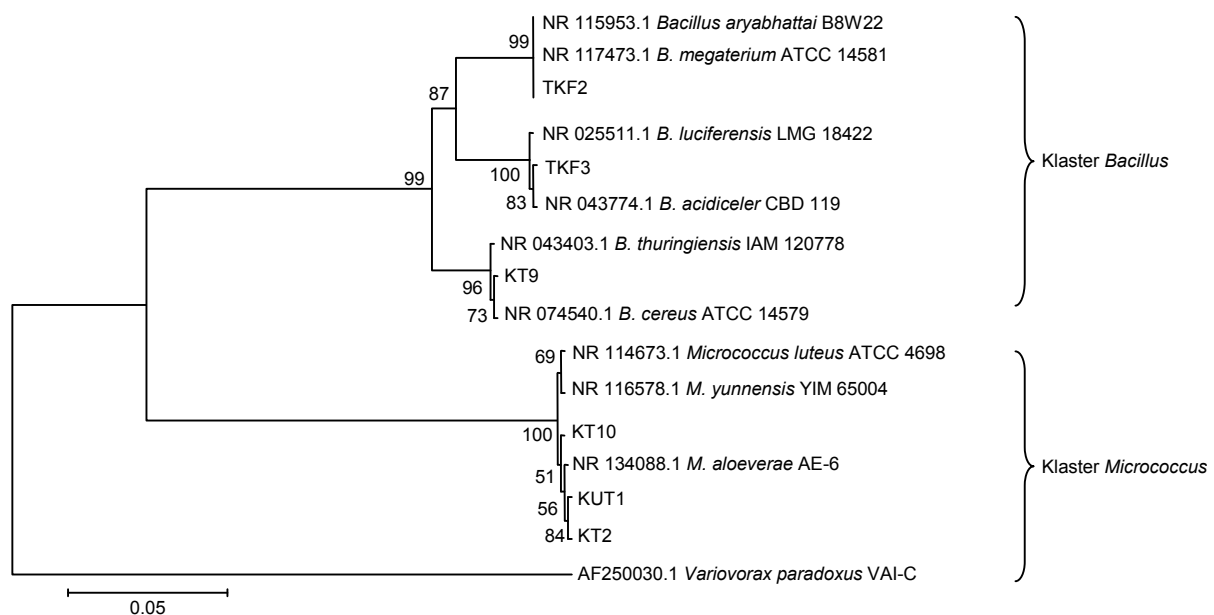
Proses QQ dapat dilakukan melalui degradasi enzimatik AHL menggunakan enzim AHL-laktonase. AHL-laktonase dapat menghidrolisis ikatan ester pada cincin lakton AHL (Dong et al. 2000). Gen *aiiA* merupakan salah satu gen penyandi AHL-laktonase.

Hasil deteksi menunjukkan hanya dua dari enam isolat yang positif memiliki gen *aiiA*, yaitu KT9 dan TKF2. Hasil analisis gen ini menggunakan program BLASTx menunjukkan bahwa protein yang dikode oleh gen *aiiA* isolat KT9 memiliki kemiripan 99% dengan protein N-asil homoserin lakton hidrolase dari kelompok *Bacillus*, sedangkan gen *aiiA* isolat TKF2 memiliki kemiripan tertinggi dengan N-asil homoserin laktonase *B. thuringiensis* (Tabel 4). Kedua isolat tersebut teridentifikasi ke dalam genus *Bacillus* berdasarkan gen 16S rRNA. Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa gen penyandi enzim AHL-laktonase pada genus *Bacillus* adalah *aiiA* (Dong et al. 2000).

Beberapa bakteri dalam genus *Bacillus* yang telah dilaporkan memiliki gen *aiiA* adalah *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. silvestri*, *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. weihenstephanensis*, *B. aquimaris*, *B. marisflavi*, *B. altitudinis*, dan *B. axarquensis* (Fitriyah et al. 2015; Ma et al. 2013; Morohoshi et al. 2009; Pan et al. 2008; Sakr et al. 2013; Yin et al. 2010). Keberadaan gen *aiiA* pada *B. aryabhatai* belum pernah dilaporkan sebelumnya.

Tabel 3. Analisis gen 16S rRNA isolat bakteri terpilih menggunakan BLASTn.

Kode isolat	Basis data spesies pada GenBank®	Identitas (Isolat/GenBank®)	Kemiripan (%)	E-value	Nomor akses
KT9	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	1281/1283	99	0,0	NR 074540.1
KT2	<i>Micrococcus aloeverae</i> AE-6	1238/1242	99	0,0	NR 134088.1
KUT1	<i>M. aloeverae</i> AE-6	1243/1245	99	0,0	NR 134088.1
KT10	<i>M. aloeverae</i> AE-6	1205/1206	99	0,0	NR 134088.1
WKF3	<i>B. acidicer</i> CBD 119	1253/1258	99	0,0	NR 043774.1
TKF2	<i>B. aryabhatai</i> B8W22	1270/1270	100	0,0	NR 115953.1



Gambar 6. Pohon filogenetik neighbor-joining 16S rRNA isolat bakteri pendegradasi AHL terpilih menggunakan MEGA 6.0 (analisis bootstrap 1.000 pengulangan).

Tabel 4. Analisis gen *aiiA* pada isolat bakteri pendegradasi AHL menggunakan BLASTx.

Kode isolat	Basis data spesies pada GenBank®	Identitas (isolat/GenBank®)	Kemiripan (%)	E-value	Nomor akses
KT9	<i>Multispecies: N-acyl homoserine lactone hydrolase (Bacillus)</i>	247/248	99	0,0	WP 000216574.1
TKF2	<i>N-acyl homoserine lactonase family protein (B. thuringiensis)</i>	94/97 152/153	97 99	0,0 0,0	WP 086401981.1

Kim et al. (2014) juga telah melaporkan bahwa *Micrococcus* sp. mampu mendegradasi AHL, namun hingga saat ini belum diketahui gen yang menyandikan enzim pendegradasi AHL-nya. Hal yang sama juga terjadi pada penelitian ini. Isolat-isolat yang teridentifikasi sebagai *Micrococcus* tidak terdeteksi memiliki gen *aiiA*. Kemungkinan gen penyandi enzim pendegradasi AHL pada bakteri ini berbeda dengan gen *aiiA*. Aktivitas AHL-laktonase dalam memblok regulasi rantai ekspresi faktor-faktor virulensi fitopatogen dapat dimanfaatkan untuk meningkatkan ketahanan tanaman terhadap penyakit melalui teknik rekayasa genetik, seperti pada porang atau suweg (*Amorphophallus konjac*) dan sawi (*Brassica rappa*) transgenik (Ban et al. 2009; Vanjildorj et al. 2009).

KESIMPULAN

Enam dari 79 isolat bakteri *quorum quencher* asal rizosfer dan filofosfer dari daerah Sukabumi, Tegal, Wonosobo, dan Kupang berpotensi sebagai agen biokontrol penyakit tanaman karena tidak menimbulkan respons hipersensitif pada tembakau. Aktivitas QQ enam isolat tersebut terbukti mampu menghambat patogenesis *D. dadantii*. Berdasarkan analisis sekuens gen 16S rRNA, keenam isolat tersebut teridentifikasi sebagai *M. aloeverae*, *B. cereus*, *B. aryabhatai*, dan *B. acidicerer*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian ini didanai oleh Hibah Penelitian Kerjasama Penelitian, Pengkajian, dan Pengembangan Pertanian Strategis (KP4S) dari Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian, Indonesia.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhdiya, A., Sukmadjaja, D. & Rusmana, I. (2017) Bioprospeksi *Bacillus* spp. penghasil AHL-laktonase sebagai biokontrol bakteri fitopatogen. Dalam: Wihardjaka, A., Dariah, A., Harsanti, E.S., Lina, H. & Hasyim, A. (editor) *Prosiding Seminar Nasional Inovasi Pestisida Ramah Lingkungan Mendukung Swasembada Pangan*. Pati, 6–7 September 2017. Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian, Kementerian Pertanian, Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumber Daya Lahan Pertanian.
- Ban, H., Chai, X., Lin, Y., Zhou, Y., Peng, D., Zhou, Y., Zou, Y., Yu, Z. & Sun, M. (2009) Transgenic *Amorphophallus konjac* expressing synthesized acyl-homoserine lactonase (*aiiA*) gene exhibit enhanced resistance to soft rot disease. *Plant Cell Reports*, 28, 1847–1855.
- Chan, K.G., Atkinson, S., Mathee, K., Sam, C.K., Chhabra, S.R., Cámara, M., Koh, C.L. & Williams, P. (2011) Characterization of N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria associated with the *Zingiber officinale* (ginger) rhizosphere: Co-existence of quorum quenching and quorum sensing in *Acinetobacter* and *Burkholderia*. *BMC Microbiology*, 11, 51.
- Chong, T. M., Koh, C.L., Sam, C.K., Choo, Y.M., Yin, W.F. & Chan, K.G. (2012) Characterization of quorum sensing and quorum quenching soil bacteria isolated from Malaysian tropical montane forest. *Sensors*, 12, 4846–4859.
- Chowdhary, P.K., Stewart, L., Lopez, C. & Haines, D.C. (2008) A single mutation in P450BM-3 enhances acyl homoserine lactone: Acyl homoserine substrate binding selectivity nearly 250-fold. *Journal of Biotechnology*, 135 (4), 374–376.
- Christianto, B. & Yogiara, Y. (2011) Screening of quorum quenching activity of bacteria isolated from ant lion. *Microbiology Indonesia*, 5, 46–49.
- Czajkowski, R., Perombelon, M.C.M., van Veen, J.A. & van der Wolf, J.M. (2011) Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: A review. *Plant Pathology*, 60, 999–1013.
- Dong, Y.H., Xu, J.L., Li, X.Z. & Zhang, L.H. (2000) *AiiA*, an enzyme that inactivates the acylhomoserine 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, 3526–3531.
- Fitriyah, D., Wahyudi, A.T. & Rusmana, I. (2015) Characterization of bacteria producing acyl homoserine lactone (AHL) lactonase from agricultural lands. *Advances in Environmental Biology*, 9, 140–148.
- Khoiri, S., Damayanti, T.A. & Giyanto (2017) Identification of quorum quenching bacteria and its biocontrol potential against soft rot disease bacteria, *Dickeya dadantii*. *AGRIVITA, Journal of Agricultural Science*, 39, 45–55.
- Kim, A.L., Park, S.Y., Lee, C.H. & Lee, J.K. (2014) Quorum quenching bacteria isolated from the sludge of a wastewater treatment plant and their application for controlling biofilm formation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24, 1574–1582.
- LaSarre, B. & Federle, M.J. (2013) Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77, 73–111.

- Liu, Q., Xiao, W., Wu, Z., Li, S., Yuan, Y. & Li, H. (2016) Identification of *Dickeya dadantii* as a causal agent of banana sheath rot in China. *Journal of Plant Pathology*, 98 (3), 503–510.
- Ma, A., Lv, D., Zhuang, X. & Zhuang, G. (2013) Quorum quenching in culturable phyllosphere bacteria from tobacco. *International Journal of Molecular Science*, 14, 14607–14619.
- Marchesi, J.R., Sato, T., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J., Dymock, D. & Wade, W.G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primer that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 795–799.
- Molina, L., Constantinescu, F., Michel, L., Reimann, C., Duffy, B. & Defago, G. (2003) Degradation of pathogen quorum-sensing molecules by soil bacteria: A preventive and curative biological control mechanism. *FEMS Microbiology Ecology*, 45, 71–81.
- Morohoshi, T., Someya, N. & Ikeda, T. (2009) Novel N-acylhomoserine lactone-degrading bacteria isolated from the leaf surface of *Solanum tuberosum* and their quorum-quenching properties. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73, 2124–2127.
- Muharam, A., Indrasti, R. & Hanudin (2012) Occurrence of *Dickeya dadantii* the causal agent of bacterial soft rot on orchid in DKI Jakarta and West Java Indonesia. *Crop Environmental*, 3 (1–2), 37–44.
- Nasser, W., Bouillant, M.L., Salmond, G. & Reverchon, S. (1998) Characterization of the *Erwinia chrysanthemi* *expl-expR* locus directing the synthesis of two N-acyl-homoserine lactone signal molecules. *Molecular Microbiology*, 29, 1391–1405.
- 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. *Microbiology Research*, 163 (6), 711–716.
- Pustelny, C., Albers, A., Buldt-Karentzopoulos, K., Parschat, K., Chhabra, S.R., Camara, M., Williams, P. & Fetzner, S. (2009) Dioxxygenase-mediated quenching of quinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology*, 16, 1259–1267.
- Romero, M., Diggle, S.P., Heeb, S., Camara, M. & Otero, A. (2008) Quorum quenching activity in *Anabaena* sp. PCC 7120: Identification of AiiC, a novel AHL-acylase. *FEMS Microbiology Letters*, 280, 73–80.
- Roy, V., Fernandes, R., Tsao, C.Y. & Bentley, W.E. (2010) Cross species quorum quenching using a native Aii-2 processing enzyme. *ACS Chemical Biology*, 5, 223–232.
- Sakr, M.M., Aboshanab, K.M.A., Aboulwafa, M.M. & Hassouna, N.A.H. (2013) Characterization and complete sequence of lactonase enzyme from *Bacillus weihenstephanensis* isolate P65 with potential activity against acyl homoserine lactone signal molecules. *BioMed Research International*, 2013, Article ID 192589.
- Sakr, M.M., Aboulwafa, M.M., Aboshanab, K.M.A. & Hassouna, N.A.H. (2014) Screening and preliminary characterization of quorum quenching activities of soil *Bacillus* isolates against acyl homoserine lactone of clinically isolate *Pseudomonas aeruginosa*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 10, 80–91.
- Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Saux-M., F-L., Achouak, W. & Gardan, L. (2005) Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder *et al.* 1953) Brenner *et al.* 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov and *Dickeya paradisiaca* comb. nov and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1415–1427.
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, Md.C. & Govindappa, M. (2012) Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A review. *Biocontrol Science and Technology* 22, 855–872.
- Sari, P.E., Rusmana, I. & Akhdiya, A. (2016) AHL-lactonase characteristics of *Bacillus thuringiensis* SGT3g and its effectiveness in inhibiting pathogenicity of *Dickeya dadantii*. *Malaysian Journal of Microbiology*, 12, 315–321.
- Song, C., Ma, H., Zhao, Q., Song, S. & Jia, Z. (2012) Inhibition of quorum sensing activity by ethanol extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, S7, 001.
- Vanjildorj, E., Song, S.Y., Yang, Z.H., Choi, J.E., Noh, Y.S., Park, S., Lim, W.J., Cho, K.M., Yun, H.D. & Lim, Y.P. (2009) Enhancement of tolerance to soft rot disease in the transgenic Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) inbred line, Kenshin. *Plant Cell Reports*, 28 (10), 1581–1591.
- Végh, A., Némethy, Z., Salamon, P., Mándoki, Z. & Palkovics, L. (2014) First report of bacterial wilt on chrysanthemum caused by *Dickeya chrysanthemi* (syn. *Erwinia chrysanthemi*) in Hungary. *Plant Disease*, 98 (7), 988.
- White, C.E. & Finan, T.M. (2009) Quorum quenching in *Agrobacterium tumefaciens*: Chance or necessity? *Journal of Bacteriology*, 191, 1123–1125.
- Yin, X.T., Xu, L., Fan, S.S., Xu, L.N., Li, D.C. & Liu, Z.Y. (2010) Isolation and characterization of an AHL lactonase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26 (8), 1361–1367.
- Zhu, W., Magbanua, M.M. & White, F.F. (2000) Identification of two novel *hrp*-associated genes in the *hrp* gene cluster of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Journal of Bacteriology*, 182, 1844–1853.
- Zou, L., Wang, X., Xiang, Y., Zhang, B., Li, Y., Xiao, Y., Wang, J., Walmsley, A.R. & Chen, G.Y. (2006) Elucidation of the *hrp* clusters of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* that control the hypersensitive response in nonhost tobacco and pathogenicity in susceptible host rice. *Applied and Environmental Microbiology*, 72 (9), 6212–6224.