بررسی فیلوژنتیکی عامل پوسیدگی نرم ارکیده در گلخانه‌های منطقه پاکدشت

Phylogenetic study of the bacterium causing orchid soft rot disease in Pakdasht region

طیبه یوسفیه[1]، ابوالقاسم قاسمی[2] و علی علیزاده علی‌آبادی[3]

دریافت: 1392/10/13 پذیرش: 1393/2/25

چکیده

ارکیده از با ارزش‌ترین گل‌های زینتی و پوسیدگی نرم از بیماری‌های مهم این گیاه می‌باشد. در بهار سال 1392 از گلخانه‌های منطقه پاکدشت تهران بازدید و از گیاهان دارای علائم پوسیدگی نرم نمونه‌برداری شد. جداسازی باکتری در محیط کشت‌های NA و EMBA انجام و بیماری‌زایی جدایه‌های آن در برگ‌های ارکیده به اثبات رسید. براساس ویژگی‌های مورفولوژیکی، آزمون‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی، جدایه‌ها گرم منفی و بی‌هوازی اختیاری، تولید اندول، احیاء نیترات، حساسیت به اریترومایسین و داشتن فعالیت فسفاتاز، جدایه‌های مذکور به جنس *Dickeya* تعلق داشتند. جدایه‌ها بر اساس تکثیر ژن پکتات‌لیاز با استفاده از آغازگر ADE1/ADE2 و عدم تکثیر با آغازگرهای EXPECCF/R و Y1/Y2، گونه‌ای از جنس *Dickeya* شناسایی شد. توالی قطعات تکثیر شده ژن‌های ریکامبیناز آ و RNA پلیمراز زیر واحد بتا تعدادی از جدایه‌ها به میزان 99 تا 100 درصد با نمونه‌های *Dickeya* sp. موجود در بایگانی NCBI شباهت داشتند ولی با گونه‌های توصیف شده این جنس متفاوت بودند.

واژگان کلیدی: ارکیده، پوسیدگی نرم، تعیین توالی، *Dickeya* sp، PCR.

1- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، ورامین.

2و3- به ترتیب استادیار و دانشیار، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، تهران

نویسنده مسئول مکاتبات: **aghasemi@yahoo.com**

مقدمه

گیاه زینتی ارکیده دارای گل‌های زیبا با رنگ‌های بسیار متنوع می‌باشد و یکی از با ارزش‌ترین گیاهان زینتی است که هر نوعی از آن، آب و هوای خاصی را می‌طلبد. ارکیده‌ها براساس درجه حرارت شامل ارکیده‌های گرمسیری (*Phalaenopsis* و *Vanda*)، ارکیده‌های گلخانه سرد (*Sypripedium* و *Cymbidium*)، ارکیده‌های گلخانه گرم (*Cattleya* و *Oncidium*) گروه‌بندی می‌شوند (متقی، 1386).

ارکیده گیاهی است، که برگ‌های نیزه‌ای به رنگ سبز تیره تولید می‌کند و به صورت شاخه بریده عرضه می‌گردد و تکثیر آن‌ها از طریق تقسیم بوته، پیاز و کشت بافت صورت می‌گیرد (متقی، 1386). این گیاهان دو تا سه ماه در سال گل می‌دهند، و گل‌ها و شکوفه‌هایی که از این گیاه چیده شود، تا دو ماه دوام دارد. بیماری باکتریایی پوسیدگی نرم ارکیده یکی از بیماری‌های مهم و خسارت‌زا در گلخانه‌های پرورش این محصول بوده و علائم این بیماری ابتدا به صورت نقاط آبسوخته در برگ‌ها، دمبرگ و ریشه ظاهر می‌شود. با پیشرفت بیماری لکه‌های بزرگ‌تری از سطح برگ به صورت خیسی نمایان می‌شود. که در تماس با دست لزج و لهیده می‌شود.

بیماری پوسیدگی نرم ارکیده با عامل *Dickeya* sp. تا کنون از کشورهای فلوریدای آمریکا توسط کاتینگ و پالماتیر (Cating and Palmateer, 2011) و یکی از استان‌های چین توسط لی و همکاران (Li *et al*., 2009) گزارش شده است. در اندونزی این بیماری خسارت زیادی به تولیدکنندگان ارکیده وارد می‌کند (Tri *et al*., 2014). در تمامی این گزارش‌ها به گونه آن‌ها اشاره‌ای نشده و آن را متفاوت از سایر گونه‌های شناخته شده معرفی کرده‌اند. به دلیل مشاهده این بیماری در گلخانه‌های ارکیده ایران و ارزش اقتصادی بالای گل‌های ارکیده و خسارتی که بیماری پوسیدگی نرم باکتریایی به آن در شرایط گلخانه وارد می‌کند، شناسایی عامل بیماری هدف این تحقیق بوده است.

مواد وروش‌ها

برگ، طوقه و ریشه بوته‌های ارکیده با علائم پوسیدگی نرم از گلخانه‌های منطقه پاکدشت جمع‌آوری و نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها ابتدا با آب معمولی و سپس با آب مقطر شسته شدند. برای جداسازی باکتری قطعاتی از بافت آلوده در آب مقطر سترون خرد شده و پس از پنج دقیقه، یک لوپ از سوسپانسیون حاصل روی محیط کشت NA (Nutrient Agar) و EMBA (Eosin methylene blue Agar) مخطط گردید. پس از دو تا سه روز نگهداری در دمای 28 درجه سانتی‌گراد تک کلونی‌های به رنگ سبز متالیک از محیط کشت EMBA و کلنی‌های روشن روی NA انتخاب و تکثیر گردیدند (Shaad *et al*., 2001).

ویژگی‌های فنوتیپی بیمارگر

برای تعیین ویژگی‌های باکتری عامل آزمون‌های متعدی شامل آزمون‌های گرم، رشد هوازی و بی‌هوازی، اکسیداز، کاتالاز، فسفاتاز، تولید اندول، لسیتیناز، احیای نیترات به نیتریت، تحمل نمک طعام 5 درصد، رشد در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، تولید مواد احیاءکننده از سوکرز، تولید گاز H_2S از سیستئین، هیدرولیز ژلاتین، نشاسته، اسکولین، تولید لوان از سوکروز، حساسیت استرین‌های مورد بررسی نسبت به اریترومایسین و مصرف کربوهیدرات مختلف در محیط پایه آیر به روش شاد و همکاران (Shaad *et al*., 2001) انجام شد.

اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها

بیماری‌زایی جدایه‌ها با تزریق سوسپانسیون 10^7 سلول در میلی‌لیتر باکتری به دو روش تزریق به قطعات بریده برگ در ظروف پتری و برگ متصل به گیاه ارکیده انجام شد. نتایج برگ‌های بریده 24 ساعت و برگ‌های متصل تا یک هفته بعد مورد ارزیابی قرار گرفت (Tri *et al*., 2014).

روش‌های مولکولی برای شناسایی باکتری عامل بیماری

استخراج DNAی جدایه‌ها به روش لیز قلیایی صورت گرفت (Rademaker *et al*., 2000) و به همراه استرین‌های استاندارد *Pectobacterium carotovorum*، *P. atrosepticum* و *Dickeya dianthicola* براساس برنامه تکثیر ژن کدکننده پکتات‌لیاز Y(pelY) در پکتوباکتریوم‌ها به روش داراس و همکاران (Darasse *et al*., 1994) بر اساس توالی آغازگرهای Y1/Y2 و جفت آغازگر ADE1/ADE2 (جدول 1) مربوط به ژن پکتات‌لیاز ADE (PelADE) در جنس *Dickeya* به روش نسار و همکاران (Nassar *et al*., 1996) و نیز آغازگرهای EXPCCR/EXPCCF به روش کانگ و همکاران (Kang *et al*. 2003) در ترموسایکلر مدل Mj - research, Bio Rad انجام و در ژل آگارز 1/2 درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. برای تعیین جایگاه فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد نظر، قطعه 730 جفت بازی از ژن *Recombinase* A با استفاده از آغازگرهای recA1/recA2 تکثیر و قطعه 637جفت بازی ژن *RNA Polymerase beta sub unit* با استفاده از آغازگر *rop*B CM81/ CM32 به روش والرون و همکاران (Waleron *et al*., 2002) تکثِیر شد. قطعات تکثیر شده توسط شرکت (Macrogen, Korea) با استفاده از دستگاه اتوماتیک ABI 3730 XL تعیین توالی گردید. توالی‌ها با برنامه BLAST (NCBI)، با توالی‌های دیگر موجود در بانک ژن به روش آلتشول (Altschul, 1990) مقایسه شدند. دندروگرام مربوطه با نتایج موجود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار Mega5 به‌روش Bootstrap-Neighbour Joining به روش تامورا و همکاران (Tamura *et al*. 2011) ترسیم گردید.

جدول 1- توالی آغازگرهای اختصاصی EXPCCF/R، Y1/Y2 و ADE1/2 و آغازگر ژن خانه‌دار ریکامبیناز آ (recA1/2) و آران‌ای پلیمراز (CM81/32)

Table 1. Specific primer sequencing of EXPCCF/R, Y1/Y2 and ADE1/2 and two housekeeping genes primer of Recombinase A and RNA polymerase beta sub unit

نام آغازگر	توالی	اندازه قطعه
Primer	Sequence	Size
Y1/Y2	(5`TTACCGGACGCCGAGCTGTGGCGT3`)/ (5`CAGGAAGATGTCGTTATCGCGAGT3`)	434bp
ADE1/ADE2	(5`GATCAGAAAGCCCGCAGCCAGAT3`)/ (5`CTGTGGCCGATCAGGATGGTTTTGTCGTGC 3)	420bp
EXPCF/EXPCR	(5`GAACTTCGCACCGCCGACCTTCTA3`)/ (5`GCCGTAATTGCCTACCTGCTTAAG3`)	550bp
recA1/recA2	(5`GGTAAAGGGTCTATCATGCG3`)/ (5`CCTTCACCATACATAATTTGGA3`)	730bp
rpoB (CM81/CM32)	(5`CAG TTC CGC GTT GGC CTG3`)/ (5`CGGACCGGC CTG ACG TTG CAT3`)	637bp

نتایج وبحث

از نمونه‌های دارای علائم پوسیدگی نرم ارکیده 21جدایه جداسازی و بیماری‌زایی آن‌ها به اثبات رسید (شکل 1). جدایه‌های مورد نظر گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت بوده و ورقه‌های سیب زمینی را پس از 24 ساعت له کردند. در تولید رنگ فلورسانت، هیدرولیز نشاسته، تحمل نمک طعام 5 درصد و تولید مواد احیاءکننده از سوکروز منفی بودند و در دمای 37 درجه سلسیوس رشد نمودند.

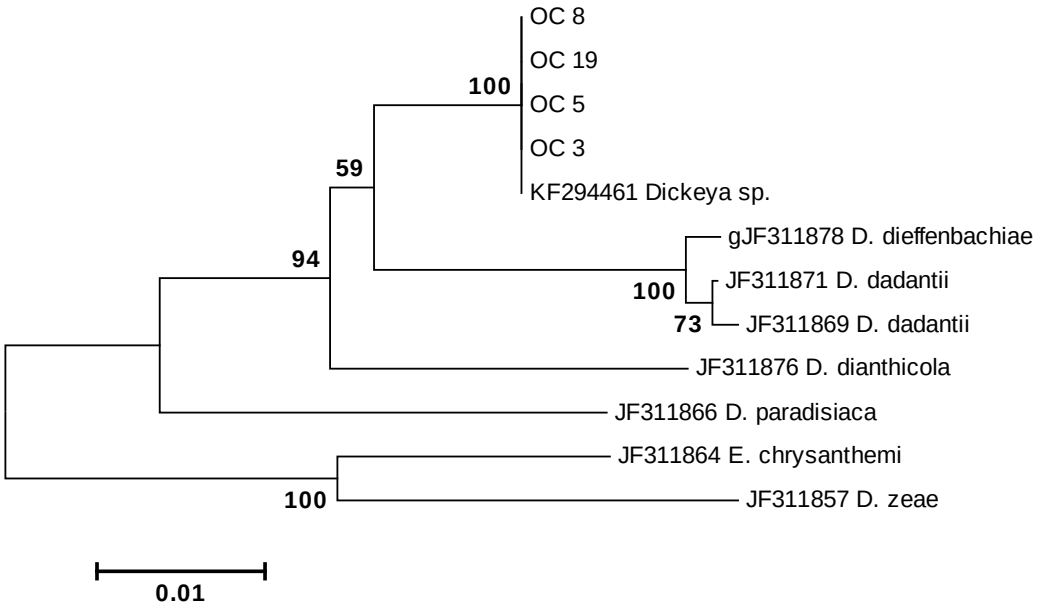
شکل 1- اثبات بیماری‌زایی در برگ‌های ارکیده با جدایه‌های .sp *Dickeya*

Fig. 1. Pathogenisity test of *Dickeya* sp. strains on Orchid leaves

جدایه‌ها در هیدرولیز ژلاتین، اسکولین، کازئین و فعالیت لسیتیناز، فسفاتاز و اوره‌آز، احیای نیترات و تولید اندول مثبت بودند و در تزریق به برگ‌های توتون پس از گذشت 24 ساعت واکنش فوق حساسیت ایجاد کرده و نسبت به آنتی بیوتیک اریترومایسین حساس بودند. همچنین جدایه‌ها از قندهای ملی بیوز و مانیتول استفاده نموده و در استفاده از، رافینوز، لاکتوز، مالتوز و نمک مالونات مثبت بودند. در استفاده از آرابیتول و اینولین منفی بودند. این ویژگی‌ها مشابه با مواردی بود که قبلا در چین و ایالات متحده توسط لی و همکاران (Li *et al*. 2009) و کاتینگ و پالماتیر (Cating and Palmateer 2009; 2011) گزارش شده بود.

تکثیر جدایه‌ها با جفت پرایمر طراحی شده برای جنس پکتوباکتریوم نسبت به ژن *pel*Y که برای تفکیک جنس پکتوباکتریوم از سایر جنس‌های عامل پوسیدگی نرم توسعه یافته است و نیز با آغازگرهای EXPCCR/EXPCCF منفی بوده و تنها در گونه‌های پکتوباکتریوم استاندارد مورد بررسی قطعه‌ای به اندازه 434 و 550 جفت بازی به ترتیب تکثیر شد و قادر به تکثیر این قطعه‌ها در جنس *Dickeya*ی استاندارد و جدایه‌های مورد بررسی نبود و تنها با استفاده از جفت آغازگر ADE1/ADE2 قطعه نوکلئوتیدی 420 جفت بازی تکثیر گردید که نشان‌دهنده تعلق استرین‌های مورد بررسی به جنس *Dickeya* بود. در تکثیر ژن‌های *Recombinase* A و *RNA Polymerase beta sub unit* نمونه‌های پکتوباکتریوم و دیکیای استاندارد و جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق، یک قطعه با اندازه تقریبی 730 جفت بازی را در ژل آگارز نشان دادند که تعیین توالی ناحیه *Recombinase* A و یک قطعه در محدوده 637 جفت بازی ژن *RNA Polymerase beta sub unit* نشان داد، جدایه‌های مذکور به میزان، 100 درصد با نمونه‌های .sp *Dickeya* موجود در بایگانی NCBI بر اساس توالی ژن *rpo*B شباهت داشته و به این جنس تعلق دارند و با گونه‌های دیگر این جنس متفاوت می‌باشند، به‌طوری که با گونه *D. dianthicola*، 97 درصد شباهت نشان داد. با گونه‌های دیگر *Dickeya* از جمله *D. dadanti* 97 درصد شباهت نشان داد، در حالی که با گونه دیگر *D. paradisica* 95 درصد وجه تشابه داشتند و همچنین با گونه‌های *D. zeae* و *D. chrysanthemi* 94 - 93 درصد شباهت نشان دارند (شکل 2).

بر اساس توالی ژن *recA* میزان قرابت جدایه‌های عامل پوسیدگی نرم ارکیده با جدایه‌های نزدیک به آن‌ها در بانک ژن (NCBI) با نرم افزار Blast نشان داد که جدایه‌های مذکور در توالی ژن *recA* به میزان 100 در صد با نمونه‌های .sp *Dickeya* در بایگانی NCBI شباهت دارد و با گونه‌های دیگر تفاوت نشان می‌دهد. نمونه‌های مذکوربا *D. dadantii* و *D. dieffenbachiae* 95 درصد قرابت داشته و با گونه‌های دیگر جنس *Dickeya* به‌نام *D. dianticola* قرابت 94درصد داشت و وجه تشابه آن‌ها با *D. zeae* و *D. chrysanthemi* 88 درصد بود (شکل 3). این تحقیق نشان داد که گونه‌های .sp *Dickeya* از نظر فیلوژنتیکی با گونه‌های شناخته شده متفاوت بوده و در گروهی مجزا قرار گرفتند.

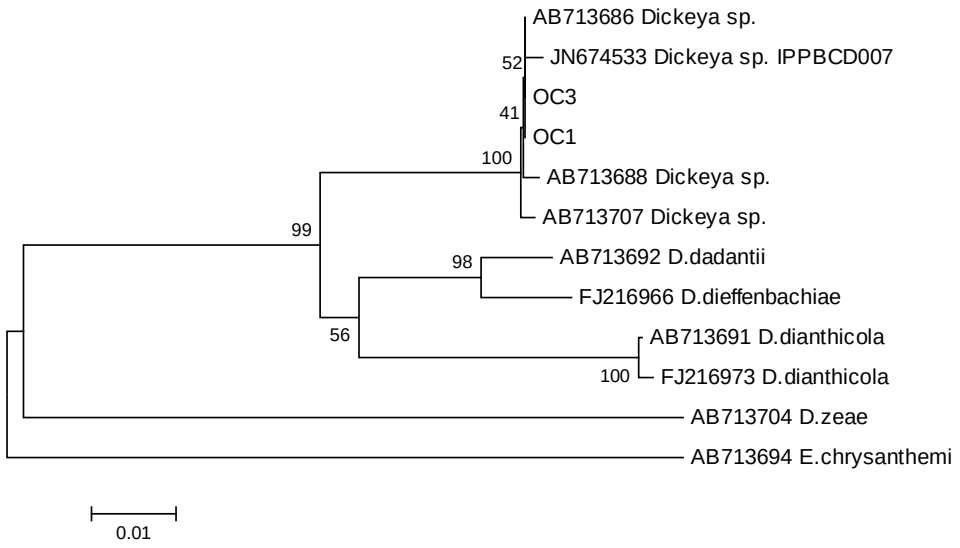


شکل 2- دندروگرام فیلوژنتیکی باکتری *Dickeya* sp. جدا شده از ارکیده در مقایسه با تعدادی از گونه‌های شناخته شده در خانواده انتروباکتریاسه بر اساس توالی ژن *RNA Polymerase beta subunit* با استفاده از نرم افزار مگا-5

Fig. 2. Phylogenetic tree showing the relationship of the Orchids soft rot bacterial strains on the basis of *RNA Polymerase beta subunit* sequence alignment, a phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method. Stability of the tree was assessed by 1, 000 bootstrap replications by Mega5 software.

براساس گزارش‌های لی وهمکاران (2009) وکاتینگ وپالماتر (2011و 2009) تعداد محدودی استرین از گونه‌های مختلف این جنس به طور کامل تعیین ویژگی شده‌اند و شناسایی گونه‌های *Dickeya* هنوز دچار مشکل بوده و نیاز به بررسی کامل‌تر از نمونه‌های متعدد در مناطق مختلفی است که تا کنون این بیماری گزارش شده است ابزارهایی نظیر آنالیز چندژنی و همولوژی DNA لازم است تا بتوان گونه یا گونه‌های جدید را نام‌گذاری نمود. باتوجه به این‌که این بیماری روی ارکیده برای بار اول از ایران گزارش می‌شود، نتایج کلی نشان داد باکتری عامل بیماری یک گونه‌ای از *Dickeya* است که با سایر گونه‌های شناخته شده از نظر فنوتیپی و ژنتیکی متفاوت می‌باشد. براساس نتایج این تحقیق در آزمون‌های فنوتیپی و آزمون‌های مبتنی بر DNA از نظر پرایمرهای اختصاصی *Dickeya* sp. شناسایی شد که با گونه‌های شناخته شده بانک ژن شباهت در سطح گونه ندارد. با نتایجی که در کشورهای آمریکا و چین بدست آمده نشان می‌دهد که عامل بیماری یک گونه‌ای جدید از Dickeya است و تا کنون نام گونه‌ای برای آن تعیین نشده است.

با وجود این‌که ارکیده در ایران تولید نمی‌شده و گیاه وارداتی است منشاء باکتری عامل بیماری در پاکدشت از کشورهای صادرکننده می‌باشد. در یک تحقیقی که در اندونزی صورت گرفته است عامل بیماری پوسیدگی نرم ارکیده باکتری *D. dadantii* و *Pseudomonas viridiflava* براساس خصوصیات مورفولوژی و فنوتیپی تشخیص داده شد که با خصوصیات باکتری مورد بررسی در ایران متفاوت بوده‌است (Muharam *et al*., 2012). در تایوان و تایلند از کشورهای صادرکننده ارکیده به ایران نیز باکتری عامل بیماری پوسیدگی نرم ارکیده *D. chrysanthemi* و *D. zeae* گزارش شده‌است که با نتایج فیلوژنتیکی و منابع موجود در پایگاه ژنتیکی و نتایج فنوتیپی باکتری عامل بیماری جداسازی شده از ایران مشابه جدایه‌هایی که از چین و فلوریدا شناسایی شده است به *Dickeya* sp. تعلق داشته و با گونه‌های معرفی شده متفاوت می‌باشد (Cating, 2010).



شکل 3- دندروگرام فیلوژنتیکی باکتری .sp *Dickeya* جدا شده از ارکیده در مقایسه با تعدادی از گونه‌ها و جنس‌های شناخته شده در خانواده انتروباکتریاسه بر اساس توالی ژن A *Recombinase* با استفاده از نرم افزار مگا-5

Fig. 3. Phylogenetic tree showing the relationship of the orchids soft rot bacterial strains on the basis of *recA* sequence alignment. The tree was constructed using the neighbour-joining method. Stability of the tree was assessed by 1, 000 bootstrap replications by Mega5 software.

منابع References

متقی، ح. 1386. گل‌ها و گیاهان زینتی آپارتمانی، گونه‌ها و هیبریدهای گلدار برگ‌سبز، برگ‌رنگی. انتشارات خود کفایی، قم. 86 صفحه.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. 1990. Basiclocal alignment search tool. Journal of Molecular Biology. 215: 403-410.

Cating, R. A. 2010. Towards Orchid IPM: Tools and molecular techniques for the diagnosis and management of selected orchid arthropod pests and diseases in Florida. A dissertation presented to the Graduate School of the University of Florida in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Doctor of Philosophy, 175pp.

Cating, R. A. and Palmateer, A. J. 2009. First report of a bacterial soft rot on *Tolumnia Orchids* caused by a *Dickeya* sp. in the United States. Plant Disease 93: 12, 1354.

Cating, R. A. and Palmateer, A. J. 2011. Bacterial soft rot of *Oncidium* orchids caused by a *Dickeya* sp. (*Pectobacterium chrysanthemi*) in Florida. Plant Disease 95(1): 74-81.

Darrasse, A., Priou, S., Kotoujansky, A. and Bertheau, Y. 1994. PCR and restriction fragment length polymorphism of a *pel* gene as a tool to identify *Erwinia carotovora* in relation to potato diseases. Applied and Environmental Microbiology 60: 1437-1443.

Kang, H. W., Kwon, S. W. and Go, S. J. 2003. PCR-based specific and sensitive detection of Pectobacterium carotovora subsp. carotovora by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band. Plant Pathology 52: 127-133.

Li, B., Qiu, W., Fang, Y. and Xie, G. L. 2009. Bacterial stem rot of *Oncidium* orchid caused by a *Dickeya* sp. (ex *Pectobacterium chrysanthemi*) in Mainland China. Plant Disease 93(5) 552.

Muharam, A., Indrasti, R. and Hanudin. 2012.Occurrence of *Dickeya dadantii* the causal agent of bacterial soft rot on orchids in dki Jakarta and west Java Indonesia.Crop Environent 3: 37-44.

Nassar, A., Darrasse, A., Lemattre, M., Kotoujansky, A., Dervin, C., Vedel, R. and Kotoujansky, A. 1996. Characterization of *Erwinia chrysanthemi* by pectinolytic isoenzyme polymorphism and restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments of pel genes. Applied and Environmental Microbiology 62: 2228–2235.

Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vatuerin, L., Vatuerin, P. and de Bruijn, F.J. 2000. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: Xanthomonas as a model system. Systematic Microbiology 50: 665-677.

Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Third ed. APS Press, St. paul, Minnesota. 373 pp.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei M. and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28: 2731-2739.

Tri, J., Subandi, A., Kusumandari, N., Wibowo, A. and Priyatmojo, A. 2014. Activities of plant cell wall-degrading enzymes by bacterial soft rot of orchid. Archives of Phytopathology and Plant Protection 47(10):1239-1250.

Waleron, M., Waleron, K., Podhajska, A. J. and Lojkowska, E. 2002. Genotyping of bacteria belonging to the former Erwinia genus by PCR-RFLP analysis of a recA gene fragment. Microbiology 148: 583–595.