آنالیز فیلوژنی باکتری های همراه با بیماری چوب خیس در مشهد

فاطمه سلیمان[۱] ، محمد زکی عقل[۲]، سعید هاتفی[۲]، نرگس پور طوسی[۳]
[۱]دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
[۲]گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ایران
[۳]سازمان پارکها و فضای سبز، شهرداری مشهد، ایران
fateme_soleiman@yahoo.com

چکیده

بیماری چوب خیس یک بیماری باکتریایی در درختان چوب سخت است که باعث پوسیدگی چوب مرکزی و ترشح شیره از تنه درخت میشود. به منظور شناسایی میکروارگانیسمهای همراه با علائم چوب خیس در ساقه درختان توت و پالونیا در سطح شهر مشهد بخشی از ژن 16SrDNA پرگنه ها جداسازی و سپس همانند سازی و تعیین توالی شد. نتایج مقایسه توالی بدست آمده با بانک ژن نشان داد که پرگنه های جداسازی شده شباهت زیادی به باکتری های *Bacillus pumilus* و *Bacillus mojavensis* دارند.

کلمات کلیدی : چوب خیس، فیلوژنی

مقدمه

بیماری چوب خیس یا پوسیدگی کف آلود چوب یک بیماری غیر عادی در درختان چوب سخت است که باعث پوسیدگی در چوب مرکزی درخت میشود. این بیماری در دامنه وسیعی از درختان سایه دار و جنگلی نظیر چنار، زبان گنجشک، صنوبر، بلوط، افرا، توت، نارون، بید، صنوبر، و بازدانگان مشاهده میشود (۴). علائم بیماری در تنه، ساقه های مسن یا ریشه درخت مشاهده میشود. علائم عمده بیماری تغییررنگ چوب بخصوص درمرکز تنه درخت است که توام با حالت خیسی و پوسیدگی است (۴و۷). **دراین مناطق مقدار زیادی گاز تولید شده که همراه با ترشحات کف آلود از بافت خارج میشود** (۴و۷). این بیماری در بافتهای جوان یا چوب نرم وجود ندارد. آوند چوبی در گیاهان مبتلا به عارضه تیره تر بوده و مایع آوندی به چوب نرم نفوذ میکند. بافتهای بیمار آبسوخته، تیره رنگ و بدبو هستند و توسط بافت سالم احاطه میشوند. (۴و۷) از محل زخمها ترشحات تیره یا سفید رنگی ترشح میشود که سطح زخم و تنه درخت را پوشش میدهد. به علت اسیدیته پائین شیره ترشح شده بافت کامبیوم تخریب شده و امکان تولید کالوز در محل زخم و بهبود بیماری وجود ندارد (۴و۷). در درختان آلوده علائم دیگری از جمله زردی و پژمردگی شاخساره و خشک شدن سرشاخه ها نیز مشاهده می شود (۴و۷). چوب خیس یک بیماری باکتریائی در چوب درختان زنده است. باکتری های از گونه های Bacillus ، Lactobacillus ، Entrobacter ، Erwinia ، Pseudomonas ، Xanthomonas و Clostridium از گیاهان بیمار جداسازی شده اند (۶و۸). بیماری چوب خیس معمولا یک عارضه کشنده نیست هر چند که باعث زوال تدریجی درخت میشود لیکن در جنگلها و صنایع چوب اهمیت اقتصادی زیادی دارد (۴). علائمی مشابه با بیماری چوب خیس در درختان توت و پالونیا در سطح شهر مشهد مشاهده میشود. برای تعیین عوامل همراه با عارضه چوب خیس در مشهد پس از جدا سازی، تعیین ترادف قسمتی از دی. ان. ای. ریبوزومی آنها انجام شده است.

مواد و روش ها

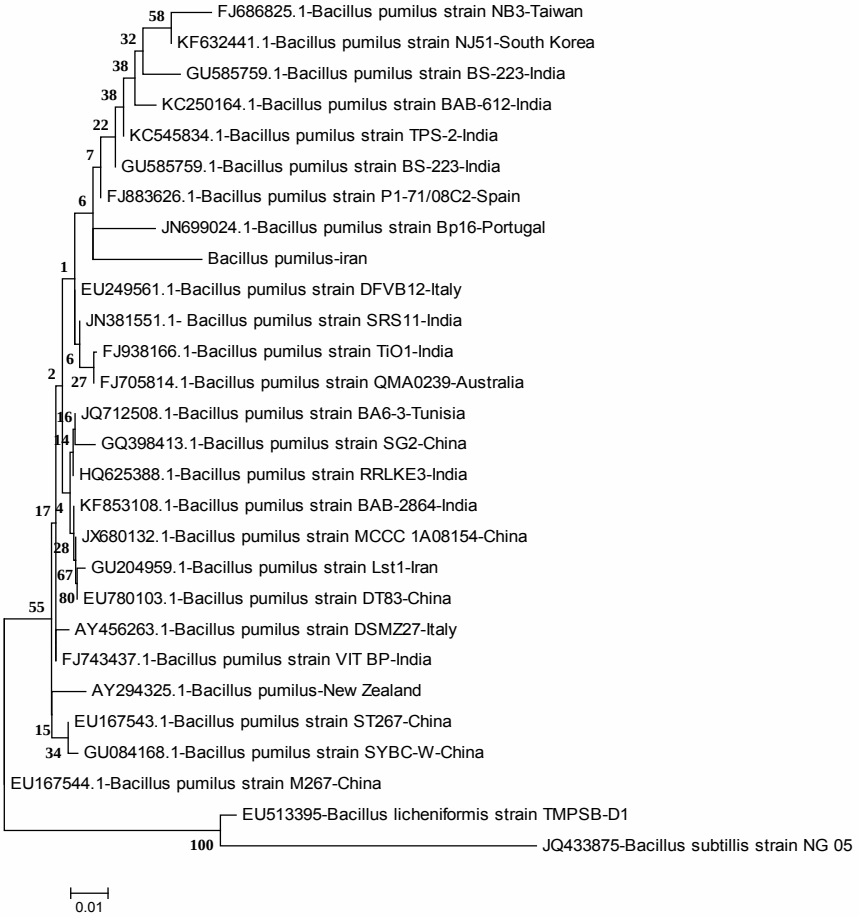
به منظور شناسایی میکروارگانیسمهای همراه با عارضه چوب خیس از ساقه درختان توت و پالونیا که علائم ترشح شیره از تنه اصلی را داشتند نمونه برداری و نمونه ها پس ازضدعفونی سطحی در محیط آگار غذایی کشت و در دمای ۲۸ درجه سانتی گراد قرار داده شده و پرگنه های ایجاد شده خالص سازی شدند. به منظور شناسایی باکتری دی. ان. ای. تعدادی ازجدایه ها به روش لیز قلیایی استخراج شده و بخشی از ژن 16SrDNA به وسیله آغازگرهای عمومی(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 27F و 1492R (ACGGTTACCTTGTTAGGACTT) تکثیر شد (۱۰) و محصول واکنش پس از خالص سازی تعیین توالی شد. ترادف بدست آمده به وسیله نرم افزار DNASTAR Ver5.00 بررسی و ترادف نهایی حاصل از خوانش دو رشته بدست آمد. ترادف بدست آمده بوسیله نرم افزار BLAST با ترادفهای موجود در بانک ژن مقایسه شد. میزان شباهت ترادفهای بدست آمده با ایزوله های مشابه بانک ژن بوسیله نرم افزار SDT محاسبه شد (۵). آنالیز فیلوژنی جدایه ها بروش neighbor- joining توسط نرم افزار MEGA 5.1 انجام شد (۹).

نتایج

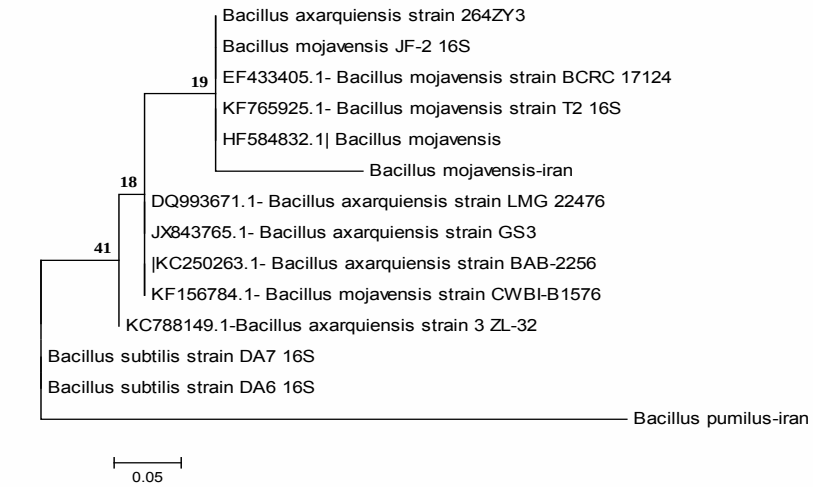
درختان بیمار دارای زوال تدریجی بوده و خطوط تیره رنگ در پوست آنها مشاهده میشود. ازمنافذ یا ترکهای موجود در تنه و سرشاخه ها و زخمهای ناشی از هرس ترشحات کف آلود شیری یا سیاه رنگ جاری بود که بروی تنه درخت پخش میشود (شکل ۱)(۴و۷). از چوب نمونه های کشت داده شده دو تیپ کلونی جداسازی شد. برخی از پرگنه ها بروی محیط آگار غذایی رشته ای شکل، منشعب و سفید رنگ بودند در حالیکه سایر پرگنه ها چروکیده با حاشیه نامنظم و تیره رنگ بودند. پرگنه های مشابه از چوب درختان توت و پالونیا از مناطق مختلف مشهد جداسازی شد. در واکنش زنجیره ای پلی مراز قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی از 16SrDNA سلولهای باکتری همانند سازی شد. نتایج آزمون بلاست نشان داد که توالیهای نوکلئوتیدی بدست آمده شباهت زیادی به باکتری های *Bacillus pumilus* و *Bacillus mojavensis* دارد. پرگنه های رشته ای، منشعب و سفید رنگ *Bacillus pumilus* در حالیکه پرگنه های چروکیده با حاشیه نامنظم و تیره رنگ *Bacillus mojavensis* شناسایی شدند (۸). 16S rDNA جدایه *B.pumilus* با سایر جدایه های بانک ژن ۹۰/۲-۹۷/۶ درصد شباهت داشت. در دندروگرام ترسیم شده این جدایه با جدایه های پرتغال، اسپانیا، کره، تایوان و بعضی از ایزوله های هند در یک گروه قرار گرفتند (شکل ۲). شباهت این ایزوله با جدایه دیگر *B.pumilus* گزارش شده از ایران ۹۸,۱ درصد بود. جدایه *B.mojavensis* نیز ۸۸/۷-۹۰/۲ درصد با جدایه های بانک ژن تشابه داشت. در دندروگرام ترسیم شده ترادف حاصل همراه با سایر ایزوله های *B.mojavensis* در یک شاخه قرار گرفتند و از گونه های نزدیک به آنها همچون *B.axarquiensis* و*B.subtilis* جدا شدند (شکل ۳) (۲). گونه های *Bacillus* و *Lactobacillus* از درختان با علائم چوب خیس پیشتر نیز جداسازی شده اند (۶و۸). همچنین هر دو گونه *B.pumilus* و *B.mojavensis* به عنوان باکتری های اپی فیت یا محرک رشد[1] از گیاهان متعددی جداسازی شده اند (۹)

[1] Plant growth prompting rhizobacteria (PGPR).

شکل ۱ : علائم بیماری چوب خیس در توت (الف) و پالونیا (ب). مرفولوژی پرگنه های *Bacillus pumilus* (ج) و *Bacillus mojavensis* (د) خالص سازی شده از درختان آلوده



شکل ۲ : دندروگرام رابطه جدایه *Bacillus pumilus* جداسازی شده از توت با سایر جدایه های بانک ژن. رسم دندروگرام به روش neighbor joining به وسیله نرم افزار MEGA5 با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی bootstrape انجام شده است.



شکل ۳ : دندروگرام رابطه جدایه *Bacillus mojavensis* جداسازی شده از توت با سایر جدایه های بانک ژن. رسم دندروگرام به روش neighbor joining به وسیله نرم افزار MEGA5 با ۱۰۰۰ تکرار در ارزیابی bootstrape انجام شده است.

منابع

1-**Bacon, C.W. and Hinton, D.M. (2011).** Bacillus mojavensis: its endophytic nature, thesurfactins, and their role in the plant response to infection by fusariumverticillioides. In: D.K. Maheshwari (ed.), Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses.

2-**Carola, S.,Farrows, J.A.E.,Allbank, A. and Ollinsd, D.C. (1991).** Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed bycomparative analysis of small-subunit-ribosomal RNAsequences
Letters in Applied Microbiology. 13: 202-206.

3-**Maheshwari, D.K.(2011)**. Bacteria in Agrobiology: Plant Growth Responses. DOI 10.1007/978-3-642-20332-9.

4-**Mohan, S.K., Colt, W.M. and Barney, D.L. (1990)**. Bacterial wetwood and slime flux of trees. Technical sheet of university of Idaho.

5-**Muhire B, Martin DP, Brown JK, Navas-Castillo J, Moriones E, Zerbini FM, Rivera-Bustamante R, Malathi VG, Briddon RW, Varsani A.(2013)** A genome-wide pairwise-identity-based proposal for the classification of viruses in the genus *Mastrevirus* (family *Geminiviridae*).

6-**Murdoch, C.W. and Campana, R.J. (1983)**. Bacterial species associated with wetwood of elm. Phytopathology 73: 1270-1273.

7 **Schink,B., Ward, J.andZeikus, J.G. (1981)**. Microbiology of wetwood: role of anaerobic bacterial populations inliving trees. J. Gen. Microbiology 123: 313-322.

8-**Schink, B. and Ward, J.(1984).** Microaerobic and anaerobic bacterial activities involved in formationof wetwood and discoloured wood. IAWA Bulletin. 5: 105-109.

9-**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.

10-**Weisburg, W. G., S. M. Barns, D. A. Pelletier, and D. J. Lane. 1991**. 16Sribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. **173:**697–703.

Phylogenetic analysis of the bacteria associated with wetwooddisease in Mashhad

Soleiman, F.[1], Zakiaghl, M.[2], Hatefi, S.[2], Pour-toosi, N.[3]

1- M. Sc. student of Plant Pathology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
2- Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
3- Parks and Green Space Organization, Municipality of Mashhad, Iran
Fateme_soleiman@yahoo.com

Abstract

Wetwood disease is a bacterial disorder in hardwood trees, induce heart rot and fluxing. To investigate bacteria associated with wetwood disease, microflora were isolated from stems of morus and *Paulownia* trees and partial length of 16S rDNA were amplified in PCR and sequenced. Analysis of 16s rDNA sequences indicated presence of *Bacillus pumilus and Bacillus mojavensis* in microflora of diseased trees.
Keywords: wet wood, gene sequencing, gene bank