مطالعه برهمکنش سلطان مرکبات و عامل بیماری میوه سبز مرکبات

پیمان طاهری[۱و۲*]، مریم غایب زمهریر[۱]، جابر کریمی[۲]، ناصر فرخی[۳]، امیر محمد ناجی[۲] ،علی علیزاده[۱] و حسین غلامپور[۲]

۱) آزمایشگاه پروکاریوت شناسی، بخش تحقیقات بیماریهای گیاهان، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی، تهران، ایران.

۲) گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۳) دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران.

p_taheri65 @yahoo.com

بیماری ناشی از باکتری های سخت کشت *Candidatus* Liberibacter asiaticus و *Candidatus* L. africanus در مرکبات که نشانه‌های بارزآن زردی برگ ها و باقی ماندن لکه‌های سبز روی میوه است، میوه سبز مرکبات نامیده می شود. این بیماری یکی از پرخسارت‌ترین بیماری‌های مرکبات درنواحی جنوب شرقی تا جنوب غربی آسیا است. این بیماری در سال ۱۳۸۶ از جنوب ایران گزارش گردید. در این بررسی برهمکنش میزبان- پاتوژن با استفاده از روش cDNA-AFLP مورد مطالعه قرار گرفت. مطالعه موجود بر روی شش گیاه سلطان مرکبات، ۶ ماه پس از آلودگی انجام شد. ترکیب آنزیمی *Mse*I/*Eco*RI در مرحله برش آنزیمی و ۱۰ ترکیب پرایمری برای تکثیر cDNA های هضم شده با آنزیمهای مذکور، استفاده شد. در مجموع ۲۵ قطعه از نسخه های ژنی موجود در برگ گیاهان سلطان مرکبات مورد مطالعه ، به دست آمد. توالی ۱۶ قطعه شبیه به نسخه های میزبان ، ۵ قطعه شبیه به پروتئین باکتری و ۴ قطعه دیگر با توالی‌های ثبت شده در بانک‌های اطلاعاتی شباهتی نداشتند. بیان بسیاری از ژنها، مانند ژنهای دخیل در سنتز کروزیمات، glucosyltransferase، NADH dehydrogenase، glycoside hydrolase، phosphoglycerate mutase، bisphosphoglycerate، auxin efflux carrier- like، auxin:hydrogen symporter ، methyltransferase، Vps51/Vps67 family (components of vesicular transporter) در طی آلودگی افزایش می‌یافت که وابسته به واکنشهای مقاومت القایی در گیاه می باشد. بر عکس ژنهایی که بیان آنها در سلولهای مایه‌زنی شده کاهش یافته بود، متعلق به پروتئینهای باکتری بود. این مطالعه اولین بررسی بر روی تغییرات بیان ژنهای سلطان مرکبات و *Candidatus* Liberibacter asiaticus است که در طی بیماری اتفاق می افتد.

واژگان کلیدی:

سلطان مرکبات ، بیماری میوه سبز مرکبات، cDNA AFLP

مقدمه

بیماری میوه سبز مرکبات(Citrus Greening) که امروزه با نام Huanglongbing (HLB) نیز شناخته می‌شود، یکی از مهمترین بیماری‌های مرکبات در دنیا می باشد. خسارت ناشی از این بیماری به باغات مرکبات بسیار سنگین و جبران ناپذیر است. این بیماری در بسیاری از مناطق آسیا و آفریقا و اخیرا در برزیل و آمریکا باعث خسارات زیادی شده است(۱۰). در صورتی که درختان جوان به این بیماری آلوده شوند به مرحله محصول دهی نرسیده و در درختان بالغ موجب ناباروری می گردد. به احتمال زیاد HLB از چین منشا گرفته است (۸). در آگوست ۲۰۰۵ بیماری HLB تحت عنوان میوه‌سبز مرکبات و یا بیماری شاخه زردی در فلوریدا وایالات متحده گزارش شد (۷). این بیماری تا چند سال پیش در ایران به عنوان یک بیماری قرنطینه‌ای محسوب می‌شد (۱) . اما در سال ۱۳۸۶ در استان های سیستان و بلوچستان بر روی ارقام مختلف مرکبات مشاهده شده است (۲).

عامل بیماری یک باکتری گرم منفی، غیرقابل کشت و محدود به آوندهای آبکشی گیاه است. در مناطق مختلف دنیا سه فرم(۹)، آسیایی عامل بیماری *Candidatus* Liberibacter asiaticus, فرم آفریقایی *Candidatus* Liberibacter africanus, و فرم آمریکایی *Candidatus* Liberibacter americanus گزارش شده است. علائم بیماری شامل ابلقی برگها، زردی سرشاخه های درخت می باشد. برگها ،کوچک تنک، چرمی و ضخیم و به حالت ایستاده بوده و رگبرگها نیز برجسته اند. علائم ایجاد شده روی میوه بسیار اختصاصی می‌باشند و شامل کوچکتر شدن میوه ها، نامتقارن شدن میوه‌ها، تغییر طعم میوه می باشد. بذور میوه آلوده معمولا چروکیده، پوک، تیره و عقیم می باشند و میوه ها شدیدا ریزش پیدا می کنند(۹). بررسی ها نشان می دهد که ژنوتیپ های مختلف مرکبات پاسخ متفاوتی به آلودگی *Ca.* Liberibacter asiaticus (Las) تحت شرایط گلخانه ای نشان می دهند. بر اساس تحقیق انجام گرفته در مالزی مشخص گشت که *Citrus grandis* پس از گذشت ۶ ماه از آلودگی درداخل گلخانه علائمی از آلودگی نشان نمی‌دهد. این گزارش در تحقیقات دیگر نیز تایید شده است. برطبق این گزارشات علائم HLB برروی *C . reticulate* (نارنگی) و *C. sinensis* (پرتقال) بعد از شش ماه ظاهر می گردد واین جنس ها نسبت به این بیماری بسیار حساس می باشند. اما گریپ فروت و لیمو ترش جزو ارقام متحمل می‌باشند و هم چنین *C. aurantifolia* (لیموترش) و *C. grandis* (سلطان مرکبات) تحمل بیشتری نسبت به HLB دارند.هم چنین در طی این گزارش مشخص گردید که پوملو هیچ یک از علائم بیماری را نشان نمی دهد. در طی آزمایشات مختلف مشخص گردید که *C. grandis* در طی انجام تست PCR واکنش منفی را نشان دادند و در طی۶ ماه هیچ علائمی را بروز ندادند(۶،۸).

استفاده از ارقام مقاوم، مبارزه با حشرات ناقل و استفاده از آنتی بیوتیک در کاهش بیماری مؤثر است (۱) . درک مکانیسم مولکولی فعل وانفعالات مربوط به برهمکنش میزبان – پاتوژن از راهکارهای اولیه مهم جهت دستیابی به استراتژی‌های جدید کنترل بیماری است. برای این منظور از تجزیه وتحلیل تغییرات بیان ژن در سطح انبوه استفاده می شود(۷).

در این بررسی برهمکنشهای میزبان- پاتوژن در گیاهان نسبتا مقاوم آلوده به بیماری میوه سبز مرکبات با استفاده از روش cDNA-AFLP مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نهال پیوندی سلطان مرکبات (*C.grandis*)، از شمال کشور تهیه و درخاک سبک در گلدان و در داخل گلخانه کشت داده شد. وقتی ارتفاع نهال‌ها به ارتفاعی حدود ۶۰-۶۵ سانتیمتر رسید با پیوندک آلوده تهیه شده از منطقه جیرفت آلوده شدند. به محض بروز علایم در گیاه حساس نمونه برداری انجام گردید. نمونه های گیاهی بعد از برداشت بلافاصله به ازت مایع منتقل شده و تا انجام مراحل بعدی در فریزر منفی هشتاد درجه نگهداری شد. استخراج RNA به CTAB

انجام شد (۵،۱۱). سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA با نام Reverse H first strand synthesis system ساخت شرکت promega انجام شد(Promega, 2011).cDNA تهیه شده در مرحله قبل، با آنزیم *Mse*I/ *Eco*RI برش داده شدند. مرحله AFLP با ۱۰ جفت ترکیب پرایمری انجام گردید. فرآورده حاصل از واکنش فوق با استفاده از ژل پلی آکریل آمید ۸٪ الکتروفورز گردید و با استفاده از محلول نیترات نقره رنگ آمیزی شد (۴) و عکس ژلهای رنگ آمیزی شده با استفاده از اسکنر تهیه شد. ژلهای cDNA AFLP حاصل از مرحله قبل با یکدیگر مقایسه شدند و ژنهایی که بیان متفاوتی در نمونه های مختلف داشتند به عنوان کاندید مورد بررسی بیشتر قرار گرفتند. تعیین توالی قطعات جدا شده به روش اتوماتیک توسط شرکت فزابیوتک انجام شد. همولوژی بین کلنهای cDNA AFLP و توالیهای موجود در بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) با BLASTN و BLASTX algorithms تعیین گردید (۳).

نتایج و بحث

نتایج الکتروفورز RNA استخراج شده در ژل آگارز ۱٪ نشان می دهد که RNA استخراج شده از نمونه های مورد بررسی کیفیت خوبی دارند. از الکتروفورز cDNA بر روی ژل آگارز، یک باند اسمیر مشاهده گردید که با نتایج مورد انتظار مطابقت دارد. نتایج حاصل از فرآورده های واکنش AFLP در ژل پلی آکریل آمید نشان دهنده وجود باندهای پلی مورف با استفاده از آغازگرهای مختلف می باشد. مقایسه ژلهای cDNA AFLP حاصل از مرحله قبل با یکدیگر نشان دهنده ۲۵ قطعه حاصل از رونوشتها[1] (TDF) بود که در گیاهان سالم و آلوده به طور متفاوتی بیان شده بودند. اندازه این قطعات بین ۷۰۰- ۵۰ جفت باز بود. پس از تعیین توالی قطعات جدا شده، همولوژی بین کلنهای cDNA AFLP و توالیهای موجود در بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) با BLASTN و BLASTX algorithms تعیین گردید.

به طور کلی نتایج بررسی ما نشان می دهد که بسیاری از ژنهای سلطان مرکبات که بررسی شدند در طی آلودگی بیانشان افزایش می‌یافت مانند ژنهای دخیل در سنتز کروزیمات، glucosyltransferase، NADH dehydrogenase، glycoside hydrolase، phosphoglycerate mutase، bisphosphoglycerate، auxin efflux carrier-like، auxin:hydrogen symporter، Vps51/Vps67 family (components of vesicular transporter)، methyltransferase. افزایش بیان این ژنها در ارتباط با واکنشهای مقاومت القایی در گیاه می باشد. بر عکس ژنهایی که بیان آنها در سلولهای مایه‌زنی شده کاهش یافته بود، متعلق به پروتئینهای باکتری پاتوژن بود. این مطالعه اولین بررسی بر روی تغییرات بیان ژنهای سلطان مرکبات و *Candidatus* Leiberibacter asiaticus است که در طی بیماری اتفاق می افتد. این نتایج می تواند به پیشرفت اطلاعات مولکولی مربوط به روند بیماری و شناسایی ژنهای دخیل در آن کمک نماید.

تقدیر و تشکر

با درود فراوان به روح پر فتوح پدر بزرگوارم ، سپاس بیکران بر همدلی مادردلسوزو همراهی و همگامی همسرمهربانم و با تقدیر و تشکر شایسته از استاد فرهیخته و فرزانه سرکارخانم دکترغائب زمهریر که همواره راهنما و راه گشای اینجانب در اتمام واکمال این مقاله بوده است.

[1] - Transcript derived sequence (TDF)

منابع

۱- فتوحی قزوینی، ر.، فتاحی مقدم، جواد . ۱۳۸۵، پرورش مرکبات در ایران ، انتشارات دانشگاه گیلان.چاپ دوم.

۲- محکمی، ا.،ستاری، ر.، لری، ز.، احسانی، ا.، ناظمی، ا.، ۱۳۹۰، اولین گزارش از وجود بیماری قرنطینه‌ای میوه سبز مرکبات(Huanglongbing) در استان کرمان (ارزوئیه) ، بیماری‌های گیاهی،جلد ۴۷، شماره ۱، ۱۰۵

3- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. and Lipman, D. J. ,1990,Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. **215**: 403-410.

4- Bassam, B.J., Caetano-Anollés G., and Gresshoff PM. 1991, Fast and Sensitive staining of DNA in Polyacrylamide Gels. Analytical biochemistry. 196:80-83.

5- Chang, S., Puryear, J., Cairney, J.,1993, A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. Plant Molecular Biology Reporter. 11: 113-116.

6- Hajivand, S., Lee, T., Sijam, A., Abdullsh, S. and Abdullah, N., 2009, Differential Reacation Species in Malaysia to Huanglongbing(HLB) Disease Grafting Method. American Journal of Agricultural and Biological Sciences. 4(1) : 32-38.

7- Hideo, M., Stefanie, R., Akiko, I., Hiromasa, S., Sophien, K., Peter, W., Gunter, K., Monika, R., Detlev, H., Kru, G. and Ryohei, T., 2003, Gene expression analysis of plant host–pathogen interactions by SuperSAGE. PNAS, 100 (26):15718–15723.

8- John, B., Rick, M., Kathy, K., Magally, W., Marylou, P., Dale, W., Ron,B., Fred, G., Mark, M., Michael, R., 2006, Recovery Plan for Huanglongbing (HLB) or Citrus Greening. National Plant Disease Recovery System (NPDRS). 21 PP.

9- Marilou, P., Georgios, V., Kiris, G., Citrus Bacterial Canker Disease and Huanglongbing (Citrus greening). ANR Pablication, 8218, 10 PP. (http://anrcatalog.ucdavis.edu.)

10- Richard, D., Tony, G., Glenn, B.and Judy, G., 2005, Huanglongbing disease of citrus trees. Pest advisiory leaflet ,45: 4P.

11- Tsai, C., Cseke, L., Harding, J., 2003, Isolation and purification of RNA. Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine. 2nd ed. CRC Press.