مطالعه برهمکنش عامل بیماری میوه سبز مرکبات در گریپ‌فروت

حسین غلامپور[1]*، مریم غایب زمهریر[2]، جابر کریمی[1]، ناصر فرخی[3]، علی علیزاده[2] و پیمان طاهری[1]

1) گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
2) آزمایشگاه پروکاریوت شناسی، بخش تحقیقات بیماریهای گیاهان، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی، تهران، ایران.
3) دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

Hosein_gh89@yahoo.com

بیماری میوه سبز مرکبات توسط باکتری سخت کشت *Candidatus* Leiberibacter asiaticus ایجاد می‌شود که اولین بار در چین توصیف شده است و در سال 1919 با نام رسمی Huanglongbing معرفی گردید. HLB از خطرناک‌ترین و ویران‌کننده‌ترین بیماری‌های مرکبات است. این بیماری یکی از پرخسارت‌ترین بیماری‌های مرکبات درجنوب شرقی آسیا، شبه قاره هند، آفریقای جنوبی و شبه جزیره عربستان است. این بیماری در سال 1386 از جنوب ایران گزارش گردید. در این بررسی برهمکنش میزبان- پاتوژن با استفاده از روش cDNA-AFLP مورد مطالعه قرار گرفت. ترکیب آنزیمی در مرحله برش آنزیمی *Mse*I/*Eco*RI و 10 ترکیب پرایمری برای تکثیر cDNA های هضم شده با آنزیم‌های مذکور، استفاده شد. در مجموع 24 قطعه از نسخه های ژنی موجود در برگ گیاهان گریپ‌فروت مورد مطالعه به دست آمد. توالی 16 قطعه شبیه به نسخه های میزبان بود و 8 قطعه شباهتی با توالی‌های ثبت شده در بانک اطلاعاتی NCBI نداشت و بررسی بیشتر آنها حائز اهمیت است. بسیاری از ژنهایی که بررسی شدند در طی آلودگی بیانشان افزایش می یافت مانند ژنهای دخیل در سنتز ATP، cytochrome P450، isoflavone 2'-hydroxylase، zeaxanthin epoxidase، cellulose synthase، DNA repair protein، aconitate hydratase 2 ، citrus tristeza virus resistance gene. افزایش بیان این ژنها در ارتباط با واکنشهای تحمل در گیاه می باشد. این مطالعه اولین بررسی بر روی تغییرات بیان ژنهای گریپ‌فروت و *Candidatus* Leiberibacter asiaticus است که در طی بیماری اتفاق می‌افتد. این نتایج می تواند به پیشرفت اطلاعات مولکولی مربوط به روند بیماری و شناسایی ژنهای دخیل در آن کمک نماید.

واژگان کلیدی: میوه سبز مرکبات، cDNA-AFLP، HLB

مقدمه

بیماری میوه سبز مرکبات اولین بار در چین توصیف شده است و در سال 1919 با نام رسمی Huanglongbing معرفی گردید. HLB از خطرناک‌ترین و ویران-کننده‌ترین بیماری‌های مرکبات است. در جنوب آفریقا به این بیماری Citrus greening یا میوه سبز مرکبات گفته می‌شود، زیرا میوه‌های درختان آلوده روی درخت رنگ نمی‌گیرند و سبز باقی می‌مانند (5).

علائم اولیه بیماری بصورت زردی یک یا چند شاخه از گیاه مشاهده می‌شود. در مراحل اولیه آلودگی، در برگ‌ها ممکن است کلروز رگبرگ‌ها یا ابلق شدن رخ دهد. در درختانی که شدت آلودگی در آن‌ها بالا است، برگ‌های جوان کوچک، چرمی و قاشقی می شوند. علائمی مشابه کمبود عنصر روی شامل سبز ماندن رگبرگ‌ها و رنگ‌پریدگی نواحی بین رگبرگ‌ها در درختان بیمار مشاهده می‌شود. در درختانی که شدت آلودگی در آن‌ها بالا است، ریزش قبل از موعد برگ‌ها اتفاق افتاده و درختان دچار سرخشکیدگی می‌شوند. درختان جوان کوتوله مانده و گاهی به ثمردهی نمی‌رسند (5).

از نظر تاکسونومی این باکتری در رده Bacteria، شاخه Proteobacteria، دامنه Alphaproteobacteria، راسته Rhizobiales، خانواده Phyllobacteriaceae قرار دارد. نام علمی آن Liberibacter *Candidatus* است که سه گونه از آن گزارش شده است (4).

بررسی‌ها نشان می دهد شش ماه پس از آلودگی در شرایط گلخانه ، علایم بیماری روی *Citrus grandis* مشاهده نمی‌شود. همچنین گزارش شده است که علائم HLB روی *C. reticulata* و *C. sinensis* شدید هستند، اما لیمو(Lemon) و گریپ‌فورت متحمل هستند. اما ظهور و شدت علائم بیماری HLB روی گونه-های مختلف مرکبات شش ماه پس از آلودگی از طریق پیوند متفاوت است. به این ترتیب گونه‌های مرکبات را می‌توان از نظرحساسیت به HLB در گروه‌های بسیارحساس، حساس، نسبتا حساس، متحمل و مقاوم تقسیم بندی کرد (4).از راهکارهای عملی برای کنترل HLB حذف درختان آلوده، کنترل ناقل به وسیله به کار بردن حشره کش‌ها، واکشت رقم‌های جدید است (4،6)

در این بررسی برهمکنش‌های میزبان- پاتوژن در گیاهان متحمل گریپ‌فروت مایه زنی شده با پاتوژن بیماری میوه سبز مرکبات با استفاده از روش cDNA-AFLP مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نهال پیوندی گریپ‌فروت، از جیرفت تهیه و درخاک سبک در گلدان و در داخل گلخانه کشت داده شد. وقتی ارتفاع نهال‌ها به ارتفاعی حدود 65-60 سانتیمتر رسید با پیوندک آلوده تهیه شده از منطقه جیرفت آلوده شدند. به محض بروز علایم در گیاه حساس نمونه برداری انجام گردید. نمونه‌های 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(3،7). سنتز

cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA با نام Reverse H first strand synthesis system ساخت شرکت Fermentas انجام شد. cDNA تهیه شده در مرحله قبل، با آنزیم‌های MseI/ EcoRI برش داده شدند. مرحله AFLP با 10 جفت ترکیب پرایمری انجام گردید. فرآورده حاصل از واکنش فوق با استفاده از ژل پلی آکریل آمید 8٪ الکتروفورز گردید و با استفاده از محلول نیترات نقره رنگ آمیزی شد (2) و عکس ژل‌های رنگ آمیزی شده با استفاده از اسکنر تهیه شد. ژل-های cDNA AFLP حاصل از مرحله قبل با یکدیگر مقایسه شدند و ژن‌هایی که بیان متفاوتی در نمونه‌های 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 کلون‌های cDNA AFLP و توالی‌های موجود در بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) با BLASTN و BLASTX algorithms تعیین گردید (1).

نتایج و بحث

نتایج الکتروفورز RNA استخراج شده در ژل آگارز 1٪ نشان می‌دهد که RNA استخراج شده از نمونه‌های 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 فرآورده‌های واکنش AFLP در ژل پلی آکریل آمید نشان دهنده وجود باندهای پلی‌مورف با استفاده از آغازگرهای مختلف می باشد. مقایسه ژل‌های cDNA AFLP حاصل از مرحله قبل با یکدیگر نشان دهنده 24 قطعه حاصل از رونوشت‌ها(TDF) بود که در گیاهان سالم و آلوده به طور متفاوتی بیان شده بودند. اندازه این قطعات بین700- 50 جفت باز بود. پس از تعیین توالی قطعات جدا شده، همولوژی بین کلون‌های 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 می‌دهد که بسیاری از ژن‌های گریپ‌فروت که بررسی شدند در طی آلودگی بیانشان افزایش می‌یافت مانند ژن‌های دخیل در در سنتز ATP، cytochrome P450، isoflavone 2'-hydroxylase، zeaxanthin epoxidase، cellulose synthase، DNA repair protein، aconitate hydratase 2 ، citrus tristeza virus resistance gene. افزایش بیان این ژن‌ها در ارتباط با واکنش‌های تحمل در گیاه می باشد. تعدادی از ژن‌هایی که بیان آنها در سلول‌های مایه زنی شده کاهش یافته بود متعلق به توالی‌هایی بود که شباهتی با داده‌های موجود در بانک‌های اطلاعاتی نداشتند. این مطالعه اولین بررسی بر روی تغییرات بیان ژن‌های گریپ‌فروت و Candidatus Leiberibacter asiaticus است که در طی بیماری اتفاق می‌افتد. این نتایج می تواند به پیشرفت اطلاعات مولکولی مربوط به روند بیماری و شناسایی ژن‌های دخیل در آن کمک نماید.

منابع

1. 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.
2. Bassam, B.J., Caetano-Anollés, G., and Gresshoff, PM., 1991. Fast and Sensitive staining of DNA in Polyacrylamide Gels. Analytical biochemistry. 196:80-83.
3. 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.
4. Hajivand, S., Lee, T., Sijam, A., Abdullsh, S.N.A. and Abdullah, N.A.P., 2009, Differential Reacation Species in Malaysia to Huanglongbing(HLB) Disease Grafting Method, American Journal of Agricultural and Biological Sciences, 4(1) : 32-38.
5. Marilou, P., Georgios, V., Kiris, G., Citrus Bacterial Canker Disease and Huanglongbing (Citrus greening). ANR Pablication, 8218,10 PP. (http://anrcatalog.ucdavis.edu.)
6. Sankaran,S, Ehsani,R., Etxeberria, E., 2010, Mid-infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing (greening) in citrus leaves, Talanta, 83 :574–581.
7. Tsai, C. J., Cseke, L. J., Harding, S.A., L.J.,Kaufman, P.B., Podila, G.K., Tsai C.-J., 2003,Isolation and purification of RNA. In: Cseke, (eds) Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine. 2nd ed. CRC Press.