مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
دوره ۴، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۴
صفحه ۱۳۳-۱۲۵

بررسی بیوانفوماتیکی ژن مقاومت به سویه آسیایی باکتری عامل بیماری میوه سبز مرکبات در گیاه گریپ فروت

مسعود توحید فر[۱] و مریم غایب زمهریر[۲*]

Isolation, cloning and bioinformatic study of a resistance gene against an Asian strain of citrus greening librobacter in grapefruit plant

Masoud Tohidfar[1] and Maryam Ghayeb Zamharir[2]

۱-گروه بیوتکنولوژی دانشکده فن‌آوری‌های نوین و مهندسی انرژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

۲- بخش تحقیقات بیماریهای گیاهان، موسسه تحقسقات گیاهپزشکی کشور- سازمان تحقیقات ، آموزش و ترویج کشاورزی -تهران، ایران

1. Biotechnology group, Department of New Technology and Energy Engeenier, Shahid Beheshti University, Tehran, I. R. Iran.

2. Department of Plant Disease, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Tehran, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zamharir2005@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۶/۲۴)

چکیده

بیماری میوه سبز مرکبات از جمله مهم‌ترین بیماری‌های باکتریایی مرکبات در مناطق جنوبی کشور است. با توجه به ماهیت بیماری، استفاده از ارقام مقاوم مناسب‌ترین راه‌کار در جهت مبارزه با این بیماری است. اخیرا، مطالعه جامع برهمکنش میزبان-پاتوژن و شناسایی ژن‌های دخیل در این برهمکنش، نشان داد که در گریپ‌فروت متحمل به این بیماری، بیان یک ژن آنالوگ مقاومت متعلق به خانواده Nucleotide Binding Site- Leucien-Rich Repeats (NBS-LRR) افزایش می‌یابد. در این تحقیق جداسازی ژن (*NBS552*) با آغازگرهای اختصاصی از گریپ-فروت به روش PCR صورت گرفت و در پلاسمید pGEM-T همسانه‌سازی شد. آنالیز توالی‌یابی نشان داد که چارچوب بازخوانی این ژن ۱۷۱ جفت باز است و پروتئین با طول ۵۷ اسید امینه را کد می‌کند. نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که این ژن در بین گونه‌های گیاهی دارای توالی‌های حفاظتی بالایی است و احتمالا ترشح پروتئین NBS552 در غشاء پلاسمایی و ترشح خارج سلولی آن ناچیز است. هدف این مطالعه جداسازی و همسانه سازی ژن *NBS552* از ژنوم گیاه گریپ‌فروت و تعیین مشخصات آن به منظور استفاده کاربردی در گیاهان است.

واژه‌های کلیدی

گریپ‌فروت
NBS552
میوه سبز مرکبات
مقاومت

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.8.8]

مقدمه

مرکبات در ایران از اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است و ایران از نظر تولید مرکبات در جهان در رتبه هشتم قرار دارد (FAO 2013). در سال‌های اخیر بیماری میوه سبز مرکبات یا huanglongbing **(HLB)** از جنوب ایران گزارش شد (Salehi *et al.* 2010) ولی خسارت آن در ایران هنوز تعیین نشده است. عامل بیماری یک باکتری گِرم منفی سخت کِشت و محدود به آوند آبکشی (PLB) است (Ute and Kim 2008). این باکتری بیرون از سلول‌های میزبان زنده نمی‌ماند، به همین دلیل مطالعه آن مشکل است. از نظر تاکسونومی این باکتری در خانواده Phyllobacteriaceae قرار دارد. نام علمی جنس آن *Candidatus* Liberibacter است که بر اساس پراکنش جغرافیایی سه گونه *Ca.* L. asiaticus، *Ca.* L. africanus و *Ca.* L. americanus از آن گزارش شده است (Bove 2006). دو گونه از پسیل مرکبات *Diaphorina citri* Kuwayama (پسیل آسیایی) و *Trioza erytreae* Del Guerico (پسیل آفریقایی) توانایی انتقال پاتوژن میوه سبز را دارند (Bove 2006).

براساس مطالعات انجام شده عامل بیماری میوه سبز مرکبات در ایران از فرم آسیایی است. بر اساس وجود پسیل آسیایی مرکبات و با استفاده از روش‌های تشخیص علائم بیماری در مرکبات، انتقال بیماری با پیوند، ردیابی عامل بیماری در بدن پسیل مرکبات و همچنین درختان پرتقال و نارنگی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی فرم آسیایی، در سال ۱۳۸۸ این بیماری در استان‌های سیستان و بلوچستان و هرمزگان گزارش شد (Salehi *et al.* 2012). نتایج تحقیقات قبلی نشان می‌دهد گونه *Citrus grandis* (سلطان مرکبات) دارای تحمل نسبی و گونه‌های *C. reticulate* (نارنگی) و *C. sinensis* (پرتقال) دارای حساسیت فراوان در برابر این بیماری می‌باشند (Hajivand *et al.* 2009). همچنین مشخص شده است که گریپ‌فروت و لیموترش (*C. aurantifolia*) جزو ارقام متحمل محسوب می‌شوند (Ute and Kim 2008).

به دلیل ماهیت این عامل بیماریزا، کنترل بیماری مشکل بوده و در حال حاضر استراتژی کارآمد برای کنترل بیماری‌های ناشی از فایتوپلاسماها و لیبروباکترها استفاده از گیاهان مقاوم است. به منظور دستیابی به ارقام مقاوم و منابع ژنتیکی مقاومت، درک مکانیسم مولکولی فعل و انفعالات مربوط به برهمکنش میزبان- پاتوژن آنالیزهای cDNA-AFLP در گریپ‌فروت مایه‌زنی شده با باکتری عامل میوه سبز مرکبات انجام شد. نتایج بررسی نشان می‌دهد که بیان یک ژن متعلق به خانواده NBS LRR با نام اختصاری NBS552 در گیاهان گریپ‌فروت مایه‌زنی‌شده با عامل بیماری میوه‌سبز مرکبات افزایش می‌یابد (Gholampour et al. 2014). NBS552، هومولوژی بالایی با ژن مقاومت در برابر Citrus Tristeza Virus (Ctv) که ژنی منفرد و غالب در *Poncirus trifoliata* است، دارد (Mariângela et al. 2007). بیماری تریستیزای مرکبات از چند جهت مشابه با میوه‌سبز مرکبات است. با توجه به اینکه عامل تریستیزا نیز محدود به آوند آبکشی است و نیز انتقال آن توسط حشره ناقل صورت می‌گیرد، همچنین در علائم ایجاد شده توسط عامل بیماری نیز تشابهاتی مشاهده می‌شود (Sagheer et al. 2012)، مطالعه بیشتر این ژن ضروری است. پیشرفت عمده در جهت درک وقایع مولکولی که منجر به مقاومت گیاهان به بیماری‌ها می‌شود، اتفاق افتاده است. جالب توجه است که، باتوجه به اختصاصی بودن این ژن‌ها، تقریبا تمام ژن‌های R که تا این تاریخ شناسایی شده‌اند، کد کننده پلی‌پپتیدهایی است که قسمتی از آن‌ها مشابه است و باعث تقسم بندی ژن‌های R داخل پنج گروه عمده می‌شود (Lawrence et al. 2000).

Ctv به عنوان ژنی غالب در گروه ژنی NBS-LRR مقاومت گسترده‌ای به عامل CTV در *Poncirus trifoliata* ایجاد می‌کند (Mariângela et al. 2007). همچنین نتایج بررسی در پایگاه داده مرکبات (CitEST database) نشان می‌دهد که حضور ژن Ctv در گونه‌های مختلف مرکبات آلوده به پاتوژن *Xylella fastidiosa* عامل ایجاد مقاومت در برابر آن پاتوژن بوده است (Simone and Helaine 2007).

مطالعات بر روی ژن‌های آنالوگ مقاومت در خانواده NBS-LRR در ارقام مختلف مرکبات، نشان داد که بیان ژن *NBS552* در

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.8.8]

مرکبات متحمل مایه‌زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات افزایش می‌یابد و در ارقام مرکبات حساس این ژن بیان نمی‌شود (Ghayeb Zamharir *et al.* 2014). از آنجایی که اطلاعات کمی درمورد این خانواده ژنی و ساختار و عملکرد آن در دست است، هدف این تحقیق جداسازی، تعیین ویژگی‌های توالی کاندید (*NBS552*) در مقاومت به باکتری عامل میوه سبز مرکبات، ترسیم ساختارهای پروتئینی و پیش‌بینی عملکرد و بررسی‌های فیلوژنتیکی با سایر ژن‌های این خانواده با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی است.

مواد و روشها

تهیه نهال گیاهان گریپ فروت: نهال‌های گریپ‌فروت از نهالستان‌های جیرفت تهیه شد. نهال‌ها دارای گواهی سلامت از سازمان حفظ نباتات و فاقد علایم بیماری‌های قارچی و باکتریایی بودند. نهال‌ها پس از انتقال به گلخانه قرنطینه موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، در خاک سبک کشت شده و در دمای ۲۰°C– ۱۸ و در نسبت روشنایی ۸:۱۶ ساعت با مقدار نور طبیعی قرار داده شدند. پس از استقرار نهال‌ها، نهال‌های با قطر مناسب با پیوندک آلوده (که از درختان علایم‌دار در جیرفت تهیه و با روش‌های مولکولی آلودگی آنها به عامل میوه سبز مرکبات تایید شده بود)، مایه‌زنی شدند (شکل ۱) پس از گذشت ۴ ماه، استخراج RNA ژنومی روی چهار نهال سالم و چهار نهال پیوندی با پیوندک آلوده انجام شد. آلودگی در نهال‌های پیوندی با روش-های مولکولی تائید شد.

جداسازی RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA با استفاده از روش CTAB انجام شد (Song *et al.* 2011). در این روش ۸۰۰ µl بافر CTAB دو درصد به نمونه‌های پودرشده برگ که از گیاهان گریپ‌فروت سالم و مایه‌زنی شده با عامل میوه سبز مرکبات تهیه شده بود اضافه و ویال‌ها ۱۵ ثانیه ورتکس شدند. ویال‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵°C نگه داشته و سپس به آن‌ها ۶۰۰ µl کلروفرم–ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه شد

شکل ۱– مایه زنی گریپ فروت با پیوندک ها آلوده به عامل میوه سبز مرکبات در شرایط گلخانه

Fig 1- Grapfruit inoculation by grafting with citrus greening agent in greenhouse

پس از ورتکس کردن ویال‌ها، نمونه‌ها در دمای ۴°C و در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و مایع رویی به تیوب جدید منتقل شد. به این محلول ۵۰۰ µl آب مقطر استریل و ۱۷۰ µl نمک لیتیوم کلراید ۸ M اضافه شد. تیوب‌ها چند بار با دست معکوس کرده تا محلول‌ها با هم مخلوط شوند. میکروتیوب‌ها ۳–۵ ساعت در دمای ۴°C در یخچال نگهداری شدند و پس از آن در دمای ۴°C و در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن مایع رویی، پلیت تشکیل شده، در ۵۰۰ µl آب فوق خالص حل شده و ۱۷۰ µl نمک لیتیوم کلراید ۸ M به آن اضافه شد. میکروتیوب‌ها مجدد ۳–۵ ساعت در دمای ۴°C در یخچال نگهداری و سپس در دمای ۴°C و در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن مایع رویی، پلیت تشکیل شده، در ۳۰۰ µl آب فوق خالص حل شد و ۳۰ µl نمک استات سدیم ۱۰ M و ۶۰۰ µl الکل اتانول خالص که در فریزر خنک شده بود به آن اضافه و یک ساعت در دمای ۵۰°C– نگهداری شدند. بعد از سانتریفیوژ کردن میکروتیوب‌ها در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی دور ریخته شد. پلیت تشکیل شده را با اتانول (v/v) ۸۰٪ شسته و در دمای ۴°C با سرعت ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ نمودیم. بعد از دور ریختن مایع رویی، رسوب تشکیل شده در دمای ۳۷°C خشک شد. به هر نمونه ۲۵ µl آب مقطراستریل اضافه نموده و پس از حل‌شدن رسوب در آب نمونه‌ها برای انجام

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.8.8]

آزمایشات بعدی در ۸۰°C – نگهداری شدند. سنتز cDNA نیز با استفاده از کیت first strand synthesis system (promega, USA) انجام شد.

طراحی آغازگر و انجام PCR: بر اساس مطالعات cDNA-AFLP بر روی گریپ‌فروت مایه‌زنی شده با عامل میوه‌سبز مرکبات مشخص شد که رونوشت شماره ۵۵۲ در مطالعات ترانسکریپتومیکس که در این مطالعه *NBS552* نامیده می‌شود، همولوژی بالایی با ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها در خانواده *NBS-LRR* دارد (Gholampour *et al.*, 2014). آغازگرهای مختلف به منظور جداسازی ژن *NBS552* از روی توالی رونوشت۵۵۲ حاصل از مطالعات cDNA-AFLP طراحی شد. از جمله مناسب‌ترین آنها، آغازگر 5'-CGGGGCGTCTAACTCATAGA-3' به عنوان آغازگر روبه‌جلو و توالی 5'-GGGGAAAGACAACCTTGGA-3' به عنوان آغازگر برگشتی در نظر گرفته شدند. از cDNA سنتز شده در مرحله قبل به عنوان الگوی تکثیر در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز استفاده شد. برنامه‌ی انجام PCR شامل واسرشتگی اولیه به مدت ۴ دقیقه در ۹۴°C و انجام ۳۵ چرخه متوالی (۹۴°C به مدت یک دقیقه، ۵۸°C به مدت ۵۰ ثانیه، ۷۲°C به مدت ۶۰ ثانیه) انجام شد. این آغازگر قطعه ای به طول bp ۲۲۰ را در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر می‌کند.

همسانه سازی در وکتور pGEM-T : بعد از تکثیر ژن توسط PCR و خالص‌سازی آن به روش لئونارد و همکاران (Leonard *et al.*, 1998)، عمل اتصال بین ژن و پلاسمید pGEM-T easy vector system I، محصول شرکت پرومگا (آمریکا) صورت گرفت. پلاسمید pGEM-T شامل پروموتورهای T7 و SP6 در طرفین ناحیه‌ی سایت برشی (MCS) است و ژن انتخاب‌گر آن برای گزینش *E. coli* ژن مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد. همچنین کاست ژنی حاوی β–گلوکورونیداز تحت پروموتورهای SP6 وT7 در طرفین سایت برشی اختصاصی (MCS) جهت گزینش به روش کلونی سفید و آبی وجود دارد. پس از الحاق قطعه به پلاسمید و ایجاد پلاسمید نوترکیب، ترانسفورماسیون به وسیله‌ی شوک حرارتی به باکتری *E. coli* نژاد Top10 انجام شد. در مرحله‌ی بعد باکتری‌ها روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، IPTG و X-GAL کشت داده شدند. پس از ۱۶ ساعت تیمار در دمای ۳۷°C، تعدادی کلونی سفید به عنوان کلونی‌های نوترکیب انتخاب و در نهایت استخراج پلاسمیدهای نوترکیب انجام گرفته و کلونی‌های نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR مورد بررسی قرار گرفتند. سه نمونه برای توالی‌یابی با دو پرایمر T7 و SP6 به کمپانی ماکروژن کره‌ی جنوبی ارسال شد.

آنالیزهای تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنی: با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI و BLAST، توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای ژن *NBS552* در گریپ‌فروت و چندین گونه دیگر به همراه سایر ویژه‌گی‌ها (ویژگی های توالی های مورد بررسی از جمله طول mRNA ، cDNA، تعداد اگزون و اینترون طول پروتئین و شماره دسترسی توالی‌ها) مورد بررسی قرار گرفت. هم‌ردیفی مقایسه‌ای ژن کلون شده در وکتور pGEM-T با سایر گیاهان موجود در NCBI با استفاده از نرم افزار T-Coffee به روش ClustalW انجام شد. بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از *NBS552* و انواع ژن‌های *NBS* با استفاده از نرم‌افزار MEGA4 به روش UPGMA انجام شد. به منظور تایید صحت و اعتبار درخت‌های حاصل تست BootStrap با ۱۰۰ تکرار صورت گرفت.

تعیین مشخصات و شناسایی دومین‌های پروتئین: توالی پروتئینی با استفاده از پایگاه‌های اطلاعاتی پروتئینی و UniProtKB تعیین شد. برای شناسایی دومین‌های پروتئینی از بانک اطلاعاتی ثانویه Blouks و CDD استفاده شد. تعیین قسمت‌های درون، خارج سلولی و غشائی پروتئین با استفاده از برنامه TMHMM صورت گرفت.

تعیین ساختار و محل عملکرد پروتئین: برای تعیین ساختارهای اول و دوم پروتئین از برنامه‌های Uniprot B، PSIpred و برای تعیین محل عملکرد آن از بانک PSORT PROTEINاستفاده شد. به منظور مشخص کردن توالی‌های کد کننده و سایر توالی‌های جانبی آن، آنالیز توالی و مستند سازی (Annotation) آن‌ها با استفاده از نرم‌افزار Vector NTi انجام شد.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.8.8]

نتایج

پس از استخراج RNA از گیاه گریپ‌فروت سالم و مایه‌زنی شده با پیوندک آلوده به عامل میوه سبز مرکبات و سنتز cDNA، PCR به منظور تکثیر ژن *NBS552* با استفاده از آغازگرها انجام شد. محصول PCR یک باند ۲۲۰ جفت بازی روی ژل آگارز نشان داد (شکل۲). پس از خالص‌سازی، باند مورد نظر برای تعیین توالی با دو آغازگر T7 و SP6 به کمپانی ماکروژن کره‌ی جنوبی ارسال شد و نمونه‌ها با دستگاه Automatic Sequencer 3730 XL تعیین ترادف شدند. آنالیز بلاست با استفاده از برنامه NCBI نشان داد که توالی مورد نظر ۹۴٪ شباهت را با ژن مقاومت به ویروس Poncirus trifoliata citrus tristeza دارد. در واقع این ژن قطعه‌ای از منطقه ژنوم *Citrus trifoliata* است که در مقاومت به ویروس نقش دارد. آنالیزهای بیشتر با استفاده از برنامه Vector NTi نشان داد که ۲۲۰ جفت باز از توالی ما بطور کامل با این منطقه از ژنوم شباهت صددرصدی دارد که از این میان ۱۷۱ جفت باز آن دارای ORF است که تاکنون گزارش نشده است (شکل ۳A).

به منظور بررسی بیشتر وضعیت ژنوم، در حدود ۱۰۰۰ جفت باز از دو طرف ژن بررسی شد که نتایج نشان داد در این منطقه از ژنوم تاکنون فقط برای سه ناحیه (Misc Feature1, Misc Feature2, Misc Feature3) مستند سازی انجام شده است (شکل ۳B). لازم است آنالیزهای بیشتر برای نقش عملکردی این مناطق انجام شود. آنالیزهای مستندسازی نشان داد که این ژن بدون اینترون بوده و فقط بصورت یک اگزون عمل می‌کند. آنالیز عملکردی با استفاده از ترجمه پروتئین نشان داد که این ژن احتمالا بصورت یک گیرنده عمل می‌کند.

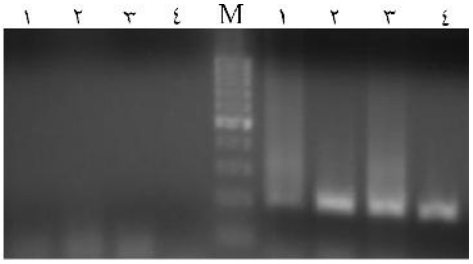
نتایج هم‌ردیفی با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI و نرم افزار T-Coffee به روش ClustalW نشان داد که این ژن حفاظت شدگی بالایی به طول حدود ۵۰ جفت باز را در گیاهان مختلف نشان می‌دهد. دلیل اصلی تفاوت را می‌توان به تفاوت بین گونه‌ای و جهش‌های احتمالی در طول تکامل نسبت داد (Matsuba *et al.* 2013) (شکل ۳C).

به منظور بررسی روابط تکاملی بین گیاهان از نظر توالی مورد نظر درخت فیلوژنی رسم شد، تا میزان شباهت آنها با سایر گیاهان موجود در پایگاه بررسی شود. با توجه به اینکه ژنوم جانداران حجم گسترده‌ای از اطلاعات را در خود دارد و بررسی تمام این توالی‌ها بسیار دشوار است، معمولا از توالی‌های استفاده می‌شود که در موجودات هومولوگ باشد. ترسیم درخت فیلوژنی چهار گروه را ایجاد کرد (شکل ۵ بالا) گروه اول شامل *Poncirus trifoli*، *Vaccinium macrocarpon*،*Daucus carot* است، که بیشترین شباهت با ژن مذکور مربوط به گیاه *Vaccinium* است. اگر چه این سه گیاه از خانواده‌های مختلفی هستند، این ژن در گونه‌های مختلف وجود دارد. گروه دوم فقط شامل گیاه *Geranium maderence* است که بصورت جداگانه از بقیه گروه‌ها قرارگرفته‌است. گروه سوم شامل *Gosspium* ، *Rhazya stric* و *Helianthus annuus* است که متعلق به خانواده‌های مختلف است. در نهایت گروه چهارم که دورترین گروه نسبت به ژن مورد نظر است شامل *Oenothera bertian* است که کمترین شباهت را با ژن مورد نظر دارد. نکته حائز اهمیت در این درخت وجود ژن مورد نظر در خانواده‌های مختلف با عملکرد یکسان است که نشان می‌دهد این ژن می‌تواند نقش کلیدی در گیاه داشته باشد و همین باعث شد تا بصورت حفاظت شده در گونه‌های مختلف در طول تکامل حفظ شود.

بررسی ساختار دوم پروتئین ژن کلون شده با استفاده از PSIpred نشان داد که این پروتئین فقط از مارپیچ α تشکیل شده است (شکل ۵ پایین).

خصوصیات پروتئین و دومین‌های آن: خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین ژن توالی‌یابی شده نشان داد که پروتئین مورد نظر دارای ۵۷ اسیدآمینه با وزن ملکولی ۶۵۶۱ دالتون و نقطه ایزوالکتریک ۹/۱ است. این پروتئین با فرمول شیمیایی C3132H4808N796O925S18 و شاخص ناپایداری (بیانگر میزان پایداری در لوله آزمایش) برابر با ۴۹/۵ است. نیمه عمر این پروتئین به صورت بیوانفورماتیکی در شرایط درون شیشه‌ای حدود ۳۰ ساعت در یوکاریوت‌ها تخمین زده می‌شود که این نیز دلیل دیگری بر پایداری پروتئین است.

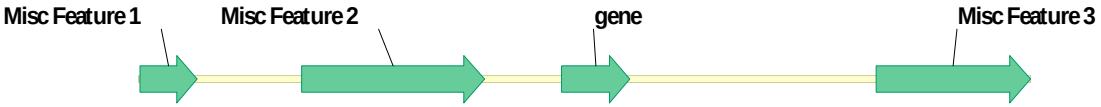
[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.8.8]

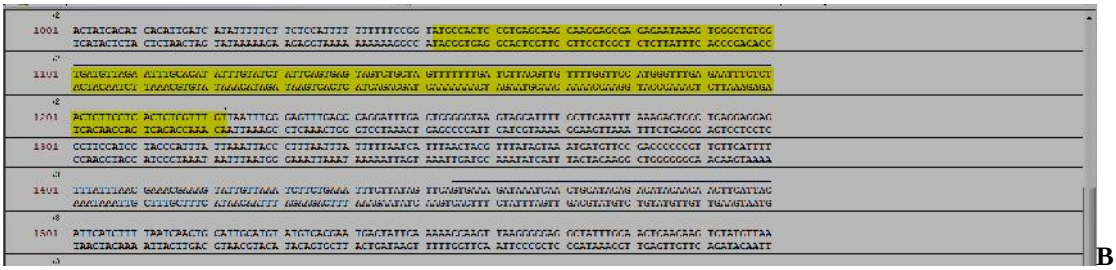


شکل ۲- تکثیر ژن NBS552 از روی cDNA حاصل از گیاهان آلوده گریپ فروت (چاهک ۱تا ۴ در سمت راست مارکر)،گیاهان سالم (چاهک ۱تا ۴ در سمت چپ مارکر) و M سایز مارکر 100 bp (فرمتاز).

Fig 2- NBS552 amplification from infected grapefruit plant cDNA (wells 1-4 at left of marker), healthy one (wells 1-4 at right of marker) and M: DNA 100 bp size marker (Fermentase).

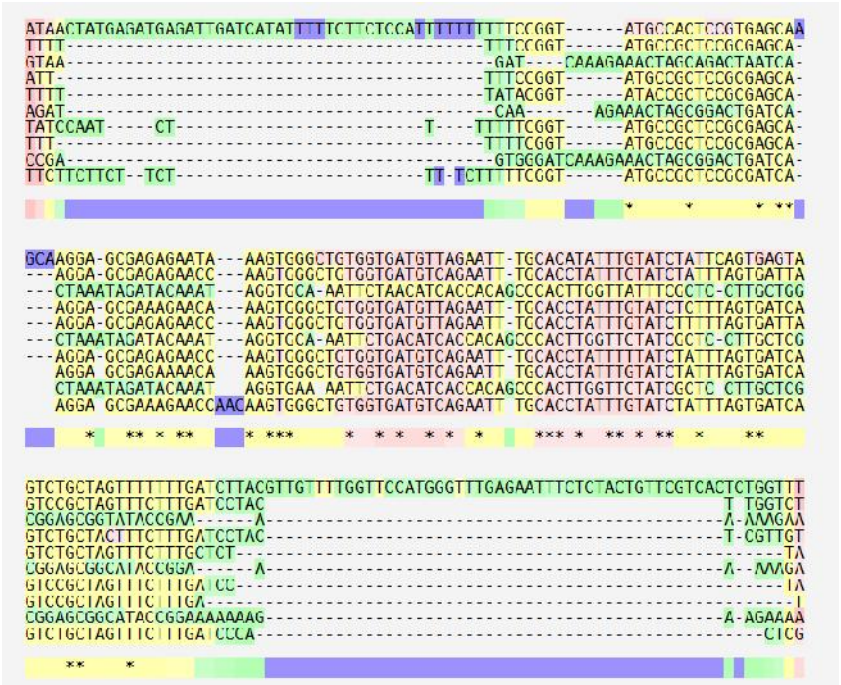
A





B

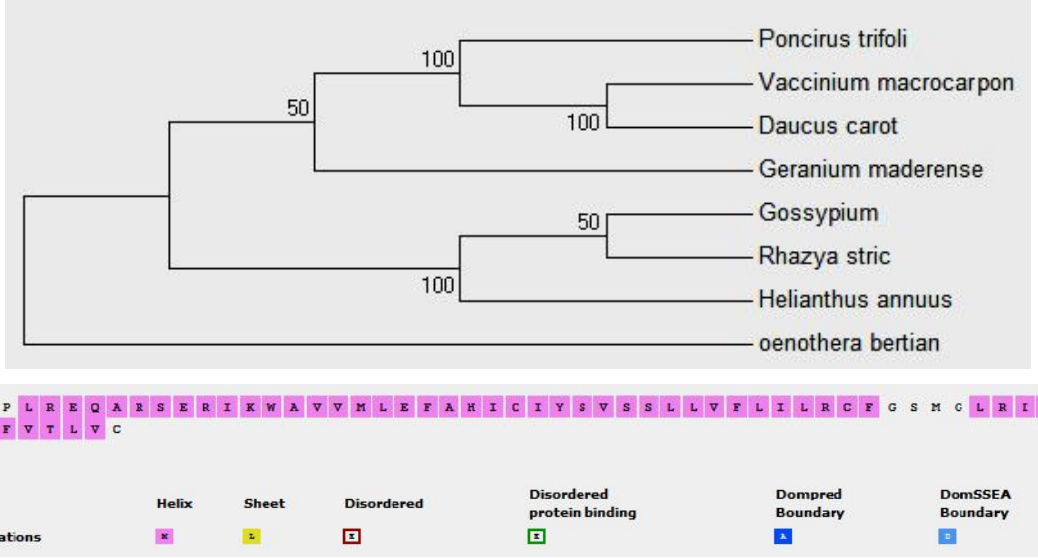
C



شکل ۳- **A**: توالی ORF به طول ۱۷۱ جفت باز، **B**: نقشه فیزیکی ژن *NBS552* با سایر مناطق ژنوم بعد از مستند سازی شده و **C**: همردیفی مقایسه‌ای ژن کلون شده در وکتور pGEM-T با *Poncirus trifoliata* (AF5a06028.1), *Gossypium raimondii* (KU317325.1), *Vaccinium macrocarpon* (KF386162.1), *Daucus carota* (AJ300556.1), *Geranium maderense* (KP940515.1), *Rhazya stricta* (KJ485850.1), *Helianthus annuus* and Oenothera موجود در NCBI با استفاده از برنامه‌ی T-Coffe.

Fig 3- A: ORF sequence include of 171 bp, **B:** Physical map of *NBS552* Gene with other genome regions after annotation and **C:** Comparative alignment of cloned gene into the vector pGEM-T with *Poncirus trifoliata* (AF5a06028.1), *Gossypium raimondii* (KU317325.1), *Vaccinium macrocarpon* (KF386162.1), *Daucus carota* (AJ300556.1), *Geranium maderense* (KP940515.1), *Rhazya stricta* (KJ485850.1), *Helianthus annuus* and Oenothera sequence in the NCBI using T-Coffe.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.8.8]



شکل ۵- بالا: درخت فیلوژنتیکی توالی همسانه شده با سایر ژن‌های همتای خود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA4.

پایین: ساختار دوم پروتئین ژن *NBS552* جدا شده از گریپفروت ایرانی با استفاده از PSIpred

Fig 5- Up: Phylogenetic tree of cloning sequence with different similar genes in NCBI database using MEGA4 software,

Down: Structure of second protein structure of *NBS552* gene isolated from Iranian grapefruit using PSIpred

همچنین این پروتئین دارای سه دومین است. دومین اولی که از اسید آمینه ۱ الی ۱۴ را شامل می‌شود در خارج سلول قرار دارد. دومین دوم که داخل غشایی است از اسید آمینه ۱۵ الی ۳۷ را شامل می‌شود. در نهایت دومین آخری داخل سلولی است از اسید آمینه ۳۸ الی ۵۷ را در برمی‌گیرد. دومین اولی به عنوان یک گیرنده عمل می‌کند. در این پروتئین تعداد کل اسیدآمینه‌های باردار ۱۶/۴ درصد که از این تعداد ۳ اسیدآمینه دارای بار منفی و ۶ اسید آمینه با بار مثبت هستند.

تعیین عملکرد پروتئین با استفاده از پایگاه BLOCKS نشان داد که پروتئین مد نظر با دارا بودن کمترین ارزش مورد انتظار، به خانواده پروتئینی bradykinin receptor مربوط بوده و این خانواده پروتئینی دارای ۸ بلوک حفاظت شده است. نتایج بیوانفورماتیکی مربوط به هدف‌گیری پروتئین، نشان داد که بیشترین میزان ترشح پروتئین درغشاء پلاسمائی بوده است.

بحث و نتیجه گیری

با در نظر گرفتن خسارت بیماری‌های باکتریایی، اهمیت شناسایی و آنالیز ژن‌های مقاوم به پاتوژن‌های باکتریایی در کشاورزی حائز اهمیت است. با توجه به خسارت بالای بیماری‌های باکتریایی در باغبانی تولید گیاهان تراریخته متحمل از طریق انتقال ژن می‌تواند منجر به افزایش تولیدات، کاهش مصرف سم و رسیدن به راندمان مطلوب تولید آن در واحد سطح شود.

بیماری میوه سبز مرکبات یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در ایران است (Salehi *et al*. 2010). ولی با توجه به آن- که ناقل این بیماری یعنی پسیل مرکبات می‌تواند همه گونه مرکبات را آلوده نماید، در صورت عدم کنترل به موقع این بیماری به نظر می‌رسد خطرناک‌تر از جاروک لیموترش باشد. مهم‌ترین علایم در درختان آلوده شامل کم پشت بودن، کوتاهی، مرگ ترکه‌ها، زردی شاخساره یا ریزش شدید میوه، ایجاد رنگ سبز در قسمت گل‌گاه میوه است (Akhtar and Ahmad 1999). باکتری عامل میوه سبز می‌تواند بیشتر رقم‌ها، گونه‌ها، هیبریدها و نیز خویشاوندان مرکبات را آلوده کند (Sindhuja and Ehsani 2010).

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.8.8]

واکنش ارقام مختلف و هیبریدهای مرکبات به عامل میوه سبز مرکبات متفاوت است. در مالزی گزارش شده که علائم بیماری میوه سبز مرکبات روی پوملو مشاهده نمی‌شود، اما نارنگی رقم عسلی (*C. reticuluta* cv. Honey Mandarin)، *C. madurensis* cv. Calamondin، *C. aurantium* به ترتیب علائم را با شدت ۷۵٪ ، ۶۵٪، ۵۰٪ نشان دادند. بیماری میوه سبز مرکبات روی ۱۵ گونه از مرکبات، شش ماه پس از آلودگی از طریق پیوند دیده می‌شود. اما ظهور و شدت علائم بین گونه‌های مختلف متفاوت بود (Sindhuja and Ehsani 2010).

داده‌های بدست آمده در مطالعات اخیر نشان داده‌اند که تظاهر ژن *NBS552* نقش مهمی در مقاومت به باکتری عامل میوه سبز مرکبات دارد (Gholampour *et al*. 2014). این ژن برای اولین بار از گیاه گریپ‌فروت ایرانی از طریق PCR جداسازی و در پلاسمید pGEM کلون شد. شماره دسترسی به این ژن در بانک جهانی ژن JZ775596 است. این اولین گزارش از جداسازی و کلونینگ این ژن از طریق مهندسی ژنتیک در ایران است.

درخت فیلوژنی براساس توالی *NBS552* بین گونه‌های مختلف گیاهی به منظور بررسی روابط تکاملی نشان می‌دهد که دو شاخه اصلی شامل گیاهان زراعی و باغی را شکل می‌دهد که شاخه باغی شامل *Poncirus trifolia* و بقیه شامل گیاهان غیر باغی است. قابل توجه این‌که ژن *NBS552* گریپ‌فروت جدا از بقیه قرار گرفته، همچنین دیگر گونه گیاهی در درخت فیلوژنی در جایگاه مناسبی به‌لحاظ تاکسونومیکی قرار نگرفته‌اند به عنوان مثال گیاه پنبه که زراعی است با گیاه *Rhazya stric* که دارویی است کنار هم قرار گرفته‌اند که بیانگر شباهت بالای ژن *NBS552* در سطح ملکولی بین گونه‌های گیاهی است و این‌که نقش مهمی در مقاومت در گونه‌های مختلف گیاهی دارد.

براساس آنالیزهای مختلف بیوانفورماتیکی مشخص شد قطعه‌ی توالی‌یابی شده شباهت زیادی با توالی ژن‌های سایر گیاهان ثبت شده در NCBI دارد. بررسی شباهت ژن *NBS552* با سایر ژن‌های موجود در NCBI نشان داد که این ژن در اکثر گیاهان حفظ شده است. از آنجایی که خانواده NBS-LRRها در مقاومت عمودی نقش دارند، این مطالعه راهی برای تولید گیاهان تراریخته متحمل به بیماری میوه‌سبز مرکبات از طریق انتقال ژن برای مطالعه آینده است.

منابع

Akhtar M, Ahmad I. 1999. Incidence of citrus greening disease in Pakistan. Pakistan Journal of Phytopathology 11: 1–5.

Bove JM. 2006. Huanglongbing: a destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus. Journal of Plant Pathology 88: 7-37.

Fao. 2013. FAOSTAT. Food and agricultural commodities production. Available at http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx. FAO, Rome, Italy.

Ghayeb Zamharir M, Alizadeh A and Kachoei S. 2014. Phylogenetic analysis of divergent structural organization of nucleotide binding domain encoded by resistance genes and gene homologes in Citrus. International Journal of Agriculture and Crop Sciences 7:379-385.

Gholampour H, Ghayeb Zamharir M, Karimi J, Farrokhi N, Alizadeh A and Taheri P. 2014. Identification of genes differentially expressed during interaction of Grapefruit infected with *Candidatus* Liberibacter asiaticus in disease late stage. Journal of phytopathology 162 (11-12): 811-819, doi: 10.1111/jph.12273.

Hajivand S, Thohirah LA, Kamaruzaman S, Siti NAA, Nu APA. 2009. Differential Species Reacation to Huanglongbing (HLB) Disease by Grafting Method in Malaysia. American Journal of Agricultural and Biological Sciences 4(1): 32-38.

Lawrence L, Ram C, Ning H, Pamela C and Frederick M. 2000. Isolation and characterization of disease resistance gene homologues from rice cultivar IR64. Gene 255: 245–255.

Leonard JT, Grace MB, Buzard GS, Mullen MJ and Barbagallo CB. 1998. Preparation of PCR Products for DNA Sequencing. BioTechniques 24: 314-317.

Mariângela C, Irving J, Maria L, Marco A, Sílvia O, Juliana F, Alessandra A, Raquel L, Marcelo S and Marcos A. 2007. Differential expression of genes identified from Poncirus trifoliata tissue inoculated with CTV through EST analysis and in silico

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.8.8]

hybridization. Genetics and Molecular Biology 30(3): 972-979.

Matsuba Y, Nguyen TT, Wiegert K, Falara V, Gonzales-Vigil E, Leong B, Schafer P, Kudrna D, Wing RA, Bolger AM. 2013. Evolution of a complex locus for terpene biosynthesis in *Solanum*. Plant Cell 25: 2022–2036.

Sagheer A, Zhou C, Zhou Y, Cao M, Wang X. 2012. Distribution and research advances of citrus tristeza virus. Journal of Integrative Agriculture 11(3): 346-358.

Salehi M, Faghihi M, Bagheri A, Zakeri M and Izadpanah K. 2010. Further studies on citrus huanglongbing disease in Southern Iran. In proceeding of 19th Iranian plant protection congres, 31 July- 3 August, IRIPP, Tehran. P: 473. (In Farsi with English abstract)

Salehi M, Faghihi M, Khancheh R, Bagheri A, Zakeri M and Izadpanah K. 2012. Distribiution of citrus huanglongbing disease and its vector in southern Iran. Iranian journal of plant pathology 48 (2): 195-208. (In Farsi with English abstract)

Simone G, Helaine C. 2007. Putative resistance genes in the CitEST database. Genetics and Molecular Biology 30(3): 931-942.

Sindhuja S and Ehsani R. 2010. Mid-infrared spectroscopy for detection of Huanglongbing (greening) in citrus leaves. Talanta 83: 574–581.

Song HW, Liu YX, Hu GB, Qin YH, Lin SQ. 2011. An improved method for total RNA isolation from recalcitrant loquat (Eriobotrya japonica Lindl.) buds. Pakestan Journal of Botany 43(2):1-9.

Ute A and Kim DB. 2008. Gene expression in Citrus sinensis (L.) Osbeck following infection with the bacterial pathogen *Candidatus* Liberobacter asiaticus causing Huanglongbing in Florida. Plant Science 175: 291–306.

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.8.8]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Vol4, Number2, Fall 2015 and Winter 2016, Bi-seasonal

Isolation, cloning and bioinformatic study of a resistance gene against an Asian strain of citrus greening librobacter in grapefruit plant

Masoud Tohidfar[1] and Maryam Ghayeb Zamharir[2*]

1. Biotechnology group, Department of New Technology and Energy Engeenier, Shahid Beheshti University, Tehran, I. R. Iran.

2. Department of Plant Disease, Iranian Research Institute of Plant Protection (IRIPP), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREO), Tehran, Iran.

*Corresponding Author, Email: zamharir2005@yahoo.com

ABSTRACT

Citrus greening disease is the most important bacterial diseases of citrus and is present in the southern region of Iran. Due to the nature of the pathogen, disease control is difficult. cDNA-AFLP analysis shows that the expression pattern of NBS-LRR (Nucleotide Binding Site- Leucine-Rich Repeats) genes was upregulated in grapefruit plant interacting with *Candidatus* Leiberibacter aciaticus. In this study we have isolated the *NBS552* gene from grapefruit by PCR and clone it by ligation of this product to pGEM-T vector transformed *E. coli* bacteria. Sequencing analysis revealed an open reading frame for a gene of 171 bp that encodes a protein of 57 amino acids. Results of bioinformatic analysis showed that this gene contains regions that are conserved in different plant species. The NBS552 protein is associated with membranes and its extracellular secretion is low. The aim of this study was isolation and cloning of *NBS552* genes from the grapefruit genome and characterization of the genes in view of their potential for practical use in plants.

Key Words

Grapefruit,C itrus Greening, Gene *NBS552*, Resistance

[Downloaded from gebsj.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1394.4.2.8.8]