

بررسی بیوانفورماتیکی 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 Tohidfar¹ and Maryam Ghayeb Zamharir²

۱- گروه بیوتکنولوژی دانشکده فن‌آوری‌های نوین و مهندسی انرژی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- بخش تحقیقات بیماریهای گیاهان، موسسه تحقیقات 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 راه کار در جهت مبارزه با این بیماری است. اخیراً، 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 (NBS-LRR) Nucleotide Binding Site- Leucien-Rich Repeats (NBS552) با آغازگرهای اختصاصی از گریپ-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 آمینه را کد می‌کند. نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که این ژن در بین گونه‌های گیاهی دارای توالی‌های حفاظتی بالایی است و احتمالاً 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

به دلیل ماهیت این عامل بیماریزا، کنترل بیماری مشکل بوده و در حال حاضر استراتژی کارآمد برای کنترل بیماری‌های ناشی از فایتوپلاسماها و لیروباکترها 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 مایه‌زنی شده 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 تریتیزیای مرکبات از چند جهت مشابه با میوه‌سبز مرکبات است. با توجه به اینکه عامل تریتیزیای 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، با توجه به اختصاصی بودن این ژن‌ها، تقریباً تمام ژن‌های R که تا این تاریخ شناسایی شده‌اند، کد کننده پلی‌پپتیدهایی است که قسمتی از آن‌ها مشابه است و باعث تقسیم 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

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 گرم منفی سخت کشت 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. americanus*، *Ca. L. africanus*، *Ca. L. asiaticus* گزارش شده است (Bove 2006). دو گونه از پسپل مرکبات *Diaphorina citri* Kuwayama (پسپل آسیایی) و *erytrae* Del Guericco (پسپل 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 پسپل آسیایی مرکبات و با استفاده از روش‌های تشخیص علائم بیماری در مرکبات، انتقال بیماری با پیوند، ردیابی عامل بیماری در بدن پسپل 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. reticulata* (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).



شکل ۱- مایه زنی گریپ فروت با پیوندک‌ها 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 4°C و در 13000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و مایع رویی به تیوب جدید منتقل شد. به این محلول $500\ \mu\text{l}$ آب مقطر استریل و $170\ \mu\text{l}$ نمک لیتیم کلراید $8\ \text{M}$ اضافه شد. تیوب‌ها چند بار با دست معکوس کرده تا محلول‌ها با هم مخلوط شوند. میکروتیوب‌ها ۳-۵ ساعت در دمای 4°C در یخچال نگهداری شدند و پس از آن در دمای 4°C و در 13000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن مایع رویی، پلیت تشکیل شده، در $500\ \mu\text{l}$ آب فوق خالص حل شده و $170\ \mu\text{l}$ نمک لیتیم کلراید $8\ \text{M}$ به آن اضافه شد. میکروتیوب‌ها مجدد ۳-۵ ساعت در دمای 4°C در یخچال نگهداری و سپس در دمای 4°C و در 13000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از دور ریختن مایع رویی، پلیت تشکیل شده، در $300\ \mu\text{l}$ آب فوق خالص حل شد و $30\ \mu\text{l}$ نمک استات سدیم $10\ \text{M}$ و $600\ \mu\text{l}$ الکل اتانول خالص که در فریزر خنک شده بود به آن اضافه و یک ساعت در دمای 50°C - نگهداری شدند. بعد از سانتریفیوژ کردن میکروتیوب‌ها در 13000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه، مایع رویی دور ریخته شد. پلیت تشکیل شده را با اتانول (v/v) ۸۰٪ شسته و در دمای 4°C با سرعت 13000 rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ نمودیم. بعد از دور ریختن مایع رویی، رسوب تشکیل شده در دمای 37°C خشک شد. به هر نمونه $25\ \mu\text{l}$ آب مقطر استریل اضافه نموده و پس از حل شدن رسوب در آب نمونه‌ها برای انجام

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 در مورد 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 علائم بیماری‌های قارچی و باکتریایی بودند. نهال‌ها پس از انتقال به گلخانه قرنطینه موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، در خاک سبک کشت شده و در دمای 20°C - 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 علائم‌دار 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 روش‌های مولکولی تایید شد.

جداسازی RNA و سنتز cDNA: استخراج RNA با استفاده از روش CTAB انجام شد (Song *et al.* 2011). در این روش $800\ \mu\text{l}$ بافر CTAB دو درصد به نمونه‌های پودر شده 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 65°C نگه داشته و سپس به آن‌ها $600\ \mu\text{l}$ کلروفرم-ایزواکیل الکل (۲۴:۱) اضافه شد

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 (ویژگی‌های توالی‌های 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 نرم‌افزار 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 PROTEIN استفاده 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.

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 رونوشت ۵۵۲ حاصل از مطالعات cDNA-AFLP طراحی شد. از جمله مناسب‌ترین آنها، آغازگر 3'-CGGGGCGTCTAACTCATAGA-5' به عنوان آغازگر روبه‌جلو و توالی 5'-GGGAAAGACAACCTTGG-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 قطعه‌ای به طول ۲۲۰ bp را در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر می‌کند.

همساز 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 -گلوکوکورونیداز تحت پروموتورهای SP6 و T7 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

نتایج

پس از استخراج RNA از گیاه گریپ فروت سالم و مایه زنی 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 (شکل ۲). پس از خالص سازی، باند مورد نظر برای تعیین توالی با دو آغازگر T7 و SP6 به کمپانی ماکروژن کره ی جنوبی ارسال شد و نمونه ها 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 قطعه ای 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).

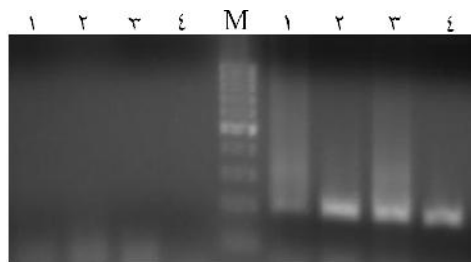
به منظور بررسی بیشتر وضعیت ژنوم، در حدود ۱۰۰۰ جفت باز از دو طرف ژن بررسی شد که نتایج نشان داد در این منطقه از ژنوم تاکنون فقط برای سه ناحیه (Misc Feature1, Misc Feature2, Misc Feature3) مستند سازی انجام شده است (شکل ۳B). لازم است آنالیزهای بیشتر برای نقش عملکردی این مناطق انجام شود. آنالیزهای مستندسازی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

نتایج هم ردیفی 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 می دهد. دلیل اصلی تفاوت را می توان به تفاوت بین گونه های و جهش های 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 گسترده ای از اطلاعات را در خود دارد و بررسی تمام این توالی ها بسیار دشوار است، معمولاً از توالی های استفاده می شود که در موجودات هومولوگ باشد. ترسیم درخت فیلوژنی چهار گروه را ایجاد کرد (شکل ۵ بالا) گروه اول شامل *Poncirus trifoliata*، *Daucus carot*، *Vaccinium macrocarpon* است، که بیشترین شباهت با ژن مذکور مربوط به گیاه *Vaccinium* است. اگر چه این سه گیاه از خانواده های مختلفی هستند، این ژن در گونه های مختلف وجود دارد. گروه دوم فقط شامل گیاه *Geranium maderence* است که بصورت جداگانه از بقیه گروه ها قرار گرفته است. گروه سوم شامل *Gossypium*، *Rhazya stric* و *Helianthus annuus* است که متعلق به خانواده های 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 خانواده های مختلف با عملکرد یکسان است که نشان می دهد این ژن می تواند نقش کلیدی در گیاه داشته باشد و همین باعث شد تا بصورت حفاظت شده در گونه های مختلف در طول تکامل حفظ شود.

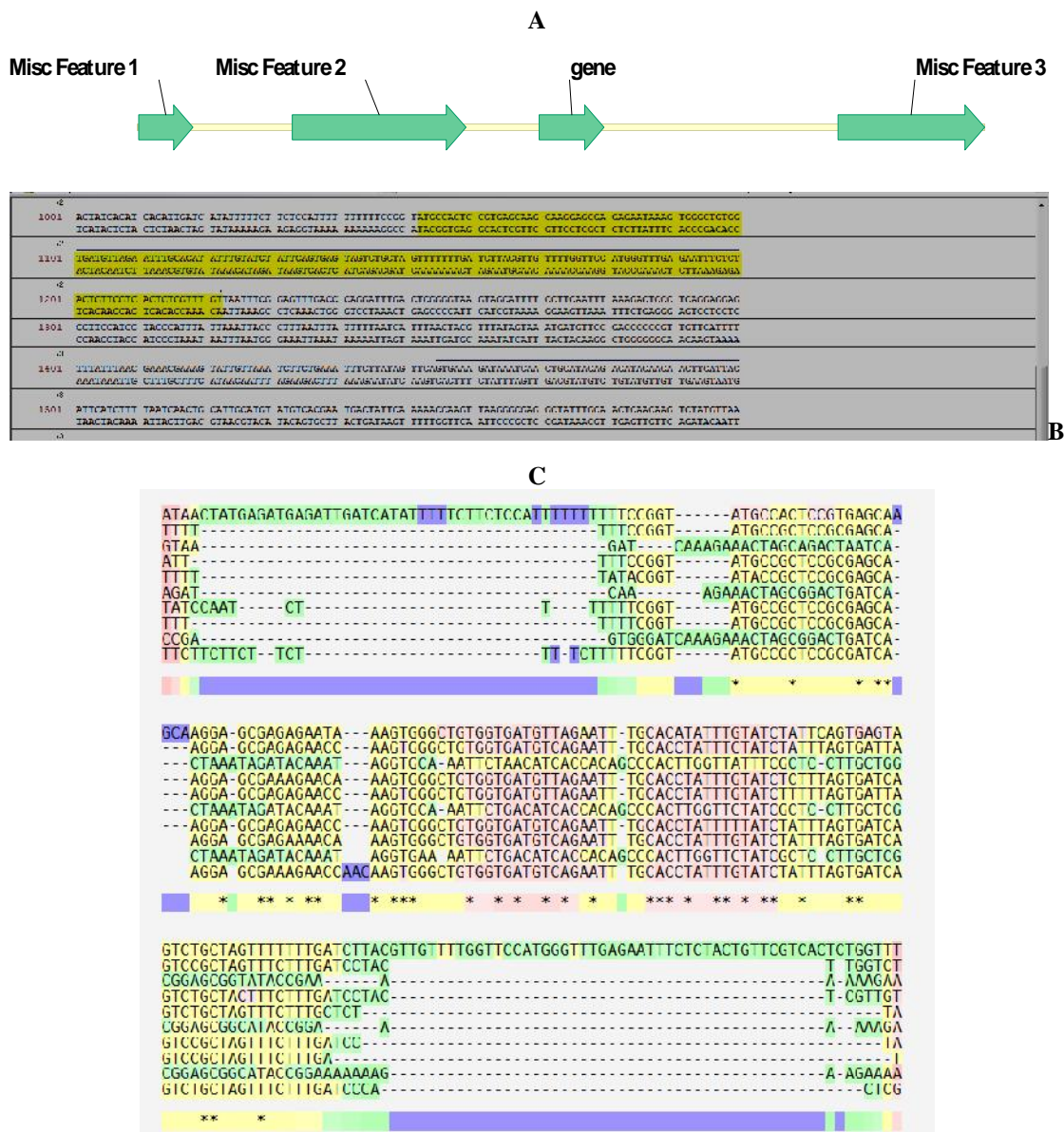
بررسی ساختار دوم پروتئین ژن کلون شده با استفاده از PSIPred نشان داد که این پروتئین فقط از مارپیچ تشکیل شده است (شکل ۵ پایین).

خصوصیات پروتئین و دومین های آن: خصوصیات فیزیکوشیمیایی پروتئین ژن توالی یابی شده نشان داد که پروتئین مورد نظر دارای ۵۷ اسید آمینه 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 شیشه ای حدود ۳۰ ساعت در یوکاریوت ها تخمین زده می شود که این نیز دلیل دیگری بر پایداری پروتئین است.



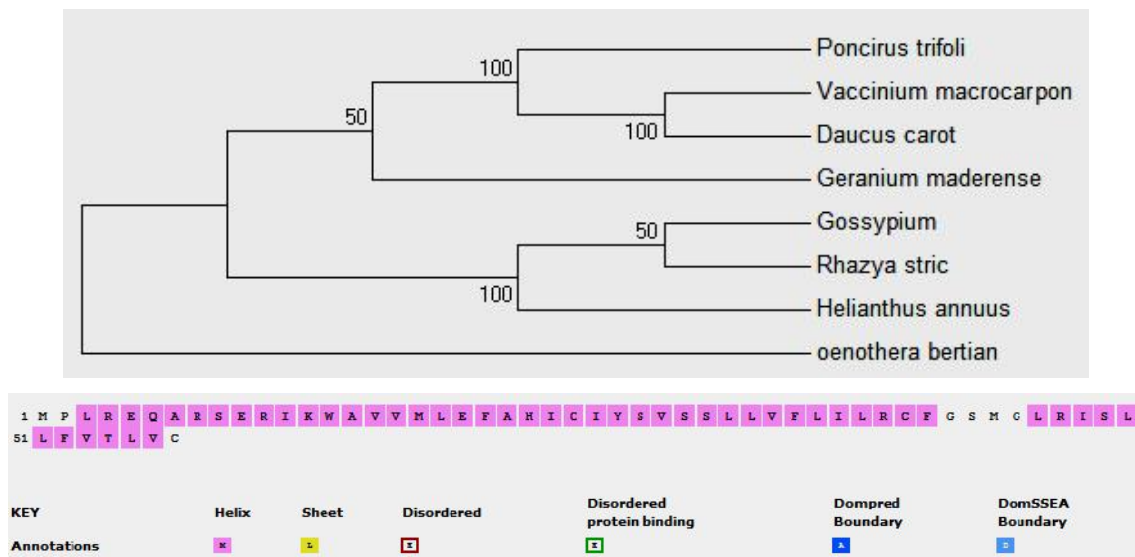
شکل ۲- تکثیر ژن NBS552 از روی cDNA حاصل از گیاهان آلوده گریپ فروت (چاهک انا ۴ در سمت راست مارکر)، گیاهان سالم (چاهک انا ۴ در سمت چپ مارکر) و M سایز مارکر 100 bp (فرمتاز).

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).



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* 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 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.



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

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 علائم 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).

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 در غشاء پلاسمایی بوده است.

شاخه باغی شامل *Poncirus trifolia* و بقیه شامل گیاهان غیر باغی است. قابل توجه این که ژن *NBS552* گریپ فروت جدا از بقیه قرار گرفته، همچنین دیگر گونه گیاهی در درخت فیلوژنی در جایگاه مناسبی به لحاظ تاکسونومیک قرار نگرفته اند به عنوان مثال گیاه پنبه که زراعی است با گیاه *Rhazya stric* که دارویی است کنار هم قرار گرفته اند که بیانگر شباهت بالای ژن *NBS552* در سطح ملکولی بین گونه های گیاهی است و این که نقش مهمی در مقاومت در گونه های مختلف گیاهی دارد.

بر اساس آنالیزهای مختلف بیوانفورماتیکی مشخص شد قطعه ی توالی یابی شده شباهت زیادی با توالی ژن های سایر گیاهان ثبت شده در NCBI دارد. بررسی شباهت ژن *NBS552* با سایر ژن های 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 میوه سبز مرکبات از طریق انتقال ژن برای مطالعه آینده است.

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 نمی شود، اما نارنگی رقم عسلی (*C. reticulata* cv. Honey Mandarin)، *C. madurensis*، *C. aurantium*، cv. Calamondin، ۷۵٪، ۶۵٪، ۵۰٪ نشان دادند. بیماری میوه سبز مرکبات روی ۱۵ گونه از مرکبات، شش ماه پس از آلودگی از طریق پیوند دیده می شود. اما ظهور و شدت علائم بین گونه های مختلف متفاوت بود (Sindhuja and Ehsani 2010).

داده های بدست آمده در مطالعات اخیر نشان داده اند 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 گریپ فروت 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 گونه های مختلف گیاهی به منظور بررسی روابط تکاملی نشان می دهد که دو شاخه اصلی شامل گیاهان زراعی و باغی را شکل می دهد که

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 Reaction 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

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 homologues 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*

- 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 congress, 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.** Distribution 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. *Pakistan 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.

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

Masoud Tohidfar¹ 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 citrus Greening, Gene *NBS552*, Resistance