

تعیین ترادف ژنوم ویروئید کوتولگی رازک از درختان مبتلا به بیماری

کاککسیای مرکبات مازندران

Nucleotide sequence of *Hop stunt viroid* cDNA from Cachexia-infected citrus plants in Mazandaran province

سید محمد علوی، علی آهون منش و حشمت‌اله رحیمیان*

بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران

پذیرش ۱۳۸۶/۶/۱۶

دریافت ۱۳۸۵/۵/۲

چکیده

بیماری کاککسیا در اکثر مناطق مرکبات‌کاری در دنیا دیده می‌شود. علائم این بیماری به صورت کوتولگی، صمغ زیر پوست، زردی و ضعف درختان، ساقه آبله‌ای و ناسازگاری در محل اتصال پایه و پیوندک می‌باشد که در بسیاری از درختان مرکبات استان مازندران مشاهده گردیده است. در سال ۱۳۸۴ هشت درخت مرکبات دارای علائم بیماری کاککسیا از دو منطقه مرکبات‌کاری شهرستان ساری انتخاب و از برگهای جوان آنها با استفاده از فنول اسیدی آر. ان. ا استخراج شد. آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروئیدهای کوتولگی رازک و ویروئیدهای دیگر مرکبات نظیر اگزوکورتیس، خمیدگی برگ، III و IV مرکبات و ژن مولد پروتئین پوششی ویروس تریستزای مرکبات (CTV, CP₂₅) برای شناسایی عامل احتمالی مولد بیماری کاککسیا نشان داد که درختان مبتلا فقط حاوی ویروئید کوتولگی رازک می‌باشند. نوار دی. ان. ا تکثیر شده در PCR با استفاده از کیت خالص‌سازی (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) شرکت روش آلمان از ژل آگاروز بازیافت و با آنالیز چند شکلی فرم فضایی رشته‌های تک‌لا

* مسئول مکاتبه

(SSCP) ارزیابی شد. دو جدایه متفاوت در SSCP، انتخاب و در پلاسמיד p^{Bluescript SK} همسانه‌سازی و ترادف نوکلئوتیدی آن تعیین (توسط شرکت SeqLab آلمان) شد. هم‌سانی ترادف‌ها با ترادف‌های بانک ژن نشان‌دهنده حضور ویروئید کوتولگی رازک در نمونه‌های آلوده بودند. از آنجایی که علائم این بیماری در بیشتر درختان مرکبات نظیر نارنگی‌های انشو، کلمانتین و محلی در شمال ایران مشاهده شده است، احتمال دارد بیشتر درختان مرکبات شمال ایران به عامل بیماری کاککسیای مرکبات آلوده باشند. ترادف نوکلئوتیدی ویروئید کوتولگی رازک همراه با بیماری کاککسیا برای اولین بار در ایران تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: کاککسیا، ساقه آبله‌ای، کوتولگی رازک، ویروئید، انشو

مقدمه

ویروئیدها کوچکترین عوامل بیماری‌زای گیاهی هستند که تا به حال شناسایی شده‌اند. هم‌اکنون پنج گونه ویروئید آلوده‌کننده مرکبات شناسایی و آرایه‌بندی شده‌اند ولی تعداد دیگری وجود دارند که هنوز گروه‌بندی نشده‌اند (Flores *et al.* 2000, Flores *et al.* 2004). در بین ویروئیدهای مرکبات، ویروئیدهای گروه II مرکبات که نماینده آنها ویروئید کوتولگی رازک (*Hop stunt viroid*, HSVd) می‌باشد، عامل مولد بیماری کاککسیای (Cachexia) مرکبات گزارش شده است (Reanwarakorn & Semancik 1999). در ۱۹۳۴ بیماری زایلوپوروز^۱ توسط رایچرت و پرلبرگر معرفی گردید (Reichert & Perlberger 1934). بیماری کاککسیا در سال ۱۹۵۰ توسط چایلدنز نامگذاری شد (Childs 1950). چایلدنز براساس شباهت‌های آسیب‌شناختی گزارش نمود که عامل مولد این دو بیماری یکسان هستند (Childs 1952). رویستاکر اعلام نمود که عامل دو بیماری زایلوپوروز و کاککسیا یکی هستند و زمانی که عامل بیماری کاککسیا به لیمو شیرین منتقل شود علائم زایلوپوروز را در این گیاه ایجاد می‌کند (Roistacher 1988). عامل بیماری تا سال ۱۹۹۹ به عنوان ویروئید کاککسیا معرفی شده بود ولی در همان سال ران‌واراکون و سمانچیک گزارش نمودند که عامل بیماری توسط ویروئید کوتولگی رازک ایجاد می‌شود (Reanwarakorn & Semancik 1999). ویروئید کوتولگی رازک در بین تمامی ویروئیدهای

^۱ Xyloporosis

شناخته شده بیشترین دامنه میزبانی را دارد و علائم متفاوتی را در گیاهان مختلف ایجاد می‌کند. علائم بیماری کاککسیا در مرکبات شامل ترشح صمغ، زردی برگها، ساقه آبله‌ای، کوتولگی و ناسازگاری در محل پایه و پیوندک می‌باشد. بررسی واکنش ارقام پس از انتقال بیماری با پیوند به گیاهان محک نظیر نارنگی Parson's Special و 'Orlando' tangelo از اولین روشهایی بودند که در تشخیص بیماری کاککسیا به کار رفته است (Roistacher 1991). از آنجایی که این روش حداقل به ۱۲ ماه زمان برای بروز علائم نیاز دارد محققین به دنبال یافتن روش‌های سریعتر تشخیص بوده‌اند. با ابداع روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR)، تشخیص و ردیابی ویروئیدها آسانتر گردیده به طوری که امروزه این روش به صورت روزمره برای ردیابی ویروئیدها به کار می‌رود (Hadidi et al. 2003).

در ایران علائم بیماری کاککسیا اولین بار توسط حبشی و ابراهیمی در درختان مرکبات سواحل دریای خزر مشاهده شد (Bove 1995). حبشی و رحیمیان توانستند عامل مولد بیماری را با پیوند به گیاهان محک 'Orlando' tangelo منتقل کنند (Habashi & Rahimian 1983) اما تاکنون تحقیقاتی در زمینه شناسایی عامل بیماری در درختان آلوده در ایران انجام نشده است. از آنجایی که شروع گسترش ویروس تریسترا سبب روی آوردن باغداران به استفاده از پایه‌های مقاوم به تریسترا ولی حساس به ویروئیدهای مرکبات نظیر سیترنج و سیتروملو در مازندران گردیده است، شناسایی عامل بیماری کاککسیای مرکبات و تعیین پراکندگی بیماری در مرکبات استان مازندران اهمیت بیشتری یافته است. هدف از بررسی حاضر شناسایی مولکولی عامل بیماری کاککسیا و پراکنش بیماری در درختان مرکبات مازندران می‌باشد.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه

نمونه‌برداری در تابستان ۱۳۸۴ از دو منطقه مهم مرکبات‌کاری شهرستان ساری شامل مهدشت پایین، مهدشت بالا و اطراف مهدشت بالا صورت گرفت. چهار نمونه نارنگی انشو از مهدشت پایین ($LMSX_1$, $LMSX_2$, $LMSX_3$, $LMSX_4$)، دو نمونه نارنگی انشو از مهدشت بالا ($UMSX_1$, $UMSX_2$) و دو نمونه نارنگی کلمانتین ($UMCX_1$, $UMCX_2$) از باغهای اطراف مهدشت بالا جمع‌آوری شد. علائم مشاهده شده در نارنگی انشو شامل ضعف وزردی،

ناسازگاری محل اتصال پایه و پیوندک و ساقه آبله‌ای بود (شکل ۱). علائم در نارنگی کلمانتین به صورت صمغ زیر پوست مشاهده شد. علائم مذکور در درختان مرکبات استان مازندران مشاهده شده و از پراکندگی بالایی برخوردار است (رحیمیان، ح. منتشر نشده). از چهار سمت درخت مقداری شاخه و برگ جوان جدا و جهت نگهداری دراز مدت در دمای 7°C قرار داده شد. برای نمونه‌برداری از هر درخت، ضدعفونی چاقو به مدت ۱۰ ثانیه در هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد (محلول ده برابر رقیق شده سفید کننده خانگی) انجام و سپس چاقو در آب مقطر شسته شد.



شکل ۱- علائم ساقه آبله‌ای در نارنگی انشو از دور (الف) و از نزدیک (ب).

Fig. 1. Stem pitting on Satsuma mandarin trunks.

استخراج آر.ان.ا

آر.ان.ا کل (total RNA) نمونه‌ها به روش یانگ و همکاران (Yang *et al.* 1992) با تغییراتی به صورت زیر استخراج شد:

یکصد میلی‌گرم بافت برگ و سرشاخه در نیتروژن مایع در هاون استریل پودر گردید و یک میلی‌لیتر بافر استخراج (0.1M glycine – NaOH , pH 9.0 , 50mM NaCl , 2% SDS, 1mM Na_2EDTA , 1% sodium lauryl sarcosine) به آن اضافه و پنج ثانیه ورتکس (Vortex) شد. سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در 12000 دور در دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ و 600 میکرولیتر فاز بالایی به میکروتیوب جدید منتقل و به آن فنول و کلروفرم

اضافه شد و به مدت دو ثانیه ورتکس شد. سپس به مدت ده دقیقه داخل یخ قرار گرفت. پس از سانتریفوژ کردن در شرایط یاد شده، ۶۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی به لوله جدید منتقل شده و ۴۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه و چند بار تکان داده شد. میکروتیوب به مدت دو ساعت در ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفت و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه در چهار درجه سانتیگراد سانتریفوژ شد. بعد از دو بار شستشوی رسوب ته میکروتیوب با اتانول ۷۰٪، لوله به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصله در زیر هود استریل خشک و در ۲۰ میکرولیتر آب استریل تیمار شده با DEPC (Diethyl pyrocarbonate) حل و مدت یک شبانه روز در چهار درجه سانتیگراد قرار گرفت. نمونه‌ها تا زمان استفاده در دمای ۷۰°C- نگهداری شدند. کلیه مراحل استخراج آر. ان. ا در شرایط استریل انجام شد و تمامی محلولهای مورد استفاده با آب تیمار شده با DEPC تهیه گردیدند. کمیت و کیفیت نمونه آر. ان. ا با روشهای اسپکتروفتومتری الکتروفورز ژل آگاروز- فرمالدهید و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نسخه‌برداری معکوس (Reverse transcription-polymerase chain reaction) با آغازگرهای ناحیه بین ژنی 18s rDNA (جدول ۱) ارزیابی شد. روش الکتروفورز در ژل واسرشته‌سازی آر. ان. ا براساس دستورالعمل Rneasy Mini Handbook شرکت QIAGEN و آزمون RT-PCR نیز بر اساس روش کورودا (Kuroda 2003) انجام گردید.

آزمون RT-PCR

واکنش نسخه‌برداری معکوس (Reverse transcription, RT) با آغازگرهای معکوس ویروئیدهای کوتولگی رازک، خمیدگی برگ (Citrus bent leaf viroid, CBLVd)، آگزوکورتیس (Citrus exocortis viroid, CEVd)، III (Citrus viroid III, CVd-III)، IV (Citrus viroid IV, CVd-IV)، و ویروس تریستزا (ژن پروتئین پوششی، CP₂₅) مرکبات انجام شد (جدول ۱). تمام مواد استفاده شده در واکنش نسخه‌برداری معکوس و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از شرکت فرمنتاس (Fermentas) و سیناژن تهیه گردید. مراحل ساخت رشته cDNA از الگوی آر. ان. ا با استفاده از دستورالعمل آنزیم MMuLV-Reverse transcriptase شرکت فرمنتاس انجام شد با این تفاوت که دمای واسرشته‌سازی ژنوم ویروئید در ۹۴ درجه به مدت ۵ دقیقه انجام و میکروتیوب سریعاً به مدت سه دقیقه روی یخ سرد شد و بعد از اضافه نمودن آنزیم، واکنش به مدت دو ساعت در دمای ۴۲ درجه انجام گرفت. بعد از اتمام واکنش

نسخه‌برداری معکوس، نمونه به مدت پنج دقیقه در ۹۴ درجه واسرشته و به سرعت به روی یخ منتقل شد.

جدول ۱- نام، ترادف، دمای اتصال و اندازه قطعه تولید شده مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در آزمون RT-PCR

Table 1. Name, sequence, annealing temperature and PCR product lengths of the primers used in PCR

ترادف ۳' → ۵' (Sequence 5' → 3')	اندازه محصول PCR (جفت باز) PCR product length(bp)	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) Annealing temp.	نام آغازگر (Primer name)
CTTCGGGATCGGAGTAATGATTAA GCCCAGAACATCTAAGGGCATCACAGA	600	56	18SU 18SR
GGGTAGTCTCCAGAGAGAAG GGTGAAACAACCTGAAGCTT	370	53	CEVd(-) CEVd(+)
CGCGGATCCTCAACGTGTGTTGAATTC GGTTGGATCCATGGACGACGAAACAAAG	672	58	CTV-L28 CTV-U28
ACGACCAGTCAGTCTCCTCTG CGTCGACGAAGGCTCGTCAGCT	320	54	CBLVd(-) CBLVd(+)
GGCTCCTTTCTCAGGTAAG CCGGGGCAACTCTTCTCAGAATCCA	300	52	HSVd(-) HSVd(+)
TCGACGACGACAGGTAAGTT CGAAGGCAGCTAAGTTGGTGA	290	51	CVd-III(-) CVd-III(+)
GGATCCCTCTCAGGTATGT CCGGGGAAATCTCTCAGACTC	285	51	CVd-IV(-) CVd-IV(+)
GTA AAAACGACGGCCAGT CAGGAAACAGCTATGAC	variable	52	M13F M13R

واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) طبق دستورالعمل موجود در برگه راهنمای آنزیم *Taq DNA Polymerase* شرکت سیناژن طبق واکنش زیر با دمای واسرشته‌سازی اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت سه دقیقه و سنتز نهایی ۱۵ دقیقه انجام شد. دمای مناسب اتصال آغازگرهای ویروئیدها و ویروس تریسترا مطابق جدول ۱ به کار برده شد. پس از انجام PCR، محصول در ژل آگاروز دو درصد در بافر TBE 1X (۱۰/۸ گرم Tris، ۵/۵ گرم اسید بوریک، ۴ میلی لیتر از ۰/۵ مولار EDTA ۸ pH و آب مقطر تا حجم نهایی یک لیتر) در ۸۰ ولت الکتروفورز گردید. پنج میکرولیتر از هر نمونه با یک میکرولیتر از رنگ بارگذاری (Loading dye) مخلوط و در چاهکها ریخته شد.

آب مقطر	۱۵ میکرولیتر
بافر ۱۰× PCR	۲/۵ میکرولیتر
MgCl ₂ (۵۰ میلی مولار)	۰/۷ میکرولیتر
dNTP (۱۰ میلی مولار)	۰/۵ میکرولیتر
آغازگر مستقیم (۱۰ Pmol/ul)	۰/۵ میکرولیتر
آغازگر معکوس (۱۰ Pmol/ul)	۰/۵ میکرولیتر
پلیمراز Taq (۵ واحد در میکرولیتر)	۰/۳ میکرولیتر
قالب (cDNA)	۵ میکرولیتر

برش آنزیمی قطعه تکثیر شده

جهت تأیید قطعه بدست آمده از واکنش PCR به عنوان دی. ان. ا ساخته شده از ویروئید کوتولگی رازک، برش آنزیمی با استفاده از ترادف جدایه های ویروئید کوتولگی رازک موجود در بانک ژن (NCBI) و نرم افزار MEGALIGN و MAPDRAW انجام شد. آنزیم *Cla* I که دارای یک مکان برشی در ژنوم ویروئید کوتولگی رازک بوده و تولید قطعات با اندازه های قابل ردیابی در ژل آگاروز می نمود انتخاب گردید. بعد از خالص سازی دی. ان. ا تکثیر شده با استفاده از کیت خالص سازی شرکت روش (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche)، هضم آنزیمی با شرایط زیر به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام و محصول آن در ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز گردید

دی. ان. ا تکثیر شده ۲۰ نانوگرم (۸ میکرولیتر)

بافر ۱۰× ۱ میکرولیتر

آنزیم *Cla* I (۱۰ واحد در میکرولیتر شرکت روش) ۱ میکرولیتر

آنالیز چند شکلی حاصل از فرم فضایی رشته های منفرد (PCR-SSCP)

بررسی چند شکلی حاصل از فرم فضایی رشته تکلا (Single – strand conformation polymorphism, SSCP) جهت شناسایی جدایه های مختلف (از نظر ترادف ژنوم) ویروئید کوتولگی رازک مولد بیماری کاککسیا انجام گرفت. بعد از خالص سازی دی. ان. ا هشت جدایه ویروئید کوتولگی رازک، از هر جدایه یک میکرولیتر دی.

ان. ا برای تعیین غلظت به کمک مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز مثبت (100 bp Ladder plus) در ژل آگاروز دو درصد الکتروفورز گردید.

روش SSCP با مقادیر مختلف ترکیبات خصوصاً غلظتهای متفاوت نمونه، نسبت‌های مختلف نمونه و بافر بارگذاری و با شرایط مختلف الکتروفورزی نظیر ولتاژ، درصد ژل، حضور یا عدم حضور گلیسرول، دما و زمان انجام شده و در نهایت روشی که مطلوبتر از روشهای دیگر بود به شرح زیر انتخاب گردید (Palacio & Duran-Vila 1999):

۱- حدود سه تا چهار میکرولیتر (۱۵ - ۱۰ نانوگرم) دی. ان. ا خالص شده با ۲۰-۱۵ میکرولیتر از محلول واسرشته‌سازی (۹۰ درصد فرامید، ۲۵ میلی‌مولار EDTA با pH ۸، ۰/۰۵ درصد زایلین سیانول و ۰/۰۵ درصد بروموفنول بلو) در یک میکروتیوب خنک مخلوط و به مدت کوتاهی در دمای چهار درجه سانتی‌فروز شد.

۲- مخلوط به مدت ده دقیقه در ۱۰۰ درجه جوشانده و سریعاً به یخ آب منتقل و سه دقیقه در آن نگهداشته شد. دی. ان. ا واسرشته شده در ژل پلی‌اکریل‌آمید دوازده درصد به ابعاد ۱۷×۱۶×۰/۱ سانتی‌متر الکتروفورز شد. الکتروفورز در ۲۰۰ ولت و در چهار درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت انجام گردید.

پس از اتمام الکتروفورز، رنگ آمیزی ژل بوسیله نترات نقره طبق روش ساکر (Saker 2000) انجام شد.

همسانه سازی دی. ان. ا تکثیر شده در ناقل پلاسمیدی

استخراج پلاسمید p^{Bluescript SK+} (Fermentas) با روش Miniprep از سلولهای *E. coli* انجام شد و سپس پلاسمید استخراج شده در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید. برای تهیه ناقل دارای انتهای اضافی تی (T-overhang) ، برش آنزیمی در ناحیه همسانه‌سازی چند گانه (multiple cloning site, MCS) پلاسمید p^{Bluescript SK+} انجام و dTTP به انتهای پلاسمید خطی شده اضافه شد. واکنش اتصال قطعه تکثیر شده به ناقل دارای انتهای تی اضافی در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶ ساعت با استفاده از مواد شرکت روش آلمان انجام شد. برخی از این مراحل از دستورالعمل‌های کتابچه راهنمای Ins T/A cloneTM PCR Product Cloning Kit شرکت فرمنتاس استفاده شد.

سلول‌های مستعد *E. coli* (Competent cell) (شرکت Invitrogen و سویه MC1061) با

استفاده از بافر حاوی کلسیم تهیه و با روش شوک حرارتی تراریخت گردید (Sambrook & Russell 2001).

مرحله غربالگری شامل غربالگری سریع و PCR پلاسمید با آغازگرهای اختصاصی ویروئید و آغازگرهای استاندارد M₁₃ انجام و نمونه‌ها در ژل آگاروز الکتروفورز گردیدند (Sambrook & Russell 2001).

برای اطمینان در انتخاب پلاسمیدهای نوترکیب PCR قطعه وارد شده با آغازگرهای استاندارد M₁₃ (جدول ۱) با ۳۰ سیکل طبق واکنش زیر انجام شد. در این مرحله از پلاسمیدهای نوترکیب که در مرحله قبلی (غربالگری سریع) انتخاب شده بودند به عنوان الگو استفاده و با پلاسمیدهای غیرنوترکیب مقایسه گردید. محصول PCR در ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز شد.

آب مقطر استریل	تا حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر
بافر ۱۰× PCR	۲/۵ میکرولیتر
MgCl ₂ (۵۰ میلی مولار)	۰/۷ میکرولیتر
dNTP (۱۰ میلی مولار)	۰/۵ میکرولیتر
آغازگر مستقیم (۱۰ پیکومول در میکرولیتر)	۰/۵ میکرولیتر
آغازگر معکوس (۱۰ پیکومول در میکرولیتر)	۰/۵ میکرولیتر
آنزیم Taq DNA polymerase (۵ واحد در میکرولیتر)	۰/۳ میکرولیتر
پلاسمید نوترکیب	۱ نانوگرم

برای تأیید نهایی حضور دی. ان. ا تکثیر شده در پلاسمیدهای نوترکیب، PCR پلاسمیدهای نوترکیب با آغازگرهای اختصاصی ویروئید کوتولگی رازک در مقایسه با پلاسمیدهای غیرنوترکیب انجام شد. واکنش PCR همانند واکنش مرحله قبلی انجام شد. محصول PCR در ژل آگاروز ۲٪ الکتروفورز گردید.

تعیین ترادف و آنالیز کامپیوتری ترادف‌ها

پس از انتخاب کلنی دارای دی. ان. ا ویروئید کوتولگی رازک، پلاسمید دارای دی. ان. ا ویروئید با استفاده از کیت خالص‌سازی شرکت (High Pure Plasmid Isolation Kit, Roche) خالص گردید و پس از تعیین غلظت در حضور مارکر وزن مولکولی، دو میکروگرم از

پلاسمید به شرکت SeqLab آلمان ارسال گردید. تعیین ترادف با استفاده از آغازگرهای استاندارد M_{13} (جدول ۱) انجام گرفت. ترادف‌های تعیین شده با استفاده از برنامه‌های مجموعه نرم‌افزار DNASTAR اصلاح گردید و با به کارگیری برنامه BLASTn (NCBI) با ترادف‌های موجود در بانک ژن (GenBank) به صورت نوکلئوتید به نوکلئوتید هم‌ردیفی (alignment) شد و میزان هم‌سانی (identities) ترادف تعیین شده با ترادف‌های موجود در بانک ژن تعیین گردید.

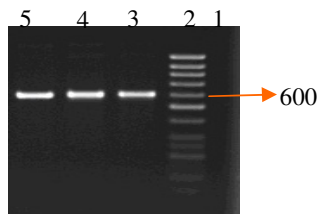
نتیجه

بررسی فراوانی و پراکنش بیماری کاککسیا بر اساس علایم بیماری

علایم بیماری کاککسیا در بسیاری از درختان نارنگی انشو (*C. unshiu*) و نارنگی یافا (کلمانتین، *C. reticulata*) و نارنگی محلی (*C. reticulata*) در استان مازندران مشاهده می‌شود. در دو نمونه فاقد علائم بیماری کاککسیا که از درختان نارنگی انشو مهدشت پایین جمع‌آوری شد، نوار دی. ان. ا حاصل از تکثیر با آغازگرهای اختصاصی ویروئید کوتولگی رازک نیز جدا شد. بنابراین در نمونه‌های فاقد علایم کاککسیا نیز احتمال حضور ویروئید کوتولگی رازک می‌باشد. پراکندگی ویروئید کوتولگی رازک در گونه‌های مرکبات ذکر شده در استان مازندران نسبتاً بالا می‌باشد و با توجه به آلودگی بسیار بالایی که در مرکبات‌کاری مازندران وجود دارد احتمال حضور عامل بیماری در هر درختی هست.

بررسی استخراج آر. ان. ا

غلظت و کیفیت نمونه‌های آر. ان. ا استخراج شده از بافت‌های آلوده با روشهای اسپکتروفتومتری، الکتروفورز در ژل آگاروز- فرمالدهید و RT-PCR با آغازگرهای ناحیه بین‌ژنی 18s rDNA ارزیابی گردید. نسبت میزان جذب نور نمونه‌ها در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر در محدوده ۱/۸۵ قرار داشت. در آزمون RT-PCR با آغازگرهای ناحیه بین‌ژنی 18s rDNA فقط یک نوار مربوط به محصول اصلی واکنش RT-PCR در محدوده ۶۰۰ جفت باز دیده شد و نوارهای غیراختصاصی و یا گستره (Smear) مشاهده نشد (شکل ۲).

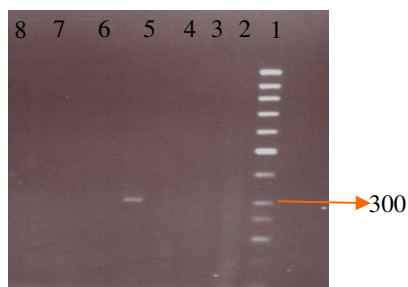


شکل ۲- نتایج الکتروفورز محصول RT-PCR نمونه‌های آر. ان. استخراج شده از مرکبات آلوده به ویروئیدها با آغازگر اختصاصی 18s rDNA چاهک‌ها: ۱، شاهد منفی؛ ۲، مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ ۳، نارنگی انشو؛ ۴، نارنگی کلمانتین؛ ۵، تامسون.

Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products amplified with 18s rDNA specific primer from RNA samples extracted from viroid-infected citrus trees Lanes: 1, negative control; 2, 100bp Ladder; 3, Satsuma sample; 4, Clementine sample; 5, Thomson navel sample.

آزمون RT-PCR

در الکتروفورز محصول PCR، با استفاده از آغازگر ویروئید کوتولگی رازک به نحو اختصاصی فقط نوار مربوط به این ویروئید در محدوده ۳۰۰ جفت باز مشاهده شد (شکل ۳). هیچ نواری برای ویروئیدهای دیگر مرکبات مشاهده نشد.

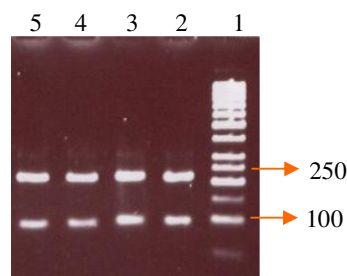


شکل ۳- نتایج RT-PCR ویروئیدها و ویروس تریستنزای مرکبات نمونه LMSX₂ در ژل آگاروز ۱/۵٪ چاهک‌ها: ۱، مارکر ۱۰۰ جفت باز؛ ۲، CTV؛ ۳، CBLVd؛ ۴، شاهد سالم؛ ۵، HSVd؛ ۶، CEVd؛ ۷، CVd-III؛ ۸، CVd-IV.

Fig. 3. Gel electrophoresis of RT-PCR products of citrus viroids and CTV in 1.5% agarose gel Lanes: 1, 100bp Ladder; 2, CTV; 3, CBLVd; 4, Healthy control; 5, HSVd; 6, CEVd; 7, CVd-III; 8, CVd-IV.

تائید محصول PCR با هضم آنزیمی

برش آنزیمی دی. ان. ۱ تکثیر شده با آغازگرهای اختصاصی ویروئید کوتولگی رازک توسط آنزیم *Cla* I انجام شد. قطعات بدست آمده در اثر برش با این آنزیم در محدوده ۲۱۰ و ۹۰ جفت باز قرار داشتند که نشان دهنده صحت تکثیر ژنوم ویروئید کوتولگی رازک در مقایسه با جدایه‌های دیگر این ویروئید موجود در بانک ژن با استفاده از آنالیز کامپیوتری می‌باشد (شکل ۴).



شکل ۴- نتایج برش آنزیمی محصول PCR تکثیر شده با آغازگر اختصاصی Hsvd از نمونه‌های آر. ان. ۱ استخراج شده از درختان مرکبات آلوده به ویروئید چاهک‌ها: ۱، مارکر ۵۰ جفت باز؛ ۲، نمونه $LMSX_2$ ؛ ۳، نمونه $UMSX_1$ ؛ ۴، نمونه $UMSX_2$ ؛ ۵، نمونه $UMCX_1$.

Fig. 4. Restriction digestion of PCR products amplified from RNA samples extracted from viroid-infected citrus trees Lanes: 1, 50bp Ladder; 2, $LMSX_2$; 3, $UMSX_1$; 4, $UMSX_2$; 5, $UMCX_1$.

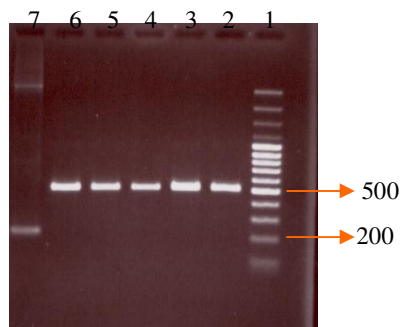
چند شکلی حاصل از فرم فضایی رشته‌های تک‌لا (SSCP)

پس از خالص‌سازی از ژل آگاروز هشت جدایه ویروئید کوتولگی رازک به روش SSCP مقایسه شدند. شرایط بهینه برای بررسی SSCP استفاده از ژل اکریل آمید ۱۲٪، الکتروفورز در ولتاژ ۲۰۰ ولت و دمای چهار درجه سانتی‌گراد و به کار بردن گلیسرول در ترکیب ژل تعیین گردید. اختلاف حرکتی تک رشته‌های دی. ان. ۱ در دی. ان. ۱ تکثیر شده ویروئید کوتولگی رازک دو نمونه $LMSX_2$ و $UMCX_1$ مشاهده شد. بر این پایه دو جدایه مذکور انتخاب و دی. ان. ۱ آنها در پلاسمید دارای انتهای اضافی تی همسانه‌سازی شد.

همسانه سازی دی. ان. ۱ ویروئید در ناقل دارای انتهای اضافی تی

در PCR نمونه‌های پلاسمید نوترکیب حاوی ویروئید مورد مطالعه با آغازگرهای فاژ M_{13}

که در دو طرف ناحیه همسانه‌سازی p^{Bluescript SK} وجود دارد قطعه‌ای با اندازه تقریبی ۵۲۰ جفت باز بدست آمد (شکل ۵). که موید حضور دی. ان. ا با اندازه معادل یک ژنوم ویروئید کوتولگی رازک در پلاسمید در مقایسه با محصول PCR پلاسمید غیرنوترکیب (حدود ۲۲۰ جفت باز) بود. همسانه‌های احتمالی دارای دی. ان. ا ویروئید کوتولگی رازک در آزمون PCR با آغازگرهای اختصاصی ویروئید کوتولگی رازک نیز همگی دارای دی. ان. ا به اندازه ژنوم ویروئید کوتولگی رازک بودند (شکل ۶). در آخر جهت اطمینان از حضور دی. ان. ا تکثیر شده با آغازگرهای ویروئید کوتولگی رازک در پلاسمید نوترکیب از روش برش محصول PCR مرحله قبلی با آنزیم *Cla* I استفاده شد (اطلاعات نشان داده نشده). دو نوار مورد انتظار ۹۰ و ۲۱۰ جفت باز معادل نوارهای حاصل از برش دی. ان. ا تکثیر شده ویروئید کوتولگی رازک تولید گردید.



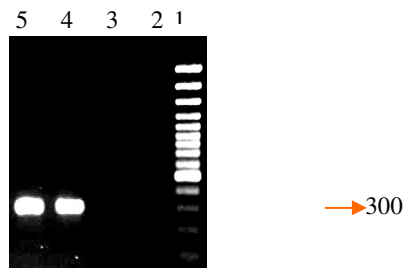
شکل ۵- الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای M_{13} از پلاسمیدهای نوترکیب (چاهک‌های ۲-۶) و غیرنوترکیب (چاهک ۷) در مقایسه با مارکر ۱۰۰ جفت باز مثبت (چاهک ۱).

Fig. 5. Electrophoresis of PCR products using recombinant (Lanes 2-6) and non-recombinant p^{Bluescript SK} plasmid (Lane 7) as template with 100bp Ladder plus (Lane 1).

نتایج تعیین ترادف و آنالیز کامپیوتری

ترادف‌های تعیین شده دی. ان. ا تکثیر شده از روی ژنوم ویروئید کوتولگی رازک با کمک برنامه Notepad ارزیابی شد و نوکلئوتید ناشناخته‌ای در ترادف مربوط به ژنوم ویروئید

وجود نداشت. نمودار حاصل از پردازش داده‌های مربوط به تجزیه و تحلیل خودکار تعیین ترادف مولکولهای دی. ان. ا حاصل از فراورده‌های PCR در برنامه Chromas بسیار مناسب بوده و گراف‌های بلند و منفرد و فاقد روی هم افتادگی در ناحیه ژنوم ویروئیدی موجود بودند. ترادف‌ها با کمک برنامه BLASTn موجود در بانک ژن (NCBI) ردیف‌سازی شد. نتایج نشانگر شباهت ترادف‌ها با ترادف‌های جدایه‌های مختلف ژنوم ویروئید کوتولگی رازک و کاکسیسیای مرکبات در بانک ژن بود. ترادف‌های تعیین شده در بانک ژن (NCBI) با شماره شناسه EF126046 (Accession no.) برای ویروئید کوتولگی رازک نمونه UMCX₁ و شماره شناسه EF186992 برای ویروئید کوتولگی رازک نمونه LMSX₂ ثبت گردید.



شکل ۶- محصول PCR نمونه‌های پلاسمید نوترکیب (چاهک ۴ و ۵) و پلاسمید سالم (چاهک ۲ و ۳) در حضور مارکر ۱۰۰ جفت باز مثبت (چاهک ۱) با کمک آغازگرهای اختصاصی ویروئید کوتولگی رازک.

Fig. 6. Agarose gel electrophoresis of PCR products of recombinant (Lanes 4-5) and non-recombinant (Lanes 2-3) plasmids with 100bp Ladder plus using HSVd-specific primer pairs

بحث

وجود بیماری کاکسیسیا یا زایلوپروز (Cachexia-Xyloporosis) در ایران صرفاً بر اساس مشاهده علائم بیماری روی درختان باغ‌ها و انتقال بیماری با پیوند به نهال‌های ارقام محک (عمدتاً اورلاندو تانجلو، 'Orlando' tangelo) سال‌ها قبل گزارش گردیده است

(Habashi & Rahimian 1983). تحقیقاتی در زمینه اثبات ویروئیدی بودن بیماری و انطباق ویژگیهای ویروئید عامل با خصوصیات جدایه‌های ویروئید مولد بیماری کاککسیا در دنیا به عمل نیامده است. علایم آبله‌ای شدن چوب در محل و بالاتر از محل پیوند در تنه درختان نارنگی و لیموشیرین در اکثر مناطق مرکبات خیز ایران از جمله مناطق مختلف استان فارس، کرمان، هرمزگان، مازندران، گلستان و گیلان مشاهده شده و در بسیاری از مناطق از جمله نواحی مختلف استان مازندران و گیلان و برخی نواحی استان کرمان (مانند بم، شهداد و جیرفت) و فارس (خفر و جهرم) اغلب درختان بررسی شده واجد این علایم بوده‌اند (اطلاعات منتشر نشده). در بررسی حاضر وجود ویروئید عامل مولد کاککسیا (ویروئید کوتولگی رازک) در درختان دارای علایم نارنگی انشو در باغ‌های مهدشت ساری و نیز از نهال‌های دو ساله آلوده شده با پیوند با استخراج اسید نوکلئیک و تکثیر دی. ان. ا معادل ویروئید با PCR اثبات گردید. با بهینه شدن شرایط این آزمون، می‌توان آنرا به عنوان روش سریع و مطمئن برای شناسایی درختان آلوده بکار برد. آزمونهای بیولوژیک در مقایسه با RT-PCR بسیار زمان‌بر هستند و از دقت پایین‌تری برخوردارند و به همین دلیل برای شناسایی و ردیابی این ویروئید قابل توصیه نیستند. غلظت ویروئید در بافت‌های گیاهی مزرعه مناسب می‌باشد طوری که بافت پوست و برگ جوان هیچ تفاوتی در میزان دی. ان. ا تکثیر شده ویروئید در آزمون RT-PCR در فصول معتدل سال نشان ندادند (نشان داده نشد) و در هر دو مورد نوارهای واضح ویروئیدی مشاهده می‌شد. آغازگر ویروئید کوتولگی رازک کاملاً اختصاصی عمل کرده و هیچ نوار اضافه‌ای را تکثیر نکرد. حتی با حضور دی. ان. ا بافت گیاهی نیز هیچ نوار اضافه‌ای با به کارگیری آغازگرهای اختصاصی ویروئید کوتولگی رازک مشاهده نشد.

آزمون SSCP به خوبی توانست اختلاف دو نوکلئوتیدی را بین دو جدایه ویروئید کوتولگی رازک نشان دهد. پس از تعیین ترادف این اختلاف دقیقاً مشخص گردید. اکثر جدایه‌های ویروئید کوتولگی رازک از نظر طول و ترادف مشابه بودند و دو جدایه متفاوت تنها در دو نوکلئوتید با هم اختلاف داشتند. در بررسی مشابهی که روی ویروئید اگزوکورتیس انجام شد تنوع بیشتری در بین جدایه‌ها دیده شد (اطلاعات منتشر نشده). به نظر می‌رسد

جدایه های و پروئید عامل کاکسیای موجود در منطقه دارای تنوع کمتری هستند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (30-32) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: سید محمد علوی و علی آهون منش، بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان و حشمت‌اله رحیمیان، بخش گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران

References

- BOVE, J. M. 1995. **Virus and Virus-Like Diseases of Citrus in the Near East Region**. FAO: Rome. 518pp.
- CHILDS, J. F. L. 1950. The cachexia disease of Orlando tangelo. **Plant Dis. Rep.** 34:295-298.
- CHILDS, J. F. L. 1952. Cachexia disease, its bud transmission and relation to xyloporosis and to tristeza. **Phytopathology** 42:265-268.
- FLORES, R., RANGLES, J. W., BAR-JOSEPH, M., and DIENER, T. O. 2000. Agents viroids. pp. 1009-1024. *In* **Virus Taxonomy**, Academic Press; London.
- FLORES, R., RANGLES, J. W., BAR-JOSEPH, M., OWENS, R. A., and DIENER, T. O. 2004. Viroidae. pp. 1145-59. *In* **Virus Taxonomy**, Elsevier/Academic; London.
- HABASHI, M., and RAHIMIAN, H. 1983. Citrus xyloporosis disease in Iran. *Scientific J. Agric.* 10: 19-27.
- HADIDI, A., FLORES, R. RANGLES, J. W., and SEMANCIK, J. S. “**Viroids**”. CSIRO Publishing, Oxford Street, Australia. 370pp.
- KURODA, S. 2003. Analysis of DNA extraction buffer components from plant tissue by polymerase chain reaction. **Anal. Biochem.** 318: 314-317.
- PALACIO, A., and DURAN-VILA, N. 1999. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis as a tool for viroid characterization. **J. Virol. Methods** 77: 27-36.
- REANWARAKORN, K., and SEMANCIK, J. S. 1999. Correlation of *Hop stunt viroid* variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. **Phytopathology** 89: 568-574.
- REICHERT, I., and PERLBERGER, J. 1934. Xyloporosis, the new citrus disease. **Agri. Exp. Stn**, Rehovoth Palestine Bull. 12:49.
- ROISTACHER, C. N. 1988. The cachexia and xyloporosis diseases of citrus: A review. pp. 116-123, *In* **Proc. 10th. Conf. Int. Organ. Citrus Virol., IOCV**, Riverside, CA.
- ROISTACHER, C. N. 1991. **Graft-Transmissible Diseases of Citrus**. FAO: Rome. 286pp.
- SAKER, P. J. 2000. Mutation screening using pcr-ssep (silver staining and isotopic protocols). pp. 695-703. *In* **The Nucleic Acid Protocols Handbook**, ed. Rapley. R. Human Press, Totowa, New Jersey.
- SAMBROOK, J., and RUSSELL, D. W. 2001. **Molecular Cloning**, Vol. 1 & 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York.
- YANG, X., HADIDI, A., and GARNSEY, S. M. 1992. Enzymatic cDNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts. **Phytopathology** 82: 279-285.