نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، ص. ۲۱-۱۷

Journal of Plant Protection
Vol. 33, No. 1, Spring 2019, P. 17-21

مقاله کوتاه پژوهشی

ردیابی مولکولی عامل بیماری لکه سبز مرکبات در جنوب کرمان

مرتضی گل محمدی[1]*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۸/۱۹

چکیده

بیماری لکه سبز مرکبات (گرینینگ) توسط سه گونه باکتری به نام‌های *Candidatus* Liberibacter asiaticus، *Ca*. L. africanus و *Ca*. L. americanus ایجاد می‌شود. دو گونه پسیل مرکبات به نام‌های پسیل آسیایی *Diaphorina citri* و پسیل آفریقایی *Trioza erytreae* باکتری عامل بیماری را منتقل می‌کنند. علاوه بر پسیل، از طریق منابع تکثیری آلوده و استفاده از پیوندک آلوده نیز منتقل می‌شوند. به منظور ردیابی عامل این بیماری، نمونه‌های برگی و میوه‌های مشکوک به آن از جنوب کرمان جمع‌آوری گردید. در ۱۲ نمونه از ۴۸ نمونه بررسی شده، وجود بیماری تأیید شد. توالی‌یابی محصول پی‌سی‌آر (ناحیه ریبوزومی) به طول ۱۰۷۷ جفت باز و مقایسه آن با استرین کنترل مثبت استاندارد و همچنین تولید دو قطعه ۶۴۰ جفت باز و ۵۲۰ جفت بازی این ناحیه با هضم آنزیمی توسط *Xba*I نشان داد که عامل بیماری لکه سبز مرکبات *Candidatus* Liberibacter asiaticus (تیپ آسیایی) است. جدایه‌های مورد بررسی در این مطالعه با وجود بروز علایم متفاوت، با یکدیگر و با جدایه استاندارد قرابت کامل نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: پی‌سی‌آر، تشخیص، تیپ آسیایی، *Candidatus* Liberibacteri asiaticus

مقدمه

بیماری لکه سبز مرکبات (گرینینگ) یک بیماری خسارت‌زا در اغلب ارقام تجاری مرکبات مانند پرتقال، لیمو، گریپ فروت و غیره می‌باشد (۵). بیماری نخستین بار در سال ۱۳۸۸ در نمونه‌های پسیل و مرکبات در هرمزگان و سیستان و بلوچستان توسط فقیهی و همکاران گزارش گردید (۲). سپس علیزاده و همکاران در سال ۱۳۸۹ بیماری را از سیستان و بلوچستان گزارش کردند (۱). صالحی و همکاران در سال ۱۳۹۱ حضور عامل بیماری میوه سبز و ناقل آن را در استان‌های هرمزگان و سیستان و بلوچستان گزارش کردند (۷). استان کرمان مقام سوم تولید مرکبات را در ایران دارد. تحقیق حاضر جهت ردیابی بیماری در استان کرمان و شناسایی آن با استفاده از روش‌های مولکولی پی‌سی‌آر و توالی‌یابی محصول پی‌سی‌آر و تعیین خصوصیات استرین‌های ایرانی صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از درختان دارای علایم+ (J10, N2, N4, D, D1, C, I, G, F, E) (شکل ۱) از استان کرمان انجام شد. برای کنترل مثبت از دی. ان. ا تیپ آسیایی بیمارگر استفاده شد.

استخراج دی. ان. ا جهت بررسی بیماری به روش CTAB طبق روش مورای و تامسون (۶)، با اندکی تغییرات انجام گرفت. برای ردیابی مولکولی عامل بیماری در نمونه‌ها با روش پی‌سی‌آر، از دو جفت آغازگر OI1/OI2c (۴) و A2/J5 (۳) استفاده شد که طول قطعه تکثیری توسط آغازگر OI1/OI2c، ۱۱۶۰جفت باز در ناحیه 16srDNA و طول قطعه تکثیری توسط A2/J5 برابر ۷۰۳ جفت باز است. توالی‌یابی قطعات حاصل توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام شد. در هضم آنزیمی محصولات PCR، قطعه تکثیر شده با آغازگر OI1/OI2c، توسط آنزیم *Xba*I هضم آنزیمی شده و قطعات حاصله بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ تفکیک شدند.

نتایج و بحث

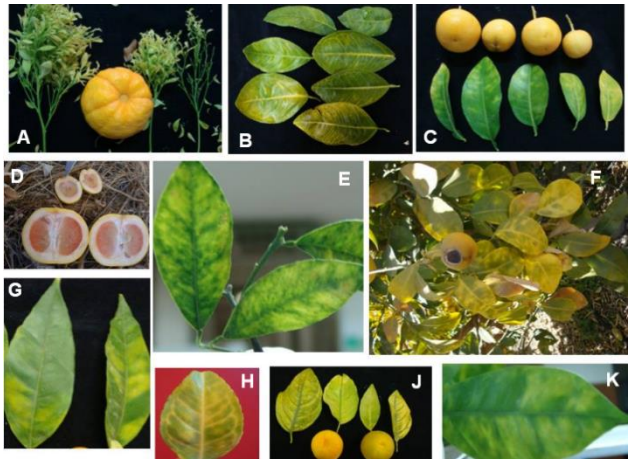
نمونه‌ها با استفاده از آغازگر A2/J5 قطعه ۷۰۳ جفت بازی برای شناسایی فرم آسیایی و ۶۶۹ جفت بازی برای شناسایی احتمالی فرم

۱- استادیار مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده مرکبات و میوه‌های نیمه گرمسیری، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رامسر، ایران
(*- نویسنده مسئول: (Email: Mgolm2009@gmail.com
DOI: 10.22067/jpp.v33i1.67543

www.SID.ir

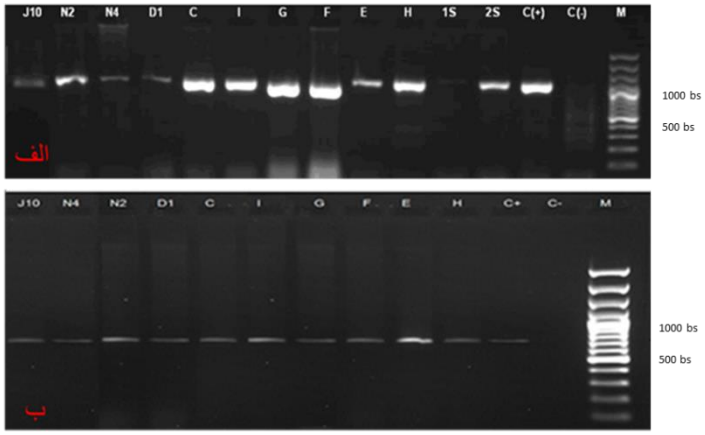
Archive of SID

آفریقایی باکتری و از آغازگر OI1/OI2c قطعه ۱۱۶۰ جفت بازی برای شناسایی هر دو فرم آسیایی و آفریقایی مربوط به ناحیه 16s rDNA آنها استفاده شد (شکل ۲، الف و ب). با وجود اینکه هر دو آغازگر به صورت اختصاصی برای شناسایی HLB طراحی شده‌اند اما آغازگر A2/J5 قادر به شناسایی آلودگی در نمونه مربوط به شهرستان فاریاب نبوده که با تکرار PCR با آغازگر OI1/OI2c و مشاهده الگوی باندی مشابه سایر استرین‌ها این مسئله بدین صورت توجیه شد که این تفاوت ممکن است ناشی از جهش بی اثر نقطه‌ای در ناحیه اتصال آغازگر باشد که تنها در شناسایی بیمارگر با آغازگر A2/J5 مؤثر بوده است. نمونه‌های دی‌ان‌ا جمع‌آوری شده از استان کرمان که با آغازگر OI1/OI2c تکثیر و سپس قطعات ۱۱۶۰جفت‌بازی حاصل از هر دو انتهای ´۳ و ´۵ توالی‌یابی شد. با بررسی همردیفی این توالی‌ها شماره رس شمار (GN 049632) با توالی‌های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI، توالی‌های موجود در ایران با توالی‌های تیپ آسیایی (چین: DQ431997، تایوان:AB555707، اندونزی: AB480102، فلوریدا: CP001677، برزیل:AY91933) در ناحیه توالی‌یابی شده ۱۰۰٪ تشابه داشته و هیچ تفاوتی مشاهده نشد.



شکل ۱- علایم بیماری در درختان بکرایی (A)، پرتقال (B,D,G,J,K)، نارنگی (E)، گریپ فروت (C,D,F,H)

Figure 1- Symptoms of disease (A) Bakraee; (B,D,G,J,K) Orange; (E)Madarin; (C,D,F,H) Grapefruit



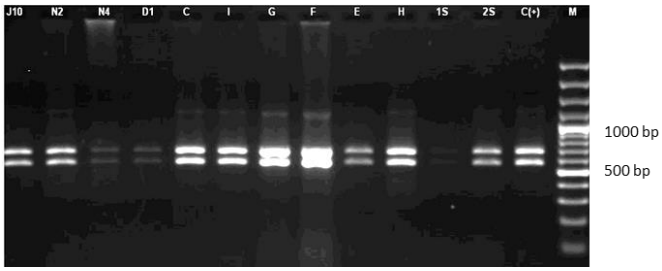
شکل ۲- (الف) واکنش تکثیری پی‌سی‌آر با آغازگرهای اختصاصی OI1 و OI2c، در نمونه‌های پرتقال، نارنگی و گریپ فروت به‌ترتیب (J10، N2، N4، D1،C،I،G،F، E، H، 1S، 2S)، کنترل مثبت وکنترل منفی، M (ladder100bp)، (ب) واکنش تکثیری پی سی آر با آغازگرهای اختصاصی A2 و J5، در نمونه‌های پرتقال، نارنگی و گریپ فروت. نمونه‌ها به ترتیب (J10، N2، N4، D1،C،I،G،F، E، H)، کنترل مثبت وکنترل منفی، M (ladder100bp)

Figure 2-Polymerase change reaction with OI1 and OI2 primers. (A) Respectively(J10 ،N2 ،N4 ،D1،C،I ،G،F ،E ،H ،1S ،2S), Positeve control and negative control, lader100bp (B) Polymerase change reaction with OI1 and OI2 primers. Respectively (J10 ،N2 ،N4 ،D1،C،I ،G،F ،E ،H), positive control and negative control, lader100bp

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم *Xba*I قطعه تکثیری توسط آغازگر OI1/OI2c در فرم آسیایی را در یک نقطه بریده و به دو قطعه ۶۴۰ و۵۲۰ جفت بازی تبدیل می‌کند و فرم آفریقایی را در دو نقطه برش و به ۳ قطعه ۵۲۰، ۵۰۶ و ۱۳۰ جفت بازی تبدیل می‌کند (۸). نتایج حاصل از هضم آنزیمی محصول پی‌سی‌آر مربوط به ۱۳ منطقه با آغازگر OI1/OI2c توسط آنزیم *Xba*I به دو قطعه ۶۴۰، ۵۶۰ جفت بازی بریده شد.



شکل ۳- واکنش تکثیری پی‌سی‌آر با آغازگرهای اختصاصی OI1 و OI2c هضم شده با آنزیم *Xba*I ، در نمونه‌های پرتقال، نارنگی و گریپ فروت (J10، N2، N4، D1،C،I، G،F، E، H، 1S، 2S)، کنترل مثبت، M (lader100bp)

Figure 3- Polymerase change reaction with OI1 and OI2 primers.with XbaI (A) Respectively (J10 ،N2 ،N4 ،D1،C،I ،G،F ،E ،H ، 1S ،2S), Positive control, lader 100bp

بر اساس نتایج حاصل از پی سی آر با آغازگرهای اختصاصی A2 و J5 و آغازگرهای OI1 و OI2c باکتری عامل بیماری در ۱۲ نمونه دارای علایم به اثبات رسید. توالی نوکلئوتیدی ۱۱۶۰ جفت باز از محصول پی‌سی‌آر از ناحیه ریبوزومی و مقایسه آنها با داده‌های بانک ژن و جدایه‌های کنترل مثبت تیپ آسیایی از برزیل، و تولید دو قطعه ۶۴۰ جفت باز و ۵۲۰ جفت باز محصول پی‌سی‌آر با آغازگرهای OI1 و OI2c در اثر هضم آنزیمی با *Xba*I تمامی استرین‌های ایران از نوع آسیایی *Candidatus* Liberibacter asiaticus می‌باشند. محصول پی‌سی‌آر ۱۰۷۷ جفت باز ناحیه ریبوزومی تمامی ۱۲ استرین مشابه و ۱۰۰ درصد همولوژی با یکدیگر و استرین تیپ آسیایی برزیل نشان دادند، اگرچه از نظر علایم ظاهری تفاوت زیادی بین آنها وجود داشت. به این منظور تحقیقی جهت بررسی تنوع ژنتیکی استرین‌های ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی و بیولوژیکی در دست بررسی است.

منابع

1- Alizadeh Aliabadi A., Foroutan A., and Golmohammadi M. 2010. Occurrence of citrus greening caused by *Candidatus* Liberibacter asiaticus in Sistan-Baluchestan province. Proceedings of the 18thIranian Plant Protection Congress. Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran, Pp. 525.

2- Faghihi M.M., Salehi M., Bagheri A., and Izadpana K. 2008. First report of citrus huanglongbing disease on orange in Iran. New Disease Reports, 18: 42.

3- Hocquellet A., Toorawa P., Bove J.M., and Garnier M. 1999. Detection and identification of the two Candidatus Liberobacter species associated with citrus huanglongbing by PCR amplification of ribosomal protein genes of theβ operon. Molecular and Cellular Probes 13(5): 373-379.

4- Jagoueix S., Bové J.M., and Garnier M. 1996. PCR detection of the two «Candidatus» liberobacter species associated with greening disease of citrus. Molecular and Cellular Probes 10(1): 43-50.

5- Manjunath K.L., Halbert S.E., Ramadugu C., Webb S., and Lee L. 2008. Detection of *Candidatus* Liberobacter asiaticus' in *Diaphorina citri* and Its Importance in the management of citrus huanglongbing in Florida. Bacteriology 98: 387-396.

6- Murray M.G., and Thomson W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8: 4321-4325.

7- Salehi M., Faghihi M.M., Khavanche Z., Bagheri E., and Izadpanah K. 2012. Distribution of citrus huanglongbing disease and its vector in south Iran. Plant Pathology 48: 208-195.

8- Teixeira D.C., Lopes S.A., Yamamoto P.T., Eveillard S., Martins E.C., de Jesus Junior W.C., Bassanezi R.B., Ayres A.J., Danet J.L., Saillard C., and Bové J.M. 2005. PCR Detection of the Two Liberibacter Species Associated with Citrus Huanglongbing in Sمo Paulo State, Brazil. Sixteenth IOCV Conference, Short Communications 432- 438

www.SID.ir

Journal of Plant Protection
Vol. 33, No. 1, Spring 2019, P. 17-21

نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۳۳، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، ص. ۲۱-۱۷

Determining of Molecular Characterization of Citrus Greening Disease in Southern Kerman

M. Golmohammadi[1]*

Received: 13-01-2018
Accepted: 10-11-2018

Introduction: HLB (Huanglongbing ex greening) caused by three species of bacterium *Candidatus* Liberibacter asiaticus, *Ca*. L. africanus and *Ca*. L. americanus, is the most important citrus disease over the globe. The causal agent is transmitted by two psyllids *Diaphorina citri* and *Trioza erytreae* and infected bud woods. The causal agent of HLB disease was identified as a phloem-restricted, Gram-negative bacterium belonging to a new genus in the α-Proteobacteria subdivision. In Asia, the pathogen of HLB was categorized as the *Candidatus* Liberibacter asiaticus transmitted by the Asian citrus psyllid (*Diaphorina citri*). This was also reported in the south of Iran over 2000. Diagnosis of HLB disease can be difficult under field conditions when relying on visual surveys. This is due to its low concentration in its citrus hosts and the nonspecific nature of HLB symptoms, similarity of its symptoms to micronutrient deficiency such as zinc, magnesium, and iron and virus-like disease symptoms such as stubborn caused by *Spiroplasma citri*. Therefore, distinguishing causal agents of similar symptoms such as nutritional or stress related symptoms from HLB disease needs a robust procedure. Many detection methods have been used to detect *Candidatus* Liberibacter spp. including biological indexing (grafting and vector), electronic microscopy (EM), DNA probe specific to the bacterium, enzyme-linked Immunosorbent assay (ELISA). However, TEM methods are less practical, because ultra-thin sectioning is tedious and requires expensive equipment. Transmission tests are of limited value due to the latency and the long incubation period in insect and plant. Development of conventional polymerase chain reaction (PCR) test has great advantages of analyzing the bacterium at genetic level. The objective of this study was the detection of HLB in symptomatic citrus plants based on conventional polymerase chain reaction assay (PCR) in the south of Iran and the comparison of Iranian strains with other strains on the globe.

Materials and Methods: In order to detect, identify and characterize the diseases, leaf and fruit samples were collected from some suspected sites situated in the southern Kerman. Samples were stored in plastic bags and transferred into the laboratory and conserved at low temperature (6^0C) before DNA extraction. Total DNA was extracted from symptomatic samples on the basis of the method/protocol of Murray and Thompson (1980) with minor modifications. Briefly, 5 to 10 symptomatic leaves were washed with sterile water and dried on paper. The leaf midrib tissue derived from field plants was cut out by sterile scalpel and CTAB buffer added with addition of B-mercaptoethanol. The extract was transferred to a new tube and incubated at 65 0c for 15min. The other steps were conducted according to the original protocol. Existence of pathogen in samples was confirmed using PCR with primers A2 / J5 and OI1 / OI2c.

Results and Discussion: The PCR products were analyzed by gel electrophoresis using a 1% agarose in TBE buffer (Tris base, boric acid and 0.5M EDTA [pH 8.0]) and stained with ethidium bromide. Gel was visualized and analyzed by the GEL documentation.12 of 48 samples amplified with primers above and the disease was confirmed. By sequencing of PCR products with length of 1077 bp and comparison with the strains positive control, also production two fragments of 640 bp and 520 bp resulting from the digestion with XbaI PCR products, the agent of disease was found to be *Candidatus* Liberibacter asiaticus. The agent showed 100% homology with standard HLB Asiatic type. BLAST analysis showed that the nucleotide sequences obtained for the ribosomal protein (GenBank Accessions No. GN 049632) had 100% identity with sequences of '*Ca.* L. asiaticus' from China (DQ431997), Taiwan (AB555707), Indonesia (AB480102), Florida (CP001677), and Brazil (AY91933)**.** The Asian vector of HLB, *Diaphorina citri* was reported in 2000, therefore, the diseases might be distributed in other areas in the southern Iran. Thus, detection of HLB disease in young citrus plants is important to prevent a widespread outbreak of this disease. The results also showed that Iranian strain belongs to Asian type of Liberibacter and nominated *Candidatus* Liberibacter asiaticus. In the southern Iran, *Diaphorina*

1- Associate Professor, Horticultural Science Research Institute, Citrus and Subtropical Fruits Research Center, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Ramsar, Iran
(*- Corresponding Author Email: mgolm2009@gmail.com)

www.SID.ir

Archive of SID

citri with high ability to spread the *Candidatus* Liberibacter asiaticus is found in most of citrus cultivating areas which implies a high risk of rapid dissemination. Therefore, the survey of the disease by an accurate and sensitive method is recommended for the disease detection in new areas and eradication of infected trees.

Keywords*:* Asiatic type, Detection, *Candidatus* Liberibacter asiaticus, PCR

www.SID.ir