

جداسازی و شناسایی عامل بیماری استابورن مرکبات در مازندران بر اساس توالی ژن اسپیرالین

ابوالفضل صلحی زاده^۱، حشمت اله رحیمیان^۲، سید محمد علوی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، abolfazl.solhizadeh@gmail.com

۲- استاد و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، Rahimian.h@gmail.com

۳- دانشجوی دکتری دانشگاه فردوسی مشهد، Smalavi59@yahoo.com

چکیده

Spiroplasma citri عامل استابورن از بیماری های مهم مرکبات در ایران و جهان می باشد. مهمترین روش مبارزه با این بیماری شناسایی سریع و حذف درختان آلوده به منظور جلوگیری از انتشار آلودگی می باشد. بدین منظور نمونه برداری و جداسازی عامل بیماری از باغات مازندران صورت گرفت و بخشی از توالی ژن اسپیرالین به منظور شناسایی سریع و مطمئن بیماری مطالعه شد.

واژه های کلیدی

استابورن مرکبات، PCR، اسپیرالین

مقدمه

جنس اسپیروپلاسما از رده مالیکوتها و پروکاریوت هایی فاقد دیواره سلولی هستند که داشتن ویژگی هایی مانند شکل مارپیچی، تحرک، فعالیت منفی اوره آز و قابل کشت بودن، آنها را از سایر مالیکوت ها متمایز می کند [۱].

بیماری ریزبرگی یا استابورن مرکبات، در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری مانند اکثر کشورهای حوزه مدیترانه وجود دارد. ریزبرگی بزرگترین تهدید در تولید پرتقال و گریپ فروت در بعضی از کشورهای مدیترانه و کالیفرنیاست. به علت کندی بروز نشانه ها این بیماری گسترش می یابد و ردیابی آن دشوار است. ریزبرگی روی برگ، میوه و ساقه تمام واریته های تجاری مرکبات و روی هر پایه ای اثر می گذارد. برخی از میوه ها رشد یک طرفه داشته و کج می شوند. *S. citri* آوند آبکشی را آلوده و در آن رشد می کند. این عامل در گیاهان متعلق به تیره های متعدد دولپه ای، و چندین درخت میوه هسته دار دیده شده یا به آنها انتقال داده شده است. بیماری ریزبرگی با پیوندهای پوستی و چوبی و با کارایی نسبتاً بالا انتقال می یابد و عامل آن به طور معمول توسط چند گونه زنجرف، مانند *Circulifer tenellus*، *Scaphytopius nitridus* و *haematoceps* در باغ های مرکبات پخش می شود [۲].

اولین گزارش از وجود علائم *S. citri* در ایران توسط کاکران و صمدی در سال ۱۹۷۶ داده شد. رحیمیان در سال ۱۳۶۱ از وجود استابورن در استان کرمان اطلاع داد که طی این بررسی *S. citri* کشت داده و آزمایش های سرولوژیکی نشست متقابل در آگار و بازداري رشد (Growth inhibition) انجام شد [۳]. حسینی پور و

همکاران در سال ۱۳۸۰ از مرکبات برخی مناطق شمالی و جنوبی ایران، استرین هایی از *S. citri* جداسازی، کشت و پلی مورفیسم در DNA ژنومی به ویژه ناحیه ۱6S ریبوزومی آنها را بررسی کردند [۴]. در سال ۱۳۸۶ با استفاده از روش از الایزای غیرمستقیم از زنجرف های جمع آوری شده از جنوب استان کرمان عامل بیماری ریزبرگی مرکبات ردیابی شد [۵]. دو روش تشخیصی ELISA با استفاده از آنتی بادی پلی کلنال و PCR با استفاده از آغازگرهای P58 و P89 در توان ردیابی عامل بیماری مقایسه و بررسی شده است که نتایج نشان دهنده تشخیص مثبت آلودگی به وسیله PCR حتی در غلظت های بسیار پایین بود [۶].

لیپوپروتئین اسپیرالین که یکی از پروتئین های غشایی *S. citri* است که تحقیقات زیادی در مورد آن صورت گرفته [۷] به خصوص این که این پروتئین مختص به جنس اسپیروپلاسماست و در بین اعضای این جنس و همچنین خود گونه *S. citri* تنوع نشان داده است [۸]. طی این پژوهش پس از کشت نمونه های مشکوک به آلودگی جمع آوری شده از باغات مازندران، بخشی از ناحیه اسپیرالین DNA ژنومی تکثیر و در جهت شناسایی عامل بیماری استفاده شد.

مواد و روش ها

به منظور جداسازی و کشت *S. citri* از باغ های مازندان نمونه های مشکوک جمع آوری و قسمت کلومای میوه های مشکوک بعد از ضد عفونی، در محیط مایع LD10 [۹] در لوله کشت داده شد. به مدت ۱۵-۲۵ روز تغییر رنگ لوله ها بررسی و پس از مشاهده تغییر رنگ محیط از قرمز به زرد، چند میکرولیتر از آن روی لام منتقل و در زیر میکروسکوپ زمینه سیاه بررسی شد. به منظور استخراج DNA از لوله هایی که سلول های مارپیچی شکل در آن مشاهده شد، یک سی سی از محیط کشت را با یک سی سی آب ترکیب کرده و به مدت یک دقیقه در ۹۵ درجه سلسیوس قرار داده و سپس سانترفیوژ ۱۶۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس انجام و سپس سی سی میکرولیتر از محلول رویی به عنوان نمونه DNA برداشته شد.

آزمون PCR با استفاده از آغازگر ژن اسپیرالین و تغییراتی در روش یوکومی و همکاران [۱۰] انجام شد. بخش تکثیر شده جدایه ها جهت توالی یابی به شرکت بایونیر (کره جنوبی) ارسال شد.