همانند سازی، تعیین ترادف و آنالیز بخشی از دی. ان. ای خارج کروموزومی فیتوپلاسمای فیلودی لوبیا

سارا قارونی کاردانی*[۱]، محمد زکی عقل [۱]، الهام جمشیدی[۱]
۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد *saragharooni@yahoo.com

چکیده

فیتوپلاسماها پروکاریوتهای فاقد دیواره سلولی، غیر قابل کشت و محدود به آوندهای آبکشی گیاه بوده و عامل بیماری در بسیاری از گیاهان هستند. ژنوم در فیتوپلاسماها یک قطعه دی. ان. ای کروموزومی غنی از بازهای آدنین و تیمین و چند قطعه دی. ان. ای خارج کروموزومی است، لیکن در فیتوپلاسماها نقش پلاسمید همراه با آنها تاکنون مشخص نشده است. بمنظور مطالعه پلاسمید فیتوپلاسمای فیلودی لوبیا، از لوبیای مشکوک به آلودگی به فیتوپلاسما نمونه برداری و استخراج دی. ان. ای کل انجام شد. تشخیص فیتوپلاسما در آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگر P1 و P7 انجام و محصول PCR همسانه سازی و تعیین ترادف گردید. به منظور تکثیر پلاسمید فیتوپلاسما از نمونه لوبیای آلوده از آنزیم فی دی . اِن. اِی پلی مراز استفاده گردید و قطعه ای از پلاسمید فیتوپلاسما همسانه سازی و تعیین ترادف شد. بر اساس ترادف ژن آر. ان. ای ریبوزومی فیتوپلاسمای فیلودی لوبیا متعلق به گروه 16SrVI یا گروه جاروئی شبدر است. قطعهای از پلاسمید فیتوپلاسمای فیلودی لوبیا به طول ۲۵۰۸ باز که تعیین ترادف گردید، بیشترین شباهت را با Beat leaf hopper transmitted virescence phytoplasma داشت. ای ن قطعه دارای سه چارچوب خواندنی باز به طول ٤٤٤، ۷۵۹ و ٥٦٧ است. این اولین گزارش از ردیابی و تعیین ترادف پلاسمید فیتوپلاسمای فیلودی لوبیا میباشد.

واژه های کلیدی: فیتوپلاسما، دی. ان. ای خارج کروموزومی، همانند سازی دایره غلتان.

مقدمه

فیتوپلاسماها پروکاریوتهای فاقد دیواره سلولی هستند و عامل بیماری های متعددی در گیاهان میباشند (٦). فیتوپلاسماها محدود به آوندهای آبکشی گیاه بوده و توسط حشرات تغذیه کننده از آوندها انتقال مییابند (٦). امکان کشت و جداسازی فیتوپلاسماها در آزمایشگاه تاکنون میسر نشده است و به همین دلیل بسیاری از خصوصیات آنها کاملا شناخته شده نیست (۲، ۳، ٦). ژنوم فیتوپلاسماها همانند باکتریها از یک قطعه دی. ان. ای کروموزومی تشکیل شده که غنی از بازهای آدنین و تیمین است (۲، ٦). همچنین تعدادی دی. ان. ای خارج کروموزومی همراه با اسپیروپلاسماها، میکوپلاسماها و اکلوپلاسماها قبلا گزارش شده است (٦). حضور دی. ان. ای خارج کروموزومی در بعضی از فیتوپلاسماها نیز گزارش شده است، ولی تنها ترادف کامل تعدادی از آنها در دسترس می باشد (۲، ٦). پلاسمیدهای باکتریائی تولید پروتئینهایی با نقش مهم بیولوژیکی برای آنها میکنند لیکن اطلاعات کمی در مورد پروتئینهای سنتز شده بوسیله پلاسمید مولیکوتها و فیتوپلاسماها وجود دارد (۳، ٦). پلاسمیدهای باکتریهای بیماریزای گیاهی مانند گونههای اگروباکتریوم برای بیماری زائی ضروری هستند لیکن در فیتوپلاسماها نقش پلاسمید همراه با آنها تاکنون مشخص نشده است. احتمال دارد که این پلاسمیدها کد کننده ژنهائی باشند که در ارتباط با بیماری زائی یا انتقال فیتوپلاسما باشند (۲، ۳، ٦). در تعدادی از اعضای گروه 16SrVI فیتوپلاسما یا گروه جاروئی شبدر نیز وجود یک یا دو قطعه دی. ان. ای خارج کروموزومی گزارش شده است (۲، ۳). در این مقاله به منظور بررسی احتمال وجود پلاسمید همراه با فیتوپلاسمای عامل فیلودی لوبیا جهت مطالعات بیشتر در نقش آنها در

بیماری زائی فیتوپلاسما، یک قطعه از دی. ان. ای خارج کروموزومی فیتوپلاسمای همراه با فیلودی لوبیا همسانه سازی و تعیین ترادف شده است.

مواد و روشها

شناسائی فیتوپلاسما با استفاده از آزمون زنجیره ای پلیمراز:

بمنظور جداسازی پلاسمید همراه با فیتوپلاسما، لوبیای مشکوک به آلودگی با علایم کوچک شدن و بدشکلی برگ، فیلودی گلبرگ و کوتولگی به آزمایشگاه منتقل شد. استخراج دی. ان. ای کل با استفاده از Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) به روش ژانگ[1] و همکاران (۱۹۹۸) انجام شد (۷). از آغازگرهای عمومی P1 (۱) و P7 (٤) برای شناسائی فیتوپلاسما استفاده شد. در واکنش زنجیرهای پلی مراز ۱/۵ میکرولیتر دی. ان. ای الگو با ۲ میکرولیتر از هر یک از آغازگرها، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش با غلظت ۱۰ برابر، ۱/۲۵ میکرولیتر کلرید منیزیوم ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs (۱۰ میلی مولار) و ۰/۲۵ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (با غلظت ۵ واحد در میکرولیتر) در حجم نهائی ۲۵ میکرولیتر مخلوط شد. پروفایل دمایی واکنش شامل ۹٤°C به مدت ۲ دقیقه بعنوان واسرشته سازی آغازین و بدنبال آن ، ۳۵ چرخه شامل ۹٤ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۵ °C به مدت ۹۰ ثانیه، ۷۲ °C به مدت ۲ دقیقه و یک چرخه انتهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ °C بعنوان تکمیل پلیمریزاسیون بود. محصول پی سی آر، در ژل آگاروز ۱/۲ درصد الکتروفورز شد و باند حاصل از ژل استخراج و با استفاده از کیت Ins TA Clone ™ PCR Cloning Kit در ناقل pTZ57R/T الحاق و در سویه *Escherichia Coli* DH5α همسانه سازی شده و توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) تعیین ترادف گردید. ترادف بدست آمده بوسیله نرم افزار Blast در سایت NCBI با ترادف های موجود در بانک ژن مقایسه شد.

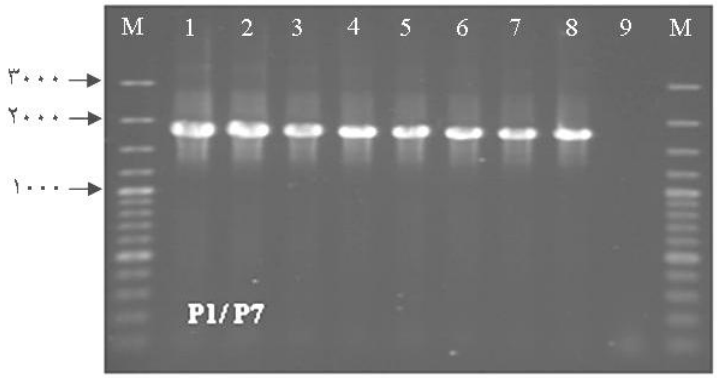
تکثیر و همسانه سازی پلاسمید فیتوپلاسما به روش دایره غلتان

جهت تکثیر پلاسمید همراه با فیتوپلاسما از آنزیم فی دی. اِن. اِی پلی مراز (ϕ polymerase) موجود در کیت Templiphi (GE Healthcare)، براساس روش شفرد[2] و همکاران استفاده گردید (۵). با استفاده از این کیت، نوکلئیک اسید حلقوی به روش دایره غلتان (rolling circle amplification, RCA) و بصورت یک پلیمر خطی تکثیر شد. پلیمر تولید شده و ناقل pTZ57R بوسیله آنزیم محدودکنندهی *Hind*III برش خورده و با استفاده از کیت GenCatch PCR Purification Kit (Epoch Life Science, USA) خالص سازی شدند. سپس پلاسمید فیتوپلاسما در ناقل الحاق و همسانه سازی شد. تعیین ترادف پلاسمید فیتوپلاسما به روش Primer walking انجام و ترادف بدست آمده بوسیله نرم افزار Blast با ترادف های موجود در بانک ژن مقایسه گردید. شناسائی چارچوبهای ژنی توسط نرم افزار Vector NTI ver. 10 انجام گرفت.

[1]- Zhang et al.,
[2] Shepherd

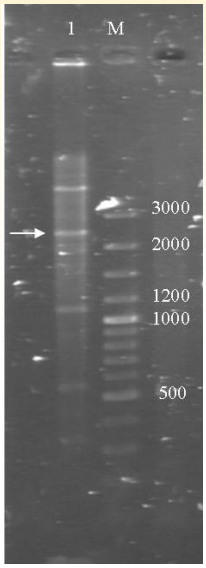
نتایج و بحث

همانند سازی قطعه ۱۸۰۰bp بوسیله آغازگرهای P1 و P7 در لوبیای دارای علائم و فقدان آن در گیاه سالم تائید کننده آلودگی نمونه های لوبیا به فیتوپلاسما بود (شکل ۱). نتایج تعیین ترادف نیز ماهیت قطعه تکثیر شده را تائید کرد. از مقایسه ترادف بدست آمده با ترادف موجود در بانک ژن مشخص شد که فیتوپلاسمای عامل فیلودی لوبیا متعلق به زیر گروه A از گروه 16SrVI یا گروه فیتوپلاسمای عامل انبوهی شبدر است. ترادف حاصل شباهت زیادی با فیتو پلاسمای زردی کلم و جاروئی سیب زمینی دارد که پیشتر توسط صالحی و همکاران در ایران شناسائی شده اند (مطالعات منتشر نشده). فیتو پلاسمای عامل زردی کلم نیز متعلق به زیر گروه A از گروه 16SrVI یا گروه فیتوپلاسمای عامل انبوهی شبدر است.

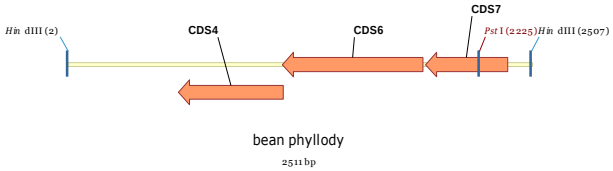


شکل ۱: نتیجه الکتروفورز محصول PCR با آغازگرهای P1/P7 از گیاهان لوبیا با علائم فیلودی و ریز برگی در ژل آگارز۱/۲ درصد، ۸-۱ نمونه های آلوده به فیتوپلاسما، ستون ۹ کنترل منفی. M نشانگر (100-3000bp).

پس از هضم آنزیمی محصول همانند سازی شده توسط آنزیم فی دی. اِن. اِی پلی مراز در ژل آگارز شش قطعه با اندازه تقریبی ۲۵۰، ۵۵۰، ۱۱۰۰، ۱۶۰۰، ۲۵۰۰ و ۵۸۰۰ جفت باز مشاهده شد (شکل ۲). قطعه ۲۵۰۰ جفت بازی جهت تعیین ترادف و شناسائی ماهیت آن برای تعیین ترادف انتخاب و همسانه سازی شد. نتیجه تعیین ترادف نشان داد که این قطعه دارای ۲۵۰۸ نوکلئوتید طول و دارای ۹۶ درصد شباهت نوکلئوتیدی با قسمتی از پلاسمید بزرگتر فیتوپلاسمای Beet leaf hopper transmitted virescence phytoplasma (AY423627) است (۳). از هضم آنزیمی پلاسمید بزرگتر این فیتو پلاسما توسط نرم افزار نیز الگوی مشابهی با هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده با *Hind*III ایجاد میگردد. قطعه تعیین توالی شده دارای سه چارچوب ژنی کامل بود (شکل ۳). چارچوبهای ژنی بترتیب ٤٤٤، ۷۵۹ و ٥٦٧ نوکلئوتید طول داشتند. آنها دارای ۹۳-۹۱ درصد شباهت در سطح نوکلئوتید و ۹۰-۸۷ درصد همولوژی در سطح آمینواسید با چارچوبهای ژنی چهار، شش و هفت پلاسمید pBLTVA-1 بودند. نقش پروتئینهای احتمالی تولید شده در بیولوژی فیتوپلاسما مشخص نیست. در pBLTVA-1 بین چارچوب ژنی چهار و شش، یک چارچوب ژنی دیگر نیز وجود دارد لیکن قطعه تعیین توالی شده فاقد این چارچوب ژنی بود.



شکل۲: نقش الکتروفورزی هضم آنزیمی پلاسمید همراه با فیتوپلاسمای فیلودی لوبیا بوسیله آنزیم*Hind*III در ژل آگاروز ۱٪ (چاهک ۱)، M نشانگر (100-3000bp). قطعه همسانه سازی شده در تحقیق حاضر با فلش مشخص شده است.



شکل ۳: نقشه ژنی قسمتی از پلاسمید همراه با فیتوپلاسمای فیلودی لوبیا از گروه16SrVI ترسیم شده با نرم افزار Vector NTI ver. 10.

غلظت مشابه باندهای حاصل از هضم آنزیمی پلاسمید با آنزیم *Hind*III نشان دهنده آن است که همگی از الگوی واحدی منشاء گرفتهاند و احتمالا فیتوپلاسمای فیلودی لوبیا بر خلاف BLTVA تنها حاوی یک نوع دی. ان. ای خارج کروموزومی است. از گروه 16SrVI فیتوپلاسماها تاکنون تنها حضور دی. ان. ای خارج کروموزومی در BLTVA و Onion yellows phytoplasma، Paulownia witches'-broom phytoplasma، Candidatus Phytoplasma australiense، 'Brassica napus' phytoplasma ، Aster yellows phytoplasma و Periwinkle leaf yellowing phytoplasma گزارش شده بود و این اولین گزارش از شناسائی دی. ان.ای. خارج کروموزومی در فیتوپلاسمای فیلودی لوبیا است.

منابع:

1. **Deng, S. J., Hiruki, C., 1991**. Genetic relatedness between two non culturable mycoplasma like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. Phytopathology, 81, 1475–1479.
2. **Kuboyama, T., Huang, Ch., Lu, X., Sawayanagi, T., Kanazawa, T., Kagami, T., Matsuda, I., Tsuchizaki, T., Namba, Sh., 1998**. A Plasmid Isolated from Phytopathogenic Onion Yellows Phytoplasma and Its Heterogeneity in the Pathogenic Phytoplasma Mutant. MPMI, 11: 1031–1037.
3. **Liefting, L. W., Shaw, M. E., Kirkpatrick, B. C., 2004**. Sequence analysis of two plasmids from the phytoplasma beet leafhopper-transmitted virescence agent. Microbiology 150: 1809–1817.
4. **Schneider, B., Seemuller, E., Smart, C. D., Kirkpatrick, B. C., 1995.** Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas. In: Razin S, Tully JG. (eds) Molecular and diagnostics procedures in Mycoplasmology, Vol I. San Diego, CA, Academic Press, pp 369–380.
5. **Shepherd, D. N., Martin, D. P., Lefeurve, P., Monjane, A. L., Owor, B., Rybicki, E. P., Varsani, A., 2008**. A protocol for the rapid isolation Of full geminivirus genomes from dried plant tissue. J Virol Methods 149:97-102
6. **Weintraub, P. G., Jones, P., (eds). 2010**. PHYTOPLASMAS: Genomes, Plant Hosts and Vectors CAB International. 348 pages
7. **Zhang, Y. P., Uyemoto, J. K., Kirkpatrick, B. C., 1998.** A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. Virology Method, 71: 45-50.

Amplification, and sequence analysis of extrachromosomal DNA of bean phyllody phytoplasma

Sara Gharouni Kardani *[1], Mohammad Zakiaghl [1], Elham Jamshidi [1]

1- Department of Plant Protection, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

* saragharooni@yahoo.com

Abstract

Phytoplasmas are prokaryotes that lack a cell wall, inhabit into the phloem sieve elements of plants and are the causal agents of numerous plant diseases. Phytoplasmas cannot be cultured in vitro and as a result they remain poorly characterized. The genome of phytoplasmas consists of an ciruular A-T rich chromosom and several extrachromosomal DNA. However there is extremely little information on function of phytoplasma plasmids. To study plasmid of bean phyllody phytoplasma, total DNA were extracted from samples of bean which were suspected to phytoplasma infection. PCR was carried out using P1/P7 primer pair followed by sequencing to identify phytoplasma. Phi DNA polymerase used in order to amplify extrachromosomal DNA of phytoplasma; then, part of the amplified plasmid was sequenced. Based on 16SrRNA sequence, casual agent of bean phyllody clusterd in 16srVI group of phytoplasma. A 2508bp fragment of bean phyllody phytoplasma have high similarity with larger plasmids of Beat leaf hopper transmitted virescence phytoplasma. This fragment contain three open reading fram with 444, 759 and 567 bp lenght. Based on our knowledge, it is the first report for amplification and sequencing of bean phyllody phytoplasma plasmids.

Keywords: Phytoplasma, Extrachromosomal DNA, Rolling Circle Amplification