ژنتیک نوین
دوره ششم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۰
صفحه ۷۴-۶۵

ردیابی سرولوژیکی و مولکولی ویروس پسوروز مرکبات در استان گلستان

سعید نصراله نژاد*[۱]، عباداله عبادی[۲]

۱و۲- به ترتیب دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: snasrollanejad@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۸۸/۱۱/۶ - تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۱)

چکیده

در سال‌های اخیر علایم پوسته پوسته شدن تنه و نقش برگ بلوطی پسوروزی روی درختان مرکبات در شهرستان گرگان مشاهده شده است. به منظور بررسی حضور ویروس پسوروز مرکبات، نمونه برداری‌هایی طی فصول مختلف سال ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ از باغات منطقه گرگان صورت گرفت. نمونه برداری از تمامی ارقام مرکبات منطقه شامل پرتقال (یافا، واشنگتن ناول، سان گین و تامسون) و نارنگی (کلمانتین) و از درختان مشکوک به آلودگی که دارای علایم بیماری پسوروز بودند، انجام گردید. آزمون سرولوژیکی از طریق روش دو طرفه الیزا (DAS-ELISA) و با کیت الیزای آنتی‌بادی تک همسانه‌ای ویروس پسوروز مرکبات (CPsV) و آزمون RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس پسوروز مرکبات (CPV1 و CPV2) طراحی شده از ناحیه ژن کد کننده پوشش پروتئینی ویروس پسوروز مرکبات روی ۲۰۰ نمونه جمع آوری شده از باغات منطقه گرگان و چهار نمونه تهیه شده از گلخانه مرکز تحقیقات مرکبات (رامسر) که در آزمون بیولوژیکی آلودگی آنها به ویروس پسوروز مرکبات به اثبات رسیده بود، انجام پذیرفت. بر اساس نتایج آزمون سرولوژیکی، در هیچکدام از نمونه‌ها نتیجه ردیابی ویروس پسوروز مرکبات مثبت نبوده است. نتایج آزمون فوق‌الذکر در ۷/۵ درصد از نمونه‌های جمع‌آوری شده از باغات شهرستان گرگان و تمام نمونه‌های تهیه شده از گلخانه مرکز تحقیقات مرکبات (رامسر) پس از تفکیک محصولات PCR، در محدوده ۶۰۰ جفت باز (مربوط به ویروس پسوروز مرکبات)، تولید باند کردند. نتایج این دو روش نشان دهنده عدم هماهنگی سرولوژیکی ایزوله بومی ویروس پسوروز مرکبات با آنتی‌بادی تک‌همسانه‌ای تجارتی می‌باشد. در بررسی روش‌های استخراج ژنوم ویروس نیز استفاده از بافر گوانیدین تیوسیانات بهترین نتیجه را در میان بافرهای استخراج نشان داد. این اولین گزارش از وجود این ویروس بر روی درختان مرکبات در استان گلستان است.

واژه‌های کلیدی

الیزا،
پروتئینی،
پرتغال،
ژن کد کننده پوشش،
واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.8.6]

مقدمه

مرکبات یکی از با ارزش‌ترین میوه‌ها در جهان می‌باشد (روی و همکاران، ۲۰۰۵). مرکبات بطور گسترده در بسیاری از نقاط دنیا از جمله در قسمت‌های شمالی و جنوبی ایران کشت می‌شوند و به عنوان یک محصول اصلی در تغذیه و اشتغال نیروی انسانی و تجارت اهمیت بسزایی دارد. مرکبات از تیره Rutaceae و زیر تیره Aurantoidaَe می‌باشد. این زیر تیره دارای ۳۳ جنس است که فقط سه جنس آن یعنی Poncirus، Fortunella و Citrus، جنبه اقتصادی داشته و در کشورهای تولید کننده مرکبات از اهمیت بالایی برخوردارند (خوئی، ۱۳۷۱). ویروس پسوروز مرکبات[1] اولین ویروس شناسایی شده در مرکبات و قدیمی‌ترین بیماری مرکبات است، که مورد تحقیق قرار گرفته و یکی از مخرب‌ترین بیماری‌ها در مرکبات می‌باشد و هنوز هم در برخی مناطق، مهمترین بیماری مرکبات محسوب می‌شود. منشاء این بیماری خاورمیانه است و از طریق انتشار ارقام و واریته‌های مرکبات در تمام دنیا انتشار یافته است. ویروس پسوروز مرکبات عامل یکی از شدیدترین بیماری‌های مرکبات با پراکنش جهانی است (دونقیا و همکاران، ۲۰۰۱). این ویروس به ندرت درخت را از پای در می‌آورد، ولی باعث کاهش زیادی در عملکرد محصول می‌شود (روی و همکاران، ۲۰۰۵). عبارت"پسوروز مرکبات" به چندین بیماری که دارای عوامل ایجاد کننده یکسانی نیستند دلالت دارد. پسوروز اولین بیماری مرکبات است که توانایی انتقال آن با پیوند مشخص شد و اولین بیماری است که با استفاده از گیاهان شاخص شناسایی گردید (پاول و همکاران، ۱۹۹۸). پسوروز در اغلب مناطق مرکبات کاری دنیا از قبیل امریکا، ایتالیا، فرانسه، هند، لبنان، اسپانیا، آرژانتین، یونان و ایرن گزارش شده است (مارتین و همکاران، ۲۰۰۵). این ویروس دارای سه قطعه آر ان ای تک رشته‌ای منفی[2] است که در یک پوشش مشابه قرار گرفته و به شکل قطعات رشته‌ای باریک، ممکن است در سه اندازه و بصورت حلقه‌های بسته بسیار پیچ خورده مشاهده شوند (دونقیا و همکاران، ۲۰۰۱). حبشی در سال ۱۳۸۲ گزارش کرد پسوروز نوع B در شمال ایران کمتر از نوع A است و بیشتر در حومه نوشهر و ساری وجود دارد. آنتی‌بادی‌های تک همسانه‌ای برای ویروس پسوروز مرکبات جهت تشخیص و تفکیک استرین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (دجلوا و همکاران، ۲۰۰۰ و پوتر و همکاران، ۱۹۹۹). بارث و همکاران (۱۹۹۸) با توالی‌یابی ژن پوشش پروتئینی ویروس پسوروز مرکبات موفق به ارائه روش RT-PCR و دورگه‌سازی[3] در شناسایی ویروس پسوروز مرکبات شدند. همچنین در این آزمایشات مشخص شد روش RT-PCR در نمونه‌های با عیار کم ویروس خیلی بهتر از دو رگه‌سازی نتیجه می‌دهد. لگارتا و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از روش Heminested-PCR ویروس پسوروز مرکبات را در رقت 10^{-10} نمونه‌های مورد بررسی، شناسایی کردند. گارسیا و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند، که روش RT-PCR قادر است ویروس CPRSV را در رقت ۱/۱۲۸۰۰ از دو میکرو گرم بافت آلوده ردیابی کند. در حالی که روش DAS-ELISA در رقت‌های ۱/۱۶۰۰ تا ۱/۲۰۰ قادر به ردیابی بودند. روی و همکاران (۲۰۰۵) اعلام کردند، تشخیص همزمان و دقیق ویروس‌های آر ان ای و دی ان ای دار بوسیله روش M-PCR باعث کاهش در خطر آلودگی، کاهش زمان و هزینه‌ها در مقایسه با روش‌های متداول تشخیص مبتنی بر اندازه مولکولی می‌باشد. لگارتا و همکاران (۲۰۰۰) همگرایی بسیار بالایی (۹۶/۶ تا ۱۰۰ در صد در توالی نوکلئوتیدها) میان شش ایزوله ویروس پسوروز مرکبات حاصل از مناطق تولید مرکبات آرژانتین جهت تهیه آغازگرهای اختصاصی برای سنجش روش Heminested-PCR یافتند. تحقیق حاضر، نظر به مشاهدات مزرعه‌ای مبنی بر حضور علائم بیماری پسوروز مرکبات در منطقه گرگان و حومه و جهت ارائه یک روش سریع و مطمئن جهت شناسایی و ردیابی این ویروس با اهمیت صورت گرفت.

[1] *Citrus Psorosis Virus* (CPsV)
[2] ssRNA

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.8.6]

مواد و روش‌ها

بازدید از باغات مرکبات شهرستان گرگان

جهت تعیین مناطق آلوده به بیماری ویروسی پسوروز مرکبات در منطقه، طی فصول بهار، تابستان و پاییز سال ۱۳۸۵ و بهار سال ۱۳۸۶ از برخی باغات مرکبات شهرستان گرگان بازدیدهایی صورت گرفت. در این بازدیدها علائم اختصاصی بیماری پسوروز روی درختان مرکبات مورد ردیابی قرار گرفت. علائم مورد نظر عبارت از علائم نقش برگ بلوطی روی پهنک برگ و نقوش ایجاد شده روی برگ‌های جوان (شکل ۱)، پوسته پوسته شدن تنه اصلی (شکل ۲) و شاخه‌ها (شکل ۳) بود. از درختان دارای آلودگی عکس‌برداری شد و مناطق دارای درختان آلوده مشخص گردید، تا جهت ردیابی‌های سرولوژیکی و مولکولی آزمایشات تکمیلی در مورد آنها انجام پذیرد.



شکل ۱ – علائم نقش برگ بلوطی روی پهنک برگ (پرتقال روی پایه نارنج)



شکل ۲– علائم پوسته پوسته شدن تنه (پرتقال روی پایه نارنج)



شکل ۳– علائم پوسته پوسته شدن شاخه (پرتقال روی پایه نارنج)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.8.6]

آزمون سرولوژیکی

نمونه برداری از درختان مشکوک به بیماری

جهت انجام آزمون سرولوژیکی و به منظور ردیابی و تشخیص ویروس پسوروز مرکبات طی ماه‌های اردیبهشت و خرداد و تیر ماه سال ۱۳۸۵، از برخی باغات مرکبات شهرستان گرگان که طی بازدیدهای مکرر، علائم بیماری‌های پسوروزی در آنها مشاهده شده بود و احتمال آلودگی به بیماری پسوروز مرکبات در آنها وجود داشت، نمونه برداری (تعداد ۲۰۰ نمونه) صورت گرفت. نمونه برداری در امتداد دو قطر باغ انجام گرفت (صارمی، ۱۳۸۲) و از چهار طرف هر درخت، نمونه مرکب انتخاب گردید که شامل برگ‌های جوان و سرشاخه‌ها و اجزاء گل طبقه‌ی دوم و سوم (از نظر سن و کیفیت یکسان انتخاب شدند) درخت بودند (دجلوآ و همکاران، ۲۰۰۲). درختان مدنظر اغلب دارای علائم مختلف بیماری‌های پسوروزی بودند. همچنین از نهال‌های پرتقال محلی موجود در گلخانه مرکز تحقیقات مرکبات (رامسر) که آلودگی آنها به ویروس پسوروز مرکبات در آزمون بیولوژیکی گلخانه‌ای به اثبات رسیده بود، نمونه برداری (شش نمونه) صورت گرفت. نمونه‌ها پس از جمع‌آوری، به طور جداگانه درون کیسه پلاستیکی و روی یخ قرار داده شدند و سریعا به آزمایشگاه منتقل گردیدند. در آزمایشگاه نمونه‌ها، تا زمان عصاره‌گیری در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. نمونه‌هایی که لازم بود بیشتر از ۲۴ ساعت نگهداری شوند، در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار داده شدند.

آزمون DAS-ELISA

به منظور تعیین حضور و یا عدم حضور ویروس پسوروز مرکبات درنمونه‌های جمع آوری شده از باغات شهرستان گرگان (تعداد ۲۰۰ نمونه) و همچنین نمونه‌های تهیه شده از گلخانه مرکز تحقیقات مرکبات (رامسر) آزمون سرولوژیکی به روش ساندویچ دو طرفه الیزا با استفاده از آنتی سرم تک همسانه‌ای ویروس پسورز مرکبات[3] تهیه شده از موسسه تحقیقات مرکبات (رامسر)، بر پایه روش آلیوتو و همکاران (۱۹۹۹) و طبق دستورالعمل شرکت تولید کننده آنتی سرم (Agritest, Bari, Italy) به این صورت انجام گرفت. ابتدا تیوب محتوی ایمنوگلوبولین (IgG-CPsV) به مدت چند ثانیه در g ۳۲۰۰ سانتریفیوژ شد. سپس مقداری از ایمنوگلوبولین با بافر پوششی به نسبت ۱:۱۰۰۰ مخلوط و به هر چاهک ۱۰۰ میلی لیتر توسط میکروسمپلر اضافه شد. پس از آن پلیت با پارافیلم پوشانده شد و به مدت پنج ساعت در دمای ۳۰ درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شد. پس از آن، پلیت توسط دستگاه شستشو دهنده الیزا مدل ELx50 (Bio Tech) سه مرتبه و به فواصل چهار دقیقه با بافر شستشو داده شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده توسط دستگاه عصاره‌گیری و به نسبت ۱:۱۰ (بافر: عصاره) با بافر استخراج مخلوط گردید. آنگاه به هر چاهک ۱۰۰ میلی لیتر از این محلول اضافه شد. به خاطر پرهیز از خطای چاهک‌های اطراف، در هر پلیت این چاهک‌ها تکرار چاهک‌های داخلی در نظر گرفته شدند. در هر پلیت دو چاهک به عنوان شاهد مثبت با عصاره‌ی گیاه آلوده، سه چاهک به عنوان شاهد منفی با عصاره‌ی سالم و یک چاهک به عنوان چاهک خالی با بافر استخراج پر شدند. پس از آن، روی پلیت پارافیلم کشیده شده و در دمای چهاردرجه سانتیگراد به مدت یک شب نگهداری گردید. سپس شستشو پلیت مشابه مرحله‌ی قبل انجام گرفت. پس از سانتریفیوژ، میکروتیوب محتوی آنتی‌سرم کانجوگیت، مقداری از آن با بافر کانجوگیت به نسبت ۱:۱۰۰۰ (بافر: آنتی‌سرم) رقیق شد و ۱۰۰ میلی لیتر از محلول به هر یک از چاهک‌ها اضافه گردید. سپس پلیت با پارافیلم پوشانده و مجدداً در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت پنج ساعت نگهداری شد. سپس شستشو مشابه مرحله‌ی قبل انجام گرفت. مقدار ۱۰۰ میلی گرم از قرص p-Nitrophenyl Phosphate (PNPP) ساخت شرکت سیگما (Sigma, Germany) در ۱۰ میلی لیتر بافر سوبسترا حل شد و فوراً مقدار ۱۰۰ میلی لیتر از آن به هر چاهک اضافه گردید و سپس پلیت در دمای محیط و دور از نور قرار داده شدند. پس از ریختن سوبسترا، پلیت‌ها ۳۰ دقیقه در دمای محیط و مکان تاریک قرار داده شدند. آنگاه در دو زمان، یکبار پس از گذشت ۳۰ دقیقه انکوباسیون و بار دیگر پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه انکوباسیون،

[3] CPsV psorosis Elisa kit Double Antibody Sandwich (DAS) by monoclonal antibody line PS29 produced by DPPMA, University of Bari, Italy (Agritest)

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.8.6]

جذب نوری شش چاهک توسط دستگاه قرائت کننده الیزا[4] Bio Tech (مدل ELx800) در طول موج ۴۰۵ نانومتر خوانده شد و نتایج ثبت گردید. جهت توقف واکنش‌ها در هر چاهک ۲۵ میکرولیتر هیدروکسیدسدیم سه مولار ریخته شد.

آزمون مولکولی

استخراج RNA

به دلیل وجود ترکیبات بازدارنده استخراج RNA در شیره گیاهی درختان مرکبات و جهت ارائه روشی مطمئن، سریع و کارآ، سه روش متفاوت استخراج ژنوم پیشنهاد شده توسط منابع مختلف با هم مقایسه شدند.

روش الف: روش گوانیدین تیوسیانات (لگارتا و همکاران، ۲۰۰۰) با کمی تغییرات انجام شد. ابتدا ۲۰۰ میلی گرم بافت برگی جوان، در نیتروژن مایع خرد شد. ۶۰۰ میکرولیتر از بافر عصاره‌گیری شامل گوانیدین ایزوتیوسیانات چهار مولار، سارکوسیل ۵ درصد، سیترات سدیم ۲۵ میلی مولار، دو مرکاپتو اتانول ۱۰ میلی مولار با pH= ۷ به بافت خرد شده اضافه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر فنول اشباع اضافه شد و محتوای تیوپ به مدت ۱۵ ثانیه هم‌زده شد. سپس ۶۰۰ میکرولیتر کلروفرم ایزو آمیل الکل با نسبت ۱:۴۹ اضافه گردید و به مدت ۱۵ ثانیه روی دستگاه ورتکس مخلوط گردید. سپس در g ۱۳۲۲۰ به مدت ۱۰ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. بعد از عمل سانتریفیوژ، رونشین به تیوپ جدید منتقل شده و حجم مساوی از فنول- کلرفرم به آن اضافه گردید و در g۱۳۲۲۰ به مدت ۱۰ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. رونشین به تیوپ جدید منتقل شده و دوباره کلروفرم- ایزوآمیل الکل ۴۹:۱ اضافه شده و عمل سانتریفیوژ همانند مراحل قبلی انجام گردید. رونشین به تیوپ جدید منتقل شده و با حجم برابر کلرید لیتیم سه مولار مخلوط شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد به مدت شش تا هشت ساعت نگهداری گردید. سپس در g ۱۳۲۲۰ به مدت ۳۰ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شده و با لیتیم کلراید سه مولار، دو بار شستشو داده شده و روی محلول ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲۰۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۰/۳ مولار اضافه گردید. در انتها RNA با ۲/۵ حجم ایزوپروپانل رسوب داده شد و در ۲۰- درجه سانتیگراد برای شش تا هشت ساعت نگهداری گردید. RNA درg ۱۳۲۲۰ به مدت ۳۰ دقیقه در چهار درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوب به دست آمده با اتانول۷۰ درصد شستشو و سپس خشک گردید. آنگاه، در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد.

روش ب: طبق روش پیشنهادی بارث و همکاران (۱۹۹۸) با کمی تغییرات، نیم گرم از بافت برگی جوان خرد شده در ازت مایع در بافری شامل تریس ۵۰ میلی مولار با pH حدود دو و هشت دهم درصد SDS و نیم درصد ۲- مرکاپتواتانول کاملا″ مخلوط شد. سانتریفیوژ در g ۷۲۰۰ برای ۲۰ دقیقه صورت گرفته و رونشیتن به تیوب جدیدی منتقل گردید. سپس استخراج توسط بافر فنول- کلرفورم (به نسبت یک به یک) انجام شده و سانتریفیوژ در g ۱۱۲۰۰ برای ۱۰ دقیقه صورت گرفت. رونشین با حجم برابر از اتانول مطلق مخلوط شده و برای شش تا هشت ساعت در دمای ۲۰- نگهداری شد. پس از آن، سانتریفیوژ در g ۱۰۲۰۰ برای ۱۵ دقیقه انجام گرفته و رسوب RNA مخلوط با DNA حاصل پس از شستشو در اتانول ۷۰ درصد در ۵۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل حل گردید.

روش ج: بر اساس روش پیشنهادی سانچزدلاتوره و همکاران (۱۹۹۸) با استفاده از بافر فسفات پتاسیم انجام گرفت. این بافر در غلظت بین ۰/۰۱ و ۰/۵ مولار و pH بین هفت تا هشت تهیه گردید. مقدار ۰/۲ گرم بافت برگی با ازت مایع کاملا″ پودر شده و بلافاصله با ۱۰۰ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول مخلوط شد. یک میلی‌لیتر از بافر عصاره‌گیری به آن اضافه شده و در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد. میکروتیوب‌ها در g ۷۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رونشین به میکروتیوب جدید منتقل گردید و حجم مساوی از کلروفرم- ایزوآمیل الکل به آن اضافه شد. میکروتیوب‌ها در g۷۲۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شده و رونشین به میکروتیوب جدید منتقل گردید. پس از تکرار مجدد مرحله استخراج با کلروفرم- ایزوآمیل الکل دوبار تکرار شد. رونشین به میکروتیوب جدید منتقل شده و به میزان دو سوم حجم آن

[4] ELISA reader

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.8.6]

ایزوپروپانل سرد اضافه گردید. پس از شش تا هشت ساعت نگهداری در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد رسوب تشکیل شده با اتانول ۷۰ درصد شستشو گردید و اجازه داده شد تا خشک شود. رسوب RNA حاصل در۱۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر شده استریل حل گردید.

بررسی کیفیت و کمیت RNA استخراج شده

جهت بررسی کیفیت و کمیتRNA استخراج شده، نمونه‌های RNA استخراج شده توسط هر یک از روش‌ها به طور جداگانه با استفاده از روش اسپکتروفتومتری (در طول موج‌های ۲۶۰ و۲۸۰ نانومتر) و الکتروفورز در ژل آگارز یک درصد ارزیابی گردیدند.

آزمون RT-PCR

بررسی مولکولی نمونه‌های جمع آوری شده از منطقه (۲۰۰نمونه) و همچنین نمونه‌های (شش نمونه) تهیه شده از گلخانه مرکز تحقیقات مرکبات (رامسر) که آلودگی آنها به ویروس پسوروز مرکبات در آزمون‌های بیولوژیک گلخانه‌ای به اثبات رسیده بود (طاهری، ح، مکاتبات شخصی)، توسط آغازگرهای اختصاصی ویروس پسوروز مرکبات که بر اساس توالی‌های حفاظت شده قسمتی از ژن کد کننده پوشش پروتئینی ایزوله‌های مختلف ویروس پسوروز مرکبات طراحی شده بودند (بارث و همکاران، ۱۹۹۸) انجام پذیرفت (جدول ۱). از آنجایی که ژنوم ویروس‌های مذکور از نوع RNA می‌باشد، ابتدا RNA را با روش نسخه برداری معکوس (RT) به DNA تبدیل نموده و سپس واکنش PCR در یک مخلوط به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل بافر PCR (1X)، MgCl2 ۲/۵ میلی مولار، dNTP ۲۰۰ میکرو مولار، ۶۰ پیکو مول از هر آغازگر و یک واحد در میکرولیتر از آنزیم P*fu* DNA Polymerase و ۶۰ نانوگرم از cDNA سنتز شده در مرحله RT مطابق با چرخه دمایی ارائه شده توسط بارث و همکاران (۱۹۹۸) با کمی تغییر (جدول ۲) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر ساخت آلمان کمپانی بیورد[5] انجام شد. از دو شاهد منفی شامل میکروتیوب فاقد DNA و میکروتیوب فاقد آغازگر جهت ارزیابی صحت نتایج استفاده شد

ارزیابی محصولات PCR

شش میکرولیتر از محصول cDNA سنتز شده در روش RT-PCR پس از مخلوط با یک میکرولیتر بافر بارگذاری در ژل آگارز یک درصد در بافر TAE و در ولتاژ ۶۰ و به مدت یک ساعت وسی دقیقه الکتروفورز تفکیک شد. جهت بررسی محصول نهایی PCR، شش میکرولیتر از cDNA ساخته شده در مرحله PCR پس از مخلوط شدن با یک میکرولیتر بافر بارگذاری در ژل آگارز ۱/۸ درصد در بافر TBE در ولتاژ ۶۵ به مدت ۴۵ دقیقه الکتروفورز تفکیک گردید. پس از انجام الکتروفورز، ژل به مدت ۱۵ دقیقه در محلول اتیدیم بروماید (۰/۵ میلی گرم بر لیتر) قرارداده شد. پس از شستشوی ژل با آب، مشاهده باندها و عکس‌برداری از ژل با دستگاه ترانس لومیناتور (ساخت کشور کره جنوبی) صورت گرفت. در کنار نمونه‌های اصلی، از نشانگر[6] GeneRuller 3000bp ladder plus (ساخت کشور آلمان) استفاده شده و وزن مولکولی تقریبی قطعه تکثیر شده بدین صورت به دست آمد. نگهداری تمامی محصولات روش RT و PCR در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و در صورت نگهداری طولانی مدت در دمای ۸۰- درجه صورت گرفت.

[5] BIORAD
[6] DNA Ladder Marker

جدول ۱- نام و توالی آغازگرهای مورد استفاده (تهیه شده از شرکت سیگما، آلمان) در روش PCR

نام آغازگر	ترادف
CPV1	5' GCTTCCTGGAAAAGCTGATG 3'
CPV2	5' TCTGTTTTTGTCAACACACTCC 3'

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.8.6]

جدول ۲- سیکل دمایی PCR

چرخه حرارتی	تعداد چرخه	دمای چرخه	مدت زمان
واسرشت اولیه	یک چرخه	۹۴	سه دقیقه
واسرشت		۹۴	سی ثانیه
اتصال	۳۵ چرخه	۵۰	سی ثانیه
بسط		۷۲	یک دقیقه
بسط نهایی	یک چرخه	۷۲	پنج دقیقه

نتایج و بحث

نتایج بررسی سرولوژیک

نتایج بررسی سرولوژیکی ۲۰۰ نمونه جمع آوری شده از باغات شهرستان گرگان و شش نمونه تهیه شده از مرکز تحقیقات مرکبات (رامسر) هیچگونه نتیجه مثبتی حاکی از آلودگی این نمونه‌ها به ویروس پسوروز مرکبات در پی نداشت. در حالی که در نمونه شاهد مثبت (تهیه شده از اگریتست، ایتالیا) واکنش مثبت و تغییر رنگ مشاهده شد ولی در نمونه شاهد منفی هیچ-گونه تغییر رنگی مشاهده نشد.

نتایج بررسی مولکولی

بررسی مولکولی ۲۰۰ نمونه جمع آوری شده از باغات شهرستان گرگان و چهار نمونه تهیه شده از مرکز تحقیقات مرکبات (رامسر) که در آزمون بیولوژیکی آلودگی آنها به ویروس پسوروز مرکبات به اثبات رسیده بود به روش RT-PCR و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس پسوروز، آلودگی ۱۵ نمونه جمع آوری شده از باغات شهرستان گرگان و چهار نمونه تهیه شده از مرکز تحقیقات مرکبات را نشان داد (شکل ٤). این نتایج نشان دهنده حضور ویروس پسوروز مرکبات در باغات شهرستان گرگان می-باشد. عدم حصول نتیجه مثبت از آزمون سرولوژیکی با استفاده از آنتی‌سرم تک همسانه‌ای در تحقیقات قبلی محققین موسسه تحقیقات مرکبات رامسر (طاهری، ح، مکاتبات شخصی) نیز بدست آمده بود که نشان دهنده عدم کارایی آنتی سرم تک همسانه‌ای تجارتی در ردیابی ایزوله‌های بومی ویروس پسوروز مرکبات در ایران می‌باشد. گارسیا و همکاران (۱۹۹۴) و ناواس کاستیلو و مورنو (۱۹۹۵) در پی بررسی‌های خود دریافتند که برخی ایزوله‌های ویروس پسوروز مرکبات در اندازه پوشش پروتئینی متفاوتند. استفاده از آنتی‌بادی‌های تک همسانه‌ای علیه پوشش پروتئینی در نمونه‌هایی از آمریکا، لبنان، اسپانیا و جنوب ایتالیا سروتیپ‌های زیادی را تفکیک کرد (دجلوآ و همکاران، ۲۰۰۰، روستاکر و همکاران، ۲۰۰۰، آلیوتو و همکاران، ۲۰۰۱ و مارتین وهمکاران، ۲۰۰۲). گارنسی و تیمر (۱۹۸۰) پیشنهاد کردند که تمایز ایزوله‌ها به میزانی (عیاری) که از آنها در میزبان در دسترس است و در سهولت انتقال مکانیکی آنها به گیاهان مورد آزمایش بستگی دارد. تفاوت سرولوژیکی ایزوله‌های مختلف ویروس پسوروز مرکبات می‌تواند ناشی از نرخ بالای جهش در ویروس‌های دارای ژنوم RNA باشد (مارتین و همکاران، ۲۰۰۵). بطور کلی ویروس‌های گیاهی دارای استعداد بالایی برای تغییرات ژنتیکی هستند، زیرا RdRp[7] آنها فاقد خصوصیت تصحیح خطای خواندن است، ولیکن دیگر عوامل تکاملی مانند تبادل ژنی (نوترکیبی و نوترتیبی قطعات ژنتیکی) و انتخاب طبیعی ساختار جمعیتی ویروس‌ها را به وجود می‌آورد که در تحقیقات متعدد مشاهده شده است (مارتین و همکاران، ۲۰۰۵، دجلوآ و همکاران، ۲۰۰۰ و داگراسا و همکاران، ۱۹۹۱). لوکونسول و همکاران (۲۰۰۲) با بررسی علائم مزرعه‌ای و انجام آزمون‌های آزمایشگاهی جهت ارزیابی انتشار و ارتباط ویروس پسوروز مرکبات با استفاده از روش‌های داس‌الیزا و دورگه‌سازی مولکولی، ارتباطی بین وجود ویروس پسوروز و مشاهده علائم اختصاصی پسوروز از قبیل پوسته پوسته شدن تنه، نقش میخی روی پهنک برگ، نقش برگ بلوطی روی پهنک برگ، پیچیدگی برگ‌ها و

[7] RNA-dependent RNA polymerase

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.8.6]

خشکیدگی سرشاخه‌ها مشاهده نکردند. واکنش اختصاصی تک-همسانه‌ای در قبال تنها یک ایزوله خاص باعث محدودیت امکان استفاده از این نوع آنتی بادی‌ها شده است. تفاوت در اپیتوپ‌های حاضر در پروتئین پوششی ایزوله‌های متفاوت CPsV، استفاده از مخلوط آنتی بادی‌های تک همسانه‌ای را الزامی کرده است. از سوی دیگر عدم کارائی بالای آنتی بادی‌های چندهمسانه‌ای برای ایزوله‌های مختلف ویروس پسوروز مرکبات باعث محدودیت استفاده از این آنتی‌بادی در دنیا شده است و نیاز به تهیه آنتی بادی ایزوله های بومی ویروس پسوروز مرکبات را نمایان‌تر کرده است. تفاوت علائم ایزوله‌های پسوروز می‌تواند به علت تفاوت در نوع میزبان‌ها، اندازه پوشش پروتئینی و یا واکنش آنها علیه آنتی بادی-های تک همسانه‌ای باشد، که تفاوت ژنتیکی وسیعی را برای ویروس پسوروز مرکبات پیشنهاد می‌کند (مارتین و همکاران، ۲۰۰۵). انجام آزمون‌های سرولوژیکی برای تشخیص ایزوله‌های مختلف ویروس پسوروز مرکبات نیاز به تهیه آنتی‌سرم‌های مختلف دارد. خالص‌سازی سخت ذره ویروسی برای تهیه آنتی-سرم و تفاوت‌های ایزوله‌های مختلف، موفقیت روش سرولوژیکی را با محدودیت روبرو کرده است، در حالی که در روش RT-PCR با استفاده از ژن کد کننده پروتئین پوششی تشخیص موفقی را در ایزوله‌های مختلف ویروس پسوروز مرکبات باعث شده است (بارث و همکاران، ۱۹۹۸).

نتایج بررسی روش های مختلف استخراج ژنوم

نتایج حاصل از الکتروفورز و اسپکتروفتومتری ژنوم‌های استخراج شده با استفاده از سه نوع بافر استخراج از بافت‌های گیاهی نمونه-های مورد ارزیابی در آزمون مولکولی، نشان داد که ژنوم استخراج شده با روش بافر گوانیدین تیوسیانات ارائه شده توسط لگارتا و همکاران (۲۰۰۰) همراه با چند مرحله اضافی استخراج با فنل، ژنومی با ناخالصی کم و جذب نوری مناسب در اسپکتروفتومتری فراهم می‌کند. ژنوم استخراج شده به روش سانچز دلاتوره و همکاران (۱۹۹۸) انجام شده، دارای ناخالصی فراوان بود و به سختی در آب مقطر حل گردید. در این روش برای رسوب پروتئین‌ها و ناخالصی‌ها از ترکیب کلرو فرم ایزوآمیل الکل استفاده شد. ولی با مشاهده رسوب زیاد در مرحله پایانی، با اندکی تغییر در این روش از ترکیب فنول-کلروفرم-ایزوآمیل‌الکل (به نسبت ۱:۴۸:۴۹) استفاده گردید و در نتیجه کاهش قابل ملاحظه‌ای در میزان ناخالصی‌ها مشاهده شد. روش ارائه شده توسط بارث و همکاران (۱۹۹۸) نیز نتایج قابل قبولی ارائه نکرد. در استفاده از بافر گوانیدین تیوسیانات ارائه شده توسط لگارتا و همکاران (۲۰۰۰) ژنوم استخراج شده دارای ناخالصی فراوان بود ولی با تکرار مرحله استخراج با فنول طی سه مرحله، ژنوم تقریباً خالص به دست آمد. نتایج حاصل از بررسی ژنوم استخراج شده توسط بافرهای مورد آزمایش نشان داد، بافر گوانیدین ایزوتیوسیانات برای استخراج RNA کل از بافت‌های برگی، مناسب‌تر از سایر بافرهاست. با وجود اینکه استفاده از این روش استخراج مستلزم خطرات زیاد ناشی از سمیت بالای بافرگوانیدین ایزوتیوسیانات و زمان طولانی و انجام چندین مرحله اضافه‌تر است، لیکن اسید نوکلئیک حاصل در مرحله پایانی دارای ناخالصی کم یا فاقد ناخالصی بود. روش گوانیدین تیوسیانات عموما برای استخراج RNA از بافت‌های گیاهی استفاده می‌شود. RNA ممکن است با چسبیدن به پلی‌ساکاریدها، پلی‌فنل‌ها یا دیگر ترکیبات ناشناخته موجود در شیره گیاه طی استخراج از بین برود. پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنل‌ها می‌توانند با اسید نوکلئیک فعل و انفعالاتی انجام داده و ترکیبات پیچیده غیر قابل حل ایجاد کنند. در روش گوانیدین‌تیوسیانات، این ترکیبات در طی استخراج بعدی با فنل یا رسوب با پتاسیم استات از بین می‌روند. زیرا گوانیدیوم و نمک‌های گوانیدین واسرشت کننده پروتئین هستند و نمی‌توانند عامل موثری برای جداسازی RNA از ترکیبات غیر پروتئینی باشند (جون جون و همکاران، ۱۹۹۸). نتایج تعیین غلظت هر یک از نمونه‌های RNA با استفاده از روش اسپکتروفتومتر نشان داد که، در بین نمونه‌های استخراج شده با بافرهای فوق، برخی نمونه‌های استخراج شده با روش تصحیح شده بافر فسفات پتاسیم دارای نسبت‌های ۱ تا ۱/۳ در دامنه جذب نوری ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بودند. در حالی که نمونه‌های استخراج شده توسط بافر گوانیدین ایزوتیوسیانات دارای ناخالصی کمتری بودند. نتایج انجام آزمون‌های RT-PCR روی نمونه‌های تهیه شده به روش بافر فسفات پتاسیم و بافر گوانیدین تیوسیانات

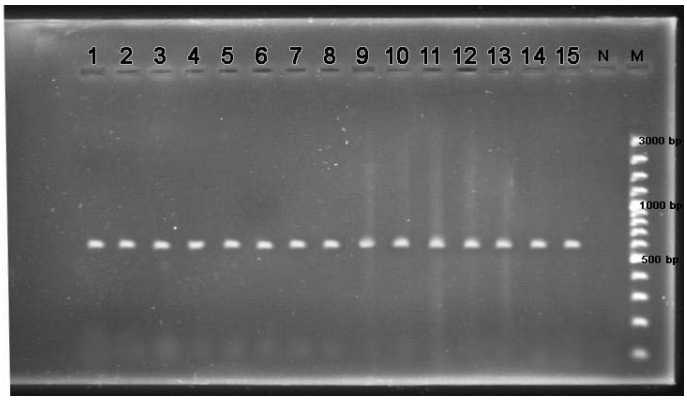
[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.8.6]

نتایج مطلوبی را ارائه داد. روش‌های مختلف استخراج اسیدهای نوکلئیک با توجه به خصوصیات فیزیکوشیمیایی عامل هدف و میزبان طراحی می‌شوند. روش‌های قدیمی بیشتر بر پایه استخراج تمام اسیدهای نوکلئیک موجود در بافت میزبان استوار بود، در حالیکه روش‌های کنونی بر استخراج اختصاصی ژنوم عامل هدف تاکید دارند. مهمترین مرحله در آزمون‌های مولکولی بر پایه PCR استخراج مناسب اسید نوکلئیک است. هرگونه آلودگی یا ناخالصی ممکن است آزمون را با شکست مواجه کند. در برخی نمونه‌ها جهت کاهش میزان بازدارندگی فنل، چندین بار شستشو با اتانول ۷۰ درصد نتایج بهتری را ارائه کرد. همچنین تهیه رقت‌های ۱ به ۲۰ و ۱ به ۵۰ از RNA کل استخراج شده نیز به عنوان راهکاری مناسب برای کاهش مواد بازدارنده ارزیابی گردید. در هر حال، می‌توان RNA با کیفیت بالا را از بافت‌های برگ با استفاده از روش گوانیدین استخراج کرد که می‌تواند به علت پایین بودن سطح ترکیبات متصل شونده به RNA در این بافت‌ها باشد.

سپاسگذاری

بدین وسیله از موسسه تحقیقات مرکبات (رامسر) جهت تامین کیت الیزا و نمونه‌های گلخانه‌ای صمیمانه تشکر می‌شود. همچنین از کلیه همکاران گروه گیاهپزشکی و باغبانی و مسولین محترم آزمایشگاه مرکزی پردیس دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و مدیریت محترم حفظ نباتات استان گلستان که امکانات لازم جهت این تحقیق را فراهم نموده و همکاری صمیمانه‌ای داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌گردد.



شکل ۴- باندهای حاصل از الکتروفورز محصولات RT-PCR، نشانگر Generuler 1000bp ladder plus (M)، شاهد منفی (N)، شماره یک تا ۱۱ نمونه‌های جمع آوری شده از باغات منطقه گرگان و شماره ۱۲ تا ۱۵ نمونه‌های تهیه شده از مرکز تحقیقات مرکبات

منابع

1. Alioto, D., Gangemi, M., Deaglio, S., Sposato, P., Noris, E., Luisoni, E. And R.G., Milne. 1999. Improved detection of Citrus psorosis virus using polyclonal and monoclonal antibodies. Plant Pathology, 48 (6): 735-741.
2. Alioto, D., Malfitano, M., Peluso, A., Boscia, D. And R.G., Milne. 2001. Variability among citrus psorosis virus (CPsV) sources in campania. Abstracts XV conference Of the international organization of citrus virologists. Paphos,Cyprus. P156.
3. Barthe, G.A., Ceccardi, T.L., Mantunath, K.L. And K.S., Derrick. 1998. Citrus psorosis virus: Nucleotide sequencing of the coat protein gene and detection by hybridization and RT-PCR. Journal of general virology. Vol. 79 (6): 1531-1537.
4. D'Onghia, A.M., Carimi, F., De Pasquale, F., Djelouah, K. And G.P., Martelli. 2001. Elimination Of Citrus Psorosis Virus By Somatic Embryogenesis From Stigma And Style Cultures. Plant Pathology, 50: 266-269.
5. Da Graca, J.V., Lee, R.F., Moreno, P., Civerolo, E.L. And K.S., Derrick. 1991. Comparison of isolates of Citrus ring spot, psorosis, and other virus like agents of citrus. Plant Disease, 75:613-616.
6. Djelouah, K., Frasheri, D. and A.M., D'Onghia. 2002. Serological Diagnosis of Citrus psorosis virus and Citrus tristeza virus Using Flower Parts. Fifteenth IOCV Conference, Short Communications, P, 363-365.
7. Djelouah, K., Potere, O., Boscia, D., D'Onghia, A.M. and V, Savino. 2000. Production of monoclonal antibodies to Citrus psorosis-associated virus. Proceedings 14th Conference of International Organization of Citrus Virologists. Brazil, P192.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.8.6]

8. Garcia, M.L., Dal Bo, E., Grau, O. and R.G., Milne. 1994. The Closely Related Citrus ring spot and Citrus psorosis viruses, have particles of novel lamentous morphology. Journal of General Virology, 75: 3585-3590.
9. Garcia, M.L., Sa Nchez De La Torre, M.E., Dal Bo , E., Djelouah, K., Rouag, N., Luisoni, E., Milne, R.G. and O.,Grau. 1997. Detection of Citrus psorosis-ring spot Virus using RT-PCR and DAS-ELISA. Plant Pathology, 46: 830-836.
10. Garnsey, S.M. And L.W., Timmer. 1980. Mechanical transmissibility of Citrus ring spot virus isolates from Florida, Texas, and California. In: Proceedings of the 8th conference of the international organization of Citrus Virologists. 1980. P,174-179. Edited by E. C. Calavan, S. M. Garnsey and L. W. Timmer. IOCV, University of California, Riverside. USA.320P.
11. Habashi, M. 1382. Citrus virus diseases in north of Iran. Journal of plant diseases vol 2: 127-133.
12. Jun-Jun, L., Chong-Jin, G., Chiang-Shiong Loh, P.L. and P., Eng-Chong.. 1998. A method for isolation of total RNA from fruit tissues of banana. Plant Molecular Biology Reporter, Vol,16: 1-6.
13. Khoi, S. 1371. Citrus nutrient principle. publication of islamic cultural and guidance organization. 34P.
14. Legarreta, G.G., Garcia, M.L., Costa, N. And O., Grau. 2000. A high sensitive Heminested RT-PCR assay for the detection of Citrus psorosis virus, targeted to a conserved region of the genome. Journal of Virological Methods, 84:15-22.
15. Loconsole, G., Fatone, M.T., Minafra, A., Potere, O., Castellano, M. And V., Savino. 2002. Occurrence Of Citrus psorosis virus in Apulia. Journal of Plant Pathology, 84: 171-200.
16. Martin, S., Alioto, D., Milne, R. G., Guerri, J. And P., Moreno. 2002. Detection of Citrus psorosis virus in field trees by direct tissue blots immunoassay in comparison with ELISA, symptomatology, biological indexing and cross-protection tests. Plant Pathology, 51:134-141.
17. Martin, S., Lopez, C., Garcia, M.L., Naum-Onganya, G., Grau, O., Flores, R., Moreno, P. and J., Guerri. 2005. The complete nucleotide sequence of a Spanish isolate of Citrus psorosis virus: comparative analysis with other Ophioviruses. Arch Virology, 150: 167–176.
18. Navas-Castillo, J. And P., Moreno. 1995. Filamentous flexuous particles and serologically related proteins of variable size associated with Citrus psorosis and ring spot diseases. European Journal of Plant Pathology, 101: 343-48.
19. Potere, O., Boscia, D., Djelouah, K., Elicio, V., And V., Savino. 1999. Use of monoclonal antibodies to Citrus psorosis virus for diagnosis. Short Communication. Journal of Plant Pathology, 81:209-212.
20. Powell, C.A., Pelosi, R.R., Sonoda, R.M., and R.F., Lee. 1998. A psorosis-like agent prevalent in Florida's grapefruit groves and budwood sources. Plant Disease, 82: 208-209.
21. Roistacher, C.N., D'Onghia, A.M. And K., Djelouah. 2000. Defining psorosis by biological indexing and ELISA. P, 221-223, In: Proceedings of the 14th conference of the international organization of Citrus Virologists IOCV, Campinas SP, Brazil.
22. Roy, A., Fayad, A., Barthe, G. and R.H., Brlansky. 2005. A multiplex polymerase chain reaction method for reliable, sensitive and simultaneous detection of multiple viruses in citrus trees. Journal of Virological Methods, 129: 47–55.
23. Sanchez, De. La. Torre. M.E., Zandomeni, G. and M. L. García., 1998. The top component of Citrus psorosis virus contains two ssRNAs, the smaller encodes the coat protein.Retrieved (April, 6, 2006), from : http://www.Bspp.Org.Uk/Mppol/1998/1019sanchez.
24. Sarami, H. 1382. *Fusarium spp.* distribution model in various hemispheres. Journal of Plant Diseases, 39:101-113.

[Downloaded from mg.genetics.ir on 2026-11-06]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1390.6.1.8.6]