

## بسمه تعالی

### دستور العمل تشخیص بیماری جاروک لیموترش

**الف) دستور العمل تشخیص با استفاده از علائم ظاهری:** با توجه به اینکه در ایران غیر از *Phytoplasma aurantifolia Ca.* فیتوپلاسمای دیگری در لیموترش گزارش نشده است و نظر به علائم بسیار مشخص و منحصر بفرد این فیتوپلاسم، برای تشخیص بیماری جاروک لیموترش استفاده از علائم ظاهری روشی مطمئن، آسان و اقتصادی می‌باشد. علائم مشخص بیماری جاروک لیموترش عبارتند از: ظهور جاروک در یک قسمت از درخت و سپس گسترش بیماری و افزایش تدریجی تعداد جاروها در سایر قسمتهای درخت از جمله تنه و طوقه. هر جارو از تعداد زیادی شاخه کوتاه و ظریف تشکیل شده که تعداد زیادی برگ با فاصله کوتاه روی آنها قرار گرفته‌اند. رنگ برگ‌ها از سبز کم‌رنگ تا زرد و اندازه آنها از کوچک تا بسیار کوچک متغیر است. معمولاً در جاروها و شاخه‌های حامل جاروها گل و میوه تشکیل نمی‌شود. ولی در بعضی موارد در قسمتهایی از درخت که علائم آلودگی را نشان می‌دهند میوه‌های ریز و غیر عادی به صورت خوشه‌ای ظاهر می‌شوند که دارای بذور قهوه‌ای پوک و چروکیده هستند. برگهای ریز جاروها به تدریج خشک شده و می‌ریزند. متعاقب خشک شدن جاروها، شاخه‌های حامل آنها نیز یکی پس از دیگری خشک شده و در نهایت منجر به مرگ درختان مبتلا می‌شود. این روند سه تا پنج سال پس از ظهور اولین علائم بیماری در درختان آلوده به طول می‌انجامد (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱- ریز برگی و حالت جارویی در درخت



شکل ۲- زوال و خشکیدگی در درخت



ب) دستور العمل تشخیص با استفاده از روش‌های مولکولی: برای تأیید تشخیص بیماری با استفاده از علائم ظاهری و همچنین شناسایی درختان لیموترش آلوده‌ای که هنوز به مرحله ظهور علائم آلودگی نرسیده‌اند (در دوره کمون بیماری می‌باشند)، از آزمون واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) استفاده می‌شود. در آزمون PCR از جفت آغازگر اختصاصی فیتوپلاسمای عامل جاروک لیموترش P1/WB3 و همچنین آغازگرهای عمومی فیتوپلاسمها مانند جفت آغازگرهای P1/P7 و R16F2n/R16R2 به شرح زیر استفاده می‌شود.

۱- استخراج دی. ان. ای (DNA) کل

۱-۱- روش Hung et al., 2000

مواد مورد نیاز جهت استخراج DNA شامل بافر استخراج (Tris-HCl) ۱۰۰ میلی مولار (pH=8)، EDTA ۱۰۰ میلی مولار (pH=8) و NaCl ۲۵۰ میلی مولار، CTAB ۵٪ محلول در NaCl ۰/۷ مولار، محلول N-Lauroylsarcosine ۱۰٪، NaCl ۵ مولار، کلروفرم/ایزوامیل الکل به نسبت ۱:۲۴، ایزوپروپانول، اتانول ۷۵٪ و آب دوبار تقطیر است.

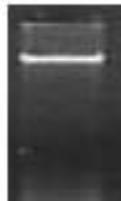
ابتدا ۱۰۰ میلی گرم از بافت گیاهی در نیتروژن مایع بوسیله هاون پودر شده و به تیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل می‌شود. ۹۰۰ میکرولیتر بافر استخراج به آن اضافه کرده و به خوبی سوسپانسیون می‌کنیم. سپس ۱۰۰ میکرولیتر محلول سارکوزین ۱۰٪ به سوسپانسیون حاصله اضافه کرده و تیوب‌ها را بمدت ۱ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم. سوسپانسیون حاصله را در ۴۰۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و ۸۰۰ میکرولیتر از فاز رویی حاصله را به تیوب جدید منتقل می‌کنیم. در مرحله بعد ۱۰۰ میکرولیتر محلول NaCl ۵ مولار و ۲۰۰ میکرولیتر محلول CTAB ۵٪ به تیوب اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد قرار می‌دهیم. سپس ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم/ایزوامیل الکل (۲۴:۱) اضافه نموده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ می‌کنیم. فاز رویی حاصله به تیوب جدید منتقل شده و مجدداً ۶۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم/ایزوامیل الکل (۲۴:۱) به آن اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور سانتریفیوژ می‌شود. فاز رویی حاصله به تیوب جدید منتقل شده و هم حجم آن ایزوپروپانول اضافه می‌شود. تیوب در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ تا ۶۰ دقیقه قرار گرفته و پس از آن بمدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانتریفیوژ می‌شود. فاز رویی دور ریخته شده و رسوب حاصله با اتانول ۷۵٪ شستشو داده می‌شود. سانتریفیوژ در ۱۲۰۰۰ دور بمدت ۲ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد صورت می‌گیرد. مجدداً فاز رویی دور ریخته شده و تیوب در دمای محیط به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه قرار داده می‌شود تا رسوب خشک شود. ۵۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر جهت حل شدن DNA درون تیوب ریخته و در نهایت DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شود. برای اطمینان از سالم بودن DNA استخراج شده ۲ تا ۵ میکرولیتر از DNA حاصله را روی ژل آگاروز ۱٪ (تهیه شده با بافر یک برابر TAE) RUN می‌کنیم (شکل ۳). همچنین غلظت و کیفیت DNA توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (نانو- دراپ) تعیین می‌گردد.

۲-۱- روش Zhang et al., 1998

در هر تیوب اپندورف ۱/۵ میلی لیتری ۸۰۰ میکرولیتر از بافر CTAB (شامل ۲ درصد CTAB، ۱۰۰ میلی مولار تریس، pH=8، ۲۰ میلی مولار EDTA، ۱/۴ مولار نمک طعام، ۲ درصد PVP و ۲ درصد ۲-۲

شماره : .....  
تاریخ : .....  
پیوست : .....

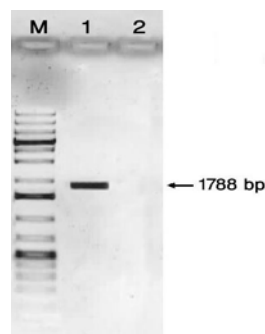
مرکاپتوانول) به نمونه‌ها (۰/۲ گرم بافت رگبرگ میانی پودر شده در ازت مایع) اضافه شده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد قرار داده می‌شوند. سپس در دمای معمولی به هر تیوپ محتوی نمونه ۶۰۰ میکرولیتر مخلوط کلروفرم - ایزوآمیل الکل (به نسبت حجمی ۲۴ به ۱) اضافه و تیوپ‌ها در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۶ دقیقه سانتریفیوژ می‌شوند. برای رسوب دادن DNA کل روشین هر تیوپ به یک تیوپ اپندورف منتقل و پس از اضافه کردن ۶۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد، تیوپ‌ها به مدت ۸ دقیقه در ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ می‌گردند. پس از شستشوی رسوب حاصل با الکل ۸۰ درصد، خشک کردن و حل کردن آن در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل از آن به عنوان دی. ان. ای الگو در آزمون PCR استفاده می‌شود.



شکل ۳- الکتروفورز محصول استخراج دی. ان. ای کل از برگ لیموترش آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک در ژل آگارز ۱٪

## PCR -۲

واکنش PCR با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش و آغازگرهای عمومی فیتوپلاسمها (جدول ۱) در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام می‌شود (جدول ۲). شرایط دمایی و زمانی چرخه‌های مختلف دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر می‌باشد: واسرشته سازی اولیه در  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴ دقیقه، به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در  $94^{\circ}\text{C}$  واسرشته سازی، ۴۵ ثانیه در دمای اتصال هر آغازگر (جدول ۱) و ۴۵ ثانیه در  $72^{\circ}\text{C}$  تکثیر و تکثیر نهایی در  $72^{\circ}\text{C}$  بمدت ۷ دقیقه. پس از تکثیر، محصول PCR در ژل آگاروز ۲٪ تهیه شده توسط بافر یک برابر TAE الکتروفورز می‌گردد. باندهای DNA پس از رنگ آمیزی ژل با محلول اتیدیوم بروماید قابل مشاهده خواهند بود (شکل ۴).



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR با جفت آغازگر P1/P7 در ژل آگاروز ۲٪. چاهک های M، ۱ و ۲ به ترتیب نشانگر +bp ۱۰۰، نمونه درخت لیموترش آلوده به فیتوپلاسمای عامل جاروک و درخت لیموترش سالم می‌باشند.

شماره : .....  
 تاریخ : .....  
 پیوست : .....

جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در ردیابی و تشخیص فیتوبلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش و مشخصات آنها

نام جفت آغازگر	ترادف (۳-۵)	دمای اتصال	اندازه قطعه مورد انتظار (جفت باز)
P1/P7	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT CGTCCTTCATCGGCTCTT	۵۵	۱۸۰۰
R16F2n/R16R2	GAAACGACTGCTGCTAAGACTGG TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	۵۵	۱۲۰۰
P1/WB3	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT GCAAGTGGTGAACCATTTGTTT	۵۳	۱۰۰۰

جدول ۲- مواد مورد نیاز و مقدار آنها در PCR به صورت واکنش ۲۵ میکرولیتری

نام ماده*	مقدار استفاده شده
PCR Buffer 10X	۲/۵ میکرولیتر
MgCl <sub>2</sub> (25Mm)	۱/۴ میکرولیتر
dNTPs (10Mm)	۱ میکرولیتر
Primer F (10 pmol)	۱ میکرولیتر
Primer R (10 pmol)	۱ میکرولیتر
Taq DNA Polymerase	۰/۲ میکرولیتر
DNA (50 ng)	۲ میکرولیتر
DDW	۱۵/۹ میکرولیتر

\* کلیه مواد از شرکت فرمنتاز می باشند و آغازگرها توسط شرکت MWG ساخته شده اند.

منابع

Hung, T. H., Wu, M. L. and Su, H. J. 2000. A rapid method based on the one-step reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) technique for detection of different strains of citrus tristeza virus. *J. Phytopathol.* 148:469-475.

Zhang Y.P., Uyemoto J.K. and Kirkpatrick, B. C. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytoplasmas for PCR assay. *J. Virol. Methods* 71: 45-50.