آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۵، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۶

ردیابی ویروئیدهای مرکبات با روش استخراج اسید نوکلئیک توسط CF-11

سید وحید علوی[۱] و پرسا تیموری[۲]✉

۱- استادیار بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران؛ ۲- دانش آموخته‌ی کارشناسی ارشد گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

(تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۵؛ تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۹۶)

چکیده

بیماری‌های کاچکسیا ناشی از ویروئید *Citrus Cachexia viroid*, CCaVd و اگزوکورتیس ناشی از ویروئید *Citrus exocortis viroid*, CEVd مهم‌ترین بیماری‌های ویروئیدی مرکبات در جهان هستند. ویروئیدها با روش‌های متداول سرولوژیکی قابل شناسایی نبوده و روش‌های فعلی تشخیص آنها عموماً وقت‌گیر، پر هزینه و با محدودیت‌هایی همراه است. در این بررسی امکان خالص‌سازی و شناسایی دقیق این ویروئیدها با استفاده از ستون کروماتوگرافی CF-11 بررسی شد. طی سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲، از سرشاخه‌های ۲۲ درخت نارنگی و ۱۵ درخت پرتقال به ترتیب واجد علائم بیماری‌های کاچکسیا و اگزوکورتیس در شرق مازندران نمونه برداری شد. بافت برگ پس از پودر شدن با بافر استخراج مخلوط شد. خالص‌سازی در ستون حاوی پودر سلولز انجام و با افزودن اتانول، مولکول‌های آر ان ای دو رشته‌ای استخراج و توسط استات سدیم رسوب داده شد. رسوب حاصل در آگارز یک درصد الکتروفورز و دو باند اختصاصی در محدوده‌های ۳۰۰ تا ۴۰۰ جفت باز (فرم خطی) و ۷۸۰۰ –۷۰۰۰ جفت باز (فرم حلقوی) مرتبط با این دو ویروئید به دست آمد که به ترتیب در ماه‌های گرم و در تمامی ماه‌های سال با این روش قابل‌شناسایی بود. ماهیت RNA دورشته‌ای باندهای به دست آمده، با عدم تخریب آنها توسط آنزیم DNase وهمچنین RNase در حضور محلول نمک طعام ۰/۳ مولار و حلالیت آن‌ها در محلول LiCl تایید شد. ماهیت ویروئیدی باندهای به دست آمده توسط واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (RT-PCR) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی CEVd و CCaVd تعیین گردید. تعداد ۵۰۰ نهال پرتقال و ۳۰۰ نهال نارنگی در آزمون سلامت نهال با این روش بررسی شد.با توجه به تکرار پذیری و قابل اعتماد بودن این روش و تأیید ماهیت باندهای به دست آمده با آغازگر اختصاصی هر یک از این دو ویروئید در واکنش زنجیره ای پلی‌مراز، این روش برای تشخیص ویروئیدهای مرکبات در برنامه‌های کاربردی تولید نهال سالم با صرف حداقل زمان و هزینه پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: اگزوکورتیس، ستون کروماتوگرافی CF-11، کاچکسیا، ویروئید مرکبات، RT-PCR

Detection of Citrus Viroids by CF-11 Nucleic Acid Extraction Method

S. V. ALAVI[1] and P. TEYMURI[2]✉

1- Assistant Professor Plant Protection Division, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, (AREEO), Sari, Iran; 2- and MSc. Graduated, Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Islamic Azad University, Tehran Science and Research Branch, Iran

Abstract

Cachexia (*Citrus cachexia viroid*, CCaVd) and exocortis (*Citrus exocortis viroid*, CEVd) are the most important citrus viroid diseases in the world. Detection of the viroids through the common serological methods is not feasible and the current methods are time consuming and costly with some limitation. Purification and accurate detection of the viroids was studied by column chromatography with CF-11 cellulose powder in presence of ethanol (common method for viruses' dsRNA detection) in comparison to the conventional methods. During 2010-2012, sampling was done from twigs of 22 Mandarin and 15 orange trees have symptoms of cachexia and exocortis, respectively, in East Mazandaran. Leaf samples were ground and mixed with extraction buffer. Purification carried out in CF-11 column and viroid molecules extracted with ethanol and precipitated by adding sodium acetate. The nucleic acid extracts were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis and specific bands of the two viroids with molecular sizes of 7000-7800bp (circular form) and 300-400bp (linear form) were detected in warm and all months, respectively. The dsRNA nature of the bands was confirmed by nuclease treatment (DNaseI and RNaseA) and 2M LiCl extraction methods.Viroid entity of the each nucleic acid sample was recognized by RT-PCR method using specific primers of cachexia and exocortis viroids. 500 orange and 300 mandarin seedlings were tested in healthy citrus seedling production program.As regards of advantages of this method (repeatability, reliability, saving time and price) and confirmation by RT-PCR, the method is recommended for viroid detection in healthy citrus seedling production programs.

Key words: Cachexia, citrus viroids, CF-11 column chromatography, Exocortis, RT-PCR.

✉ **Corresponding author: P_teymuri@yahoo.com**

مقدمه

ویروئیدها مولکول‌های RNA تک‌رشته‌ای حلقوی کوچک با جرم مولکولی پایین هستند که در نواحی مشخصی با قرارگیری بازهای مکمل روبروی یکدیگر حالت شبه دورشته‌ای می‌یابند. ویروئیدها از جمله کوچکترین عوامل ژنتیکی ایجادکننده بیماری‌های گیاهی با اندازه‌ای در حدود ۲۴۶ تا ۳۷۵ نوکلئوتید و فاقد اطلاعات کافی برای کُد نمودن پلی پپتیدها هستند (Kees and Symons, 1985). حداقل ۵ گونه مشخص از ویروئیدها، مرکبات را آلوده می‌کند که برخی از آنها دارای تنوع درون گونه‌ای هستند (Ben-shaul *et al.*, 1995). کاچکسیا با عامل *Citrus cachexia viroid* (CCaVd) موجب کوتولگی، زردی، ضعف، ساقه آبله‌ای و صمغ زیر پوست در ارقام نارنگی، پرتقال و انواع دیگری از مرکبات می‌شود. اگزوکورتیس با عامل *Citrus exocortis viroid* (CEVd) علائم پوسته‌پوسته شدن پایه، کوتولگی و زوال را روی پایه‌های حساس مرکبات (ارقام سه‌برگچه‌ای) ایجاد می‌نماید. ویروئیدها از طریق پیوندک آلوده به مناطق مختلف جهان انتشار یافته و از طریق ابزار باغبانی به سهولت منتقل می‌شوند. ویروئیدها اغلب غلظت پایینی در میزبان خود داشته و در برخی از پایه- پیوندک‌های تجارتی مرکبات علائم مشخصی را ایجاد نمی‌کنند (Roistacher, 1991).

ارقام مرکبات نارنگی (*Citrus reticulata* Blanco.) روی پایه نارنج (*Citrus aurantium* L.) و پرتقال (*Citrus sinensis* L. Osbeck.) روی پایه پونسیروس (*Poncirus trifoliata* L.) و دورگ‌های آن، به ترتیب علائم بیماری‌های کاچکسیا و اگزوکورتیس را در سنین بالای هشت سال نشان داده‌اند (Roistacher, 1991). تولید پیوندک و نهال‌های سالم عاری از بیماری‌های مُسری، به خصوص عوامل ویروسی و شبه‌ویروسی اولین شرط لازم برای تولید اقتصادی و پایدار در صنعت مرکبات است. کنترل سلامت نهال‌ها و درختان مرکبات در طی مراحل مختلف تولید نهال سالم و پس از آن در مراحل زمانی مشخص در باغات مادری وگلخانه‌های تکثیری صورت می‌گیرد (Hull, 2002).

فقدان پوشش پروتئینی، خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاصی را موجب گردیده که تشخیص ویروئیدها را با روشهای رایج شناسایی ویروس‌های بیمارگر گیاهی دشوار یا ناممکن نموده است. استفاده از گیاهان محک برای تشخیص ویروئیدهای مرکبات، در شرایط ایده آل بین سه تا نه ماه زمان نیاز دارد و از دقت مناسب و کافی برخوردار نیست (Roistacher, 1991; Hull, 2002). سایر روش‌های تشخیص دقیق معرفی شده برای شناسایی ویروئیدهای مرکبات شامل الکتروفورز در ژل پلی‌اکریل آمید متوالی (Sequential polyacrylamide gel electrophoresis – sPAGE) و هیبریداسیون مستقیم (Direct hybridization assay) دارای محدودیت‌هایی در تشخیص و نیازمند هزینه و امکانات آزمایشگاهی بالایی است. به منظور ارزیابی دقیق سلامت اندام‌های تکثیری مرکبات، تلفیق روش‌های شناسایی مولکولی با نموده سازی الزامی می‌باشد (Frison and Taher, 1991). با توجه به ماهیت شبه دورشته‌ای RNA ویروئیدها (Kees and Symons, 1985) در این پژوهش امکان خالص‌سازی ویروئیدهای CCaVd و CEVd با استفاده از کروماتوگرافی ستونی CF-11 در حضور اتانول، در مقایسه با روش‌های مرسوم بررسی شد.

روش بررسی

نمونه برداری: در طی سال‌های ۱۳۹۰ تا ۱۳۹۲ باغات مرکبات شهرستان‌های بابل، قائمشهر و ساری بازدید شد. از۲۲ درخت نارنگی با سن۱۵-۱۰سال روی پایه نارنج با علائم مشکوک به آلودگی کاچکسیا، شامل ضعف و زوال عمومی و وجود آبله‌های چوب همراه با صمغ زدگی در محل پیوند (Semancik and Roistacher, 1988)، ۱۵ درخت پرتقال روی پایه پونسیروس واجد علائم مشکوک به بیماری اگزوکورتیس، شامل کندی رشد، ریزش برگ‌ها، سرخشکیدگی و پوسته پوسته شدن تنه در زیر محل پیوند (Bitter *et al.*, 1987) و ۱۵ درخت فاقد علائم فوق الذکر،

نمونه‌برداری و پس از ثبت مشخصات به آزمایشگاه منتقل شد. در اسفند تا اردیبهشت سال های ۱۳۹۳ و ۱۳۹۴ نیز تعداد ۵۰۰ نهال از ارقام پرتقال و ۳۰۰ نهال از ارقام نارنگی برای آزمون سلامت نهال به طور تصادفی از نهالستان های شهرستان ساری جمع آوری و بررسی شد (جدول ۱). با توجه به اینکه ویروئیدها و اغلب ویروس‌های مرکبات از طریق بذر قابل انتقال نمی‌باشند (Roistacher, 1991)، شاهد سالم از نهال‌های پرتقال روئیده از بذر (نوسلار) و شاهد آلوده به ویروئیدهای اگزوکورتیس و کاچکسیا به ترتیب از نهال‌های پرتقال و نارنگی (Alavi *et al.*, 2010)، ویروس پسوروز مرکبات از نهال‌های پرتقال آلوده به جدایه B (Falaki *et al.*, 2013) و ویروس تریستزای مرکبات از نهال‌های پرتقال آلوده به جدایه‌های IR.n1 ، IR.n2، IR.n3 و IR.n4 (Alavi *et al.*, 2005) در گلخانه قرنطینه مرکز تحقیقات کشاورزی استان مازندران انتخاب شد.

جدول ۱- نمونه‌های جمع آوری شده به تفکیک مکان نمونه برداری در شرق مازندران

Table 1. Collected samples based on the region in the east Mazandaran

منطقه Region	نارنگی با علائم کاچکسیا Mandarin tree with cachexia symptoms	پرتقال با علائم اگزوکورتیس Orange tree with exocortis symptoms	نارنگی فاقد علائم Mandarin tree without symptoms	پرتقال فاقد علائم Orange tree without symptoms	نهال پرتقال Orange seedling	نهال نارنگی Mandarin seedling
ساری Sari	7	6	3	2	–	–
نهالستان های مرکبات Citrus nurseries	-	-	-	-	500	300
قائمشهر Ghaemshahr	10	5	3	2	–	–
بابل Babol	5	4	3	2	–	–
جمع Total	22	15	9	6	500	300

خالص سازی dsRNA با استفاده از CF-11: کلیه نمونه‌ها با استفاده از روش خالص‌سازی با ستون کروماتوگرافی سلولز CF-11، بررسی شد. استخراج اسید نوکلئیک از نمونه‌های جمع آوری شده با تلفیق روش‌های Dodds and Bar-Joseph (1983) و Morris and Dodds (1979) به شرح زیر انجام گرفت.

مقدار ۶ تا ۸ گرم بافت برگ جوان از هر نمونه در نیتروژن مایع خرد و با ۲۰ میلی لیتر بافر استخراج (۰/۲ مولار گلیسین، ۰/۱ مولار مونوپتاسیم فسفات، ۰/۶ مولار کلرید سدیم، ۰/۰۱ مولار کلرید منیزیم، ۱/۵ درصد SDS، ۱۰ درصد مرکاپتواتانول، pH 8) مخلوط شد. میانگریز با سرعت ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. رونشین به لوله‌های جدید انتقال یافت و هم حجم هر نمونه فنل اشباع در بافر تریس pH 7.8 اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه مخلوط شد. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g میان‌گریز انجام شد، فاز مایع رویی جمع آوری و به مدت ۱۰ دقیقه تحت شرایط خلاء قرار گرفت. دو گرم پودر سلولز CF-11 (Whatman Ltd, UK) و اتانول با غلظت نهایی ۱۷٪ به آن افزوده شد. سوسپانسیون موجود در محفظه کروماتوگرافی ریخته شد و با ۳۰ میلی لیتر بافر STE– اتانول (۰/۰۵ مولار تریس، ۰/۰۰۱ مولار EDTA، ۰/۱. مولار کلرید سدیم، ۱۷ درصد اتانول، pH 6.8)و سپس با ۵ میلی لیتر بافر STE بدون الکل شستشو و جمع آوری

گردید. به میزان یک دهم حجم آن استات سدیم ۳ مولار (pH 6.2) و ۲ برابر حجم اتانول مطلق افزوده و در دمای ۲۰− درجه سلسیوس به مدت یک شب نگهداری شد. در ادامه میانگریز به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰g انجام گردید و رسوب به دست آمده در ۲۰ میکرولیتر بافر بارگذاری (۰/۰۴ مولار تریس، ۰/۰۲ مولار استات سدیم، ۰/۰۰۱ مولار EDTA، ۲۰ درصد گلیسرول و ۰/۰۱ درصد برم فنل بلو) به آرامی به مدت یک تا دو دقیقه با میله‌ای پلاستیکی ساییده و سوسپانسیون حاصل در چاهک‌های تعبیه شده در ژل آگارز یک درصد (Low Melting Point, EEO type, BDH Co., India) در بافرالکتروفورز (۰/۰۴ مولارتریس، ۰/۰۲ مولار استات سدیم، ۰/۰۰۱ مولار EDTA، pH 7.8) ریخته شد و الکتروفورز به مدت یک ساعت در ۷۰ ولت انجام گرفت. یک چاهک با نمونه نهال سالم پرتقال با منشاء نوسلار استخراج شده به روش فوق الذکر و یک چاهک نیز با مارکر DNA پلکانی فرمنتاس با فواصل ۱۰۰ bp (SM0331, Fermentas, Life Sciences, Germany) به میزان توصیه شده پرشد. ژل الکتروفورز پس از دو مرتبه شستشو با آب مقطر استریل به مدت بیست دقیقه در بافر الکتروفورز حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار داده شد و سپس در طول موج ۳۰۲ نانومتر بررسی و عکس برداری (UVP-Gel Documentation Apparatus, USA) شد. نمونه‌برداری و خالص سازی به روش مذکور در چهار فصل سال انجام شد.

تایید ماهیت dsRNA استخراجی از ستون CF-11 به روش هضم آنزیمی: برای تایید ماهیت اسید نوکلئیک خالص شده، رسوب حاصل از هر نمونه در مرحله قبل با تیمارهای DNaseI و RNaseA به ترتیب در حضور کلرید منیزیم و کلرید سدیم بررسی گردید (Dodds and Bar-Joseph, 1983). در تیمار اول، ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حاوی ۱/۵ واحد DNaseI (۱۰ میکروگرم در میلی لیتر) و پنج میلی‌مولار کلرید منیزیم به رسوب اسید نوکلئیک استخراج شده از هر نمونه اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس هم حجم آن محلول فنل/کلروفرم/ایزوآمیل الکل (۲۵:۲۴:۱) اضافه شده، ۱۵ دقیقه به آرامی مخلوط و میانگریز به مدت ۱۰ دقیقه در۸۰۰۰g انجام شد. فاز رویی جدا شده و پس از افزودن اتانول مطلق و استات سدیم ۳ مولاربه ترتیب به میزان ۲/۵ و ۱/۱۰ برابرحجم آن، به مدت یک شب در ۲۰− درجه سلسیوس قرار گرفت. در تیمار دوم به رسوب به دست آمده، ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حاوی ۱/۵ واحد RNaseA (۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) و ۰/۳ مولار کلرید سدیم اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شد. سایر مراحل مانند تیمار اول صورت گرفت. میانگریز نمونه‌های حاصل از تیمارهای فوق الذکر به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۱۰۰۰g انجام شد. پس از حذف مایع رویی، رسوب به دست آمده در ۲۰ میکرولیتر بافر بارگذاری (۰/۰۴ مولارتریس، ۰/۰۲ مولار استات سدیم، ۰/۰۰۱ مولارEDTA، حاوی۲۰درصد گلیسرول و۰/۰۱ درصد برم فنل بلو) به آرامی سوسپانسیون شد. نمونه گیاه سالم قبل و بعد از عبور از ستون کروماتوگرافی نیز عنوان شاهد در نظر گرفته شد. الکتروفورز در ژل آگارز مشابه با مرحله قبل انجام شد.

واکنش زنجیره ای پلی مراز با نسخه برداری معکوس: به منظور تأیید ماهیت ویروئیدی رسوب به دست آمده با این روش برای هر نمونه، واکنش زنجیره‌ای پلی مراز به همراه نسخه برداری معکوس (RT–PCR) توسط آغازگرهای اختصاصی متعلق به ویروئیدهای کاچکسیا و اگزوکورتیس (جدول شماره ۲) انجام شد (Almeyda-Leon *et al*., 2007; Alvarado-Gomez *et al*., 2000).

دو تا پنج میکرولیتر از رسوب به دست آمده به لوله‌های ۵۰۰ میکرولیتری سترون روی یخ قرار گرفته، افزوده شد. ۴۰ پیکومول آغازگر معکوس (C-primer)، ۴ میکرولیتر بافر واکنش Reaction buffer-5x (۲۵۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۲۵۰ میلی‌مولارKCl، ۲۰ میلی مولار$MgCl_2$، ۵۰ میلی‌مولارDTT، 8.3 pH) و آب مقطر دیونیزه سترون (تا حجم نهایی پنجاه میکرولیتر) افزوده و کاملاً مخلوط شد. سپس به مدت ۳ دقیقه

در ۹۴ درجه سلسیوس قرار داده شده و بلافاصله روی یخ منتقل و پس از آن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. به هر لوله، ۵ واحدآنزیم MMuLV-Reverse Transcriptase (Fermentas, Life Sciences, Germany) و ۲ میکرولیتراز مخلوط dNTP mix با غلظت ۰/۴ میلی‌مولار افزوده و به مدت یک ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. پنج میکرولیتر از محلول حاوی DNA الگو (cDNA) به دست آمده در مرحله قبل به لوله‌های سترون جدید منتقل و ۲۰پیکومول از هر یک از آغازگرهای مستقیم (H-Primer) و معکوس (C-Primer)، نیم میکرولیتر از مخلوط نوکلئوتیدها (dNTP mix) و نیم میکرولیتر (یک واحد) از آنزیم Taq-DNA Polymerase، یک میکرولیتر $MgCl_2$ و سپس آب مقطر دیونیزه سترون تا حجم نهایی بیست میکرولیتر به آن افزوده شد. لوله‌ها در دستگاه چرخه حرارتی (MJ Mini 48-Well Personal thermal cycler, Bio-RAD, USA) ابتدا به مدت دو دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و سپس در معرض ۳۵ چرخه حرارتی (به ترتیب به مدت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۰ درجه و ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس) قرار داده شد و در آخر گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس صورت گرفت. محصول نهایی PCR در ژل آگارز مشابه با روش ذکر شده قبلی بررسی شد.

جدول ۲- مشخصات آغازگرهای اختصاصی ویروئید های اگزوکورتیس و کاچکسیا مورد استفاده در RT-PCR

Table 2- Specific Primers of Cachexia and Exocortis used in RT-PCR

آغازگر Primer	توالی Sequences	ماخذ طراحی آغازگر References
C^a – CEVd	(5 –CCCTGAAGGACTTCTTCCCC-3)	**Yang *et al*., 1992**
H^b– CEVd	(5- ATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAG-3)	**Yang *et al*., 1992**
C^a– CCaVd	(5-TTGCCCCGGGGCTCCTTTCTC-3)	**Levy and Hadidi, 1993, Francis *et al.,* 1995**
H^b–CCaVd	(5-CTCTTCTCAGAATCCAGCGA-3)	**Levy and Hadidi,1993, Francis *et al.,* 1995**

a : آغازگر اختصاصی مکمل (antisense primer)

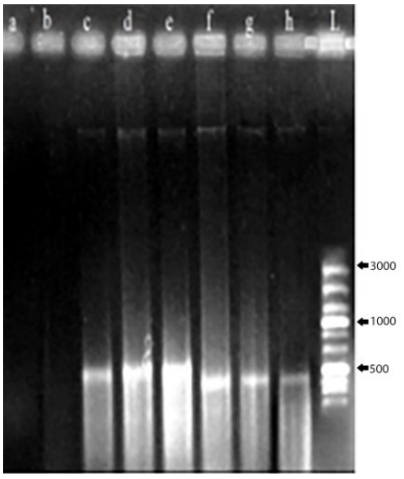
b: آغازگر اختصاصی همسان(sense primer)

نتیجه و بحث

خالص سازی با استفاده از ستون CF-11: پس از خالص سازی اسید نوکلئیک نمونه‌های مورد بررسی با استفاده از ستون CF-11 و الکتروفورز آن در ژل آگارز، دو باند واضح مشاهده شد که جرم مولکولی آنها به ترتیب در محدوده ۴۰۰bp–۳۰۰ و ۷۵۰۰bp–۷۰۰۰ تخمین زده شد. در مسیر حرکت شاهد سالم باندی مشاهده نشد (شکل۱).

حرکت باندهای اسید نوکلئیک به دست آمده از هر یک از درختان واجد علائم بیماری کاچکسیا، اندکی سریع‌تر از باندهای مربوط به اسید نوکلئیک به دست آمده از هر یک از درختان واجد علائم بیماری اگزوکورتیس بود. جرم مولکولی اولین باند حدود ۷۵۰۰bp—۷۰۰۰ تخمین زده شد که آن را به فرم حلقوی (Circular) ویروئیدهای مرکبات نسبت داده‌اند (Rezaian, 1999)، اگر چه در گزارشات منتشر شده، اندازه دقیق این باند تعیین نشده است (Rivera-Bustamante *et al*., 1986; Beaudry and Perreault, 1995). دومین باند که در محدوده ۴۰۰bp–۳۰۰ قرار گرفت، مربوط به فرم خطی (Linear) ویروئیدهای مورد بررسی بود. در صورت نیاز به شناسایی نوع ویروئید با افزایش زمان الکتروفورز و طول ژل، باندها قابل تفکیک خواهد بود (Rezaian *et al*., 1990). فرم حلقوی ویروئیدها در تمامی ماه‌های سال، اما فرم خطی آن در فروردین تا اواخر مهر ماه به خوبی قابل رویت بود ولی از اوائل آبان تا اواخر اسفند ماه در اغلب مواقع غلظت بسیار پایین و به سختی قابل مشاهده بود. به علت غلظت پایین ویروئیدهای مرکبات به خصوص در ماه‌های سرد سال، روشی که برای تشخیص ویروئیدهای مرکبات تا قبل از این مورد

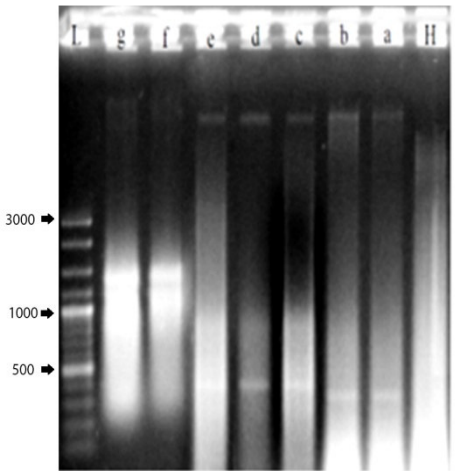
استفاده قرار گرفته، الکتروفورز روی ژل متوالی پلی اکریل آمید (Sequential PAGE) بوده که برای شناسایی میزان اندک اسید نوکلئیک طراحی شده است. اما حتی این روش نیز به علت غلظت پایین ویروئید در ارقام تجاری مرکبات، قادر به شناسایی ویروئیدها در درختان آلوده فاقد علائم مشخص در باغات نبوده و بر لزوم تلفیق آن با روش شناسایی بیولوژیک (گیاهان محک) تأکید شده است. در کاربرد مستقیم این روش شناسایی نیز معمولا ابتدا قطعاتی از پوست درختان مشکوک به آلودگی را به نهال مناسب تکثیری در گلخانه پیوند نموده و پس از تکثیر ویروئید در این میزبان گلخانه‌ای، RNA ویروئیدها استخراج و سپس الکتروفورز روی ژل متوالی پلی اکریل آمید انجام گردیده است (Garnsey *et al*., 2002).



شکل ۱- نمونه های اسید نوکلئیک استخراج شده از برگ مرکبات توسط ستون CF-11 ؛ a,b: نهال سالم نوسلار پرتقال، c: شاهد آلوده به اگزوکورتیس، d,e: نمونه درختان واجد علائم اگزوکورتیس به ترتیب از ساری و بابل. F: شاهد آلوده به کاچکسیا، g,h: نمونه درختان آلوده به کاچکسیا به ترتیب از ساری و بابل، L: نشانگر نردبانی SM0331 (Fermentas, Life Sciences, Germany).

Fig. 1. Nucleic acid samples extracted from citrus leaves by CF-11 column; a,b: Healthy nucelar orange seedlings, c: Positive control of exocortis, d,e: Samples of citrus trees with exocortis symptoms from Sari and Babol, respectively, f: Positive control of cachexia, g,h: Samples of citrus trees with cachexia symptoms from Sari and Babol, respectively, L: GeneRuler™ DNA Ladder Mix#SM0331 (Fermentas, Life Sciences, Germany).

در نقوش الکتروفورزی جدایه تیپ B ویروس پسوروز مرکبات، دو باند dsRNA با اندازه ۱/۶ و ۱/۹ مشاهده شد که با فرم تکثیری (Replicative Form, RF) ویروس پسوروز مرتبط بوده (De La Torre *et al*., 2002) و با باندهای به دست آمده از ویروئیدها دراین بررسی شباهتی نداشته و لذا امکان تفکیک آنها توسط این روش وجود داشت (شکل۲).



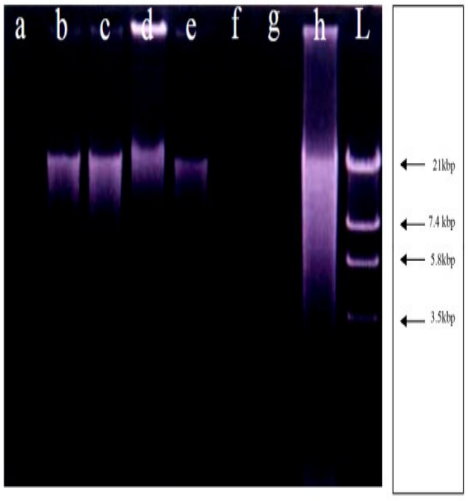
شکل ۲- نمونه‌های اسید نوکلئیک استخراج شده از برگ مرکبات توسط ستون CF-11؛ H: نهال سالم نوسلار پرتقال، a,b: نمونه درختان واجد علائم کاچکسیا از بابل و قائمشهر، c, d: نمونه درختان واجد علائم اگزوکورتیس از بابل و قائمشهر، e: شاهد آلوده به اگزوکورتیس، f,g: شاهدآلوده به پسوروز، L: نشانگر نردبانی SM0331 (Fermentas, Life Sciences, Germany).

Fig. 2. Nucleic acid samples extracted from citrus leaves by CF-11 column; H: Healthy nucelar orange seedling, a,b: Samples of citrus trees with cachexia symptoms from Babol and Ghaeshahr, c,d: Samples of citrustrees with exocortis symptoms from Babol and Ghaemshahr, e: Positive control of exocortis, f,g: Positive control of psorosis, L: GeneRuler™ DNA Ladder Mix# SM0331 (Fermentas, Life Sciences, Germany).

فرم تکثیری (RF) اصلی ویروس تریستزای مرکبات نیز جرمی حدود ۱۹/۵ کیلو باز داشته که در محدوده اندازه ویروئیدها نمی‌باشد (شکل ۳). برای سایر ویروس‌های مرکبات نیز اگرچه RF های فرعی با اندازه پایین دارند ولی امکان تداخل الگوی الکتروفورزی وجود ندارد (Roistacher, 1991; Dodds and Bar-Joseph, 1983).

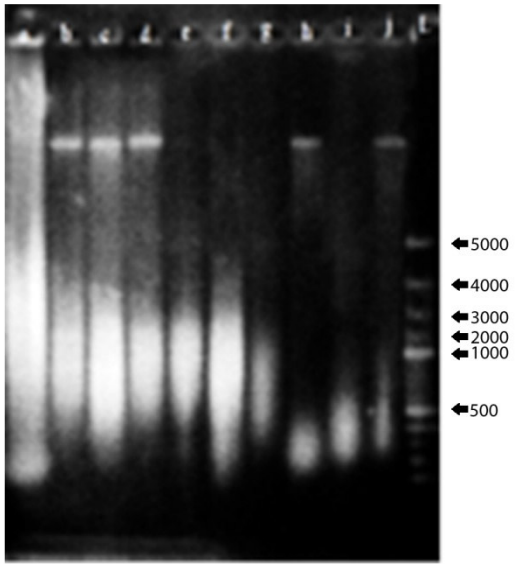
تأیید ماهیت dsRNA اسید نوکلئیک‌های استخراجی از ستون CF-11: رسوب حاصل از استخراج اسید نوکلئیک با روش خالص سازی ستون CF-11 پس از تیمار با آنزیم RNaseA درحضور ۰/۳ مولار نمک طعام، باندی در حدود

۷۰۰۰bp در ژل آگارز یک درصد داشت، در حالیکه در نمونه تیمار شده با آنزیم RNaseA و بدون NaCl، باندی تشکیل نگردید. تیمار این نمونه با آنزیم DNaseI نیز باندی در حدود ۷۰۰۰bp تشکیل داد. در مسیر نمونه خالص سازی شده از بافت گیاه سالم (نوسلار) با این روش، باندی مشاهده نشد. در آمودهٔ اسید نوکلئیک کل نیز باندی به طور مشخص تشکیل نشد و تنها حالت نشت (smear) رویت گردید (شکل۴). با توجه به نتایج به دست آمده، باندهای حاصل از نمونه‌های خالص سازی شده از برگ درختان آلوده به دو ویروئید مورد بررسی، ماهیت RNA دو رشته‌ای داشته که از خصوصیات اصلی ویروئیدها به شمار می‌آید. در واقع هر رشته ویروئیدی در دو انتها به هم متصل شده و فرم دایره بسته پیدا می‌کند که پس از آن در مکان‌هایی که بازهای مکمل روبروی هم قرار می‌گیرند به همدیگر متصل شده و ساختاری شبه دورشته‌ای می‌یابد (Rezaian *et al*., 1990; Beaudry and Perreault, 1995).



شکل ۳- نمونه های اسید نوکلئیک استخراج شده از برگ مرکبات توسط ستون CF-11؛ **a:** بافر بارگذاری، b,c,d,e: نمونه جدایه های IR.n1 تا IRn4 ویروس تریستزای مرکبات (CTV) از گلخانه مرکز تحقیقات مازندران، f,g: نمونه نهال سالم نوسلارپرتقال، h: نمونه درخت آلوده به CTV از ساری، L: نشانگر نردبانی Lambda DNA/EcoR I DNA(Bioneer, Korea).

Fig. 3. Nucleic acid samples extracted from citrus leaves by CF-11column; **a:** Loading buffer, **b,c,d,e:** IR.n1 to IR.n4 *Citrus tristeza virus* (CTV) isolates from research center screen house, **f,g:** Healthy nucelar orange seedling samples, **h:** Sample of CTV infected tree from Sari, **L:** Lambda DNA/EcoR I DNA marker (Bioneer, Korea).



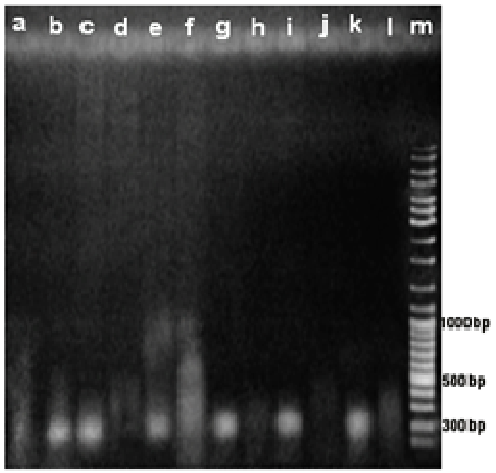
شکل ۴- الکتروفورز روی ژل آگارز پس از تیمار آنزیمی نمونه‌های NA خالص شده توسط ستونCF-11؛ **a:** اسید نوکلئیک کل نهال سالم قبل از خالص سازی از طریق ستون CF-11، **b,d:** اسید نوکلئیک خالص شده درختان آلوده به کاچکسیا و تیمار شده با DNaseI، **c:** اسید نوکلئیک خالص شده درخت آلوده به اگزوکورتیس و تیمار شده با DNaseI، **e,g:** اسید نوکلئیک خالص شده درختان آلوده به کاچکسیا و تیمار شده با RNaseA، **f:** اسید نوکلئیک خالص شده درخت آلوده به اگزوکورتیس و تیمار شده با RNaseA، **h:** اسید نوکلئیک خالص شده درخت آلوده به کاچکسیا و تیمار شده با RNaseA+NaCl، **i:** اسید نوکلئیک خالص شده نهال سالم و تیمار شده با RNaseA+NaCl، **j:** اسید نوکلئیک خالص شده درخت آلوده به اگزوکورتیس و تیمار شده با RNaseA+NaCl، **L:** نشانگر نردبانی SM0331 (Fermentas, Life Sciences, Germany).

Fig. 4. Agarose gel electrophoresis of purified NA samples by CF-11 columnafter enzyme treatment; **a:** Total NA of healthy seedling before extraction by CF-11, **b** & **d:** DNaseI treatment of purified NAs from cachexia infected trees, **c**: DNaseI treatment of purified NA from Exocortis infected tree, **e** & **g:** RNaseA treatment of purified NAs from cachexia infected trees, **f:** RNaseA treatment of purified NA from Exocortis infected tree, **h:** RNaseA+NaCl treatment of purified NA from cachexia infected tree, **i:** RNaseA+NaCl treatment of purified NA from healthy seedling, **j:** RNaseA+NaCl treatment of purified NA from Exocortis infected tree, **L:** GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix#M0331 (Fermentas, Life Sciences, Germany).

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز با نسخه‌برداری معکوس

RT-PCR: در الکتروفورز محصولات RT-PCR با استفاده از آموده اسید نوکلئیک خالص شده توسط CF11، باندی در حدود ۴۰۰-۳۰۰ نوکلئوتید تکثیر گردید. نمونه‌های آلوده به

اگزوکورتیس با آغازگر اختصاصی کاچکسیا و نمونه های آلوده به کاچکسیا با آغازگر اختصاصی اگزوکورتیس تکثیر نشده و باندی ایجاد نکرد. اسید نوکلئیک خالص شده از نمونه سالم نیز با آغازگرهای اگزوکورتیس و کاچکسیا تکثیر نگردید (شکل ۵).



شکل ۵- الکتروفورز محصولات RT-PCR نمونه‌های NA خالص شده با ستون CF-11 (پس از تکثیر با آغازگرهای اختصاصی اگزوکورتیس وکاچکسیا) روی ژل آگارز؛ a: اسید نوکلئیک خالص شده نمونه سالم با آغازگر اختصاصی کاچکسیا، b, c, e: اسید نوکلئیک خالص شده نمونه‌های آلوده به اگزوکورتیس با آغازگر اختصاصی اگزوکورتیس، d: اسید نوکلئیک خالص شده نمونه سالم با آغازگر اختصاصی اگزوکورتیس، g, i,k: اسید نوکلئیک خالص شده نمونه‌های آلوده به کاچکسیا با آغازگر اختصاصی کاچکسیا، f, h: اسید نوکلئیک خالص شده نمونه‌های آلوده به کاچکسیا با آغازگر اختصاصی اگزوکورتیس، j, l: اسید نوکلئیک خالص شده نمونه-های آلوده به اگزوکورتیس با آغازگر اختصاصی کاچکسیا، m: نشانگر نردبانی(Fermentas, Life Sciences, Germany)SM0331.

Fig. 5. RT-PCR products electrophoresis of purified NA samples with CF-11column (after amplification with Exocortis and Cachexia primers) on agarose gel; a: Purified NA of healthy samplewith specific primer of CCaVd; b, c, e: Purified NAs of Exocortis infected samples with specific primer of CEVd; d: Purified NA of healthy sample with specific primer of CEVd; g, i, k: Purified NAs of cachexia infected samples with specific primer of CCaVd; f & h: Purified NAs of cachexia infected samples with specific primer of CEVd; j & l: Purified NAs of Exocortis infected samples with specific primer of CCaVd; m: GeneRuler^{TM} DNA Ladder Mix$_{\#}$ SM0331 (Fermentas, Life Sciences, Germany).

نتایج حاصل از بررسی ۸۰۰ نمونه ارقام مختلف مرکبات توسط روش CF-11 با نتایج آزمون RT-PCR همخوانی داشت. از تعداد ۵۰۰ نهال از ارقام پرتقال، تعداد ۳۵ نهال به اگزوکورتیس و ۲۶ نهال به کاچکسیا و از ۳۰۰ نهال از ارقام نارنگی تعداد ۱۱ نهال به کاچکسیا آلوده بود و آلودگی توأمان مشاهده نگردید. با توجه به تایید ماهیت شبه دو رشته‌ای اسید نوکلئیک استخراج شده توسط ستون سلولزی CF-11 مربوط به نمونه‌های آلوده به هر یک از دو ویروئید اگزوکورتیس و کاچکسیا و تکثیر آن با آغازگر اختصاصی خود و تشکیل باندهایی با جرم مولکولی مورد انتظار (bp ۴۰۰-۳۰۰) و عدم تکثیر هر یک از آنها با آغازگر غیر مرتبط، مشخص گردید که اسید نوکلئیک استخراجی با داشتن ماهیت دورشته‌ای و RNA، مربوط به هر یک از دو ویروئید کاچکسیا و اگزوکورتیس است. از سوی دیگر نمونه سالمی که با همین روش خالص سازی شد، با هیچ یک از دو آغازگر اختصاصی تکثیر نگردید. لذا می‌توان نتیجه گرفت که روش خالص سازی با ستون CF-11 به طور اختصاصی قادر به جداسازی رشته‌های ویروئیدی در درختان مبتلا به دو بیماری مهم ویروئیدی مرکبات، یعنی اگزوکورتیس و کاچکسیا است. تعداد نوکلئوتیدها در ویروئیدهای گروه اگزوکورتیس از ۳۶۸ تا ۴۶۳ و در گروه CVd II که ویروئید کاچکسیا در آن قرار گرفته، معادل ۳۰۰ تا ۳۰۲ نوکلئوتید برآورد گردیده است (Flores *et al.*, 2005) و اختلاف آنها بین ۵۰ تا ۱۰۰ باز می‌باشد، لذا در صورتی که نیاز به تفکیک دو ویروئید از روی اندازه و میزان حرکت باند باشد، افزایش غلظت و طول ژل آگارز و همچنین پلی اکریلامید با غلظت‌های بالای شش درصد پیشنهاد گردیده است (Wagner and Sun, 1998; Tietz, 1998).

از مواردی که این روش قادر به تفکیک نمی‌باشد، نوع نژاد هر یک از این دو ویروئید است اما از آنجا که در پروژه‌های سالم سازی نهال، هر گونه حضور عوامل ویروسی یا ویروئیدی، ناسالم بودن تلقی می‌گردد، بنابراین از این روش در غربال کردن عمومی نژادهای مختلف این دو ویروئید می‌توان استفاده نمود و برای مطالعات دقیق تحقیقاتی که

شناسایی نوع ویروئید و اختلافات درون گونه‌ای مد نظر می‌باشد، قطعاً نیاز به بررسی‌های تکمیلی می‌باشد. در مورد فاژهای dsRNA جنس *Cystovirus* نیز سه قطعه ۲/۹، ۴ و ۶/۴ کیلوجفت باز (Semancik *et al.*, 1973) داشته که اختلاف قابل توجهی با اندازه ویروئیدهای مرکبات دارد. با توجه به نتایج به دست آمده در این بررسی، روش شناسایی ویروئیدها از طریق استخراج با ستون CF-11 می‌تواند به عنوان یک روش دقیق، کاربردی و مناسب برای شناسایی ویروئیدهای مرکبات در ایران مورد استفاده قرار گیرد. البته ذکر این نکته ضروری است که همچنان کاربرد گیاهان محک به عنوان روشی مکمل در کنار روش‌های تشخیص مولکولی جدید برای ویروس‌ها و ویروئیدهای مرکبات جایگاه ویژه‌ای داشته (Almayda-Leon *et al.*, 2007) و در پروتکل های ارائه شده برای جابجایی بین المللی بذر و نهال مرکبات در این خصوص تأکید گردیده است (Frison and Taher, 1991).

References

AlAVI, S. V., P. TEIMOURI and H. R. ZAMANIZADE, 2010. First report of the new causal agent of concave gum disease on Thomson navel orange in northern Iran. 13th Congress of Mediterranian Phytopathological Union. p. 243-244.

AlAVI, V., B. KHATABI and G. HOSSEINI SALEKDEH, 2005. Comparison of biologically distinct isolates of *Citrus tristeza virus* from Iran using major coat protein sequences. Australasian Plant Pathology, No. 34: 577-582.

ALMAYDA-LEON, I. H., M. A. ROCH-PENA, M. M. IRACHETACARDENAS, F. ORONA-STERO and C. J. KHALKE, 2007. A simple method for the multiple detection of citrus viroids. Agrociencia, No. 41: 87-93.

ALVARADO-GOMEZ, O. G., M. A. ROCH-PENA, S. SILVA-VARA, J. P. MARTINEZ-SORIANO, R. F. LEE, R. RIVERA-BUSTAMANTE and P. RUIZ-BELTRAN, 2000. Citrus exocortis and citrus cachexia viroids in commercial groves of Tahiti lime in Mexico. 15th Conf. IOCV: 289-293.

BEAUDRRY, D. and J. P. PERREAULT, 1995. An efficient strategy for the synthesis of circular RNA molecules. Nucleic Acids Research, No. 23: 3064-3066.

BEN–SHAUL, A., Y. GUANG, N. MOGILNER, R. HADAS, M. MAWASSI, R. GAFNY and M. BAR-JOSEPH, 1995. Genomic diversity among populations of two citrus viroids from different graft-transmissible dwarfing complexes in Israel. Phytopathology, No. 85: 359–64.

BITTER, W. P., N. DURAN-VILA and J. S. SEMANCIK, 1987. Effect of citrus exocortis viroid on flower and fruit structure and development citron. Plant Disease. No. 71: 397-399.

DE LATORRE, S. M. E., C. LOPEZ, O. GRAU and M. L. GARCIA, 2002. RNA2 of *Citrus psorosis virus* is of negative polarity and has a single open reading frame in its complementary strand, Journal.of General Virology, No. 83: 1777-1781.

DODDS, J. A. and M. BAR-JOSEPH, 1983. Double Stranded RNA from plants infected with closteroviruses. Phytopathology, No. 73: 419-423.

FALAKI, F., S. V. ALAVI and F. RAKHSHANDEHROO, 2013. Citrus psorosis virus, causal agent of ring pattern disorder in Thomson Navel trees in east of Mazandaran. Iranian Journal of Applied Entomology and Phytopathology, No. 80(2): 161-172. (In Persian with English summary).

FLORES, R., C. HERNANDES, A. MARTINEZDE-ALBA, A. DAROS and F. DISERIO, 2005. Viroid and viroid-host interaction. Annual Review.of Phytopathology, No. 43: 117-139.

FRANCIS, M. I., J. A. SZYCHOWSKI and J. S. SEMANSIK, 1995. Structural sites specific to citrus viroid groups. Journal of General.Virology, No. 76: 1081-1089.

FRISON, E. A. and M. M. TAHER, 1991. FAO/IBPGR technical guidelines for the safe movement of citrus germplasm. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rom, Italy. 50pp.

GARNSEY, S. M., D. L. ZIES, M. IREY, P. J. SIEBURTH,

J. S. SEMANCIK, L. LEVY and M. E. HILF, 2002. Practical field detection of citrus viroids in Florida by RT-PCR. 15th Conference, IOCV: 219–229.

HULL, R. 2002. "Mathews Plant Virology" (4th edition). Academic Press, SanDiego. 1001pp.

KEES, P. and R. H. SYMONS, 1985. Domain in Viroids: Evidence intermolecular RNA re arrangements and their contribution to viroid evolution. Proceeding of the.Nathional.Academic.Scinces of the United State. No. 82: 4582-4586.

LEVY, L. and A. HADIDI, 1993. Direct nucleotide sequencing of PCR amplified DNAs of the closely related viroids IIa and IIb (cachexia). 12 th Conference, IOCV: 180-186.

MORRIS, T. J. and J. A. DODDS, 1979. Isolation and analysis of double stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue .Phytopathology, No. 69: 854-858.

REZAIAN, M. A. 1999. Synthesis of infectious viroids and other circular RNAs. Molecular.Biology, No. 1: 13-20

REZAIAN, M. A., L. R. KRAK and Q. CUNYING, 1990. Detection of virus-associated dsRNA from leaf-roll infected Grapevines. Journal of Virology Methods, No. 31: 325-334.

RIVERA-BUSTAMANTE, R. F., R. GIN and J. S. SEMANCIK, 1986. Enhanced resolution of circular and linear forms of viroid and viroid like RNA by electrophoresis in a discontinuous pH system. Analytical Biochemistry, No. 156: 91-95.

ROISTACHER. C. N. 1991. Graft - Transmissible Diseases of Citrus . FAO: Rom .286pp.

SEMANCIK, J. S. and C. N. ROISTACHER, 1988. A new viroid is the causal agent of the citrus Cachexia disease. Virology, No. 10: 125-135.

SEMANCIK, J. S., A. K. VDAVER and J. L. VANETTEN, 1973. Characterization of segmented double-helical RNA from bacteriophage phi6. Journal Molecular Biology, No. 78: 617–625.

TIETZ, D. 1998. Nucleic Acid Electrophoresis. Springer, Berlin, Germany. 328 pp.

WAGNER, R. W. and L. SUN, 1998. Double- stranded RNA poses puzzle. Nature. No. 19: 391(6669): 744-745.

YANG, X. A., A. HADIDI and S. M. GARNSEY, 1992. Enzymatic amplification of citrus exocortis and cachexia from infected citrus hosts. Phytopathology, No. 82: 279-285.