بسم الله الرحمن الرحیم

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
معاونت ترویج

نحوه جمع آوری نمونه‌های گیاهی آلوده به بیماری گرینینگ و تشخیص آزمایشگاهی آنها

سرشناسه	: علیزاده علی‌آبادی، علی، ۱۳۴۰ -
عنوان و نام پدیدآور	: نحوه جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی آلوده به بیماری گرینینگ و تشخیص آزمایشگاهی آنها/ نویسنده علی علیزاده‌علی‌آبادی؛ ویراستاران ترویجی علیمراد سرافرازی، مصطفی احمدی؛ تهیه شده در موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، دفتر شبکه دانش و رسانه‌های ترویجی.
مشخصات نشر	: کرج: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، معاونت ترویج، نشر آموزش کشاورزی، ۱۳۹۶.
مشخصات ظاهری	: ۲۴ ص.: مصور (رنگی).
شابک	: رایگان۷-۳۵۵-۵۲۰-۹۶۴-۹۷۸
وضعیت فهرست نویسی	: فیپا
یادداشت	: کتابنامه.
موضوع	: مرکبات -- بیماری‌ها و آفت‌ها
موضوع	: Citrus -- Diseases and pests
موضوع	: بیماری گرینینگ
موضوع	: Greening disease
شناسه افزوده	: سرافرازی، علی‌مراد، ۱۳۴۲ -، ویراستار
شناسه افزوده	: Sarafrazi, Alimorad
شناسه افزوده	: احمدی، مصطفی، ۱۳۵۱ -، ویراستار
شناسه افزوده	: موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور. دفتر شبکه دانش و رسانه‌های ترویجی
شناسه افزوده	: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی. معاونت ترویج. نشر آموزش کشاورزی
رده بندی کنگره	: ۱۳۹۶ ۸۵ع۴م /SB۶۰۸
رده بندی دیویی	: ۶۳۴/۳۰۴۹
شماره کتابشناسی ملی	: ۴۹۳۰۶۶۹

نشر آموزش کشاورزی

شابک : ۷-۳۵۵-۵۲۰-۹۶۴-۹۷۸
ISBN : 978-964-520-355-7

عنوان : **نحوه جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی آلوده به بیماری گرینینگ و تشخیص آزمایشگاهی آنها**

نویسنده : علی علیزاده علی آبادی

ویراستاران ترویجی : علیمراد سرافرازی، مصطفی احمدی

ویراستار ادبی : گیتی زمانی زاده

مدیر داخلی : شیوا پارسانیک

تهیه شده در : مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور – دفتر شبکه دانش و رسانه‌های ترویجی

ناشر : نشرآموزش کشاورزی

شمارگان : ۲۵۰۰ جلد

نوبت چاپ : اول / ۱۳۹۶

قیمت : رایگان

مسئولیت صحت مطالب با نویسنده است.

شماره ثبت در مرکز فناوری اطلاعات و اطلاع رسانی کشاورزی ۵۰۹۳۲ به تاریخ ۹۵/۱۰/۲۱ است.

نشانی: تهران، بزرگراه شهید چمران، خیابان یمن، پلاک ۱ و ۲، معاونت ترویج،

صندوق پستی: ۱۱۱۳-۱۹۳۹۵، تلفکس: ۲۲۴۱۳۹۲۳-۰۲۱

مخاطبان:

کارشناسان و مروجان مسئول پهنه

اهداف:

نحوه جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی آلوده
به بیماری گرینینگ و تشخیص آزمایشگاهی آنها

فهرست

عنوان **صفحه**

مقدمه **۵**

جمع آوری نمونه‌های گیاهی آلوده به بیماری گرینینگ **۶**

مراحل کار در آزمایشگاه ۱۱

مراحل کار در آزمایشگاه **۱۲**

انجام پی سی آر ۱۲

استخراج DNA ۱۲

بررسی کمی و کیفی DNA استخراج‌شده ۱۶

واکنش PCR ۱۶

آغازگر های مورد استفاده ۱۷

الکتروفورز محصول PCR در ژل و عکس‌برداری از ژل ۱۸

تشخیص بیماری میوه سبز مرکبات با رنگ‌آمیزی نشاسته موجود در بافت پهنک برگ **۲۰**

فهرست منابع **۲۳**

مقدمه

مدیریت جامع بیماری میوه سبز مرکبات (گرینینگ) در کشورهایی که این بیماری شیوع دارد، استفاده از راه‌بردهای مدیریت تلفیقی نظیر: کاهش منابع آلودگی اولیه با حذف درختان و یا شاخه‌های آلوده، کنترل ناقلین با استفاده از روش‌های مختلف و نگه‌داری جمعیت پسیل در پائین‌ترین سطح ممکن و تهیه‌ی نهال سالم از نهالستان‌های عاری‌از آلودگی، به‌منظور پیش‌گیری از گسترش آلودگی به‌درختان مناطق غیرآلوده با موفقیت همراه بوده است.

بدیهی است بدون رعایت این موارد، بیماری میوه سبز مرکبات در یک منطقه‌ی آلوده به‌سرعت گسترش خواهد یافت. کاهش منابع آلودگی اولیه با حذف درختان و یا شاخه‌های آلوده، تنها زمانی میسر است که با ردیابی، تشخیص و شناسایی دقیق عامل بیماری در مناطق مرکبات کاری، ابتدا کانون‌های اولیه‌ی آلودگی مورد شناسایی قرار گیرند. این امر نخستین اقدام مهم و اساسی در هر بسته‌ی مدیریتی است.

در مجموعه‌ی حاضر، چگونگی جمع‌آوری نمونه آلوده به بیماری میوه سبز مرکبات (گرینینگ) در باغ‌ها و نهالستان‌های مرکبات کشور و نحوه‌ی تشخیص و شناسایی آزمایشگاهی آن‌ها، برای کارشناسان حفظ نباتات اعم از شاغلین بخش‌های دولتی و یا کلینیک‌های گیاه‌پزشکی، به‌تفصیل ارائه شده است. به‌طوری‌که خواننده با نحوه‌ی نمونه‌برداری، تشخیص و شناسایی آزمایشگاهی عامل بیماری آشنا خواهد شد.

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی آلوده به بیماری گرینینگ

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی درمورد بیماری گرینینگ به‌منظور انجام بررسی‌های آزمایشگاهی و تشخیص یا حصول اطمینان بیشتر از آلوده بودن یا نبودن درختان مورد بررسی است.

نمونه‌های جمع‌آوری شده می‌توانند برگ، شاخه و میوه باشند. از آن‌جاکه عامل بیماری در آوندهای آبکش زندگی می‌کند، لذا رگبرگ‌ها، دم‌برگ‌ها، دم‌گل‌ها و دم‌میوه‌ها همواره از غلظت بالاتر باکتری عامل بیماری برخوردار هستند. آنالیز کمی باکتری HLB نشان می‌دهد که غلظت این باکتری در بافت‌های مختلف گیاه بیمار متغیر است. این تفاوت غلظت باکتری در بافت‌های مختلف تا ۱۰۰۰۰ برابر است. لذا برای ردیابی و تشخیص باکتری و تعیین گیاهان آلوده، انتخاب بافت مناسب که حاوی بالاترین غلظت باکتری باشند، مانند رگبرگ‌ها، دم‌برگ‌ها، دم‌گل‌ها و دم‌میوه‌ها ضروری است. توصیه می‌شود درهنگام نمونه‌برداری علاوه‌بر نمونه‌های معمولی و احیانا بدون علائم حتما نمونه‌های با علائم مشکوک نیز جمع‌آوری شوند. زیرا گزارش‌هایی وجود دارد که نشان می‌دهد از نمونه‌های برگی شاخه‌های بدون علائم هیچ‌گونه باکتری تشخیص داده نشده است. درصورتی‌که برگ‌های دارای علائم ابلقی از شاخه‌های آلوده در همان درخت، حاوی میزان $۱۰^{۷}$ سلول در یک‌گرم بافت گیاهی بودند. این نشان‌دهنده‌ی انتشار نامنظم باکتری در گیاهان بیمار است. در زیر موارد مهمی که باید در هنگام نمونه‌برداری مدنظر قرار گیرد آمده است:

الف- برگ: نمونه‌های برگی باید از رشد کافی برخوردار باشند، به‌طوری‌که برگ از لحاظ اندازه به‌حد طبیعی یک برگ بالغ رسیده باشد. بهتر است دم‌برگ نیز همواره در نمونه‌های برگی به آن وصل باشد (شکل ۱).

شکل ۱: نمونه‌های برگ به‌همراه یا بدون دم‌برگ مناسب نمونه‌برداری

ب- شاخه: منظور شاخه‌های جوان یک‌ساله‌ای است که هنوز کاملاً سبزتیره‌اند، این شاخه‌ها باید از رشد کافی برخوردار و مقطع عرضی آنها از حالت مثلثی خارج و به شکل دایره درآمده باشند. گاهی توصیه شده است که شاخه و برگ‌های آلوده و دارای علایم که به‌هم چسبیده‌اند با هم نمونه‌برداری شوند، که در این صورت طول شاخه‌ها حدود ده سانتی‌متر و تعداد برگ‌های متصل به آن حدوداً ۶ تا ۸ برگ توصیه شده است (شکل ۲).

شکل ۲: نمونه‌های برگ به همراه شاخه مناسب نمونه‌برداری

تعداد نمونه‌های برگی حدود ۱۲ الی ۲۰ عدد باشد که توصیه می‌شود در درختان بدون علایم از چهار طرف درخت و قسمت‌های پایین و بالای تاج درخت و در درختان دارای علایم، عمدتا از قسمت‌های دارای علایم برداشته شوند. در صورت نمونه‌برداری از شاخه‌های آلوده ۶ الی ۸ شاخهٔ دارای حداقل ۵ برگ نمونه‌برداری شود (شکل ۳).

نمونه‌های برگی، شاخه و یا شاخه به همراه برگ را به‌صورت جداگانه در داخل پاکت‌های نایلونی که درب آنها بسته می‌شود، قرارداده و پس‌از خارج‌کردن هوای داخل آن درب آن بسته شود. اطلاعات مربوطه روی پاکت درج شود یا به‌همراه آن ارسال شود.

شکل۳: نمونه های برگ به همراه شاخه ی یک یا دو ساله مناسب نمونه برداری

ج- میوه: توصیه شده است میوه از شاخ‌های آلوده برداشته شود و حتی‌الامکان دارای علایم مربوطه باشد. دم‌میوه ترجیحاً همراه نمونه میوه جمع‌آوری شود، زیرا درصورت آلودگی دارای تراکم بالایی از عامل بیماری است (شکل ۴).

شکل ۴: نمونه های میوه آلوده به بیماری گرینینگ به همراه دم میوه متصل به آن

۱- نمونه‌برداری از میوه مشکوک به‌تنهایی صورت نگیرد، بلکه باید به همراه یک نمونهٔ جداگانه از برگ‌های آلوده مربوط به همان درخت که میوه از آن برداشت شده است باشد (شکل ۵).

شکل ۵: نمونه های میوه به همراه دم‌میوه و شاخه و برگ متصل به آن

اکیداً توصیه می‌شود نمونه‌ها به‌هیچ‌وجه درمعرض نور آفتاب قرار نگرفته و در شرایط خنک (مثلاً روی یخ داخل یخدان) نگه‌داری و از یخ‌زدن نمونه‌ها جلوگیری شود. نمونه‌ها در اسرع‌وقت به آزمایشگاه و یا شرکت حمل‌ونقل منتقل شوند تا شبانه به آدرس آزمایشگاه موردنظر فرستاده شوند. درخصوص نحوه‌ی ثبت اطلاعات مربوط به نمونه‌ها توجه به‌موارد زیر ضروری است:

نام و مشخصات جمع‌آوری‌کننده

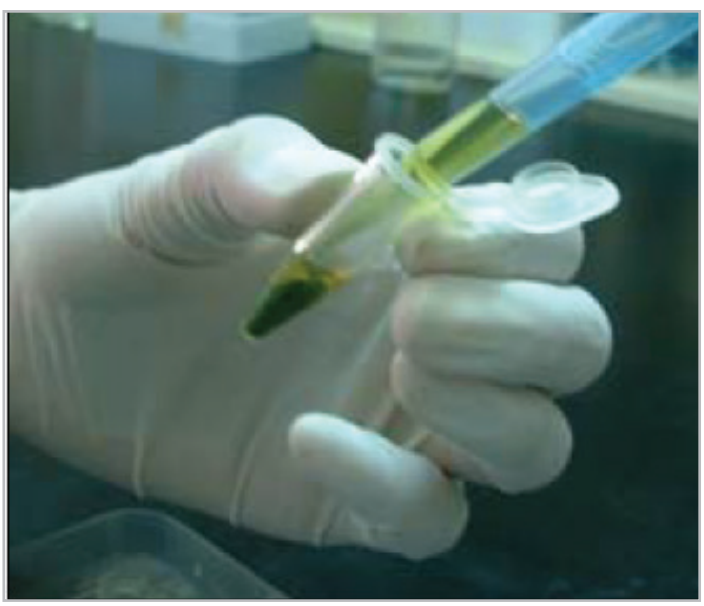
- تاریخ جمع‌آوری
- شماره‌ی نمونه
- اندام نمونه‌برداری شده
- گونه و رقم گیاه نمونه‌برداری شده
- تعداد درختان آلوده در باغ
- حضور ناقل
- نوع ملک (مسکونی، نهالستان، باغ تجاری، معیشتی و یا رها شده)
- مختصات جغرافیایی محل نمونه
- وسعت باغ، ترکیب و سن درختان باغ
- آدرس کامل محل جمع‌آوری
- نام و مشخصات باغ‌دار
- شرایط عمومی و یا هر گونه اطلاعات مربوطه دیگر

در نمونه‌برداری از نهالستان‌ها، توجه شود که ابتدا باید از حداقل ۱۰ درصد نهال‌های موجود نمونه‌بردای شود. البته درصورت مشاهده یک نهال آلوده در یک نهالستان، لازم است نمونه‌برداری از تک‌تک نهال‌ها صورت گیرد، تا از سلامت یا بیماری تک‌تک نهال‌ها اطمینان کامل حاصل شود. در نمونه‌برداری اولیه یعنی زمانی که از وضعیت بیماری در نهالستان هیچ اطلاعی موجود نیست می‌توان از ۱۰درصد نهال‌ها و از هر نهال یک برگ نمونه‌برداری کرد و تمامی برگ‌ها را با هم مخلوط و به‌عنوان یک نمونه تلقی کرد. درصورت وجود آلودگی در این نمونه باید نهال‌های موجود در نهالستان و به دسته‌جات مثلاً ۲۰ تایی تقسیم کرد و نمونه های از هر بیست نهال را به‌عنوان یک نمونه مخلوط کرد.

پس‌از آزمایش این نمونه‌های مرکب، در مرحلهٔ بعدی فقط باید از نهال‌هایی نمونه‌برداری کرد که مربوط به نمونه‌های ۲۰ تایی آلوده هستند، در این مرحله از تمامی بیست نهال مربوطه نمونه‌برداری جداگانه خواهد شد تا سلامت یا آلودگی تک‌تک آنها بررسی و نهال‌های آلوده مشخص شوند. بدیهی است ارتباط هر دسته ۲۰تایی از نمونه‌ها با ۲۰ نهال موجود در نهالستان باید به‌نحوی دقیق مشخص و علامت‌گذاری شوند.

در جدول زیر این روند با تغییراتی در اعداد در یک نهالستان با ۴۰ نهال نشان داده شده است:

مراحل کار در آزمایشگاه



مراحل کار در آزمایشگاه

۱- اختصاص یک شماره ویژه مربوط به آزمایشگاه برای هرنمونه
۲- ثبت و یادداشت شماره نمونه، تاریخ دریافت نمونه و شرایط ظاهری آن
۳- انتقال اطلاعات مربوط به نمونه به پایگاه اطلاعاتی و کامپیوتری آزمایشگاه
۴- بسته‌بندی و نگه‌داری نمونه‌ها در محل امن (به دلیل موارد قرنطینه‌ای و بهداشتی)
۵- انتخاب و جداسازی چهار شاخه و از هر شاخه ۳ برگ (برگ سوم، چهارم و پنجم از نوک شاخه)
۶- قطعه‌قطعه کردن رگ‌برگ اصلی و بخش‌هایی از رگ‌برگ‌های فرعی و دم‌برگ و استفاده از آن به‌عنوان یک نمونه مورد آزمون (به‌دلیل این‌که رگبرگ‌ها و دم‌برگ دارای میزان بالایی از باکتری عامل بیماری هستند).

انجام پی سی آر

استخراج **DNA** : استخراج دی ان ای کل نمونه‌های آلوده به روش هانگ و همکاران (Hung et al., ۲۰۰۰) (شکل ۶):

مواد لازم برای استخراج DNA به‌شرح زیر می‌باشد :

۱. بافر استخراج (DNA-Extraction Buffer, pH=۸)

Tris-HCl	۱۰۰ mM
EDTA	۱۰۰ mM
NaCl	۲۵۰mM
Proteins K	۱۰۰µg/ml (می‌تواند حذف شود)

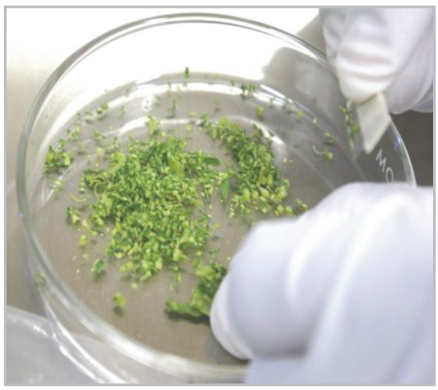
۲. محلول CTAB ٪۵

پنج گرم CTAB در NaCl ۰/۷ مولار حل و حجم نهایی به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شود.

۳. محلول N-Lauroylsarcosine ٪۱۰
۴. NaCl ۵ مولار
۵. کلروفرم / ایزوآمیل الکل به نسبت ۲۴:۱
۶. ایزوپروپانول
۷. اتانول ٪۷۰
۸. بافر TE

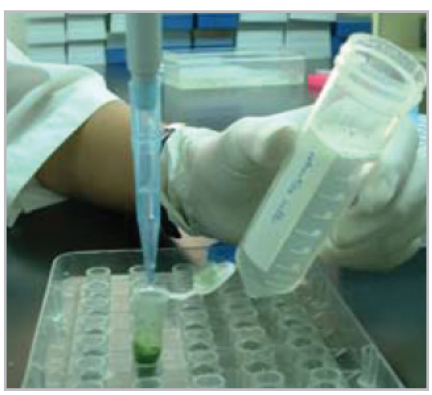
Tris-HCl (pH=۸)	۱۰mM
EDTA (pH=۸)	۱mM

۱. رگبرگ‌های آماده‌ی خرد شدن



۲. رگبرگ‌های خردشده

۳. مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت گیاهی در نیتروژن مایع به‌وسیله هاون به‌صورت پودر درآید.



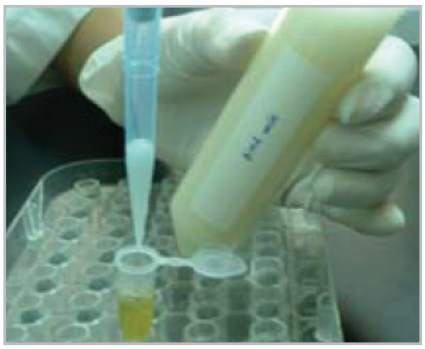
۴. نمونه‌های پودر شده درون تیوب‌ها با ۹۰۰ میکرولیتر بافر استخراج

۵. صد میکرولیتر سارکوزین ۱۰٪ به آن افزوده و در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به‌مدت یک ساعت قرار گیرند.

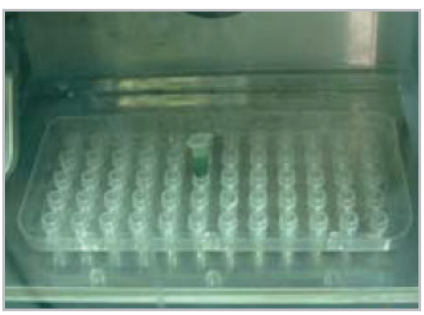
۶. سوسپانسیون حاصله در g ۴۰۰۰ به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شود.

شکل ۶– مراحل استخراج DNA از برگ آلوده به گرینینگ

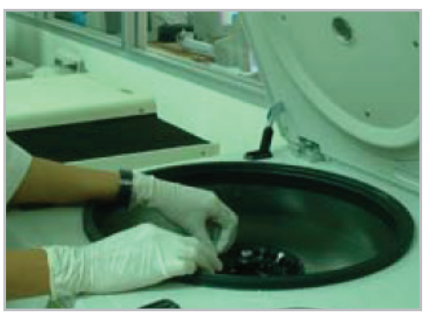
۷. حدود ۸۰۰ میکرولیتر از فاز رویی حاصله به تیوب جدید انتقال یابد.



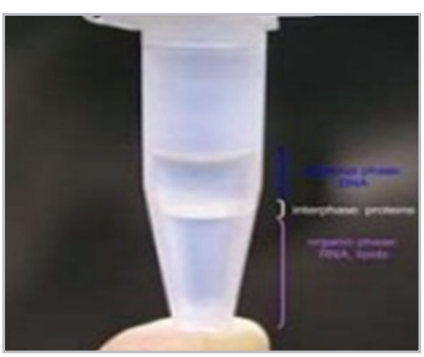
۸. صد میکرولیتر محلول NaCl ۵ مولار و ۲۰۰ میکرولیتر محلول CTAB ۵٪ به تیوب اضافه شود.



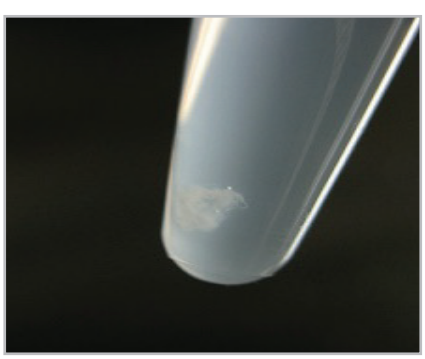
۹. تیوب در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شوند. (توجه: محلول CTAB ۵٪ قبل از افزوده شدن به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شود).



۱۰. محلول کلروفرم / ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) به میزان هم حجم به لوله‌ها اضافه و به آرامی مخلوط و لوله ها در g ۱۰۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شوند.

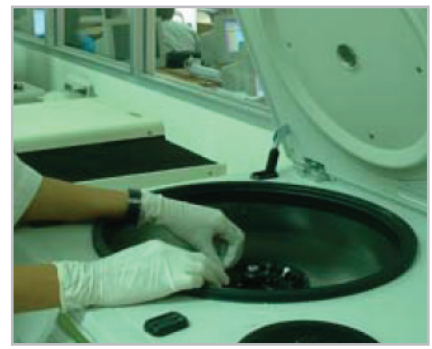


۱۱. فاز رویی حاصله به تیوب جدید انتقال و سپس مرحله ۹ تکرار شود.

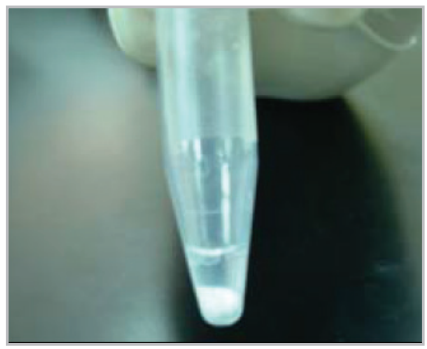


۱۲. فاز رویی حاصله به تیوب جدید انتقال و به آن به میزان هم حجم ایزوپروپانول افزوده و تیوب ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس به مدت ۱۵ تا ۶۰ دقیقه، قرار داده شوند.

ادامه شکل ۶ – مراحل استخراج DNA از برگ آلوده به گرینینگ

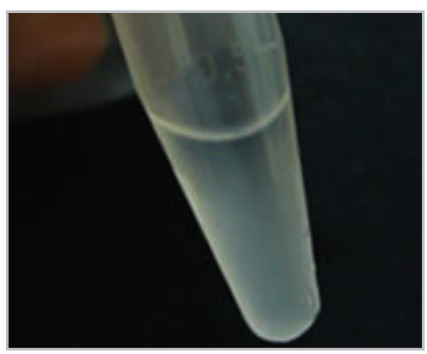


۱۳. لوله‌ها در g ۱۳۰۰۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شوند.



۱۴. فاز رویی دور ریخته شود و رسوب حاصله با اتانل ۷۰٪ شستشو و در g ۱۳۰۰۰ به مدت ۴ دقیقه سانتریفیوژ گردد.

۱۵. فاز رویی دور ریخته شود و تیوب در دمای محیط قرار داده شود، تا زمانی که مایع درون تیوب تبخیر شود.

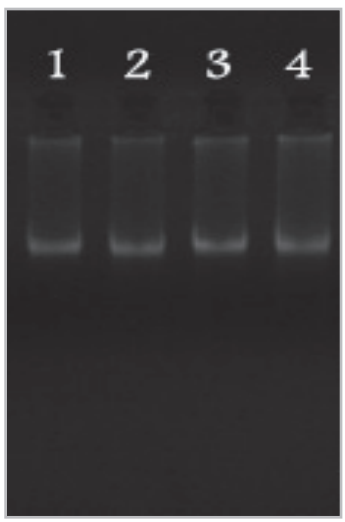


۱۶. میزان ۵۰ تا ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر دو بار تقطیر یا بافر TE به رسوب اضافه و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگه‌داری شود.

ادامه شکل ۶ – مراحل استخراج DNA از برگ آلوده به گرینینگ

بررسی کمی و کیفی DNA استخراج‌شده: برای تعیین خلوص و غلظت اسید نوکلئیک استخراج‌شده از روش‌های زیر استفاده گردد:

۱. الکتروفورز اسیدنوکلئیک در ژل آگاروز ۱٪ و بررسی کلی غلظت DNA کل استخراج شده (شکل ۷).



شکل ۷- الکتروفورز DNA استخراج شده حاصل از روش CTAB

همان‌طور که در شکل ۷ مشخص است در ژل آگاروز ۱٪ چاهک های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب DNA های حاصل از ناحیه رگبرگ و دمبرگ لیموترش آلوده به بیماری گرینینگ مرکبات و چاهک ۴، لیموترش سالم هستند.

برای تعیین مقدار DNA کل (کمی) نیز پس‌از تهیه رقت ۱/۵ از DNA استخراج شده، جذب نوری (Opical Density) آن در طول‌موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شود. مقدار DNA بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر بر اساس فرمول زیر تعیین گردد:

عکس رقت x ۵۰ x OD قرائت شده = غلظت DNA (برحسب میکروگرم در میلی‌لیتر)

اگر نسبت جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ برابر ۱/۸ باشد نشان دهنده خلوص بالای DNA بوده ولی اگر کمتر از ۱/۸ باشد نشان دهنده خلوص پایین است.

واکنش PCR: بااستفاده‌از DNA به‌دست آمده در مراحل قبل، واکنش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شود. بهترین شرایط برای انجام واکنش PCR، غلظت‌های مواد واکنش‌دهنده ازقبیل آغازگر، $MgCl_2$، DNA و همچنین شرایط دمایی و زمانی به شرح جدول زیر می‌باشد:

جدول ۲- غلظت مواد مورد استفاده جهت انجام واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای OI۲c/OI۱ و J۵/A۲

ترکیبات		حجم (µl)	غلظت نهایی
آب مقطر		۱۷/۴	
۱۰X PCR Buffer (۲۵۰ mM Tris-HCl, pH ۸/۳; ۲۵۰ mM KCl, ۲۰ mM $MgCl_۲$, ۵۰ mM DTT)		۲/۵	۱ X
$MgCl_۲$ (۲۵ mM)		۱/۴	۱ mM
dNTPs (۱۰ mM)		۰/۵	۰/۲ mM
Forward Primer (۱۰ pmol/µ)		۰/۵	۰/۲ µM
Reverse Primer (۱۰ pmol/µl)		۰/۵	۰/۲ µM
Taq DNA Polymerase (۵ u/µl)		۰/۲	۱ U
DNA		۲	۲۵ ng
حجم نهایی		۲۵	

آغازگر های مورد استفاده:

جدول ۳- آغازگرهای مورد استفاده جهت ردیابی بیماری گرینینگ مرکبات

نام آغازگر	ترادف ۵/ - ۳/	طول (نوکلئوتید)	اندازه محصول (جفت‌باز)	دمای ذوب (C°)
OI۱	GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA	۲۳	۱۱۶۰	۵۹
OI۲c	GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT	۲۲		
A۲	TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT	۲۴	۷۰۳	۵۹
J۵	ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA	۲۵		

جدول۴- شرایط دمایی و زمانی مراحل مختلف واکنش PCR با استفاده از آغازگر های OI۲c/OI۱ و J۵/A۲

مرحله	دما (°C)	زمان	تعداد چرخه ها
واسرشته سازی اولیه	۹۴	۳'	۱
واسرشته سازی	۹۴	۴۵"	۳۵
اتصال آغازگر	۵۹	۴۵"	
تکثیر	۷۲	۴۵"	
تکثیر نهایی	۷۲	۷'	۱

الکتروفورز محصول PCR در ژل و عکس‌برداری از ژل

۱- محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تا زمان الکتروفورز، در دمای C ۲۰- نگه‌داری شود.

۲- محصول PCR را می‌توان با دستگاه الکتروفورز افقی مینی‌ژل (mini gel) روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز کرد.

بافر مورد استفاده در ژل و در محفظه الکتروفورز، بافر TAE است که به‌صورت زیر تهیه شود:

تهیه‌ی بافر (pH=۸ Tris Borate Ethylen diamin tetra acetic acid (TBE)

میزان ۱۰/۸ گرم تریس، ۵/۵ گرم بوریک اسید و ۴ میلی‌لیتر EDTA نیم مولار (pH=۸) در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (این بافر در هنگام استفاده در حد ده‌برابر رقیق شود).

۳- ابتدا ژل آگارز در بافر TAE تهیه گردد.

برای تهیه‌ی ژل آگارز ۱ درصد باید نیم گرم آگارز در ۵۰ میلی‌لیتر بافر TBE ۱x حدود ۲ دقیقه در ماکرو ویو حرارت داده شود تا کاملا ذوب گردد. آنگاه می‌توان ژل موردنظر را روی دستگاه الکتروفورز افقی مینی‌ژل (mini gel) تهیه کرد.

برای این کار ابتدا در ظرف مخصوص ژل، شانه جهت ایجاد چاهک‌ها درجای مناسب قرار گیرد و به ژل پس‌از اندکی خنک‌شدن محلول اتیدیوم‌بروماید با غلظت mg/L ۱ اضافه گردد. (به طوری‌که ۲۰ میکرولیتر از محلول ۲۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اتیدیوم‌بروماید در ۴۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل گردد) و سپس در ظرف ریخته شود. پس‌از حدود ۱۵ دقیقه و حصول اطمینان از بسته شدن ژل، شانه خارج و ظرف حاوی ژل درون تانک قرار گیرد، به‌صورتی‌که چاهک‌ها به سمت الکترود منفی قرار بگیرند. سپس تانک با بافر TBE ۱x به‌نحوی پر شود که سطح ژل کاملا پوشانده شود.

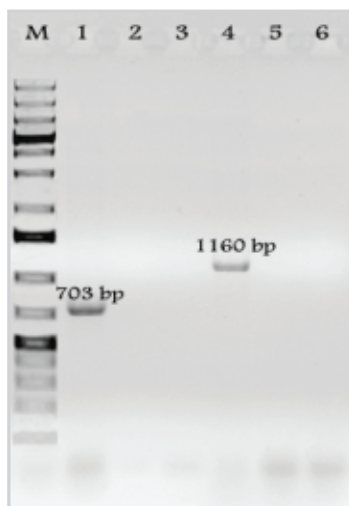
۴- آماده‌سازی محصول پی سی آر: ماده‌ی رنگی Loading dye (حاوی گلیسرول ۶۰ درصد،

EDTA۶۰ میلی‌مولار، بروموفنول بلو ۰/۰۹ درصد و زایلن سیانول FF۰۹/۰ درصد) به نسبت ۱ به ۶ با محصول PCR مخلوط شود. یا می‌توان حدود ۵ میکرولیتر از هر نمونه با ۲ میکرولیتر از ماده‌ی رنگی یاد شده (Loading dye)، که محلولی است از ۳ میلی‌لیتر گلیسرول، ۰/۰۲۵ گرم بروموفنول بلو، ۰/۰۲۵ گرم زایلن سیانول در ۱۰ میلی‌گرم آب، به‌خوبی مخلوط گردد.

۵- هفت میکرولیتر از نمونه‌های آماده شده (محصول PCR) به آرامی درون چاهک‌ها ریخته شود. یکی از چاهک‌ها نیز به مارکر، اختصاص یابد و در آن ۵ میکرولیتر مارکر ریخته شود.

۶- در پایان، تانک به‌مدت حدود ۱/۵ ساعت به منبع برق متصل و ژل با ولتاژ ثابت ۷۵ ولت الکتروفورز گردد.

۷- هرگاه نمونه‌ها به‌حدود ۱ تا ۲ سانتی متری انتهای ژل رسیدند، جریان برق قطع شده در نهایت، ژل در دستگاه document Gel- مورد مشاهده و عکس برداری قرار گیرد (شکل ۸)



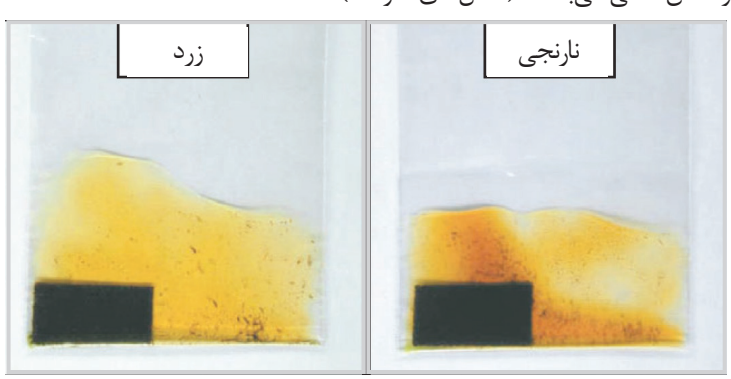
شکل ۸ : الکتروفورز محصول‌های ۱۶S RNA ریبوزومی و اپرون-rplKA JL-rpoBC بیماری گرینینگ مرکبات

چاهک M نشانگر وزن مولکولی ۱Kb+، چاهک های ۱، ۲ و ۳ به‌ترتیب محصول تکثیری پرتقال آلوده به گرینینگ از منطقه‌ی سرباز استان سیستان‌وبلوچستان، پرتقال سالم (شاهد منفی) و آب (شاهد منفی) حاصل‌از جفت آغازگر A۲/J۵ به‌روش PCR، چاهک‌های ۴، ۵ و ۶ به‌ترتیب محصول تکثیری پرتقال آلوده به گرینینگ، پرتقال سالم (شاهد منفی) و آب (شاهد منفی) حاصل‌از جفت آغازگر OI۱/OI۲c به‌روش PCR هستند

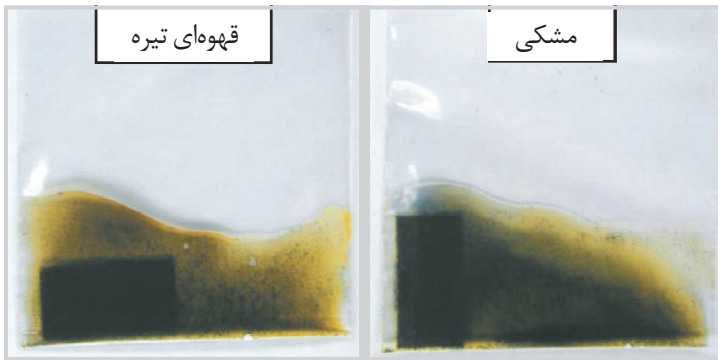
تشخیص بیماری میوه سبز مرکبات با رنگ‌آمیزی نشاسته موجود در بافت پهنک برگ

نشاسته یک محصول طبیعی از تثبیت CO_2 توسط پدیده‌ی فتوسنتز در بافت سبز است و از تبدیل ساکارز در سلول‌های ذخیره‌سازی ایجاد می‌شود. نشاسته از اتصال آلفا یک و چهار گلوکز به‌وجود می‌آید. زنجیر نشاسته به‌دو صورت وجود دارد: آمیلوز، زنجیره‌ای خطی کوتاه و محلول و آمیلوپکتین زنجیره‌ای نامحلول و شاخه‌ای. به‌طورکلی، نشاسته‌ی گیاه، با تغییرات خاص درمیان گونه‌های مختلف، عمدتا متشکل از ۳۰ درصد آمیلوز و آمیلوپکتین ۷۰ درصد است. این نیز به‌خوبی ثابت شده است که سطح نشاسته گیاه و ویژگی‌های فیزیکی، بیوشیمیایی و مورفولوژیک به‌شدت توسط بسیاری از شرایط اعم از عوامل محیطی، تغییرات ژنتیکی و بیماری تحت تاثیر قرار می‌گیرد. در دهه‌ی ۱۹۶۰، "تجمع عظیم" نشاسته در نمونه‌های برگ جمع‌آوری شده از درختان پرتقال آلوده به بیماری میوه سبز مرکبات (HLB) به اثبات رسید. مطالعات اخیر میزان تجمع نشاسته را در برگ آلوده به بیماری میوه سبز مرکبات (HLB) شش برابر بیش از برگ سالم گزارش کرده اند. نشاسته به آسانی با ید واکنش نشان می‌دهد، و به رنگ خاکستری بسیار تیره در می‌آید. (لیلی انگ ۲۰۰۷).

از آنجاکه مقدار متوسط نشاسته در برگ مرکبات آلوده به بیماری میوه سبز مرکبات (HLB) به میزان ۵۱۴٫۲ میلی گرم بر کیلوگرم و در برگ سالم ۸۵٫۶ میلی گرم بر کیلوگرم است، تفاوت قابل توجهی درسطح نشاسته بین برگ‌های بیمار و سالم وجود دارد. به‌همین دلیل تاکوشی و همکارانش در سال ۲۰۰۷ یک روش سریع و ساده برای تشخیص بیماری میوه سبز مرکبات (HLB)، با تشخیص تجمع بالای نشاسته در برگ مرکبات، با رنگ‌آمیزی نشاسته توسط ید، را نشان دادند. در این روش ابتدا با استفاده از کاغذ سمباده سطح برگ مرکبات را، حداقل ۲۰ بار، خراش داده و سپس به آن یک میلی‌لیتر آب اضافه کرده و به آن حدود ۲۵ میکرولیتر محلول ید ۵۰ میلی مولار برای رنگ‌آمیزی نشاسته اضافه کردند. ایجاد رنگ "قهوه ای تیره یا سیاه و سفید" نشان دهنده‌ی واکنش مثبت و "زرد یا نارنجی واکنش منفی می‌باشند (شکل‌های ۹ و ۱۰).



شکل ۹: ایجاد رنگ زرد یا نارنجی نشان‌دهنده‌ی واکنش منفی می‌باشند



شکل ۱۰: ایجاد رنگ "قهوه‌ای تیره یا سیاه و سفید" نشان‌دهنده‌ی واکنش مثبت می‌باشند

این روش با نتایج حاصل از روش PCR بیش از ۹۰٪ هماهنگی را نشان داد. بنابراین، روش رنگ‌آمیزی نشاسته برای، تشخیص سریع و ساده بیماری میوه‌سبز مرکبات (HLB) مفید است (تاکوشی و همکاران ۲۰۰۷).

لی‌لی انگ درسال ۲۰۰۷ میزان هماهنگی بین این دو روش «پی سی آر» و رنگ‌آمیزی نشاسته را در نارنگی (بین ۷۴/۵ تا ۸۹/۵ درصد) و در پوملو (بین ۱۲/۵ تا ۵۱/۷ درصد) تعیین کردند. به‌تازگی، تعدادی از محققان از ویتنام و ژاپن نیز میزان انطباق نتایج دو روش واکنش نشاسته با ید و پی سی آر را ۹۰ درصد گزارش کرده‌اند.

در گزارشی دیگر ویتاکر و همکارانش در سال ۲۰۱۳، با تجزیه‌وتحلیل آماری جامع از سطح نشاسته در برگ مرکبات سالم و بیمار با استفاده از روش رنگ‌آمیزی عصاره‌ی برگ‌های خراشیده با محلول ید و مقایسه آنها با نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) در طول فصل گرم (ژوئن تا نوامبر) در مقایسه با فصل سرد (دسامبر تا مه) مشخص شد که هماهنگی میان نتایج حاصل از این دو روش در فصل گرم بیشتر از فصل سرد است. به‌طوری‌که میزان ناهماهنگی و ناهمخوانی این دو روش در فصل سرد ۴۳٪ در صورتی که در طول فصل گرم، تنها ۸٪ بوده است.

اتگزبریا و همکارانش در سال ۲۰۰۷ از روش برگ برش داده شده به جای عصاره‌ی برگ برای رنگ‌آمیزی با ید استفاده کرده است. وی موارد زیر را در انتخاب برگ مدنظر قرار داده است:

۱ـ برگ دارای علائم آشکار این بیماری انتخاب شود

۲ـ تنهاازبرگ‌های‌سالم‌ازشاخه‌های‌سالم(فاقدآسیب‌های‌فیزیکی)استفاده‌شود.زیراشاخه‌های‌شکسته، ممکن است باعث تجمع نشاسته در برگ شوند.

۳ـ برگ‌های واقع در قسمت نورگیر درخت بهترین نمونه‌ها هستند.

۴ـ همیشه حداقل ۳-۲ برگ دارای علائم شاخص بیماری آزمون شوند.

۵ـ برگ‌های جمع‌آوری شده نباید برای بیش از ۲۴ ساعت قبل‌از آزمون ذخیره شوند، آن‌هم تنها در شرایط یخچال.

اتگزبریا و همکارانش (سال ۲۰۰۷) چگونگی انجام این روش را به‌صورت زیر ذکر کرده اند (شکل ۱۱):

۱ـ با استفاده از تیغ تیز و تمیز، بخشی از برگ، که دارای علائم آشکار ابلقی است، برش داده شود.

۲ـ بخش برش‌داده شده‌ی برگ به‌مدت ۱٫۵ تا ۲ دقیقه در محلول ید آماده قرار داده شود.

۳ـ غلظت محلول ید در این آزمایشات ۲ درصد پیشنهاد شده است.

۴ـ بهتر است از تنتورید استفاده شود نه موادی مثل بتادین

۵ـ بیرون آوردن برگ و شستشوی آن با آب

۶ـ بررسی بخش لبه برش و مقایسه‌ی رنگ قطعه‌ی برگ آلوده با شاهد سالم ازنظر تغییر رنگ به قهوه‌ای تیره.

تهیه برشی مناسب از برگ آلوده برای رنگ آمیزی | قهوه‌ای‌تیره شدن مقطع برگ (وجود میزان بالای نشاسته در برگ) | تغییررنگ ناچیز مقطع برگ (وجود ناچیز نشاسته در برگ)

شکل ۱۱: تشخیص بیماری میوه سبز مرکبات با رنگ‌آمیزی نشاسته موجود در بافت پهنک برگ بریده شده

فهرست منابع

علیـــزاده علی‌آبـــادی، ع. (۱۳۸۲):. بیمـــاری میـــوه ســـبز مرکبـــات ناشـــی از Candidatus Liberibacter spp. انتشارات نشر آموزش کشاورزی، ۲۳۲ صفحه.

یادداشت