



## Detection of Citrus Psorosis Virus by dsRNA and Molecular Hybridization

Faezeh Falaki<sup>1</sup>, Vahid Aalavi<sup>2</sup>, Farshad Rakhshandehroo<sup>3</sup>, Amir Mousavi<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ph.D student, Department of Plant Protection, College of Agriculture Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran. <sup>2</sup>Associate professor, Department of Plant Protection, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research Center, Sari, Iran. <sup>3</sup>Associate professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture Sciences and Food Industries, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran. <sup>4</sup>Associate professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

### Abstract

**Background and Objectives:** Citrus psorosis virus is the causal agent of one of the most important viral citrus diseases in the world and has been detected from the citrus orchards in the east of Mazandaran province, IRAN. Because of the simultaneous presence of various strains of this virus in infected citrus samples, molecular detection methods like PCR are not able to detect this virus with high accuracy. In this research, we introduce a method for the precise detection of Citrus psorosis virus.

**Materials & Methods:** Detection and Identification of infected samples performed by triple antibody sandwich indirect-ELISA (TAS-ELISA) method and monoclonal antibody from symptomatic Thomson orange and Unshiu tangerine samples with suspicious symptoms to CPsV infection in Sari, Neka and Ghaemshahr districts of Mazandaran. Infection in samples tested by ELISA and confirmed by RT-PCR. Extraction of CPsV-dsRNA (Double-strand RNA) from infected samples was done by CF-11 column. Molecular hybridization performed by DIG labeled cDNA probe.

**Results:** Exploring the electrophoretic pattern of dsRNA extracted from the CPsV infected citrus samples by using ELISA and RT-PCR methods, indicating the presence of CPsV genomes with the molecular weights of 920 bp and 2500 bp in infected samples. The presence of CPsV in the samples was also confirmed by using molecular hybridization and designed probe.

**Conclusion:** The major advantages of the hybridization method relating to the dsRNA electrophoretic mobility is the simultaneous detection of the all citrus psorosis virus strains within the infected citrus samples. This way can separate virus isolates.

**Keywords:** Citrus Psorosis virus (CPsV), hybridization, dsRNA, detection, electrophoretic pattern.

Received: 20 December 2022

Revised: 11 March 2023

Accepted: 30 April 2023

Correspondence to: Farshad Rakhshandehroo

Tel: +98 9124786687

E-mail: [Rakhshandehroo\\_fa@srbiau.ac.ir](mailto:Rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir)

Journal of Microbial World 2023, 16(1): 59 - 71

DOI:10.30495/jmw.2023.1964714.2030



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



## ردیابی ویروس پسوروز مرکبات با استفاده از dsRNA و هیبریداسیون

فائزه فلکی<sup>۱</sup>، سید وحید علوی<sup>۲</sup>، فرشاد رخشنده رو<sup>۳\*</sup> و امیر موسوی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. <sup>۲</sup> دانشیار، بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران. <sup>۳</sup> دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. <sup>۴</sup> دانشیار، گروه زیست فناوری مولکولی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

### چکیده

**سابقه و هدف:** ویروس پسوروز مرکبات عامل ایجاد یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی مرکبات در جهان است که در باغات مرکبات واقع در شرق مازندران شناسایی شده است. به دلیل حضور هم‌زمان نژادهای مختلف ویروس در نمونه‌های آلوده، روش‌های شناسایی مولکولی مانند PCR اغلب از توان ردیابی این ویروس با دقت بالا برخوردار نیستند. در این تحقیق، روشی دقیق برای شناسایی ویروس پسوروز مرکبات معرفی شده است.

**مواد و روش‌ها:** ردیابی و تشخیص نمونه‌های آلوده با استفاده از آزمون الیزا به روش ساندریچ غیر مستقیم سه طرفه پادتن (TAS-ELISA) و آنتی‌بادی تک همسانه‌ای از نمونه‌های پرتقال تامسون و نارنگی انشو با علائم مشکوک به آلودگی به CPsV، در شهرستان‌های ساری، نکا و قائم‌شهر از استان مازندران انجام پذیرفت. آلودگی در نمونه‌ها با استفاده از RT-PCR تایید و استخراج dsRNA (Double-strand RNA) ویروس CPsV با استفاده از ستون CF-11 انجام شد. برای هیبریداسیون مولکولی از پروب cDNA نشاندار شده با DIG استفاده شد.

**یافته‌ها:** بررسی الگوی الکتروفورز حاصل از استخراج dsRNA از نمونه‌هایی که با الیزا و RT-PCR به CPsV آلوده تشخیص داده شده بودند بیانگر حضور ژنوم CPsV با وزن‌های مولکولی ۲۵۰۰ و ۹۲۰ جفت باز در نمونه‌های آلوده بود. همچنین با استفاده از هیبریداسیون مولکولی و پروب طراحی شده، حضور CPsV در نمونه‌های آلوده مورد تایید قرار گرفت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده از آزمون هیبرید سازی مولکولی ارتباط مستقیم بین dsRNA استخراج شده از نمونه‌های آلوده و حضور ویروس پسوروز مرکبات را در نمونه‌های علائم‌دار مرکبات شهرستان ساری اثبات نمود.

**کلمات کلیدی:** ویروس پسوروز مرکبات (CPsV)، هیبریداسیون، RNA دو رشته‌ای، ردیابی، الگوی الکتروفورزی.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۲/۱۰

ویرایش مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۲۰

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۹/۲۹

### مقدمه

محصولات باغی محسوب می‌شوند (۱). همچنین ایران رتبه یازدهم را در بین کشورهای تولیدکننده مرکبات دارد (۲). در بین استان‌های تولیدکننده مرکبات، استان مازندران با سطح زیر کشت بیش از ۱۰۰ هزار هکتار و تولید سالانه بالغ بر ۲/۳ میلیون تن، اولین استان مرکبات خیز کشور می‌باشد (۳).

مرکبات در ایران با سطح زیر کشت حدود ۳۰۰ هزار هکتار و میزان تولید حدود ۵ میلیون تن (سال ۱۳۹۶) از مهم‌ترین

(\* آدرس برای مکاتبه: گروه گیاه پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، تهران، ایران.  
تلفن: ۰۹۱۲۴۷۸۶۶۷ پست الکترونیک: [Rakhshandehroo\\_fa@srbiau.ac.ir](mailto:Rakhshandehroo_fa@srbiau.ac.ir)



مستقل در یک پوشش پروتینی قرار گرفته‌اند. هر دو نوع قطبیت مثبت و منفی در مولکول‌های RNA موجود می‌باشد، اما قطبیت منفی غالب است. اندازه RNA1 (۸/۲ kb)، RNA2 (۱/۶ kb) و RNA3 (۱/۵ kb) می‌باشد (۱۵ و ۸). رشته مکمل RNA1 حاوی دو چارچوب خواندنی باز (Open Reading (ORF) Frame است. چارچوب قرائت اول نزدیک به انتهای ۵ قرار گرفته و یک پروتین ۲۴ کیلودالتونی با عملی ناشناخته را رمز می‌نماید که شباهت خاصی با دیگر پروتین‌های شناخته شده ندارد. چارچوب قرائت دوم یک پروتین ۲۸۰ کیلودالتونی را رمز می‌کند که حاوی جایگاه‌های خاص اسید آمینه‌ای مختص آنزیم پلی‌مراز (RdRP) ویروس برای رشته منفی می‌باشد و توالی اسیدهای آمینه‌ای آن شباهت زیادی با پلی‌مراز ویروس‌های متعلق به راسته Mononegavirales دارد (۸).

در ایران، بیماری پسروروز مرکبات اولین بار در سال ۱۳۳۶ توسط منوچهری در شمال ایران شناسایی شد. طی سال‌های بعد این بیماری در مناطق مرکبات‌خیز ساری و بابل به نحو بی‌سابقه‌ای موجب خشک شدن درختان گردید (۵).

تحقیقات نشان داده است که تیپ A بیماری‌زای ویروس در مقایسه با تیپ B در شهرهای نوشهر و ساری شیوع بیشتری داشته است. همچنین با استفاده از روش RT-PCR ویروس پسروروز از استان گلستان گزارش شده است و مشخص شده که سرم‌های تجاری خارجی موجود برای ردیابی نژادهای ایرانی ویروس کارآمد نیستند (۱۶).

روش‌های تشخیص سنتی مانند روش‌های سرولوژیکی ELISA و Tissue blot-ELISA و یا روش‌های تشخیص وابسته به اسید نوکلئیک مانند PCR و همچنین روش‌های مبتنی بر پروب نیاز به دانش قبلی از توالی‌های اسید آمینه و یا اسید نوکلئیک ویروس دارد (۱۲). توالی‌های واگرا یا انواع ویروس با اپی‌توپ‌های متفاوت روی سطح پیکره با استفاده از این روش‌ها شناسایی نمی‌شوند و امر تشخیص را با مشکل مواجه می‌کنند (۱۷).

وقوع RNA دو رشته‌ای (dsRNA) با وزن مولکولی بالا در سلول گیاهان حاصل تکثیر ژنوم ویروس‌های دارای ژنوم RNA

گونه‌ها و ارقام مرکبات غالب موجود در استان مازندران شامل درختان بذری پرتقال محلی، ارقام پیوندی پرتقال واشنگتن ناول (Washington Navel)، تامسون ناول (Thomson Navel)، پرتقال خونی (Blood Oranges)، ارقام پیوندی نارنگی انشویا ساتسوما (Citrus unshiu (Macf.) Marc.) و کلمانتین (Citrus reticulata Blanco var. clementine) می‌گردد (۴).

مرکبات از جمله درختان میوه‌ای هستند که دامنه وسیعی از عوامل بیماری‌زای ویروسی و شبه ویروسی آن‌ها را آلوده می‌کند. تاکنون چندین بیماری با عامل ویروسی یا شبه ویروسی از مرکبات گزارش شده است که بیماری پسروروز یکی از مهم‌ترین آن‌ها بوده و در بسیاری از نواحی تولید مرکبات جهان شایع و منجر به بروز خسارت‌های شدیدی شده است (۶ و ۵). نام این بیماری از کلمه یونانی Psora به معنی زخم یا جرب گرفته شده و اولین بار در سال ۱۸۹۶ از آن برای تشریح بیماری پوسته فلسی شدن تنه مرکبات در فلوریدا و کالیفرنیا استفاده شد (۷). احتمالاً منشأ این بیماری، خاورمیانه بوده و با جابه‌جایی ارقام و گونه‌های مرکبات در سراسر جهان گسترش پیدا کرده است. این بیماری از طریق پیوند از درختان مرکبات آلوده به درختان سالم منتقل می‌شود (۸).

پسروروز به گروهی از بیماری‌ها گفته می‌شود که از نظر نشانه‌های ظاهری متفاوت، ولی در ایجاد نشانه در برگ‌های تازه روئیده با یکدیگر مشابه هستند (۹). پسروروز، برگ‌های درختان جوان را در وضعیت زرد و سبز قرار داده و در درختان مسن برگ‌ها را شیاردار و فلس مانند می‌نماید (۱۰). عده‌ای معتقدند که پسروروز مختص مرکبات است و بیشتر از همه به پرتقال، نارنگی، لیمو و دارابی خسارت می‌زند. پسروروز دو نوع نشانه به نام‌های نقش میخی (Flecking pattern) و نقش برگ بلوطی (Oak leaf pattern) در برگ‌های مرکبات ایجاد می‌کند (۹).

ویروس پسروروز مرکبات به جنس *Ophiovirus*، خانواده *Aspividae* تعلق دارد (۱۱) و ژنوم CPsV، به صورت ssRNA رشته‌ای منفی است (۱۲ و ۱۳ و ۱۴). ژنوم CPsV، از سه مولکول RNA تک رشته‌ای تشکیل شده است (۱۱ و ۱۳) که به صورت

باغ در شهرستان ساری که دارای درختان پرتقال تامسون ناول و نارنگی انشو دیررس بودند و یک باغ در شهر نکاء که دارای پرتقال تامسون بود، برای تفکیک جدایه‌های ویروس پسروروز مرکبات نمونه‌برداری شدند. از سه درخت پرتقال تامسون واقع در قائم‌شهر که دارای علائم ریزش میوه‌های نارس بود و از دو درخت پرتقال تامسون ناول و نارنگی انشو دیررس واقع در ساری که دارای علائم رگه‌ای شدن برگ و لکه‌های حلقوی بر روی برگ‌های مسن و ریزش میوه نارس و سه درخت پرتقال تامسون واقع در نکاء که دارای علائم لکه‌های حلقوی و نقوش حلقوی بودند نمونه‌برداری شد، نمونه برداری سرشاخه‌ها از چهار سمت درخت انجام شد. هر نمونه در کیسه پلاستیکی جداگانه قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل شد. در این تحقیق سعی شد که از تمام تیپ‌های علائمی مختلف ویروس پسروروز مرکبات که در منطقه شرقی استان مازندران مشاهده شده بود، نمونه برداری شود.

ب) بررسی سرولوژیکی: آزمون سرولوژی مورد استفاده، آزمون الایزا به روش ساندویچ غیر مستقیم سه طرفه پادتن (TAS-ELISA) بود. این آزمون با استفاده از پادتن تک همسانه‌ای 13C5 به همراه کنترل منفی و مثبت (اهدایی دکتر Milne از ایتالیا) صورت پذیرفت. ابتدا پادتن 13C5 به میزان  $1/4000$  در بافر پوششی (۲۵ میلی‌مولار  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ، ۷۰ میلی‌مولار  $\text{NaHCO}_3$ ، pH 9.6) رقیق شده و ۱۲۰ میکرولیتر از آن در هر چاهک از بشقابک الایزا (MaxiSorp® Plate, Nunc, Denmark) ریخته شد و به مدت ۴ ساعت در دمای  $37^\circ\text{C}$  قرار گرفت. سپس پنج مرتبه و هر بار به مدت یک دقیقه چاهک‌ها با بافر شستشو (۸ میلی‌مولار  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ، ۱/۵ میلی‌مولار  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۲/۷ میلی‌مولار  $\text{KCl}$ ، ۰/۱۴ میلی‌مولار  $\text{NaCl}$ ، ۳ میلی‌مولار  $\text{NaN}_3$ ، ۰/۱ درصد Tween-20، pH 7.4) شسته شد. ۰/۱ گرم بافت برگ جوان با یک میلی‌لیتر بافر عصاره‌گیری (۸ میلی‌مولار  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ، ۱/۵ میلی‌مولار  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ، ۲/۷ میلی‌مولار  $\text{KCl}$ ، ۰/۱۴ میلی‌مولار  $\text{NaCl}$ ، ۳ میلی‌مولار  $\text{NaN}_3$ ، ۰/۱ درصد Tween-20، ۲ درصد PVP-10000، دو درصد شیر بدون چربی، pH 7.4) در هاون

در میزبان می‌باشد. RNA دو رشته‌ای از نظر فیزیکی دارای پایداری بالایی است و می‌تواند به راحتی از اکثر گونه‌های گیاهی استخراج شود و ابزاری عالی برای شناسایی ویروس‌های جدید که نسبت به خالص‌سازی مقاوم هستند، فراهم می‌کند (۱۷ و ۱۸). RNA دو رشته‌ای در زمان تکثیر ویروس‌های RNA مثبت و یا با ژنوم از نوع قطبیت متضاد (ambisense) شکل می‌گیرد. پایداری ترمودینامیکی مولکول dsRNA و مقاومت آن در برابر تخریب توسط آنزیم RNase باعث می‌شود در تیتراژ پایین حضور ویروس و یا در زمان وجود بازدارنده‌ها در سلول باقی بماند و استخراج آن می‌تواند روشی عالی را برای شناسایی ویروس‌های گیاهی فراهم آورد (۱۹). استخراج dsRNA جایگزینی مناسب برای شناسایی ویروس در اکثر گونه‌های گیاهی آلوده است. در طول سال‌های گذشته بیش از ۳۰ گونه ویروس با استفاده از استخراج dsRNA آن‌ها از چندین گونه گیاه میزبان از جمله *Pisum*، *Fragaria*، *Rubus*، *Solanum*، *Mentha*، *Rosa* شناسایی شده‌اند (۱۸ و ۲۰). در بسیاری از موارد، به‌ویژه ویروس‌های دارای ژنوم ssRNA که گیاهان با مقادیر بالایی از ترکیبات فنلی و کربوهیدرات‌ها را آلوده می‌کنند، محققین به سختی می‌توانند ssRNA استخراج شده را برای استفاده در شناسایی مولکولی و بررسی خصوصیات ژنومی مورد استفاده قرار دهند. خالص‌سازی dsRNA روش بینابینی است که می‌تواند برای تهیه پروب، RT-PCR، شبیه‌سازی مولکولی و تعیین توالی نوکلئوتیدی مورد استفاده قرار گیرد (۱۸ و ۲۰). با توجه به آنکه روش‌های مولکولی موجود تاکنون قادر به تفکیک تیپ‌های بیماری‌زای CPsV در مرکبات نبوده‌اند، هدف از این پژوهش توسعه روش مولکولی با کارایی و دقت بالا برای ردیابی سریع و دقیق CPsV بود که بتواند جدایه‌های احتمالی آن را تفکیک کند.

## مواد و روش‌ها

الف) نمونه برداری: جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق از سه منطقه مختلف در استان مازندران شامل شهرستان قائم‌شهر که واجد درختان تامسون با سن پائین (۵-۳ سال) بودند و دو

مخلوط و با سرعت ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. روشین 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 سانتریفیوژ انجام شد، فاز مایع رویی جمع‌آوری و به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط خلاء قرار گرفت. دو گرم پودر سلولز CF-11 (Whatman Ltd, UK) و اتانول با غلظت نهایی ۱۷٪ به آن افزوده و سوسپانسیون موجود در محفظه کروماتوگرافی ریخته شد و با ۳۰ میلی‌لیتر 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 میلی‌لیتر بافر STE بدون الکل شستشو و جمع‌آوری گردید. به میزان یک دهم حجم آن اسنات سدیم ۳ مولار (pH 6.2) و ۲ برابر حجم اتانول مطلق افزوده و در دمای ۲۰°C- به مدت یک شب نگهداری شد. در ادامه سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g انجام گردید. رسوب به دست آمده در ۲۰ میکرولیتر بافر بارگذاری (۰/۰۴ مولار تریس، ۰/۰۲ مولار اسنات سدیم، ۰/۰۰۱ مولار EDTA، ۲۰ درصد گلیسرول و ۰/۰۱ درصد برم فنل بلو) و به آرامی به مدت یک تا دو دقیقه با میله‌ای پلاستیکی ساییده و سوسپانسیون حاصل در چاهک‌های تعبیه شده در ژل آگارز یک درصد در بافر الکتروفورز (۰/۰۴ مولار تریس، ۰/۰۲ مولار اسنات سدیم، ۰/۰۰۱ مولار EDTA، pH 7.8) ریخته شد و در آخر الکتروفورز با ۷۰ ولت به مدت یک ساعت انجام گرفت. یک چاهک با نمونه نهال سالم پرتقال با منشاء نوسلار استخراج شده به روش فوق و یک چاهک نیز با مارکر DNA پلکانی فرمنتاس با فواصل ۱۰۰ bp (DNA Ladder plus, Fermentas science co., Switzerland) به میزان توصیه شده پر شد. ژل الکتروفورز پس از دومرتبه شستشو با آب مقطر استریل به مدت بیست دقیقه در بافر الکتروفورز حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) قرار گرفت و سپس در طول موج ۳۰۲ نانومتر بررسی و عکس‌برداری شد. نمونه برداری و خالص سازی به روش مذکور در چهار فصل انجام شد (۲۱).

سترون و سرد عصاره‌گیری و ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره به دست آمده در چاهک ریخته و به مدت یک شب در دمای ۴°C قرار گرفت. برای حذف اثر میزبان جذب پلی‌استیرن، به اولین چاهک (A1) عصاره گیاهی افزوده نشد (Blank). بشقابک مانند مرحله قبلی شسته شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی 13C5 که در بافر عصاره‌گیری به میزان ۱/۱۰۰۰ رقیق شده بود، درون چاهک‌ها ریخته شده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار داده شد. بشقابک مانند قبل شسته شد و پادتن تهیه شده علیه گاماگلوبولین موش و متصل به آنزیم آلکالین فسفاتاز (Boehringer Mannheim Co., Germany) در بافر عصاره‌گیری به میزان ۱/۱۰۰۰۰ رقیق شد و ۱۰۰ میکرولیتر از آن در چاهک ریخته شد و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۳۷°C نگهداری شد. پس از شستشوی بشقابک، ۱۰۰ میکرولیتر محلول پارائنتروفینیل فسفات ۱/۱۰۰۰ رقیق شده در بافر سوپسترا (۱۰ میلی‌مولار دی اتانول آمین، ۰/۵ میلی‌مولار MgCl<sub>2</sub>، pH 9.5) در هر چاهک ریخته شد و به مدت ۸۰ دقیقه در دمای اتاق و دور از نور مستقیم قرار گرفت. میزان جذب چاهک‌ها در طول موج ۴۰۵ نانومتر توسط دستگاه خوانش الایزا (ELISA Reader Stat Fax 2100, USA) اندازه‌گیری و نمونه‌هایی که میزان جذب سه برابر چاهک حاوی عصاره نمونه سالم (کنترل منفی) را نشان دادند، به عنوان نمونه آلوده به CPV در نظر گرفته شد (۱۶).

ج) استخراج dsRNA (Double-strand RNA) با استفاده از ستون CF-11. نمونه‌ها با استفاده از روش خالص سازی با ستون کروماتوگرافی سلولز CF-11، بررسی شدند. استخراج اسید نوکلئیک از نمونه‌های جمع‌آوری شده طبق روش علوی و تیموری (۱۳۹۶) به شرح زیر انجام گرفت. مقدار ۶ تا ۸ گرم بافت برگ جوان از هر نمونه در نیتروژن مایع خرد و با ۲۰ میلی‌لیتر بافر استخراج (۰/۲ مولار گلیسین، ۰/۱ مولار مونوپتاسیم فسفات، ۰/۶ مولار کلرید سدیم، ۰/۱۰ مولار کلرید منیزیم، ۱/۵ درصد SDS، ۱۰ درصد مرکاپتواتانول، pH 8)

ژل آگارز به غشاء نایلونی (nylon membrane, positively charged, Boehringer Mannheim, Germany) مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. سپس غشاء نایلونی در ظرفی حاوی ۲۰ میلی‌لیتر گاماگلوبولین آنتی سرم تولید شده بر علیه digoxigenin و نشان دار شده با آنزیم آلکالین فسفاتاز که به نسبت ۷۵ هزارم واحد در میلی‌لیتر در محلول بلوکه رقیق شده بود، قرار داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در این محلول نگهداری شد. غشاء به مدت ۵ دقیقه در ظرف حاوی ۲۰ میلی‌لیتر بافر تشخیص (۰/۱ مولار تریس-اسید کلریدریک، ۰/۱ مولار کلرور سدیم، ۵۰ میلی‌مولار کلرور منیزیم، pH 9.5) نگهداری و سپس به ظرفی حاوی ۹۰ میکرولیتر محلول رنگ‌آمیزی (۷۵ میلی‌گرم NBT در یک میلی‌لیتر دی متیل فورامید)، ۷۰ میکرولیتر محلول BCIP (۵۰ میلی‌گرم BCIP در یک میلی‌لیتر دی متیل فورامید) و ۲۰ میلی‌لیتر بافر تشخیص منتقل و به صورت ساکن در تاریکی قرار داده شد. غشاء با تابانیدن نور غیرمستقیم ارزیابی شده و متعاقب ظهور رنگ ارغوانی در محل باندهای cDNA، غشاء نایلونی به مدت ۵ دقیقه به ظرفی حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر منتقل گردید. غشاء نایلونی سپس از ظرف خارج و در دمای اطاق قرار داده شد. جرم مولکولی باندهای cDNA براساس روش فارل (۲۲) محاسبه گردید.

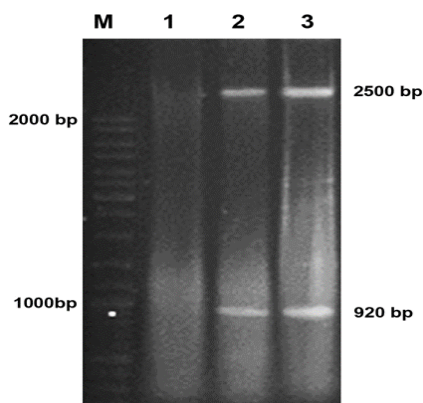
۵) واکنش زنجیره‌ای چرخه پلی‌مرز: واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز با استفاده از پنج میکرولیتر محلول حاوی DNA مکمل (cDNA) نشان‌دار به دست آمده در مرحله قبل و با استفاده از ۲۰ پیکومول از آغازگر اختصاصی ویروس پسروروز مرکبات شامل CPV-F: (5-GGAGTTGCACCAACAGCAG-3) و CPV-R: (5-TGATCAACTGAAGCTCAAGGAG) در سه تکرار بوسیله دستگاه ترموسایکلر (MJ Mini 48-Well Personal thermal cycler, Bio-Rad, USA) انجام شد. آغازگرهای مذکور برای تکثیر بخشی از منطقه ژنتیکی کد کننده پروتئین پوششی ویروس طراحی شده بود.

برنامه حرارتی برای تکثیر با هر کدام از آغازگرهای اختصاصی شامل ۱۳۰°C به مدت ۲ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه و

د) هیبریداسیون مولکولی: سنتز cDNA براساس روش توصیه شده شرکت سازنده و با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت روخه آلمان (cDNA synthesis kit for the synthesis of cDNA from RNA, Roche, Germany) انجام شد. تشخیص ایمونولوژیک cDNA ساخته شده سپس با استفاده از کیت ردیابی cDNA نشان‌دار شده با DIG (Digoxigenin nucleic acid detection kit, Roche, Germany) و براساس دستورالعمل شرکت روخه (Roche) صورت گرفت. نمونه اسید نوکلئیک استخراج شده از ژل آگارز به لوله آزمایش استریل منتقل و به مدت ۵ دقیقه در آب جوش و سپس به مدت ۵ دقیقه در نیتروژن مایع قرار داده شد. لوله از نیتروژن مایع خارج و روی یخ خرد شده قرار داده شد. پس از ذوب شدن محتوی، هشت میکرولیتر بافر واکنش، ۴ میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتیدها حاوی یک میلی‌مولار dATP، یک میلی‌مولار dCTP، یک میلی‌مولار dGTP، ۰/۶۵ میلی‌مولار dTTP و ۰/۳۵ میلی‌مولار dUTP و ۰/۳۵ میلی‌مولار dUTP نشان دار شده با DIG، pH ۷/۵، ۴ میکرولیتر محلول آغازگر و ۴ میکرولیتر محلول آنزیم AMV reverse transcriptase، طبق توصیه شرکت سازنده به آن افزوده شد. در لوله با پارافیلیم پوشانده شده و به مدت چهار ساعت در حمام آب گرم با دمای ۴۲ درجه سلسیوس قرار گرفت. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول مارکر DNA با جرم مولکولی مشخص و نشان دار شده با DIG (DNA molecular weight marker VI, digoxigenin labeled, Roche, Germany) در یک لوله آزمایش استریل ریخته و به مدت ۳ دقیقه در آب جوش قرار داده شد و پس از آن به نیتروژن مایع منتقل گردید. لوله‌های حاوی سوسپانسیون cDNA و محلول مارکرهای DNA از نیتروژن مایع خارج و با قرار دادن در دمای اطاق ذوب گردید. حجم ۱۰-۵ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌های cDNA و مارکر در چاهک‌های ژل آگارز یک درصد ریخته شده و در سیستم افقی با بافر تانک ۰/۰۴ مولار تریس، ۰/۰۲ مولار استات سدیم، ۰/۰۰۱ مولار EDTA، pH 7.8 به مدت ۲ ساعت با ۸۰ ولت الکتروفورز شد و پس از اتمام کار، ژل از محفظه خارج گردید. انتقال باندهای cDNA از

در باغ برای جدایه‌های مورد مطالعه در این پژوهش و شدت آن‌ها و مقایسه آن با علائم گزارش شده می‌توان نتیجه گرفت که تیپ B ویروس CPsV در منطقه مورد نمونه‌برداری در پایه‌های پرتقال تامسون و نارنگی انشو دیررس وجود دارد (۱۶ و ۲۳).

ج) استخراج dsRNA (Double-strand RNA) با استفاده از CF-11. الگوی الکتروفورز پس از استخراج اسیدنوکلئیک نمونه‌های آلوده به دست آمد (شکل ۱) و در ژل آگارز، دو باند واضح با جرم‌های مولکولی حدود ۲۵۰۰ و ۹۲۰ مشاهده شد. همچنین در بافت سالم هیچ باندهایی دیده نشد. بررسی آلودگی ویروس در تعداد ۶۰ نهال از ارقام پرتقال و نارنگی با روش استخراج dsRNA با نتایج حاصل از آزمون RT-PCR مطابقت داشت. از تعداد ۴۰ نهال از ارقام پرتقال، تعداد ۲۰ نهال و از ۲۰ نهال ارقام نارنگی، تعداد ۱۵ نهال به ویروس پسروروز مرکبات آلوده بودند که آلودگی آن‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ویروس پسروروز مرکبات مورد تایید قرار گرفت و باند ۶۰۰ جفت بازی را در ژل آگارز ۱ درصد نشان دادند.



شکل ۱: الگوی الکتروفورز حاصل از استخراج dsRNA با استفاده از ستون CF-11، چاهک M، نشانگر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت بازی DNA ladder mix sm0331. چاهک‌های ۲ و ۳ به ترتیب مربوط به نمونه پرتقال آلوده به ویروس و چاهک ۱: نمونه پرتقال سالم و فاقد آلودگی.

د) هیبریداسیون مولکولی: حساسیت تشخیص این آزمون مشابه با آزمون الایزا به روش ساندویچ دوطرفه پادتن بود. سادگی و نیاز به حداقل زمان و امکانات از مزایای این آزمون نسبت به دیگر روش‌های الایزا بوده و از کاستی‌های مهم آن عدم توانایی

سپس ۳۵ چرخه حرارتی (۹۳°C به مدت ۳۰ ثانیه برای واسرشت‌سازی، ۵۱°C به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال و ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه برای تکثیر) و در پایان ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه برای تکثیر نهایی بود (۲۳).

و) آنالیز آماری: برای تایید آلودگی CPsV از الگوی الکتروفورزی dsRNA استفاده شد. برای این منظور تعداد ۴۰ نهال از ارقام پرتقال و ۲۰ نهال از ارقام نارنگی دارای علائم مشکوک به طور تصادفی از نهالستان‌های شهرستان ساری جمع‌آوری و مورد آزمون قرار گرفتند. برای نمونه کنترل سالم از نهال‌های پرتقال روئیده از بذر استفاده شد. برای نمونه آلوده از نمونه‌های جمع‌آوری شده از پرتقال و نارنگی به ویروس پسروروز مرکبات تیپ B (۱۶) که در گلخانه قرنطینه مرکز تحقیقات کشاورزی استان مازندران نگهداری می‌شود، انتخاب شد.

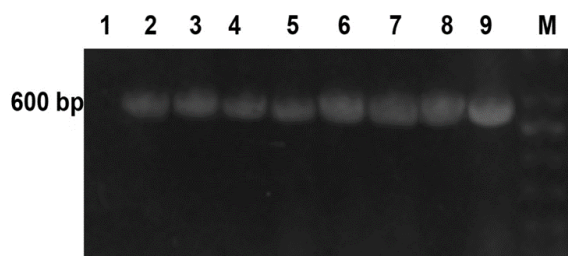
### یافته‌ها

الف) واکنش گیاهان میزبان: در بازدیدهای به عمل آمده، علائم بیماری پسروروز در درختان بالای ده سال مشاهده شد. این علائم مانند پوسته شدن مشکوک تنه، پوسته شدن فلسی تنه و خشکیدگی سرشاخه‌های جوان و زوال و مرگ درخت که مربوط به فرم مهاجم‌تر بیماری (تیپ B) می‌باشد، در موارد معدودی مشاهده شد. علائم پوسته شدن فلسی بیشتر روی تنه اصلی مشاهده شد و تنها در یک باغ که برای آزمون‌های بعدی انتخاب شده بود، علائم پوسته شدن فلسی شدید علاوه بر تنه اصلی روی شاخه‌های بالاتر نیز مشاهده شد. در بین ارقام مورد بررسی، درختان پرتقال رقم تامسون بیشترین آلودگی را به ویروس پسروروز نشان دادند و علائم پوسته شدن فلسی تنه شاخص پسروروز در فرم پیشرفته آن تنها در رقم سانگین مشاهده شد.

ب) آزمون سرولوژیکی: تمامی نمونه‌های جمع‌آوری شده و گیاهان پیوندی در واکنش با پادتن تک همسانه‌ای 13C5 پاسخ مثبت دادند که نشانه آلوده بودن تمامی نمونه‌ها به ویروس پسروروز مرکبات می‌باشد. با توجه به نوع علائم مشاهده شده

ویروسی (RT-PCR) و همچنین روش نوردن بلات از نوع دات‌بلات (dot-blot) نیز شناسایی کرد. نتایج هم‌زمان این روش‌ها می‌تواند موجب شود تا محققین نسبت به تشخیص دقیق تیپ‌های مختلف CPsV که از نظر ژنتیکی بسیار نزدیک به یکدیگر می‌باشند اقدام نمایند (۲۶).

ه) واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با نسخه برداری معکوس (RT-PCR): نمونه‌های جمع‌آوری شده از درختان آلوده پرتقال تامسون و نارنگی انشودیررس واجد علائم با جفت آغازگرهای اختصاصی CPsV که در این تحقیق طراحی شده بودند واکنش مثبت نشان دادند و قطعه‌ای مورد انتظار به طول حدود ۶۰۰ bp در ۱۱ نمونه آلوده توسط آن‌ها تکثیر شد (شکل ۳). درحالی که نمونه‌های مربوط به درختان بدون علائم با آغازگرهای مذکور واکنش نشان ندادند. آغازگرهای اختصاصی F, R برای تکثیر بخشی از ژن رمز کننده پروتئین پوششی CPsV طراحی شده است و کارایی آن در تحقیقات گذشته مورد تایید قرار گرفته بود.

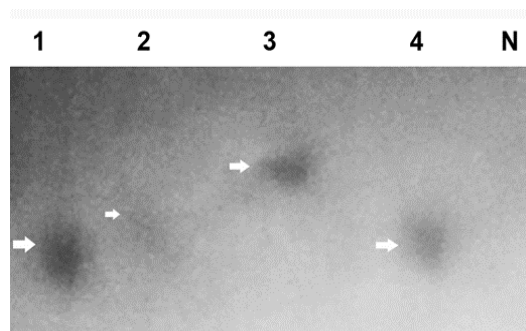


شکل ۳: الکتروفورس محصول PCR CPsV بر روی ژل آگاروز ۱ درصد حاصل از تکثیر ژنوم با پرایمر CPsV. چاهک‌های ۲-۹: قطعات تکثیر شده با وزن تقریبی ۶۰۰ جفت باز با استفاده از پرایمر اختصاصی تکثیر کننده ژن پروتئین پوششی ویروس، چاهک ۱: نمونه سالم فاقد آلودگی، چاهک ۱۰: مارکر ۱۰۰ جفت بازی شرکت Jena Bioscience Inc (Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder, Jena Bioscience Inc).

### بحث

روش‌های مختلفی برای شناسایی ویروس‌های گیاهی در دسترس محققان و متخصصان است. برای سال‌ها، روش‌های سرولوژیک و سنجش‌های بیولوژیک معمولاً در ترکیب با تشخیص اسید نوکلئیک ویروسی مورد استفاده قرار می‌گرفتند. امروزه رویکردهای بر پایه نوکلئیک اسید برای تشخیص

تشخیص کمی ویروس در بافت‌های گیاهی آلوده است (۲۴). در این تحقیق باندهای مربوط به آلودگی به ویروس در ورقه نیتروسولوز کاملاً مشخص گردید (شکل ۲).



شکل ۲: هیبریداسیون مولکولی مربوط به لکه‌گذاری غشاء با RNA نمونه‌های آلوده به پسروروز مرکبات. شماره‌ها مربوط به نمونه‌های آلوده و RNA: N نمونه مرکبات عاری از آلودگی.

RNAs یکنواخت نشان‌دار (آنتی سنس) می‌توانند به‌عنوان پروب در تشخیص و تعیین مقدار DNA یا RNA استفاده شوند (تجزیه و تحلیل northern blot). یکی از مزایای استفاده از پروب‌های RNA در نوردن بلات دستیابی به حساسیت بیشتر آن در تشخیص مولکولی عناصر ژنتیکی آلوده کننده مانند ویروس‌های آلوده کننده گیاهان می‌باشد که به دلیل تیترا پایین ماده ژنتیکی هدف، امکان ردیابی دقیق آن‌ها با روش‌های مولکولی معمول مانند RT-PCR وجود ندارد. پروب‌های RNA در صورت نشان‌دار شدن یا مواد پرتوزا این امکان را می‌توانند فراهم آورند تا به صورت آنتی‌سنس به گونه‌ای طراحی شوند که به توالی‌های مربوط به دو انتهای توالی ژنتیکی از ژنوم هدف متصل شوند. از این طریق می‌توان نسبت به تعیین توالی و تعیین ویژگی‌های مولکولی دو انتهای ماده ژنتیکی توالی هدف در تعیین نقشه ژنتیکی مربوط به طول کامل ژنوم آن اقدام نمود. تعیین طول کامل توالی ژنومی موجودات همواره از چالش‌های مهم در تعیین ویژگی‌های دقیق مولکولی آن‌ها می‌باشد که در تشخیص دقیق تر آن‌ها ضروری است (۲۵).

نتایج ما نشان می‌دهد که CPsV را می‌توان به راحتی نه تنها با صورت‌های مختلف ELISA بلکه با روش‌های تشخیص RNA



بیماری‌های مشکوک، اما ثابت نشده با منشا ویروسی، به دلیل ناتوانی در خالص‌سازی ذرات ویروس فراهم می‌کند. جداسازی موفق ویروس‌ها از بافت به نوع بافت و پایداری ویروس بستگی دارد و هیچ روش خالص‌سازی واحدی برای همه ویروس‌ها قابل استفاده نیست. به این مفهوم که جهت ردیابی و تشخیص آلودگی‌های همزمان ویروس‌های متفاوت در یک میزبان امکان دارد نیاز به اجرای روش‌های متفاوت جهت استخراج ماده ژنتیکی هر یک از آن‌ها داشت. این امر موجب افزایش هزینه و زمان در تشخیص دقیق آلودگی‌های ویروسی می‌شود. در چنین شرایطی با استفاده از تنها یک دستورالعمل جهت جداسازی dsRNA می‌توان نسبت به تشخیص همزمان آلودگی‌های مختلف ویروسی در یک نمونه با دقت بالا اقدام نمود. در این خصوص با ارزیابی وزن مولکولی dsRNAs مختلف در پروفایل حاصل از استخراج dsRNA حاصل بر روی ژل الکتروفورز و مقایسه آن با نتایج موجود از تحقیقات گذشته می‌توان نسبت به تشخیص مولکولی و دقیق هر یک از عوامل ویروسی موجود در آلودگی مشترک و هم‌زمان یک نمونه خاص اقدام نمود. این روش برای شناسایی ویروس‌ها در بافت‌های گل رز، انگور و گیلاس استفاده می‌شود. محتوای بالای پلی ساکاریدها در این گیاهان جداسازی اسید نوکلئیک را با روش‌های قبلی دشوار می‌کند (۲۷). از زمان توسعه اولین پروتکل برای خالص‌سازی dsRNA از گیاهان توسط موریس و دادز در سال ۱۹۷۹، چندین روش دیگر برای بهینه‌سازی عملکرد یا برآوردن نیازهای یک ترکیب ویروس میزبان خاص توسعه یافته است (۲۸). dsRNA الگوهای نواری الکتروفورز مشخصی را تولید می‌کنند که آن‌ها را متمایز می‌کند. الگوهای dsRNA به طور کلی شامل یک (در مورد ویروس‌های تک بخشی)، دو (دو قسمتی) یا بیشتر (چند قسمتی) باندهای ژنومی است (۱۸). با این وجود، مانند ویروس‌های RNA گیاهی، الگوهای الکتروفورز بسته به گونه‌های ویروس متفاوت است. استخراج و تجزیه و تحلیل الگوی الکتروفورز dsRNA به طور گسترده‌ای برای مطالعه ویروس‌های مهم مانند ویروس *Citrus tristeza virus* (CTV)

ویروس مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)، همراه با توالی‌یابی، به دلیل حساسیت بالا و سازگاری با توسعه روش‌های توان عملیاتی بالا، به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند. اخیراً فناوری‌های جدیدی برای تشخیص و شناسایی ویروس مانند توالی‌یابی نسل بعدی (NGS) در دسترس قرار گرفته‌اند. روشی با پتانسیل بالا برای تشخیص و شناسایی ویروس‌های گیاهی است. برای هر روش مبتنی بر اسید نوکلئیک برای تشخیص ویروس RNA، دستورالعمل‌های استخراج RNA کارآمد و عملی مورد نیاز است. روش‌های زیادی از جمله کیت‌های تجاری در حال حاضر برای استخراج RNA تک رشته‌ای (ssRNA) از طیف وسیعی از بافت‌های بیولوژیکی موجود است. با این وجود، در برخی موارد، ناپایداری ssRNA می‌تواند عاملی باشد که بر شناسایی موفقیت‌آمیز ویروس تأثیر بگذارد (۱۸).

استخراج، خالص‌سازی و تجزیه و تحلیل الکتروفورز ژل RNAs دو رشته‌ای ویروسی (dsRNAs) با هدف شناسایی ویروس‌های گیاهی ابزار مکملی را برای دانشمندان فراهم می‌کند. علاوه بر این، منبعی از RNA را نیز فراهم می‌کند که می‌تواند در روش‌های دیگر تشخیص و شناسایی مبتنی بر اسید نوکلئیک برای ویروس‌های RNA استفاده شود (۱۷ و ۱۸ و ۲۷). dsRNA به‌عنوان ماده ژنتیکی در بسیاری از ویروس‌های گیاهی، جانوری، قارچی و باکتریایی شناخته شده است. یکی دیگر از ویژگی‌های منحصر به فرد dsRNA این است که به سلولز در بافرهای حاوی اتانول متصل می‌شود (۱۸).

جداسازی و ویژگی‌های RNA دو رشته‌ای مخصوص ویروس (dsRNA) از بافت آلوده به ویروس‌های دارای ژنوم RNA گزارش شده بود. dsRNA روشی برای جداسازی سریع و کارآمد از برگ‌های گیاهان با بافت‌های مختلف و میسلیم قارچی توصیف شده است. جداسازی موفق dsRNA مستقل از نوع بافت صورت می‌گیرد که این روش جداسازی با سایر انواع بافت نتایج خوبی را ارائه داده است و مستندات در این مورد وجود دارد. از آنجایی که dsRNA فقط در گیاهان آلوده به ویروس شناسایی شده است، این روش ابزاری را برای مطالعه

زمستان، با استفاده از برگ‌های مسن، پاسخ ELISA نزدیک به ۵۰٪ کاهش یافت. در واقع، هیچ نمونه‌ی آلوده به ویروسی در زمستان ELISA مثبت نبود (۳۰). نتایج به‌دست آمده در این تحقیق نیز گواهی بر این ادعا است که در زمستان شناسایی ویروس پسروروز با روش ELISA بسیار دشوار بوده درحالی‌که در روش هیبریداسیون براحتی می‌توان آلودگی را تشخیص داد. بر اساس نتیجه مطالعه حاضر، می‌توان نتیجه گرفت که هیبریداسیون dot blot حساس‌تر از ELISA است و می‌تواند برای تشخیص عادی در مقیاس بزرگ مفید باشد، بنابراین جایگزینی مفید برای سنجش سرولوژی است (۳۰) و نتایجی که ما به‌دست آوردیم کاملاً گواه این می‌باشد.

#### نتیجه‌گیری

اگرچه پروتکل مبتنی بر سلولز برای استخراج و خالص‌سازی dsRNA ویروسی از گیاهان و قارچ‌های آلوده به ویروس‌های دارای ژنوم از نوع RNA بیش از ۴۰ سال است که وجود دارد، اما هنوز ابزاری کاربردی برای مطالعه، تشخیص و شناسایی ویروس‌ها در اختیار متخصصان شناسایی کننده و محققان قرار می‌دهد. سادگی و تطبیق‌پذیری این روش، همراه با تغییراتی که بازده و کیفیت dsRNA را بهبود بخشیده و هزینه‌های کلی را کاهش داده است، با منابع محدود، مناسب می‌سازد. همان‌طور که قبلاً اشاره شد، در گذشته تنها با استفاده از بررسی الگوی الکتروفورزی dsRNA استخراج شده از نمونه‌های آلوده جهت شناسایی نوع آلودگی ویروسی اقدام می‌شد. اما امروزه تاکید بیشتر بر استفاده از dsRNA ویروسی برای RT-PCR، شبیه‌سازی و توالی‌یابی ژنتیکی نمونه‌های آلوده است که منجر به شناسایی دقیق تر نژادها و جمعیت‌های حاضر از ویروس‌ها در نمونه‌های آلوده می‌شود. همچنین استخراج dsRNA از نمونه‌های آلوده به ویروس ابزاری مناسب برای انجام توالی‌یابی‌های نسل جدید Next generation sequencing (NGS) فراهم می‌آورد که می‌تواند جهت شناسایی دقیق و سریع جمعیت‌های مختلف حاضر از نژادهای متفاوت یک ویروس در نمونه‌های مختلف مورد استفاده قرار گیرد (۱۸).

و *Citrus parasitica virus*، عامل ایجاد کننده بلایت شاه بلوط استفاده شده است (۱۸).

مزیت تجزیه و تحلیل dsRNAs این است که برخلاف سایر تکنیک‌های تشخیص ویروس، غیراختصاصی است و بنابراین امکان تجسم عفونت‌های ویروسی مختلط وجود دارد. مزیت دیگر این روش آنست که در برخی موارد، سویه‌های یک ویروس مشخص را می‌توان با بررسی میزان تحرک یا تعداد قطعات dsRNA مشاهده شد پس از الکتروفورز در ژل متمایز کرد. به‌عنوان مثال می‌توان به نتایج پژوهش‌های پیشین اشاره نمود که در آن با استفاده از بررسی پروفایل حاصل از الکتروفورز dsRNA استخراج شده از بافت نمونه آلوده امکان تفکیک نژادهای مختلف ویروس وابسته به موزاییک توتون Satellite tobacco mosaic virus فراهم آمد (۱۸).

تجزیه و تحلیل نوردن بلات RNAs را براساس اندازه جدا می‌کند و اجازه شناسایی RNAs خاص با استفاده از پروب‌های نشاندار را می‌دهد. آلواین و همکاران اولین کسی بود که RNAs مشخص را با استفاده از این روش تجسم کرد. روش Northernblot ابتدا برای شناسایی گونه‌های مداخله‌گر RNA در گیاهان به‌کار می‌رفت و اولین miRNAهای حفاظت شده بین *Caenorhabditis elegans* و پستانداران از این طریق شناسایی شدند (۱۸).

کاوشگرهای رادیواکتیو و غیر رادیواکتیو با استفاده از dsRNA برای تولید و نشان‌گذاری ssRNA یا cDNA تولید شده‌اند. جردن و دادز از dsRNA TMV برای توسعه پروب‌های ssRNA با برچسب انتهایی P32 استفاده کردند و از آن‌ها با موفقیت در آزمایش‌های هیبریداسیون مولکولی استفاده کردند. پروب‌های غیر رادیواکتیو نیز با برچسب گذاری مستقیم ssRNA با استفاده از dsRNA به‌عنوان ماده اولیه تهیه شده‌اند (۱۸ و ۲۹). استفاده از دو ریوپروب با برچسب DIG تولید شده برای تشخیص CPsV و CVV در گیاهان مرکبات گزارش شده بود. در تجزیه و تحلیل نشان داده شده، میزان تشخیص CPsV در برگ/گل‌های جوان با روش ELISA و هیبریداسیون دات بلات در طول بهار مشابه بود، در حالی که در

### ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

### تشکر و قدردانی

بدین وسیله از تمامی افرادی که در اجرای این پروژه همکاری کرده‌اند، تقدیر و تشکر به عمل می‌آید.

### تعارض منافع

وجود ندارد.

## References

1. Anonymous. Production and yield per hectare of mandarin crop by province. Agricultural Statistics of the Crop Year 2016-2017. Department of Statistics and Information of Ministry of Agriculture Jihad. 2018; 241 pages.
2. FAO STAT. National Agricultural Statistics Service. 2016; USDA.<http://www.faostat.fao.org>.
3. Anonymous. Production and yield per hectare of mandarin crop by province. Agricultural Statistics of the Crop Year 2006-2007. Department of Statistics and Information of Ministry of Agriculture Jihad. 2008; 154 pages.
4. Khoii S. The Principales of citrus nutrition. Author Press. 1993; 266pp.
5. Behdad, E. Pests and diseases of fruit trees. Yadbood Press. 2009;350pp.
6. Sanchez De La Torre ME, Garcia ML, Riva O, Dal Bo E, Jones L, Zandomeni R, Grau O. Genome Organization of the Top Component of Citrus Psorosis Virus and Identification of the Coat Protein Gene. Fourteenth IOCV Conference. 2000; 345-346.
7. Garnsey SM, Timmer LW. Local Lesion Isolate of Citrus Ringspot Virus Induces Psorosis Bark Scaling. Proc. 10th Conf. IOCV. 1988; 334-339.
8. Achachi A, Barka EA, Ibriz M. Recent advances in Citrus psorosis virus. Virusdisease. 2014; 25 (3): 261-276.
9. Elahinia SA. Diseases of fruit trees and some garden plants and methods of combating them. 3th Ed, Guilan University Press. 2012; 565pp
10. Fotohi-Ghazvini R. Citrus Growing in Iran. 1th Ed, Guilan University Press. 1999; 150pp.

11. El Sayed TA, Saker KE, El Shorbagy AE, Soliman AM. Elimination of Citrus psorosis virus using shoot tip grafting and electrotherapy techniques. *Egypt. J. Agric. Res.* 2022; 100 (4): 641-652.
12. Alas T, Akın A, Kahramanoğlu i. Symptomological identification of Citrus Psorosis Virus (CPsV) in citrus orchards of Northern Cyprus. *Tr Prikl Bot Genet Sel.* 2022;183(2):149-158. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-2-149-158.
13. Simeone M, Gómez C, Bertalmío A, Ruiz E, Hauteville C, Suarez LG, Tito B, García ML. Detection of citrus psorosis virus by RT-qPCR validated by diagnostic parameters. *Plant Pathol.* 2021;70:980–986. <https://doi.org/10.1111/ppa.13341>.
14. Sofy AR, Moussa AA, Fahmy H, Ghazal SA, El-DougDoug KA. Anatomical and ultrastructural changes in Citrus leaves infected with Citrus psorosis virus Egyptian isolates. *J Appl Sci Res.* 2007; 3(6):485–94.
15. Roistacher CN. Psorosis-Areview. *Proc. 12th Conf. IOCV.* 1993; 139-154.
16. Falaki F, Alavi SV, Rakhshanderoo F. Citrus psorosis virus, causal agent of ring pattern disorder in Thomson Navel trees in east of Mazandaran. *Iranian JAEP.* 2013; 80 (2): 161-172. (In Persian with English summary).
17. Gafar YZA, Ziebell H. Comparative study on three viral enrichment approaches based on RNA extraction for plant virus/viroid detection using high-throughput sequencing. *PLoS ONE.* 2020; 15 (8): e0237951. doi: 10.1371/journal.pone.0237951.
18. Valverde RA, La Torre-Almaraz R. Extraction and purification of large dsRNAs from virusinfected plants and fungi: Applications in virus detection and identification. *Rev Mex Fitopatol.* 2017; 35:80-105. doi: 10.18781/R.MEX.FIT.1606-9.
19. Ma Y, Marais A, Lefebvre M, Theil S, Svanella-Dumas L, Faure C, Candresse T. Phytoviroome analysis of wild plant populations: comparison of double-stranded RNA and virion-associated nucleic acid metagenomic approaches. *J Virol.* 2020; 94: e01462-19. <https://doi.org/10.1128/JVI.01462-19>.
20. Holeva MC, Sklavounos A, Rajeswaran R, Pooggin MM, Voloudakis AE. Topical Application of Double-Stranded RNA Targeting 2b and CP Genes of Cucumber mosaic virus Protects Plants against Local and Systemic Viral Infection. *Plants.* 2021; 10: 963.<https://doi.org/10.3390/plants10050963>
21. Alavi SV, Teymuri P. Detection of Citrus Viroids by CF-11 Nucleic Acid Extraction Method. *Iranian JAEP.* 2017; 85:1 (77-86). (In Persian with English summary).
22. Farrell RE. *RNA Methodologies.* Academic press. 2010; 261-282.
23. Falaki F, Alavi SV, Rakhshanderoo F, Mousavi A. Partial Biological and Molecular Characterization of Citrus psorosis virus Infecting Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc) in the east of Mazandaran province. *Iranian JAEP.* 2019; 87:2 (195-207). (In Persian with English summary).

24. Rocha-Pena MA, Lee RF, Niblett CL. Development of a dot-immunobinding assay for detection of citrus tristeza virus. *J Virol Methods*. 1991; 34: 297-309
25. Huang C, Yu Y. Synthesis and Labeling of RNA in Vitro. *Curr Protoc Mol Biol*. 2013; Pp. 19.
26. Martin S, Alioto D, Milne RG, Garnsey SM, Garcia ML, Grau O, Guerri J, Moreno P. Detection of Citrus psorosis virus by ELISA, molecular hybridization, RT-PCR and immunosorbent electron microscopy and its association with citrus psorosis disease. *Eur J Plant Pathol*. 2004; 110: 747–757.
27. Morris TJ, Dodds JA. Isolation and analysis of double-stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue. *Phytopathology*. 1979; 69: 854-858.
28. Tzanetakis IE, Martin RR. A new method for extraction of double-stranded RNA from plants. *J Virol Methods*. 2008; 149:167–170. doi:10.1016/j.jviromet.2008.01.014
29. Tabein S, Jansen M, Noris E, Vaira AM, Marian D, Behjatnia SAA, Accotto GP, Miozzi L. The Induction of an Effective dsRNA-Mediated Resistance Against Tomato Spotted Wilt Virus by Exogenous Application of Double-Stranded RNA Largely Depends on the Selection of the Viral RNA Target Region. *Front. Plant Sci*. 2020; 11:533338. doi: 10.3389/fpls.2020.533338
30. Loconsole G, Fatone MT, Savino V. Specific digoxigenin-labelled riboprobes for detection of citrus psorosis virus and citrus variegation virus by molecular hybridization. *Plant Pathol*. 2009; 91 (2): 311-319.