



## مقایسه روش های استخراج آر.ان.ای برای شناسایی ویروس برگ بادبزنی مو

زهرا غلامپور<sup>۱</sup> - محمد زکی عقل<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۸/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۵/۲۴

### چکیده

وجود مقادیر زیاد ترکیبات فنلی و پلی ساکاریدها در بافتهای مو از معضلات استخراج اسید نوکلئیک با کیفیت بالا از این گیاه است. به منظور ردیابی موثر ویروس برگ بادبزنی مو در تاکهای آلوده چهار روش استخراج RNA با یکدیگر مقایسه و روش استخراج اسید نوکلئیک از این گیاه بهینه سازی شد. کیفیت اسید نوکلئیک استخراج شده به روشهای اسپکتروفوتومتری و واکنش زنجیره ای پلی مراز با نسخه برداری معکوس تعیین شد. در بین روشهای مورد مقایسه اختلاف زیادی در نتایج مشاهده شد به نحوی که بعضی از این روشها قادر به شناسایی ویروس در بافت آلوده نبودند. در بین روشهای مورد بررسی، استفاده از CTAB-PVPP در بافر استخراج همواره بیشترین غلظت و بالاترین کیفیت اسید نوکلئیک را در پی داشت و ردیابی ویروس در اغلب نمونه ها امکان پذیر بود.

واژه‌های کلیدی: استخراج نوکلئیک اسید، مقایسه، ویروس برگ بادبزنی مو

### مقدمه

میشود که نشان دهنده آلودگی های پروتئینی است در حالیکه بعضی از روشها تولید رسوب ژله ای می کنند که نشان دهنده وجود پلی ساکاریدها است (۲۱). همچنین بعضی از روشها در اثر وجود پلی فنلها تولید رسوب تیره رنگ می کنند (۱ و ۷). اتصال RNA استخراج شده به پلی ساکاریدها و مواد فنلی موجود در رسوب موجب ناپایداری آن عدم موفقیت در آزمایشهای پائین دست از جمله RT-PCR میشود (۱۸). روش های متعددی برای استخراج آر.ان.ای. از مو استفاده شده است (۴، ۵، ۱۶). از موادی همچون CTAB، کلرید سزیم و نمکهای گوانیدین در روشهای متعددی استفاده شده است. مک کنزی و همکاران (۹) از کیت های تجاری برای استخراج آر.ان.ای. از درختان میوه آلوده به ویروس استفاده کردند که توانایی حذف ترکیبات بازدارنده را بطور موثر دارد. روحانی و همکاران نیز چهار روش را برای استخراج آر.ان.ای. ویروس برگ بادبزنی مو<sup>۲</sup> از درختچه های مو مقایسه کردند که تنها استفاده از فنل در استخراج کارائی داشت (۱۶). از دیگر روشها تثبیت پیکره های ویروس در محیط واکنش و حذف مواد بازدارنده از طریق شستشو می باشد. این روش که IC-PCR<sup>۳</sup> نام دارد تلفیقی از روش های سرولوژیکی و پی سی آر است (۱۲)، روش Dot Blot(DB)-PCR نیز برای ردیابی GFLV نیز استفاده شده است (۱۷).

تاکنون بیش از ۷۰ بیماری ویروسی و شبه ویروسی از مو گزارش شده است. اغلب این ویروسها در تیره های Closteroviridae، Flexiviridae، Secoviridae و Tymoviridae قرار دارند (۱۹). ولی جنسهای *Nepovirus* و *Amplovirus* از نظر اقتصادی اهمیت بیشتری دارند و خسارت آنها تا ۸۵ درصد محصول نیز می رسد (۹). برای شناسایی ویروس های مو اغلب از آزمون الیزا استفاده می شود اما به دلیل غلظت پایین ویروسها در گیاهان آلوده طی ماه های گرم سال (به ویژه در تابستان) الیزا حساسیت کافی برای شناسایی ویروس را ندارد (۱۱). همچنین به دلیل عدم پراکنش یکسان ویروس در بخش های مختلف گیاه، ردیابی ویروس با روشهای سرولوژیکی با مشکلاتی همراه است (۶)، لذا روش های مبتنی بر ژنوم برای شناسایی و ردیابی ویروسهای مو به کار گرفته می شود. استخراج RNA با کیفیت مناسب لازمه موفقیت در کاربرد روشهای مولکولی مانند RT-PCR است (۴). استخراج RNA با کیفیت مناسب از درختان و بخصوص مو به علت غلظت بالای پلی ساکاریدها، ترکیبات فنلی و سایر متابولیت های ثانویه با مشکلاتی همراه است (۸ و ۱۸). بعضی از روشهای استخراج RNA در مو باعث تولید رسوب نامحلول

۱ و ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد  
\* نویسنده مسئول: (Email: zakiagh@ferdowsi.um.ac.ir)

هر کدام از این روش های دارای مزایا و معایبی هستند. به عنوان مثال در روش مک کنزی و همکاران (۹) از کیت های استخراج نوکلئیک اسید استفاده شده است که در سطح وسیع مقرون به صرفه نمی باشد. در روش روحانی و همکاران نیز از مواد شیمیایی خطرناک همچون فنل استفاده شده است (۱۶). روش IC-PCR نیازمند آنتی بادی اختصاصی ویروس است. بعلاوه این روش وقت گیر است و برای تعداد زیاد نمونه ها جوابگو نیست (۱۶). در روش DB-PCR پیکره ها مستقیماً به دیواره لوله واکنش متصل شده و از آنجا که تمام مراحل شستشو و استخراج، سنتز دی. ان. ای. مکمل و پی سی آر در یک لوله انجام می پذیرد که ریسک آلودگی به نوکلئازها و تخریب اسید نوکلئیک ویروس وجود دارد که موجب کاهش دقت واکنش میشود (۱۷).

ویروس برگ بادبزی مو یکی از مخرب ترین بیماری های ویروسی مو در سراسر دنیا است (۱۵). ویروس برگ بادبزی مو یکی از مخرب ترین بیماری های ویروسی مو در سراسر دنیا محسوب می شود. این ویروس به وسیله نماتد خنجری ریشه ( *Xiphinema index*) انتقال می یابد (۱۴). موثر ترین روش کنترل بیماری با توجه به نحوه انتقال آن استفاده از قلمه های عاری از ویروس در تاکستانها است. این ویروس پراکنش وسیعی در اغلب تاکستانهای کشور دارد. با توجه به تنوع ژنتیکی بالای این ویروس و تفاوت های ژنوم جدایه ایرانی با جدایه های دیگر دنیا (۱۲، ۱۳، ۱۵، ۲۲) ردیابی جدایه های ایرانی GFLV بوسیله آزمون RT-PCR با مشکلاتی همراه است. با طراحی آغازگرهای اختصاصی بر اساس ترادف جدایه های ایرانی GFLV انتظار می رفت که ردیابی ویروس با مشکلات کمتری همراه باشد، لیکن کیفیت پائین اسید نوکلئیک استخراج شده در آزمون RT-PCR ایجاد اختلال می کند. لذا اقدام به بهینه سازی و مقایسه روشهای مختلف استخراج اسید نوکلئیک برای ردیابی GFLV در آزمون RT-PCR شد.

در این بررسی، پنج روش استخراج آر. ان. ای. شامل استفاده از کیت استخراج RNA تجاری، استفاده از تریازول، روش چهارم روحانی و همکاران (۱۶)، روش استخراج با CTAB-PVPP (۷) و استخراج با استفاده از سیلیکون دی اکسید (۳) از لحاظ کمیت و کیفیت اسید نوکلئیک استخراج شده و موفقیت در آزمون RT-PCR مورد مقایسه قرار گرفته اند.

## مواد و روش ها

### نمونه برداری

طی بهار و تابستان سال ۹۱ از تاکستان های استان خراسان رضوی نمونه برداری و تعداد ۴۰ نمونه گیاهی مشکوک با علائم آلودگی به GFLV جمع آوری شدند. آلودگی نمونه ها با استفاده از

آنتی بادی اختصاصی GFLV در آزمون الیزای مستقیم تأیید شد (۱۱).

## استخراج آر. ان. ای. کل

آر. ان. ای. کل از برگ های مشکوک به آلودگی با پنج روش خالص سازی شد.

### ۱- استفاده از کیت استخراج RNA

در این روش از کیت Column RNA Isolation Kit-I ساخت شرکت دنا زیست آسیا مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد

### ۲- استفاده از تریازول

برای ساخت تریازول ۳۸٪ فنول اسیدی، ۰/۸ مول گوانیدین تیو سیانات، ۰/۴ مولار آمونیوم تیو سیانات، ۰/۱ مولار استات سدیم و ۵٪ گلیسرول در یک لیتر آب مخلوط شده و پس از همگن شدن مخلوط در استخراج اسید نوکلئیک استفاده شد.

مقدار ۰/۲ گرم از بافت برگ با استفاده از ازت مایع پودر شده و ۲ میلی لیتر تریازول به آن افزوده و ورتکس شد. مخلوط حاصل برای ۵ دقیقه در ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شده و به روشین ۰/۱ حجم استات آمونیم و ۰/۸ حجم ایزوپروپانول اضافه شد و برای ۳۰ دقیقه در ۲۰°C نگهداری شد. سپس لوله ها برای ۱۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شده و رسوب حاصل پس از شستشو با الکل ۷۰ درجه در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل شد.

### ۳- روش روحانی و همکاران (۱۶ و ۱۷)

مقدار ۰/۲ گرم از بافت برگ در یک میلی لیتر بافر استخراج ( 21.7g K2HPO4.3H2O, 4.1g KH2PO4, 100g Sucrose, ) 1.5 g BSA, 20g PVP40, 5.3g Ascorbic acid, pH 7.6) به مدت ۱۰-۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از هموژنیزه شدن کامل بافت برگ، یک میلی لیتر دیگر از بافر استخراج اضافه و دوباره هموژنیزه شد. نمونه ها در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ شدند و فاز رویی به لوله های جدید منتقل و لوله ها در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز رویی حذف شده و رسوب در ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE (۱۰ میلی مولار EDTA با pH 8، ۵۰ میلی مولار تریس و ۰/۱ درصد SDS- مرکاپتوتانول) حل شده و به آن ۲۵ میکرولیتر سدیم دودسیل سولفات ۱۰٪ اضافه شد. سپس لوله ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۶۰°C نگهداری شده، ۸۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار به لوله ها اضافه و مخلوط شدند. لوله ها به مدت ۳۰ دقیقه روی یخ نگهداری شده سپس در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ و فاز رویی به لوله جدید منتقل شده و ۰/۱ حجم استات سدیم و هم حجم

Guanidine Hydrochloride, 0.2 M Na Acetate pH 5, 25mM EDTA) شستشو و سپس به مدت ۳۰ ثانیه در سرعت ۶۵۰۰ دور در دقیقه رسوبدهی مجدد شد. در مرحله بعد رسوب در ۵۰۰ میکرولیتر بافر (Wash II (10 mM Tris, pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl and absolute ethanol) حل شده و مجدداً رسوبدهی انجام شد. این مرحله یکبار دیگر نیز تکرار شد. سپس لوله ها به مدت ۲ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد خشک شده و رسوب در ۷۰ میکرولیتر بافر TE حل شد و برای ۱ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت. در مرحله ی آخر میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و فاز رویی حاوی اسید نوکلئیک به میکروتیوب جدید انتقال داده شد.

### بررسی کیفیت اسید نوکلئیک

کیفیت اسید نوکلئیک خالص سازی شده با سه روش نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰، نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰ (۱، ۷، ۱۰، ۱۸ و ۲۱) و ردیابی ویروس در RT-PCR بررسی شد. نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ نشان دهنده مقدار آلودگی به پروتئین در نمونه است در حالیکه نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰ برای سنجش میزان پلی ساکاریدها و پلی فنل ها کاربرد دارد.

### بهینه سازی آر تی- پی سی آر (RT-PCR)

برای سنتز رشته مکمل (cDNA) ۳ میکرولیتر از آر. آن. ای. کل استخراج شده با ۲ میکرولیتر آغازگر عمومی (Oligod (T) و ۹/۵ میکرولیتر آب دیونیزه مخلوط و میکروتیوب دردمای ۶۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. سپس ۲ میکرولیتر مخلوط dNTPs، ۴ میکرولیتر بافر ۵x واکنش و ۰/۵ میکرولیتر آنزیم نسخه بردار معکوس (MMuLV-Reverse Transcriptase) به مخلوط اضافه گردیده و میکروتیوب به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۷ درجه ترموسایکلر قرار گرفت (۱۳ و ۳).

واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای طراحی شده 5'-DetF (3'-CGGCAGACTGGCAAGCTGT-5') و 5'-DetR (3'-GGTCCAGTTTAATTGCCATCCA-5') برای تکثیر قسمتی از ژن پروتئین پوششی انجام شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر شامل ۳ میکرولیتر از cDNA، ۱ میکرولیتر از هر آغازگر، ۲ میکرولیتر 10x PCR buffer، ۱/۲ میکرولیتر (۵۰ میلی مولار) MgCl<sub>2</sub>، ۰/۴ میکرولیتر مخلوط dNTPs و ۰/۲ میکرولیتر (۵ واحد در میکرو لیتر) Taq DNA Polymerase بود. پروفایل دمایی واکنش زنجیره ای پلیمرز شامل یک چرخه در دمای ۹۵ °C به مدت ۳ دقیقه و ۳۰ چرخه شامل ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه در مرحله واسرشت سازی، ۵۶ °C به مدت ۴۵ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۸۰ ثانیه و در نهایت یک سیکل ۷۳ °C به مدت ۱۵ دقیقه با استفاده از ترموسایکلر انجام گردید.

آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد و در ۲۰ °C- به مدت یک ساعت نگهداری شده و در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. رسوب با ۲۰۰ میکرولیتر از اتانول سرد ۸۰٪ شستشو داده شده و پس از خشک شدن در ۳۰ میکرولیتر آب مقطر استریل حل شد.

### ۴- روش CTAB-PVPP

از این روش در استخراج اسید نوکلئیک از برگ پنبه استفاده شده بود (۷) که با مختصر تغییراتی برای مو بهینه سازی شده است. مقدار ۲۰ میلی گرم از بافت برگ در ۷۰۰ میکرو لیتر بافر استخراج (200 mM GuanidinThiocynate, 1.4M NaCl, 0.1M Tris-Hcl PH=7, 1% PVP<sup>۱</sup>40, 2% CTAB) با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد درون هاون استریل عصاره گیری و ۵ میکرولیتر ۲- مرکاپتواتانول به آن اضافه شد. عصاره به میکروتیوب حاوی ۰/۰۵ گرم PVPP<sup>۲</sup> منتقل شده و پس از مخلوط شدن، به مدت ۱۰-۵ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس برای ۲ دقیقه در سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر از رانشین به میکروتیوب جدید منتقل شد و ۴۰۰ میکرولیتر کلروفرم به آن اضافه و بعد از همگن سازی، به مدت ۲ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. رانشین به میکروتیوب جدید منتقل شده و ۱/۱ حجم استات آمونیوم و هم حجم آن ایزوپروپانول سرد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس لوله ها با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شدند. رسوب در ۱ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ شستشو داده شد و سپس لوله ها به مدت ۲ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد خشک شده و رسوب در ۷۰ میکرولیتر بافر TE حل شد.

### ۵- استفاده از سیلیکون دی اکسید (۲)

مقدار ۱۵۰ میلی گرم از بافت برگ در ۱ میلی لیتر بافر استخراج (4M Guanidine Hydrochloride, 0.2 M Na Acetate pH 5, 25mM EDTA, 2.5% PVP-40) درون هاون استریل عصاره گیری و ۵ میکرولیتر ۲-مرکاپتواتانول اضافه شد. عصاره به میکروتیوب منتقل شده و به مدت ۲ دقیقه در سرعت ۶۸۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۵۰۰ میکرولیتر از فاز رویی به میکروتیوب جدید حاوی ۶۰ میکرولیتر سارکوسیل ۲۰ درصد منتقل شد و پس از مخلوط کردن، به مدت ۲۰ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی گراد نگهداری و سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۳۵۰ میکرولیتر از رانشین به میکروتیوب حاوی ۲۰ میکرولیتر سیلیکا انتقال داده شد و بعد از همگن سازی ۳۱۵ میکرولیتر اتانول مطلق به مخلوط اضافه شد. لوله ها به مدت ۳۰ ثانیه در سرعت ۶۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند و رسوب با ۶۰۰ میکرولیتر بافر (Wash I (4M

2- Polyvinylpyrrolidon

3- Polyvinylpolypyrrolidon



شکل ۱- علائم ویروس برگ بادبزنی مو در تاکهای آلوده  
Figure 1- Symptoms of GFLV in infected grapevine

جدول ۱- مقایسه کمیت و خلوص اسید نوکلئیک استخراج شده از روشهای مختلف از برگ مو  
Table 1- Comparison of yield and quality from various methods of RNA isolation from grapevine leaves

روش استخراج Extraction methods	جذب نوری Absorbance		مقدار آر. ان ای RNA yield (ng/-l)
	260/280	260/230	
کیت تجاری Commercial kit	2.03	1.47	557
Trizol	1.86-2.17	1.3-2.87	499
CTAB	1.7-2	0.9-1.94	235.5-300
Rowhani <i>et al.</i>	2.3-4	0.4-1.04	33.3-77.2
سیلیکا Silica	1.1-2	1.59	11.5-51.8

و از بافت تازه برگ  $33/3-77/2 \mu\text{g/g}$  اسید نوکلئیک خالص سازی شد (جدول ۱). روش CTAB-PVPP از این لحاظ بیشترین کارایی را در بین روشها داشت.

کیفیت اسید نوکلئیک خالص سازی شده با سه روش محاسبه نسبت جذب  $260/280$  نانومتر، نسبت جذب  $260/230$  نانومتر و ردیابی ویروس در RT-PCR بررسی شد.

کمترین نسبت جذب  $260/280$  در روش استخراج با سیلیکا مشاهده شد ( $1/1-2$ ) ولی در سایر روشهای استخراج بکار برده شده این نسبت بالاتر از  $1/8$  بود و اختلاف معنی داری در بین روشهای مختلف مشاهده نشد. لیکن نسبت جذب  $260/230$  در بین روشهای مختلف تفاوت داشت. بیشترین نسبت در روشهای استخراج تریازول و CTAB-PVPP مشاهده شد. کمترین نسبت جذب  $260/230$  در روش فنل مشاهده شد و میزان جذب در استفاده از کیت استخراج سیلیکا بینابینی بود (جدول ۱).

#### همانند سازی در آر تی-پی سی آر

واکنش نسخه برداری معکوس با آغازگر Oligo d(T) و بدنال آن آزمون پی سی آر با آغازگرهای DetR و DetF در  $25$  نمونه که در آزمون الیزا آلوده تشخیص داده شده بودند، برای بررسی کارایی

به منظور بررسی نتایج آر تی-پی سی آر،  $5$  میکرولیتر از محصول PCR در ژل آگارز  $1$  درصد حاوی  $2$  میکرولیتر از Green viewer الکتروفورز و در نهایت در دستگاه ژل داک عکسبرداری شد.

#### نتایج و بحث

علائم GFLV شامل رگبرگ نواری و موزائیک زرد (شکل ۱) در مناطق نمونه برداری مشاهده شد که با علائم توصیف شده برای GFLV در منابع (۱۴ و ۲۳) به طور کامل تطابق داشت. از  $40$  نمونه جمع آوری شده  $25$  نمونه در آزمون الیزای مستقیم آلوده به GFLV تشخیص داده شدند. در این نمونه ها میزان تغییر رنگ ماده زمینه  $2-3$  برابر شاهد منفی بود.

#### بررسی کمیت و کیفیت اسید نوکلئیک استخراج شده

میزان اسید نوکلئیک استخراج شده بسته به روش استخراج بکار برده شده متغیر بود (جدول ۱). استفاده از کیت استخراج RNA، تریازول و روش CTAB-PVPP بیشترین میزان اسید نوکلئیک را از برگ مو استخراج کردند ( $235.5-300 \mu\text{g/g}$ ) در حالیکه در روش سیلیکا کمترین غلظت اسید نوکلئیک از برگ استخراج شد ( $11.5-51.8 \mu\text{g/g}$ ). روش استخراج روحانی و همکاران نتایج بینابینی داشت

همه روشهای مورد بررسی در حذف پروتئین از پریپارسیون موفق بودند به طوری که نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ در اغلب نمونه ها بیشتر از ۱/۸ بود. از این نظر روش سیلیکا تغییرات زیادی داشت و نسبت به روشهای دیگر کارائی مناسبی نداشت.

نسبت جذب ۲۶۰/۲۳۰ برای سنجش میزان پلی ساکاریدها و پلی فنل ها کاربرد دارد. هر چه این نسبت بزرگتر باشد نشان دهنده خلوص بیشتر نمونه و حذف پلی ساکاریدها از پریپارسیون است (۱، ۸، ۱۸ و ۲۰). از بین روشهای مورد بررسی، استخراج با تریازول و CTAB-PVPP بهترین راندمان حذف پلی ساکاریدها را داشتند در حالیکه روش روحانی و همکاران کمترین کارائی را از این نظر داشت. البته فاکتورهائی همچون غلظت اسید نوکلئیک، نسبت جذب ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰ شاخصهای خوبی برای موفقیت در RT-PCR نیستند (۱، ۲، ۸، ۹، ۱۶، ۱۸ و ۲۰). از لحاظ کیفیت مناسب اسید نوکلئیک برای PCR استخراج با CTAB-PVPP با ردیابی ویروس در ۸۸ درصد از نمونه ها بهترین روش استخراج بود در حالیکه کمترین موفقیت در شناسائی مربوط به استخراج با کیت تجاری و روش سیلیکا بود. روشهای تریازول و روحانی و همکاران موجب خرد شدن اسید نوکلئیک شده و واکنش پلی مرز را تحت تاثیر قرار میدهند (۱، ۸ و ۱۸) همچنین نمونه های خالص شده با سیلیکا به مقادیر زیادی از پروتئین و پلی ساکارید آلوده بودند که از بازدارندگان واکنش پلی مرز هستند (۱، ۸ و ۱۸).

نتایج این تحقیق نشان داد که روش های استفاده از کیت استخراج، روش روحانی و همکاران و استفاده از سیلیکا قادر به حذف مواد بازدارنده از جمله پلی ساکاریدها و ترکیبات فنلی موجود در بافتهای مو نبودند، در حالیکه روش CTAB-PVPP بطور قابل توجهی برای استخراج اسید نوکلئیک از مو کارایی مناسبی داشت.

عدم تکثیر قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی در واکنش آر تی-پی سی آر از نمونه هایی که آلودگی آنها در آزمون الیزا محرز شده بود، ناشی از ناکارآمدی روش استخراج آر. آن. ای. از آنها بوده است. استخراج آر. آن. ای. با استفاده از روشهای کیت استخراج RNA، روش روحانی و همکاران و استفاده از سیلیکا موجب حذف مواد بازدارنده، ترکیبات فنلی و پلی ساکاریدها از عصاره گیاهان آلوده نشده و این ناخالصی ها در انجام آر تی-پی سی آر در عمل آنزیم ها اختلال ایجاد کرده اند. در مجموع روش CTAB-PVPP دارای نتایج یکنواخت تر با تکرار پذیری زیاد نسبت به سایر روشهای مورد استفاده بود و ردیابی ویروس به سهولت امکان پذیر بود. همانندسازی قطعه ی ۱۰۰۰ جفت بازی و فقدان آن در نمونه سالم دلالت بر اختصاصی بودن آغازگر طراحی شده در این تحقیق داشت. با توجه به تنوع ژنتیکی زیاد این ویروس (۵، ۱۲، ۱۳ و ۱۵) و بروز مشکلاتی در زمینه شناسایی آن به وسیله ی آزمون RT-PCR که ناشی از عدم اتصال آغازگر به رشته

روش استخراج بکار برده شده در ردیابی ویروس از بافت مو استفاده شد.

با استفاده از کیت استخراج آر. آن. ای تجاری ویروس برگ بادبزنی مو تنها در چهار نمونه الیزا مثبت (۱۶ درصد از نمونه ها) ردیابی شد. استفاده از روش سیلیکا در استخراج آر. آن. ای. منجر به تولید قطعه ای به طول ۱۰۰۰ bp از ژن پروتئین پوششی GFLV در ۴۰ درصد از نمونه ها (۱۰ نمونه) شد در حالیکه با استفاده از روشهای تریازول و روحانی و همکاران در استخراج اسید نوکلئیک GFLV بترتیب در ۶۰ و ۵۶ درصد از نمونه های آلوده ردیابی شد.

در استفاده از روش CTAB-PVPP در ۸۸ درصد از نمونه های جمع آوری شده (۲۲ نمونه) قطعه ۱۰۰۰ bp پروتئین پوششی GFLV همانند سازی شد که نشان دهنده ی کارآمدتر بودن این روش نسبت به سایر روشهای مورد بررسی است (جدول ۲).

## بحث

هدف از این تحقیق مقایسه روشهای استخراج اسید نوکلئیک و بهینه سازی آر تی-پی سی آر جهت ردیابی GFLV در بافتهای مو با استفاده از واکنش زنجیرهای پلیمرز بود. کاهش غلظت ویروس در بافتهای مو در فصول گرم موجب کاهش حساسیت روشهای سرولوژیکی در شناسائی ویروس می شود. روشهای مولکولی امکان شناسائی ویروس در تمامی فصول سال را فراهم میکنند (۱۱، ۱۶ و ۱۷). واکنش زنجیرهای پلیمرز دارای حساسیت زیادی در ردیابی بیمارگرهای گیاهی و از جمله GFLV است. استفاده از روشهای معمول استخراج اسید نوکلئیک برای ردیابی ویروسهای مو و از جمله GFLV توام با موفقیت نیست هر چند استفاده از این روشها در میزبانهای علفی براحتی موجب شناسائی ویروس می شود (۴، ۹، ۱۶ و ۱۷). بافتهای مختلف مو دارای مقادیر زیادی از پلی فنلها و پلی ساکاریدها هستند. این ترکیبات در عملکرد اسید نوکلئیک ایجاد اختلال کرده و به عنوان بازدارنده های واکنش زنجیره ای پلیمرز عمل می کنند. روشهای استخراج مختلف از لحاظ توانائی حذف ترکیبات بازدارنده واکنش آر تی-پی سی آر در این تحقیق مقایسه شده اند.

بیشترین غلظت RNA با استفاده از کیت استخراج RNA، تریازول و CTAB-PVPP بدست آمد لیکن کاربرد روشهای روحانی و همکاران و سیلیکا در استخراج اسید نوکلئیک با غلظت بالا از بافتهای مو توام با موفقیت نبود. جلوگیری از تخریب و اکسیداسیون RNA بر راندمان خالص سازی اسید نوکلئیک تاثیر گذار است (۱، ۸، ۱۸ و ۲۰). چنین به نظر میرسد که بافر عصاره گیری در این دو روش موثر عمل نکرده به نحوی که غلظت اسید نوکلئیک استخراج شده نسبت به سایر روشها کاهش چشمگیری داشته است.

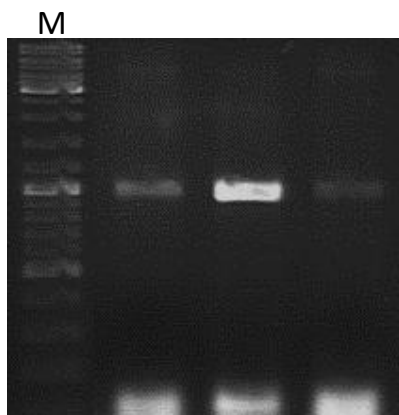
شناسائی ویروس به روش واکنش زنجیره ای پلی مرز امکان استفاده از آن را در سیستمهای گواهی قلمه امکانپذیر می کند. روش استخراج اسید نوکلئیک ارائه شده در این تحقیق می تواند در تسهیل استفاده از تکنولوژی مولکولی در شناسائی ویروسهای موثر واقع شود.

الگو می باشد آغازگر فوق با توجه به ترادف جدایه های ایرانی موجود در بانک ژن و سایر ایزوله های GFLV طراحی شده است و این آغازگر می تواند مشکلات مربوط به شناسایی جدایه های مختلف این ویروس را مرتفع سازد. حساسیت و سهولت روش ارائه شده در استخراج اسید نوکلئیک و

جدول ۲- مقایسه کارایی روشهای استخراج آر.ان.ای در ردیابی ویروس برگ بادبزی مو از برگ مو

Table 2- Comparison of efficiency of various RNA extraction methods in detection of GFLV from grapevine leaves

روش استخراج Extraction methods	No. ELISA positive samples	No. RT-PCR positive samples	% موفقیت در RT-PCR % RT-PCR success
کیت تجاری Commercial kit	25	4	16
Trizol	25	15	60
CTAB	25	22	88
Rowhani <i>et al.</i>	25	14	56
سیلیکا Silica	25	10	40



شکل ۲- الکتروفورز محصول RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی ویروس برگ بادبزی مو (DetR / DetF). M: Generuler DNA ladder. ۱: روش روحانی و همکاران، شماره ۲: روش CTAB، شماره ۳: روش سیلیکا

Figure 2- Results of RT-PCR using GFLV specific primer pairs (DetF / DetR). :Generuler DNA ladder mix, Fermentas; 1: extraction using Rowhani *et al.* Method; 2: extraction using CTAB method; 3: extraction using Silica method

## منابع

- 1- Bahloul M., and Burkard G.1993. An improved method for the isolation of total RNA from spruce tissues. *Plant Molecular Biology Reporter*, 11:212-215.
- 2- Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M.E., Van der Nooraa. J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology*, 28:495-503.
- 3- Fattouch S., Acheche H., Mhirsi S., Mellouli L., Bejar S., Marrakchi M., and Marzouki N. 2005. RT-PCR-RFLP for genetic diversity analysis of Tunisian Grapevine fanleaf virus isolates in their natural host plants. *Journal of Virological Methods*, 127:126-132.
- 4- Gambino G., Perrone I., and Griboaldo I. 2008. A rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical Analysis*, 19: 520-525.

- 5- Hajizadeh M., Sokhandan-bashir N., Niknam A., and Nikkhah Sh. 2007. Optimization of Nucleic Acid Extraction and RT-PCR for Detection of Grapevine fanleaf virus Isolates from Vineyards in North-West of Iran. *Journal of Agricultural Science*, 16: 145-156.
- 6- Hewitt W.B., Raski D.J., and Goheen A.C. 1958. Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology*, 48:586-595.
- 7- Katterman F.R., and Shattuck V.I. 1983. An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 13: 347-359.
- 8- Loulakakis K.A. Roubelakis-Angelakis K.A. and A.K. Kanellis. 1996. Isolation of functional RNA from grapevine tissues poor in nucleic acid content. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47: 181-185.
- 9- MacKenzie D.J., Mclean M.A., Mukerji S., and Green M. 1997. Improved RNA extraction from woody plants for the detection of viral pathogens by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 81:222-226.
- 10- Martelli G.P. 1993a. Grapevine degeneration - fanleaf. In: Martelli G.P. (ed). *Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis* pp. 9-18. Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome Italy.
- 11- Martelli G.P. 1993b. Graft-transmissible disease of grapevines. *Handbook for detection and diagnosis*. (Ed) G. P. Martelli (p. 263) FAO. Roma.
- 12- Naraghi-Arani P., Daubert S., and Rowhani A. 2001. Quasispecies nature of the genome of Grapevine fanleaf virus. *Journal of General Virology*, 82:1791-1795.
- 13- Noorinejad Zarqani Sh., Shamsbakhsh M., Sokhandan bashir N., and Pajoohandeh M. 2012. Identification and detection of Iranian osplates of Grapevine fanleaf virus using green-grafting and RT-PCR. *Iranian journal of Plant pathology*, 48:381-391.
- 14- Raski D.J., Goheen A.C., Lider L.A., and Meredith C.P. 1983. Strategies against Grapevine fanleaf virus and its nematode vector. *Plant Disease*, 67:335-340.
- 15- Ritzenthaler C., Viry M., Pinck M., Margis R., Fuchs M., and Pinck L. 1991. Complete nucleotide sequence and organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *Journal of General Virology*, 72:2357-2365.
- 16- Rowhani A., Chay C., Golino D.A., and Falk W. 1993. Development of a polymerase chain reaction technique for the detection of Grapevine fanleaf virus in grapevine tissue. *Phytopathology*, 83:749-753.
- 17- Rowhani A., Manangas M.A., Lile L.S., Daubert S.D., and Golino D.A. 1995. Development of a detection system for viruses of woody plants based on PCR analysis of immobilized virions. *Phytopathology*, 85: 47-352.
- 18- Salzman R.A., Fujita T., Zhu-Salzman K., Hasegawa P.M., and Bressan R.A. 1999. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17:11-17.
- 19- Sanfacon H., Wellink J., Le Gall O., Karasev A., van der Vlugt R., and Wetzel T. 2009. Secoviridae: a proposed family of plant viruses within the order Picornavirales that combines the families Sequiviridae and Comoviridae, the unassigned genera Cheravirus and Sadwavirus, and the proposed genus Torradovirus. *Arcives of Virology*, 154:899-907.
- 20- Tattersall E., Ergul A.R., AlKayal A.F., DeLuc L., Cushman J.C., and Cramer G.R. 2005. Comparison of methods for isolating high-quality RNA from leaves of grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56:400-407.
- 21- Tesniere C., and Vayda M.E. 1991. Method for the isolation of high-quality RNA from grape berry tissues without contaminating tannins or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter*, 9:242-251.
- 22- Vigne E., Komar V., and Fuchs M. 2004b. Field safety assessment of recombination in transgenic grapevines expressing the coat protein gene of Grapevine fanleaf virus. *Transgenic Research*, 13:165-179.
- 23- Vuittenz A. 1970. Fanleaf of grapevine. In: N. W. Frazier (ed). *Virus disease of small fruits and grapevine*. University of California, Berkeley, pp. 217-228.
- 24- Wetzel T.R., Jardak L., Meunier A., Ghorbel G., Reustle M., and Krczal G. 2002. Simultaneous RT-PCR detection and differentiation of arabis mosaic and Grapevine fanleaf nepovirus in grapevine with a single pair of primers. *Journal of General Virology*, 101: 63-69.