

مشکلات پیش روی تشخیص فیتوپلازماها با استفاده از آزمون Nested PCR

کبری مسلم خانی^{1*} - ساره بقایی راوری² - پژمان خدایگان³

تاریخ دریافت: 1394/2/15

تاریخ پذیرش: 1394/6/7

چکیده

توانمندی تشخیص و ردیابی صحیح فیتوپلازماها از گیاهان، اهمیت به سزایی در کنترل موثر این عوامل و جلوگیری از گسترش آنها از طریق مواد گیاهی آلوده دارد. استخراج DNA به گونه‌ای که کمترین مواد ممانعت کننده و بیشترین میزان ماده ژنتیکی فیتوپلازما حاصل گردد، در موفقیت آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و صحت نتایج حاصل از آن تاثیرگذار است. در این تحقیق، مقایسه روش‌های مختلف استخراج DNA نشان داد که استفاده از روش مناسب، در کاهش واکنش منفی کاذب اهمیت دارد. اما حتی در روش موفق استخراج DNA مبتنی بر استفاده از ستون نیز واکنش‌های منفی کاذب هرچند به تعداد اندک اما به صورت پراکنده وجود دارد. این امر می‌تواند ناشی از غلظت پایین و پراکنش نامنظم سلول‌های فیتوپلازمایی در بافت‌های گیاه میزبان باشد. بر اساس نتایج حاصل از تعیین توالی قطعه تکثیر شده با ترکیب آغازگری P1/P7-R16F2n/R16R2، واکنش مثبت دروغین در برخی تکرارهای آزمون Nested PCR به دست آمد. به منظور کاهش آلودگی‌های متقاطع و اجتناب از واکنش‌های مثبت دروغین، آزمون Single Tube Nested PCR بهینه سازی گردید. علیرغم دستیابی به محاسن مختلف این روش از جمله سهولت اجرا، صرفه جویی در هزینه و زمان و همچنین توان ردیابی بیمارگر در غلظت‌های پایین، متأسفانه واکنش‌های مثبت کاذب در تعداد کمی از نمونه‌ها همچنان مشاهده شد. در مجموع نتایج حاصل از روش Nested PCR با یک ترکیب آغازگری و به تنهایی برای ردیابی و ارزیابی‌های وسیع باغات و مزارع کفایت نمی‌کند و استفاده از ترکیبات پرایمری مختلف، تعیین توالی و یا هضم آنزیمی به منظور اجتناب از واکنش مثبت دروغین توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: چالش‌ها، ردیابی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

مقدمه

اسیدنوکلیتیک فیتوپلازماها توسعه یافته است (17). آغازگرهای عمومی طراحی شده بر اساس توالی‌های حفاظت شده (مانند توالی 16S rRNA و فاصله 16S-23S) با طیف کاربرد وسیع قادر به ردیابی انواع فیتوپلازماها بوده‌اند. برای نمونه آغازگرهای عمومی مانند P1/P7 (8) که این جفت آغازگر تمام طول 16S، فضای بین 16S-23S و قسمت کوچکی از ژن 23S rRNA را تکثیر می‌کند و محصول 1800 bp تولید می‌کند و همچنین آغازگرهای R16F2n/R16R2 (18) و FU5/RU3 (22) که قسمتی از ناحیه 16S rDNA را تکثیر می‌کنند و به ترتیب تولید محصولی با اندازه‌های حدود 1250 bp و 876 bp می‌کنند، بیشترین کاربرد را در ردیابی آلودگی‌های مختلف فیتوپلازمایی داشته‌اند. از آنجایی که برخی از این آغازگرها از نظر توالی مشابهت با توالی ناحیه 16S کلروپلاست و پلاستیدها دارند، لذا امکان مشاهده واکنش مثبت کاذب (False positive reaction) وجود دارد (13). مشکل دیگری که در ردیابی فیتوپلازماها بوسیله PCR بسیار شایع است وجود ممانعت کننده‌های گیاهی است که مانع از عملکرد صحیح PCR می‌شود و واکنش منفی دروغین (False negative reaction) را باعث می‌گردد (13، 19 و 28).

فیتوپلازماها گروهی از پروکاریوت‌های بدون دیواره سلولی در رده مولیکوت‌ها هستند که جهت استقرار در آوند آبکش گیاهان و پیکره‌ی حشرات ناقل سازگار شده‌اند (16). تشخیص دقیق و حساس فیتوپلازماها با توجه به خسارات قابل تأمل آن‌ها در برخی محصولات کشاورزی به عنوان یک پیش‌نیاز ضروری مطرح است و باعث کارآمدی راهبرد ممانعت از گسترش بیماری می‌گردد همچنین به عنوان یک نیاز اولیه در مطالعات اپیدمیولوژیک بیماری و مدیریت آن مطرح است (2). از آنجایی که تشخیص این عوامل به دلیل غیر قابل کشت بودن با مشکلات عدیده‌ای همراه بوده است، امروزه روش‌های جدید سرولوژیکی و نیز روش‌هایی بر پایه تشخیص

1- استادیار موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

* - نویسنده مسئول: (Email: Moslemkhany@yahoo.com)

2- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

3- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر رفسنجان (عج)

دقیقه در 13000rpm انجام شد و از رسوب حاصله در مراحل بعدی استخراج استفاده گردید.

آزمون PCR آشیانه‌ای (Nested PCR)

آزمون PCR آشیانه‌ای با استفاده از جفت آغازگرهای P1/P7 و جفت آغازگرهای درونی R16F2n / R16R 2 و FU5/RU3 به صورت دو مرحله‌ای (11) و یک مرحله‌ای (Single Tube Nested PCR) انجام شد (27).

شرایط آزمون Nested PCR یک مرحله‌ای

آزمون Single Tube Nested PCR (STNP) با استفاده از یک جفت آغازگر بیرونی P1/P7 و جفت آغازگر درونی R16F2n/R16R2 در یک تیوب بهینه سازی گردید. حجم نهایی مخلوط واکنش PCR 50 میکرولیتر شامل 3 میکرولیتر DNA الگو، جفت آغازگر بیرونی P1/P7 هر یک با غلظت 0/1 میکرومولار، آغازگرهای درونی R16F2n/ R16R2 یا fU5/rU3 (جدول 1) هر یک با غلظت 0/3 میکرومولار، 4 میلی‌مولار MgCl2، 0/4 میلی‌مولار از مخلوط نوکلئوتیدی (dNTP)، 5 میکرولیتر بافر با غلظت پایه 10X و 3 واحد از آنزیم Taq DNA Polymerase بود. چرخه دمایی PCR عبارت بود از یک برنامه یک چرخه‌ای شامل دمایی 94 درجه سلسیوس به مدت 4 دقیقه و یک برنامه 40 چرخه‌ای شامل دمایی 94 درجه سلسیوس به مدت 35 ثانیه، دمایی 53 درجه سلسیوس به مدت 35 ثانیه و دمایی 72 درجه سلسیوس به مدت 45 ثانیه. چرخه نهایی در دمایی 72 درجه سلسیوس به مدت 5 دقیقه انجام شد. محصول PCR در ژل آگاروز 1/5 درصد بوسیله رنگ آمیزی با Gel Red مورد ارزیابی قرار گرفت.

خالص سازی DNA از ژل و توالی یابی

محصولات تکثیر یافته دو جفت آغازگر R16F2n/R16R2 و fU5/rU3 (حاصل از DNA استخراج شده با روش مبتنی بر ستون) با استفاده از کیت خالص سازی DNA از ژل (کیژن) جدا و خالص شدند و جهت تعیین توالی (توسط شرکت بایونیر کره جنوبی) و هضم آنزیمی مورد استفاده قرار گرفتند.

آنالیز توالی‌های بدست آمده

توالی هر یک از قطعات تکثیر شده در PCR با اندازه مورد نظر با استفاده از الگوریتم BLASTn با توالیهای نوکلئوتیدی ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی مقایسه شد و با استفاده از Clustalw مورد آزمون هم‌ردیفی قرار گرفت.

استفاده از روش‌های تشخیصی دقیق، قابل اطمینان و مقرون به صرفه از پیش نیازهای اساسی فرایند گواهی سلامت درختان مادری، نهالستانها و مواد تکثیر شونده رویشی با هدف کنترل گسترش بیماری‌های فیتوپلاسمایی در سطح باغات کشور، به شمار می‌رود (26 و 32). اما با توجه به حجم بسیار بالای نمونه‌های گیاهی مورد ارزیابی در فرایند گواهی سلامت که عمدتاً فاقد علائم شاخص بیماری فیتوپلاسمایی هستند و می‌توانند بالقوه به عنوان منابع اولیه آلودگی در باغات جدید الاحداث ایفای نقش کنند، انجام آزمون‌های گران قیمتی چون RFLP و توالی یابی به دنبال Nested PCR برای تشخیص نوع فیتوپلاسمای ردیابی شده در کلیه نمونه‌ها مقرون به صرفه نمی‌باشد، لذا به منظور استفاده از آزمون Nested PCR به تنهایی، لازم است میزان اطمینان پذیری این روش در ردیابی واقعی آلودگی فیتوپلاسمایی (بدون در نظر گرفتن نوع فیتوپلاسمای) در شمار زیادی نمونه تعیین گردد، لذا مقاله حاضر به بررسی نقاط ضعف و اشکالات پیش روی استفاده از این روش پرداخته است.

مواد و روش‌ها

نمونه های گیاهی

یک نمونه لیموترش با علائم اختصاصی جارویی و ریزبرگی که آلودگی آنها به فیتوپلاسمایی *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* با استفاده از PCR-RFLP و توالی‌یابی محرز شده بود از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی دریافت گردید و به عنوان کنترل مثبت در کلیه آزمایشات استفاده شدند. همچنین نمونه‌ی گیاهی سالم و فاقد علائم به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

روشهای استخراج DNA

استخراج DNA، به دو صورت کلی انجام شد. در یک آزمون مستقیماً 0/5 گرم از رگبرگ‌های پودر شده گیاه آلوده و در آزمون دیگر از محصول مرحله پیش تیمار (1) جهت استخراج DNA استفاده شد. سپس با استفاده از پنج روش ژانگ و همکاران (36)، کیت تجاری استخراج DNA شرکت فرمنتاس، روش لیوپ و همکاران (21)، روش پاستریک و میز (30) و کیت تجاری Genet Bio مبتنی بر استفاده از ستون، استخراج DNA صورت گرفت.

مرحله پیش تیمار با تغییراتی در روش آرنز و سیمولار در حجم کم انجام شد (1). برای این منظور ابتدا نیم گرم از رگبرگ پودر شده گیاه آلوده در 1800 میکرولیتر بافر پیش تیمار به مدت 15 دقیقه در یخ قرار داده شد. بافر ذکر شده حاوی 125mM فسفات پتاسیم، 30mM آسکوربیک اسید، 10 درصد سوکروز، 0/15 درصد بوین سرم آلبومین و 1/5 درصد PVP₂₅ است. پس از ترکیب نمودن بافر و محتویات تیوب، سانتریفوژ در چهار درجه سانتی‌گراد به مدت 25

جدول 1- اطلاعات مربوط به پرایمرهای مورد استفاده در آزمون‌های Nested PCR

منبع Reference	جایگاه Position	توالی آغازگر Sequence	نام آغازگر Primer name
8	16S rDNA	5' -AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'	P1
	23S rDNA	5' -CGTCCTTCATCGGCTCTT-3' 5' -GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'	P7
18	16S rDNA	5' -TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'	R16F2n
	16S rDNA		R16R2
22	16S rDNA	5' -CGGCAATGGAGGAAACT-3'	fU5
	16S rDNA	5' -TTCAGCTACTCTTTGTAACA-3'	rU3

نتایج و بحث

آن باعث کاهش تکثیر قطعه هدف می‌گردد. از طرفی این ممانعت کننده‌ها می‌توانند به محل هدف آنزیم Taq DNA Polymerase متصل شوند و یا بصورت مستقیم از فعالیت این آنزیم ممانعت نمایند (25). لذا این ممانعت کننده‌ها می‌توانند نتایج کمی اشتباه و یا نتایج منفی دروغین را باعث شوند (29).

در مجموع انتخاب روش استخراج مناسب به میزان زیادی در اطمینان‌پذیری نتایج تشخیص تاثیر گذار می‌باشد. روش‌های مبتنی بر CTAB قادر به حذف موفق عناصر ممانعت کننده در برخی گونه‌های گیاهی نبوده (7 و 9) و استفاده از این روش‌ها در تحقیق حاضر نیز عملکرد مناسبی در حذف کامل ممانعت کننده‌ها از درخت لیموترش را نداشته است در حالیکه در روش مبتنی بر ستون به دلیل عدم استفاده از موادی مانند فتل و کلروفورم که به شدت باعث اختلال در عملکرد PCR می‌شوند، واکنش منفی دروغین کاهش بسیار چشمگیری داشت، همچنین با توجه به اینکه این ستون‌ها قابلیت بالایی در جذب DNA دارند قادرند ضمن حذف بسیاری از عناصر نامطلوب، در مقایسه با سایر روش‌های سنتی استخراج، DNAیی با کیفیت و کمیت بسیار بالاتری تولید کنند.

به منظور اطمینان از صحت نتایج تعدادی از باندهای محصول Nested PCR R16F2n/R16R2 و fU5/rU3 مربوط به آزمون Nested PCR جهت توالی‌یابی و هضم آنزیمی استفاده شدند. بر اساس نتایج توالی-یابی و هضم آنزیمی ردیابی صحیح فیتوپلازما متعلق به گروه 16SrII محرز گشت. اما در برخی از نمونه‌های سالم و بدون علائم که با استفاده از کیت مبتنی بر ستون استخراج DNA انجام شده بود، قطعاتی با اندازه‌ی نزدیک به 1250bp در محصول R16F2n/R16R2 مشاهده شد در حالیکه با استفاده از آغازگرهای fU5/rU3 هیچ باندهای مشاهده نگردید.

تحقیق حاضر در تأیید گزارشات برخی محققین نشان داد که انتخاب روش استخراج مناسب در اطمینان‌بخشی نتایج ردیابی فیتوپلازماها حائز اهمیت است (4). مرحله پیش تیمار به کار گرفته شده در غالب نمونه‌ها تاثیری در ارتقاء کیفیت و کمیت DNA نداشت. البته در مورد روش ساده‌ای چون روش لیوپ و همکاران که فاقد برخی از مراحل معمول استخراج DNA است و همچنین به دلیل وجود ناخالصی‌های زیاد، استفاده از پیش غنی سازی موثر واقع گردید و استفاده از موادی مانند PVP، آسکوربیک اسید و BSA باعث غیر فعال شدن برخی ممانعت کننده‌های گیاهی شد و به تبع آن دقت ردیابی و تکرار پذیری نتایج در این روش افزایش یافت (جدول 2). با عنایت به اینکه نمونه‌های گیاهی مورد استفاده در کلیه آزمایشات نمونه‌های فریز شده بودند و غنی سازی تاثیر مثبتی بر افزایش غلظت DNAی استخراج شده از این نمونه‌ها نداشت، لذا به نظر می‌رسد فرایند غنی سازی تنها برای بافت‌های تازه موثر است (12) و کارایی لازم برای نمونه‌های فریز شده را ندارد. کمیت و کیفیت DNAهای حاصل از روش‌های مختلف، تفاوت مشخصی نشان دادند، کمترین کمیت و کیفیت مربوط به روش لیوپ و همکاران بود در حالیکه در روش مبتنی بر ستون در مقایسه با سایر روش‌ها بیشترین کمیت و کیفیت و کمترین واکنش‌های منفی دروغین در آزمون Nested PCR مشاهده گردید. وجود واکنش‌های منفی دروغین می‌تواند ناشی از وجود ممانعت کننده‌های فراوان در نمونه‌های بیولوژیکی باشد (15). گونه‌های مختلف گیاهی خصوصاً گیاهان چوبی دارای غلظت‌های مختلفی از متابولیت‌های ثانویه، پلی‌ساکاریدها و پلی‌فنل‌ها هستند که قابلیت ایجاد اختلال در واکنش PCR را دارند (3 و 35).

ممانعت کننده‌ها مانع فعالیت کوفاکتور Mg^{2+} در PCR می‌شوند. Mg^{2+} ضمن اینکه با dNTP یک ترکیب قابل حل ایجاد می‌کند، باعث تحریک فعالیت Taq DNA Polymerase می‌گردد و کمبود

جدول 2- نتایج PCR و Nested PCR نمونه‌های DNA استخراج شده از درخت لیمو ترش آلوده به فیتوپلازما *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* با پنج روش مختلف استخراج

Table 2- PCR and Nested PCR results of DNA samples that extracted from Lime infected with *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* by five different DNA extraction methods

روش استخراج Extraction method	PCR (P1/P7)	Nested PCR (R16F2n/R16R2)	Nested PCR (fU5/rU3)	STNP (P1/P7- R16F2n/R16R2)
کیت مبتنی بر استفاده از ستون (+PT)	+/-	+/-	+	ND
Column based kit (+PT)				
کیت مبتنی بر استفاده از ستون (-) (PT)	+/-	+/-	+	-/+
Column based kit (-PT)				
کیت فرمتاس (بدون ستون) (+PT)	+/-	+/-	+	ND
Kit without Column (+PT)				
کیت فرمتاس (بدون ستون) (-PT)	-	+/-	+	-/+
Kit without Column (-PT)				
ژانگ و همکاران (36) (+PT)	+/-	+/-	+	ND
(+PT) (36) Zhang <i>et al</i>				
ژانگ و همکاران (36) (-PT)	-	+/-	+	-/+
(-PT) (36) Zhang <i>et al</i>				
لیوپ و همکاران (21) (+PT)	+/-	+/-	+	ND
(+PT) (21) Liop <i>et al</i>				
لیوپ و همکاران (21) (-PT)	-	-	-	ND
(-PT) (21) Liop <i>et al</i>				
پاستریک و میز (30) (+PT)	-	-	+	ND
Pastrik and Maiss (+PT) (30)				
پاستریک و میز (30) (-PT)	-	-	+	ND
Pastrik and Maiss (-PT) (30)				

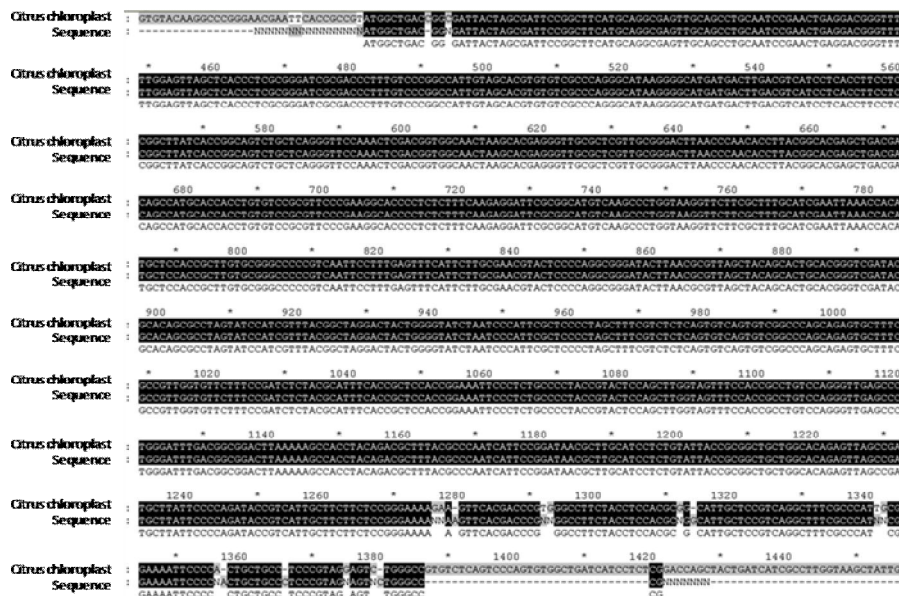
+PT: با پیش تیمار -PT: بدون پیش تیمار ND: بررسی نشد +: ردیابی شد -: ردیابی نشد +/-: تنها در برخی نمونه ها ردیابی شد
Detected in some samples: +/-; Not detected: -; Detected: +; Not determined: ND; without pre treatment: -PT; with pre treatment: +PT.

مثبت دروغین گزارش شده در این مقاله با استفاده از آغازگر R16F2n/R16R2، تاکنون تکثیر قطعه غیراختصاصی با استفاده از آغازگرهای P1/P7، Pc399/Pc1694، P1/U3 و P1/P7-M1/P7-PCR بوسیله آغازگرهای P1/P7-16R758F/16R1232R، P1/P7-fU5/rU3، Pc399/Pc1694 گزارش شده است (10 و 34).

ردیابی فیتوپلازماها به ویژه در گیاهان چوبی به دلیل غلظت پایین و پراکنش نامنظم آن در بافت‌های میزبان کار دشواری است (31). اما استفاده از آزمون nested PCR که حساسیت و دقت تشخیص را خصوصاً در نمونه‌هایی با تیتراژ پایین افزایش می‌دهد و همچنین به دلیل دو مرحله‌ای بودن غلظت ممانعت کننده‌هایی که موجب اختلال در کارایی PCR می‌شوند را کاهش می‌دهد (24 و 20)، می‌تواند بسیار کارآمد باشد.

لذا این قطعات پس از جداسازی، خالص سازی و تعیین توالی با استفاده از الگوریتم BLASTn که توالی‌های نوکلئوتیدی را با توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت شده در پایگاه اطلاعاتی مقایسه می‌کند مطابقت داده شدند و نتایج حاکی از واکنش مثبت دروغین با قسمتی از ژنوم مربوط به گیاه بود. توالی حاصله بیش از 99 درصد شباهت به کلروپلاست *Citrus sinensis* نشان داد (شکل 1).

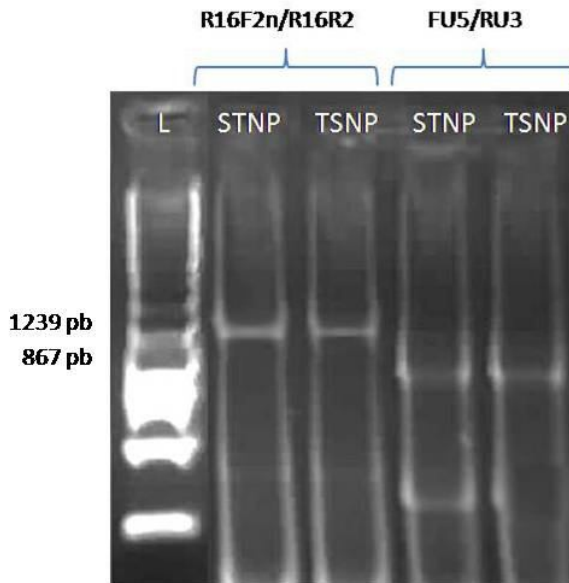
مشکل مهم و قابل تأمل دیگر در استفاده از آزمون PCR، وجود نتایج مثبت دروغین است. در سال‌های اخیر عمدتاً از آغازگرهایی که بر پایه توالی ژن rRNA 16S طراحی شده‌اند، در ردیابی فیتوپلازماها استفاده شده است (14، 33) که البته این ژن در گیاهان وجود ندارد (1، 6 و 11) اما با توالی ناحیه 16S کلروپلاست و پلاستیدها در گیاهان شباهت‌های زیادی دارند که این شباهت‌ها بروز واکنش‌های مثبت کاذب را امکانپذیر می‌نماید (13). علاوه بر نتایج



شکل 1- هم‌ردیفی توالی نوکلئوتیدی قطعه 1250bp~ حاصل از آزمون Nested PCR با آغازگرهای P1/P7- R16F2n/R16R2 مربوط به نمونه

فاقد علامت با توالی نوکلئوتیدی کلروپلاست *Citrus sinensis*

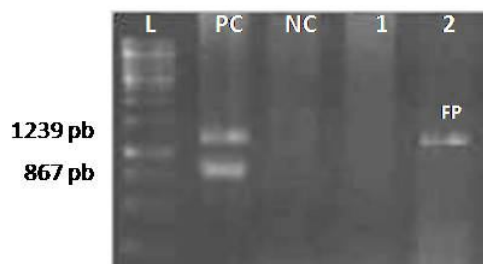
Figure 1- Alignment of ~1250 bp nucleotide sequence obtained by Nested PCR using P1/P7- R16F2n/R16R2 from non infected sample with chloroplast sequence of *Citrus sinensis*



شکل 2- نتایج آزمون Nested PCR دو مرحله‌ای (Two Step Nested PCR, TSNP) در مقایسه با آزمون یک مرحله‌ای (Single Tube Nested PCR, STNP) با استفاده از آغازگرهای P1/P7-FU5/rU3 و P1/P7-R16F2n/R16R2 در ردیابی فیتوپلاسما از نمونه لیموترش آلوده به جاروی

جادوگر. ستون L: مارکر 1Kb

Figure 2- Results of Two Step Nested PCR (TSNP) in comparison with Single Tube Nested PCR (STNP) using P1/P7-FU5/rU3 and P1/P7-R16F2n/R16R2 primers in detection of phytoplasma from lime infected with lime witches broom. L: 1KB ladder



شکل 3- واکنش مثبت کاذب (FP) در استفاده از ترکیب آغازگری P1/P7- R16F2n/R16R2 (با محصول 1239bp) و P1/P7- fU5/rU3 (با محصول 867 bp) در آزمون Nested PCR یک مرحله‌ای در نمونه لیمو ترش. ستون L: مارکر 1Kb، PC: کنترل مثبت، NC: کنترل منفی

Figure 3- False positive reaction was observed (FP) in using primer combination P1/P7- R16F2n/R16R2 (product is 1239bp) and P1/P7- fU5/rU3 (product is 867 bp) in Single Tube Nested PCR assay in lime sample. L: 1Kb ladder; PC: Positive control; NC: Negative control

واقع نگردید.

با وجود اینکه واکنش مثبت و منفی دروغین، استفاده از روش‌های مبتنی بر PCR را در تشخیص عوامل فیتوپلاسمایی با مشکلاتی همراه ساخته است، اما به دلیل غیر قابل کشت بودن فیتوپلاسمها و توانایی این روش‌ها در ردیابی جمعیت‌های بسیار پایین بیمارگر در بافت‌های گیاهی، همچنان روش‌های مبتنی بر PCR به‌عنوان ابزار اصلی در شناسایی و مطالعات اپیدمیولوژیک فیتوپلاسمها مورد توجه هستند (23). بنابراین در راستای مرتفع نمودن این مشکلات دستیابی به روش استخراج مناسب و استفاده از روش‌های تکمیلی مانند هضم آنزیمی، تعیین توالی و یا استفاده از چند آغازگر در ردیابی بیماری ضروری و اجتناب ناپذیر به نظر می‌رسد.

اما برخی محققان دو مرحله‌ای بودن PCR را عاملی در ایجاد آلودگی بیشتر و افزایش بروز خطا و واکنش مثبت کاذب می‌دانند (5). نتایج STNP بهینه سازی شده در این تحقیق نشان داد که روش یک مرحله‌ای مزایایی نسبت به روش دو مرحله‌ای دارد که از جمله می‌توان به سهولت اجرا، صرفه جویی در هزینه و زمان و همچنین توان ردیابی بیمارگر در حد روش دو مرحله‌ای (شکل 2) اشاره نمود اما برخلاف انتظار واکنش‌های مثبت کاذب در این روش نیز، مشاهده شده است (شکل 3)، لذا به نظر می‌رسد بیشتر این واکنش‌های مثبت کاذب ناشی از تکثیر توالی‌های ناحیه 16S کلروپلاست و پلاستید گیاه باشد تا سایر میکروارگانیسم‌ها. لذا nested PCR یک مرحله‌ای علیرغم تمامی محاسنی که دارد در کاهش واکنش مثبت کاذب موثر

منابع

- Ahrens U. and Seemuller E. 1992. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene. *Phytopathology*, 82: 828-832.
- Berges R., Rott M. and Seemüller E. 2000. Range of phytoplasma concentrations in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 90:1145-1152
- Borah B.K., Johnson A., Sai Gopal D.V.R. and Dasgupta I. 2008. A comparison of four DNA extraction methods for the detection of *Citrus yellow mosaic badna virus* from two species of citrus using PCR and dot-blot hybridization. *Journal of Virological Methods*, 151: 321-324.
- Cankar K., Stebih D., Dreo T., Źel J. and Gruden K. 2006. Critical points of DNA quantification by real-time PCR – Effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. *BMC Biotechnology*, 6: 37-51.
- Christensen N.M., Nyskjold H. and Nicolaisen, M. 2013. Real-time PCR for universal phytoplasma detection and quantification. *Methods in Molecular Biology*, 938:245-52.
- Davis R.E. and Lee M. 1993. Cluster-specific polymerase chain reaction amplification of 16S rDNA sequences for detection and identification of mycoplasma like organisms. *Phytopathology*, 83: 1008-1001.
- Davis T.M., Yu H. Haigis K.M. and McGowan P.J. 1995. Template mixing: A method of enhancing detection and interpretation of codominant RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 91:582-588
- Deng S.J. and Hiruki C. 1991. Amplification of 16S ribosomal-RNA genes from culturable and

- nonculturable mollicutes. *Journal of Microbiological Methods*, 14:53–61
- 9- Doyle J.J. and Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin*, 19:11-15.
 - 10- Franova J. 2011. Difficulties with conventional phytoplasma diagnostic using PCR/RFLP analyses. *Bulletin of Insectology*, 64: 287-288
 - 11- Gundersen D.E. and Lee I.M. 1996. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer sets. *Phytopathologia Mediterranea*, 35: 144-151.
 - 12- Harrison N.A., Griffiths H.M., Carpio M.L. and Richardson P.A. 2001. Detection and characterization of an elm yellows (16SrV) group phytoplasma infecting Virginia creeper plants in southern Florida. *Plant Disease*, 85: 1055–1062
 - 13- Heinrich M., Botti SCaprara L., Arthofer W. and Strommer S. 2001. Improved detection methods for fruit tree phytoplasmas. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 169-179.
 - 14- Javaheri M., Ghareyazie B., Delkhosh H.R. and Rahimian H. 2000. Detection of witches' broom infected citrus trees using polymerase chain reaction. P.147. Proceeding of 14th Iranian Plant Protection Congress. 5-8 Sept. 2000, Esfahan. Iran. (in Persian with English abstract).
 - 15- Jiang J., Aldeisio A.K., Singh A. and Xiao L. 2005. Development of Procedures for Direct Extraction of *Cryptosporidium* DNA from Water Concentrates and for Relief of PCR Inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1135–1141.
 - 16- Lee I.M. and Davis R.E. 1986. Prospects for in vitro culture of plant-pathogenic mycoplasma like organisms. *Annual Review of Phytopathology*. 24:339-354.
 - 17- Lee I-M., Davis R.E. and Gundersen-Rindal D.E. 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54:221–255
 - 18- Lee I-M, Hammond R.W., Davis R.E. and Gundersen D.E. 1993. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma like organisms. *Phytopathology*, 83: 834-842.
 - 19- Lepka P., Stitt M., Moll E. and Seemuller E. 1999. Effect of phytoplasmal infection on concentration and traslocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55: 59–68.
 - 20- Leyva-Lopez NE, Ochoa-Sanchez JC, Leal-Klevezas DS, Martinez-Soriano JP. (2002). Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico. *Canadian Journal of Microbiology*, 48: 1062-1068.
 - 21- Liop P., Bonaterra A., Peñalver J. and Lopez M.M. 2000. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2071- 2078.
 - 22- Lorenz K.H., Schneider B., Ahrens U. and Seemuller E. 1995. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of Ribosomal and non-ribosomal DNA .*Phytopathology*, 85:771-776
 - 23- McGarvey P. and Kaper J.M. 1991. A simple and rapid method for screening transgenic plants using the PCR. *BioTechniques*, 11:428–432.
 - 24- Marzachi C. 2004. Molecular diagnosis of phytoplasmas. *Phytopathologia Mediterranea*, 43: 228-231.
 - 25- Mayr W., Winidhorst S. and Hillemeier K. 2005. Antiproliferative plant and synthetic polyphenolics are specific inhibitors of vertebrate inositol-1,4,5-trisphosphate 3-kinases and inositol polyphosphate multikinase. *Journal of Biological Chemistry*, 280: 13229–13240.
 - 26- Mirzaee M., Heydarnejad J., Saleh M. Hosseini Pour A., Massumi H. and Shabani M. 2010. production of polyclonal antiserum against the causal agent of lime witches'-broom. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 45:155- 159. (in Persian with English abstract).
 - 27- Moslemkhani C., Razavi V., Sadeghi L, Mobasser S, Khelgati bana F. and Shahbazi R. 2014. Characterization of phytoplasmas associated with tomato big bud disease, using single-tube nested PCR. *Journal Crop Protection*, 3:573-580
 - 28- Musetti R., Favali A. and Pressacco L. 2000. Histopathology and polyphenol content in plants infected by phytoplasmas. *Cytobios*, 102: 133–147.
 - 29- Nolan T., Hands R.E., Ogunkolade W. and Bustin S. 2006. SPUD: A quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparation. *Analytical Biochemistry*, 351: 308-310.
 - 30- Pastrik K.H. and Maiss E. 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tubers by polymerase

- chain reaction. *Journal of Phytopathology*, 148: 619-626.
- 31- Sadeghi A., Salehi M., Faghihi M.M., Bagheri A.N. and Samavi S. 2010. Detection of witches'broom disease of lime phytoplasma in crown region by PCR during latentperiod of the disease. p. 517. *Proceeding of 19th Iranian Plant Protection Congress*, 31 Jul -3 Aug. 2010, Tehran, Iran. (in Persian with English abstract)
- 32- Shahryari F., Shams-Bakhsh M., Safarnejad M.R., Safaie N. and Ataei Kachooie S. 2013. Preparation of Antibody against Immunodominant Membrane Protein (IMP) of *Candidatus Phytoplasma aurantifolia*. *Iranian Journal of Biotechnology* 11: 14-21.
- 33- Siampour M., Izadpanah K., Afsharifar A.R. Salehi M. and Taghizadeh M. 2006. Detection of phytoplasma in insects collected in witches' broom affected lime groves. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 42: 139-158 .(in Persian with English abstract)
- 34- Wally V., Klausegger A., Koller U., Lochmuller H., Krause S., Wiche G., Mitchell L.G., Hintner H. and Bauer J.W. 2008. 5' trans-splicing repair of the PLEC1 gene. *Journal of Investigative Dermatology*. 128 (3): pp. 568-574.
- 35- Wei T., Lu G. and Clover G. 2008. Novel approaches to mitigate primer interaction and eliminate inhibitors in multiplex PCR, demonstrated using an assay for detection of three strawberry viruses. *Journal of Virological Methods*, 151: 132-139.
- 36- Zhang Y P, Uymoto J K, and Kirkpatrick B C. (1998) A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytoplasmas for PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 71: 45-50.