جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان حفظ نباتات کشور

راهنمای شناسائی و ردیابی

آفت قرنطینه خارجی

بیماری فیتوپلاسمای زردی کشنده خرما

Palm lethal yellows phytoplasma

Acholeplasmatales:Acholeplasmataceae

تهیه و تنظیم:

احمد چراغیان

دفتر پایش و تحلیل خطر

1404

بیماری فیتوپلاسمائی زردی کشنده خرما

Palm lethal yellowing phytoplasma

Domain: Bacteria
Phylum: Firmicutes
Class: Mollicutes Order:
Acholeplasmatales Family:
Acholeplasmataceae

Other scientific names:

Coconut lethal yellowing phytoplasma
Coconut lethal yellowing mycoplasma-like organism

Common name:

Lethal yellowing of coconut

اهمیت اقتصادی:

مناطق حوزه اقیانوس اطلس، رایج ترین اکوتیپ نارگیل در سراسر منطقه کارائیب و سواحل اقیانوس اطلس قاره آمریکا (هریس، a1978)، بسیار مستعد ابتلا به بیماری LY است. در طول سه دهه گذشته، حداقل 50 درصد از تخمین زده شده یک میلیون نخل نارگیل فلوریدا و بیش از 80 درصد از پنج میلیون نخل نارگیل جامائیکا توسط LY حذف شده اند (McCoy et al., 1983). تلفات اپیدمی مشابه نارگیل به LY در جنوب مکزیک تکرار می شود (Oropeza و Zizumbo، 1997). اگرچه به ندرت نخل‌های کمتر از 5 سال را مبتلا می‌کند، اما این بیماری از ایجاد مجدد اکوتیپ‌های بسیار حساس نارگیل در مکان‌های آندمیک LY مانند فلوریدا و جامائیکا جلوگیری می‌کند.

میزبانها:

درختان خرما مهمترین میزبان این بیماری می باشند، لیست کلی میزبانها به شرح ذیل می باشد

Major hosts:

Cocos nucifera (coconut)

Minor hosts:

Arenga engleri , *Borassus flabellifer* (toddy palm), *Caryota mitis* , *Chrysalidocarpus cabadae* ,*Corypha utan* (gebang palm), *Dictyosperma album* , *Howea forsteriana* (paradise palm), *Hyophorbe verschaffeltii* (spindle palm), *Latania* , *Livistona chinensis* (chinese fan-palm), *Livistona rotundifolia* , *Phoenix canariensis* (palm (Canary Island)), *Phoenix dactylifera* (date-palm), *Phoenix reclinata* (senegal date palm), *Phoenix sylvestris* (east Indian wine palm), *Trachycarpus fortunei* (chinese windmill palm), *Veitchia macdanielsii* , *Veitchia merrillii* (christmas palm).

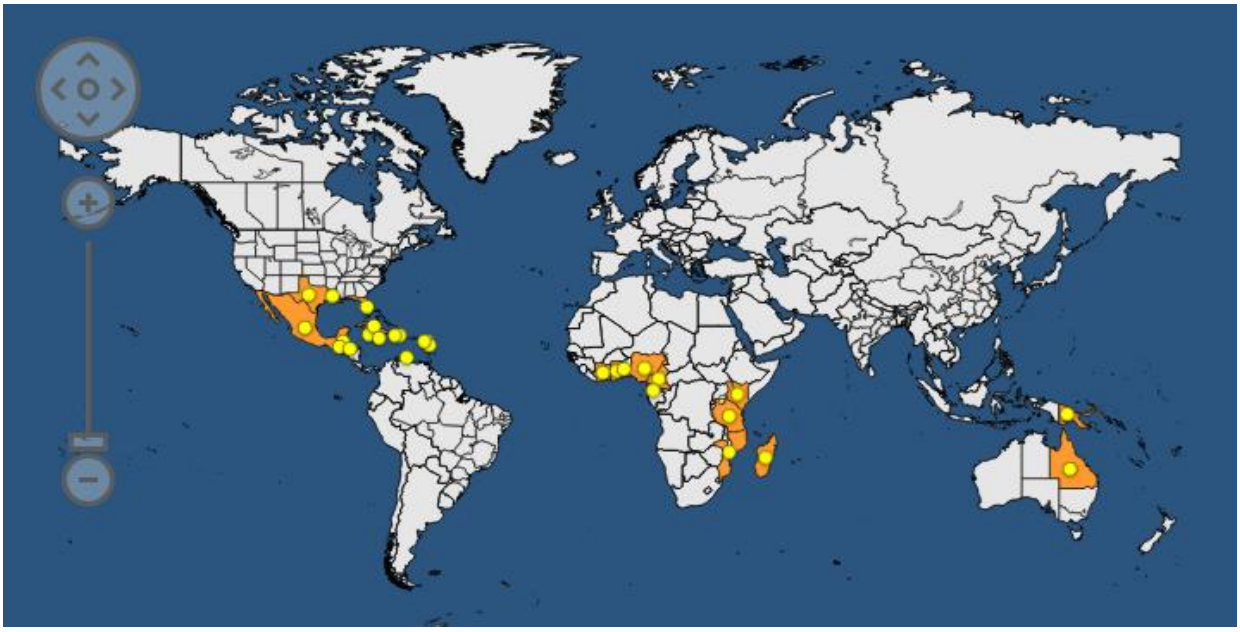
پراکنش جغرافیائی:

آفریقا: کامرون،غنا،کنیا،ساحل عاج،ماداگاسکار،موزامبیک،نیجریه،تانزانیا،توگو،

آمریکای شمالی: آمریکا،مکزیک

آمریکای مرکزی و حوزه کارائیب: آنتیگوا و باربادو،بلیز، کوبا،جمهوری دومنیکن،هائیتی،هندوراس،

اقیانوسیه: استرالیا



نقشه پراکنش بیماری فیتوپلاسمائی زردی کشنده خرما

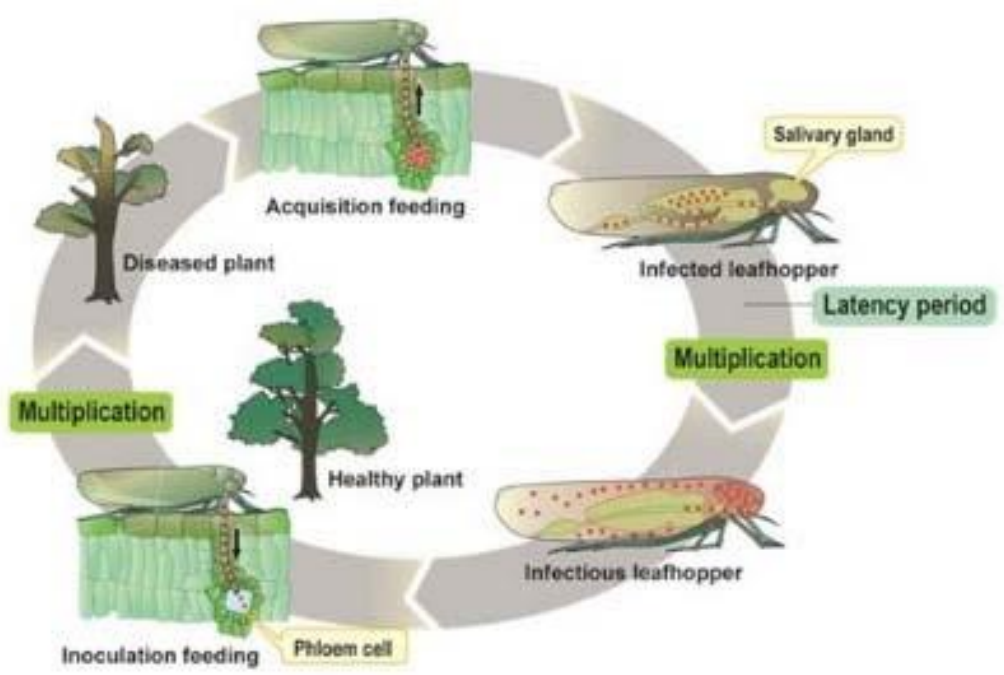
زیست شناسی:

انتقال

فیتوپلاسماها به روشی پایدار (گردشی-ازدیاد) عمدتاً توسط حشرات ناقل متعلق به خانواده های Cicadelloidea (leafhoppers) و Fulgoroidea (planthoppers) منتقل می شوند (D'Arcy و Nault، 1982).

Myndus crudus ناقل اولیه نخل LY در فلوریدا هوارد و همکاران، 1983، 1984 است. پراکنش این گونه گیاه خوار نیز با محدوده جغرافیایی شناخته شده بیماری همزمان است (هوارد، 1983). اگرچه این ارتباط قویاً از نقش *M. crudus* به عنوان ناقل LY در سایر نقاط منطقه کارائیب حمایت می کند، انتقال موفقیت آمیز بیماری LY با استفاده از این گونه در مکان های جغرافیایی خارج از فلوریدا هنوز نشان داده نشده است (Eden-Green, 1995).

.



Phytoplasma Life Cycle

گسترش:

دو نوع گسترش مشخص کننده شیوع اولیه بیماری نخل LY است. یکی شامل ظهور علائم در ابتدا بر روی یک یا دو کف دست است، و به دنبال آن گسترش موضعی بیشتر در یک الگوی بی‌حسی در اطراف این کانون فعال بیماری است که در نهایت مستعدترین کف دست‌ها را در محل مورد نظر قرار می‌دهد. از این تمرکز اولیه، نوع دوم گسترش به صورت مجموعه ای از پرش های چند تا 100 کیلومتری یا بیشتر رخ می دهد، بنابراین کانون های بیماری جدیدی ایجاد می شود که از آن الگوی محلی گسترش تکرار می شود (McCoy et al., 1976). با توجه به تخمین های انتشار محلی نخل-توپالم در شهرستان Dade، فلوریدا (مک کوی و همکاران، 1983)، هر نخل نارگیل آلوده برای تلقیح 4.6 نخل جدید در طول یک دوره 8 ماهه پس از ایجاد کانون های بیماری اولیه خدمت کرد. در طی 2 سال، زمانی که مرحله لگاریتمی انتشار به خوبی در حال انجام بود، هر نخل آلوده به عنوان مخزن تلقیح برای عفونت 9.3 نخل جدید عمل کرد. در سایت های محلی در جنوب شرقی فلوریدا، نرخ آشکار گسترش LY به طور کلی در میان نخل های واقع در مجاورت خط ساحلی در مقایسه با نخل های موجود در سایت های داخلی تحت نگهداری فرهنگی بالا کمتر بود. تفاوت در میزان شیوع بیماری در مکان های جغرافیایی مختلف نیز مورد توجه قرار گرفته است.

علائم خسارت:

بیماری زردی کشنده نخل شامل یک مرحله نهفته (انکوباسیون) طولانی مدت است. زمان از عفونت اولیه تا ظهور علائم آشکار آشکار در نخل های نارگیل جوان و بدون بارور بین 112 تا 262 روز تخمین زده شده است (دابک، 1975). حدود 80 روز قبل از ظهور علائم، رشد کف دست های آلوده تحریک می شود. به دنبال آن یک دوره کاهش تدریجی و سپس مهار کامل رشد حدود یک ماه قبل از پایان مرحله جوجه کشی دنبال می شود.

علائم قابل مشاهده در اکوتیپ نارگیل قد بسیار حساس اقیانوس اطلس (همچنین به عنوان قد جامائیکا شناخته می شود) از نظر زمانی شامل ریزش زودهنگام همه میوه ها (آجیل) صرف نظر از مرحله رشد آنها است. آجیل سقط شده اغلب پوسیدگی انتهای کاسه گل قهوه ای مایل به سیاه ایجاد می کند که باعث کاهش زنده ماندن بذر می شود. ریزش زودرس با نکروز گل آذین همراه یا به دنبال آن است. این علامت بعدی به راحتی با بیرون آمدن گل آذین های تازه بالغ از اسپات پوششی مشاهده می شود. به طور معمول به رنگ زرد روشن تا کرمی سفید، گل آذین آسیب دیده در عوض تا حدی سیاه شده (نکروز) معمولا در نوک سنبلچه های گل. با پیشرفت بیماری، گل آذین های تازه یا بیرون نیامده اضافی نکروز گسترده تری نشان می دهند و ممکن است کاملاً تغییر رنگ دهند. چنین تشدید علائم منجر به مرگ بیشتر گل های نر و کمبود میوه می شود.

زرد شدن برگها معمولاً زمانی شروع می شود که نکروز روی دو یا چند گل آذین ایجاد شود (Arellano and Oropeza, 1995) و تغییر رنگ سریعتر از پیری طبیعی برگ است. با شروع با مسن‌ترین (پایین‌ترین) برگ‌ها، زرد شدن به سمت بالا پیش می‌رود و کل تاج را درگیر می‌کند. برگ های زرد شده قهوه ای می شوند، خشک می شوند و می میرند. در برخی موارد، ظهور این علامت به صورت تک برگ زرد (برگ پرچم) در قسمت میانی تاج دیده می شود. برگهای آسیب دیده اغلب برای چندین روز قبل از افتادن آویزان می شوند و یک دامن در اطراف تنه تشکیل می دهند. پوسیدگی نرم قاعده ای پوسیده نیزه (جوانترین برگ) که به تازگی برآمده شده است، زمانی رخ می دهد که زردی برگی پیشرفت کند. ریزش برگ نیزه و پوسیدگی مریستم آپیکال همیشه قبل از مرگ نخل است که در آن نقطه تاج سرنگون می شود و تنه ای برهنه باقی می ماند. کف دست های آلوده معمولاً در عرض 3 تا 6 ماه پس از ظهور اولین علائم می میرند (McCoy et al., 1983).

مراحل اولیه LY در نخل نارگیل با ناهنجاری های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی متعددی در ریشه ها همراه است که شامل نوسانات مشخص در تنفس، کل قندها و قندهای کاهنده می شود (Oropeza و همکاران، 1995). کاهش تنفس و افزایش نکروز ریشه قبل از ظاهر شدن هر گونه علائم قابل مشاهده در قسمت های بالای زمین کف دست ادن-گرین، 1976، 1982 رخ می دهد. شروع علائم همچنین همزمان با تغییرات در میزان شار آبکش (Eden-Green and Waters, 1982) و تغییرات در روابط آب (McDonough and Zimmerman, 1979; Eskafi et al., 1986) به دلیل سرکوب برگشت ناپذیر هدایت روزنه ای برگ (et1.19) است. همکاران، 1996). کاهش ظرفیت فتوسنتزی با کاهش رنگدانه های فتوسنتزی، تنظیم کننده های رشد و فعالیت آنزیم های چرخه کاهش کربن مشخص می شود (دابک و هانت، 1976؛ لن و همکاران، 1996).

علائم LY ممکن است توسط عوامل دیگر پیچیده شود. به عنوان مثال، نخل های غیر بارور فاقد علائم میوه و گل هستند. تغییر رنگ برگی نیز در بین اکوتیپ ها و هیبریدهای نارگیل به طور قابل توجهی متفاوت است. برای اکثر نخل‌های نارگیل از نوع بلند، برگ‌ها قبل از مردن به رنگ زرد طلایی در می‌آیند در حالی که در اکوتیپ‌های کوتوله، برگ‌ها معمولاً مایل به قرمز تا قهوه‌ای مایل به خاکستری می‌شوند.

ریزش میوه و نکروز گل آذین علائمی در مراحل اولیه هستند که در سایر گونه های نخل که تحت تأثیر بیماری LY هستند مشترک هستند. ممکن است در مرحله ای که نکروز برگ نیزه ای ظاهر می شود، تفاوت هایی رخ دهد. برای نخل خرمای

خوراکی (P. dactylifera)، مرگ برگ نیزه معمولاً قبل از تغییر رنگ برگی است، در حالی که برای گونه‌های آدونیدیا و ویتچیا، نیزه معمولاً تا زمانی که همه برگ‌های دیگر بمیرند، تحت تأثیر قرار نمی‌گیرد. دو الگوی تغییر رنگ برگ توصیف شده است. برگها قبل از مرگ در گونه هایی مانند نخل دم ماهی (Caryota sp.)، Chelyocarpus chuco، نخل C.) gebang elata)، نخل فن (Livistona و Pritchardia sp.)، نخل شاهزاده خانم (D. album) و نخل آسیاب بادی (T. fortunei) زرد می شوند. در بیشتر گونه های حساس دیگر، برگ ها به جای زرد شدن قهوه ای می شوند. با این حال، صرف نظر از گونه ها، تغییر رنگ برگی معمولاً از قدیمی ترین به پیش می رود.

علائم توسط قسمت آسیب دیده گیاه

میوه/غلاف: ریزش زودرس.

نقاط رشد: ضایعات.

گل آذین: ضایعات.

برگها: زرد یا مرده.

ریشه: پوسیدگی.

Sign
Fruit
premature drop
Growing point
rot
Inflorescence
blight; necrosis
Leaves
yellowed or dead
Roots
rot of wood
Seeds
rot
Whole plant
plant dead; dieback

Calyx-end rot: Aborted coconuts often develop a calyx-end rot.

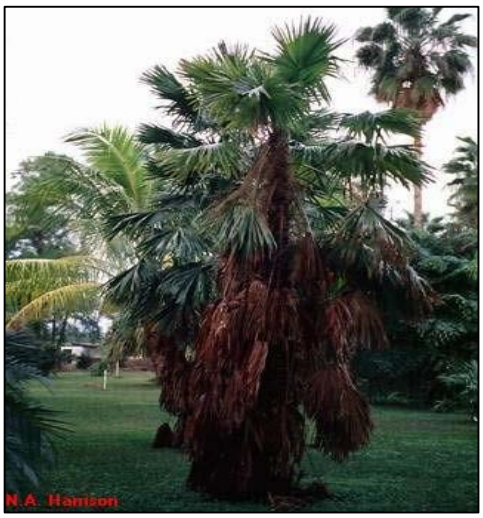
Necrosis of inflorescence: Necrosis (blackening) of newly emerged inflorescence on the Atlantic tall coconut ecotype.

Foliar discoloration: Mid-stage foliar discoloration symptoms on the Atlantic tall coconut ecotype.

Borassus flabellifer

Hyophorbe verschafeltii

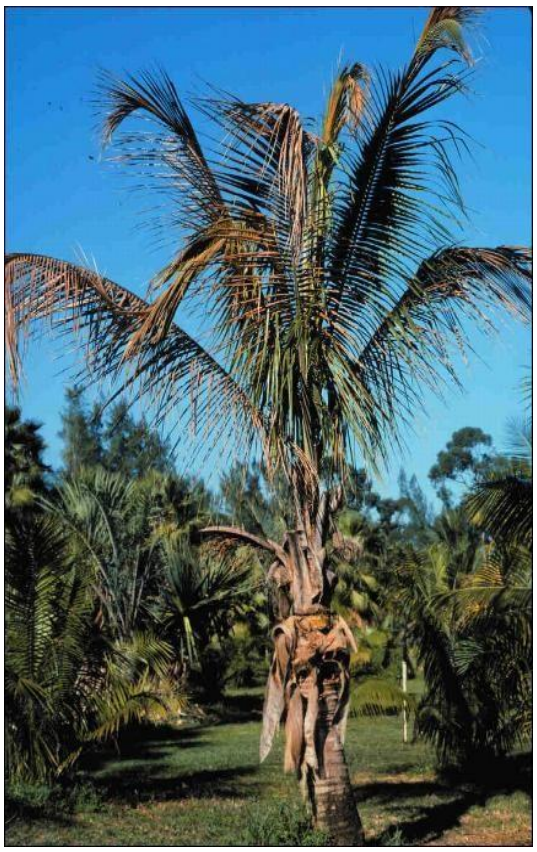
Phoenix dactylifera



footstool palm (*Livistona rotundifolia*)

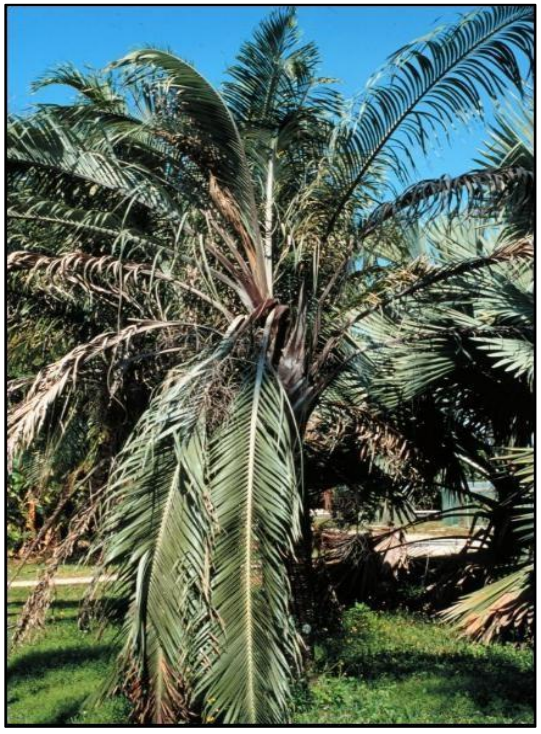
'Jamaica Tall' *Cocos nucifera* on left is exhibiting Lethal Yellowing symptoms of solitary, yellowed leaf ("flag leaf") in middle of canopy plus dead leaves hanging down around trunk.

Coconut grove in Ghana badly affected by LY

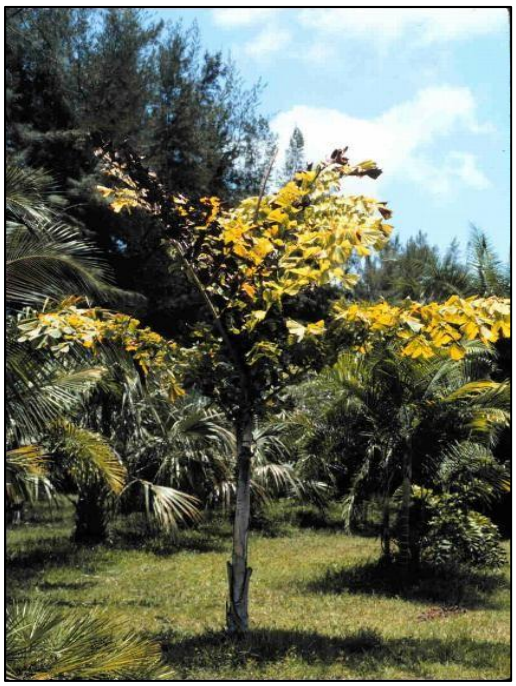


'Maypan' *Cocos nucifera* with Lethal Yellowing exhibiting discoloration of leaves (grayish-brown rather than yellow).

Caryota mitis

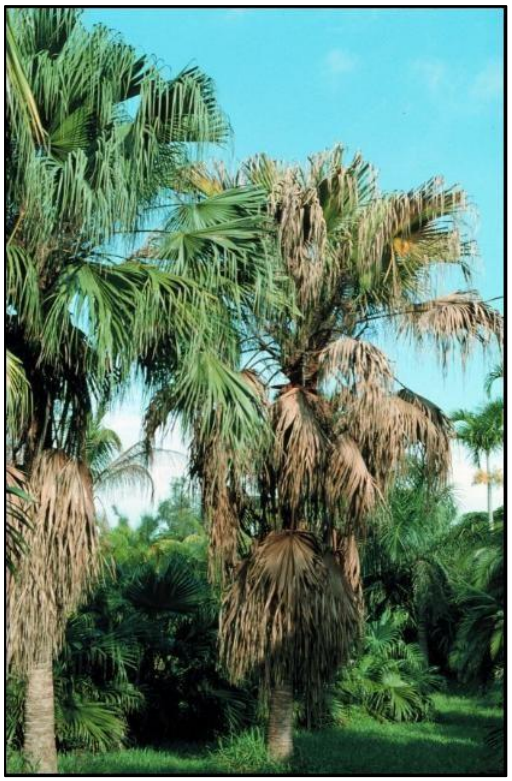


Dypsis decaryi

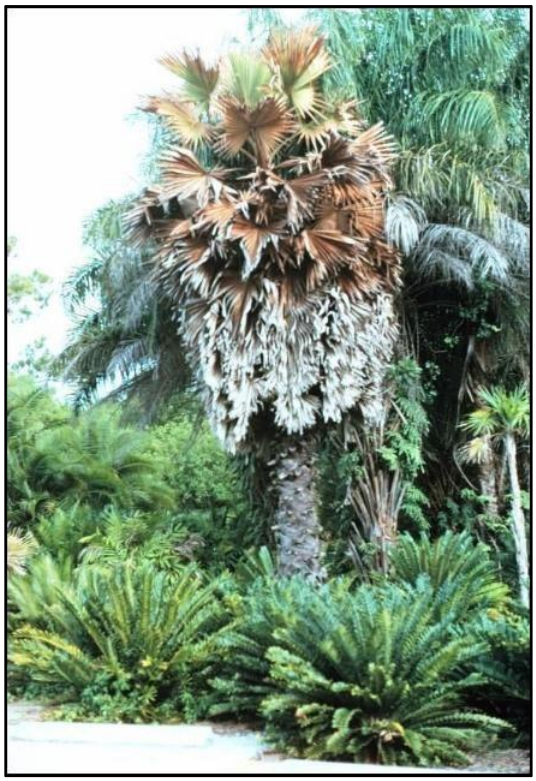


Caryota rumphiana

Hyophorbe verschaffeltii



Livistona chinensis



Borassus flabellifer

Phoenix sylvestris

Collapsed spear leaf of *Phoenix sylvestris* is hanging down from crown (see arrow). Once this spear leaf breaks off or falls from the crown, it is not readily apparent that the apical meristem (bud) has died.

Death of *Cocos nucifera* apical meristem (bud) from Lethal Yellowing causes crown to wither and topple from trunk.

راههای انتقال و انتشار:

شواهد تجربی نشان می دهد که حشره *Myndus crudus* به عنوان ناقل فیتوپلاسمای زرد رنگ کشنده است. حشره ای است با قطعات دهانی سوراخ کننده و مکنده و از محتویات سیستم عروقی گیاه میزبان تغذیه می کند. حشره، فیتوپلاسما را در طول فعالیت تغذیه، در حالی که از نخل به نخل دیگر حرکت می کند، پخش می کند. فیتوپلاسما در خارج از میزبان گیاه یا حشره خود شناخته نشده است. اگرچه شواهد اولیه PCR حاکی از وجود DNA فیتوپلاسما در جنین برخی از دانه‌های نخل‌های بیمار است (Harrison et al., 1996; Harrison and Oropeza, 1997)، هیچ شواهد قبلی برای حمایت از انتقال بذر LY (Romney, 1983) یا سایر بیماری‌های مرتبط با آن وجود ندارد.

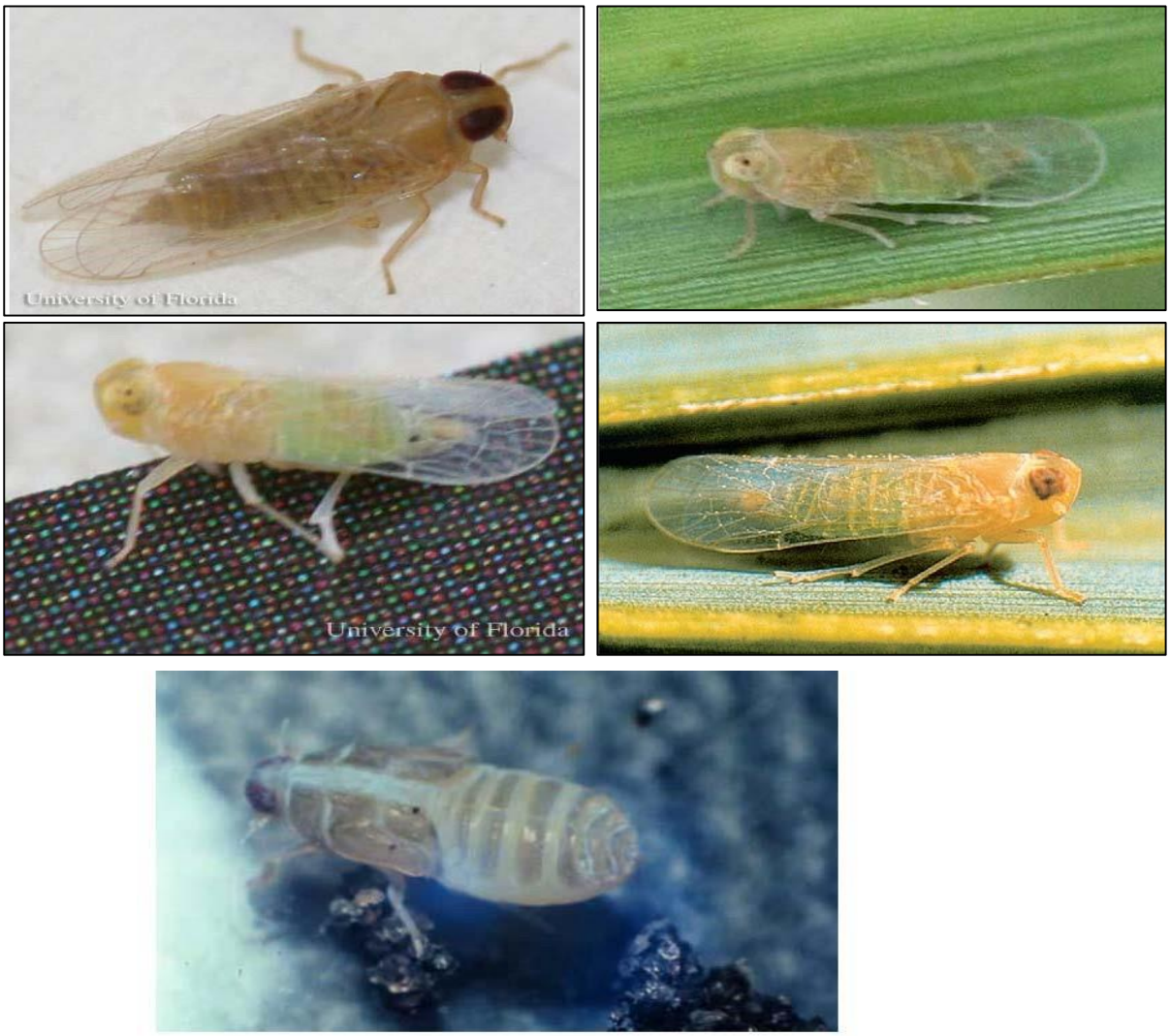
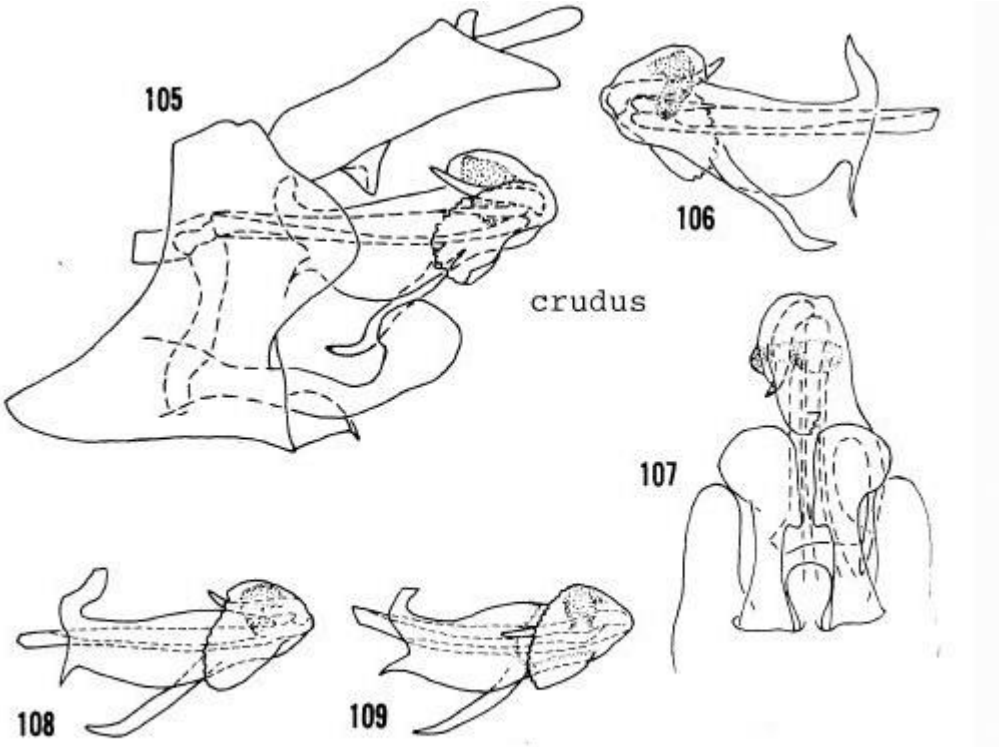


Figure 10. A nymph of American palm cixiid, *Myndus crudus* Van Duzee. Photograph by Jim DeFilippis, University of Florida.

Figure 7. The abdomen of an adult female American palm cixiid, *Myndus crudus* Van Duzee. Note the dark ovipositor. Photograph by F.W. Howard, University of Florida.



105-109, *M. crudus* Van Duzee;
105-107, from Jamaica; 108, from Fla.; 109, from Venezuela.

اقدامات قرنطینه ای:

فیتوپلاسما زرد کشنده یک آفت قرنطینه ای برای ایران و برخی دیگر از کشورها است و بیماری های مرتبط با آن تهدید قابل توجهی برای تولید نارگیل در جهان است (Harry, 1978b). برای جلوگیری از انتشار ناخواسته LY در مناطق استوایی، جابجایی تجاری نخل های زنده و دانه های خرما از مناطق آسیب دیده به مناطق آسیب دیده به طور کلی مجاز نیست. با این حال، الزامات قرنطینه با توجه به مناطق جغرافیایی خاص درگیر متفاوت است. دستورالعمل های فنی برای جابجایی ایمن ژرم پلاسم نارگیل از مناطق تحت تأثیر LY برای تحقیقات، اما نه برای اهداف تجاری، تحت نظارت هیئت بین المللی منابع ژنتیکی گیاهی (IBPGR) (فریسون و همکاران، 1993) ایجاد شده است.

روشهای ردیابی و بازرسی:

به دلیل طولانی شدن فاز انکوباسیون (دابک، 1975)، معاینه چشمی برای علائم **LY** برای تعیین قطعی وضعیت بیماری نیست. تا به امروز، هیچ آزمایش بیولوژیکی یا سرولوژیکی برای تشخیص فیتوپلاسما **LY** با موفقیت ایجاد نشده است. **PCR** حساس ترین آزمایشی است که در حال حاضر برای تشخیص فیتوپلاسما موجود است، اگرچه این روش تشخیصی به دلیل پایین بودن تیترهای پاتوژن غیرمعمول در بافت های پیچیده است. زمانی که نخل های نارگیل پیش از بارور از نظر بیماری طبیعی توسط **LY** مورد ارزیابی قرار گرفتند، ارزیابی ماهانه نمونه های برگ نیزه با **PCR** اختصاصی **LY** در یک مطالعه یک ساله نشان داد که تیتر فیتوپلاسما در این نخل ها بین 47 تا 57 روز قبل از ظهور علائم قابل مشاهده برگی به سطوح قابل تشخیص رسیده است (Harrison et al., 1994).

آنالیزهای مولکولی

تشخیص مولکولی فیتوپلاسمای زرد رنگ کشنده نخل با هیبریداسیون پروب DNA یا سنجش PCR تا حد زیادی جایگزین تکنیک های میکروسکوپی غیر اختصاصی به عنوان روش های ارجح برای تشخیص بیماری شده است.

قطعات DNA فیتوپلاسمای LY که از نخل مانیل یا نخل آسیاب بادی مبتلا به LY کلون شده است (Harrison et al., 1992; Harrison et al., 1994; Harrison et al., 1994a; Harrison and Oropeza, lettoplasma, 20) استفاده شده است. اجازه تشخیص و شناسایی فیتوپلاسما **LY** و سویه های نزدیک به آن را در عصاره های مشتق شده از بافت های قلب کف دست می دهد (Harrison et al., 1994b, c; Harrison and Oropeza, 1997; Tymon et al., 1997). با این حال، این کاوشگرها از نظر حساسیت و ویژگی نیز متفاوت هستند (هاریسون و همکاران، 2008).

هیبریداسیون ساترن بلات برای تجزیه و تحلیل پروفایل های محدودیت **DNA** فیتوپلاسما مورد استفاده قرار گرفته است و می تواند معیاری از تنوع ژنتیکی در میان سویه های فیتوپلاسمایی نزدیک به هم باشد (Harrison et al., 1992, 2008).

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) با استفاده از جفت‌های آغازگر «جهانی» فیتوپلاسما ساخته شده از توالی‌های ژن RNA ریبوزومی 16(rRNA) S این سنجش‌ها به آسانی rDNA بیشتر یا همه فیتوپلاسماها را تقویت می‌کنند. **هضم محصولات PCR با آنزیم‌های محدودکننده انتخاب شده، فرآیندی که به نام پلی‌مورفیسم طول قطعه محدود (RFLP) شناخته می‌شود، یک اثر انگشت DNA را در قالب الگوهای قطعه 16**rDNA S ارائه می‌کند که می‌تواند برای تعیین هویت فیتوپلاسما در صورت حل شدن روی آگارز یا الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید (PAGE) استفاده شود. با این حال، این آغازگرها توالی های هدف غیر فیتوپلاسمایی را نیز شناسایی کرده اند. محصولات PCR اخیر از نظر اندازه مشابه محصولات PCR از فیتوپلاسما هستند، بنابراین هویت فیتوپلاسما مشخص نیست (Harrison et al., 1999). پروفایل هایی که توسط PAGE پس از هضم جداگانه محصولات با اندونوکلئازهای AluI، HinfI، TaqI یا Tru9I حل می شوند، به ویژه برای شناسایی فیتوپلاسم های گروه 16SrIV مفید هستند (Harrison et al., 1999). آنها همچنین برای تشخیص این پاتوژن از

فیتوپلاسماهای مرتبط با بیماری های زوال کشنده نارگیل آفریقایی مفید هستند (Harrison et al., 1994a) **و دیگر اعضای اخیراً شناخته شده گروه فیتوپلاسما** LY (Harrison and Oropeza، **1997**؛ Cordova et al., 2000).

تشخیص گروه یا زیرگروه خاص فیتوپلاسما با استفاده از پرایمرهای PCR بر اساس نواحی متغیر ژن S rRNA16 یا توالی‌های ناحیه فاصله‌ساز بین ژنی 16-S23 ژنوم فیتوپلاسما، امکان تکثیر انتخابی توالی‌های ژن rRNA از 'Ca را فراهم می‌کند. *Phytoplasma palmae* و سویه های مربوط به آن به شیوه ای خاص گروهی. پرایمرهای f503 و LY16Sr مشتق شده از ژن S rRNA16 فیتوپلاسمای LY به طور انتخابی یک محصول rDNA 928 جفت باز را از سویه‌های فیتوپلاسمای LY که نارگیل و پاندانوس را آلوده می‌کنند و از YLD (کاهش کشنده نارگیل یوکاتانی) و زردی پلاسمای زرد (CPYatovicaspal) تقویت می‌کنند. (هاریسون و همکاران، 1999؛ کوردووا و همکاران، 2000). سویه ها را می توان با هضم AluI محصولات تقویتی حاصله متمایز کرد.

LY16Sf و LY16Sr همچنین به طور انتخابی توالی های ژن SrRNA16 عامل LY را از مخلوط با DNA نخل میزبان تقویت می کنند (هاریسون و اوروپزا، 2008). هنگامی که برای تکثیر مجدد محصولات به دست آمده با PCR با استفاده از جفت پرایمر جهانی P1 و P7 استفاده می شود، مجموعه پرایمر LY16Sf/LY16Sr rDNA را از فیتوپلاسمای LY و سویه های مرتبط به روشی خاص برای گروه (SrIV16) تقویت می کند (Harrison et al., 2002a). پلی مورفیسم های آشکار شده توسط هضم اندونوکلئاز HinfI محصولات rDNA، فیتوپلاسم های آلوده کننده نارگیل را در جامائیکا از آنهایی که در فلوریدا، هندوراس و مکزیک شناسایی شده بودند متمایز کرد (Harrison et al., 2002a). تشخیص انحصاری سویه های زیرگروه SrIV-A16 با استفاده از روش PCR با استفاده از جفت پرایمر غیرریبوزومی LYF1/LYR1 امکان پذیر است که امکان شناسایی صریح "Ca" را فراهم می کند. 'Phytoplasma palmae' (یعنی زیر گروه SrIV-A16) در کف دست، Pandanus utilis و ناقل Haplaxius crudus (Harrison et al., 1994; Llauger et al., 2002).

تجزیه و تحلیل توالی های کمتر حفاظت شده ژن secA نیز برای تشخیص گروه ها و زیر گروه های فیتوپلاسما استفاده شده است (Hodgetts et al., 2008).

PCR امکان تشخیص حساس فیتوپلاسم LY در گل آذین، برگ نیزه و بافت تنه را فراهم می کند و نمونه برداری غیر مخرب عملی از نخل ها را برای تشخیص LY ممکن کرده است.

سنجش سرولوژی:

انتخاب نمونه:

فیتوپلاسماها آبکش محدود هستند و بافت عروقی باید برای تشخیص موفقیت آمیز PCR استفاده شود. دمبرگ های برگ، رگبرگ میانی از برگ های علامت دار و خراشیدن پوست شاخه ها و شاخه ها را می توان از میزبان های گیاهی در حال رشد استفاده کرد. می توان از دمگل های میوه گیلاس استفاده کرد و در بادام از قسمت نوک تیز پایین پوسته در حالی که هنوز نرم است می توان استفاده کرد (Lauri Guerra Pers. Comm.). اگر گیاه خواب باشد، می توان از جوانه ها و خراشیدن پوست شاخه ها، تنه و ریشه ها استفاده کرد، اگرچه اینها احتمالاً کمتر قابل اعتماد هستند. در صورت استفاده از تراشیدن پوست از مواد چوبی، لایه مرده پوست بیرونی را جدا کنید تا بافت عروق داخلی سبز رنگ نمایان شود.

روش تشخیص فیتوپلاسما توصیه شده

• استخراج DNA کل با استفاده از روش توصیف شده توسط گرین و همکاران. (1999) که از a بافر استخراج CTAB و DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Cat. No. 69104).

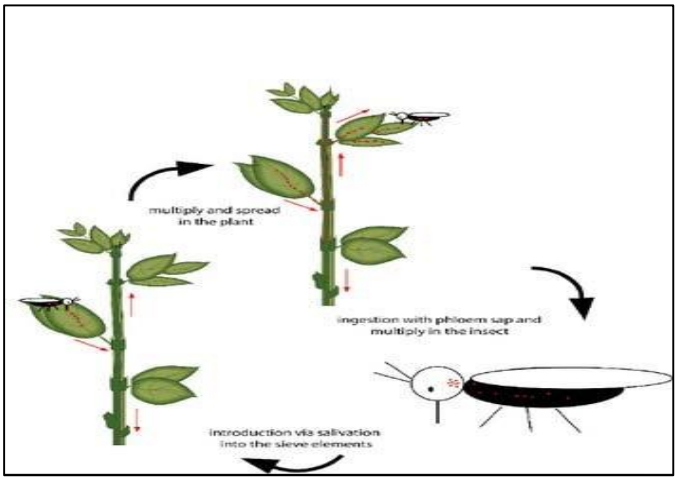
• PCR کنترل داخلی را با پرایمرهای rP1/fD2 انجام دهید. پرایمرهای rP1/fD2 ژن S rRNA16 را از بیشتر پروکاریوت‌ها و همچنین کلروپلاست‌ها تقویت می‌کنند. اگر این آزمایش منفی باشد، DNA وجود ندارد یا مهارکننده‌های DNA پلیمراز استخراج شده با اسید نوکلئیک وجود دارد. در این شرایط، سعی کنید اسید نوکلئیک را تمیز کنید (پیوست 1) یا استخراج را با روش دیگری تکرار کنید (پیوست 2).

PCR را با استفاده از روش زیر انجام دهید:

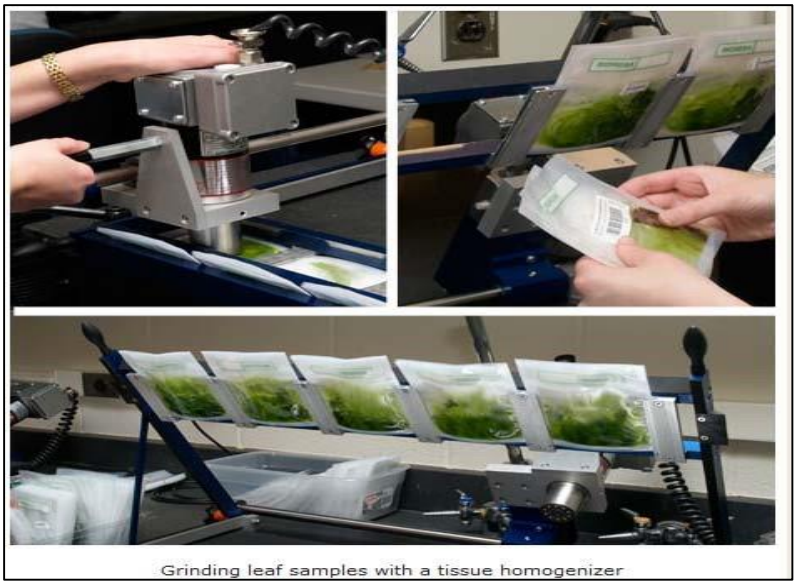
• از یک PCR تو در تو روی DNA خالص شده با استفاده از جفت پرایمر جهانی فیتوپلاسما، P1/P7 برای PCR مرحله اول و سپس جفت پرایمر R16F2n/R16R2 برای مرحله دوم PCR استفاده کنید (جدول 4).

• محصولات PCR را با الکتروفورز ژل آگارز آنالیز کنید

برای تعیین هویت فیتوپلاسما، محصول PCR تودرتو را توالی مستقیم کنید. اگر توالی یابی مستقیم مشکل ساز باشد، محصول PCR را می توان کلون کرد و سپس با استفاده از روش های شبیه سازی و توالی یابی استاندارد، توالی یابی کرد. داده‌های توالی را می‌توان با استفاده از ابزار اصلی جستجوی هم‌ترازی محلی (BLAST) که در آدرس: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi موجود است، تجزیه و تحلیل کرد. اگر امکانات توالی یابی در دسترس نباشد، می توان از یک PCR تودرتو با استفاده از محصول PCR برای محصول PCR مرحله اول (P1/P7) و پرایمرهای اختصاصی گروه SrIII16 (جدول 4) برای شناسایی فیتوپلاسما در سطح گروه استفاده کرد، اما این مشخص نمی کند که کدام گونه فیتوپلاسمای SrIII16 وجود دارد.

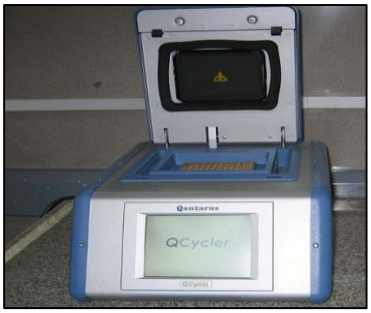


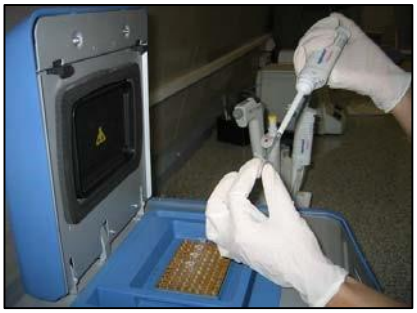
Excision of leaf tissue from orchard or homeowner samples to be processed



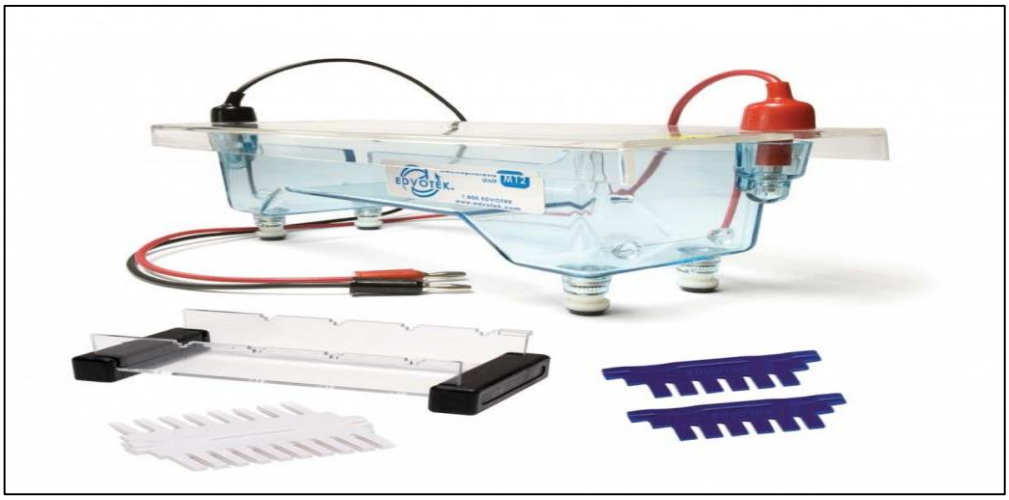
Grinding leaf samples with a tissue homogenizer

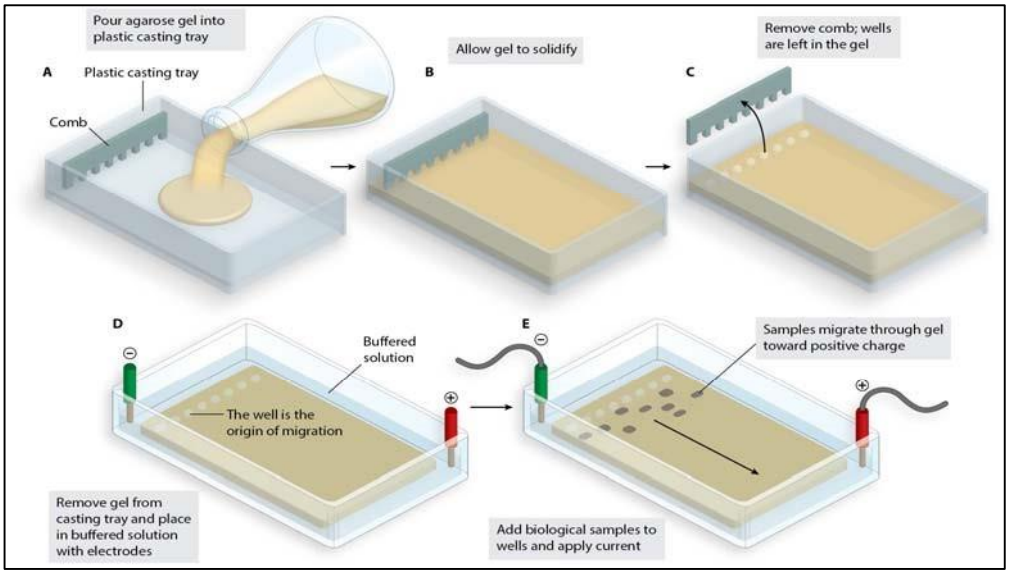
Grinding buffer is added to samples.

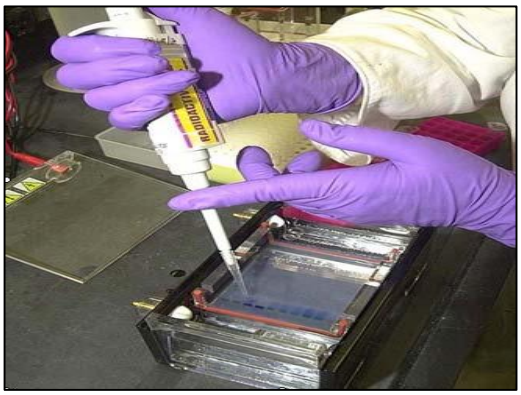


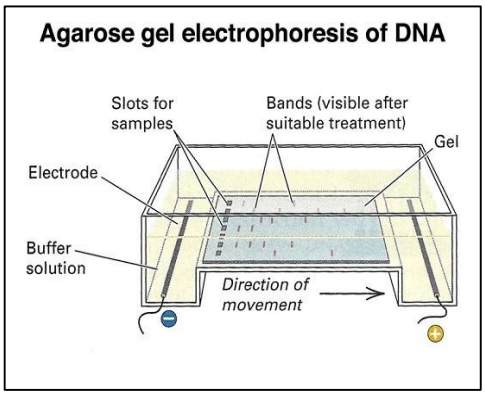


Detection and inspection Phytoplasma by PCR









Detection and inspection Phytoplasma by PCR

منابع:

CAB International. 2025. Crop Protection Compendium. 2025 Edition. CAB International. Wallingford, Oxon, UK.
https://gd.eppo.int/taxon/PHYP56/distribution
Hasanzadeh ,Nader, 1995, principles and methods of plant bacteriology, scientific publication center of Islamic azad university,P 641.
CAB International. 2007. Crop Protection Compendium. 2007 Edition. CAB International. Wallingford, Oxon, UK.
http://www.plantapalm.com/vpe/pestsndiseases/vpe_ly_coconut.htm
http://edis.ifas.ufl.edu/pp146 6.https://search.yahoo.com/search.
http://www.agriculture.gov.tt/publications/pest-alert/lethal-yellowing-of-coconuts.html 8.
http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/prokaryotes/Pages/LethalYellowing.aspx
http://www.cabi.org/isc/datasheet/38647
http://entnemdept.ufl.edu/creatures/orn/palms/palm_cixiid.htm
http://canr.udel.edu/planthoppers/north-america/north-american-cixiidae/genus-haplaxiusfowler-1904/
http://www.mypalmbeachpestcontrol.com/identify-your-pest.html
http://plantbiosecuritydiagnostics.net.au/wordpress/wp-content/uploads/2015/03/NDP-17-Xdisease-phytoplasma-V1.2.pdf