

ردیابی مولکولی ویروئید اگزوکورتیس مرکبات و تعیین خصوصیات بیولوژیک نمونه‌های شبه‌اگزوکورتیس در استان مازندران

MOLECULAR DETECTION OF *Citrus exocortis viroid* AND BIOLOGICAL INDEXING OF EXOCORTIS - LIKE AFFECTED CITRUS TREES IN MAZANDARAN PROVINCE

سید محمد علوی^{۱*}، هاله هاشمی سهی^۲، علی آهون‌منش^۳ و حشمت‌اله رحیمیان^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۱؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۱۱/۱۲)

چکیده

علائم بیماری اگزوکورتیس به صورت پوسته پوسته شدن پایه نارنج سه‌برگچه‌ای (*Poncirus trifoliata*) و کوتولگی درختان مرکبات در مناطق محدودی از مرکبات‌کاری‌های مازندران مشاهده گردیده است. به منظور شناسایی و تعیین خصوصیات بیولوژیکی جدایه‌های ویروئید اگزوکورتیس، تعداد ۳۰ نمونه در سال ۱۳۸۳ از دو منطقه مهم مرکبات‌کاری مازندران جمع‌آوری و روی گیاه محک بالنگ اتراک (*Citrus medica var. Etrog*) کلون Arizona 861-S1 پیوند زده شد. در نهال‌های بالنگ پیوند شده علائم متفاوتی از خفیف تا شدید دیده شد. نتایج آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نسخه‌برداری معکوس (RT-PCR) با آغازگر اختصاصی ویروئید اگزوکورتیس نشان داد، هجده نمونه که علائم بیماری را نشان می‌دادند حاوی ویروئید اگزوکورتیس بودند. در این هجده نمونه، نوارهای دی.ان.ا تشکیل شده با استفاده از کیت خالص‌سازی محصول PCR بازیافت و با روش آنالیز چند شکلی فرم فضایی رشته‌های تک‌لا (SSCP) مقایسه و از نظر ترادف ارزیابی شدند. دی.ان.ا سه جدایه که در SSCP متفاوت به نظر می‌رسیدند انتخاب و به همراه چهار جدایه دیگر که مشابه بودند همسانه‌سازی و تعیین ترادف شدند. هم‌ردیفی ترادف‌های تعیین شده اختلاف دو تا سه نوکلئوتیدی در ترادف سه جدایه را نشان داد ولی تفاوتی در ترادف چهار جدایه دیگر که از نظر شدت بیماری‌زایی با هم متفاوت بودند دیده نشد. نتایج حاصل از عدم حضور ویروئید اگزوکورتیس در دوازده نمونه از نمونه‌های دارای علائم شبه اگزوکورتیس و هم‌چنین نتایج تعیین ترادف مبنی بر عدم اختلاف در ترادف جدایه‌هایی که از نظر خصوصیات بیولوژیک متفاوت بودند، این احتمال را مطرح می‌سازد که علاوه بر ویروئید اگزوکورتیس مرکبات عوامل شبه‌اگزوکورتیسی نیز می‌توانند در ایجاد علائم بیماری و شدت بیماری‌زایی دخالت داشته باشند. این اولین گزارش از بررسی مولکولی ویروئید اگزوکورتیس در درختان آلوده مرکبات شمال ایران است.

واژه‌های کلیدی: ویروئید اگزوکورتیس، ردیابی مولکولی، خصوصیات بیولوژیک، آنالیز چندشکلی

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: smalavi59@yahoo.com

۱. به‌ترتیب کارشناس ارشد و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۲. استادیار پژوهش پژوهشگاه ملی تحقیقات مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران

۳. استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

مقدمه

بیماری آگزوکورتیس (*Exocortis*) مرکبات که *Scaly butt* نیز نامیده شده است برای اولین بار در ۱۹۴۸ توسط فاست و کلاتر (Fawcett & Klotz) گزارش شد که سبب پوسته‌پوسته شدن پایه نارنج سه‌برگچه‌ای (*Poncirus trifoliata* [L.] Raf.) می‌شود. درختان روی پایه نارنج سه‌برگچه‌ای به شدت کوتوله و قطر پایه نیز کم شده و پوسته پوسته شدن پایه در زیر محل پیوند اتفاق می‌افتد (Diener 1987). ویروئید آگزوکورتیس (*Citrus exocortis viroid*) در جنس *Pospiviroid* در خانواده *Pospiviroidae* طبقه‌بندی شده است (Flores et al. 2005). در حال حاضر معمول‌ترین روش‌های شناسایی ویروئیدها استفاده از گیاه محک و آنالیز مولکولی می‌باشد. متداول‌ترین گیاهان محکی که برای شناسایی ویروئیدهای مرکبات به کار می‌روند شامل بالنگ اتراک (*Citrus medica* L. cv. Etrog) کلون Arizona 861-S1 است که برای تمام ویروئیدهای مرکبات به غیر از کاکسیا (*Cachexia*) قابل استفاده بوده و در دامنه محدودتر گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.) رقم راتگرز (Rutgers) است که تعدادی از ویروئیدهای مرکبات از جمله آگزوکورتیس و ویروئید ۴ در آن تکثیر می‌یابند.

یک گونه از جینورا (*Gynura aurantiaca*) نیز فقط به ویروئید آگزوکورتیس حساس بوده و تولید علائم شاخصی از جمله کوتولگی شدید می‌کند (Hadidi et al. 2003). الکتروفورز اسیدهای نوکلئیک روی ژل پلی‌اکریل آمید و دورگ‌گیری اسید نوکلئیک با شناساگرهای اختصاصی ویروئیدها و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نسخه‌برداری معکوس از روش‌های مولکولی جهت تشخیص ویروئیدها به حساب می‌آیند (Ito 2002).

در شمال ایران به خصوص در استان مازندران به دلیل انتشار ویروس تریستزا (*Citrus tristeza virus*)، نهال‌های روی پایه پونسیروس و دورگ‌های آن برای کاشت توصیه می‌شود. از آنجایی که پایه‌های دیگر مقاوم به تریستزا نظیر یوزو (*C. junos* Sieb.) و رافلمون (*C. jambhiri* Lush.) اشکالات خاص خود را نظیر حساسیت به پوسیدگی طوقه و گموز و تولید محصول با کیفیت و کمیت پایین دارند، در گذشته و حال چندان مورد استفاده نبوده و به نظر می‌رسد در آینده پونسیروس و دورگه‌های آن جای اکثر پایه‌ها را بگیرند.

با توجه به این‌که پونسیروس و دورگ‌های آن از پایه‌های حساس به ویروئید آگزوکورتیس و شبه آگزوکورتیس می‌باشند و این ویروئیدها با وسایل باغبانی نیز قابل انتقال هستند و در درختان مرکبات بر روی پایه نارنج (*C. aurantium* L.) علائم مشخصی را ایجاد نمی‌کنند، بنابراین در صورت وجود ویروئید یا ویروئیدهای عامل بیماری آگزوکورتیس ممکن است این ویروئید به همراه ویروس تریستزای مرکبات عامل اصلی محدود کننده توسعه کشت و تولید مرکبات در شمال کشور شوند. بررسی‌های پیشین در شمال ایران توسط منتظری و همکاران به نتایجی اشاره نموده‌اند که مؤید حضور یکی از ویروئیدهای مرکبات در درختان مشکوک به آلودگی بوده که شباهت زیادی به آگزوکورتیس داشته است. در گزارشات فعلی از آن به عنوان ویروئید شبه آگزوکورتیس مرکبات یاد می‌شود و شناسایی دقیق عامل آن به بررسی مولکولی نیاز دارد (Montazeri et al. 1997). حبشی نیز براساس مشاهدات خود، علائم بیماری آگزوکورتیس و اشاعه آن در شمال ایران را شدید توصیف نموده است (Habashi 1988). با توجه به مسئله یاد شده در

تیمار شده با DEPC (diethyl pyrocarbonate) تهیه گردیدند. به منظور سنتز رشته cDNA، هفت میکرولیتر از الگوی آر. ان. ا در واکنش نسخه برداری معکوس با آغازگر معکوس ویروئید اگزوکورتیس مورد استفاده قرار گرفت (Ito *et al.* 2002). در ابتدا و قبل از انجام واکنش، مخلوط واکنش نسخه برداری معکوس بدون وجود آنزیم به مدت ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سلسیوس در دستگاه ترموسایکلر مدل MJ-Mini (شرکت BIO-RAD) با دمای درپوش ۱۰۵ درجه قرار داده شد و سپس به سرعت به مدت ۳ دقیقه داخل یخ آب قرار گرفت و در آخر با اضافه نمودن ۲۰۰ واحد (یک میکرولیتر) آنزیم MMuLV-Reverse transcriptase (شرکت Fermentas)، واکنش نسخه برداری معکوس به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سلسیوس انجام شد. سه جفت آغازگر در دو جایگاه متفاوت در ژنوم ویروئید اگزوکورتیس در واکنش های زنجیره ای پلیمرز و نسخه برداری معکوس مورد استفاده قرار گرفتند پس از ساخت cDNA، واکنش PCR با توجه به نوع آغازگر و دمای اتصال آن (جدول ۱) طبق روش های توصیه شده شرکت سازنده آنزیم پلیمرز انجام شد (Palacio & Duran-Vila 1999 and Ito *et al.* 2002). پس از انجام PCR، محصول در ژل آگاروز ۲٪ در ۸۰ ولت و در بافر IX TBE الکتروفورز گردید (Sambrook & Russell 2001).

برای انتخاب جدایه های متفاوت از نظر ترادف به کمک آنالیز چندشکلی فرم فضایی رشته های تک لا (SSCP)، در ابتدا محصول PCR در ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز شد. نوار مربوط به دی. ان. ا ویروئیدی از ژل بریده شد و با استفاده از دستورالعمل کیت خالص سازی شرکت Roche (High Pure PCR Product Purification Kit) بازیافت شد. غلظت دی. ان. ا. هر جدایه در مقایسه با

خصوص روند رو به افزایش استفاده از پایه های حساس به اگزوکورتیس، مطالعه بیشتری در جهت شناسایی مولکولی این ویروئید در مرکبات دارای علائم اگزوکورتیس و بررسی تنوع جدایه های آن احساس گردید.

روش بررسی

نمونه ها از دو منطقه مهم مرکبات کاری شهرستان ساری شامل مهدشت بالا و پایین و یک نمونه مشکوک از باغ بهارستان (واحد تحقیق و توسعه) شرکت باغداری فجر ساری در تابستان سال ۱۳۸۳ جمع آوری شد. علائم باغ شامل کوتولگی با شدت های مختلف، پوسته پوسته شدن پایه در اکثر نمونه ها، شکاف خوردگی پوست پایه در برخی نمونه ها، کلروز برگ ها، کوچک شدن اندازه برگ و شاخه و کاهش قطر پایه در ارقام پیوند شده روی پایه های پونسیروس و سیترنج (*C. sinensis* [L.] Osb. × *P. trifoliata* [L.] Raf.) بود. در اکثر نمونه های پیوند شده روی پایه نارنج علائمی دیده نشد. از هر درخت، چهار شاخه جهت تهیه نمونه برای ایندکس کردن روی بالنگ اترراگ کلون Arizona 861-S1 (اهدایی دکتر Duran-Vila از مرکز تحقیقات کشاورزی والنسیای اسپانیا) برداشته و جهت پیوند زنی به گلخانه انتقال یافت. انتقال آلودگی در سه تکرار و هر گیاه از یک تکرار به وسیله ۴ پیوندک از منابع آلوده، پیوند گردید و گیاهان پیوندی در شرایط گلخانه در دمای ۳۰ - ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. نهال های بالنگ به مدت ۶ ماه و هر دو تا سه هفته یکبار جهت بررسی علائم مورد بازبینی قرار گرفتند (Roistacher 1991). آر. ان. ا کل نمونه ها به روش چنگ و همکاران با تغییراتی اعمال شده استخراج گردید (Rapley 2000). مراحل استخراج در شرایط استریل انجام شد و تمامی محلول های مورد استفاده با آب

جدول ۱. ترادف آغازگرهای اختصاصی ویروئید اگزوکورتیس مرکبات مورد استفاده در آزمون RT-PCR

Table 1. Sequence of *Citrus exocortis viroid* specific primer pairs used in RT-PCR

نام آغازگر Primer name	ترادف Sequence	دمای اتصال Annealing temp.	جهت Direction	منبع Reference
CEV+	5' GGTGGAAACAACCTGAAGCTT 3'	۵۲	مستقیم	Palacio & Duran-Vila 1999
CEV-	5' GGGTAGTCTCCAGAGAGAAG 3'	۵۲	معکوس	Palacio & Duran-Vila 1999
fCEV	5' GGAAACCTGGAGGAAGTCG 3'	۵۱	مستقیم	Palacio & Duran-Vila 1999
rCEV	5' CCGGGGATCCCTGAAGGA 3'	۵۱	معکوس	Palacio & Duran-Vila 1999
CEV24+	5' ATCCCCGGGGAAACCTGGAGGAAG 3'	۵۳	مستقیم	Ito et al. 2002
CEV20-	5' CCCTGAAGGACTTCTTCCCC 3'	۵۳	معکوس	Ito et al. 2002

ویروئید با استفاده از کیت شرکت (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche) خالص شد. همسانه‌سازی با استفاده از کیت InsT/AcloneTM PCR Product Cloning Kit در پلاسמיד pTZ57R/T (شرکت Fermentas) انجام گرفت.

برای کسب اطمینان از ورود پلاسمیدهای نو ترکیب به درون سول‌های مستعد، سلول‌های رشد یافته روی محیط کشت LB-آگار دارای آمپی‌سیلین، X-gal و IPTG از نظر حضور پلاسمیدها مورد آزمایش قرار گرفتند. روش‌های مورد استفاده شامل استخراج پلاسمید، کلنی PCR و PCR با آغازگرهای استاندارد M₁₃ مطابق با دستورالعمل کیت InsT/AcloneTM PCR Product Cloning Kit و روش سمبروک و راسل (Sambrook & Russell 2001) بود. پلاسمیدهای نو ترکیب با استفاده از کیت Roche (High Pure Plasmid Isolation Kit) شرکت خالص گردید و پس از تعیین غلظت در حضور مارکر وزن مولکولی ۱۰۰ جفت باز مثبت، ۳-۴ میکروگرم از پلاسمید به شرکت SeqLab آلمان ارسال گردید. تعیین ترادف در هر دو جهت با استفاده از آغازگرهای استاندارد M₁₃ انجام شد.

غلظت قطعات مارکر وزن مولکولی مشخص گردید و مقدار ۱۰ نانوگرم جهت انجام SSCP با روش پالاسیو و همکاران به کار برده شد. برای این منظور مقدار ۱ μl معادل ۱۰ نانوگرم از محصول PCR خالص شده با ۱۰ μl از محلول دناتوره کننده (۹۰٪ فرمامید، ۲۵ mM EDTA، ۰/۰۵٪ xylene – cyanol، pH 8) و ۰/۰۵٪ blue bromophenol و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس جوشانده و سپس به سرعت به مدت ۵ دقیقه روی یخ آب نگهداری شد. نمونه در ژل پلی اکریل‌آمید ۱۲٪ و ۱۴٪ به ابعاد ۲۰ × ۲۱ سانتی‌متر حاوی بافر 1X TBE الکتروفورز شد. پس از الکتروفورز، رنگ‌آمیزی ژل با نیترات نقره انجام گردید (Palacio & Duran-Vila 1999). نمونه‌هایی که از لحاظ الگوی حرکتی نوارهای دی.ان.ا. تک‌رشته در SSCP متفاوت بودند برای همسانه‌سازی به منظور تعیین ترادف ژنوم آنها انتخاب شدند. جهت همسانه‌سازی دی.ان.ا. مکمل ویروئید اگزوکورتیس، پس از اتمام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تحت یک مرحله بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفته و دی.ان.ا.

نتایج و بحث

در بین علایم مشاهده شده در نمونه‌ها، نازنگی انشوی آلوده به اگزوکورتیس دارای علایم خفیف‌تر کوتولگی و پوسته پوسته شدن در مقایسه با ارقام پرتقال تامسون ناول (C. sinensis [L.] Osb. cv. Thomson navel) و سانگین (پرتقال خونی رقم Moro) بود (شکل ۱). تنوع علایم در هر سه گونه و ارقام مرکبات جمع‌آوری شده از خفیف تا شدید متغیر بود. علایم ایجاد شده در گیاه محک به‌طور کلی شامل کوتولگی، نکروز نوک برگ، نکروز دمبرگ، نکروز رگبرگ میانی، خمیدگی و پیچیدگی برگ در بالنگ اتراک بود. نمونه‌هایی که علایم شدیدتری داشتند در شاخه‌های جوان و سبز نهال سیتروملو نوارهای چوب‌پنبه‌ای ایجاد کردند. در نمونه‌هایی که دارای علایم متوسط تا خفیف در باغ بودند، کوتولگی و پیچیدگی شدید برگ دیده نمی‌شد اما خمیدگی برگ، نکروز رگبرگ میانی و دمبرگ در تمام نمونه‌های دارای علایم دیده شد. اکثر نمونه‌ها، علایم شدید و نسبتاً شدید را در گیاه محک ایجاد نمودند. شدت پاکوتاهی و میزان پوسته پوسته شدن پایه نارنج سه برگچه‌ای در باغ مؤید همان میزان شدت در علایم گیاه محک در گلخانه بود و این دو رابطه تقریباً مستقیمی داشتند.

در مجموع نمونه‌های جمع‌آوری شده در سه گروه بیولوژیک مجزا قرار گرفتند به این صورت که جدایه‌های پاکوتاه شامل نمونه‌های LMP2, LMP3, LMP4, LMP6, LMP8, LMP12, LMP13, LMP14, LMP15, LMP16, UMS1, UMS2, UMSH1, UMSH2, UMP2, UMP3, UMP1 و SSS، جدایه‌های متوسط (LMP1, LMP5, LMP7, LMP9 و LMP10) و جدایه‌های خفیف شامل نمونه‌های LMPm, LMP19, UMS2, UMS3 و UMS1 بودند. نمونه‌های LMP11, LMP17 و LMP18 شامل

جدایه‌های حد واسط متوسط و خفیف بودند. آغازگرهای CEV- و CEV+ با دمای اتصال ۵۲ درجه سلسیوس بهترین آغازگرهای مورد استفاده در این بررسی بودند، به‌طوری‌که در روش‌های معمولی استخراج RNA نیز به راحتی ویروئید اگزوکورتیس را در نمونه‌های مزرعه و گلخانه ردیابی نمودند (شکل ۲).

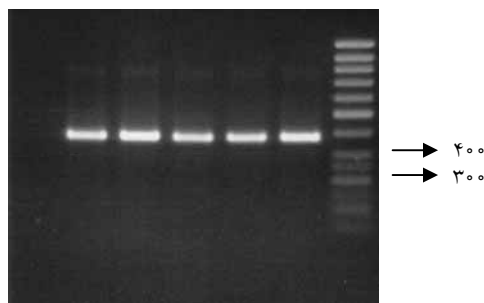
هشت جدایه جمع‌آوری شده از نازنگی‌های انشوی (از جدایه LMP12 تا LMP19) و نمونه‌های LMP1، LMP2، LMP5 و LMPm که از درختان تامسون ناول روی پایه سیترنج بودند علی‌رغم داشتن علایم، فاقد نوار دی. ان. ا. مربوط به ویروئید اگزوکورتیس بوده ولی در سایر نمونه‌ها، نواری به اندازه تقریبی ۳۷۰ جفت باز تکثیر شد. هجده نمونه دارای ویروئید اگزوکورتیس، پس از خالص‌سازی دی. ان. ا. آنها از ژل آگاروز مورد بررسی SSCP قرار گرفتند. بعد از آنالیز SSCP و مشاهده تفاوت‌ها، جدایه‌های LMP3, LMP4, LMP7, LMPm, UMS1, UMS2 و BSS برای همسانه‌سازی دی. ان. ا. آنها در پلاسمید pTZ57R/T انتخاب شدند. علی‌رغم مشکلات در بهینه‌سازی روش SSCP این روش برای نمونه‌های ژنوم ویروئید اگزوکورتیس به خوبی اختلافات دو نوکلئوتیدی را نمایان کرد. استفاده از ژل پلی‌اکریل‌آمید ۱۲٪ و دمای ۴ درجه سلسیوس و غلظت ۱۰ نانوگرم از دی. ان. ا. خالص شده بهترین نتیجه را در پی داشت. ترادف‌های تعیین شده دی. ان. ا. های تکثیر شده از روی ژنوم ویروئید اگزوکورتیس (توسط شرکت SeqLab آلمان) با ترادف‌های دیگر موجود در NCBI با استفاده از برنامه BLASTn هم‌ردیفی شد. نتایج نشانگر بیشترین شباهت ترادف‌ها (۹۹٪) با ترادف‌های جدایه‌های ویروئید اگزوکورتیس گزارش شده از مناطق مختلف دنیا بود. ترادف جدایه‌های LMPm, LMP3, BSS و UMS2 کاملاً شبیه



شکل ۱. علائم کوتولگی (راست) و پوسته پوسته شدن (چپ) پرتقال تامسون روی پایه سیترنج (نمونه LMP3).

Fig 1. Dwarfing (right) and scaling (left) symptoms in Thomson navel orange on Troyer citrange rootstock (LMP3 sample).

UMS1 LMP4 LMPm LMP7 BSS M شاهد منفی



شکل ۲. الکتروفورز محصول آزمون RT-PCR تعدادی از جدایه‌های ویروئید آگزوکورتیس مایه‌زنی شده به اترآگ در حضور مارکر وزن

مولکولی ۵۰ جفت‌بازی شرکت فرمتاس (M).

Fig. 1. Electrophoresis of RT-PCR products amplified using CEVd specific primer pairs from inoculated Etrog citron plants. Lane M is 50Kbp DNA ladder (Fermentas).

آگزوکورتیس می‌شوند ولی بررسی دقیق‌تر نیاز به خالص‌سازی ویروئیدها و بررسی‌های بیولوژیکی و تعیین ترادف جدایه‌های متعددی از هر کدام از ویروئیدها دارد. در شرایط حاضر و تا انجام بررسی‌های جامع در زمینه ارتباط دادن علائم خاص با نوع ویروئید دخیل در بیماری و نیز گستردگی آلودگی در درختان بدون علائم، می‌توان اظهار نمود که صرف دیدن علائم پوسته شدن پایه‌های حساس (پونسیروس و دورگ‌های آن) و وجود یا عدم وجود کوتولگی محسوس نمی‌تواند نشانگر آلودگی درخت به ویروئید آگزوکورتیس، دست‌کم در استان مازندران باشد. در واقع مشاهده تمامی علائم شاخص بیماری آگزوکورتیس در درختان باغ به علاوه مشاهده

به هم و ترادف جدایه‌های UMS1، LMP4 و LMP7 نیز دارای اختلاف دو تا سه نوکلئوتیدی بودند. ترادف جدایه‌ها در بانک ژن NCBI ثبت شد (شماره دسترسی جدایه‌های LMP4، LMP7، LMP3، LMPm به ترتیب EF126048، EF126047، EF186989، EF186990 در NCBI موجود می‌باشد).

ایتو و همکاران در ژاپن نیز به حضور تعدادی از ویروئیدها در مرکبات اشاره نمودند که سبب علائم آگزوکورتیس در غیاب ویروئید آگزوکورتیس می‌شوند (Ito et al. 2002). در بررسی‌های اولیه علوی و همکاران در سال ۱۳۸۴ (Alavi et al. 2005) نیز به حضور تعدادی از ویروئیدها اشاره شده که سبب بروز علائم

با ترادف جدایه‌های اگزوکورتیس موجود در NCBI به همراه بررسی واکنش بالنگ اتراک به نمونه مظنون می‌تواند آزمون‌های مناسب‌تر باشند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (94-93) متن انگلیسی مراجعه شود.

واکنش‌های بالنگ اتراک که خاص اگزوکورتیس اعلام گردیده و نیز مشاهده نوار هم‌اندازه ویروئید اگزوکورتیس با الکتروفورز اسید نوکلئیک استخراج شده از بالنگ مایه‌زنی شده واجد علائم و تا حدی از درختان آلوده باغ، می‌تواند با ضریب اطمینان بالایی نمایانگر آلودگی درختان به اگزوکورتیس باشد. ولی برای شناسایی قطعی آلودگی درختان به اگزوکورتیس؛ مقایسه ترادف قطعه تکثیر شده با RT-PCR اسید نوکلئیک جدا شده از نمونه‌های مظنون