Archive of SID
بیماریهای گیاهی، جلد ٤١، ١٣٨٤

# تشخیص *Ralstonia solanacearum* در غده‌های بذری سیب‌زمینی و خاک با استفاده از تکنیک PCR *

Diagnosis of *Ralstonia solanacearum* in potato seed tubers and soil, using PCR technique

**کبری مسلم‌خانی، جواد مظفری** **، عزیزاله علیزاده**

بخش تحقیقات ژنتیک مؤسسهٔ اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج و دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

دریافت ١٣٨٣/٤/١٧ پذیرش ١٣٨٣/١٢/٥

**چکیده**

باکتری *Ralstonia solanacearum* عامل بیماری پژمردگی باکتریایی یکی از عوامل مهم در کاهش محصول سیب‌زمینی در مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر می‌باشد. آلودگی نهفتهٔ این بیماری در غده‌های بذری ظاهرا سالم موجب گسترش سریع آن در خاکهای غیر آلوده می‌گردد. به همین خاطر کنترل موثر آن نیازمند دستیابی به روشهای دقیق و حساس تشخیص آلودگی در خاک و غده می‌باشد. در این تحقیق کارایی تکنیک PCR برای تشخیص مولکولی باکتری *R. solanacearum* مورد بررسی قرار گرفت. این روش به تنهایی قادر به ردیابی جمعیت‌های پایین باکتری در حد $10^4$ CFU/ml باکتری در عصاره گیاه آلوده بود ولی پس از یک مرحله غنی‌سازی به مدت ۴۸ ساعت توانست تا ۱۰ CFU/ml باکتری در غده و خاک آلوده

* قسمتی از پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد نگارندهٔ اول، ارائه شده به دانشگاه تربیت مدرس

** مسئول مکاتبه



www.SID.ir

Archive of SID

را نیز شناسایی نماید. با استفاده از این روش حضور و گسترش باکتری *R. solanacearum* در غده و ساقهٔ گیاهان آلوده در سه رقم هرتا، نیکولا و فیانا با استفاده از پرایمرهای 759 و 760 نشان داده شد. پرایمرهای مذکور بطور اختصاصی یک قطعهٔ ۲۸۱ جفت بازی از جدایه های *R. solanacearum* تولید نمودند. این روش با موفقیت وجود باکتری *R. solanacearum* را در غلظتهای CFU/ml ۱۰، $۱۰^{۳}$، $۱۰^{۵}$ و $۱۰^{۷}$ در عصارهٔ غنی شدهٔ خاک آلوده ردیابی نمود. عمل پیش غنی‌سازی علاوه بر افزایش جمعیت پاتوژن باعث خنثی نمودن اثرات ممانعت کننده‌ها و در نهایت موجب افزایش دقت تشخیص در تکنیک PCR گردید.

**واژه‌های کلیدی: سیب‌زمینی، پژمردگی باکتریایی، *Ralstonia solanacearum*، PCR، غنی‌سازی**

---

**مقدمه**

باکتری *Ralstonia solanacearum* (Yabuuchi *et al*. 1995) عامل بیماری پژمردگی باکتریایی یکی از عوامل مهم کاهش دهندهٔ محصول سیب‌زمینی در مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر به شمار می‌رود (Hayward 1991). این بیماری در سالهای اخیر در بسیاری از استانهای کشور خصوصا در مناطق جنوبی به شدت به محصول سیب‌زمینی خسارت وارد نموده است *باقری خیرآبادی* (۱۳۷۲)، *غیاثی و تقوی* (۱۳۸۱). مبارزه با این باکتری به دلیل دامنه میزبانی گسترده و نیز پراکندگی وسیع آن در خاکهای مناطق مختلف و انتقال آن از طریق آبیاری و غده‌هایی که آلودگی پنهان دارند بسیار مشکل است. در واقع یکی از مهمترین عوامل پراکنش جهانی این بیماری، آلودگی پنهان یا توانایی تکثیر و تجمع پاتوژن در بافت آوندی بدون بروز علائم بیماری می‌باشد (Hayward 1991). شرایط آب و هوایی سرد و آلودگیهای دیر هنگام معمولا موجب عدم بروز علائم بیماری می‌گردد. در حال حاضر مشکل بودن تشخیص آلودگی غده‌های بذری موجب می‌شود که باکتری *R. solanacearum* براحتی توسط غده‌های بذری آلوده ولی به ظاهر سالم از سالی به سال دیگر و به نقاط مختلف انتقال یابد. بهترین راه کنترل این بیماری کاشت بذور عاری از بیماری در خاکهای غیر آلوده و نیز استفاده از ارقام مقاوم



www.SID.ir

Archive of SID

می‌باشد که برای تهیهٔ آنها دستیابی به روشهای دقیق و حساس تشخیص آلـودگی در خـاک و غده حائز اهمیت زیادی است. این روشها علاوه بر دقت و سرعت باید از اختصاصیت بـالایی نیز برخوردار باشند تا بتوانند جمعیت‌های پایین جدایه‌های بیمـاریزای بـاکتری را در کمتـر از سـطحی کـه باعـث خسـارت اقتصـادی مـی‌گـردد، ردیـابی نماینـد (Elphinstone *et al*. 1996, Hayward 1991).

امروزه روش واکـنش زنجیـره‌ای پلیمـرازی (Polymerase Chain Reaction, PCR) بصـورت گسترده‌ای در تشخیص و ردیابی پاتوژنهای گیاهی و جانوری مورد استفاده قرار می‌گیرد. ایـن روش در مقایسه با روشهای معمول تشخیص از سادگی، حساسیت، سـرعت و کـارایی بسـیار بالاتری برخوردار است. کاربرد PCR بـرای شناسـایی بـاکتری *R. solanacearum* در غلظتهـای پایین در بافت غدهٔ سیب‌زمینی و خاک تاکنون نتایج امید بخشی را به دنبال داشته اسـت. البتـه باید توجه داشت که موفقیت PCR در تشخیص به اختصاصیت پرایمرها، توالی هدف و شرایط واکنش بستگی داشته و استفادهٔ آن را محدود می سازد. اولـین بـار سـیل و همکـاران از PCR برای تشخیص باکتری *R. solanacearum* در غـده اسـتفاده کردنـد. آنهـا دریافتنـد کـه ردیـابی غلظتهای پایین باکتری *R. solanacearum* درعصارهٔ غده با استفاده از PCR همیشه بـا موفقیـت همراه نیست زیرا عصاره دارای ممانعت کننده‌های بسیاری است که مانع تکثیر DNA هدف می شوند (Seal *et al*. 1992, Seal *et al*. 1993).

تحقیقات انجام شده نشان داده که علاوه بر ممانعت کننده‌های سلولی، گاهی مواد اسـتفاده شده در استخراج DNA نیز بعنوان ممانعت کننده در تکثیر DNA عمل می‌نمایند بنابراین برای دستیابی به DNA عاری از ممانعت کننـده‌هـا اسـتفاده از یـک روش اسـتخراج مناسـب امـری ضروری به نظر می‌رسد (Rossen *et al*. 1992). پاستریک و مـیس ده روش مختلـف اسـتخراج DNA از غدهٔ آلوده به باکتری *R. solanacearum* را مقایسه نمودند و نتایج آزمایشات آنها نشان داد که سه روش استخراج DNA با اسـتفاده از SDS ، CTAB و کیـت اسـتخراج DNA-Easy از کارایی بالایی برخوردارند و قادر به استخراج DNA با کیفیـت بسـیار خـوب از عصـارهٔ غـده مـی‌باشـند (Pastrik & Maiss 2000) هرتانـگ و همکـاران از تکنیـک PCR بـرای شناسـایی



www.SID.ir

Archive of SID

استرینهای *R. solanacearum* از مناطق جغرافیایی مختلف استفاده نمودند و نشان دادند که پرایمرهای PS96I و PS96H بسیار اختصاصی بوده و توانستند تمام استرینهای مورد بررسی *R. solanacearum* را تشخیص دهند (Hartung *et al*. 1998).در همان سال ایتو و همکاران از پرایمرهای اختصاصی 759 و 760 برای ردیابی *R. solanacearum* در خاک استفاده نمودند. آنها مشاهده کردند که وجود ممانعت کننده‌های فراوان در خاک مانع از فعالیت کامل و پایدار Taq DNA Polymerase و تکثیر DNA و ظهور قطعهٔ مورد انتظار ۲۸۱bp می گردد. اشکال دیگری که گروه مزبور با آن روبرو شدند عدم کارایی PCR در تمایز سلولهای زنده از سلولهای مرده بود (Ito *et al*. 1998).

در این تحقیق کارایی روش PCR برای تشخیص آلودگی پنهان به جدایه‌های نژاد ۳ باکتری *R. solanacearum* در غده‌های سیب‌زمینی و خاک مورد ارزیابی قرار گرفت.

**روش بررسی**

**جدایه‌های باکتری**

مخلوطی از جدایه‌های جمع‌آوری شده از گرگان، اراک، شیروان و اقلید برای آلوده‌سازی ارقام سیب‌زمینی و خاک مورد استفاده قرار گرفت. این جدایه‌ها از گیاه سیب‌زمینی جدا شده و بیوار ۲ و نژاد ۳ تعیین شدند. کلنی این جدایه‌ها روی محیط TZC (تترا زولیوم کلراید) به صورت گرد، قرمز کمرنگ با حاشیه سفید و نامنظم همراه با مواد لزج فراوان بود (Winstead and Kelman 1952).همهٔ جدایه‌های مورد بررسی بر روی رقم حساس پرمیر بیماریزا بوده و در آزمون (( Nitrocellulose Membrane Enzyme Linked Immuno_Sorbent Assay) NCM-ELISA) با آنتی‌بادی اختصاصی *R. solanacearum* واکنش مثبت دادند *مسلم‌خانی* (۱۳۸۰).

**مواد گیاهی و آلوده‌سازی آنها**

غده‌های بذری طبقهٔ سوپرالیت ارقام سیب‌زمینی هرتا، نیکولا و فیانا از بخش تحقیقات سیب‌زمینی و پیاز مؤسسهٔ اصلاح و تهیهٔ نهال و بذر کرج تهیه گردیده و در این بررسی مورد



www.SID.ir

Archive of SID

استفاده قرار گرفت. جهت آلوده‌سازی گیاهچه‌های مستقر در گلخانه، سوسپانسیونی با غلظت $10^8$ CFU/ml (این غلظت با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و سنجش Optical Density (OD) در ٦٠٥ نانومتر و در نظر گرفتن $OD= 0/45 = 10^9$ CFU/ml تعیین گردید، از کشت ۲۴ ساعتهٔ جدایه‌ها فراهم شد حسن *زاده* (۱۳۷۴) و بوسیلهٔ سرنگ انسولین به زاویهٔ سومین برگ از بالا در گیاهچه‌های ۴ برگی تزریق گردید. گیاهان آلوده در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ روز نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت علائم بیماری روی گیاه آلوده و شاهد مقایسهٔ گردید (Winstead & Kelman 1952).

**استخراج DNA از عصارهٔ غده و خاک**

به منظور بهینه‌سازی استخراج DNA و انجام PCR از عصارهٔ غده‌های سالمی که به‌طور مصنوعی به نسبت ۱۰ به ۱ با غلظت‌های مختلف سوسپانسیون باکتری مخلوط شده بود استفاده گردید. برای این کار پس از شستشو و ضدعفونی غده‌های سالم با هیپوکلریت سدیم ٪۱، قطعاتی از ناحیه استولون غده جدا و عصاره‌گیری شد و عصاره ها به نسبت ۱۰ به ۱ با غلظت‌های[1] $10^1$ تا $10^7$ CFU/ml سوسپانسیون باکتری مخلوط گردید. سپس ۱۰۰ µl از عصاره غده آلوده با ۲۲۰ µl بافر لیزکننده ( ۱۰۰میلی مولار NaCl با pH ۸ , ۱۰میلی مولار Tris-HCl و ۱ میلی‌مولار EDTA ) مخلوط شد و ترکیب به مدت ۱۰ دقیقه در ۹۵ درجه و سپس به مدت ۵ دقیقه در یخ نگهداری شد. درمرحله بعد ۸۰µl محلول لیزوزیم (50mg/ml Tris-HCl 10 mM pH 8) به ترکیب فوق اضافه گردید و نمونه‌ها در ۳۷ درجه به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند سپس ۵۰۰µl بافر استخراج CTAB که شامل ٪ ۲ Cetyl trimethy1 ammonium bromide ، ۱۰۰میلی‌مولارTris – HCl، ۱/٤ مولار NaCl ، ۱۰میلی‌مولار EDTA بود به ترکیب فوق اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام بن ماری ۶۰ درجه قرار گرفت. نمونه‌ها در۱۵۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند و فاز رویی با ۵۰۰ µl کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) مخلوط شده و دوباره در ۱۵۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز روئی برداشته شد و به لولهٔ جدید منتقل و هم حجم آن محلول ایزوپروپانول سرد اضافه گردید و به مدت چند ساعت در۲۰- درجه قرار داده شد.



www.SID.ir

Archive of SID

نمونه‌ها در ۱۵۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. رسوب اسید نوکلئیک حاصله پس از چند ساعت خشک شدن در دمای اتاق در ۱۰۰ µl آب مقطر استریل رقیق شد. هر دفعه ٤µl از محلول بدست آمده به عنوان DNA الگو در PCR استفاده گردید (Pastrik & Maiss 2000).

برای استخراج DNA از غده یا ساقه با آلودگی طبیعی، پس از شستشو و ضد عفونی غده‌ها با هیپوکلریت سدیم ٪۱، قطعاتی از ناحیهٔ استولون غده جدا و عصاره‌گیری شد. سپس ۱۰۰ µl از عصارهٔ غدهٔ آلوده با ۲۲۰ µl بافر لیز کننده مخلوط شد و مراحل استخراج به روش یاد شده از بالا انجام شد.

برای استخراج DNA از خاک ابتدا به منظور آلوده‌سازی مصنوعی، یک گرم خاک با دو میلی‌لیتر آب به خوبی مخلوط گردید و پس از سانتریفوژ (به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰rpm) فاز بالایی دور ریخته شد. رسوب حاصل مجددا در دو میلی‌لیتر آب مقطر استریل بصورت سوسپانسیون درآمد و به نسبت ۱۰ به ۱ با غلظت‌های ۱۰ تا $10^{7}$ CFU/ml سوسپانسیون باکتری آلوده گردید. استخراج DNA از این سوسپانسیون آلوده، مطابق روشی که برای استخراج DNA از عصارهٔ غده شرح داده شد صورت گرفت.

**واکنش PCR**

واکنشهای PCR در حجم ۵۰ µl شامل بافر 1X PCR سیناژن، $MgCl_2$ ۲/۵ mM، ۲۵ pmol از هر یک از پرایمرها، ۰/۲ mM از هر dNTP، ۱/۵U از Taq DNA Polymerase سیناژن و ۵ µl DNA الگو تهیه گردید.

پرایمرهای اختصاصی 759 با توالی(5´ GTC GCC GTC AAC TCA CTTTCC3´) و 760 با توالی (5´ GTC GCC GTC AGC AAT GCGG AAT CG3´) (Ito *et al*. 1998) برای تکثیر DNA استفاده شد. سیکلهای PCR شامل یک سیکل در دمای ۹٤° C به مدت ۳ دقیقه، دمای ۵۳ ° C به مدت ۱ دقیقه، دمای ۷۲ ° C به مدت ۱/۵ دقیقه سپس ۳۰ سیکل در دمای ۹٤ ° C به مدت ۱۵ ثانیه (مرحله واسرشت) ، دمای٦۰° C به مدت ۱۵ ثانیه (اتصال) ، دمای۷۲ ° C به مدت ۱۵ ثانیه (مرحله ساخت) و یک مرحلهٔ تکثیر در دمای۷۲° C به مدت ۵ دقیقه بود (Ito *et al*. 1998).



www.SID.ir

Archive of SID

پس از اتمام سیکل‌های واکنش، محصولات PCR در روی ژل آگاروز ۱/۵٪ الکتروفورز و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید زیر نور UV مشاهده گردیدند. از DNA فاژ Lambda هضم شده با *Hind* III و *ECO*RI بعنوان نشانگر مولکولی استفاده شد.

**غنی‌سازی باکتری در عصاره**

اثر غنی‌سازی در افزایش دقت و حساسیت PCR بررسی گردید. برای این منظور هفت رقت پاتوژن (۱۰تا $10^{7}$ CFU/ml ) در عصارهٔ خاک یا غده تهیه گردید سپس ۵۰۰ µl از هر رقت در لوله‌های جداگانه با ۵۰۰ µl محیط مایع نیمه‌انتخابی (SMSA) Semi-selective media, South Africa (Englebrecht 1994) مخلوط شد و در ۳۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور همزن کشت گردید. باکتریهای کشت شده پس از ۴۸ ساعت جهت استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند.

**نتیجه**

در این بررسی تشخیص و ردیابی باکتری *R. solanacearum* با استفاده از تکنیک PCR با موفقیت صورت گرفت. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 759 و760 توانست قطعه‌ای به اندازهٔ bp ۲۸۱ از باکتری *R. solanacearum* را تکثیر نماید (شکلهای ۵-۱). وضوح و شدت باند تکثیر شده در شرایط مختلف متفاوت بود بنابراین برای افزایش کارآیی تکنیک PCR در تشخیص این باکتری، ابتدا روشهای استخراج DNA و فاکتورهای واکنش PCR مانند غلظت $MgCl_2$ و غلظت Taq DNA Polymerase بهینه‌سازی گردید. بطور مثال غلظت $MgCl_2$ اثر قابل توجهی در شدت واکنش داشت و باندهای DNA تکثیر شده در غلظت ۲/۵ میلی مولار $MgCl_2$، و۱/۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase بیشترین وضوح را ایجاد کرد (شکل ۱).

PCR توانست غلظت‌های مختلف باکتری را در عصارهٔ گیاه سیب‌زمینی که بصورت مصنوعی با باکتری آلوده شده بود از $10^{4}$ - $10^{6}$ CFU/ml تشخیص دهد (شکل ۲). برای افزایش کارآیی تکنیک PCR، اثر غنی سازی باکتری در عصارهٔ گیاهی بر روی دقت و



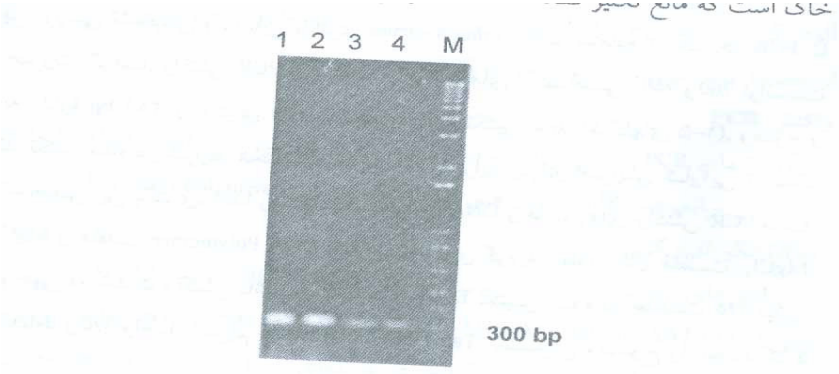
www.SID.ir

Archive of SID

حساسیت این روش بررسی گردید. عصاره‌های آلودهٔ بافت گیاهی، غده و خاک قبل از استخراج DNA به مدت ٤٨ ساعت در محیط SMSA مایع غنی‌سازی شدند. غنی‌سازی باعث افزایش دقت این روش تا هزار برابر شد بطوریکه با تکنیک PCR به همراه غنی‌سازی (Post-enrichment PCR) تا غلظت ۱۰ CFU/ml باکتری در عصاره غده ردیابی گردید (شکل۳).

با استفاده از تکنیک Post- enrichment PCR حضور و گسترش باکتری *R. solanacearum* در غده و ساقه سه رقم هرتا، نیکولا و فیانا که بصورت مصنوعی در گلخانه آلوده‌سازی شده بودند تشخیص داده شد و با موفقیت میزان وشدت آلودگی نمایان گردید (شکل۴).

در آزمایش دیگر تکنیک PCR برای ردیابی غلظتهای مختلف باکتری *R. solanacearum* در خاک به کار گرفته شد و با موفقیت غلظتهای ۱۰، $۱۰^{۳}$، $۱۰^{۵}$و $۱۰^{۷}$ CFU/ml باکتری در خاک را شناسایی نمود. اما همانند مطالعات انجام شده توسط محققین دیگر یکنواختی و تکرارپذیری کامل نتایج مشاهده نگردید این مشکل معمولا به دلیل وجود ممانعت کننده‌های فراوان در خاک است که مانع تکثیر قطعات DNA الگو می‌گردند (شکل۵ ) (Ito *et al*. 1998).



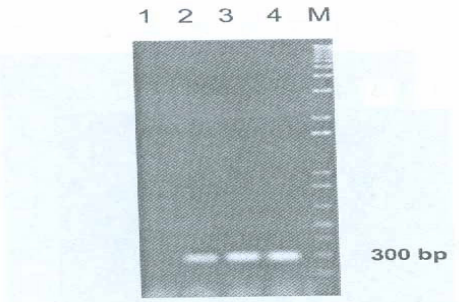

شکل۱- مقایسهٔ اثر غلظت $MgCl_2$ در بالا بردن کارایی روش PCR برای ردیابی *R. solanacearum* در عصارهٔ گیاهان آلوده. واکنش PCR با غلظت ۲/۵ mM $MgCl_2$ (ستون ۱ و۲ )، وغلظت ۱/۵ mM $MgCl_2$ (ستون ۳ و۴)، نشانگر۱kb (ستون M).

Fig. 1. Effects of $MgCl_2$ concentration on enhancing PCR efficiency for detection of *R. solanacearum*. PCR products (281 bp) using 2.5 mM $MgCl_2$ (lane 1 and 2) or 1.5 mM $MgCl_2$ (lane 3 and 4). Lane M is 1kb DNA size marker.



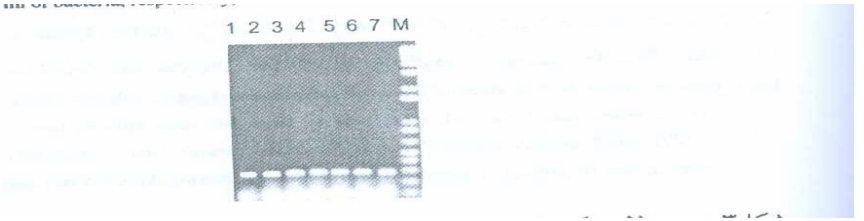
www.SID.ir

Archive of SID




شکل۲- محصولات تکثیر یافته PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد با استفاده از DNA استخراج شده عصاره گیاه سیب‌زمینی که به طور مصنوعی با غلظتهای مختلف باکتری *R. solanacearum* آلوده شده است. ستونهای ۱ تا ۴ نشان دهندهٔ محصولات PCR، به ترتیب با غلظتهای $۱۰^{۳}$ تا $۱۰^{۶}$ CFU/ml باکتری و ستونM، نشانگر 1Kb می‌باشد.

Fig. 2. PCR products on 1.5% agarose gel, amplified using DNA extracted from plant tissues artificially inoculated with various concentration of *R. solanacearum*. Lane. 1- 4, extracts containing $10^3$ to $10^6$ CFU/ml of bacteria, respectively, and lane M is 1kb DNA size marker.



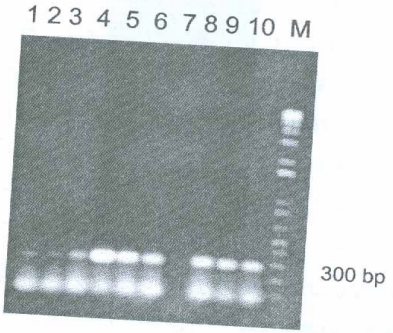

شکل۳- محصولات تکثیر یافته PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد با استفاده از DNA استخراج شده عصاره غنی شدهٔ غدهٔ سیب‌زمینی که به طور مصنوعی با غلظت‌های مختلف باکتری *R. solanacearum* آلوده شده است. ستونهای ۱ تا ۷ نشان دهندهٔ محصولات PCR، به ترتیب با غلظتهای $۱۰^{۱}$– $۱۰^{۷}$ CFU/ml باکتری و ستون M، نشانگر 1Kb می‌باشد.

Fig. 3. Amplified PCR products on 1.5% agarose gel using DNA extracted after enrichment of potato tubers artificially inoculated with different concentrations of *R. solanacearum.* Lanes 1-7 PCR products amplified from samples containing $10^1$-$10^7$ CFU/ml of bacteria, respectively; lane M, is 1kb DNA size marker.



www.SID.ir

Archive of SID




شکل ٤- محصولات تکثیر یافتهٔ PCR از عصارهٔ غده و ساقهٔ سیب‌زمینی آلوده به باکتری *R. solanacearum* در سه رقم هرتا ، نیکولا و فیانای آلوده شده در گلخانه. سه ستون اول مربوط به عصارهٔ غدهٔ سه رقم هرتا (۱)، نیکولا ا(۲) و فیانا (۳)، ستونهای ۴، ۵ و ۶ به ترتیب مربوط به عصارهٔ ساقه‌های این سه رقم، ستون۷، شاهد منفی، ستون ۸، شاهد مثبت، ستون ۹، عصارهٔ غدهٔ آلوده شده، ستون۱۰، عصارهٔ ساقهٔ بوتهٔ آلوده شده و ستون M نشانگر 1Kb.

Fig.4. Post-enrichment PCR products of tuber and stem tissues of potato cultivars Herta, Nicola and Fiana in the greenhouse. Lanes 1-3, tuber extracts; lanes 4-6, stem extracts; lane 7, negative control ($H_2O$); lane8, positive control (DNA of *R. solanacearum*); lane 9, artificially inoculated tuber extract; lane 10, artificially inoculated stem extract and lane M, 1kb DNA size marker.

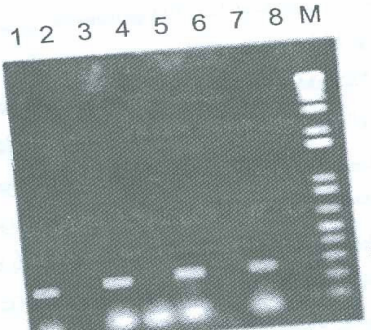
**بحث**

تکنیک PCR بدلیل دارا بودن حساسیت، سرعت و سهولت استفاده از توانایی بالایی در امر شناسایی سریع عوامل بیماریزا برخوردار است. در این تحقیق با استفاده از پرایمرهای اختصاصی که توسط محققین قبلا گزارش شده بود امکان تشخیص سریع جدایه‌های ایرانی باکتری *R. solanacearum* فراهم گردید. بکارگیری روش PCR در مقایسه با روشهای معمول تشخیص باکتری مانند کشت و تشخیص مورفولوژیک، بیولوژیک، روشهای سرولوژیک و



www.SID.ir

Archive of SID




شکل ۵- محصولات تکثیریافته PCR از DNA استخراج شده عصاره غنی شدهٔ خاک با آلودگی مصنوعی به باکتری *R. solanacearum* بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد. ستونهای ۱ تا ۷ به ترتیب نشان دهندهٔ غلظتهای $10^{1}$ تا $10^{7}$ CFU/ml سلول باکتری در هر میلی‌لیتر عصاره خاک مورد استفاده است. ستون ۸ شاهد منفی و ستون M نشانگر 1 Kb می‌باشد.

Fig. 5. PCR products of enriched soil extracts inoculated with different concentraitions of *R. solanacearum* on 1.5% agarose gel: lanes1-7, samples containing 10- $10^{7}$ CFU/ml bacteria, respectively; lane 8, negative control ($H_2O$) and lane M, 1kb DNA size marker.

هیبریداسیون بویژه در شناسایی بیماریهای نهفته مانند پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی دارای دقت و سادگی بیشتری است. حساسیت این تکنیک به ممانعت‌کننده‌های گیاهی و خاک از اشکالات عمدهٔ آن به شمار می‌رود (Niepold 1999, Elphinstone *et al*. 1996, Pastrik & maiss 2000)

یکی از اجزاء بسیار مهم در واکنش PCR آنزیم Taq DNA Polymerase است که به ممانعت‌کننده‌های موجود در عصاره، نمونه‌های بیولوژیکی و نیز بقایای مواد شیمیایی مورد استفاده در استخراج DNA، حساس می‌باشد و همین امر موجب اختلال در تکثیر DNA می‌گردد (Rossen *et al*. 1992). بنابراین برای کسب نتیجه مطلوب از روشهای مبتنی بر PCR در مرحله اول باید از یک روش مناسب برای استخراج DNA استفاده نمود (Pastrik & Maiss 2000). در این تحقیق ابتدا برای افزایش کارایی و حساسیت تکنیک PCR بهینه‌سازی فاکتورهای مؤثر در آن صورت گرفت. از این میان با توجه به نقش تعیین کنندهٔ



www.SID.ir

Archive of SID

کلرید منیزیم در فعالیت آنزیم Taq DNA polymerase بهینه‌سازی آن صورت گرفت. زمانیکه غلظت استاندارد ۱/۵ mM کلرید منیزیم استفاده شد تکثیر قطعهٔ ۲۸۱ bp با کیفیت پایین مشاهده گردید در حالیکه با افزایش غلظت کلرید منیزیم به ۲/۵ mM در واکنش، قطعهٔ ۲۸۱ bp با وضوح خوبی تولید شد. با افزایش غلظت کلرید منیزیم اتصال پرایمرها به DNA الگو افزایش می‌یابد. یون منیزیم موجب افزایش فعالیت پلیمرازی آنزیم Taq نیز می‌گردد و تکثیر قطعهٔ DNA هدف با کارائی بیشتری صورت می گیرد(Newton & Graham 1995) . البته تشکیل دایمرهای DNA نیز با بالا بردن غلظت یون منیزیم افزایش می‌یابد که باعث می گردد پرایمرهایی که بصورت دو تایی با یکدیگر اتصال یافته اند به طور غیر اختصاصی تکثیر یابند و تجمعی از قطعات کوچک را پدید آورند (شکل ۵-۱). بنابراین در این تحقیق DNA به روش CTAB استخراج شده و با استفاده از پرایمرهای 760 و 759 یک قطعه DNA به اندازهٔ ۲۸۱ bp از نمونه‌های آلوده تکثیر گردید. شناسایی جدایه‌های ایرانی *R. solanacearum* با استفاده از PCR و پرایمرهای اختصاصی 759 و 760 برای اولین بار در کشور گزارش می‌گردد. هر چند این پرایمرها دو باکتری دیگر به نام‌های *Ralstonia syzgii* و عامل بیماری خونی موز (Blood disease bacterium) را نیز با تولید قطعات دیگر DNA، غیر از قطعهٔ ۲۸۱ bp شناسایی می‌نماید (Ito *et al*. 1998). ولی ایجاد قطعهٔ ۲۸۱ bp اختصاصی *R. solanacearum* می‌باشد. موفقیت پرایمرهای بکار برده شدهٔ فوق در شناسایی اختصاصی جدایه‌های جمع‌آوری شده از استرالیا، فیلیپین، تایوان و ژاپن نیز قبلا گزارش شده بود (Ito *et al* . 1998)

نتایج مطالعات قبلی نشان داده بود که تشخیص باکتری در خاکهای آلوده از طریق PCR از حساسیت ناچیزی برخوردار است و فقط در صورت بالا بودن غلظت باکتری ($\geq 10^6$CFU/ml) کارائی دارد. به همین علت در این تحقیق ابتدا عصارهٔ خاک آلوده با کشت دادن به مدت ۴۸ ساعت غنی‌سازی شد. به این صورت تکنیک PCR توانست غلظتهای $10^1$ تا $10^7$ CFU/ml باکتری را در عصارهٔ خاک آلودهٔ غنی‌سازی شده ردیابی نماید. نتایج حاصل در این مورد از یکنواختی و تکرارپذیری ثابتی برخوردار نبود، به طوری که در واکنشهای مربوط به غلظتهای $10^6$، $10^4$ و $10^2$ CFU/ml باند اختصاصی ۲۸۱ bp تولید نشد (شکل ۵). بنظر می‌رسد که این



www.SID.ir

Archive of SID

اشکال ناشی از باقیماندهٔ ممانعت کننده‌های موجود در خاک باشد که در برخی از نمونه‌ها بطور کامل حذف نشده بود. این مشکل در نمونه های آلودهٔ بافت گیاهی مشاهده نگردید. ایتو و همکاران برای ردیابی باکتری *R. solanacearum* از خاک پیشنهاد کردند که بدلیل وجود ممانعت‌کننده‌های فراوان در خاک لازم است DNA بعد از استخراج از خاک در ژل آگاروز الکتروفورز شده و نوار حاوی باند DNA باکتری جدا و با کیت Gen clean II خالص‌سازی شده و سپس DNA بدست آمده برای PCR استفاده گردد .با توجه به اینکه با این روش استخراج DNA، از غلظت‌های بالای باکتری در خاک ($10^6$ CFU/ml) تنها ۱۰ng DNA بدست می‌آید، لذا محققین فوق نتوانستند در کمتر از این غلظت باکتری، DNA لازم برای واکنش PCR را بدست آورند. در نتیجه امکان تشخیص باکتری در خاک زمانیکه غلظت باکتری کم است موفقیت‌آمیز نبوده و احتمالا ممانعت‌کننده‌های موجود در نمونه خاک از فعالیت Taq DNA Polymerase نیز جلوگیری می‌نمایند.

نتایج این تحقیق به همراه گزارشات محققین قبلی نشان داد که تشخیص باکتری *R. solanacearum* در خاک با استفاده از PCR امکان‌پذیر است. جهت استخراج DNA با خلوص بالاتر استفاده از روش استخراج DNA مناسبتری الزامی است تا تشخیص و تکثیر DNA با سهولت بیشتر صورت گیرد. نتایج ما همچنین نشان داد که غنی‌سازی عصارهٔ خاک قبل از استخراج DNA گام مؤثری در افزایش دقت PCR می‌باشد. البته برای استفاده از این تکنیک در سطح وسیع، لازم است ارزیابی کارائی آن در تشخیص آلودگی طبیعی خاک مزارع صورت پذیرد.

برخلاف نتایج PCR حاصل از خاک، تشخیص باکتری در عصارهٔ بافت غده و ساقهٔ آلوده شده به باکتری بدون انجام غنی‌سازی در غلظت $10^4$ CFU/ml با موفقیت انجام شد (شکل ۲). این نتایج نشان داد که PCR روش مناسبی برای تشخیص اختصاصی *R. solanacearum* می باشد. اثر غنی‌سازی عصارهٔ بافت گیاهی در افزایش حساسیت تشخیص باکتری در بافت غده و ساقه کاملا مشهود بود بطوریکه بدون غنی‌سازی تشخیص باکتری تنها از غلظت $10^4$CFU/ml به بالا در عصارهٔ گیاهی انجام گردید ولی پس از غنی‌سازی، تشخیص باکتری در غلظتهای



www.SID.ir

Archive of SID

پایین تا CFU/ml ۱۰ نیز در عصارهٔ غده امکان‌پذیر شد (شکل ۲ و۳). باتوجه به اینکه فقط ۴۸ ساعت زمان برای غنی‌سازی لازم است، بنابر این انجام غنی سازی قبل از استخراج DNA برای تشخیص باکتری *R. solanacearum* توصیه می‌گردد. به نظر می‌رسد غنی‌سازی همزمان با افزایش جمعیت پاتوژن باعث رقیق شدن غلظت مواد ممانعت‌کننده در محلول DNA استخراج شده نیز می‌گردد و در نتیجه بکارگیری غنی‌سازی موجب تکثیر بیشتر DNA هدف و تشخیص دقیقتر باکتری می‌شود. بعلاوه تکنیک PCR سلولهای غنی‌شده و زندهٔ عصارهٔ آلوده را ردیابی می‌نماید (Elphinstone *et al*. 1996). این در حالی است که در PCR بدون غنی‌سازی، DNA سلولهای مرده و زنده باکتری ممکن است به صورت تؤام یا غیر قابل تفکیک تکثیر شده و ردیابی شود.

پس از اطمینان از کارائی PCR در تشخیص اختصاصی جدایه‌های ایرانی باکتری *R. solanacearum* و بهینه‌سازی تکنیک مربوطه، تشخیص این باکتری در بافت آلودهٔ طبیعی نیز با موفقیت انجام گرفت (شکل۴). مقایسهٔ شدت وضوح قطعات bp ۲۸۱ تکثیر شده در عصارهٔ غده و ساقه نشان داد که میزان تکثیر قطعات DNA هدف از DNA ساقه بیشتر از غده بوده است. این موضوع ممکن است ناشی از بالا بودن غلظت باکتری *R. solanacearum* در آوندهای بافت ساقه باشد البته وجود ممانعت‌کننده‌های بیشتر در بافت غده نیز ممکن است باعث کاهش میزان تکثیر DNA هدف باشد. در مجموع نتایج این بررسی‌ها نشان داد که تشخیص اختصاصی جدایه‌های ایرانی باکتری *R. solanacearum* با استفاده از تکنیک PCR به همراه غنی‌سازی باکتری در عصارهٔ گیاه و خاک امکان‌پذیر بوده و این روش به مراتب سریعتر، حساستر و دقیقتر از روشهای کلاسیک تشخیص می‌باشد.

**منابع**

جهت ملاحظه به صفحات (85-83) متن انگلیسی مراجعه شود.

---

نشانی نگارندگان: جواد مظفری و کبری مسلم‌خانی، بخش تحقیقات ژنتیک مؤسسهٔ اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج، عزیزاله علیزاده، گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه تربیت‌مدرس



www.SID.ir