مقایسه روش‌های مختلف ردیابی باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* در بذر لوبیا*

علی‌رضا اخوان[۱]، مسعود بهار[۱**]، قدرت‌اله سعیدی[۲] و محمدرضا لک[۳]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۲/۲۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۳/۲۷)

چکیده

در سال‌های اخیر بیماری سوختگی معمولی لوبیا خسارات زیادی را به مزارع لوبیا در ایران وارد کرده است. اصلی‌ترین منبع گسترش این بیماری کاشت بذرهای لوبیای آلوده به *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* است و لذا اطمینان از عدم آلودگی بذرهای به عامل بیمارگر در کنترل بیماری نقش اساسی دارد. در این بررسی کارایی روش‌های الایزای غیرمستقیم، آزمون PCR مستقیم، Ic-PCR و Bio-PCRبرای ردیابی *X. axonopodis* pv. *phaseoli* در بذرهای جمع‌آوری شده لوبیا از مزارع آلوده استان مرکزی مقایسه شد. به این منظور، عصاره به‌دست آمده از غوطه‌وری بذرهای مورد آزمایش در آب و بافر، برای انجام آزمایش‌های الایزای غیرمستقیم و PCR مستقیم با جفت آغازگر اختصاصی X_4c/ X_4e به‌کار رفت. در آزمون Ic-PCR استخراج DNA پس از به‌دام انداختن سلول‌های باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* موجود درعصاره بذرهای با گاماگلوبولین و در روش Bio-PCR بعد از رشد باکتری روی محیط کشت نیمه انتخابی، به‌روش جوشانیدن صورت گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده، در آزمون الایزای غیرمستقیم تعداد 10^4 الی 10^5 واحد تشکیل دهنده پرگنه در میلی‌لیتر از باکتری*X. axonopodis* pv. *phaseoli* در بذر قابل ردیابی بود. عدم تکرارپذیری نتایج PCR مستقیم نشان داد که این روش نیز برای ارزیابی آلودگی بذرهای به *X. axonopodis* pv. *phaseoli* مناسب نیست. روش Ic-PCR نیز علی‌رغم کارایی مناسب، به‌دلیل هزینه‌بری زیاد مورد توجه قرار نگرفت. در روش Bio-PCR حتی یک سلول زنده از باکتری در عصاره حاصل از غوطه‌وری بذرها در بافر شستشو ردیابی گردید. بنابراین به‌نظر می‌رسد روش Bio-PCR به‌دلیل حساسیت زیاد، سادگی روش و هزینه کمتر، روش مناسب‌تری برای ردیابی*X. axonopodis* pv. *phaseoli* در بذر لوبیا باشد.

واژه‌های کلیدی: بذر لوبیا، سوختگی معمولی لوبیا، *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*، ELISA، Bio-PCR، IC-PCR

مقدمه

در سال‌های اخیر بیماری سوختگی معمولی لوبیا بر اثر باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* خسارت زیادی را به مزارع لوبیا در استانهای مرکزی و لرستان به‌عنوان مناطق عمده تولید این محصول در کشور وارد کرده است (Akhavan *et al.* 2006, Amani *et al.*

* : بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mbahar@cc.iut.ac.ir

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. استاد زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳. مربی پژوهشی بخش تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی استان مرکزی

Archive of SID
www.SID.ir

2004 Lak *et al.* 2002a) چون بذرهای آلوده مهم‌ترین عامل انتشار بیماری سوختگی معمولی لوبیا به نقاط دوردست و اصلی‌ترین منبع زاد مایه تلقیح اولیه در شروع هر فصل زراعی هستند (Angeles-Ramos *et al.* 1991)، لذا تشخیص و استفاده از بذر سالم از مهم‌ترین راه‌های کنترل این بیماری محسوب می‌شود. در گذشته استفاده از محیط کشت‌های نیمه‌انتخابی، آزمون بیماری‌زایی (Claflin *et al.* 1987) و نیز روش الایزای غیرمستقیم (Lak *et al.* 2002b, Malin *et al.* 1985) برای تشخیص آلودگی بذرها مرسوم بود. با فراگیر شدن کاربرد واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) در شناسایی عوامل بیمارگر، استفاده از جفت آغازگر X_4c و X_4e نیز برای ردیابی باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli*، توصیه شده (Audy *et al.* 1994, Audy *et al.* 1996) که این جفت آغازگر براساس توالی یک کاوشگر اختصاصی پلاسمید (Gilbertson *et al.* 1989) طراحی و معرفی شده است.

روش معمول PCR با استفاده مستقیم از عصاره حاصل از غوطه‌وری بذر در بافر شستشو، با دو مشکل اصلی روبه‌رو است، به‌طوری‌که مقادیر قابل توجهی از کند کننده‌های آنزیم*Taq* DNA Polymeras در عصاره مذکور ممکن است مانع انجام واکنش PCR شود و یا به‌علت عدم تفکیک سلول‌های مرده از سلول‌های زنده، نمی‌توان از بیماری‌زا بودن جمعیت باکتری موجود در عصاره، اطمینان حاصل نمود (Schaad *et al.* 1995). روشBio-PCR، تلفیق تکثیر بیولوژیکی DNA باکتری روی محیط کشت و تکثیر آنزیمی DNA طی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز است. این روش اولین بار جهت ردیابی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* به‌عنوان عامل بیماری سوختگی هاله‌دار لوبیا در بذرهای مشکوک به آلودگی با مؤفقیت به‌کار رفت (Schaad *et al.* 1995) و هم‌چنینBio-PCR به‌عنوان بهترین روش برای تشخیص باکتری *Xanthomonas albilineans* عامل بیماری Leaf scald در نیشکر معرفی شد (Wang *et al.* 1999).

در مواردی که به‌علت تعداد کم باکتری یا وجود ممانعت کننده‌های فعالیت آنزیم *Taq* DNA Polymerase در نمونه، استفاده از روش معمول PCR قابل اجرا نباشد، به‌کارگیری روش Ic-PCR، که تلفیقی از آزمون‌های سرولوژی و PCR می‌باشد نیز توصیه می‌گردد (Dittapongpitch & Surat 2003, Peng *et al.* 2001). این روش جهت ردیابی باکتری *Xanthomonas fragariae* عامل بیماری لکه برگی زاویه‌ای توت‌فرنگی با هدف کاهش و یا حذف ممانعت کننده‌های PCR موجود در عصاره توت‌فرنگی (Hartung & Pooler 1997) و هم‌چنین تشخیص حضور باکتری *Ralstonia solanacearum* عامل پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در خاک و علف‌های هرز استفاده شده است (Dittapongpitch & Surat 2003).

تا به‌حال میزان کارامدی روش‌های توصیه شده برای ردیابی آلودگی بذرهای لوبیا به باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* مقایسه نشده است. در این بررسی روش‌های,Indirect ELISA, Direct-PCR Bio-PCR و Ic-PCR جهت ردیابی باکتری عامل بیماری سوختگی معمولی در لوبیا مقایسه شدند تا دقیق‌ترین و ساده‌ترین روش برای تشخیص آلودگی بذرها به باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* معرفی شود.

روش بررسی

نمونه‌برداری از مزارع لوبیا

طی سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸٤، مزارع مختلف لوبیا واقع در شهرستآنهای اراک و خمین در استان مرکزی مورد بازدید قرار گرفتند. از مزارعی که در آنها علایم بیماری سوختگی معمولی شایع بود، نمونه‌های دانه لوبیای دارای علایم بیماری و یا فاقد آن (ظاهرا سالم) جمع‌آوری شد.

تهیه عصاره از دانه‌های لوبیا

به‌منظور تهیه عصاره، ۱۰ دانه از نمونه‌های جمع‌آوری شده در ۲۰ میلی‌لیتر آب یا بافر شستشو (۱۰میلی‌مولار بافر فسفاته،

Archive of SID

۱۰میلی‌مولار سولفات منیزیم و ۰/۰۱ در صد توین ۲۰) غوطه‌ور شدند و به‌مدت ۱۲ ساعت در یخچال نگه‌داری گردیدند (Claflin *et al.* 1987). از عصاره حاصل به دو طریق آنتی ژن تهیه شد. در حالت اول ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره مزبور به‌طور مستقیم در هر چاهک الایزا ریخته شد. در حالت دوم ابتدا عصاره حاصل و رقت‌های متوالی آن روی محیط کشت نیمه‌انتخابی Nutrient Broth Yeast Agar (NBYA) تغییر یافته (۸ گرم آب‌گوشت غذایی، ۰/۷ گرم عصاره مخمر، ۲گرم KH_2PO_4، ۰/۵ گرم K_2HPO_4، ۱ گرم گلوکز، ۱ میلی‌لیتر $7H_2O$. 1 M $MgSO_4$ ، ۲۵ میلی‌گرم سفالکسین، ٦ میلی‌گرم فلویورسیل، ۷۵ میلی‌گرم سیکلوهگزامید و۲ میلی‌گرم نیتروفورانتوین در یک لیتر) کشت گردید (Akhavan 2006) وسپس به‌مدت ٤٨ ساعت داخل انکوباتور ۲۸°C قرار گرفتند تا پرگنه‌های باکتری ظاهر گردد. با افزودن دو میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر پتری، پرگنه‌ها به حالت سوسپانسیون درآمدند و ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به‌عنوان آنتی ژن مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش الایزای غیرمستقیم

آزمون الایزای غیرمستقیم (Indirect- ELISA) با استفاده از گاماگلوبولین تهیه شده قبلی (Lak *et al.* 2002b) و براساس پروتکل پیشنهادی (Hampton, *et al*. 1990) انجام گرفت. ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر عصاره بذرها در داخل چاهک‌های پلیت الایزا ریخته شد و پلیت به‌مدت سه ساعت در ۳۷°C قرار گرفت. پس از سه مرتبه شستشوی پلیت به‌وسیله بافر شستشو، از گاماگلوبولین رقیق شده (۱:۱۰۰۰) به‌میزان۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک پلیت الایزا افزوده شد و پلیت مجدداً در انکوباتور ۳۷°C به‌مدت یک ساعت قرار گرفت و سپس سه مرتبه شسته شد. در این مرحله ۱۰۰ میکرولیتر از گاماگلوبولین ضد خرگوش متصل به آنزیم الکالین فسفاتاز (Sigma A3687) رقیق شده (۱:۲۵۰۰) به هر چاهک پلیت الایزا اضافه گردید و پلیت‌ها یک ساعت در دمای ۳۷°C قرار گرفتند. بعد از چهار مرتبه شستشو و خشک شدن پلیت، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از بافر سوبسترا (۲۹/۴ میلی‌لیتر دی اتانل آمین، ۸ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱۸% و آب تا حجم نهایی ۵۰ میلی‌لیتر، pH۹/۸) حاوی ماده *p*-nitrophenyl phosphatase به غلظت 1mg/ml به هر چاهک اضافه شد و پس از نگه‌داری در تاریکی به‌مدت یک ساعت نتایج آزمون با مشاهده چشمی یادداشت گردید، به‌طوری‌که بروز رنگ زرد در هر چاهک به‌عنوان نتیجه مثبت و عدم تغییر رنگ به‌عنوان نتیجه منفی ارزیابی شد. در تمام آزمایش‌ها از آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد منفی و از سوسپانسیون 10^8 واحد تشکیل دهنده پرگنه در میلی‌لیتر از باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد.

جهت تعیین حداقل تعداد سلول باکتری برای انجام واکنش درآزمون الایزا، از سوسپانسیون رقت‌های 10^2 تا 10^8 واحد تشکیل دهنده پرگنه در میلی‌لیتر باکتری که به‌روش رقیق کردن متوالی شمارش شده بودند استفاده شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام از غلظت‌های مزبور با چهار تکرار در هر آزمون الایزا استفاده گردید.

برای بررسی میزان اختصاصی بودن گاماگلوبولین تهیه شده برای باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* درآزمون الایزا، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^8 واحد تشکیل دهنده پرگنه در میلی‌لیتر از باکتری‌های *Pectobacterium carotovorum*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas viridiflava*, *X. axonopodis* pv. *P. marginalis*, *P. fluorescens*, *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *X. axonopodis* pv. *citri* و *X. arboricola* pv. *Juglandis* و *X. translucens* به‌عنوان آنتی‌ژن به‌کار رفت.

روش PCR مستقیم

جهت انجام PCR مستقیم، ازسوسپانسیون عصاره بذرهای تهیه شده و رقت‌های متوالی آن به‌روش جوشاندن (Pastrik & Maiss 2000) استخراج DNA صورت

Archive of SID

www.SID.ir

گرفت و ۱۰ میکرولیتر از DNA حاصل به‌عنوان الگو در واکنش PCR به‌کار رفت.

واکنش‌های PCR مطابق روش توصیه شده و در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافرPCR (×۱۰)، ۱/۷۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۲ میلی‌مولار از مخلوط dNTPs، ۰/۵ میکرومولار از هر یک از آغازگرهای X_4c(5'-ggCAACACCCgATCCCTAAACAgg-3') و X_4e (5'-CgCCggAAgCACgATCCTCgAAg-3')، ۱/۲۵ واحد *Taq* DNA Polymerase و ۱۰ میکرولیتر DNA الگو تهیه شد (Audy *et al.* 1994). واکنش در دستگاه ترموسایکلر (Genius FGEN 05 TD) با برنامه دمایی شامل یک مرحله یک دقیقه‌ای در $95^{\circ}C$ و سپس ۳۵ چرخه $95^{\circ}C$ برای یک دقیقه، $65^{\circ}C$ برای یک دقیقه و $72^{\circ}C$ برای دو دقیقه انجام گرفت. در پایان یک مرحله گسترش نهایی در $72^{\circ}C$ برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. محصول PCR پس از مخلوط کردن با بافر بارگذاری در ژل آگارز ۱/۲% بارگذاری و به‌مدت سه ساعت با ولتاژ ثابت ۶۵ در بافر Tris-Borate- TBE الکتروفورز شد.

جهت اطمینان از دقت و اختصاصی بودن محصول PCR، واکنش برای تعدادی از پرگنه‌های زرد رنگ ساپروفیت که از بذرهای لوبیا جدا شده بودند و مرفولوژی متفاوتی از نظر اندازه، رنگ و آرایش حاشیه پرگنه داشتند و هم‌چنین باکتری‌های *X. campestris* pv. *compestris*، *X. translucens*، *X. axonopodis* pv. *citri*، *Pseudomonas marginalis*، *P. fluorescens*، *Ralstonia solanacearum* و *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* نیز صورت گرفت.

روش Ic-PCR

در روش Ic-PCR از ترکیب هر دو روش ELISA و PCR هم‌زمان استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر گاماگلوبولین رقیق شده (۱:۱۰) به هر چاهک پلیت الایزا اضافه شد و پلیت به‌مدت سه ساعت در $37^{\circ}C$ قرار گرفت. بعد از سه بار شستشوی چاهک‌ها، ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره حاصل از غوطه‌وری دانه‌ها به هر چاهک اضافه شد و پلیت مجدداً به‌مدت سه ساعت در $37^{\circ}C$ قرار گرفت. بعد از شستشوی پلیت به‌روش قبلی، به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر آب مقطر سترون اضافه شد و پلیت به‌مدت پنج دقیقه در دمای جوش و سپس ۱۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. مقدار ۱۸ میکرولیتر از محتویات هر چاهک به‌عنوان DNA در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مطابق روش قبلی، به‌کار رفت.

روش Bio-PCR

در روش Bio-PCR، ۱۰۰µl از سوسپانسیون دانه‌های لوبیای مورد آزمایش و رقت‌های متوالی آن تا 10^{-4} روی محیط کشت نیمه انتخابی NBYA تغییر یافته کشت گردید. پس از ظهور پرگنه‌ها، دو میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر محیط کشت اضافه گردید و پرگنه‌های موجود در سطح محیط کشت به حالت سوسپانسیون درآمدند. پس از استخراج DNA از ۵۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون به‌روش جوشاندن، ۱۰ میکرولیتر از مایع رویی به‌عنوان الگوی DNA در واکنش PCR به‌کار رفت. شرایط واکنش، مطابق آزمایش PCR مستقیم از دانه‌ها بود.

نتیجه

آزمایش الایزای غیرمستقیم

در آزمایش تعیین حساسیت الایزا، حداقل تعداد لازم باکتری برای انجام واکنش، 10^4 الی 10^5 واحد تشکیل دهنده پرگنه در میلی‌لیتر از باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* براورد گردید و در رقت‌های پایین‌تر تغییر رنگی مشاهده نشد. نتایج پژوهش‌های دیگران نیز نشان داده است که حساسیت آزمایش الایزا در شرایط بهینه، 10^4 واحد تشکیل دهنده پرگنه در میلی‌لیتر می‌باشد (Malin *et al.* 1985).

در تعیین میزان اختصاصی بودن آنتی سرم تهیه شده علیه باکتری عامل سوختگی معمولی لوبیا (Lak *et al.* 2002b)، علاوه بر باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli*، چاهک‌های مربوط به باکتری

Archive of SID

X. axonopodis pv. *citri* نیز تغییر رنگ دادند، در حالی‌که هیچ‌کدام از باکتری‌های مورد استفاده دیگر واکنشی با این آنتی‌سرم نداشتند. قبلاً نیز بروز واکنش غیر اختصاصی بین آنتی‌سرم تهیه شده علیه باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* با باکتری *X. campestris* pv. *malvacearum* گزارش شده بود (Wong 1990). چون در این آزمایش باکتری‌های دیگر غیر از *X. axonopodis* pv. *citri* واکنشی با گاماگلوبولین تهیه شده نداشتند و به‌دلیل این‌که باکتری‌های *X. axonopodis* pv. *citri* و *X. campestris* pv. *malvacearum* از نظر میزبان اختصاصی هستند و قادر به فعالیت در لوبیا نیستند، لذا استفاده از آنتی سرم تهیه شده برای ردیابی باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* در بذر لوبیا با آزمون الایزا منطقی به‌نظر می‌رسد.

در آزمایش‌های مربوط به ردیابی باکتری عامل بیماری سوختگی معمولی در دانه‌های لوبیا به‌روش الایزا، عصاره حاصل از غوطه‌وری دانه‌ها در آب با گاما گلوبولین *X. axonopodis* pv. *phaseoli* واکنش زرد رنگی ایجاد کرد که دلیل آن آلوده بودن دانه‌های لوبیا به باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* ارزیابی شد. شدت واکنش در رقت‌های مختلف عصاره حاصل از غوطه‌وری دانه‌ها با کاهش غلظت باکتری رابطه مستقیمی داشت و با کاهش غلظت باکتری، زردی واکنش نیز کمتربود. در این آزمون، غوطه‌ور نمودن بذر در آب نتایج بهتری نسبت به بافر شستشو برای تهیه آنتی ژن داشت. با توجه به این‌که بافر شستشو نسبت به آب دارای توانایی بیشتری برای جداسازی سلول‌های باکتری از سطح دانه‌هاست، می‌توان دخالت مواد موجود در بافر شستشو را عامل تضعیف اتصال باکتری در چاهک‌های الایزا دانست. در تحقیق مشابه دیگری نیز هنگامی‌که از محیط کشت مایع جهت غوطه‌ور کردن دانه‌ها استفاده شد، شدت واکنش الایزا کاهش یافته بود که دلیل آنرا اختلال مواد موجود در محیط کشت در سیستم الایزا دانسته‌اند (Wong 1991).

تلفیق کشت عصاره حاصل از غوطه‌وری دانه‌ها روی محیط نیمه‌انتخابی NBYA تغییر یافته و آزمایش الایزا، توانایی ردیابی باکتری عامل بیماری را در بذرهای لوبیا به‌طور چشم‌گیری افزایش داد. دلیل این امر را می‌توان تکثیرسلول‌های باکتری در محیط کشت نیمه‌انتخابی و رسیدن جمعیت به آستانه حساسیت الایزا دانست.

روش PCR مستقیم

در آزمون PCR مستقیم عصاره بذرهای غوطه‌ور شده در بافر شستشو هیچ قطعه‌ای تکثیر نگردید، هرچند در بعضی موارد وجود آلودگی به *X. axonopodis* pv. *phasoli* در این دانه‌ها با روش‌های دیگر به اثبات رسیده بود. احتمال دارد وجود ممانعت کننده‌های آنزیم *Taq* DNA Polymerase در بافر شستشو مانع تکثیر DNA شده باشد. در چندین مورد که دانه‌ها در آب غوطه‌ور شدند، قطعه مورد انتظار باکتریایی تکثیر یافت ولی چون این نتیجه واکنش PCR تکرارپذیر نبود، از نتایج آزمون PCR عصاره بذر در آب اطمینان حاصل نگردید. با توجه به عدم یک‌نواختی در نتایج و نیز عدم تفکیک باکتری‌های زنده از باکتری‌های مرده در واکنش PCR مستقیم (Audy *et al.* 1996)، استفاده از این روش پیگیری نشد.

روش Ic-PCR

با استفاده از روش Ic-PCR به راحتی تعداد 10^3 واحد تشکیل دهنده پرگنه در میلی‌لیتر از عصاره حاصل از غوطه‌وری بذرهای در آب ردیابی گردید (شکل۱). این روش مشتمل بر دو مرحله کاملا اختصاصی یعنی واکنش اتصال سلول‌های باکتری با گاماگلوبولین مربوطه و تکثیر اختصاصی DNA باکتری در طی واکنش PCR است. بنابراین روش Ic-PCR یک روش بسیار اختصاصی و با دقت قابل توجه جهت ردیابی سلول‌های باکتریایی محسوب می‌شود. از مزایای دیگر این روش حذف کامل ممانعت کننده‌های آنزیم *Taq* DNA Polymerase موجود در نمونه و هم‌چنین توانایی ردیابی سلول‌های زنده فاقد توانایی رشد

Archive of SID

www.SID.ir

در محیط کشت (VNC)Viable but Nonculturable است (Dittapongpitch & Surat 2003, Hartung & Pooler 1997). به‌کارگیری روش Ic-PCR جهت ردیابی باکتری *Xanthomonas fragariae* عامل بیماری لکه‌برگی زاویه‌ای توت‌فرنگی با هدف حذف ممانعت کننده‌های آنزیم *Taq* DNA Polymerase موجود در عصاره توت‌فرنگی با مؤفقیت همراه بوده است (Hartung & Pooler 1997). هم‌چنین گزارشی مبنی بر استفاده از این روش برای ردیابی باکتری *Ralstonia solanacearum* عامل پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی در خاک و علف‌های هرز وجود دارد (Dittapongpitch & Surat 2003).

روش Bio-PCR

در تمام موارد که از Bio-PCR برای ردیابی *X. axonopodis* pv. *phaseoli* در عصاره حاصل از غوطه‌وری دانه‌های لوبیا در بافر شستشو و یا رقت‌های مختلف آن استفاده شد، یک قطعه ۷۳۰ جفت نوکلئوتیدی تکثیر گردید (شکل۲). در این روش، تکثیر بیولوژیکی باکتری روی محیط غذایی و متعاقب آن تکثیرDNA هدف با سیستم آنزیمی PCR فرصتی ایجاد می‌کند که حتی یک و یا تعداد معدودی سلول زنده باکتری قابل ردیابی باشد. در تحقیقات دیگر نیز استفاده از روش Bio-PCR برای ردیابی باکتری*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* عامل بیماری سوختگی هاله‌دار لوبیا با به‌کارگیری محیط King B (Schaad *et al.* 1995) و *Xanthomonas albilineans* عامل بیماری Leaf Scald در نیشکر با به‌کارگیری محیط XAM تغییر یافته مؤفقیت‌آمیز بوده است(Wang *et al.* 1999). با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان از محیط کشت نیمه انتخابی NBYA تغییر یافته به‌عنوان یک محیط ساده و ارزان برای استفاده در روش Bio-PCR جهت ردیابی*X. axonopodis pv. phaseoli* استفاده کرد.

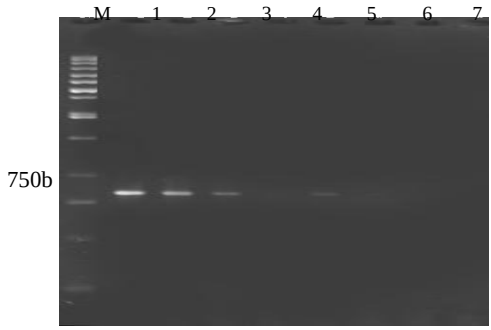
آزمایش تعیین اختصاصی بودن واکنش PCR

در هر سه روش PCR مستقیم، Ic-PCR و Bio-PCR از جفت آغازگر X_4c/X_4e استفاده گردید که با کارایی بسیار بالا یک قطعه ۷۳۰ جفت نوکلئوتیدی را به‌طور اختصاصی در جدایه‌های باکتری*X. axonopodis* pv. *phaseoli* تکثیر کرد. این قطعه در هیچ یک از باکتری‌های شاهد مورد استفاده تکثیر نشد (شکل۳) که با نتایج سایر محققین مطابق بود (Audy *et al.* 1994, Audy *et al.* 1996).

مقایسه روش‌های الایزای غیرمستقیم، PCR، Bio-PCR و Ic-PCR

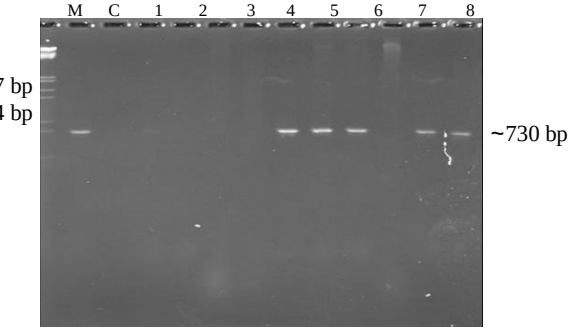
مقایسه روش‌های مختلف سرولوژیکی و PCR برای ردیابی *X. axonopodis* pv. *Phaseoli* از بذر لوبیا نشان داد که روش الایزای غیرمستقیم نسبت به‌روش‌های مبتنی بر PCR حساسیت کمتری دارد. روشPCR مستقیم نیز علی‌رغم کارایی مناسب برای تشخیص تعداد کم باکتری (تعداد 10^3 واحد تشکیل دهنده پرگنه در میلی‌لیتر) در بذر، به‌دلیل فقدان تکرارپذیری و عدم تشخیص سلول‌های مرده و زنده باکتری، روش مناسبی برای تشخیص بذرهای آلوده نیست. روش Ic-PCR یک روش بسیار اختصاصی ارزیابی گردید که عمدتا جهت پالایش باکتری از ممانعت‌کننده‌های آنزیمی موجود در عصاره‌های گیاهی و یا تشخیص سلول‌های VNC کاربرد دارد. استفاده از این روش در خصوص تشخیص سلول‌های VNC باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* منتفی است، زیرا نتایج مطالعات قبلی نشان داده است که وضعیت VNC در مورد باکتری عامل سوختگی معمولی لوبیا اتفاق نمی‌افتد (Jacques *et al.* 2005). از طرف دیگر روش Ic-PCR به‌دلیل نیاز توام به امکانات سرولوژی و PCR هزینه زیادی را در بر دارد. روش Bio-PCR در مقایسه با روش‌های دیگر به‌دلیل تشخیص حداقل معیت باکتری در بذر آلوده لوبیا روش کارامدتری تشخیص داده شد. حساسیت بالا و اختصاصی عمل کردن این روش توسط محققین دیگر نیز مورد توجه قرار گرفته است (Schaad *et al.* 1995, Wang *et al.* 1999). از طرف دیگر در

Archive of SID



شکل ۱. ردیابی باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* در بذر لوبیای جمع‌آوری شده از مزارع اراک به‌روش Ic-PCR: M، Marker III؛ 1، *X. axonopodis* pv. *phaseoli*؛ ۲، توده بذری با آلودگی مصنوعی؛ ۳، توده بذری لوبیا قرمزآلوده ؛ ۵ ، توده بذری لوبیا سفید آلوده ؛ ۴، ۶ و ۷، توده‌های بذری غیر آلوده ؛ ۸ ، آب.

Fig. 1. Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in different seed lots of bean collected from Arak bean farms using Ic-PCR: M: Marker III, 1: *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, 2: artificially infected bean seeds, 3: infected seed lot of Red bean, 5: infected seed lot of white bean: 4,6 & 7: uninfected seed lots, 8: distilled water.



شکل ۲. ردیابی باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* در بذر لوبیای جمع‌آوری شده از مزارع اراک به‌روش Bio-PCR: M، مارکر III ؛ C ، *X. axonopodis* pv. *phaseoli* ؛ ۱،۲،۳،۴،۵، و ۹، توده بذری سالم؛ ۶ ، توده بذری با آلودگی مصنوعی؛ ۷ و ۸، توده بذری لوبیا قرمزآلوده؛ ۱۰ و ۱۱ ، توده بذری لوبیا سفید آلوده.

Fig. 2. Detection of *Xanthomonas. axonopodis* pv. *phaseoli* in different seed lots of bean collected from Arak bean farms using Bio-PCR: M: Marker III, C: *X axonopodis* pv. *phaseoli*, 1,2,3,4,5 & 9 uninfected seed lots, 6: artificially infected bean seeds, 7 & 8: naturally infected seed lots of Red bean, 10 & 11: infected seed lots of white bean.

شکل ۳. آزمون اختصاصی بودن واکنش PCR برای تشخیص باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *Phaseoli* M ، مارکر III ؛ ۱، *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var.*fuscans* ؛ ۲، *X. campestris* pv. *phaseoli* ؛ ۳، *X. axonopodis* pv. *citri* ؛ ۴ ، *X. arboricola* pv. *juglandis* ؛ ۵ ، *Pseudomonas viridiflava* ؛ ۶، *P. marginalis* ؛ ۷، *P. fluorescens* ؛ ۸ و۹، یک باکتری زرد جدا شده از بذر لوبیا.

Fig. 3. Specificity of the Polymerase Chain Reaction: M: Marker III, 1: *Xanthomonas. axonopodis* pv. *phaseoli*, 2: *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var.fuscans, 3: *X. axonopodis* pv. citri, 4: *X. arboricola* pv. *juglandis*, 5: *Pseudomonas viridiflava*, 6: *P. marginalis*, 7: *P. fluorescens*, 8 & 9: A yellow bacterium isolated from bean seeds.

Archive of SID

www.SID.ir

این روش تنها DNA سلول های زنده باکتری تکثیر می شوند و احتمال بروز پاسخ های مثبت کاذب به‌علت تکثیر DNA سلول‌های مرده از بین می‌رود. هزینه کمتر و سهولت انجام آزمایش نیز از جمله دلایل رجحان روش Bio-PCR نسبت به‌روش‌های دیگر برای ردیابی باکتری *Xaxonopodis* pv. *phaseoli* در بذر لوبیا شد.

سپاسگزاری

نگارندگان از دکترM.A.Jacques از مرکز تحقیقات کشاورزی این فرانسه، مهندس هما عسکریان و مهندس ابوالفضل ناظمی به خاطر کمک‌های فنی و آقایان امام جمعه، رحمتی و عزیزی به موجب کمک‌های اجرایی تقدیر می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (2-1) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID