توسعه دقت و حساسیت روش‌های نوین در ردیابی باکتری *Erwinia amylovora* در مواد گیاهی با آلودگی‌های پنهان*

COMPARISION AND DEVELOPMENT OF NEW METHODS FOR DETECTION OF *Erwinia amylovora* IN LATENT INFECTION PLANT MATERIAL

کبری مسلم خانی** و لیلا صادقی[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۴/۲۹)

چکیده

بیماری آتشک با عامل *Erwinia amylovora* یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های خانواده گل‌سرخیان است. روش‌هایی که با سرعت و حساسیت زیاد پاتوژن را ردیابی می‌کنند ابزار مهمی در کنترل بیماری هستند. در این تحقیق حساسیت و دقت چهار روش تشخیصی مختلف بدون غنی‌سازی و به همراه غنی‌سازی مقایسه و ارزیابی گردید. روش کشت روی محیط نیمه انتخابی CCT تا ۱CFU/ml باکتری *E. amylovora* را از عصاره گیاه آلوده تشخیص داد اما قادر به ردیابی آلودگی پنهان نبود. با استفاده از غنی‌سازی تشخیص و ردیابی باکتری در آلودگی‌های پنهان امکانپذیر شد. روش Lateral flow immuno Chromatography غلظت CFU/ml 10^5 باکتری در عصاره گیاه آلوده را شناسایی نمود، ولی پس از غنی‌سازی علاوه بر توان ردیابی باکتری در شرایط آلودگی پنهان، دقت تشخیص این آزمون صد هزار برابر یعنی تا CFU/ml ۱ افزایش پیدا کرد. روش PCR معمول و PCR آشیانه‌ای با استفاده از آغازگرهای اختصاصی با موفقیت قادر به ردیابی آلودگی پنهان و جمعیت‌های پایین باکتری در حد CFU/ml ۱ باکتری در عصاره گیاهی با غنی‌سازی و بدون غنی‌سازی شد. غنی‌سازی تأثیری در افزایش دقت این آزمون مولکولی نداشت هرچند که در ردیابی سلول‌های زنده باکتری بسیار موثر است.

واژه‌های کلیدی: ***Erwinia amylovora***، ردیابی، PCR، غنی سازی، کشت، **Lateral flow immunochromatography**

---

*: بخشی از نتایج طرح پذیرفته شده شماره ۲۰۸۰۸۸۸۰۱۳ در مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

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

۱. به ترتیب استادیار و کارشناس بیماری‌های گیاهی، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال

مقدمه

بیماری آتشک یکی از بیماری‌های باکتریایی مخرب روی درختان میوه دانه‌دار و سایر گیاهان خانواده رزاسه است (Vander Zwet and Keil 1979). استراتژی‌های معمول برای کنترل این بیماری، پیش آگاهی، ردیابی پاتوژن، هرس و حذف درختان آلوده و استفاده از سموم و مواد باکتری‌کش می‌باشد(Vander Zwet 2002). تشخیص زود هنگام و به موقع بیماری به خصوص قبل از ظهور علائم می‌تواند کمک شایانی به کاهش خسارت بیماری کند. تاکنون محیط کشت‌های زیادی برای ردیابی این باکتری از گیاه میزبان معرفی شده است و در اکثر این محیط‌ها از سوکروز به عنوان منبع کربن استفاده شده است که می‌توان به محیط کشت‌های D3، SNA، CG agar، NSA و CCT اشاره نمود (Crosse and Goodman 1973 ; Miller and Schroth 1972; Bereswill *et al*. 1998; Ishimaru and Klos 1984).

اخیراً روش تشخیص سرولوژیکی Lateral flow immunochromatography (LFIC) به عنوان یک روش تشخیصی سریع و بدون نیاز به تجهیزات گسترده آزمایشگاهی در برخی کشورها مورد استفاده قرار گرفته است که این روش تنها جمعیتی در حد 10^6 CFU/ml باکتری را ردیابی می‌نماید (WWW.bioreba.com). از روش‌های تشخیصی دقیق و حساس دیگر روش PCR یا واکنش زنجیره‌ای پلی مریزاسیون است که قادر به ردیابی جمعیت‌های بسیار پایین باکتری در بافت گیاهی است. مشکل اصلی این تکنیک ممانعت کننده‌های PCR است که در گیاهان میزبان باکتری *E. amylovora* بسیار معمول هستند. به منظور افزایش حساسیت و دقت این روش استفاده از PCR آشیانه‌ای (nested PCR) پیشنهاد شده است (Llop *et al*. 2000; Baranauskaite *et al*. 2008). در تحقیق حاضر میزان دقت و حساسیت روش‌های ذکر شده و تلفیق آنها با یکدیگر مورد ارزیابی قرار گرفته است. هم‌چنین اثر پیش غنی‌سازی روی افزایش دقت تشخیص سلول‌های زنده باکتری نیز بررسی گردیده است.

مواد و روش‌ها

جدایهٔ خالص شدهٔ باکتری *E. amylovora* از مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی دریافت و روی محیط نیمه انتخابی CCT (Ishimaru and Klos 1984) کشت شد. جهت ارزیابی دقت تشخیص تکنیک‌های مورد آزمون از سری رقت‌های باکتری بیماری‌زا (10^8- ۱ CFU/ml) در عصاره گیاهی حاصل از شاخ برگ‌های درخت سیب استفاده شد. برای بررسی اثر پیش غنی‌سازی ۵۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره آلوده با ۵۰۰ میکرولیتر محیط نیمه انتخابی مایع CCT ترکیب و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. یک میلی‌لیتر از هر رقت نیز بدون غنی‌سازی در -20^oC تا زمان استخراج نگهداری شد. به منظور کشت روی محیط نیمه انتخابی ده میکرولیتر از عصاره‌های غنی شده، غنی نشده، گیاه شاهد (فاقد آلودگی) و گیاه آلوده طبیعی (فاقد علائم) روی محیط کشت جامد CCT از طریق پخش نمودن عصاره، کشت شدند و میزان جمعیت باکتری و کلنی‌ها بررسی گردید. در روش LFIC نوارهای Agri strip (شرکت Bioreba) طبق دستوالعمل شرکت تولیدکننده در ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی غنی‌شده و نشده قرار داده شد و سپس دقت و حساسیت تشخیص این روش ارزیابی گردید. گیاهان فاقد و دارای علائم بیماری بصورت غنی شده و نشده با استفاده از این روش ارزیابی شدند. به منظور انجام

روش PCR معمولی و آشیانه‌ای استخراج DNA طبق روش *لیوپ و همکاران* (Llop *et al* 2000) از عصاره‌های گیاهی انجام گردید. به منظور شناسایی و تشخیص باکتری با روش PCR از آغازگرهای A و B طبق روش برسویل و همکاران استفاده شد (Bereswill *et al*. 1998). واکنش Nested PCR با استفاده از جفت آغازگرهای بیرونی AJ75 و AJ76 و جفت آغازگرهای درونی PEANT1 و PEANT2 انجام شد(McManus and Jones 1995).

نتایج و بحث

در تحقیق حاضر محیط CCT رقت‌های مختلف باکتری *E. amylovora* را تا جمعیت ۱CFU/ml شناسایی نمود اما قادر به ردیابی آلودگی پنهان از نمونه گیاهی نبود. استفاده از یک مرحله غنی‌سازی ۴۸ ساعته قبل از کشت باعث افزایش دقت این روش و تشخیص آلودگی‌های پنهان شد و قدرت تشخیص این روش به وسیله غنی‌سازی افزایش چشمگیری داشت. در واقع بدلیل یکسان بودن مورفولوژی کلنی استرین‌های مختلف *E. amylovora* روی محیط CCT و نیز تمایز کلنی این باکتری از کلنی سایر گونه‌های باکتریایی و هم‌چنین قابلیت رشد و تمایز ۱CFU/ml باکتری *E. amylovora* در حضور جمعیت 10^4CFU/ml باکتری *E. herbicola* و سایر باکتری‌هایی که به صورت معمول در بافت سیب و گلابی وجود دارد، CCT به عنوان یک محیط مناسب برای ردیابی این باکتری معرفی شده است. (Ishimaru and Klos 1984). روش LFIC به تنهایی حداکثر در مدت زمان ۱۵ دقیقه قادر به ردیابی 10^5CFU/ml باکتری در عصاره گیاهی بود و نتوانست باکتری را در شرایط آلودگی پنهان تشخیص دهد. اما با استفاده از پیش غنی‌سازی دقت این روش تا حد ردیابی ۱CFU/ml باکتری *E. amylovora* از بافت گیاهی افزایش یافت و به راحتی آلودگی پنهان را نیز ردیابی نمود این اولین گزارش در رابطه با اثر غنی‌سازی در افزایش دقت روشLFIC است به نحوی که نتایج آن قابل مقایسه با روش‌های حساس و دقیقی مثل PCR معمولی و آشیانه‌ای است.

غنی‌سازی در دقت و حساسیت آزمون‌های PCR معمولی و آشیانه‌ای تأثیری نداشت، در واقع بدلیل حساسیت و دقت بالای تشخیص در این روش‌ها لزومی به غنی‌سازی عصاره مورد آزمون نیست. آزمون PCR به تنهایی تا ۱CFU/ml جمعیت باکتری را به راحتی ردیابی و باکتری را در شرایط آلودگی پنهان به خوبی غلظت‌های بالای *E. amylovora* در بافت تشخیص داد. اثر ممانعت‌کنندگی بازدارنده‌های مختلف موجود در نمونه DNA روی واکنش PCR استفاده از این تکنیک را در مواقعی با محدودیت روبرو نموده است (Henson and French 1993; McManus and Jones 1995). بررسی‌های مختلف انجام گرفته در خصوص تشخیص عامل بیماری آتشک با این روش اهمیت این مشکل را آشکارتر نموده است. گاهی در اثر این مشکل توان ردیابی نمونه‌های مثبت به وسیله تکنیک استاندارد PCR نسبت به روش کشت و یا روش‌های سرولوژیکی همراه با غنی‌سازی کمتر بوده است. روش PCR آشیانه‌ای تا حد زیادی بر این مشکل فائق آمده است. در واقع استفاده از حجم کم نمونه گیاهی باعث اجتناب از نتایج منفی اشتباه می‌گردد زیرا به نسبت حجم، مواد ممانعت‌کننده نیز کاهش می‌یابد. هم‌چنین استفاده از PCR آشیانه‌ای آلودگی‌های متقاطع احتمالی را نیز به شدت کاهش می‌دهد. نتایج بررسی‌های گذشته نشان داده که سیستم آشیانه‌ای ۱۰۰ تا

۱۰۰۰ برابر حساس‌تر از PCR استاندارد است بگونه‌ای که با میزان اندکی حجم نمونه گیاهی، ردیابی صورت می‌گیرد (Llop *et al*. 2000). هم‌چنین مشخص گردید پیش غنی‌سازی اگرچه در افزایش دقت آزمون‌های PCR استاندارد و آشیانه‌ای تأثیرگذار نبوده ولی استفاده از این مرحله علاوه بر اینکه در ردیابی سلول‌های زنده باکتری بسیار حائز اهیمت است، در کاهش غلظت ممانعت‌کننده‌های گیاهی نیز بسیار مثمرثمر بوده و غالبا نمونه‌های پیش غنی‌سازی شده واکنش منفی اشتباه نداده و قابل اعتمادتر می‌باشند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات(156-155) متن انگلیسی مراجعه شود.