وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

نشریه فنی

Xylella fastidiosa
(روش‌های تشخیص، ردیابی و برخی میزبان‌های آن در ایران)

نگارنده
ناصر امانی فر

شماره ثبت

52225

1396

وزارت جهاد کشاورزی

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

Xylella fastidiosa

(روش‌های تشخیص، ردیابی و برخی میزبان‌های آن در ایران)

نگارنده

ناصر امانی فر

عضو هیئت‌علمی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی
چهارمحال و بختیاری

1396

مخاطبان نشریه فنی: کارشناسان حفظ نباتات، کارشناسان ارشد مراکز آموزشی، پژوهشی و اجرایی وابسته به وزارت جهاد کشاورزی

موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، نشریه فنی

Xylella fastidiosa (روش‌های تشخیص، ردیابی و برخی میزبان‌های آن در ایران)

نگارنده: ناصر امانی فر

ناشر: موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

سال نشر: 1395

شماره و تاریخ ثبت نشریه: 52225 مورخ :96/6/6

نشانی مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی: تهران، بزرگراه شهید چمران، خیابان یمن، پلاک 1 - سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

فهرست مندرجات

عنوان	صفحه
مقدمه	4
انتشار جغرافیایی *X. fastidiosa* در دنیا	4
علائم بیماری‌های ناشی از *X. fastidiosa*	6
بادام	6
مو	6
سایر گیاهان	9
تشخیص و ردیابی *X. fastidiosa*	10
جداسازی *X. fastidiosa* روی محیط‌های کشت و ویژگی‌های مرفولوژیکی و رشدی جدایه ها	10
الیزا	13
استخراج دی ان ای و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (پی سی آر):	14
مقایسه روش‌های ردیابی *X. fastidiosa*	16
ارتباط تنش‌های محیطی و تغذیه‌ای در بروز علائم بیماری‌های ناشی از *X. fastidiosa*	17
فهرست منابع	17

مقدمه

باکتری *Xylella fastidiosa* یک بیمارگر محدود به آوندهای چوبی است. این بیمارگر باعث کاهش عملکرد محصول، زوال تدریجی گیاهان میزبان، مستعد کردن گیاهان برای خسارت سایر عوامل زنده و گاهی مرگ گیاه می‌شود (Purcell 2013). این باکتری گیاهان جوان و مسن را آلوده می‌کند. بنابراین در نهالستان‌های درختان میوه و غیرمثمر نیز واجد اهمیت است. *X. fastidiosa* در طبیعت با زنجرک های سر مخروطی (sharpshooter) و اندام‌های رویشی تکثیری آلوده منتقل می‌شود. چون دوره کمون بیماری‌های ناشی از *X. fastidiosa* نسبتاً طولانی است ممکن است با نهال‌های آلوده بدون علائم ظاهری عامل بیماری به مناطق غیر آلوده منتقل شود (Janse and Obradovic. 2010). میزان آلودگی و خسارت بیماری بسته به شرایط محیطی، فعالیت ناقل و حساسیت میزبان متفاوت است و از چند درصد تا 30% گزارش‌شده است (Purcell 2013). علائم بیماری‌های ناشی از *X. fastidiosa* از سال‌ها قبل در برخی از مناطق ایران روی درختان میوه به‌ویژه بادام، مو و درختان جنگلی و سایه‌دار مشاهده‌شده است. بر اساس نتایج الیزا از نمونه‌های، دارای علائم شبیه به بیماری‌های ناشی از *X. fastidiosa*، جمع‌آوری‌شده از مناطق مختلف ایران شامل استان‌های چهارمحال و بختیاری، فارس، خراسان رضوی، قزوین، البرز، کرمان، اصفهان، همدان و کرمانشاه طی سال‌های 93-1388 برخی نمونه‌ها آلوده بودند (امانی فر 1393). بر این اساس نمونه‌هایی از بادام، پسته، مو، بلوط، چنار، افرای شبه چناری، فندق، گلابی، توت و آلو به *X. fastidiosa* آلودگی نشان دادند. بیش‌ترین درصد آلودگی به ترتیب مربوط به نمونه‌های پسته، بادام و مو بود. از نمونه‌های بادام، مو و پسته باکتری *X. fastidiosa* روی محیط کشت‌های PW و PD3 جداسازی شد. دی ان ای استخراج‌شده از دم برگ بادام، مو و پسته و باکتری‌های جداشده از آن‌ها در آزمون پی سی آر با جفت آغازگرهای RST31/RST33، 272-1-int/272-2-int و Dixon454fa/Dixon1261rg اختصاصی *X. fastidiosa* قابل تکثیر به‌اندازه های موردنظر بود. بر این اساس وجود *X. fastidiosa* عامل یا همراه با برگ سوختگی برخی درختان میوه و جنگلی و سایه‌دار در مناطقی از ایران به اثبات رسید (امانی فر 1393).

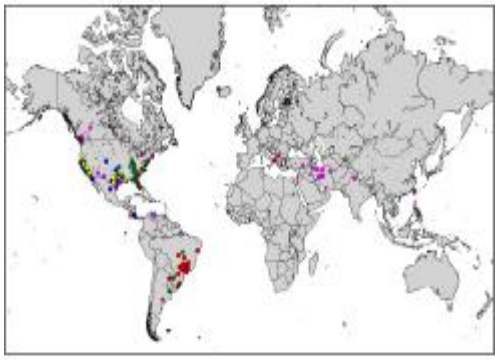
نظر به اینکه *X. fastidiosa* از بیمارگرهای مهم در دنیاست و تاکنون مشمول بیمارگرهای قرنطینه خارجی ایران بود، از طرفی بررسی‌های مقدماتی حاکی از عدم آلودگی برخی مناطق و میزبان‌ها در ایران به این بیمارگر است، لذا ضمن توصیه اعمال قرنطینه داخلی، در این راستا این نوشتار به‌منظور ارائه دستاوردهای تحقیقاتی در خصوص *X. fastidiosa* در ایران با تأکید بر روش‌های ردیابی این بیمارگر برای استفاده محققین و کارشناسان گیاه‌پزشکی و باغبانی تهیه‌شده است.

انتشار جغرافیایی *X. fastidiosa* در دنیا

بیماری‌های ناشی از *X. fastidiosa* عمدتاً در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر رخ می‌دهند، گرچه گزارش‌هایی از بیماری‌های برگ سوختگی (leaf scorch) مانند برگ سوختگی بلوط در مناطق سرد نظیر کانادا نیز وجود دارد (Henneberger *et al.* 2004). بر اساس آخرین منابع در دسترس (EFSA PLH Panel, 2015) توزیع جغرافیایی این بیمارگر در جهان به شرح زیر است (شکل 1):

اروپا و منطقه مدیترانه: تا سال 2013 گزارش‌های تأیید نشده‌ای از آلودگی مو در فرانسه و کوزوو بر اساس آزمون الیزا وجود داشته است. از ترکیه نیز، بر اساس آزمون الیزا، از بادام گزارش‌شده است. اخیراً

از جنوب ایتالیا از بادام، خرزهره و زیتون این بیمارگر گزارش‌شده است. به خاطر پتانسیل خطر و اهمیت *X. fastidiosa* از طرف سازمان حفظ نباتات منطقه اروپا و مدیترانه به‌عنوان بیمارگر قرنطینه‌ای کلاس A1 تلقی شده است.



شکل 1- نقشه پراکنش *X. fastidiosa* در دنیا بر اساس منابع در دسترس تا پایان 2014 (EFSA PLH Panel, 2015)

آسیا: گزارش تأیید نشده‌ای از بیماری برگ سوختگی بادام با عامل *X. fastidiosa* از هند وجود دارد. از تایوان برگ سوختگی گلابی با عامل باکتریایی شبیه به *X. fastidiosa* و "پیرس" مو (Pierce's disease, PD) با عامل *X. fastidiosa* گزارش‌شده است.

آمریکای شمالی: از مکزیک و ایالات‌متحده آمریکا (آلاباما، آریزونا، کالیفرنیا، فلوریدا، جورجیا، لوئیزیانا، می‌سی‌سی‌پی، میسوری، مونتانا، کارولینای شمالی، اوکلاهاما، کارولینای جنوبی، تگزاس، کنتاکی، نیویورک و غرب ویرجینیا) از میزبان‌های مختلف *X. fastidiosa* گزارش‌شده است.

آمریکای مرکزی و کارائیب: در کاستاریکا و احتمالاً بسیاری از کشورهای آمریکای مرکزی برگ سوختگی قهوه و برگ سوختگی خرزهره وجود دارد.

آمریکای جنوبی: بیماری سبز ردی ابلک مرکبات از آرژانتین و برزیل گزارش‌شده که به‌سرعت در حال گسترش است. "پیرس" مو در ونزوئلا و برگ سوختگی آلو در بسیاری از مناطق آمریکای جنوبی وجود دارد.

گزارش تأییدشده‌ای از وجود *X. fastidiosa* و بیماری‌های ناشی از آن در قاره آفریقا، غرب آسیا و خاورمیانه نیست. تا اینکه در سال‌های اخیر وجود این بیمارگر به روش پیوند، الیزا، PCR، جداسازی و اثبات بیماری‌زایی روی بادام و مو در برخی مناطق ایران به اثبات رسید (Amanifar *et al*. 2014).

علائم بیماری‌های ناشی از *X. fastidiosa*

بادام: علائم اولیه بیماری برگ سوختگی درختان بادام از اوایل تیرماه تا اواسط مرداد (بسته به سال) ظاهر می‌شود. نوک و حاشیه برگ‌ها تغییر رنگ داده به‌صورت سبز خاکستری درمی‌آیند. روی برگ علائم تا حدودی متنوع است، در مرز قسمت سوخته (scorched) ممکن است همراه یا بدون هاله زرد مشاهده می‌شود (شکل‌های 2-الف، 2-ب و 2-پ)، این تنوع ممکن است مربوط به واکنش رقم یا سویه باکتری باشد. بیماری به‌تدریج طی چند سال توسعه می‌یابد، علائم معمولاً در سال اول روی یک شاخه دیده می‌شود (شکل 2-ت). در سال دوم در اغلب شاخه‌های درخت علائم قابل‌مشاهده است و در سال

سوم یک تغییر رنگ عمومی (زرد طلایی) در کل درخت دیده می‌شود (شکل 2-ث). به همین خاطر به این بیماری در بادام بیماری مرگ طلایی (golden death) نیز می گویند. در سال چهارم میزان برگ بسیار کاهش‌یافته و برگ‌های تشکیل‌شده بسیار ریز بوده و درخت در اواسط تابستان کاملاً لخت شده و خشک می‌شود (شکل 2-ج) (Amanifar *et al*. 2014).

گاهی درختان آلوده تا سال‌ها زنده باقی می‌مانند، اما در مواردی مرگ درختان نیز مشاهده می‌شود. شدت علائم و توسعه بیماری در درختان بادام استان چهارمحال و بختیاری کاملاً وابسته به رقم و مدیریت باغ به‌ویژه آبیاری و کود دهی بود. در باغ‌های دارای تنش کم‌آبی و یا تغذیه ناکافی، شدت علائم و توسعه بیماری بیشتر است و مرگ درختان بادام نیز مشهود است (امانی فر 1393).

مو: در باغ‌هایی که تازه آلوده‌شده‌اند آلودگی به‌صورت تک درختچه مشاهده می‌شود (شکل 3 -الف). در مو علائم ابتدایی آلودگی به *X. fastidiosa* خشک شدن حاشیه برگ است. قسمت‌های خشک‌شده معمولاً بافت مرده و با یک هاله زرد تا قرمز احاطه‌شده است (شکل 3-ب). گاهی قسمت پهنک‌برگ ریزش کرده و دم برگ متصل به شاخه باقی، به‌صورت چوب‌کبریتی، می‌ماند که شاخص‌ترین علائم "پیرس" است (شکل‌های 3-پ، 3-ت و 3-ث) و همزمان در پاییز با ریزش برگ‌های سالم ریزش می‌کند. در بیماری "پیرس" به‌تدریج و در سال‌های بعد زردی برگ‌ها توسعه‌یافته، خوشه‌ها چروکیده شده و لکه‌های نامنظم قهوه‌ای و سبز (به‌صورت جزیره‌ای) درروی ساقه پدیدار می‌شود (شکل 3-ج). کم‌رشدی، کوتولگی و کاهش رشد درختان درنهایت ممکن است منجر به مرگ درختچه شود (Amanifar *et al*. 2014).

شکل 2- علائم برگ سوختگی بادام و روند پیشرفت بیماری روی بادام در حاشیه زاینده‌رود. الف- شروع برگ سوختگی روی رقم سفید. ب- برگ سوختگی شدید رقم سفید بدون هاله زرد. پ- برگ سوختگی همراه با هاله زرد رقم مامایی. ت- علائم برگ سوختگی در تک شاخه رقم سفید. ث- مرگ طلایی تک‌درخت بادام رقم مامایی و ج- مرگ درخت بادام در سال چهارم آلودگی.

شکل 3- علائم مختلف "پیرس" روی مو. الف- تک درختچه آلوده در باغ (تاکستان- قزوین). ب- برگ سوختگی مو. پ- ریزش برگ‌های مو و باقی ماندن دم برگ روی تنه ت- چوب کبریتی شدن دم برگ‌ها و نکروز انتهای آن‌ها در رقم پیکامی در خلیل‌آباد. ث- چوب کبریتی شدن دم برگ‌ها در رقم بی‌دانه قزوین. ج- جزایر سبز (green islands) روی ساقه.

شکل 4- علائم آلودگی به *Xylella fastidiosa* در برخی درختان میوه و غیر مثمر در مناطقی از ایران. الف- برگ سوختگی گلابی (بادرود اصفهان). ب- برگ سوختگی پسته در مهرماه (رفسنجان). پ- برگ سوختگی بلوط (لردگان- چهارمحال و بختیاری). ت- برگ سوختگی چنار (باغ ارم- شیراز).

سایر گیاهان: علائم برگ سوختگی در برخی از گونه‌های درختان مثمر و غیر مثمر ازجمله گلابی، فندق، پسته، چنار، افرا، آلو، بلوط، شاه‌بلوط و نارون در مناطق مختلف ایران مشاهده می‌شود.

زوال درختان گلابی به‌صورت سوختگی شدید حاشیه برگ همراه با هاله زرد و ریز شدن برگ‌ها در باغ‌های منطقه بادرود اصفهان نسبتاً زیاد است (شکل 4-الف). در برخی از باغ‌های پسته شهرستان رفسنجان به‌صورت لکه‌ای درختانی با علائم برگ سوختگی تک شاخه (شکل 4-ب) و یا کل تاج درخت، همراه با تغییر رنگ برگ و کوچک شدن برگ‌ها مشاهده می‌شود. از درختان جنگلی علائم برگ سوختگی در چنار (مناطق مختلف ایران) و بلوط (استان چهارمحال و بختیاری) مشاهده می‌شود (شکل 4-پ). در چنار به‌جز برگ سوختگی که بندرت همراه با هاله زرد است (شکل 4-ت)، علائم دیگری مشاهده نشد، اما در بلوط زوال و خشکیدگی درختان مشهود است (امانی فر 1393).

تشخیص و ردیابی *X. fastidiosa*

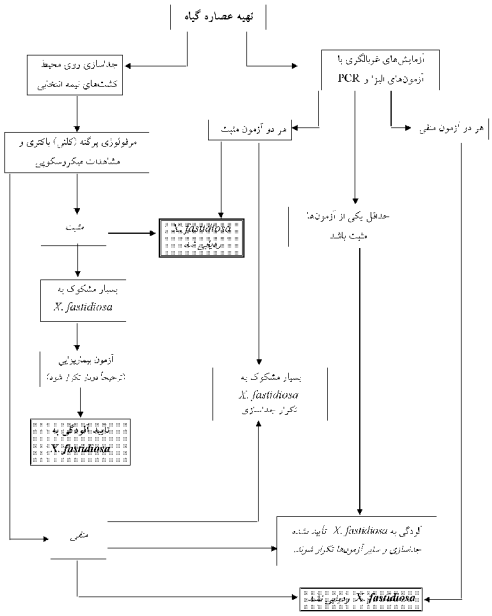
حساسیت و قابل‌اعتماد بودن روش‌های ردیابی *X. fastidiosa* در گیاهان و حشرات برای تفکیک زیرگونه‌ها یا سویه‌ها از منظر پژوهشی مهم است، به‌ویژه اینکه بسیاری از میزبان‌های گزارش‌شده (و احتمالاً گزارش نشده) *X. fastidiosa* بدون علائم هستند. اقتصادی بودن، مؤثر و امکان‌پذیر بودن روش‌های ردیابی *X. fastidiosa*، به‌ویژه برای گیاهان دارای جمعیت کم باکتری، ازنظر قرنطینه و مدیریت بیماری ضروری است (Minsavage *et al*. 1994, EFSA PLH Panel, 2015). روش‌های

متعددی برای ردیابی این بیمارگر وجود دارد اما روش‌های معمول و قابل‌قبول همه پژوهشگران الیزا، PCR، جداسازی روی محیط‌های کشت و اثبات بیماری‌زایی است. برنامه (طرح) شکل 5 را برای ردیابی و اثبات وجود *X. fastidiosa* می‌توان ارائه نمود (امانی فر 1393).

جداسازی *X. fastidiosa* روی محیط‌های کشت و ویژگی‌های مرفولوژیکی و رشدی جدایه ها: برای جداسازی باکتری *X. fastidiosa* از روش‌های شاد و همکاران (Schaad *et al.* 2001) و یا روش ذیل استفاده کرد.

قطعاتی به طول 3-2 سانتی‌متر از دم برگ و رگبرگ اصلی و مقداری از جوانه و شاخه باریک تهیه شود و به مدت دو دقیقه در الکل اتانول 70% سپس دو دقیقه در مایع سفیدکننده 20% (1:5 محلول تجاری) ضدعفونی گردد. تعداد 8-5 دم برگ از هر نمونه انتخاب شود و با ایجاد شکاف طولی با اسکالپل در آن‌ها داخل محیط کشت مایع درون لوله‌آزمایش قرار داده شود، پس از مسدود کردن درب لوله‌ها با پارافیلم به مدت 48 ساعت در دمای 28 ^{o}C نگه‌داشته شوند، سپس مقدار 100 میکرولیتر از مایع درون ظروف پتری حاوی محیط کشت جامد پخش گردد و ظروف مزبور به مدت شش هفته در دمای 28 ^{o}C نگه‌داشته شوند. موفقیت در جداسازی با این روش بیشتر از سه روش دیگر (Schaad *et al.* 2001) است. در این روش از حدود 5% نمونه‌های آلوده به *X. fastidiosa* باکتری جدا می‌شود، درحالی‌که میزان جداسازی با روش‌های دیگر کمتر از 3% است (امانی فر 1393).

از محیط کشت‌های PW، *X. fastidiosa*-D1، PD3 و PD2 توصیه‌شده شاد و همکاران (Schaad *et al.* 2001) با اندکی تغییرات به شرح جدول 1 استفاده شود. در هرکدام از روش‌های جداسازی، 10 روز بعد از کشت روزانه وجود پرگنه‌های باکتری با استفاده از بینوکولر بررسی شود. اگر تا 48 ساعت بعد از کشت روی محیط‌های کشت پرگنه باکتری ظاهر شد به‌عنوان آلوده به باکتری‌های ساپروفیت تلقی گردد و حذف شود (امانی فر 1393).

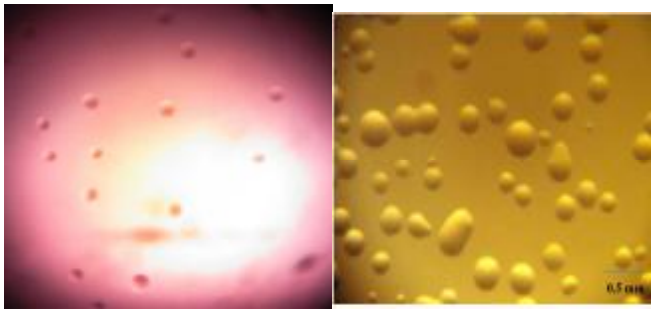


شکل 5- طرح کلی (برنامه) تصمیم‌گیری برای آزمایش نمونه‌های گیاهی جهت ردیابی *Xylella fastidiosa*

جدول 1- محتویات محیط کشت‌های مورداستفاده در جداسازی *Xylella fastidiosa* و باکتری‌های همراه با بیماری‌های برگ سوختگی درختان میوه و غیر مثمر (گرم/لیتر)

نوع ماده	محیط کشت			
	PW	PD2	PD3	*X. fastidiosa*-D1
phytone peptone	4	-	-	-
trypticase	2/1	-	-	-
tryptone	-	4	4	-
soytone	-	2	2	-
soluble potato	-	-	2	-
trisodium citrate	-	1	1	/51
disodium succinate	-	1	1	/51
$MgSO_4$-7H20	5/0	5/0	5/0	/50
K_2HPO_4	5/11	5/11	5/11	/51
K				1

H2PO4				
phenol red	02/001/0	-	02/001/0	020/010/
hemin chloride (0.1% in 0.05 N NaOH)		01/0		
L-glutamine	4	-	-	3
bovine serum albumin (BSA)	6	2	-	-
L-asparagine	-	-	-	1
L-cysteine	-	-	5/0	/50
Agar (Bacto-Difco)	15	15	15	15
Distilled wa	1000	1000	1000	1000

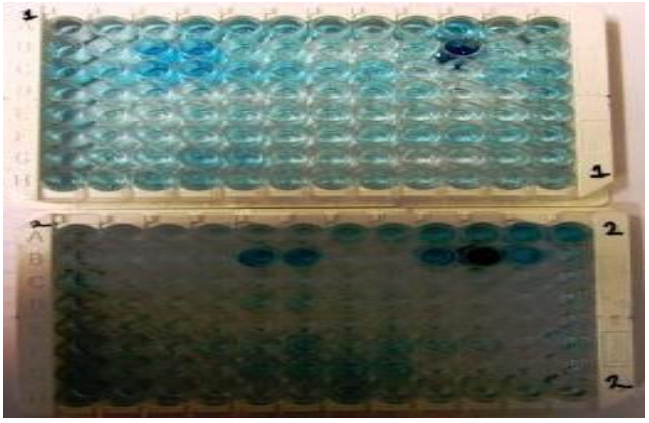


شکل 6- پرگنه‌های *Xylella fastidiosa* روی محیط کشت. جدایه مو روی محیط PD3، 10 روز بعد از کشت (راست) (Scale bar= 0.5 mm). جدایه مو روی محیط کشت PW، 12 روز بعد از کشت (چپ).

از سویه‌های ایرانی *X. fastidiosa*، جداشده تاکنون، همه جدایه‌های روی محیط کشت PD3 رشد می‌کنند. اکثر جدایه‌ها روی محیط کشت PW رشد می‌کنند، اما هیچ‌کدام قادر به رشد روی NA نیستند. پرگنه سویه‌های مو حدود 10 روز بعد از کشت روی محیط‌های PD3 و PW در دمای $28\ ^{o}C$ ظاهر می‌شوند. سویه‌های بادام و پسته دیر رشدترند و پرگنه باکتری حداقل دو هفته بعد از کشت ظاهر می‌شوند. همه سویه‌های مو روی محیط کشت *X. fastidiosa*-D1 و PD2 رشد می‌کنند. سویه‌های بادام و پسته روی *X. fastidiosa*-D1 رشد نمی‌کنند اما قادر به رشد روی PD2 بعد از 10 روز هستند. پرگنه جدایه‌های بادام و پسته محدب، صاف و شیری‌رنگ با حاشیه مشخص هستند. جدایه‌های مو دو نوع پرگنه دارند برخی شبیه پرگنه‌های بادام و پسته هستند و برخی جدایه‌ها پرگنه‌های ناصاف با حاشیه نامشخص در محیط کشت دارند (شکل 5) (امانی فر 1393).

سویه‌های *X. fastidiosa* گرم منفی، اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت‌اند. بقاء جدایه‌های *X. fastidiosa* روی محیط کشت جامد PW و PD3 حداکثر سه هفته بعد از ظهور پرگنه ها است. از تجدید کشت پرگنه ها بعدازاین مدت‌زمان هیچ‌گونه پرگنه باکتری ظاهر نمی‌شود. در شرایط نگهداری $-20^{0}C$ در محیط کشت مایع تا شش ماه یاخته‌های باکتری زنده می‌مانند. ماندگاری *X. fastidiosa* در دمای $-80^{0}C$ بیشتر است (Schaad *et al.* 2001، امانی فر 1393).

الیزا: از روش الیزا به‌عنوان یک روش محافظه‌کارانه مثبت برای ردیابی *X. fastidiosa* در گیاهان استفاده‌شده است (Henneberger *et al.* 2004). آستانه حداقل جمعیت باکتری برای ردیابی *X. fastidiosa* به روش الیزا 10^{4} CFU در گرم بافت گیاه است (Minsavage *et al.* 1994)، درحالی‌که تعداد باکتری لازم برای انتقال موفق بیمارگر توسط ناقل نصف این آستانه است. چون جمعیت باکتری در همه میزبان‌ها در اواخر تابستان و اوایل پاییز به حداکثر خود می‌رسد نمونه‌های (دارای علائم) تهیه‌شده در این زمان را می‌توان با روش الیزا غربال کرد، حدود 80% این نمونه‌ها که با الیزا مثبت (جذب نوری بالای 0/65) هستند در آزمون پی سی آر با استفاده از دی ان ای استخراج‌شده از دم برگ همان نمونه مثبت می‌باشند. الیزا برای ردیابی بیمارگر در اوایل فصل رشد روش مؤثری نیست (امانی فر 1393).



شکل 7- آزمون DAS-ELISA با استفاده از آنتی سرم چند همسانه ای *X f* (تهیه شده از شرکت Agdia آمریکا)

کیت تجارتی آنتی سرم مورداستفاده برای *X. fastidiosa* از مخلوط چند سویه این باکتری تهیه‌شده است و به‌عنوان یک آنتی سرم چند همسانه‌ای است که تمامی سویه‌های این باکتری را ردیابی و شناسایی می‌کند. مزیت این کیت قابلیت ردیابی سویه‌های است که تاکنون شناسایی‌شده است؛ اما معایب کیت‌های تجاری عدم توانایی تفکیک و یا تشخیص سویه (های) خاص است. عیب دیگر این کیت‌ها این است که باوجود چند همسانه‌ای بودن ممکن است توانایی ردیابی سویه جدید را نداشته باشد. در آزمون الیزا ممکن است منفی کاذب نیز وجود داشته باشد (Henneberger *et al.* 2004).

آزمون الیزا را با استفاده از آنتی‌بادی چند همسانه‌ای فراهم‌شده از سویه‌های مختلف باکتری *X. fastidiosa* تهیه‌شده توسط شرکت Agdia آمریکا (Agdia, Inc. Elkhart, IN, USA)، بر اساس دستورالعمل شرکت می‌توان انجام داد.

استخراج دی ان ای و واکنش زنجیره‌ای پلی مراز (پی سی آر): به‌طور تئوریک 10 تا 100 یاخته *X. fastidiosa* را در نمونه بافت آلوده می‌توان به روش پی سی آر ردیابی کرد، اما در بیشتر حالات روش استخراج دی ان ای به دلیل آزاد شدن ترکیبات بازدارنده ناکارآمد است و ممکن است نتیجه منفی کاذب (false-negative) بدهد.

انتخاب یک روش مناسب برای استخراج دی ان ای و استفاده از تکنیک تکثیر مناسب دی ان ای اهمیت دارد. چندین روش استخراج دی ان ای با استفاده از منابع بیولوژیکی مختلف وجود دارد که شامل استفاده از فنول-کلرو فرم، نمک غلیظ و تیمار با آنزیم‌ها و استفاده از کیت‌های تجارتی هست. جمیعت خیلی کم باکتری در گیاه، تفاوت جمعیت باکتری از برگی به برگ دیگر، مشکلات استخراج باکتری از آوندهای چوبی، نوسان جمعیت باکتری در طول سال و عدم ارتباط مستقیم علائم بیماری باوجود باکتری در گیاه از مهم‌ترین چالش‌های ردیابی *X. fastidiosa* است. بهبود روش‌های استخراج باکتری از بافت برای کشت، الیزا و پی سی آر، همچنین زمان مناسب نمونه‌برداری تا حدودی می‌تواند در کاهش این چالش‌ها مؤثر باشد. معایب عمده پی سی آر عدم توانایی تخمین جمعیت زنده باکتری یا تراکم جمعیت است. استخراج دی ان ای گیاه برای پی سی آر چالش ساز بوده و نیاز به کشت باکتری است و چون

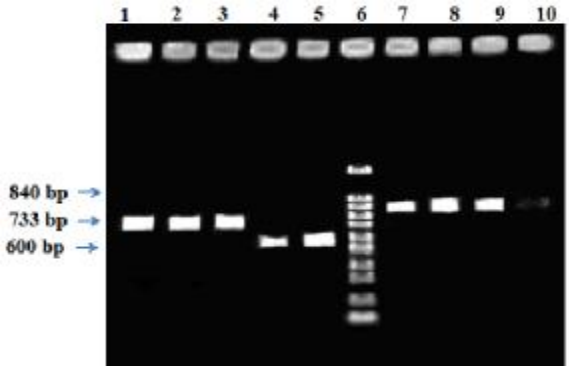
پرگنه‌های باکتری خیلی کند رشدند و زمان‌بر بوده لذا احتمال آلودگی محیط کشت زیاد است (امانی فر 1393).

جدول 2- آغازگرهای مورداستفاده برای واکنش زنجیره‌ای پلی مراز جدایه‌های *Xylella fastidiosa*

Primer	Primer Sequences	Gene	TmAnnealing	Amplicon length (bp)
RST31	5’-GCGTTAATTTTCGAAGTGATTCGATTGC-3'	RNA polymerase sigma-70 factor gene	**55**	**733**
RST33	5’-CACCATTCGTATCCCGGTG-3'			
272-1-in	5'-CTGCACTTACCCAATGCATCG-3'	Hypothet	**56**	**600**

t272-2-int	5'-GCCGCTTCGGAGAGCATTCCT-3'	icall protein gene		
Dixon454fa	5'-AACAACTAGGTATTAACCAATTGCC-3'	16S rDNA	**57**	**847**
Dixon1261rg	5'-CCTTTTGTTGGGGAAGAAAA-3'			

کیت کیاژن (Qiagen DNeasy Tissue Kit) مؤثرترین کیت در استخراج دی ان ای از دم برگ گیاه است. روش CTAB نیز روش مؤثری به‌ویژه برای نمونه‌های مو است. از آغازگرهای مشروح در جدول 2 در ردیابی سویه‌های *X. fastidiosa* استفاده می‌شود، به‌طوری‌که جفت آغازگرهای RST31/RST33 و 272-1-int/272-2-int برای همه سویه‌ها و جفت آغازگر Dixon1261rg/Dixon454fa برای سویه بادام است (امانی فر 1393).



شکل 8- نقوش الکتروفورزی محصول پی سی آر با استفاده از آغازگر های اختصاصی ***Xylella fastidiosa***

مقایسه روش‌های ردیابی *X. fastidiosa*

استفاده از محیط‌های اختصاصی ازنظر حساسیت برای یاخته‌های زنده نزدیک به پی سی آر است و الیزا حساسیت کمتری نسبت به کشت زنده دارد. نتایج روش‌های انتقال با پیوند، الیزا و جداسازی باکتری نشان داد که *X. fastidiosa* توزیع غیریکنواخت و نامنظم در بافت‌های گیاه دارد. چون میزان بافتی که برای استخراج دی ان ای باکتری بکار می‌رود نسبتاً کم است لذا به دلیل توزیع غیریکنواخت باکتری احتمال عدم موفقیت در استخراج دی ان ای باکتری افزایش می‌یابد. در بررسی‌های نگارنده حدود 40% از نمونه‌های مورداستفاده در الیزا به *X. fastidiosa* آلودگی نشان دادند. از حدود 5% از نمونه‌ها باکتری فوق روی محیط کشت جدا شد. از کمتر از 2% نمونه‌های بافت گیاه مورداستفاده برای استخراج دی ان ای کل با استفاده از کیت‌های تجارتی دی ان ای *X. fastidiosa* بر اساس نتایج پی سی آر استخراج شد (امانی فر 1393). زمانی که جمعیت باکتری در گیاه و ناقل خیلی پایین است ردیابی *X. fastidiosa* با پی سی آر ناکارآمد است. در هر دو روش الیزا و پی سی آر احتمال واکنش مثبت کاذب و منفی کاذب وجود دارد که همیشه دلایل آن مشخص نیست، اما یکی از دلایل عمده آلودگی‌های باکتریایی همراه با *X. fastidiosa* است (Minsavage *et al.* 1993). می‌توان گفت الیزا بهترین روش برای بررسی جنبه‌های بیولوژیکی بیمارگر مانند تغییرات فصلی جمعیت باکتری، غلظت باکتری در اندام‌های مختلف، مطالعات اپیدمیولوژیک و مقاومت ارقام و پراکنش بیماری است. الیزا مناسب‌ترین روش برای غربال کردن تعداد زیادی نمونه است و برای اطمینان از نتایج الیزا بهتر است آستانه حداقل بیشتر از حد استاندارد (میانگین جذب نوری نمونه‌های کنترل منفی بعلاوه سه برابر انحراف معیار) باشد. الیزا مناسب‌ترین روش برای کمک در پاسخ به سؤالاتی همانند وجود *X. fastidiosa* و تراکم جمعیت، به‌ویژه شرایط آلودگی پنهان است (EFSA 2015).

بر اساس نتایج الیزا، جداسازی و پی سی آر می‌توان گفت بهترین روند برای ردیابی و تشخیص *X. fastidiosa* غربال کردن نمونه‌های با جذب نوری بالا در الیزا و استفاده از این نمونه‌ها برای جداسازی باکتری روی محیط کشت اختصاصی و به‌کارگیری پرگنه‌های باکتری در پی سی آر با آغازگرهای اختصاصی است. چون گونه های متعددی از باکتری ها به صورت درون رست در بافت گیاهان زندگی می کنند که برخی از آنها کند رشد نیز بوده و پرگنه هایی شبیه *X. fastidiosa* دارند، لذا انجام پی سی آر با آغازگرهای اختصاصی این باکتری روی پرگنه ها ضروری است (امانی فر 1393).

ارتباط تنش‌های محیطی و تغذیه‌ای در بروز علائم بیماری‌های ناشی از *X. fastidiosa*

علائم بیماری‌های ناشی از *X. fastidiosa* ممکن است با علائم مربوط به سمیت نمک، کمبود عناصری مانند بر، مس، فسفر و پتاسیم و کم‌آبی اشتباه شود. به‌طورکلی این علائم نسبت به علائم آلودگی به *X. fastidiosa* در باغ‌های بادام و مو و درختان غیر مثمر بیشتر عمومیت دارد و درختان آلوده به *X. fastidiosa* به‌صورت لکه‌ای و تک‌درخت مشاهده می‌شوند (شکل‌های 2-ث و 3-الف) (امانی فر 1393). اگرچه در مو علائم "پیرس" به خاطر تشکیل تایلوز و وجود صمغ در بافت‌های چوبی آلوده به *X. fastidiosa* است، اما اغلب محققین علت اصلی بروز این علائم را محدودیت در انتقال آب به خاطر وجود پیکره‌های باکتری می‌دانند (Almeida and Purcell 2003). درواقع بیماری "پیرس" به واژه‌ای مترادف با کمبود آب در مو تبدیل‌شده است.

در مو علائم شاخص بیماری "پیرس" وجود جزایر سبز (green islands) در ساقه، بافت‌مردگی حاشیه برگ (برگ سوختگی) و حالت چوب‌کبریتی (matchsticks) دم برگ است (Amanifar *et al.* 2014). بررسی‌های میدانی طی سال‌های 94-88 در باغ‌های مو و بادام مناطق مختلف ایران حاکی از این است که شدت بیماری‌های برگ سوختگی بادام و "پیرس" مو و میزان آلودگی روند افزایشی داشته است. این وضعیت در باغ‌های بادام حاشیه زاینده‌رود و باغ‌های مو کاشمر و خلیل‌آباد کاملاً مشهود است (امانی فر مشاهدات شخصی). با توجه به دوره خشک‌سالی در سال‌های اخیر شاید بتوان یکی از دلایل افزایش این بیماری‌ها در برخی مناطق کشور را به اثر هم‌افزایی تنش کم‌آبی در ایجاد بیماری توسط *X. fastidiosa* نسبت داد (Almeida and Purcell 2003).

فهرست منابع

امانی فر (صحراگرد)، ن. 1392. ردیابی *Xylella fastidiosa*، عامل سوختگی باکتریایی برگ درختان میوه و غیر مثمر در استان‌های چهارمحال و بختیاری، آذربایجان غربی و شرقی و قزوین. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی. مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی چهارمحال و بختیاری. 32 صفحه.

امانی فر، ن. 1393. تعیین ویژگی‌های مولکولی و بیولوژیکی *Xylella fastidiosa* در ایران. رساله دکتری ارائه‌شده به دانشگاه شیراز، 212 صفحه.

Almeida, R. P. P. and A. H. Purcell. 2003. Biological traits of *Xylella fastidiosa* strains from grapes and almonds. Appl. Environ. Microbiol. 69:7447-7452.

Amanifar, N., Taghavi, T. Izadpanah, K and Babaei, GH. 2014. Isolation and Pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from Grapevine and Almond in Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 53: 318−327.

Amanifar , N., Taghavi and M. Salehi. 2016. *Xylella fastidiosa* from almond in Iran: overwinter recovery and effects of antibiotics. *Phytopathologia Mediterranea* 55, 3, 337-345.

EFSA PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health), 2015. Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Xylella fastidiosa* in the EU territory, with the identification and evaluation of risk reduction options. EFSA Journal 2015;13(1):3989, 262 pp., doi:10.2903/j.efsa.2015.3989. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal

Henneberger, T. S. M., K. L. Stevenson, K. O. Britton and C. J. Chang. 2004. Distribution of *Xylella fastidiosa* in sycamore associated with low temperature and host resistance. Plant Dis. 88:951-958.

Janse, J.D. and A. Obradovic. 2010. *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. J. Plant Pathol. 92, S35–S48.

Minsavage, G. V., C. M. Thompson, D. L. Hopkins, R. M. Leite and R. E. Stall. 1994. Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. Phytopathology 84: 456-461.

Pooler, M. R. and J. S. Hartung. 1995. Specific PCR detection and identification of *Xylella fastidiosa* causing citrus variegated chlorosis. Curr. Microb. 31: 377-381.

Purcell, A. H. 2013. Paradigms: Examples from the Bacterium *Xylella fastidiosa*. Ann. Rev. Phytopathol. 51:339–56.

Schaad, N.W., J.B. JONES and W. CHUN. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul, MN, USA.

Ministry of Jihad–e-Agriculture
Agricultural Research, Education & Extension Organization
Iranian Research Institute of Plant Protection

Xylella fastidiosa

(