

بهینه سازی روش پی سی آر آشیانه ای در ردیابی باکتری سخت کشت

Xylella fastidiosa

Development of a Nested-PCR Approach for Detection and Identification of

Xylella fastidiosa

جبرئیل بهمنی^۱، نادر حسن زاده^{۲*}، مریم غایب زمهریر^۳ و بهروز حریقی^۴

دریافت: ۱۴۰۴/۳/۱۹

پذیرش: ۱۴۰۴/۶/۱۶

چکیده

باکتری *Xylella fastidiosa* گونه ای سخت کشت و محدود به آوند چوبی و عامل بروز بیماری های جدی در گیاهان مختلف می باشد. تاکنون، اپیدمی های وسیع و ریشه کن کننده در نقاط مختلف دنیا از این باکتری گزارش شده است. در دهه اخیر، علائم بیماری های ناشی از *X. fastidiosa* در برخی از مناطق ایران روی درختان میوه از جمله بادام و انگور مشاهده شده است. میزان حساسیت، به صرفه بودن، مؤثر و قابل اعتماد بودن روش های ردیابی *X. fastidiosa* در گیاهان و حشرات ناقل به ویژه در گیاهان چند ساله مانند انگور و پسته که جمعیت باکتری در آن ها کم است، از نظر قرنطینه و مدیریت بیماری بسیار ضروری است. علیرغم دقت بالای ردیابی به روش PCR روی یاخته های کشت شده، کشت باکتری *X. fastidiosa* بسیار پرهزینه، زمان بر و با درصد موفقیت پایین گزارش شده است. بنابراین، به منظور بهینه سازی روشی سریع، کم هزینه و با دقت برای ردیابی باکتری سخت رشد آوندی *X. fastidiosa* به طور مستقیم از گیاه میزبان، PCR آشیانه ای دو مرحله ای، برای تکثیر ژن RNA polymerase gene 70S sigma طراحی شد. طبق نتایج به دست آمده از این روش، از ۲٪ کل نمونه های استخراج یافته، به ۷٪ در نمونه های استخراج یافته بهبود یافت. بنابراین، استفاده از روش PCR آشیانه ای می تواند روش جایگزین سریع، به صرفه و مؤثر برای ردیابی مستقیم این باکتری از میزبان باشد.

واژگان کلیدی: پیرس انگور، باکتری سخت کشت، PCR استاندارد، PCR آشیانه ای، RNA polymerase gene 70S sigma، *Xylella fastidiosa*

مقدمه

باکتری *X. fastidiosa* یک باکتری گرم منفی و محدود به آوند چوبی است. این باکتری در بسیاری از میزبان های گیاهی بیماری هایی با علائم مختلف ایجاد می کند (Wells et al., 1987). میزان آلودگی و خسارت بیماری های ناشی از باکتری *X. fastidiosa* بسته به شرایط محیطی، فعالیت ناقل و حساسیت میزبان متفاوت است و از چند درصد تا ۳۰ درصد گزارش شده است (Purcell, 2013; Wang et al., 2024). علائم بیماری های ناشی از *X. fastidiosa* از سال ها قبل در برخی از مناطق ایران روی درختان میوه به ویژه بادام، مو، درختان جنگلی و سایه دار مشاهده شده است. بر اساس نتایج الایزا از نمونه های مشکوک به عامل بیماری *X. fastidiosa* جمع آوری شده از مناطق مختلف ایران شامل استان های چهارمحال و بختیاری،

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار، گروه گیاه پزشکی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- دانشیار، بخش بیماری های گیاهی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، تهران، ایران

۴- استاد، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: hasanzadehr@yahoo.com

فارس، خراسان رضوی، قزوین، البرز، کرمان، اصفهان، همدان و کرمانشاه طی سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۸۸، برخی نمونه‌ها آلوده گزارش شده‌اند (Amanifar et al., 2019).

عامل بیماری پیرس انگور ابتدا در باغ‌های انگور کالیفرنیا مشاهده شد (Pierce, 1892). عامل بیماری تا پایان دهه ۱۹۷۰ قابل کشت نبود (Davis et al., 1978). امروزه این باکتری در زمره ۱۰ پاتوژن برتر گیاهی با بیشترین مطالعات انجام شده قرار دارد (Mansfield et al., 2012).

X. fastidiosa در طبیعت با زنجیرک‌های سر مخروطی و اندام‌های رویشی تکثیری آلوده منتقل می‌شود و چون دوره کمون بیماری‌های ناشی از *X. fastidiosa* نسبتاً طولانی است، ممکن است با نهال‌های آلوده بدون علائم ظاهری ناشی از بیمارگر به مناطق غیرآلوده منتقل شود (Janse and Obradovic, 2010).

طبق منابع جدید، دامنه میزبانی این باکتری در بیش از ۶۰۰ گونه گیاهی به‌ویژه گونه‌های چندساله ردیابی شده است (EFSA et al., 2024)، که لزوماً در همه موارد عامل بیماری‌زا نبودند، بلکه تعدادی از آنها اندوفیت بافت گیاهی (Chatterjee et al., 2008) و بعضاً به‌صورت همسفره و هم‌غذا گزارش شدند (Castro et al., 2021). امروزه خطر این بیماری با توجه به تنوع زیرگونه بسیار جدی است و محصولات باغی و زراعی، مرتعی و دیگر عرصه‌های طبیعی و محیط زیستی را مورد تهدید قرار داده است (Castro et al., 2021).

از بیماری‌های شناخته شده عامل بیماری می‌توان به بیماری پیرس انگور (Davis et al., 1978)، سوختگی برگ بادام (Mircetich et al., 1976)، کوتولگی یونجه (Wells et al., 1987)، کلروز چندرنگی مرکبات (Chang et al., 1993)، سوختگی برگ بلوط (Barnard et al., 1998)، سوختگی برگ گلابی (Leu and Su, 1993)، سوختگی برگ خرزهره (Purcell et al., 1999)، بیماری زوال سریع زیتون (Luvisi et al., 2017; Saponari et al., 2017) و سوختگی برگ پسته (Amanifar et al., 2019) اشاره نمود.

باکتری مذکور بر مبنای قدرت بیماری‌زایی، دامنه میزبانی، آزمون‌های سرولوژیکی (الایزا)، روابط فیلوژنی و اخیراً مقایسه توالی‌های ناحیه فاصله‌ساز داخلی (ITS) و توالی‌یابی چند لوکوس ژن‌های خانه‌دار (multilocus sequencing through partial sequences of housekeeping genes) به دو گونه عمده *X. fastidiosa* و *Xylella taiwanensis* تقسیم می‌شوند (Johnson et al., 2021) که گونه *X. fastidiosa* دارای شش زیرگونه است: زیرگونه *X. fastidiosa* subsp. *fastidiosa* عامل بیماری پیرس بر روی انگور، خرزهره، افرا، رزماری و بادام (Buzombo et al., 2006; Nunney et al., 2010)، زیرگونه *X. fastidiosa* subsp. *sandyi* عامل بیماری بر روی خرزهره (Yuan et al., 2010)، زیرگونه *X. fastidiosa* subsp. *Multiplex* عامل بیماری روی بادام، آلو، هلو، زردآلو و بلوط (Hernandez-Martinez et al., 2006; Schaad et al., 2004)، زیرگونه *X. fastidiosa* subsp. *tashke* عامل بیماری روی درخت زینتی درخت چیتالیا (Randall et al., 2009)، زیرگونه *X. fastidiosa* subsp. *pauca* عامل بیماری روی میزبان‌های مرکبات (CVC)، سندرم زوال سریع زیتون (OQDS)، قهوه، خرزهره، بادام (de Souza et al., 2020) و زیرگونه *X. fastidiosa* subsp. *Morus* عامل بیماری توت سفید، توت قرمز، بامبو بهشتی و ناندینا می‌باشند (Nunney et al., 2014).

غیر از آمریکا به‌عنوان خاستگاه اصلی، در اروپا نیز سه زیرگونه اصلی *X. fastidiosa* subsp. *pauca* (Xfp)، *X. fastidiosa* subsp. *Multiplex* (Xfm) و *X. fastidiosa* subsp. *Fastidiosa* (Xff) شناسایی شده است (Jacques et al., 2016; Dupas, et al., 2023). علاوه بر قاره اروپا و منطقه مدیترانه، از دیگر نقاط دنیا چون تایوان هم وجود این بیماری ردیابی و گزارش شده است (Su et al., 2016).

در ایران این باکتری از باغات انگور و بادام (Amanifar et al., 2014) و پسته (Amanifar et al., 2019) گزارش شده است.

بروز بیماری در باغات انگور، بادام و پسته در ایران از نقطه نظر پراکنش و پیامدهای آن بر تولید، نیازمند بررسی و تحلیل دقیق است. از آنجا که نشانه‌های این بیماری در بسیاری موارد با علائم ناشی از تنش‌های محیطی نظیر خشکی و شوری اشتباه گرفته می‌شود، تشخیص درست بیماری، از اهمیت بالایی برخوردار است. در این تحقیق که طی پنج سال از ۱۳۹۶ تا ۱۴۰۱ در استان‌های مختلف ایران انجام گرفت، نسبت به ردیابی عامل بیماری از روی میزبان‌های مختلف در مناطق مختلف ایران اقدام شد.

مواد و روش‌ها

پایش بیماری و نمونه‌برداری

طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۶ تعداد ۳۷۴ نمونه از میزبان‌های مختلف از جمله انگور، پسته، بادام، سیب، گلابی، نارون، گیلان و مرکبات بر اساس مشاهده علائم ظاهری بیماری و نیز از میزبان‌های بدون علائم آشکار بیماری، از نقاط آلوده و مشکوک به آلودگی با علائم حاشیه سوختگی برگ‌ها و چوب کبریتی شدن دمبرگ‌ها جمع‌آوری گردید (شکل ۱).



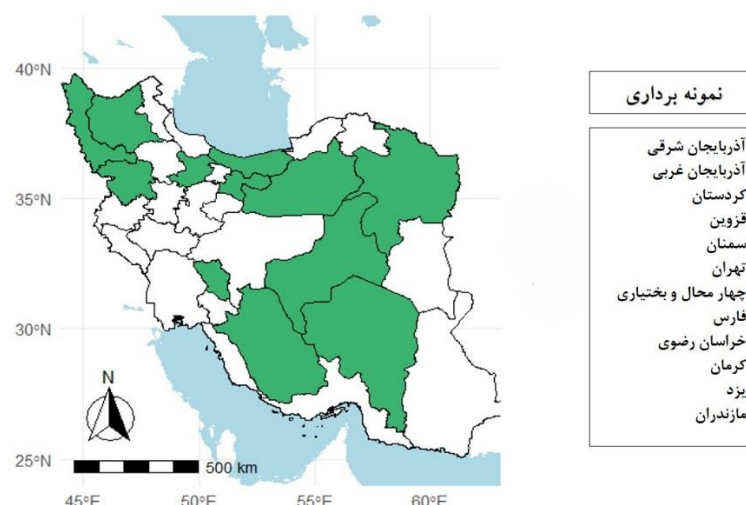
شکل ۱- علائم آلودگی در میزبان‌های مختلف: (A) علائم حاشیه سوختگی و چوب کبریتی شدن برگ‌ها در میزبان انگور، (B)

علائم سوختگی حاشیه برگ درخت پسته

Fig. 1. Symptoms of infection in different hosts: (A) Leaf scorch and matchstick-like of leaves on grape host; (B) Marginal leaf scorch symptoms in pistachio trees.

استان‌های هدف عبارت از کرمان، قزوین، یزد، تهران، سمنان، فارس، آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، مازندران، چهارمحال و بختیاری، خراسان رضوی و کردستان بودند (شکل ۲).

نمونه‌های مشکوک به آلودگی از شاخه و برگ‌های درختان نواحی مختلف جمع‌آوری شد و هر نمونه با برچسب مشخص در یک کیسه پلاستیکی قرار گرفت و در ظرف حاوی یخ جهت کشت و انجام آزمون‌های پی‌سی‌آر به آزمایشگاه انتقال داده شد. درصد آلودگی برای هر استان، بر اساس میزبان نمونه‌برداری شده، به صورت کسری از تعداد نمونه‌های مثبت به کل نمونه‌های تست شده در هر استان محاسبه شد.



شکل ۲- نقشه جمع‌آوری نمونه‌ها از ۱۲ استان کشور. این نقشه، با نرم‌افزار RStudio (نسخه ۴.۵.۱) تهیه شده است.

Fig 2. Map of collecting samples from 12 provinces of the country. The map was generated using RStudio (version 4.5.1).

محیط کشت‌های اختصاصی

محیط‌های کشت اختصاصی شامل BCYE (Buffered charcoal yeast extract) (Wells *et al.*, 1987) PWG (Periwinkle wilt) (Davis *et al.*, 1980; Hill and Purcell, 1995; Janse *et al.*, 2012) (Periwinkle wilt Gelrite) (Schaad *et al.*, 2001) و PDA2 (Potatp Dextrose Agar 2) (Davis *et al.*, 1980) تهیه شدند (جدول ۱).

جدول ۱- مواد تشکیل دهنده محیط کشت‌ها

Table 1. Constituent components of culture media			
BCYE (g/L)	PWG (g/L)	PW (g/L)	PD2 (g/L)
10 Yeast extract	4 Phytone peptone	4 Phytone peptone	1 Disodium succinate
2 Activated charcoal	1 Trypticase peptone	1.2 Trypticase	4 Tryptone
0/4 L-cysteine HCl	0/01 Hemin chloride	0/5 MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 Soytone
Ferric pyrophosphate	0/01 Phenol red	0/01 Hemin chloride	1 Trisodium citrate
10 ACES buffer	1 K ₂ HPO ₄	1.5 K ₂ HPO ₄	0/5 MgSO ₄ ·7H ₂ O
17 Difco Bacto Agar	1 KH ₂ PO ₄	1 KH ₂ PO ₄	1.5 K ₂ HPO ₄
40 ml KOH (1M)	9 Gelrite gellan gum	4 L-glutamine	1 KH ₂ PO ₄
–	0/4 MgSO ₄ ·7SO ₄	Bovine serum albumin	0/01 Hemin chloride
–	4 L-glutamine	15 Agar	6 Bovine serum albumin
–	Bovine serum albumin	–	15 Agar
–	15 Agar	–	–

برای تهیه سوسپانسیون ابتدا از محل دمبرگ و رگرگ‌های اصلی برگ‌ها که دارای علائم تیپیک بیماری بودند، مقدار ۰/۵ گرم نمونه تهیه و با آب سترون شسته و خشک شد. سپس در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت سه دقیقه ضدعفونی سطحی انجام شد. سپس به مدت سه دقیقه در محلول اتانول ۷۰٪ قرار داده شد و در نهایت در آب مقطر سترون به مدت ۵ دقیقه سه نوبت شستشو و آماده کشت شد (EPPO, 2016). پتری‌های کشت شده به مدت چهار هفته در دمای ۲۸°C و در شرایط تاریکی قرار داده شدند. کلنی‌های سریع رشد که قبل از یک هفته ظهور کردند، به‌عنوان عوامل ثانویه حذف شدند. تشکیل یا عدم تشکیل کلنی بسیار ریز از هفته دوم به بعد به‌طور روزانه تا هفته چهارم، مورد بازبینی قرار گرفتند.

استخراج DNA و آنالیز PCR

DNA کل گیاه، با استفاده از کیت کیاژن (QIAGEN (Cat. No. 69104)، بر اساس دستورالعمل کارخانه سازنده و هم چنین با استفاده از بافر CTAB (Cetyltrimethylammonium bromide) استخراج شدند (Ausubel et al., 1992). در روش CTAB، مقدار ۵۰ میلی گرم نمونه از میانبرگ و رگبرگ های اصلی خرد شده بافت تازه گیاه با ازت مایع در ۵ سی سی بافر CTAB با pH=۸ استخراج گردید (Hendson et al., 2001).

واکنش پی سی آر استاندارد (Conventional PCR)

جفت پرایمر RST 31/33 (Minesavage et al., 1994) جهت تکثیر ژن RNA-Pol sigma-70 factor در واکنش های PCR معمولی با حجم محلول پایه ۱۴ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر DNA، ۶ μL، مسترمیکس، ۵ μL آب تزریقی و ۱ μL از پرایمرهای پیشرو و پسرو، مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲). برنامه تکثیر، شامل یک مرحله دناتوراسیون (گسست) اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، دمای اتصال ۵۵ درجه سلسیوس برای تکثیر ژن RNA-Pol sigma-70 factor به مدت ۳۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله افزایش طول در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ۸ دقیقه، برای واکنش PCR معمولی انجام شد.

جدول ۲- فهرست آغازگرهای مورد استفاده برای ردیابی *X. fastidiosa*

Table 2. List of the primers used for detection of *X. fastidiosa*

منبع Reference	اندازه محصول (bp) Amplicon size (bp)	ژن هدف Target gene	توالی (۵' به ۳') Sequence (5' to 3')	نوع آغازگر Primer type
Minesavage et al., 1994	733	RNA polymerase gene 70S sigma RNA	5'-GCGTTAATTTTCGAAGTGATTGCGATTGC-3' 5'- CACCATTTCGTATCCCGGTG-3'	RST31/ RST33
در دست چاپ	480	polymerase gene 70S sigma	5'-AATGTTGCAGCAGTTTGGTCG-3' 5'-TTGCCCTACACGTGATTAAGCAC-3'	ALSC491-F ALSC491-R

واکنش پی سی آر آشیانه ای (Nested PCR)

در واکنش پی سی آر آشیانه ای، ۱ μL از محصول پی سی آر اولیه در ۱۹ μL آب تزریقی رقیق و همگن گردید و مقدار ۱ μL از آن در پایه واکنش شامل، ۶ μL از مستر میکس (EmeralAmpMaxHS PCR primer Mix TaKaRa-RR330Q) (EmeralAmpMaxHS PCR primer Mix TaKaRa-RR330Q)، ۵ μL آب تزریقی، ۱ μL از پرایمر ALSC491-F/ALSC491-R در حجم نهایی ۱۴ μL اضافه گردید. برنامه تکثیر مرحله دوم پی سی آر آشیانه ای، همانند مرحله اول تکرار گردید. در پایان، محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱٪ در ولتاژ ۸ ولت به مدت ۴۵ دقیقه اجرا و با دستگاه UV باندهای تکثیر شده مشاهده و عکس برداری شد (شکل ۴).

نتایج

نمونه برداری و میزان آلودگی

طی فصول مختلف در سال های ۱۴۰۱-۱۳۹۶ تعداد ۳۷۴ نمونه گیاهی، از میزبان های مختلف به ویژه انگور، پسته، بادام و گیلان با علائم و بدون علائم نمونه برداری شد. بیشترین درصد آلودگی به ترتیب مربوط به هفت استان کرمان با ۳۵٪،

قزوین با ۲۸٪، خراسان رضوی با ۲۷٪، آذربایجان غربی ۲۳٪، یزد ۱۸٪، سمنان ۹٪ و چهارمحال و بختیاری ۶٪ آلودگی بود (جدول ۳، شکل ۳).

جدول ۳- مکان، زمان، تعداد نمونه‌های با علائم و بدون علائم و درصد آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده از میزبان‌های مختلف طی سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۶

Table 3. Place, time, number of samples with symptoms and without symptoms and percentage of contamination of samples collected from different hosts during 2018-2021

Sampling Time	زمان نمونه‌برداری	Sampling province	استان‌های نمونه‌برداری	Host	میزبان	تعداد نمونه‌ها Number of samples		درصد آلودگی % of infection
						با علائم Symptomatic	بدون علائم Asymptomatic	
(Summer, Autumn) 2019,2020	(پائیز، تابستان) ۱۳۹۸-۱۳۹۹	Semnan	سمنان	Grapevine	انگور	44	6	9%
(Summer, Autumn) 2019,2020	(پائیز، تابستان) ۱۳۹۸-۱۳۹۹	Qazvin	قزوین	Grapevine	انگور	41	3	28%
(Summer) 2019-2020	(تابستان) ۱۳۹۸-۱۳۹۹	Khorasan Razavi	خراسان رضوی	Grapevine	انگور	16	3	-
(Summer, Autumn) 2018-2019	(پائیز، تابستان) ۱۳۹۷-۱۳۹۸	West Azerbaijan	آذربایجان غربی	Grapevine	انگور	17	2	23%
(Autumn) 2019	(پائیز) ۱۳۹۸	East Azerbaijan	آذربایجان شرقی	Grapevine	انگور	8	-	-
(Summer) 2019	(تابستان) ۱۳۹۸	Kurdistan	کردستان	Grapevine	انگور	6	-	-
(Spring, Summer, Autumn) 2019-2021	(پائیز، تابستان، بهار) ۱۳۹۸-۱۴۰۰	Kerman	کرمان	Pistachio	پسته	96	5	35%
(Spring, Summer, Autumn) 2019-2021	(پائیز، تابستان، بهار) ۱۳۹۸-۱۴۰۰	Yazd	یزد	Pistachio	پسته	54	6	18%
(Summer, Autumn) 2020-2021	(پائیز، تابستان) ۱۳۹۹-۱۴۰۰	Chaharmahal and Bakhtiari	چهارمحال و بختیاری	Almond	بادام	23	3	6%
(Summer) 2018-2019	(تابستان) ۱۳۹۷-۱۳۹۸	Fars	فارس	Almond	بادام	9	-	-
(Winter) 2018	(زمستان) ۱۳۹۶	Tehran	تهران	Plantanus	چنار	7	1	-
(Winter) 2019	(زمستان) ۱۳۹۷	Mazandaran	مازندران	Citrus	مرکبات	5	1	-
(Summer, Autumn) 2022	(پائیز، تابستان) ۱۴۰۱	Khorasan Razavi	خراسان رضوی	Cherry	گیلاس	16	2	27%

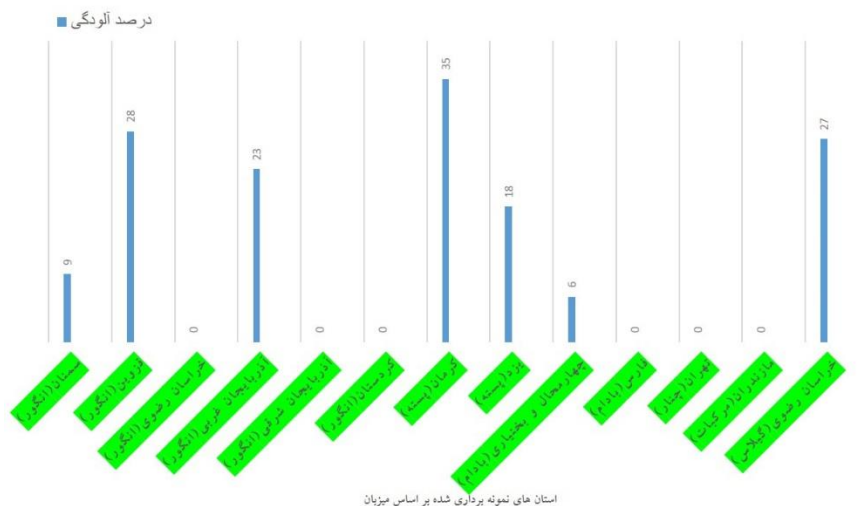
کشت نمونه‌ها روی محیط کشت‌های اختصاصی

برغم تلاش‌های مکرر، باکتری *X. fastidiosa* روی محیط‌های کشت اختصاصی BCYE، PW، PD2، PWG جداسازی نشد.

PCR استاندارد (Conventional PCR)

در این روش تکثیر ژن RNA polymerase gene 70S برای تمام استخراج‌های گیاهی، با روش PCR استاندارد یک مرحله‌ای با استفاده از پرایمر اختصاصی RST31/33 انجام شد. از مجموع ۳۷۴ نمونه گیاهی استخراج شده، تعداد ۷ نمونه با

پرایمر یاد شده، واکنش PCR مثبت نشان دادند. بنابراین، درصد موفقیت این روش برای نمونه‌های گیاهی استخراج شده ایرانی، حدود ۲٪ برآورد شد.

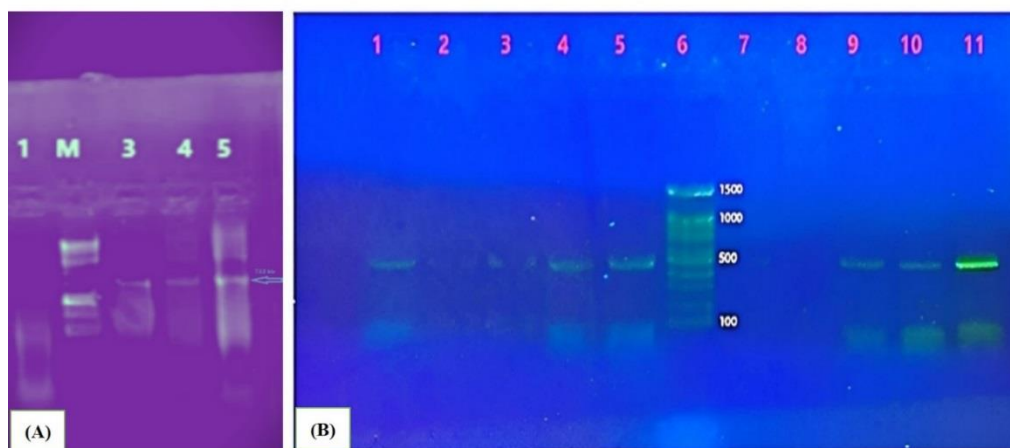


شکل ۳- نمودار درصد آلودگی استان‌ها بر اساس میزبان نمونه برداری شده

Fig. 3. Percentage of infection in provinces based on the sampled host plants

PCR آشیانه‌ای (Nested PCR)

واکنش PCR آشیانه‌ای برای ۳۷۴ نمونه استخراج شده گیاهی با استفاده از پرایمر طراحی شده ALSC491، انجام شد و در مجموع تعداد ۲۵ نمونه، با نتیجه مثبت تکثیر شدند. از این تعداد، ۷ نمونه در دو روش PCR استاندارد و PCR آشیانه‌ای با نتیجه مثبت تکثیر شدند. تعداد ۱۸ نمونه صرفاً با PCR آشیانه‌ای شناسایی شدند که این عملکرد می‌تواند، بیانگر افزایش کارایی این روش در نمونه‌های استخراج شده گیاهی باشد. بر این اساس، درصد موفقیت این روش، برای نمونه‌های استخراج شده گیاهی، حدود ۷٪ برآورد شد.



شکل ۴- ژل الکتروفورز تکثیر نمونه‌ها: (A) با آغازگر RST31/RST33 و (B) با آغازگر ALSC491-F/ALSC491-R

Fig. 4. Electrophoresis gel of PCR-amplified samples: (A) Using primers RST31/RST33; (B) Using primers ALSC491-F/ALSC491-R

بحث

علایم شاخص بیماری‌های ناشی از سویه‌های مختلف *X. fastidiosa* اغلب به‌صورت سوختگی حاشیه برگ‌ها، سه رنگی، کوتولگی، خزان زودرس برگ‌ها، چروکیدگی میوه، خشکی سرشاخه‌ها و بالاخره مرگ درختان آلوده مشاهده می‌شود (Amanifar et al., 2014). در این تحقیق، ردیابی بیماری با روش‌های مختلف از جمله کشت بر روی محیط کشت‌های اختصاصی باکتری *X. fastidiosa* و روش‌های مولکولی انجام گرفت. نتایج به‌دست آمده از روش‌های به‌کار گرفته شده متغیر بود و این ادامه کار را با دشواری مواجه ساخت، بنابراین نیاز به انتخاب روشی موثر و کارآمد، احساس شد (Baldi and La Porta, 2017).

عدم موفقیت در کشت باکتری *X. fastidiosa* دور از انتظار نبود. نیازهای غذایی ویژه، مکان زیستگاه خاص (آوند چوبی)، تأثیرپذیری قابل توجه باکتری از شرایط محیطی از جمله دما، حضور و میزان فعالیت ناقلین و وجود علف‌های هرز میزبان از جمله عوامل مؤثر در میزان موفقیت کشت این باکتری گزارش شده است (Sicard et al., 2018). علاوه بر مشکلات جداسازی، تشابه علائم بیماری ناشی از *X. fastidiosa* با دیگر علائم مرتبط با عوامل غیرزنده از جمله تنش‌های خشکی، شوری و کمبود عناصر غذایی، ردیابی این بیماری را نیز پیچیده‌تر می‌کند (De Pascali et al., 2022). افزون بر این، روش کشت و وقت‌گیر و مواد تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت متعدد و بسیار گران است و پیدایش آلودگی‌های ثانویه طی انکوباسیون طولانی‌مدت و رشد کند.

کلنی‌های *X. fastidiosa* بسیار چالش‌برانگیزند (Mourou et al., 2025). در بسیاری از موارد، حتی با ضدعفونی چندباره بافت‌های مورد استفاده برای جداسازی، سطح پتری‌ها اغلب ۵-۴ روز بعد از کشت، توسط کلنی‌های باکتری‌های پوده‌رست و گاهی کندرشد همراه بافت‌های بیمار، اشغال می‌شود و تشخیص کلنی اصلی و خالص‌سازی آنها را ناممکن می‌سازد. به‌طور نظری، حداقل جمعیت باکتری *X. fastidiosa* برای جداسازی، برابر با ۱۰۰۰ واحد تشکیل‌دهنده کلنی (CFU) در هر گرم بافت تعیین شده است (Purcell et al., 1999). در برخی از گیاهان، جمعیت باکتری *X. fastidiosa* کمتر از حد آستانه لازم برای جداسازی است و به دلیل وجود مواد بازدارنده در عصاره گیاهی، پایداری باکتری نیز بسیار کم است. بنابراین، روش‌های جداسازی و PCR استاندارد برای ردیابی این بیمارگر، در بسیاری از موارد موفقیت‌آمیز نیستند و موفقیت جداسازی باکتری *X. fastidiosa* در محیط کشت، کمتر از ۵٪ گزارش شده است (Amanifar et al., 2014).

علی‌رغم سختی کار با باکتری سخت‌کشت *X. fastidiosa*، همچنان گزارش‌های موردی در خصوص این باکتری از ایران منتشر می‌شود. با توجه به موارد یاد شده و همچنین نتایج این تحقیق و مشاهدات ماکروسکوپی علائم بیماری بر روی میزبان‌های مختلف در استان‌های متعدد، وجود بیمارگر بسیار محتمل شد. از این‌رو، با بهینه‌سازی روش PCR آشیانه‌ای، موفقیت چشمگیر در ردیابی این باکتری مهم و خطرناک به دست آمد. این روش اولین بار در اواخر دهه ۱۹۸۰ میلادی، در مقالات مربوط به تکثیر ژنوم در ویروس‌ها و ژن‌های با تعداد نسخه بسیار کم، به‌عنوان یک تکنیک نوین برای افزایش حساسیت PCR معرفی و از سال ۱۹۹۰ به بعد؛ به‌عنوان روشی استاندارد در تشخیص‌های مولکولی به‌ویژه در نمونه‌های با غلظت پایین ژنومی مرسوم شد (Saiki et al., 1988). روش PCR آشیانه‌ای، در تشخیص عوامل بیماری‌زای گیاهی به‌خصوص برای باکتری‌های سخت‌کشت، کم‌تعداد در سلول گیاهی، محدود به آوندها، از جمله باکتری *X. fastidiosa* کاربرد گسترده‌ای دارد (Cruaud et al., 2014). این روش در تشخیص *Colletotrichum siamense* عامل بیماری آنتراکنوز توت‌فرنگی نیز موفقیت‌آمیز گزارش شده است، به‌طوری‌که توانایی شناسایی پاتوژن را در غلظت‌های بسیار پایین، معادل حداقل یک پیکوگرم DNA برابر با حدود ۱۵ سلول قارچی نشان داده است (Chung et al., 2022). همچنین در مورد عامل فیتوپلاسمایی پژمردگی برگ نخل (WCLWD)، تشخیص پاتوژن با روش PCR آشیانه‌ای، موفقیت‌آمیز گزارش شده است (De Silva et al., 2023). در مطالعه دیگری، برای تشخیص دو گروه فیتوپلاسمایی 16SrI و 16SrII از روش PCR آشیانه‌ای استفاده شد که حساسیت

تشخیص برای گروه 16SrI به میزان 7.5×10^{-7} ng/ μ L و برای گروه فیتوپلاسمائی 16SrII، معادل 4×10^{-7} ng/ μ L گزارش شده است (Ge et al., 2025). در مطالعه‌ای که بر روی ۲۵۰۰ نمونه از حشره *Philaenus spumarius*، ناقل باکتری *X. fastidiosa* در منطقه کورسیکای فرانسه انجام شد، دو روش مولکولی qPCR و PCR آشیانه‌ای برای ردیابی پاتوژن مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد روش qPCR از حساسیت کافی برای تشخیص برخوردار نبود و میزان برآورد آلودگی با این روش کمتر از میزان واقعی برآورد شد، درحالی‌که روش PCR آشیانه‌ای حضور باکتری را در همه نمونه‌های آلوده به‌درستی تشخیص داد (Cruaud et al., 2018). مجموعه این مطالعات نشان می‌دهد که روش PCR آشیانه‌ای، با افزایش چشمگیر، امکان شناسائی ژنوم در مقادیر بسیار کم را فراهم می‌سازد. در مطالعه‌ای از عوامل مؤثر بر افزایش کارکرد روش PCR آشیانه‌ای به دو شاخص کلیدی حساسیت (Sensitivity) و اختصاصیت (Specificity) به‌ویژه در شرایط تکثیر یک الگوی ژن خاص از خانواده ژنی چندشکلی یا تکثیر یک نسخه cDNA از mRNA که با فراوانی بسیار کم در یک نمونه حاوی جمعیت ناهمگن از انواع سلول‌ها وجود داشته باشد، اشاره شده است. (Green et al., 2019). بر اساس یافته‌های این پژوهش، ردیابی مولکولی باکتری به‌صورت مستقیم از گیاه، از ۲٪ در PCR استاندارد به حدود ۷٪ در PCR آشیانه‌ای بهبود یافت که این موفقیت چشمگیری در ردیابی و شناسائی این عامل بیماری‌زای گیاهی است. نتایج به‌دست‌آمده، اهمیت استفاده از آغازگرهای اختصاصی و طراحی دقیق PCR آشیانه‌ای را برای تشخیص سریع و دقیق باکتری سخت‌کشت *X. fastidiosa*، به‌ویژه در فعالیت‌های مرتبط با قرنطینه این باکتری بسیار مهم را به‌خوبی نشان می‌دهد. به نظر می‌رسد، زمانی‌که جمعیت باکتری *X. fastidiosa* در گیاه یا ناقل بسیار پایین است، حساسیت روش PCR استاندارد برای ردیابی این باکتری کاهش می‌یابد. افزایش چشمگیر درصد موفقیت واکنش PCR آشیانه‌ای با پرایمرهای اختصاصی، کارآمدی و دقت این روش را در ردیابی سریع این باکتری به‌صورت مستقیم از بافت‌های آلوده میزبان نشان می‌دهد. بر اساس نتایج حاصل از فرآیند جداسازی و PCR در این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که به‌کارگیری PCR آشیانه‌ای با آغازگرهای اختصاصی، روشی بهینه‌سازی شده و قابل اعتماد برای ردیابی و تشخیص باکتری *X. fastidiosa* است.

References

منابع

- Amanifar, N., Babaei, G. and Mohammadi, A.H. 2019. *Xylella fastidiosa* causes leaf scorch of pistachio (*Pistacia vera*) in Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 58(2): 369-378.
- Amanifar, N., Taghavi, M., Izadpanah, K. and Babaei, G., 2014. Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* from grapevine and almond in Iran. *Phytopathologia Mediterranea* 53(2): 318-327.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1992. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates & Wiley-Interscience, New York.
- Baldi, P. and La Porta, N. 2017. *Xylella fastidiosa*: host range and advances in molecular identification techniques. *Frontiers in Plant Science* 8: 944.
- Barnard, E.L., Ash, E.C., Hopkins, D.L. and McGovern, R.J. 1998. Distribution of *Xylella fastidiosa* in oaks in Florida and its association with growth decline in *Quercus laevis*. *Plant Disease* 82(5): 569-572.
- Buzombo, P., Jaimes, J., Lam, V., Cantrell, K., Harkness, M., Mc-Cullough, D. and Morano, L. 2006. An American hybrid vineyard in the Texas Gulf Coast: Analysis within a Pierce's disease hotzone. *American Journal of Enology and Viticulture* 57: 347-355.
- Castro, C., DiSalvo, B. and Roper, M.C. 2021. *Xylella fastidiosa*: A reemerging plant pathogen that threatens crops globally. *PLoS Pathogens* 17(9): e1009813.
- Chang, C.J., Garnier, M., Zreik, L., Rossetti, V. and Bové, J.M. 1993. Culture and serological detection of the xylem-limited bacterium causing citrus variegated chlorosis and its identification as a strain of *Xylella fastidiosa*. *Current Microbiology* 27: 137-142.
- Chatterjee, S., Almeida, R.P.P. and Lindow, S. 2008. Living in two worlds: the plant and insect lifestyles of *Xylella fastidiosa*. *Annual Review of Phytopathology* 46(1): 243-271.

- Chung, P.C., Wu, H.Y., Chen, Y.C., Hung, T.H. and Chung, C.L. 2022.** Development of a nested PCR assay for detecting *Colletotrichum siamense* and *C. fructicola* on symptomless strawberry plants. *PLoS ONE* 17(6): e0270687.
- Cruaud, A., Gonzalez, A.A., Godefroid, M., Nidelet, S., Streito, J.C., Thuillier, J.M., Rossi, J.P., Santoni, S. and Rasplus, J.Y. 2018.** Using insects to detect, monitor and predict the distribution of *Xylella fastidiosa*: a case study in Corsica. *Scientific Reports* 8(1): e15628.
- Davis, M.J., Thomson, S.V. and Purcell A.H., 1980.** Etiological role of a xylem-limited bacterium causing Pierce's disease in almond leaf scorch. *Phytopathology* 70: 472–475.
- Davis, M.J., Purcell, A.H. and Thomson, S.V. 1978.** Pierce's disease of grapevines: isolation of the causal bacterium. *Science* 199: 75-77.
- De Pascali, M., Vergine, M., Negro, C., Greco, D., Vita, F., Sabella, E., De Bellis, L. and Luvisi, A. 2022.** *Xylella fastidiosa* and drought stress in olive trees: a complex relationship mediated by soluble sugars. *Biology* 11(1): e112.
- De Silva, P.R., Perera, C.N., Bahder, B.W. and Attanayake, R.N. 2023.** Nested PCR-based rapid detection of phytoplasma leaf wilt disease of coconut in Sri Lanka and systemic movement of the pathogen. *Pathogens* 12(2): 294. doi:10.3390/pathogens12020294.
- De Souza, J. B., Almeida-Souza, H. O., Zaini, P. A., Alves, M. N., de Souza, A. G., Pierry, P. M. and Nascimento, R. 2020.** *Xylella fastidiosa* subsp. *pauca* strains Fb7 and 9a5c from citrus display differential behavior, secretome, and plant virulence. *International Journal of Molecular Sciences* 21(18): e6769. <https://doi.org/10.3390/ijms21186769>.
- Dupas, E., Durand, K., Rieux, A., Briand, M., Pruvost, O., Cuntty, A., Denancé, N., Donnadieu, C., Legendre, B., Lopez-Roques, C. and Cesbron, S. 2023.** Two bridgehead invasions of *Xylella fastidiosa* subsp. *multiplex* in France. *Communications Biology* 6: e103.
- EPPO, 2016.** EPPO Bulletin, PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa*. <https://doi.org/10.1111/epp.12327>.
- European Food Safety Authority (EFSA), Cavalieri, V., Fasanelli, E., Gibin, D., Gutierrez Linares, A., La Notte, P., Pasinato, L. and Delbianco, A., 2024.** Update of the *Xylella* spp. host plant database—Systematic literature search up to 31 December 2023. *EFSA Journal*, 22(7): e8898.
- Ge, H., Meng, X., Lin, Z., Jan, S., Song, W., Qin, W., Tang, Q. and Zhu, X. 2025.** Specific nested PCR for detection of 16SrI and 16SrII group phytoplasmas associated with yellow leaf disease of areca palm in Hainan, China. *Plants* 14(14): 2144.
- Green, M.R. and Sambrook, J. 2019.** Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols* 2019(2). doi:10.1101/pdb.prot095182.
- Hendson, M., Purcell, A.H., Chen, D., Smart, C., Guilhabert, M. and Kirkpatrick, B., 2001.** Genetic diversity of Pierce's disease strain and other pathotypes of *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 895–903.
- Hernandez-Martinez, R., Costa, H.S., Dumenyo, C.K. and Cooksey, D.A. 2006.** Differentiation of strains of *Xylella fastidiosa* infecting grape, almonds, and oleander using a multiprimer PCR assay. *Plant Disease* 90(11): 1382-1388.
- Hill B.L. and Purcell, A.P. 1995.** Multiplication and movement of *Xylella fastidiosa* within grapevine and four other plants. *Phytopathology* 85: 1368–1372.
- Jacques, M.A., Denancé, N., Legendre, B., Morel, E., Briand, M., Mississippi, S. and Crouzillat, D. 2016.** New coffee plant-infecting *Xylella fastidiosa* variants derived via homologous recombination. *Applied and Environmental Microbiology* 82(5): 1556-1568.
- Janse J.D., Valentini, F., Purcell, A.H. and Almeida, R.P.P. 2012.** Detection and identification methods and new tests as used and developed in the framework of COST873 for bacteria pathogenic to stone fruits and nuts-*Xylella fastidiosa*. *Journal of Plant Pathology* 94(1, Suppl.): S1.147-S1.154. <https://doi.org/10.4454/jpp.v94i1sup.022>.
- Janse, J.D. and Obradovic, A. 2010.** *Xylella fastidiosa*: its biology, diagnosis, control and risks. *Journal of Plant Pathology* 92: S35-S48.
- Johnson, K.A., Bock, C.H. and Brannen, P.M. 2021.** Phony peach disease: past and present impact on the peach industry in the southeastern USA. *CABI Agriculture and Bioscience*, 2(1): 29. <https://doi.org/10.1186/s43170-021-00049-4>.
- Leu, L. S. and Su, C.C. 1993.** Isolation, cultivation, and pathogenicity of *Xylella fastidiosa*, the causal bacterium of pear leaf scorch disease in Taiwan. *Plant Disease* 77: 642-646.

- Luvisi, A., Aprile, A., Sabella, E., Vergine, M., Nicoli, F., Nutricati, E., Miceli, A., Negro, C. and De Bellis, L. 2017.** *Xylella fastidiosa* subsp. pauca (CoDiRO strain) infection in four olive (*Olea europaea* L.) cultivars: Profile of phenolic compounds in leaves and progression of leaf scorch symptoms. *Phytopathologia Mediterranea* 56(2): 259-273.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M.A.X., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A. and Toth, I.A.N. 2012.** Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13(6): 614-629.
- Minesavage, G., Thompson, C., Hopkins, D., Leite, R. and Stall, R. 1994.** Development of a polymerase chain reaction protocol for detection of *Xylella fastidiosa* in plant tissue. *Phytopathology* 84(5): 456-461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/Phyto-84-456>.
- Mircetich, S.M., Lowe, S.K., Moller, W.J. and Nyland, G. 1976.** Etiology of almond leaf scorch disease and transmission of the causal agent. *Phytopathology* 66(1): 17-24.
- Mourou, M., Incampo, G., Carlucci, M., Salamone, D., Pollastro, S., Faretra, F. and Nigro, F. 2025.** Insight into biological strategies and main challenges to control the phytopathogenic bacterium *Xylella fastidiosa*. *Frontiers in Plant Science* 16: e1608687.
- Nunney, L., Schuenzel, E.L., Scally, M., Bromley, R.E. and Stouthamer, R. 2014.** Large-scale intersubspecific recombination in the plant-pathogenic bacterium *Xylella fastidiosa* is associated with the host shift to mulberry. *Applied and Environmental Microbiology* 80: 3025-3033.
- Nunney, L., Yuan, X., Bromley, R., Hartung, J., Montero-Astua, M., Moreira, L., Ortiz, B. and Stouthamer, R. 2010.** Population genomic analysis of a bacterial plant pathogen: Novel insight into the origin of Pierce's disease of grapevine in the US. *PloS ONE* 5(11): e15488.
- Pierce, N.B., 1892.** The California vine disease: a preliminary report of investigations. Vol. 2. US Government Printing Office.
- Purcell, A.H., Saunders, S.R., Hendson, M., Grebus, M.E. and Henry, M.J. 1999.** Causal role of *Xylella fastidiosa* in oleander leaf scorch disease. *Phytopathology* 89: 53-58.
- Purcell, A. 2013.** Paradigms: examples from the bacterium *Xylella fastidiosa*. *Annual review of Phytopathology* 51(1): 339-356.
- Randall, J.J., Goldberg, N.P., Kemp, J.D., Radionenko, M., French, J.M., Olsen, M.W. and Hanson, S.F. 2009.** Genetic analysis of a novel *Xylella fastidiosa* subspecies found in the southwestern United States. *Applied and Environmental Microbiology* 75(17): 5631-5638.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. 1988.** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839): 487-491.
- Saponari, A., Tavano, D. and Savino, V.N. 2017.** Isolation and pathogenicity of *Xylella fastidiosa* associated to the olive quick decline syndrome in southern Italy. *Scientific Reports* 7(1): 17723. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17957-z>.
- Schaad, N.W., Postnikova, E., Lacy, G., Fatmi, A. and Chang, C.J. 2004.** *Xylella fastidiosa* subspecies: *X. fastidiosa* subsp. *piercei* subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *multiplex* subsp. nov., *X. fastidiosa* subsp. *pauca* subsp. nov. *Syst. Applied and Environmental Microbiology* 27: 290-300.
- Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001.** Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. APS Press, St. Paul, MN, USA. 3rd ed., 373 pp.
- Schuenzel, E.L., Scally, M., Stouthamer, R. and Nunney, L. 2005.** A multigene phylogenetic study of clonal diversity and divergence in North American strains of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 71(7): 3832-3839.
- Sicard, A., Zeilinger, A.R., Vanhove, M., Schartel, T.E., Beal, D.J., Daugherty, M.P. and Almeida, R.P.P. 2018.** *Xylella fastidiosa*: Insights into an emerging plant pathogen. *Annual Review of Phytopathology* 56(1): 181-202. doi:10.1146/annurev-phyto-080417-045849.
- Su, C.C., Deng, W.L., Jan, F.J., Chang, C.J., Huang, H., Shih, H. T. and Chen, J. 2016.** *Xylella taiwanensis* sp. nov., causing pear leaf scorch disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(11): 4766-4771.
- Wang, N., Sundin, G.W., de la Fuente, L., Cubero, J., Tatineni, S., Brewer, M.T., Zeng, Q., Bock, C.H., Cuniffe, N.J., Wang, C. and Candresse, T. 2024.** Key challenges in plant pathology in the next decade. *Phytopathology* 114(5): 837-842.

- Wells, J.M., Raju, B.C., Hung, H.Y., Weisburg, W.G., Mandelco-Paul, L. and Brenner, D.J., 1987.** *Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 37(2): 136-143.
- Yuan, X., Morano, L., Bromley, R., Spring-Pearson, S., Stouthamer, R. and Nunney, L. 2010.** Multilocus sequence typing of *Xylella fastidiosa* causing Pierce's disease and oleander leaf scorch in the United States. Phytopathology 100(6): 601-611.

Development of a Nested-PCR Approach for Detection and Identification of *Xylella fastidiosa*

J. Bahmani^{1*}, N. Hasan Zadeh², M. Ghayeb Zamharir³ and B. Harighi⁴

Received: 9 Jun., 2025

Accepted: 7 Sep., 2025

ABSTRACT

Xylella fastidiosa is a difficult-to-cultivate, xylem-limited bacterium that causes severe diseases in various plants. Extensive and devastating epidemics of this bacterium have been reported in different parts of the world. In the last decade, symptoms of diseases caused by *X. fastidiosa* have been observed in some regions of Iran on fruit trees, including almonds and grapes. Sensitivity, cost effectiveness, and reliability of methods for detecting *X. fastidiosa* in plants and insects, especially in perennial plants such as grapes and pistachios, where the bacterial population is low, are essential in terms of quarantine and disease management. Detection by PCR on cultured bacterial cells is highly accurate, but the cultivation of *X. fastidiosa* is very expensive, time-consuming, and has been reported to have a low success rate. Therefore, in order to optimize a rapid, low-cost, and accurate method for detecting the hard-to-grow vascular bacterium *X. fastidiosa* directly from the host plant, a two-step nested PCR was designed for gene amplification (RNA polymerase gene 70S sigma). The results obtained from this method improved from 2% of the total extracted samples to 7% of the extracted samples. Therefore, the use of nested PCR method can be a rapid, cost-effective and effective alternative method for direct detection of this bacterium from the host.

Key words: Grape Pierce, Fastidious bacteria, Standard PCR, Nested-PCR, 70S sigma RNA polymerase gene, *Xylella fastidiosa*

1 and 2. PhD student and Associate Professor, respectively, Department of Plant Protection, SR.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Associate Professor, Department of Plant Pathology, Agricultural Research, Education and Extension Organization, National Plant Research Institute, Tehran, Iran

4. Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Corresponding author: hasanzadehr@yahoo.com