مقایسه کارآیی روش‌های پی‌سی‌آر معمولی، nested-PCR، real-time PCR و تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه(LAMP) در ردیابی عامل بیماری هوآنگ‌لونگ‌بینگ مرکبات در ایران*

COMPARISON OF THE EFFICIENCY OF CONVENTIONAL PCR, NESTED PCR, REAL-TIME PCR AND LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) METHODS FOR DETECTION OF THE CAUSAL AGENT OF CITRUS HUANGLONGBING IN IRAN

محمد مهدی فقیهی[۱]، سید محسن تقوی[۱**]، حبیب ا...حمزه زرقانی[۱] و علی نیازی[۲]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۹/۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۷)

چکیده

بیماری هوانگ‌لونگ‌بینگ (HLB) یا میوه‌سبز مرکبات یکی از بیماری‌های خطرناک مرکبات در دنیا است که اخیراً از ایران نیز گزارش شده است. برای انجام مدیریت بهینه بیماری HLB، ردیابی به موقع و سریع بیماری در باغ‌های مرکبات امری اجتناب‌ناپذیر است. به منظور مقایسه کارآیی روش‌های پی‌سی‌آر معمولی، nested-PCR، real-time PCR و تکثیر هم دمای وابسته به حلقه (Loop-mediated Isothermal Amplification) در ردیابی *Candidatus* Liberibacter asiaticus، عامل بیماری HLB در ایران، از نمونه‌های برگ مربوط به یک درخت پرتقال آلوده و یک درخت سالم استخراج دی‌ان‌ای کل انجام شد. سپس در مقادیر مختلف دی ان ای کل (از ۱۰۰ نانوگرم تا ۰/۱ فمتوگرم) از گیاه آلوده و سالم ردیابی عامل بیماری با آزمون پی‌سی‌آر معمولی (با چهار آغازگر مختلف)، nested-PCR (با سه مجموعه آغازگر مختلف)، real-time PCR (با یک جفت آغازگر) و LAMP (با دو مجموعه آغازگر مختلف) انجام و حساسیت، اختصاصیت و صحت برای هر روش بررسی شد. کلیه روش‌ها، به‌جز پی‌سی‌آر معمولی با آغازگر F1/R1 (۹۰ درصد)، در مقادیر ۱۰۰، ۱۰ و ۱ نانوگرم از دی‌ان‌ای کل با حساسیت ۱۰۰ درصد عامل بیماری را ردیابی کردند. روش پی‌سی‌آر معمولی (با هر کدام از چهار آغازگر) با مقدار ۱۰۰ پیکوگرم DNA، به‌طور میانگین عامل بیماری را در حدود ۳۰ درصد ردیابی نمود ولی در مقادیر ۱ پیکوگرم تا ۰/۱ فمتوگرم نتوانست عامل بیماری را ردیابی نماید. روش LAMP تا میزان ۱۰ پیکوگرم از دی‌ان‌ای کل را با حساسیت ۲۰ تا ۳۰ درصد ردیابی نمود ولی در مقادیر پایین‌تر از این مقدار (۱ پیکوگرم و کمتر از DNA)، با هرکدام از دو مجموعه آغازگر قادر به ردیابی عامل بیماری نبود. حساسیت روش LAMP شبیه یا در برخی مقادیر DNA اندکی بیشتر از پی‌سی‌آر معمولی بوده ولی سریع‌تر و ارزان‌تر از آن است. روش nested-PCR (با هر سه جفت آغازگر برای دور دوم)، عامل بیماری را با حساسیت ۱۰۰ درصد تا مقدار ۱ پیکوگرم دی‌ان‌ای کل ردیابی کرده و در کمترین مقدار دی‌ان‌ای کل یعنی ۰/۱ فمتوگرم نیز با حساسیت حدود ۳۰ درصد عامل بیماری را ردیابی نمود. روش real-time PCR تا ۱۰ فمتوگرم DNA، عامل بیماری را با حساسیت ۱۰۰ درصد و در مقادیر ۱ و ۰/۱ فمتوگرم DNA، عامل بیماری را با حساسیت ۹۰ درصد ردیابی نمود و بیشترین حساسیت را نشان داد؛ با وجود این، از عیوب این روش وقوع بیشتر نتایج مثبت کاذب نسبت به سایر روش‌ها می‌باشد. براساس نتایج به دست آمده به دلیل حساسیت بالای روش‌های real-time PCR و nested-PCR در ردیابی عامل بیماری HLB، استفاده از این روش‌ها در ردیابی درختان آلوده به‌ویژه در مناطقی که بیماری بتازگی وارد شده یا خطر آلودگی وجود دارد در کنار سایر روش‌های ردیابی پیشنهاد می‌شود. در بسیاری از شرایط استفاده از روش nested-PCR با توجه به کمتر بودن نتایج مثبت کاذب و ارزان‌تر بودن نسبت به روش real-time PCR می‌تواند انتخاب مناسب‌تری برای ردیابی بیماری HLB باشد.

واژه‌های کلیدی: ردیابی بیمارگر، *Candidatus* Liberibacter asiaticus، میوه‌سبز مرکبات، LAMP

*: بخشی از پایان‌نامه دکتری بیماری‌شناسی گیاهی نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: mtaghavi@shirazu.ac.ir
۱. به ترتیب دانشجوی دکتری، استاد و استادیار بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز
۲. دانشیار مرکز بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

مقدمه

بیماری هوانگ‌لونگ‌بینگ (HLB) یا میوه‌سبز مرکبات به عنوان یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مرکبات در دنیا شناخته شده است و باعث کاهش عملکرد محصول، زوال و نهایتاً مرگ درختان می‌شود. این بیماری در بسیاری از مناطق آسیا، آفریقا و آمریکای جنوبی خسارت‌های هنگفتی را ایجاد کرده است (Bove 2006).

عامل بیماری HLB مرکبات باکتری‌های سخت‌کشت، گرم منفی و محدود به آوند آبکشی در جنس *Candidatus* Liberibacter می‌باشند. گونه‌های *Candidatus* Liberibacter asiaticus، *Ca.* L. africanus و *Ca.* L. americanus به ترتیب به عنوان عامل فرم‌های آسیایی، آفریقایی و آمریکایی بیماری HLB شناخته شده‌اند. در طبیعت باکتری عامل بیماری توسط دو گونه پسیل به نام‌های *Diaphorina citri* (ناقل فرم‌های آسیایی و آمریکایی) و *Trioza erytreae* (ناقل فرم آفریقایی) انتقال می‌یابد (Bove 2006).

در ایران، پسیل ناقل فرم آسیایی بیماری، *D. citri*، اولین بار در سال ۱۹۹۷ گزارش شد (Bove *et al.* 2000). در سال‌های اخیر، *D. citri* در باغ‌های مرکبات جنوب ایران در استان‌های سیستان و بلوچستان، هرمزگان، کرمان و فارس انتشار زیادی داشته و خسارت زیادی نیز ایجاد کرده است و علاوه بر این به عنوان ناقل بیماری HLB اهمیت زیادی دارد (Salehi *et al.* 2012).

در ایران، بیماری HLB برای اولین بار در سال ۱۳۸۸ از استان‌های سیستان و بلوچستان و هرمزگان (Faghihi *et al.* 2009) و سپس در سال ۱۳۹۰ از استان کرمان (Mohkami *et al.* 2011) گزارش و در هر دو مطالعه گونه *Ca.* L. asiaticus به عنوان عامل بیماری تعیین شد.

برای انجام مدیریت بهینه بیماری HLB، ردیابی به موقع و سریع بیماری در باغ‌های مرکبات امری اجتناب‌ناپذیر است و عملی بودن آن نیاز به روش‌های حساس و در عین حال سریع و ارزان دارد. روش‌های تشخیص و شناسایی عامل بیماری HLB شامل الکترون میکروسکوپی، روش‌های سرولوژیکی و روش‌های مولکولی مانند هیبریداسیون DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) می‌باشند. روش‌های مولکولی حساس مانند PCR معمول‌ترین روش‌های ردیابی و تشخیص بیماری‌های ناشی از باکتری‌های سخت‌کشت مانند لیبریباکترهای عامل HLB هستند.

دینگ و همکاران (Ding *et al.* 2005). با استفاده از روش‌های پی‌سی‌آر معمولی (یک‌مرحله‌ای) و nested-PCR با آغازگرهای F1/R1 و F2/R2، عامل فرم آسیایی بیماری را در گیاهانی مانند lemon (*Citrus limon*) و wampee (*Clausena lansium*) ردیابی نمودند و نشان دادند که حساسیت nested-PCR به مراتب بیشتر از پی‌سی‌آر معمولی (تا ۱۰۰۰۰ برابر) در ردیابی عامل بیماری است؛ به نحوی که در پی‌سی‌آر معمولی و nested-PCR آستانه تشخیص و ردیابی لیبریباکتر عامل HLB به ترتیب تا ۱۰ پیکوگرم و ۰/۱ فمتوگرم از دی‌ان‌ای الگو بوده است.

در تحقیقی دیگر دینگ و همکاران (Ding *et al.* 2008) حساسیت ردیابی چندین جفت آغازگر مختلف را برای باکتری عامل HLB مقایسه کردند. در پی‌سی‌آر معمولی ترتیب حساسیت آغازگرها از بیشترین به کمترین به

ترتیب F2/R2، F1/R1، A2J5، OI1/OI2c و OI2/r23S1 بودند. در این بررسی آستانه ردیابی توسط آغازگرهای OI1/OI2c و A2/J5 به ترتیب در مقدار ۱ نانوگرم و ۱۰ پیکوگرم از دی‌ان‌ای کل بود. همچنین حساسیت nested-PCR و semi nested-PCR خیلی بالاتر از پی‌سی‌آر معمولی ذکر شد و در کمترین غلظت آزمایش شده یعنی ۰/۱ فمتوگرم در میکرولیتر DNA، قطعه مورد انتظار را تکثیر و عامل بیماری را ردیابی کردند. روش‌های nested-PCR و semi nested-PCR با یکدیگر اختلاف معنی‌داری در ردیابی باکتری عامل بیماری نداشتند.

جگ‌تاپ و همکاران (Jagtap *et al.* 2013) در یک مطالعه نشان دادند که روش پی‌سی‌آر معمولی قادر به ردیابی عامل بیماری HLB تا مقدار ۱۰۰ پیکوگرم دی‌ان‌ای کل از گیاه آلوده بود. همچنین آنها نتیجه گرفتند که حساسیت آغازگرهای مختلف در ردیابی عامل بیماری می‌تواند متفاوت باشد.

چن و همکاران (Chen *et al.* 2006) با استفاده از روش‌های nested-PCR و real-time PCR موفق به ردیابی *Ca.* L. asiaticus در عصاره‌های گیاهی که دارای غلظت پایین باکتری و حاوی مواد بازدارنده PCR بودند شدند.

مطالعات *ونگ و همکاران* (Wang *et al.* 2006) در چین نشان داد که برای ردیابی موثر *Ca.* L. asiaticus در باغ‌ها به‌ویژه در نمونه‌های فاقد علائم، کارآیی پی‌سی‌آر معمولی کمتر بوده و باید از روش‌های حساس‌تری نظیر real- time PCR استفاده کرد.

از جمله روش‌های تکثیر هم‌دمای DNA، که به ویژه در چند سال اخیر کاربرد آن افزایش یافته است روشی به نام تکثیر هم‌دمای وابسته به حلقه (Loop-mediated Isothermal Amplification=LAMP) می‌باشد که اولین بار توسط *نوتومی و همکاران* (Notomi *et al.* 2000) معرفی شد. واکنش LAMP با استفاده از ۴ تا ٦ آغازگر متفاوت - که به طور اختصاصی برای تشخیص ٦ تا ۸ ناحیه مستقل از ژن هدف طراحی می‌شوند - و با کمک یک دی‌ان‌ای‌پلی‌مراز با فعالیت بالای جایگزینی رشته انجام می‌گیرد. در این واکنش از آغازگرهای داخلی FIP (F1c, F2) و BIP (B1c, B2)، آغازگرهای خارجی F3 و B3 و درمواردی برای افزایش سرعت واکنش از آغازگرهای اضافی حلقه، LB(LBP) و LF(LPF)، استفاده می‌شود. فرآیند واکنش در یک دمای ثابت (٦٠-٦٥ درجه سانتی‌گراد) و در مدت بین ۳۰ تا ٦٠ دقیقه صورت می‌گیرد (Notomi *et al.* 2000 ; Ushikubo 2004).

لی و همکاران (Li *et al.* 2006; Li *et al.* 2007) نشان دادند که آزمون TaqMan real-time PCR یک روش سریع، حساس و اختصاصی برای شناسایی و بررسی کمی گونه‌های لیبریباکتر است و ۱۰ تا ۱۰۰ برابر حساس‌تر از روش‌های پی‌سی‌آر معمولی و LAMP برای ردیابی و تشخیص بیماری HLB می‌باشد؛ همچنین نشان دادند که در پی‌سی‌آر معمولی، از نظر حساسیت بین آغازگرهای OI1/OI2c و A2/J5 برای ردیابی *Ca.* L. asiaticus و بین آغازگرهای OA1/OI2c و A2/J5 برای ردیابی *Ca.* L. africanus اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

با توجه به اینکه در سال‌های اخیر بیماری HLB در برخی از استان‌های جنوبی ایران گزارش شده است (Faghihi *et al.* 2009; Mohkami *et al.* 2011) و پتانسیل گسترش به سایر نواحی مرکبات‌خیز کشور را دارد، استفاده از یک روش مناسب برای ردیابی عامل بیماری به‌منظور اعمال مدیریت بهینه بیماری اهمیت زیادی دارد. علاوه بر این، تاکنون تحقیقی در رابطه با مقایسه روش‌های تشخیص و ردیابی باکتری عامل HLB

در ایران صورت نگرفته است. در این تحقیق حساسیت، اختصاصیت و صحت روش‌های مولکولی پی‌سی‌آر معمولی، nested-PCR، real-time PCR و LAMP با استفاده از آغازگرهای مختلف در ردیابی فرم آسیایی عامل بیماری HLB در ایران بررسی و مقایسه شده‌اند.

روش بررسی

روش انجام آزمایش

ابتدا از ۵ نمونه برگی دارای علائم مشخص بیماری مربوط به یک درخت پرتقال آلوده (از استان سیستان و بلوچستان منطقه سرباز) و ۵ نمونه برگی از یک درخت پرتقال سالم در منطقه غیرآلوده به‌طور جداگانه استخراج دی‌ان‌ای کل انجام شد. کمیت و کیفیت نمونه‌های دی‌ان‌ای کل استخراج شده از گیاه آلوده و سالم، با دستگاه نانودراپ مورد سنجش قرار گرفت. یک نمونه DNA از گیاه آلوده و یک نمونه DNA از گیاه سالم که کیفیت بهتری نسبت به سایر نمونه‌ها داشتند انتخاب و سری‌های رقت از هرکدام تهیه شد. سپس به طور جداگانه، از رقت های موجود مقادیر مختلف شامل ۱۰۰ نانوگرم، ۱۰ نانوگرم، ۱ نانوگرم، ۱۰۰ پیکوگرم، ۱۰ پیکوگرم، ۱ پیکوگرم، ۱۰۰ فمتوگرم، ۱۰ فمتوگرم، ۱ فمتوگرم و ۰/۱ فمتوگرم DNA به عنوان قالب برای روش‌های مختلف استفاده شد و آزمایشی با ۱۰ تکرار برای هر رقت انجام شد.

روش‌های استفاده شده شامل پی‌سی‌آر معمولی با چهار جفت آغازگر مختلف، nested-PCR با سه جفت آغازگر مختلف برای دور دوم، real-time PCR با یک جفت آغازگر و LAMP با دو مجموعه آغازگرهای ژن‌های پروتئین ریبوزومی اپرون بتا (*rpl*KAJL-*rpo*B operon) و 16S rDNA بودند. بنابراین، برای هر روش، ۱۰ تکرار از رقت مورد نظر DNA از گیاه آلوده و سالم جداگانه آزمایش شدند؛ در هر آزمایش از آب سترون نیز به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس روش‌ها ازنظر پارامترهای حساسیت (Sensitivity)، اختصاصیت (Specificity) و صحت (Accuracy) مقایسه شدند.

استخراج دی‌ان‌ای کل از گیاه

استخراج دی‌ان‌ای کل با استفاده از روش *هانگ* و *همکاران* (Hung *et al*. 1999) به شرح زیر انجام شد. نیم گرم از رگبرگ‌های اصلی به قطعات کوچک تقسیم و در ۴ میلی‌لیتر بافر استخراج DNA (Tris-HCl, 100mM؛ EDTA, 100mM؛ NaCl, 250mM؛ N-Lauroylsarcosine ،1% (w/v) Proteinase K,100 µg/ml با pH=۸) کاملاً له شد. سوسپانسیون حاصل به لوله‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل و در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ساعت نگهداری و سپس در *g* ۴۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. رونشین جمع و ۰/۱۲۵ حجم از NaCl ۵ مولار و CTAB ۱۰ درصد در ۰/۷ مولار NaCl به آن اضافه گردید. مخلوط در ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه نگهداری شد و سپس دوبار به آن کلروفرم/ایزوآمیل الکل (۲۴ به ۱) اضافه و در ۱۰۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. رونشین جمع و ۰/۶ حجم ایزوپروپانول با دمای ۲۰- °C به آن اضافه و در *g* ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رونشین حذف و رسوب حاصل با الکل ۷۰ درصد شسته و خشک شد. به هر لوله ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون اضافه و به عنوان DNA الگو برای مراحل بعدی آزمایش استفاده شد (Ruangwong *et al*. 2006).

آزمون پی‌سی‌آر معمولی و nested-PCR

جهت ردیابی باکتری *Ca.* L. asiaticus، در نمونه‌های گیاهی از آزمون پی‌سی‌آر معمولی با کاربرد آغازگرهای اختصاصی OI1/OI2c، A2/J5، F1/R1 و RPF1/RPR1 این گونه استفاده شد (جدول ۱). در آزمون nested-PCR از جفت آغازگرهای OI1/OI2c، F1/R1 و RPF1/RPR1 در دور اول و به ترتیب از جفت آغازگرهای CGO3F /CGO5R، F2/R2 و RPF2/RPR2 در دور دوم

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمون‌های پی‌سی‌آر معمولی و nested-PCR.

Table 1. Characteristics of the oligonucleotide primers used in conventional PCR and nested-PCR tests.

نام آغازگر Primer name	ترادف Sequence	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد) Annealing (°C)	اندازه قطعه تکثیر کننده (جفت‌باز) Amplicon size (bp)	ناحیه هدف Target	منبع Reference
OI1	5′-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3′	56	1160	16S rDNA	Jagoueix *et al.* 1996
OI2c	5′-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3′				
CGO3F	5′- RGGGAAAGATTTTATTGGAG-3′	56	800 (nested-PCR)		Zhou *et al*. 2007
CGO5R	5′-GAAAATAYCATCTCTGATATCGT-3′				
A2	5′- TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT-3′	60	700	β-operon	Hocquellet *et al.* 1999
J5	5′- ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3′				
F1	5′-TGAATTCTTCGAGGTTGGTGAGC-3′	53	530	β-operon	Villechanoux *et al*. 1993
R1	5′-AGAATTCGACTTAATCCCCACCT-3′				
F2	5′-GCGTTCATGTAGAAGTTGTG-3′	55	400 (nested-PCR)		
R2	5′-CCTACAGGTGGCTGACTCAT-3′				
RPF1	5′-GCTTAAAGAGCGTGCTACGG-3′	56	1780	β-operon	طراحی شده در این مطالعه Designed in this study
RPR1	5′-CCTAAAAACGAAGCCCCTTT-3′				
RPF2	5′-TGCCTAATTTGAGGGTTGG-3′	56	1090 (nested-PCR)		
RPR2	5′-GAAAGTTCCGCAGCTTCAAT-3′				

استفاده شد (جدول ۱). مقدار مواد لازم برای هر واکنش ۲۵ میکرولیتری پی‌سی‌آر معمولی و nested-PCR شامل Taq buffer ×10: ۲/۵ میکرولیتر، MgCl2 (50mM): ۰/۷۵ میکرولیتر، ۱ میکرولیتر از هرکدام از آغازگرها (۱۰ µM)، ۰/۵ میکرولیتر از dNTPs (10 mM)، ۰/۲۵ میکرولیتر Taq DNA polymerase (۵u/µL)، ۱۸ میکرولیتر آب‌مقطر سترون و مقدار مناسب از DNA الگو (اغلب ۱ تا ۲ میکرولیتر) بود. چرخه‌های گرمایی مورد استفاده در آزمون پی‌سی‌آر معمولی شامل واسرشته‌سازی اولیه ۹۴ درجه ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه ۱ دقیقه، ۵۳ تا ۶۰ درجه ۱ دقیقه و ۷۲ درجه ۲ دقیقه و سپس ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه بود. چرخه دمایی در آزمون

nested-PCR واسرشته سازی اولیه ۹۴ درجه ۳ دقیقه، ۳۵ سیکل شامل ۹۴ درجه ۳۰ ثانیه، ۵۵ تا ۵۶ درجه ۴۰ ثانیه، ۷۲ درجه ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه و سپس ۷۲ درجه ۱۰ دقیقه بود. برای انجام آزمون nested-PCR، محصول به دست آمده از PCR اول به نسبت ۱ به ۱۰ با آب‌مقطر سترون رقیق و از آن به عنوان DNA الگو در آزمون nested-PCR استفاده شد (Chen *et al*. 2006; Das 2004; Deng *et al*. 2007; Ding *et al*. 2005; Jagoeix *et al*. 1996; Villechanoux *et al*. 1993). نام و ترادف نوکلئوتیدی آغازگرها، دمای اتصال و اندازه قطعه‌ای که تکثیر می‌کنند در جدول ۱ آمده است.

ده میکرولیتر از محصول‌های پی‌سی‌آر معمولی و nested-PCR روی ژل آگاروز ۱% برده شد و پس از رنگ‌آمیزی در اتیدیوم بروماید ژل روی دستگاه UV transilluminator مشاهده و با دستگاه عکس‌برداری از ژل از آن عکس گرفته شد. سپس براساس وجود یا عدم وجود باند مورد نظر، تعداد واکنش‌های مثبت و منفی در هر آزمایش ثبت شد.

آزمون real-time PCR

برای انجام real-time PCR از آغازگرهای طراحی شده در این مطالعه براساس قسمتی از توالی ژن پروتئین ریبوزومی اپرون بتا که از گونه *Ca*. L. asiaticus در بانک جهانی ترادف‌ها در دسترس بود استفاده شد. این آغازگرها شامل FRP-RT (5′-ATTGCTTCTTTACCCGATCTTGAG-3′) و RRP-RT (5′-AACTTGAGTCTGTGGCGTACC-3′) بودند. مواد استفاده شده برای هر واکنش ۲۰ میکرولیتری شامل ۱۰ میکرولیتر مستر میکس سایبرگرین (SYBR Green Master Mix, Bioneer, Korea)، ۱ میکرولیتر از هرآغازگر، ۷ میکرولیتر آب دوبار سترون شده و ۱ تا ۲ میکرولیتر DNA الگو بود. این آزمون در دستگاه BIOER line gene K چین انجام شد و براساس منحنی‌های حاصل مبنی بر تکثیر و یا عدم تکثیر قطعه مورد نظر نتایج مثبت و منفی منظور شد. چرخه دمایی استفاده شده شامل ۹۴ درجه ۲ دقیقه و سپس ۴۰ چرخه ۹۴ درجه ۱۰ ثانیه، ۵۸ درجه ۱۵ ثانیه و ۷۲ درجه ۳۰ ثانیه بود.

واکنش LAMP

برای انجام واکنش LAMP از آغازگرهای مربوط به ناحیه 16S rDNA و ژن‌های پروتئین ریبوزومی اپرون بتا استفاده شد. این آغازگرها توسط برنامه Primer Explorer 4 براساس توالی‌های موجود از این نواحی که از گونه *Ca*. L. asiaticus در بانک جهانی ترادف‌ها در دسترس بود در این مطالعه طراحی شدند. لیست آغازگرهای مورد استفاده و ترادف آنها در جدول ۲ آورده شده است.

مواد لازم و میزان آنها نیز برای انجام واکنش LAMP در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: dNTPs به غلظت ۱/۴ میلی مولار، بافر ۱۰X به غلظت ۰/۲ میلی مولار، بتائین به غلظت ۰/۸ مولار، ۸ واحد آنزیم *Bst* DNA polymerase، آغازگرهای FIP و BIP به غلظت ۱/۶ میکرومولار، آغازگرهای F3 و B3 به غلظت ۰/۲ میکرومولار، آب‌مقطر سترون و مقدار مناسب از DNA الگو است. واکنش LAMP با آغازگرهای اپرون *rpl*KAJL-*rpo*B و با آغازگرهای ناحیه 16S rDNA به طور جداگانه برای رقت‌های مختلف DNA انجام و اختصاصیت، حساسیت و صحت آنها با هم و با سایر روش‌ها مقایسه شدند (Okuda *et al*. 2005).

واکنش LAMP در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه انجام شد؛ سپس تیوب‌ها را ۱۰دقیقه در ۸۲

درجه سانتی‌گراد گذاشته و بعد از این مرحله به هر لوله مقدار یک میکرولیتر از سایبرگرین ۱/۰ درصد اضافه و تغییر رنگ لوله‌ها مشاهده شد؛ بدین ترتیب لوله‌هایی که از نظر واکنش LAMP مثبت بودند در نور معمولی به رنگ سبز خیلی کم‌رنگ (گاهی متمایل به زرد) و لوله‌های منفی به رنگ نارنجی مایل به قهوه‌ای مشاهده شدند. زیر نور UV لوله‌های مثبت به رنگ سبز (فلورسنت) مشاهده شدند. نتایج واکنش LAMP براساس تغییر رنگ در لوله‌ها

جدول ۲. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در روش LAMP

Table 2. Characteristics of the primers used in LAMP method

نام آغازگر Primer name	ترادف Sequence	ناحیه Region
rDNA-FIP	5′- ACCGTCATTATCTTCTCCGGCG-TTTT-CATGCCGCGTGAGTGAAG -3′	16S rDNA
rDNA-BIP	5′- AGAAGCCCCGGCTAAACTTCG-TTTT-CGCCCAGTTATTCCGAACAA -3′	
rDNA-F3	5′- AATGGGGGCAACCCTGAT -3′	
rDNA-B3	5- CTTAATCGCCCGCCTACG -3′	
rpl-FIP	5′- ACCAATCTAGTTGCATTAGATTGGA-TTTT-GCAAATTGCTTCTTTACCCG -3′	*rpl*KAJL-*rpo*B operon
rpl-BIP	5′- GTACGCCACAGACTCAAGTTG-TTTT-CGATGAACAGAACTAACCTTG -3′	(β-operon)
rpl-F3	5′- GGGCGTCCTTAATCAAGA -3′	
rpl-B3	5′- GGACATATCACATATTTCCTTTGT -3′	

درنظر گرفته شد؛ با این حال، برخی از محصولات لوله‌های مثبت حاصل از واکنش LAMP با الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد نیز بررسی شد و محصول تکثیر شده در واکنش مثبت LAMP به صورت باندهای متعدد (نردبانی شکل) دیده شد (Notomi *et al*. 2000; Parida *et al*. 2008).

محاسبه حساسیت، اختصاصیت و صحت برآورد فراسنجه‌های قابلیت اتکاء

نمونه‌های برگی جمع‌آوری شده در این بررسی که متعلق به گیاهان آلوده بودند درحقیقت آلوده به عامل HLB بودند یا چنین فرض شدند و نمونه‌های برگی متعلق به گیاهان سالم درحقیقت عاری از عامل HLB بودند یا چنین فرض شدند.

بنابراین، نمونه‌های DNA استخراج شده از گیاه آلوده به HLB به عنوان مثبت حقیقی و DNA استخراج شده از گیاه سالم در منطقه عاری از بیماری به عنوان منفی حقیقی درنظر گرفته یا چنین فرض شدند.

بر اساس این مفروضات، نتایج تجزیه تحلیل‌ها را می توان در یکی از گروه‌های زیر قرار داد:

مثبت واقعی (True positive=TP): روش ردیابی به طور صحیح عامل HLB را در نمونه DNA که به عنوان نمونه مثبت استفاده شد، ردیابی کرد.

منفی واقعی (True negative=TN): روش ردیابی به طور صحیح عامل HLB را در نمونه DNA که به عنوان نمونه منفی استفاده شد، ردیابی نکرد.

مثبت کاذب (False positive=FP): روش ردیابی به طور ناصحیح عامل HLB را در نمونه DNA که به عنوان نمونه منفی استفاده شد، ردیابی کرد.

منفی کاذب (False negative=FN): روش ردیابی به طور ناصحیح عامل HLB را در نمونه DNA که به عنوان نمونه مثبت استفاده شد، ردیابی نکرد.

نتایج حاصل از روش‌های مختلف ردیابی در جداول ۳ و ۴ با محاسبه صحت (Accuracy=AC)، حساسیت (Sensitivity=SE) و اختصاصیت (Specificity=SP) ارزیابی شده اند (Enøe *et al.* 2000).

صحت (Accuracy=AC) فراسنجه‌ای است که توانایی یک روش را در ردیابی صحیح نمونه‌های آلوده به عامل HLB در نمونه‌های مثبت HLB و عدم ردیابی را در نمونه‌های عاری از عامل HLB (نمونه‌های منفی HLB) نشان می‌دهد:

$$Accuracy(AC) = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}$$

حساسیت (Sensitivity=SE) فراسنجه‌ای است که توانایی یک روش در ردیابی صحیح نمونه‌های آلوده به عامل HLB به عنوان نمونه‌های مثبت HLB را اندازه گیری می‌کند:

$$Sensitivity(SE) = \frac{TP}{TP + FN}$$

اختصاصیت (Specificity=SP) نیز فراسنجه ای است که قابلیت اتکاء (reliability) یک روش در ردیابی صحیح نمونه‌های عاری از عامل HLB به عنوان نمونه‌های منفی HLB را داشته باشد:

$$Specificity(SP) = \frac{TN}{TN + FP}$$

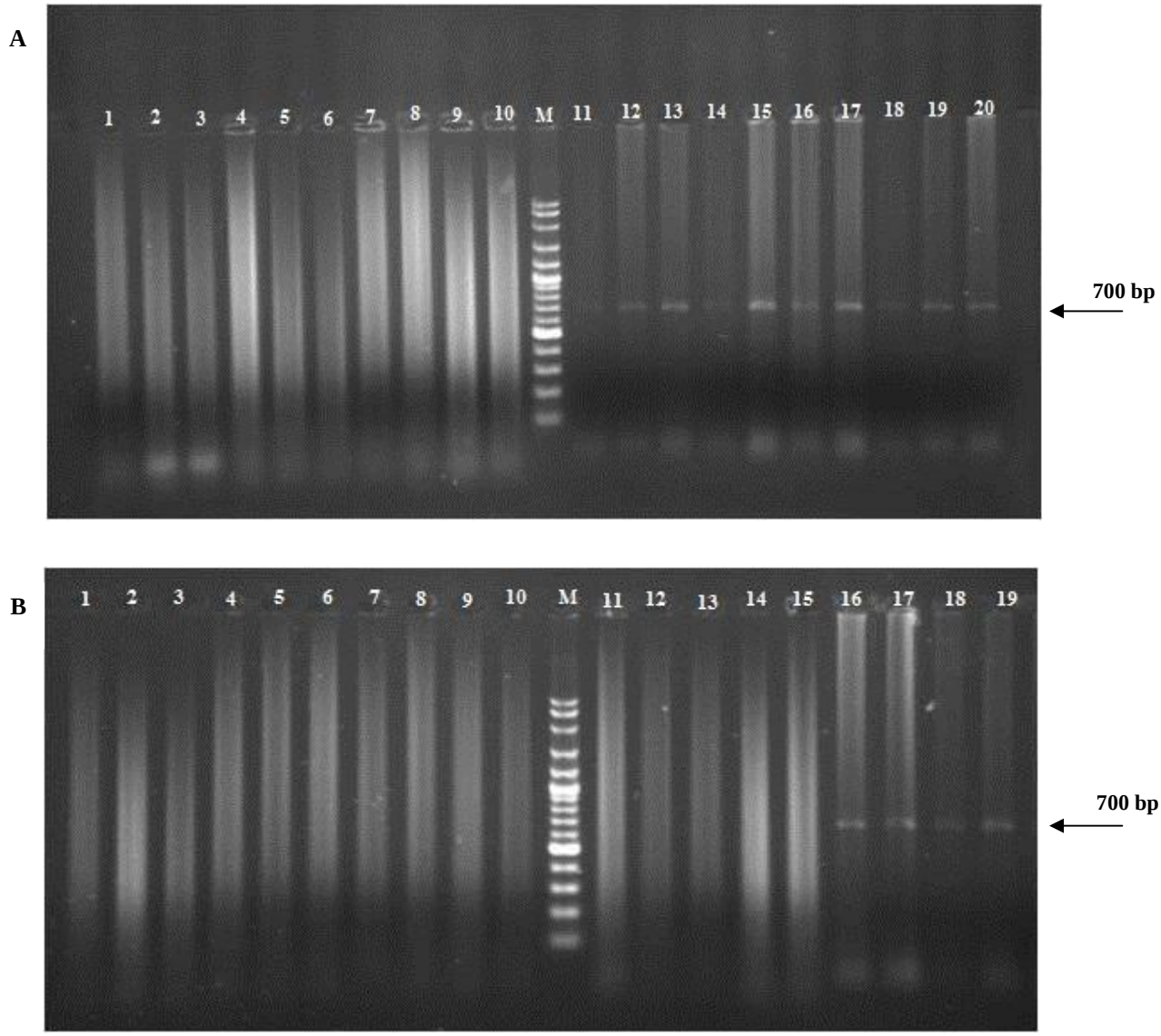
فاصله احتمال ۹۵ درصد بیز (95% Bayesian probability intervals) بر اساس روش بیز، که دانش قبلی درباره فراسنجه ناشناخته وجود ندارد و استنباط در باره تمام نااطمینانی در باره فراسنجه را با احتمال مدل می کند، برای همه فراسنجه‌های صحت، حساسیت و اختصاصیت برآورد شد. فاصله احتمال ۹۵ درصد بیز در واقع فاصله احتمال حقیقی است که مقدار واقعی فراسنجه با احتمال ۹۵ درصد در آن فاصله قرار دارد. فاصله‌های اطمینان ۹۵ درصد برای فراسنجه‌های محاسبه شده براساس داده‌های دودویی (binary) با استفاده از برنامه نوشته شده براساس proc sql به وسیله *زو و همکاران* (Zhu *et al.* 2010) در نرم افزار SAS برآورد شدند.

نتایج

پی‌سی‌آر معمولی

روش پی‌سی‌آر معمولی در مقادیر ۱۰۰، ۱۰ و ۱ نانوگرم از دی‌ان‌ای کل، به‌عنوان الگو، کارآیی خوبی را نشان داد. این روش با استفاده از آغازگرهای مختلف در مقادیر ۱۰۰ و ۱۰ نانوگرم DNA، با حساسیت ۱۰۰ درصد عامل بیماری HLB را ردیابی نمود. در مقدار ۱ نانوگرم DNA، با جفت آغازگر F1/R1 با حساسیت ۹۰ درصد و با جفت آغازگرهای OI1/OI2c، A2/J5 و RPF1/RPR1 با حساسیت ۱۰۰ درصد *Ca.* L. asiaticus را ردیابی نمود (شکل ۱). این روش (با هر کدام از چهار جفت آغازگر) در مقدار ۱۰۰ پیکوگرم DNA، به‌طور میانگین عامل بیماری را در حدود ۳۰ درصد ردیابی نمود (شکل ۱)؛ همچنین در مقدار ۱۰ پیکوگرم DNA با استفاده از جفت آغازگر A2/J5 به میزان ۱۰ درصد قادر به ردیابی عامل

بیماری بود. با وجود این، هنگامی که مقادیر پایین‌تر (۱ پیکوگرم و کمتر) از DNA گیاه آلوده به‌عنوان الگو استفاده شد، نتیجه واکنش‌ها در پی‌سی‌آر معمولی با هر چهار جفت آغازگر منفی بود (جدول ۳ و شکل ۲). مقایسه فاصله اطمینان ۹۵ درصد (جدول ۴) نشان می‌دهد که در روش پی‌سی‌آر معمولی بین مقادیر ۱۰۰، ۱۰ و ۱ نانوگرم DNA با مقادیر کمتر از ۱۰۰ پیکوگرم DNA ازنظر حساسیت در ردیابی *Ca.* L. asiaticus اختلاف معنی‌دار وجود دارد. همان‌طور که در جدول ۴ مشخص است حساسیت، اختصاصیت و صحت روش پی‌سی‌آر معمولی برای هر مقدار مشخص از DNA تقریباً برای هر چهار



شکل ۱. الکتروفورز محصول پی‌سی‌آر معمولی (مستقیم) با آغازگرهای A2/J5. A) مقدار ۱ نانوگرم DNA از درخت آلوده به HLB و همچنین درخت سالم به عنوان الگو استفاده شده‌اند. قطعه ۷۰۰ جفت‌باز در هر ۱۰ نمونه DNA از درخت آلوده تکثیر شد (راهک‌های ۱۱ تا ۲۰) ولی در نمونه‌های درخت سالم این قطعه تکثیر نشد (راهک‌های ۱ تا۱۰). B) مقدار ۱۰۰ پیکوگرم DNA از درخت آلوده و سالم به عنوان الگو به کار رفته‌اند. تنها در ۴ نمونه DNA از درخت آلوده قطعه ۷۰۰ جفت‌باز به دست آمد

(راهک‌های ۱۶ تا ۱۹) و در سایر نمونه‌های DNA از درخت آلوده (راهک‌های ۱۱ تا ۱۵) و نمونه‌های سالم این قطعه تکثیر نشد (راهک‌های ۱ تا ۱۰) . M: مارکر.

Fig. 1. Gel electrophoresis of direct-PCR product obtained by using primer pair A2/J5. A) 1 ng DNA of HLB-infected tree and healthy tree used as template. The 700 bp expected fragment was amplified in all DNA samples of infected (lanes 11-20) but not DNA samples of healthy tree (lanes 1-10). B) 100 pg DNA from infected and healthy tree used as template. The 700 bp fragment was only amplified in 4 DNA samples of infected tree (lanes 16-19) and was not amplified in some DNA templates of infected tree (lanes 11-15) and DNAs of healthy tree (lanes 1-10). Lane M: DNA size marker.

جدول ۳. مقایسه روش‌های مختلف در ردیابی عامل بیماری HLB (*Ca.* L. asiaticus) در مقادیر مختلف دی‌ان‌ای کل (۱۰۰ نانوگرم تا ۰/۱ فمتوگرم) استخراج شده از گیاه آلوده که به صورت درصد واکنش‌های مثبت برای هر روش محاسبه شده است. cPCR-P1، cPCR-P2، cPCR-P3 و cPCR-P4 روش پی‌سی‌آر معمولی به ترتیب با استفاده از آغازگرهای OI1/OI2c، A2/J5، F1/R1 و RPF1/RPR1 می‌باشند؛ nPCR-P1، nPCR-P2 و nPCR-P3 روش nested-PCR به ترتیب با استفاده از آغازگرهای F2/R2، CGO3F/CGO5R و RPF2/RPR2 برای دور دوم می‌باشند؛ LAMP-P1 و LAMP-P2 روش LAMP به ترتیب با استفاده از آغازگرهای مربوط به ناحیه 16S rDNA و اپرون بتا هستند.

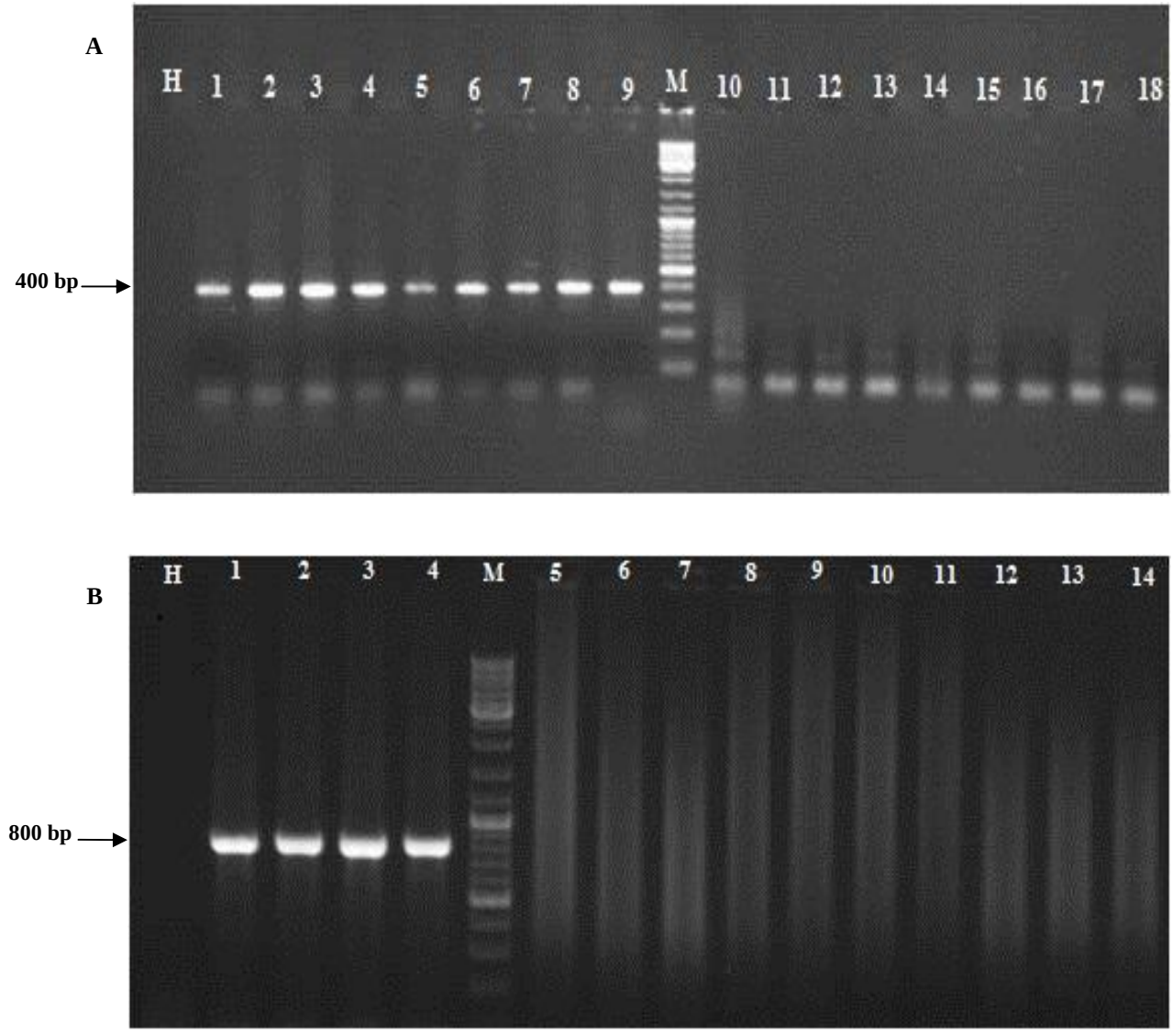
Table 3. Comparison of different methods in detection of the causal agent of HLB disease (*Ca.* L. asiaticus) in various amounts of total DNA (100 ng-0.1 fg) extracted from an infected tree which calculated as positive reaction percent for each method. cPCR-P1, cPCR-P2, cPCR-P3 and cPCR-P4, are conventional PCR using primer pairs OI1/OI2c, A2/J5, F1/R1 and RPF1/RPR1, respectively. nPCR-P1, nPCR-P and nPCR-P3 are nested-PCR using F2/R2, CGO3F/CGO5R and RPF2/RPR2 primers for second round, respectively. LAMP-P1 and LAMP-P2 are LAMP methods using two sets of primers for 16S rDNA and beta-operon regions, respectively.

		METHOD روش									
		P1-cPCR	cPCR-P2	cPCR-P3	cPCR-P4	nPCR-P1	nPCR-P2	nPCR-P3	real-time PCR	LAMP-P1	LAMP-P2
		Positive ratio (%) درصد واکنش‌های مثبت در هر روش									
TREAT تیمار	100 ng	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	10 ng	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	1 ng	100	100	90	100	100	100	100	100	100	100
	100 pg	20	40	30	30	100	100	100	100	40	60
	10 pg	0	10	0	0	100	100	100	100	20	30
	1 pg	0	0	0	0	100	100	100	100	0	0
	100 fg	0	0	0	0	80	90	100	100	0	0
	10 fg	0	0	0	0	80	80	90	100	0	0
	1 fg	0	0	0	0	40	50	50	90	0	0
	0.1 fg	0	0	0	0	30	30	20	90	0	0

جفت آغازگر مشابه است و مقایسه فاصله اطمینان ۹۵ درصد نیز اختلاف معنی‌داری را نشان نمی‌دهد. با وجود این، آستانه ردیابی جفت آغازگر A2/J5 تا ۱۰ پیکوگرم DNA است (ولی با حساسیت ۱۰ درصد) و به‌نظر می‌رسد در پی‌سی‌آر معمولی برای ردیابی *Ca*. L. asiaticus کارآیی بهتری نسبت به سایر آغازگرهای به‌کار رفته در این تحقیق دارد. مزیت دیگر استفاده از جفت آغازگر A2/J5 این است که هر دو فرم آسیایی و آفریقایی بیماری را ردیابی می‌کند و از روی اندازه قطعه تکثیر شده می‌توان عامل فرم آسیایی (۷۰۳ جفت‌باز) و فرم آفریقایی (۶۶۹ جفت‌باز) را از یکدیگر مشخص کرد.

nested-PCR

روش nested-PCR با کاربرد هر سه جفت آغازگر در دور دوم تا میزان ۱ پیکوگرم از دی‌ان‌ای کل، *Ca*. L. asiaticus



شکل ۲. مقایسه حساسیت پی‌سی‌آر مستقیم با nested-PCR در ردیابی عامل بیماری HLB. A) پی‌سی‌آر مستقیم با آغازگر F1/R1 در برابر nested-PCR با استفاده از آغازگرهای F1/R1 (دور اول) و F2/R2 (دور دوم). B) پی‌سی‌آر مستقیم با آغازگر OI1/OI2c در برابر

nested-PCR با استفاده از آغازگرهای OI1/OI2c (دور اول) و CGO3F/CGO5R (دور دوم). در شرایطی که در حدود ۱ و ۱۰ پیکوگرم از دی‌ان‌ای کل از درخت آلوده به عنوان الگو به ترتیب برای هر روش استفاده شد، درآزمون پی‌سی‌آر مستقیم قطعه مورد انتظار با هیچ یک از آغازگرها تکثیر نشد (شکل A راهک‌های ۱۰ تا ۱۸ و شکل B راهک‌های ۵ تا ۱۴) ولی در روش nested-PCR در تمام نمونه‌های DNA قطعات مورد انتظار ۴۰۰ جفت‌باز (شکل A راهک‌های ۱ تا ۹) و ۸۰۰ جفت‌باز (شکل B راهک‌های ۱ تا ۴) به‌ترتیب با آغازگرهای F2/R2 (دور دوم) و CGO3F/CGO5R (دور دوم) تکثیر شد. M: مارکر. H: آب مقطر سترون به عنوان کنترل منفی.

Fig. 2. Comparison of sensitivity of direct-PCR and nested-PCR in detection of the causal agent of HLB disease. A) Direct-PCR using primer pair F1/R1 and nested-PCR with primer pairs F1/R1 (first round) and F2/R2 (second round). B) Direct-PCR using primer pair OI1/OI2c and nested-PCR with primer pairs OI1/OI2c (first round) and CGO3F/CGO5R (second round). Approximately 1 pg and 10 pg of total DNA from an infected tree used as template for each method, respectively. The expected fragments were not amplified in direct-PCR (Fig.2A, lanes 10-18 and Fig.2B lanes 5-14). However, the 400 bp (Fig.2A lanes 1-9) and 800 bp(Fig.2B lanes 1-4) fragments were amplified by primer pairs F2/R2 (second round) and CGO3F/CGO5R (second round), respectively, from each DNA template using nested-PCR. Lane M: DNA size marker; lane H: Sterile distilled water as negative control.

جدول ۴. مقایسه حساسیت، اختصاصیت و صحت روش‌های به‌کار رفته در تیمارهای مختلف DNA الگو (۱۰۰ نانوگرم تا ۰/۱ فمتوگرم)

Table 4. Comparison of sensitivity, specificity and accuracy of different methods at various amounts of DNA template ranging from 100 ng to 0.1 fg.

روش	مقدار DNA کل	حساسیت (Sensitivity)	اختصاصیت (Specificity)	صحت (Accuracy)
Method	amount of total DNA	SEN=TP/(TP+FN)	SP=TN/(TN+FP)	AC=(TP+TN)/(TP+TN+FP+FN)
cPCR-P1	100 ng	1.00 (0.7225-1.0000)a	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
cPCR-P1	10 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
cPCR-P1	1 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
cPCR-P1	100 pg	0.20 (0.0567-0.5098)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.60
cPCR-P1	10 pg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P1	1 pg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P1	100 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P1	10 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P1	1 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P1	0.1 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P2	100 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
cPCR-P2	10 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
cPCR-P2	1 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
cPCR-P2	100 pg	0.40 (0.1682-0.6873)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.70
cPCR-P2	10 pg	0.10 (0.0179-0.4042)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.55
cPCR-P2	1 pg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P2	100 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P2	10 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P2	1 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P2	0.1 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P3	100 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
cPCR-P3	10 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
cPCR-P3	1 ng	0.90 (0.5958-0.9821)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.95
cPCR-P3	100 pg	0.30 (0.1078-0.6032)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.65
cPCR-P3	10 pg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P3	1 pg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P3	100 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P3	10 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P3	1 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P3	0.1 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P4	100 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
cPCR-P4	10 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00

ادامه جدول ۴.

cPCR-P4	1 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
cPCR-P4	100 pg	1.00 (0.1078-0.6032)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.65
cPCR-P4	10 pg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P4	1 pg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P4	100 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P4	10 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P4	1 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
cPCR-P4	0.1 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
nPCR-P1	100 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	0.90 (0.5958-0.9821)	0.95
nPCR-P1	10 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P1	1 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P1	100 pg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P1	10 pg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P1	1 pg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P1	100 fg	0.80 (0.4902-0.9433)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.90
nPCR-P1	10 fg	0.80 (0.4902-0.9433)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.90
nPCR-P1	1 fg	0.40 (0.1682-0.6873)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.70
nPCR-P1	0.1 fg	0.30 (0.1078-0.6032)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.65
nPCR-P2	100 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P2	10 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P2	1 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P2	100 pg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P2	10 pg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P2	1 pg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P2	100 fg	0.90 (0.5958-0.9821)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.95
nPCR-P2	10 fg	0.80 (0.4902-0.9433)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.90
nPCR-P2	1 fg	0.50 (0.2366-0.7634)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.75
nPCR-P2	0.1 fg	0.30 (0.1078-0.6032)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.65
nPCR-P3	100 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P3	10 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P3	1 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P3	100 pg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P3	10 pg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P3	1 pg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P3	100 fg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
nPCR-P3	10 fg	0.90 (0.5958-0.9821)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.95
nPCR-P3	1 fg	0.50 (0.2366-0.7634)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.75
nPCR-P3	0.1 fg	0.20 (0.0567-0.5098)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.60

ادامه جدول ۴.

RT-PCR	100 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	0.80 (0.4902-0.9433)	0.90
RT-PCR	10 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	0.70 (0.3968-0.8922)	0.85
RT-PCR	1 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
RT-PCR	100 pg	1.00 (0.7225-1.0000)	0.80 (0.4902-0.9433)	0.90
RT-PCR	10 pg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
RT-PCR	1 pg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
RT-PCR	100 fg	1.00 (0.7225-1.0000)	0.90 (0.5958-0.9821)	0.95
RT-PCR	10 fg	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
RT-PCR	1 fg	0.90 (0.5958-0.9821)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.95
RT-PCR	0.1 fg	0.90 (0.5958-0.9821)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.95
LAMP-P1	100 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
LAMP-P1	10 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
LAMP-P1	1 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
LAMP-P1	100 pg	0.40 (0.1682-0.6873)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.70
LAMP-P1	10 pg	0.20 (0.0567-0.5098)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.60
LAMP-P1	1 pg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
LAMP-P1	100 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
LAMP-P1	10 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
LAMP-P1	1 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
LAMP-P1	0.1 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
LAMP-P2	100 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
LAMP-P2	10 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	0.90 (0.5958-0.9821)	0.95
LAMP-P2	1 ng	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00 (0.7225-1.0000)	1.00
LAMP-P2	100 pg	0.60 (0.3127-0.8318)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.80
LAMP-P2	10 pg	0.30 (0.1078-0.6032)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.65
LAMP-P2	1 pg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
LAMP-P2	100 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
LAMP-P2	10 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
LAMP-P2	1 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50
LAMP-P2	0.1 fg	0.00 (0.0000-0.2775)	1.00 (0.7225-1.0000)	0.50

a: فاصله اطمینان ۹۵ درصد

a: 95% confidence interval

را با حساسیت ۱۰۰ درصد ردیابی کرد و در کمترین مقدار DNA کل یعنی ۰/۱ فمتوگرم نیز با حساسیت کمتری (۲۰ تا ۳۰ درصد) *Ca*. L. asiaticus را ردیابی نمود (جدول ۱). بنابراین، آغازگرهای به کار رفته در این روش، در مقادیر مشخص DNA (۱۰۰ نانوگرم تا ۱ پیکوگرم) از نظر حساسیت اختلافی نداشتند و تنها در مقادیر پایین‌تر DNA یعنی از ۱۰۰ تا ۰/۱ فمتوگرم اختلاف بسیار کمی در حساسیت در هر مقدار مشاهده شد؛ مقایسه فاصله اطمینان ۹۵ درصد نشان می‌دهد که این اختلاف معنی‌دار نیست (جدول ۴). در موارد بسیار اندکی نتایج مثبت کاذب

در بررسی نمونه‌های سالم مشاهده شد. از نظر اختصاصیت تنها در یک مورد در مقدار ۱۰۰ نانوگرم از DNA گیاه سالم با آغازگر F2/R2 نتیجه مثبت کاذب مشاهده شد که درنتیجه اختصاصیت و صحت را اندکی در این مقدار DNA نسبت به آغازگرهای دیگر کاهش داد؛ هرچند اختلاف در حساسیت و اختصاصیت این آغازگر با آغازگرهای دیگر استفاده شده در این روش در یک میزان مشخص از DNA معنی دار نبود (جدول ۴).

تفاوت در حساسیت nested-PCR در مقایسه با پی‌سی‌آر معمولی در ردیابی *Ca*. L. asiaticus به‌وضوح مشاهده شد. به‌عنوان مثال در تیمار ۱ پیکوگرم از دی‌ان‌ای کل از گیاه آلوده در پی‌سی‌آر معمولی با کاربرد آغازگرهای F1/R1 قطعه مورد نظر تکثیر نشد (منفی کاذب) ولی هنگامی که از روش nested-PCR با آغازگرهای F2/R2 در دور دوم استفاده شد در تمام تکرارها قطعه ۴۰۰ جفت‌باز تکثیر شد و ردیابی *Ca*. L. asiaticus مثبت بود (شکل ۲، A). همچنین مقایسه پی‌سی‌آر معمولی با جفت آغازگر OI1/OI2c در برابر nested-PCR با استفاده از جفت آغازگر CGO3F/CGO5R در دور دوم در ردیابی *Ca*. L. asiaticus در شرایطی که حدود ۱۰ پیکوگرم از دی‌ان‌ای کل از گیاه آلوده به عنوان الگو برای هر روش به کار رفت نشان داد که تنها در nested-PCR قطعه مورد انتظار ۸۰۰ جفت‌باز تکثیر شد و در پی‌سی‌آر معمولی قطعه مورد نظر تکثیر نگردید (شکل ۲، B).

روش LAMP

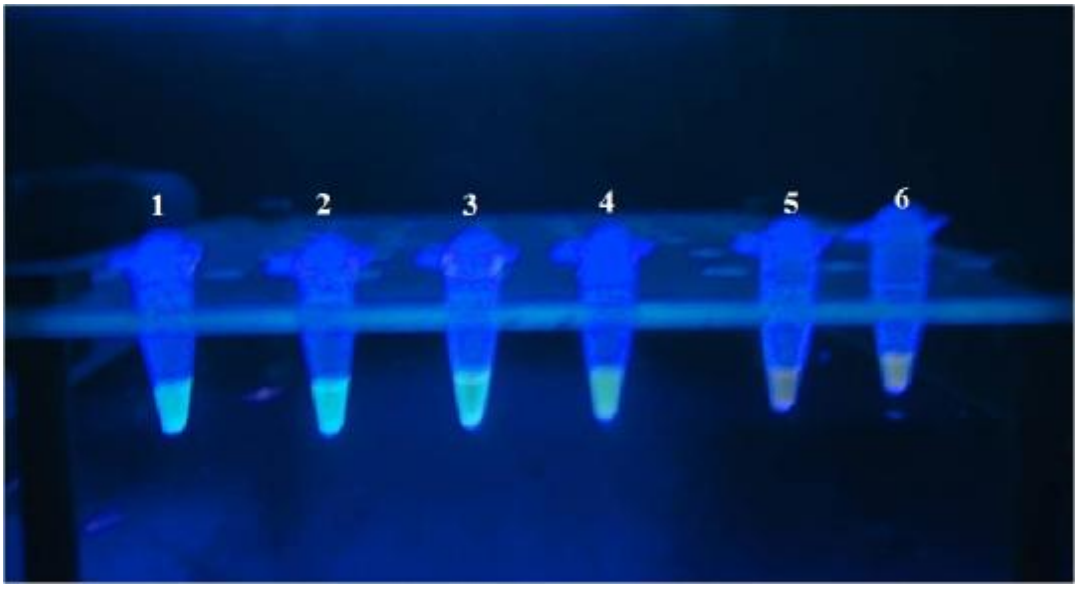
روش LAMP با کاربرد آغازگرهای اپرون بتا و 16S rDNA تا میزان ۱۰ پیکوگرم از DNA کل، *Ca*. L. asiaticus را به ترتیب با حساسیت ۲۰ و ۳۰ درصد ردیابی نمودند ولی در مقادیر پایین‌تر (۱ پیکوگرم و کمتر) قادر به ردیابی *Ca*. L. asiaticus نبودند (شکل ۳). جدول ۳ نشان می‌دهد که حساسیت روش LAMP با استفاده از دو مجموعه آغازگر تقریباً یکسان بوده و تنها در مقادیر ۱۰۰ و ۱۰ پیکوگرم DNA گیاه آلوده، اندکی حساسیت روش LAMP با آغازگرهای اپرون بتا بیشتر است. هرچند فاصله اطمینان ۹۵ درصد نشان می‌دهد که این اختلاف معنی‌دار نیست (جدول ۴). در رابطه با روش LAMP با کاربرد آغازگرهای 16S rDNA در یک مورد در مقدار ۱۰ نانوگرم DNA از گیاه سالم نتیجه مثبت کاذب مشاهده شد و در نتیجه اندکی اختصاصیت و صحت آن را کاهش داد (جدول ۴).

real-time PCR

روش real-time PCR با توانایی بالا در ردیابی عامل بیماری در مقادیر بسیار اندک DNA (۰/۱ فمتوگرم) به عنوان حساس‌ترین روش برای تشخیص و ردیابی *Ca*. L. asiaticus می‌باشد. این روش تا مقدار ۱۰ فمتوگرم DNA، عامل بیماری را با حساسیت ۱۰۰ درصد و در مقادیر ۱ و ۰/۱ فمتوگرم DNA، عامل بیماری را با حساسیت ۹۰ درصد ردیابی نمود و بیشترین حساسیت را نشان داد (جدول ۳)؛ با وجود این، بروز نتایج مثبت کاذب در برخی نمونه‌ها از مشکلات این روش بود.

بحث

مقایسه چهار روش پی‌سی‌آر معمولی، nested-PCR، real-time PCR و LAMP با آغازگرهای مختلف در ردیابی عامل بیماری HLB در ایران (*Ca*. L. asiaticus) در مقادیر مختلف DNA (۱۰۰ نانوگرم تا ۰/۱ فمتوگرم)



شکل ۳. نتیجه واکنش LAMP (آغازگرهای اوپرون بتا) در مقادیر مختلف دی‌ان‌ای کل استخراج شده از درخت آلوده به HLB؛ در لوله‌های ۱ تا ۶ به ترتیب مقادیر ۱۰۰ ، ۱۰ ، ۱ نانوگرم ۱۰۰ ، ۱۰ و ۱ پیکوگرم از دی‌ان‌ای کل به عنوان الگو استفاده شده است. در لوله‌های ۱ تا ۴ که با تابش نور UV به رنگ سبز فلورسنت مشاهده می‌شوند نتیجه مثبت و در لوله‌های ۵ و ۶ که به رنگ نارنجی مایل به قهوه‌ای می‌باشند نتیجه منفی است.

Fig. 3. Result of LAMP reaction (beta operon primers) using different amounts of DNA extracted from an infected tree. LAMP reaction was carried out in tubes 1-6 using 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg and 1 pg DNA as template, respectively. After addition of SYBR green I dye to each reaction tube under UV light, tubes from 1 to 4 showed green fluorescence (positive) while tubes 5 and 6 that remained orange/brown were assumed to be negative.

استخراج شده از نمونه‌های برگ آلوده و سالم در ۱۰ تکرار برای هر مقدار DNA انجام شد. در مجموع چهار روش مذکور کارآیی کم و بیش متفاوتی را در ردیابی *Ca*. L. asiaticus نشان دادند. کلیه روش‌ها در مقادیر ۱۰۰، ۱۰ و ۱ نانوگرم از دی‌ان‌ای کل کارآیی مطلوبی را نشان دادند و تقریباً همه روش‌ها با آغازگرهای مربوطه، در این سه مقدار DNA با حساسیت ۱۰۰ درصد عامل بیماری را ردیابی کردند. تنها پی‌سی‌آر معمولی با جفت آغازگر F1/R1 در مقدار ۱ نانوگرم DNA با حساسیت ۹۰ درصد عامل بیماری را ردیابی نمود.

مقایسه فاصله اطمینان ۹۵ درصد نشان می‌دهد که آغازگرهای به‌کار رفته در هر روش در میزان مشخصی از DNA از نظر حساسیت در ردیابی *Ca*. L. asiaticus اختلاف معنی‌دار با یکدیگر ندارند؛ به‌عنوان مثال در روش LAMP با مقدار ۱۰ نانوگرم DNA دومجموعه آغازگر استفاده شده اختلاف معنی‌داری در ردیابی عامل بیماری نشان ندادند (جدول ۴).

روش‌های PCR معمولی و LAMP در هرمقدار مشخص از DNA ازنظر حساسیت در ردیابی *Ca*. L. asiaticus اختلاف معنی‌داری را نشان ندادند. در صورتی که این دو روش از نظر حساسیت با روش‌های nested-PCR و real-time PCR در مقادیر ۱۰۰ پیکوگرم تا ۱۰ فمتوگرم DNA اختلاف معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد نشان دادند و حساسیت کمتری داشتند.

روش nested-PCR با وجود حساسیت بسیار بالایی که نشان داد نیاز به مراقبت کافی فرد جهت جلوگیری از

آلودگی‌ها دارد و در برخی مواقع نتایج مثبت کاذب در نمونه‌های سالم نیز مشاهده می‌شود. همچنین، انجام این روش نسبت به پی‌سی‌آر معمولی و LAMP نیازمند به زمان و صرف مواد مصرفی بیشتری است؛ با این حال در بسیاری از شرایط به‌خصوص درمورد بیماری HLB که ممکن است غلظت عامل بیماری در درختان مرکبات پایین باشد و انتشار باکتری در درخت به صورت غیریکنواخت می‌باشد اهمیت بسیاری دارد و به‌ویژه برای ردیابی عامل بیماری در مورد مناطقی که بیماری بتازگی در آنجا وارد شده مهم‌تر است و تعداد منفی‌های کاذب را کاهش می‌دهد (شکل ۲).

تحقیق حاضر نشان می‌دهد که روش LAMP با آغازگرهای به کار رفته در مقادیر ۱۰۰ و ۱۰ پیکوگرم DNA اندکی حساس‌تر از PCR معمولی است ولی نسبت به nested-PCR از حساسیت کمتری در ردیابی عامل بیماری هوانگ‌لونگ‌بینگ مرکبات برخوردار است.

به طور کلی طراحی مناسب و کارآمد آغازگرها از مشکلات روش LAMP است؛ انتخاب توالی هدف و توالی نوکلئوتیدی متفاوت به کاربرده شده می‌تواند در حساسیت این روش تأثیرگذار باشد (Zhang *et al.* 2001). با وجود این، ویژگی مهم LAMP تکثیر نوکلئیک‌اسید در شرایط هم‌دما است که با کاربرد تجهیزات مقرون به صرفه و ساده و بدون نیاز به ترموسایکلر صورت می‌گیرد و درمقایسه با پی‌سی‌آر معمولی و nested-PCR ارزان‌تر و سریع‌تر است. با توجه به اینکه روش PCR نیاز به دستگاه ترموسایکلر و ابزارهای گران قیمت دارد می‌توان روش LAMP را به‌ویژه در کلینیک‌های شخصی، در مناطق محروم و در مکان‌هایی که مجهز به دستگاه‌های مذکور نیستند و مراکز تحقیقاتی برای تشخیص بیماری HLB توسعه داد و آغازگرهایی را با حساسیت بیشتر نیز طراحی نمود (Notomi *et al.* 2000).

لی و همکاران (Li *et al.* 2007) نشان دادند که روش LAMP از نظر حساسیت شبیه به آزمون‌های پی‌سی‌آر معمولی است ولی در برابر آلودگی‌ها آسیب‌پذیرتر است؛ به همین دلیل نیاز به دقت زیادی در حین انجام آزمایش دارد.

نتایج به دست آمده نشان داد که روش پی‌سی‌آر معمولی دارای اختصاصیت بالایی است و احتمال ایجاد پاسخ مثبت کاذب در این روش نسبت به روش‌های nested-PCR و LAMP کمتر است. یک مورد نتیجه مثبت کاذب در روش LAMP ممکن است به دلیل آلودگی واکنش‌ها هنگامی که آنزیم *Bst* polymerase به هر لوله اضافه شده است باشد.

آستانه جمعیت باکتری عامل بیماری برای ایجاد علائم معمولاً بالا بوده و درنتیجه ردیابی درختان آلوده ولی فاقد علائم در مراحل اولیه بیماری مشکل است و با روش پی‌سی‌آر معمولی امکان‌پذیر نمی‌باشد و نیاز به روش‌های خیلی حساس مانند real time PCR دارد. *لی و همکاران* (Li *et al.* 2006; Li *et al.* 2007) نشان دادند که آزمون TaqMan real-time PCR یک روش سریع، حساس و اختصاصی برای شناسایی و بررسی کمی گونه‌های لیبریباکتر است و می تواند در کنترل و مدیریت بیماری HLB برای ردیابی سریع و زودهنگام بیماری کمک فراوانی نماید. همچنین آنها در مطالعه‌ای دیگر نشان دادند که روش TaqMan real-time PCR ۱۰ تا ۱۰۰ برابر حساس‌تر از روش‌های معمول PCR و LAMP برای ردیابی و تشخیص بیماری HLB می‌باشد و به خصوص قبل از بروز علائم بیماری روش مناسب و

ارزشمندی برای تشخیص عامل بیماری است (Li *et al.* 2006; Li *et al.* 2007).

مطالعات *ونگ و همکاران* (Wang *et al.* 2006) در چین نشان داد که حساسیت روش پی‌سی‌آر معمولی کمتر از real-time PCR برای ردیابی *Ca.* L. asiaticus است. همچنین سرعت، اختصاصیت و حساسیت روش real-time PCR بالاتر از پی‌سی‌آر معمولی است؛ درنتیجه، برای ردیابی موثر عامل بیماری در باغ ها به ویژه در نمونه های فاقد علائم، کارآیی پی‌سی‌آر معمولی کمتر بوده و باید از روش‌های حساس‌تری مانند real-time PCR استفاده کرد.

مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در روش real-time PCR در تمام مقادیر DNA ازنظر حساسیت اختلاف معنی‌دار وجود ندارد که نشان‌دهنده کارآیی خوب این روش در ردیابی عامل بیماری حتی در مقادیر پایین DNA است. با وجود این، به‌دلیل بروز نتایج مثبت کاذب در برخی از مقادیر DNA مانند ۱۰۰ و۱۰ نانوگرم صحت این روش در مقادیر بالاتر DNA از سایر روش‌ها کمتر می‌باشد درحالی‌که در مقادیر بسیار اندک DNA از ۱۰ تا ۰/۱ فمتوگرم حساسیت و صحت این روش نسبت به سایر روش‌ها بیشتر است. به‌طور کلی صحت روش‌های real-time PCR و nested-PCR در مقادیر ۱۰۰ پیکوگرم تا ۰/۱ فمتوگرم از روش‌های پی‌سی‌آر معمولی و LAMP بیشتر است و در نتیجه نتایج این دو روش در این مقادیر DNA به واقعیت نزدیک‌تر است.

روش استخراج DNA و غلظت اولیه باکتری در برگ‌های دارای علائم بیماری می‌توانند در جزئیات نتایج به دست آمده (واکنش‌های مثبت و منفی) تغییراتی را ایجاد کنند، هر چند به نظر می‌رسد نتیجه کلی مقایسه روش‌ها تغییر چندانی نکند.

با توجه به اینکه به‌نظر می‌رسد در برخی از باغ‌های مرکبات جنوب کشور بیماری HLB به‌صورت نهفته وجود داشته باشد و همچنین با توجه به دوره کمون طولانی، بیماری ممکن است با نهال‌های آلوده و بدون علائم ظاهری به مناطق غیرآلوده منتقل شود؛ از آنجایی که غلظت عامل بیماری در درون درختان آلوده اغلب پایین یا انتشار آن به‌صورت نامنظم و غیریکسان است ردیابی عامل بیماری مشکل می‌باشد. بنابراین، به منظور اعمال قرنطینه صحیح داخلی در کشور و گواهی نهال‌های مرکبات و ردیابی *Ca.* L. asiaticus در درختان آلوده و در بدن پسیل ناقل بیماری به‌ویژه در مناطقی که بیماری بتازگی وارد شده یا خطر آلودگی وجود دارد استفاده از روش‌های حساس real-time PCR و nested-PCR (با رعایت دقت کامل در انجام آزمایش) بسیار حائز اهمیت است و انجام آن در کنار سایر روش‌های ردیابی اجتناب‌ناپذیر است و توصیه می‌گردد. در بسیاری از شرایط استفاده از روش nested-PCR با توجه به کمتر بودن نتایج مثبت کاذب و ارزان‌تر بودن نسبت به روش real-time PCR می‌تواند انتخاب مناسب‌تری برای ردیابی بیماری HLB باشد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (125-123) متن انگلیسی مراجعه شود.