

دستور العمل فنی

دستور العمل تشخیص بیماری باکتری *Burkholderia gladioli*،

عامل پوسیدگی بنہ و اندام هوایی زعفران به روش الایزا



نویسندگان

محمد رضا صفر نژاد

سعید سهیلی وند

سید الشہید محمد
ابوالفتح محمد



نوع نشریه: دستورالعمل فنی

نام نشریه: دستورالعمل تشخیص بیماری باکتری *Burkholderia gladioli* عامل پوسیدگی بنه و اندام هوایی زعفران به روش الایزا

نویسندگان: محمدرضا صفرنژاد، سعید سهیلی وند

ویراستار علمی:

ویراستاران ادبی:

تهیه شده در: سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور و پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی
شمارگان:

نوبت انتشار: اول

سال انتشار:

مسئولیت صحت مطالب با نویسندگان است



شماره ثبت در مرکز اطلاعات و مدرک علمی کشاورزی 67569 به تاریخ 1404/04/11 است



دستورالعمل تشخیص بیماری باکتری *Burkholderia gladioli*، عامل پوسیدگی بنه و اندام هوایی زعفران به روش الایزا

نویسندگان

محمدرضا صفرنژاد

سعید سهیلی وند

فهرست مطالب

5	 مقدمه
7	 اهمیت بیماری پوسیدگی باکتریایی زعفران
7	 گیاهشناسی و مشخصات زعفران
8	 مشخصات بیماری پوسیدگی بنه زعفران
9	 آنتی‌بادی‌ها و ساخت کیت الایزای تشخیص بیماری پوسیدگی باکتریایی Bgg زعفران
10	 موارد استفاده از کیت
11	 اساس آزمون الایزا (ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)
12	 دستورالعمل کیت الایزای تشخیص باکتری <i>Burkholderia gladioli</i>
13	 اجزای و متعلقات کیت الایزا و وسایل و مواد مورد نیاز
13	 شرایط نگهداری اجزای کیت و محلول‌ها
14	 وسایل، مواد و ابزارهای کمکی مورد نیاز
14	 مشخصات محلول‌ها و بافرها
14	 تفسیر نتایج آزمایش
15	 توصیه‌های مهم
16	 منابع

مقدمه

بیماری پوسیدگی باکتریایی زعفران (*Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (Bgg) به عنوان تهدیدی جدی برای مزارع زعفران به خصوص در زمان‌های احداث مزارع جدید و همچنین در سیستم‌های ایروپونیک و هیدروپونیک به شمار می‌آید. این بیماری به تمام اندام‌های هوایی و زمینی گیاه حمله کرده و بیشترین گسترش و خسارت را در فصل‌های مرطوب سال باعث می‌شود. علائم ظاهری آن شبیه به سوختگی روی بنه و برگ‌ها و ساقه‌های گیاه زعفران می‌باشد. بنابراین تشخیص مزرعه‌ای این بیماری، به دلیل مشابهت علائم ظاهری آن با علائم ناشی از کمبود عناصر غذایی مشکل بوده و در بسیاری موارد قابل تشخیص نیست. بنابراین وجود روشی مطمئن برای تشخیص زودهنگام این بیماری و جلوگیری از سرایت آن به دیگر کروم‌های زعفران، یک نیاز اساسی در تولید پایدار محصول زعفران است. با توجه به این نیاز و بر پایه همکاری علمی مشترک بین موسسه گیاه‌پزشکی کشور و پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، کیت الایزا برای تشخیص دقیق این بیماری، طراحی و ارائه شده است. مبنای این کیت بر آنتی‌بادی اختصاصی برای شناسایی و ردیابی عامل بیماری باکتریایی پوسیدگی بنه زعفران استوار است که قادر است بنه‌های آلوده زعفران را با دقتی بالا شناسایی و غربال کند. دستورالعمل حاضر، علاوه بر معرفی بیماری، روش کار با کیت را در قالب پروتکل‌های ارائه شده توضیح می‌دهد.

گیاه زعفران سالیان زیادی به عنوان یک محصول فرعی در خاک‌های فقیر و در شرایط اقلیمی ناسازگار تلقی می‌شده است و از نقطه نظر علمی کمتر مورد توجه قرار گرفته است. با این حال افزایش توجه به خواص زعفران و کشف یا تأیید ویژگی‌های مطلوب زعفران خصوصاً خاصیت ضد سرطان، ضد افسردگی و ضدآلایمری آن موجب افزایش توجه دانشمندان به این گونه گیاهی و تلاش روزافزون در جهت بهبود کیفیت و کمیت تولید آن شده است. این نکته نیز حائز اهمیت است که گیاه زعفران به عنوان یکی از مهمترین محصولات کشاورزی و گران‌بهارترین ادویه جهان، جایگاه ویژه‌ای در بین محصولات صنعتی و صادراتی ایران دارد. کاربردهای متعدد و فراوان زعفران، خواص دارویی و مصرف متنوع غذایی آن توجه ویژه به مسائل تولید، بازار و صادرات زعفران را بیش از پیش روشن می‌سازد. بنابراین محصول زعفران به عنوان یکی از با ارزش‌ترین محصولات تجاری در جهان محسوب می‌شود و با توجه به ارزش تجاری زعفران، تجارت داخلی و خارجی زعفران در ایران همچون بسیاری از کشورهای جهان همواره دارای رونق و گسترش قابل توجه بوده است (علی‌پور و همکاران، 1403). مهمترین قسمت مورد استفاده از نظر تجاری، کلاله سه شاخه‌ای و قرمز رنگ گل می‌باشد که پس از خشک شدن به مصارف گوناگون می‌رسد. کلاله گل به عنوان یک رنگ و طعم‌دهنده طبیعی جایگاه ویژه‌ای در صنایع دارویی، آرایشی و بهداشتی و غذایی دارد. در واقع زعفران به عنوان یک گیاه داروئی و چاشنی گران‌بها در جهان شناخته شده است (خضری و همکاران، 1403).

در حال حاضر ایران بزرگترین تولید کننده و صادر کننده زعفران در جهان می‌باشد. مقدار تولید زعفران در کشور در سال 1400 حدود 277 تن و سطح زیر کشت بارور آن بیش از 101 هزار هکتار بوده است.

بیشترین سطح مربوط به استان‌های خراسان رضوی با حدود 76 هزار هکتار و خراسان جنوبی با حدود 15 هزار هکتار است. استان‌های بعدی بر اساس میزان تولید به ترتیب خراسان شمالی، اصفهان، کرمان، یزد و فارس عنوان شده‌اند (Anonymous, 2022). البته کشت و تولید این محصول در مناطق دیگر از جمله استان‌های اصفهان، فارس، آذربایجان شرقی و غربی مطلوب گزارش شده است. با صادرات 200 تن از این محصول می‌توان درآمد 500 میلیون دلاری برای کشور به ارمغان آورد. این امید وجود دارد که با بهبود و توسعه صنایع تبدیلی و تکمیلی زعفران، درآمد حاصله تا سه برابر افزایش یابد. زعفران یکی از اقلام مهم صادرات غیرنفتی کشور بوده (شرایعی و آذر پژوه، 1382) و بر اساس آمارهای گمرک جمهوری اسلامی ایران، حدود 220 تن زعفران از ایران به سراسر دنیا صادر شده است که این رقم تقریباً معادل 53 درصد از کل مقدار زعفران تولید شده در همان سال است. با توجه به این ارقام مشخص می‌شود که اهمیت تجارت زعفران هم در داخل و هم خارج کشور تقریباً به یک اندازه است (علی‌پور و همکاران، 1403).

زعفران نیز مانند سایر گیاهان در معرض حمله آفات و بیماری‌های گیاهی می‌باشد. اما متأسفانه با وجود تحقیقات و مطالعات فراوان انجام شده بر روی جنبه‌های مختلف بیولوژیکی، اکولوژی و ژنتیک زعفران، مطالعه دقیق و جامعی بر روی عوامل بیماری‌زای زعفران خصوصاً ویروس‌های آلوده کننده این گیاه در سطح دنیا انجام نشده است. با این حال، در دهه‌های اخیر تحقیقاتی در زمینه عوامل بیماری‌زای آن صورت گرفته است. از پاتوژن‌های قارچی جدا شده از گیاه زعفران در تحقیقات مختلف می‌توان به *Penicillium cyclopium*، *Fusarium oxysporum f.sp.*، *Penicillium corymbiferom*، *Macrophomina phaseolina*، *Sclerotium rolfsii* و *gladioli* (Francesconi, 1973; Carta et al., 1982; Cappelli et al., 1991; Di Primo, 2000; Kalha et al., 2007) اشاره کرد. در ایران نیز برای اولین بار کریمی شهری (1372) میکروفلور زعفران را مورد بررسی قرار داد و گونه‌های مختلفی از جنس‌های *Alternaria*، *Penicillium*، *Phoma*، *Fusarium*، *Embelisia*، *Cladosporium*، *Botrytis*، *Aspergillus* و *Ulocladium* را گزارش نمود. نتایج نشان داد که اکثر قارچ‌های جدا شده از زعفران به صورت ساپروفیت در سطح گیاه به سر می‌برند و در بررسی بیماری‌زایی تنها *Botrytis* به صورت خفیف روی برگ‌های زعفران علائم زردی ایجاد نمود.

علاوه بر قارچ‌ها، ویروس‌های گیاهی یکی دیگر از بیمارگرهای مهم محسوب می‌شوند. در بررسی‌های مربوط به آلودگی‌های ویروسی در زعفران، در سال 2005 علائم کوتولگی، زردی، نکروز و شکستگی رنگ گلبرگ در *Crocus spp.* (کولتیوارهای *Flavus*، *Pick-wick*، *Remembrance* و *Grand Maitre*) گزارش و نتایج حاصل از بررسی‌های ملکولی و آنالیز توالی نوکلئوتیدی حاصل، *Bean yellow mosaic virus* (BYMV)، *Narcissus mosaic virus* (NMV)، *Turnip mosaic virus* (TuMV)، *Iris severe mosaic virus* (ISMV)، *Tobacco rattle virus* (TRV) و *Tobacco necrosis* (TNV) را در این کولتیوارها ردیابی نمود (Miglino et al., 2005).

اهمیت بیماری پوسیدگی باکتریایی زعفران

از محدودیت‌های مهم در تولید زعفران در سراسر دنیا، بیماری‌های ناشی از باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشد. در این بین بیماری پوسیدگی باکتریایی زعفران (*Burkholderia gladioli* pv. *gladioli* (Bgg) به عنوان تهدیدی جدی برای مزارع زعفران (به خصوص در سیستم‌های ایروپونیک و هیدروپونیک) به شمار می‌آید. این بیماری به تمام اندام‌های هوایی و زمینی گیاه حمله کرده و به خصوص در فصل‌های مرطوب سال گسترش بیشتری دارد و علائمی شبیه به سوختگی روی بنه و برگ‌ها و ساقه‌های گیاه زعفران به وجود می‌آورد. تشخیص مزرعه‌ای این بیماری به دلیل مشابهت علائم بیماری با علائم ناشی از کمبود عناصر غذایی مشکل است. در حال حاضر هیچ راهکار مناسبی جز راهکارهای قرنطینه‌ای شناخته نشده است و این موضوع زمانی که این بیماری وارد یک منطقه‌ی عاری از این باکتری می‌شود، وضع بحرانی‌تری را ایجاد می‌کند. بنابراین در مناطق عاری از این بیماری، شناسایی سریع و جمع‌آوری محصولات آلوده و قرنطینه از روش‌های کنترلی محسوب می‌شوند. با در نظر گرفتن انتشار سریع این بیماری، یک روش تشخیصی مستقیم، دقیق، کم هزینه و با حساسیت بالا برای شناسایی سریع نمونه‌های گیاهی آلوده و ممانعت از انتقال گیاهان آلوده ضرورت دارد. از روش‌های مولکولی مانند PCR (Polymerase Chain Reaction)، هیبریداسیون DNA و روش میکروسکوپ الکترونی برای شناسایی بیماری‌های باکتریایی استفاده می‌شود. همچنین تشخیص سرولوژیکی، سریع، مطمئن و با صرفه اقتصادی است که امکان ارزیابی انبوهی از نمونه‌ها را در زمانی کوتاه مهیا می‌سازد. هدف از انجام این تحقیق تولید آنتی‌بادی اختصاصی برای شناسایی عامل بیماری باکتریایی پوسیدگی بنه زعفران می‌باشد که بتوان از روش‌های سرولوژیکی برای تشخیص بیماری استفاده کرد.

گیاه‌شناسی و مشخصات زعفران

زعفران (*Crocus sativus* L.) که به طلای سرخ معروف است گیاهی علفی، چندساله و متعلق به خانواده‌ی زنبقیان (Iridaceae) است. (Fernandez et al., 2004) رویشگاه اولیه‌ی زعفران در ایران در دامنه‌ی کوه‌های زاگرس و به ویژه ناحیه‌ی الوند است (Kafi et al., 2002). تولید سالانه زعفران در جهان و ایران به ترتیب 418 و 320 تن می‌باشد. این گیاه به دلیل داشتن سه ماده‌ی زیستی فعال: کروسین^۱، پیکروکروسین^۲ و سافرانال^۳ به عنوان گران‌ترین ادویه در جهان شناخته می‌شود (Leone et al., 2018).

1 - Crocin

2 - Picrocrocin

3 - Safranal

مشخصات بیماری پوسیدگی بنه زعفران

برای اولین بار بیماری مربوط به باکتری بورخولدريا گلادیولی در ایتالیا گزارش شد. به طوری که 25 سویه‌ی مختلف از این باکتری باعث ایجاد بیماری‌زایی در زعفران می‌شد (Fiori et al., 2011). علائم بیماری پوسیدگی زعفران، وجود لکه‌ها و پوسیدگی روی برگ‌ها، ساقه‌ها و بنه مشاهده شده است (شکل 1). به طوری که با پیشرفت بیماری در مزرعه، حدود 80 درصد محصول به طور کامل از بین می‌رود (Fiori et al., 2011). در ایران در سال‌های اخیر، این بیماری در مزارع خراسان رضوی و خراسان جنوبی بطور پراکنده مشاهده شده و بیم آن می‌رود که به مزارع دیگر استان‌هایی که در آنها زعفران کشت می‌شود گسترش یابد (کریمی شهری و قاسمی، 1399).



شکل 1: علائم بیماری پوسیدگی زعفران که توسط باکتری Bgg روی بنه و برگ‌های گیاه زعفران ایجاد می‌شود (برگرفته از Fiori et al., 2011)

یکی از دلایل ایجاد این بیماری، تک‌کشتی بودن زعفران است. طبق تحقیقات انجام گرفته، مشخص شد که بسیاری از بیماری‌های باکتریایی و قارچ‌ها از طریق بنه‌ها منتقل می‌شوند. *Bacillus croci* و *B. Pseudomonas gladioli*، بیماری‌های باکتریایی زعفران هستند. باکتری بورخولدريا گلادیولی گونه‌ای ناهمگن با تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی است که تنها از طریق بیماری‌زایی، قابل تفکیک می‌باشد (Saddler et al., 1994). این گونه حتی باعث ایجاد بیماری فیروز کیستیک در انسان می‌شود. بررسی توالی 16s rDNA برای مقایسه‌ی گونه‌های مختلف این جنس بسیار موثر واقع شده است. اما به دلیل شباهت آن با جنس

سودوموناس^۴، به راحتی قابل شناسایی نیست. تاژک‌ها^۵ و سیستم ترشحی نوع III^۶ برای ایجاد بیماری‌زایی کامل این باکتری مورد نیاز هستند.

جنس بورخولدريا شامل بیش از 60 گونه است و در طیف وسیعی از محیط‌ها از جمله خاک، گیاهان، ریزوسفرها، آب، حیوانات و انسان‌ها، یافت می‌شود. گونه‌های گلا دیولی دارای سویه‌های مختلف بیماری‌زای حیوانی، گیاهی و انسانی هستند (Kennedy et al., 2007). با این حال تمایز بین این سویه‌های بیماری‌زای گیاهی و انسانی در یک گونه به راحتی قابل انجام نیست و بسیار محتمل است که بعضی از این سویه‌های بیماری‌زای گیاهی، در حیوان و انسان نیز مشترک باشند و باعث بیماری در انسان و حیوان بشوند (Jacob et al., 2005). گونه‌ی گلا دیولی باعث بیماری‌زایی روی برنج نیز می‌شود ولی بیماری‌زایی آن نسبت به گونه‌ی *glumae* بسیار کمتر است. این باکتری به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های معمول مقاوم است و به همین دلیل راه درمان برای آن هنوز وجود ندارد. در زعفران، علائم بیماری ابتدا به صورت لکه‌های کوچک در سطح بنه مشاهده می‌شود. هر ساله لکه در سطح بنه گسترش یافته و به صورت لکه‌های قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره با حاشیه نامنظم دیده می‌شود. پس از مدتی لکه‌ها کمی عمیق‌تر شده و حدود ۱ میلی‌متر در بافت فرو می‌رود و به صورت زخم درمی‌آید. در این مرحله حاشیه زخم‌ها کاملاً مشخص و از بافت سالم مجزا می‌شود. با گسترش بیماری، علائمی روی اندام‌های هوایی از قسمت بالا به سمت پائین ایجاد شده و گیاه دچار خشکیدگی و زردی شده و روی بنه زعفران پوشش سفید رنگی دیده می‌شود که پس از مدتی کاملاً بنه‌ها را می‌پوشاند (Kalha et al., 2007).

آنتی‌بادی‌ها و ساخت کیت الایزای تشخیص بیماری پوسیدگی باکتریایی Bgg زعفران

مرسوم‌ترین روش انتقال این بیماری، از طریق حمل و نقل بنه به سایر نقاط است. بنابراین می‌توان به وسیله‌ی غربالگری بنه‌های زعفران از انتقال بیماری به مزارع دیگر ممانعت کرده و از گسترش آن به مناطق مختلف جلوگیری کرد. یکی از مهمترین راه‌های پیشگیری تشخیص سریع عامل بیمارگر به وسیله‌ی تست‌های سرولوژیکی است دستورالعمل حاضر روش استفاده از کیت تشخیص را ارائه می‌دهد. هسته مرکزی این کیت آنتی‌بادی اختصاصی جهت شناسایی این بیماری است. آنتی‌بادی‌ها مولکول‌های پروتئینی متشکل از چهار زنجیره پلی‌پپتیدی شامل دو زنجیره سبک^۷ و دو زنجیره سنگین^۸ هستند که به کمک پیوندهای کوالان^۹ و غیرکوالان بهم متصل هستند. دامین‌های زنجیره‌ی سبک شامل VL و CL و دامین‌های زنجیره‌ی سنگین شامل VH, CH₁, CH₂, CH₃ و بعضاً CH₄ می‌باشند. مناطقی از اسیدآمین‌های ناحیه متغیر در مولکول‌های

4- *Pseudomonas spp.*

5- Flagella

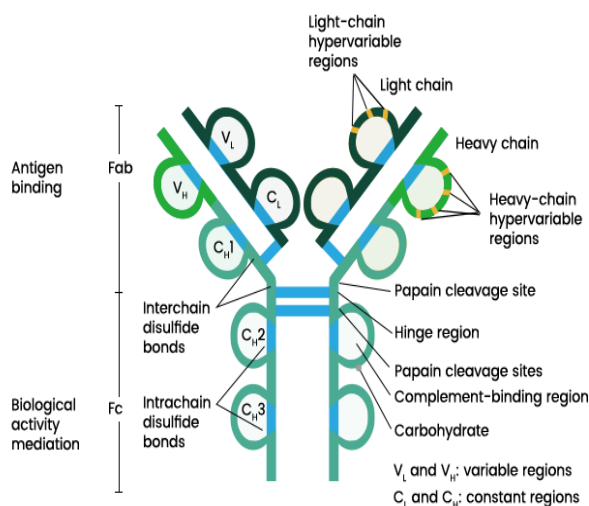
6- Type III secretion systems (T3SS)

7- light chain

8- Heavy chain

9- Covalent bonds

ایمونوگلوبولین ثابت نیستند و برای هر آنتی ژن متغیر می‌باشند. این مناطق را که اسید آمینه‌ها در آن ثابت نیستند به اصطلاح مناطق بسیار متغیر (HV) یا مناطق مکمل^{۱۰} (CDR) می‌گویند. مناطق متغیر در آنتی‌بادی‌ها مسئول شناسایی و پیوستن به ملکول‌های آنتی ژن هستند (شکل 2).



شکل 2. ساختار و نمای کلی از پیوندها و دامین‌های موجود در زنجیره سبک و سنگین ساختمان آنتی‌بادی

برای ساخت کیت تشخیص باکتری Bgg مبتنی بر روش‌های سرولوژیکی، بطور خلاصه، ابتدا باکتری از بنه‌های آلوده جداسازی شده و از سلول‌های کشته شده باکتری برای تهیه آنتی‌بادی استفاده می‌شود. سوسپانسیون باکتری به خرگوش تزریق شده و پس از افزایش عیار آنتی سرم اختصاصی، خون‌گیری و جداسازی سرم خون انجام می‌شود. خالص‌سازی ایمونوگلوبولین با روش کروماتوگرافی تمایلی صورت گرفته و سپس برای انجام آزمون‌های متعدد و تایید کارایی آنتی‌بادی، اتصال آنتی‌بادی به آنزیم آلکالین فسفاتاز انجام می‌شود. در آخر، پس از تایید کارایی آنتی‌بادی در انواع آزمون‌های تشخیصی مبتنی بر سرولوژیکی، آنتی‌بادی تلخیص شده، به عنوان هسته اصلی کیت ارائه می‌شود.

موارد استفاده از کیت

کیت الایزای تشخیص بیماری پوسیدگی باکتریایی Bgg زعفران یک کیت تخصصی بوده و قابلیت استفاده در موارد زیر را دارد:

- ایستگاه‌های قرنطینه بنه‌های زعفران
- گمرک و پایانه‌های واردات و صادرات بنه یا محصول زعفران
- کلینیک‌های گیاه‌پزشکی مرتبط با بیماری‌های زعفران

10- Complementarity-determining regions (CDR)

- گلخانه‌داران (کشت‌های سنتی، هیدروپونیک و ایروپونیک)

اساس آزمون الایزا (ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay)

یک روش آزمایشگاهی بیوشیمیایی مبتنی بر اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن با حساسیت بالا است که امکان آنالیز تعداد زیادی نمونه را به صورت همزمان فراهم می‌کند. از بین انواع الایزا، آزمون ساندویچ دو طرفه الایزا (DAS-ELISA: Double Antibody Sandwich ELISA) بیشتر برای تشخیص و ردیابی بیماری‌ها استفاده می‌شود. در این روش آنتی‌ژن در بین دو لایه آنتی‌بادی اختصاصی قرار می‌گیرد که آنتی‌بادی ثانویه متصل به آنزیم (معمولاً آنزیم آلکالید فسفاتاز) است. فعالیت آنزیم روی سوبسترا و ظهور رنگ نشان دهنده ترتیب صحیح قرارگیری آنتی‌بادی-آنتی‌ژن-آنتی‌بادی متصل به آنزیم بوده و نشان دهنده حضور پاتوژن در نمونه است.

دستورالعمل کیت الایزای تشخیص باکتری *Burkholderia gladioli*

دستورالعمل انجام آزمایش

- 1- به کمک پمپ‌تور یک میکرولیتر از آنتی‌بادی پوششی را در 4 میلی‌لیتر بافر رقیق‌سازی حل نموده و مقدار 100 میکرولیتر از آن را به ته هر چاهک پلیت الایزا ریخته و درب پلیت را بر روی آن قرار می‌دهید و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد به مدت 12-16 ساعت انکوبه کنید.
- نکته 1: تعداد چاهک‌ها به اندازه دو برابر تعداد نمونه‌های مشکوک زعفران بعلاوه چهار چاهک اضافی جهت لود کردن کنترل مثبت آلوده و منفی سالم در نظر گرفته شود (دو چاهک برای هر نمونه‌ای در واقع 2 تکرار) و مقدار بافر حاوی آنتی‌بادی پوششی به اندازه تعداد چاهک‌ها ضربدر 100 میکرولیتر تهیه شود.
- نکته 2: می‌توان برای تسریع در کار، بجای 12-16 ساعت انکوبه کردن در 4 درجه، 4 ساعت در دمای اتاق انکوبه کرد. با این حال روش اول بیشتر توصیه می‌شود.
- 2- پس از گذشت مدت زمان ذکر شده محلول آنتی‌بادی اولیه از داخل چاهک‌ها جمع‌آوری شده و چاهک‌ها سه بار به وسیله محلول شستشو، کاملاً شسته شوند.
- 3- پس از شستشو، 200 میکرولیتر محلول شیرخشک¹¹ دو درصد به هر کدام از چاهک‌ها به منظور مسدود کردن چاهک‌ها اضافه شود و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گرمادهی شوند.
- نکته 3: بدلیل آلودگی سریع محلول شیرخشک، بایستی در هر آزمون بصورت تازه تهیه و استفاده شود.

11 - Skimmed milk

- 4- پس از تخلیه کامل محلول شیرخشک، پلیت‌ها سه بار به وسیله محلول شستشو شسته شوند.
- 5- نمونه‌های گیاهی مشکوک از بنه یا جوانه‌های زعفران انتخاب شده و در وزن‌های یکسان با استفاده از بافر استخراج از آنها سوسپانسیون تهیه شود (شکل 3). به میزان 100 میکرولیتر به پلیت‌های الایزای شسته شده اضافه، درب پلیت گذاشته شده و در دمای اتاق به مدت 2 ساعت انکوبه شوند.



شکل 3. مراحل انجام آزمون الایزا از چپ به راست: تهیه نمونه‌های مشکوک به آلودگی به همراه نمونه‌های مثبت و منفی، استخراج شیره گیاه، انجام آزمون الایزا طبق دستورالعمل و خوانش آزمون به کمک دستگاه

نکته 4: دو تکرار از کنترل مثبت و منفی موجود در کیت بایستی در کنار نمونه‌های مشکوک در هر آزمون قرار داده شوند. برای این منظور 2 ماکرولیتر از هر نمونه کنترل مثبت و منفی را در 200 میکرولیتر بافر استخراج جداگانه حل کرده و 100 میکرولیتر از آنها، در هر یک از چاهک‌های مشخص شده برای کنترل‌ها ریخته شود.

نکته 5: توصیه اکید می‌شود از سوسپانسیون‌های تازه برای آزمون استفاده شود و نمونه گیاهی کاملاً در بافر استخراج له شده و یک سوسپانسیون یکنواخت از هر نمونه برای حداقل دو تکرار (حداقل 200 میکرولیتر) تهیه شود.

6- دوباره بعد از تخلیه سوسپانسیون نمونه‌های گیاهی و کنترل‌های آن، چاهک‌های پلیت‌ها، سه بار به وسیله محلول شستشو شسته شوند و همانند مرحله اول یک میکرولیتر از آنتی‌بادی کانژوگه شده با آلکالین فسفاتاز¹² (AP) در یک میلی‌لیتر محلول بافر رقیق‌سازی حل شده و 100 میکرولیتر از آن درون هر چاهک ریخته، درب پلیت گذاشته شده و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت گرماگذاری شود.

¹² - Alkaline phosphatase (AP)

7- پس از جمع‌آوری محلول آنتی‌بادی کانژوگه شده با آلکالین فسفاتاز، برای بار آخر، پلیت‌ها سه بار به وسیله محلول شستشو، بطور کامل شسته شوند. پس از آن 100 میکرولیتر از محلول $pNPP^{13}$ با غلظت 1 میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای بررسی فعالیت آنزیم آلکالین فسفاتاز به هر چاهک اضافه شود و پس از تولید رنگ، OD واکنش در زمان‌های 15، 30 دقیقه در طول موج 405 نانومتر قرائت گردد. نکته 6: برای اثر بخشی بیشتر توصیه می‌شود محلول pNPP برای هر آزمون بصورت تازه تهیه شود.

اجزای و متعلقات کیت الایزا و وسایل و مواد مورد نیاز

- 1- نمونه کنترل مثبت
- 2- نمونه کنترل منفی
- 3- محلول بافر استخراج (کربنات)
- 4- محلول بافر رقیق‌سازی
- 5- محلول بافر شستشو
- 6- ویال آنتی‌بادی پوششی¹⁴ غلظت 5µg/ml
- 7- ویال آنتی‌بادی کانژوگه شده با آلکالین فسفاتاز غلظت 5µg/ml
- 8- محلول $pNPP^{15}$ (به نسبت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

شرایط نگهداری اجزای کیت و محلول‌ها

- 1- ویال نمونه‌های کنترل مثبت، کنترل منفی، ویال آنتی‌بادی پوششی و ویال آنتی‌بادی کانژوگه شده با آلکالین فسفاتاز برای نگهداری طولانی مدت در فریزر 20- نگهداری شود.
- 2- محلول‌های بافر استخراج (کربنات)، محلول بافر رقیق‌سازی، محلول بافر شستشو و محلول pNPP موجود در کیت برای استفاده محدود و کوتاه مدت چند روزه پس از تحویل کیت قابل مصرف هستند و به مرور زمان بدلیل ماهیت ذاتی آنها، خاصیت‌شان از بین خواهد رفت. برای بالا بردن مدت نگهداری این محلول‌ها پس از دریافت کیت در یخچال نگهداری شوند. به همین خاطر توصیه می‌شود برای بهره‌مندی حداکثر از کیت و انجام آزمون‌های بعدی، طبق دستورالعمل اقدام به تهیه تازه این بافرها نمایید. دستورالعمل تهیه محلول‌ها و بافرها در انتهای برگه راهنمای " اجزای و متعلقات کیت الایزا و

¹³ - p-nitrophenyl phosphate

¹⁴ - Coating antibody

¹⁵ - p-Nitrophenyl phosphate

وسایل و مواد مورد نیاز جهت تشخیص سریع باکتری *Burkholderia gladioli* " دستورالعمل آورده شده است.

وسایل، مواد و ابزارهای کمکی مورد نیاز

- 1- سمپلرهای کالیبره ($10 \mu\text{l} - 1000 \mu\text{l}$)
- 2- سرسمپلرها
- 3- پلیت الایزا 96 چاهکی
- 4- هاون چینی
- 5- شیرخشک
- 6- دستگاه شیکر انکوباتور 37 درجه
- 7- دستگاه ورتکس
- 8- ترازو
- 9- دستگاه الایزا ریدر با فیلتر 450 نانومتر

مشخصات محلول‌ها و بافرها

- بافر استخراج کربنات (pH 9.6):
1/59 گرم بر لیتر Na_2CO_3 ، 2/93 گرم بر لیتر NaHCO_3 ، 0/2 گرم بر لیتر NaN_3 (سدیم آزید)
- بافر رقیق‌سازی PBS (pH 7.3):
137 میلی‌مولار NaCl ، 2/7 میلی‌مولار KCl ، 8/1 میلی‌مولار $\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$ و KH_2PO_4 (1/5 میلی‌مولار)
- بافر شستشو (PBST):
0.05% Tween20 + PBS
- محلول شیر خشک 2 درصد
100 میلی‌گرم شیر خشک در 5 میلی‌لیتر PBS
- محلول pNPP (1 میلی‌گرم از pNPP در 1 میلی‌لیتر از محلول):
100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2

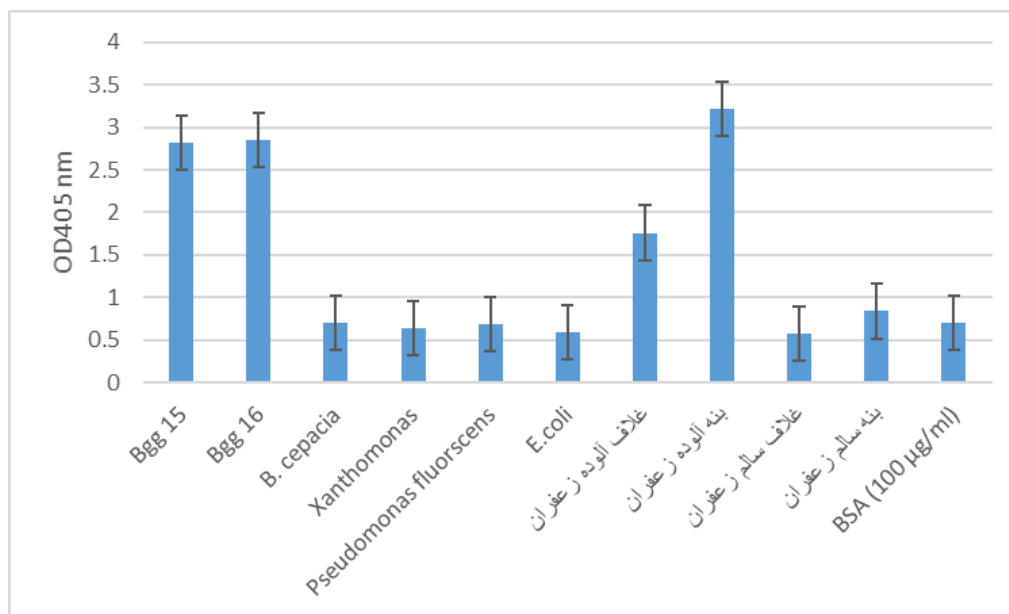
تفسیر نتایج آزمایش

برای مشخص کردن وضعیت نمونه‌ها (مثبت، مشکوک و یا منفی) و بررسی درستی آزمون، باید در وهله اول نسبت میانگین دو کنترل مثبت به میانگین دو کنترل منفی بیشتر از سه و نیم (3/5) باشد. پس از آن از رابطه زیر وضعیت هر یک از نمونه‌ها (S/P) مشخص خواهد شد (شکل 4).

$$S/P = \frac{\text{Mean OD sample} - \text{Mean OD NC}}{\text{Mean OD PC} - \text{Mean OD NC}}$$

NC: کنترل منفی PC: کنترل مثبت.

نتیجه آزمون نمونه		S/P
منفی		$S/P < 15$
مشکوک (غیر قابل تفسیر)		$15 \leq S/P < 25$
مثبت		$25 \leq S/P$



شکل 4. یک نمونه از نتایج حاصل از الایزا

توصیه‌های مهم

- 1- توصیه می‌شود قبل از اجرای آزمون جایگاه و تکرار نمونه‌های را بر روی نقشه پلیت 96 تایی الایزا مشخص نموده و برای کاهش خطا با استفاده از نقشه نمونه‌های زعفران مشکوک را در چاهک‌های مشخص شده لود نمایید.
- 2- قبل از مصرف محتویات محلول‌ها، آنها را کاملاً تکان دهید و محتویات ویال‌ها را با پایپت کردن مکرر همگن کنید.
- 3- درب پلیت 96 تایی الایزا در مدت زمان اعمال تیمارهای زمانی بایستی بسته باشد تا از تبخیر محلول‌ها جلوگیری به عمل آید.
- 4- قبل از قرائت نمونه‌ها با دستگاه خوانش الایزا، دستگاه مربوط روشن و آماده باشد تا زمان عمل آنزیم آلکالین فسفاتاز دقیق در آزمون لحاظ شود.
- 5- در صورت تمایل برای متوقف کردن واکنش آنزیم آلکالین فسفاتاز، می‌توان از محلول NaOH 2N به میزان 50 میکرولیتر برای هر چاهک استفاده کرد.

منابع

- 1- خضری، م، کریمی شهری، م. ر، و قاسمی، ابوالقاسم. (1403). ارزیابی تأثیر چند ترکیب شیمیایی بر کنترل باکتری *Burkholderia gladioli pv. gladioli* عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران. زراعت و فناوری زعفران، (12): 211-224.
- 2- شرایعی، پ. و آذرپژوه، ا. (1382). تأثیر زمان برداشت و فراوری بر خصوصیات کیفی و آلودگی میکروبی زعفران. مجموعه مقالات سومین همایش ملی زعفران.
- 3- کریمی شهری، م. ر. (1372). بررسی میکوفلور زعفران. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
- 4- کریمی شهری، م. ر. و قاسمی، ا. (1399). بیماری باکتریایی پوسیدگی بنه زعفران ناشی از *Burkholderia gladioli* و اقدامات لازم در جهت پیشگیری از بروز آن، نشریه فنی، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، 23 ص.
- 5- علی‌پور، ع.، قدرتی شاتوری، ز. و یوسفی، ع. (1403). ارزیابی منافع رفاهی تجارت منطقه‌ای زعفران در ایران. زراعت و فناوری زعفران، 12(4): 485-506.
- 6- Anonymous (2022). Agriculture Statistics, Chapter 3: Horticultural and greenhouse products report. Ministry of Jihad Agriculture Publications, Information and Communication Center, Programming Deputy, Tehran, Iran. 307 pp. (In Persian).

- 7- Cappelli, C., Buonauro, C. R., & Polverari, A. (1991). Occurrence of *Penicillium corymbiferum* on saffron in Italy. *Plant Pathology*. 40: 148-149.
- 8- Carta, C., Fiori, M., & Franceschini, A. (1982), "*Marcium cabonioso*" Deibulbi dello zafferano (*Crocus sativus* L.). *Studi Sassaresi*, 29.
- 9- Di Primo, P. (2000). Preliminary characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* causing fusarium corm rot of saffron in Italy. *Plant Disease*. 84(7): 806.
- 10- Fernandez, J.A. (2004). Biology, biotechnology and biomedicine of saffron. *Recent Research Developments in Plant Science*. 2: 127-159.
- 11- Francesconi, A. (1973). The rotting of bulbs of *Crocus sativus* L. by *Penicillium cyclopium* Westing. *Annales Botanici Fennici*. 32: 63-70.
- 12- Kafi, M. (2002). Saffron, production and processing. Language and Literature Publications. 276 pp.
- 13- Fiori, M., Ligios, V., & Schiaffino, A. (2011). Identification and characterization of *Burkholderia* isolates obtained from bacterial rot of saffron (*Crocus sativus* L.) grown in Italy. *Phytopathologia Mediterranea*. 50(3): 450-461.
- 14- Kalha, C .S., Gupta, V., & Gupta, D. (2007). First report of sclerotial rot of saffron caused by *Sclerotium rolfsii* in India. *Plant Diseases*, 91(9): 1203.
- 15- Kennedy, M.P., Coakley, R.D., Donaldson, S.H., Aris, R.M., Hohneker, K., Wedd, J.P., Knowles, M.R., Gilligan, P.H. and Yankaskas, J.R. (2007) *Burkholderia gladioli*: five year experience in a cystic fibrosis and lung transplantation center. *J. Cyst. Fibros*. 6, 267–273.
- 16- Jacob, D., Sachs, G., & Wagner, S. (Eds.). (2005). Basic Research and Technologies for Two-stage-to-orbit Vehicles: Final Report of the Collaborative Research Centres 253, 255 and 259. Wiley-VCH.
- 17- Leone, S., Recinella, L., Chiavaroli, A., Orlando, G., Ferrante, C., Leporini, L., Brunetti, L., Menghini, L. (2018). Phytotherapeutic use of the *Crocus sativus* L. (Saffron) and its potential applications: a brief overview. *Phytother. Res*. 32 (12): 2364–2375.
- 18- Miglino, R., Jodlowska, A., & van Schadewijk, A. R. (2005). First report of Narcissus mosaic virus Infecting *Crocus* spp. cultivars in the Netherlands. *Plant Disease*. 89(3): 342.