



The Biosensors and Their Application in Plant Pathology

MAHSA ABADKHAH and DAVOUD KOOLIVAND

Department of Plant Protection, University of Zanjan, Zanjan, Iran
(Corresponding author: Koolivand@znu.ac.ir)

Received: 26.09.2017

Accepted: 07.05.2018

Abadkhah M. and Koolivand D. 2018. The biosensors and their application in plant pathology. *Plant Pathology Science* 7(2):47-59. DOI:10.2982/PPS.7.2.47

Abstract: Preventing plant disease damage requires the use of new, powerful, simple and portable tools to quickly diagnose pathogens. Today, biosensor technology known as a powerful tool for evaluating conventional methods in agricultural sciences. Sensitivity, selectivity and portability of biosensors made it possible to develop them as special tools for rapid analysis of compounds in samples with low concentration. Biosensors have three main components, biological element, transducer and readout system. The most important application of biosensors in plant pathology is rapid detection of plant pathogens, in order to reduce the use of expensive and environmentally-damaging chemicals. This article introduces different types of biosensors and their applications in plant pathology.

Key words: ELISA, Fungus, Virus, Chromatography

بیوسنسورها و کاربرد آن‌ها در بیماری‌شناسی گیاهی

مهسا آبادخواه و داود کولیوند

گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه زنجان

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۱۷

دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۰۴

آبادخواه م. و کولیوند د. ۱۳۹۷. بیوسنسورها و کاربرد آن‌ها در بیماری‌شناسی گیاهی. *دانش بیماری‌شناسی گیاهی* ۷(۲): ۴۷-۵۹. DOI:10.2982/PPS.7.2.47

چکیده: پیشگیری از خسارت بیماری‌های گیاهی نیازمند استفاده از ابزارهای جدید، توانمند، ساده و قابل حمل برای تشخیص سریع عوامل بیماری‌زا است. امروزه فناوری بیوسنسور ابزاری توانمند برای ارزیابی روش‌های مرسوم در علوم کشاورزی است. از ویژگی‌های مهم بیوسنسورها حساسیت، گزینندگی و قابل حمل بودن آن‌ها می‌باشد که برای تجزیه و تحلیل سریع ترکیبات پیچیده با مقدار کم نمونه بکار می‌روند. هر بیوسنسور مرکب از سه بخش عنصر زیستی، مبدل و آشکارساز است. مهم‌ترین کاربرد آنها در بیماری‌شناسی گیاهی تشخیص سریع بیمارگرهای گیاهی برای کاهش مصرف مواد شیمیایی گران‌قیمت و آسیب‌رسان به محیط زیست است. این مقاله به معرفی انواع بیوسنسورها و کاربردهای آنها در بیماری‌شناسی گیاهی می‌پردازد.

واژه‌های کلیدی: الیزا، باکتری، قارچ، ویروس، کروماتوگرافی

مقدمه

امنیت غذایی جهانی، که با تعادل در تولید و تقاضای جهانی غذا تعیین می‌شود، در سال‌های اخیر به یک مسئله مهم بین‌المللی تبدیل شده است (Keinan and Clark 2012). از بین رفتن محصولات کشاورزی ناشی از بیماری‌گرهایی از قبیل قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها و نماتدها برای قرن‌ها است که در سراسر جهان وجود دارد. این وضعیت منجر به کاهش بهره‌وری از زمینهای محدود زراعی و تولید محصولات کشاورزی شده است. اگرچه کاهش بهره‌وری در کشاورزی می‌تواند به دلایل مختلفی اتفاق بیافتد، ولی آسیب ناشی از آفات و بیماری‌ها نقش مهمی را در کاهش محصولات کشاورزی در سراسر جهان دارند (Conway 2013). امروزه در زمینه‌های مختلفی از جمله پزشکی (اندازه‌گیری قند خون در افراد دیابتی، آنالیز DNA بیماران سرطانی، تست بارداری)، تولید محصولات دارویی و بهداشتی (اندازه‌گیری داروها و متابولیت‌های آنها)، کشاورزی (ردیابی بقایای سموم گیاهی، تشخیص سریع بیماری‌گرهای گیاهی)، صنایع غذایی (کنترل پروسه تولید تخمیر، تشخیص کیفیت و آلودگی‌های غذایی) و غیره از بیوسنسورها (Biosensors) بهره می‌گیرند (Monosik *et al.* 2012). بیوسنسورها یا زیست حسگرها ابزارهای واکاو هستند که می‌توانند ترکیبات زیستی را شناسایی نموده و با آنها واکنش دهند. محصول این واکنش می‌تواند یک پیغام شیمیایی، نوری و یا الکتریکی باشد. این سنسورها ابزاری توانمند جهت شناسایی مولکول‌های زیستی می‌باشند (Perdikaris *et al.* 2011). واژه بیوسنسور برای نخستین بار توسط فردی به نام Cammann معرفی شد و معنی آن توسط IUPAC (اتحادیه بین‌المللی شیمی محض و کاربردی) تعریف گردید (Cammann 1977). فناوری بیوسنسور در حقیقت نشان دهنده ترکیبی از علوم بیوشیمی، بیولوژی مولکولی، شیمی، فیزیک، الکترونیک و کامپیوتر است. گسترش و توسعه بیوسنسورها از سال ۱۹۵۰ آغاز شد، زمانی که بیوسنسورها با یک الکتروود اکسیژن (که به نام الکتروود کلارک شناخته می‌شود) توسط Leland C Clark (پدر علم بیوسنسور) در ایالات متحده آمریکا برای اندازه‌گیری اکسیژن محلول در خون توسعه یافتند (Jain *et al.* 2010). به‌منظور حداقل رساندن آسیب و خسارت ناشی از بیماری‌ها به محصولات در طول دوره‌های رشد، برداشت و پس از برداشت و نیز برای به حداکثر رساندن بهره‌وری و اطمینان از کشاورزی پایدار، تشخیص سریع بیماری‌ها و میزان پیشرفت آنها برای

پیشگیری از خسارت آنها به محصولات کشاورزی امری بسیار مهم و ضروری است، که این عمل به کمک بیوسنسورها میسر گردیده است.

۱- روش‌های رایج تشخیص بیماری‌های گیاهی

ردیابی و شناسایی بیمارگرهای گیاهی در محصولات می‌تواند با هر دو روش مستقیم و غیرمستقیم صورت گیرد. تشخیص مستقیم بیماری شامل روش‌های مولکولی و سرولوژیکی است که می‌تواند بیمارگرهایی که باعث بیماری می‌شوند مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها را به‌طور مستقیم شناسایی کنند. از طرف دیگر، روش‌های غیرمستقیم شناسایی بیماری‌های گیاهی از طریق پارامترهای مختلفی مانند تغییرات مورفولوژیکی، تغییر درجه حرارت، تبخیر ترکیبات آلی فرآر منتشر شده توسط گیاهان آلوده صورت می‌گیرد (Fang and Ramasamy 2015).

۱-۱- روش‌های تشخیص مستقیم: روش‌های تشخیص مستقیم برای شناسایی بیمارگرهای گیاهی براساس مزایا و محدودیت‌های آنها انجام می‌گیرد (جدول ۱). روش‌های پایه آزمایشگاهی مانند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (Polymerase Chain Reaction=PCR)، ایمونوفلوروسنس (Immunofluorescence=IF)، روش الایزا (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay=ELISA)، فلوسایتومتری (Flow Cytometry=FCM) اغلب روش‌های تشخیص مستقیم هستند (Fang and Ramasamy 2015).

جدول ۱- مقایسه روش‌های مستقیم تشخیص بیمارگرهای گیاهی (Fang and Ramasamy 2015).

Table 1. Comparison of the direct methods for detecting plant diseases (Fang and Ramasamy 2015)

روش	مزایا	معایب
PCR	فناوری رایج و کامل، قابل حمل و استفاده آسان	اثرهای جانبی DNA استخراج شده، مهارکننده‌ها، فعالیت پلی‌مراز، غلظت بافر
ELISA	کم هزینه و براساس تغییر رنگ	حساسیت کم برای باکتری‌ها
IF	حساسیت بالا	عکسبرداری
FCM	اندازه‌گیری همزمان چند پارامتر، تشخیص سریع	هزینه بالا

PCR=Polymerase chain reaction, ELISA=Enzyme-linked immunosorbent assay, IF=Immunofluorescence, FCM=flow cytometry

۱-۱-۱- واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR): از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز، اتصال و هیبریداسیون DNA و رونویسی برای شناسایی اختصاصی بسیاری از بیماری‌های ناشی از ویروس‌ها، باکتری‌ها و قارچ‌ها استفاده می‌شود. در حال حاضر، این روش به طور گسترده برای تشخیص بیمارگرهای گیاهی استفاده می‌شود (Fang and Ramasamy 2015).

۱-۱-۲- روش سرولوژیکی اتصال آنزیم: روش سرولوژیکی (ELISA) یکی دیگر از روش‌های مستقیم برای شناسایی بیمارگرها مبنی بر آنتی‌بادی و تغییر رنگ است. در این روش اپی‌توپ‌های هدف (آنتی‌ژن) به طور اختصاصی با آنتی‌بادی‌هایی که به آنزیم متصل هستند، مرتبط می‌شوند. این تشخیص براساس تغییرات رنگ ناشی از تعامل بین سوبسترا و آنزیم است. عملکرد این روش می‌تواند تا حد زیادی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و نوترکیب اختصاصی که به طور تجاری در دسترس هستند بهبود یابد. این روش بیشتر برای تشخیص ویروس‌های گیاهی استفاده می‌شود و حساسیت آن برای باکتری‌ها کم است و فقط برای تأیید بیماری‌های ویروسی گیاهی پس از ظهور نشانه‌های قابل رؤیت است و برای تشخیص زودهنگام بیماری قبل از وقوع نشانه‌ها قابل استفاده نمی‌باشد (Clark and Adams 1977).

۱-۱-۳- روش ایمونوفلوروسانس (IF): یک روش نوری مبنی بر میکروسکوپ فلوروسانس است که برای تجزیه و تحلیل نمونه‌های میکروبیولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش می‌تواند برای تشخیص عفونت‌های بیمارگر در بافت‌های گیاهی استفاده شود. در مطالعات انجام شده از IF برای تشخیص قارچ *Botrytis cinerea* Per. در پیاز استفاده شده است (Fang and Ramasamy 2015).

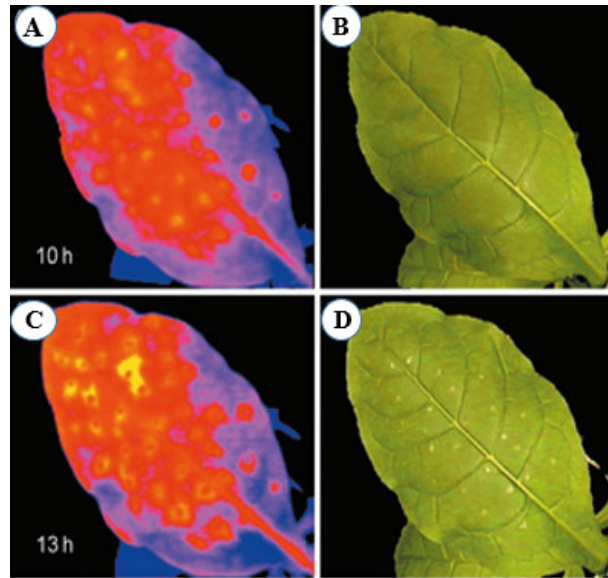
۱-۱-۴- روش فلوسایتومتتری (FCM): فلوسایتومتتری یک روش مبتنی بر لیزر است که به طور گسترده برای شمارش و جداسازی سلول‌ها و تشخیص مارکرهای زیستی استفاده می‌شود. FCM برای شناسایی سریع سلول‌ها، در حالی که سلول‌ها از طریق یک دستگاه تشخیص الکترونیکی در یک جریان مایع عبور می‌کنند استفاده می‌شود. مزیت این تکنولوژی قابلیت اندازه‌گیری همزمان چندین پارامتر است. این روش برای تشخیص DNA باکتری‌ها، و هاگ‌های قارچ‌ها، به عنوان یک روش نسبتاً جدید برای تشخیص بیماری‌های گیاهی استفاده می‌شود.

۱-۲-۲- روش‌های تشخیص غیرمستقیم: علاوه بر روش‌های مستقیم از روش‌های غیرمستقیم براساس پروفیل گیاه برای شناسایی تنش‌های زیستی و غیرزیستی و نیز عوامل بیماریزا در گیاهان استفاده می‌شود. در این راستا، انواع جدیدی از سنسورهای نوری که تنش‌های زیستی و غیرزیستی را در گیاهان تشخیص می‌دهند توسعه یافته‌اند. سنسورهای نوری اطلاعات دقیقی مبنی بر طیف الکترومغناطیسی مختلف ارائه می‌دهند، بنابراین پیش‌بینی سلامت گیاهان را قادر می‌سازند. روش‌هایی از جمله ترموگرافی (Thermography)، تصویربرداری فلوروسانس (Fluorescence Imaging)، تصویربرداری فوق طیفی (Hyperspectral Techniques) و کروماتوگرافی گازی (Gas Chromatography =GC) از بهترین روش‌های غیرمستقیم برای تشخیص و شناسایی بیمارگرهای گیاهی و بیماری‌های حاصل از آن‌ها هستند (Chaerle and Van der streaten 2000).

۱-۲-۱- روش ترموگرافی: این روش اجازه تصویربرداری دماهای مختلف از سطح برگ گیاه را می‌دهد. اشعه مادون قرمز منتشر شده از سطح برگ ناشی از بیماری می‌تواند توسط دوربین‌های ترموگرافی ضبط شود و تفاوت رنگ را آنالیز و تجزیه تحلیل کرد (شکل ۱). همچنین این روش ابزاری برای تشخیص بیمارگرهای خاکزاد است (Chaerle and Van der Streaten 2000).

۱-۲-۲- روش تصویربرداری فلوروسانس: در این روش غیرمستقیم، فلوروسانس کلروفیل برگ‌ها به عنوان تابعی از نور اندازه‌گیری می‌شود. تغییر در پارامترهای فلوروسانس برای تجزیه و تحلیل عفونت‌های بیمارگر براساس تغییرات در دستگاه‌های فتوسنتزی و واکنش‌های انتقال الکترون در فتوسنتز می‌تواند استفاده شود. با استفاده از این روش تغییرات فلوروسانس برای تشخیص دقیق آلودگی‌های زنگ و سفیدک پودری در برگ‌های گندم در طول موج ۴۷۰ نانومتر (nm) آنالیز و استفاده شد (Chaerle and Van der Streaten 2000).

۱-۲-۳- روش تصویربرداری فوق طیفی: از این روش می‌توان برای بدست آوردن اطلاعات مفیدی در مورد سلامت گیاهان در طیف گسترده‌ای بین ۳۵۰ تا ۲۵۰۰ نانومتر استفاده کرد. این روش به‌طور گسترده برای بررسی فنوتیپ گیاهان، تشخیص و شناسایی بیماری‌ها در محصولات کشاورزی بوسیله اندازه‌گیری نور



شکل ۱- تصاویر ترموگرافی از سطح برگ گیاه توتون آلوده به ویروس موزائیک توتون (*Tobacco mosaic virus, TMV*). تصاویر (A, B) تغییرات دما پس از ۱۰ ساعت آلودگی. تصاویر (C, D) گسترش اثر حرارتی و مرگ سلول‌ها پس از ۱۳ ساعت (Chaerle and Van der Streten 2000).

Figure 1. Thermographic visualization of the local resistance response of tobacco to *tobacco mosaic virus* infection. (A, B) after 10 h infection. (C, D) expansion of the thermal effect and cells death 13 h later (Chaerle and Van der Streten 2000).

بازتاب شده ناشی از تغییرات بیوشیمیایی و بیوفیزیکی گیاهان آلوده مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش بسیار قوی است و تجزیه و تحلیل سریع داده‌های تصویربرداری را فراهم می‌کند. بیمارگرهایی از جمله قارچ‌های *Magnaporthe grisea* Hebert در برنج، *Phytophthora infestans* Montagne در گوجه‌فرنگی و *Venturia inaequalis* Cooke در درختان سیب با استفاده از این روش شناسایی و تشخیص داده شده‌اند (Delalieux et al. 2007).

۱-۲-۴- کروماتوگرافی گازی: روشی کاملاً غیرمستقیم برای تشخیص بیماری‌های گیاهی براساس اندازه-گیری مواد شیمیایی فرار از گیاهان آلوده است. عوامل بیماری‌زا در گیاهان می‌توانند منجر به انتشار ترکیبات آلی فرار خاص (Volatile Organic Compound=VOCs) از گیاهان شوند که نشان‌دهنده استرس در گیاهان است. در بررسی‌های انجام شده آلودگی ناشی از قارچ *Phytophthora cactorum* Lebert and Cohn که باعث بیماری پوسیدگی در توت‌فرنگی می‌شود، باعث آزاد شدن اتیل گلیکول و اتیل فنول به عنوان ترکیبات

آلی فرآر (VOCs) از قسمت‌های آلوده گیاه و میوه توت‌فرنگی می‌شود که با استفاده از GC این بیماری شناسایی شده است. در طول آسیب مکانیکی به برگ گیاهان، مواد آلی فرآر از برگ‌های سبز (Green Leaf Volatiles=GLVs) مانند سیس-هگزینول، سیس-هگزینیل استات و هگزینیل استات تولید می‌شود (Fang *et al.* 2014).

۲- انواع بیوسنسورها

بیوسنسورها ابزارهایی هستند که بر مبنای مواد بیولوژیکی پایه‌گذاری و به گونه‌ای طراحی شده‌اند تا تنها با یک ماده‌ی خاص واکنش نشان دهند. هر بیوسنسور مرکب از سه بخش: عنصر زیستی یا بیورسپتور (Biological element or Bio receptor)، مبدل (Transducer) و آشکارساز (Readout system) است. مواد مورد استفاده در بیوسنسورها براساس سازوکارهای آنها به سه دسته تقسیم می‌شوند: الف) گروه بیوکاتالیتی شامل آنزیم‌ها، ب) گروه بیوفین شامل آنتی‌بادی‌ها و اسیدهای نوکلئیک و ج) میکروب‌ها یا ریزجانداران (Mehrotra 2016, Vidic *et al.* 2017). بیوسنسورها براساس مؤلفه‌های مختلف نظیر نوع بیورسپتور (عنصر زیستی) و یا نوع مبدل طبقه‌بندی می‌شوند.

طبقه‌بندی براساس نوع بیورسپتور: بیوسنسور شامل لایه زیستی حساس است که می‌تواند به روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی به مبدل متصل گردد. بیورسپتور، گونه مولکولی زیستی (آنتی‌بادی، آنزیم، پروتیین، اسید نوکلئیک) یا سیستم زیستی زنده (سلول، بافت، جاندار) بوده و از مکانیسم بیوشیمیایی جهت تشخیص استفاده می‌کند. رایج‌ترین بیورسپتورها بر پایه برهمکنش‌های آنتی‌ژن - آنتی‌بادی، برهمکنش‌های اسیدهای نوکلئیک (دو رشته مکمل)، برهمکنش‌های آنزیمی (آنزیم - سوبسترا) و برهمکنش‌های سلولی (ریزجاندارها - پروتیین) می‌باشند.

طبقه‌بندی بر اساس نوع مبدل: مبدل وقوع و میزان وقوع برهمکنش بین مولکول هدف و بیورسپتور را به یک پدیده فیزیکی قابل اندازه‌گیری تبدیل می‌کند. تبدیل می‌تواند به واسطه روش‌های وسیعی صورت گیرد و بیوسنسورها می‌توانند بر اساس نوع سیستم تبدیل بکار رفته طبقه‌بندی شوند. طبقه‌بندی سیستم‌های تبدیل رایج شامل، ۱- سیستم‌های نوری، ۲- الکتروشیمیایی و ۳- سیستم‌های حساس به جرم است. سیستم‌های

تبدیل موجود، یک یا ترکیبی از روش‌های بالا است. بیوسنسورهای الکتروشیمیایی متداول‌ترین گروه بیوسنسورها را تشکیل می‌دهند.

۳- ویژگی‌های بیوسنسورهای مورد استفاده در بیماری‌شناسی گیاهی

امروزه استفاده از روش‌های سریع و حساس تشخیص بیماری‌های گیاهی از اهمیت خاصی برخوردار است. در بیماری‌شناسی گیاهی از بیوسنسورهای آنزیمی که براساس مهار کولین‌استرازها هستند جهت تشخیص و ردیابی باقی مانده آفت‌کش‌های فسفره و کارباماته و شناسایی بیماری‌های انباری از روی مواد فرآور تولید شده در اثر بیماری استفاده می‌شود (Reyes De Corcuera and Cavalieri 2010). بیوسنسورها با چند ویژگی مهم ارزیابی می‌شوند. گزینش‌گری (Selectivity) به این معنا که سیستم تا چه اندازه قادر است مولکول هدف را از سایر مواد موجود در نمونه تفکیک کند، به عبارت دیگر هر چه قدرت گزینندگی بالا باشد، بیوسنسور قادر است مولکول هدف را با کمترین فرصت از دیگر مواد موجود در نمونه تشخیص داده و اندازه‌گیری نماید. حساسیت (Sensitivity) بدین معنا است که با کمترین تغییرات در غلظت مولکول هدف، تغییر قابل توجهی در سیگنال خروجی از حسگر مشاهده می‌شود و توان تجزیه کمی چنین حسگری بالا است. تکرارپذیری (Repeatability) بیوسنسور بایستی قابلیت تکرارپذیری داشته باشد به این صورت که در آزمایشی کاملاً یکسان توسط یک بیوسنسور جواب مشابه بدهد. زمان واکنش، نیمه عمر، ثبات، قابلیت تولید در تعداد بیشتر با کمترین هزینه، استفاده آسان و بادوام، ساده و کوچک از مهم‌ترین مشخصه‌های بیوسنسورها هستند (Jain et al. 2010).

۴- استفاده از بیوسنسورها جهت شناسایی دقیق و سریع بیمارگرهای گیاهی

بیوسنسورها سیستم‌های اندازه‌گیری بسیار دقیق، حساس و اختصاصی می‌باشند و وجود بیورسپتورهای خاص علت ویژگی‌های منحصر به فرد این سیستم‌های اندازه‌گیری می‌باشد. در حقیقت اساس شناسایی و سنجش ترکیبات در این سیستم‌ها، اتصال ویژه مولکول هدف مورد اندازه‌گیری به سنسور توسط بیورسپتورها می‌باشد. بیوسنسورها براساس عناصر زیستی شناخته شده نظیر آنزیم‌ها، آنتی‌بادی‌ها، باکتریوفازها و DNA/RNA به عنوان ابزاری جدید برای شناسایی به موقع و زود هنگام بیماری‌های گیاهی معرفی شده‌اند (Fang and Ramasamy 2015).

۴-۱- بیوسنسورهای با پایه آنزیم: آنزیم‌ها رایج‌ترین مولکول‌هایی هستند که به فرم خالص شده در داخل ریزجاندارها یا قسمتی از بافت وجود دارند. این مولکول‌ها پروتیین‌هایی با فعالیت کاتالیزوری بالا بوده و می‌توانند خود را به سوپسترای خاصی متصل سازند. کارایی این مواد در ساخت بیوسنسور مربوط به عمل کاتالیزوری آن‌ها می‌باشند. عملکرد بسیاری از آنزیم‌ها شامل فرآیند اکسید یا احیا است که با روش‌های الکتروشیمیایی قابل آشکارسازی است. عموماً آنزیم‌هایی که برای این منظور استفاده می‌شوند اکسیدوردوکتاز، پلی‌فنول اکسیداز، پراکسیداز و آمینواکسیداز هستند (Mehrotra 2016). مزایایی که این بیوسنسورها دارند این است که به جسم مورد سنجش متصل می‌شوند، از قدرت گزینش بالایی برخوردارند، چون دارای فعالیت کاتالیکی هستند حساسیت را افزایش می‌دهند، عملکرد آن‌ها سریع است و از جمله مواد بیولوژیکی هستند که بیشترین مصرف را دارند. در کنار مزایا دارای معایبی هم هستند از جمله گران قیمت هستند، لذا هزینه‌ی استخراج، جداسازی و خالص‌سازی آنزیم‌ها خیلی بالاست، در برخی موارد ممکن است قیمت منبع آنزیم گران باشد و در دمای بالای ۶۰ درجه سانتی‌گراد غیر فعال شوند (Reyes De Corcuera and Cavalieri 2010).

۴-۲- بیوسنسورهای مبنی بر آنتی‌بادی: به بیوسنسورهای با پایه آنتی‌بادی ایمونوسنسور (Immunosensor) گفته می‌شود. در ایمونوسنسورها معمولاً مبدل‌های نوری یا الکتروشیمیایی به کار می‌روند. آنتی‌ژن‌های ناشناخته را می‌توان با آنتی‌بادی‌های نشاندار تعیین نمود. پیوند آنتی‌بادی با آنتی‌ژن، در مقایسه با پیوند آنزیم با سوپسترای مربوط، بسیار قوی‌تر و اختصاصی‌تر است. از مزایای این بیوسنسورها، قدرت گزینش بالا و تشخیص سریع و حساس دامنه‌ای از انواع بیمارگرها می‌باشد و تشخیص بیمارگرها را در آب، هوا، بذرها در گلخانه و مرحله پس از برداشت قادر می‌سازند و پیوند آن‌ها بسیار قوی است. در حالی که این بیوسنسورها فاقد اثر کاتالیکی هستند (Fang and Ramasamy 2015). با استفاده از این بیوسنسورها بیمارگرهای گیاهی از قبیل ویروس موزائیک لوبیا چشم‌بلبلی (*Cowpea mosaic virus, CoMV*)، ویروس موزائیک خیار (*Cucumber mosaic virus, CMV*)، ویروس موزائیک توتون (TMV)، ویروس موزائیک کاهو (*Lettuce mosaic virus, LMV*) و قارچ‌هایی از جمله *Puccinia striiformis*، *Fusarium culmorum*، *P. infestans* و ویروس‌های آلوده کننده گل ارکیده و *Aspergillus niger* شناسایی شدند (Fang and Ramasamy 2015).

۳-۴- **بیوسنسورهای مبنی بر DNA/RNA:** نوع جدیدی از بیوسنسورها با استفاده از قطعات اسیدهای نوکلئیک برای شناسایی بیمارگرهای گیاهی توسعه یافته‌اند. این نوع بیوسنسورها تشخیص زود هنگام بیماری را قبل اینکه نشانه‌های بیماری ظاهر شود در سطح مولکولی امکان پذیر می‌سازند. مبدل‌های بکار رفته در این بیوسنسورها از نوع الکتروشیمیایی و یا نوری هستند. طبق مطالعات انجام شده دو ویروس مهم گیاه اَرکید (Cymbidium mosaic virus, CymMV) و (Odontoglossum ringspot virus, ORSV) با استفاده از این بیوسنسورها شناسایی شدند (Fang and Ramasamy 2015).

۴-۴- **بیوسنسورهای تشخیص دهنده باکتریوفاژها:** باکتریوفاژها ویروس‌هایی هستند که دارای یک اسید نوکلئیک درونی DNA یا RNA هستند که این ژنوم توسط یک پوشش پروتئینی حفاظتی از خارج احاطه شده است. از باکتریوفاژها برای تشخیص بیمارگرهای گیاهی به دلیل حساسیت بالا، گزینندگی و هزینه کم و توانایی بالای آنها استفاده می‌گردد. بیمارگرهایی از قبیل *Dickeya solani* عامل عفونت باکتریایی در گوجه‌فرنگی و سیب‌زمینی، *Pseudomonas syringae* pv. *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* عوامل شانکر باکتریایی در کیوی و باکتری خاکزاد *Ralstonia solanacearum* عامل پوسیدگی قهوه‌ای سیب‌زمینی با استفاده از چنین بیوسنسورهایی شناسایی شدند (Frampton et al. 2014).

۵-۴- **بیوسنسورهای قابل حمل برای تشخیص سریع ویروس‌های گیاهی**

بیوسنسورهای مبنی بر سلول‌های زنده دارای ویژگی حساسیت بالا، گزینندگی و واکنش سریع در زمان هستند. بیوسنسورهای سلولی براساس اتصال آنتی‌بادی‌های اختصاصی غشای ویروس‌ها توسعه یافته‌اند. طوری که غشای این بیوسنسورها به طور مصنوعی با آنتی‌بادی‌های اختصاصی ویروس‌های گیاهی اشباع شده است. چنین بیوسنسورهایی با روشی به نام تشخیص بیوالکتریکی BERA که بر پایه تغییرات پتانسیل الکتریکی غشا می‌باشد قادر به شناسایی پیکره‌های ویروسی گیاهی هستند. طبق بررسی‌های انجام شده *CMV*، ویروس وای سیب‌زمینی (*Potato virus Y, PVY*) و ویروس خراشک توتون (*Tobacco rattle virus, TRV*) همچنین آلودگی‌های مخلوط این ویروس‌ها در محصولات کدوئیان و بادنجانیان با استفاده از این روش با موفقیت شناسایی شدند (Perdikaris et al. 2011). یکی دیگر از پرکاربردترین روش‌هایی که برای

تشخیص سریع ویروس‌های گیاهی استفاده می‌شود روش رزونانس پلاسمون سطحی (Surface Plasmon Resonance=SPR) است. در این روش روی الکترودهایی از جنس طلا یا نقره یک سری آنتی‌بادی اختصاصی قرار دارد که آنتی‌ژن خاص هدف خود را شناسایی کرده، متصل می‌شوند و پیوند برقرار می‌کنند. از یک منبع نوری به سطح این الکترودها نوری ساطع می‌شود و طول موج نور بازتابیده به یک دستگاه پردازشگر فرستاده می‌شود و نتیجه این واکنش به صورت یک نمودار در کامپیوتر رسم می‌شود. براساس مطالعات و تحقیقات انجام شده ویروس‌هایی از جمله ویروس پیسکی کلروتیک ذرت (*Maize chlorotic mottle virus, MCMV*)، ویروس ایکس سیب‌زمینی (*Potato virus X, PVX*)، *TMV* و *PVY* توسط این روش شناسایی شده‌اند (Gutierrez-Aguirre et al. 2014).

نتیجه‌گیری و پیشنهاد

بیمارگرهای گیاهی خسارت اقتصادی قابل توجهی به صنعت کشاورزی وارد می‌کنند. لذا استفاده از ابزاری حساس و توانمند برای تشخیص سریع عوامل بیماریزا به منظور کاهش تلفات محصولات و کاهش مصرف سموم گران‌قیمت و آسیب‌رسان به محیط زیست ضروری است. انواع مختلف بیوسنسور با توجه به نوع مبدل، نوع عناصر زیستی و روش‌های شناسایی ابداع شده‌اند. اگرچه روش‌های تشخیص مستقیم و غیرمستقیم در حال حاضر در دسترس هستند و به طور گسترده برای تشخیص عوامل بیماریزا و بیماری‌های گیاهی استفاده می‌شوند، اما استفاده از آن‌ها نسبتاً دشوار است و نیازمند تکنسین‌های متخصص هستند و برای آنالیز داده‌ها زمان زیادی نیاز می‌باشد. لذا استفاده از بیوسنسورهای مبنی بر عناصر زیستی به دلیل اختصاصی بودن، سرعت بالا در آنالیز داده‌ها، استفاده آسان و بادوام، قابلیت ردیابی مداوم و تولید در تعداد بیشتر با کمترین هزینه افزایش یافته است، بنابراین استفاده از این بیوسنسورها برای تشخیص سریع بیمارگرهای گیاهی برای کاربردهای مزرعه‌ای پیشنهاد می‌گردد.

References

منابع

1. Cammann K. 1977. Biosensors based on ion-selective electrodes. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 287:1-9.
2. Chaerle L. and Straeten D. V. D. 2000. Imaging techniques and the early detection of plant stress. *Journal of Trends in Plant Science* 5:495-501.

3. Clark M. F. and Adams A. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology* 34:475–483.
4. Conway G. 2013. One billion hungry: can we feed the world?. *Agroecology and Sustainable Food Systems* 37:968–971.
5. Delalieux S., Aardt J. V., Keulemans W., Schrevels E. and Coppin P. 2007. Detection of biotic stress (*Venturia inaequalis*) in apple trees using hyperspectral data: Non-parametric statistical approaches and physiological implications. *European Journal of Agronomy* 27:130–143.
6. Fang Y. and Ramasamy R. P. 2015. Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors* 4:537-561.
7. Fang Y., Umasankar Y. and Ramasamy R. P. 2014. Electrochemical detection of p-ethylguaiacol, a fungi infected fruit volatile using metal oxide nanoparticles. *Journal of Analyt* 139:3804–3810.
8. Frampton R. A., Taylor C., Moreno A. V. H., Visnovsky S. B., Petty N. K., Pitman A. R. and Fineran P. C. 2014. Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. *Applied and Environmental Microbiology* 80:2216–2228.
9. Gutierrez-Aguirre I., Hodnik V., Glais L., Rupar M., Jacquot E., Anderluh G. and Ravnikar M. 2014. Surface plasmon resonance for monitoring the interaction of *Potato virus Y* with monoclonal antibodies. *Analytical Biochemistry* 447:74-81.
10. Jain Y., Rana C., Goyal A., Sharma N., Verma M. L. and Jana A. K. 2010. Biosensors, types and applications, in BEATS. Proceedings the International Conference on Biomedical Engineering and Assistive Technologies, Jalandhar, India, 1-6.
11. Keinan A. and Clark A. G. 2012. Recent explosive human population growth has resulted in an excess of rare genetic variants. *Science* 336:740–743.
12. Mehrotra P. 2016. Biosensors and their applications – A review. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research* 6:153-159.
13. Monosik M., Stredansky M. and Sturdík E. 2012. Biosensors-classification, characterization and new trends. *Acta Chimica Slovaca* 5:109-120.
14. Perdikaris A., Vassilakos N., Yiakoumettis I., Kektsidou O. and Kintzios S. 2011. Development of a portable high throughput biosensor system for rapid plant virus detection. *Journal of Virological Methods* 177:94-99.
15. Reyes De Corcuera J. I. and Cavalieri R. P. 2010. Biosensors. *Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering* 28:173-177.

16. Savary S., Ficke A., Aubertot J. and Hollier C. 2012. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Security* 4:519–537.
17. Vidic J., Manzano M., Chang C. M. and Renault N. J. 2017. Advanced biosensors for detection of pathogens related to livestock and poultry. *Bio. Med. Central* 48:11-22.