مقاله کوتاه

تهیه پادتن چند همسانه‌ای علیه عامل بیماری جاروک لیموترش*

PRODUCTION OF POLYCLONAL ANTISERUM AGAINST THE CAUSAL AGENT OF LIME WITCHES'-BROOM

مهناز میرزائی[۱]، جهانگیرحیدرنژاد[۱]**، محمدصالحی[۲]، اکبرحسینی پور[۱]، حسین معصومی[۱] و مهدی شعبانیان[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۷/۱۰/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۸/۲۰)

چکیده

بیماری جاروک لیموترش که توسط *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* ایجاد می‌گردد، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های لیموترش دراستان‌های جنوبی ایران است. برای تهیه پادتن علیه عامل جاروک لیموترش، رگبرگ لیموترش آلوده با استفاده از بافر GMS هموژنیزه شده و آموده به صورت افتراقی سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل پس از تیمار با پادتن تولید شده بر علیه پروتئین‌های گیاه سالم، مجدداً تحت سانتریفیوژ افتراقی قرار گرفت و آموده حاصل بعد از اختلاط با آجوانت ناقص به خرگوش تزریق شد. گاماگلوبولین استخراج شده از آنتی سرم درآزمون سرولوژیکی الایزای غیرمستقیم در رقت ۱/۱۰۰ با رقت ۱/۵۰۰ عصاره گیاه آلوده بهترین واکنش را نشان داد. علاوه بر این در آزمون دیبا رقت ۱/۱۰۰ پادتن استخراج شده با رقت‌های۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ عصاره گیاه آلوده لیموترش واکنش نشان داد، در حالی‌که بین عصاره گیاه سالم لیموترش و پادتن استخراج شده واکنشی دیده نگردید. پادتن تهیه شده بر علیه عامل جاروک لیموترش می‌تواند برای ردیابی بیماری در طبیعت استفاده شود.

واژه‌های کلیدی: جاروک لیموترش، پادتن چند همسانه‌ای، دیبا، الایزا

Archive of SID

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: jheydarnejad@mail.uk.ac.ir

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار، دانشیار و مربی بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید باهنر کرمان

۲. استادیار پژوهشی بیماری‌شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی فارس، زرقان

www.SID.ir

مقدمه

بیماری جاروک لیموترش یکی از بیماری‌های مهم لیموترش در استان کرمان است. این بیماری اولین بار از استان سیستان و بلوچستان درسال ۱۳۷۶ و سپس از استان‌های هرمزگان و کرمان (کهنوج وجیرفت) گزارش گردید. در حال حاضر اپیدمی شدید این بیماری دراستان‌های آلوده وجود دارد و سایر مناطق لیموکاری در جنوب ایران را نیز به شدت تهدید می‌کند (Salehi *et al.* 1997 2002). این بیماری قبل از ایران از دو کشور همسایه عمان و امارات نیز گزارش شده بود (Garnier *et al.* 1991). فیتوپلاسمای عامل بیماری جاروک لیموترش، پس از تعیین خصوصیات، در گروه خود (16 SrII) به عنوان گونه کاندید به نام *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia توصیف گردید (Zreik *et al.* 1995).

از آنجا که بیماری جاروک لیموترش یکی از بیماری‌های مهم مناطق مرکبات خیزجنوب و جنوب شرق ایران است، لازم است در جهت کاهش خسارت و جلوگیری از توسعه بیماری اقداماتی صورت گیرد. اولین گام در جهت کنترل این بیماری استفاده از روش‌های سریع و حساس تشخیص عامل بیماری است. آزمون‌های سرولوژیکی با استفاده از پادتن‌های چند همسانه‌ای ضمن ساده بودن، به امکانات متعددی نیز نیاز ندارد. از این روش برای شناسایی چندین بیماری فیتوپلاسمایی در جهان مثل فیلودی باقلا، جاروک بادام زمینی (Saeed *et al.* 1993) فیلودی شبدر(Clark *et al.* 1983) استفاده شده است. در ایران نیز این روش برای شناسایی و تفکیک عوامل جاروک یونجه دراستان های فارس و یزد (Salehi & Izadpanah 2000, Esmailzadeh-Hosseini *et al.* 2003) و عوامل فیتوپلاسمایی برگ سفید مرغ و نیشکر از استان خوزستان (Biabani *et al.* 2005) استفاده گردیده است. روش‌های مولکولی بخصوص آزمون PCR به مراتب حساس‌تر و دقیق‌تر از آزمون‌های سرولوژیکی است، ولی ردیابی و تشخیص با استفاده از این آزمون علاوه بر پرهزینه بودن، به امکاناتی احتیاج دارد که تهیه آن برای تمام مراکز امکان‌پذیر نیست. از طرف دیگر، استفاده از پادتن چند همسانه‌ای هنوز برای تشخیص عامل بیماری جاروک لیموترش مورد بررسی قرار نگرفته است. هدف ار این تحقیق تهیه پادتن چند همسانه‌ای بر علیه عامل این بیماری و بررسی اختصاصی بودن پادتن به دست آمده در مقایسه با عوامل چند بیماری فیتوپلاسمایی دیگر است.

روش بررسی

در سال‌های ۸۴-۸۳ از مناطق آلوده به بیماری جاروک لیموترش در استان کرمان بازدید به عمل آمد. نمونه‌هایی از درختان لیموترش با علائم جاروک و درختان سالم از باغ‌های مرکبات منطقه جهادآباد جیرفت تهیه و پس از انتقال به آزمایشگاه، تا زمان جداسازی عامل بیماری در دمای $4^{\circ}C$ نگه‌داری شدند. آلودگی و عدم آلودگی نمونه‌های مورد استفاده توسط آزمون PCR با استفاده از آغازگرهای (Deng & Hiruki 1991, Schneider *et al.* 1995) P1/P7 بررسی گردید. خالص‌سازی فیتوپلاسما از نمونه‌های لیمو ترش با استفاده از روش *سعید و همکاران* (Saeed. *et al.* 1993) به صورت زیر انجام گرفت: بیست گرم رگبرگ برگ سالم لیموترش با استفاده از پنج برابر حجم بافر GMS (حاوی گلیسین ۰/۳ مولار pH ۸، $MgCl_2$ و Na_2SO_4 با غلظت۰/۰۲ مولار) در دستگاه مخلوط کن هموژنیزه شد. پس از فیلتر کردن رگبرگ‌های هموژنیزه شده با پارچه ململ استریل، نمونه به دست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰*g* سانتریفیوژ گردید. رونشین در ۳۹۰۰۰*g* به مدت یک ساعت سانتریفیوژ شد. درمرحله بعد رونشین حذف و رسوب در بافر GMS (یک میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰ گرم بافت) حل گردید. آموده به دست آمده جهت تهیه آنتی سرم بر علیه پروتئین‌های گیاهی سالم با حجم مساوی روغن اجوانت ناقص مخلوط و در ۴ نوبت متوالی به طور یک درمیان (در فواصل ۷ روز) به ماهیچه پای عقبی و زیر پوست پشت گردن خرگوش تزریق شد. در مرحله بعد آنتی سرم تهیه شده بر علیه پروتئین‌های گیاه سالم جدا گردید. برای تهیه پادتن بر علیه عامل بیماری، ابتدا

Archive of SID

www.SID.ir

خالص‌سازی بافت آلوده، مشابه بافت سالم انجام شد. سپس آموده حاصل با پادتن به دست آمده بر علیه پروتئین‌های گیاه سالم مخلوط و به مدت یک شب در $4^{\circ}C$ نگه‌داری شد. مخلوط فوق به مدت ۱۵ دقیقه در $2000g$ سانتریفیوژ شد. بعد از حذف رسوب، رونشین با استفاده از بافر GMS، رقیق شده و به مدت یک ساعت در $39000g$ سانتریفیوژ شد. رونشین حذف و رسوب در بافر PBC، ۰/۰۱ مولار، pH ۷/۴ (یک میلی‌لیتر بافر به ازای هر ۲۰ گرم بافت) به حالت سوسپانسیون درآمد. آموده به دست آمده جهت تهیه آنتی سرم برعلیه فیتوپلاسمای همراه بیماری جاروک لیموترش به خرگوش تزریق گردید. این مراحل در سه نوبت دیگر برای تزریق هفتگی نمونه حاصل انجام شد. آنتی‌سرم به دست آمده با عصاره گیاه سالم جذب شده و سپس خالص‌سازی گاماگلوبولین از ستون سلولز انجام گرفت. خالص‌سازی گاماگلوبولین و مراحل آزمون الایزای غیر مستقیم به منظورتعیین آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده بر اساس روش ارائه شده توسط *کلارک و آدامز* (Clark & Adams. 1977) انجام شد. ارزیابی نتایج بر اساس تغییر رنگ چاهک با استفاده از دستگاه الایزاخوان مدل EL800 (Biotek Instrument) با طول موج ۴۰۵ نانومتر صورت گرفت. ابتدا رقت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ آنتی‌سرم تهیه و با رقت‌های ۱/۲۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ عصاره گیاهان آلوده به جاروک لیموترش واکنش داده شدند. میزان جذب نمونه‌های سالم و آلوده لیموترش مورد مقایسه قرار گرفت. به منظور بررسی درجه اختصاصی بودن پادتن تهیه شده در این مطالعه، رقت ۱/۱۰۰ عصاره گیاهان آلوده کنجد، گوجه، کدو، و دو نمونه گیاه پروانش آلوده تهیه گردید. گیاهان کنجد، گوجه و کدو از مزارع استان کرمان جمع‌آوری شدند. منشاء آلودگی دو نمونه گیاه پروانش زنجرک‌هایی بودند که از مزارع کنجد منطقه جیرفت و شهداد جمع‌آوری شده بودند (Omidi *et al.* 2005). قبلاً آلودگی فیتوپلاسمایی تمامی این گیاهان با آزمون PCR به اثبات رسیده بود. در نهایت رقت‌های ۱/۲۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ عصاره این گیاهان وگیاه آلوده لیموترش، با رقت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ از پادتن تهیه شده در این آزمایش واکنش داده شد و میزان جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر برای هر یک ثبت گردید. این آزمایش در چند تکرار انجام شد و در آخر برای هر واکنش میانگین گرفته شد. آزمون دیبا طبق روش ارائه شده توسط *هیبی و سایتو* (Hibi and Saito, 1985) با تغییراتی انجام شد. در این روش رقت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ از عصاره گیاه آلوده به بیماری جاروک لیموترش و رقت ۱/۱۰۰ از عصاره پروانش آلوده به دو فیتوپلاسما با منشاء جیرفت و شهداد و رقت ۱/۱۰۰ از پادتن تولید شده در این تحقیق روی کاغذ نیتروسلولزی در آزمون سرولوژیکی دیبا مورد بررسی قرار گرفت. جهت مقایسه، رقت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ عصاره لیمو ترش سالم با رقت ۱/۱۰۰ پادتن به دست آمده در این تحقیق واکنش داده شد. ایجاد لکه‌های بنفش، در مقایسه با لکه‌های بی رنگ گیاه سالم به عنوان واکنش مبثت ارزیابی گردید.

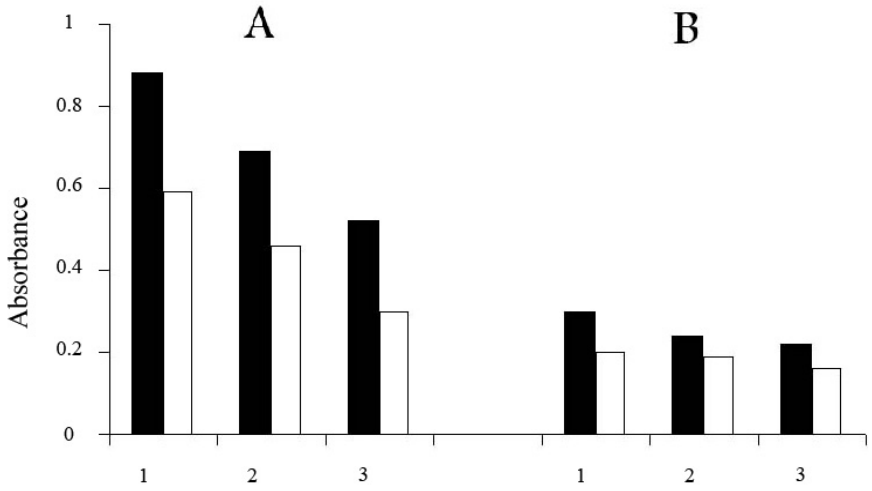
نتایج و بحث

آنتی‌سرم تهیه شده علیه فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک لیموترش توسط آزمون الایزای غیر مستقیم در رقت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ با رقت‌های ۱/۲۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ عصاره گیاه آلوده مورد بررسی قرار گرفت. علی‌رغم این‌که قبلا عمل ترکیب پادتن با عصاره گیاه سالم(Cross absorption) انجام شده بود در رقت‌های مختلف آنتی‌ژن و پادتن به خصوص در رقت ۱/۵۰۰ پادتن، با گیاه سالم واکنش دیده شد (شکل ۱).

اختلاف میزان جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر بین نمونه‌های سالم و آلوده در رقت ۱/۵۰۰ پادتن در مقایسه با رقت ۱/۱۰۰ کمتر بود (شکل ۱). از طرف دیگر ازمیان سه رقت ۱/۲۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ آنتی‌ژن، بهترین رقت ۱/۵۰۰ تعیین گردید. در این رقت میزان جذب نور بین نمونه‌های آلوده و سالم تقریباً دو برابر بود. بنابراین می‌توان گفت که بهترین رقت پادتن چند همسانه‌ای که در این تحقیق تهیه شده بود ۱/۱۰۰ و بهترین رقت عصاره گیاه لیموترش آلوده برای ارزیابی آلودگی یا عدم آن، رقت ۱/۵۰۰ می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir



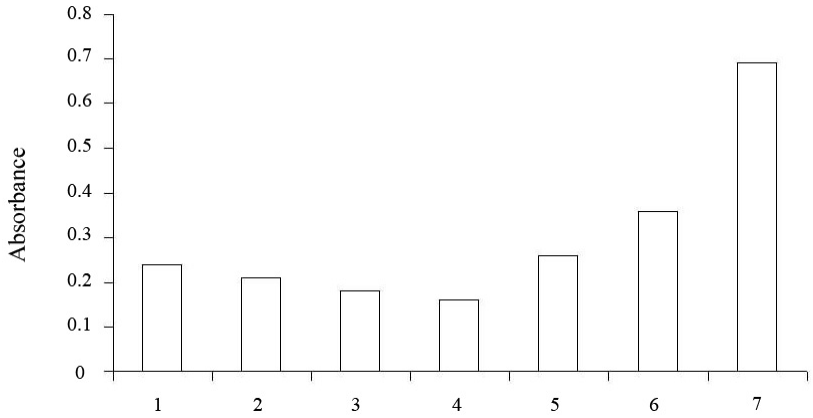
شکل ۱. نتایج آزمون الایزا با استفاده از پادتن چند همسانه‌ای به منظور تشخیص نمونه‌های آلوده به بیماری جاروک لیموترش. A وB به ترتیب رقت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ آنتی‌سرم، 1، 2 و 3 به ترتیب رقت‌های ۱/۲۰، ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ آنتی‌ژن می‌باشند. ستون سیاه گیاهان آلوده به جاروک لیموترش و ستون سفید گیاهان سالم لیموترش را نشان می‌دهد.

Fig. 1. Detection of lime witches' broom (LWB) infected samples by ELISA using polyclonal antiserum raised against the phytoplasma associated with the LWB disease. A and B, dilutions of 1/100 and 1/500 of antiserum, respectively; 1, 2 and 3, dilutions of 1/20, 1/100 and 1/500 of antigen, respectively; black, LWB infected plant; white, control healthy plant.

پادتن چند همسانه‌ای تهیه شده علیه عامل بیماری جاروک لیموترش با عصاره چند گیاه آلوده به بیماری فیتوپلاسمایی در آزمون الایزای غیر مستقیم بررسی شد. ابتدا رقت ۱/۱۰۰ عصاره گیاهان آلوده کنجد، گوجه، کدو، دو نمونه گیاه آلوده پروانش و عصاره گیاه آلوده به جاروک لیموترش، با رقت ۱/۱۰۰ از پادتن تهیه شده در این آزمایش واکنش داده شدند. پادتن تهیه شده به خوبی قادر به تشخیص گیاه لیموترش آلوده به بیماری جاروک لیموترش بود، اما واکنش ضعیفی با عصاره گیاهان آلوده کنجد، گوجه و کدو دیده شد. به عبارت دیگر میزان جذب نور آنها کمتر از نصف میزان جذب عصاره گیاه سالم لیموترش می‌باشد (شکل ۲). اما میزان جذب واکنش بین پادتن و عصاره گیاهان آلوده پروانش با منشاء جیرفت و خصوصاً پروانش با منشاء شهداد (Omidi *et al.*, 2005) بیشتر از میزان جذب واکنش‌های بین پادتن و عصاره گیاه لیموترش سالم است. این یافته ممکن است ناشی از نزدیکی تاکسونومیکی عامل جاروک لیموترش و عامل بیماری گیاه آلوده پروانش با منشاء شهداد باشد. در بررسی که به همین منظور انجام گرفت ترادف نوکلئوتیدی ناحیه ۳۰۰ جفت بازی بین ژن‌های آر.ان.ای ریبوزومی ۱۶S و ۲۳S گیاه پروانش آلوده با منشاء شهداد به میزان ۹۹/۷ با ترادف همین ناحیه در فیتوپلاسمای عامل peanut witches'-broom از گروه 16 SrII مشابه بود (Omidi unpublished). بر این اساس فیتوپلاسماهای همراه بیماری در گیاهان لیموترش و پروانش با منشاء شهداد هر دو از گروه 16 SrII بوده و بنابراین از لحاظ تاکسونومیکی به هم نزدیک هستند. این نتایج نشان می‌دهد که در تهیه پادتن‌های چند همسانه‌ای هرچه فیتوپلاسماهای عامل بیماری از نظر تاکسونومیکی به هم نزدیک‌تر باشند، احتمالاً از نظر سرولوژیکی نیز این ارتباط را نشان خواهند داد.

رقت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ عصاره گیاه آلوده لیموترش و رقت ۱/۱۰۰ عصاره پروانش آلوده به فیتوپلاسمای با منشاء شهداد با رقت ۱/۱۰۰ پادتن تهیه شده واکنش نشان دادند. محل واکنش روی کاغذ نیتروسلولز به رنگ قرمز تیره در آمد. در حالی‌که رقت‌های ۱/۱۰۰ و ۱/۵۰۰ عصاره گیاه سالم و رقت ۱/۱۰۰ عصاره پروانش آلوده به فیتوپلاسمای با منشاء جیرفت

Archive of SID
www.SID.ir



شکل ۲. واکنش عصاره گیاهان آلوده به فیتوپلاسما شامل کنجد (2)، گوجه فرنگی (3)، کدو (4)، پروانش آلوده به یک فیتوپلاسما از منطقه جیرفت (5)، پروانش آلوده به یک فیتوپلاسما از منطقه شهداد (6)، لیموترش آلوده (7) و گیاه سالم لیموترش (1) در مقابل آنتی‌سرم چند همسانه‌ای علیه فیتوپلاسمای همراه با بیماری جاروک لیموترش در آزمون الایزای غیرمستقیم. رقت پادتن و عصاره‌های مورد استفاده ۱/۱۰۰ می‌باشد.

Fig. 2. Reaction of several phytoplasma infected plant samples to polyclonal antiserum raised against the phytoplasma associated with the lime witches'-broom (LWB) disease in indirect ELISA using 1/100 dilution of antiserum and antigen. 1, healthy lime; 2, sesame; 3, tomato; 4, zucchini squash; 5, infected periwinkle by a leafhopper collected from Jiroft; 6, infected periwinkle by a leafhopper collected from Shahdad; 7, LWB infected sample.

هیچ واکنشی بارقت ۱/۱۰۰ پادتن نشان نداد. نتایج آزمون سرولوژیکی دیبا مشابه آزمایش سرولوژیکی الایزای غیر مستقیم بوده و آن را تأیید نمود.

در مجموع پادتن‌های چند همسانه‌ای که بر علیه فیتوپلاسماهای بیمارگر گیاهی تولید شده‌اند، تا حدودی با عصاره گیاه سالم نیز واکنش می‌دهند. یکی از دلایل این امر می‌تواند غیر قابل کشت بودن و در نتیجه مشکل بودن خالص‌سازی این موجودات باشد. بنابراین به علت وجود اجزای گیاهی، آموده تهیه شده از آنها از خلوص بالایی برخوردار نیست. علی‌رغم جذب پادتن‌های مربوط به گیاه سالم، هنوز در آزمون الایزا مقداری واکنش بین عصاره گیاه سالم و این پادتن‌ها مشاهده گردید. با این وجود، پادتن تهیه شده در این بررسی درجه نسبتاً بالائی از اختصاصی بودن را نشان داد و می‌توان از آن برای تشخیص سرولوژیکی فیتوپلاسمای جاروک لیموترش استفاده کرد. بر اساس نتایج *سعید و همکاران* (1993) با تهیه قسمت F(ab')2 پادتن می‌توان اختصاصی بودن پادتن را بالا برد. در نهایت می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که پادتن‌های چند همسانه‌ای برای ردیابی فیتوپلاسماهای عامل بیماری فقط در مورد فیتوپلاسماهایی کاربرد دارد که از نظر تاکسونومیکی دور از همدیگرند. بر اساس گزارش *لی و داویس* (Lee & Davis 1992) برای جداسازی فیتوپلاسمای نزدیک به هم پادتن‌های تک همسانه‌ای مفید است. از آنجایی که تهیه آنتی سرم چند همسانه‌ای به امکانات اندکی نیاز دارد، می‌توان تعداد زیادی گیاه را سریع و آسان مورد بررسی قرار داد. از طرف دیگر چنین تکنیکی می‌تواند به عنوان ابزار مفیدی برای تشخیص ناقلین فیتوپلاسماها مورد استفاده قرار گیرد. این در صورتی است که از حشرات ناقل به عنوان آنتی‌ژن و از گیاهان برای تهیه پادتن استفاده شود در این حالت واکنش‌های بین آنتی‌سرم و آنتی‌ژن‌های گیاهی هم کمتر است (Saeed *et al.* 1993).

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (44–43) متن انگلیسی مراجعه می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir