نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۷، شماره ۱، بهار ۱۳۹۲، ص. ۱۴۱-۱۳۹

Journal of Plant Protection
Vol. 27, No. 1, Spring 2013, P. 139-141

مقاله کوتاه پژوهشی

تشخیص مولکولی *Spiroplasma citri* در برخی ارقام مرکبات با استفاده از آزمون PCR در مقایسه با DAS- ELISA

کبری مسلم خانی[1*]- راحله شهبازی[2]

تاریخ دریافت:۱۳۹۱/۷/۴
تاریخ پذیرش:۱۳۹۱/۱۱/۹

چکیده

Spiroplasma citri عامل بیماری استابورن از عوامل بیماریزای مهم در صنعت مرکبات ایران است. یکی از مهمترین روش های کنترل این بیماری معرفی درختان مادری، مواد تکثیر شونده رویشی و نهالستان های سالم به منظور ممانعت از استقرار منابع آلوده در باغات تازه احداث می باشد. در همین راستا توان ردیابی دو روش تشخیصی ELISA با استفاده از آنتی بادی پلی کلنال و PCR با استفاده از سه جفت آغازگر مختلف مقایسه و بررسی گردید. نتایج، عدم کارامدی روش ELISA در تشخیص آلودگی های پنهان (در گیاهان فاقد علائم بیماری) و تیتر های پایین بیمارگر را نشان داد و استفاده از این روش تشخیصی در سیستم گواهی سلامت نهال، اشکالات قابل تاملی از جمله واکنش منفی دروغین را به همراه خواهد داشت. آزمون PCR و مشخصا آغازگر P89f/r در مقایسه با دو جفت آغازگر P58-1f/5r و P58-6f/4r در خصوص استرین های ایرانی اعم از جدایه های جنوب و شمال ایران با موفقیت آلودگی را در غلظت های بسیار پایین و در فصول معتدل سال ردیابی می نماید. در این بررسی با استفاده از آزمون PCR و آغازگر P89f/r، از بین ۳۵۰ نهال از ارقام مختلف مرکبات، ۴/۶ درصد آن ها که فاقد علائم تیپیک بیماری بودند، آلوده تشخیص داده شدند.

واژه های کلیدی: *Spiroplasma citri*، ELISA، PCR، مرکبات، تشخیص

مقدمه

Spiroplasma citri عامل بیماری استابورن مرکبات که عمدتا در غلظت های پایین و بصورت پراکنده در آوند های آبکشی گیاهان آلوده وجود دارد در اکثر مناطق مرکبات خیز دنیا و ایران گزارش شده است (۱۰ و ۳). عدم ظهور علائم بیماری در دماهای پایین (۳) نقش مهمی در پراکنش بیماری از طریق مواد گیاهی تکثیر شونده ایفا می نماید لذا استفاده از روش های تشخیصی دقیق که در فصول مختلف سال در ردیابی بیمارگر موفق عمل نماید در مراحل صدور گواهی سلامت نهال و مواد تکثیری بسیار حائز اهمیت است (۴ و ۷). تا کنون روش های متعددی برای ردیابی *S. citri* مورد استفاده قرار گرفته اند که هر کدام مزایا و معایبی به همراه داشته اند از جمله آنها می توان به استفاده از ایندکس های بیولوژیک (۱)، کشت، روش های سرولوژیک (۷) و روش های مبتنی بر تشخیص DNA اشاره نمود (۳ و ۸). آزمون PCR با استفاده از پرایمر های طراحی شده بر پایه توالی ژن های مختلف مانند اسپیرالین و ژن های چسبندگی که در انتقال اسپیروپلاسما به وسیله حشرات ناقل نقش اساسی دارند (۹) استفاده شده است. با توجه به اینکه برخی روش های تشخیصی به دلیل وجود تنوع در استرین های مختلف *S. citri* و همچنین غلظت پایین بیمارگر در گیاه آلوده کارایی لازم را برای ردیابی دقیق ندارند (۸) لذا در تحقیق حاضر علاوه بر بهینه سازی روش تشخیص *S. citri* در نهالستان ها و مواد تکثیری در فصل پاییز، دقت و حساسیت دو روش DAS-ELISA و PCR (با ترکیبات مختلف پرایمری) در ردیابی این عامل مقایسه گردید.

مواد و روش ها

نمونه برگی از درختان پرتقال آلوده به *S. citri* واقع در استان های کرمان و مازندران تهیه شد و جهت بهینه سازی شرایط آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. نمونه برداری از نهال های ارقام مختلف مرکبات شامل Washington Navel foyos، Okitsu، Washington Navel، Navel late، Navelina، fukumoto، Clementine Marisol، Valencia late، Clemantin

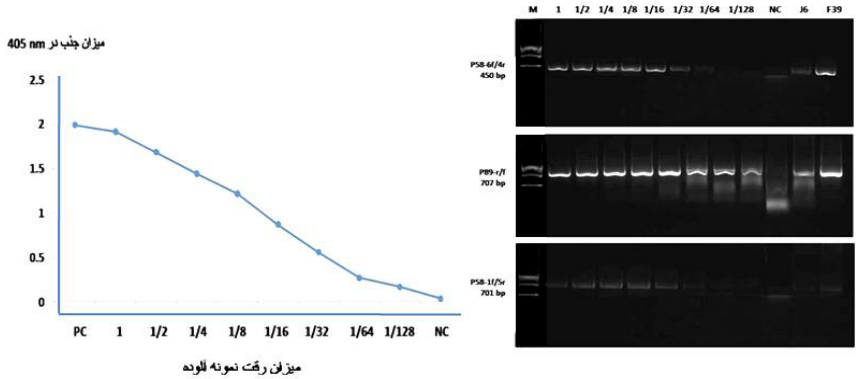
۱ و۲- استادیار و کارشناس ارشد موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال
(*- نویسنده مسئول: Email: Moslemkhany@yahoo.com)

Delta seed less، Lime Bears، clime new less، Hashimoto، Navelina انجام شد و سپس از نظر آلودگی به *S. citri* بررسی گردیدند.

آزمون سرولوژیکی DAS-ELISA برای تشخیص *S. citri* با استفاده از کیتهای سرولوژیکی (Agdia, USA) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. استخراج DNA از رگبرگ نمونه های گیاهی با استفاده از کیت استخراج DNA (Fermentas, Lithuania) طبق دستورالعمل شرکت صورت گرفت. آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگر های P89r/f، P58-1f/5r و P58-6f/4r با تغییراتی در روش یوکومی و همکاران (۸) انجام شد. به منظور اثبات صحت نتایج PCR و اجتناب از واکنش مثبت دروغین، محصول جفت آغازگر P89r/f پس از خالص سازی، جهت توالی یابی به شرکت MWG آلمان ارسال گردید. توالی های بدست آمده در پایگاه اطلاعاتی NCBI با برنامه Blast با ترادف های موجود در Gen Bank مقایسه شدند. برای بررسی و مقایسه دقت آزمون های DAS-ELISA و PCR ، ۱۰ سری رقت از سوسپانسیون نمونه های آلوده تهیه و در آزمون های مذکور استفاده گردید. همچنین با استفاده از سری رقت های ۱:۲ دقت تشخیصی آغازگر های مختلف مقایسه گردید. سپس از این آزمون ها برای بررسی آلودگی ۳۵۰ نهال از ارقام مختلف در جنوب و شمال ایران استفاده شد.

نتایج و بحث

حساسیت آزمون های ELISA و PCR با استفاده از سری رقت های نمونه آلوده مقایسه گردید. با استفاده از آزمون DAS-ELISA نمونه های آلوده به *S. citri* تنها تا رقت 10^{-3} مثبت ارزیابی شد در حالیکه آزمون PCR با دقت بسیار بالاتری از DAS-ELISA تا رقت 10^{-6} قادر به ردیابی آلودگی و شناسایی آلودگی پنهان در نمونه های جدا شده از جنوب و شمال ایران شد. برخی از نمونه های آلوده دارای علائم و کلیه نمونه های آلوده فاقد علائم در آزمون ELISA هیچ نوع واکنش مثبتی نشان ندادند. نتایج تحقیقات وانگ و همکاران (۷) نیز کارایی پایین روش ELISA و واکنش کاذب منفی و یا مثبت را از عوامل محدود کننده استفاده از آن بیان کردند. استفاده از این روش خصوصا در مطالعات اپیدمیولوژیک و فرایند صدور گواهی سلامت دقت کافی در ردیابی تیتر های پایین آلودگی را ندارد (۷). روش ELISA قادر به شناسایی ۱۰ng پروتئین *S. citri* است در حالیکه برای ردیابی دقیق و صحیح غلظت های پایین بیمارگر در بافت برگ، حساسیتی در حد ردیابی ۱ng پروتئین بیمارگر لازم است. حتی در درختان با علائم نسبتا شدید نیز تکرار نتایج ELISA ثبات ندارد و گاها نتایج منفی حاصل می گردد (۶) لذا استفاده از روش تشخیصی ELISA برای ردیابی *S. citri* در شرایط پنهان مناسب نمی باشد. آزمون PCR با استفاده از سه جفت آغازگر P89r/f ، P58-1f/5r و P58-6f/4r در ردیابی جدایه های ایرانی *S. citri* موفق عمل نمود و به ترتیب قطعه اختصاصی ۷۰۷ bp، ۷۰۱ bp و ۴۵۰ bp با استفاده از این آغازگرها در نمونه های آلوده مورد ارزیابی بدست آمد. انتخاب نوع آغازگر در دقت آزمون PCR اهمیت بسیار بالایی دارد به نحوی که آغازگر های P89r/f در مقایسه با آغازگر های P58-1f/5r و P58-6f/4r نه تنها در رقت های بسیار پایین قادر به ردیابی آلودگی در عصاره گیاه آلوده است بلکه به راحتی آلودگی های پنهان را در نهال های آلوده بدون علائم تشخیص داد. آغازگر های P58-1f/5r و P58-6f/4r تنها تا رقت ۱/۶۴ آلودگی را ردیابی نمود که در مقایسه با آزمون ELISA که قادر به تشخیص آلودگی تا رقت ۱/۱۲۸ بود از دقت کمتری برخوردار است (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه توان تشخیصی آغازگر های مختلف در آزمون PCR در مقایسه با آزمون DAS-ELISA. M: 1 kb Ladder، NC: کنترل منفی، J6 و F39: کنترل مثبت

با توجه به استقرار ژن Adhesion-related protein (P89) روی پلاسمید و ژنوم باکتری، امکان ردیابی جمعیت های اندک بیمارگر از طریق ردیابی این ژن فراهم می گردد. البته آغازگر های P58 مربوط به Putative adhesion نیز در چند کپی روی ژنوم *S. citri* مستقر هستند (۲) اما تنوع ژنتیکی در جمعیت های این بیمارگر بسته به نوع استرین کارایی تشخیصی آغازگر های P58 را تغییر می دهد (۸).

به دلیل تیتر پایین *S. citri*، استفاده از آغازگر هایی که فقط در یک کپی روی کروموزوم قرار دارد تنها در ماه های بسیار گرم تابستان که غلظت بیمارگر به بیشترین حد خود می رسد کارایی لازم را دارد (۵). در ارزیابی صورت گرفته روی ۳۵۰ عدد نهال از ارقام مختلف مرکبات، دو نهال Washington navel foyos، پنج نهال Navel late، یک نهال Navelina و هشت نهال Fukumoto که فاقد علائم بیماری بودند با استفاده از تکنیک PCR و آغازگر P89r/f مثبت ردیابی شد. به منظور اطمینان از صحت نتایج و عدم وجود نتایج مثبت دروغین، قطعه تکثیر شده در تعدادی از نمونه ها توالی یابی گردید. نتایج توالی ها مشابهت ۹۶ درصد با توالی استرین های *S. citri* موجود در بانک اطلاعاتی ژن را نشان داد. نتایج این ارزیابی با آزمون ELISA در تمام نمونه ها به استثنای کنترل مثبت منفی بود. در مجموع پراکنش بیماری استابورن در باغات جوان بسیار سریع و در خور توجه است و با توجه به حساسیت تعداد زیادی از ارقام مختلف مرکبات به این بیماری و دامنه میزبانی نسبتا وسیع *S. citri*، در صورت وجود منبع آلودگی در یک باغ تازه احداث، گسترش بیماری به سایر درختان به عنوان یک ریسک اقتصادی مهم مطرح است که استفاده از نهال و مواد تکثیری گواهی شده گام موثری در کنترل گسترش روز افزون این بیماری به شمار می رود.

منابع

1- Calavan E.C., and Christiansen D.W. 1965. Rapid indexing for stubborn disease of citrus. Phytopathology, 55: 1053.

2- Comer J., Fletcher J., Davis R.E., and Melcher U. 2007. Evolution of the spiroplasma P58 multigene family. Biochemical Genetics. 45:25-32.

3- Mello A.F.S., Yokomi R.K., Payton M.E., and Fletcher J. 2010. Effect of citrus stubborn disease on navel orange production in a commercial orchard in California. Journal of Plant Pathology, 92: 429-438.

4- OEPP/EPPO .1995. Certification schemes No. 12. Pathogen-tested citrus trees and rootstocks. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 25.

5- Foissac X., Saillard C., Gandar J., Zreik L., and Bové J. M. 1996. Spiralin polymorphism in strains of *Spiroplasma citri* is not due to differences in posttranslational palmitoylation. Journal of Bacteriology, 178:2934-2940.

6- Saillard C., Garcia-Jurado O., Bove J.M., Vignault J.C., Moutous G., Fos A., Bonfils J., Nhami A., Vogel R., and Viennot-Bourgin G. 1980. Application of ELISA to the detection of *Spiroplasma cirri* in plants and insects, p. 145-52. In: Eighth IOCV Conference.

7- Wang J., Huang H., Feng Q., Liang T., Bi K., Gu W., Wang W., and Shield J.D. 2009. Enzyme-Linked immunosorbent assay for the detection of pathogenic spiroplasma in commercially exploited crustaceans from China. Aquaculture, 292:166-171.

8- Yokomi R.K., Mello A.F.S., Saponari M., and Fletcher J. 2008. Polymerase Chain Reaction-Based Detection of *Spiroplasma citri* Associated with Citrus Stubborn Disease. Plant Disease, 92:2253-2260.

9- Yu J., Wayadande A.C., and Fletcher J. 2000. *Spiroplasma citri* Surface Protein P89 Implicated in Adhesion to Cells of the Vector Circulifer tenellus. Phytopatholog, 90: 716-722

10- Nejat N., Salehi M., Fayyazi M., and Izadpanah K. 2007. Survey of sweet orange cultivars for stubborn disease resistance in Iran. Bulletin of Insectology, 60: 305-306 .