

ارتباط سرولوژیکی میان سه استرین فیتوپلاسمایی از گروه 16SrII در ایران

مجید صیام‌پور^{۱*} و کرامت‌الله ایزدپناه^۲

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۸/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۱/۲۸)

چکیده

فیتوپلاسم‌ها شامل گروهی از بیمارگرهای مهم گیاهی از رده مولیکوتها هستند. در این مطالعه ارتباط سرولوژیکی سه فیتوپلاسم‌ها از گروه 16SrII شامل فیتوپلاسم‌های جاروک لیموترش (زیر گروه 16srII-B)، جاروک یونجه (زیر گروه 16SrII-C) و فیلودی خیار (زیر گروه 16SrII-D) مورد بررسی قرار گرفت. در این ارتباط از آنتی سرم نو ترکیب تولید شده بر علیه پروتئین غشاء فیتوپلاسمی جاروک لیموترش در الیزای غیر مستقیم استفاده شد. آنتی سرم مذکور قادر به شناسایی نمونه‌های پروانش آلوده به فیتوپلاسمی جاروک لیموترش و فیتوپلاسمی جاروک یونجه (با میانگین جذب نوری کمتر) بود لکن بین میانگین جذب نوری عصاره گیاه آلوده به فیتوپلاسمی جاروک لیموترش و خیار و گیاه سالم تفاوت معنی داری مشاهده نشد. هنگامی که در آزمون الیزا از آنتی سرم فیتوپلاسمی جاروک یونجه استفاده شد، میانگین جذب عصاره گیاه مبتلا به فیتوپلاسمی خودی بیشتر از میانگین جذب عصاره آلوده به فیتوپلاسمی جاروک لیموترش بود. با توجه به این نتایج، دو فیتوپلاسمی جاروک لیموترش و جاروک یونجه با یکدیگر ارتباط سرولوژیکی داشتند هر چند مقادیر جذب نوری در آزمون الیزا بین این دو فیتوپلاسم‌ها از نظر آماری متفاوت بود. در این مطالعه نتایج بدست آمده در آزمون الیزا با نتایج آزمون لکه برداری و سترن مقایسه شد و ارتباط آن با تنوع ژنتیکی ژن Imp مورد بحث قرار گرفته است. با توجه به اهمیت تعیین ارتباط سرولوژیکی بین فیتوپلاسم‌ها برای شناسایی گونه‌های جدید، احتمال می‌رود که فیتوپلاسم‌های زیر گروه 16SrII-B (جاروک لیموترش) و فیتوپلاسم‌های زیر گروه 16SrII-D متعلق به گونه‌های متفاوتی باشند. با این وجود برای اثبات این فرضیه به شواهد بیشتری نیاز است.

کلیدواژه: فیتوپلاسم، سرولوژی، پروتئین غشاء، فیلودی، جاروک

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: siampour@agr.sku.ac.ir

۱. استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

۲. استاد مرکز تحقیقات ویروس شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

Serological relationship among three phytoplasma strains belonging to the group 16SrII in Iran

M. Siampour and K. Izadpanah^{1*}

(Received: 31.10.2016; Accepted: 16.2.2017)

Abstract

Phytoplasmas are among the most important plant pathogens belonging to the class *Mollicutes*. In this study the serological relatedness of three 16SrII- related phytoplasmas including lime witches' broom (LWB; 16SrII-B), alfalfa witches' broom (AlfWB, 16SrII-C) and cucumber phyllody (CuPh; 16SrII-D) phytoplasmas was examined. A recombinant antibody raised against the Immunodominant membrane protein of the LWB phytoplasma was used in indirect ELISA. Results showed that the produced antiserum reacted with the LWB and AlfWB phytoplasma infected samples, although with lower absorption rate with the later. Under the same conditions, the mean OD obtained from periwinkle extracts infected with CuPh phytoplasma was not significantly different from that of healthy periwinkle. With the antiserum raised against AlfWB phytoplasma, however, the OD value obtained with AlfWB phytoplasma was higher than that obtained with LWB phytoplasma samples. These data suggest that LWB and AlfWB phytoplasmas but not CuPh phytoplasma are serologically related, although not identical. In this study we compared the results of ELISA test and western blot analysis. The serological variation was also compared with Imp and DnaD sequence variability. AS serological distinction is an important criterion for description of new phytoplasma species within a 16S rRNA group, results of this study argues that phytoplasmas of 16SrII-D (CuPh phytoplasma) and II-B (LWB phytoplasma) could be accommodated within two species. However, further evidences are needed to support this argument.

Keywords: Phytoplasma, serology, membrane protein, phyllody, witches' broom

*Corresponding author's E-mail: siampour@agr.sku.ac.ir

1. Assistant Professor, Plant Protection Dept., Shahrekord University, msiam57@yahoo.com
2. Professor, Plant Virology Research Center, Shiraz University, izadpana@shirazu.ac.ir

مقدمه

ایران به ترتیب توسط فیتوپلاسم‌های متعلق به زیرگروه‌های 16SrII-B، 16SrII-C و 16SrII-D ایجاد می‌شوند (Salehi et al, 2002; Esmailzadeh et al. 2015; Siampour et al. 2013; Salehi et al. 2015). علیرغم تنوع اکولوژیکی قابل توجه و گسترش وسیع، همه فیتوپلاسم‌های گروه مذکور شباهت قابل توجهی در ژن آر ان ای ریبوزومی خود دارند. تنها گونه فیتوپلاسمایی توصیف شده در این گروه *Candidatus Phytoplasma aurantifolia* است که به عنوان عامل بیماری جاروک لیموترش شناخته شده است (Zreik et al. 1995). عدم ارتباط سرولوژیکی بین یک استرین فیتوپلاسم در یک گروه آر ان ای ریبوزومی با گونه یا گونه‌های توصیف شده در همان گروه به عنوان یکی از شاخصه‌ها برای توصیف گونه جدید مطرح شده است (IRPCM, 2014).

مطالعات سرولوژیکی نشان داده است که غشاء فیتوپلاسم‌ها غالباً از یک پروتئین عمده غشائی تشکیل یافته است که دارای خاصیت ایمونوژنیک (immunodominant) بوده و محل استقرار آن نیز با مطالعات الکترونی میکروسکوپی در سطح فیتوپلاسم مشخص شده است (Milne et al. 1995; Hogenhout et al. 2008). این پروتئین در مورد برخی فیتوپلاسم‌های گروه 16SrI (Aster yellows) قادر به ایجاد برهمکنش اختصاصی با برخی پروتئین‌های روده زنجرک‌های ناقل بوده است (Suzuki et al. 2006; Galetto et al. 2011).

مشخصات ژن کدکننده پروتئین عمده غشاء فیتوپلاسم‌ها با استفاده از آنتی‌سرم‌های چند همسانه ای و تک همسانه ای تهیه شده بر علیه فیتوپلاسم (بعنوان ایمونوژن) تعیین شده است. در این روش‌ها پروتئین فیتوپلاسمایی که با این آنتی‌سرم‌ها واکنش سرولوژیکی ایجاد کرده شناسایی و ترادف ژن مسئول این پروتئینها

فیتوپلاسم‌ها پروکاریوت‌های فاقد دیواره سلولی با ژنوم کوچک (۵۳ تا ۱۳۵ میلیون جفت باز) محدود به آوند آبکشی و درصد جی سی (G+C) اندک (حدود ۲۵ مول درصد) هستند و گروه مهمی از بیمارگرهای گیاهی را شامل می‌شوند (Lee et al., 2000). طبقه‌بندی فیتوپلاسم‌ها عمدتاً براساس ژن آر.ان.ای ریبوزومی ۱۶S بوده و مشخص شده که فیتوپلاسم‌ها یک گروه مونوفایلیتیک را در رده مولیکوت‌ها تشکیل می‌دهند (Hogenhout et al., 2008).

بر اساس آنالیزهای ترادف ژن آر.ان.ای ریبوزومی ۱۶S، فیتوپلاسم‌ها در بیش از ۳۲ گروه طبقه بندی شده اند (Jomantiene et al., 2016; Yang et al., 2016). در ایران نیز فیتوپلاسم‌های متعلق به چندگروه با بیماریهایی در گونه‌های مختلف گیاهی همراه بوده اند. فیتوپلاسم‌های گروه 16SrII از مهمترین گروه‌های فیتوپلاسمایی شناسایی شده در ایران هستند (Salehi et al. 2005). بیماری جاروک لیموترش و جاروک یونجه و فیلودی خیار از بیماریهای مهم شناسایی شده در ایران هستند که توسط فیتوپلاسم‌های متعلق به این گروه ایجاد می‌شوند (Salehi et al. 2002, 2015; Esmailzadeh et al. 2015). فیتوپلاسم‌های مربوط به گروه 16SrII از نظر اکولوژیکی متنوع بوده و در گونه‌های گیاهی و مناطق جغرافیایی مختلف ردیابی و شناسایی شده اند. فیتوپلاسم‌های این گروه در بیش از ۱۳ زیرگروه طبقه بندی شده اند (Yang et al. 2016). تاکنون فیتوپلاسم‌های متعلق به زیر گروه‌های 16SrII-B، 16SrII-C و 16SrII-D در ایران شناسایی و گزارش شده اند. بیماریهای مهم جاروک لیموترش، جاروک یونجه و فیلودی خیار گزارش شده از

قرار گرفتند. استرین‌ها شامل جاروک یونجه فارس متعلق به زیر گروه 16SrII-C (Salehi *et al.* 1995)، جاروک لیموترش متعلق به زیرگروه 16SrII-B (Siampour *et al.* 2013) و فیلودی خیار (استرین یزد؛ Salehi *et al.* 2015) متعلق به زیر گروه 16SrII-D (16S rRNA accession No. KY349111) بودند. مترادف ژن Imp فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و یونجه که قبلاً مشخص شده بود (Siampour *et al.* 2013) از بانک ژن بدست آمد. مترادف ژن مذکور در فیتوپلاسمای فیلودی خیار با استخراج دی ان ا از گیاه پروانش آلوده، انجام آزمون PCR و سپس مترادف بدست آمد. روش استخراج دی ان ا، آغازگرهای مورد استفاده (IMR1 و IMF1) و روش انجام PCR قبلاً گزارش شده است (Siampour *et al.* 2013). ژن DNA replication initiation protein (DnaD) در دو فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و یونجه نیز تکثیر و مترادف آن مشخص شد. به این منظور آغازگرهای dnaF (5'-attgccgaagtattatc-3') و dnaR (3'-agattcaatatcgccctcaat-3') طراحی و برای تکثیر قطعه دی ان ای مربوط به ژن DnaD (PCR به روش استاندارد) مورد استفاده قرار گرفتند. قطعه تکثیر شده بطور مستقیم تعیین مترادف شد.

الکتروفورز و لکه برداری وسترن

برای آزمون لکه برداری وسترن (Western blot) اقدام به تهیه پروتئین کل از گیاهان آلوده به روش Lin و همکاران شد (Lin *et al.* 2009). حدود ۰/۳ گرم از بافت آلوده در ۲۰۰ میکرولیتر بافر عصاره‌گیری شد. این بافر شامل ۴۰ میلی‌مولار تریس (pH=۶/۸)، ۵٪ SDS، ۸ میلی‌مولار اوره، یک میلی‌مولار EDTA و ۱۰ میلی‌مولار-2-mercaptoethanol (2-ME) بود. عصاره حاصل به مدت

مشخص شده است. بر این اساس سه نوع پروتئین غیر همولوگ به نامهای Imp (Immunodominant membrane protein)، Amp (Antigenic membrane protein) و IdPA (Immunodominant protein A) به‌عنوان پروتئین‌های اصلی غشاء فیتوپلاسمای شناسایی شده‌اند. پروتئین Imp به‌عنوان پروتئین ایمونوژن اصلی از فیتوپلاسمای متعلق به گروه‌های 16SrX و 16SrII، AMP به‌عنوان پروتئین ایمونوژن اصلی از فیتوپلاسمای متعلق به گروه 16SrI و IdPA از فیتوپلاسمای X (متعلق به گروه 16SrIII) جدا سازی و گزارش شده‌اند (Yu *et al.* 1998; Berg *et al.* 1999; Blomquist *et al.* 2001; Barbara *et al.* 2002).

پیشتر در یک مطالعه پروتئین Imp فیتوپلاسمای جاروک لیموترش (متعلق گروه 16SrII) ایران در باکتری *Escherichia coli* بیان و بر علیه آن آنتی سرم تولید شده و مشخصات این پروتئین به‌مراه ژن کدکننده آن تعیین شده است (Siampour *et al.* 2013). در این بررسی با استفاده از این آنتی سرم و همچنین آنتی سرم تهیه شده بر علیه فیتوپلاسمای جاروک یونجه فارس (Salehi *et al.* 2011) ارتباط دقیق سرولوژیکی بین فیتوپلاسمای نماینده سه زیرگروه 16SrII-B، 16SrII-C و 16SrII-D بررسی و در مورد آن بحث شده است. همچنین ارتباط تنوع ژنتیکی ژنهای Imp در ایجاد این تنوع سرولوژیکی و مقایسه میزان تنوع این ژن با ژن بالا دست DnaD مورد بحث قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های مورد آزمایش و آزمون PCR

در این مطالعه سه استرین فیتوپلاسمایی متعلق به گروه 16SrII که در پروانش نگهداری می‌شدند مورد استفاده

گرفت. از ۴-نیتروفنیل فسفات نیز بعنوان ماده زمینه استفاده شد. سپس میزان جذب نوری در چاهکهای میکرو پلیت الیزا در طول موج ۴۰۵ نانومتر سنجش شد.

پیش بینی اپی توپها روی Imp

با استفاده از خصوصیات فیزیکوشیمیایی ژن Imp وجود اپی توپ های B-Cell روی آن در فیتوپلاسمای جاروک لیموترش پیش بینی شد. بر این اساس با استفاده از برنامه BCEPRED (<http://www.imtech.res.in/ragha/va/bcepred>) اپی توپهای موجود بر اساس چهار خصوصیت فیزیکوشیمیایی آمینواسیدها شامل flexibility, hydrophilicity, accessibility و polarity روی ژن مذکور پیش بینی شد (Saha et al. 2004). آستانه های مورد استفاده برای پیش بینی بر اساس flexibility ۱/۹، polarity برابر ۳ و hydrophilicity و accessibility برابر ۲ بود. آستانه های استفاده شده در مورد هر شاخص بهترین حساسیت و اختصاصیت را برای پیش بینی اپی توپ بدست داده است (Saha et al. 2004).

نتایج

آزمون لکه برداری و سترون و الیزا

در آزمون لکه برداری و سترون با استفاده از انتی سرم نو ترکیب (تولید شده بر علیه پروتئین Imp فیتوپلاسمای جاروک لیموترش) یک قطعه به اندازه حدود 18kDa در پروتئین های استخراج شده از گیاهان پروانش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و جاروک یونجه ردیابی شد.

در این آزمون هیچ باند مشخصی در پروتئین های استخراج شده از گیاه پروانش سالم و همچنین در پروتئین های استخراج شده از گیاه پروانش آلوده به فیتوپلاسمای

پنج دقیقه در دمای چهار درجه در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رونشین جمع آوری و هم حجم آن بافر بارگذاری اضافه و بمدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. نمونه بدست آمده در ژل پلی آکریل آمید ۱۵٪ حاوی SDS الکتروفورز شد. سپس پروتئین ها به غشاء نایلونی (PVDF) انتقال داده شدند. غشاء به مدت یک ساعت در دمای اتاق در بافر blocking شامل ۵۰ گرم در لیتر شیر خشک در Phosphate-buffered saline (PBS) قرار داده شد. سپس غشا به مدت سه ساعت در محلول PBS حاوی آنتی سرم تهیه شده علیه پروتئین غشایی غالب فیتوپلاسمای جاروک لیموترش (Siampour et al. 2013) به نسبت ۱ به ۱۰۰۰ به هم زده شد. غشاء به طور کامل با بافر شستشو داده شده و به مدت دو ساعت در بافر PBS حاوی آنتی ریت کانجوگیت شده با آلکالین فسفاتاز (نسبت ۱ به ۲۵۰۰) قرار داده شد. غشاء دوباره شستشو شده و نتیجه واکنش آن با ماده زمینه NBT/BCIP برای تولید باند مورد نظر ارزیابی شد (Sambrook et al. 1989).

آزمون الیزا

برای ردیابی و تعیین ارتباط سرولوژیکی فیتوپلاسمای آزمون الیزای غیرمستقیم انجام شد. به این منظور ۰/۱ گرم پروانش آلوده به فیتوپلاسمای پروانش سالم (بعنوان کنترل) در ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج عصاره گیری (بافر PBS به همراه ۵٪ Tween 20) و در چاهک های میکروپلیت الیزا به مدت ۳ ساعت در ۳۷°C نگهداری شد. بعد از شستشو با بافر شستشو، آنتی سرم تهیه شده (به رقت یک به هزار) برای اتصال به آنتی ژن به مدت یک شب در چهار درجه به چاهک ها اضافه و سپس آنتی بادی متصل شده با آلکالین فسفاتاز برای ردیابی آنتی سرم متصل به آنتی ژن به نسبت یک به ۲۵۰۰ درجه مورد استفاده قرار

جدول ۱- مقایسه نتایج آزمون الیزا (مقدار جذب نوری در ۴۰۵ نانومتر) با استفاده از آنتی بادی پلی کلونال تولید شده علیه پروتئین Imp فیتوپلاسمای جاروک لیموترش (آنتی بادی ۱) و آنتی بادی تولید شده بر علیه فیتوپلاسمای جاروک یونجه (آنتی بادی ۲) در مقابل آنتی ژن های خودی و نا خودی

Table1. Comparison of ELISA results (ODs at 405 nm) achieved using polyclonal antibodies produced against Imp gene of lime witches' broom phytoplasma (antibody 1) and against Alfalfa witches' broom phytoplasma (antibody 2) with homologous and heterologous antigens

میزان جذب با آنتی بادی ۲			میزان جذب با آنتی بادی ۱			استرین فیتوپلاسمای
OD value with antibody2			OD value with antibody1			Phytoplasma strain
Repeat3	Repeat2	Repeat1	Repeat3	Repeat2	Repeat1	
0.31	0.35	0.38	0.82	0.68	0.9	جاروک لیموترش Lime witches' broom
0.81	0.74	0.81	0.43	0.38	0.44	جاروک یونجه Alfalfa witches' broom
-----	-----	-----	0.22	0.19	0.17	فیلودی خیار Cucumber phyllody
0.14	0.13	0.15	0.18	0.16	0.15	پروانش سالم Healthy periwinkle

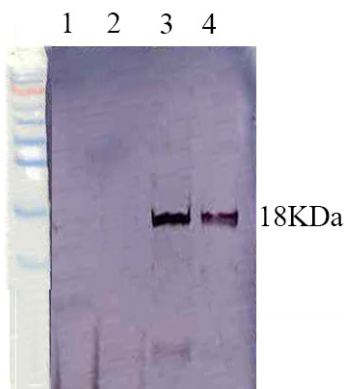
جذب نوری به دست آمده در نمونه های آلوده به فیتوپلاسمای فیلودی خیار نزدیک به میانگین جذب در نمونه سالم بود.

نتایج آزمون الیزا با استفاده از آنتی سرم به دست آمده علیه فیتوپلاسمای جاروک یونجه نیز در جدول ۱ نمایش داده شده است. در این ارتباط میزان جذب نوری به دست آمده در نمونه های پروانش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و جاروک یونجه نسبت به نمونه های سالم تفاوت معنی دار نشان داد. بطور میانگین (حاصل از سه تکرار آزمون الیزا) میزان جذب نوری در نمونه های آلوده به فیتوپلاسمای جاروک یونجه حدود ۲/۲ برابر نمونه های آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش بوده و از نظر آماری قابل تفکیک بودند.

شناسایی اپی توپ ها روی ژن Imp

با استفاده از آغازگرهای ImF1/ImR1 قطعه دی ان ا به اندازه حدود ۸۰۰ جفت باز از گیاه آلوده به فیتوپلاسمای

فیلودی خیار ردیابی نشد. میزان جذب نور در طول موج ۴۰۵ نانومتر به دست آمده در آزمون الیزا در جدول ۱ نمایش داده شده است. در این ارتباط و با استفاده از آنتی سرم نو ترکیب تولید شده بر علیه ژن Imp فیتوپلاسمای جاروک لیموترش نمونه های پروانش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و جاروک یونجه مثبت تشخیص داده شدند. میانگین جذب نوری نمونه های پروانش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش در هر سه تکرار از آزمون الیزا بیش از چهار برابر نمونه های سالم بود. با استفاده از این آنتی سرم نو ترکیب، میانگین جذب نوری در نمونه های پروانش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک یونجه تفاوت معنی داری با میزان جذب در نمونه های سالم نشان داد و حدود ۲/۵ برابر آن بود. آنالیز آماری نشان داد که میانگین جذب نوری بدست آمده از نمونه های پروانش آلوده به فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و فیتوپلاسمای جاروک یونجه با هم تفاوت معنی داری دارند (در سطح ۵٪). برعکس میانگین



شکل ۱: آزمون لکه برداری وسترن با استفاده از آنتی بادی تولید شده بر علیه پروتئین نو ترکیب Imp فیتوپلاسمای جاروک لیموترش. راهک ۱ مربوط به به پروتئین کل استخراج شده از پروانش سالم و راهکهای ۲ تا ۴ به ترتیب مربوط به پروتئین کل گیاهان پروانش آلوده به فیتوپلاسمای فیلودی خیار، جاروک لیموترش و جاروک یونجه.

Fig.1. Western blot analysis of total proteins extracted from healthy (Lane 1) and phytoplasma-infected periwinkle plants (Lanes 2-4) probed with polyclonal antisera produced against recombinant Imp protein of lime witches' broom phytoplasma. Lanes 2- 4 are proteins from plants infected by cucumber phyllody, lime witches' broom and alfalfa witches' broom phytoplasmas, respectively.

دوم و سوم در ناحیه متناظر از ژن Imp فیتوپلاسمای جاروک یونجه (Acc. No. JQ745273) نیز وجود داشت. ترادف اپی توپهای اول (ADLSSDDAKKEGQKAV) و چهارم (NEESAAPKEWNDAD) با ترادف های متناظر خود در ژن Imp فیتوپلاسمای جاروک یونجه متفاوت بود. ضمناً هیچکدام از این اپی توپ های پیش بینی شده در ناحیه متناظر خود از ژن Imp فیتوپلاسمای فیلودی خیار شناسایی نشدند (شکل ۲).

مقایسه تنوع ژنتیکی

ترادف نوکلئوتیدی ژن Imp فیتوپلاسمای جاروک لیموترش با ترادف ژن مذکور در فیتوپلاسمای جاروک یونجه و فیلودی خیار به ترتیب ۹۴/۸ و ۸۵٪ شباهت

فیلودی خیار تکثیر شد. ترادف قطعه مذکور تعیین و یک چارچوب خوانش به اندازه ۵۰۴ نوکلئوتید در آن مشخص شد. آزمون BLAST نشان داد که این چارچوب ژنی دارای بیشترین شباهت (۱۰۰ درصد) با ژن Imp ردیابی شده در فیتوپلاسمای تورم جوانه گوجه فرنگی (Acc. No. JQ745285) می باشد. همچنین وجود یک ناحیه تراغشایی در سمت انتهای N ترادف آمینواسیدی ژن مذکور پیش بینی شد (اطلاعات نشان داده نشده). این نتایج نشان میدهد که ترادف بدست آمده دارای مشخصات مربوط به ژن Imp گزارش شده در فیتوپلاسمهاست.

چارچوب ژن Imp در فیتوپلاسمای جاروک لیموترش (Acc. No. GU339497) شامل ۱۷۲ آمینواسید بود. با استفاده از برنامه BCPRED چند اپی توپ آنتی ژنیک روی ترادف آمینواسیدی این ژن ردیابی شد. پیش بینی اپی توپ ها براساس مشخصات مختلف بود. در این ارتباط و با استفاده از شاخص flexibility پنج اپی توپ، شاخص hydrophilicity شش اپی توپ، شاخص accessibility پنج اپی توپ، و با استفاده از شاخص polarity هفت اپی توپ روی Imp فیتوپلاسمای جاروک لیموترش پیش بینی شد.

بیشترین تعداد آمینو اسید پیش بینی شده به عنوان اپی توپ مربوط به شاخص hydrophilicity با حدود ۱۲۵ آمینواسید و کمترین آن مربوط به شاخص flexibility با حدود ۵۰ آمینواسید بود. برای شناسایی دقیقتر اپی توپ ها، نواحی آمینو اسیدی (شامل حداقل ۶ آمینو اسید) از ژن Imp که حداقل با سه روش یادشده شناسایی شده باشند به عنوان اپی توپ های اصلی منظور شده اند. با استفاده از این رهیافت چهار اپی توپ به اندازه های ۱۶، ۱۴، ۹ و ۱۴ آمینو اسید روی ژن Imp شناسایی شد (شکل ۲). از بین ۴ اپی توپ پیش بینی شده ترادف دو اپی توپ

A:

Hydrophilicity:
 .MNHKENFLQTKNGKIT...TTLTNKDIENLK...KDLGKQQRVADLSSDDAKKEGQKAV...AFAENNKADDKDKKISSA...QSANDLTKKADDAKLFVNEESAAPKEWNDAD...NNKMVKASEINDLLNKAKSDLKLS

Flexibility:
 TNKDIEN ADLSSDDAKKEGQKAVDGL AENNKADDKDKKISS TMQSANDLTKKADDA NEESAAPKEWNDAD

Accessibility:
 NFLQTKN VDLKDLGKQ ADLSSDDAKKEGQ ENNKADDKDKKI DLLNKAK

Polarity:
 MNHKENFLQ AKLLHWKP KDLENLKVLDKDL SDDAKKEGQKAV ENNKADDKDKKISS DLTKKADDAKLFVNEESAAPKEWNDAD KAKSDLK

B:

86

LWB MNHKENFLQTKNGKITVGVLASIGIAIVVYIIAAKLLHWKPFNITTLTNKDIENLKVLDKDLGKQQRVADLSSDDAKKEGQKAVDGLI
 AlfWB MNHKENFLQTKNGKITVGVLASIGIAIVVYIIAAKLLHWKPFNITTLTNKDFENLKVLDKDLTGKQKTSDDLSSDDAKKEGQKAVDGLI
 CuPh MNHKENFLQTKNGKITVGVLASIGIAIVVYIIAAKLLHWKPFNITTLTNKDIENLKVLDKDLGKQKSTKQDLSDDLSSDDAKKEGQKAVDGLI

172

GLKKIIDAFIENNKADDKDKKISSATMQSANDLTKKADDAKLFVNEESAAPKEWNDADVVNFVNNKMKVKAASEINDKSDLKLS
 GLKKIIDAFIENNKADDKDKKISSATMQSANDLTKKADDAKLFVNEESAASKGWDDADVNFVNNKMKVKTDTIDNKSDLKLS
 AMKKIVDALAENNKADIKDKKISSSTIITAANNLKTKADEALKEVNDNASNWIDDRVKDFVP...KMKVTSIDINDKSDLKLS

شکل ۲- (A): اپی توپهای B-Cell پیش بینی شده روی ترادف آمینو اسیدی Imp در فیتوپلاسمای جاروک لیموترش بوسیله شاخصه های hydrophylicity, accessibility, flexibility و Polarity (B): هم ردیف سازی ترادف آمینو اسیدی Imp در فیتوپلاسماهای جاروک لیموترش (LWB)، جاروک یونجه (AlfWB) و فیلودی خیار (CuPh). اپی توپهای روی ترادف Imp فیتوپلاسمای جاروک لیموترش پیش بینی شده حداقل با سه شاخص و نواحی متناظر آن در ژن Imp از فیتوپلاسماهای جاروک یونجه و فیلودی خیار در داخل کادر قرار داده شده اند.

Fig. 2. (A): B-Cell epitopes predicted in the Imp gene sequence of lime witches' broom phytoplasma based on hydrophilicity, accessibility, flexibility and polarity parameters. (B): Amino acid sequence alignment of Imp from lime witches broom (LWB), alfalfa witches' broom (AlfWB) and cucumber phyllody (CuPh). Epitopes of Imp gene of lime witches' broom predicted at least by three parameters and their corresponding amino acid stretches in Imp gene of AlfWB and CuPh are shown within boxes.

داشت. میزان تشابه ترادف آمینو اسیدی ژن Imp فیتوپلاسمای جاروک لیموترش با ژن همولوگ خود در فیتوپلاسمای جاروک یونجه و فیلودی خیار نیز به ترتیب ۸۸ و ۷۵ درصد بود.

در این مطالعه قطعه دی ان ای فیتوپلاسمایی به اندازه حدود ۱۰۰۰ جفت باز شامل ژن حفاظت شده DnaD (در موقعیت بالا دست ژن Imp) با آغازگرهای dnaF و dnaR در فیتوپلاسماهای جاروک لیموترش و جاروک یونجه تکثیر و تعیین ترادف شد. اندازه چارچوب ژنی مربوط به DnaD در هر دو فیتوپلاسمای جاروک لیموترش (Acc. No. KY052775) و جاروک یونجه (Acc. No. KY052776) نوکلئوتید ۶۱۵ نوکلئوتید بود. میزان شباهت نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی ژن DnaD در دو فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و یونجه به ترتیب ۹۷/۲ و ۹۵/۴ درصد بود.

بحث

هدف اصلی این مطالعه انجام مقایسات سرولوژیک با استفاده از آنتی سرم نوترکیب تولید شده بر علیه پروتئین Imp فیتوپلاسمای جاروک لیموترش بود. در این راستا، ارتباط سرولوژیک بین فیتوپلاسمای جاروک لیموترش (استرین نماینده زیر گروه 16SrII-B) با فیتوپلاسماهای

داشت. میزان تشابه ترادف آمینو اسیدی ژن Imp فیتوپلاسمای جاروک لیموترش با ژن همولوگ خود در فیتوپلاسمای جاروک یونجه و فیلودی خیار نیز به ترتیب ۸۸ و ۷۵ درصد بود.

در این مطالعه قطعه دی ان ای فیتوپلاسمایی به اندازه حدود ۱۰۰۰ جفت باز شامل ژن حفاظت شده DnaD (در موقعیت بالا دست ژن Imp) با آغازگرهای dnaF و dnaR در فیتوپلاسماهای جاروک لیموترش و جاروک یونجه تکثیر و تعیین ترادف شد. اندازه چارچوب ژنی مربوط به DnaD در هر دو فیتوپلاسمای جاروک لیموترش (Acc. No. KY052775) و جاروک یونجه (Acc. No. KY052776) نوکلئوتید ۶۱۵ نوکلئوتید بود. میزان شباهت نوکلئوتیدی و آمینو اسیدی ژن DnaD در دو فیتوپلاسمای جاروک لیموترش و یونجه به ترتیب ۹۷/۲ و ۹۵/۴ درصد بود.

نیست بلکه مربوط به ارتباط بین آنتی ژن و آنتی بادی است. بر این اساس نتایج این بررسی نشان می‌دهد که حساسیت روش سرولوژیک عامل مهمی در تعیین ارتباط سرولوژیکی فیتوپلاسم‌های جاروک لیموترش و جاروک یونجه است. آزمون لکه برداری وسترن بدلیل حساسیت بالا و نیز در معرض قرار دادن اپی توپهای مخفی (Cryptotopes) قادر به شناسایی ارتباطات سرولوژیک ضعیف میباشد. با استفاده از این آزمون حساس دو فیتوپلاسمی جاروک لیموترش و یونجه دارای ارتباط سرولوژیک بوده و از یکدیگر قابل تفکیک نبودند. در آزمون الیزا با حساسیت کمتر ضمن تایید ارتباط سرولوژیکی، این دو فیتوپلاسم براساس مقدار جذب نوری از یکدیگر قابل تمایز یوندند. آزمون DIBA به دلیل حساسیت پایین ارتباط سرولوژیک بین فیتوپلاسمی جاروک لیموترش و یونجه را نشان نداده و از این رو دو فیتوپلاسمی مذکور را از یکدیگر متمایز کرده است (Errampalli and Fletcher, 1993; Niimi *et al.* 1999;) (Salehi *et al.* 2011).

نتایج مربوط به پیش بینی اپی توپهای آنتی ژنیک موجود روی ترادف آمینو اسیدی ژن Imp در فیتوپلاسمی جاروک لیموترش نیز منطبق بر نتایج آزمونهای سرولوژیک بود. تنها دو اپی توپ از مجموع چهار اپی توپی که با اطمینان بالا روی ژن Imp فیتوپلاسمی جاروک لیموترش شناسایی شدند در ژن مذکور در فیتوپلاسمی جاروک یونجه نیز وجود داشتند.

احتمالاً تفاوت در ترادف این اپی توپها در دو فیتوپلاسمی مذکور باعث تفاوت در میزان جذب نوری در آزمون الیزا شده است. هیچ کدام از این اپی توپهای پیش بینی شده روی ژن Imp روی ژن همولوگ خود در فیتوپلاسمی فیلودی خیار (متعلق به زیرگروه 16SrII-D)

جاروک یونجه (استرین نماینده زیرگروه 16SrII-C) و فیتوپلاسمی فیلودی خیار (استرین نماینده زیر گروه 16SrII-D) بررسی شد.

مقایسه نتایج آزمونهای سرولوژیک لکه برداری وسترن و الیزا شباهت‌ها و تفاوت‌هایی را نشان داد. با هر دو روش به کار رفته مشخص شد که فیتوپلاسمی جاروک لیموترش و فیتوپلاسمی جاروک یونجه با فیتوپلاسمی فیلودی خیار ارتباط سرولوژیک ندارند. در آزمون لکه برداری وسترن ارتباط سرولوژیک بین فیتوپلاسمی جاروک لیموترش و جاروک یونجه تأیید شد. این یافته منطبق با برخی نتایج گزارش شده قبلی بود (Siampour *et al.* 2013). علیرغم این یافته نتایج آزمون سرولوژیک DIBA با استفاده از آنتی سرم تولید شده بر علیه فیتوپلاسمی جاروک یونجه عدم ارتباط سرولوژیک بین فیتوپلاسم‌های جاروک یونجه و جاروک لیموترش را نشان داد (Salehi *et al.* 2011). برای بررسی این تناقض در نتایج بدست آمده، آزمون سرولوژیک الیزا انجام شد.

براساس نتایج آزمون الیزا نیز فیتوپلاسم‌های جاروک لیموترش و یونجه با یکدیگر ارتباط سرولوژیک داشتند. نکته مهم در این زمینه تفاوت معنی دار در میزان جذب نور (OD) مربوط به این دو فیتوپلاسم بود. در این ارتباط در زمانی که از آنتی بادی نو ترکیب تولید شده علیه Imp فیتوپلاسمی جاروک لیموترش استفاده شد، میزان جذب نوری مربوط به فیتوپلاسمی جاروک لیموترش به طور معنی دار بیشتر از جذب نوری مربوط به فیتوپلاسمی جاروک یونجه بود. برعکس زمانی که از آنتی سرم تولید شده بر علیه فیتوپلاسمی جاروک یونجه استفاده شد، میزان جذب نوری در نمونه‌های مربوط به فیتوپلاسمی جاروک یونجه بیشتر بود. این موضوع نشان می‌دهد که تفاوت میزان جذب مربوط به غلظت‌های متفاوت آنتی ژن

نشان می دهد که فاکتورهای دیگری به جز زمان تکاملی (evolutionary time) مسئول ایجاد تنوع در ژن Imp هستند. این یافته مطابق با نتایج مطالعات دیگر مبنی بر وجود فشار انتخاب مثبت روی این ژن است (Kakizawa et al. 2009; Siampour et al. 2013). از این رو تصور میشود فشار انتخاب مثبت اعمال شده روی ژن Imp مسئول تفاوت‌های سرولوژیکی بین فیتوپلاسماهای گروه 16SrII باشد. همچنین نتایج این تحقیق نشان می دهد که استرین های فیتوپلاسمای زیرگروه 16SrII-D (به دلیل عدم ارتباط سرولوژیکی با *Ca. P. auratifolia*) برای توصیف یک گونه جدید قابل بررسی هستند.

سپاسگزاری

نگارندگان از آقای دکتر محمد صالحی به دلیل فراهم نمودن نمونه های گیاهی آلوده به فیتوپلاسمای تشکر می نمایند.

وجود نداشت. این یافته نیز تأییدکننده نتایج مربوط به آزمون لکه برداری وسترن و الیزا مبنی بر عدم ارتباط سرولوژیکی بین فیتوپلاسماهای جاروک لیموترش و فیلودی خیار بود. نتایج آزمون الیزا و لکه برداری و وسترن به دست آمده در این مطالعه منطبق با آنالیزهای فیلوژنتیک بوده است. آزمون های فیلوژنتیکی نشان داده اند که قرابت فیتوپلاسمای جاروک لیموترش با فیتوپلاسماهای زیرگروه 16SrII-C (جاروک یونجه) بیشتر از قرابت آن با فیتوپلاسماهای زیرگروه 16SrII-D است (Siampour et al. 2013). مقایسه ی بین میزان تنوع ژنتیکی ژن Imp و تنوع ژن حفاظت شده بالادست DnaD (Kakizawa et al. 2009) نشان داد که شباهت ترادف نوکلئوتیدی هر دو ژن در فیتوپلاسماهای جاروک لیموترش و جاروک یونجه بیش از ۹۴ درصد است. ولی در سطح آمینو اسیدی میزان شباهت ژن Imp بین دو فیتوپلاسمای بطور چشم گیری کاهش یافت (۸۸٪) در صورتی که میزان شباهت آمینو اسیدی در ژن DnaD بیش از ۹۵ درصد بود. این نتیجه

منابع

- Barbara D.J., Morton A., Clark M.F. and Davis D.L. 2002. Immunodominant membrane proteins from two phytoplasmas in the aster yellows clade (chlorate aster yellows and clover phyllody) are highly divergent in the major hydrophilic region. *Microbiology* 148:157-167.
- Berg M., Davis D.L., Clark M.F., Vetten H.J., Maier G., Marcone C. and Seemüller, E. 1999. Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterisation of the gene product. *Microbiology* 145:1937-1945.
- Blomquist C.L., Barbara D.J., Davies D.L., Clark M.F. and Kirkpatrick B.C. 2001. Cloning and characterization of a major membrane protein of the X-disease phytoplasma. *Microbiology* 147:571-580.
- Cai H., Wei W., Davis R. E., Chen H. and Zhao Y. 2008. Genetic diversity among phytoplasmas infecting *Opuntia* spp.: Virtual RFLP analysis identifies new subgroups in the peanut witches'-broom phytoplasma group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 58:1448-1457
- Errampalli D. and Fletcher, J. 1993. Production of monospecific against Aster Yellows Mycoplasma-like Organism-Associated Antigen. *Genetics* 83:279-1282
- Esmailzadeh-Hosseini S.A., Khodakaramian G., Salehi M., Fani S.R., Bolok Yazdi H.R., Raoufi D., Jadidi O. and Bertaccini, A. 2015. Status of alfalfa witches' broom phytoplasma disease in Iran. *Phytopathogenic Mollicutes* 5:65-66
- Galetto L., Bosco D., Balestrini R., Genre A., Fletcher J. and Marzachi C. 2011 The major antigenic membrane

- protein of “*Candidatus Phytoplasma asteris*” selectively interacts with ATP synthase and actin of leafhopper vectors. *PLoS One* 6:e22571, 2011
- Hogenhout S.A., Oshima K., Ammar E-D., Kakizawa S., Kingdom H.N. and Namba S. 2008. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Molecular Plant Pathology* 9:403–423.
- IRPCM, Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma Taxonomy Group. 2004. ‘*Candidatus Phytoplasma*’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1243–1255.
- Jomantiene R., Ivanauskas A., Valiunas D., Urbanavicienė L. and Sneideris D., 2016: Epidemics of group 16SrI-A phytoplasmas in a garden of Vilnius region in Lithuania. *Botanica Lithuanica* 22:16–22.
- Kakizawa S., Oshima K., Ishii Y., Hoshi A., Maejima K., Jung H. Y., Yamaji Y. and Namba S. 2009. Cloning of immunodominant membrane protein genes of phytoplasmas and their in planta expression. *FEMS Microbiology Letters* 293:92–101
- Lin C.I., Zhou T., Li H.F., Fan Y.L., Piao C.G. and Tian, G.Z. 2009. Molecular characterisation of two plasmids from paulownia witches’-broom phytoplasma and detection of a plasmid-encoded protein in infected plants. *European Journal of Plant Pathology* 123:321-330.
- Milne, R.G., Ramasso, E., Lenzi, R., Masenga, V., Sarindu, N. and Clark, M.F. 1995. Pre- and post-embedding immunogold labelling and electron microscopy in plant host tissues of three antigenically unrelated MLOs: primula yellows, tomato big bud and bermudagrass white leaf. *European Journal of Plant Pathology* 101:57–67
- Niimi N., Gondaira T., Kutsuwada Y. and Tsuji, H. 1999. Detection by ELISA and DIBA Tests of Lily Symptomless Virus (LSV), Tulip Breaking Virus-Lily (TBV-L) and Cucumber Mosaic Virus (CMV) in *Lilium* spp. Grown in the Field. *Journal of Japanese Society for Horticultural Science* 1:176-183
- Saha S. and Raghava G. P. S. 2004. BcePred: Prediction of continuous B-Cell epitopes in antigenic sequences using physico-chemical properties, pp. 197-204. In: G. Nicosia, V. Cutello, P.J. Bentley and J.Timis (Eds.) ICARIS. Springer.
- Salehi M., Heydarnejad J. and Izadpanah K. 2005. Molecular characterization and grouping of 35 phytoplasmas from central and southern provinces of Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 41:62-64.
- Salehi M., Izadpanah K. and Ebrahimnesbat F. 1995. Etiology, transmission and host range of alfalfa witches’ broom in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 31:1-9.
- Salehi M., Izadpanah K., Siampour M. and Esmailzadeh-Hosseini S. A. 2011. Polyclonal antibodies for the detection and identification of Fars alfalfa witches’ broom phytoplasma. *Bulletin of Insectology* 64:59-60
- Salehi M., Izadpanah K., Taghizadeh M. 2002. Witches’ broom disease of lime in Iran: New distribution areas, experimental herbaceous hosts and transmission trials. *Proceedings of 15th Conference of International Organization of Citrus Virologists (IOCv)* pp. 293-296.
- Salehi M., Siampour M., Esmailzadeh-Hosseini S.A., and Bertaccini A. 2015. Characterization and vector identification of phytoplasmas associated with cucumber and squash phyllody in Iran. *Bulletin of Insectology* 68:311-319
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Siampour M., Izadpanah K., Salehi M. and Marzachi C. 2013. Molecular characterization, phylogenetic comparison and serological relationship of the Imp protein of several ‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’ strains. *Microbiology* 62:452-459
- Suzuki S., Oshima K., Kakizawa S., Arashida R., Jung H.Y., Nishigawa H., Ugaki M. and Namba, S. 2006. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceeding of National Academy of Science* 103:4252–4257
- Suzuki S., Oshima K., Kakizawa S., Arashida R., Jung H.Y., Yamaji Y., Nishigawa H., Ugaki M. and Namba S. 2006. Interaction between the membrane protein of a pathogen and insect microfilament complex determines insect-vector specificity. *Proceeding of National Academy of Science* 103:4252–4257.
- Yang Y, Jiang L., Che H., Cao X., Luo D. 2016. Identification of a novel subgroup 16SrII-U phytoplasma associated with papaya little leaf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66:3485-3491
- Yu Y.-L., Yeh K.W. and Lin C.P. 1998. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato

witches' broom. *Microbiology* 144:1257–1262.

Zreik L., Carle P., Bové J. M., and Garnier M. 1995. Characterization of the mycoplasma-like organism associated with witches'-broom disease of lime and proposition of a Candidatus taxon for the organism, "Candidatus *Phytoplasma aurantifolia*". *International Journal of Systematic Bacteriology* 45:449-453.