انتاج مصل مضاد للكشف عن الفطر *Pythium aphanidermatum* بإختبار اليزا

رائد رؤوف العاني
مركز بحوث التقنيات الأحيائية، جامعة النهرين، العراق، البريد الالكتروني: raed_r1961@yahoo.com

الملخص

العاني، رائد رؤوف. 2012. انتاج مصل مضاد للكشف عن الفطر *Pythium aphanidermatum* بإختبار اليزا. مجلة وقاية النبات العربية، 30: 135-138.

يصاب نبات الخيار (*Cucumis sativus* L.) بعديد من الأمراض وخصوصاً الفطرية مثل عفن الجذور وموت البادرات التي تتسبب عن الفطر *Pythium aphanidermatum*، ولغرض الإسراع في عملية التشخيص، فقد أجريت هذه الدراسة بإستخدام الطرائق المناعية للكشف عن المسبب المرضي بوساطة تقنية اليزا (DAS-ELISA). استخلصت بروتينات الفطر وحقنت في جسم أرنب مختبري تحت الجلد ثلاث مرات بمعدل 0.5 مغ لكل حقنة. تم الحصول على المصل المضاد لبروتينات الفطر ونقي الجلوبيولين المناعي (IgG) وربط بانزيم الفوسفاتيز القاعدي لاستخدامه كعدة تشخيصية في اختبار اليزا. سجلت قراءة قاريء اليزا عند طول موجة 405 نانومترات عند فحص مستخلص بروتينات الفطر *P. aphanidermatum* والمصل المضاد المحضر له باختبار اليزا وكانت القيمة 1.32 في حين كانت القيمة 0.22 عند فحص المستخلص البروتيني للفطر *Alternaria solani* و 0.24 عند فحص المستخلص البروتيني للفطر *Rhizoctonia solani*. أكدت النتائج التخصصية العالية للمصل المضاد المنتج للفطر *P. aphanidermatum* وعلى هذا الأساس يمكن استخدام الطرق المصلية كطرائق مكملة للطرائق التقليدية للفطور مما يساهم في الإسراع وزيادة الدقة في التشخيص.

كلمات مفتاحية: مصل مضاد متعدد الكلون، DAS-ELISA، *Pythium aphanidermatum*.

المقدمة

يعد الفطر *Pythium aphanidermatum* من الفطور ذات المدى العوائلي الواسع وينتشر في مناطق عديدة من العالم وهو المسبب الرئس لمرض موت البادرات وتعفن بذور وجذور عدد كبير من الأنواع النباتية فضلاً عن تعفن الثمار مؤدياً إلى تلفها (1). وأشير إلى أن الفطر يعد من الفطور الملازمة لمرض تعفن بذور وسقوط بادرات الخيار فضلاً عن قدرة الفطر على إصابة الثمار الناضجة (2). اعتمدت الإختبارات المصلية على نطاق واسع في الكشف وتحديد السلالات لعديد من الفطور. وأشير إلى امكانية تحضير أجسام مضادة متعددة الكلون (Polyclonal Antibodies) عن طريق تمنيع الحيوان بغزل الفطر *Aphanomyces euteiches* (8). تمكن Salinas و Schots (12) من انتاج أجسام مضادة وحيدة الكلون لكونيديا الفطر *Botrytis cineria* واستخدم فحص التألق المناعي (Immunoflorescence) في تمييز 43 عزلة من الفطر. وقد تم انتاج أجسام مضادة متعددة الكلون للمستخلص البروتيني لغزل الفطر *Thielaviopsis basicola* واستخدمت تقنية اليزا ELISA للكشف عنه (6). وأشار Randles إلى أن الطرائق المصلية/السيرولوجية تعد من الطرائق السريعة وغير المكلفة لتشخيص الكائنات الممرضة للنبات (11). وقد تم التوصل إلى انتاج أجسام مضادة للمستخلص البروتيني لغزل الفطرين *Aspegills flavus* و *A. parasiticus*، واستخدمت تقنية اليزا (ELISA) في الكشف عنهما (13). وتوصل Kageyama وآخرون (7) إلى انتاج أجسام مضادة وحيدة الكلون لجدار خلية الفطر *Pythium sulcatum* وباستخدام تقنية اليزا تم الكشف عن سبعة عزلات لهذا الفطر، في حين تمكن Ferraris وآخرون (4) من إنتاج أجسام مضادة متعددة الكلون للمستخلص البروتيني للفطر *Phytophthora cinnamomi* وباستعمال تقنية اليزا أمكن التمييز بين عدة عزلات من الفطر. توصل Yuen وآخرون (14، 15) إلى إنتاج أجسام مضادة للفطر *Pythium ultimum* (أجسام مضادة وحيدة ومتعددة الكلون) واستخدمها في تشخيص الفطر من جذور الفاصولياء واللهانة/الملفوف وقصب السكر باستخدام تقنية اليزا وأظهرت النتائج تفاعلاً ايجابياً قوياً وتمكن من تشخيص سبعة عزلات للفطر بينما لم يعط تفاعلاً موجباً مع باقي أنواع الفطر *Pythium* spp. والفطور الأخرى التي تصيب الجذور.

ونظراً للدقة العالية والسرعة التي تتميز بها الإختبارات المصلية/السيرولوجية في تشخيص المسببات المرضية قياساً بالطرائق الأخرى وقلة تكاليفها فقد أجريت هذه الدراسة لتحضير مصل متخصص للكشف عن الفطر الممرض *Pythium aphanidermatum* بوساطة إختبار اليزا.

مواد البحث وطرائقه

عزل الفطر وتشخيصه

جمعت عينات ثمار الخيار من الأسواق الشعبية لمدينة بغداد والتي تتصف بوجود نمو قطني أبيض اللون على سطحها العلوي. طهرت ثمار الخيار سطحياً بوساطة هايبوكلوريت الصوديوم 1 % لمدة دقيقة واحدة ثم قطعت إلى قطع صغيرة وغسلت بالماء المعقم ثم جففت على ورق ترشيح وزرعت في أطباق بتري حاوية على الوسط الغذائي PDA (Potato dextrose agar) والمضاف اليه المضاد الحيوي أمبيسيلين بمقدار 100 مغ/ليتر ومبيد بنليت تركيز 10 مغ/ليتر، وحضنت الأطباق عند 30º س لمدة 3 أيام. نقي الفطر بنقل قطعة من الغزل الفطري بالقرب من أطراف المستعمرة الفطرية إلى وسط PDA ووضعت في الحاضنة عند 30º س لمدة 3 أيام ثم فحصت مجهرياً لتشخيص الفطر النامي وفق المفتاح التصنيفي والصفات المذكورة من قبل Waterhouse (16).

استخلاص بروتينات الفطر

أتبعت طريقة Osherov و May (10) في استخلاص بروتينات الفطر موضوع الدراسة وقدرتركيز البروتين حسب معادلة Fedenko (5):

$$\text{تركيز البروتين (ملغ/مل)} = \frac{OD_{235} - OD_{280}}{2.51}$$

تمنيع حيوانات التجربة

أتبعت طريقة Lin وآخرون مع إجراء بعض التحويرات في تمنيع حيوانات التجربة (9). سحب 20 مل من دم الأرنب وأخذ المصل غير الممنع وحفظ عند –20º س لحين الإستخدام. حقن 1.5 مغ من المستخلص البروتيني للفطر *P. aphanidermatum* تحت جلد ارنب أبيض وعلى ثلاث حقنات بمعدل 0.5 مغ/مل لكل حقنة وكانت المدة بين كل حقنة وأخرى 14 يوماً. روعي مزج حجم مساو من عامل التمنيع المساعد غير الكامل (Incomplete freund's adjuvant) مع مولد الضد (Antigen) في كل حقنة. بعد سبعة أيام من إنتهاء برنامج الحقن سحب ما يقارب من 20 مل من دم الأرنب وترك لمدة ساعتين في درجة حرارة المختبر ثم جمع المصل المضاد واخضع لعملية طرد مركزي بسرعة 5000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة وحفظ المصل عند –20º س لحين الاستخدام.

تنقية الغلوبيولين جاما المناعي (IgG)

استخدمت طريقة الـ DEAE-Cellulose في تنقية الـ IgG وكما أشير سابقاً (16) مع إجراء بعض التحويرات. ربطت الأجسام المضادة IgG المنقاة بانزيم الفوسفاتيز القاعدي وذلك باضافة 2 مغ من الانزيم إلى 1 مل من مستحضر الجاما جلوبيولين IgG بتركيز 1 مغ/مل. أجري للمحلول عملية فصل غشائي لمدة 30 ساعة مقسمة على ثلاث مراحل في محلول فوسفاتي ملحي (PBS) وبحجم 500 مل في كل مرحلة مع التحريك المستمر عند درجة حرارة المختبر. أجريت عملية فصل غشائي للمحلول لمدة 4 ساعات في 500 مل من محلول الـ PBS المخفف إلى النصف حاوياً 0.06% جلوترألديهايد مع التحريك المستمر عند درجة حرارة المختبر حتى اصفرار لون المحلول. أجريت عملية فصل غشائي للمحلول لمدة 30 ساعة مقسمة على ثلاث مراحل متعاقبة في 500 مل من محلول PBS. وبذلك تم الحصول على مركب الأجسام المضادة المعلمة بالإنزيم Enzyme labeled–globulin. واستخدم احلول التغطية (Coating buffer) (1.59 غ Na_2CO_3 و 2.93 غ $NaCO_3$ ذو درجة حموضة 9.6) للحصول على التركيز المطلوب (10 مايكروغرام IgG/مل) وتم تحضير التركيز نفسه من الجاما جلوبيولين المعلم بالإنزيم الذي حضر سابقاً بالطريقة نفسها (3).

اختبار اليزا DAS-ELISA

أجري اختبار اليزا باستخدام المصل المضاد لبروتينات الفطر *P. aphanidermatum* لفحص المعلق البروتيني له كما وتم استخدام المصل المضاد نفسه لفحص المعلق البروتيني لكل من الفطر *Alternaria solani* و *Rhizoctonia solani* فضلاً عن استخدام المصل العادي غير الممنع في فحص كل من المستخلص البروتيني للفطور الثلاثة أعلاه وتم قراءة النتائج في جهاز قاريء اليزا.

النتائج والمناقشة

أوضحت النتائج أن تركيز البروتينات التي تم استخلاصها من الفطر هي 156 ميكروغرام/مل. أجري اختبار اليزا للكشف عن المستخلص البروتيني للفطر موضوع الدراسة وأعطى قاريء اليزا عند فحص المستخلص البروتيني للفطر *P. aphanidermatum* عند طول موجة 405 نانومترات قراءة مقدارها 1.32، في حين كانت قيم اليزا 0.22 للمستخلص البروتيني للفطر *A. solani* و 0.24 للمستخلص البروتيني للفطر *R. solani*. ومن النتائج التي تم الحصول عليها يلاحظ مدى التخصصية العالية للمصل المضاد المنتج للفطر *P. aphanidermatum*. وكانت نتائج فحص المستخلص البروتيني للفطور الثلاثة باستخدام المصل غير الممنع هي 0.21، 0.20 و 0.24، على التوالي (جدول 1).

جدول 1. قيم إمتصاص قاريء اليزا عند طول موجة 405 نانومترات بإستخدام المصل المضاد لبروتينات الفطر *Pythium aphanidermatum*.

Table 1. ELISA values at 405 nm when using an antiserum produced against proteins extracted from *Pythium aphanidermatum* fungus

قراءة اليزا ELISA values	العينة المفحوصة Tested sample	
	المصل المضاد للفطر *P.aphanidermatum*	
1.32	*P. aphanidermatum*	المستخلص البروتيني للفطر
0.22	*Alternaria solani*	المستخلص البروتيني للفطر
0.24	*Rhizoctonia solani*	المستخلص البروتيني للفطر
	المصل غير الممنع Normal serum	
0.21	*P. aphanidermatum*	المستخلص البروتيني للفطر
0.20	*Alternaria solani*	المستخلص البروتيني للفطر
0.24	*Rhizoctonia solani*	المستخلص البروتيني للفطر

يلاحظ من الجدول مدى التخصصية العالية للمصل المضاد المنتج للمستخلص البروتيني للفطور عند استخدامها في اختبار اليزا DAS-ELISA فضلاً عن سهولة إنتاجها وكلفتها المنخفضة وبساطة الفحص وهذا ما أشار اليه كل من Tsai و Yu (13) مقارنة بانتاج المصل المضاد للغزل الفطري لاستخدامه في اختبار اليزا الأقل دقة (6). في حين كان استخدام المصل المضاد وحيد الكلون في الكشف عن الفطور باستخدام مستخلص جدران الخلايا للفطور عالية الدقة لكن طريقة إنتاجها مكلفة ومعقدة (14). لذا يمكن الإستنتاج أن أفضل طريقة في إنتاج الأجسام المضادة متعددة الكلون للفطور لاستخدامها في اختبار اليزا هو بروتينات الفطر وهذا يتفق مع ما أشار اليه Randles وآخرون (11). وعلى هذا الأساس يمكن إعتماد الطرائق المصلية/السيرولوجية في تشخيص الفطور كوسيلة دقيقة جداً للتشخيص ومنخفضة الكلفة ومكملة للمفاتيح التشخيصية مما يسرع في الحصول على النتيجة وزيادة الدقة في الإختبار.

Abstract

Al-Ani, R.R. 2012. Produce Polyclonal Antibody for the Identification and Detection of the Fungus *Pythium aphanidermatum* by ELISA. Arab Journal of Plant Protection, 30: 135-138.

Cucumber plant *Cucumis sativus* L. is known to be affected by many diseases including root rot and damping off caused by the fungus *Pythium aphanidermatum.* To speed up the identification process, this study was carried out to develop an immunological method to detect this pathogen by DAS-ELISA. Fungal proteins were extracted, and three subcutaneous injections were administered in to a white rabbit with 0.5 mg/injection. Antiserum against fungal proteins was obtained, and the immunoglobulin G (IgG) fraction was purified and conjugated with alkaline phosphatase to use for detection by DAS-ELISA. The ELISA value of protein extracted from *P. aphanidermatum* was 1.32 whereas the value was 0.22 for the protein extract of *Alternaria solani* and 0.24 for protein extract of *Rhizoctonia solani*. The results obtained demonstrate the high specificity of the antibodies produced for detecting *P. aphanidermatum* by DAS-ELISA. Accordingly, this test can be used as complementary test to the classical methods to enhance diagnosis speed and accuracy.

Keywords: Polyclonal antibodies, DAS-ELISA, *Pythium aphanidermatum*

Corresponding author: Raed Raouf Al-Ani, Biotechnology Research Center, Al-Nahrain University, Iraq, Email: raed_r1961@yahoo.com

References

المراجع

1. **Adams, P.B.** 1971. *Pythium aphanidermatum* oospore germination as affected by time, temperature and pH. Phytopathology, 61: 1149-1150.
2. **Bilgrami, K.S. and H.C. Dube.** 1976. Text book of modern plant pathology. Viska publishing house Pvt Ltd, New Delhi, 344 pp.
3. **Clark, M.F. and A.N. Adams.** 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme –linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. Journal of General Virology, 43: 475-483.
4. **Ferraris, L., F. Cardinale, D. Valentino, P. Roggero and G. Tamietti.** 2004. Immunological discrimination of *Phytophthora cinnamomi* from other phytophthora pathogenic on chestnut. Journal of Phytopathology, 152: 93-95.
5. **Fedenko, V.S.** 1989. Determination of protein in solutions from absorption in the ultraviolet region. Chemistry of Natural Compounds, 25: 590-592.
6. **Holtz, B.A., E.K. Alexander and A.R. Weinhold.** 1994. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Thielaviopsis basicola*. Phytopathology, 84: 977-983.
7. **Kageyama, K., M. Kobayashi, M. Tomita, N. Kubota, H. Suga and M. Hyakumachi.** 2002. Production and evaluation of monoclonal antibodies for the detection of *Pythium sulacatum* in soil. Journal of Phytopathology, 150: 97-104.
8. **Kraft, J.M. and W.L. Boge.** 1994. Development of antiserum to quantify *Aphanomyces euteiches* in resistant pea lines. Plant Disease, 78: 179-183.
9. **Lin, H.H., R.M. Lister and M.A. Cousin.** 1986. Enzyme-Linked immunosorbent assay for detection of

mold tomato puree. Journal of Food Science, 51: 180-183.

10. **Osherov, N. and G.S. May.** 2002. Optimization of protein extraction from *Aspergillus nidulaus* for gel electrophoresis. Fungal Genetics Newsletter, 45: 38-40.
11. **Randles, J.W., R.A. Hodgson and E. Wefels.** 1996. The rapid and sensitive detection of plant pathogens by molecular methods. Australian Plant Pathology, 25: 71-85.
12. **Salinas, J. and A. Schots**. 1994. Monoclonal antibodies–based immunoflourescence test for detection of conidia of *Botrytis cinerea* on cut flowers. Phytopathology, 84: 351-356.
13. **Tsai, G.J. and S.C. Yu.** 1997. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus*. Journal of Food Protection, 60: 978-984.
14. **Yuen, G.Y., J.Q. Xia and G.L. Sutula.** 1998. A sensitive ELISA for *Pythium ultimum* using polyclonal antibodies and species–specific monoclonal antibodies. Plant Disease, 82: 1029-1032.
15. **Yuen, G.Y., M.L. Craig and F. Avila.** 1993. Detection of *Pythium ultimum* with a species- specific monoclonal antibody. Plant Disease, 77: 602-698.
16. **Waterhouse, G.M.** 1967. Key to *Pythium pringsheim*. Commonwealth Mycological Institute, Kew. *Mycological Papers*, 109: 1-15.

Received: November 24, 2010; Accepted: May 29, 2011

تاريخ الاستلام: 2010/11/24؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2011/5/29