فصلنامه گیاه پزشکی
۵۵- ۴۳ : (۱) ۱- ۱۳۸۸

خالص سازی و خصوصیات سرولوژیکی فیتوپلاسمای برگ سفیدی نیشکردر استان خوزستان

رویا بیابانی*، ساسان قاسمی
گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز
محمد صالحی
بخش تحقیقات آفات و بیماریهای گیاهی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی فارس، زرقان
حشمت اله رحیمیان
گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه مازندران، ساری

چکیده

بیماری برگ سفیدی نیشکر یکی از مخربترین بیماری‌های نیشکر در آسیا می‌باشد. این بیماری به عنوان یک بیماری فیتوپلاسمایی بر روی نیشکر در استان خوزستان نیز گزارش شده است. علاوه بر نیشکر، مرغ نیز علائم برگ سفیدی ناشی از فیتوپلاسما را در این استان نشان می‌دهد. به منظور خالص‌سازی نسبی فیتوپلاسمای عامل برگ سفیدی از نیشکر آلوده به بیماری استفاده شد. آموده حاصل از خالص‌سازی نسبی ۴۰ گرم بافت آلوده به خرگوش تزریق و بعد از خون‌گیری، آنتی سرم تهیه گردید. آنتی سرم حاصل پس از جذب با عصاره سالم در آزمایش‌های الیزا (PTA-ELISA)، دیبا (DIBA) و Tissue Print (TPIA)، فقط قادر به تشخیص و شناسایی فیتوپلاسمای همولوگ خود بود درحالی‌که هیچ گونه واکنشی بین آنتی سرم با فیتوپلاسماهای غیر همولوگ (زردی پروانش، جاروک لیمو ترش، جاروی بادام و برگ سفیدی مرغ) مشاهده نشد.

واژه های کلیدی : فیتوپلاسما، نیشکر، بیماری برگ سفیدی، سرولوژی

مقدمه

بیماری برگ سفیدی نیشکر یکی از مهم‌ترین بیماری‌های نیشکر در بعضی از کشورهای آسیایی مانند تایلند و تایوان محسوب می‌شود (Sdoodee *et al.*, 1999). این بیماری باعث

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: roya_biabani@yahoo.com
دریافت: ۱۳۸۷/۷/۴، پذیرش: ۱۳۸۷/۱۰/۲۵

می‌شود تعداد و اندازه ساقه های قابل آسیاب گیاهان بیمار کاهش یافته و در نهایت منجر به کاهش عملکرد محصول می شود (Rishi & Chen ,1989). روش ابتدایی و اصلی انتقال این بیماری از طریق قلمه های آلوده می باشد. گسترش ثانویه این بیماری از طریق زنجرک *Matsumuratettix hiroglyphicus* (Matsumura) به روش تکثیری انجام می‌پذیرد (Matsumoto *et al.*, 1968; Yang & Pan, 1970).

بیماری برگ سفیدی نیشکر در ایران با توجه به ماهیت عامل بیماری، نحوه انتقال و سیر صعودی شیوع آن از زمان اولین گزارش تا به حال، از بیماری های خطرناک محسوب می شود (Salehi *et al.*,2001). از این رو مطالعه و شناسایی دقیق عامل یا عوامل بیماری، تعیین راه‌های انتقال و گسترش بیماری و در نهایت شناخت بهترین و موثرترین راه های کنترل آن در ایران یک امر ضروری به‌نظر می رسد.

علائم این بیماری از مدت‌ها پیش در کشت و صنعت های نیشکری ایران در سطح وسیع مشاهده می شد، ولی به غلط به‌عنوان اختلالات ژنتیکی و گاهی نیز به‌عنوان کمبود آهن تشخیص داده می شد (Salehi *et al.*,2001).

هدف از تحقیق حاضر توسعه یک روش سرولوژی برای تشخیص، شناسائی دقیق و تعیین ارتباط فیتوپلاسمای برگ سفیدی نیشکر با سایر فیتوپلاسماهای برگ سفیدی غلات می‌باشد.

مواد و روشها

منبع بیماری

قلمه هایی از نیشکر رقم CP 74-1119 با علائم برگ سفیدی از موزه ژرم پلاسم مرکز تحقیقات نیشکر ایران انتخاب ودر گلخانه ای با شرایط دمای۲۰- ۳۵ درجه سلسیوس کشت و نگهداری شدند. چهل گرم از بافت تازه گیاهان رشد یافته از قلمه های مذکور، که علائم برگ سفیدی را به خوبی نشان می دادند، انتخاب و جهت خالص سازی مورد استفاده قرار گرفت. هم چنین نمونه های مرغ با علائم برگ سفیدی، پروانش با علائم زردی و لیمو ترش و بادام با علائم جارویی در گلخانه با شرایط فوق کشت و نگهداری شدند.

خالص سازی

خالص سازی عامل بیماری با استفاده از روش Saeed *et al.* (1993) با تغییرات جزیی و به ترتیب ذیل انجام گرفت: چهل گرم بافت برگ سالم نیشکر رقم CP 74-1119 که عدم آلودگی آنها با PCR به اثبات رسیده بود، انتخاب و با استفاده از ۵ حجم بافر GMS (گلیسین ۰/۳ مولار، pH=8، ۰/۰۲ مولار کلرور منیزیم و ۰/۰۲ مولار سولفیت سدیم) در دستگاه مخلوط کن هموژنیزه شده و پس از فیلتر کردن به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حذف و رونشین به مدت یک ساعت در ۳۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتیریفوژ گردید. رسوب

در ۴ میلی گرم بافر GMS حل و آموده حاصله جهت تهیه آنتی سرم علیه پروتئین های گیاه سالم در چهار نوبت متوالی به فاصله یک هفته به خرگوش تزریق و در پایان هفته پنجم خون‌گیری به‌عمل آمد. سرم خون مذکور جدا و از آن به‌عنوان آنتی سرم گیاه سالم (پروتئین های نیشکر) در مراحل خالص سازی استفاده شد. در مرحله بعد چهل گرم بافت آلوده نیشکر که آلودگی آنها به فیتوپلاسما با PCR تائید شده بود، با استفاده از ۵ حجم بافر GMS هموژنیزه شده و با استفاده از سانتریفوژ افتراقی، همانند پروتئین های بافت سالم، رسوب داده شد. رسوب حاصله در ۴ میلی لیتر بافر GMS حل و با ۲ میلی‌لیتر آنتی سرم تهیه شده علیه گیاه سالم مخلوط و به مدت یک شب در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شد. مخلوط فوق به مدت ۱۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و رونشین به مدت یک ساعت در ۳۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. رسوب حاصله در ۲ میلی‌لیتر بافر PBS (۱/۴۴ گرم Na_2Hpo_4، ۰/۲ گرم KH_2po_4، ۸ گرم $Nacl$، ۰/۲ گرم Kcl و ۰/۲ گرم NaN_3 در لیتر، $pH = 7.4$) به حالت سوسپانسیون در آمده و به‌عنوان آموده نسبتاً خالص فیتوپلاسمای برگ سفیدی نیشکر جهت تهیه آنتی سرم مورد استفاده قرار گرفت.

برای تهیه آنتی سرم هر بار یک میلی‌لیتر آموده خالص فیتوپلاسما با حجم مساوی (در مورد تزریق زیرجلدی) و با نیم حجم (در مورد تزریق ماهیچه ای) روغن Freund's incomplete adjuvant مخلوط و با استفاده از همزن به صورت امولسیون در آمد. امولسیون حاصله به صورت یک در میان به ماهیچه ران و زیر پوست پشت گردن خرگوش تزریق شد. عمل تزریق ۴ بار به فواصل ۷ روز انجام گرفت و در پایان هفته پنجم خون‌گیری از قلب خرگوش انجام پذیرفت. سرم خون حاصله جدا و به عنوان آنتی سرم برگ سفیدی نیشکر در آزمون‌های سرولوژیکی مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون‌های سرولوژیکی

به منظور تعیین ارتباط احتمالی فیتوپلاسمای برگ سفیدی نیشکر با سایر فیتوپلاسماهای مهم شناخته شده در ایران از آزمون‌های Plate-Trapped Antigen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Dawson & Mowat, 1987) ، Dot-Immunoblotting Assay (Hibi & Saito, 1985) و Tissue Print Immuno Assay (Huth, 1999) استفاده شد.

نتایج

علائم بیماری برگ سفیدی نیشکر عمدتاً روی پهنک برگ و به‌صورت ظهور یک نوار منفرد سفید یا کرم بر روی برگ های جوان مشاهده می‌شود. در مراحل بعدی سه نوع علائم شامل سفیدی کامل، نوارها و نقوش سفید رنگ ظاهر می شوند (شکل ۱).

خالص سازی

از آن‌جایی‌که معیار مناسبی برای سنجش میزان فیتوپلاسمای خالص شده در آموده های بدست آمده وجود نداشت، اندازه گیری راندمان خالص سازی مقدور نبود و آموده بدست آمده از خالص سازی چهل گرم بافت آلوده در چهار نوبت به خرگوش تزریق شد. خلوص آنتی سرم حاصله و عدم واکنش با گیاه سالم به‌عنوان معیاری از خلوص نسبی آموده فیتوپلاسما تلقی شد. به‌طوری‌که متوسط میزان جذب نور نمونه های آلوده نیشکر پس از دو ساعت نگهداری پلیت ها در دمای محیط حدود ۱ و در مورد نمونه های سالم حدود صفر بود (جدول ۱).

تعیین تیتر آنتی سرم

برای تعیین تیتر آنتی سرم حاصله علیه فیتوپلاسمای برگ سفیدی نیشکر از روش PTA-ELISA استفاده شد. براساس این آزمون تیتر بهینه آنتی سرم فوق در رقت $1/1500$ بدست آمد. در این رقت بیشترین اختلاف بین میزان جذب نور نمونه های سالم و آلوده مشاهده شد (جدول ۱).

آزمون‌های سرولوژیکی

آزمون PTA-ELISA

واکنش مثبت در آزمون الیزا با استفاده از رابطه $I \geq H + 5sd\overline{H}$ محاسبه گردید که در آن I نشان دهنده جذب نمونه های مثبت، $\overline{H}$ متوسط میانگین جذب نوری نمونه های سالم و sd انحراف معیار جذب نمونه های سالم در طول موج ۴۰۵ نانومتر می باشد. همان‌طور که در شکل ۲ نشان داده شده آنتی سرم فیتوپلاسمای برگ سفیدی نیشکر تنها قادر به تشخیص نمونه های آلوده به برگ سفیدی نیشکر بود و با نمونه های آلوده به برگ سفیدی مرغ، زردی پراونش، جارویی لیمو ترش و جارویی بادام واکنشی نشان نداد.

آزمون DIBA

در این آزمون پس از قرار دادن نوار نیتروسلولز در محلول سوبسترا، نمونه های مثبت رنگ ارغوانی تیره گرفته و نمونه های منفی بی رنگ مانده یا کمی کدر شدند. بر اساس شکل ۲ آنتی سرم برگ سفیدی نیشکر در این آزمون هیچ ارتباطی با فیتوپلاسماهای برگ سفیدی مرغ، جارویی بادام، جارویی لیموترش و زردی پروانش نشان نداد و تنها نمونه های ردیف ۵، ۶ و ۷ که به ترتیب نیشکر با علام زردی و کلروز، برگ سفیدی و برگ پرچمی بودند، به رنگ ارغوانی در آمدند.

جدول ۱- تعیین تیتر آنتی سرم تولید شده برعلیه بیماری برگ سفیدی نیشکر در آزمون الیزا (بعد از دو ساعت)

→ میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر در رقت‌های آنتی‌سرم	۱۰۰	۱۰۰	۵۰۰	۵۰۰	۱۰۰۰	۱۰۰۰	۱۵۰۰	۱۵۰۰	۲۰۰۰	۲۰۰۰
↓ رقت آنتی ژن										
شاهد منفی بدون نمونه	b_1 (۲/۰۳۸)	b_1 (۲/۱۸۰)	b_1 (۰/۷۵۰)	b_1 (۰/۵۸۳)	b_1 (۰/۴۶۶)	b_1 (۰/۵۲۶)	b_1 (۰/۶۰۸)	b_1 (۰/۵۷۳)	b_1 (۰/۳۶۱)	b_1 (۰/۳۶۲)
۲۵ نمونه‌ی نیشکر آلوده	۱ >۲/۵	۱ >۲/۵	۲ ۱/۵۱۵	۲ ۱/۳۲۵	۳ ۰/۸۲۰	۳ ۰/۷۷۱	۴ ۰/۹۶۳	۴ ۰/۹۱۰	۵ ۰/۸۲۸۹	۵ ۰/۰۸۸
۲۵ نمونه نیشکر سالم	۰ ۱/۷۴۷	۰ ۱/۸۰۲	۰ ۰/۰۸۵	۰ ۰/۰۹۶	۰ -۰/۱۵۸	۰ -۰/۱۷۱	۰ -۰/۰۷۷	۰ -۰/۱۱۷	۰ -۰/۳۸۳	۰ -۰/۳۷۶

جدول ۲- ارزیابی واکنش آنتی‌سرم تهیه شده علیه فیتوپلاسمای برگ سفیدی نیشکر با نمونه‌های سالم و آلوده

رقت آنتی ژن	میزان جذب در ۴۰۵ نانومتر در رقت ۱۰۰۰ آنتی‌سرم									
	b_1	b_1	۱	۱	۲	۲	۳	۳	۴	۴
۲۵	(۰/۲۳۹)	(۰/۳۳۸)	(۰/۴۴۴)	(۰/۴۶۶)	(۱/۶۳۱)	(۱/۵۹۸)	(۱/۲۰۱)	(۱/۱۷۰)	(۰/۶۴۸)	(۰/۷۵۳)
	۵	۵	H	H	۶	۶	۷	۷	۸	۸
۲۵	-۰/۰۲۲	-۰/۰۳۲	-۰/۰۷۴	-۰/۰۶۹	۰/۰۲۱	۰/۰۳۱	-۰/۰۷۳	-/۰۴۰	-۰/۰۴۵	-۰/۰۴۷
	۹	۹	۱۰	۱۰	H	H	۱۱	۱۱	۱۲	۱۲
۲۵	۰/۱۲۸	۰/۱۴۸	۰/۲۲۳	۰/۲۱۵	-۰/۰۴۶	-۰/۰۵۲	-۰/۰۱۶	۰/۰۰۵	۲/۰۲۳	۲/۰۱۸
	۱۳	۱۳	۱۴	۱۴	I	I	b_1	b_1	H	H
۲۵	۰/۸۰۹	۰/۷۶۶	۰/۰۳۷	۰/۰۷۹	۱/۶۲۴	۱/۶۸۹	(۰/۲۱۰)	(۰/۲۱۲)	۰/۰۴۹	-۰/۰۲۵

Blank (b1): نیشکر با علائم برگ پرچمی (۱)، نیشکر با علائم برگ سفیدی (۲)، نیشکر با علائم برگ پرچمی (۳)، نیشکر با علائم برگ پرچمی (۴)، نیشکر با علائم روشن شدن بین رگبرگ‌ها (۵)، پروانش با علائم زردی (۶)، جارویی بادام (۷)، جارویی لیموترش (۸)، مرغ با علائم برگ سفیدی (۹)، مرغ با علائم برگ سفیدی (۱۰)، مرغ با علائم برگ سفیدی (۱۱)، نیشکر با علائم زردی و کلروز (۱۲)، نیشکر با علائم برگ پرچمی (۱۳)، مرغ بدون علائم (۱۴)، شاهد مثبت برگ سفیدی نیشکر (I)، نیشکر سالم (H).

آزمون TPIA

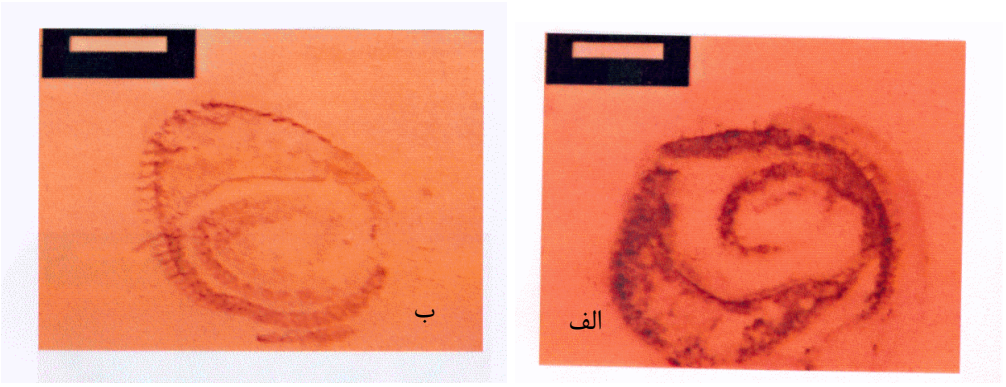
نتایج این آزمون نیز همانند سایر آزمون‌های سرولوژیکی قبلی نشان‌دهنده واکنش اختصاصی آنتی سرم فیتوپلاسمای برگ سفیدی نیشکر با نمونه های آلوده نیشکر بود. در این آزمون محل های تراکم فیتوپلاسما در گیاهان آلوده به صورت لکه ارغوانی متمایل به سیاه مشاهده گردید. بافت مقاطع برگ‌های آلوده به فیتوپلاسمای برگ سفیدی نیشکر در واکنش با آنتی سرم برگ سفیدی نیشکر به رنگ ارغوانی درآمد. محل تجمع لکه های ارغوانی عمدتاً در بافت‌های آوندی آبکشی بود که مؤید ماهیت فیتوپلاسمایی عامل بیماری است (شکل ۳). عدم واکنش آنتی سرم مذکور با نمونه های آلوده به برگ سفیدی مرغ، زردی پروانش و نیشکر و مرغ سالم در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

الف ب ج

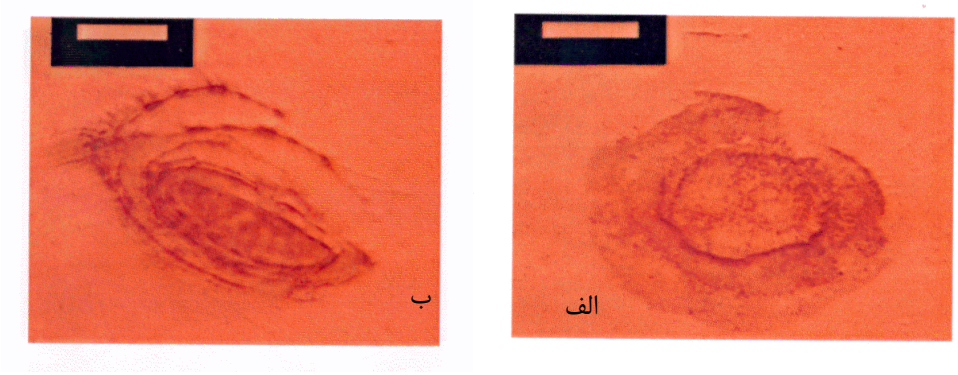
شکل ۱- علائم اولیه (الف) و نهایی (ب و ج) برگ سفیدی نیشکر

جدول ۲ – نتایج آزمون دیبا با استفاده از آنتی سرم برگ سفیدی نیشکر. آنتی ژن های نیشکر سالم، برگ سفیدی مرغ (۱، ۲و ۳)، برگ سفیدیی نیشکر (زردی، سفیدی و پرچمی)، جارویی بادام، جارویی لیمو ترش و زردی پراونش .

آنتی سرم / آنتی ژن	برگ سفیدی نیشکر
گیاه سالم	
برگ سفیدی مرغ ۱	
برگ سفیدی مرغ ۲	
برگ سفیدی مرغ ۳	
برگ سفیدی نیشکر (زردی)	
برگ سفیدی نیشکر (سفیدی)	
برگ سفیدی نیشکر (پرچمی)	
جارویی بادام	
جارویی لیمو ترش	
جارویی پروانش	



شکل ۳- تاثیر آنتی سرم تولیدی برعلیه فیتوپلاسمای برگ سفیدی نیشکر بر روی نیشکر آلوده به برگ سفیدی (الف) و سالم (ب) در آزمون TPIA



شکل ۴- تاثیر آنتی سرم تولیدی بر علیه فیتوپلاسمای برگ سفیدی نیشکر بر روی نمونه های آلوده به برگ سفیدی مرغ (الف) و زردی پراونش (ب) در آزمون TPIA

بحث

از آنجایی که علائم بیماری برگ سفیدی شبیه علائم ایجاد شده به وسیله طیف گسترده‌ای از عوامل زنده و غیر زنده از جمله چندین بیماری قارچی و باکتریایی، تغذیه نامناسب و موتاسیون ژنتیکی است (Rott *et al.*, 2000)، تعیین همراهی فیتو پلاسما با علائم مشاهده شده ضروری است.

در این تحقیق نیشکرهایی که علائمی از قبیل ایجاد یک نوار کشیده سفید رنگ به موازات رگبرگ اصلی، برگ پرچمی، برگ سفیدی و کلروز یا رنگ پریدگی نشان می‌دادند (شکل ۱)، در آزمون‌های سرولوژیکی آلوده به فیتوپلاسمای برگ سفیدی نیشکر تشخیص داده شدند. در مواردی که گیاهانی با علائم فوق الذکر مثبت تشخیص داده نشدند، احتمال دخالت دیگر عوامل ذکر شده وجود دارد. عدم ردیابی فیتوپلاسماها در این گونه گیاهان می‌تواند به علت توزیع ناهمگن فیتوپلاسما در قسمت های مختلف گیاه یا تیتر پایین فیتوپلاسما در گیاه و یا تیتر اندک آنتی سرم در روش‌های شناسایی سرولوژیکی باشد.

روش های تشخیص سرولوژیکی مالیکوت های گیاهی به در دسترس بودن آنتی سرم های اختصاصی بستگی دارد. گزارش‌های متعدد نشان می دهد که آزمایشگاه های کمی برای تولید آنتی سرم های پلی کلونال اختصاصی فیتوپلاسما از گیاهان مختلف موفق بوده اند (Caudwell *et al.*, 1982; Clark *et al.*, 1983; Cousin *et al.*, 1989; Hobbs *et al.*, 1987; Sinha, 1979; Sinha & Bwenhamou, 1983; Sinha & Chiykowski, 1984).

چنین آنتی سرم‌های پلی کلونال قادرند گیاهان آلوده به فیتوپلاسما را از گیاهان سالم تشخیص دهند. اگر چه استفاده از آنتی بادی های منوکلونال بسیاری از مشکلات استفاده از آنتی سرم های پلی کلونال را حل کرده است، اما تولید آنتی بادی های منوکلونال مناسب نیازمند تجهیزات آزمایشگاهی پیشرفته و اختصاصی می باشد (Clark *et al.*, 1989; Liu & Chen, 1985; Schwartzy *et al.*, 1989). آنتی سرم های تولیدی در بررسی حاضر دارای

کمترین واکنش غیر اختصاصی زمینه ای با گیاه سالم بودند، لذا روش خالص سازی به کار رفته در این تحقیق قابل توجه می باشد. آنتی ژن های گیاهی در مرحله ای از خالص سازی با آنتی‌سرم های تولیدی علیه آنتی ژن های گیاه سالم واکنش داده و از آموده فیتوپلاسمای خالص شده حذف می گردد. بنابراین، میزان آنتی ژن های گیاهی تزریقی همراه با آموده خالص شده به حداقل رسیده و در نتیجه، آنتی سرم تولیدی از اختصاصیت بالایی در تشخیص فیتوپلاسمای همولوگ برخودار می باشد. این روش خالص سازی و تهیه آنتی سرم در گذشته به منظور خالص سازی فیتوپلاسمای عامل فیلودی باقلا در سودان مورد استفاده قرار گرفته است (Saeed *et al*., 1993). در ایران نیز از این روش برای خالص سازی فیتوپلاسمای عامل جاروک یونجه استفاده شده است (Salehi & Izadpanah, 2000). در بررسی اخیر برای اولین بار از این روش با تغییرات جزیی در مورد خالص سازی فیتوپلاسماها از گیاهان تیره غلات استفاده شده است. تیتر آنتی سرم های تولیدی در این تحقیق ۱/۱۵۰۰ بود که در مقایسه با آنتی سرم‌های تولیدی برعلیه سایر فیتوپلاسماها، از تیتر قابل قبولی برخوردار است.

کلیه آزمون‌های سرولوژیکی مورد استفاده در این تحقیق، مبین وجود اختلاف بین فیتوپلاسما برگ سفیدی نیشکر با سایر فیتوپلاسماهای آزمایش شده بودند. آزمون PTA-ELISA که در آن نیازی به خالص سازی گاماگلوبولین نیست، برای اولین بار در این تحقیق به منظور تشخیص فیتوپلاسماها مورد استفاده قرارگرفته است. به علاوه از آنجا که در این روش برای رقیق کردن آنتی سرم از عصاره گیاه سالم در بافر آنتی بادی استفاده می شود، میزان واکنش های غیر اختصاصی زمینه ای نیز به شدت کاهش می یابد.

نتایج آزمون‌های دیبا و TPIA اگر چه از اختصاصیت کمتری نسبت به آزمون الیزا برخودار است (Hibi & Saito, 198; Huth, 1999)، ولی به دلیل مزایایی از قبیل حساسیت بسیار بالا، استفاده از مقادیر بسیار کم آنتی ژن (۲ میکرولیتر) تشخیص تعداد زیادی گیاه در شرایط مزرعه ای، سرعت و آسانی استفاده از این روش ها، آنها را به عنوان ابزاری با ارزش در تشخیص بیماری های فیتوپلاسمایی در گیاه و حشره ناقل معرفی می کند. نتایج بررسی با استفاده از این دو روش نیز بیانگر عدم ارتباط سرولوژیکی بین فیتوپلاسماهای عامل برگ سفیدی نیشکر و مرغ و تمایز این دو فیتوپلاسما از یکدیگر می باشد. این نتایج با نتایج به دست آمده در تایلند (Sarindu & Clark, 1993; Sdoodee *et al*., 1999) و استرالیا (Blanche *et al*., 2003; Tran-Nguyen *et al*., 2000) مطابقت دارد.

منابع

Blanche, K.R., Tran-Nguyen, L. & Gibb, K.S. 2003. Tests of transimission of cynodon white leaf phytoplasma to sugarcane and maize on northern Australia. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54: 423-427.

Caudwell, A., Meignoz, R., Kuszala, C., Larrue, J., Fleury, A., & Boudon-Pudieu, E. 1982. Purification serologique et observation ultramicroscopique de l'agent pathogen (Mlo) de flavescence doree de la vigne. *Annales de L'Institut Pasteur, Microbiology,* 176: 5-723 (in French with English abstract).

Clark, M.F., Barbara,D.J. & Davies, D.L. 1983. Production and characteristics of antisera to *Spiroplasma citri* and clover phyllody-associated antigens derived from plants. *Annals of Applied Biology,* 103: 251-259.

Clark, M.F., Morton, A. & Buss, S.L. 1989. Preparation of mycoplasma immunogens from plants and a comparison of polyclonal and monoclonal antibodies made against primula yellow MlO-associated antigens. *Annals of Applied Biology,* 114: 111-124.

Cousin, M.T., Dafalla, G.A., Demazeu, E., Theveu, E. & Grosclaude, J. 1989. In situ detection of MlOs for solanaceae stolbur and faba bean phyllody by indirect immunofluoresence. *Journal of Phytopathology,* 124: 71-79.

Hibi, T. & Saito, Y. 1985. A dot immunobinding assay for the dectection of tobacco mosaic virus in tissues. *Journal Genetic Virology,* 66: 1191-1194.

Hobbs, H.A., Reddy, D.V.R. & Reddy, A.A. 1987. Detection of a mycoplasma-liked organisem by Enzyme-Linked Immunosorbont Assay (ELISA). *Plant Pathology,* 36: 164-167.

Huth, W. 1999. Tissue print immunoassay rapid and reliable method for routinely detecting gramineae viruses. *Plant Research and Development,* 49: 7-19.

Lin, C.P. & Chen, T.A. 1985. Monoclonal antibodies against the aster yellows agent. *Science,* 227: 1233-1235.

Matsumoto, T., Lee, C.H. & Teng, W.S. 1968. Studies on sugarcane white leaf disease of Taiwan with special reference to transmission by a leafhopper, *Epitettix hiroglyphicus* Mats. *Proceedings of the Society of Sugarcane Technology,* 13: 1090-1099.

Rishi, N. & Chen, C.T. 1989. Grassy shoot and white leaf disease. pp. 287-300 In: Ricaud, B. C. & Egan, B. T. (Eds.) *Disease of Sugercance, Major Diseases*. Elsevier Science Publisher, Amesterdam.

Rott, P., Bailey, R.A., Comstock, J.C., Croft, B.J. & Saumtally, A.S. (Eds.) 2000. *A Guide to Sugarcane Diseases*. CIRAD, Montpellier, France.

Saeed, E.M., Rotx, J. & Cousin, M.T. 1993. Studies of polyclonal antibodies for the detection of Mlos associated with faba been (Vicia fabal) using different ELISA methods and dot-blot. *Journal of Phytopathology,* 137: 33-43.

Salehi, M., Ghasemi, S., Taher-Khani, K. & Izadpanah, K. 2001. Phytoplasmal white-leaf disease of sugarcane in Iran. *Iranian Journal Plant Pathology*, 37: 98-99.

Salehi, M. & Izadpanah, K. 2000. Partial purification and serological identification of phytoplasmal agent of alfalfa Witche's broom from Fars province. *Proceedings of the 14th Iranian Plant Protection Congress, Vol. 2, 5-8 Sept. Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran,* p. 292.

Sarindu, N. & Clark, M.F. 1993. Antibody production and identity of Mlos associated with sugarcane white leaf disease and Bermuda-grass white leaf disease from sugarcane white leaf disease and Bermuda-grass white leaf disease from Thailand. *Plant Pathology,* 42: 396-402.

Schwartzy, E., Boudon-Padhfu, S., Grange, R., Melgnoz, T. & Caudwell, A. 1989. Obtention danticorps manodonoux specitique de pagent pathogen de type mycoplsme (Mlo) de flavescence doree de la vigne. *Annales de L'Institut Pasteur, Microbiology,*

140: 311-324 (in French with English abstract).
Sdoodee, R., Schneider, B. Padovan, A.C. & Gibb, K.S. 1999. Detection and genetic relatedness of phytoplasmas associated with plant disease in Thailand *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics*, 3: 133-139.
Sinha, R.C & Bwenhamou, N. 1983. Detection of mycoptasma-like organism antigens from aster yellows-diseased plants by two serological procedures. *Phytopathology,* 73: 1199-1202.
Sinha, R.C. 1979. Purification and serology mycoplasma-like organisms from aster yellows infected plants. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1: 65-70.
Sinha, R.C. & Chiykowski, I.N. 1984. Purification and serological detection of mycoplasma-like organisms from plants affects by peach eastern X disease. *Canadian Journal of Plant Pahtology*, 6: 200-205.
Tran-Nguyen, L., Blanche, K.R., Egan, B. & Gibb, K.S. 2000. Diversity of phytoplasma in northern Australian sugarcane and other grasses. *Plant Pathology,* 49: 666-679.
Yang, S.L., & Pan, Y.S. 1970. Bionomics of *Matsumuratettix hiroglyphicus* Matsumura, an insect vector of sugarcane white leaf disease. II. Development in relation to host plants. *Report Taiwan Sugar Experiment Station,* 50: 73-79.

Purification and serological study of sugarcane white leaf phytoplasma in Khuzestane province

Roya BIABANI, Sasan GHASEMI

Department of Plant Protection, College of Agriculture, Islamic Azad Uiniversity, Shiraz branch, Shiraz, Iran (Corresponding author, Email: roya_biabani@yahoo.com)

Mohammad SALEHI

Plant Pests and Diseases Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Center, Zarghan, Fars, Iran

Heshmatollah RAHIMIAN

Department of Plant Protection, College of Agriculture, Mazandaran University, Sari, Iran

Abstract

Sugarcane white leaf (SCWL) is among the most important and economical diseases of sugarcane in Asia. SCWL is reported from Khuzestan province as an emerging phytoplasmal disease of sugarcane. In addition to SCWL, Bermuda grass white leaf (BGWL) the other monocot phytoplasmal disease also is reported from this province. Rabbit has been used for rising of antiserum by injection of partially purified SCWL at 40g of infected tissue. This antiserum exhibited specificity for its homologous phytoplasma antigen in Plate- Trapped Antigen enzyme-linked immunosorbent assay (PTA-ELISA) dot immunoblotting assay (DIBA) and tissue print immuno assay (TPIA). No cross-reactions were observed in reciprocal tests between this antiserum and other tested phytoplasmas.

Key words: Phytoplasma, Sugarcane, White Leaf disease, Serology