انتاج عدة تشخيصية مناعية للكشف عن سلالتين للبكتيريا *Ralstonia solancearum* (smith) بطريقة اليزا ELISA المسببة لمرض الذبول البكتيري على الطماطة في العراق

Production an immuno kit for identification two strains of *Ralstonia solancearum* (smith) by ELISA which caused a bacterial wilt on tomato in Iraq

رائد رؤوف العاني
مركز بحوث التقنيات الأحيائية / جامعة النهرين

Raed Raouf Al-Aniy
Biotechnology Research center/ Al-Nahrain University

المستخلص:

تعتبر البكتيريا *Ralstonia solanacearum* أحد أهم المسببات المرضية التي تصيب الطماطة وتسبب خسائر اقتصادية كبيرة . شخصت عزلات مرضية من البكتيرياعتمادا" على الصفات المظهرية والتفريقية في الوسط الغذائي Tetrazolium chloride agar (TZS) واختبار فرط الحساسية على اوراق نبات التبغ صنف Xanthi . اجريت عدة اختبارات بايوكيميائية معتمدة في تشخيص الجنس و النوع . شخصت سلالتين من هذه البكتيريا هي R3 ،R1 و حصل على المصل المضاد لكل سلالة بعد حقن المعلق البكتيري النقي لكل منهما في جسم ارنب مختبري . نقي الكلوبيولين المناعي Immunoglobulin (IgG) وربط بانزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase لأستخدامها كعدة تشخيصية لكل سلالة في اختبار اليزا ELISA وسجلت قراءة جهاز قاريء اليزا على طول موجي 405 نانومترعند فحص مستخلص النبات المصاب بالسلالة R1 والمصل المضاد المحضر له 1.14 بينما كانت لمستخلص نبات مصاب بالسلالة R3 والمصل المضاد المحضر لها 1.10 كما واجري اختبار اليزا بين مستخلص نبات مصاب بالسلالة R1 والمصل المضاد للسلالة الثانية R3 . اجري اختبار اليزا لنبات مصاب بالسلالة R3 والمصل المضاد للسلالة R1 إذ سجلت قراءات قاريء اليزا 0.90 و 0.92 على التوالي . كانت نتائج فحص اليزا سالبة عند استخدام المصل غير الممنع Normal serum والمحلول الداريء Carbonate buffer كمصل مضاد كدليل واضح على التخصص العالي للمصل المضاد المنتج في هذه الدراسه .

Abstract

R*alstonia solancearum is* one of most important tomato pathogen which annually causes considerable yield loss. Strains of these pathogenic bacteria were identified based on both phenotypic and differentiation media on Tetrazolium Chloride Agar (TZC) and the hypersensitivity tests on leaves of tobacco cultivar xanthi. Many biochemical adapted tests were carried out for identification of both the genus and species of the bacteria. Two strains R1 and R3 were identified. Antiserum of each strain was obtained following the injection of pure cell suspension of each strain in lab. Rabbit. Immunoglobulin (IgG) was purified and conjugated with alkaline phosphates and used as an identification kit for each strain by ELISA test .The reading of ELISA reader at 405 nanometer when testing plant extract infected by R1 strain with its antiserum were 1.14 while it was 1.10 for R3 strain, ELISA test were also carried out for plant extract infected by R1 strain and the antiserum of R3 strain, ELISA test were carried out too for plant infected by R3 strain and antiserum of R1 strain the reading of ELISA reader were 0.90, 0.92 respectively. The result of ELISA

test was negative when using the normal serum and carbonate buffer as antiserum. The result of this test is clear evidence showed the high specify of the antiserum which produced in this study.

المقدمة

تعد الطماطة.L *Lycopersicn esculentum* من المحاصيل الغذائية العالية وهي من أهم محاصيل الخضر على الاطلاق في العالم وذلك لأمكانية استهلاكها طازجة او مصنعة في كثير من الأطعمة المحببة للأنسان في مختلف بقاع العالم. ويعد مرض الذبول البكتيري المتسبب عن البكتريا *Ralstonia solancearum* من بين اهم الامراض التي تصيب العائلة الباذنجانية ومن ضمنها الطماطة ولاسيما في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية من العالم وفي الزراعة المحمية في المناطق الاخرى [1 ،2] .عدٌ المرض واحدا من بين أهم خمسة أمراض سببت فقدا" في الحاصل والذي تراوح بين 3.3 -20.6 وينتشر المرض بشكل واسع على نباتات الطماطة والفلفل والباذنجان مسببا" خسارة في الحاصل تبلغ 15%في الطماطة و5% في الفلفل والباذنجان [3] .

يملك المسبب المرضي مدى واسع من العوائل النباتية فهو يصيب فضلا عن نباتات العائلة الباذنجانية وبعض محاصيل الخضر اشجار الموز ونباتات الأدغال ويسبب خسائركبيرة عليها [4] ووجد ان نسبة الذبول في بعض الأصناف الهجينة المقاومة تراوحت بين (15- 26)% في حين بلغت في الأصناف الحساسة 55% ويأتي مسبب مرض الذبول البكتيري في المرتبة الأولى من حيث الأهمية الأقتصادية من بين الأحياء المتوطنة بالتربة التي تصيب العائلة الباذنجانية والتي منها *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersicon* والذبول الفيوزيرمي المتسبب عن الفطر *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* فضلا عن الأمراض البكتيرية الأخرى التي تصيب الطماطة [5] . أثبتت الدراسات التصنيفية ان للبكتيريا *Ralstonia solanacearum* عددا" من السلالات التي يمكن التمييز بينها في بعض الصفات الفسيولوجية وطبيعة رد فعل اوراق التبغ Hypersensitive Reaction عند حقن معلق البكتريا في الفراغ بين الخلوي قسم هذا النوع الى ثلاث سلالات تختلف في قدرتها الأمراضية والمدى العائلي وهذه السلالات هي R1 التي لها القدرة على اصابة التبغ والطماطة والبطاطا وباقي نباتات العائلة الباذنجانية ونحو 44 عائلة نباتية والسلالة R2 ولها القدرة على اصابة الموز فقط واحداث مرض يسمى Moko والسلالة R3 ولها القدرة على اصابة الطماطة والبطاطا فقط [5] ولوحظ انه يمكن التمييز بين السلالات الثلاث على اساس استجابة اوراق التبغ *Nicotiana tabaccum xanthi* عند حقن معلق البكتيريا في الفراغ بين الخلوي لهذه الاوراق اذ ينتج عن حقن السلالة R1 ظهور بقع بنية غامقة محاطة بهالة صفراء في المساحة الملقحة بعد 36 ساعة اما السلالة R2 فينتج عنها بقعة صفراء في المساحة الملقحة بعد (10-12) ساعة في حين ان السلالة R3 ينتج عنها اصفرار للمساحة الملقحة من الورقة بعد 48 ساعة[4] . قسَمت البكتيريا الى اربعة طرز وراثية اعتمادا" على صفاتها المظهرية وشكل DNA[7] صنَف النوع *R. solanacearum* الى خمسة طرز (Biovare) تختلف عن بعضها في استغلال ثلاثة سكريات ثنائية هي Cellobiose, Lactose, Maltose وثلاثة كحولات سداسية هي Sorbitol، Manitol، Dutcitol وخمسة سلالات اعتمادا" على المدى العائلي لها ، فالسلالة الأولى تصيب نباتات العائلة الباذنجانية والعديد من النباتات العائدة لعوائل مختلفة مثل الموز امَا السلالة الثانية فتصيب الموز فقط والسلالة الثالثة تصيب الطماطة والبطاطا وبعض انواع التبغ اما السلالتين الأخرتين فتصيب نباتات غير مهمة اقتصاديا [6 ، 7] .

ونظرا" لصعوبة الأختبارات البايوكيميائية التي تستهلك الكثيرمن الوقت والجهد والكلفة لتحديد الجنس والنوع والسلالة لهذه البكتيريا فقد انجز هذا البحث لتحضير مصل مضاد متخصص لكل سلالة وانتاج عدة تشخيصية لها لأستخدامها في اختبار اليزا ELISA لغرض الكشف السريع عنها .

المواد وطرق العمل:

جمع العينات

جمعت نباتات طماطة مصابة بالذبول اعتمد في اختيارها على الأعراض الظاهرة في المجموع الخضري والأوعية الناقلة في الساق من مناطق اليوسفية وابو غريب والرضوانية القريبة من بغداد .

عزل البكتيريا المسببة للمرض

عزلت البكتيريا من النباتات المصابة حيث غسلت بالماء الجاري لأزالة ما يعلق بها من تربة ، وقطعت سيقان النباتات الى قطع صغيرة وعقمت سطحيا بتغطيسها بمحلول هايبوكلورات الصوديوم 1 % لمدة دقيقة واحدة ثم

غسلت السيقان بما ء مقطر معقم وجففت على ورق ترشيح . أخذت عدد من السيقان التي يظهر فيها تلون نسيج الخشب باللون البني على شريحة زجاجية معقمة وأضيفت اليها عدة قطرات من الماء المقطر وسحقت ثم تركت لفترة من الزمن لحين ظهور عكرة في قطرات الماء نتيجة خروج البكتيريا المسببة للمرض من الأنسجة المصابة وفحصت تحت المجهر . أخذ قسم آخر من السيقان وسحق جيدا في عدة قطرات من الماء المقطر في طبق بتري وأخذ جزء من المعلق الناتج بواسطة أبرة تلقيح ذات عقدة (correctly formed loop) معقمة ولقحت بها الاوساط الغذائية (NA) و (PDA) بطريقة التخطيط (streak plate -method) ، ثم حضنت الأطباق بدرجة حرارة30 م لمدة 72 ساعة وأنتخبت المستعمرات الفردية وأعيدت زراعتها بالطريقة نفسها للتأكد من نقاوة العزلة ودونت الصفات المظهرية للمستعمرات النامية ومن ثم حضر من هذه المستعمرات أغشية على شرائح زجاجية نظيفة وصبغت بصبغة كرام تحت المجهر الضوئي نقلت المستعمرات الفردية الى أنابيب أختبار تحتوي على 5 مل ماء مقطر معقم وأغلقت باحكام وحفظت على درجة حرارة 21 م [5 ، 6] .

الكشف عن العزلات المرضيـة

أ- االصفات المظهرية على وسط Tetrazolium chloride agar (TZC)

حضر الوسط الزرعيTetrazolium chloride agar(TZC) في الكشف عن العزلات المرضية وعدل الأس الهيدروجيني pH = 7.5 ثم أضيف لكل 100 مل من الوسط 1 مل من المحلول 1% من (5،2,3) triphphenyl tetrazolium chloride المعقم بالترشيح . لقح الوسط بمعلق البكتيريا المحضرة آنفا بطريقة التخطيط وحضنت على درجة 30 م لمدة 48 ساعة . أختيرت المستعمرات الفردية التي تنطبق عليها مواصفات المستعمرات الممرضه. نقلت المستعمرات الى أنابيب اختبار تحوي 5 مل ماء مقطر وحفظت بدرجة حرارة 21م . أجري اختبار فرط الحساسية على اوراق نباتات تبغ صنف *xanthi* حيث لقحت اوراق التبغ بمعلق بكتيري بتركيز (10 $^{-8}$ خلية/مل) في الفراغ الخلوي بواسطة محقنة ذات قياس 28 . وضعت النباتات في حاضنة مع المتابعة اليومية لحين ظهورالأعراض وبواقع 4 أوراق لكل عزلة مع معاملة المقارنة باستخدام الماء المقطر كما واعتمدت هذه الطريقة ايضا لتشخيص السلالات [4 ،8] .

تشخيص الجنس

درست بعض الصفات المظهرية والمجهرية للعزلات المرضية المختارة فضلا عن بعض الصفات البايوكيميائية للوصول الى الجنس .*Ralstonia* SPP وكما يلي:

الصفـات المظهريـة

طبيعة النمو في الأوساط الغذائية

لقحت الأوساط الزرعية Nutrient agar (NA) و (YDC) CaCO3-Yeast extract dextrose و Kings Medium(KB) و(NB) Nutrient Broth بالعزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها لغرض دراسة طبيعة نمو العزلات وحضنت الأوساط لمدة 72ساعة على درجة 30م . درست حركة خلايا البكتريا والتسوط في العزلات المذكورة حيث أستخدمت مزارع للعزلات في وسط السائل المغذي Nutrient Broth بأعمار (10،18،24) ساعة . كما و أستخدم اختبار الأكسدة Oxidase test واختبار الكاتاليز Catalase test لتأكيد التشخيص[7، 9 ،10] .

تشخيص النوع *solanacearum*

أجريت اختبارات عديدة لتشخيص النوع *solancearum* شملت اختزال النترات Nitrate reduction وحسب وفحص الأندولIndol test وانتاج كبريتيدالهيدروجين Production of hydrogen sulfide و اختبار انتاج الأمونيا من الببتون (Production ammonia from peptone)و التحلل المائي للآرجنين(Argenin dihydrolase) [6] .

عزل سلالات البـكـتريا

تم التمييز بين سلالات البكتريا وذلك بتحضير لقاح بكتيري تركيز10^{-8} مستعمرة/مل من كل عزلة بكتيرية نامية على الوسط الزرعي TZC وبعمر 48 ساعة ولقحت نباتات طماطة بعد وصولها الى ارتفاع 15سم في أبط الورقة العلوية الثالثة بواسطة محقنة طبية حجم 23 مل ووضعت النباتات في درجة حرارة (28-32) م وغطيت بأكياس النايلون للمحافظة على الرطوبة وبعدد خمسة نباتات لكل عزلة مع نبات واحد للمقارنة اذ حقن بالماء المقطر[7] .

تحضير مصل مضاد متخصص لسلالات البكتيريا :

نميت عزلتي البكتريا النقية لمدة 48 ساعة ثم نقلت مستعمرة نامية من كل عزلة الى وسط غذائي جديد كما في أعلاه وحضرمصل مضاد للعزلتين البكتيرية باتباع طريقة Koeing [11] بأتباع الخطوات التالية :

1. رسبت خلايا كل عزلة من البكتيريا في جهاز طرد مركزي نوع (ultrasopin 1020) وبسرعة 1000 د/د لمدة 10 دقائق وعلى درجة حرارة 4م .
2. غسل الراسب مرتين بـ 5 مل ماء مقطر معقم ثم أضيف للراسب النهائي 5 مل ماء مقطر معقم .
3. عومل المعلق البكتيري بمادة الكلوترلديهايد Gluteraldehyde بتركيز 0.25 % وذلك عن طريق الأنتشار الغشائي (Dialysis) لمدة 12 ساعة.
4. ضبطت الكثافة الضوئية للمعلق النهائي على درجة كثافة ضوئية 2.0 عند طول موجي 600 نانومتر وقسم من المعلق ضبط على كثافة ضوئية 1.0 على نفس الطول الموجي وحفظ في المجمدة على درجة حرارة -20 م لحين حقنه في جسم أرنب مختبري .
5. سحب 20 مل من دم الأرانب المستخدمة للتجربة كمعاملة مقارنة ثم حقنت كل عزلة من البكتيريا في جسم أرنب مختبري تحت الجلد بجرعة مقدارها 500 مايكروليتر من المعلق البكتيري الذي كانت كثافته الضوئية 2.0 عند طول موجي 600 نانوميتر بعد مزجها بحجم مماثل من زيت التمنيع المساعد Freund's incomplete adjuvant .
6. حقنت الأرانب بعد 5 أسابيع بنفس مقدار الحقنة الأولى في عضلة الفخذ بعد خلطها بحجم مماثل من زيت التمنيع المساعد وأستخدم في هذه الحقنة المعلق البكتيري الذي كانت كثافته الضوئية 1.0 على طول موجي 600 نانومتر.
7. نفذت الحقنة الثالثة بعد 12 أسبوع من الحقنة الأولى في عضلة الفخذ بأستخدام المعلق البكتيري ذو الكثافة الضوئية 2.0 على طول موجي 600 نانومتر بعد خلطها بحجم مماثل من زيت التمنيع المساعد.
8. تمت عمليات الحقن لثلاث أرانب من كل سلالة .
9. سحب الدم من الأرانب بعد أسبوع من الحقنة الثالثة ولمدة 7 أسابيع وبمقدار 25 مل في كل مرة عن طريق عمل جرح في الوريد الأذني الحافي الخارجي لأذن الأرنب .
10. ترك دم الأرنب الذي يسحب في كل مرة لمدة (2-3) ساعة عند درجة حرارة المختبر قبل حفظه على م4 ئوي لمدة (10-12) ساعه.
11. فصل المصل عن الدم المتجلط بأستخدام جهاز طرد مركزي بسرعة 2000 د/د لمدة 10 دقائق .
12. حفظ المصل الناتج في المجمدة على -20 مْ لحين الأستخدام .

ربط الأجســـــــام المضادة بالأنزيم :

أتبعت طريقة [12] في ربط الأجسام المضادة التي تم الحصول عليها من كل من عزلتي البكتريا موضوع الدراسة بأنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase للحصول على االمصل المضاد المعلم بالأنزيم وكالتالي :

أ: تنقية الكاماكلوبيولين(Immuonoglobulin Gama (IgG

1. أخذ المصل المضاد وأضيف له حجم مساو من محلول كبريتات الأمونيوم المشبع $(NH_4)2SO_4$ وترك المزيج بدرجة حرارة المختبر لمدة ثلاث ساعات .
2. أجريت عملية طرد مركزي للمحلول على سرعة 6000د/د لمدة30 دقيقة.
3. أهمل الطافي وأضيف للراسب 8 مل من الحلول الداريء PBS المخفف الى النصف
4. أجريت عملية فصل غشائي Dialysis بوضع معلق الراسب (المصل المضاد) في أنبوب الفصل الغشائي (Dialysis tube) ووضع في دورق يحوي لتر واحد من محلول PBS المخفف الى النصف لمدة 24 ساعة مع التحريك المستمر داخل الثلاجة على درجة حرارة 4ْم وكررت العملية ثلاث مرات.
5. أخذ المحلول من داخل انبوب الفصل الغشائي ومرر عبر عمود من مادة DEAE-cellulose سمك 1 سم في ماصة زجاجية وضعت قطعة من الصوف الزجاجي في قاعدة ماصة زجاجية ذات حجم 5 مل

مثبتة على حامل ووصلت نهايته السفلى بانبوب مطاطي مثبت عليه كلاب حديدي لغرض التحكم بعملية الفتح والغلق بسهولة.

6. وضع 2 مل من المصل فوق طبقة السليلوز وجمع المصل من أسفل الماصة وبذا تم الحصول على IgG.

ب: ربط الأجسام المضادة بالأنزيم :

أخذ 1 مل من مستحضر الكاماكلوبيولين IgG بتركيز 1 ملغم/مل وأضيف اليه 2 ملغم من انزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase وأجريت له عملية فصل غشائي لمدة 30 ساعة مقسمة على ثلاث مراحل متعاقبة في محلول PBS وبحجم 500 مل في كل مرحلة مع التحريك المستمر للتخلص من كبريتات الأمونيوم بدرجة حرارة المختبر .ثم اجريت عملية فصل غشائي الأول لمدة 4 ساعات في 500 مل من محلول 0.06 % كلوتيرالديهايد مع التحريك المستمر بدرجة حرارة المختبر حتى تغير لون المحلول الى أصفر خفيف ثم أجريت عملية فصل غشائي لمدة 30 ساعة مقسمة على ثلاث مراحل متعاقبة في 500 مل من محلول PBS المشبع في كل مرحلة وبذلك تم الحصول على الأجسام المضادة المعلمة بالأنزيمEnzyme labeled-globulin . ثم أضيفت عليها قطرة واحدة من محلول 2% أزيد الصوديوم NaN3 لحين الأستخدام .

اختبار اليزا Direct antigen coating – ELISA :

أتبعت طريقة Koenig [11] وذلك باستخدام معلق بكتيري محضر في محلول داريء الكاربونات carbonate buffer)) ذو أس هيدروجيني pH=9.6 وفي كل الاختبارات بحيث كانت الكثافة الضوئية 2.0 على طول موجي 600 نانومتر واجري الأختبار وفق الخطوات التالية:

1. أضيف 100 مايكروليتر من المعلق البكتيري لكل حفرة من اطباق اليزا ولكل عزلة ثم حضنت الاطباق لمدة ثلاث ساعات على درجة حرارة25م وغسلت بفاصل زمني 5 دقائق بمحلول فوسفاتي يحتوي مادة Tween 20 ذو اس هيدروجيني pH=7.4 (Phosphate buffer saline-Tween20)PBST وأضيف 300 مايكروليتر/حفرةمن محلول التغطية المكون من 0.1 مولاري من ملح الطعام و 10 غم من مادة بوفين سيروم البومين BSA لتغطية السطوح الداخلية للحفر .
2. حضنت الاطباق لمدة ساعة واحدة على درجة 25 م ثم غسلت مجددا بمحلول الغسيل (PBST) ثم اضيف لكل حفرة100 مايكروليتر من المصل المضاد والمخفف بمحلول (PBST) يحوي على 2 % من مادة PVP (polyvinyl pyrolodin) ذو درجة حموضة pH=6 لكل عزلة ثم حضنت الاطباق لمدة 16 ساعة على درجة حرارة 4م و غسلت ثلاث مرات بمحلول الغسل (PBST) .
3. اضيف 100 مايكروليتر/حفرة من المصل المضاد المرتبط بالأنزيم (Alkaline phosphates) المخفف 2000/1 في محلول PBST الحاوي 2% من PVP و2 % من مادة BSA عند درجة حموضة PH= 9.8 والتي يتغير لونها الى اللون الاصفر بوجود انزيم الفوسفاتيز القاعدي وقدرت شدة التفاعل بقياس درجة امتصاص الضوء بواسطة قاريء اليزا ELISA-reader عند طول موجي 405 نانوميتر بعد 30 دقيقة .

كما أستخدم اختبار اليزا لتحديد أفضل السحبات من الدم التي يمكن اعتمادها في عمليات الكشف عن عزلتي البكتيريا 1 /200 ، 1 /400، 1 /800 .

أجري كذلك اختبار اليزا من كل مصل عزلة بكتيريا مع السلالة البكتيرية الأخرى لمعرفة مدى تخصص المصل المحضر لكل سلالة وكما موضح في جدول (1) :

جدول (1): اختبار اليزا لعزلة بكتريا والمصل المضاد المحضر لها وبين المصل المضاد المنتج لعزلة بكتريا وعزلة البكتريا الأخرى

المصل المحضرلعزلة البكتريا	الضد
R3	**R1**
R1	**R3**
R3	**R3**
R1	**R1**

النتائــج والمناقشـــة

1. **عزل البكتيريا وصفاتها المظهرية**

-عزلت البكتيريا المسببة لمرض الذبول البكتيري من العينات التي تم جمعها وقد ظهر نمو بكتيري على الوسطين الزرعيين PDA ،NA بعد 24 ساعة من التحضين على درجة 30 م في حين لم تظهر المستعمرات الفردية الا بعد 48 ساعة من التحضين ومن الصفات التي تمت ملاحظتها انها صغيرة الحجم ، نقطية الشكل وذات قطر 0.5 ملم مستديرة محدبة ، ملساء لماعة وذات لون أبيض حليبي يتحول الى الأبيض الرمادي ، بزيادة مدة التحضين الى أسبوع اذ يصبح لون المستعمرات بنيا فاتحا ، هلامية ذات قطر 3.5 ملم وهذه الصفات تنطبق مع الصفات المظهرية للجنس*Ralstonia* [6] .

2. **الصفات المظهرية للبكتيريا على وسط TZC :**

تميزت المستعمرات الفردية لعزلتي البكتريا الممرضة على وسط TZC بكونها شبه مستديرة مرتفعة قليلا عن سطح الوسط الغذائي هلامية لونها ابيض وذات مركز وردي . وبعد ثلاث ايام من التحضين اصبح قطر المستعمرة 4 ملم . اما العزلات غير الممرضة التي ظهرت على نفس الوسط فكانت ذات لون احمر غامق مع وجود حافة دائرية شفافة زبدية (Butyrous) صغيرة الحجم اذ يبلغ قطرها 0.2 ملم مستديرة الشكل اذ تم الأجماع من قبل الباحثين على ان سبب الاختلاف في الصفات المظهرية للعزلات الممرضة وغير الممرضة على الوسط TZC بان السلالة الممرضة غير قادرة على اختزال ملح التترازوليوم العديم اللون والذائب في الماء بالدرجة نفسها التي تستطيع بها السلالة غير الممرضة أن تختزل ملح التترازوليوم الى مادة الفورمازان (Formazan) الملونة وغير الذائبة في الماء مما يدل على ان نشاط الانزيمات المزيلة للهيدروجين (dehydrogenase) يكون أعلى في العزلات الغير ممرضة [6 ، 10] .

3. **تشخيص الجنس *Ralstonia* :**

اوضحت نتائج دراسة الصفات المظهرية لجنس البكتيريا *Ralstonia* في الأوساط الزرعية NA ،PDA بأنها كريمية اللون مستديرة وذات حافة محدبة كاملة ناعمة ولماعة وهو مماثل لما سجل في دراسات عديدة [7] .

4. **النمو في بعض الأوساط الزرعية**

إتصفت المستعمرات البكتيرية المنماة على الوسط الزرعي KB باللون الأبيض والطبيعة السائلة فضلا" عن عدم إنتاجها للصبغة المتألقة على عكس ما يحدث في الأوساط الزرعية CVP ، YDC [7] .

تشخيص النوع :

دراسة الصفات البايوكيميائية

أظهرت نتائج دراسات الصفات البايوكيمياوية لعزلات جنس البكتريا*Ralostonia* بأن كل من اختبار اختزال النترات ، اختبار انتاج H2S واختبار انتاج الأمونيا من الببتون قد اعطت نتائج فحص موجبة على عكس النتائج السلبية في الأختبارات البايوكيميائية مثل فحص الأندول ، فحص التحلل المائي للآرجينين وهذا يتفق مع ما اشار اليه [7] مما يؤكد ان البكتيريا موضوع الدراسة هي *Ralostonia solancearum* .

تشخيص السلالـة

شخصت السلالة R1 من البكتريا بسبب ظهور بقع بنية غامقة محاطة بهالة صفراء في المساحة الملقحة من الورقة بعد 36 ساعةكما شخصت السلالة R3 نتيجة اصفرار المساحة الملقحة من الورقة بعد 48 ساعة [8] .

انتـاج مصـــــل مضاد متخصص واختبار اليزا

اظهرت نتائج اختبار اليزا زيادة الامتصاص عند الطول الموجي 405 نانومتر خلال سحبات الدم المتعاقبة لكلا المصلين الخاص بالسلالتين R1،R3 وذلك عند استخدام التخفيف 800/1 مما يشير الى ارتفاع نسبة الأجسام المضادة في دم الأرنب مع مرور الزمن وبذلك يمكن اعتبار السحبة الخامسة من الدم وما تلاها مناسبة لأعتماد دم الأرنب المحقون بسلالتي البكتيريا R1 ، R3 ، وعند مقارنة الدم المأخوذ بعد الحقن مع ذلك المأخوذ قبل الحقن لجميع الأرانب المستخدمة بالتجربة وفق ثلاث تخفيفات 1 /200 و 1 /400 و1 /800 وبأستخدام الضد الموافق للمصل لوحظ وجود فارق كبير في قراءة قاريء اليزا بين مصل دم الأرانب قبل الحقن بسلالتي البكتيريا R1وR3 لجميع الأرانب فضلا" عن المحلول المنظم وكما موضح في جدول (2) .

جدول(2): قيم امتصاص قاريء اليزا على طول موجي 405 نانومترلعزلتي البكتيريا *R. solancearum* R1وR3 عند فحصها مع تخافيف الامصال المنتجة لها ومصل الدم قبل الحقن والمحلول المنظم

عزلة البكتريا	التخافيف المستخدمة	قراءات قاريء اليزا قبل الحقن	المحلول المنظم	أمصالها المضادة
	200/1	0.34	0.38	1.65
R1	400/1	0.32	0.53	1.43
	800/1	0.31	0.49	1.40
	200/1	0.33	0.39	1.63
R3	400/1	0.36	0.51	1.40
	800/1	0.38	0.47	1.38

جدول (3) مقدار الأمتصاص في جهاز قاريء اليزا عند استخدام مصل مضاد من البكتيريا *R. solancearum* مع العزلة الأخرى للبكتريا على طول موجي 405 نانومتر

عزلة البكتيريا	الضد	القـراءات Optical density
R1	R1	1.95
R3	R1	0.90
R1	R3	0.90
R3	R3	1.94

يلاحظ من جدول (3) وجود فارق كبير في قراءة قاريء اليزا على طول موجي 405 نانومتر في اختبار اليزا بين المصل المضاد المنتج لعزلة البكتريا والمصل المنتج له مقارنة" مع المصل المضاد لعزلة البكتريا مع العزلة الثانية للبكتريا وعلى الرغم من ان النتيجتين موجبة الا انها نتيجة طبيعية والتي هي من خواص المصل المضاد المتعدد النسيلة Polyclonal antibodies في فحص السلالات [13،14] كما ويلاحظ من جدول (2) بأن قراءة قاريء اليزا كان قد أعطى نتائج سالبة عند الستخدام المصل العادي normal serum مع سلالتي البكتريا وهذا ما حصل عند استخدام المحلول المنظم (carbonate buffer) ضد سلالتي البكتريا فضلا" عن أن هناك فرق قليل بين قيم امتصاص قاريء اليزا في جدول (2،3) لعزلتي البكتريا والمصل المضاد المنتج لها ويعزى ذلك لأختلاف تركيز الضد في الفحص .

تعتبر الفحوصات السيرولوجية في الكشف عن الأحياء المجهرية والفايروسات تعتبر من الطرائق السريعة والدقيقة في التشخيص بدلا من الطرائق والأختبارات البايوكيميائية التي تأخذ جهد ووقت كبير فضلا عن الكلفة العالية في اجراء هذه الاختبارات واحتمال الوقوع في اخطاء اثناء اجراءها مقارنة بالفحوصات السيرولوجية التي يكون فيها نسبة الخطأ ضئيل جدا" ان لم يكن معدوما" لذا ينصح باستخدام هذه الفحوصات في التشخيص الدقيق والسريع للأحياء المجهرية والفايروسات .

المصادر:

1. Shamb, P.Dhital. N.Thaveechai and Sundar, K.Shresta .2001.Characteristics of *Ralstonia solansearum* strains of potato wilt disease from Nepal and Thailand. Nepal Agric. Res. J. Vol. 5 2000/2001.
2. Wang, J.F.: Hanson. And Barnes, J.A.1998. Worldwide evaluation of an international set of resistance source to bacterial wilt in tomato. Pages 269-275 in: Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspect. Prior P.: Allen, and Elphinstone, J.eds .Spring –Verlag, Berlin, Germany.
3. Hayward, A.C.1991.Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solancearum.* Annual Review of Phytopathology 29:65-87.

4. S.A.Weller,; J.G.Elphinstone ; N.C.Smith ; N.Boonham and D.E.Stead .2000.Detection of *Ralstonia solansearum* Strains with a quantitative ,Multiplex ,Real-Time, Fluorogenic PCR (TaqMan) Assay .Applied and Environmental Microbiology 66:2853-2858.
5. Norman David ,J.; Zapata Mildred.; Gabriel Dean W.; Duany,P.; Yuen Jeanne ,M.F.;Donahoo Ryan,S. 2009. Genetic Diversity and Host Range of *Ralstonia solancearum* strains Entering North America. Americanphyto Pathological Society, St.Paul, NN, ETATS-UNIS (1911) (Revue)
6. Ymada,T.,Kawasaki,T.,Nagata,S.,Fujiwara,A.,Usami,S.,Fujie,M.2007.New acterial phytopathogen *Ralstonia solanceam.*Microbiology 153:2630-2639.
7. Emmanuel Wicker.;Laurence Grassart.;Regin Corason-Beaudu.;Daniele Mian .;Caroline Guilbaud.; Mark Fegan and Philippe Prior.2007.*Ralstonia solancearum* Strains from Martinque (French West Indies) Exhibiting a New Pathogenic Potential. American Society for Microbiology 73:6790-6801.
8. Kiraly , Z.and Klement ,Z. 1974.Methods in Plant Pathology with Special Reference to Breeding for Disease Resistance to Breeding for Disease Resistance .Academic Press , New York.
9. McDonald and Mehan,V. K.1995. Technique for resistance screening against ground nut bacterial wilt. Teqnique Manual.No.1 (ICARDA).
10. Crabtree, K.T.and Hinsdill, R.D.1974. Fundamental experiments in microbiology .Saunders, W.B.Comp.
11. Koeing , R.1981.Indirect ELISA methods for the broad specifity detection of plant viruses. Journal of General Virology 55:475-483.
12. Clark, M. and A. Adam .1977.Characteristics of the microplate of Enzyme Linked Immunosorbent Assay for detection of potato viruses'. Virology.34:475-483.
13. Mitsuo Horita ,and Kenchi Tsuchiya. 2000. Phenotypic and Cluster Analysis of Japanese Refrence Strains of *Ralstonia solancearum* .Ann.Phytopathol .Soc. Jpn. 65:604-611.
14. M.Machmud and Yadi Suryadi .2008.Detection and Identification of *Ralstonia solancearum* Using the Indirect ELISA Teqnique.Indonesian Journal of Agriculture 1(1):13-21