إنتاج مصل مضاد متخصص للكشف عن البكتيريا *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* المسببة لمرض التخطط البكتيري على القمح في سورية

ميادة كيالي[1]، أحمد الأحمد[1]، بكري دبس[1]، خالد مكوك[2]، سهام الأسعد[2]، صفاء قمري[2] ونوران عطار[2]
(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة حلب، سورية؛
(2) المركز الدولي للبحوث الزراعية في المناطق الجافة (إيكاردا)، ص ب 5466، حلب، سورية.

الملخص

كيالي، ميادة، أحمد الأحمد، بكري دبس، خالد مكوك، سهام الأسعد، صفاء قمري ونوران عطار. 2004. إنتاج مصل مضاد متخصص للكشف عن البكتيريا *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* المسببة لمرض التخطط البكتيري على القمح في سورية. مجلة وقاية النبات العربية. 22: 72-76.

يعد مرض التخطط البكتيري على القمح والمتسبب عن البكتيريا *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* من الأمراض المهمة التي تصيب محصول القمح في سورية. تم في هذه الدراسة تحضير مصل مضاد لعزلتين معزولتين من حقول مصابة في مناطق حلب والرقة " عزلة حلب 7 وعزلة رقة 67" من سورية. أظهر اختبار التخثر على الشريحة الزجاجية وكذلك اختبار إليزا وجود تفاعل مصلي ما بين العزلة البكتيرية والمصل المنتج ضدها، وكذلك ما بين العزلة والمصل المنتج ضد العزلة الأخرى. سمحت هذه التقنية في الكشف عن المسبب المرضي سواء كان على شكل معلق بكتيري مأخوذ من مستعمرات نامية على مستنبت مغذي أو في عصير أنسجة النباتات المصابة. كما أدى اختبار التخثر لكل من المصلين تفاعلاً إيجابياً مع 27 عزلة ذات قدرة إمراضية عالية جمعت خلال عملية مسح للمرض من حقول قمح محلية.

كلمات مفتاحية: التخطط البكتيري على القمح، *Xanthomonas translslusens* pv. *undulosa*، القمح، سورية.

المقدمة

يعدّ القمح (*Triticum* spp.) من أهم المحاصيل الغذائية المزروعة في العالم، فهو محصول استراتيجي، ويشكل بذلك أهم مقومات الأمن الغذائي للشعوب. يصاب القمح بالعديد من الأمراض البكتيرية الخطيرة ومنها مرض تخطط الأوراق البكتيري أو العصافة السوداء والمتسبب عن بكتيريا *Xanthomonas translusens* pv. *undulosa* (16).

تشير نتائج المسح الحقلي الذي أجريت في سورية خلال عام 2001 إلى انتشار المرض بشكل ملحوظ في حقول القمح المزروعة في محافظات حلب، ادلب، حماة، والرقّة (كيالي، معلومات غير منشورة). ومن المعروف أن هذا المرض ينتشر في جميع المناطق التي يزرع فيها القمح في العالم مثل الولايات المتحدة الأمريكية (15) وكندا والمكسيك والدول الأوروبية واستراليا (2).

يصيب هذا المرض كلاً من القمح والشعير والشيلم والشوفان والتريتكالي وكذلك العديد من الأعشاب النجيلية (5). تظهر أعراض هذا المرض على الأوراق والسنابل والعصافات والأغماد، كما يصيب الحبوب ويسبب ضمورها، الأمر الذي يؤدي بصورة عامة إلى انخفاض وزن الألف حبة والتأثير بشكل سلبي في قدرة الحبوب المصابة على الإنبات (10). تشكل الحبوب المصابة المصدر الرئيسي للقاح المعدي وحدوث العدوى الأولية (11 ، 12). كما يمكن للبكتيريا أن تثابر في مخلفات النباتات المصابة وعلى الكثير من الأعشاب النجيلية عند غياب عوائلها الرئيسة. وتنتشر هذه البكتيريا عن طريق الأمطار والري الرذاذي والمنّ، كما تساعد الرياح على نشر البكتيريا إلى مسافات قصيرة (15). وتعتبر البكتيريا الممرضة من الكائنات المشمولة ضمن قائمة الحجر الزراعي في سورية (3) وفي العديد من دول العالم. ونظراً لصعوبة تحديد البكتيريا المسببة للمرض باستخدام الاختبارات البيولوجية، اعتبر اختبار الاليزا (ELISA) (6) واختبار الترسيب المرتبط ببكتيريا *Staphylococcus aureus* على الشريحة الزجاجية (9) من أفضل الاختبارات السيرولوجية للكشف عن المسبب المرضي، نظراً لسرعة تطبيقها وحساسيتها العالية. وفي سورية لم يسبق بصورة عامة لأية جهة علمية تحضير مصل مضاد لبكتريا *X. translucens* pv. *undulosa* إلا أن هناك عملاً مماثلاً تناول البكتيريا *Pseudommona syringae* pv. *pisi* المسببة لمرض لفحة البازلاء ،حيث تم تحضير مصل مضاد ضد العزلة المحلية السورية (P196\22) وضد السلالة (299A) من البكتيريا ذاتها والمعروفة عالمياً منذ وقت مبكر(1).

لذلك هدفت هذه الدراسة إلى إنتاج مصل مضاد ضد البكتيريا *X. translucens* pv. *undulosa* بغية استخدامه في الكشف عنها في البذار الملوثة والعينات النباتية.

مواد البحث وطرائقه

العزلات المستخدمة

أظهر اختبار القدرة الإمراضية الذي نفذ على العزلات من المسبب المرضي *X. translucens* pv. *undulosa* وجود 29 عزلة محلية ذات قدرة إمراضية عالية. وتم اختيار عزلتين فقط هما "حلب 7" و "رقة 67" من أجل استخدامهما في انتاج الأمصال المضادة، المعزولتين من نباتات قمح مصابة من محافظتي حلب والرقّة خلال

المسح الحقلي الذي نفذ في عام 2001. تتصف هاتان العزلتان بمقدرتهما الإمراضية العالية والأعراض النموذجية التي تحدثانها على نباتات القمح المعداة اصطناعياً. أما بقيت العزلات الممرضة (27 عزلة) فحفظت لاختبار فاعلية الأمصال المضادة المنتجة في الكشف عنها. نميت البكتيريا في مستنبت المرق المغذي (NB) ورسبت خلاياها باستخدام جهاز طرد مركزي بسرعة 10.000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق وعند درجة حرارة 4°س ثم غسلت مرتين بالماء المقطر المعقم، ومن ثم حل الراسب النهائي في 5 مل ماء مقطر معقم.

تحضير الأمصال المضادة

تمت معاملة المعلق البكتيري بمادة الجلوتر ألدهيد (glutaraldehyde) بتركيز 0.25% وذلك عن طريق الانتشار عبر الغشاء لمدة 12 ساعة (4)، ثم حفظ في المجمدة لحين حقنه في الأرانب. حقنت الأرانب بالمعلق البكتيري لكلتا العزلتين "حلب 7" و"رقة 67" تحت الجلد بجرعة 500 ميكروليتر ثم حقنت الأرانب في العضل بكمية مماثلة بعد خمسة أسابيع من الحقنة الأولى ونفذت الحقنة الثالثة في العضل بعد سبعة أسابيع من الحقنة الثانية. هذا وقد تم في جميع الحقن مزج المعلق البكتيري بحجم مماثل من زيت فروين غير الكامل (Freund's incomplete adjuvant). بعد أسبوع من الحقنة الثالثة، تم سحب الدم أسبوعياً من الوريد الأساسي لأذن الأرنب ولمدة سبعة أسابيع، وبمقدار 25-30 مل في كل سحبة. وفي كل مرة تركت عينة الدم لمدة 2-3 ساعات عند درجة حرارة المختبر ثم وضعت في الثلاجة عند درجة حرارة 4 °س لمدة ليلة كاملة حيث فصل المصل عن الدم المتجلط، ثم ثفل لمدة 10 دقائق بسرعة 5000 دورة/دقيقة. أضيف أزيد الصوديوم (NaN3) بنسبة 0.05% كمادة حافظة إلى المصل ثم حفظ الناتج في المجمدة عند درجة حرارة -10 °س لحين استخدامه.

الاختبارات السيرولوجية

1. اختبار التخثر على الشريحة الزجاجية (9):

أ. تحضير محلول العمل: نميت سلالة من بكتيريا *Staphylococcus aureus* (Cowan1strain, NCTC 8530) على الآجار المغذي لمدة 72 ساعة وغسلت النموات البكتيرية لتلك السلالة بوساطة محلول منظم فوسفاتي (PBS) يحتوي على 0.02% أزيد الصوديوم، ثم عرض المعلق لطرد مركزي بسرعة 3000 دورة/دقيقة ولمدة 30 دقيقة. أضيف للراسب 20 مل من 1.5 % محلول الفورمالدهايد، ثم مزج جيداً لمدة 90 دقيقة، وسخن المعلق عند درجة حرارة 80 س لمدة 30 دقيقة ثم ترك ليبرد حتى درجة حرارة المختبر. غسل المحضر الناتج مرتين باستخدام جهاز طرد مركزي 3000 دورة ولمدة 30 دقيقة بمحلول منظم ملحي (PBS) يحتوي على 0.05% أزيد الصوديوم ثم خفف بالمحلول المنظم بنسبة 9:1 (وزن : حجم). عومل المعلق الناتج بالموجات فوق صوتية(Sonication) مدة 30 ثانية لإزالة التكتلات، ثم حفظ المحلول الناتج عند درجة حرارة 4 °س.

ب. تحضير محلول الربط: حضر محلول الربط عن طريق مزج الأحجام التالية مع بعضها البعض: أ) 170 ميكروليتراً من المصل المضاد لكل من العزلتين "حلب 7" و"رقّة 67" مضافاً إليه الغليسرول بنسبة 1:1 (حجم : حجم)؛ ب) 4 مل محلول منظم فوسفاتي ملحي (PBS)؛ جـ) 830 ميكروليتراً من المعلق البكتيري لبكتيريا *S.aureus* محلول العمل المحضر في الفقرة السابقة؛ د) 100 ميكروليتراً فوكسين أساسي كحولي مشبع ومعقم بالترشيح. حفظ محلول الربط عند درجة حرارة 4 °س لحين استخدامه.

جـ. خطوات الاختبار: فحص محلول الربط من خلال تفاعله مع معلق كل من عزلتي "حلب 7" و "رقة 67" ومع 27 عزلة ممرضة أخرى تم عزلها خلال عملية المسح الحقلي لعام 2001. وذلك عن طريق مزج 7 ميكروليترات من محلول الربط مع 5 ميكروليترات من معلق البكتيريا المدروسة، خلطت بأعواد الأسنان الخشبية لمدة 10 ثوان وتركت لمدة دقيقة قبل أن تأخذ نتائج تفاعلهما. استخدمت قطرة من المحلول دون إضافة البكتيريا إليه كشاهد سلبي. هذا وقد تم تحضير وفحص التخفيفات (25/1، 50/1، 100/1، 200/1، 400/1) (1 ميكروليتر مصل: 25 ميكروليتر محلول ربط) لكل من المصلين لتحديد أقل تركيز من كلا المصلين قادر على إعطاء تفاعل إيجابي.

2. طريقة الإليزا باستخدام تغطية الأطباق بالبكتيريا مباشرة (8):

حضر المعلق البكتيري لكلتا العزلتين الممرضتين "حلب 7" و "رقة 67" باستخدام محلول الكربونات المنظم درجة حموضته 9.6 بنسبة 20/1 (1 ميكروليتر من المعلق/ 20 ميكروليتر من محلول الكربونات المنظم) (1). قدرت شدة التفاعل بقياس درجة امتصاص الضوء بواسطة جهاز قارىء الاليزا عند الموجة 405 نانومتراً بعد خمسة دقائق.

أجري اختبار الاليزا لتحديد أفضل سحبة من دم الأرنب لاعتمادها في عمليات الكشف عن البكتريا المسببة للمرض المعزولة سواء كانت على شكل مستعمرات نامية على مستنبت أو في عصارة نسيج نباتات القمح المعداة اصطناعياً بالبكتيريا الممرضة. استخدم في هذا الاختبار تخفيف 200/1 لكلا المصلين حيث استخدمت البكتيريا بتركيز 20/1، ونباتات القمح المصابة طحنت بمحلول منظم بنسبة 20/1 (1 غ نبات مصاب / 20 مل محلول منظم). أما الأجسام المضادة المنتجة في الماعز ضد الجلوبيولينات المناعية للأرانب والمرتبطة مع أنزيم الفوسفاتاز القلوي (alkaline phosphatase) فقد استخدمت بتخفيف 2000/1. كما استخدمت ذات الطريقة لاختبار التركيز الأفضل من المصل المحضر وذلك عن طريق اختبار قوة فاعلية ستة تخفيفات وهي (200/1، 400/1، 800/1، 1600/1،

6400/1 ،3200/1) إذ استخدم في هذا الاختبار سحبة الدم السادسة لكلا المصلين المنتجين. استخدم كل من مستنبت المرق المغذي وعصارة نسيج نباتي سليم ومحلول كربونات الصوديوم درجة حموضته 9.6 كشواهد سلبية.

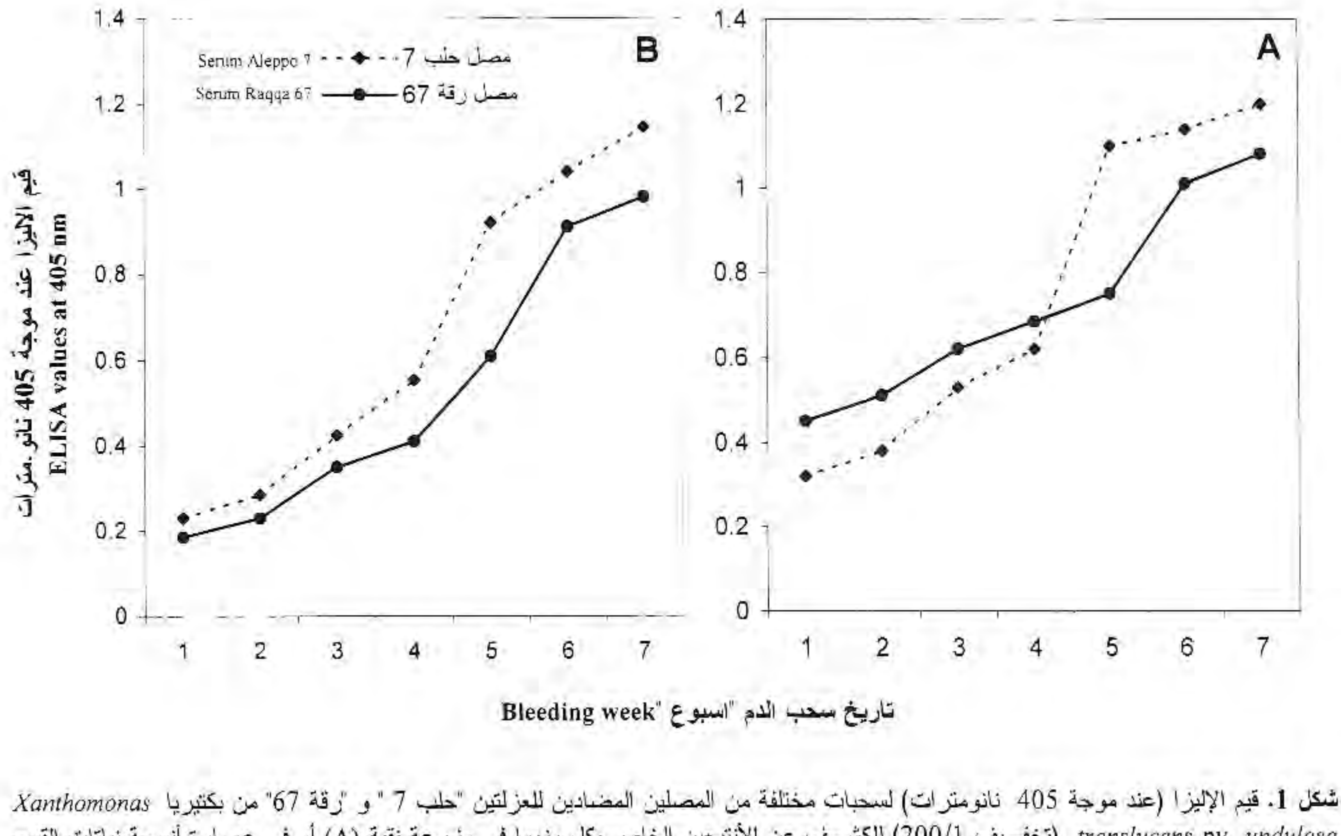
النتائج والمناقشة

اختبار التخثر على الشريحة الزجاجية

أظهرت نتائج اختبار التخثر على الشريحة الزجاجية ترسيباً واضحاً بين العزلة البكتيرية "حلب 7" ومصلها المضاد في حين كان الترسيب أقل وضوحاً بين العزلة البكتيرية "رقة 67" ومصلها المضاد. كما ظهر تفاعل إيجابي بين العزلة البكتيرية "حلب 7" والمصل المضاد للعزلة البكتيرية "رقة 67"، وكذلك بين العزلة البكتيرية "رقة 67" والمصل المضاد للعزلة البكتيرية "حلب 7". وعند اختبار المصلين الناتجين مع 27 عزلة ذات قدرة إمراضية عالية عزلت في عام 2001، تفاعلت كل العزلات بشكل جيد مع المصلين المنتجين. إلا أن ذلك التفاعل كان شديد الوضوح مع مصل العزلة "حلب 7" وأقل وضوحاً مع مصل العزلة "رقة 67". ولدى اختبار عدة تخفيفات لكلا المصلين (25/1، 50/1، 100/1، 200/1، 400/1) مع العزلتين "حلب 7" و"رقة 67"، لوحظ أن التفاعل الترسيبي يقل بانخفاض تركيز المصل، وأعطى التركيزين (25/1، 50/1) أفضل النتائج. وتتفق هذه النتائج مع نتائج دراسة سابقة أجريت في سورية، تم فيها تحضير مصل مضاد للبكتيريا المسببة لمرض اللفحة البكتيرية على البازلاء *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* ونصح فيها باستخدام المصل بالتخفيف 50/1 فقط (1). هذا وقد اتسمت هذه الطريقة ببساطتها وسرعة ظهور نتائجها وسهولة تطبيقها سواء في الحقل أو في المختبر. وهذه المواصفات تمكنها من التفوق على الطرق السيرولوجية بالرغم من قلة حساسيتها واستهلاكها للمصل المضاد، حيث يستهلك في هذا الإختبار كمية من الأمصال المضادة تفوق الكمية المستخدمة في اختبار الإليزا.

طريقة الإليزا باستخدام تغطية الأطباق بالبكتيريا مباشرة

أ. تحديد فعالية الأجسام المضادة في سحبات الدم المتعاقبة: أوضحت نتائج اختبار الإليزا أن فعالية الأجسام المضادة قد ازدادت بزيادة رقم سحبة الدم ولكلا المصلين "حلب 7" و"رقة 67" سواء عند استخدام المعلق البكتيري للعزلة المختبرة (شكل 1-A) أو عند استخدام عصارة نسيج نباتات القمح المصابة بالمرض (شكل 1-B)، وتدل تلك الزيادة إلى الارتفاع المضطرد لنسبة الأجسام المضادة في دم الأرنب مع مرور الزمن. وتم اعتماد المصل المضاد من السحبة الخامسة وما تلاها للعزلة "حلب 7"، والسحبة السادسة وما تلاها بالنسبة للعزلة "رقة 67".

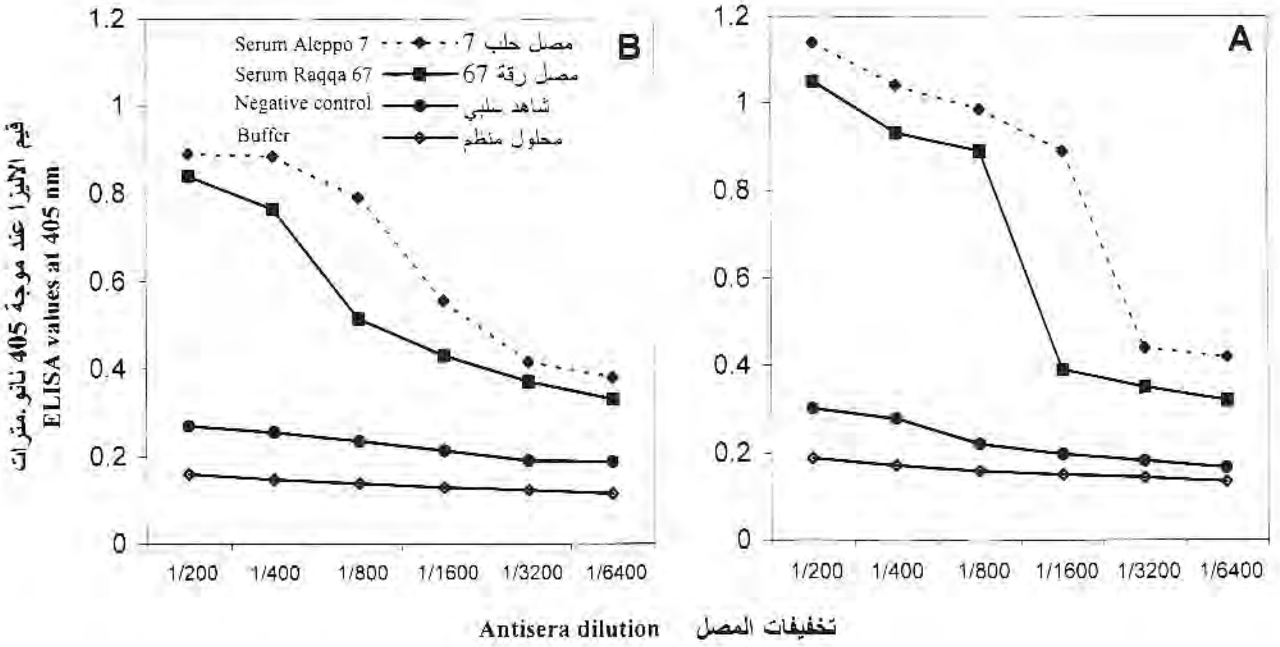


شكل 1. قيم الإليزا (عند موجة 405 نانومترات) لسحبات مختلفة من المصلين المضادين للعزلتين "حلب 7" و"رقة 67" من بكتيريا *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* (تخفيف 200/1) للكشف عن الأنتيجين الخاص بكل منهما في مزرعة نقية (A) أو في عصارة أنسجة نباتات القمح المصابة بكل منهما (B).

Figure 1. ELISA values (at 405 nm) obtained for different antisera bleeding dilution 1/200 of Aleppo 7 and Raqqa 67 isolates of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* whem used to detect their homologus antigen in pure culture (A), or the antigen in crude sap of infected wheat plants (B).

ب. تحديـد فاعلية أفضل تخفيف من سحبة الدم السادسة لكلا المصلين المنتجين. بينت نتائج اختبار الإليزا أن كلا المصلين كانا فعالين في جميع التخفيفات (1/200، 1/400، 1/800، 1/1600، 1/3200، 1/6400) سـواء بالكشـف عن المعلق البكتيري للعزلة المختبرة (شـكل A-2) أو بالكشـف عـن عصـارة نباتات القمح المصابة بالمـرض (شكل B-2)، وأوضحت النتائج أيضاً أن فاعلية المصل المنـتج ضـد العزلة "حلب 7" كان أقوى من فاعلية المصل المنتج ضد العزلة "رقة 67" سواء في تفاعله مع المعلق البكتيري مباشرة أو مع عصارة نسيج نباتات القمح المعداة اصطناعياً بالبكتيريا.

وتعتـبر هـذه الدراسـة هي الأولى التي استخدمت إختبار الإليزا بالكشف عن المرض *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* في عصـارة نـباتات القمـح المعـداة إصطناعياً. أوضحت النتائج السيرولوجية لهذه الدراسة أنه يوجد تفاعل إيجابي بين العزلة ومصلها المضـاد، وهـناك تفاعل إيجابي أيضاً بين كل عزلة والمصل المضاد المنـتج ضـد العـزلة الأخرى. وبما أن المرض موجود في سورية وأعراضـه تتشابه مع أعراض أمراض أخرى مثل تبقع أوراق القمح *Mycosphaerella graminicola* (14)، وقد لا تظهر أعراضه المثالية إلا في مراحل متأخرة من نمو النبات (10)، فإن وجود مصل مضاد له يساعد الفني والمزارع بدون شك على التحديد الدقيق لهوية الممرض. وهـذه الدراسـة وفـرت الأمصال المضادة للبكتيريا المسببة لمرض التخطط البكتيري على القمح لأول مرة في سورية.



شـكل 2. قـيم الإلـيزا (عـند موجـة 405 نانومترات) لتخفيفات مختلفة من المصل المضاد لكل من العزلتين "حلب 7" و "رقة 67" من بكتيريا *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* عند تفاعلها مع معلق البكتيريا الموافقة (A) أو عصارة أنسجة نباتات القمح المصابة بكل منهما (B)

Figure 2. ELISA values (at 405 nm) obtained for different antisera dilutions of Aleppo 7 and Raqqa 67 isolateds of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* when reacting with their homologus antigen (A) or with the antigen in crude sap of infected wheat plants (B).

Abstract

Kayali, M., A. El-Ahmed, B. Debs, K.M. Makkouk, S. Asaad, S.G. Kumari and N. Attar. 2003. Production of Specific Antiserum to *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* the Causal Organism of Bacterial Stripe on Wheat in Syria. Arab J. Pl. Prot. 22: 72-76.

Bacterial stripe (black chaff) caused by *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa is* considered the most important bacterial disease that infects wheat in Syria.The objective of this study aimed to prepare an antiserum for each of the two local isolates "Aleppo 7 and Raqqa 67" collected from wheat in Syria. Results of ELISA and slide-agglutination tests showed positive reactions between each bacterial isolate and its homologus antiserum.This work has facilitated the indentification of *X. t.* pv. *undulosa* colonies developed from seed incubated on nutrient culture, or from the crude sap extracted from the infected wheat plants. In addition, the slide - agglutination test proved that both antisera gave positive reaction with other 27 virulent isolates collected during a field survey of local wheat fields.

Key words: Bacterial stripe on wheat, *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa*, wheat, Syria
Corresponding author: M. Kayali, Plant Protection Department. Faculty of Agriculture, Aleppo University, Syria.

المراجع

References

1. **حمويــة، عــلاء الدين، خالد مكوك، أحمد الأحمد وبكري دبس.** 1999. إنتاج مصل مضاد متخصص بالبكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* المسببة لمرض اللفحة البكتيرية على البازلاء في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 17: 26–30.
2. **روبــيرت نيفال.** 1991. أمراض المحاصيل الحقلية. جامعة عمر المختار – ليبيا، 986 صفحة.
3. **وزارة الــزراعة والإصــلاح الزراعــي.** 1991. قــانون الحجر الزراعــي فــي الجمهورية العربية السورية دمشق، سورية. 34 صفحة
4. **Allan, E. and A. Kelman.** 1977. Immunofluorscent stain procedures for detection and identification of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica*. Phytopathology, 67:1705-1312.
5. **CABIMI.** 1993. Distribution Maps of Plant Diseases. Map No. 264, edition 3. *Xanthomonas campestris* pv translucens (Jones, Johnson & Reddy) Dye. Commonwealth Agricultural Bureaux, Oxon, UK.
6. **Clark, M. and A. Adams.** 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme- linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. Journal of Virology, 34:475-483
7. **Frommel, M.I.** and **G.Pazos**. 1994. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* infested wheat seeds by combined liquid medium enrichment and ELISA. Plant Pathology, 43: 38-47.
8. **Koenig, R.** 1981. Indirect ELISA methods for the broad specificity detection of plant viruses. Journal of General Virology, 55:53-62.
9. **Lyons, N.F. and J.D. Taylor.** 1990. Serologial detection and identification ofbacterial blight from plants by the conjugated *Staphylococcus aureus* slide agglutination test. Plant Pathology, 39:584-590.
10. **Mehta, Y.R.** 1990.Management of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* and *hordei* through cereal seed testing Sead. Science and Technology, 18:476 – 476.
11. **Milus, E. A and A.F. Mirlohi.** 1993. A Test tube assay for estimanting populations of *Xanthomonas campestris* pv.*translucens* on individual wheat leaves. Phytopthology, 83:134-139.
12. **Schaad, N.W. and R.L. Forster.**1985. Asemiselective agar medium for isolating *Xanthomonas campestris* pv.*translucens* from wheat seeds. Phytopathology, 75(3):260-263.
13. **Schaad, N.W., A.K. Hdaver, G.H. Lacy, K. Rudlph and J.B. Janes.** 2000. Evaluation of proposed amended names of several *Pseudomounas* and *Xanthomonads* and recommendations. Phytopathology, 90: 208-213.
14. **Seifers, D.L. T.L. Harvey and R.L. Bowden.** 1995. Occurrence and symptom expression of American wheat striate mosaic virus in wheat in Kansas. Plant Disease, 79(8): 853-858.]
15. **Tubajika. K.M. and J.S. Russin.**1991.Analysis of bacterial leaf streak epidemics on winter wheat in Louisiana. Plant Disease , 83(6):541-548
16. **Weise, M.V.** 1982.Compendium of wheat diseases. 2nd edition. American Phytopathological Society. ST.Paul, MN,USA, 112 pp.

Received: April 9, 2003; Accepted: February 7, 2004

تاريخ الاستلام: 2003/4/9؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2004/2/7