Methods for identification of the Plant Pathogenic Bacteria

الطرق المستخدمة للتعرف على البكتيريا المسببة لأمراض النبات

د. محمد عبد الرحمن الوكيل

Professor Mohamed A. Elwakil

أستاذ أمراض النبات المتفرغ

جامعة المنصورة

http://osp.mans.edu.eg/wakil, mwakil.net

E-mail: mawakil@mans.edu.eg

مارس 2019

للتعرف على البكتيريا المسببة لأمراض النبات تتبع الطرق المختلفة من تقليدية إلى طرق حديثة وذلك تبعاً للإمكانات المتاحة حيث بعضها مرتفع التكاليف أو معقد فى تنفيذة ويحتاج إلى تدريب وأجهزة مرتفعة الثمن، وعلى أية حال فجميع الطرق تؤدى فى النهاية إلى التعرف على البكتيريا حتى مستوى النوع مع إختلاف درجة الدقة بينها وهذا لن يؤثر فى الهدف الأكبر وهو مقاومة هذة البكتيريا والتى قد تكون سبباً فى هلاك محصول زراعى معين وهنا نستعرض هذة الطرق دون الدخول فى تفاصيل تنفيذها ونترك الإختيار للباحث لإلتقاط الأنسب لة حسب إمكانياتة المعملية ودرجة خبرتة فى التنفيذ مع الوضع فى الإعتبار التسلسل العلمى فى التعريف بدأ بدراسة مورفولوجيا البكتيريا وذلك تمهيداً للدخول فى الطرق المتقدمة للحصول على بيانات أكثر دقة عن هذة الكائنات وسلالاتها المختلفة.

أولاً: الطرق التقليدية Conventional methods

1- الشكل المورفولوجى للمستعمرات Morphology of Bacterial Colonies

2- الصفات الفسيولوجية Physiological Characteristics

ويندرج تحت هذا الإختبار درجات الحرارة المثلى لنموها - درجات الحرارة المميتة لها - درجة حساسيتها للكيماويات والمضادات الحيوية - إنتاجها للسموم - قدرتها على تكوين انوية الثلج Ice-nucleation activity وعديد من الصفات الأخرى.

3- الصفات الكيماوية Biochemical characteristics

مقدرة البكتيريا على تحليل بعض مصادر الغذاء من سكريات - كحولات - مواد عضوية – جليكوسيدات أو مصادر النيتروجين من الأحماض الأمينية – إنتاج H_2S – تحليل النشا – الجيلاتين – الكازين – السليلوز .....إلخ بواسطة الإنزيمات التى قد تنفرد بها دون غيرها من السلالات أو تنتجها بكميات أكثر نتيجتها سرعة التحلل .. إختبار الأكسيديز – إختبار نشاط إنزيم الكاتاليز – تحليل البكتين ..... إلخ.

4- الطرق السيرولوجية Serological characteristics

ومنها

أ- إختبار التجلط Agglutination test

ب- إختبار الترسيب Precipitation test

ت- الإستشعاع المناعى Immunofluorescence test (IF)

ث- إختبار الإليزا Enzyme - Linked Immuno Sorbent assay (ELISA)

ج- قدرتها على تحمل الإصابة بالفاج Bacteriophage test

ثانياً: الطرق الحديثة للتعريف Newer Methods

أ- Monoclonal antibodies test (MA)

ب- DNA / RNA (dot / Slot - blot) hybridization

ت- Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) using r RNA (r DNA) oligonucleotide probes

ث- Polymerase chain reaction(PCR)

ج- Real – time (Taq Man®) PCR

وفيها يمكن قياس درجة التشعع fluorescence الحادثة خلال دورة ال PCR

ح- Special serological techniques, eventually in combination with others

1- Immuno – electrophoresis

2- Monoclonal or polyclonal antibodies against specific components (e.g. protein or polysaccharides) of the bacteria, so-called monospecific antibodies

3- Immuno – gold labeling

طرق فصل الخلايا البكتيرية لمكوناتها

Separation of Bacterial components

A. طرق الفصل بإستخدام الكروماتوجرافى

Separation by chromatography technique

توجد ثلاث طرق للفصل الكروماتوجرافى يمكن إستخدامها وهى

1- **Amino acids and cell wall carbohydrate (paper chromatography, thin-layer chromatography)**

2- **Isoprenoid quinones (thin – layer, high performance Liquid chromatography)**

3- **Fatty acids, fats (Gas chromatography)**

B. طرق الفصل بإستخدام المجال الكهربائى

Separation of the components (Protein, Nucleic acids) in an electric field

توجد عدة طرق دقيقة وشائعة الإستخدام لفصل المكونات البكتيرية إعتماداً على درجة هجرة المكونات داخل المجال الكهربى وهى

1- **Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of the whole cell protein**

2- **Immuno – electrophoresis**

3- **Native protein electrophoresis(enzyme detection)**

4- **Restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP)**

5- **Random amplified polymorphism DNA(RAPD) analysis**

6- **Repetitive sequence based (RAP) fingerprinting PCR**

7- **Amplified fragment length polymorphisms analysis (AFLP)**

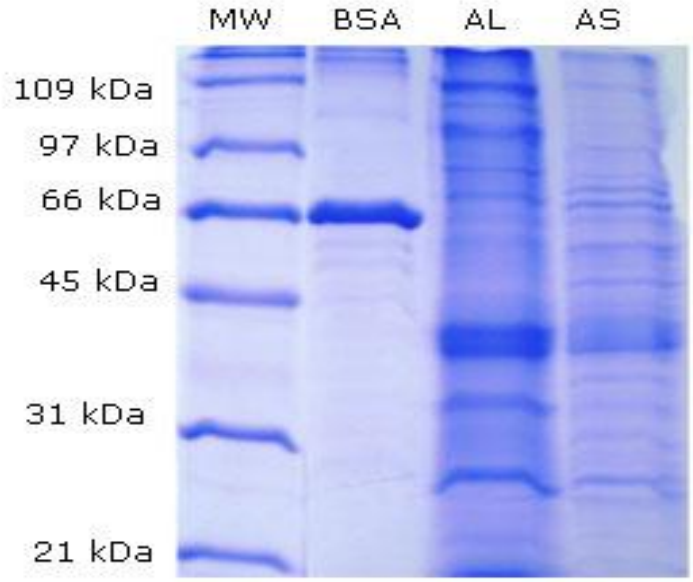
أمثلة توضيحية لبعض طرق الفصل

Case study (1)

Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of the whole proteins

من أشهر الطرق المتبعة لفصل مكونات الخلايا البكتيرية إعتماداً على سرعة حركتها فى المجال الكهربى وبها يمكن المقارنة بين الشكل العام لمكونات بروتين البكتيريا وبين غيرها ولو من نفس النوع حيث يوجد ما بين 20-40 نوع مختلف من البروتين يمكن الإعتماد عليهم بفصل البروتين ثم تكسيره بإستخدام المنظفات الصناعية Detergents وأشهرها إستخداماً فى هذا المجال هو **Sodium dodecyl**

Mercaptoethanol مع sulfate (SDS) حيث ينشأ عن ذلك أن يفقد البروتين شكلة الثلاثى the 3 dimensional structure و يصبح محملاً بالشحنات السالبة فقط. عند وضع هذا المخلوط فى مجال كهربى يمر فى Polyacrylamide gel حيث يحتوى هذا ال gel على ثقوب متساوية متزنة فإن قطع البروتين تهاجر من القطب السالب إلى الموجب خلال ثقوب ال gel وتتباين سرعة مرورها إعتماداً على حجمها وما تحملة من شحنات ومن المعروف أن قطع البروتين صغيرة الحجم ستكون أسرع وتتواجد قريبة من القطب الموجب. بعد فترة محدودة يتم فصل التيار الكهربى وصبغ البروتين بالصبغة الملائمة ومنها (Silver nitrate, coomasia blue, fluorosent dyes)



قد تكون العين المجردة كافية فى بعض الأحيان للتفرقة بين أنظمة توزيع قطع البروتين داخل المجال الكهربى إلا انة فى غالب الأحيان وفى مجال فحص عينات كثيرة لا يمكن ذلك وهنا تكون الحاجة إلى نقل الصورة إلى برنامج خاص من Soft ware الذى يقوم بتحويل هذة التراتيب إلى أشكال هندسية مختلفة بل وتقوم بتحليلها إحصائياً لتوضيح أوجة التقارب أو التباعد بين العزلات المختلفة من نفس النوع أو الأنواع فيما بينها.

Case study (2)

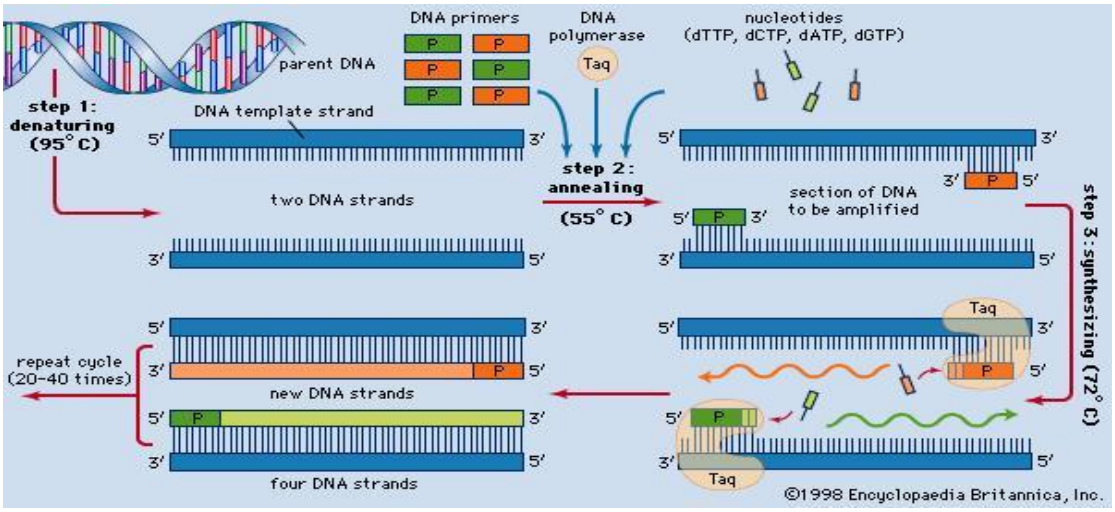
Polymerase chain reaction (PCR)

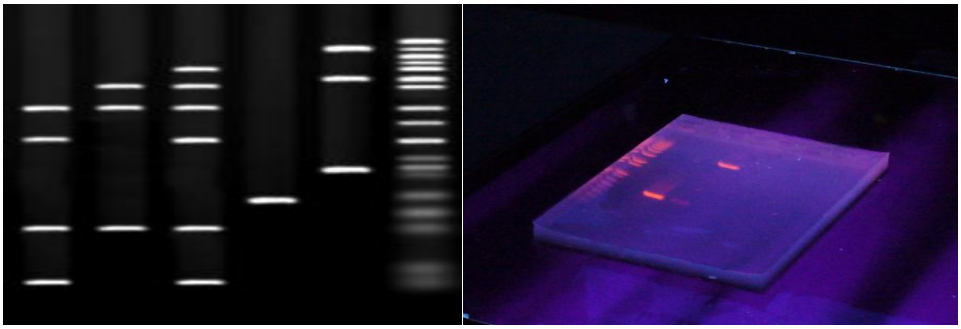
وفى هذة الطريقة يتم تعظيم حجم قطعة من الحمض النووى الخاص بالبكتيرة محل الدراسة وذلك قبل البدء فى عملية التقدير ويتم ذلك فى خطوات هى

1- تغيير طبيعة البروتين البكتيرى أو صهرة على درجة حرارة 95 م° Denaturation(Melting) فى وجود أو عدم وجود الصودا الكاويا NaOH لتحطيم الجدار الخلوى وفصل الDNA عن الشوائب من بواقى الجدار الخلوى

2- تقسية القطع الصغيرة الناشئة عن الحامض النووى المنصهر والتى تسمى Primers وذلك بالتسخين على درجة 68 م° Annealing of short strands of the nucleic acids

3- فرد الأجزاء السابقة Extension على درجة 72م° فى وجود نيكليتيدات حرة وإنزيم محلل للحامض النووى يتحمل الحرارة Thermostable nucleic acid polymerase وأشهرها Taq polymerases وعقب هذة العملية فإن ناتج ال PCR يمكن التعرف علية ظاهرياً بعد صبغة بصبغة Ethidium bromide فى Agrarose gel electrophoresis فى الظلام بتعريض المكونات للأشعة فوق البنفسجية.





Ethidium bromide staining

مراجع

1- أمراض النبات البكتيرية e-Book2006 د. محمد عبد الرحمن الوكيل

2- Phytobacteriology 2006. J.D. Janse

3- Methods in phytobacteriology 1990 klement *et al.*

4- Plant Bacterial Diseases. A Diognoses Guide 1983 Fahy p. and G. parsley

5- Microbial Plant Pathogens and Crop Disease Management 2002. P. Narayanasamy