

دراسة مظاهر البلازميد Plasmid Profiles لبكتيريا *syringae* pv. *savastano* *Pseudomonas*

فتحية المختار المجدوب
نورية علي العامري
عبدالني محمد أبوغنية

كلية التقنية الطبية، جامعة طرابلس، ليبيا
كلية الزراعة، جامعة طرابلس، ليبيا
كلية العلوم، جامعة طرابلس، ليبيا

fatheyaelmajdob@yahoo.com

<https://doi.org/10.36602/jmuas.2019.v01.01.28>

الملخص

تعتبر بكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* (Psv) المسبب لمرض تعقد الزيتون، تم الحصول على 49 عزلة لبكتيريا Psv من عقد موجودة على عوائل مختلفة بالمنطقة الغربية من ليبيا 31 عزلة من الزيتون *Olea europaea*، 17 عزلة من نبات التماريش *Tamarix aphylla* (سجل المرض لأول مرة على نبات التماريش)، وعزلة واحدة من الرتم *Retama raetam*، عُرفت العزلات على أساس خصائصها الظاهرية واختبارات LOPAT، أنتجت العزلات المختبرة مستعمرات مستديرة بلون أبيض- كريمي على أوساط غذائية انتقائية (KB و PAB)، خمسة عشر عزلة منها تفرز صبغة فلورسينية، أظهرت جميع العزلات نتائج سالبة لاختباري نشاط إنزيم تحلل البكتين والأرجنين، باستثناء اختبارات LOPAT الأخرى، أظهرت بعض العزلات نتائج موجبة لاختباري الليفان (عدد 10 عزلات) والأكسيديز (عدد 12 عزلة)، أما باقي العزلات أعطت نتائج سالبة، كانت غالبية العزلات المختبرة موجبة لاختبار فرط الحساسية على نباتي الدخان والفلفل، عند تحليل المظهر البلازميدي لعزلات Psv تبين وجود تنوع وراثي بين عزلات العائل النباتي الواحد أو العوائل المختلفة، صنفت أغلب عزلات الزيتون على أساس المظهر البلازميدي إلى خمس مجاميع (A, B, C, D, F)، في حين أن عزلات الأثل قد أمكن تصنيفها إلى ثلاث مجاميع (G, K, N)، ومن ناحية أخرى فقد اشتملت المجموعتان E و H على عزلات من عوائل مختلفة: تضمنت المجموعة H عزلتين من الزيتون (OS25w و OS42w) وعزلة واحدة من الرتم (Ra1)، أما العزلتان OS6w و Ta5y من الزيتون والأثل على التوالي فقد تم تصنيفهما ضمن المجموعة E، أظهرت باقي العزلات وعددها سبعة من عوائل مختلفة نمطا بلازميديا فريدا، تراوح عدد البلازميدات للعزلات المختبرة من 1-4 بلازميد، أما المحتوى البلازميدي فقد تراوح من 540 إلى 13550 زوج قاعدي (bp)، بينما كانت 14 عزلة عديمة البلازميد، لقد أثبت تحليل الجينوم باستخدام المظهر البلازميدي قدرة عالية لهذه التقنية في التمييز بين عزلات بكتيريا Psv من عوائل ومواقع جغرافية مختلفة.

الكلمات المفتاحية: مظاهر البلازميد Plasmid Profiles – (*Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*) – تعقد أغصان الزيتون

المقدمة

المرض تعقد الزيتون Olive Knot Disease الذي تسببه بكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* وهو ميكروب قد تم تصنيفه سابقا تحت النوع *P. syringae* يصيب أشجار الزيتون وعوائل أخرى، تظهر الأعراض على شكل عقد وانتفاخات مختلفة الأحجام على السيقان وأفرع النبات العائل نتيجة الزيادة المفرطة غير الطبيعية في عدد خلايا النبات مما يترتب عنه التضخم، وتكون الإصابة على شكل ثآليل يصل قطرها إلى 2.5 سم، تأخذ اللون الأخضر في بداية تكونها، كروية الشكل ذات مظهر إسفنجي ناعم ومتماسك، أما عندما تتقدم هذه التدرنات في العمر تصبح ذات لون غامق وسطح متصلب ومتشققة (أبوعرقوب، 1998)، والعقد التي تحدث مبكرا في الأشجار النامية يمكن أن تسبب ضعفا في الأفرع كما أن البراعم التي تنمو عليها العقد غالبا ما تكون ميتة وغالبا ما يسبب انخفاضاً في إنتاجية الثمار للشجرة على المدى الطويل، كما أن أشجار الزيتون المصابة بالعقد تكون ثمارها عديمة الطعم والنكهة (Kennelly وآخرون، 2007، Moreno Rodríguez - وآخرون، 2008)، يعرف مرض تعقد أغصان الزيتون أيضا باسم سل الزيتون (الثآليل البكتيري)، لقد سجل مرض تعقد الزيتون لأول مرة في القرن الرابع عشر قبل الميلاد بواسطة العالم الإغريقي Theophrastus (Iacobellis وآخرون، 1998)، انتشر المرض بواسطة أشجار الزيتون *Olea europaea* subsp *europaea*، حيث سُجل في معظم مناطق زراعة الزيتون في العالم وجد في أجزاء من أوروبا، آسيا، أفريقيا، أمريكا الشمالية، أمريكا الجنوبية وأستراليا وبالأخص بلدان حوض البحر المتوسط، كما وجد المرض في الوطن العربي في كل من المغرب، سوريا، مصر، العراق، ليبيا، (أبوعرقوب، 1998؛ Kenyon، 2013؛ Buonauro وآخرون، 2015)، سُجلت الإصابة في ليبيا في العديد من الأماكن، وعلى سبيل المثال لا الحصر المناطق الغربية من ليبيا، بغيران، مسلاتة، القره بوللي، تاجوراء، عين زارة، جنزور، يفرن، ككلة والرقيعات (العربي وآخرون، 2007)، إضافة للزيتون هناك العديد من النباتات التي تصاب بهذا المرض منها الرتم، الدفلة، الحنة، الدردار، الياسمين (Cookscy وآزاد، 1995)، تستخدم عدة طرائق لتعريف ودراسة خصائص البكتيريا المسببة للمرض، منها الاختبارات الفسيولوجية والكيموحيوية والتي تعرف بـ LOPAT، وهي سلسلة من الاختبارات لدراسة وتعريف البكتيريا (Ramos وآخرون، 2012؛ González وآخرون، 2003)، تعتبر دراسة جينوم البكتيريا من أهم تقنيات الاختبارات الجزيئية (Bella وآخرون، 2008)، تعد البلازميدات أحد مكونات هذا الجينوم، وهي جزيئات صغيرة من DNA دائرية ثنائية الخيط مغلقة، وبعض البلازميدات تكون بشكل مستقيم خيطي (Brown، 1998؛ 2001)، تكون البلازميدات بمعزل عن الكروموسوم البكتيري وتحمل مورثات مسؤولة عن تضاعفها وتكاثرها (منشأ التضاعف) بشكل مستقل وذلك بواسطة عملية تضاعف تكون مشابهة لتلك التي تحدث للصبغي الأصلي، كما أن أغلب صفات المقاومة للمواد الكيميائية والمضادات الحيوية وتخليق السموم البكتيرية، تتحكم بها مورثات خاصة محمولة على بلازميدات مما يؤدي إلى زيادة ضراوة البكتيريا

العائل لوجود تلك البلازميدات، وللبلازميدات القدرة على الانتقال بين الخلايا، بعد أن تفتح دائرته المغلقة وبعد الانتقال يعاد ربط نهايته ليصبح قادراً على التضاعف، توجد البلازميدات في مجموعة متنوعة واسعة من البكتيريا، يتراوح عددها من 1-50 بلازميد وقد تكون الخلايا البكتيرية عديمة البلازميد، تقع البلازميدات في مجموعتين: اقترانية وغير اقترانية، تتصف البلازميدات الاقترانية بمقدرتها على الاقتران الجنسي بين خلايا البكتيريا، العملية التي بواسطتها يمكن لبلازميد الاقتران الانتشار من خلية بكتيرية إلى جميع خلايا البكتيريا الأخرى في مزرعة بكتيرية، إن عملية الاقتران وانتقال البلازميد يتم التحكم فيها بواسطة مجموعة من جينات النقل *transfer or tra genes*، الموجودة على بلازميدات الاقتران وغير موجودة على البلازميدات غير الاقترانية، إلا أنه تحت ظروف معينة قد تُنقل بلازميدات غير اقترانية برفقة بلازميدات اقترانية عند وجود كليهما في نفس الخلية البكتيرية، إن كل ما تتميز به البلازميدات من خصائص ذكرت سلفاً لجعل من الأهمية بمكان دراسة كل ما يتعلق بهذا الجزيء (Brown, 1998؛ 2001)، إن دراسة مظهر وخصائص البلازميد في البكتيريا الممرضة للنبات يُعد أحد الطرائق المباشرة لتحليل ومقارنة جينوم تلك البكتيريا (Louws, 1999؛ Elamri, 2001)، إن مظهر البلازميد متنوعاً بتقنية تباين أطوال مقاطع التقيد Restriction fragment length polymorphism (RFLP) يعتبر من أهم الطرق المستعملة للمقارنة بين أنواع وسلالات البكتيريا الممرضة للنبات، (Shaw و Beck von Bodman, 1987، Lazo و Gabrial, 1987؛ Koul وآخرون, 1997، EL-Hendawy و Azab, 1998، Yildirm وآخرون, 2011)، نظراً للأهمية الكبيرة التي تتميز بها البلازميدات في مدى قدرتها على حمل جينات لها الأثر الكبير على العوائل التي تصيبها البكتيريا الحاملة لتلك البلازميدات، فإن هذه الدراسة اهتمت بمظهر البلازميد Plasmid profile لعزلات البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* من عدة عوائل باستخدام طريقة دراسة مظهر البلازميد Plasmid profile-based method (Moulton وآخرون, 1993)، وذلك للوصول إلى مدى التنوع بين عزلات نفس النمط البكتيري الممرض.

تهدف الدراسة إلى:

1. عزل البكتيريا المسببة لمرض تعقد أغصان الزيتون من عوائل مختلفة.
2. التعرف على العزلات المختلفة بإجراء الاختبارات الفسيولوجية والكيموحيوية.
3. عزل ومعرفة حجم وعدد البلازميدات باستخدام *gel electrophoresis*، ثم مقارنة مظهر تلك البلازميدات للعزلات البكتيرية المختلفة التي تشملها الدراسة.
4. تصنيف العزلات البكتيرية على أساس التشابه والاقتران في نتائج الاختبارات الكيموحيوية والفسيولوجية والاختبارات الجزيئية وعلاقتها بالموقع الجغرافي.

مواد وطرق العمل

أجريت الدراسة بمختبرات كل من قسم وقاية النبات بكلية الزراعة وقسم الكيمياء الحيوية بكلية الطب البشري، جمعت عينات النباتات المصابة بمرض تعقد الزيتون التي ظهرت عليها أعراض المرض في شكل عقد على أفرع هذه النباتات، وبناء على تقرير لحصر أمراض الزيتون والذي شمل بعض المناطق الغربية (العربي وآخرون، 2007)، فقد تم تجميع العينات المصابة خلال الفترة الزمنية 2014/4 إلى 2014/11 من طرابلس (الجدول 1)، وضعت العينات في أكياس بلاستيكية مع تسجيل الملاحظات، مكان التجميع وتاريخه واسم العائل ونقلها للمختبر للقيام بعملية العزل، استخدمت في هذه الدراسة الأوساط الغذائية NA، PAB، KB، LB، SNA (الوسط الغذائي الخاص باختبار Levan)، الوسط الغذائي الخاص باختبار Arginine Dihydrolase تم تحضير الأوساط الغذائية اللازمة للعزل وفق الطرق المعملية (King وآخرون، 1954) (Stead و Lelliott، 1987).

عزل وحفظ البكتيريا

تم عزل وحفظ 49 عزلة (جدول 1) من المناطق المشار إليها، حُفظت في الثلاجة لإجراء الاختبارات المراد إجراؤها حيث تم تحضير الوسط الغذائي PAB، ووضع في كل أنبوبة زجاجية صغيرة الحجم كمية تقدر بحوالي 3 مل من الوسط وتم تعقيم هذه الأنابيب، وضعت الأنابيب بشكل مائل للتجمد، وحقنت بالبكتيريا المعزولة وحفظت في الثلاجة عند درجة 4°م، كما استخدمت طريقة أخرى للحفظ وذلك باستعمال أنابيب إندورف *Eppendorf tubes*، حيث تم تنمية العزلات البكتيرية قيد الدراسة على بيئة غذائية سائلة LB لمدة 24 ساعة، تم أخذ 500 µl ميكرو لتر من المعلق البكتيري لكل عزلة ويضاف إليها 500 µl ميكرو لتر 40% جليسرول glycerol المسبق إعداده (بوضع 40 مل من الجليسرول في دورق ويضاف إليه 100 مل ماء مقطر ويتم التعقيم)، ويخلط المعلق ويوضع في المجمد تحت درجة حرارة -20°م، خضعت جميع العزلات للاختبارات الفسيولوجية الكيموحيوية والجزيئية.

الطرق المستعملة لتعريف البكتيريا الممرضة للنبات

تم التعرف على البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* على أساس الخصائص الظاهرية للمستعمرات، شكل المستعمرة ولونها وإذا ما كانت وميضية أو غير وميضية، الاختبارات الفسيولوجية والاختبارات الجزيئية المحددة.

1. الاختبارات الفسيولوجية والكيموحيوية وهي تعرف بـ LOPAT

اختبار تكون الليفان Levan Formation تم إجراء هذا الاختبار لمزارع بكتيرية نامية على وسط غذائي الأجار المغذي مضاف إليه 5% سكروز، وملاحظة الشكل القبي للمستعمرات المتكونة في حالة العزلات الموجبة لهذا الاختبار، وملاحظة العزلات السالبة له، اختبار اوكسيديز Oxidase يستعمل هذا الاختبار للكشف عن وجود الأنزيم اوكسيديز، وبواسطة إبرة حقن ذات عقدة بلاتينية يؤخذ من مستعمرة عمرها 24 ساعة نامية على الوسط الغذائي NA وتوضع على الورقة المبللة بمحلول phenylenediamine dihydrochloride بتركيز 1% ويتم مراقبة التغير في اللون خلال 10 ثوانٍ من الوقت، وكانت النتائج مختلفة منها سالبة ومنها موجبة لهذا الاختبار، اختبار نشاط تحلل البكتين Pectinolytic Activity يتم إجراء اختبار التعفن الطري على شرائح البطاطس، ويتم ملاحظتها خلال 24-48 ساعة وملاحظة وجود تعفن من عدمه على الشرائح مكان حقن البكتيريا، اختبار Arginine Dihydrolase يستدل على إيجابية التفاعل بتغير اللون إلى الأحمر القاتم أما النتيجة السالبة فتكون وردي إلى البرتقالي، تم تحضير الوسط الخاص بهذا الاختبار، ثم الوخز بإبرة الحقن ويغلى الأنبوب بأجار معقم وذلك لتوفير ظروف لاهوائية وتحضن لمدة ستة أيام.

جدول 1. عزلات البكتيريا المستعملة في هذه الدراسة ومواقع الحصول عليها

الرقم	اسم العينة	العائل		تاريخ العزل	الموقع
		الاسم العلمي	الاسم العام		
1	OS3w	<i>Olea europaea</i>	الزيتون	2014	قصر الأخيار
2	OS6w	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	قصر الأخيار
3	OS7y	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	قصر الأخيار
4	OS9y	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	غريان
5	OS10y	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	غريان
6	OS11w	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	سوق الجمعة
7	OS14w	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	مزرعة كلية الزراعة
8	OS15w	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	قصر الأخيار
9	OS16w	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	تاجورا الحميدية
10	OS17w	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	مسلاتة
11	OS18w	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	القره بوللي
12	OS20w	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	سوق الجمعة
13	OS23w	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	قصر الأخيار
14	OS25w	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	قصر الأخيار
15	OS26w	<i>O. europaea</i>	الزيتون	2014	سوق الجمعة

سوق الجمعة	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS27w	16
قصر بن غشير	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS31w	17
قصر بن غشير	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS32w	18
قصر بن غشير	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS33w	19
قصر بن غشير	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS35w	20
قصر بن غشير	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS36w	21
سوق الجمعة	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS38w	22
سوق الجمعة	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS39y	23
جنزور	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS40w	24
تاجورا	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS41y	25
جنزور	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS42w	26
غريان	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS45w	27
قصر الأخيار	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS49w	28
العززية	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS51w	29
العززية	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS52y	30
العززية	2014	الزيتون	<i>O. europaea</i>	OS54w	31
وادي الربيع	2014	الرتم	<i>Retama raetam</i>	Ra1	32
قصر الأخيار	2014	تماريش (الأثل)	<i>Tamarix aphylla</i>	Ta1w	33
قصر الأخيار	2014	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta2w	34
قصر الأخيار	2014	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta3w	35
قصر الأخيار	2014	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta3y	36
قصر الأخيار	2014	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta4w	37
قصر بن غشير	2014	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta10w	38
قصر الأخيار	2014	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta11y	39
قصر الأخيار	2014	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta12w	40
قصر الأخيار	2014	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta13w	41
قصر الأخيار	2014	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta14w	42
الساعدية	2015	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta15y	43
قصر الأخيار	2015	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta16w	44
العززية	2015	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta19w	45
العززية	2015	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta20w	46
العززية	2015	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta21w	47
عين زارة	2015	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta22w	48
تاجورا	2015	تماريش (الأثل)	<i>T. aphylla</i>	Ta23w	49
المجر	P,s,Sncaim B01868				الشاهد

اختبار فرط الحساسية **Hypersensitive reaction** تم تحويل طريقة الشغل لهذا الاختبار حيث تم تجهيز معلق من الكائن المرض وذلك بإضافة ماء مقطر معقم للطبق المحتوي على مستعمرات بكتيرية بعمر 24 ساعة، تم حقن المعلق في الجزء السفلي من الورقة.

2. الاختبارات الجزيئية

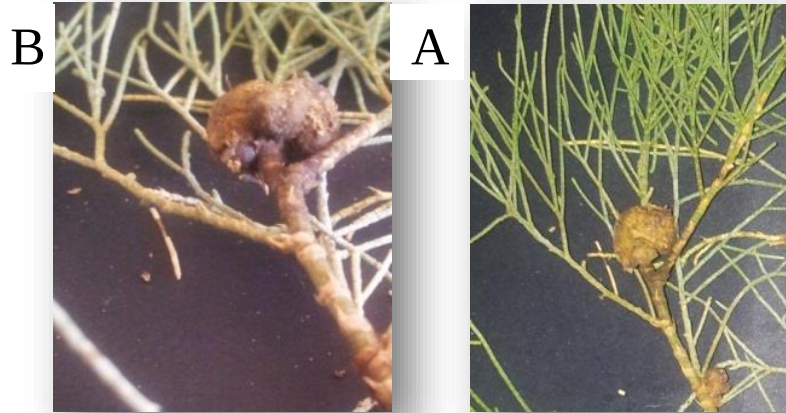
استخلاص الـ DNA البلازميدي الكامل، استعملت طريقة Moulton وآخرون 1993، المبنية على التحلل القلوي Alkaline lysis، تنمي البكتيريا في البيئة الغذائية (LB) لمدة 24 ساعة، تجهيز Agarose gel وذلك بإذابة 1.05 جم آجاروز في 150 مل ماء مقطر و 3 مل محلول منظم TAE×50 ويتم التسخين لغرض الذوبان، يبرد المخلوط إلى درجة حرارة 50°م، ويضاف 3 µl بروميد الإثديوم Ethedim Bromide، يسكب المخلوط في حامل الـ Agarose الخاص به وذلك بعد وضع المشط. ينزع المشط بعد أن يتجمد ويتصلب الأجاروز فتتكون غرف صغيرة يتم تحميل DNA بداخلها، حصاد 350 µl من البكتيريا (لكل عزلة) باستخدام جهاز الطرد المركزي 12.500 لفة لمدة 3 دقائق، التخلص من المعلق وإبقاء الراسب، إضافة 20 µl من المحلول المنظم TE إلى الراسب دون مزجها، سحب 15 µl من محلول حديث التحضير يتألف من 0.2% SDS، 0.2 مolar NaOH، ويبقى عليه في الماصة، يمزج الراسب جيدا مع TE باستخدام القمة البلاستيكية للماصة (التي تحتوي على NaOH / SDS)، يتم خلط وتوزيع المحلول الموجود في الماصة مع محلول الخلايا حتى يصبح صافيا ولزجا، يترك المحلول عند درجة حرارة الغرفة لمدة 3 دقائق حتى تتحلل الخلايا، يضاف للأنبوب 30 µl من (فينول phenol : كلوروفورم chloroform : كحول الأيزواميل isoamyl alcohol ويخلط المزيج، يوضع المزيج في جهاز الطرد المركزي (12.500) لفة في الثانية لمدة 10 دقائق، ينقل المعلق (بلازميد DNA) ويحمل مباشرة على الأجاروز داخل الغرف بعد إضافة صبغة التحميل 1 µl وتترك لمدة 10 دقائق قبل وضعها في الجهاز مع مراعاة وضع الشاهد (Marker) 4 µl في كل جانب من الأجاروز. يغمر حامل الأجاروز بعد وضعه في الجهاز بمحلول منظم TAE (10.5 TAE / 600 مل ماء مقطر) تفصل البلازميدات بتمرير تيار كهربائي فولت منخفض 75 فولت/سم لمدة 30 دقيقة، ثم يرفع إلى 100 فولت/سم إلى أن يكتمل الترحيل، عند وصول الحزمة الأولى من صبغة التحميل إلى نهاية الهلام، يوقف التيار الكهربائي، تستعمل الأشعة فوق البنفسجية UV للكشف عن بلازميد DNA ويتم التصوير فوتوغرافيا باستخدام كاميرا مجهزة بجهاز حاسوب لالتقاط وتخزين صور البلازميدات المتحصل عليها، مقارنة النمط البلازميدي، من خلال قياس حجم وعدد البلازميدات.

النتائج

تم تجميع عقد من النباتات المصابة لعوائل الزيتون *Olea europaea*، التماريش *Tamarix aphylla* والرتم *Retama raetam* يغلب عليها الشكل الكروي، الغضة منها تتميز بوجود نسيج اسفنجي ناعم ومتماسك، أما عندما تتقدم هذه التدرنات في العمر تصبح ذات لون غامق وسطح متصلب ومتشققة شكل (1، 2، 3).

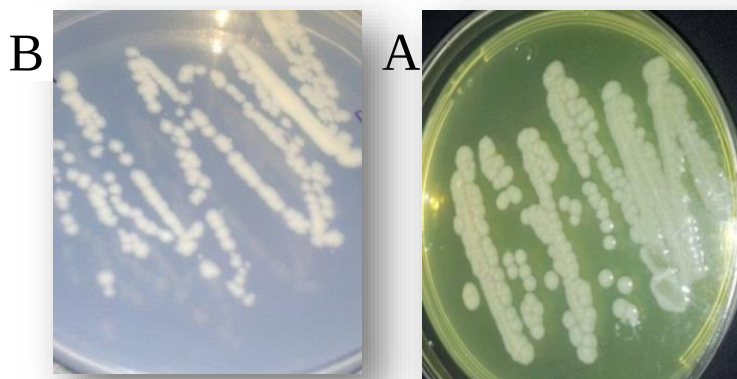


شكل (1) أعراض مرض تعقد أغصان الزيتون المتسبب عن *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* على نبات الزيتون *Olea europaea*. A عقد حديثة غضة ذات لون فاتح، B عقد خشنة صلبة ذات لون بني .



شكل (2) أعراض مرض تعقد أغصان الزيتون المتسبب عن *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* نبات التماريش *Tamarix aphylla*. A عقد حديثة غضة ذات لون فاتح، B عقد خشنة صلبة ذات لون بني .

في هذه الدراسة لوحظ أن للعزلات خصائص مرفولوجية محددة حيث تكون مستعمرات مستديرة ذات لون أبيض كريمي إلى مصفر (شكل 4)، وعلى الوسط الغذائي KB و PAB تنتج بعض تلك العزلات صبغة خضراء وميضية بينما لا ينتج بعضها الآخر تلك الصبغة، وأنها سالبة لتفاعل جرام، هوائية.



شكل (3) أعراض مرض تعقد أغصان الزيتون المتسبب عن *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* على نبات الرتم *Retama raetam*

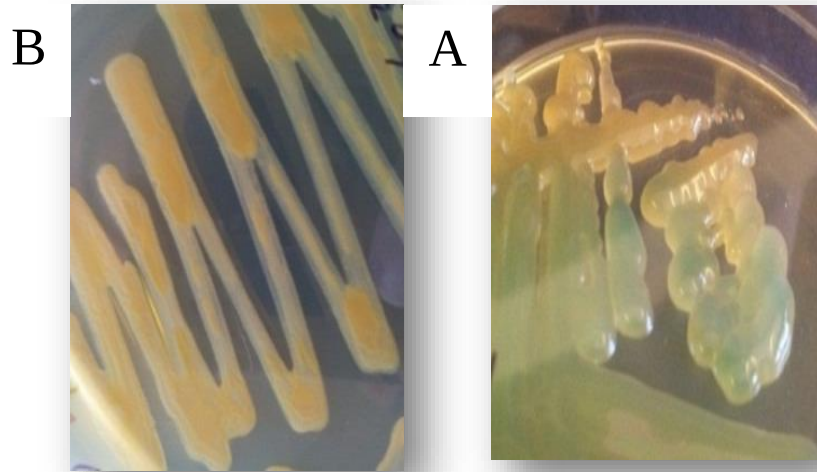


شكل (4) مستعمرات بكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* على الوسط الغذائي-(PAB)
A، عزلات ذات مستعمرات بلون أبيض كريمي تكون صبغة الفلورسين.
B، عزلات ذات مستعمرات بلون أبيض كريمي لا تكون صبغة الفلورسين

الاختبارات الفسيولوجية والكيموحيوية

أظهرت نتائج الاختبارات الكيموحيوية والتي أجريت على 49 عزلة كما هو مبين (جدول 1) أن اختبار تكون الليفان تم إجراؤه ولوحظ أن عدد 10 عزلات موجبة لهذا الاختبار، حيث أعطت مستعمرات شفافة إلى معتمة ولماعة وقيية الشكل بعضها بلون أخضر فلورسنتي شكل (5)، أما باقي العزلات وعددها 39 عزلة فقد كانت سالبة للاختبار، لوحظ اختبار الاوكسيديز شكل (6) تم مراقبة التغير في اللون خلال 10 ثواني من الوقت لوحظ أن العزلات المختبرة قد أظهرت تفاوتاً في مدى استجابتها للاختبار حيث حدث تغير في اللون إلى اللون البنفسجي في عدد 12 عزلة، أما باقي العزلات وعددها (37 عزلة) أعطت نتائج سالبة، عند اختبار مدى قدرة العزلات المختبرة على إحداث العفن الطري لأنسجة درنات البطاطس كانت كل النتائج سالبة لهذا الاختبار شكل (7)، وكذلك الأمر في اختبار Dihydrolase Arginine فقد كانت جميع العزلات المختبرة سالبة لهذا الاختبار، أظهر اختبار فرط الحساسية وجود موت موضعي في الأوراق التي تم حقنها بالعزلات البكتيرية وكان عددها (39 و 40) عزلة على شتول التبغ والفلفل على التوالي، أما السالب وعددها (10 و 9) عزلة على شتول التبغ والفلفل على التوالي، حيث لم يحدث تغير في الورقة، شكل (8، 9، 10).

الاختبارات الجزيئية (مظاهر البلازميدات Plasmid profiles) إن وجود بلازميدات أصلية أو طبيعية (native plasmid) قد تم تحديده وذلك عن طريق عزل DNA البلازميدات فائقة الحلزونة supercoiled plasmids DNA



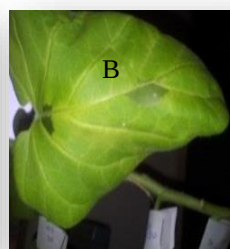
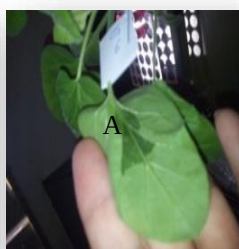
شكل (5) مستعمرات بكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* اختبار تكوين الليفان (levan) A، موجبة لاختبار الليفان تتميز بلمعائها وبالشكل القبي. B، سالبة لاختبار الليفان.



شكل (6) مستعمرات بكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* B
لاختبار وجود أوكسيداز Oxidase، موجبة للاختبار، A، سالبة للاختبار، B



شكل (7) اختبار التعفن الطري على البطاطس ونشاط بكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*
لتحليل البكتين. A. شرائح بطاطس قبل الحقن، B. الشرائح بعد الحقن سالبة للاختبار



شكل (8) اختبار فرط الحساسية على أوراق الدخان.. عزلات من الزيتون موجبة للاختبار فرط الحساسية على
أوراق.. A. حقن الأوراق بمعلق البكتيريا، B. بعد 24 ساعة من الحقن، C. سالبة للاختبار.



شكل (9) اختبار فرط الحساسية على أوراق الدخان عزلات من التماريش موجبة لاختبار فرط الحساسية على أوراق الدخان



شكل (10) اختبار فرط الحساسية على أوراق نبات الفلفل،
A بعد 24 ساعة من الحقن ، B سالبة للاختبار ، C بعد خمسة أيام من إيجابية الاختبار

كما هو موضح في (جدول 2) من جميع العزلات المختبرة، باستثناء العزلات OS23w، OS14w، OS7y، OS3w، OS33w، OS35w، OS36w، OS1w، Ta2w، Ta10w، Ta12w، Ta16w، Ta19w، Ta20w. التي كانت عديمة البلازميد، فإن جميع العزلات تأوي ما بين واحد إلى أربعة بلازميدات شكل (8-12). قسمت العزلات حسب مظهر البلازميدات إلى عشرة مجموعات أشير إليها بالرموز A، B، C، D، E، F، G، H، K، N. قُدرت أصغر بلازميد بحوالي 540 bp في العزلة OS31w، وأكبر بلازميد بحوالي 13550 bp في العزلة OS39y (جدول 2)، على الرغم من أن العزلات OS9y (A)، OS40w، OS41y قد أظهرت نمطا بلازميديا متشابها إلا أن بعض تلك العزلات (OS9y، OS40w) قد فقدت بلازميدا واحدا، قدر حجمها بـ 580 bp، لقد أمكن تصنيف عزلات نبات الزيتون في خمسة مجاميع (A، B، C، D، E، F) وعزلات نبات التماريش في ثلاثة مجاميع (A، B، C، D، E، F، G، H، K، N) إلا أن هناك مجموعات مشتركة، فرغم أن بعض العزلات المختبرة قد تم عزلها من عوائل مختلفة OS25w، OS42w من أشجار الزيتون، و Ra1 من نبات الرتم، إلا أنه قد تم تصنيفها ضمن مجموعة مشتركة H، وكذلك الأمر في المجموعة E فهي مجموعة مشتركة بين الزيتون والتماريش، تضم عزلة واحدة من كل عائل OS6w، OS15y، عند تقدير حجم البلازميدات لعزلات

المجموعة D، وجد أنها تشترك في واحد من البلازميدات مما ساعد في تصنيفها ضمن نفس المجموعة حيث تشترك كل من العزلة OS51w و OS52y في بلازميد واحد وكذلك العزلة OS51w و OS54w في بلازميد واحد وجميعها ضمن المجموعة D، في حين أن العزلات التي ضمن المجموعة (F) OS17w، OS18w، متطابقة تماما في حجم وعدد بلازميداتها، أظهرت النتائج أن عزلات الزيتون OS9y، OS10y، OS16w، OS17w، OS18w، OS40w، OS52y، لها أنماط بلازميدية مختلفة إلا أن النتائج أكدت على وجود بلازميد مشترك فيما بينها بحجم 1000 bp، ولوحظ أن عزلات التماريش Ta4w، Ta23w، قد أظهرت أنماط بلازميدية مختلفة إلا أنها تشترك في بلازميد بحجم 1200 bp، إن النمط الفريد لمظهر البلازميدات خاصة اتسمت بها أربع عزلات من الزيتون OS10y، OS31w، OS45w، OS49w، وعزلتان من التماريش Ta11y، Ta21wK في حين أنه لم يتم تسجيل وجود للبلازميدات في العزلات OS3w، OS7y، OS14w، OS23w، OS33w، OS35w، OS36w (عزلات من أشجار الزيتون) و Ta1w، Ta2w، Ta10w، Ta12w، Ta16w، Ta19w، Ta20w (عزلات من نبات التماريش)، بوجه عام فإن المحتوى الكلي للـ DNA البلازميدي في خلايا العزلات المختبرة متفاوت إلى حد كبير، يتراوح من 9700 bp إلى 20700bp.

جدول 2 تعريف عزلات بكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* باستخدام الاختبارات الفسيولوجية

والكيموحيوية (LOPAT)

Hypersensitive reaction T		Arginine A	Pectin P	Oxidase O	Levan L	اسم العينة	الرقم
الدخان	الفلل						
*+	+	—	—	—	—	OS3w	1
*+	+	—	—	—	—	OS6w	2
*+	+	—	—	—	—	OS7y	3
+	+	—	—	—	—	OS9y	4
+	—	—	—	—	—	OS10y	5
+	+	—	—	+	++	OS11w ^F	6
+	+	—	—	—	—	OS14w	7
—	+	—	—	+	—	OS15w ^F	8
+	—	—	—	+	—	OS16w	9
*+	—	—	—	—	+	OS17w	10
+	+	—	—	—	—	OS18w	11
+	+	—	—	—	++	OS20w ^F	12
+	+	—	—	+	—	OS23w	13
+	+	—	—	—	—	OS25w	14

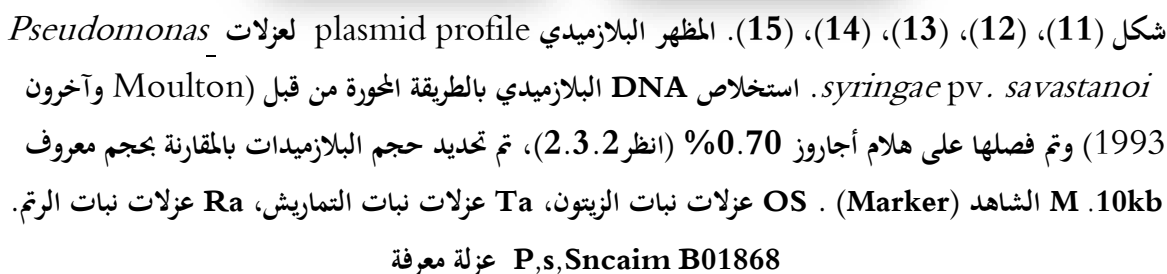
تابع جدول 2

Hypersensitive reaction T		Arginine A	Pectin P	Oxidase O	Levan L	اسم العينة	الرقم
الفلفل	الفلفل						
+	+	—	—	—	—	OS26w ^F	15
+	+	—	—	—	—	OS27w	16
+	+	—	—	+	+	OS31w ^F	17
—	+	—	—	+	+	OS32w ^F	18
+	—	—	—	—	—	OS33w	19
+	+	—	—	—	—	OS35w ^F	20
+	—	—	—	—	—	OS36w	21
+	+	—	—	—	—	OS38w	22
+	+	—	—	—	—	OS39y	23
+	+	—	—	—	—	OS40w	24
+	+	—	—	—	—	OS41y	25
+	+	—	—	—	—	OS42w	26
+	+	—	—	—	—	OS45w	27
+	—	—	—	—	++	OS49w ^F	28
+	+	—	—	+	—	OS51w ^F	29
—	+	—	—	+	+	OS52y ^F	30
+	+	—	—	—	—	OS54w ^F	31
+	+	—	—	—	—	Ra1	32
+	+	—	—	—	+	Ta1w	33
—	؟+	—	—	—	—	Ta2w	34
+	+	—	—	+	—	Ta3w	35
—	+	—	—	+	—	Ta3y	36
—	—	—	—	+	—	Ta4w ^F	37
+	—	—	—	—	—	Ta10w ^F	38
+	+	—	—	—	—	Ta11y	39
—	+	—	—	—	—	Ta12w	40
+	—	—	—	—	+	Ta13w ^F	41
—	+	—	—	+	+	Ta14w	42
+	+	—	—	—	—	Ta15y	43
+	؟+	—	—	—	—	Ta16w	44
+	+	—	—	—	—	Ta19w	45
+	+	—	—	—	—	Ta20 w ^F	46
+	+	—	—	—	—	Ta21w	47
—	+	—	—	—	—	Ta22w	48
—	+	—	—	—	—	Ta23w	49

• أعراض فرط الحساسية: +* أقل من 24 ساعة، + من 24 إلى 48 ساعة، ؟+ بعد 72 ساعة.

• ++ الايجابية للاختبار كانت بشكل واضح لاختبار الليفان

• ^F. تكون صبغة الفلوروسين fluorescein.



تم تجميع بعض العينات النباتية من أشجار الزيتون والتمايش (الأثل) والرم والتي كانت مصابة بمرض تعقد أغصان الزيتون Olive Knot، والجدير بالذكر أن البكتيريا المعزولة من التمايش لم تجرى عليها دراسات سابقة من حيث الوصف والتعريف وبذلك فإن هذه الدراسة هي أول تسجيل لهذا المرض على نبات التمايش، عُزلت البكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* المسببة للمرض من العقد الموجودة على النباتات المصابة وتم التعرف على عزلات نقية والتي كان عددها 49 عزلة، عُرفت علمياً أساس الخصائص العامة والاختبارات الكيموحيوية والمتمثلة في اختبارات الـ LOPAT، والاختبارات

جدول 3 تقدير أحجام وأعداد البلازميدات الأصلية لعزلات بكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* من عوائل نباتية مختلفة.

رقم العينة	المصدر	العائل	حجم البلازميد بـ bp *	المحتوى الكلي لـ DNA البلازميدي	عدد البلازميدات	مجموعة المظهر البلازميدي
OS9y	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	1000 1700 9300	12000	3	A
OS40w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	1000 1700 9200	11900	3	A
OS41y	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	580 ~ 1000 1700 9700	12980	4	A
OS27w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	13000~	13000	1	B
OS38w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	13500~	13500	1	B
OS39y	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	13550~	13550	1	B
OS11w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	580 ~ 1700 2000 10000	14850	4	C
OS20w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	550~ 1600 2050 10100~	14300	4	C
OS26w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	550 ~ 1600 2000 10200 ~	14380	4	C
OS15w ^s	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	570 ~ 1700 2350 9700	14220	4	D
OS16w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	600~ 1000 2000 9500	13100	4	D
OS32w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	550 ~ 1600 2250 9600	14000	4	D
OS51w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	580 ~ 1700 2000 9600	13880	4	D
OS52y	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	600~ 1000 2000 9500	13100	4	D
OS54w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	550~ 1600 2250 9600	14000	4	D
OS6w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	12800	12800	1	E
Ta15y	ضمن هذه الدراسة	التمايش	12650	12650	1	E
OS17w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	1000 1200 9700	11900	3	F
OS18w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	1000 1200 9700	11900	4	F
Ta3y ^L	ضمن هذه الدراسة	التمايش	1200 1800 3600 11000~	17600	4	G
Ta4w	ضمن هذه الدراسة	التمايش	1200 1800 3600 10600~	17200	4	G
OS25w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	1200 2100 13100 ~	16400	3	H
OS42w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	2000 13500~	15500	2	H
Ra1	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	1100 1900 13000~	16000	3	H
Ta22w	ضمن هذه الدراسة	التمايش	1300 2100 12000~	15400	3	K
Ta23w	ضمن هذه الدراسة	التمايش	1200 2100 11600~	14900	3	K
Ta13w	ضمن هذه الدراسة	التمايش	1100 1950 9600□	12650	3	N
Ta14w	ضمن هذه الدراسة	التمايش	1100 2000 9600□	12700	3	N

تابع جدول 3

رقم العينة	المصدر	العائل	*bp حجم البلازميد ب	المحتوى الكلي DNA البلازميدي	عدد البلازميدات	مجموعة المظهر البلازميدي
OS31w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	540 ~ 900 9600	11040	3	U
OS10y ^L	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	600~ 1000 1400 9900	12900	4	U
OS45w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	9700	9700	1	U
OS49w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	580 ~ 9900	10480	2	U
Ta3w ^L	ضمن هذه الدراسة	التمايش	2500 4800 12000~ 1400	20700	4	U
Ta11y	ضمن هذه الدراسة	التمايش	1400 1800 11000	14200	3	U
Ta21w	ضمن هذه الدراسة	التمايش	11200 ~	11200	1	U
OS3w ^L	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	ع ب			ع ب
OS7y	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	ع ب			ع ب
OS14w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	ع ب			ع ب
OS23w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	ع ب			ع ب
OS33w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	ع ب			ع ب
OS35w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	ع ب			ع ب
OS36w	ضمن هذه الدراسة	الزيتون	ع ب			ع ب
Ta1w	ضمن هذه الدراسة	التمايش	ع ب			ع ب
Ta2w ^L	ضمن هذه الدراسة	التمايش	ع ب			ع ب
Ta10w	ضمن هذه الدراسة	التمايش	ع ب			ع ب
Ta12w	ضمن هذه الدراسة	التمايش	ع ب			ع ب
Ta16w	ضمن هذه الدراسة	التمايش	ع ب			ع ب
Ta19w	ضمن هذه الدراسة	التمايش	ع ب			ع ب
Ta20 w	ضمن هذه الدراسة	التمايش	ع ب			ع ب
الشاهد	P,s,Sncaim B01868	الزيتون	~11600 2000 1300	14900	3	

*تم فصل البلازميد بالترجيل الكهربائي لهلام الأجاروز في 0.70% أجاروز (2.4.3) وتم تقدير الأحجام بالمقارنة مع الشاهد 10000bp
 . ع ب عديم البلازميد . □ عدد 2 بلازميد قريبة . L معزولة من أوراق . S معزولة من ساق.

الجزيئية والمتمثلة في مظهر البلازميدات profiles Plasmid، فعند نموها على الوسط الغذائي PAB لوحظ أنها تكون مستعمرات مستديرة ذات لون أبيض كريمي إلى مصفر، بعضاً منها تنتج صبغة خضراء بوميض فلورسنتي والبعض الآخر لا تنتج هذه الصبغة، كانت النتائج المتحصل عليها من اختبار LOPAT (Schaad, 1988) متباينة بين العزلات قيد الدراسة. ففي اختبار الليفان كانت أغلب العزلات سالبة لهذا الاختبار باستثناء عدد 10 عزلات أعطت نتائج موجبة بمستعمرات شفافة إلى معتممة ولماعة وقيية الشكل بعضها بلون أخضر فلورسنتي وهذا يتفق مع (Marchi وآخرون، 2005) التي كانت أغلب العزلات قيد دراسته سالبة للاختبار وكذلك الدراسة التي قام بها (González وآخرون 2003) فكان لون المستعمرات يتميز بلون مصفر مائل للاخضرار قليلاً، بينما (Krid وآخرون 2008، 2010) ذكر أن جميع العزلات كانت سالبة لاختبار الليفان، على الرغم أن أغلب العزلات المختبرة كانت سالبة لاختبار الأوكسيداز Oxidase وهذا يتفق مع (González وآخرون، 2003) إلا أن عدد 12 عذلة كانت موجبة لهذا الاختبار، جميع العزلات قيد الدراسة كانت سالبة لاختبار تحليل البكتين في شرائح البطاطس، وهذا يتفق مع ما أكدته العديد من الدراسات السابقة، (González وآخرون، 2003؛ Krid وآخرون، 2008؛ Krid وآخرون، 2010)، حيث أكد (González وآخرون، 2003) أن اختباري الليفان وتحلل البكتين يمكن الاعتماد عليهما في الدراسات الكيموحيوية للتمييز بين عزلات *P. syringae* و *P. viridiflava*، أما اختبار Arginine فقد أظهرت جميع العزلات نتائج سالبة لهذا الاختبار وهذا يتفق مع جميع ما ذكر من الدراسات السابقة، كانت النتائج غالباً موجبة لاختبار فرط الحساسية على أوراق التبغ وأوراق الفلفل، جميع اختبارات LOPAT لعزلة الرتم (Ra1) كانت سالبة باستثناء اختبار فرط الحساسية على نباتي التبغ والفلفل فقد أظهرت إيجابية لهذا الاختبار وهذا يتفق مع النتائج المتحصل عليها في دراسة سابقة (سعيد، 1987). إن دراسة مظهر البلازميدات Plasmid profile هي إحدى الطرق الجزيئية لتعريف ودراسة الجينوم (Moulton وآخرون، 1993) حيث أن البلازميدات تلعب دوراً كبيراً في مقاومة العقاقير والمضادات الحيوية (Toba وآخرون، 2015)، كما أن العديد منها يحمل جينات تؤدي إلى زيادة القدرة الإراضية للبكتيريا (Comai وآخرون، 1982)، إن دراسة وتحليل الجينوم على أساس المظهر البلازميدي Plasmid profile لعدد 49 عذلة، من بكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi* قد أظهرت اختلافات كبيرة في المحتوى البلازميدي بين تلك العزلات، تراوح بين 540 bp في العزلة OS31w إلى 13550 bp للعزلة OS39y وإلى عديمة البلازميد (14 عذلة)، هذه النتائج تتفق مع ماتوصل إليه (Denny وآخرون، 1998؛ Cuppels و Ainsworth، 1995؛ Liang وآخرون، 1994؛ Elamri، 2001) فقد أظهرت نتائجهم وجود تفاوت كبير في حجم ومظهر البلازميدات بين عزلات لأنماط ممرضة (pathovars) من *P. syringae* تربطهم علاقة وراثية كبيرة، وهذا خلاف ما ذكرته دراسة (العاقل، 1997) حيث قام فيها بمقارنة بين البلازميدات المعزولة لبكتيريا *Agrobacterium tumefaciens*

المسببة لمرض التدردن التاجي أوضح أن عدد وحجم وشكل البلازميدات كان متطابقا في جميع العزلات، في هذه الدراسة وباستثناء عدد 14 عزلة عديمة البلازميد فقد أظهرت النتائج تفاوتاً في الحجم والعدد مما أدى إلى تقسيم العزلات إلى 10 مجموعات، في دراسة قام بها Klaus و Geid، (1997) أوضحت أن عزلات بكتيريا *Pseudomonas syringae* pv. *glycinia* تحمل العديد من البلازميدات مما أدى إلى إمكانية تقسيمها إلى أربع مجاميع حسب حجمها، في بعض المجموعات رغم تشابه عزلات المجموعة إلا أنه تم ملاحظة وجود بلازميدات صغيرة الحجم وعدم وجودها في البعض الآخر، إن العزلات OS9y، OS40w، OS41y قد صنفت تحت مجموعة واحدة (A) حيث تحمل كل منها ثلاث بلازميدات باستثناء عدم وجود بلازميد صغيرة في العزلتين OS9y، OS40w، يمكن تفسير ذلك أن العزلتين قد فقدتا تلك البلازميد التي يتراوح حجمها 580 زوج قاعدي bp، على الرغم من أن العزلات OS25w، OS42w، Ra1 قد صُنفت تحت مجموعة واحدة (H)، إلا أن العزلة OS42w قد فقدت بلازميد يتراوح حجمها من 1100-1200 زوج قاعدي تقريبا، إن الاختلاف البسيط في مظهر البلازميد لعزلات المجموعة (A) قد يكون راجعا إلى حقيقة أن بلازميدات البكتيريا تمتلك خاصية الاتحاد أو الارتباط مع DNA الكروموسومي، لقد أكدت دراسة أجراها Curiale و Mills، (1982)؛ Elamri، (2001) أن البلازميد pmmc 7105 (150 كيلوقاعدي Kb) لبكتيريا *P. syringae* pv. *phaseiolicola* لها القدرة على الاتحاد مع كروموسوم البكتيريا، إن وجود عزلات من عوائل مختلفة مثل الزيتون والرم ضمن مجموعة واحدة (H) يمكن تفسيره على أن عزلات هذه البكتيريا لها القدرة على إصابة العائلين ربما يكون هذا تأكيدا لما ذكره سعيد، (1987) في دراسته التي أكدت أن البكتيريا المعزولة من الرتم لها القدرة على إصابة الزيتون والعكس صحيح، رغم الاختلاف في المظهر البلازميدي بين العزلات، إلا أن هذه الدراسة لجزء من جينوم البكتيريا أظهر تناسقا كبيرا بين العزلات داخل المجموعة الواحدة، و أظهرت نتائج الاختبارات الجزيئية أن هناك عزلات تتطابق تماما مثل ماهو موجود في المجموعة (F) OS17w و OS18w، رغم أن هذا التطابق لم يكن بشكل كلي في الاختبارات الكيموحيوية للعزلتين، أظهرت المجموعة (E) تشابها في مظهر البلازميدات لعزلتين OS6w، Ta15y تم الحصول عليها من الزيتون والتماريش على التوالي، إن وجود العزلتين في مجموعة واحدة رغم اختلاف العائل يُظهر مدى التقارب الوراثي بين عزلات البكتيريا المتحصل عليها من عوائل مختلفة أحيانا، وقد يُفسر ذلك نتيجة لاستخدام بعض المزارعين لنبات التماريش كمصدات رياح حول حقول الزيتون في عدة مناطق من ليبيا، صُنفت عزلات نباتي الزيتون والتماريش تحت مجموعات تضم عزلات كل نبات على حدة، فقد كانت المجموعة A، B، C، D، F تمثل عزلات الزيتون، بينما المجموعة G، K، N اشتملت على عزلات من نبات التماريش، وتبين هذه النتيجة أن العزلات المتحصل عليها من عائل واحد كالزيتون أو التماريش مثلا قد يكون بينها تقارب وراثي أدى إلى التشابه الكبير في مظهر البلازميدات فيما بينها وهذا يتفق مع العديد من الدراسات السابقة (Klaus و Bernd، 1997؛ Elamri، 2001)، أظهرت 4 عزلات من

الزيتون و3 عزلات من التماريش نمطا فريدا بالنسبة لمظهر البلازميدات فيها، مما يجعل من الصعب إدراجها تحت المجموعات الأخرى، وهذا يتفق مع دراسات سابقة أكدت أن بعض عزلات النمط الممرض الواحد لها مظهر بلازميدي فريد مقارنة بعزلات نفس النمط الممرض (Moulton وآخرون، 1993؛ Elamri، 2001)، تشير النتائج إلى وجود عزلات (14عزلة) عديمة البلازميدات من نباتي الزيتون والتمايش، رغم ذلك فقد أظهرت إيجابية لاختبار فرط الحساسية مما يدل على قدرتها الإراضية، يمكن تفسير ذلك على أن جيناتها المسؤولة على الإراضية قد تكون محمولة على الكروموسوم في غياب أي بلازميد وهذا ما أكدته العديد من الدراسات السابقة التي أوضحت أن جينات البكتيريا المسؤولة عن الإراضية قد تكون محمولة على بلازميد أو الكروموسوم البكتيري نفسه (Kenyon، 2013)، أظهرت هذه الدراسة عدم وجود علاقة بين الدراسات الفسيولوجية، الكيموحيوية والمجاميع المتحصل عليها من الدراسة الجزئية لمظهر البلازميدات، أثبتت الدراسة أن الاختبارات الجزئية أكثر دقة من الاختبارات السابقة، حيث أوضحت الفروقات بين العزلات حتى ضمن نفس المجموعة، رغم اختلاف العوائل إلا أنه هناك تشابه في المظهر البلازميدي بين بعض العزلات البكتيرية، ضمتهم مجموعة واحدة، (عزلات من الزيتون والرتم) و(عزلات من الزيتون والتمايش)، إن التركيبة الوراثية لعزلات (*Pvs*) قد يتأثر أساسا بالظروف البيئية لكل منطقة، ونقل الأجزاء النباتية المصابة وأدوات التقليم الملوثة بين حقول الزيتون، وهذا يمكن أن يفسر التشابه الوراثي بين العزلات من حقول مختلفة الموقع الجغرافي، ومن ناحية أخرى فإن الاختلاف في النمط الظاهري للعزلات المختبرة لم يكن مرتبطا باختلاف مناطقها الجغرافية، فقد اشتملت بعض المجاميع المتحصل عليها على عزلات من مناطق مختلفة والبعض الآخر من نفس المنطقة.

التوصيات

1. إجراء دراسات أخرى لمعرفة خصائص العديد من البلازميدات المتحصل عليها خلال هذه الدراسة عن طريق دراسة تتابع (sequencing) تلك البلازميدات والوصول إلى عدد ونوع الجينات التي تحملها، وتحديد أهميتها والدور الذي تلعبه في العزلات البكتيرية.
2. استخدام طرائق أخرى لدراسة التنوع الوراثي لهذه العزلات البكتيرية مثل RAPD-PCR.
3. استخدام طرائق جزيئية قد تساهم في التنبؤ المبكر بالمرض من خلال الكشف عن وجوده في العوائل النباتية المختلفة.

المراجع

- أبو عرقوب، م. م. موسى (1998). الزيتون (إنتاج-أمراض-حشرات-نيماتودا-حشائش) جامعة قاريونس بنغازي ليبيا 319 - 336.
- العافل، ع. أ. (1997). مقارنة بين البلازميدات المعزولة لبكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* (رسالة ماجستير) كلية الزراعة جامعة الفاتح. 62.
- العربي، خ. ف، العامري، ن. ع.، الدنقلي، أ. ، دياب ، خ. م.، فريوان، م. م. (2007). حصر لأهم الأمراض المعدية على أشجار الزيتون بمناطق غرب ليبيا . المؤتمر العلمي الأول حول شجرة الزيتون . جامعة الجبل الغربي - كلية الزراعة - الريانة ص 35 مستخلص .
- سعيد ، م. ع. (1987). دراسات عن مرض العقد الدرنية على الزيتون، الرتم والدفلة (رسالة ماجستير) مركز البحوث الزراعية. 65.
- Azad, H. R., and Cookscy, D. A. (1995). A Semiselective medium for detecting epiphytic and systemic populations of *Pseudomonas savastanoi* from oleander. *Phytopathology* 85, 740-745.
- Beck von Bodman, S. and Shaw, P. D. (1987). Conservation of plasmids among plant-pathogenic *Pseudomonas syringae* isolates of diverse origins. *Plasmids* 17, 240-247.
- Bella, p. Licciardello, g .Tessitori, M. Catara, v. (2008). A real-time PCR quantitative detection assay for *Pseudomonas savastanoi* pv. *nerii* in *Nerium oleander* *Phytopathologia Mediterranea* 47, 204-213.
- Brown, T. A. (1998). *Genetics, A molecular Approach* (3rded) chapman and Hall. 469 pp.
- Brown, T. A. (2001). *Gene cloning and DNA Analysis. An introduction.* (4th ed.). Blackwell Science. 363 pp.
- Buonauro, R., Moretti, C., da Silva , D. P., Cortese. C., Ramos. C. and Venturi. V. (2015). The olive knot disease as a model to study the role of interspecies bacterial communities in plant disease. *frontiers in plant Science* 6 - 434.

Comai, L., Surico, G. and Kosuge, T. (1982). Relation of Plasmid DNA to Indoleacetic Acid Production in Different Strains of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. Journal of General Microbiology 128, 2157-2163.

Cuppels, D. A. and Ainsworth, T. (1995). Molecular and physiological characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* and *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* strains that produce the phytotoxin coronation. Applied and Environmental Microbiology 61, 3530-3536.

Curiale, M.S. and Mills, D. (1982). Integration and partial excision of a plasmid in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. Journal of Bacteriology 152, 797-802.

Denny, T. P., Gilmour, M. N. and selander, R. K. (1998). Genetic diversity and relationships of two pathovars of *Pseudomonas syringae* Journal of geneul Microbiology 134, 1949-1960.

EL- Hendawy, H. H., and Azab, E. A. (1998). Characterization and plasmid profile of an inhibitory strain of *Erwinina herbicola* isolated from *Phaseolus vulgaris* in Egypt. Microbiology Research 153, 341-348.

Elamri, N. A. (2001). Strain Diversity and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and related pathovars Ph. D. thesis. 235 pp.

González, A. J., Rodicio, R., Mendoza, M. C. (2003). Identification of an Emergent and Atypical *Pseudomonas viridiflava* Lineage Causing Bacteriosis in Plants of Agronomic Importance in a Spanish Region . Applied and Environmental Microbiology 69, 2936-2941.

Iacobellis, N. S., Caponero, A. and Evidente, A. M. (1998). Characterization of *Pseudomonas syringae* ssp. *savastanoi* strains isolated from ash. Plant Pathology 47, 73-83.

Kennelly, M. M., Cazorla, F. M., de Vicente, A., Ramos, C., Sundin, G. W. (2007). *Pseudomonas syringae* Diseases of fruit Trees. The American Phytopathological Society.91 No. 1.

Kenyon, H, J. (2013). Virulence of *Pseudomonas savastanoi*. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php?title=Virulence_of_Pseudomonas_savastanoi&oldid=87987.

King, E. O., Ward, M. K., Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 44, 301-307.

Klaus, R. and Bernd, S. (1997). Role of exv polysaccharides from *pseudomonas syringae* pathovars in pathogenesis. in: *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Edited by Rudolph, K., Burr, T.J., Mansfield, J. W., Stead, D., Vivian, A. and Von Kietzell, J. pp. 265-270. Kluwer Academic Publishers. Netherlands

Klaus., Geider. (1997). Differentiation and identification of *Pseudomonas syringae* pathovars by PCR-AND PFGE-analyses in: *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Edited by Rudolph, K., Burr, T.J., Mansfield, J. W., Stead, D., Vivian, A. and Von Kietzell, J. pp549-464. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.

Krid, S., Rhouma, A. Quesada, J. M., Penyalver, R. and Gargouri, A. (2008). Delineation of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated in Tunisia by random-amplified polymorphic DNA analysis. *Journal of Applied Microbiology* 106, 886-894.

Krid, S., Rhouma, A. Mogou, I., Quesada, J. M., Nesme, X., and Gargouri, A. (2010). *Pseudomonas savastanoi* Endophytic bacteria in olive tree knots and Antagonistic potential of strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. *Journal of Plant Pathology* 92, 335-341.

Lazo, G. R., and Gabrial, D. W. (1987). Conservation of plasmid DNA sequences and pathovar identification of strains of *Xanthomonas campestris campestris*. *Phytopathology* 77, 448-453.

Lelliott. R. A, and Stead. D. E. (1987) . Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants. 1987 pp.vii + 216pp. ref.11 pp.

Liang, L. Z., Sobiczewski, P., Paterson, J. M. and Jones, A. L. (1994). Variation in Virulence, Plasmid Content, and genes for coronatine Synthesis Between *Pseudomonas syringae* pv. *morsprunorum* and *P. s. syringae* from *Prunus*. *Plant Disease* 78, 389-392.

Louws, F. J., Rademaker, Jlk. and de Bruijn, F. J. (1999). The three Ds of PCR—based genomic analysis of phytobacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. *Annual Review of Phytathology* 37, 81-125.

Marchi, G., Viti, C., Giovannetti, L. and Surico, G. (2005). Spread of levan-positive populations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*, the causal agent of olive Knot, in central Italy. *European Journal of Plant Pathology*. 112, 101-112.

Moulton, P. J., Vivan, A., Hunter, P.J. and Taylor, J.D. (1993). Changes in cultivar-specificity toward pea can result from transfer of plasmid RP4 and other incompatibility group P1 replicons to *Pseudomonas syringae* pv .*pisi*. *Journal of General Microbiology* 139, 3149-3155.

Ramos, C., Matas, I. M., Bardajil, L., Aragon, I. M., Murillo, J. (2012). *Pseudomonas savastanoi*pv. *savastanoi* : some like it knot. *Molecular plant pathology* 13, 998-1009.

Rodríguez-Moreno, L., Barceló-Muñoz, A. and Ramos, C. 2008 *In vitro* analysis of the interaction of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *nerii* with micropropagated olive plants. *Phytopathology* 98:815-822.

Schaad, N. W., ed. (1988). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. 2nd. Ed. American Bacteriological Society. St. Paul, Minnesota. pp 72.

Toba, O. A., Emmanuel, A, E., Alaba, A. A. (2015) .Plasmid profile of multi-drug resistance bacteria isolated from available water sources and leachate samples from dumpsite at ebira communities in ekiti north senatorial District, Ekiti state, Nigeria. *European Journal of Advanced Research in Biological and Life Sciences* 3, 2056-5984.

Yildirm, I. H. ,Yildirim, S. C. and kocak, N. (2011). Molecular methods for bacterial genotyping and analyzed gene regions. *journal of Microbiology and Infectious Disease* 1,42-46.

Plasmid Profiles of *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*

Fathea. E. Elmagdub

Medical Technology
Faculty, University of
Tripoli, Libya.

Nuria. A. Elamri

Agriculture Faculty,
University of Tripoli,
Libya

fatheyaelmajdob@yahoo.com

Abdunabi. M. Abughania

Science Faculty, University of
Tripoli. Libya

<https://doi.org/10.36602/jmuas.2019.v01.01.28>

Abstract

Pseudomonas syringae pv. *savastanoi* (Psv) is the causal agent of olive knot disease. Forty nine bacterial isolates of Psv were isolated from knots on several hosts at the western area of Libya: 31 isolates from olive *Olea europaea*, 17 isolates from athel *Tamarix aphylla* (on which the disease is documented for the first time) and one isolate from retem *Retama raetam*. The isolates were identified on the basis of their morphological characteristics and LOPAT profile. They produced round, white creamy colonies on selective media (PAB and KB), from which 15 isolates produced fluorescent pigments. With the exception of other LOPAT analysis, all isolates were pectinolytic activity and arginine dihydrolase negative. some isolates were levan positive (10 isolates) and oxidase positive (12 isolates), while the rest of isolates were negative for both tests. Most of the isolates induced a hypersensitive reaction on tobacco and pepper leaves. Plasmid profile analysis of Psv strains indicated high genetic variability between the isolates of the same host or different hosts. Most of the olive isolates were classified according to their plasmid profile into five groups (A, B, C, D, F), however, the athel isolates were separated into three different groups designated as G, K, N, on the other hand, group E and H contained mixed isolates from different hosts: group H included two isolates from olive (OS25w and OS42w) and one isolate from retem (Ra1); only two strains OS6w and Ta5y from olive and athel respectively were classified within the same group designated as E. The remaining seven isolates from all hosts were unique. The total number of plasmids ranged from 1-4 for the strains tested, while the DNA content varied widely ranging from 540 to 13550 bp. No plasmid were detected in 14 isolates tested. Genome analysis based on plasmid profiles indicated the great potential of this technique to discriminate between the isolates of Psv from different hosts and geographical regions.

Keywords: plasmid profiles, *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*, olive knot disease.