دراسة القرابة الوراثية بين عزلات محلية من البكتريا المسببة لمرض سل الزيتون

Pseudomonas savastanoi pv. *savastanoi* (pss)

الباحثين: د. فاتن العلوش[1]، د. محمود أبوغرة[2]، د. عايدة جلول[3]

(1) الهيئة العامة للتقانة الحيوية، دمشق، سورية

(2) كلية الزراعة ، جامعة دمشق (3) كلية الزراعة ، جامعة مشق

للمراسلة: م. فاتن العلوش، البريد الالكتروني en.alouche@gmail.com

الملخص :

يعدّ مرض سل الزيتون الذي تسببه البكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss) من الأمراض الهامة التي تصيب شجرة الزيتون في سورية. طُبقت تقانات البصمة الوراثية repetitive- PCR (rep-PCR) على 25 عزلة من Pss (تم عزلها وتعريفها بالاختبارات الكيميائية والعدوى الاصطناعية) بهدف تمييز العزلات ورسم شجرة القرابة الوراثية. أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي لتقانات rep-PCR وجود حزم مميزة تراوحت أوزانها بين bp100 و bp1400 (24 و12 و12 حزمة لتقانات ERIC-, REP-, BOX-PCR). حُسبت مصفوفة التشابه لنتائج البصمة الوراثية باستخدام برنامج POPGENE 1.32، حيث تراوحت نسبة التشابه في العزلات البكتيرية المدروسة بين 40% و100%. كانت العزلة sav21 المأخوذة من منطقة مصياف هي الأقرب للعزلة المرجعية B46 بنسبة تشابه 85% تليها sav5.2 و sav10.a المأخوذتان من منطقة اللاذقية بنسبة تشابه 80%. انقسمت شجرة القرابة الوراثية إلى عنقودين أحدهما ضم العزلات المرجعية B46،A77،B34،S32 والأخر انقسم إلى تحت عنقودين منفصلين حيث ضم تحت العنقود الأول عزلات منطقة مصياف (sav23،sav21،sav20) وضم تحت العنقود الثاني عزلات محافظة اللاذقية. وبالتالي تمكنت تقانات البصمة الوراثية من تصنيف عزلات Pss إلى ثلاثة عناقيد تبعاً منطقة العزل.

الكلمات المفتاحية: بكتريا المسببة لسل الزيتون، تقانات rep-PCR، البصمة الوراثية، شجرة القرابة الوراثية.

A Study of the genetic relationship between local isolates of olive Knot bacteria *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*

Abstract

Olive Knot caused by the bacterium *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (Pss) is one of important diseases infecting the olive tree in Syria. Repetitive - PCR (rep-PCR) techniques were applied to 25 isolates of Pss (isolated and defined by chemical tests and artificial infection) to distinguish isolates and to draw the genetic dendrogram. Electrophoresis of rep-PCR products showed distinct bands of weights ranging between 100bp and 1400bp, (24, 12, and 12 bands of ERIC-, REP-, BOX-PCR techniques respectively). The similarity matrix of the isolates genetic fingerprints results of rep-PCR techniques was calculated using POPGENE 1.32 program. The percentage of similarity in the studied bacterial isolates ranged between 40% and 100%. The isolate sav21 from Mesyaf region was the closest to the reference isolate (B46) with a similarity of 85%, followed by sav5.2 and sav10.a from Lattakia region with a similarity with reference isolate (B46) of 80%. The genetic dendrogram was divided in two clusters, one of which included the reference isolates (S32, B34, A77, B46) and the other was divided into two separate sub-clusters, the first sub-cluster included the isolates of Mesyaf region (sav20, sav21, sav23). The second sub-cluster included the isolates of Lattakia region. Thus, DNA fingerprinting techniques were able to classify Pss isolates into three clusters according to the isolation region.

Key words: *Pseudomonas savastanoi*, fingerprint, rep-PCR, genetic dendrogram, Syria.

مقدمة:

يعد مرض سل الزيتون من الأمراض النباتية القديمة، حيث تسبب الإصابة به أضراراً مختلفة فعند إصابة غراس الزيتون الصغيرة تؤدي إلى موت البراعم مما يشوه المنظر العام للأشجار وخفض الإنتاج بنسبة 22%، كما تسبب طعماً غير مستساغ للثمار والزيت (Schroth وزملاؤه، 1968) وتخفض من المحتوى الزيتي والبروتيني للثمار (Osman وزملاؤه، 1980؛ Civantos Lopez-Villalta، 1999)، وعلى كمية الإنتاج (Schroth وزملاؤه، 1973). تمت الإشارة إليه منذ العام 300 قبل الميلاد وقد وصفه العالم النباتي والفيلسوف الاغريقي Thiophrastos (Janse،1981)، وقد أعتقد في البداية أن المرض ناتج عن إصابات حشرية أو جروح التقليم أو ضربة شمس إلى أن قام العالم Luigi Savastano بتحديد الطبيعة البكتيرية لهذا المرض عن طريق إجراء العدوى الاصطناعية عام 1889 وسماها Bacillus olea tuberculosis (Marchi وزملاؤه، 2005)، وفي عام 1908 حدد العالم Smith صفات هذه البكتريا وسماها Bacterium savastanoi، وسُميت البكتريا لاحقا Pseudomonas savastanoi من قبل Stevense (1913). تصيب هذه البكتريا عدة نباتات من العائلة الزيتونية Oleaceae مثل الدردار Fraxinus sp و Ligustrum sp و الياسمين Jasminum sp. وتصيب أيضاً الدفلة Nerium oleander L. و Phyllyrea sp. (Bradbury، 1986)، وقد سُميت البكتريا المعزولة من العوائل النباتية المختلفة بأسماء مختلفة (Surico وIacobellis، 1992)، كما أُستخدمت عدة طرائق للتصنيف ودراسة التنوع الوراثي للبكتريا كاختبارات القدرة الإمراضية، اختبار الحساسية، الاختبارات المصلية باستخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة ومتعددة النسيلة، الاختبارات الكيماحيوية، اختبارات المسح من خلال المواد التي تستهلكها البكتريا BIOLOG، اختبار الحساسية للمضادات الحيوية، دراسة أنماط الأحماض الدهنية fatty acid methyl esters (FAME). رحلان مستخلصات البروتين على هلامة البولي أكريلامايد sodium dodecyl sulfat polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)، الرحلان ثنائي الاتجاه للبروتينات 2.D PAGE ، الكشف عن الآيزوزيمات، تحليل البلاسميد والـ DNA الجينومي وتحديد التتابع النكليوتيدي لمورثات (ssu rDNA، 16S rDNA، 23S rDNA) (louws وزملاؤه، 1994؛ De Bruijn وزملاؤه، 1996؛ Adhikari

وزملاؤه، 2012؛ Ferreira–tonin وزملاؤه، 2012) ولكل طريقة من الطرائق السابقة مشاكلها التي تحد من استخدامها.

درس Sisto وزملاؤه (2002) التنوع الوراثي لعزلات بكتيرية Pss معزولة من الزيتون والدفلة والدردار بطريقة restriction fragment length polymorphism (RFLP) ووجدوا أن عزلات الزيتون تختلف عن عزلات الدفلة والدردار وهذا يدعم النظريات التي تقول أن مجتمع Pseudomonas syringae subsp. savastanoi الذي يصيب العوائل المختلفة متنوع، إلا أن هذه الطريقة تتطلب مجهود ووقت كبيرين علاوة على أنها تحتاج كميات كبيرة من الـDNA 2– 10 µg (powell وزملاؤه، 1996)، واستخدمت أيضاً تقانة التضخيم العشوائي للـ DNA متعدد الأشكال Random Amplification polymorphic of DNA (RAPD) وهي نادرة الاستخدام في دراسة البكتريا ولا تحظى بثقة الباحثين لعدم ثباتية النتائج عند تكرار الاختبار لنفس العزلات (Mueller و Welfenbarger، 1999؛ Garcia وزملاؤه، 2004؛ Ghazi وزملاؤه، 2013)، حيث وجد Krid وزملاؤه (2008) عند دراسة خصائص 58 عزلة من تونس بوساطة RAPD و rep–PCR أن العزلات توزعت في ثلاث مجموعات بشكل متوافق مع المنطقة الجغرافية التي عزلت منها وأُستخدمت أيضاً طريقة التعدد الشكلي لأطوال القطع المضخمة Amplifed fragment length polymorphism (AFLP) لكنها تحتاج إلى DNA عالي النقاوة و مجهود ووقت كبيرين وكلفتها عالية (Garcia وزملاؤه، 2004)، وذكر De Bruijn وزملاؤه (1996) أن الذي حسن الطرائق المعتمدة على DNA هو استخدام الـ PCR بالتعريف والتصنيف والبصمة الوراثية. واقترحت دراسات عديدة بأن تقنيات البصمة الوراثية المعتمدة على السلاسل التكرارية repetitive– PCR (rep–PCR) يمكن استخدامها كتقنيات فحص سريعة ومميزة جداً لتحدد النمط الوراثي والتنوع التصنيفي وتركيب القرابة الوراثية للمجتمعات البكتيرية (Louws وزملاؤه، 1994؛ Rademaker وزملاؤه، 2000؛ Rademaker وزملاؤه، 2005؛ Asgaranil وزملاؤه، 2015) حيث تقوم اختبارات البصمة الوراثية المعتمدة على repetitive–PCR على استخدام بادئات الـ DNA المقابلة لتكرارات (motifs) محفوظة في سلاسل تكرارية موجودة طبيعيا في جينوم البكتريا(Louws وزملاؤه، 1994؛ Busse و Wieser، 2000) وهذه السلاسل المكررة موجودة في أغلب البكتريا إن لم يكن جميعها (De Bruijn، 1996).

تسمح طرائق البصمة الوراثية بفحص المناطق العشوائية في جينومات الممرضات النباتية بهدف تحديد سلاسل متخصصة بالنوع عندما تكون المورثات المحفوظة غير كافية لتعريف الأنواع، وتستخدم عادة من أجل دراسة القرابة الوراثية لمجتمعات الممرضات حتى أنها تفيد في تعريف سلاسل متخصصة تسمح بالكشف عن الممرضات على مستويات تصنيفية منخفضة والتمييز بين عزلات النوع الواحد (د.عايدة جلول، اتصال شخصي). وذكر Louws وزملاؤه (1994) أنَ هناك عدة عائلات من سلاسل تكرارية منتشرة على طول جينومات الأنواع البكتيرية لكن ثلاث منها درست بتفاصيل كبيرة وهي:

سلسلة repetitive extragenic palindromic (REP) وزنها من 35 إلى 40 bp.

سلسلة enterobacterial repetitive entergenic consensus (ERIC) وزنها من 124 إلى bp127 ، وسلسلة (BOX) وزنه bp154 .

وذكر De Bruijn (1996) أن بادئات الـ PCR صُممت لتُقرأ خارج الاتجاه واعتباراً من التكرارات المعكوسة في REP و .ERIC ومن تحت الوحدة BOX A في BOX. وأدى استخدام البادئات الثلاث في . PCR لتضخيم انتقائي للمناطق الوراثية المتواضعة بين سلاسل BOXوالـREP و ERIC، بحيث يُطلق على التقانات المقابلة لها اسم (ERIC-, REP-, BOX-PCR) ولجميعها (rep-PCR) (Versalovic وزملاؤه، 1994)، وبذلك فإن الحزم المضخمة عند ترحيلها على هلامة الآغار ستعطي أنماط بصمة وراثية مشابهة للباركود وظيفتها مثل توقيع خاص ونوعي للعزلات البكتيرية حيث استخدم هذه الطريقة على عزلات Pss كل من Mirik وزملاؤه (2011) و Scortichini وزملاؤه (2004).

هدف البحث إلى

دراسة القرابة الوراثية بين عزلات محلية من البكتريا المسببة لمرض سل الزيتون باستخدام تقنيات Eric_ PCR، Box_ PCR،Rep_ PCR

مواد وطرائق العمل :

استخلاص DNA و تفاعلات البصمة الوراثية rep-PCR :

أُستخلص DNA من مستعمرات فتية بعمر 24 ساعة باستخدام DNA wizard isolation and purification kit من شركة Promega وفق تعليمات الشركة الصانعة. حُددت سلامة DNAبوساطة الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز Agarose 1% المُضاف لها ايثيديوم

بروميايد باستخدام محلول منظم للرحلان 1X TBE (10x TBE= 108 غ Tris base، 55غ boric acid، 9.3غ 1mM EDTA /1 ل ماء مقطر). فُحصت الهلامة تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) بوساطة جهاز توثيق الهلامات Gel documentation system (ViLBER LourMat). أُعتبرت عينات الحمض النووي DNA ذات جودة جيدة عند عدم وجود تفكك فيها (Smear). ثم أُجريت تقانات (REP-PCR، ERIC-PCR، BOX-PCR) المعتمدة على السلاسل التكرارية الموجودة ضمن الجينوم البكتيري لـ DNA من العزلات البكتيرية المدروسة. يتكون تفاعل الـ PCR من 12.5 µl (promega) hot start go taq Master Mix 2x و 1.25 µl من البادئ المباشر For (10Mµ) و1.25 µl من البادئ غير المباشر Rev (10Mµ) وذلك في تقانتي الـ Rep و Eric أما في تقانة الـ Box فقد تم استخدام 2.5 µl من البادئ Box1R و5 µl من محلول DNA و5 µl ماء مقطر معقم لإكمال حجم التفاعل النهائي إلى 25 µl. وأُجري تفاعل الـ PCR للتقانات الثلاث باستخدام جهاز (eppendorf Mastercycler) وفق المراحل التالية : مرحلة تنشيط الأنزيم وفصل سلسلتي الـDNA ولمدة زمنية 7 دقائق لدورة واحدة تليها مرحلة مكررة لـ 35 (denaturation لمدة 1 دقيقة، alignment حسب Tm كل زوج بادئات لمدة دقيقة وبلمرة polymerization لمدة 8 دقائق ثم مرحلة استطالة final extention لدورة واحدة ومدة زمنية 16 دقيقة.

جدول (1) تسلسل البادئات المستخدمة في تفاعلات Rep-PCR

Sequence	primer	Tm
5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3'	ERIC1	60
5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG -3'	ERIC2	62
5'-IIIICGICGICATCIGGC-3'	REP1	53
5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'	REP2	53
5'-CTAGGCAAGGCGACGCGCGCTGACG-3'	BOX	69

(Penyalver وزملاؤه، 2006).

بعد إتمام الـ PCR لدوراته تم الكشف عن نواتج التفاعل على هلامة أغاروز 1.5% ضمن محلول TBE، بالمقارنة مع مؤشر قياسي 1kb (Fermentas# SM0333) ومؤشر قياسي

pb100 (Fermentas# SM0333) وتطبيق تيار كهربائي 100 فولط لمدة ساعتين، ثم إظهار الحزم بعد صبغ الهلامة بمحلول إيثديوم برومايد تركيزه 5 مغ/ ل والتصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية 256 nm باستخدام جهاز توثيق الهلامات system Gel documentation (VILBERL OURMAT). حُدد وجود أو غياب الحزم الناتجة من التضخيم بتقانة rep- PCR من خلال مقارنتها مع المؤشرات الجزيئية المستخدمة وفق النظام الثنائي 0/1 وحُددت مصفوفة التشابه والتباعد الوراثي بين العزلات المدروسة بكل تقانات rep- PCR حسب Nei (1979) باستخدام برنامج population genetic analysis POPGEN version 1.32، ورسمت شجرة القرابة الوراثية باستخدام برنامج Treecon 1.3b بطريقة Neighbor joining بالاعتماد على معادلة Nei و Li (1979) في حساب معامل التباعد وأظهرت الـ Bootstrap على أفرع الشجرة (100 iteration مرة).

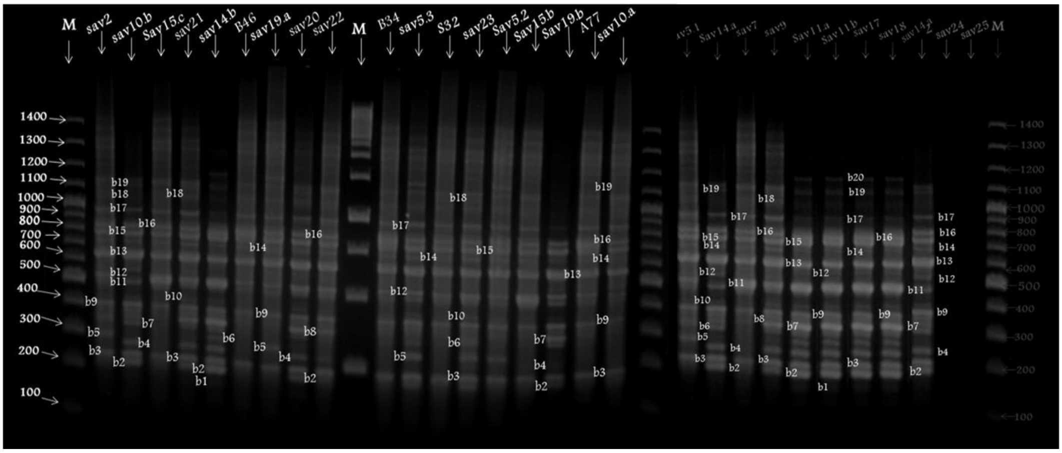
النتائج والمناقشة:

التباين الوراثي لعزلات Pss :

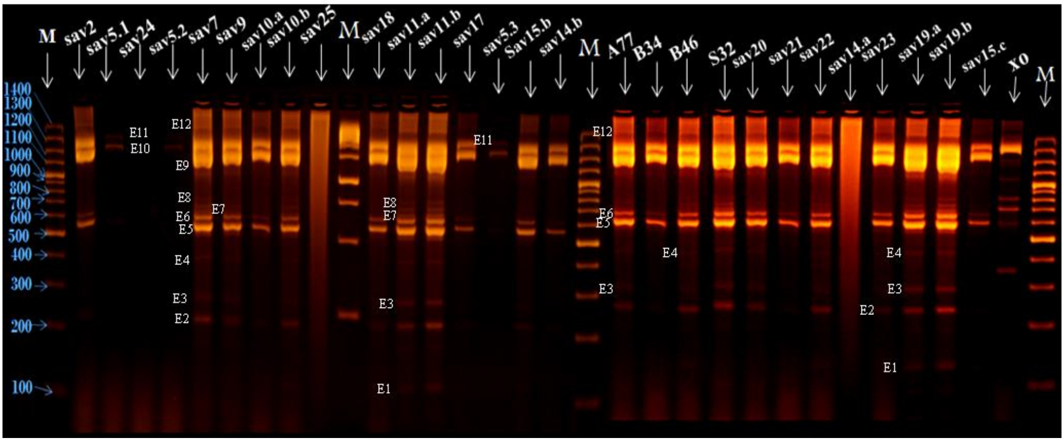
أُجريت اختبارات البصمة الوراثية rep-PCR بأنواعها الثلاث (ERIC-, REP-, BOX-PCR) على 25 عزلة بكتيرية تم تحديد انتماؤها على النمط الممرض Pss بوساطة الاختبارات الكيميا حيوية والجزيئية بهدف تحدد تباينها الوراثي ودرجة قرابتها من بعضها البعض.

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي لتقانات rep-PCR وجود 48 حزمة مميزة توزعت لـ (24، 12، 12) لتقانات BOX-PCR (الشكل1)، ERIC-PCR (الشكل2)، REP-PCR (الشكل3) على التوالي. وُجد تنوع وراثي بين العزلات، بتطبيق تقانة الـBOX-PCR حيث كانت 21 حزمة متعددة شكلياً polymorphic وثلاثة حزم (b9،b13،b16) متماثلة شكلياً monomorphic (موجودة عند جميع العزلات) (الشكل 1) وتراوحت الأوزان الجزيئية التقريبية للحزم حسب المؤشر الجزيئي بين bp200 (الحزمةb1) و1400 bp (الحزمة b24)، كما ظهرت الحزمة b10 عند العزلات sav2، sav14.a، sav14.b، sav20، sav22، sav5.3، sav19.a، sav11.a، sav11.b، sav7،sav9، sav17، sav18، وغابت الحزمة b4 عند العزلات sav2، sav15.b، sav15.c، sav19.a، sav19.b، sav23،sav5.3، A77، S32، B34، B46 وبالنسبة لتقانة ERIC-PCR كانت الحزم الناتجة الـ 12 polymorphic

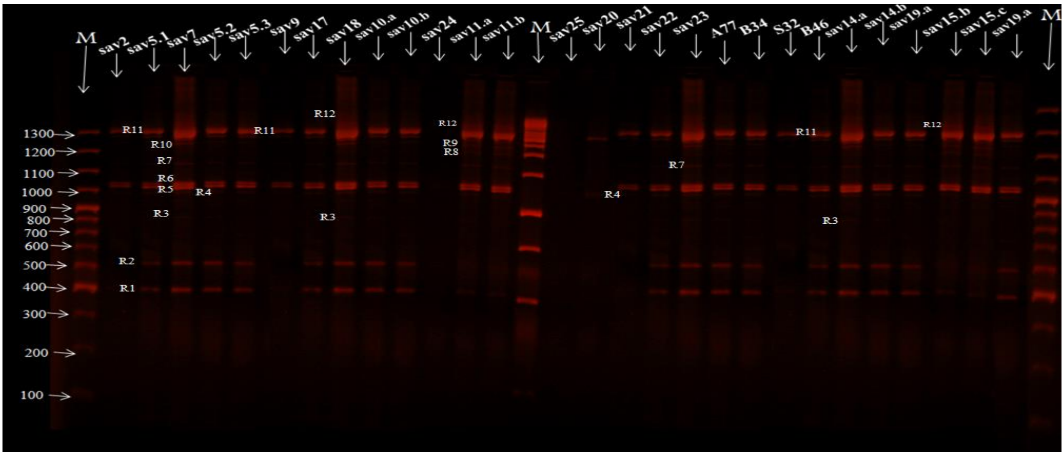
(الشكل 2) وحُددت الأوزان الجزيئية التقريبية لها بين 100 bp و 1400 bp. وغابت الحزمة E2 عند العزلات ماعدا العزلة sav7، sav9، sav10.b، sav11.a، sav11.b، sav19.a، sav19.b، sav18 ، sav15.b، وكذلك غابت الحزمتان E5 وE12 عند العزلات sav5.1، sav5.2، sav5.3. وبالنسبة لتقانة REP -PCR كانت جميع الحزم الـ 12 polymorphic (الشكل3) وتراوحت الأوزان الجزيئية التقريبية لها بين 400 bp و 1300 bp. و ظهرت الحزمتان R1 وR2 عند معظم العزلات ماعدا العزلات sav9، sav20، sav21، S32، وكذلك ظهرت الحزمتانR5 وR6 عند كافة العزلات ماعدا العزلة sav20 (شكل 1و2و3).



شكل(1) حزم التعددية الشكلية على هلامة الآغاروز 1.5% لنواتج تفاعل تقانة BOX-PCR على عزلات Pss



شكل(2) حزم التعددية الشكلية على هلامة الآغاروز 1.5% لنواتج تفاعل تقانة ERIC-PCR على عزلات Pss



الشكل(3) حزم التعددية الشكلية على هلامة الآغاروز 1.5% لنواتج تفاعل تقانة REP-PCR على عزلات Pss

في الاختبارات المُجراة في هذا البحث وُجد أن تقانة BOX-PCR أعطت أعلى تعددية شكلية لعزلات Pss المحلية وهذا يتوافق مع ما وجده Mirik وزملاؤه (2011) و Alabdalla وزملاؤه (2009) أن تقانة box-pcr كانت الأكثر قدرة على الكشف عن التعدد الشكلي للعزلات البكتيرية لـ Pss.

في حين وجد Scortichini وزملاؤه (2004) عند إتباعه تقانات REP-PCR أن تقانة REP-PCR هي التقانة الأكثر تمييزاً بين عزلات Pss .

تحليل نتائج البصمة الوراثية rep–PCR ورسم شجرة القرابة الوراثية:

تم تحليل نتائج الصور بالنظام الثنائي (1، 0) تعبيراً عن (الحزمة موجودة، أو غير موجودة) حسب التباعد بين العزلات البكتيرية عن طريق برنامج population genetic analysis POPGENE version 1.32 حسب معامل Nei (1979) وذلك لتقانات rep–PCR كاملة.

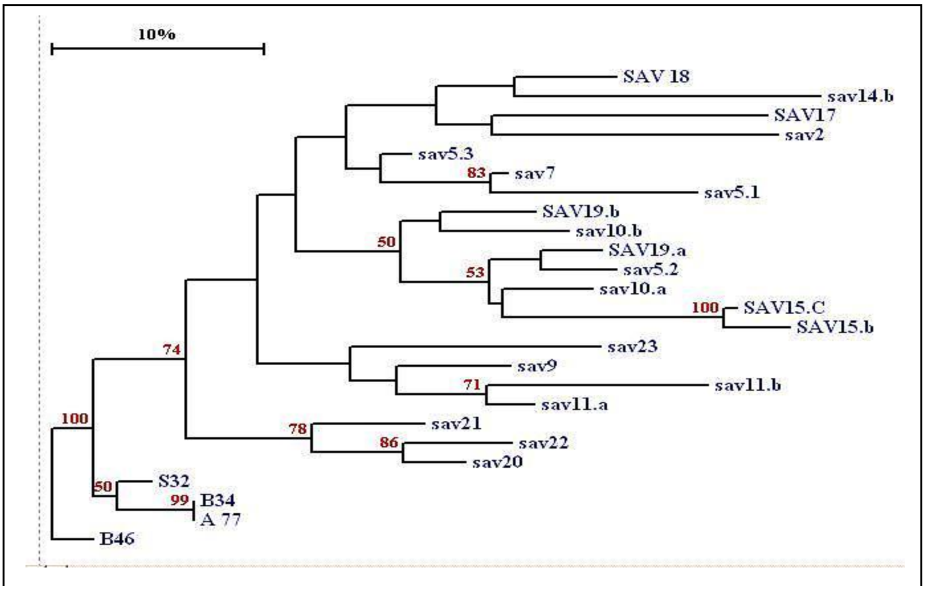
وتراوحت نسبة التشابه في العزلات البكتيرية المرجعية (B46،A77،B34،S32) بين 90% و100% بينما تراوحت نسبة التشابه في عزلات هذا البحث بين 40% و92.5% في حين تراوحت نسبة التشابه بين العزلات البكتيرية المرجعية وعزلات هذا البحث بين 57% و85% حيث كانت العزلة sav21 المأخوذة من منطقة مصياف هي الأقرب للعزلة المرجعية B46 بنسبة تشابه 85% في حين كانت العزلة الأقرب من عزلات منطقة اللاذقية sav5.2 وsav10.a بنسبة تشابه 80% لكلتا العزلتين (شكل 4).

…b	sav20	sav21	sav22	sav23	A 77	B34	B46	S32
[illegible]	0.6500	0.5750	0.6250	0.7000	0.6750	0.6750	0.6750	0.7250
[illegible]	0.7000	0.6750	0.7250	0.6500	0.6250	0.6250	0.6250	0.6750
[illegible]	0.6250	0.6000	0.6500	0.6750	0.7500	0.7500	0.7500	0.8000
[illegible]	0.7250	0.7000	0.7000	0.7750	0.7000	0.7000	0.7000	0.7500
[illegible]	0.7000	0.6750	0.6750	0.7000	0.6750	0.6750	0.6750	0.7250
[illegible]	0.7000	0.7250	0.6750	0.8000	0.7750	0.7750	0.7250	0.7750
[illegible]	0.6250	0.6500	0.6500	0.6250	0.7500	0.7500	0.8000	0.8000
[illegible]	0.7000	0.7250	0.6750	0.5500	0.5750	0.5750	0.6750	0.6250
[illegible]	0.6500	0.7250	0.6250	0.7000	0.7750	0.7750	0.7250	0.7250
[illegible]	0.6500	0.6750	0.5750	0.7500	0.7250	0.7250	0.6750	0.6750
[illegible]	0.6500	0.6750	0.6250	0.5500	0.5750	0.5750	0.6250	0.6250
[illegible]	0.4500	0.5250	0.4750	0.5000	0.6250	0.6250	0.6250	0.6250
[illegible]	0.4500	0.5250	0.4750	0.5500	0.6750	0.6750	0.6750	0.6750
[illegible]	0.6500	0.5750	0.5750	0.6500	0.6750	0.6750	0.6750	0.7250
[illegible]	0.8000	0.7250	0.7250	0.7000	0.6750	0.6750	0.7250	0.7250
[illegible]	0.5500	0.5250	0.5750	0.6500	0.6750	0.6750	0.6750	0.7250
[illegible]	0.7000	0.7250	0.6750	0.6500	0.6250	0.6250	0.6750	0.6750
****	****	0.8750	0.9250	0.7000	0.7250	0.7250	0.7750	0.7750
[illegible]	0.1335	****	0.8500	0.6750	0.7500	0.7500	0.8500	0.8000
[illegible]	0.0780	0.1625	****	0.6250	0.7500	0.7500	0.8000	0.8000
[illegible]	0.3567	0.3930	0.4700	****	0.7750	0.7750	0.6750	0.7250
[illegible]	0.3216	0.2877	0.2877	0.2549	****	1.0000	0.9000	0.9500
[illegible]	0.3216	0.2877	0.2877	0.2549	0.0000	****	0.9000	0.9500
[illegible]	0.2549	0.1625	0.2231	0.3930	0.1054	0.1054	****	0.9500
[illegible]	0.2549	0.2231	0.2231	0.3216	0.0513	0.0513	0.0513	****

توافق ما توصلنا إليه مع نتائج كل من Scortichini وزملاؤه (2004) حيث وصلت نسبة التشابه بين عزلات Pss إلى 81%، في حين كانت نسبة التشابه بين عزلات Pss المعزولة

عند Mirik وزملاؤه (2011) إلى 98%، وعند Alabdalla وزملاؤه (2009) وصلت نسبة التشابه إلى 87%. وبالاعتماد على تحليل التباين رُسمت شجرة القرابة الوراثية ذات الجذر لاختبارات ERIC-, REP-, BOX-PCR مجتمعة بتطبيق طريقة Neighbor joining بالاعتماد على معادلةNei و Li (1979) وأظهرت Bootstrap على أفرع الشجرة (100iteration مرة) باستخدام برنامج Treecon version 1.3b.

انقسمت شجرة القرابة الوراثية اعتماداً على نتائج البصمة الوراثية rep-PCR كاملة (شكل، 5) إلى عنقودين أحدهما ضم العزلات المرجعية (S32، B34، A77، B46) والأخر انقسم إلى تحت عنقودين منفصلين حيث ضم تحت العنقود الأول عزلات منطقة مصياف (sav20، sav21، sav22) وتحت العنقود الثاني انقسم إلى مجموعتين حيث ضمت المجموعة الأولى عزلات (sa11.a، sav11.b، sav9، sav23) بينما انقسمت المجموعة الثانية إلى فرعين حيث انقسم الفرع الأول إلى تحت فرعين ضم أحدهما عزلات (sav18، sav17، sav2، sav14.b) وضم الثاني عزلات (sav5.3، sav7، sav5.1) وكذلك انقسم الفرع الثاني إلى تحت فرعين ضم أحدهما عزلات (sav10.b، sav19.b) بينما ضم الأخر العزلات (sav5.2، sav15.a، sav15.b، sav19.a، sav10.a)، وتم استبعاد العزلات sav14.a، sav24، sav25، وذلك لتحلل الـ DNA فيها.



شكل (5) شجرة التباعد الوراثي لعزلات Pss المدروسة والمرجعية الناتجة عن البصمة الوراثية rep-PCR

وبالتالي يمكن الإشارة إلى وجود 9 مجموعات وراثية (21 طرز وراثي) مختلفة من Pss المعزولة من أشجار الزيتون من منطقتي اللاذقية ومصياف، وهذا يتوافق مع ما ذكره Quesada (2010) حيث وجد مجتمعات Pss متباينة وراثياً ومظهرياً وتميل للتماثل المظهري والوراثي في المنطقة الواحدة، وهذا أيضاً ما أكده Alabdalla وزملاؤه (2009) و Kaluzana وزملاؤه (2010) عند دراسة التباين الوراثي بطريقة rep-PCR حيث توضعت العزلات البكتيرية للنوع *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* المأخوذة من منطقة جغرافية واحدة في مجموعة واحدة على شجرة القرابة الوراثية، كما ذكر Sisto (2007) و Kird (2008) و Matas (2008) أن التباين الوراثي مرتبط بالمنطقة الجغرافية وأن العزلات المعزولة من نفس المنطقة تمتلك قرابة وراثية أكبر من تلك المأخوذة من مناطق مختلفة.

وجد keshteker وزملاؤه (2016) عند اتباع تقانات rep-PCR لمعرفة التباين الوراثي بين عزلات تابعة لـ P.syringae تشابهاً كبيراً بين العزلات المأخوذة من نفس المنطقة و اختلافاً كبيراً بينها وبين العزلات المعزولة من مناطق أخرى حيث انقسمت شجرة التباين الوراثي إلى أفرع على أساس المنطقة الجغرافية، في حين وجد najafi وTaghavi (2011) عند مقارنة عزلات مختلفة من P.syringae . بإتباع تقانة box-PCR ورسم شجرة القرابة الوراثية أن الشجرة انقسمت إلى أفرع تبعاً للعائل النباتي الذي عُزلت منه، وكذلك وجد little وزملاؤه (1998) عند اتباعه تقانة ERIC-PCR أن شجرة القرابة الوراثية انقسمت تبعاً للعائل النباتي.

وبذلك نجد أن تقانات rep- PCR طريقة مفيدة لتعريف وتوصيف ممرضات النبات البكتيرية، وتعتبر ناجحة لدراسة مجتمعات أمراض النبات البكتيرية كما ذكر De Bruijn وزملاؤه (1996)، وتعتبر تقانات فحص سريعة ومميزة جداً لتحديد النمط الوراثي والتنوع التصنيفي وتركيب القرابة الوراثية للمجتمعات البكتيرية كما وجد Rademaker وزملاؤه (2000).

Reference

1. المراجع الأجنبية

1- Adhikari, T.B., Gurung, S., Hansen, J. M., and Bonman, J. M and Bonman, M. (2012). Pathogenic and genetic diversity of *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* in North Dakota. Phytopathology 102 (4):390-402.

2- Alabdalla, N., F. Valentini., C. Mortti., S. Essa., R. Buonaurio and M. Abu-Ghorra. (2009). First report of *Pseudomonas savastanoi* pv.*savastanoi* causing olive knot in Syria. Plant Pathology 58:1170-1170.

3- Asgaranil, E., Ghashghaei, T., Soudi, M. R. and N. Alimadadi, (2015). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) PCR based genetic diversity of *Xanthomonas* spp. and its relation to xanthan production. Iran. J. microbiol. 7 (1):38-44.

4- Baratta, B. and Marco, L. (1981). Control of olive knot attacks on cultivar Nocellara del Belice. Informatore Fitopatologico. 31: 115-116.

5- Besenyei, E. and Hevesi, M. (2003). Characterization of the *Pseudomonas savastanoi* pv. *forthiae*. Nov.- a novel pathovar of knot disease bacterium. European Journal of Plant Pathology. 139 : 123-128.

6- Civantos López-Villalta. (1999). Olive Pest and Disease Management. International Olive Oil Council, Madrid.

7- Comai, L. and T. Kosuge. (1982). Cloning and characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. Journal of Bacteriology 149: 40-46.

8- Connell, J. H. (1994). History and scope for the olive industry. In: Ferguson L, Sibbett GS, Martin GC, eds. Olive Production Manual. Publication No. 3353. Oakland, CA, USA: University of California, Division of Agriculture and National Resources, P.1–9.

9- De Bruijn, f.,j., Rademaker,J., Schneider, M., Rossbach,U., Louws, F,.J.(1996). Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associanted bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses in: Biology of plant- microbe interaction; proceeding of the 8th inernational congress of molecular plant-

microbe interaction (G. Stacey, B. Mullin and P.Gresshoff, Eds.) APS Press 497-502

10- Ercolani, G. L. (1971). Occurrence of *Pseudomonas savastanoi* (E. F.Smith) Satevens as an epiphyte of olive trees in Puglia .Phytopathologia Mediterranea. 10: 130-132.

11- Ercolani, G.L. (1991). Distribution of epiphytic bacteria on olive leaves and the influence of leaf age and sampling time. Microb Ecol. 21: 35-48.

12- Ferreira-Tonin, M., Rodrigues-Neto, J., Harakava, R and Destefano, S.A.L.(2012). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* based on partial rpoB gene sequences and species differentiation by PCR-RFLP. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 62:(2) 1419–1424.

13- Garcia, A.A.F., Benchimol, L. L., Barbosa,A.M.M., Geraldi, O.I., Souza Jr, C.L and de Souza, A.p. (2004). Comparison of RAPD, RFLP, AFLP and SSR markers for diversity studies in tropical maize inbred lines. Genetics and Molecular Biology. 27(4): 579-588.

14- Gardan, L., David, C.,Morel, M., Glickmann, E., Abo-Ghorrah, M., Pett, A. and Dessaux, Y. (1992). Evidence for a correlation between auxin production and host plant species among strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. Applied and Environmental Microbiology. 58: 1780-1783.

15- Garrity, G. M.; D. J. Brenner; N. R. Krieg; J. T. Staley, (2005). Bergey´s manual of systematic bacteriology, 2nd ed., springer veralge, NY, Volum two, part B, P: 372-373.

16- Ghazi, F., Benmechernene, Z., Kihal, M and Gurakan, G.C.(2013). The reproducibility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) profiles of Streptococcus thermophilus strains with XD9, M13 and OPI-02 MOD primers. African Journal of Biotechnology. Vol. 12(44). 6245-6252.

17- Glickmann. E**.,** Gardan. L**.,** J.sylvie**.,** H.shafik., E.miena., P.annik.,D.yves. (1998). Axin production is a common feature of most pathovars of

Pseudomonas syringae. The american Phytopathological Society. Vol. 2,No 11. P: 156-162.

18- Graniti, A. (1990). Plant diseases in the Mediterranean region. Phytoparasitica. 18: 57-65.

19- Hewitt, W. B. (1938). Leaf-scar infection in reaction to the olive disease. Hilgardia. 12: 41-65.

20- Holt, J. G., N. R. Krieg and P. A. P. Sneath. (1994). Bergey's manual of determinative bacteriology.9th Ed, Williams and Wilkins Pub, Baltimore.

21- Iacobellis, N. S., Contesini, A. M., and Surico, G. (1995). Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* .Phytopathologia Mediterranea. 34: 15-22.

22- Janse, J. D. (1982). *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* (ex Smith) subsp. Nov., nom. Rev., the Bacterium causing excrescences on *Oleaceae* and *Nerium oleander* L. International Journal of Systematic Bacteriology. 32 (2): 166-169.

23- Janse, J. D., (1981). The bacterial disease of ash (*Fraxinus excelsior*), caused by *Psudomonas syringae* subsp. *savastanoi* pv. fraxini,(Histology, occurrence and symptoms). Sonderdruck aus European Journal of Forest Pathology 5: 306-315.

24- Kaluzana,M., P,Ferannante., P,Sobiczews, and M, Schortichini. (2010). Characterization and Genetic Diversity Of *Pseudomonas syringae* from stone fruits and hazelnut using repetitive- PCR and MLST. Journal of plant pathology (3):781-787.

25- Keshtkar A. R., Khodakaramian G. and Rouhrazi K. (2016). Isolation and characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* which induce leaf spot on walnut. European Journal of Plant Pathology.146(4): 837–846

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

27- Krid, S., Rhouma, A., Gargouri, A. (2008). Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains by RAPD, BOX-PCR and rep-PCR. IN; Symposium international sur la protection integree de l olivir, Sousse, Tunisie 25-27 Nov. 2008, p: 24.

28- Krueger, W. H., Teviotdale, B. L. and Shcorth, M. N. (1999). Improvements in the control of olive knot disease. Acta Horticulture. 474: 567-571.

29- Lelliott, R. A.; E. Billing; and A. C. Hayward, (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. J. Appl. Bacteriol 29: 470–489.

30- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., and de Bruijn, F. J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology.60(7):2286-2295.

31- Little E.L., Bostock R.M., Kirkpatrick B.C., 1998. Genetic characterization of Pseudomonas syringae pv. syringae strains from stone fruits in California. Applied and Environmental Microbiology 64: 3818-3823

32- Marchi, G., Mori, B., Pollacci, P., Mencuccini, M. and Surico, G. (2009). Systemic spread of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* inolive explants. Plant Pathology. 58: 152-158.

33- 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.

34- Matas,I,M., I, P,Martinez., I,M,Quseada., J,J,Redriguez., R.penylver and Cayo Romos.(2008). *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* contains two iaal paralogs, one of which exhabits a variable number of a Trinucleotide (TAC) tandrm repeat. Applied and Environmental Microbiology.p:1030- 1035.

35- Mirik, M. Y, Aysan, and F. Sahin.(2011). Characterizations of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isaolated from several host plants in turkey and report of fontanesia as a new host. journal of Plant pathology. 93(2), p: 263-270.

36- Mourad,., Fadhil, K., Chahinez, M., Meriem, R., Philipe, L. and Abdelkader, B. (2009). Characterization of small and medium bacteriocins produced by *Rhizobium* sp. Strains ORN 83 and ORN 24 against *Pseudomonas savastanoi* strain CFBP 2074, the causative agent of olive knot disease in Algera. In: Proceedings of the 2 ed international e-conference on agricultural bio science, LeCAB. Pp: 15-17.

37- Mueller, U.G. and Wolfenbarger, L.L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. Trends in Ecology & Evolution. 14(10):389-394.

38- Mugnai, L., Giovannetti, L., Ventura, S. and Surico, G. (1994). The grouping of strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* by DNA restriction fingerprinting. Journal of Phytopathology. 142: 209-218.

39- Najafi Pour G., and Taghavi S. M. (2011). Comparison of *P. syringae* pv. *syringae* from Different Hosts Based on Pathogenicity and BOX-PCR in Iran. J. Agr. Sci. Tech. 13: 431-442

40- Nei, M and Li, W-H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Genetics.76(10):5269-5273.

41- Ogawa, J. M. and English, H. (1991). Olive knot. In: Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops, Publ. 3345, Division of Agriculture and Natural Resources, University of Califorina, Oakland. Pp: 341-344.

42- Osman, W. A., Tarabeih, A. M., Michail, S. H., (1980). Studies on olive knot disease in Iraq with reference to response of different cultivars. Mesopotamia journal of agriculture. 15: 245-261

43- Palm, C. J., Gaffney, T. and Kosuge, T. (1989). Cotranscription of genes encoding indoleacetic acid production in *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* . Journal of Bacteriology. 171: 1002-1009.

44- Patten, C. L. and B. R. Glick. (2002). Role of *Pseudomonas putida* indole acetic acid in development of the host plant root system. Applied and Environmental Microbiology. 68(8): 3795–3801.

45- Penyalver, R., Garcia A., Ferrer A., Bertolini,E, and Lopez, M.M. (2000). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. Appl Environ Microbial 66: 2673-2677

46- Penyalver, R., Garcia A., Ferrer A., Bertolini, E., Quesadaj, J. M.,Salcedo C.I., piquer J., Perez-pandes J., Carbonell E.A., Delrio C.,Caballero J.M., and Lopez, M.M., (2006). Factors affecting *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plant inoculation and their usefor evaluation of olive cultivar susceptibility. Phytopathology . 96: 313-319.

47- Pérez-Martínez, I., Zhao, Y., Murillo, J., Sundin, G. W. And Ramos, C. (2008). Global genomic analysis of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* plasmids. Journal of Bacteriology. 190: 625-635.

48- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalasky A (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Molecular breeding. 2(3):225–238.

49- Quesada, J. M., Penyalver, R., Pérez-Panadés, J., Salcedo, C. L., Carbonell, E. A. and López, M. M. (2010). Dissemination of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations and subsequent appearance of olive knot disease. Plant Pathology. 59: 262-269.

50- Raczkowska-Blach, E., H. Rozycki, E. Strzelczyk, A. Pokojska. (1995). Decomposition of indole acetic acid IAA in soil and by bacterial strains isolated from soil and from root zone of Scots pine. Microbiological Research. 150(3): 265-270.

51- Rademaker, J. L.W., louws, F.J., Schultz, M.H., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J., and de Bruijn, F.J. (2005). A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. Phytopathology. 95(9):1098-111.

52- Rademaker, J.L.W., Hoste, B., louws, F.J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P and de Bruijn, F.J.(2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA–DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50(2):665–677.

53- Reetha, S., G. Bhuvaneswari, P. Thamizhiniyan and T. RaviMycin. (2014). Isolation of indole acetic acid (IAA) producing rhizobacteria of *Pseudomonas fluorescence* and *Bacillus subtilis* and enhance growth of onion (Allimcepa.L). International Joutnal of Current Microbiology and Applied Sciences. 3(2): 568-574.

54- Rokni- Zadeh, H., Khavazi, K., Asgharzadeh, A., Hosseini-Mazinani, M. and De-Mot, R. (2008). Bio control of *Pseudomonas savastanoi* causative agent of olive knot disease: antagonistic potential of nonpathogenic rhizosphere isolates of *Pseudomonas fluorenscens*. Comm.Appl. Biol. Sci, Ghent University. 73: 199-203.

55- Saad, A. T. And L. Hanna, (2002). Two new hosts of *Pseudomonas savastanoi* and variability in strains isolated from different hosts Phytopathology. 92: s 71.

56- Schaad, N. W., Jones, J. B. and Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.3rd ed. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN.

57- Schroth, M. N., Hilderbranda, D. C. and Oreilly, H. J. (1968). Off-flavor of olives from trees with olive knot tumeros. Phytopathology. 58: 524-525.

58- Schroth, M. N., Osgood, J. W. and Miller, T. D. (1973). Quantitative assessment of the effect of the olive knot disease on olive yield and quality. Phytopathology. 63: 1064-1065.

59- Scortchini, M., M, P, Rossi., and M, Salerno. (2004) Relationship of genetic structure of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* populations from Italian olive trees and patterns of host genetic diversity.journal of Plant pathology.553, p: 491- 497.

60- Sisto, A. Cipriani,M.G. and Morea, M. (2004). Knot formation caused by *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* on olive plants is hrpdependent. Phytopathology. 94: 484-489.

61- Sisto, A., Morea, M., Baruzzi, F. and Palumbo, G. (2002). Differentiation of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* strains isolated from various host plants by restriction fragment length polymorphism. Phytopathologia Mediterranea. 41: 63-71.

62- Sisto, A. Cipriani, M. G., Telgli, S., Cerboneschi, M., Stea, G. and Santilli, E. (2007). Genitic characterization by fluorescent AFLP of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated from different host species. Plant Pathology. 56: 366-372.

63- Smith, C. O. (1928). Oleander bacteriosis in California. Phytopathology. 18: 503-518.

64- Stevens, F. L.(1913). The fungi which cause plant disease. Marcmillan Co, New York.776 pp.

65- Surico, G. (1977). Histological observation on tumerus of olive knot. Phytopathlogia Mediterranea. 16: 109-125.

66- Surico, G. and Iacobellis, N. S. (1992). Phytohormone and olive knot disease. In: Verma DPS, ed. Molecular Signals in Plant Microbe Communications. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 209-229.

67- Suslow, T. V., Schrot, H. M. N. and Isaka, M. (1982). Application of rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology. 72: 917-918.

68- Temsah, M., Hanna, L. and Saad, A. T. (2007). Anatomical observation of *Pseudomonas savastanoi* on *Rhamnus alaternus*. For. Path. 37: 64-72.

69- Teviotdale, B. L. and Krueger, W. H. (2004). Effects of timing of copper sprays, defoliation, rainfall, and inoculum concentration on incidence of olive knot disease. Plant Disease. 88 (2): 131-135.

70- Tien, T. M., M. H. Gaskins and D. H. Hubbell. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). Applied and Enviromental Microbiology. 37(5): 1016-1024.

71- Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F.J and Lupski, J.R .(1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. Methods in molecular and cellular biolgy. 5(1):25-40.

72- Wells, J. M., Casano, F. J. and Surico, G. (1991). Fatty acid composition of Pseudomonas syringae pv. savastanoi. Journal of Phytopathology. 133: 152-162.

73- Wieser, M and Busse, H-J. (2000). Rapid identification of Staphylococcus epidermidis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50(3):1087-1093.

74- Wilson, E. E. (1935). The olive knot disease: Its conception, development, and control. Hilgardia. 4: 233-257.

75- Wilson, E. E., Heskett, M. G., Johanson, M. L. and Kosuge, T. (1972). Metabolic behaviour of *Pseudomonas savastanoi* isolates from olive and oleander on certain carbohydrates and amino substrates. Phytopathology. 62: 350-355.

76- Yamakawa, T., O. Kurahashi, K. Ishida, S. Kato, T. Kodama and Y. Minoda. (1979). Stability of indole-3 acetic acid to autoclaving, aeration and light illumination. Agricultural and Biological Chemistry. 43(4): 879-880.

77- Young, J. M., Dyet, D. W., Bradbury, J. F., Panagopoulos, C. G. and Robrs, C. F. (1978). A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. New Zealand Journal of Agricultural Research. 21: 153-177.

78- Young, J. M., Saddler, G. S., Takikawa, Y., Deboer, S. H., Vauterin, L., Gardan, L., Gvozdyak, R. I. and Stead, D. E. (1996). Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. Review of Plant Pathology. 75: 721-63.

79- Young, J. M., Wilkie, J. P., Fletcher, M. J., Park, D. C., Pennycook, S., Triggs, C. M. and Watson D. R. W. (2004). Relative tolerance of nine olive cultivars to Pseudomonas savastanoi causing bacterial knot disease. Phytopathology Mediterranea. 43: 395-402.