الكشف عن بكتيريا *Xylella fastidiosa* في المنطقة الوسطى من سورية بطريقة الوميض المناعي(IFA)

صبا المسطي[1] أ. د. حسن خليل[2]

الملخص

تعد بكتيريا *Xylella fastidiosa* أكثر مسببات أمراض النبات أهمية , فلذلك هدف البحث إلى الكشف عن هذه البكتيريا التي تسبب العديد من الأمراض وذلك في المنطقة الوسطى من سورية بطريقة الوميض المناعي (Immunofluorescence assay)(IFA), نفذت الجولات الحقلية في محافظتي حمص وحماه خلال أعوام (2019-2022), وجمعت العينات النباتية من عدة عوائل نباتية (الزيتون-الكرمة-اللوز) والتي تتشابه أعراضها المرضية مع أعراض بكتيريا *X. fastidiosa* النموذجية . تم تحليل العينات النباتية بطريقة الوميض المناعي في مخبر وقاية النبات التابع لوزارة الزراعة بدمشق. أظهرت نتائج البحث عدم وجود هذه البكتيريا في المنطقة الوسطى من سورية حيث كانت جميع النتائج سلبية.

الكلمات المفتاحية: *Xylella fastidiosa*, الوميض المناعي Immunofluorescence assay (IFA) , سورية, الزيتون, اللوز , الكرمة.

[1]طالبة ماجستير في قسم وقاية النبات – كلية الزراعة- جامعة البعث.

[2]أستاذ في قسم وقاية النبات – كلية الزراعة- جامعة البعث.

Detection of Bacteria *Xylella fastidiosa* in the Middle Region of Syria by Immunofluorescence assay method(IFA)

seba almsty[(1)] **Hasan Khilil[(2)]**

(abstract)

Xylella fastidiosa is the most important plant. therefore, the research aimed to detect the bacteria *X. fastidiosa* that cause many diseases in the middle region of Syria by immunofluorescence assay(IFA) method. Surveys were carried out in the governorates of Homs and Hama during the 2019-2022 years. Plant samples were collected from several cultivated plants (olive-grapevine-almond)which demonstrated symptoms are similar to those of *X.fastidiosa*. The samples were analysed at the plant protection laboratory in Damascus. The results of the research showed the absence of bacteria in the tested samples.

KeyWords: *Xylella fastidiosa*, Immunofluorescence assay (IFA) ,Syria , olive, grapevine, almond.

[(1)]Master student, Dep. Plant Protection, Facutly of Agriculture,Al-Baath University.

[(2)] Prof ,Dep. Plant Protection, Facutly of Agriculture,Al-Baath University .

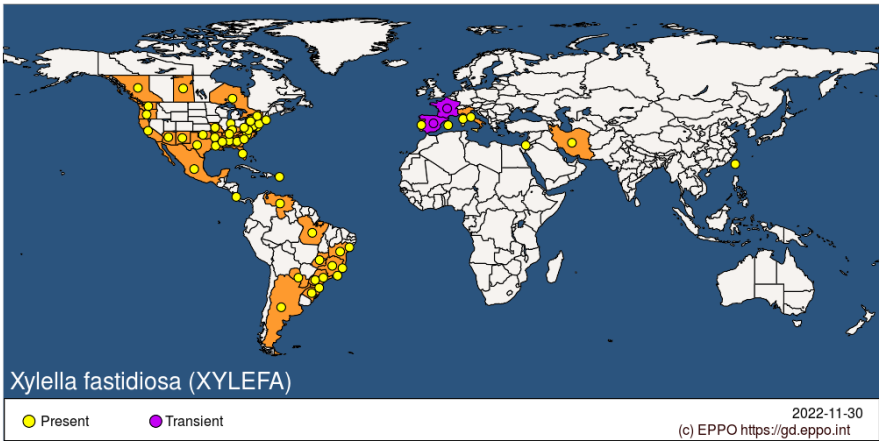
1-المقدمة والدراسة المرجعية

تشكل مسببات الأمراض النباتية تهديداً كبيراً للإنتاج الزراعي والغابات حيث تسبب أضراراً اقتصادية وبيئية مهمة [16]. تتفاقم هذه الأضرار أكثر مع تغير المناخ العالمي والذي يسهل ظهورها وسرعة انتشارها [8]. ومن هذا المسببات بكتيريا *X. fastidiosa*(Wells1978) حيث كان عدد الدراسات المنشورة حول هذه البكتيريا أقل بكثير مقارنة بمسببات الأمراض الأخرى مثل أنواع *Erwinia amylovora* (Burrill 1882) أو *Clavibacter xyli* (Davis1984) من الممرضين الآخرين حتى عام 2000 [25]. ثم أصبحت بكتيريا *X. fastidiosa* من أكثر مسببات أمراض النبات أهمية والتي ظهرت مؤخراً في جميع أنحاء العالم [2]. وقد تم إجراء دراسة جديدة حول احتمالية غزو هذه البكتيريا للشرق الأوسط وشمال أفريقيا وتم تحديد البلدان الأكثر عرضة لغزوها بشكل أساسي في منطقة حوض البحر المتوسط ولاسيما تركيا واليونان والمغرب وتونس بأعلى نسبة ولبنان بدرجة عالية بينما سورية بدرجة متوسطة [19]. كما تشير التوقعات المناخية إلى أنّ خطر تفشي البكتيريا سيزداد حتى عام 2100 [20] .

كان يعتقد سابقاً حتى عام 1973 أن العامل المسبب لمرض بيرس على الكرمة في كاليفورنيا هو فيروس [23,20], وقد تم التأكيد في عام 1987 تمّ التأكيد على أنّ المسبب هو بكتيريا, حيث تم تصنيفها وتسميتها ببكتيريا *X. fastidiosa* [35].

أظهرت الدراسات الأخيرة إصابة حوالي 638 عائل نباتي بهذه البكتيريا وبعضها لا يظهر أعراض [10]. ومن المعروف أنّها تسببت بالكثير من الأمراض مثل احتراق أوراق الدفلة، والشحوب اليخضوري على الحمضيات في البرازيل، ومرض التدهور السريع على الزيتون في أوروبا[4].

أدى تفشي مرض التدهور السريع على الزيتون في إيطاليا إلى تهديد هائل للزراعة الأوروبية [33]. وفي عام 2014 عزل الممرض من أشجار اللوز في إيران, مما يدل على أنه يتجه نحو آسيا [3], ويوجد تقارير للمنظمة الأوروبية لوقاية النبات European Plant Protection Organization عن وجود البكتيريا في تركيا [14,21]، وفي لبنان [22,34] ولكنها غير مؤكدة [13] وكما ذكرت EPPO وجود البكتيريا في فلسطين المحتلة [15] كما في (الشكل 1).



الشكل 1: خريطة الانتشار العالمي للبكتيريا *X. fastidiosa* (EPPO, 2022).

تصيب بكتيريا *X. fastidiosa* شبكة الأوعية الخشبية للنبات, حيث تتحرك البكتيريا صعوداً وهبوطاً [27,1]، كما تعيق حركة الماء في الأوعية الخشبية, وتزداد أعداد الأوعية المغلقة بتطور أعراض المرض [29].

بشكل عام, تسبب بكتيريا *X. fastidiosa* أعراض احتراق الأوراق, الذبول, تساقط الأوراق قبل الأوان, الشحوب اليخضوري أو التلون البرونزي على محيط الأوراق, والتقزّم، وعادة يكون شحوب الأوراق مترافقاً مع اصفرار واضح بين الأنسجة السليمة والنكرزة, كما تؤدي الإصابة إلى تخشب غير منتظم على الساق, وتقليل الإنتاج, وانخفاض القيمة

التسويقية للثمار. وتظهر الأعراض بدايةً على عدد قليل من الفروع ثم تنتشر لتشمل النبات بأكمله، وتؤدي الإصابة الشديدة إلى موت النباتات المصابة [24].

تعد جميع الحشرات الثاقبة الماصة التي تتغذى على نسيج الخشب نواقل محتملة لهذه البكتيريا, ولكن جميع النواقل المعروفة تتبع لرتبة Homoptera ولفصيلة Cercopidae وCicadellidae [31]. وتعّد مواد التطعيم طريقة فعّالة لانتقال البكتيريا [32].

يمكن الكشف عن البكتيريا *X. fastidiosa* في العوائل النباتية عن طريق الأعراض النموذجية, أو العزل على مستنبتات غذائية متخصصة [5]. ويمكن الكشف عنها بطريقة الوميض المناعي (Immunofluorescence assay) (IFA) [11]. وكما تعد طريقة اختبار الادمصاص المناعي المرتبط بالأنزيم ELISA (Enzyme– Linked Immunosorbent Assay) ذات كفاءة عالية في الكشف عن بكتريا *X. fastidiosa* [13], بالإضافة لذلك يتم الكشف عنها بتقنية التفاعل البوليميري المتسلسلPolymerase Chain Reaction (PCR) [9].

2- مبررات وهدف البحث

نظراً لخطورة بكتيريا *X. fastidiosa*، ولعدم وجود أي دراسة حولها في سورية تثبت أو تنفي وجودها، بالإضافة للتوجه والاهتمام العالمي الكبير بهذه البكتيريا والخوف من تزايد انتشارها، واستناداً إلى الجولات الميدانية الاستطلاعية التّي قمنا بها فقد هدف هذا البحث إلى الكشف عن وجود بكتيريا *X. fastidiosa* المُسبّبة للعديد من الأمراض على العديد من العوائل النباتية في المنطقة الوسطى من سورية، بطريقة الوميض المناعي(IFA) كون هذه البكتيريا غير مسجلة في سورية سابقاً.

3- مواد وطرائق البحث

3-1-الجولات الحقلية وجمع العينات: أخذت عينة أغصان من أربع مناطق من نفس الشجرة وفق [17]. تم جمع 21 عينة من العوائل النباتية (العنب- اللوز- الزيتون) بتاريخ 2021/8/16، وهي أغصان تظهر أعراض شبيهة بالأعراض النموذجية للإصابة ببكتريا *X. fastidiosa* وذلك من مناطق (الشتاية- الهزة- العادلية-عيفير- الناصرية-الجابرية-سكرى- أبودالي) في محافظة حمص. وبعد ذلك جمعت أربع عينات(زيتون) من محافظة حماه (دير شميل- اللقبة- الزاوي- القريات) بتاريخ 12/15/ 2021، وتم جمع نباتات سليمة كشاهد، وأرفقت العينات بالمعلومات الخاصة بكل عينة.

3-2- الكشف عن البكتيريا *X. fastidiosa* بطريقة الوميض المناعي (IFA):

تم تحليل العينات في مخبر وقاية النبات التابع لوزارة الزراعة في دمشق حسب برتوكول الوميض المناعي ((Protocol for Immunofluorescence assay(IFA) برتوكول من شركة LOEWE ألمانيا وفق الخطوات التالية:

1- تجهيز العينة النباتية: أخذت 10-8 أوراق كل من العينات النباتية(اللوز و العنب والزيتون) وتم تقطعيها لقطع صغيرة وبعد ذلك تم نقعها ووضعها ضمن عبوة سعة 50 مل تحوي محلول (IF-Buffer) المكون من [10 mM phosphate buffered saline (PBS),pH 7.2] والمعقم بالأوتوغلاف على درجة حرارة 121ºC لمدة 15دقيقة ، ولمدة 24ساعة على درجة حرارة 6-4 درجة وبعدها تم ترقيم العبوات بحيث تأخذ كل عبوة نفس رقم العينة .

2-استخلاص البكتيريا: تم أخذ 40 مل من كل عبوة ووضعه ضمن أنانبيب سعة 50مل، ووضع ضمن جهاز التثقيل. وتم عملية تثقيل أول بسرعة 2000 دورة /دقيقة

لمدة 5 دقائق. ثم يؤخذ 20 مل من كل عبوة، وجرى تثفيل ثاني بسرعة 8000 دورة/ دقيقة لمدة 30 دقيقة, بعد ذلك تم وضع 20 ميكرون من كل عينة ضمن حفرة الشريحة.

3- تحضير الأمصال: وفق الخطوات التالية:

(1)- تم تحضير محلول (IF-Buffer) و(IF-Buffer Tween) وفق الكيت وتعقيمه بالاتوغلاف على درجة حرارة 121 س لمدة 15دقيقة.

(2)- تم تحضير الشاهد الايجابي (antisera): نأخذ 5 ميكرون من الشاهد الإيجابي وتوضع ضمن أنبوب زجاجي وأضيف ل 5 مل أو(5000) ميكرون من محلول (IF-Buffer) و تكون نسبة (1/1000).

(3) - تم تحضير المصل المضاد (secondary antibody): حيث تم تحضير تركيزين الأول بتركيز 50 والثاني بتركيز 200 أي بنسبة 1:50 - 1:200 بحيث نأخذ أنبوبين سعة 1مل أي (1000ميكرون) من محلول (IF-Buffer) ونضيف للأول 5 ميكرون والثاني 20 ميكرون من المصل المضاد .

(4)-تحضير فوسفات الغليسرول المعدل [Phosphate buffered glycer;

ol(cover solution),pH 7.6]).

4 - تطبيق الأمصال على العينة:

(1) تطبيق المصل الأول(antiserum): تم وضع 20 ميكرولتر على كل فتحة من الشريحة ثم حضنت ضمن جو رطب لمدة 30 دقيقة على حرارة الغرفة وتم العمل بالقرب من اللهب , وغسلت الشرائح بمحلول(IF-Buffer -Tween), وبمحلول(IF-

Bufferلمدة 7دقائق. ثم شطفت بالماء المقطر مرتين ثم تجفف على درجة حرارة 37 س بوساطة المجففة.

(2) تطبيق المصل الثاني(secondary antibody): تم وضع 20 ميكرولتر بكل فتحة من الشريحة ثم حضنت الشرائح في الظلام ضمن جو رطب لمدة 30 دقيقة على حرارة الغرفة, وغسلت الشرائح بمحلول(IF–Buffer –Tween), وبمحلول(IF–Buffer) لمدة 7 دقائق. ثم شطفت بالماء المقطر مرتين ثم جففت على درجة حرارة 37 س.

5–الفحص أو التقييم (Evaluation): تم وضع 10–5 ميكرولتر من محلول غليسرول الفوسفات المعدل بكل حفرة , ثم تم فحص الشرائح الموجودة على المجهر ,قوة التكبير: (1000–400) زيت الأرز ضروري للفحص.

تمت عملية الفحص بالمجهر الإلكتروني المزود بوحدة الإنارة بالأشعة فوق البنفسجية باستخدام العدسة الزيتية الغاطسة بعد وضع زيت الأرز على قوة تكبير(10×100) حيث تم العمل ضمن غرفة مغلقة لتجنب التعرض للضوء.

4–النتائج والمناقشة

الأعراض على الزيتون : لوحظت أعراض احتراق حواف أوراق الزيتون الحديثة في عام 2019 في نهاية شهر تشرين الثاني وبداية شهر كانون الأول ويرافقها من الداخل لون اصفر والتفاف أوراق الزيتون نحو الداخل و ومن ثم جفاف الأفرع على الأشجار بشكل كامل في محافظة حمص وحماه الشكل (2) وهذا يتوافق مع دراسة في عام2013 ذكر فيها بأنّه لا يستبعد بأن يكون تدهور الزيتون وموته هو نتيجة عدوى فطرية أو بكتيرية مختلفة [6], قد تكون أحد أنواع فطور التابعة Botryosphaeriaceae

بالإضافة لفطر *Phaeocremonium* sp. من العوامل التي أسهمت في موت وتدهور الزيتون في جنوب إفريقيا [7].

الشكل2: أعراض احتراق الأوراق على الزيتون.

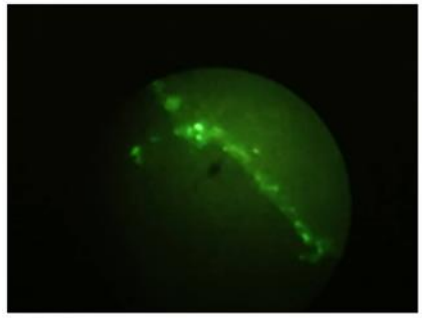
الأعراض على العنب: لوحظت أعراض بداية تلون الأوراق الفتية في بعض كروم العنب في بعض المناطق في نهاية شهر أيار وبداية شهر حزيران عام 2019 من حواف الورقة باتجاه الداخل وعلى فرع ثم انتشرت على كامل النبات وعلى أصناف أخرى ظهر احتراق حواف ومحاطة من الداخل بهالة صفراء ويتجه نحو الداخل وموت الأوراق من الفروع الحديثة نحو الأقدم بالإضافة لملاحظة أعراض النضج غير المنتظم على بعض الفروع في محافظة حمص الشكل (3), وقد يعزى هذا إلى الخلط بين أعراض الأوراق المصابة بمرض بيرس وبين والأمراض الفطرية الأخرى و لاسيما Rotberrner, وهو مرض فطري يصيب كروم العنب مسببه (*Pseudopezicula tracheiphila*) (Korf 1986) [30].

الشكل 3: أعراض احتراق الأوراق على العنب.

نبات اللوز : ظهرت أعراض احترق حواف أوراق اللوز في منتصف شهر تموز في عام 2019 بينما ظهرت هذه الأعراض في بداية شهر تموز في عام 2021 واشتدت الإصابة في منتصف تموز وأدت في النهاية إلى يباس و تساقط أوراق الأشجار وتعري بعض الأشجار من أعلى إلى الأسفل في منتصف شهر آب من نفس العام وبدرجات متفاوتة في بعض الحقول, وقد يكون ظهور أعراض حرق الأوراق اللوز المفاجئ بسبب زيادة الاملاح وحرق الكلوريد[28]. ظهرت هذه الأعراض في بساتين ريف حمص الشرقي الشكل(4).

الشكل 4: أعراض احتراق على أوراق اللوز.

بينت جميع نتائج الاختبار الذي أجري على العينات النباتية المختبرة عدم وجود البكتيريا ضمنها وذلك بعد مقارنتها بالشاهد الإيجابي الشكل(5).



الشكل 5: نتائج الكشف السلبية عن بكتيريا *X.fastidiosa* ضمن العينة النباتية.

يعزى عدم وجود البكتيريا في العينات النباتية لوجود مسببات مرضية أخرى إذ يمكن الخلط بين هذه الأعراض التي تسببها البكتيريا وبين الأعراض التي تسببها عوامل بيولوجية أو غير إحيائية أخرى (العوامل الممرضة الأخرى, الإجهاد البيئي, خلل التوازن المائي, زيادة الأملاح, ملوثات الهواء, مشاكل التغذية, لفحة الشمس وغيرها) [30].

5-الخاتمة

بالرغم من أن نتائج البحث أظهرت عدم وجود بكتيريا في العينات المدروسة إلا أن هذه النتيجة محددة بالمكان والزمان المذكورين وبدقة IFA وان هناك تشابه كبير بين أعراض بكتيريا *X.fastidiosa* النموذجية وأعراض مسببات مرضية أخرى بحاجة إلى التوسع في دراستها وتحديدها بدقة, حيث ليست كل أعراض احتراق تظهر على الأوراق هي أعراض بكتيريا*X. fastidiosa* .

المراجعReferences

1. Almeida, R.P.P., Pereira, E.F., Purcell, A.H. and Lopes, J.R.S. 2001- **Multiplication and movement of a citrus strain of *Xylella fastidiosa* within sweet orange**. Plant Disease, 85, 382–386.
2. Almeida,R.P.P., and Nunney,L., 2015-**How do plant disease caused by *Xylella fastidiosa* emerge?,**Plant disease. 99:1457-1467.
3. Amanifar,N., Taghavi, M., Salehi,M., 2016- ***Xylella fastidiosa* from almond in Iran: overwinter recovery and effects of antibiotics,** Phytopathology Mediterr, 55 : 337-345
4. Baldi, P. and La Porta, N., 2017- ***Xylella fastidiosa*: host range and advance in molecular identification Techniques**. Frontiers in Plant Science, 8, 22.
5. Camanharo,J.C., Lemos,M.V .F., Gertrudes,E. Lemos, E. G. D., 2003- **Growth optimization Procedures for the Phytopathogen *Xylella fastidiosa***. Current Microbiology, (46): 99–102.
6. *Carlucci, A., Raimondo, M. L., Cibelli, F., Phillips, A. J. L., & Lops, F., 2013- **Pleurostomophora richardsiae, Neofusicoccum parvum and Phaeoacremonium aleophilum associated with a decline of olives in***

southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea, 52, 517–527.*

7. Carlucci ,A., Lops, F,. Cibelli ,F., and Raimondo,M.L., 2020– ***Phaeoacremonium*** **species associated with olive wilt and decline in southern Italy**. Eurthology Journal Plant Pathology.
8. Chakraborty, S., Newton, A.C., 2011– **Climate change, plant diseases and food security**. Plant Pathology. 60, 2–14.
9. Chen ,C., Bock,H.C., and Brannen,M.P., 2019– **Novel primers and sampling for for PCR detection *Xylella fastidiosa* of in Peach**. Phytopathology 109: 307–317.
10. EFSA (European Food Safety Authority), DELBIANCO, A, Gibin, D, Pasinto, L & Morelli, M., 2022– **Scientific report on the update of the *Xylella* spp. host plant database– systematic literature search up to 30 June 2021**. EFSA Journal, 20(1):7039, 67.
11. EPPO, 2009– **PM 7/97 (1): Indirect immunofluorescence test for plant pathogenic bacteria**. EPPO Bulletin 39, 413–416.
12. EPPO, 2015– **EPPO Reporting Service 2015/181 *Xylella fastidiosa* detected in *Coffea* spp**. plants imported into Switzerland.

13. EPPO, 2018- **EPPO Global Database *Xylella fastidiosa* declaration from Turkey**. https://gd.eppo.int. 15/9/2020

14. EPPO, 2022-**EPPO global database, first report of *Xylella fastidiosa* in Israel,** EPPO reporting service no. 6–2019, num.article:2019/121.

15. FAO ,2018- **The Future of Food and Agriculture—Alternative**.

16. FAO-IPPC-CIHEMA, 2016- **International workshop on *Xylella fastidiosa* & the olive quick decline syndrome(QODS),sampling procedures in Apulia, Franco Valentini**.

17. Frem, M., Chapman, D., Fucilli, V., Choueiri, E., Moujabber ,M,E. , Notte, P,L., and Nigro, F., 2020- ***Xylella fastidiosa* invasion of new countries in Europe, the Middle East and North Africa: Ranking the potential exposure scenarios**. *NeoBiota* 59: 77–97.

18. Goheen,C,A., Nyland,G., Lowe,K,S.,1973- **Association of a rickettsia like organism with Pierce's disease of grapevines and alfalfa dwarf and heat therapy of the disease in grapevines**, *Phytopathology* ,63 341-345.

19. Güldür, M. E., Caglar, B.K., Castellano, M.A., Unlu, L., Guran, S., Yilmaz ,M.A. and Martelli, G.P., 2005. **First**

report of almond leaf scorch in Turkey. Journal of *Plant Pathology*, 87, 246–246.

20. Habib, W., Nigro, F., Gerges, E., Jreijiri, F., Al Masri, Y., El Riachy M., 2016– ***Xylella fastidiosa*** **does not occur in Lebanon** 164(6): 395–403.

21. Hopkins, D. L., and Mollenhauer, H. H., 1973– **Rickettsia–like bacterium associated with Pierce's disease of grapes**. Science 179, 298–300.

22. Janse, J.D., and Obradovic, A., 2010–***Xylella fastidiosa*****: its biology, diagnosis, control and risks**. *Journal of Plant Pathology*, 92,35–48.

23. Lindow S, 2019.**Money Matters:fueling recent insight Into *Xylella fastidiosa* –An important and expanding global Pathogen**. *Phytopathology*, 103:210– 212.

24. Meng, Y., Li, Y., Galvani, C.D., Hao, G., Turner, J.N., Burr, T.J., and Hoch, H.C., 2005– **Upstream migration of *Xylella fastidiosa* via pilus–driven twitching motility**. *Journal of Bacteriology*, 187, 5560–5567.

25. Milliron,L ,. And Niederholzer .,F.,2020– **Almond Leaf Scorch** University of California ,Agriculture and Nutural Resources:http:anrcatalogy.ucdavis.edu.5/12/2020.

26. Newman, K.L., Almeida, R.P.P., Purcell, A.H., and Lindow, S.E., 2003–**Use of a green fluorescent strain for analysis of *Xylella fastidiosa* colonization of *Vitis***

vinifera. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 7319–7327.

27. OEPP/EPPO, 2016., European and Mediterranean Plant Protection Organization/ Organisation Europeenne et Mediterraneenne pour la Protection des Plantes. **PM 7/24 (2) *Xylella fastidiosa***. ISSN 0250-8052.

28. Purcell, A.H. 1999. **General insect Category**. http://www.cnr.berkeley.edu/xylella/geninsct.html.

29. Smith, I.M., McNamara, D.G., Scott, P.R., Holderness, M. and Burger, B., 1997- **Quarantine Pests for Europe (2nd edition)**. CAB International: Wallingford, UK 1425 pp.

30. Strona, G., Carstens, C.J. and Beck, P.S.A., 2017- **Network analysis reveals why *Xylella fastidiosa* will persist in Europe**. Scientific. Report, 77: 7, 71

31. Temsah, M., Hanna, I., and Saad, A., 2015- **First report of *Xylella fastidiosa* associated with oleander leaf scorch in Lebanon**. *Journal of Crop Protection* 4, 131–137.

32. Wells, J.M., Raju, B.C., Hung, H.Y., *et al*. 1987- ***Xylella fastidiosa* gen. nov., sp. nov: gram-negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xanthomonas* spp**. *International Journal of Systematic Bacteriology* ,37: 136-14.