جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم وقاية النبات

توصيف عزلات *Xanthomonas translucens* المسببة لمرض التخطط البكتيري على القمح وتحليل معلوماتي حيوي لمعطياتها الجزيئية

دراسة أُعدّت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية

(قسم وقاية النبات)

اعداد المهندس

إسماعيل الصالح

إشراف

د. عايدة جلول

كلية الهندسة الزراعية – جامعة دمشق

قسم وقاية النبات

2016 – 2017 م

تصريح

أصرح بأن البحث الموصوف في هذه الرسالة تحت عنوان:

" توصيف عزلات *Xanthomonas translucens* المسببة لمرض التخطط البكتيري على القمح وتحليل معلوماتي حيوي لمعطياتها الجزيئية"

لم يسبق أن قدم للحصول على أي درجة جامعية أخرى، وغير مقدم حالياً لذلك، وأن

كل العمل، والنتائج المذكورة هي جهودي الشخصية، وبتوجيه من المشرف العلمي وجميع المراجع التي ذكرت في الرسالة نسبت إلى مصادرها ضمن النص وفي قائمة المراجع.

المرشح

إسماعيل محمد الصالح

Declaration

To whom it may concern: I declare that the present research work entitled:

" **Characterization of *Xanthomonas translucens* isolates which cause bacterial leaf streak of wheat, and bioinformatics analysis of its molecular data**"

Is a new research work, and has neither been already accepted for any degree, nor has been submitted concurrently for any other degree. All the mentioned results are my own efforts and done by direct supervision of my guides, All the referred literature are cited, and well-documented in the list of references.

Candidate

Ismaeel Alsaleh

شهادة

نشهد بأنّ هذا البحث الموصوف في هذه الرسالة:

" توصيف عزلات *Xanthomonas translucens* المسببة لمرض التخطط البكتيري على القمح وتحليل معلوماتي حيوي لمعطياتها الجزيئية"

هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح إسماعيل الصالح بإشراف الدكتورة عايدة جلول من قسم وقاية النبات في كلية الزراعة بجامعة دمشق، وأن المراجع المستخدمة في هذه الرسالة موثقة أصولاً ضمن النص.

المرشح	المشرف العلمي
إسماعيل الصالح	الدكتورة عايدة جلول

Certification

It is hereby certified that the work described in this thesis; " **Characterization of *Xanthomonas translucens* isolates which cause bacterial leaf streak of wheat, and bioinformatics analysis of its molecular data** "

Is the result of scientific research done by candidate Ismaeel Alsaleh under the supervision of Dr. Aïda Jalloul, Plant protection department, Faculty of Agriculture, and any reference to other research works has been duly acknowledged in the text.

Candidate	Supervision
Ismaeel Alsaleh	Dr. Aïda Jalloul

قرار لجنة الحكم

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في قسم وقاية النبات في كلية الزراعة بجامعة دمشق، وأجيزت من قبل السادة أعضاء لجنة الحكم.

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirements for Master Degree in Plant protection, Faculty of Agriculture – Damascus University. The thesis has been approved by referee committee.

نوقشت هذه الرسالة في جلسة علنية في كلية الزراعة بجامعة دمشق بتاريخ 2017/1/31

لجنة الحكم

الدكتور محمود أبو غرة عضواً

الأستاذ المساعد في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة دمشق

الدكتور أنطونيوس الداود عضواً

الباحث في هيئة الطاقة الذرية

الدكتورة عايدة جلول عضواُ مشرفاُ

المدرس في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة دمشق

كلمة شكر

الحمد لله حمداً كثيراً كما ينبغي لجلال وجهه و عظيم سلطانه

أتقدم بوافر الشكر وعظيم الامتنان للدكتورة عايدة جلول لتفضلها بالإشراف على هذا العمل والتي لم تبخل بجهودها العلمية للوصول إلى الغاية المرجوة من هذا البحث.

كما أتقدم بجزيل الشكر للدكتور أنطونيوس الداود و الدكتور محمود أبو غرة أعضاء لجنة الحكم لملاحظاتهما التي أغنت هذا البحث.

فائق الشكر والامتنان لمخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة بإشراف الدكتورة سلام لاوند

للمساعدة الدائمة التي ساهمت في دعم العمل وانجازه بصورة أفضل.

فائق الشكر والتقدير للهيئة العامة للتقانة الحيوية وخاصة قسم التقانات الحيوية الطبية للدعم المقدم لإنجاز البحث بالصورة الأفضل.

الشكر الكبير لكل أولئك الأحبة الذين أحاطني الله بهم ليكونوا دعماً لي في كل شيء

- أمي الغالية وأبي رحمه الله.
- أخوتي الأحبة.
- رفيقة دربي وشريكة حياتي، الغالية على قلبي.
- جميع أصدقائي.

وأخيراً كل الشكر والامتنان لكل من ساعد وساهم وساند لإنجاز هذا البحث.

فهرس المحتويات

العنوان	الصفحة
فهرس الجداول	ا
فهرس الأشكال	ا
الاختصارات Abbreviations	ا
الملخص	ا
المقدمة	1
الدراسة المرجعية	5
المجال العائلي والتوزع الجغرافي	5
أهمية مرض تخطط الأوراق البكتيري على القمح	5
العامل المسبب لمرض تخطط الأوراق البكتيري وتنوّعه الوراثي	6
طرق التصنيف و دراسة التنوع الوراثي للبكتيريا	7
أعراض الإصابة بمرض تخطط الأوراق البكتيري	14
دورة حياة المرض ووبائيته	15
مكافحة مرض تخطط الأوراق البكتيري	17
مبررات البحث	20
أهداف البحث	21
مواد وطرائق البحث	22
مكان إجراء البحث	22
جمع العينات النباتية وعزل البكتيريا	22
تعريف البكتيريا بالطرق الكيميائية و العدوى الاصطناعية	23
استخلاص الـ DNA	23
التعريف الجزيئي	24
تفاعلات البصمة الوراثية rep-PCR	26
تحديد تتابع النيكليوتيدات في الـ 16S rDNA-23S rDNA (ITS)	28
تحليل تتابع النيكليوتيدات وتحديد هوية القطعة	31
النتائج والمناقشة	32
عزل وتعريف بكتيريا *Xanthomonas translucens* بالاختبارات البيوكيميائية والعدوى الاصطناعية	32
التعريف الجزيئي	35
التباين الوراثي لعزلات *Xt*	38
تحليل نتائج البصمة الوراثية rep-PCR ورسم شجرة القرابة الوراثية	43
تحديد تتابع النكليوتيدات لمنطقة ITS	49
تحليل تتابع النيكليوتيدات وتحديد هوية القطعة	50
الاستنتاجـــات	59
التوصيـات	60
المراجع العربية والأجنبية	61
الملحق 1	71
Abstract	72

فهرس الجداول

رقم الجدول	العنوان	رقم الصفحة
1	مساحة وانتاج وغلة القمح القاسي	1
2	مساحة وانتاج وغلة القمح الطري	2
3	الأمراض البكتيرية التي تصيب القمح وأماكن انتشارها في العالم	4
4	جدول تسجيل مرض تخطط الورقة البكتيري على عوائله	5
5	تتابع النكليوتيدات في البادئات المستخدمة	25
6	مكونات تفاعل تحديد التتابع النكليوتيدي Sequencing	29
7	شروط تفاعل تحديد التتابع النكليوتيدي Cycle sequencing	30
8	عزلات *Xanthomonas translucens* ومصدرها من المحافظات السورية	33
9	الأوزان الجزيئية (bp) التقديرية الناتجة في اختبار البصمة الوراثية rep-PCR	42
10	مصفوفة التشابه والتباعد لعزلات *Xt* وانواع *Xanthomonas*	44

فهرس الأشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
1	شجرة القرابة الوراثية لعزلات تابعة لجنس *Xanthomonas* باستخدام برنامجGel compare	11
2	نموذج عن الطريقة المستخدمة في حساب الاوزان الجزيئية التقديرية للحزم المضخمة	28
3	صور توضح اختبار غرام (A) واختبار تحريض التجمد (B)	34
4	بادرات قمح شام 3 بعمر 15 يوم معداة (A) أعراض تشبع بالماء water soaking بعد 48 ساعة من العدوى (B) أعراض اصفرار بعد 96 ساعة من العدوى (C)	34
5	نتائج تفاعلات الـ PCR باستخدام زوج بادئات rpfB	35
6	اختبار تخصصية بادئ (Xt) in silico باستخدام برنامج primer Blast على موقع NCBI	36
7	نتائج الرحلان باستخدام البادئ Xt	37
8	حزم التعددية الشكلية التي ظهرت بالرحلان الكهربائي على هلامة Agarose 1.5 % لنواتج تفاعل تقانات rep-PCR	41
9	شجرات التباعد الوراثي ذات الجذر لعزلات *Xt*	48
10	الحزم الناتجة عن تضخيم منطقة الـ ITS عند *Xt* (1) و*Xcc* Syrian (2)	49
11	تحليل Blastn لقطع الـ ITS عند *Xcc* Syrian والتشابه مع سلالات تتبع أنواع *Xanthomonas*	50
12	مقارنة قطع ITS عند *Xcc* Syrian مقابل ITS عند السلالة *Xcc* 17 (CP011946.1) التي تظهر التطابق التام	51
13	التشابه similarities بين الـ ITS لـ *Xcc* Syrian (هذا العمل) و الـ ITS لسلالات أنواع بكتيرية أخرى من الجنس *Xanthomonas*	57
14	شجرة القرابة الوراثية لبعض الـ ITS عند سلالات أنواع من الجنس *Xanthomonas* باستخدام Clustal X 2.0.8	58

Abbreviations الاختصارات

Abbreviation	Name	Abbreviation	Name
µg	Microgram	Ng	NanoGram
µl	MicroLiter	NJ	Neighbor joining
µM	MicroMolar	Nm	NanoMeter
2,D PAGE	two-dimensional polyacrylamide gel	PFGE	pulse field gel electrophoresis
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism	Pmol	Picomole
ARDRA	Amplified ribosomal DNA restriction analysis	PCR	Polymerase Chain Reaction
AVR	Avirulence genes	*R*	Resistance genes
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA
BLS	Bacterial leaf streak	rDNA	Ribosomal Deoxyribonucleic Acid
Bp	Base Pair	rep-PCR	repetitive PCR
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	REP-PCR	Repetitive Extragenic Palindromic-PCR
ddNTPs	Dideoxynucleotides	RFLP	restriction fragment length polymorphism
DNA	Deoxyribonucleic Acid	RNA	Ribonucleic Acid
dNTPs	Deoxynucleotides	rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic	*rpfB*	regular pathogenicity factor B
ERIC	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus	SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel electrophoresis
ExoSAP	Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase	SNP	Single Nucleotide Polymorphism
FAME	Fatty acid methyl esters	Ssu	small subunit
g	Garm	TBE	Tris base boric acid EDTA
is-PCR	insertion sequence PCR	*Xam*	*Xanthomonas axonopodis pv. manihotis*
ITS	Internal Transcribed Spacer	*Xcc*	*Xanthomonas campestris pv. Campestris*
L	Liter	*Xcm*	*Xanthomonas citri pv. malvacearum*
Mg	MilliGram	*Xcv*	*Xanthomonas campestris pv. vesicatoria*
Ml	Milliliter	*Xt*	*Xanthomonas translucens*
mM	MilliMolar	*Xtt*	*Xanthomonas translucens pv. translucens*
mRNA	Messenger Ribonucleic Acid	*Xtu*	*Xanthomonas translucens pv. undulosa*
NCBI	National Center for Biotechnology Information	UV	Ultra Violet

الملخص

يعدّ مرض تخطط الورقة البكتيري والعصافة السوداء الذي تسببه البكتيريا *Xanthomonas translucens* من أهم الأمراض البكتيرية على القمح في سورية؛ فقد تم عزل 98 عزلة بكتيرية من عينات نباتات نجيلية (قمح، شعير) مجموعة من 15 منطقة في سورية نتج عنها بالغربلة حسب الخصائص المورفولوجية والبيوكيميائية والعدوى الاصطناعية 35 عزلة موافقة لمواصفات *البكتيريا Xt*.

وبتطبيق تقانة Colony- PCR باستخدام زوج بادئات يضخم جزء بوزن جزيئي 1636 bp من مورثة *rpfB* التي تتحكم بانتاج البولي سكاريد عند الجنس *Xanthomonas* على 15 عزلة من العزلات المدروسة الموافقة لمواصفات *Xt* مقارنة مع 3 عزلات تمّ عزلها من النباتات ولم تنتمي إلى *Xt* كشاهد سلبي و3 عينات DNA لسلالات مرجعية تنتمي للجنس *Xanthomonas* (*Xoo, Xam, Xcv*) كشاهد إيجابي، أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة أغاروز 1 % الحزمة ذات الوزن الجزيئي المتوقع 1636 bp في العزلات الموافقة لـ *Xt* والعزلات التابعة ل *Xanthomonas* (الشاهد الإيجابي) بينما لم تظهر الحزمة على العزلات الشاهد السلبي.

وكذلك أُكد انتمائها إلى *Xt* باستخدام زوج بادئات متخصص تم تصميمه خلال هذه الدراسة باستخدام برنامج primer three المتوفر على موقع NCBI واعتمادا على السلاسل المنشورة لمنطقة rDNA (16S-23S)، وقد سمح زوج البادئات المصمم بتضخيم قطعة وزنها الجزيئي 139 bp من منطقة (ITS) عند *Xtu* و*Xtt* ؛ وكنتيجة هذه البادئات يمكن استخدامها في تعريف وتشخيص بكتيريا *Xtu* و*Xtt* في النباتات المصابة والبذور الملوثة.

ولتمييز سلالات *Xtu* عن *Xtt* طبقت تقانات البصمة الوراثية rep-PCR على عزلات الـ DNA للعزلات البكتيرية المدروسة إضافة إلى DNA 6 سلالات بكتيرية تتبع الجنس *Xanthomonas* (*Xcv, Xam, Xcc, Xoo, Xoc, Xcm*) بهدف رسم شجرة القرابة الوراثية وحساب مصفوفة التشابه. حيث أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي لتقانات rep-PCR وجود 88 حزمة مميزة تراوحت أوزانها بين 140-5000 bp، توزعت لـ (34، 30، 24) حزمة للتقانات BOX-PCR، ERIC-PCR والـ REP-PCR على التوالي؛ وكانت هناك الحزم 13 و15' و22' و11" و 13" ذات الأوزان الجزيئية التقريبية (540، 1100، 1870، 1220 و1450 bp) على التوالي مميزة لسلالات *Xt* أو بعضها.

حسبت مصفوفة التشابه لنتائج البصمة الوراثية rep-PCR للعزلات باستخدم برنامج POPGENE 1.32 حسب معادلة Nie (1978) و كانت السلالة *Xcc* أقرب الأنواع البكتيرية لسلالات *Xt بنسبة* تشابه تجاوزت الـ 82 % تلتها السلالة *Xoc* بنسبة تشابه حوالي 65 %، بينما السلالة الأبعد عن سلالات *Xt* كانت سلالة *Xcm* بنسبة تشابه حوالي 52 %.

وتراوحت نسب التشابه بين سلالات *Xt* فيما بينها من 94 % (بين Xt22.1 من جهة وسلالات Xt28, Xt3.1, Xt17) إلى 100 % (Xt4.2 مع Xt7).

كما رسمت شجرات التباعد الوراثي ذات الجذر باستخدام برنامج Treecon 1.3b بطريقة Neighbor joining حسب معادلة Nei وLi (1979) وذلك لكل تقانة من تقانات rep-PCR على حدا ومن ثم لجميعها.

وانقسمت جميع شجرات التباعد الوراثية إلى عنقودين، الأول ضم عزلات *Xt* والآخر ضمّ باقي السلالات التابعة لأنواع *Xanthomonas*، حيث انقسم عنقود *Xt* في شجرة التباعد الوراثي لتقانات البصمة الوراثية rep-PCR إلى تحت عنقودين؛ انقسم تحت العنقود الأول إلى مجموعتين الأولى ضمت عزلة واحدة Xt12.2 وضمت المجموعة الثانية عزلات (Xt24.1, Xt17, Xt28, Xt3.1)، انقسم تحت العنقود الثاني لعزلات *Xt* بدوره إلى مجموعتين أيضا, حوت الأولى عزلة Xt14 ، وانقسمت المجموعة الثانية لفرعين؛ الأول ضمّ (Xt30, Xt26, Xt33) وضم الفرع الثاني عزلات (Xt21, Xt34, Xt10, Xt4.2, Xt7)، وبالتالي تمكنت طريقة البصمة الوراثية المعتمدة على تقانات rep-PCR من تصنيف عزلات *Xt* السورية إلى 6 طرز وراثية متباينة.

أجري تحديد التتابع النكليوتيدي لمنطقة الـ ITS المضخمة بوساطة بادئات 16S rDNA-23S rDNA لعزلة Syrian *Xcc* حيث تمّ الحصول على التتابع لجزئين من الـ ITS، حُددت هوية القطع بوساطة برنامج BLASTn وBlast-2Sequence المتاح على موقع NCBI، وكانت مطابقة لقطعة الـ ITS المقابلة لها في 17 *Xcc* .

تم استخراج عدد من سلاسل الـ ITS المنشورة لسلالات بكتيرية تتبع أنواع استخدمت كشاهد في تحليل البصمة الوراثية بهذا البحث، ومقارنتها مع التتابع الكليوتيدي الذي تم الحصول عليه بالنسبة للسلالة Syrian *Xcc*، أجري تحليل القرابة الوراثية Multiple alignment باستخدام برنامج Clustal X2.0.8 ورسمت شجرة القرابة الوراثية باستخدام Clustal X 2.0.8 و TreeView ، أظهر هذا التحليل أنّ الـ ITS للعزلة Syrian *Xcc* متطابق مع ما يقابله عند 17 *Xcc* وقربية من *Xcv* و*Xcm* ومتباعدة عن *Xoo* و*Xoc* و*Xtt* و*Xtu*.

المقدمــة

أهمية القمح: ينتمي القمح wheat وأصنافه المختلفة إلى الجنس *Triticum* والفصيلة *Tritiaceae* ويعد في طليعة المحاصيل الاستراتيجيّة العالمية بحكم أهميّته الغذائيّة التّي تشكّل مصدراً غذائياً لأكثر من 35% من سكان العالم، وبإنتاج مقدر بـ 557 و 623 مليون طن في عامي 2003 و 2007 على التوالي .

ويحتل المرتبة الأولى من حيث الأهمية في الجمهورية العربية السورية لأنه يؤمن الأمان الغذائي المحلي، حيث يشكل 20% تقريباً من مجمل الأراضي المزروعة. وتختلف إنتاجية محصول القمح في سوريا من سنة إلى أخرى تبعاً للظروف المناخية وعمليات الخدمة والأساليب المستخدمة في الزراعة، ويمكننا الاطلاع على تطور زراعة هذا المحصول من حيث المساحة والإنتاج من خلال الجدول رقم (1,2) (المجموعة الإحصائية، 2013).

الجدول (1) مساحة وإنتاج وغلة القمح القاسي حسب المحافظات لعام ٢٠١٣ وتطورها على مستوى القطر خلال الفترة (٢٠٠٤-٢٠١٣)

Area, Production & Yield of Durum Wheat by Governorate for 2013
& their Development at the Country Level during (2004-2013)

Table (12) Area : Hec Production : M.T. Yield : Kg/Hec الغلة : كغ/هـ الإنتاج : طن المساحة : هكتار

Item	Total المجموع			Non- Irrigated بعل			Irrigated سقي			البيان
	غلة Yield	إنتاج Production	مساحة Area	غلة Yield	إنتاج Production	مساحة Area	غلة Yield	إنتاج Production	مساحة Area	
2004	2622	2225281	848655	1332	565216	424284	3912	1660065	424371	2004
2005	2581	2067029	800776	1305	528860	405210	3889	1538169	395566	2005
2006	2932	2230390	760785	1552	614706	396156	4431	1615684	364629	2006
2007	2580	1816397	703984	1171	410818	350970	3982	1405579	353014	2007
2008	1573	947848	602713	382	115708	302581	2773	832140	300132	2008
2009	2923	1581834	541202	1339	367295	274241	4549	1214539	266961	2009
2010	2372	1307144	550958	1327	371276	279758	3451	935868	271200	2010
2011	2846	2043813	718113	1045	334960	320668	4300	1708853	397445	2011
2012	2449	1833374	748758	921	311155	337761	3704	1522220	410997	2012
2013	2333	1611144	690591	1396	461218	330405	3193	1149926	360185	2013
Sweida	670	17520	26141	647	16765	25921	3430	755	220	السويداء
Dar'a	1124	75611	67290	662	34813	52551	2768	40798	14739	درعـــا
Quneitra	1213	7051	5813	1100	4950	4500	1600	2101	1313	القنيطـرة
Damascus	2911	23720	8148	851	1537	1805	3497	22183	6343	ريف دمشق
Homs	2232	64721	28999	1558	27486	17641	3278	37234	11358	حمـــص
Hama	2744	83473	30420	1428	15537	10881	3477	67936	19539	حمـــاه
Ghab	3219	152338	47331	1961	6928	3533	3320	145410	43798	الغـــاب
Idleb	2437	75705	31068	1702	20112	11819	2888	55593	19249	ادلـــب
Tartous	1171	7936	6777	1106	7190	6499.2	2693	747	277	طرطـــوس
Lattakia	2422	5515	2277	2422	5515	2277	-	-	-	اللاذقيـــة
Aleppo	3083	329221	106786	2697	151421	56142	3511	177800	50644	حلـــب
Al-Raqqa	3100	124077	40025	-	-	-	3100	124077	40025	الرقـــة
Dair-Ezzor	3339	125592	37608	-	-	-	3339	125592	37608	دير الـزور
Al-Hassake	2059	518665	251908	1235	168964	136836	3039	349700	115072	الحســكة

الجدول (2) مساحة وإنتاج وغلة القمح الطري حسب المحافظات لعام٢٠١٣ وتطورها على مستوى القطر خلال الفترة (٢٠٠٤-٢٠١٣)

Area, Production & Yield of Soft Wheat by Governorate for 2013
& their Development at the Country Level during (2004-2013)

Table (11) Area : Hec Production : M.T. Yield : Kg/Hec الغلة : كغ/هـ الإنتاج : طن المساحة : هكتار

Item	المجموع Total			بعل Non- Irrigated			سقي Irrigated			البيان
	غلة Yield	إنتاج Production	مساحة Area	غلة Yield	إنتاج Production	مساحة Area	غلة Yield	إنتاج Production	مساحة Area	
2004	2353	2312178	982571	1055	579583	549479	4001	1732595	433092	2004
2005	2359	2601717	1103050	1041	668776	642740	4199	1932941	460310	2005
2006	2633	2701135	1025874	1291	749148	580376	4382	1951987	445498	2006
2007	2308	2224703	963748	952	500272	525404	3934	1724431	438344	2007
2008	1349	1191465	883278	110	49699	453076	2654	1141766	430202	2008
2009	2366	2119950	896173	587	296907	506207	4675	1823043	389966	2009
2010	1694	1775938	1048150	733	421368	574518	2860	1354570	473632	2010
2011	2260	1814518	802925	634	276772	436776	4200	1537746	366149	2011
2012	2079	1775722	854056	544	242856	446270	3759	1532865	407786	2012
2013	2298	1570967	683487	1545	534105	345599	3069	1036863	337888	2013
Sweida	-	-	-	-	-	-	-	-	-	السويداء
Dar'a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	درعـا
Quneitra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	القنيطـرة
Damascus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ريف دمشق
Homs	2458	10419	4238	1500	2295	1530	3000	8124	2708	حمـص
Hama	3223	6613	2052	-	-	-	3223	6613	2052	حمـاه
Ghab	3643	27655	7592	2649	633	239	3675	27022	7353	الغـاب
Idleb	1488	47062	31620	1139	22691	19927	2084	24371	11693	ادلـب
Tartous	3420	13642	3989	1194	646	541	3768	12997	3449	طرطـوس
Lattakia	2493	98	39	2493	98	39	-	-	-	اللاذقيـة
Aleppo	2611	500416	191653	2159	241163	111718	3243	259253	79935	حلـب
Al-Raqqa	3100	230429	74332	-	-	-	3100	230429	74332	الرقـة
Dair-Ezzor	2971	74492	25072	-	-	-	2971	74492	25072	دير الـزور
Al-Hassake	1925	660141	342899	1260	266579	211605	2998	393562	131294	الحسـكة

نتجت أصناف القمح المزروعة في البداية عن التهجين الطبيعي بين الأنواع البرية ومن ثم من خلال التربية عن طريق التهجين والانتخاب. فالقمح المزروع في جنوب شرق آسيا موجود منذ آلاف السنيين ومنها انتشر إلى باقي بلدان آسيا وأفريقيا وأوروبا، كما تم إدخاله إلى العالم الجديد في نهاية القرن الخامس عشر. تختلف الأصناف الحديثة المزروعة من القمح الطـــــــري *Triticum aestivum* والقمح القاســـــــــي *Triticum turgidum* var *durum* في استخداماتها حيث يدخل القمح الطري في صناعة الخبز بينما يستخدم القمح القاسي في صناعة المعجنات (السميد والمعكرونة). يحتوي القمح على جميع المكونات الغذائية مثل السكريات والفيتامينات والبروتينات والليبيدات والأملاح المعدنية والأنزيمات ومنتجاتها إضافةً إلى الماء.

يعتبر النظام الزراعي للقمح ضعيف بسبب تدهور مجموعة من العوامل الهامة في إنتاجيتة مثل نوعية التربة، التصحر، التغيرات المناخية التي أدت إلى التحكم بظهور ضغوط إمراضية جديدة، أيضاً أدى الجفاف الناتج عن التغيرات المناخية إلى تغيرات في مجتمعات الأمراض التي تصيب هذه الزراعة. أدى نقص المياه في بعض الدول والتحول نحو الري الرذاذي إلى ظهور أمراض جديدة أكثر تخصصية منها الأمراض البكتيرية التي تحد بشكلٍ كبير من الإنتاج في كل مناطق زراعة القمح وبشكلٍ خاص في المناطق المروية، فمثلا يساعد الري في تطور مرض تخطط الورقة البكتيري (Maraitei ورفاقه، 2007).

يصاب القمح بالعديد من الآفات والأمراض، بشكلٍ متزامن أو مستقل ويمكن أن تصل الأضرار الناتجة عن الحشرات والفقد الناتج عن الأمراض إلى 20 % من الإنتاج وحتى التدمير الكامل للمحصول (Duveiller، 1989؛ Mehta، 1990؛ Maraite وزملاؤه، 2007). فقد بلغت أضرار مرض الصدأ المخطط *Puccinia glumarum* على القمح في سوريا عام 2010 حوالي عشرين مليار ليرة سورية.

يختلف عدد وأهمية الأمراض التي تصيب القمح حسب المنطقة الجغرافية والظروف المناخية السائدة وكذلك حسب الأصناف المزروعة وطبيعة النظام الزراعي. حيث أن الأمراض الأكثر أهمية ذات أصل فيروسي، فطري وبكتيري ومنها: فيروس الموزاييك المخطط للقمح Wheat streak mosaic virus ، الأصدئة (صدأ الساق الأسود *Puccinia graminis*، صدأ الأوراق البني *Puccinia recondita*، والصدأ المخطط (الأصفر) *Puccinia glumarum*)؛ والتفحمات (التفحم المغطى .*Tilletia* spp، والتفحم السائب *Ustilago nuda*)؛ لفحة السنابل .*Fusarium* spp؛ التبقع السبتوري .*Septoria* spp؛ التخطط الهيلمنثوسبوري *Helminthosporium gramineum* كأمراض فطرية (Zillinsky، 1983).

وعفن العصافة القاعدية *Pseudomonas syringae pv. atrofaciens* ولفحة الأوراق البكتيرية *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* ومرض تخطط الأوراق البكتيري (العصافة السوداء) *Xanthomonas translucens* وغيرها من الأمراض البكتيرية جدول (3) (Mariete وزملاؤه، 2007).

الجدول (3) الأمراض البكتيريا التي تصيب القمح واماكن انتشارها في العالم

اسم البكتيريا الممرضة	الاسم الأجنبي للمرض	الاسم العربي للمرض	أماكن انتشاره
Bacillus megaterium pv. cerealis	White blotch, tan streak	اللطخة البيضاء، التخطط الأسمر	استراليا، الولايات المتحدة الأمريكية
Clavibacter michiganensis supsp. tessellarius	Mosaic	الموزاييك	استراليا، كندا، الولايات المتحدة الأمريكية
Erwinia rhapontici	Pink seed	تورد البذار	استراليا، اوروبا، امريكا الشمالية
Pseudomonas cichorii	Stem and head melanosis	تلون الساق والسنابل	كندا
Pseudomonas fuscovaginae	Brown sheath rot	عفن الغمد البني	البرازيل، المكسيك، نيبال
Pseudomonas syringae pv.atrofaciens	Basal glume rot	عفن العصافة القاعدي	افريقيا، استراليا، اوروبا،فلسطين، سوريا امريكا الشمالية، نيوزيلاندا
Pseudomonas syringae pv. japonica	Black node, stripe blight	السلامية السوداء، اللفحة المخططة	اليابان
Pseudomonas syringae pv. syringae	Leaf blight	لفحة الأوراق	عالمي
Rathyibacter iranicus	Gumming	التصمغ	ايران، تركيا
Rathyibacter tritici	Tundu, yellow ear, rot	عفن السنبلة الصفراء	عالمي
Xanthomonas translucens	Leaf streak, leaf stripe, black chaff	تخطط الأوراق والعصافة السوداء	عالمي

وبيّن مندو (2007) أن البكتيريا الأكثر انتشارا على القمح هي بكتيريا *Xanthomonas translucens* المسببة لمرض تخطط الورقة البكتيري والعصافة السوداء، لذلك فقد ركزت هذه الدراسة على هذه البكتيريا.

الدراسة المرجعية

مرض تخطط الأوراق والعصافة السوداء البكتيري Bacterial Leaf Streak and Black Chaff

1- المجال العائلي والتوزع الجغرافي:

يعتبر مرض تخطط الأوراق والعصافة السوداء البكتيري الأكثر شيوعا وأهمية على القمح (Silva وزملاؤه، 2009؛ Pesce وزملاؤه، 2015)، ينتشر في جميع أنحاء العالم (Mariete وزملاؤه، 2007)، وسُجل على عوائل نجيلية أخرى جدول (4) .

الجدول (4) جدول تسجيل مرض تخطط الورقة البكتيري على عوائله Duveiller وزملاؤه (1997)

العائل	التسجيل لأول مرة والمرجع
الشعير *Hordeum vulgare* L.	(Jones *et al*., 1917)
القمح الطري *Triticum aestivum* L.	(Smith *et al*., 1919)
الشيلم *Secale cereale* L.	(Reddy *et al*., 1924)
الأعشاب grass	(Wallin, 1946a)
القمحيلم	(Zillinsky and Borlaug, 1971)

كما سجل لأول مرة في سورية على شكل انتشار وبائي مدمر على صنف القمح القاسي جزيرة 17 في منطقة سراقب في محافظة إدلب عام 1987 (أسعد، 1987)، مما أدى إلى خروج هذا الصنف من الزراعة فيما بعد. ثم سجله Mamluk وزملاؤه (1990) على القمح القاسي *Triticum turgidum* var. *durum* L. والقمح الطري *Triticum aestivum* L. في المناطق المروية. وبين مؤخراً كلاً من كيالي (2004) و مندو(2007) الانتشار الواسع له في سورية.

2- أهمية مرض تخطط الأوراق البكتيري على القمح

ظهرت أهميه المرض على القمح بشكلٍ واضح في مناطق انتشاره في ثمانينات القرن الماضي، حيث بدأ يتردد بشكل أكبر ويسبب خسائر كبيرة (Duveiller، 1989)، وقد يصل الفقد في الغلة الناتج عن الإصابة بهذا المرض إلى ما يزيد على 40% (Mehta، 1990؛ Maraite وزملاؤه، 2007). ويعود هذا إلى تأثير المرض في نوعية الحبوب الناتجة بانخفاض وزن الألف حبة 10-30% وتكون ضامرة ومنكمشة؛ وفي حالات الإصابة الشديدة بالمرض فإن 5 – 10% من السنابل من الممكن أن تصبح عقيمة بالكامل مما يؤدي إلى خسارة في الغلة (Forster وSchaad، 1988). وعلى الرغم من أن المرض يلاحظ في فترة متأخرة من فصل النمو فإن

التأثير السلبي له على الغلة يمكن أن يظهر حالما تظهر الإصابة على الورقة العلمية حتى عندما تكون المساحة المصابة منها قليلة وقد وجد عند مقارنة الغلة عند مستويات مختلفة من إصابة ورقة العلم في بيئة ماطرة في المكسيك أن الفقد في الانتاج يصل إلى 5% عندما تغطي الإصابة 10 % من مساحة الورقة العلمية وقدرت الخسائر ب 20% عندما بلغت نسبة إصابة ورقة العلم 50 % (Mariete ورفاقه، 2007).

كما تلاحظ التأثيرات المباشرة على الغلة عندما تنفصل الأوراق عن النباتات. ومن المحتمل أن يعزى تأثير المرض على الغلة إلى خفض معدلات التمثيل الضوئي وهو مرتبط بالمساحة المصابة من الأوراق. كذلك يتأثر امتلاء الحبوب بشكل رئيس بالمرض، ولكن عدد الحبوب هو الأكثر تأثراً وارتباطاً بمستوى شدة المرض (Duveiller وMaraite ، 1993).

3- العامل المسبب لمرض تخطط الأوراق البكتيري وتنوّعه الوراثي: يسبب مرض تخطط الأوراق البكتيريا ***Xanthomonas translucens*** وهي بكتريا هوائيـــة التنفـــس، ســـالبة الغرام، عصوية الشـــكل، أبعادها بحدود 0.4- 0.8*1- 2.5 ميكرون، متحركة بواسطة سوط قطبي وحيد تظهر مفردة أو في أزواج، وتعطي مستعمرات دائرية لماعة مخاطية وصفراء على وسط ويلبرنك (Sands وزملاؤه، 1986) بسبب إفرازها لمركبات Xanthomonadin (Xanthan) الصفراء، تحلل الجيلاتين وتظهر فرط حساسية على التبغ (Akhtar و Phutta، 2002)، سالبة أوكسيداز موجبة كاتلاز لا تحلل النشاء تنمو على وسط ملحي (1% Nacl) وتفقد حيويتها عند تركيز 5 % (Adhikari وزملاؤه، 2012)، درجات الحرارة المثلى لنموها 28-30 سْ. كما تتميز البكتيريا *Xt* بقدرتها على تشـكيل نوى تحرض تجمد الماء (ice nucleation activity) عند درجـــات حرارة 2-5 تحت الصفر 0 سْ (Kim وزملاؤه، 1987) وتزيد من حساسية القمح للصقيع، عرّف سابقاً بـ " *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* Jones 1917" (Milus وMirlohi ، 1994؛ Bragard وزملاؤه، 1995).

وبيّن Bragard وآخرون (1997) وجود 5 أنماط مرضية (*X.c.cerealis, X.c.hordie, X.c.secalis, X.c.translucens, X.c.undulosa*) وحديثاً جُمعت هذه الطرز تحت النوع *Xanthomonas translucens* وجميعها ممرضة لعائلة Gramminae و Poacea (Maraite وزملاؤه، 2007؛ Peng وزملاؤه، 2016).

حيث سميت هذه البكتريا بعدة أسماء تبعاً للعائل النباتي الذي عزلت منه، حيث تشير الدراسات إلى وجود تنوع كبير ضمن مجتمعات هذه البكتريا الممرضة على مختلف العوائل (Chalkley و Milus 1994؛ Bragard وزملاؤه 1995). فحسب قائمة الأمراض البكتيرية في الجمعية العالمية لأمراض النبات يسبب النمطين *X.translucens pv. translucens* و *X.translucens pv. Undulosa* أعراض تخطط بكتيري على القمح والشعير (Bull وزملاؤه، 2010)

واعتبرت العزلات المرضية على القمح والشعير على أنها *X.translucens pv. Undulosa* (Adhikari وزملاؤه، 2012)، إضافةً لإصابته الجودار والشيلم (Vauterin وزملاؤه،

1995). بينما اقترح Vauterin وزملاؤه (1995)؛ Adhikari وزملاؤه (2012) أنّ العزلات المرضية على الشعير هي *X.translucens pv. translucens* وتصيب البكتريا *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* الأعشاب النجيلية الأخرى (Vauterin وزملاؤه، 1995)، كما ذكر Maraite وزملاؤه (2007) أنها تصيب القمح أيضاً. وتصيب البكتريا *Xanthomonas translucens* pv. *secalis* نبات الشيلم (Vauterin وزملاؤه، 1995).

وأشارت الدراسات إلى اختلاف طرز *Xanthomonas translucens* في مجالها العائلي، فالسلالة التي تكون ممرضة على القمح بشراسة ربما تكون غير ممرضة على الشعير والعكس صحيح (Milus وChalkley، 1994؛ Partridge، 1998).

وبشكل عام اعتبر Simoes وزملاؤه (2007) أنّ تصنيف الطرز المرضية والأنواع التابعة للجنس *Xanthomonas* بشكل عام تحدٍ حقيقي .

واستخدمت عدة طرق للتصنيف و دراسة التنوع الوراثي للبكتيريا أهمها :

الفحص المجهري، اختبارات القدرة الإمراضية، اختبار الحساسية للفاج، الاختبارات المصلية باستخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة ومتعددة النسيلة، الاختبارات الكيمياحيوية، اختبار المسح من خلال المواد التي تستهلكها البكتيريا BIOLOG،اختبار الحساسية للمضادات الحيوية، دراسة أنماط الأحماض الدهنية fatty acid methyl esters (**FAME**)، رحلان مستخلصات البروتين على هلامة البولي أكريلامايد sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (**SDS-PAGE**) ، الرحلان ثنائي الاتجاه للبروتينات 2,D PAGE، الكشف عن الايزوزيم MLEE، تحليل البلاسميد والـ DNA الجينومي (تحديد التتابع النكليوتيدي لمورثات **ssu rDNA**, **16S rDNA**, **16S rDNA-23S rDNA**)، دراسات تهجين DNA-DNA (Louws وزملاؤه، 1994؛ de Brujin وزملاؤه، 1996؛ Bragrad وزملاؤه، 1997؛ Adhikari وزملاؤه، 2012؛ Ferreira-tonin وزملاؤه، 2012).

ولكن لكل طريقة من الطرق السابقة مشاكلها الخاصة والتي تحد من استخدامها .

فاختبارات القدرة الإمراضية اختبارات مرهقة مستهلكة للوقت مكلفة ولديها قدرة محدودة للحصول على نفس النتيجة بتكرار التجربة وهي خاضعة للظروف البيئية والنبات.

كما ذكر Louws وزملاؤه (1994) أنّ اختبارات القدرة الإمراضية اختبارات غير حاسمة ومفتوحة على تفسيرات بديلة، ومن الصعب تصنيف السلالات البكتيرية بالاعتماد على الأعراض إلا اذا كانت تخضع لنظرية الجينات المتناظرة (بكتيريا تحتوي مورثات *avr* ونبات مقاوم يحوي مورثات *R* المقابلة لها) وبالتالي وجود مجموعة من الأصناف التفريقية بحيث يمكن أن يصاب النبات (تظهر أعراض المرض) أو لا يصاب (تتطور فرط حساسية أو عدم ظهور المرض).

وبالتالي من الصعب تصنيف العزلات ذات الموقع التصنيفي غير الواضح والتي تظهر قدرة إمراضية مميزة أو قد يكون متحصل عليها من عوائل جديدة في مستوى تحت النوع (نمط مرضي) بسبب المحدودية في فحص مدى عائلي شامل (Rademaker وزملاؤه، 2006).
وذكر Peng ورفاقه (2016) أنه عند تصنيف سلالات *X.translucens* بوساطة أنماط القدرة الإمراضية وتقنيات البصمة الوراثية ظهر تشابه لبعض سلالات *Xanthomonas translucens pv. cerealis* مع سلالات *Xanthomonas translucens pv. undulosa* بقدرتها الإمراضية وتميز عنها فقط بالبصمة الوراثية .

استخدمت الاختبارات المصلية لتشخيص مرض تخطط الورقة البكتيري حيث شكلت الأنماط المرضية لـ *X.translucens* (*X.t pv. secalis* و*X.t pv. hordie* و*X.t pv. cerealis* إضافة إلى *X.t pv. undulosa* و*X.t pv. translucens*) مجموعة متجانسة وذلك سواء باستخدام الأجسام المضادة وحيدة النسيلة أومتعددة النسيلة (Bargard وVerhoyen، 1993) و أكد Bragard وزملاؤه (1997) في أن الأنماط الممرضة التابعة للنوع *Xanthomonas translucens* لا يمكن تمييزها عبر الاختبارات المصلية، وهذه صفة عامة عند كل أنواع الجنس *Xanthomonas*، **أما الاختبارات الكيميا حيوية** فهي غير واضحة لتمييز *Xanthomonas* (Bargrad وزملاؤه، 1997)، هذا عدا أنها طرق تحتاج إلى وقت طويل وجهد (Ferreira-tonin، 2012).

لم يتمكن تحليل الأحماض الدهنية (FAME) من تمييز بين الأنماط المرضية للنوع *Xanthomonas translucens* (Stead، 1989) وأكد ذلك ما أورده Bragard وزملاؤه (1997) حينما ذكر أن أغلب الأنماط المرضية جمعت مع بعضها عند استخدام FAME ، لذا اعتبره Rademaker وزملاؤه (2005) أنه تحليل ذو مستوى تصنيفي متدني يتوجب استبداله باختبارات أدق .

سمحت حزم البروتينات **عند تصنيف *X.t* بالاعتماد على فصل البروتينات الكلية باستخدام تقانة SDS-PAGE** بتمييز الأنماط المرضية *X.t pv. rehenatheri* و*X.t pv. graminis* و *X.t pv. phlei* و*X.t pv. pleipartensis* و*X.t pv.poae* لكنها لم تميز الأنماط الممرضة الأخرى (Vauterin وزملاؤه، 1992)، وهذا ما أيّده louws وزملاؤه (1994) واعتبروه اختبار قليل الحساسية.

الطرق المعتمدة على تحليل الأحماض النووية الـ DNA كانت لا تعتمد على نمو البكتيريا وعمرها، وهي أقل استهلاكا للوقت ومفيدة لتحديد علاقات القرابة الوراثية بين العزلات البكتيرية وبين طرز العزلات المختلفة (de Brujin وزملاؤه، 1996)، ومع هذا فهناك طرق أفضل من أخرى
فمثلا بالنسبة لطرق دراسة تهجين DNA-DNA شكلت هذه الطرق إحدى القواعد لتمييز وتصنيف البكتيريا على مستوى الاجناس والأنواع لكن ليس من السهل الوصول لبروتوكولات تهجين الأحماض النووية بسهولة إلى أخصائيي البكتيريا العمليين لتنميط سلالات غير معروفة

ومقارنتها بالسلالات المرجعية المعروفة أو السلالات المنمطة (Rademaker وزملاؤه، 2005).

تم تمييز القرابة الوراثية بوساطة دراسة DNA–DNA homology لمجموعة *Xanthomonas* التي تعد واحدة من أكبر المجموعات البكتيرية، وتعتبر قيمة التماثل الوراثي 70% DNA – DNA معيار مقبول عالمياً لتعريف البكتيريا على مستوى الأنواع لكن طرق تحليل DNA – DNA المعقدة تعيق التحليل السريع لأعداد كبيرة من عزلات البكتيريا والتي تعدّ ضرورية لدراسة التنوّع الميكروبي الجزيئي (Simoes وزملاؤه، 2007). حيث أوضح Rademaker ورفاقه (2005) أنّه ليس من السهل إجراء دراسات تماثل الـ DNA-DNA لأنه يجب أن تؤدى بشكل أزواج لكل السلالات وهذا ما يجعلها طريقة غير عملية للتشكيلات الكبيرة للبكتيريا .

تسمح طرائق التصنيف المعتمدة على تحديد تتابع النكليوتيدات في المورثات المرمزة للـ RNA الريبوزومي ومناطق الـ ITS (Internal transcribed sequance**)** بتمييز وتصنيف البكتيريا على مستوى الأنواع وليس السلالات وبالتالي ليس من السهل تصنيف السلالات غير المصنفة مسبقا ومقارنتها بالسلالات المرجعية المعروفة أو السلالات المنمطة (Rademaker وزملاؤه، 2005)

علاوة على ذلك بينت المقارنة الشاملة لسلاسل الـ DNA المرمزة للـ rRNA تحت الوحدات الصغيرة (**ssu rRNA**) أن التباين محدود جدا في هذه السلاسل ضمن الجنس (Hauben وزملاؤه، 1997) وبالتالي لهذه السلاسل قيمة محدودة في تمييز سلالات *Xanthomonas* حتى على مستوى الأنواع (Rademaker وزملاؤه، 2006)، وأظهر Simoes وزملاؤه (2007) أنّ تحليل المنطقة الفاصلة بين مورثات 16S rDNA- 23S rDNA (ITS) لم تسمح بتمييز وتصنيف عدد من أنواع *Xanthomonas* بسبب الدرجة العالية من التماثل conserved region وغياب التباين.

فقد أظهر تحليل سلسلة 16S rDNA لـ Xanthomonads تغيرات محدودة وليس لديه القدرة الكافية لتمييز كل الأنواع ولا كل السلالات المتكيفة مع العوائل ضمن الأنواع (Rademaker وزملاؤه، 2005). وهذا موافق لما بينه Goncalves وزملاؤه (2002) في أن درجة الحفظ العالية لسلاسل 16S rDNA قد حدّت من دراسة العلاقات بين الانوع ضمن الجنس الواحد، وقد دفع مستوى التشابه العالي لهذه السلاسل إلى البحث عن واسمات جزيئية أخرى تظهر التباينات البسيطة بين السلالات البكتيرية.

هذا كلّه شدد على الحاجة إلى طريقة تنميط وراثي سريعة لردم الفجوات بين تنظيم السلالات المنمطة والحاجة اليومية لمقارنة العزلات الجديدة والسلالات المرجعية القديمة (Rademaker وزملاؤه، 2005).

تسمح طرائق **البصمة الوراثية** بفحص بعض 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 للممرضات على مستويات تصنيفية منخفضة والتمييز بين سلالات النوع الواحد (جلول، اتصال شخصي).

تعتبر تقانة تقطيع ال **DNA** بوساطة أنزيمات **Restriction enzymes** ومن ثم ترحيله من أوائل التقانات المستخدمة في هذا المجال لكنها نادرة الاستخدام ولكي تصبح اكثر دقة تتبع إما برحلان كهربائي pulse field gel electrophoresis (**PFGE**) أو تستخدم مسابر خاصة لتهجين الـ **DNA** وفق ما يسمى تعدد أطوال القطع المقيّدة restriction fragment length polymorphism (**RFLP**) (de Brujin وزملاؤه، 1996)، لكنها تتطلب مجهود ووقت كبيرين علاوة على أنها تحتاج كميات كبيرة من الـ **DNA** 2-10 µg (Powell وزملاؤه، 1996)، واستخدمت أيضا تقانة التضخيم العشوائي للـ **DNA** متعدد الأشكال Random Amplification of Polymorphic DNA **(RAPD)** وهي نادرة الاستخدام في دراسة البكتيريا ولا تحظى بثقة الباحثين لعدم ثباتية النتائج عند تكرار الاختبار لنفس العزلات (Mueller وWolfenbarger ، 1999؛ Garcia وزملاؤه، 2004؛ Ghazi وزملاؤه، 2013)، استخدمت أيضا طريقة تعدد أشكال القطع المضخمة Amplified Fragment Length Polymorphism (**AFLP**) وتعتبر من الطرق الفعالة من حيث النتيجة لكن يؤخذ عليها أنها تحتاج إلى **DNA** عالي النقاوة وتحتاج إلى مجهود ووقت كبيرين وكلفتها عالية (Garcia وزملاؤه، 2004)، وذكر de Brujin وزملاؤه (1996) أن الذي حسن الطرق المعتمدة على الـ **DNA** استخدام الـ **PCR** بالتعريف والتصنيف والبصمة الوراثية.

واقترحت دراسات عديدة بأنّ تقنيات البصمة الوراثية المعتمدة على السلاسل التكرارية **repetitive-PCR (rep- PCR)** يمكن استخدامها كتقنيات فحص سريعة ومميِّزة جداً لتحديد النمط الوراثي والتنوع التصنيفي وتركيب القرابة الوراثية للمجتمعات البكتيرية (Louws وزملاؤه، 1994؛ Rademaker وزملاؤه، 2000؛ Rademaker وزملاؤه، 2005؛ Asgranil وزملاؤه، 2015)؛ حيث يعتمد مبدأ اختبارات البصمة الوراثية المعتمدة على rep-PCR على استخدام بادئات الدنا (DNA) المقابلة لتكرارات (motifs) محفوظة في سلاسل تكرارية موجودة طبيعيا في جينوم البكتيريا (Louws وزملاؤه، 1994؛ Wieser وBusse، 2000) وتظهرهذه السلاسل المكررة أنها موجودة في أغلب البكتيريا إن لم يكن جميعها (de Brujin وزملاؤه، 1996)

وذكر Louws وزملاؤه (1994) أنّ هناك عدة عائلات من سلاسل تكرارية منتشرة على طول جينومات الأنواع البكتيرية لكن 3 منها درست بتفاصيل كبيرة وهي:

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

سلسلة enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) وزنها من 124 إلى 127 bp

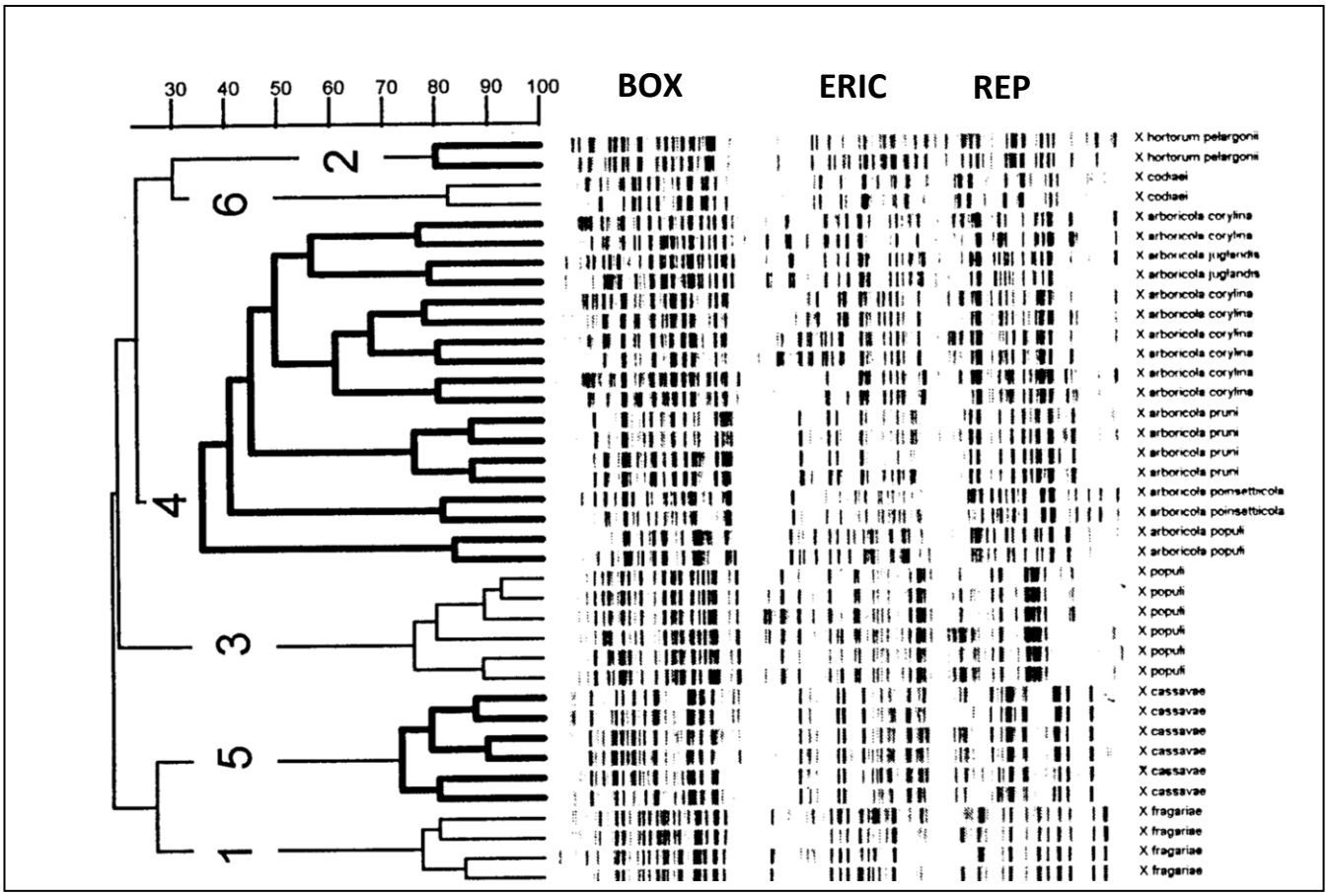
وعنصر الـ BOX وزنه 154 bp .

وذكر de Brujin وزملاؤه (1996) أنّ بادئات الـ PCR صممت لتقرأ خارج الاتجاه واعتبارا من التكرارات المعكوسة في الـ REP والـ ERIC ومن تحت الوحدة BOX A في الـ BOX ، وأدى استخدام البادئات الثلاث في الـ PCR لتضخيم انتقائي للمناطق الوراثية المتوضعة بين سلاسل الـ BOX والـ ERIC والـ REP، بحيث يطلق على التقانات المقابلة لها اسم (BOX,

ERIC, REP)-PCR ولجميعها بـ rep-PCR (Versalovic وزملاؤه، 1994)، وبذلك فإن الحزم المضخمة عند ترحيلها على هلامة الاغاروز ستعطي أنماط بصمة وراثية مشابهة للباركود وظيفتها مثل توقيع خاص ونوعي للسلالات البكتيرية.

وبكلمات أخرى تضخيم القطع الواقعة بين التكرارات التي تختلف مواقعها بين سلالة وأخرى سينتج منتج تضخيم سيزودنا ببصمة وراثية نوعية لكل سلالة عند الرحلان على الهلامات (Wilson وSharp، 2006).

تعتبر رسم شجرة القرابة وتحليل مجموعة الحزم المتشكلة بواسطة البصمة الوراثية rep-PCR عملية معقدة جدا بالعين لذلك يستخدم مجموعة من برامج الحاسوب والمعلوماتية تساعد في تحديد الحزم وتحليل القرابة الوراثية منها البرنامج المستخدم كثيرا في دراسات ممرضات النبات Gel compare والذي تم استخدامه في دراسة التنوع الوراثي ورسم شجرة القرابة الوراثية للبكتيريا التابعة لجنس *Xanthomonas* المعرفة مسبقا بطريقة تهجين DNA-DNA وتظهر نتائج rep-PCR كما في الشكل (1) (de Brujin وزملاؤه، 1996)



شكل(1): شجرة القرابة الوراثية المعتمدة على تقانات rep-PCR لعزلات تابعة لجنس *Xanthomonas* باستخدام برنامج Gel compare

لتحليل البصمة الوراثية لـ rep-PCR ميزات عديدة أهمها الحصول على نفس النتائج بتكرار الاختبار داخل وبين المخابر وبسيطة جداً لتمييز السلالات ولدراسة التنوع الوراثي (Louws

وزملاؤه، 1994؛ de Brojin وزملاؤه، 1996)، ومفيدة في تصنيف السلالات باستخدام الـ rep-PCR في الفحص المبدئي أو التأكد من التحليلات الأخرى ذات القدرة التصنيفية الأدنى مثل Amplified ribosomal DNA restriction analysis (**ARDRA**) و Fatty acid methyl esters (**FAME**) و **BILOG** المعتمدة على الاختبارات البيوكيميائية وتحديد تتابع النكليوتيدات في سلسلة 16s rDNA ، حيث وصلت فعاليتها في التنميط إلى التقييم المفصل للتنوع الوراثي حتى تحت النوع والنمط المرضي والسلالة (Rademaker وزملاؤه، 2005).
لا تعتمد هذه التقانات على DNA ذي نوعية عالية بشكل مطلق (خالي من البروتين والبولي سكاريد) حيث أن النتائج متماثلة سواء أكانت لـ DNA نقي أو مستعمرات مفردة من أطباق او من مزارع سائلة أو مفرزات التقرحات البكتيرية كما في *Xanthomonas* (Louws وزملاؤه، 1994؛ de Brojin وزملاؤه، 1996).
وتتميز كذلك بوجود ارتباط كبير بينها وبين اختبارات تهجين DNA-DNA (Rademaker وزملاؤه، 2000)، وارتباط بينها وبين اختبارات القدرة الإمراضية (Rademaker وزملاؤه، 2006).

وتعتبر هذه التقنيات المحسنة لمراقبة التنوّع الوراثي في مجتمعات كبيرة للبكتيريا ليست فقط أسرع وأرخص من التقنيات الجزيئية الأخرى إنما مفيدة أيضا لاكتشاف التوزع الجغرافي للطرز المرضية في الحقول وقياس المستوى العالي من التنوع (Adhikari وزملاؤه، 2012).

استخدمت **تقانات البصمة الوراثية rep-PCR** في التصنيف ودراسة التنوّع الوراثي للبكتيريا بشكل عام فعلى سبيل المثال استخدم Wiesser وBusse (2000) هذه التقنية لدراسة التشابة بين السلالات المختلفة للأنواع *Staphylococcus epidermidis*

و استخدم Louws وزملاؤه (1994) الـ rep-PCR للحصول على بصمة وراثية لتشكيلة من عزلات الـ *Xanthomonas* والـ *Pseudomonas* ولتحديد الأنماط الإمراضية والسلالات التي لم تكن مميزة مسبقاً بطرق التصنيف الأخرى، وذكروا بأن هذه الطريقة أداة تشخيص مفيدة لهذه الأمراض الهامة على النبات .

قارن Rademaker وزملاؤه (2000) تقنيات البصمة الوراثية المعتمدة على ال PCR وبشكل خاص الـ rep-PCR مع دراسات تهجين الـ DNA-DNA، و تم الحصول على أنماط بصمة وراثية لل rep-PCR لـ 178عزلة *Xanthomonas* تعود لـ 20 مجموعة تهجين DNA-DNA معرفة مسبقاً بالإضافة لعزلة *Stenotrophomonas maltophilia*

حسبت قيم التشابه المأخوذة من تحاليل البصمة الوراثية للـ rep-PCR واستخدمت لدراسة الارتباط بين rep-PCR وقيم DNA-DNA homology حيث لوحظ وجود ارتباط كبير أدى لاقتراح أن تقنيات البصمة الوراثية تظهر حقيقة العلاقات الوراثية والظاهرية بين البكتيريا المدروسة.

وفي إيران دُرس تنوع *Xanthomonas* من قبل Asgarnil وزملاؤه (2012) باستخدام تقانة ERIC-PCR والتي سمحت بتمييز تحت الأنواع المرضية

وفي دراسة أجراها Rademaker وزملاؤه (2005) تم الحصول على بصمة وراثية لـ 339 سلالة *Xanthomonas* تشمل 80 نمط مرضي و20 مجموعة DNA-DNA homologue وسلالة مرجعية لـ *Stenotrophomonas maltophilia*، وقد حُلِّلت أنماط ال rep-PCR في هذه البحث بمساعدة الحاسوب مما سمح بتجميع السلالات إلى مجموعات متميزة تقابل الـ 20 مجموعة DNA-DNA homologue المحددة مسبقا، بالاضافة إلى تحديد أكثر من 160 سلالة لأنواع وراثية متخصصة وهذه السلالات لم تميّز مسبقاً بتحليل تهجين DNA-DNA ولم تصنف من قبل.

واستخدمت البصمة الوراثية للـ PCR المعتمد على السلاسل المتكررة لتوصيف عزلات *Xanthomonas oryzae* في دراسة Gonzalez وزملاؤه (2007) حيث تم فصل سلالات *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* عن *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* عن *Xanthomonas translucens*، ووصلت الدقة لتمييز السلالات الآسيوية عن السلالات الإفريقية بالنسبة للبكتيريا *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* و *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* ، حيث تم تعريف 18 عزلة من *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* بوساطة الـ ERIC-PCR و13عزلة بوساطة REP-PCR، وكذلك تم تمييز 7 عزلات من الـ *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* بواسطة الـ ERIC-PCR و 8 عزلات مميزة بوساطة REP-PCR، أما سلالات *X.translucens* فقد تم تعريف 7 سلالات مميزة بوضوح بوساطة اختباري (REP-, ERIC-(PCR .

هذا عدا استخدامها في أبحاث عديدة لدراسة التنوّع الوراثي لمرض تخطط الورقة البكتيري بشكل خاص منها دراسات (Rademaker وزملاؤه، 2006؛ Adhikari وزملاؤه، 2012).

وجد في دراسة Rademaker وزملاؤه (2005) أنّ 41 عزلة من *X.translucens* تضم الأنماط المرضية *X.t pv. cerealis, X.t pv. arrenatheri, X.t pv. secalis, X.t pv. poae, X.t pv. phlei, X.t pv. pleipartensis, X.t pv. hordie, X.t pv. gramminis, X.t pv. translucens, X.t pv. Undulosa*، قد شكلت عنقود مستقل عن باقي أنواع *Xanthomonas* الأخرى.
وبذلك ظهر أن *X.translucens* يمكن أن يميز بشكل جيد ومتميّز عن الأنواع الأخرى بوساطة بصمة BER (تشمل الرحلان الكهربائي لمنتجات ال PCR لأنواع التقانات الثلاث ERIC, REP, BOX مع بعضها البعض)، إضافة لسماح أنماط rep-PCR بتمييز أكثر دقة حتى مستوى تحت النوع مما يعطي قيمة تشخيصية عالية للبصمة الوراثية rep-PCR.
علاوة على ذلك تم تنميط 3 سلالات *X.translucens pv. Arrhenthari* و3 سلالات *cerealis* وسلالتين *graminis* وسلالة *hordie* وسلالتين *translucens* وسلالتين *undulosa* لم تكن محددة مسبقاً بتقانة تهجين DNA-DNA وذلك ضمن مخطط التصنيف المعتمد على rep-PCR .
وأجرى Rademaker وزملاؤه (2006) تفاعلات rep-PCR وذلك بهدف تحديد البصمة الوراثية لـ 33 عزلة *X.translucens* ممرضة لهليون الزينة *Ornamental Asparagus* مع 61 عزلة *X.translucens* مرجعية ممرضة لمحاصيل الحبوب والأعشاب.

سهلت البصمة الوراثية للـ rep-PCR من توصيف وتمييز *X.translucens* متضمنا الأنماط المرضية (*arrhenatheri* و*graminis* و*phlei* و *phleipratensis* و*poae*) بالإضافة لعدد من سلالات *X.translucens pv. cerealis*

ونتـــج عـــن استخـــدام طريقة البصمة الوراثية rep-PCR بالاتحاد مع is-PCR (insertion sequence PCR) عند دراسة التنوع الوراثي لـ 226 عزلة *Xtu* تمييز 213 طرز وراثي (Adhikari وزملاؤه، 2012).

4- أعراض الإصابة بمرض تخطط الأوراق البكتيري

تظهر **الأعراض النموذجية للمرض** على الأوراق على شكل تخططات طولية صغيرة شفافة يمكن أن تميز بسهولة تحت الضوء. وتكون في بداية الإصابة مشبعة بالماء وربما تكون محاطة بهالة خضراء مائية water soaking، ثم تصبح صفراء إلى بنية فاتحة ثم يصبح لونها بنياً غامقاً إلى أسود، ثم تندمج هذه التخططات مع بعضها البعض مشكلة بقعاً طولية بطول عدة سنتيمترات وتغطي مساحات أكبر من سطح الورقة. تشاهد الإفرازات البكتيرية تحت ظروف الرطوبة العالية (Duveiller وMaraite، 1993)، تتصلب هذه الإفرازات وتتحول إلى حبيبات راتنجية مصفرة تغطي سطح الإصابة وتتميز بسهولة انفصالها وتصبح بلون أسود في مراحل متقدمة، تنحل هذه القطيرات بوجود الرطوبة (الندى أو في الجو الماطر) مما يعطي قطرات حليبية واضحة تنتشر فيما بعد فوق سطح الورقة ثم تجف وتتساقط كقشرة رقيقة رمادية وغالباً شفافة على شكل حراشف (Maraite وزملاؤه، 2007)، وبتقدم الإصابة تجف الأوراق وتموت. أما في حقول المزارعين التي لا تروى بالرذاذ فيمكن ملاحظة الإصابة ولكن دون هذه الإفرازات، وهذا يجعل من الصعب تحديد المسبب دون عملية عزل الممرض (Duveiller وزملاؤه، 1997)، حيث تتشابه أعراض هذا المرض مع أعراض *Septoria tritici* التي تميزها وجود البكنيدات السوداء في منطقة الإصابة.

بينت المراجع أن أعراض الإصابة على الأوراق غالباً ما تبدأ على قمة الورقة ثم تمتد باتجاه الأسفل ويمكن أن تتطور عند منطقة انحناء نصل الورقة في حال طالت فترة بقاء الندى (Maraite وزملاؤه، 2007)، ولا بدّ من الإشارة إلى قدرة الممرض على إصابة مختلف أجزاء النبات (السوق والأوراق والأعناق والعصافات والسفاة والحبوب)، وتختلف الأعراض على الأنسجة المصابة حسب البيئة السائدة والصنف المزروع وشراسة الممرض (Duveiller وزملاؤه، 1997).

هذا وتحرّض إصابة السوق والمحاور الزهرية والورقية والعصافات والسفا على ظهور أعراض العصافات السوداء بمظهرها الزيتي أو العصابات المتناوبة للمرض على السفا وهذا ما يساعد في تمييز إصابة *X.translucens* عن العصافة السوداء التي تسببها االعصافة السوداء الكاذبة (Maraite وزملاؤه، 2007).

وقد أشارت التجارب في المكسيك إلى أن التباين في الأعراض على الأوراق محدود جداً (Duveiller، 1994)، أما على السنابل فإن معظم هذا التباين قد يعزى إلى رد الفعل الميلانيني على السنابل والعقد، والذي يظهر عندما تتعـــرض بعض أصناف القمـــــح لإجهاد

فســـــــيولوجي لا إحيائي، وليـس كنتيجة لرد فعـــل مرضـــي (Duveiller وزملاؤه، 1997)؛ كما يؤمن تطور المرض على السنابل التلوث الداخلي والخارجي للبذور بهذه البكتريا.

5- دورة حياة المرض ووبائيته

يحدث مرض تخطط الورقة البكتيري في مجال من الظروف المناخية شديدة التباين مثل الحقول المروية بالرذاذ المصحوبة بحرارة معتدلة، والمناطق شبه المدارية المرتفعة ذات المعدل المطري العالي، والبيئات الدافئة والتي تتصف بليل بارد، أو المناطق ذات التغير المناخي المتردد والتغيرات الحرارية المفاجئة (Duveiller وزملاؤه، 1997).

وتعتبر الحبوب مصدراً رئيساً للقاح الأولي (Maraite وزملاؤه، 2007)، حيث يعزى انتقال مرض BLS بمعدلات عالية إلى طبيعة الممرض كونه محمولاً بالحبوب seed-borne (Duveiller وزملاؤه، 1997).

هذا وقد تم إثبات أن تلوّث البذار بـ *Xt* ناتج عن إصابة السنبلة لكن في بعض الحالات ينتج من التلوث بالبكتيريا المتحررة من الأوراق المصابة للطرز الوراثية عالية الحساسية (Maraite وزملاؤه، 2007)، وتستطيع البكتريا البقاء بحيوية جيدة في المخزن لفترة 63-81 شهراً وذلك تبعاً لظروف المخزن (Forster وSchaad، 1988).

تظهر الأعراض على البادرات في الحقل بشكل مبكر جداً من فصل النمو، والإصابات الثانوية تبدأ عندما تكون النباتات بطول 3-4 سم (Forster وزملاؤه، 1986)، تساهم الجروح في ازدياد نسبة الإصابة حيث ذكر Duvieller وزملاؤه (1997) أنّ ارتفاع نسبة إصابة البادرات إلى 81 و42% على التوالي من البادرات المعدية بعد إحداث جروح على النباتات قبل إجراء العدوى. يتركّز التوضع المهم للممرض في حبوب القمح في الغلاف الخارجي للحبة بنسبة 88.9% وتكون البكتريا المحمولة خارجياً على الحبوب قليلة الأهمية في إحداث المرض (Duveiller، 1992). ولقد أشار Duvieller وزملاؤه (1997) أن البكتريا المنقولة بواسطة البذور تصيب الساق الجنينية عن طريق الجروح أو عن طريق المسام على غمد الورقة الأولى (الغمد الأولي)، فيهاجم الممرض غمد الريشة ويسبب إصابته قبل انبثاق الورقة الأولى منه.

ذكر Duvieller وزملاؤه (1997) أنّ البكتريا *Xt* يمكن أن تبقى بحيوية عالية في التربة لفترة قليلة لكن وجود بقايا المحصول يعزز ظروف بقائها ويطيل فترته، وهي ليست المصدر الرئيس للقاح الأولي. وذكر أيضا أنّ البكتريا *Xt* تبقى حية على النباتات العائلة وغير العائلة بطور متعايش غير الطفيلي epiphytic.

كما أكّد Maraite وزملاؤه (2007) أنه يمكن لبكتيريا *Xt* بسبب مجالها العائلي الواسع أن تبقى على بعض الأعشاب النجيلية المعمرة وأيضاً تم اكتشاف مجتمعات الممرض محمولة على سطح الورقة بطور متعايش وغير طفيلي على بعض أحاديات الفلقة غير العائلة قرب حقول القمح، وبالتالي تصبح هذه النباتات مصدر عدوى بالممرض.

ولعدد البكتريا في الطور المتعايش على سطح الورقة أهمية خاصة في فهم أسباب حدوث المرض BLS بشكل متقطع (Timmer، 1987)، فاعتبر Stromberg (1999) أن حجم

المجتمع البكتيري الموجود سطحيا على الأوراق غير الحاوية على أعراض مصدر للتنبؤ بحجم الإصابة اللاحقة بتخطط الورقة البكتيري.

ويعتبر وجود الماء على السطح الخارجي للأوراق عاملاً هاماً في تكاثر البكتريا قبل حدوث الإصابة، لذلك فإن هذه الإصابة لا تحدث إلا بتوفر رطوبة كافية (Duveiller وزملاؤه، 1997؛ Partridge، 1998).

تنخفض المجتمعات البكتيرية المتعايشة على سطح أوراق القمح بعد الهطولات المطرية الكثيفة وهذا يؤكد أن *Xt* يكون موجود سطحيا قبل الدخول الفعلي للأنسجة البارانشيمية (Maraite وزملاؤه، 2007)، تدخل البكتيريا للأنسجة من خلال الفتحات الطبيعية أو تلك الناتجة عن الجروح، وبعد دخولها إلى النسيج البارانشيمي للورقة تتكاثر في الفراغات بين الخلوية، خاصةً إذا احتوت هذه الفراغات على ماء حر وتزداد القدرة الإمراضية لها بزيادة نسبة هذا الماء وتتكاثر بأعداد هائلة مما يسبب تطور أعراض تخططات طولية تمتد بشكل موازٍ للعروق التي تكون بمثابة حواجز تترافق بإفرازات بكتيرية على سطح التخططات، وتموت الأنسجة المصابة لاحقاً محدثةً الأضرار للمحصول. وأكدت الدراسات أن ظهور وبائيات المرض مرتبط بالظروف الرطبة الدافئة (Peng وزملاؤه، 2016)؛ وكثيراً ما تتطور الأعراض بين طوري التسنبل والإزهار (Duveiller، 1994). ونادراً ما تشاهد الأعراض على الأوراق قبل طور التسنبل (Milus وMirlohi، 1993). وليس من الضروري أن تترافق أعراض الأوراق مع ظهور السنابل (Duveiller وزملاؤه، 1997)، إنما قد توجد بعض نباتات القمح المتحملة للإصابة، فتصاب بالبكتريا ولا تعطي أعراضاً ظاهرية.

إضافة إلى انتقال الممرض من موسم لآخر ومن حقل لآخر بالبذور الملوثة سطحياً أو داخلياً، ينتقل الممرض بواسطة الأمطار والندى واحتكاك النباتات ببعضها البعض وذلك ضمن مسافات محدودة (Adhikari وزملاؤه، 2012) ويزداد انتشار البكتريا في الصباح عندما يكون الندى بالحد الأعلى، وينتشر المرض بجهة الرياح السائدة. كما تلعب حشرات المن في الظروف المناسبة دوراً في نقل البكتريا *Xanthomonas* من نسيج البقع المصابة المشبعة بالماء على القمح والشعير ولمسافات طويلة نوعاً ما (Duveiller وزملاؤه، 1997).

أما انتشاره لمسافات بعيدة بين الدول والقارات فيتم من خلال تبادل المصادر الوراثية للأصناف (Adhikari وزملاؤه، 2012).

يتحمل الممرض مجالاً واسعاً من درجات الحرارة15-30 سْ (Duvieller وزملاؤه، 1991). والدرجة المثلى هي أعلى من 26 سْ (Forster وزملاؤه، 1986). وتشير الدراسات إلى أن للحرارة التأثير الأساسي في حدوث الوباء فتكاثر الممرض في نسيج الورقة بعد الاختراق يعتمد على درجة الحرارة بشكل أساسي، حيث إن انخفاض رطوبة الهواء عن 30 % لا تحد من تطور المرض، إنما تظهر أعراضه عندما تسمح درجات الحرارة بتكاثر الخلايا البكتيرية والوصول إلى عتبة تقدر بـ 10^8 خلية مشكلة للمستعمرة/الورقة (cfu/leaf) تقريبا (Duveiller وMaraite، 1995)، وعلى العكس فالحرارة المنخفضة تعيق تكاثر الممرض وتطور المرض أيضاً. لذلك يسود مرض تخطط الورقة البكتيري في مناطق زراعة القمح غير التقليدية الأكثر دفئاً وذات المعدل المطري المحدود وذات ظروف الرطوبة الليلية (الندى)، حيث أن هذه الظروف كافية لاختراق الممرض للنسيج البارانشيمي، وحالما يصبح الممرض داخل نسيج

الورقة يستطيع أن يحافظ على زيادة تعداده باضطراد مستمر، دون أن تحد رطوبة الهواء المنخفضة من هذه الزيادة فالحرارة هي العامل الرئيس الذي يحكم تكاثر البكتريا داخل نسيج الورقة (Duveiller وزملاؤه، 1997).

ولخّص Adhikari وآخرون (2012) الأسباب الممكنة لظهور الأوبئة لهذا المرض بـ :

1- ازدياد انتاج القمح الشتوي والقمح المزروع في الخريف يمكن أن يكون مصدر لعدوى القمح الربيعي.
2- ازدياد زراعة أصناف القمح المقاومة لأمراض أخرى مثل لفحة الفيوزاريوم وهذه الأصناف حساسة لـ *X.translucens*
3- الظروف الجوية المعتدلة والرطبة خلال مراحل النمو المتأخرة للقمح الشتوي يساعد على زيادة العدوى ونشر اللقاح في حقول القمح الربيعي المجاورة.

تلعب البكتريا دور النواة التي تشجع تجمد الماء وتزيد من حساسية النبات لأثر الصقيع عند الدرجات الحرارة المنخفضة بين الدرجتين 0° و– 10° س (Kim وزملاؤه، 1987). والضرر الذي يسببه الصقيع لنسيج النبات يهيئ الظروف المناسبة لدخول الممرض وتكاثره. كما بيّن Azad وSchaad (1988) أن نباتات القمح والشعير والذرة الصفراء وبعض البقوليات المرشوشة بمعلق بكتيري تركيزه 10^8 خلية بكتيرية/مل من البكتريا *X. t* pv. *translucens* تعرضت لضرر الصقيع أكثر من النباتات التي رشت بالماء فقط. أي أنه يزداد خطر الصقيع عندما تتواجد البكتريا على سطح الورقة بتركيز 30 خلية بكتيرية/سم^2 على الأقل.

6- مكافحة مرض تخطط الأوراق البكتيري

تعتمد مكافحة تخطط الأوراق البكتيري على اتباع الدورة الزراعية وزراعة الأصناف المقاومة، إضافة إلى زراعة بذار خالي من الإصابة Clean seeds وحامل لشـــــــهادة صحية وإكثاره في حقول نظيـــــفة من الممرض في مناطق لا تســـــــــمح الظروف المناخيـــــــة فيها بتطوره (Duveiller وزملاؤه، 1997).

ونظراً لعدم وجود مبيدات فعالة في مكافحة المرض في الحقل، فقد ركزت أبحاث المكافحة الكيميائية على **تطهير الحبوب**، مع الأخذ بعين الاعتبار أن هذا الإجراء لا يكفي للقضاء على الممرض (Sands وزملاؤه، 1981). فقد ذكر Duvieller زملاؤه (1997) أن عدد البادرات المصابة تناقص بشكل كبير نتيجة المعاملة بالفورمالين وكبريتات النحاس. لقد تمكن Mehta (1986) من إنقاص تعداد البكتريا *Xtu* بنسبة 80% باستخدام المطهر الفطري Iminoctadine (N,N'''-(iminodi-8,1-octanediyl) bisguanidineiminoctadine) (الاسم التجاري Panoctine Plus) بمعدل 300 مل/ 100 كغ حبوب.

وذكر Stromberg ورفاقه (2004) أنّ تخفيض حجم مجتمع الممرض في الفترة التي يكون فيها موجود بطور متعايش غير طفيلي على سطح الورقة يقلل من شدّة الإصابة بهذا المرض (رش النباتات بمركبات نحاسية مثلاً).

وأفضل طرائق المكافحة هي التي تعتمد على المكافحة الوراثية بزراعة الأصناف المقاومة للبكتيريا. ولكن تربية الأصناف المقاومة لبعض الممرضات تحتاج إلى معرفة واسعة بسلالات الممرض وآلية تطوره وتأقلمه مع الظروف البيئية السائدة والعوائل النباتية وفهم عوامل القدرة الإمراضية لدى هذا الممرض.

لذلك إن العديد من المراكز البحثية بدأت تهتم بدراسة الجينوم البكتيري الذي يعطي معلومات دقيقة عن الممرض وشراسته ولكن هذا العمل يحتاج إلى جهد كبير ونفقات باهظة. ولكن توجد وسيلة أخرى للاستفادة من البيانات الجزيئية التي حصلت عليها هذه المراكز العلمية من خلال جمعها وتحليلها بواسطة **برامج المعلوماتية الحيوية** والاستفادة من النتائج في دراسة ممرضات محلية (**تصميم برايمرات متخصصة لتشخيص ممرض**، دراسة بعض مورثات الشراسة وتحديد درجة قرابتها مع سلالات معروفة عالميا....الخ).

مؤخراً نشر بيانات جينوم إحدى سلالات *Xanthomonas translucens* وهو جينوم السلالة X. translucens pv. undulosa في موقع البنك الوراثي NCBI
http://www.ncbi.nlm.nih.gov برقم تعريف RefSeq: NZ_CP008714.1
ذو الحجم 4.56 Mb ونسبة CG% (68.1) (Peng وزملاؤه، 2016).

والفائدة من معرفة تتالي نكليوتيدات الجينوم بشكلٍ كامل يسمح بتحليل إمراضية هذه البكتريا، تحديد عوامل الشراسة، كيفية تنظيم عوامل الشراسة عند السلالات المدروسة ، النقل الأفقي للمورثات، تحديد مناطق القدرة الإمراضية (Qian وزملاؤه، 2005؛ Kundu وزملاؤه، 2012) . والبحث عن الـ Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPRs) عند هذه البكتريا للتعرف على آليات التطور التي طرأت عليها وبالتالي هذا يساعد في تحديد منشأ وأصل البكتريا المدروسة (Salzberg وزملاؤه، 2008؛ Semenova وزملاؤها، 2009).

وأيضا إجراء التحليل المقارن Comparative analyses الذي يساعد في الكشف لماذا سلالة ما ممرضة واخرى غير ممرضة؛ ويساعد أيضاً في التنبوء أو الكشف عن آلية حدوث الإصابة بالإعتماد على الطرز الوراثي لهذا الممرض؛ وكذلك يساعد في تطوير آليات تسمح بتطوير لقاحات (بالنسبة لممرضات الإنسان والحيوان) أو طرائق مكافحة بالنسبة للمرضات النباتية (Van Sluys وزملاؤه، 2002).
تتضمن نتائج مقارنة الجينومات البكتيرية:

1- التعدد الشكلي الذي ينشأ من اختلاف نكليوتيد واحد (SNPs) Single nucleotide polymorphism.
2- المناطق التي تختلف عن بعضها بأكثر من SNP.
3- التكررات في الجينوم الواحد Duplication.
4- التكررات الترادفية Tandem repeats.

يتم تحديد التنوع من خلال تحليل سلاسل الـ DNA من أجل التصنيف وتحديد درجة القرابة ورسم شجرة القرابة (Goncalves وRosato، 2002) وكذلك التغيرات التي تطرأ على الجينوم البكتيري من خلال تحديد:

- فقد المورثات وتقليص حجم الجينوم بشكلٍ أساسي عند الأنواع التي تعتمد كلياً على عائلها من أجل الحياة، مثل الطفيليات داخل خلوية إجبارية التطفل (Retchless وزملاؤه، 2014). أو اكتساب مورثات بشكلٍ خاص عند الكائنات غير المتطفلة (الحرة) التي تتطلب مصادر وراثية تساعدها على التأقلم مع الظروف البيئية المتغيرة كمقاومة المضادات الحيوية (Mann وChen، 2010).
- الإنتقال الأفقي للمورثات بين الكائنات الموجودة في نفس البيئة (Lee وزملاؤه، 2009).
- إعادة الترتيب الكروموزمي مثل الـ inversions الذي يحدث عند الأنواع المتقاربة (Mahan وRoth، 1991؛ Eisen وزملاؤه، 2000).

و يعتمد تحليل المعطيات الجزيئية لتتالي النكليوتيدات في جينومات البكتيريا على الاستفادة:

- من خصائص البكتريا مثل **محتواها من الـ G+C** المتباين الذي يتراوح بين 25 – 75 % وداخل كل نوع تكون نسبة G+C ثابتة. المحتوى من G+C يمكن أن يتباين داخل الجينوم الواحد. والمناطق التي تحتوي على نسبة G+C غير اعتيادية يمكن أن تعكس اكتساب الـ DNA الغريب (مثل دخول DNA الفاج إلى الجينوم البكتيري) إذا كان المحتوى G+C عالي في مناطق الـ Intergenic يعكس أيضاً وجود مناطق ارتباط عوامل النسخ (Transcription factors) (Lee وزملاؤه، 2009؛ Mann وChen، 2010).
- **تحديد المورثات**: كما نعلم أنّ البكتيريا تتميز بالكثافة العالية للمورثات (تقريباً مورثة واحدة كل 1 كيلوباز (1 Kbp))، بغياب الـ Introns (تتالي من النكليوتيدات التي لا ترمز لأجزاء بروتينية وهي موجودة ضمن مورثات حقيقيات النوى)، والعدد القليل من سلاسل الـ DNA المكررة Repetitive DNA (Rocha، 2003).

مبررات البحث

- أدى الانتشار الوبائي المدمر لمرض التخطط البكتيري في منطقة سراقب في محافظة إدلب إلى خروج صنف جزيرة 17 من الزراعة، وسجل الانتشـــــــار الواسع له في مختلف مناطق الزراعة في ســـــــورية (كيالي، 2004؛ مندو، 2007).

- عدم المعرفة التامة بالمجتمعات البكتيرية من حيث البنية الوراثية والمرضية، إضافةً إلى عدم وجود معطيات كافية عن أصناف القمح المزروعة من حيث مستوى مقاومتها لهذه البكتريا.

- استناداً إلى ما سبق وبسبب الضغط المرضي والأضرار التي تحدثها البكتريا المسببة لهذا المرض على انتاجية القمح كانت دراسة هذه البكتيريا هدفاً لهذا البحث

أهداف البحث

1- إنشاء مجموعة من العزلات البكتيرية ممثلة لمناطق زراعة القمح في سورية. لاستخدامها في دراسات لاحقة مخبرية (تعريف وتشخيص وتباين وراثي).

2- اختبار الإمراضية لهذه العزلات البكتيرية على صنف القمح شام 3 .

3- تحديد التباين الوراثي للمجتمع البكتيري بواسطة تقانات معتمدة على الـ rep-PCR (ERIC-PCR, REP-PCR, BOX-PCR) بهدف تباين السلالات المحلية مما يؤسس للمراقبة الوبائية اللاحقة لنتمكن من تحديد فيما إذا ظهرت سلالات جديدة أم لا.

4- جمع بيانات جزيئية (تتالي النكليوتيدات في الجينوم) منشورة للبكتيريا *Xanthomonas translucens* من بنوك معلوماتية حيوية وتخزينها ومن ثم القيام بتحليلها باستخدام برامج المعلوماتية الحيوية والاستفادة منها بالتشخيص للحد من انتشار المرض لاحقاً في دراسات مستقبلية لتحديد دور بعض المورثات في القدرة الإمراضية .

مواد وطرائق البحث

مكان إجراء البحث:

أجري البحث في مخبر الأمراض البكتيرية ومخبر التقانات الحيوية في كلية الزراعة بجامعة دمشق ومخابر الهيئة العامة للتقانة الحيوية

1- جمع العينات النباتية وعزل البكتيريا:

جُمعت نباتات أبدت أعراض مرض التخطط البكتيري وحبوب لا تبدي أعراض إصابة من أصناف القمح المختلفة والشعير من تسع محافظات في سورية جدول (8)، ودونت عليها البيانات وأحضرت إلى مخبر ممرضات النبات البكتيرية في كلية الزراعة بجامعة دمشق.

عقمت الأنسجة النباتية سطحياً بنقعها بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم 3% لمدة ثلاث دقائق، ثم غُسلت بماء مقطر معقم لإزالة آثار هيبوكلوريت الصوديوم 3 مرات، ثم طحنت العينات بماء مقطر ومعقم، وتركت لمدة 30 دقيقة حتى تتحرر البكتيريا من الأنسجة.

أُخذت قطرة من المعلق ونشرت على وسط مغذي عام YPGA (Yeast extract 7 g/l, Peptone 7 g/l, Glucose 7 g/l and Agar 1.5 g/l) مضافاً له Cyclohexemide 50 mg /لتر كمضاد فطري، حضنت الأطباق على درجة حرارة 28 سْ لمدة 72 ساعة. وأخذت مستعمرات ممثلة للمستعمرات الاكثر شيوعا ونقلت إلى أطباق جديدة حاوية على وسط نصف انتخابي Wilbrink's boric acid-cephalexin (WPC) المفيد في عزل الانماط المرضية لبكتيريا *Xt* (Duveiller، 1990) وحُضر بمزج محلول (Peptone 5g, Sucrose 10g, K2H4O4 0.5g, MgSO4.7H2O 0.25g, Na2SO30.05g, Agar 15g, ماء مقطر 850 ml) مع محلول (Boric Acid 0.75g ، ماء مقطر150 ml) بعد تعقيم المحلولين بشكل منفصل ويضاف للمزيج 10 مغ من الـ Cephalexen و 75 مغ من الـ Cycloheximide بعد التبريد على درجة حرارة 50 سْ، وذلك للحصول على عزلات نقية.

حفظت العزلات البكتيرية في وسط YPG-glycerol المكون من:

(50% من "Yeast extract 7 g/l, Peptone 7 g/l, Glucose 7 g/l" و50% غليسيرول)، وعلى وسط PYDAC (أبو غرة والدوجي، 1996) لحين إجراء الاختبارات.

2- تعريف البكتيريا:

لتعريف البكتيريا أجري عدد من الاختبارات وهي:

1-2 الاختبارات البيوكيميائية:

اختبار غرام (Gram test) باستخدام KOH 3% Ryu (Goszczynska وزملاؤه، 2000)؛ و**اختبار تحريض التجمد** بأخذ 100 ميكروليتر من معلق بكتيري 10^8 cfu/ml ووضعه على شريحة مجهرية مقارنة مع شاهد بدون بكتيريا ثم تحضينه على درجة حرارة -7 سْ لمدة 5-10 دقائق، تجمد المعلق البكتيري مؤشر إيجابي مقارنة بالشاهد غير المتجمد معدل عن (Kim وزملاؤه، 1987)؛ وعدد من الاختبارات البيوكيميائية **(اختبار الأوكسيداز** حسب Kovacs (Goszczynska وزملاؤه، 2000)؛ **اختبار انتاج سكر اللوفان حسب** طريقة Dye وKemp (1977)؛ و**اختبار الكاتلاز** (Goszczynska وزملاؤه، 2000)).

2-2 **اختبار العدوى الاصطناعية**: أجريت عدوى اصطناعية للعزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها بحقن معلق بكتيري بتركيز 10^8 cfu / مل بطريقة الترشيح باستخدام سيرنغ معقم بدون ابرة وذلك ضمن نسيج أوراق بادرات قمح بعمر 15 يوم مزروعة في كؤوس بلاستيكية تحتوي على التورب تحت ظروف حرارة 25-30 سْ وإضاءة (16 ضوء/8 ظلام)، غطيت البادرات المحقونة بأكياس نايليون خلال الساعات الأولى من العدوى لتأمين الرطوبة العالية لتطور المرض. وفحصت البادرات يوميا لمدة اسبوع حيث اعتبرت العزلة ممرضة في حال ظهور أعراض التشبع بالماء و/أو الاصفرار على الأوراق مكان وحول منطقة العدوى، وغير ممرضة عند عدم ظهور تلك الأعراض (Duveiller وزملاؤه، 1997).

3-2 **استخلاص الـ DNA :** استخلص ال DNA من مستعمرات بكتيرية بعمر 24 ساعة باستخدام DNA wizard isolation and purification kit من شركة Promega وفق تعليمات الشركة الصانعة

حددت سلامة الـ DNA بوساطة الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز Agarose 1% المضاف لها ايتيديوم بروميد وباستخدام محلول منظم للرحلان TBE 1X (TBE 10x= 108غ Tris base، 55غ boric acid، 9.3غ 1mM EDTA / 1 ل ماء المقطر).

فحصت الهلامة تحت الأشعة فوق البنفسجية (UV) بوساطة جهاز توثيق الهلامات Gel documentation system (ViLBER LourMat).

واعتبرت عينات الحمض النووي DNA ذات جودة جيدة عند عدم وجود تفكك فيها (Smear).

وحُدد تركيز الـ DNA ونقاوته باستخدام جهاز المطياف الضوئي spectrophotometer (WPA Biowave DNA) عند طول الموجات 260 و280 و230 نانومتر(nm)

[DNA] µg/ml= A_{260}nm*50*التخفيف

يعرف التلوث بالبروتينات من خلال A_{260}nm / A_{280}nm ، والتلوث بالبولي سكاريد من حساب A_{260}nm/ A_{230}nm، وتكون العينة جيدة إذا كانت النسبة بين 1.8-2.2 بالنسبة للبروتينات و(1.7-2.3) بالنسبة للبولي سكاريد.

حضرت تمديدات من عزلات ال DNA بتركيز نهائي 10 نانوغرام / ميكروليتر لاستخدامه في اختبارات الـ PCR المعتمدة على الـ DNA.

4-2 التعريف الجزيئي: أجري تعريف البكتيريا جزيئياً باستخدام تقانة colony- PCR باستخدام بادئات (جدول5) للكشف عن مورثة *rpfB* (regulator of pathogencity factor B) التي تنظم انتاج البولي سكاريد عند الجنس *Xanthomonas* وبادئات متخصصة بالكشف عن قطعة من منطقة الـ ITS عند *X.translucens* صممت باستخدام برنامج primer3 وسلاسل 16S rDNA - 23S rDNA مخزنة في بنك المعلومات للبكتيريا *Xt* على الموقع NCBI، وأيضا تم التعريف بوساطة تقانة تحديد تتابع النكليوتيدات باستخدام بادئات 16S rDNA - 23S rDNA.

جدول5. تتابع النكليوتيدات في البادئات المستخدمة للكشف عن مورثة *rpfB* عند بكتيريا *Xanthomonas* والبادئات المتخصصة لتضخيم partial *ITS* المتخصصة بالنوع *Xt*، وبادئات الـ ITS لتحديد تتابع النكليوتيدات وبادئات البصمة الوراثية PCR (Rep-, ERIC-, BOX-).

الغاية	الجزء الهدف	التسلسل النكليوتيدي للبادئات	درجة الحرارة Tm سْ	الوزن الجزيئي للحزمة bp	المرجع
بادئات للتشخيص	Partial *ITS*	For 5'-CCGCCATAGGGCGGAGCACCC-3' Rev 5'-GCAGGTGCGAGCGTTTGCAGAGGGATCTGCAAAT-3'	64	139	هذا العمل
	مورثة *rpfB*	For 5′-GTC CTT GGT TGC AAA GTT ATC C-3′ Rev 5′-AGG ATC TTG CCG ACG TTG G-3′	62	1636	SIMÕES ورفاقه (2007)
بادئات لتحديد تتابع النكليوتيدات	General ITS [16S rDNA-23S rDNA]	For 5'-GTTCCCGGGCCTTGTACACAC-3' Rev 5'-GGTTCTTTTCACCTTTCCCTC-3'	60	1176	Goncalves وRosato (2002)؛ Li ورفاقه (2011)
بادئات البصمة الوراثية	REP	REP1R-I 5'-IIIICGICGICATCIGGC-3' REP2-I 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3'	40	-	(Wieser *et al.*, 2000)
	ERIC	ERIC1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3' ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	52	-	
	BOX	BOXA1R 5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'	53	-	

-: أوزان جزيئية متباينة حسب توضعها في الجينوم

أجري تفاعل الـ PCR (25 µl حجم نهائي) باستخدام Master Mix 2x (Promega) و 12.5 pmol من البادئ المباشر For [10 µM]، و 12.5 pmol من البادئ غير المباشر Rev [10 µM]، و3 ميكروليتر من معلق بكتيري 10^7 cfu / ml أو 30 ng DNA في تفاعل 16S rDNA-23S rDNA بهدف تحديد تتابع النكليوتيدات في منطقة الـ ITS وأكمل الحجم بالماء المقطر معقم.

و أجري تفاعل PCR باستخدام جهاز المدور الحراري (TECHNE TC-4000) وفق البرنامج التالي:

5 دقائق على درجة حرارة 94 سْ لتكسير الخلايا البكتيرية وفصل سلسلتي الـ DNA تلي بـ 40 دورة (94 سْ لمدة دقيقة؛60 سْ أو 62 سْ أو 64 سْ حسب البادئ المستخدم لمدة دقيقة و 72 سْ لمدة دقيقة لـ partial ITS primer و1.5 دقيقة لـ rpfB primer و General 16S rDNA-23S rDNA primer) ثم 10 دقائق على درجة حرارة 72 سْ كمرحلة أخيرة لاستكمال الاستطالة .

بعد اتمام برنامج الـ PCR لدوراته تم الكشف عن نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي بتطبيق تيار 100 فولط على هلامة أغاروز 1% تحتوي على صبغة الايتيديوم بروماید ضمن محلول TBE 1x(Tris-base, Boric acid, EDTA 1mM) ، بالمقارنة مع مؤشر الوزن الجزيئي 50 bp (Fermentas, GeneRuler^{TM})، وتم إظهار الحزم بالتصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز توثيق الهلامات Gel documentation system (ViLBER LourMat)

5-2 تفاعلات البصمة الوراثية rep-PCR:

أجريت تفاعلات (REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR) المعتمدة على السلاسل التكرارية الموجودة ضمن الجينوم البكتيري لـ 15 DNA من العزلات البكتيرية المدروسة إضافة إلى 6 سلالات أخرى تتبع الجنس *Xanthomonas* (*X.citri pv. malvacearum* (*Xcm*), *X.oryazae pv. Oryzae (Xoo), X.oryazae pv. Oryzaecola (Xoc),X.campestris pv. Campestris (Xcc), X.axononpodis pv. Manihotis (Xam), X.campestris pv. Vesicatoria (Xcv).*) بهدف رسم شجرة القرابة الوراثية.

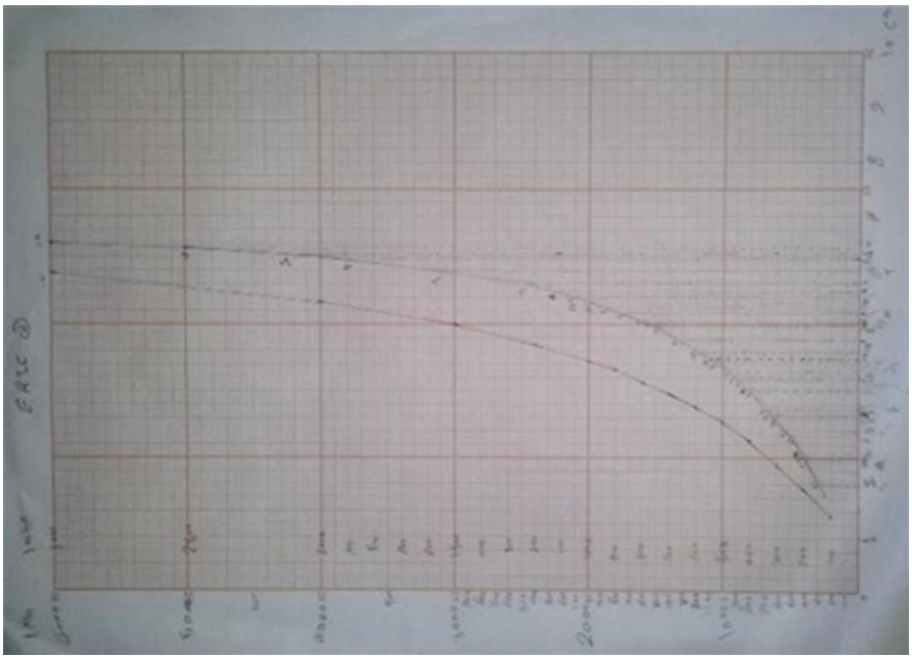
تكون تفاعل الـ PCR من 12.5 µl hot start gotaq Master Mix 2x (Promega) و 12.5 pmol من البادئ المباشر For (10 µM)، و12.5 pmol من البادئ غير المباشر Rev (10 µM) وذلك في تقانتي الـ Eric و Rep أما في تقانة الـ Box تم استخدام 25 pmol من

البادئ Box1R، و5 µl من محلول الـ DNA بتركيز 10 نانوغرام / ميكروليتر و 5 µl ماء مقطر معقم لاكمال حجم التفاعل النهائي إلى 25 µl.

و أجري تفاعل الـ PCR للتقانات الثلاث باستخدام جهاز (eppendorf Mastercycler) وفق المراحل التالية: مرحلة تنشيط الأنزيم وفصل سلسلتي الـ DNA ولمدة زمنية 7 دقائق لدورة واحدة تلتها مرحلة مكررة لـ 35 دورة [denaturation لمدة 1 دقيقة، alignment حسب Tm كل زوج بادئات (جدول5) لمدة دقيقة وبلمرة polymerization لمدة 8 دقائق] ثم مرحلة استطالةfinal extention لدورة واحدة ومدة زمنية 16 دقيقة.

بعد اتمام برنامج الـ PCR لدوراته تم الكشف عن نواتج التفاعل على هلامة أغاروز 1.5% ضمن محلول TBE، بالمقارنة مع مؤشر جزيئي 1kb (Fermentas #SM0333) ومؤشر جزيئي 100 bp (Fermentas #SM0321) وتطبيق تيار كهربائي 100 فولط لمدة ساعتين، ثم إظهار الحزم بعد صبغ الهلامة بمحلول ايتديوم بروميد تركيزه (5 مغ / ل) والتصوير تحت الأشعة فوق البنفسجية باستخدام جهاز توثيق الهلامات Gel documentation system (VILBER LOURMAT).

سُجلت نتائج الرحلان بتحديد الأوزان الجزيئية للحزم الناتجة من التضخيم بتقانة الـ rep-PCR من خلال مقارنتها مع المؤشرات الجزيئية المستخدمة حيث تم رسم المنحنيات البيانية لهذه المؤشرات على أوراق لوغاريتيمية لكل اختبار على حدا وحددت أوزان الحزم بشكل تقريبي من خلال الاسقاط على المنحني البياني المرسوم لتدريجات المؤشر الجزيئي الشكل (2)



الشكل(2) نموذج عن الطريقة المستخدمة في حساب الاوزان الجزيئية التقديرية للحزم المضخمة

ومن ثم حُدد وجود أو غياب الحزم وفق النظام الثنائي (1، 0) وحددت مصفوفة التشابة والتباعد الوراثي بين العزلات المدروسة بكل تقانات rep-PCR حسب Nei (1978) باستخدم برنامج population genetic analysis POPGENE version 1.32، ورسمت شجرات التباين (التباعد) الوراثي باستخدام برنامج Treecon 1.3b بطريقة Neighbor joining بالاعتماد على معادلة Nei وLi (1979) في حساب معامل التباعد وأظهرت الـ Bootstrap على أفرع الشجرة (iteration 100 مرة).

6-2 تحديد تتابع النيكليوتيدات في الـ ITS (16S rDNA-23S rDNA):

أجري هذا التحليل في الهيئة العامة للتقانة الحيوية من قبل الدكتور منار مخول

تم في هذا التحليل استخدام نواتج الـ PCR التي تكشف عن الـ ITS البكتيري (16S rDNA-23S rDNA) كـ DNA لتحديد تتابع النيكليوتيدات فيها.

تم تحضير عينة الـ DNA قبل تحميلها على جهاز الـ ABI PRISM® 310 Sequencer Genetic Analyzer (Applied Biosystem) وفق الخطوات التالية:

2-6-1 معالجة نواتج تفاعل الـPCR بالإنزيمات:

تم التخلص من البادئات الفائضة وغير المرتبطة Unincorporated primers والنوكليوتيدات الحرة dNTPs التي لم تدخل في التفاعلات بالمرحلة السابقة وذلك باستخدام (ExoSAP-IT USB® affymetrix) المكون من مزيج من Exonuclease I و Shrimp Alkaline Phosphatase، وتمت عملية التنقية بإضافة 2µl من ExoSAP-IT إلى 5µl من ناتج تفاعل PCR النهائي، ثم التحضن على مرحلتين :

- 15 دقيقة على درجة حرارة 37 مئوية.
- 15 دقيقة على درجة حرارة 80 مئوية.

نحصل بنهاية هذه العملية على قطعة DNA- نظيفة وخالية من الشوائب، هذه القطعة ستستخدم لاحقاً في مرحلة تحديد التتابعات sequencing.

2-6-2 وسم قطعة DNA المستهدف بالنيكلوتيدات الموسومة

خضعت نواتج تفاعل PCR النقية لتفاعلات تحديد التتابع النوكليوتيدي المستهدفة وذلك من خلال استخدام The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit المتضمن على نوكليوتيدات خاصة موسومة بمواد متوهجة Fluorescent Label تسمى بـ ddNTPs ، وصممت تفاعلات تحديد التتابع بحيث تستخدم كلا سلسلتي قطعة DNA المستهدفة باستخدام البادئين 16S rDNA و 23S rDNA (تفاعلين منفصلين) في مزيج التفاعل PCR التالي:

الجدول (6) مكونات تفاعل تحديد التتابع النكليوتيدي Sequencing

المكونات Components	الحجم Volume
Terminator Ready Reaction Mix	1 µl
(10µM) Primer البادئ	0.5 µl
5X Dilution Buffer	1.5 µl
(30ng) DNA	1 µl
RNase-free water	6 µl
الحجم النهائي	10 µl

وضعت الأنابيب الحاوية على المزيج السابق في جهاز التدوير الحراري Thermo-cycler لإنجاز تفاعل sequencing Cyle وفق البرنامج الحراري المبيّن في الجدول:

الجدول (7) شروط تفاعل تحديد التتابع النكليوتيدي Cycle sequencing

مراحل التفاعل		درجة الحرارة	المدة الزمنية
30 دورة	فصل السلسلتين Denaturation	96°C	**10 sec**
	التحام البادئ Annealing	50°C	**5 sec**
	تركيب السلسلة Extension	72°C	**4 min**

معدّل تبدّل درجات الحرارة =1°C/sec

2- 6- 3 تنقية نواتج تفاعل Cycle sequencing

يتم التخلص من فائض النوكليوتيدات الموسومة Unincorporated dye terminators والتي لم تدخل في تفاعل Cycle sequencing بإستخدام DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) واتبعت تعليمات الشركة الصانعة المرفقة بالكيت.

جففت نواتج تفاعل Cycle sequencing النقية باستخدام جهاز الطرد المركزي مع تفريغ الهواء باستخدام جهاز CentriVap Concentrator لمدة 15 دقيقة وعلى درجة حرارة 45°م.

بعد ذلك حلّت عينات DNA المجففة بإضافة 12µl من محلول الفورماميد Highly Deionized Formamide (ABI)، و حملّت العينات على جهاز تحديد التتابعات النكليوتيدية ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)، وفصل مزيج قطع DNA مع نهاياتها النوكليوتيدية المفلورة ضمن أنابيب شعرية مستقلة حاوية على وسط الفصل البولي أكريلاميد (POP6) والتي تتم ضمنها عملية الرحلان الكهربائي لكل عينة على حدا.

2- 6- 4 تحليل تتابع النيكليوتيدات وتحديد هوية القطعة:

استُخدم برنامج BioEdit Sequence Alignment Editor V7.0.8.0 (Hall، 1999) لتدقيق تسمية النيكليوتيدات basecalling وتحريرها editing، حيث حذفت التتابعات من النهايات ذات الجودة المنخفضة، تبع ذلك تجمع القراءات Reads الناتجة من عمليات تحديد قطع Segment التتابعات النوكليوتيدية، ومن ثمّ اتمام لسلسلة الـ Reverse وقلبها لتوضع بشكل متجاور مع سلسلة الـ Forword بهدف تحديد المناطق overlapping وحذف المتكرر بهدف الوصول إلى كامل التتابع.تم تحديد هوية التتابعات النكليوتيدية الناتجة باستخدام قاعدة البيانات الوراثية من خلال استخدام برنامج BLASTn وBlast-2Sequense المتاحين على موقع NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

أخذت قطع ممثلة للـ ITS عند بعض أنواع *Xanthomonas* **[(** *Xanthomonas campestris pv. campestris* strain 17, CP011946.1 (Liu وزملاؤه، 2015)**)**، *Xanthomonas vesicatoria* ATCC 35937 strain LMG 911, CP018725.1 (Richard، بيانات غير منشورة)**)**، (*Xanthomonas citri pv. malvacearum* strain MSCT, CP017020.1 (Showmaker وزملاؤه، بيانات غير منشورة)**)**، **(***Xanthomonas oryzae pv. oryzae* strain PXO602, CP013679.1 (Quibod وOliva، بيانات غير منشورة)**)**، **(** *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* strain CFBP2286, CP011962.1 (Wilkins وزملاؤه، 2015)**)**، **(** *Xanthomonas translucens pv. translucens* DSM 18974, LT604072.1 (Jaenicke ووملاؤه، 2016)**)**، **(** *Xanthomonas translucens pv. undulosa* strain *Xtu* 4699, CP008714.1 (Peng وزملاؤه، 2016))**]** والتي استخدم DNA سلالات تابعة لها كشاهد في هذه الدراسة وأجري تحليل مقارنة متعدد Multiple alignment باستخدام برنامج Clustal X 2.0.8 ورسمت شجرة القرابة الوراثية بطريقة *neighbor joining* (Larkin وزملاؤه، 2007) وأظهرت ببرنامج TreeView 1.6.6

النتائج والمناقشة

1- عزل وتعريف بكتيريا *Xanthomonas translucens* بالاختبارات البيوكيميائية والعدوى الاصطناعية:

جمعت عينات نباتية (حبوب وأوراق) من 15 منطقة موزعة على تسع محافظات سورية، عزل منها 98 عزلة بكتيرية (نتائج غير معروضة) ثم غربلت العزلات بناءأ على اختبارين (اختبار غرام واختبار تحريض التجمد)، حيث استبعدت العزلات موجبة غرام واحتفظ بالعزلات سالبة غرام (الشكل3، A) التي خضعت لاختبار تحريض التجمد لاحقاً (الشكل 3، B).

يسمح اختبار التجمد باستبعاد جميع العزلات ما عدا عزلات *Xt* وعزلات *Pseudomonas* التي تحرض تجمد الماء بدرجات قريبة من الصفر المئوي، خضعت العزلات الناتجة للاختبارات الكيمياحيوية (اختباراوكسيداز، اختبار كاتلاز، اختبار اللوفان) لتمييز ال *Xt* *عن* *Pseudomonas syringae* حيث *Ps* موجبة لانتاج اللوفان Duveiller ورفاقه (1997) وسالبة لاختبار الكاتلاز Kazempour ورفاقه (2010)، بالنتيجة تم الحصول على 35 عزلة سالبة غرام، موجبة لتحريض التجمد، موجبة الكاتلاز، سالبة أوكسيداز، سالبة اللوفان (جدول 8)، وهذه النتائج تتوافق مع صفات *Xt* كما وصفت من قبل Sands وFourest (1989) وKim ورفاقه (1987) وDuveiller ورفاقه (1997) وAdhikari ورفاقه (2012).

توزعت هذه العزلات على 6 محافظات: ريف دمشق (5)، ادلب (2)، اللاذقية (2)، درعا (1)، دمشق (1)، الحسكة (15)، حماة (9).

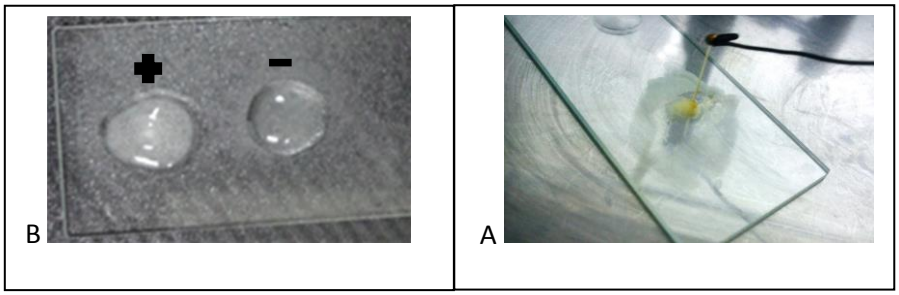
جدول (8) عزلات *Xanthomonas translucens* ومصدرها من المحافظات السورية

مكان الجمع		عدد العينات		العزلات البكتيرية		أسماء العزلات البكتيرية التي تنتمي إلى *Xt*
المحافظة	البلدة	البذرية	الورقية	العدد الكلي	المعتمدة بصفات *Xt*	
ريف دمشق	الطيبة	3	7	8	3	*Xt18.2, Xt19, Xt28*
	جيرود	2	4	4	2	*Xt3.1, Xt35*
	الناصرية	2	2	3	-	-
ادلب	*	3	**	5	2	*Xt4.2, Xt7*
اللاذقية	*	3	**	3	2	*Xt26, Xt27*
درعا	نوى	3	**	3	1	*Xt2.1*
	الصماد	3	**	1	-	-
دمشق	ابو جرش	**	6	4	1	*Xt24.1*
الرقة	*	4	**	2	-	-
الحسكة	تل معروف	3	14	20	5	*Xt5, Xt6, Xt10, Xt12.2,Xt16*
	الدرباسية	3	11	15	7	*Xt8, Xt9.1, Xt11,Xt20, Xt21, Xt22.1, Xt23*
	*	2	7	6	3	*Xt14, Xt25, Xt29*
حماة	طيبة الامام	4	16	14	6	*Xt1.2, Xt13, Xt15, Xt17, Xt33, Xt35*
	مصياف	2	4	6	3	*Xt30, Xt31.1, Xt32.1*
السويداء	*	3	5	4	-	-

*: اسم المنطقة غير محدد بدقة

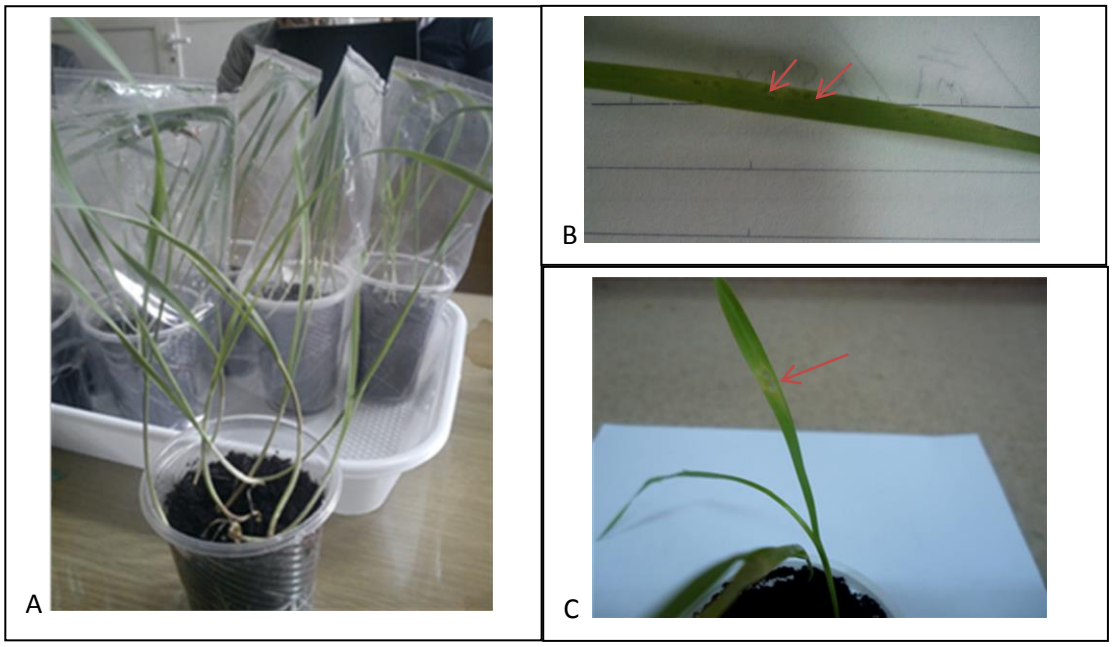
**: لا توجد عينات

- : لا توجد عزلات بكتيرية تتبع *Xt*



الشكل 3: صور توضح اختبار غرام (A) باستخدام محلول باستخدام محلول KoH 3% واختبار تحريض التجمد (B) تشير (+) لمعلق بكتيري تركيزه 10^8 cfu / مل (حسب مواد وطرائق العمل) وتشير (-) إلى الشاهد ماء مقطر معقم

للتأكد من إمراضية العزلات أجريت العدوى الاصطناعية على بادرات قمح صنف شام 3 بمعلق بكتيري تركيزه 10^8 cfu / مل (الشكل A:4) ومراقبة أعراض الإصابة خلال أسبوع من تاريخ العدوى حيث ظهرت أعراض الإصابة تشبع بالماء water soaking بعد 48 ساعة من العدوى (الشكل B:4) أو اصفرار في الفترة اللاحقة (الشكل C:4) وهذا موافق لما ذكره Duveiller ورفاقه (1997) في أن أعراض العزلات الممرضة تكون عبارة تشبع بالماء واصفرار للأنسجة النباتية في منطقة العدوى الاصطناعية.



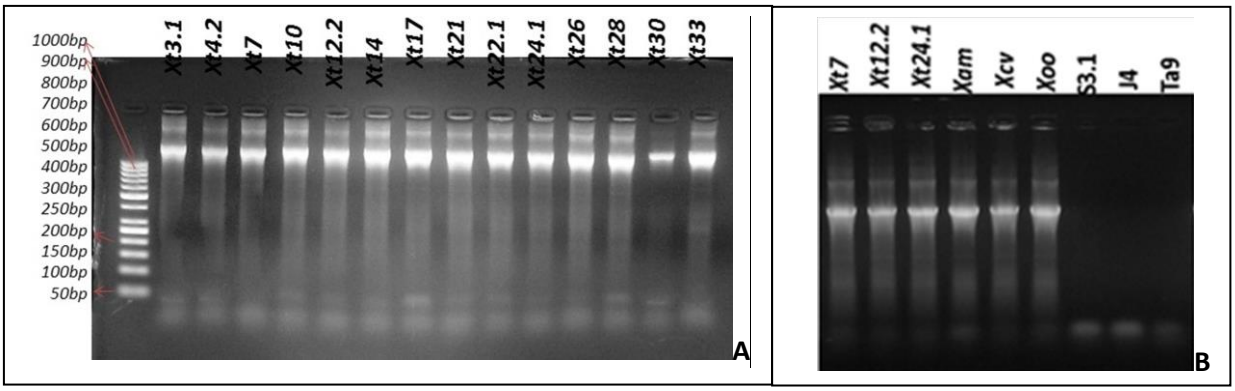
الشكل 4: بادرات قمح شام 3 بعمر 15 يوم معداة بمعلق بكتيري من عزلات *Xt* 10^8 cfu / مل ومغطاة بأكياس نايلون لتأمين الرطوبة الضرورية لتطور المرض (A) أعراض تشبع بالماء water soaking بعد 48 ساعة من العدوى (B) أعراض اصفرار بعد 96 ساعة من العدوى (C)

2- تعريف البكتيريا بالطرق الجزيئية:

عزل الحمض النووي الـ DNA من العزلات البكتيرية وأُكدت سلامته بالرحلان الكهربائي وقيست نقاوته وتركيزه بوساطة جهاز المطياف الضوئي وجهزت من كل عزلة DNA محلول DNA ممدد بتركيز 10 ng/µl وحفظ في المجمدة لحين استخدامه في التجارب اللاحقة.

تعتبر التقانات المعتمدة على الـ DNA سريعة ومتخصصة وذات حساسية وموثوقية عالية وذات صلة بالإمراضية (Louws وزملاؤه، 1994؛ Rademaker وزملاؤه، 2006)، وبناء عليه تم تأكيد التعريف بالكشف عن مورثة *rpfB* *التي* تتحكم بتعبير المورثات المسؤولة عن انتاج الـ polysaccharides عند الجنس *Xanthomonas* من خلال استخدام بادئات تسمح بتضخيم قطعة بوزن جزيئي 1636 bp من المورثة *rpfB* حيث أجري هذا الاختبار على 15 عزلة من أصل ال 35 عزلة التي كانت موافقة لمواصفات *Xanthomonas* بالمقارنة مع 3 عزلات تم الحصول عليها خلال الدراسة ولم توافق مواصفات *Xanthomonas* كشاهد سلبي و DNA ل 3 سلالات بكتيرية تنتمي للجنس *Xanthomonas* وهي *X.oryazae pv. oryzae(Xoo), X.axononpodis pv. manihotis(Xam), X.campestris pv. vesicatoria(Xcv)* كشاهد إيجابي، وجود هذه الحزمة يشير إلى أن البكتيريا تنتمي إلى الجنس *Xanthomonas* .

أظهرت النتائج أن العزلات التي أعطت نتائج موافقة لـ *Xt* بالعدوى الاصطناعية والصفات البيوكيميائية، أعطت نتائج ايجابية وظهرت الحزمة ذات الوزن الجزيئي 1636 bp الخاصة بالمورثة *rpfB* (الشكل 5، A) وكذلك عند العزلات المرجعية (*Xoo, Xam, Xcv*) الشاهد الإيجابي، بينما لم تظهر أي حزم عند العزلات التي لم تعط نتائج موافقة لـ *Xt* الشاهد السلبي (الشكل5، B) وهذه النتيجة موافقة لما ذكره SIMÕES ورفاقه (2007) في أن مورثة ال *rpfB* موجودة في أنواع *Xanthomonas* .



الشكل5: نتائج تفاعلات الـ PCR باستخدام زوج بادئات rpfB جدول(1) والرحلان الكهربائي على هلامة آغاروز1% تظهر حزمة بالوزن المتوقع 1636 bp عند عزلات *Xanthomonas translucens* مع التنبيه بأن العزلة *Xt34*: نتائجها في الشكل (7)(A) وعند عزلات (*Xoo, Xam,Xcv*) (B) بينما لم تظهر الحزمة عند عزلات (S3.1, J4, Ta9) (B)

وخلال هذه الدراسة تم تصميم زوج بادئات يسمح بتضخيم قطعة بوزن جزيئي 139 bp من منطقة الـ ITS عند البكتيريا *Xanthomonas translucens pv. translucens* و*Xanthomonas translucens pv. undulosa* باستخدام برنامج primer three الموجود على موقع NCBI-Blast والاستفادة من سلاسل النكليوتيدات لمنطقة 16s-23s rDNA المنشورة في بنك المعلومات، واختبر تخصص البادئ عبر تحليل معلوماتي حيوي (الشكل 6).

Primer pair 1

	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCGCCATAGGGCGGAGCACCC	21	69.82	76.19	10.00	3.00
Reverse primer	GCAGGTGCGAGCGTTTGCAGAGGGATCTGCAA	32	75.01	59.38	10.00	10.00

Products on target templates

>CP008714.1 *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* strain Xtu 4699, complete genome

```
product length = 139
Forward primer  1       CCGCCATAGGGCGGAGCACCC  21
Template        441114  .....................  441134

Reverse primer  1       GCAGGTGCGAGCGTTTGCAGAGGGATCTGCAA  32
Template        441252  ................................  441221
```

>KC896621.1 *Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* culture-collection NCPPB:2828 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence

```
product length = 139
Forward primer  1     CCGCCATAGGGCGGAGCACCC  21
Template        1577  .....................  1597

Reverse primer  1     GCAGGTGCGAGCGTTTGCAGAGGGATCTGCAA  32
Template        1715  ................................  1684
```

>GU058928.1 *Xanthomonas translucens* strain IPPBC 3302 clone 2-uni 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence

```
product length = 139
Forward primer  1    CCGCCATAGGGCGGAGCACCC  21
Template        174  .....................  194

Reverse primer  1    GCAGGTGCGAGCGTTTGCAGAGGGATCTGCAA  32
Template        312  ................................  281
```

>AY994098.1 *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* strain DAR 35705 16S-23S intergenic spacer, tRNA-Ala and tRNA-Ile genes, complete sequence

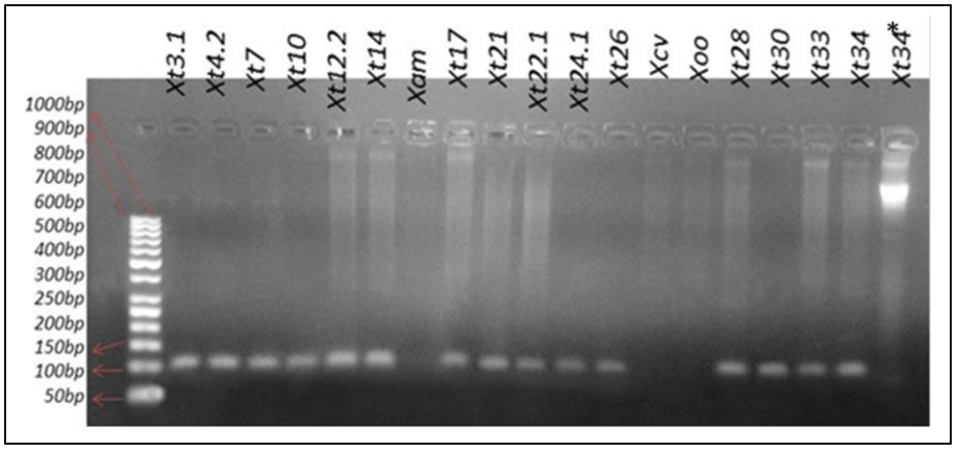
```
product length = 139
Forward primer  1   CCGCCATAGGGCGGAGCACCC  21
Template        76  .....................  96

Reverse primer  1    GCAGGTGCGAGCGTTTGCAGAGGGATCTGCAA  32
Template        214  ................................  183
```

>AY579378.1 *Xanthomonas translucens* strain p7 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, tRNA-Ala and tRNA-Ile genes, complete sequence

```
product length = 139
Forward primer  1   CCGCCATAGGGCGGAGCACCC  21
Template        76  ......C..............  96

Reverse primer  1    GCAGGTGCGAGCGTTTGCAGAGGGATCTGCAA  32
Template        214  ................................  183
```

الشكل (6) اختبار تخصصية بادئ (Xt) *In Silico* باستخدام برنامج primer Blast على موقع NCBI، يشمل الاختبار مقارنة هذه البادئات مقابل كل ما يحويه بنك المعلومات من سلاسل نكليوتيدية لجميع الكائنات الحية (nr) لغاية شهر تموز 2016

بينت نتائج تفاعل الـ PCR على العزلات الخمسة عشر المختبرة بالـ rpfB والموافقة لمواصفات *Xanthomonas* بالمقارنة مع DNA السلالات الثلاثة المرجعية المنتمية للجنس *Xanthomonas* (*Xoo, Xam, Xcv*) باستخدام البادئات المصممة أنّ الحزمة المتوقعة بوزن 139 bp فقط ظهرت عند بكتيريا *Xt* (الشكل7)



الشكل (7) نتائج الرحلان باستخدام البادئ Xt وتظهر الحزمة بالوزن المتوقع 139 bp عند عزلات (*Xt3*.1, Xt4.2, *Xt7*, *Xt10*, Xt12.2, *Xt14*, *Xt17*, *Xt21*, Xt22.1, *Xt24*.1, *Xt26*, *Xt28*, *Xt30*, *Xt33*, *Xt34*) بينما لم تظهر أي حزمة عند الأنواع المرجعية (*Xoo, Xam,Xcv*)، الحزمة *Xt34: نتائج الرحلان الكهربائي للكشف عن *rpfB* عند العزلة *Xt34*

وبالتالي هذا يشير إلى أن العزلات المدروسة تنتمي إلى أحد النوعين *Xtu* أو *Xtt*.

وبذلك يكون قد تم تصميم بادئات متخصصة بالكشف عن *Xt* التي تصيب القمح مما يساعد في سهولة تشخيص *Xt* وتمييزها عن غيرها من الأمراض البكتيرية الأخرى التي تصيب النجيليات وبشكل خاص القمح.

ولابد لتمييز *Xtu* عن *Xtt* من إجراء بصمة وراثية باستخدام تقانة REP, ERIC, BOX (PCR) التي تسمح بتفريق السلالات عن بعضها البعض.

3- التباين الوراثي لعزلات *Xt*:

أجريت اختبارات البصمة الوراثية rep_PCR بأنواعها الثلاث (REP-, ERIC-, BOX-PCR) على 15 عزلة سورية تم تحديد انتمائها إلى النوع *X.t* بوساطة الاختبارات الكيمياحيوية والجزيئية بهدف تحديد تباينها الوراثي ودرجة قرابتها من 6 سلالات تنتمي لأنواع تتبع الجنس *Xanthomonas* وهي *X.citri pv. malvacearum* (*Xcm*), *X.oryazae pv. Oryzae (Xoo), X.oryazae pv. Oryzaecola (Xoc),X.campestris pv. Campestris (Xcc), X.axononpodis pv. Manihotis (Xam), X.campestris pv. Vesicatoria (Xcv).*

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي لتقانات rep-PCR وجود 88 حزمة مميزة توزعت لـ (34، 30، 24) حزمة للتقانات BOX-PCR (الشكل 8:a)، ERIC-PCR (الشكل 8:b) والـ REP-PCR (الشكل'8:c,8:c) على التوالي.

وتبين وجود تباين وراثي بالنسبة لتقانة الـ BOX-PCR بالعزلات حيث كانت الـ 34 حزمة الناتجة جميعها حزم polymorphic الشكل (8:a)

حسبت اوزان هذه الحزم بشكل تقريبي وتراوحت أوزانها مابين 160bp الحزمة (1) إلى 3280 bp الحزمة (34) الجدول (9).

وكانت الحزمة 13 ذات الوزن الجزيئي التقريبي 540 bp حزمة مميزة للنوع *Xt*، فقد كانت حزمة مميزة لجميع سلالاته في حين أنها لم تظهر في عزلات أنواع *Xanthomonas* الأخرى المدروسة،أما باقي الحزم التي ظهرت في عزلات *Xt* لم تكن مميزة لها حيث ظهرت في بعض أنواع *Xanthomonas* الأخرى من بينها كانت الحزمة 20 ذات الوزن الجزيئي التقريبي 860 bp موجودة في جميع عزلات *Xt* المدروسة إضافة لوجودها في العزلة *Xcc* الشكل (8:a).

بالنسبة لتقانة ERIC-PCR كانت جميع الحزم الناتجة الـ 30 حزم ploymorphic الشكل (8:b)

وحُددت الأوزان الجزيئية التقربية لها حيث كان أعلى وزن جزيئي 5000 بينما الحزمة الأقل وزناً كانت 280 bp الجدول (9)

كانت الحزمة 15' ذات الوزن الجزيئي التقريبي 1100 bp حزمة مميزة لسلالات *Xt* المدروسة حيث أنها لم تظهر في أي نوع من أنواع *Xanthomonas* الأخرى المدروسة، في حين أنّ الحزمة 22' ذات الوزن الجزيئي التقريبي 1870 bp كانت حزمة مميزة على مستوى الطرز الوراثي للنوع *Xt* فقد ظهرت ببعض عزلاته (Xt33, Xt7, Xt4.2, Xt26, Xt30, Xt10, Xt34, Xt22.1, Xt21) ولم تظهر في عزلاته الأخرى وأيضا غابت بشكل كامل في عزلات أنواع *Xanthomonas* الأخرى المدروسة وهذا يؤكد ما ذكره Asgranil ورفاقه (2012) بأنّ تقانة ERIC-PCR تسمح بتمييز تحت الأنواع المرضية للجنس *Xanthomonas* .

ظهرت بقية الحزم الناتجة في سلالات *Xt* باستخدام هذه التقانة في بعض الأنواع الأخرى أو أحدها فمثلا الحزمتين 7' و9' كانتا حزم مميزة للنوع *Xt* و *Xcc*.

لم تختلف تقانة REP-PCR عن التقانتين السابقتين حيث كانت جميع الحزم الـ 24 الناتجة حزم polymorphic الشكل (8:c) والشكل ('8:c) حيث تم اعادة اجراء اختبار الـ PCR للعزلات (Xt24.1, Xt26, Xt10, Xt22.1).

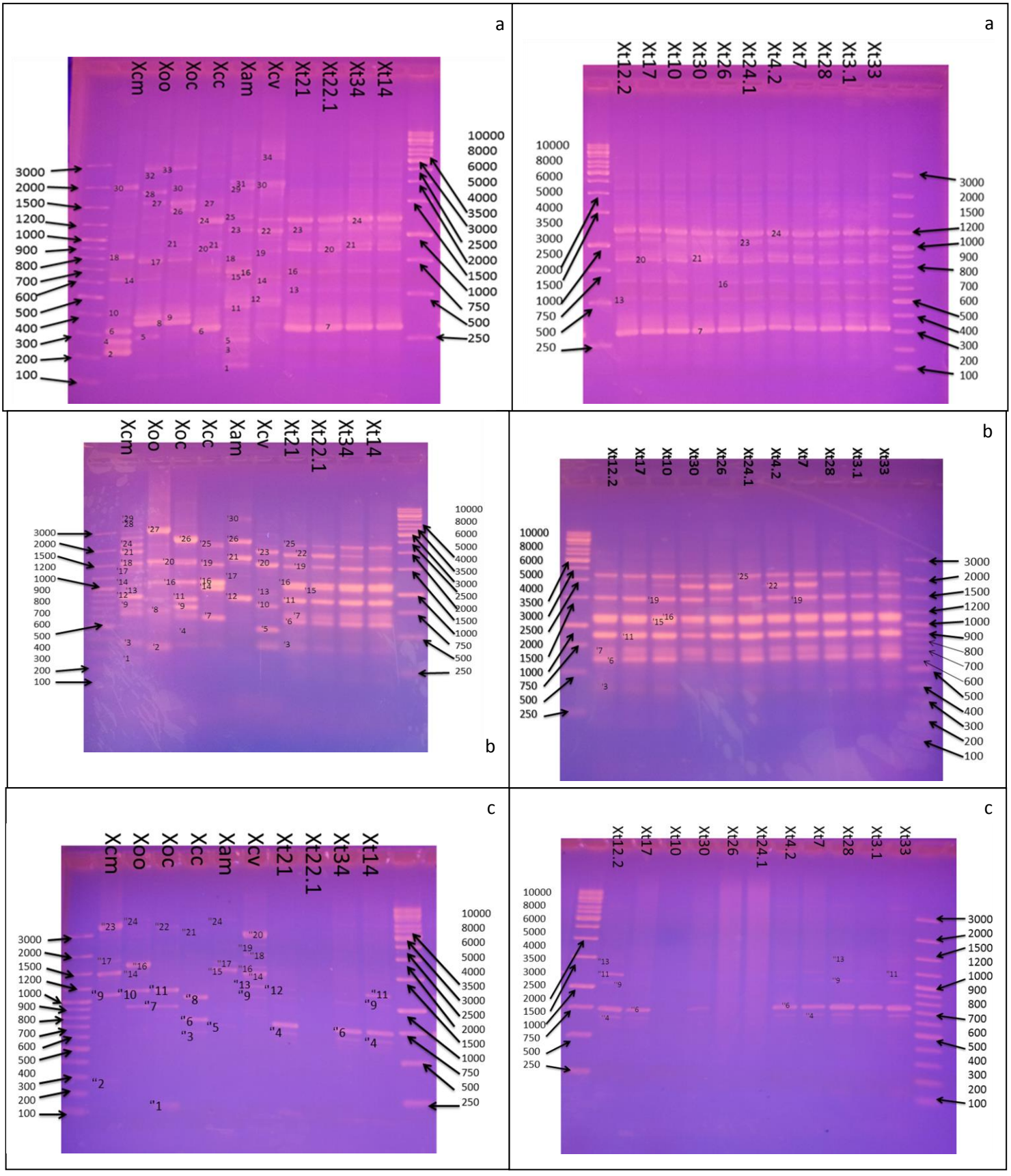
تراوحت الأوزان الجزيئية التقريبية الناتجة في هذه التقانة ما بين 140 - 3790 bp الجدول (9)

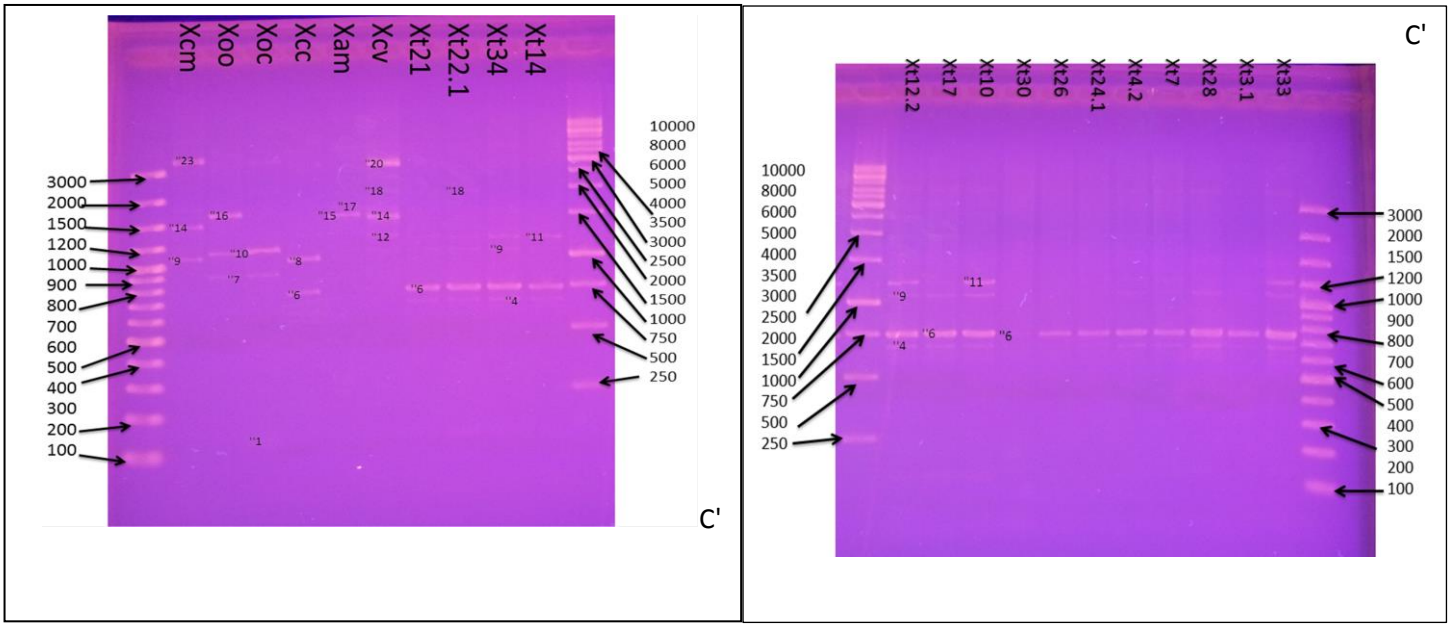
ونجد أن كلاً من الحزمة 11" (1220 bp) والحزمة 13" (1450 bp) كانتا حزم مميزة لبعض سلالات *Xt*، ظهرت11" في عزلات (Xt33, Xt7, Xt4.2, Xt10, Xt12.2, Xt14, Xt34, Xt22.1, Xt21) وظهرت 13" في عزلات (Xt33, Xt3.1, Xt28, Xt17, Xt12.2) وغابتا كليا في أنواع *Xanthomonas* الأخرى المدروسة، في حين لوحظ أنّ الحزمة 4" (670 bp) والحزمة 6" (850 bp) أنهما حزم مميزة لسلالات *Xt* و*Xcc* الشكل (8:c) والشكل ('8:c).

الحزم المميزة للنوع *Xt* ولسلالاته يمكن استخراجها من الهلامة وتحديد تتابع النكليوتيدات فيها والاستفادة منها لاحقاً بتصميم بادئات متخصصة تسمح بتعريف النوع أو تحت النوع أو الطرز الوراثي.

توافق هذه النتائج ما ذكره Wilson وSharp (2006) بأن تضخيم القطع الواقعة بين التكرارات ينتج عنها بصمة وراثية نوعية لكل سلالة عند إجراء الرحلان الكهربائي

وكما ذكر Wieser وBusse (2000) بأنّ هذه البصمة الوراثية كافية لدراسة التشابة ضمن السلالات المختلفة للأنواع .


a
Xcm
Xoo
Xoc
Xcc
Xam
Xcv
Xt21
Xt22.1
Xt34
Xt14
Xt12.2
Xt17
Xt10
Xt30
Xt26
Xt24.1
Xt4.2
Xt7
Xt28
Xt3.1
Xt33
10000
8000
6000
5000
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
750
250
b
c



الشكل(8) حزم التعددية الشكلية التي ظهرت بالرحلان الكهربائي على هلامة Agarose 1.5 % لنواتج تفاعل تقانات rep-PCR على عزلات سورية من *Xanthomonas translucens* ومقارنتها مع عزلات نموذجية لأنواع تابعة للجنس*Xanthomonas* (راجع المواد والطرائق) (a) BOX-PCR (b) ERIC-PCR (c) و('c) REP-PCR

جدول (9) الأوزان الجزيئية (bp) التقديرية للحزم الناتجة في اختبار البصمة الوراثية rep-PCR

أوزان الحزم التقريبية التي ظهرت في اختبار BOX-PCR		أوزان الحزم التقريبية التي ظهرت في اختبار ERIC-PCR		أوزان الحزم التقريبية التي ظهرت في اختبار REP-PCR	
رمز الحزمة	الوزن	رمز الحزمة	الوزن	رمز الحزمة	الوزن
1	160	'1	280	"1	140
2	210	'2	380	"2	260
3	240	'3	400	"3	640
4	250	'4	500	"4	670
5	260	'5	540	"5	680
6	320	'6	630	"6	730
7	340	'7	650	"7	850
8	380	'8	680	"8	1000
9	400	'9	810	"9	1050
10	410	'10	830	"10	1130
11	440	'11	890	"11	1220
12	470	'12	920	"12	1280
13	540	'13	960	"13	1450
14	630	'14	1060	"14	1500
15	640	'15	1100	"15	1530
16	660	'16	1180	"16	1610
17	780	'17	1340	"17	1690
18	800	'18	1500	"18	1900
19	840	'19	1550	"19	2370
20	860	'20	1600	"20	2900
21	920	'21	1760	"21	3000
22	1090	'22	1870	"22	3280
23	1120	'23	2000	"23	3420
24	1250	'24	2120	"24	3790
25	1310	'25	2260		
26	1400	'26	2500		
27	1500	'27	3000		
28	1780	'28	3800		
29	1900	'29	4260		
30	2000	'30	5000		
31	2050				
32	2500				
33	2770				
34	3280				

1-3 تحليل نتائج البصمة الوراثية rep-PCR ورسم شجرة القرابة الوراثية:

تم كتابة نتائج الصور بالنظام الثنائي (0,1) تعبيرا عن (الحزمة موجودة، أو غير موجودة) حسب التباعد بين العزلات عن طريق برنامج population genetic analysis POPGENE version 1.32 حسب معامل Nei (1978) وذلك لتقانات rep-PCR كاملة

وبينت النتائج أن أقرب الأنواع البكتيرية لسلالات *Xt* كانت السلالة *Xcc بنسبة* تشابه تجاوزت الـ 82 % تلتها السلالة *Xoc* بنسبة تشابه حوالي 65 %، بينما السلالة الأبعد عن سلالات *Xt* كانت سلالة *Xcm* بنسبة تشابه حوالي 52 %.

وتراوحت نسب التشابه بين سلالات *Xt* فيما بينها من 94 % (بين Xt22.1 من جهة وسلالات Xt28, Xt3.1, Xt17) إلى 100 % (Xt4.2 مع Xt7) الجدول (10) .

التشابه

Pop ID	Xt33	Xt3.1	Xt28	Xt7	Xt4.2	Xt24.1	Xt26	Xt30	Xt10	Xt17	Xt12.2	Xt14	Xt34	Xt22.1	Xt21	Xcr	Xam	Xcc	Xoc	Xoo	Xcm
Xt33	****	0.9659	0.9659	0.9886	0.9886	0.9773	1.0000	1.0000	0.9886	0.9659	0.9773	0.9773	0.9886	0.9773	0.9886	0.5909	0.5795	0.8182	0.6477	0.5795	0.5114
Xt3.1	0.0347	****	1.0000	0.9545	0.9545	0.9886	0.9659	0.9659	0.9545	1.0000	0.9886	0.9659	0.9545	0.9432	0.9545	0.6250	0.6136	0.8295	0.6591	0.6136	0.5455
Xt28	0.0347	0.0000	****	0.9545	0.9545	0.9886	0.9659	0.9659	0.9545	1.0000	0.9886	0.9659	0.9545	0.9432	0.9545	0.6250	0.6136	0.8295	0.6591	0.6136	0.5455
Xt7	0.0114	0.0465	0.0465	****	1.0000	0.9659	0.9886	0.9886	1.0000	0.9545	0.9659	0.9886	1.0000	0.9886	1.0000	0.6023	0.5909	0.8295	0.6591	0.5909	0.5227
Xt4.2	0.0114	0.0465	0.0465	0.0000	****	0.9659	0.9886	0.9886	1.0000	0.9545	0.9659	0.9886	1.0000	0.9886	1.0000	0.6023	0.5909	0.8295	0.6591	0.5909	0.5227
Xt24.1	0.0230	0.0114	0.0114	0.0347	0.0347	****	0.9773	0.9773	0.9659	0.9886	1.0000	0.9773	0.9659	0.9545	0.9659	0.6136	0.6023	0.8182	0.6477	0.6023	0.5341
Xt26	0.0000	0.0347	0.0347	0.0114	0.0230	****	1.0000	0.9886	0.9659	0.9773	0.9773	0.9773	0.9886	0.9773	0.9886	0.5909	0.5795	0.8182	0.6477	0.5795	0.5114
Xt30	0.0000	0.0347	0.0347	0.0114	0.0230	0.0000	****	0.9886	0.9659	0.9773	0.9773	0.9773	0.9886	0.9773	0.9886	0.5909	0.5795	0.8182	0.6477	0.5795	0.5114
Xt10	0.0114	0.0465	0.0465	0.0000	0.0347	0.0114	0.0114	****	0.9545	0.9659	0.9886	1.0000	0.9659	0.9545	0.9659	0.6023	0.5909	0.8295	0.6591	0.5909	0.5227
Xt17	0.0347	0.0000	0.0000	0.0465	0.0114	0.0347	0.0230	0.0347	****	0.9886	0.9659	0.9545	0.9432	0.9545	0.9659	0.6250	0.6136	0.8295	0.6591	0.6136	0.5455
Xt12.2	0.0230	0.0114	0.0114	0.0347	0.0000	0.0230	0.0230	0.0347	0.0114	****	0.9773	0.9659	0.9545	0.9659	0.9659	0.6136	0.6023	0.8182	0.6477	0.6023	0.5341
Xt14	0.0230	0.0347	0.0347	0.0114	0.0230	0.0230	0.0230	0.0114	0.0347	0.0230	****	0.9886	0.9773	0.9886	0.9886	0.6136	0.6023	0.8409	0.6705	0.6023	0.5341
Xt34	0.0114	0.0465	0.0465	0.0000	0.0000	0.0114	0.0114	0.0000	0.0465	0.0347	0.0114	****	0.9886	0.9773	0.9886	0.5909	0.5909	0.8295	0.6591	0.5909	0.5227
Xt22.1	0.0230	0.0585	0.0585	0.0114	0.0114	0.0465	0.0230	0.0114	0.0585	0.0465	0.0230	0.0114	****	0.9886	0.6136	0.5795	0.8182	0.6477	0.5795	0.5114
Xt21	0.0114	0.0465	0.0465	0.0000	0.0000	0.0347	0.0114	0.0000	0.0465	0.0347	0.0114	0.0000	0.0114	****	0.6023	0.5909	0.8295	0.6591	0.5909	0.5227
Xcr	0.5261	0.4700	0.4700	0.5070	0.5070	0.4884	0.5261	0.5070	0.4700	0.4884	0.4884	0.5070	0.4884	0.5455	****	0.5795	0.6136	0.6023	0.5682	0.6023	0.5795
Xam	0.5455	0.4884	0.4884	0.5261	0.5261	0.5070	0.5455	0.5261	0.4884	0.5070	0.5070	0.5261	0.5455	0.5261	0.5455	****	0.6023	0.5682	0.5682	0.5682	0.5682
Xcc	0.2007	0.1869	0.1869	0.1869	0.1869	0.2007	0.2007	0.1869	0.1869	0.2007	0.1733	0.1869	0.2007	0.1869	0.4884	0.5070	****	0.6705	0.6250	0.5341	0.5227
Xoc	0.4343	0.4169	0.4169	0.4169	0.4343	0.4343	0.4343	0.4169	0.4169	0.4343	0.3998	0.4169	0.4343	0.4169	0.5070	0.5653	0.3998	****	0.7727	0.5909	0.5227
Xoo	0.5455	0.4884	0.4884	0.5261	0.5261	0.5070	0.5455	0.5261	0.4884	0.5070	0.5070	0.5261	0.5455	0.5261	0.5070	0.5653	0.4700	0.2578	****	0.6487	0.5227
Xcm	0.6707	0.6061	0.6061	0.6487	0.6487	0.6272	0.6707	0.6487	0.6061	0.6272	0.6272	0.6487	0.6707	0.6487	0.6487	0.5455	0.5653	0.6272	0.5261	0.6487	****

الجدول (10) مصفوفة التشابه والتباعد لعزلات *Xt* وانواع *Xanthomonas* حيث حسبت حسب معامل Nei (1978) باستخدام برنامج POPGENE

وبالاعتماد على تحليل التباين رسمت شجرات التباعد الوراثي ذات الجذر لاختبارات (REP-, ERIC-,BOX-) PCR منفردة وشجرة تجمع التقانات كلها بتطبيق طريقة Neighbor joining بالاعتماد على معادلة Nei وLi (1979) وأظهرت الـ Bootstrap على أفرع الشجرة (100 iteration مرة) وباستخدام برنامج Treecon version 1.3b.

انقسمت شجرة التباعد الوراثية المرسومة للعزلات بالاعتماد على BOX-PCR إلى عنقودين أحدهما ضمّ عزلات *Xt* والآخر العزلات التابعة لأنواع *Xanthomonas* المدروسة، ضمت عنقود *Xt* تحت عنقودين منفصلين، حوى تحت العنقود الأول عزلات (Xt7, Xt33, Xt26, Xt4.2, Xt21, Xt22.1, Xt34, Xt14, Xt10, Xt30) بينما حوى تحت العنقود الثاني عزلات (Xt28, Xt12.2, Xt24.1, Xt3.1, Xt17)، والتباعد الوراثي بين تحت المجموعتين كان أقل من 10 % الشكل (9:a)

وأيضا انقسمت شجرة التباعد الوراثية التي رسمت لهذه العزلات حسب نتائج تقانة ERIC-PCR إلى عنقودين متمايزين ضم الأول عزلات *Xt* والآخر العزلات التابعة لجنس *Xanthomonas*، وتوزعت عزلات *Xt* ضمن تحت عنقودين لكن الفرق عن شجرة الـ BOX أن العزلة Xt14 قد انضمت لتحت العنقود الثاني الذي يضم عزلات (Xt12.2, Xt17, Xt24.1, Xt28, Xt3.1) الشكل (9:b)

لم تختلف الشجرة المرسومة بالاعتماد على نتائج تقانة REP-PCR عن سابقتيها في جمع عزلات *Xt* ضمن عنقود مستقل والعنقود الآخر باقي عزلات *Xanthomonas* ، انقسم بدوره عنقود *Xt* إلىتحت عنقودين، الأول ضم عزلة Xt22.1 في حين انقسمت تحت العنقود الثاني لمجموعتين، ضمت المجموعة الأولى (Xt14, Xt21, Xt34, Xt10, Xt4.2, Xt7) أما المجموعة الأخرى انقسمت لـ 3 أفرع الفرع الأول عزلتي (Xt30, Xt26) والفرع الثاني ضم (Xt33, Xt12.2) أما عزلات (Xt28, Xt3.1, Xt17, Xt24.1) كانوا في الفرع الثالث الشكل (9:c).

وعند رسم شجرة التباعد الوراثية اعتمادا على نتائج البصمة الوراثية rep-PCR كاملة انفصلت عزلات *Xt* في عنقود مستقل عن العنقود الآخر الذي ضم باقي عزلات أنواع *Xanthomonas* الأخرى المدروسة وانقسم عنقود *Xt* إلى تحت عنقودين؛ انقسم تحت العنقود الأول إلى مجموعتين الأولى ضمت عزلة واحدة Xt12.2 وضمت المجموعة الثانية عزلات (Xt24.1, Xt17, Xt28, Xt3.1)، انقسم تحت العنقود الثاني لعزلات *Xt* بدوره إلى مجموعتين أيضا،

حوت الأولى عزلة Xt14، وانقسمت المجموعة الثانية لفرعين؛ الأول ضمّ (Xt30, Xt26, Xt33) وضم الفرع الثاني عزلات (Xt21, Xt34, Xt10, Xt4.2, Xt7) الشكل (9:d)

وبالتالي يمكن الاشارة إلى وجود 6 طرز وراثية مختلفة من *Xt* المعزولة من عينات قمح في المناطق الجغرافية المزروعة به.

توافق هذه النتائج ما ظهر مع Rademaker وزملاؤه (2005) بأنّ بصمة rep-PCR تميز أنواع *Xanthomonas* المختلفة بدقة فقد ميزت مجموعات تحت نوعية تضمنت *X.hortum, X.arboricola, X.axonopodis, X.oryzae, X.campestris, X.translucens*

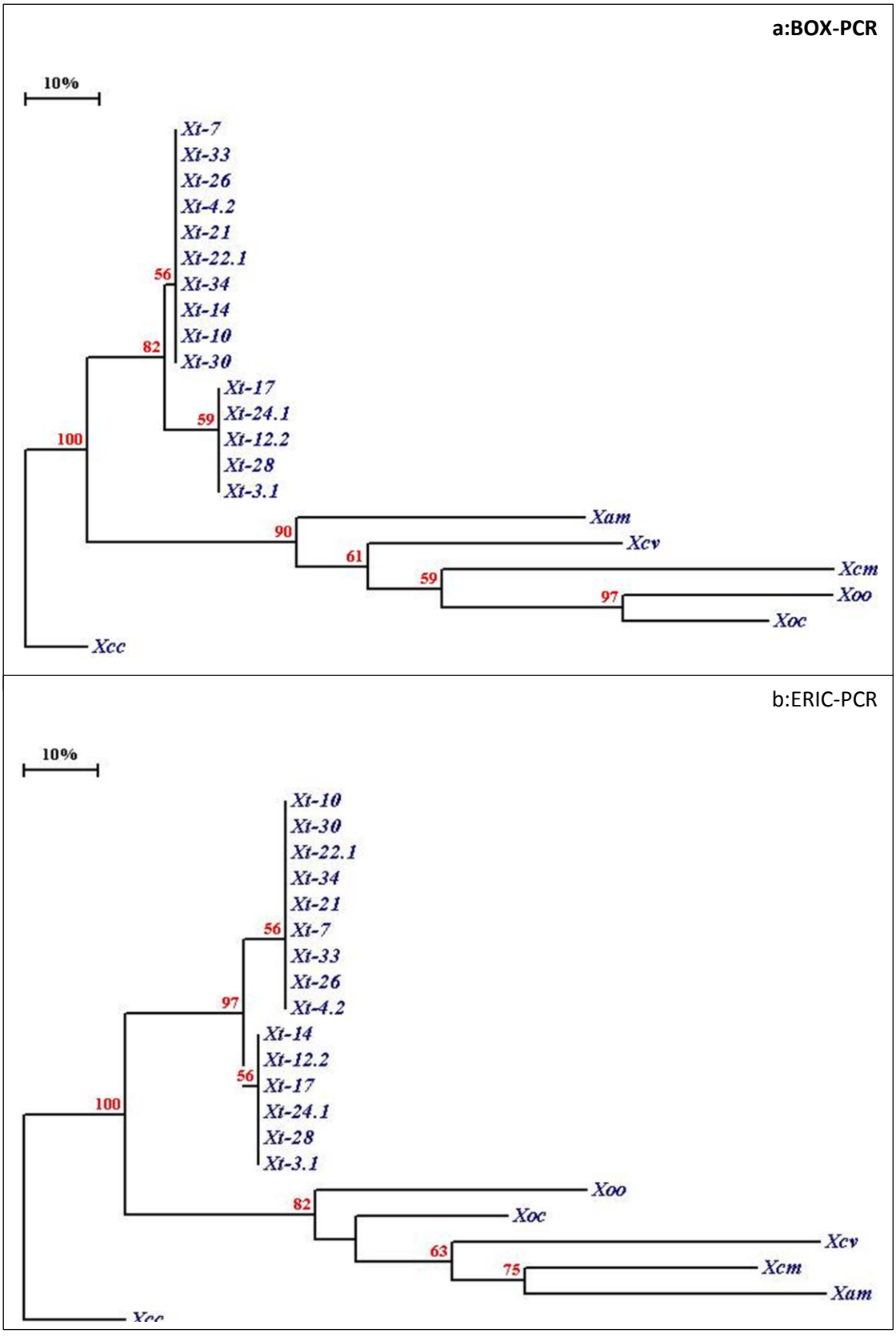
وتوافق ما ذكره Gonzales (2007) بأنّ بصمة rep-PCR تميّز بين *Xt* و*Xoo* و*Xoc*

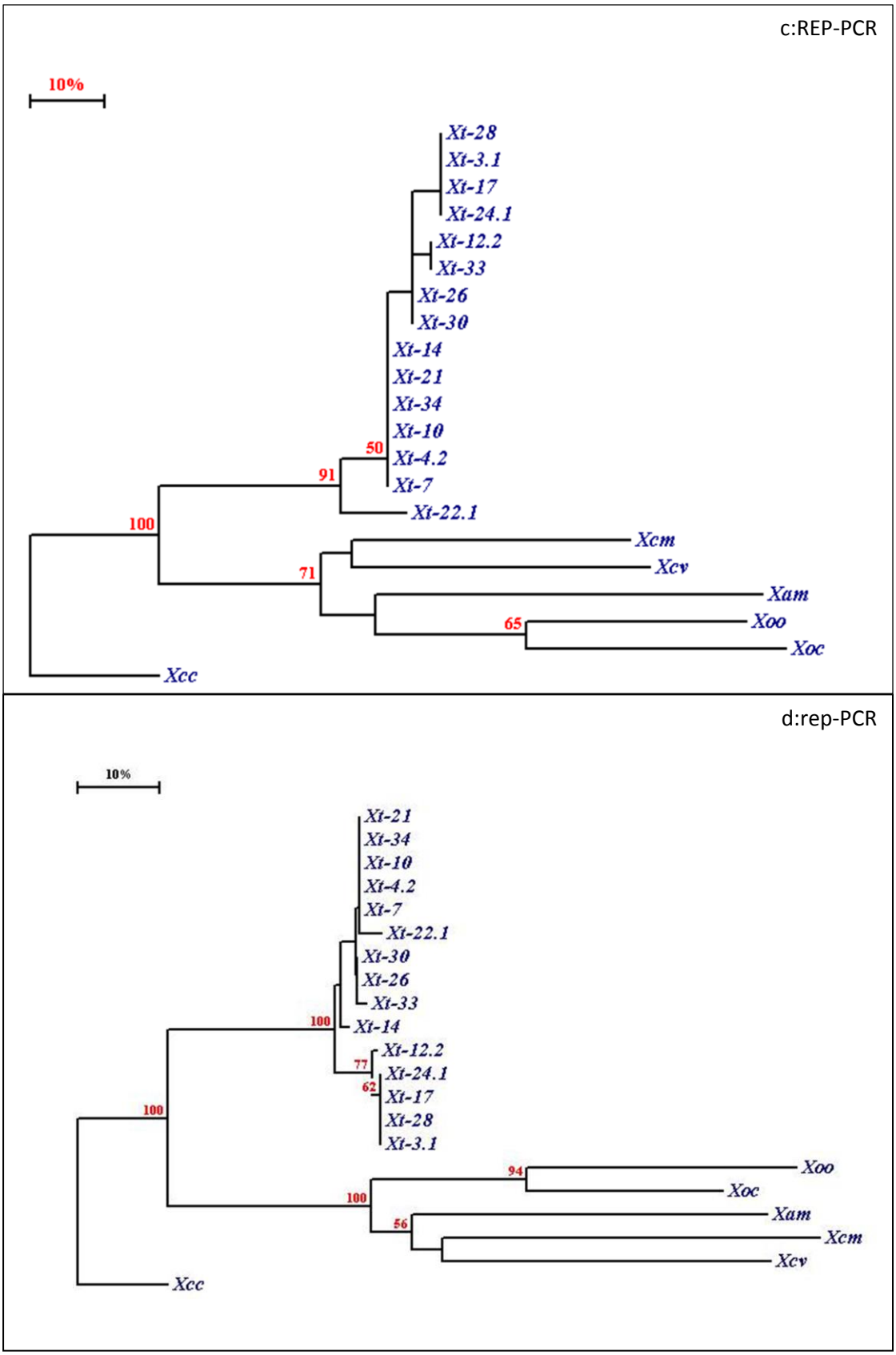
وبذلك نجد أن تقانات rep-pcr طريقة مفيدة لتعريف وتشخيص ممرضات النبات، وتعتبر ناجحة لدراسة مجتمعات أمراض النبات البكتيرية كما ذكر de Brujin وزملاؤه (1996).

وأنها تقنيات فحص سريعة ومميِّزة جداً لتحديد النمط الوراثي والتنوع التصنيفي وتركيب القرابة الوراثية للمجتمعات البكتيرية كما وجد Rademaker ورفاقه (2000)؛ وRademaker ورفاقه (2005).

حيث بينت نتائج البصمة الوراثية للـ rep-PCR إمكانية توصيف وتمييز *X.translucens* للأنماط المرضية (*Xt.arrhenatheri* و *Xt.graminis* و Xt.phlei و *Xt.phleipratensis* و *Xt.poae* و *Xt.hordie* و*Xt.secalis* و*Xt.translucens* و*Xt.undulusa* و *Xt.cerealis*) والتي سمحت التمييز بين مختلف الطرز الإمراضية بالاعتماد على التكرارات حيث وصل إلى تحت النوع والسلالة (Rademaker وزملاؤه، 2006).

هذه التقنيات المحسنة لمراقبة التنوّع الوراثي في مجتمعات كبيرة للبكتيريا ليست فقط أسرع وأرخص من التقنيات الجزيئية الأخرى إنما مفيدة أيضا لاكتشاف التوزع الجغرافي لـ haplotype الممرض في الحقول وقياس المستوى العالي من التنوع (Adhikary وزملاؤه، 2012).


a:BOX-PCR
10%
Xt-7
Xt-33
Xt-26
Xt-4.2
Xt-21
Xt-22.1
56
Xt-34
Xt-14
Xt-10
82
Xt-30
Xt-17
59
Xt-24.1
100
Xt-12.2
Xt-28
Xt-3.1
Xam
90
Xcv
61
Xcm
59
97
Xoo
Xoc
Xcc
b:ERIC-PCR
10%
Xt-10
Xt-30
Xt-22.1
Xt-34
Xt-21
56
Xt-7
Xt-33
Xt-26
97
Xt-4.2
Xt-14
Xt-12.2
56
Xt-17
100
Xt-24.1
Xt-28
Xt-3.1
Xoo
82
Xoc
Xcv
63
Xcm
75
Xam
Xcc



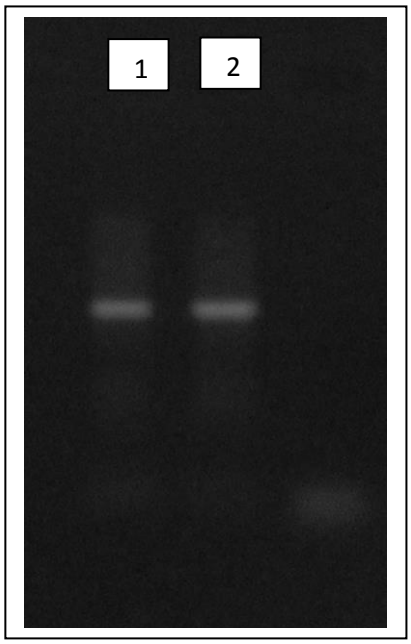
شكل(9) شجرات التباعد الوراثي ذات الجذر لعزلات *Xanthomonas translucens* مع عزلات تابعة للجنس *Xanthomonas* (راجع المواد والطرائق) الناتجة من البصمة الوراثة rep-PCR (الشكل 8)، حيث رسمت باستخدام معادلة Nei و Li (1979) باستخدام برنامج Treecon و Bootstrap (100 itreration) (d) BOX–PCR (b) ERIC–PCR (c) REP–PCR (d) rep–PCR.

4- تحديد تتابع النكليوتيدات لمنطقة ITS

أخذت عزلتين من الـ DNA وذلك لعزلة *Xt* وعزلة Syrian *Xc* المحلية والمعزولة من القرنبيط والمعرفة باستخدام اختبار rpfB.

وضخمت منطقة الـ ITS بواسطة بادئات 16S rDNA–23S rDNA ورحلوا على هلامة الاغاروز 1% للتاكد من حدوث التضخيم وعدم تلوث العزلات الشكل (10).

لكن تم تحديد التتابع النيكليوتيدات فقط للعزلة السورية Syrian *Xcc*.



الشكل: 10 الحزم الناتجة عن تضخيم منطقة الـ ITS عند *Xt* (1) وSyrian *Xcc* (2)

تم تحديد التتابع النيكليوتيدات للقطعة المضخمة باستخدام بادئات 16S rDNA لل Forword و 23S rDNA لل Reverse حيث تم الحصول على تتابع القطعتين الـ Forword sequence (450 nt) نكليوتيد والـ Reverse sequence (490 nt) (نتيجة الـ Reverse sequence المعروضة هنا بعد الإتمام والقلب)

Forword sequence (450 nt):

TCACTATCGGTCGGTCAGGAGTATTTAGCCTTGGAGGATGGTCCCCCCATATTCAGACAGGGTTTCA
CGTGCCCCGCCCTACTCGTCTTCACTGGAGTGGCCCTTTTAAATACAGGGCTATCACCTTCTATGGCC
AATCTTTCCAGATTGTTTTTCTAAAGCCATTCCAGCTTAAGGGCTGTTCCCCGTTCGCTCGTCACTACT
CAGGGAATCTCGGTTGATTTCTTTTCCTCCGGTTACTTAGATATTTCAGTTCACCGGGTTCGCTTCAAG
CAGCTATGAATTCACTGCAAGATACTGCCGAAGCAGTGGGTTTCCCCATTCGGATATTGCCGGATCA
AAGCTTGTTGCCAGCTCCCCGACACTTTTCGCAGGCTACCACGTCCTTCATCGCCTCTGACCGCCTAG
GCATCCACCGTGTGCGCTTATTCGCTTGACCATATAACCCCA

Reverse sequence (490 nt):

ATCTCAAACGCTCGCTACGTCACAAGTTATAAAAGAACATGTCTCAGCCTCAACGCTGATCCATATAA
ATTCTTAAGTGTGCACTACATTCAGAGTGGTGGGTCTGGGTAGACTCGAACTACCGACCTCACCCTTA
TCAGGGGTGCGCTCTAACCACCTGAGCTACAGACCCGAAGTCTTTTCACTCAATATGGTGGAGCCTG
TCGGGATCGAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCAGGTGCTCTCCCAGCTGAGCTAAGGCCCCAAA
AGGGACTTCGCATACCGACCTGTGCCGGTATGAATCTCTGAATGCAGGTAATTTGTGAGGACGCCCG
ACAGGACGAATAACGTCATGCTCAAAAGGAGGTGATCCAGCCGCACCTTCCGATACGGCTACCTTGT
TACGACTTCACCCCAGTCATCGGCCACACCGTGGCAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTGCTTC
TGGTGCAACAAACTCCCA

وتبين عند إجراء الـ conting بين القطعتين وجود فجوة gap بـ 121 نكليوتيد والسبب في عدم تحديد التتابع النكليوتيدي لكامل الـ ITS يعود إلى إمكانيات جهاز الـ Sequencer المتاحة لقطع بوزن لا يزيد عن 500 نكليوتيد، ويتطلب منا إجراء cloning لنواتج الـ PCR بعد تجزئتها إلى قطع أصغر - وهي إمكانات غير متوافرة في المخبر - أو تصميم بادئات متخصصة تسمح بتضخيم القطعة التي لم تغطى بالـ sequencing ومن ثم تحديد تتابع النكليوتيدات لها.

وبإجراء تحليل Blastn المتاح على الموقع (https://www.ncbi.nlm.nih.gov) لتحديد هوية التتابع للسلسلة الأولى الـ forword وجد أنها مطابقة لعدة سلالات تتبع النوع *X.campestres* بنسبة 100% وبتطابق ادنى لسلالات أخرى لأنواع أخرى تابعة لجنس *Xanthomonas* فمثلا وصلت النسبة إلى 99% بالنسبة لنوعي *X.vesicatoria, X.axonopodis X.oryzae*، وعند إجراء BLASTn للسلسلة الثانية reverse أيضا كانت نسبة التطابق عالية مع سلالات *Xcc* وصلت ل 100% وكانت النسبة عالية مع أنواع *Xo* و*Xv* و*Xcitri* حيث كانت ما يقارب 99% الشكل (11)

A- Forword sequence alignment

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Xanthomonas campestris pv campestris strain 17 genome	832	1664	100%	0.0	100%	CP011946.1
Xanthomonas campestris pv campestris strain ICMP 4013, complete genome	832	1664	100%	0.0	100%	CP012146.1
Xanthomonas campestris pv campestris strain ICMP 21080, complete genome	832	1664	100%	0.0	100%	CP012145.1
Xanthomonas campestris pv raphani 756C, complete genome	832	1664	100%	0.0	100%	CP002789.1
Xanthomonas campestris pv campestris str. ATCC 33913, complete genome	832	1664	100%	0.0	100%	AE008922.1
Xanthomonas campestris pv campestris complete genome, strain B100	832	1658	100%	0.0	100%	AM920689.1
Xanthomonas campestris pv campestris str. 8004, complete genome	832	1664	100%	0.0	100%	CP000050.1
Xanthomonas axonopodis pv glycines str. 8ra, complete genome	815	1630	100%	0.0	99%	CP017188.1
Xanthomonas vesicatoria strain NCPPB422 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer and 23S ribosomal RNA gene, partial sequence	815	815	100%	0.0	99%	KP033419.1
Xanthomonas campestris pv campestris strain ATCC 33913 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	811	811	97%	0.0	100%	NR_076178.1
Xanthomonas oryzae pv oryzae strain PXO602, complete genome	809	1619	100%	0.0	99%	CP013679.1
Xanthomonas oryzae pv oryzae strain PXO563, complete genome	809	1619	100%	0.0	99%	CP013678.1
Xanthomonas oryzae pv oryzae strain PXO524, complete genome	809	1619	100%	0.0	99%	CP013677.1
Xanthomonas oryzae pv oryzae strain PXO282, complete genome	809	1619	100%	0.0	99%	CP013676.1
Xanthomonas oryzae pv oryzae strain PXO71, complete genome	809	1619	100%	0.0	99%	CP013670.1
Xanthomonas citri pv citri strain jx-6, complete genome	809	1619	100%	0.0	99%	CP011827.2
Xanthomonas arboricola pv juglandis strain Xaj 417 genome	809	809	100%	0.0	99%	CP012251.1
Xanthomonas oryzae pv oryzicola strain CFBP2286, complete genome	809	1619	100%	0.0	99%	CP011962.1
Xanthomonas oryzae pv oryzicola strain RS105, complete genome	809	1619	100%	0.0	99%	CP011961.1
Xanthomonas oryzae pv oryzicola strain L8, complete genome	809	1619	100%	0.0	99%	CP011960.1

B- Reverse sequence alignment

	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Xanthomonas campestris pv campestris strain 17 genome	905	1811	100%	0.0	100%	CP011946.1
Xanthomonas campestris pv campestris strain ICMP 4013, complete genome	905	1811	100%	0.0	100%	CP012146.1
Xanthomonas campestris pv campestris strain ICMP 21080, complete genome	905	1811	100%	0.0	100%	CP012145.1
Xanthomonas campestris pv campestris str. ATCC 33913, complete genome	905	1811	100%	0.0	100%	AE008922.1
Xanthomonas campestris pv campestris complete genome, strain B100	905	1800	100%	0.0	100%	AM920689.1
Xanthomonas campestris pv campestris str. 8004, complete genome	905	1811	100%	0.0	100%	CP000050.1
Xanthomonas campestris pv hederae strain YNCCT1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; an	900	900	100%	0.0	99%	KU518244.1
Xanthomonas campestris pv hederae strain CCT008 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; an	900	900	100%	0.0	99%	KT820540.1
Xanthomonas campestris pv raphani 756C, complete genome	900	1800	100%	0.0	99%	CP002789.1
Xanthomonas campestris pv campestris isolate Xcc-H9 16S ribosomal RNA gene and 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, partial sequence	900	900	100%	0.0	99%	EU364838.1
Xanthomonas campestris strain XCC15 ribosomal RNA sequence	900	900	100%	0.0	99%	AF123092.2
Xanthomonas campestris pv hederae strain YNCCT6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence; 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, complete sequence; an	894	894	100%	0.0	99%	KU518245.1
Xanthomonas campestris 16S ribosomal RNA gene, 16S-23S ribosomal RNA intergenic spacer, and 23S ribosomal RNA gene, complete sequence	894	894	100%	0.0	99%	KU163446.1
Xanthomonas oryzae pv oryzae strain PXO602, complete genome	893	1786	100%	0.0	99%	CP013679.1
Xanthomonas oryzae pv oryzae strain PXO563, complete genome	893	1786	100%	0.0	99%	CP013678.1
Xanthomonas oryzae pv oryzae strain PXO524, complete genome	893	1786	100%	0.0	99%	CP013677.1
Xanthomonas oryzae pv oryzae strain PXO282, complete genome	893	1786	100%	0.0	99%	CP013676.1
Xanthomonas oryzae pv oryzae strain PXO236, complete genome	893	1786	100%	0.0	99%	CP013675.1
Xanthomonas oryzae pv oryzae strain PXO211, complete genome	893	1786	100%	0.0	99%	CP013674.1
Xanthomonas oryzae pv oryzae strain PXO145, complete genome	893	1786	100%	0.0	99%	CP013961.1

الشكل (11): تحليل Blastn لقطع الـ ITS عند Syrian *Xcc* والتشابه مع سلالات تتبع أنواع *Xanthomonas* forword sequence (A) و reverse sequence (B)

ثم أجري تحليل blastn suite-2sequences وظهر أن التطابق تام بين قطعتي الـ ITS للسلالة Syrian *Xcc* مع قطع الـ ITS المقابلة لها في جينوم السلالة *Xcc* 17 (CP011946.1) التطابق الشكل (12)

A Forword sequence

Range 3: 4476598 to 4477047 GenBank Graphics Next Match Previous Match First Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
832 bits(450)	0.0	450/450(100%)	0/450(0%)	Plus/Plus

```
Query  1        TCACTATCGGTCGGTCAGGAGTATTTAGCCTTGGAGGATGGTCCCCCCATATTCAGACAG  60
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4476598  TCACTATCGGTCGGTCAGGAGTATTTAGCCTTGGAGGATGGTCCCCCCATATTCAGACAG  4476657

Query  61       GGTTTCACGTGCCCCGCCCTACTCGTCTTCACTGGAGTGGCCCTTTTAAATACAGGGCTA  120
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4476658  GGTTTCACGTGCCCCGCCCTACTCGTCTTCACTGGAGTGGCCCTTTTAAATACAGGGCTA  4476717

Query  121      TCACCTTCTATGGCCAATCTTTCCAGATTGTTTTTCTAAAGCCATTCCAGCTTAAGGGCT  180
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4476718  TCACCTTCTATGGCCAATCTTTCCAGATTGTTTTTCTAAAGCCATTCCAGCTTAAGGGCT  4476777

Query  181      GTTCCCCGTTCGCTCGTCACTACTCAGGGAATCTCGGTTGATTTCTTTTCCTCCGGTTAC  240
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4476778  GTTCCCCGTTCGCTCGTCACTACTCAGGGAATCTCGGTTGATTTCTTTTCCTCCGGTTAC  4476837

Query  241      TTAGATATTTCAGTTCACCGGGTTCGCTTCAAGCAGCTATGAATTCACTGCAAGATACTG  300
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4476838  TTAGATATTTCAGTTCACCGGGTTCGCTTCAAGCAGCTATGAATTCACTGCAAGATACTG  4476897

Query  301      CCGAAGCAGTGGGTTTCCCCATTCGGATATTGCCGGATCAAAGCTTGTTGCCAGCTCCCC  360
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4476898  CCGAAGCAGTGGGTTTCCCCATTCGGATATTGCCGGATCAAAGCTTGTTGCCAGCTCCCC  4476957

Query  361      GACACTTTTCGCAGGCTACCACGTCCTTCATCGCCTCTGACCGCCTAGGCATCCACCGTG  420
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4476958  GACACTTTTCGCAGGCTACCACGTCCTTCATCGCCTCTGACCGCCTAGGCATCCACCGTG  4477017

Query  421      TGCGCTTATTCGCTTGACCATATAACCCCA  450
                |||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4477018  TGCGCTTATTCGCTTGACCATATAACCCCA  4477047
```

B Reverse sequence

Range 1: 4477169 to 4477658 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
905 bits(490)	0.0	490/490(100%)	0/490(0%)	Plus/Plus

```
Query  570      ATCTCAAACGCTCGCTACGTCACAAGTTATAAAAGAACATGTCTCAGCCTCAACGCTGAT  629
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4477169  ATCTCAAACGCTCGCTACGTCACAAGTTATAAAAGAACATGTCTCAGCCTCAACGCTGAT  4477228

Query  630      CCATATAAATTCTTAAGTGTGCACTACATTCAGAGTGGTGGGTCTGGGTAGACTCGAACT  689
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4477229  CCATATAAATTCTTAAGTGTGCACTACATTCAGAGTGGTGGGTCTGGGTAGACTCGAACT  4477288

Query  690      ACCGACCTCACCCTTATCAGGGGTGCGCTCTAACCACCTGAGCTACAGACCCGAAGTCTT  749
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4477289  ACCGACCTCACCCTTATCAGGGGTGCGCTCTAACCACCTGAGCTACAGACCCGAAGTCTT  4477348

Query  750      TTCACTCAATATGGTGGAGCCTGTCGGGATCGAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCAG  809
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4477349  TTCACTCAATATGGTGGAGCCTGTCGGGATCGAACCGACGACCCCCTGCTTGCAAAGCAG  4477408

Query  810      GTGCTCTCCCAGCTGAGCTAAGGCCCCAAAAGGGACTTCGCATACCGACCTGTGCCGGTA  869
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4477409  GTGCTCTCCCAGCTGAGCTAAGGCCCCAAAAGGGACTTCGCATACCGACCTGTGCCGGTA  4477468

Query  870      TGAATCTCTGAATGCAGGTAATTTGTGAGGACGCCCGACAGGACGAATAACGTCATGCTC  929
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4477469  TGAATCTCTGAATGCAGGTAATTTGTGAGGACGCCCGACAGGACGAATAACGTCATGCTC  4477528

Query  930      AAAAGGAGGTGATCCAGCCGCACCTTCCGATACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAG  989
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4477529  AAAAGGAGGTGATCCAGCCGCACCTTCCGATACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCCCAG  4477588

Query  990      TCATCGGCCACACCGTGGCAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGCAA  1049
                ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  4477589  TCATCGGCCACACCGTGGCAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTGCTTCTGGTGCAA  4477648

Query  1050     CAAACTCCCA  1059
                ||||||||||
Sbjct  4477649  CAAACTCCCA  4477658
```

الشكل (12) مقارنة قطع ITS عند Syrian *Xcc* مقابل ITS عند السلالة *Xcc* 17 (CP011946.1) التي تظهر التطابق التام Forword sequence (A) و reverse sequence (B)

تم توقع الفجوة الحاصلة بين سلسلتي ال rev وال for بالمقارنة مع السلالة *Xanthomonas campestris pv. campestris* strain 17 genome (>gb|CP011946) التي أعطت مطابقة تامة مع كلا القطعتين بـ (121 nt) وهي :

(AGTTGCCTCGGAGTTACATGCCGTGTTGTGTGGGGTACAAAGCCACCAACGCGA
ACATACGACTCAATTATTTAGGGACTCGAAGTCCCCGCCTTAGCCTCAACGACAC
GTTTAGATAGAT)

تم استخراج عدد من الـ ITS المنشورة لسلالات بكتيرية تتبع أنواع استخدمت كشاهد في تحليل البصمة الوراثية بهذا البحث **[(***Xanthomonas campestris pv. campestris* strain 17, CP011946.1 (Liu وزملاؤه، 2015))، **(***Xanthomonas vesicatoria* ATCC 35937 (Richard) strain LMG 911, CP018725.1 بيانات غير منشورة))، **(***Xanthomonas citri pv. malvacearum* strain MSCT, CP017020.1 (Showmaker وزملاؤه، بيانات غير منشورة))، **(***Xanthomonas oryzae pv. oryzae* strain PXO602, CP013679.1 (Quibod وOliva، بيانات غير منشورة))، **(***Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* strain CFBP2286, CP011962.1 (Wilkins وزملاؤه، 2015))، **(***Xanthomonas translucens pv. translucens* DSM 18974, LT604072.1 (Jaenicke ووملاؤه، 2016))، **(***Xanthomonas translucens pv. undulosa* strain *Xtu* 4699, CP008714.1 (Peng وزملاؤه، 2016))] ومقارنتها مع التتابع الكليوتيدي الذي تم الحصول عليه بالنسبة للسلالة Syrian *Xcc*، وأجري تحليل القرابة الوراثية Multiple alignment باستخدام برنامج Clustal X2.0.8 بطريقة *neighbor joining* الشكل (13) ورسمت شجرة القرابة الوراثية باستخدام Clustal X 2.0.8 و TreeView 1.6.6 الشكل (14)

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                          10         20         30         40         50
CP011946.1Xcc    TCACTATCGG TCG-GTCAGG AGTA-----T TTAGCCTT-- GGAGGATGGT
Syrian Xcc       TCACTATCGG TCG-GTCAGG AGTA-----T TTAGCCTT-- GGAGGATGGT
CP018725.1Xv     TCACTATCGG TCG-GTCAGG AGTA-----T TTAGCCTT-- GGAGGATGGT
CP017020.1Xcm    TCACTATCGG TCG-GTCAGG AGTA-----T TTAGCCTT-- GGAGGATGGT
CP013679.1Xoo    TGGGAGTTTG TTGCACCAGA AGCAGGTAGC TTAACCTTCG GGAGGGCGCT
CP011962.1Xoc    TGGGAGTTTG TTGCACCAGA AGCAGGTAGC TTAACCTTCG GGAGGGCGCT
LT604072.1Xtt    TGGGAGTTTG TTGCACCAGA AGCAGGTAGC TTAACCTTCG GGAGGGCGCT
CP008714.1Xtu    TGGGAGTTTG TTGCACCAGA AGCAGGTAGC TTAACCTTCG GGAGGGCGCT
Clustal Conse    *     *  * * *   ***  ** *       *** ****   *****  * *
```

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                             60         70         80         90        100
CP011946.1Xcc       CCCCCCA--- TATTCA--GA CAGGGTTTCA CGTGCCCCGC CCTACTCGTC
Syrian Xcc          CCCCCCA--- TATTCA--GA CAGGGTTTCA CGTGCCCCGC CCTACTCGTC
CP018725.1Xv        CCCCCCA--- TATTCA--GA CAGGGTTTCA CGTGCCCCGC CCTACTCGTC
CP017020.1Xcm       CCCCCCA--- TATTCA--GA CAGGGTTTCA CGTGCCCCGC CCTACTCGTC
CP013679.1Xoo       TGCCACGGTG TGGCCGATGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA GGTAGCCGTA
CP011962.1Xoc       TGCCACGGTG TGGCCGATGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA GGTAGCCGTA
LT604072.1Xtt       TGCCACGGTG TGGCCGATGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA GGTAGCCGTA
CP008714.1Xtu       TGCCACGGTG TGGCCGATGA CTGGGGTGAA GTCGTAACAA GGTAGCCGTA
Clustal Conse         ** *     *   *   ** * *** *  *    *   *     **  ***


                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                            110        120        130        140        150
CP011946.1Xcc       TTCACTGGAG TGGC------ ----CCTTTT AAATACAGGG CTATCACCTT
Syrian Xcc          TTCACTGGAG TGGC------ ----CCTTTT AAATACAGGG CTATCACCTT
CP018725.1Xv        TTCACTGGAG TGGC------ ----CCTTTT AAATACAGGG CTATCACCTT
CP017020.1Xcm       TTCACTGGAG TGGC------ ----CCTTTT AAATACAGGG CTATCACCTT
CP013679.1Xoo       TCGGAAGGTG CGGCTGGATC ACCTCCTTTT GAGCATGACG TCATCGTCCT
CP011962.1Xoc       TCGGAAGGTG CGGCTGGATC ACCTCCTTTT GAGCATGACG TCATCGTCCT
LT604072.1Xtt       TCGGAAGGTG CGGCTGGATC ACCTCCTTTT GAGCATGACA GCTACGCCTA
CP008714.1Xtu       TCGGAAGGTG CGGCTGGATC ACCTCCTTTT GAGCATGACA GCTACGCCTA
Clustal Conse       *     ** *  ***           ******  *  *          *  *


                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                            160        170        180        190        200
CP011946.1Xcc       CTATGGCCAA TCTTTCCAGA T----TGTTT TTCTAAAGCC ATTCCAGCTT
Syrian Xcc          CTATGGCCAA TCTTTCCAGA T----TGTTT TTCTAAAGCC ATTCCAGCTT
CP018725.1Xv        CTATGGCCAA TCTTTCCAGA T----TGTTT TTCTAAAGCC ATTCCAGCTT
CP017020.1Xcm       CTATGGCCAA TCTTTCCAGA T----TGTTT TTCTAAAGCC ATTCCAGCTT
CP013679.1Xoo       GTCGGGC--G TCCTCACAAA TTACCTGCAT TCAGAGATTC ATACCGGCAC
CP011962.1Xoc       GTCGGGC--G TCCTCACAAA TTACCTGCAT TCAGAGATTC ATACCGGCAC
LT604072.1Xtt       --CAGGC--G TCCTCACAAG TAACCTGCAT TCAGAGA--- GTTCCGCCAC
CP008714.1Xtu       --CAGGC--G TCCTCACAAG TAACCTGCAT TCAGAGA--- GTTCCGCCAT
Clustal Conse           ***    ** *  **   *    **  * *   * *     * **  *


                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                            210        220        230        240        250
CP011946.1Xcc       AAGGGCTGTT CCCCGTTCGC TCGTCACTAC TCAGGGAATC TCGGTTGATT
Syrian Xcc          AAGGGCTGTT CCCCGTTCGC TCGTCACTAC TCAGGGAATC TCGGTTGATT
CP018725.1Xv        AAGGGCTGTT CCCCGTTCGC TCGTCACTAC TTAGGGAATC TCGGTTGATT
CP017020.1Xcm       AAGGGCTGCT CCCCGTTCGC TCGTCACTAC TTAGGGAATC TCGGTTGATT
CP013679.1Xoo       AGGTCGGTAT GCGAAGTCCC TTTTGGGGCC TTAGCTCAGC TGGGAGAGCA
CP011962.1Xoc       AGGTCGGTAT GCGAAGTCCC TTTTGGGGCC TTAGCTCAGC TGGGAGAGCA
LT604072.1Xtt       AGGGCGGAGC ACC---CCGA TTTCGGGGCC ATAGCTCAGC TGGGAGAGCA
CP008714.1Xtu       AGGGCGGAGC ACC---CCGA TTTCGGGGCC ATAGCTCAGC TGGGAGAGCA
Clustal Conse       * *         *     *   *        *   **   * * * **


                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                            260        270        280        290        300
CP011946.1Xcc       TCTTTTCCTC CGGTTACTTA GATATTTCAG TTC-ACCGGG TTCGCTTCAA
Syrian Xcc          TCTTTTCCTC CGGTTACTTA GATATTTCAG TTC-ACCGGG TTCGCTTCAA
CP018725.1Xv        TCTTTTCCTC CGGTTACTTA GATATTTCAG TTC-ACCGGG TTCGCTTCCA
CP017020.1Xcm       TCTTTTCCTC CGGTTACTTA GATATTTCAG TTC-ACCGGG TTCGCTTCCA
CP013679.1Xoo       CCTGCTTTGC AAG---CAGG GGGTCGTCGG TTCGATCCCG ACAGGCTCCA
CP011962.1Xoc       CCTGCTTTGC AAG---CAGG GGGTCGTCGG TTCGATCCCG ACAGGCTCCA
LT604072.1Xtt       CCTGCTTTGC AAG---CAGG GGGTCGTCGG TTCGATCCCG ACTGGCTCCA
CP008714.1Xtu       CCTGCTTTGC AAG---CAGG GGGTCGTCGG TTCGATCCCG ACTGGCTCCA
Clustal Conse        **  *   *   *   *    *     ** * *** * *  *    *  ** *
```

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         310        320        330        340        350
CP011946.1Xcc    GCAGCTATGA A---TTCACT GCAA------ GATACTGCCG AAGCAGTGGG
Syrian Xcc       GCAGCTATGA A---TTCACT GCAA------ GATACTGCCG AAGCAGTGGG
CP018725.1Xv     GCAGCTATGA A---TTCACT GCAG------ GATACTGCCG AAGCAGTGGG
CP017020.1Xcm    GCAGCTATGA A---TTCACT GCAG------ GATACTGCCG AAGCAGTGGG
CP013679.1Xoo    CCATATT--- ---------- ---------- ---------- ----------
CP011962.1Xoc    CCATATT--- ---------- ---------- ---------- ----------
LT604072.1Xtt    CCAGATTTGC AGATCCCTCT GCAAACGCTC GCACCTGCGT GTGCGGACGG
CP008714.1Xtu    CCAGATTTGC AGATCCCTCT GCAAACGCTC GCACCTGCGT GTGCGGACGG
Clustal Conse     **  *

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         360        370        380        390        400
CP011946.1Xcc    TTTCCCCATT CGGATATTGC CGGA--TCAA AGCTTGTTGC -CAGCTCCCC
Syrian Xcc       TTTCCCCATT CGGATATTGC CGGA--TCAA AGCTTGTTGC -CAGCTCCCC
CP018725.1Xv     TTTCCCCATT CGGATATTGC CGGA--TCAA AGCTTGTTGC -CAGCTCCCC
CP017020.1Xcm    TTTCCCCATT CGGATATTGC CGGA--TCAA AGCTTGTTGC -CAGCTCCCC
CP013679.1Xoo    ---------- ----GAGTGA AAAGACTTCG GGTCTGTAGC TCAGGTGGTT
CP011962.1Xoc    ---------- ----GAGTGA AAAGACTTCG GGTCTGTAGC TCAGGTGGTT
LT604072.1Xtt    TCTCAGGGAC CTGCAAGAGC CAAGACTTTG GGTCTGTAGC TCAGGTGGTT
CP008714.1Xtu    TCTCAGGGAC CTGCAAGAGC CAAGACTTTG GGTCTGTAGC TCAGGTGGTT
Clustal Conse                 *  *        *     *  *** **  *** *

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         410        420        430        440        450
CP011946.1Xcc    GACACTTTTC GCAGGCTACC ACGTCCTTCA TCGCCTCTGA CCGCCTAGGC
Syrian Xcc       GACACTTTTC GCAGGCTACC ACGTCCTTCA TCGCCTCTGA CCGCCTAGGC
CP018725.1Xv     GACACTTTTC GCAGGCTACC ACGTCCTTCA TCGCCTCTGA CCGCCTAGGC
CP017020.1Xcm    GACACTTTTC GCAGGCTACC ACGTCCTTCA TCGCCTCTGA CCGCCTAGGC
CP013679.1Xoo    AGAGCGCACC CCTGATAAGG GTGAGGTCGG TAGTTCGAGT CTACCCAGAC
CP011962.1Xoc    AGAGCGCACC CCTGATAAGG GTGAGGTCGG TAGTTCGAGT CTACCCAGAC
LT604072.1Xtt    AGAGCGCACC CCTGATAAGG GTGAGGTCGG TGGTTCGAGT CCTCCCAGAC
CP008714.1Xtu    AGAGCGCACC CCTGATAAGG GTGAGGTCGG TGGTTCGAGT CCTCCCAGAC
Clustal Conse        *    *  * *   *     *   *    * *     *  *  ** ** *

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         460        470        480        490        500
CP011946.1Xcc    AT-CCACCGT GTGCGCTTA- --TTCGCTTG A----CCATA TAACCCCAAG
Syrian Xcc       AT-CCACCGT GTGCGCTTA- --TTCGCTTG A----CCATA TAACCCCA--
CP018725.1Xv     AT-CCACCGT GTGCGCTTA- --TTCGCTTG A----CCATA TAACCCCAAG
CP017020.1Xcm    AT-CCACCGT GTGCGCTTA- --TTCGCTTG A----CCATA TAAGCCCAAG
CP013679.1Xoo    CCACCACTCT GAATGTAGT- -GCACACTTA AGAATTTATA TGGATCAGCG
CP011962.1Xoc    CCACCACTCT GAATGTAGT- -GCACACTTA AGAATTTATA TGGATCAGCG
LT604072.1Xtt    CCACCACTCT GAATGTAAGA AGCACACTAA GAATTTAAGA TGCGCCAGCA
CP008714.1Xtu    CCACCACTCT GAATGTAAGA AGCACACTAA GAATTTAAGA TGCGCCAGCA
Clustal Conse       **** * *   *          * **          * * *    *

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         510        520        530        540        550
CP011946.1Xcc    TTGCCTCGGA GTTACATGC- --CGTGTTGT GTGGGGTACA AAGCCACCAA
Syrian Xcc       ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CP018725.1Xv     TTGCCTCGGA GCTACATGTA --CGTGTTGT GTGGGGTACA AAGCCACCAA
CP017020.1Xcm    TTGCCTCGGA GCTATCTGT- --CGTGTTGT GTGGGGTACA AAGCCACCAA
CP013679.1Xoo    TTGAGGCTGA GACATGTTCT TTTATAACTT GTGACGTAGC GAGCGTTTGA
CP011962.1Xoc    TTGAGGCTGA GACATGTTCT TTTATAACTT GTGACGTAGC GAGCGTTTGA
LT604072.1Xtt    GTGAGGCTGG GGTATGTTCT TTTAAAATTT GTGACGTAGC GAGCGTTTGA
CP008714.1Xtu    GTGAAGCTGG GGTATGTTCT TTTAAAATTT GTGACGTAGC GAGCGTTTGA
Clustal Conse
```

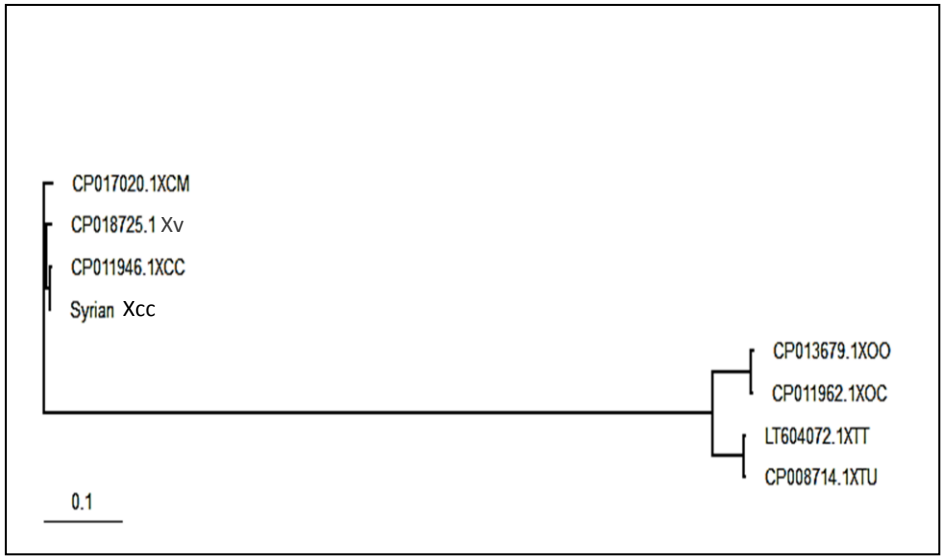
```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         560        570        580        590        600
CP011946.1Xcc    CGCGAACATA CGACTCAATT ATTTAGGGAC TCGAAGTCCC CGCCTTAGCC
Syrian Xcc       ---------- ---------- ---------- ---------- ----------
CP018725.1Xv     CGCGAACATA CGACTCAATT ATTTAGGGAC TCGAAGTCCC CGCCTTAGCC
CP017020.1Xcm    CGCGAACATA CGACTCAATT ATTTAGGGAC TCGAAGTCCC CGCCTTAGCC
CP013679.1Xoo    GAT--ATCTA T--CTAAACG TGTCGTTGAG GCTAAGGCGG GGACTTCGAG
CP011962.1Xoc    GAT--ATCTA T--CTAAACG TGTCGTTGAG GCTAAGGCGG GGACTTCGAG
LT604072.1Xtt    GATCAAACTA T--CTTGACG TGTCGTTGTG GCTAAGGCGG GGACCTCGAG
CP008714.1Xtu    GATCAAACTA T--CTTGACG TGTCGTTGTG GCTAAGGCGG GGGCCTCGAG
Clustal Conse

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         610        620        630        640        650
CP011946.1Xcc    TCAACGACAC GTTTAGATAG ATATCTCAAA CGCTCGCTAC GTCACAAGTT
Syrian Xcc       ---------- ---------- --ATCTCAAA CGCTCGCTAC GTCACAAGTT
CP018725.1Xv     TCAACGACAC GTTTAGATAG ATATCTCAAA CGCTCGCTAC GTCACAAGTT
CP017020.1Xcm    TCAACGACAC GTTTAGATAG ATATCTCAAA CGCTCGCTAC GTCACAAGTT
CP013679.1Xoo    TCC-CTAAAT AATTGAGTCG T-AT-GTTCG CGTTGGTGGC TTTGTACTCC
CP011962.1Xoc    TCC-CTAAAT AATTGAGTCG T-AT-GTTCG CGTTGGTGGC TTTGTACCCC
LT604072.1Xtt    TCC-CTAGA- AATTGAGTCG TTATAGTTCG CGTCCG-GGC GTTGTACCCC
CP008714.1Xtu    TCC-CTAGA- AATTGAGTCG TTATAGTTCG CGTCCG-GGC GTTGTACCCC
Clustal Conse                          **       **   *   *  *   *

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         660        670        680        690        700
CP011946.1Xcc    ATAAAAGAAC ATGTCTCAGC CTCAACGCTG ATCCATATAA -ATTCTTAAG
Syrian Xcc       ATAAAAGAAC ATGTCTCAGC CTCAACGCTG ATCCATATAA -ATTCTTAAG
CP018725.1Xv     ATAAAAGAAC ACGTACCAGC CTCAACGCTG ATCCGTATAA -ATTCTTAAG
CP017020.1Xcm    ATAAAAGAAC ATGTCTCAGC CTCAACGCTG ATCCATATAA -ATTCTTAAG
CP013679.1Xoo    ACACAGCACG GCATATA-GC TCCGAGGCAA CTTGGGGTTA TATGGTCAAG
CP011962.1Xoc    ACACAACACG GCATATC-GC TCCAAGGCAA CTTGGGGTTA TATGGTCAAG
LT604072.1Xtt    CG--GACTCA GCATG---AC ATTGAGGCAA CTTGAGGTTA TATGGTCAAG
CP008714.1Xtu    CG--GACTCA GCATG---AC CTTGAGGCAA CTTGAGGTTA TATGGTCAAG
Clustal Conse                *     *     * **    *     * *  **  * ***

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         710        720        730        740        750
CP011946.1Xcc    TGTGCACTAC ATTCAGAGTG GTGGGTCTGG GTAGACTCGA ACTACCGACC
Syrian Xcc       TGTGCACTAC ATTCAGAGTG GTGGGTCTGG GTAGACTCGA ACTACCGACC
CP018725.1Xv     TGTGCACTAC ATTCAGAGTG GTGGGTCTGG GTAGACTCGA ACTACCGACC
CP017020.1Xcm    TGTGCACTAC ATTCAGAGTG GTGGGTCTGG GAGGACTCGA ACCACCGACC
CP013679.1Xoo    CGAATAA-GC GCACACGGTG G-ATGCCTAG GCGGTCAGAG GCGATGAAGG
CP011962.1Xoc    CGAATAA-GC GCACACGGTG G-ATGCCTAG GCGGTCAGAG GCGATGAAGG
LT604072.1Xtt    CGAATAA-GC GCACACGGTG G-ATGCCTTG GCGGTCAGAG GCGATGAAGG
CP008714.1Xtu    CGAATAA-GC GCACACGGTG G-ATGCCTTG GCGGTCAGAG GCGATGAAGG
Clustal Conse     *   *   *    **  *** *   * ** * *  * *      * *   *

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         760        770        780        790        800
CP011946.1Xcc    TCACCCTTAT CAGGGGTGCG CTCTAACCAC CTGAGCTACA GACCCGAAGT
Syrian Xcc       TCACCCTTAT CAGGGGTGCG CTCTAACCAC CTGAGCTACA GACCCGAAGT
CP018725.1Xv     TCACCCTTAT CAGGGGTGCG CTCTAACCAC CTGAGCTACA GACCCGAAGT
CP017020.1Xcm    TCACCCTTAT CAGGGGTGCG CTCTAACCAC CTGAGCTACA GACCCAAAGT
CP013679.1Xoo    ACGTGGTAGC CTGCGAAAAG TGTCGGGGAG CTG-GCAACA AGCTTTGATC
CP011962.1Xoc    ACGTGGTAGC CTGCGAAAAG TGTCGGGGAG CTG-GCAACA AGCTTTGATC
LT604072.1Xtt    ACGTGGCAGC CTGCGAAAAG TGTCGGGGAG CTG-GCAACA AGCTTTGATC
CP008714.1Xtu    ACGTGGCAGC CTGCGAAAAG TGTCGGGGAG CTG-GCAACA AGCTTTGATC
Clustal Conse     *         * * *    *         *  *** ** ***   *    *
```

```
                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         810        820        830        840        850
CP011946.1Xcc    CTTTTCACTC AATATGGTGG AGCCTGTCGG GATCGAACCG ACGACCCCCT
Syrian Xcc       CTTTTCACTC AATATGGTGG AGCCTGTCGG GATCGAACCG ACGACCCCCT
CP018725.1Xv     CTTTTCACTC AATATGGTGG AGCCTGTCGG GATCGAACCG ACGACCCCCT
CP017020.1Xcm    CGTTTCACTC AA-ATGGTGG AGCCTGTCGG GATCGAACCG ACGACCCCCT
CP013679.1Xoo    CGGCAATATC CGAATGGGGA AACCCA-CTG CTTCGGCAGT ATCCTGCAGT
CP011962.1Xoc    CGGCAATATC CGAATGGGGA AACCCA-CTG CTTCGGCAGT ATCCTGCAGT
LT604072.1Xtt    CGGCAATGTC CGAATGGGGA AACCCA-CTG CTTCGGCAGT ATCCTGCAGT
CP008714.1Xtu    CGGCAATGTC CGAATGGGGA AACCCA-CTG CTTCGGCAGT ATCCTGCAGT
Clustal Conse    *       **    **** *  * **   * *   ***      *     *  *

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         860        870        880        890        900
CP011946.1Xcc    GCTTGCAAAG CAGGTGCTCT C---CCAGCT GAGCTAAGGC CCCAAAA-GG
Syrian Xcc       GCTTGCAAAG CAGGTGCTCT C---CCAGCT GAGCTAAGGC CCCAAAA-GG
CP018725.1Xv     GCTTGCAAAG CAGGTGCTCT C---CCAGCT GAGCTAAGGC CCCAAAA-GG
CP017020.1Xcm    GCTTGCAAAG CAGGTGCTCT C---CCAGCT GAGCTAAGGC CCCATGATGG
CP013679.1Xoo    GAATTCATAG CTGCTGGAAG CGAACCCGGT GAACTGAAAT ATCTAAG--T
CP011962.1Xoc    GAATTCATAG CTGCTGGAAG CGAACCCGGT GAACTGAAAT ATCTAAG--T
LT604072.1Xtt    GAATACATAG CTGCTGGAAG CGAACCCGGT GAACTGAAAT ATCTAAG--T
CP008714.1Xtu    GAATACATAG CTGCTGGAAG CGAACCCGGT GAACTGAAAT ATCTAAG--T
Clustal Conse    *  * ** ** * * **     *   ** * * ** ** *      *

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         910        920        930        940        950
CP011946.1Xcc    GACTT-CGCA TACCGACCTG TGCCGGTATG AATCTCTGAA TGCAGGTAAT
Syrian Xcc       GACTT-CGCA TACCGACCTG TGCCGGTATG AATCTCTGAA TGCAGGTAAT
CP018725.1Xv     GACTT-CGCA TACCGACCTG TGCCGGTATG AATCTCTGAA TGCAGGTAAT
CP017020.1Xcm    GACTTTCGCA TACCGGCCTG TGCCGATACG CATCTCTGAA TGCAGGTAAT
CP013679.1Xoo    AACCGGAGGA AAA-GAAATC AACCGAGAT- --TCCCTAAG TAGTGACGAG
CP011962.1Xoc    AACCGGAGGA AAA-GAAATC AACCGAGAT- --TCCCTAAG TAGTGACGAG
LT604072.1Xtt    AACCGGAGGA AAA-GAAATC AACCGAGAT- --TCCCTAAG TAGTGACGAG
CP008714.1Xtu    AACCGGAGGA AAA-GAAATC AACCGAGAT- --TCCCTAAG TAGTGACGAG
Clustal Conse     **    * *  *  *   *    ***  *     ** ** *  *   *   *

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                         960        970        980        990        1000
CP011946.1Xcc    TTG-TGAGGA C--GCCCGAC AGGACGAATA ACGTCATGCT CAAAAGGAGG
Syrian Xcc       TTG-TGAGGA C--GCCCGAC AGGACGAATA ACGTCATGCT CAAAAGGAGG
CP018725.1Xv     TTG-TGAGGA C--GCCCG-C AAGACGA-TG ACGTCATGCT CAAAAGGAGG
CP017020.1Xcm    TTG-TGAGGA C--GCCCGAC AGGACGA-TG ACGTCATGCT CAAAAGGAGG
CP013679.1Xoo    CGAACGGGGA GCAGCCCTTA AGCTGGAATG GCTTTAGAAA AACAATCTGG
CP011962.1Xoc    CGAACGGGGA GCAGCCCTTA AGCTGGAATG GCTTTAGAAA AACAATCTGG
LT604072.1Xtt    CGAACGGGGA CTAGCCCTTA AGCTGGTATG GTTCTAGAAA AACAACCTGG
CP008714.1Xtu    CGAACGGGGA CTAGCCCTTA AGCTGGTATG GTTCTAGAAA AACAACCTGG
Clustal Conse         * ***    ****    *    *  *       *      * **   **

                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                        1010       1020       1030       1040       1050
CP011946.1Xcc    TGAT-CCAGC CGCACCTTCC GATACGGCTA CCTTGTTACG ACTTCACCCC
Syrian Xcc       TGAT-CCAGC CGCACCTTCC GATACGGCTA CCTTGTTACG ACTTCACCCC
CP018725.1Xv     TGAT-CCAGC CGCACCTTCC GATACGGCTA CCTTGTTACG ACTTCACCCC
CP017020.1Xcm    TGAT-CCAGC CGCACCTTCC GATACGGCTA CCTTGTTACG ACTTCACCCC
CP013679.1Xoo    AAAGATTGGC CATAGAAGGT GATAGCCCTG TATT-TAAAA GGGCCACTCC
CP011962.1Xoc    AAAGATTGGC CATAGAAGGT GATAGCCCTG TATT-TAAAA GGGCCACTCC
LT604072.1Xtt    AAAGGTTGGC CATAGAAGGT GATAGCCCTG TATT-TAAAA GGGCCATTCC
CP008714.1Xtu    AAAGGTTGGC CATAGAAGGT GATAGCCCTG TATT-TAAAA GGGCCATTCC
Clustal Conse      *     ** *  *       ****   **    ** * *       **  **
```

```
                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                            1060       1070       1080       1090       1100
CP011946.1Xcc       AGTCAT--CG GCCACACCGT GGCAAGCG-- --CCCTCCCG AAGGTTAAGC
Syrian Xcc          AGTCAT--CG GCCACACCGT GGCAAGCG-- --CCCTCCCG AAGGTTAAGC
CP018725.1Xv        AGTCAT--CG GCCACACCGT GGCAAGCG-- --CCCTCCCG AAGGTTAAGC
CP017020.1Xcm       AGTCAT--CG GCCACACCGT GGCAAGCG-- --CCCTCCCG AAGGTTAAGC
CP013679.1Xoo       AGTGAAGACG AGTAGGGCGG GGCACGTGAA ACCCTGTCTG AATATGGGGG
CP011962.1Xoc       AGTGAAGACG AGTAGGGCGG GGCACGTGAA ACCCTGTCTG AATATGGGGG
LT604072.1Xtt       AGTGAAGACG AGTAGGGCGG GGCACGTGAA ACCCTGTCTG AATATGGGGG
CP008714.1Xtu       AGTGAAGACG AGTAGGGCGG GGCACGTGAA ACCCTGTCTG AATATGGGGG
Clustal Conse       *** *   **    *   **  **** * *     **   * * **  *   *


                    ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ...
                            1110       1120       1130       1140
CP011946.1Xcc       TACCTGCTTC TGGTGCAACA AACTCCCA-- ---------- ---
Syrian Xcc          TACCTGCTTC TGGTGCAACA AACTCCCA-- ---------- ---
CP018725.1Xv        TACCTGCTTC TGGTGCAACA AACTCCCA-- ---------- ---
CP017020.1Xcm       TACCTGCTTC TGGTGCAACA AACTCCCA-- ---------- ---
CP013679.1Xoo       GACCATCCTC CAAGGCTAAA TACTCCTGAC CGACCGATAG TGA
CP011962.1Xoc       GACCATCCTC CAAGGCTAAA TACTCCTGAC CGACCGATAG TGA
LT604072.1Xtt       GACCATCCTC CAAGGCTAAA TACTCCTGAC CGACCGATAG TGA
CP008714.1Xtu       GACCATCCTC CAAGGCTAAA TACTCCTGAC CGACCGATAG TGA
Clustal Conse        ***  * **     ** * *  *****
```

الشكل (13): التشابه similarities بين الـ ITS لـ Syrian *Xcc* (هذا العمل) و الـ ITS لسلالات أنواع بكتيرية أخرى من الجنس *Xanthomonas* أجريت باستخدام Clustal X2.0.8. سلاسل المقارنة هي: **[(***Xanthomonas campestris pv. campestris* strain 17, CP011946.1 (Liu وزملاؤه، 2015)**)، (***Xanthomonas vesicatoria* ATCC 35937 strain LMG 911, CP018725.1 (Richard، بيانات غير منشورة)**)، (***Xanthomonas citri pv. malvacearum* strain MSCT, CP017020.1 (Showmaker وزملاؤه، بيانات غير منشورة)**)، (***Xanthomonas oryzae pv. oryzae* strain PXO602, CP013679.1 (Quibod وOliva، بيانات غير منشورة)**)، (***Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* strain CFBP2286, CP011962.1 (Wilkins وزملاؤه، 2015)**)، (***Xanthomonas translucens pv. translucens* DSM 18974, LT604072.1 (Jaenicke ووملاؤه، 2016)**)، (***Xanthomonas translucens pv. undulosa* strain *Xtu* 4699, CP008714.1 (Peng وزملاؤه، 2016))**]**

قورنت سلسلة النكليوتيدات لـ ITS للسلالة Syrian *Xcc* مع الـ ITS لسلالات أنواع من *Xanthomonas* ونظمت المعطيات في شجرة قرابة وراثية باستخدام برنامج Clustal X 2.0.8 و TreeView 1.6.6 الشكل (14)



الشكل (14): شجرة القرابة الوراثية بدون جذر للـ Syrian *Xcc* مع بعض الـ ITS عند سلالات أنواع من الجنس *Xanthomonas* باستخدام Clustal X 2.0.8 وTreeView 1.6.6

هذا التحليل يشير إلى أنّ الـ ITS للعزلة Syrian *Xcc* متطابق مع ما يقابله عند Xcc 17 وقربية من *Xcv* و *Xcm* ومتباعدة عن *Xoo* و*Xoc* و*Xtt* و*Xtu*.

نتائج تحليل منطقة الـ ITS للعزلة Syrian *Xcc* وافقت ما ذكره Rademaker وزملاؤه بأنّ التصنيف باستخدام تحديد تتالي النكليوتيدات لسلسلة rDNA (16S-23S) طريقة غير كافية لتحديد السلالات ضمن النوع الواحد؛ حتى أنه على مستوى الأنواع هناك تشابه عالي بين الأنواع ضمن الجنس الواحد، وهذا موافق أيضاً لما ذكره Simoes ورفاقة (2007) بأنّ هناك أنواع من الجنس *Xanthomonas* لم يتم تمييزها بتحديد التتابع للـ ITS بسبب الدرجة العالية للتماثل وغياب التباين.

الاستنتاجـــات

- عزل 35 عزلة بكتيرية، بينت الاختبارات البيوكيميائية واختبار غرام وتحريض التجمد والعدوى الاصطناعية إنتمائها للنوع *Xanthomonas translucens*.

- أظهر الكشف عن مورثة *rpfB* لـ 15عزلة من العزلات الـ 35 المدروسة انتمائها للجنس *Xanthomonas* .

- تصميم بادئات متخصصة للكشف عن *Xt* وأُكّد تخصصها *In Silico* و*In Vitro* حيث يمكن الاستفادة من البادئات المصممة في مراقبة الحقول التي لا تبدي أعراض إصابة وفي الكشف عن تلوث البذور في هذه البكتيريا، وبالتالي الحد من انتشار المرض إلى مناطق غير موجود فيها.

- سمحت البصمة الوراثية rep(BOX-, ERIC-, REP-)PCR بتوزيع سلالات Xt الـ 15 المدروسة إلى 6 طرز وراثية مختلفة.

- تحديد تتابع النكليوتيدات لجزئين من منطقة الـ ITS لعزلة بكتيرية Syrian *Xcc* محلية عُزلت من القرنبيط من منطقة الطيبة وحددت نسبة تشابهها مع كل المعلومات المتعلقة بـ 17 *Xcc* الموجودة في بنك المعلومات الوراثي.

التوصيــات

- استمرار عزل البكتيريا من مناطق جغرافية مختلفة ومن عوائل مختلفة.

- العمل على تحديد تتابع النكليوتيدات لمنطقة الـ ITS أو لمورثات أخرى مرتبطة بالشراسة.

- استخراج الحزم المميزة للنوع *Xt* أو لسلالاته التي ظهرت في تقانات الـ rep-PCR وتحديد تتابعها النكليوتيدي بهدف تصميم بادئات تسمح بالكشف عن المتخصص عن هذه البكتيريا أو بعض سلالاتها.

- تحليل *In Silico* موسع لجينوم *Xt* بهدف تعريف عوامل الشراسة وتحديد مورثات عدم الشراسة *avr* والكشف عنها *In Vivo* بالعزلات السورية.

- تقييم مقاومة بعض أصناف القمح للعزلات المعزولة من البيئة السورية بهدف تربية أصناف مقاومة لهذا البكتيريا.

المراجـــع

المراجع العربية

1) **أبو غرة، محمود والدوجي، زياد الصواف. (1996-1997).** أمراض النبات البكتيرية (النظري والعملي)، منشورات جامعة دمشق. 432 صفحة.

2) **أسعد، سهام. (1987)**. مكافحة مرضي التفحم المغطى وتخطيط الأوراق البكتيري على القمح باستخدام كاسيات البذار. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة حلب، (قسم وقاية النبات). 149 صفحة.

3) **المجموعة الإحصائية السنوية. (2013).** وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي . سوريا.

4) **كيالي، ميادة. (2004)**. التخطط البكتيري على القمح*Xanthomonas translucens* pv. *undulosa* في سورية. رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة حلب، (قسم وقاية النبات). 66 صفحة.

5) **مندو، حجازي. (2007)**. توصيف الأمراض البكتيرية على النجيليات في سورية، وتفاعلها مع المصادر الوراثية للقمح . رسالة ماجستير، كلية الزراعة، جامعة دمشق، (قسم وقاية النبات).107 صفحة.

المراجع الأجنبية

6) **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.

7) **Akhtar, M.A and Bhutta, M.R. (2002).** Detection of bacterial pathogens in seeds of wheat, paddy and cotton in Pakistan. Pakistan J. Agric. Res. 17 (3):273-281.

8) **Asgaranil, E., Ghashghaei, T., Soudi, M. R. and Alimadadi, N. (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.

9) **Azad, H., and Schaad, N.W. (1988).** The relationship of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* to frost and the effect of frost on black chaff development in wheat. Phytopathology. 78(1):95-100.

10) Bragard, G. and Verhoyen, M. (1993). Monoclonal antibodies specific for *Xanthomonas campestris* bacteria pathogenic on wheat and other small grains, in comparison with polyclonal antisera. Journal of Phytopathology. 139(3):217-228

11) Bragard, C., Verdier, V., and Maraite, H. (1995). Genetic diversity among *Xanthomonas campestris* strains pathogenic for small grains. Applied and Environmental Microbiology. 61: 1020-1026.

12) Bragard, C., Singer, E., Alizadeh, A., Vauterin, L., Maraite, H., and Swings, J. (1997). *Xanthomonas translucens* from small grains: Diversity and phytopathological relevance. Phytopathology 87:1111-1117.

13) Bull, C. T., De Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M.,Saddler, G. S., Scortichini, M., Stead., D. E., and Takikawa, Y. (2010). Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. J Plant Pathol. 92(3):551-592.

14) de Bruijn, F.J., Rademaker, J., Schneider, M., Rossbach, U., Louws, F.J. (1996). Rep-PCR genomic fingerprinting of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses. In: Biology of plant-microbe interaction; proceedings of the 8th international congress of molecular plant-microbe interactions (G. Stacey, B. Mullin and P. Gresshoff, Eds.) APS Press, 497-502.

15) Duveiller, E. (1989). Research on '*Xanthomonas translucens'* of wheat and triticale at CIMMYT. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin. 19(1):97-103.

16) Duveiller, E. (1990). A seed detection method of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa,* using a modification of Wilbrink's agar medium. Parasitica 46(1):3-17.

17) Duveiller, E., Bragard, C., and Maraite, H. (1991). Bacterial diseases of wheat in the warmer areas—reality or myth? In: Wheat for the Nontraditional Warm Areas. Proceedings of the International Conference, Iguazu Falls, Brazil. D. Saunders, ed. Mexico, D.F.: CIMMYT. pp. 189-202.

18) Duveiller, E., and Maraite, H. (1993). Study of yield loss due to *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in wheat under high rainfall temperate conditions. Journal of Plant Diseases and Protection 100(5):453-459.

19) Duveiller, E. (1994). A pictorial series of disease assessment keys for bacterial leaf streak of cereals. Plant Disease 78(2):137-141.

20) Duveiller, E., and Maraite, H. (1995). Effect of temperature and air humidity on multiplication of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* and symptom expression in susceptible and field-tolerant wheat genotypes. Journal of Phytopathology 143(4):227-232.

21) Duveiller, E., Fucikovsky, L and Rudolph, K, eds. (1997). The bacterial diseases of wheat: concepts and methods of disease management. Mexico, D.F.: CIMMYT. 78 pp.

22) Dye, D.W and Kemp, W. J. (1977). A taxonomic study of plant pathogenic *Corynebacterium* species. New Zealand Journal of Agricultural Research. 20(4):563-582.

23) Eisen, J.A., Heidelberg, J.F., White, O and Salzberg, S.L. (2000). Evidence for symmetric chromosomal inversions around the replication origin in bacteria. Genome Biology . 1(6)**:** research0011.1–0011.9**.**

24) 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.

25) Forster, R.L. and Schaad, N.W. (1988). Control of black chaff of wheat with seed treatment and a foundation seed health program. Plant Disease. 72(11):935-938.

26) Forster, R.L., Mihuta-grimm, L., and Schaad, N.W. (1986). Black chaff of wheat and barley. University of Idaho, College of Agriculture. Current Information Series No.784, p. 2.

27) 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 .

28) 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.

29) Goncalves, E.R. and Rosato, Y.B. (2002). Phylogenetic analysis of *Xanthomonas* species based upon 16S–23S rDNA intergenic spacer Sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52(2): 355–361.

30) Gonzalez, C., Szurek,B., Manceau,C., Mathieu,T., Séré,Y. and Verdier, V .(2007). Molecular and pathotypic characterization of new *Xanthomonas oryzae* strains from West Africa. Molecular Plant-Microbe Interactions. 20(5):534–546.

31) Goszczynska, T., Serfontein, J.J and Serfontein, S. (2000). Introduction to practical phytobacteriology (A manual for phytobacteriology), first edition. Safrient- loop of bionet-international c/o ARC – plant protection research institute, Pretoria. 83p**.**

32) Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98.

33) Hauben, L., Vauterin, L., Swings, J and Moore, E. R. B.(1997). Comparison of 16S ribosomal DNA sequences of all *Xanthomonas* species. International journal of systemic bacteriology. 47(2):328-335.

34) Jaenicke, S., Bunk, B., Wibberg, D., Spröer, C., Hersemann, L., Blom, J., Winkler, A., Schatschneider, S., Albaum, S.P., Kölliker, R., Goesmann, A., Pühler, A., Overmann, J and Vorhölter, F-J. (2016). Complete genome sequence of the barley pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* DSM 18974T (ATCC 19319T). Genome Announc. 4(6):e01334-16.

35) Kazempour, M.N., Kheyrgoo, M., Pwdramfar, H and Rahimian, H. (2010). Isolation and identification of bacterial glum blotch and leaf blight on wheat (Triticum aestivum L.) in Iran. African Journal of Biotechnology. 9(20):2860-2865.

36) Kim, H.K., Orser, C., Lindow, S.E., and Sands, D.C. (1987). *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* strains active in ice nucleation. Plant Disease 71(11):994-997.

37) Kundo, S., Bothra, A., Tisa, L.S and Sen, A .(2012). *In silico* analysis reveals the role of horizontally transferred genes (HGTs) in shaping the pathogenicity of *Xanthomonas***.** Indian Journal of Biotechnology. 11:404-411.

38) Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. Bioinformatics, 23:2947-2948.

39) Lee, C., Lin, J., Weng, Z and Tseng, Y. (2009). Genomic characterization of the intron-containing T7-like phage phiL7 of *Xanthomonas campestris*. Applied and Environmental Microbiology. 75(24):7828–7837.

40) Li, B., Yu, R., Shi, Y., Su, T., Wang, F., Ibrahim, M., Xie, G., Wang, Y and Sun, G.(2011). Reclassification of *Xanthomonas* isolates causing bacterial leaf spot of *Euphorbia pulcherrima*. Plant Pathol. J. 27(4):360-366**.**

41) Liu Y-C, Wang S-C, Yu Y-J, Fung K-M, Yang M-T, Tseng Y-H, Tsai S-F, Sun HS, Lyu P-C, Chou S-H. (2015). Complete genome sequence of *Xanthomonas campestris pv. campestris* strain 17 from Taiwan. Genome Announc 3(6):e01466-15.

42) 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 .

43) Mahan, M.J and Roth, J.R. (1991). Ability of a bacterial chromosome segment to invert is dictated by included material rather than flanking sequence. Genetics. 129:1021-1032

44) Mamluk, O.F., AL-Ahmed, M., and Makki, M.A. 1990. Current status of wheat diseases in Syria. Phytopathologia mediterranea. 29(3):143-150.

45) Mann, S and Chen, Y-P.P. (2010). Bacterial genomic G + C composition-eliciting environmental adaptation. Genomics. 95(1): 7–15

46) Maraite, H., Bragard, C., and Duveiller, E. (2007). The status of resistance to bacterial diseases of wheat.In wheat production in stressed environments. Springer, New York. 37-49

47) Mehta, Y.R. (1986). Effect of Guazatin plus to control *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* in wheat. RENAPET (Reunion Nacional de Pesquisa em Trigo), Brazil. 56 p**.**

48) Mehta, Y.R. (1990). Management of *Xanthomonas campestris* pv. *undulosa* and hordei through cereal seed testing. Seed Science and Technology. 18(2):467-476.

49) Milus, E.A. and Chalkley, D.B. (1994). Virulence of *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* on selected wheat cultivars. Plant Disease. 78(6):612-615.

50) Milus, E.A. and Mirlohi, A.F. (1994). Use of disease reactions to identify resistance in wheat to bacterial streak. Plant Disease, 78(2):157-161.

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

52) Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89(3):583-590.

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

54) Partridge, J. E. (1998). Black chaff of wheat. Nebraska. Dept. of Plant Path. Nebraska - Lincoln Univ.

55) Peng, Z., Hu, Y., Xie, J., Potnis, N,, Akhunova1, A., Jones, J., Liu, Z., White, F.F and Liu, S .(2016). Long read and single molecule DNA sequencing simplifies genome assembly and TAL effector gene analysis of *Xanthomonas translucens***.** BMC Genomics. 17(1):21.

56) Pesce, C., Bolot, S., Cunnac, S., portier, P., FISCHER-LE Saux, M., Jacques, M-A., Gagnevin, L., Arlat, M., Noël, LD., Carrère, S., Bragard, C and Koebnik, R. (2015). High-quality draft genome sequence of the *Xanthomonas translucens* pv. *cerealis* pathotype strain CFBP 2541. Genome Announc 3(1):e01574-14.

57) 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.

58) Qian,W., Jia,Y., Ren, S., He,Y., Feng, J., Lu, L., Sun, Q., Ying, G., Tang, D., Tang, H., Wu, W., Hao, Q., Wang, L., Jiang, B., Zeng, S., Gu, W., Lu, G., Rong, L., Tian, Y.,Yao, Z., Fu, G., Chen, B., Fang, R., Qiang, B., Chen, Z., Zhao, G., Tang, J and He, C .(2005). Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris pv. campestris*.Genome Research.15(6):757-767.

59) Quibod,I.L. and Oliva,R. Ten *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* genomes.(Unpublished; cited in NCBI)

60) 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.

61) 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.

62) Rademaker, J.L.W., Norman, D.J., Forster, R.L., Louws, F.J., Schultz, M.H., and de Bruijn, F.J. (2006). Classification and identification of *Xanthomonas translucens* isolates, including those pathogenic to *ornamental asparagus*. Phytopathology 96(8):876-884.

63) Retchless, A.C., Labroussaa, F., Shapiro, L., Stenger, D.C., Lindow, S.E and Almeida, R.P.P. (2014). Genomic Insights into *Xylella fastidiosa* Interactions with Plant and Insect Hosts. In Genomics of Plant-Associated Bacteria. Springer Berlin Heidelberg. 177-202.

64) Richard,D. Complete genome sequences of four Solanaceae pathogen copper-resistant *Xanthomonas*: *X. gardneri, X. euvesicatoria, X.vesicatoria* and *X. perforans* (Unpublished; cited in NCBI)**.**

65) Rocha, E.P.C (2003).DNA repeats lead to the accelerated loss of gene order in bacteria. Trends in Genetics.19(11):600-603.

66) Salzberg, S.L., Sommer, D.D., Schatz, M.C., Phillippy, A.M., Rabinowicz, P.D., Tsuge, S., Furutani, A., Ochiai, H., Delcher, A.L., Kelley, D., Madupu, R., Puiu, D., Radune, D., Shumway, M., Trapnell, C., Aparna, G., Jha, G., Pandey, A., Patil, P.B., Ishihara, H., Meyer, D.F., Szurek, B., Verdier, V., Koebnik, R., Dow, J.M., Ryan, R.P., Hirata, H., Tsuyumu, S., Lee, S.W., Ronald, P.C., Sonti, R.V., Sluys, M.V., Leach, J.E., White, F.F and Bogdanove, A.J. (2008). Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99. *BMC Genomics.* 9(1):204p.

67) Sands, D.C., Kim, H.K., and Hall, V. (1981). *Xanthomonas* leaf streak of barley. In: Proceedings of the Barley Diseases and Associated Breeding Methodology Workshop, Rabat, Morocco. 173-182.

68) Sands, D.C., Mizrak, G., Hall, V.N., Kim, H.K., Bockelman, H.E., and Golden, M.J. (1986). Seed transmitted bacterial diseases of cereals: Epidemiology and control. Arab Journal of Plant Protection 4:127-125.

69) Sands, D.C. and Fourest, E. (1989). *Xanthomonas campestris* pv. *translucens* in North and South America and in the Middle East. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin 19(1):127-130.

70) Semenova, E., Nagornykh, M., Pyatnitskiy, M., Artamonova, I.I and Severinov, K. (2009). Analysis of CRISPR system function in plant pathogen *Xanthomonas oryzae***.** FEMS Microbiology letters. 296(1):110-116.

71) Showmaker, K.C., Arick,M.A. II, Hsu, C.-Y., Peterson, D.G. and Lu, S. MSCT Genome Sequencing and Assembly. (Unpublished; cited in NCBI)**.**

72) Silva, I.T., Rodriggues ,F.A., Oliveira, J.R., Pereira ,S.C., Andrade, C.C.L., and Coneicao, M.M. (2009). Wheat resistanse to bacterial leaf streak mediated by silicon. Journal of Phytopathology. 158(4):253-262 .

73) Simões, T. H. N., Gonçalves, E. R., Rosato, Y. B. and Mehta, A. (2007). Differentiation of *Xanthomonas* species by PCR-RFLP of *rpf*B and *atp*D genes. FEMS Microbiology Letters. 271(1): 33–39.

74) Stead, D.E. **(1989).** Grouping of *Xanthomonas campestris* pathovars of cereals and grasses by fatty acid profiling. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin.19(1):57-68.

75) Stromberg, K.D., Kinkel, L.L., Leonard, K.J. (1999). Relationship Between Phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens pv. translucens* and bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. Phytopathology .89(2):131-135.

76) Stromberg, K.D., Kinkel, L.L., Leonard, K.J. (2000). Interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *translucens*, the causal agent of bacterial leaf streak of wheat, and bacterial epiphytes in the wheat phyllosphere. Biological Control. 17(1):61-72.

77) Stromberg, K.D., Kinkel, L.L., Leonard, K.J. (2004). Quantifying the effect of bacterial antagonists on the relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens pv. translucens* and subsequent bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. Biological Control. 29(1):58-65.

78) Timmer, L.W., Marois, J.J., and Achor, D. (1987). Growth and survival of Xanthomonads under conditions nonconductive to disease development. Phytopathology. 77(9):1341-1345.

79) Van Sluys, M. A., Monteiro-Vitorello, C. B., Camargo, L. E. A., Menck, C. F. M., da Silva, A. C. R., Ferro, J. A., Oliveira, M. C., Setubal, J. C., Kitajima, J. P and Simpson, A. J. (2002). Comparative genomic analysis of plant-associated bacteria. Annual Review of Phytopathology. 40:169-189.

80) Vauterin, L., Yang, P., Hoste, B., Pot, B., Swings, J and Kersters, K. (1992). Taxonomy of xanthomonads from cereals and grasses based on SDS-PAGE of proteins, fatty acid analysis and DNA hybridization. Journal of General Microbiology. 138(7):1467-1477.

81) Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K., and Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. International Journal of Systematic Bacteriology. 45(3):472-489.

82) 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.

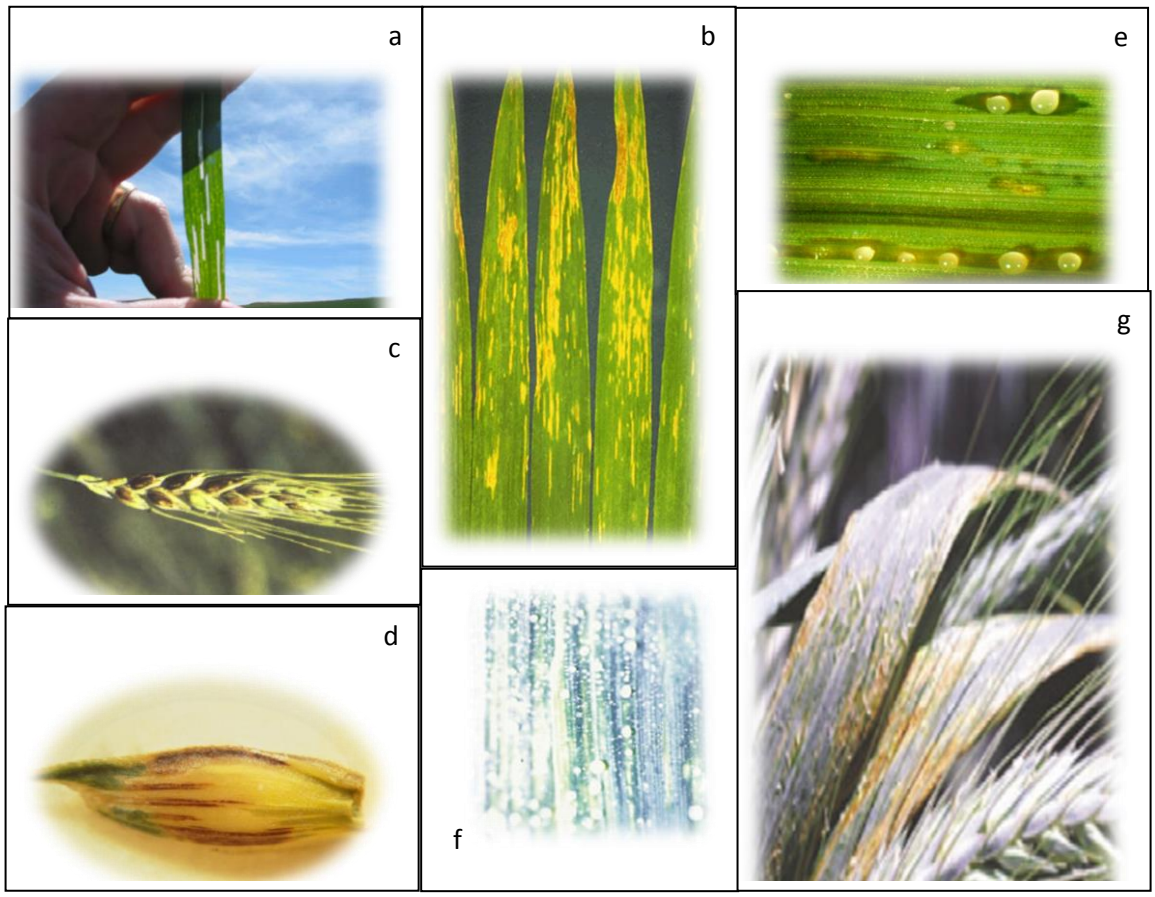
83) Wieser, M and Busse, H-J. (2000). Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 50(3):1087–1093.

84) Wilkins, K.E., Booher, N.J., Wang, L and Bogdanove, A.J. (2015). TAL effectors and activation of predicted host targets distinguish Asian from African strains of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae pv. oryzicola* while strict conservation suggests universal importance of five TAL effectors. Frontiers in Plant Science. 6:536.

85) Wilson, L.A., Sharp, M.S. (2006). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in Escherichia coli: evolution and implications for ERIC-PCR. Molecular biology and evolution. 23(6):1156–1168.

86) Zillinsky, F.J (1983). Common Diseases of Small Grain Cereals - a guide to identification. Centro lnternacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo. 141p.

الملحق 1



أعراض الإصابة ببكتيريا Xanthomonas translucens على القمح

(a) التخططات الطولية التي تظهر شفافة من خلال الضوء؛ (b) التخططات الطولية الصفراء الموازية لأعصاب الورقة؛ (c) أعراض العصافة السوداء على السنبلة؛ (d) التخططات الطولية القرمزية المتناوبة على العصافة؛ (e) قطيرات الافرازات البكتيرية على مستوى التخططات بالجو الرطب؛ (f) انحلال قطيرات الإفرازات البكتيرية الصفراء بوجود الندى أو الجو الماطر وتحولها لقطيرات حليبية ؛ (g) تحول الافرازات البكتيرية إلى شكل قشور (حراشف) في الطقس الجاف.

Abstract

Bacterial leaf streak and Black Chaff disease caused by *Xanthomonas translucens* is considered as one of the most important bacterial diseases of wheat in Syria. 98 bacterial strains was isolated from cereals samples (wheat, barley) collected from 15 Syrian regions.

35 isolates were identified as *Xt* bacteria according to morphological, biochemical and artificial infections tests. This identification was confirmed using Colony-PCR technique which amplify a partial of *rpfB* gene with length 1636 bp which control the polysaccharide production in *Xanthomonas* genus. This technique was applied on 15 studied isolates which are identical to *Xt* characters and 3 isolates which aren't identical to *Xt* as a negative control and 3 reference DNA samples belong to *Xanthomonas* genus (*Xoo*, *Xam*, *Xcv*) as a positive control. The expected band ,which length is 1636 bp, appeared in both *Xt* identical isolates and in positive control isolates, while it didn't in negative control samples on 1% agarose gel electrophoresis. The 15th isolates belongs to *Xt* were confirmed using specific primers designed during this study utilizing "Primer three" program which is available on NCBI site, these primers amplify a partial of *Xtu* and *Xtt* ITS region with length of 139 bp. As aresult, these new primers could be used to identify and diagnose *Xtt* and *Xtu* in infected plant and contaminated seeds.

To differentiate between *Xtt* and *Xtu* strains, and in order to get the matrix of similarities and phylogenetic tree, genomic fingerprinting techniques (rep-PCR) were applied on DNA of the 15 Syrian bacterial isolates and six bacterial strains related th *Xanthomonas* genus (*Xcv, Xam, Xcc, Xoo, Xoc, Xcm*).

rep-PCR amplicons showed on Agarose gel 1.5% demonstrate the existing of 88 bands distributed as (34, 30, 24) bands for BOX-PCR, ERIC-PCR and REP-PCR respectively.The size of bands ranged from 140 to 5000 bp. Bands 13, 15', 22', 11" and 13" (with expected size 540, 1100, 1870, 1220 and 1450 bp respectively) were distinctive for *Xt* isolates.

Matrix of similarities and phylogenetic analysis between isolates were performed using neighbor-joining method by POPGENE 1.32 and Treecon 1.3b programs and depending on rep-PCR results, it showed that the closest bacterial species to Xt isolates was *Xcc* strain with more than 82% of similarity, followed by *Xoc* strain with 65% similarity, whereas the farthest strain was *Xcm* with 52% of similarity.

The similarity percentages among *Xt* isolates ranged from 94% (between Xt22.1 and Xt28,Xt3.1,XT17) to 100% (between Xt4.2 and Xt7).

All the phylogenetic trees was divided into two clusters , the first one contains Xt isolates while the second one contains the rest of *Xanthomonas* species strains .

Xt cluster in phylogenetic tree of rep-PCR genomic fingerprinting divided into two sub clusters.

The first sub cluster divided into 2 groups; the first group includes Xt12.2 isolate only, while the second group contains (Xt24.1, Xt17, Xt28, Xt3.1).

The second sub cluster also divided into two goups, the first one includes just Xt14 isolate, while the second group contains two branches (first branch contains Xt30, Xt26, Xt33, while the second branch contains Xt21, XT34, Xt10, Xt4.2, Xt7).

As a result, rep-PCR genomic fingerprinting techniques succeeded to classify the Syrian *Xt* isolates to six different genetic variants.

The Syrian *Xcc* ITS region ,which amplified with (16S rDNA-23S rDNA) primers, was sequenced and identified using BLASTn and Blast-2Sequence programs available on NCBI site, the Syrian *Xcc* ITS was identical to ITS region of *Xcc* 17 strain.

Sequence similarities anf phylogenetic relationship between ITS Syrian *Xcc* and other sequences *Xanthomonas* ITS was generated using Clustal X2.08 and TreeView1.6.6 programs.

This analysis showed that ITS of Syrian *Xcc* is identical to *Xcc* 17 and closely related to *Xcm* and *Xcv* .

Damascus University

faculty of Agriculture

Plant Protection Department

Characterization of *Xanthomonas translucens* isolates which cause bacterial leaf streak of wheat, and bioinformatics analysis of its molecular data

Thesis submitted in partial fulfillment of the requirement for Master of agriculture (Plant protection)

presented by

Ismaeel Al-Saleh

Supervisor

Dr. Aïda Jalloul

Damascus university

Faculity of Agriculture

2016 - 2017