



جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم وقاية النبات

عزل وتعريف بكتيريا ممرضة للفاصولياء في سورية وتقييم قابلية بعض
الأصناف المزروعة للإصابة بها

Isolation and identification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) bacterial pathogens in Syria and susceptibility evaluation of some cultivated varieties to infection

دراسة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية (وقاية النبات)

إعداد

م. غسان البيضة

معيد في كلية الزراعة _ جامعة الفرات

المشرف المشارك

د. عايدة جلول

كلية الزراعة _ جامعة دمشق

المشرف

د. محمود أبو غرة

كلية الزراعة _ جامعة دمشق

2017

تصريح

أصرح بأن البحث الموصوف في هذه الرسالة تحت عنوان:

"عزل وتعريف بكتيريا ممرضة للفاصولياء في سوريا وتقييم قابلية بعض الأصناف المزروعة للإصابة بها"

لم يسبق أن قدم للحصول على أي درجة جامعية أخرى، وغير مقدم حالياً لذلك، وإن كل العمل والنتائج المذكورة هي جهودي الشخصية، وبتوجيه من الاساتذة المشرفين ، وجميع المراجع التي ذكرت في الرسالة نسبت الى مصادرها ضمن النص وفي قائمة المراجع .

المرشح

غسان البيضة

Declaration

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

"Isolation and identification of common bean (*Phaseolusvulgaris*L.) bacterial pathogens in Syria and susceptibility evaluationof some cultivated varieties to infection"

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

Ghassan Albeda

شهادة

نشهد بأن هذا البحث الموصوف في هذه الرسالة:

"عزل وتعريف بكتيريا ممرضة للفاصولياء في سوريا وتقييم قابلية بعض الأصناف المزروعة للإصابة بها"

هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح غسان البيضة بإشراف الاستاذ الدكتور محمود ابو غرة الاستاذ المساعد في قسم وقاية النبات في كلية الزراعة بجامعة دمشق ، والدكتورة عايدة جلول المدرس في قسم وقاية النبات في كلية الزراعة بجامعة دمشق، وان المراجع المستخدمة في هذه الرسالة موثقة أصولاً ضمن النص

المشرف المشارك

المشرف الرئيسي

المرشح

د. عايدة جلول

د. محمود أبو غرة

غسان البيضة

Certification

It is hereby certified that the work described in this thesis:

"Isolation and identification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) bacterial pathogens in Syria and susceptibility evaluation of some cultivated varieties to infection"

Is the result of scientific research done by candidate Ghassanalbaida under the supervision of prof. Mahmoud Abu Ghoraa, Plant protection department, Faculty of Agriculture, and Dr. AïdaJalloul, Plant protection department, Faculty of Agriculture, and any reference to other research works has been duly acknowledged in the text.

Candidate

supervisor

Co-supervisor

GhassanAlbeda

Prof.Mahmoud Abu Ghoraa

Dr. AïdaJalloul

قرار لجنة الحكم

قُدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في قسم وقاية النبات في كلية الزراعة بجامعة دمشق، وأُجيزت 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.

نُوقشت هذه الرسالة في جلسة علنية في كلية الزراعة بجامعة دمشق بتاريخ 2017/8/30

لجنة الحكم

الدكتور جودة فضول عضواً

الأستاذ في قسم وقاية النبات / كلية الزراعة / جامعة دمشق

الدكتور محمود أبو غرة عضواً مشرفاً

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

الدكتور أحمد مهنا عضواً

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

بسم الله الرحمن الرحيم

وَقُلْ اَعْمَلُوا فَسَيَرَى اللّٰهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ

أشكر الله ربه العالمين الذي خلق وهدي وسدد الخطى فخرج هذا العمل بعونه
وتوفيقه نحمده حمداً كثيراً في المبتدى والمنتهى

بعد رحلة بحث وجهد واجتهاد تكلفت بإنجاز هذا البحث، فإنني أتقدم بوافر الشكر
وعظيم الامتنان للأستاذ الدكتور محمود أبو غرة والدكتورة عايدة جلول لتفضلهما
بالإشراف على هذا العمل و لما قدماه من جهد ونصح ومعرفة لإنجازه

كما أتقدم بجزيل الشكر للأستاذ الدكتور جودة فضول والدكتور أحمد مهنا أعضاء لجنة
الحكم لملاحظتهما لإغناء هذا البحث والشكر موصول لجميع أساتذة قسم وقاية النبات

وكل الشكر لجامعة دمشق لحسن الصياغة وجامعة الفرات للدعم المتواصل ومخبر التقانات
الحيوية في كلية الزراعة بإشراف الدكتور سلام لاوند ومركز مكافحة الحيوية و
الأستاذ الدكتور خالد العسسى للمساعدة ومد يد العون لإنجاز هذا البحث

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

إلي من علمني العطاء دون انتظار ومن أحمل اسمه بكل افتخار والدي العزيز

إلى من كان دعائهما سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي أمي الغالية

إلى الذين كانوا سنداً وعموداً أشد بهما زري أخوتي الأحبة

إلى رفيقة دربي وشريكة حياتي والغالية على قلبي زوجتي الحبيبة

إلى رفيق الدرب والكفاح من تحلى بالإخاء وتميز بالعطاء والوفاء إسماعيل الصالح

وأتوجه بجزيل الشكر والامتنان لكل من ساهم في إنجاز هذا البحث

فهرس المحتويات Contents

الصفحة	العنوان
I	فهرس المحتويات
III	فهرس الجداول
IV	فهرس الاشكال
V	الاختصارات
VI	الملخص
1	المقدمة
3	الدراسة المرجعية
3	Common Bacterial Blight اللفحة البكتيرية العادية
7	Halo blight اللفحة الهالية
11	Bacterial Brown Spot التبقع البنى البكتيرى
14	Bacterial wilt الذبول البكتيرى
17	مكافحة الامراض البكتيرية التى تصيب نبات الفاصولياء
18	زراعة الاصناف المقاومة أو المتحملة
20	دراسة القرابة الوراثية للبكتيريا
21	Economic Importance الأهمية الاقتصادية للأمراض البكتيرية
23	ميررات البحث
24	اهداف البحث
25	مواد وطرائق العمل Materials and methods
25	جمع العينات
25	عزل و تعريف البكتيريا
26	العدوى الاصطناعية
27	الاختبارات الكيميائية الحيوية
30	تقييم قابلية أصناف الفاصولياء للإصابة
32	استخلاص الـ DNA وتفاعل البصمة الوراثية Rep-PCR
32	استخلاص الـ DNA
32	تفاعل البصمة الوراثية Rep-PCR
34	النتائج والمناقشة
34	تحري انتشار أمراض الفاصولياء البكتيرية
36	عزل وتعريف البكتيريا
36	نتائج اختبار القدرة الإراضية
37	تعريف البكتيريا بالاختبارات البيوكيميائية
40	تقييم قابلية اصناف الفاصولياء المزروعة للإصابة
47	القرابة الوراثية لعزلات Psp و Xap
53	الاستنتاجات

54	التوصيات
55	المراجع العربية والاجنبية
65	Abstract

فهرس الجداول

رقم الصفحة	العنوان	رقم الجدول
36	العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها من جميع العينات المختبرة	1
39	نتائج الاختبارات البيوكيميائية	2
46	تقسيم العزلات في مجموعات حسب قدرتها على إصابة الاصناف	3
49	الاوران الجزيئية للحزم التي ظهرت في اختبار الـ Rep-PCR	4
50	مصفوفة التشابه والتباين للعزلات المختبرة	5

فهرس الاشكال

رقم الصفحة	العنوان	رقم الشكل
4	المواصفات المورفولوجية لبكتيريا Xap	1
5	أعراض الإصابة ببكتيريا Xap على الاوراق و البذور والقرون	2
6	التوزع الجغرافي والانتشار العالمي لمرض اللفحة البكتيرية العادية CBB	3
8	المواصفات المورفولوجية للبكتيريا المسببة لمرض اللفحة الهالية	4
10	أعراض مرض اللفحة الهالية على نبات الفاصولياء	5
10	التوزع الجغرافي و الانتشار العالمي لمرض اللفحة الهالية على الفاصولياء	6
12	المواصفات المورفولوجية للبكتيريا المسببة لمرض التبقع البني البكتيري على الفاصولياء	7
13	أعراض الإصابة ببكتيريا Psp المسببة لمرض التبقع البني البكتيري على الفاصولياء	8
13	التوزع الجغرافي و الانتشار العالمي لمرض التبقع البني البكتيري على الفاصولياء	9
15	المواصفات المورفولوجية للبكتيريا المسببة لمرض الذبول البكتيري على الفاصولياء	10
15	أعراض الذبول الناتجة عن الإصابة بمرض الذبول البكتيري على نبات الفاصولياء	11
16	التوزع الجغرافي والانتشار العالمي لمرض الذبول البكتيري على الفاصولياء	12
26	نشر البكتيريا بطريقة التخطيط على وسط الزرع	13
35	بعض الأعراض المرضية التي ظهرت على نباتات الفاصولياء اثناء الجولات	14
35	قرون فاصولياء جمعت من الاسواق تظهر عليها بقع مشبعة بالماء وافرازات بكتيرية	15
37	بقع مائية على القرون المعدة بطريقة الوخز باستخدام اعواد تنظيف الاسنان	16
38	نتائج الاختبارات البيوكيميائية	17
40	تطور أعراض الإصابة على نباتات الفاصولياء المعدة بعزلات Psp و Xap	18
41	شدة الإصابة حسب السلم 0-5،	19
42	ترتيب الاصناف حسب قابليتها للإصابة بمقياس 0-5	20
43	ترتيب العزلات البكتيرية حسب شراستها	21
45	متوسط شدة الإصابة الناتجة عن تفاعل عزلات Psp و Xap مع الاصناف المدروسة	22
48	رحلان كهربائي على هلامه Agarose 2% يظهر حزم التعددية الشكلية لنواتج	23
	تفاعلات Rep-PCR	
52	شجرة القرابة الوراثية لعزلات <i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>phaseolicola</i> و <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	24

Abbreviations الاختصارات

Abbreviation	Name	الاسم
Xap	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	اللفحة البكتيرية العادية
Xapf	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>Phaseoli</i> var <i>fuscans</i>	طراز وراثي من اللفحة العادية
MXP	a semi-selective medium for <i>Xanthomonas campestris</i>	وسط زرع نصف إنتخابي
CBB	Common Bacterial Blight	مرض اللفحة البكتيرية العادية
HB	Halo blight	مرض اللفحة الهالية
BBS	Bacterial brown spot	التبقع البني البكتيري
CFU	Colony forming unit	وحدة قياس تركيز البكتيريا في المعلق
Psp	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>Phaseolicola</i>	بكتيريا اللفحة الهالية
MSP	modified sucrose peptone medium	وسط زرع انتحابي
Pss	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> van Hal .	بكتيريا التبقع البني
Cff	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	بكتيريا الذبول البكتيري
NA	Nutrient agar	وسط زرع عام
TSW	Thousand seed weight	وزن الألف بذرة
INP	Ice-nucleation proteins	بروتينات تحريض التجمد
MT	Milk tween agar	وسط زرع انتحابي
rep-PCR	repetitive PCR	تفاعل تضخيم قطع الدنا المعتمد على السلاسل التكرارية
YPGA	Yeast-peptone Glucose Agar, general medium	وسط زرع عام
Bp	Base Pair	وحدة قياس الاوزان الجزيئية
L	Liter	لتر
KB	Medium for distinguishing fluorescent pseudomonads from nonfluorescent pseudomonads	وسط لتمييز البكتيريا الومضية
TBE	Tris base boric acid EDTA	محلول منظم الرحلان

الملخص Abstract

أُجريت هذه الدراسة من أجل التحري عن بعض مسببات الامراض البكتيرية bacterial pathogens عند نبات الفاصولياء *Phaseolus vulgaris* L. في مناطق مختلفة من سوريا وعزلها وتعريفها بالاختبارات البيوكيميائية، ومن ثم تقييم قابلية بعض الاصناف المزروعة محلياً للإصابة بها.

من خلال الجولات الحقلية للمنطقة الساحلية ومناطق ريف دمشق ومن خلال العينات التي تم جمعها من الاسواق خلال عامي 2015- 2016 تبين وجود مظاهر مرضية على نباتات الفاصولياء تشبه الى حد كبير الاعراض المرضية التي تسببها الممرضات البكتيرية على نبات الفاصولياء.

أدت عملية العزل من جميع العينات النباتية الى الحصول على 125 عزلة كان منها 20 عزلة ممرضة لنبات الفاصولياء وجميعها عُزلت من القرون .

بناءً على المواصفات الشكلية ونتائج الاختبارات البيوكيميائية تبين ان معظم العزلات تتبع للنوع *pseudomonas savastanoi* pv *phaseolicola* المسبب لمرض اللفحة الهالية؛ عزلة واحدة تتبع النوع *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* المسبب لمرض اللفحة العادية.

أُختبرت قابلية خمسة اصناف فاصولياء للإصابة بالمرض في البيت الزجاجي برش معلق بكتيري على اوراق النباتات بعمر 15 يوم، بينت النتائج اصابة نباتات الفاصولياء المُعدة بدرجات متباينة حيث كان الصنف الايطالي *sais blue lake* هو الاكثر مقاومة؛ واختلاف العزلات البكتيرية في شراستها حيث كانت العزلة 7.1.1 هي الاكثر شراسة.

دُرست القرابة الوراثية بين العزلات الممرضة للفاصولياء بوجود *X.campestris* pv. *Campestris* و *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* بتقانة REP-PCR. وأظهرت نتائج الرحلان الكهربائي وجود 26 حزمة مميزة تراوحت اوزانها بين 111- 3000 bp. حُسبت مصفوفة التشابه باستخدام برنامج 1.32 POPGENE وتراوحت نسبة التشابه بين عزلات *pseudomonas* بين 73%- 100% ونسبة التشابه مع عزلات *Xanthomonas* تراوحت بين 42% حتى 61%. ورُسمت شجرة التباين الوراثي باستخدام برنامج 1.3b Treecon باستخدام طريقة Neighbor joining؛ انقسمت شجرة القرابة الوراثية الى عنقودين؛ العنقود الاول ضم عزلات (18) *Psp* عزلة والتي توزعت في تسع طرز وراثية؛ الثاني يضم عزلات *Xanthomonas* .

Introduction مقدمة:

تُعد الفاصولياء العادية *Phaseolus vulgaris* L. أهم الأنواع المزروعة التابعة لجنس *Phaseolus* ومن أكثرها تبايناً في صفاتها الخضرية، وينتمي هذا الجنس للفصيلة *Fabaceae* والرتبة *Fabales*، يتبع للجنس *Phaseolus* 70 نوعاً تقريباً (Delgado-Salinas وزملاؤه، 2011). تُعرف الفاصولياء الخضراء بإسم Green beans أو Snap beans، بينما تُعرف الفاصولياء الجافة بإسم Dry beans أو Kidney beans وهي واحدة من أهم أنواع البقوليات المزروعة على نطاق واسع في العالم.

الموطن الأصلي هو وسط و جنوب اميركا وزرعت منذ 5000 عام في المكسيك (Buckler و زملاؤه، 1998)، أُدخلت الى أوروبا من قبل الاسبان والبرتغاليين ومنها إلى أفريقيا وباقي دول العالم، وتُزرع حالياً على نطاق واسع كمحصول غذائي رئيس في كثير من المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية والمناطق المعتدلة من الأمريكيتين وأوروبا وأفريقيا وآسيا (Juhi و زملاؤه، 2010). أما فاصولياء الليما *Ph.lunatus* L. فتعد المناطق الاستوائية الرطبة من أمريكا الجنوبية الموطن الأصلي لها، حيث زُرعت في البيرو قبل 8000 عام وهذا يفسر ارتباط اسمها بمدينة ليما عاصمة البيرو ثم انتقلت إلى بقية أرجاء العالم وقد تباينت مناطق انتشارها في العالم تبعاً للخصائص البيولوجية لكل نوع من الفاصولياء ومتطلباته البيئية (Freytag و Debouck، 2002) .

تعد الفاصولياء من نباتات الموسم الدافئ الرطب، ويتراوح المجال الحراري المناسب للإنبات السريع والمتجانس بين 20-25 °C، أما درجة الحرارة المناسبة للنمو الخضري و الإزهار وعقد الثمار فتتراوح بين 25-30 °C وهي حساسة لدرجات الحرارة المرتفعة (Porch و Jahn، 2001) . وتُزرع الفاصولياء لأجل قرونها الخضراء وبذورها الجافة، قد تزرع من أجل الحصول على بذورها الخضراء، تعد الفاصولياء من محاصيل الخضر ذات القيمة الغذائية العالية سواء كانت قروناً خضراء أو بذوراً جافة، فهي غنية بالمواد الكربوهيدراتية والأملاح والألياف وتعد مصدراً هاماً للبروتين النباتي. وللفاصولياء فوائد طبية لا تقل أهمية عن قيمتها الغذائية، فقد بينت الدراسات أن قرون الفاصولياء الخضراء غنية بمادة الإينوزيت (Inosite) المقيّوة للقلب، المهدئة للأعصاب، المدرة للبول والمنشطة للكبد. كما أن بذورها الجافة تعمل على تنظيم نسبة الجلوكوز والأنسولين بالدم (Tormo و زملاؤه، 2004) وخفض نسبة الإصابة بسرطان البروستات عند الرجال وسرطان الثدي عند النساء (Bennink، 2002)، للفاصولياء قيمة زراعية كبيرة جداً فهي تُغني التربة بالآزوت بفضل ما تمتلكه جذورها من عقد آزوتية قادرة على تثبيت الآزوت الجوى.

ونظراً لدخول الفاصولياء في صناعة الحفظ بالتعليب والتجميد فقد ازدادت المساحة المزروعة لإنتاجها على الصعيدين العالمي والمحلي، ففي عام 2014 كان الانتاج العالمي من الفاصولياء الحب والخضراء يقدر بـ 26 مليون طن و 19 مليون طن على التوالي وبمساحة 30 ، 15.1 مليون هكتار على التوالي (FAO، 2014) .

ازدادت المساحات المزروعة بالفاصولياء بشكل ملحوظ في سوريا، ففي عام 2013 بلغت المساحة المزروعة بالفاصولياء الخضراء والحب 3329، 507 ألف هكتار على التوالي موزعة في محافظات القطر المختلفة وإنتاج قُدر بـ 32267 ، 3607 طن على التوالي (إحصائيات وزارة الزراعة، 2013) .

تعد الآفات والأمراض من العوائق الاساسية للإنتاج، حيث تسبب الأمراض خسائر في الانتاجية تتراوح بين 20- 100 % (Singh و Schwartz، 2010)، والسبب الرئيس لنقص الانتاجية هو الأمراض الفطرية والبكتيرية والفيروسية (Ferreira و زملاؤه، 2003)، و تصاب الفاصولياء أيضاً بمجموعة من الآفات الحشرية والأمراض الفيزيولوجية .

الأمراض البكتيرية: Bacterial Diseases

تُصاب الفاصولياء بالعديد من الأمراض البكتيرية والتي تؤثر بشكل كبير على الإنتاجية وتنتشر على نطاق واسع في معظم مناطق زراعة الفاصولياء في العالم. ومن أهم هذه الأمراض:

1- اللفحة البكتيرية العادية: Common bacterial blight

التسمية والتصنيف: Classification and Nomenclature

سُجل هذا المرض لأول مرة في الولايات المتحدة من قبل Beach عام 1892. كما وصف العالم Smith العامل الممرض وتمت تسميته *Bacillus phaseoli* (Smith, 1897) ولاحقاً حسب الطرائق المتبعة في تعريف وتصنيف البكتيريا (EPPO, 1998) تمت تسميته بـ :

Xanthomonas campestris pv. *Phaseoli* (Smith 1897) .

يتبع العامل الممرض للفصيلة *Xanthomonadaceae* والرتبة *Xanthomonadales* والصف *Gammaproteobacteria*. ويُصنف المسبب لمرض اللفحة العادية كطراز من طرز *X.campestris* والتي قُسمت إلى 125 طرازاً ممرضاً حيث يُصيب كل واحد نوع نباتي معين أو أنواع تنتمي لنفس العائلة النباتية، بإعادة تصنيف الجنس *Xanthomonas* اعتماداً على التحليل الجزيئي باستخدام تقانات PCR –Box –Rep–, Eric- تم وضع البكتيريا المسببة للمرض ضمن النوع *X.axonopodis* (CABI/EPPO, 2014).

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* (Smith 1897)

وقُسمت البكتيريا التي تسبب مرض اللفحة البكتيرية العادية إلى ثلاث مجموعات (CABI/EPPO, 2014):

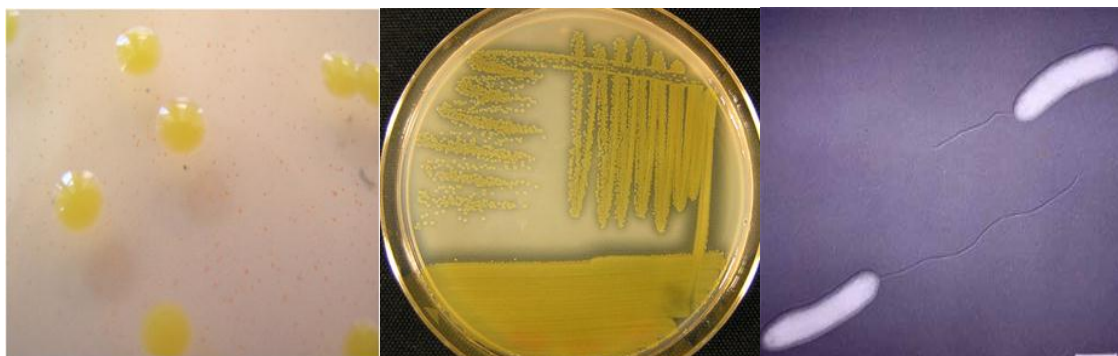
1- *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* (Xapf): تُنتج صبغة بنية منحلة في وسط الزرع بوجود الحمض الاميني Tyrosine.

2- *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *indica* (Xapi): تُنتج صبغة بنية منحلة في وسط الزرع بغياب الحمض الاميني Tyrosine.

3- *X. axonopodis* pv. *Phaseoli* (Xap): لا تُنتج صباغ بنية في وسط الزرع.

تُعرف اللفحة المُتسببة عن النمط *Fuscans* بإسم Fuscous blight وهناك العديد من الدراسات التي أشـارت إلى أن عزلات *X.axonopodis* pv.*phaseoli* var.*fuscans* أكثر إمرضية للفاصولياء (Mutlu وزملاؤه، 2008). واصبحت التسمية لسلالات الطراز *Fuscans* *Xanthomonas fuscans* subsp. *Fuscans* (Bull وزملاؤه، 2012).

بكتيريا *Xanthomonas axonopodis* pv.*phaseoli* (Xap) هوائية التنفس، عسوية الشكل، أبعادها 0.4 - 0.9 x 0.6 - 2.6 ميكرون، سالبة الغرام، غير متبوعة، متحركة بواسطة سوط قطبي واحد. تنمو بكتيريا Xap على وسط الزرع YPGA (Yeast extract 7 g/l, Peptone 7 g/l, Glucose 7 g/l Agar 15 g/l) وتشكل مستعمرات محدبة (الشكل 1)، تفرز صبغات صفراء غير ذوابة في أوساط الزرع حيث تكون مستعمراتها صفراء مائلة للبرتقالي أحياناً بسبب إفرازها لمركبات Xanthomonadins (Harveson و Schwartz، 2007). تنمو على وسط Yeast extract- dextrose- CaCo3 (YDC) وهو وسط متخصص في عزل أنواع الجنس *Xanthomonas* وتشكل عليه مستعمرات مخاطية القوام، محدبة صفراء اللون (Schaad و Stall، 1980).



شكل (1) المواصفات المورفولوجية لبكتيريا Xap، مستعمراتها محدبة صفراء اللون

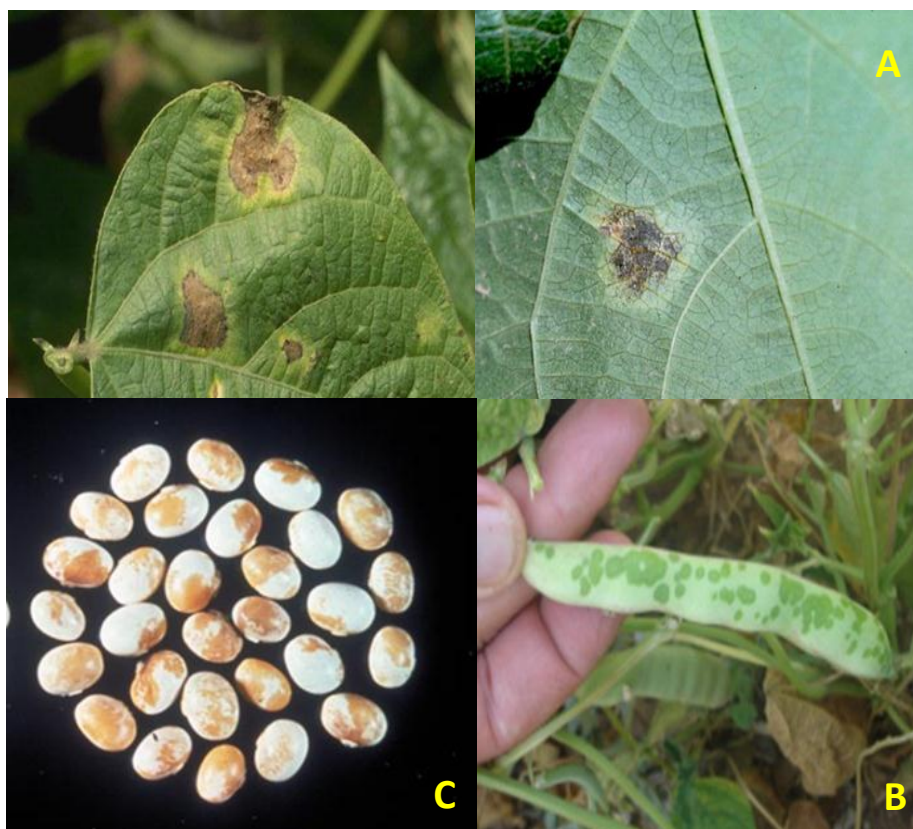
(المصدر: Howard F. Schwartz, Colorado State University, Bugwood.org)

تحلل بكتيريا Xap النشاء والجلاتين والكازئين، وتنتج غاز كبريت الهيدروجين H_2S من تفكيك الحمض الأميني السيستئين Cysteine، كما تنتج اللوفان Levan في الاوساط الحاوية على السكروز، سالبة الأوكسيداز oxidase، سالبة البكتيناز ولا تحلل الأرجنين Arginine، وموجبة لأنزيم الكاتالاز Catalase (Stall و Schaad، 2001).

تظهر الأعراض الأولى للإصابة على شكل بقع مائية صغيرة على الأوراق في غضون 4 - 10 أيام من بدء الإصابة، تكبر هذه البقع وتموت الانسجة في مركز البقع وتتحول إلى اللون البني، تصبح الأنسجة حول البقع رخوة (Schwartz وزملاؤه، 2009). تحاط البقع بهالة صفراء ضيقة وفي بعض

الاحيان تكون هذه الهالة غائبة (الشكل2). تكون إصابة الفروع أقل حدوثاً وتبدأ بظهور بقع مائية تجف وتتحول إلى اللون البني المحمر ويلاحظ بقع على الساق خاصة حول العقدة الأولى.

على القرون تبدأ الاعراض على هيئة بقع مائية دائرية غائرة وفي الظروف الرطبة تظهر إفرازات بكتيرية صفراء من البقع المتشكلة على القرون (Harveson وزملاؤه، 2005). وتظهر البذور المصابة منكشمة ومشوهة وتكون ضعيفة الإنبات وفي الأصناف ذات البذور البيضاء يمكن أن تظهر بقع صفراء أو بنية على غلاف البذرة وخاصة بالقرب من منطقة السرة وفي الأصناف ذات البذور الداكنة يكون التلون غير مرئي، وقد لا تظهر الأعراض على البذور المصابة (Akhavan وزملاؤه، 2009).



شكل (2) A. أعراض الإصابة ببكتيريا Xap على الاوراق، بقع مائية تتطور الى بقع نيكروزية محاطة بهالات صفراء اللون؛ B. على القرون بقع مائية منتشرة على طول غلاف القرن؛ C. على البذور تلون بني على غلاف البذرة (المصدر Howard F. Schwartz, Colorado State University, Bugwood.org)

سُجل مرض اللفحة العادية في معظم مناطق زراعة الفاصولياء في العالم (الشكل3)، ينتشر في غالبية دول حوض البحر الأبيض المتوسط، حيث ينتشر في دول الجوار لسورية لبنان، فلسطين المحتلة، الأردن وتركيا (EPPO، 1998). تُعد الفاصولياء العادية *Phaseolus vulgaris* المضيف الرئيسي لبكتيريا اللفحة العادية وتُصاب بعض أنواع البقوليات طبيعياً مثل: *Lablab purpureus*، *Phaseolus lunatus*، كما تشكل الأنواع *P. acutifolius*، *P. coccineus*، *Lupinus polyphyllus* عوائلًا للممرض تحت ظروف العدوى الصناعية فقط، هناك تقارير متضاربة حول ما

إذا كانت Xap ممرضة للوبياء *Vigna unguiculata* ssp. *Unguiculata* (Gilbertson) و Maxwell، 1992)، و تُصيب هذه البكتيريا أنواع الجنس *Calopogonium* sp (نباتات مزهرة تتبع للفصيلة البقولية) والجنس *Pueraria* sp (الكودزو) وتُصيب البازلاء *Pisum sativum* (Bradbury، 1986).



شكل (3) التوزيع الجغرافي والانتشار العالمي لمرض اللثة البكتيرية العادية CBB

المصدر <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap>

تحتفظ بكتيريا Xap بحيويتها في البذور وفي بقايا النباتات المصابة وبشكل سطحي Epiphytic على مدى واسع من النباتات (Gent وزملاؤه، 2005). وتنتقل البكتيريا بواسطة البذور التي يمكن أن تبقى فيها حية مدة 15 عام (Karavina و زملاؤه، 2011). وقد تحتفظ البكتيريا بحيويتها في بذور الفاصولياء المصابة مدة تصل حتى 30 عام (Trujillo و saettler، 1980). إن بذرة واحدة مُصابة من بين 10000 بذرة مُعدة للزراعة يمكنها في حال توفر الظروف المناسبة تحدث إصابة في كامل الحقل (Sutton و Wallen، 1970).

تعتبر البقايا النباتية المصابة والعوائل الجانبية الأخرى مصدراً للإصابة ببكتيريا Xap (Khlaif و Qadous، 1995). هناك تقارير متضاربة بشأن قدرة Xap على الاحتفاظ بحيويتها في التربة الملوثة والبقايا النباتية (Saettler وزملاؤه، 1986; Gilbertson وزملاؤه، 1990)، فوجد أن بكتيريا Xap تعيش لمدة 7 أشهر في البقايا النباتية على سطح التربة ولكنها لم تبقى في البقايا المدفونة بعد 30 يوم، و وجد أن البكتيريا يمكن أن تعيش في الأوراق الجافة لمدة ست سنوات في ظروف المختبر (Gilbertson وزملاؤه، 1988)، كما عزل Karavina وزملاؤه (2008) بكتيريا Xap من البقايا النباتية الموجودة في البيوت البلاستيكية بعد 12 شهر في زيمبابوي. إن البقايا النباتية المصابة يمكن أن تكون مصدراً مهماً للعدوى في المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية مقارنة مع المناطق المعتدلة (Gilbertson وزملاؤه، 1990). كما وتحتفظ بكتيريا Xap بحيويتها على الأعشاب

حيث تبين أن أنواع محددة من الأعشاب مثل السرمق الأبيض *Chenopodium album* يمكن أن تؤمن ملاذاً للممرض لأكثر من 6 أشهر (Opio وزملاؤه، 1994). تعيش البكتيريا على سطح النبات (Epiphytic) على مدى واسع من النباتات التي تتبع لفصائل مختلفة مثل الفصيلة المركبة، النجيلية، الصليبية و الحماضية بالإضافة إلى العديد من النباتات البقولية (Allen وزملاؤه، 1998)، وعندما تتواجد البكتيريا بهذا الشكل فإنها تساهم في وبائية المرض (Ishimaru وزملاؤه، 1991) .

تدخل البكتيريا النبات من خلال الفتحات الطبيعية كالمسامات والجروح الناتجة عن تغذية الحشرات ويمكن أن تحدث الاصابات الوبائية بعد الهطولات المطرية والتلجبة بوجود الرياح، فبعد وصول البكتيريا الى داخل النبات تتكاثر بسرعة في الفراغات بين الخلايا والحجر تحت المسامية وتحتاج من 10-14 يوم بدءاً من حدوث الإصابة وحتى إعادة الانتشار الثانوي (Saettler، 1991). تتراوح درجات الحرارة المثلى لتطور المرض بين 28-32 °C (Harveson و Schwartz، 2007)، وتكون النباتات أكثر حساسية في مرحلة إنتاج البذور مقارنة مع مرحلة النمو الخضري، إذ يمكن للبكتيريا أن تدخل في الأنسجة الوعائية وعندها تنتشر جهازياً في النبات ويظهر الذبول بسبب دخول البكتيريا في الأنسجة الوعائية، حيث منها تنتقل البكتيريا الى البذور (Thomas و Zaumeyer، 1957؛ Aggour وزملاؤه، 1989).

تظهر في الظروف الرطبة إفرازات بكتيرية لزجة على الأوراق تنتقل الى النباتات السليمة المجاورة بواسطة الامطار المصحوبة برياح أو بالري الرذاذي و تنتشر العدوى بين النباتات، إذ تسهم مياه الامطار في نقل الممرض لمسافة 8 أمتار حول بؤرة الإصابة ولذلك فإن نباتاً واحداً مصاباً من بين 1000 نبات سليم يمكن أن يسبب خسائر كبيرة (Steadman وزملاؤه، 1975). لقد تمت الإشارة الى اعتماد تطور الإصابة الوبائية ببكتيريا Xap على مستوى المقاومة الأفقية والظروف المناخية بدلاً من تعداد أو حجم المجتمع البكتيري في البذور وكذلك على السلالة البكتيرية، فقد وُجد أن الإصابة بـ Xapf كانت أكثر شدة والاعراض أكثر وضوحاً مقارنةً بالإصابة بـ Xap (He، 2010). كما يمكن أن تلعب بعض الحشرات دوراً في نقل البكتيريا، مثل بعض حشرات السوس *Diaprepes abbreviates* وخنفساء أوراق البقوليات والتي تقوم بإحداث جروح على النبات (Kaiser and Vakili، 1978) ويساهم أيضاً كلاً من الذباب الأبيض *Bemisia tabaci*، الجنادب *Melanoplus sp* وصانعات الانفاق في نقل بكتيريا Xap (Sabet و Ishag، 1969) .

2- اللفحة الهالية: Halo blight

سُجل هذا المرض لأول مرة في عشرينيات القرن التاسع عشر في ولاية نيويورك، وقد تم إثبات القدرة الإيمراضية للعامل الممرض من قبل العالم Burkholder وسُمي في البداية:

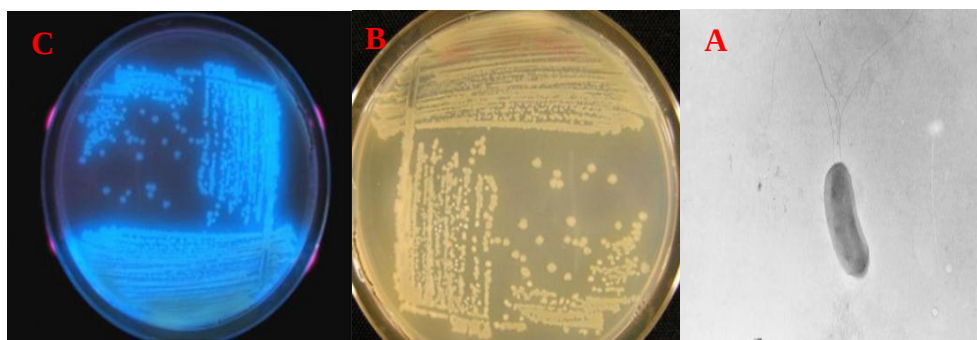
Phytophthora medicaginis var. *phaseolicola* Burkholder (1926).

ولاحقاً نُسب إلى الجنس *Pseudomonas* ، وللبكتيريا المسببة لمرض اللفحة الهالية عدة تسميات هي:

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* (Burkh.).

Pseudomonas savastanoi pv. *Phaseolicola* (Burkh.) Gardan et al., 1992 .

تتنمي بكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *Phaseolicola* (Psp) لجنس *Pseudomonas* وفصيلة *Pseudomonadaceae* ورتبة *Pseudomonadales*. هي بكتيريا هوائية التنفس، عصوية مستقيمة أو منحنية توجد مفردة أو في أشفاغ، أبعادها 5-1.5 X 1.5-0.5 ميكرون، سالبة الغرام، غير متبوعة، متحركة بسوط واحد أو أكثر قطبي، تشكل البكتيريا على وسط الزرع (King's B) مستعمرات بيضاء إلى كريمية اللون وتنتج صبغات تبدو وميضية عند تعريضها لأشعة فوق بنفسجية بطول موجة 366 نانومتر (الشكل 4). كما تنمو البكتيريا Psp على وسط الزرع شبه الانتخابي MSP (Modified Sucrose Peptone) وتشكل عليه مستعمرات دائرية لامعة، محدبة، كاملة الحافة، ذات قوام مخاطي، لونها أصفر باهت ومحيطها أقل كثافة لونية من مركزها (Mohan و Schaad، 1987). تنتج بكتيريا Psp اللوفان Levan، سالبة الأوكسيداز Oxidase، لا تحلل الأرجينين Arginine، موجبة لأنزيم الكاتالاز Catalase، لا تحلل الجيلاتين Gelatine، ولا تنتج غاز H₂S من تحليل السيستئين Cysteine، وتسبب فرط حساسية على نبات التبغ (Young و Triggs، 1994).



شكل (4) الموصفات المورفولوجية للبكتيريا المسببة لمرض اللفحة الهالية، A. صورة بالمجهر الإلكتروني للخلية البكتيرية؛ B: مستعمرات بيضاء كريمية لامعة؛ C: مستعمراتها وميضية عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية

لبكتيريا Psp عدة سلالات فقد سجل Taylor وزملاؤه (1996) تسع سلالات بناء على ردود أفعالها مع ثمانية اصناف تفريقية عند إجراء عدوى اصطناعية، عدد من هذه السلالات (1,2,5,6,7) مُنتشرة عالمياً وسلالات أخرى (3, 4, 8, 9) كانت موجودة بشكل رئيس في افريقيا وقد تم الحصول على معظم هذه السلالات من العائل الرئيسي الفاصولياء *Phaseolus vulgaris*، وسجل Ariyaratne عام 1997 سلالتين جديدتين في نبراسكا.

تتشابه أعراض الإصابة باللفحة الهالية كثيراً مع أعراض اللفحة العادية وتظهر الأعراض بعد الإصابة بـ 3-5 أيام على السطح السفلي للأوراق على شكل بقع مائية صغيرة، تزداد اتساعاً ويعفب ذلك ظهور هالة صفراء مائلة للون الأخضر عريضة حولها (Hagedorn و Inglis، 1986). مع تقدم الإصابة يظهر اصفرار بين العروق وفي حال كانت الإصابة جهازية يمكن أن تصبح الأوراق منحنية ويظهر عليها اصفرار بدون وجود بقع ميتة أو هالات (الشكل 5)، هذا يعود إلى إفراز البكتيريا لسم Phaseolotoxin حيث ان ليس جميع سلالات Psp قادرة على إنتاج هذا السم البكتيري (Oguiza وزملاؤه، 2004)، ويكون هذا الشحوب أكثر وضوحاً عند درجات الحرارة بين 17-20 °C؛ وعندما تكون درجة الحرارة فوق 24 °C فإن الاصفرار واعراض الهالة النموذجية تكون اقل وضوحاً وتظهر اعراض مشابهة للتبقع البني. قام Patil وزملاؤه (1974) بإجراء طفرة محرضة بالأشعة فوق البنفسجية حيث تكون البكتيريا المطفرة غير قادرة على انتاج السم ووجد ان هذه السلالة لا تستطيع تكوين اعراض الهالة النموذجية ولا تستطيع ان تغزو النبات جهازياً، و أكدت الدراسات اللاحقة أن إنتاج السم البكتيري ضروري من اجل القدرة الإمراضية للبكتيريا (Gnanamanickam و Patil، 1976) .

عند زراعة بذور مصابة، فإن الأعراض الشائعة هي وجود عفن حول الساق يعرف بالعفن المفصلي، حيث تبدأ الأعراض عند العقدة الأولى فوق الأوراق الفلقية على شكل بقعة مشبعة بالماء حمراء اللون حول الساق ويكون الذبول شائعاً في النباتات الناتجة من بذور مصابة، حيث تنبل الورقات في قاعدة الورقة أثناء النهار لكنها تستعيد حيويتها في الليل، كما يمكن أن تلتف السوق الجنينية للبادرات النامية من بذور مصابة وهذه الحالة تُعرف بإسم رأس الأفعى Snake heads ويكتمل تطويق الساق عندما تكون القرون شبه ناضجة ويؤدي الوزن المتزايد للقرون إلى كسر النبات عند عقدة الساق الضعيفة (Schwartz، 1989) .

يُسمى مرض اللفحة الهالية أحياناً بإسم مرض البقعة الزيتية greasy spot disease بسبب البقع الزيتية المشبعة بالماء الموجودة على الأجزاء المصابة بشكل عام، ومع توطد البكتيريا في العائل تظهر أعراض الإصابة الجهازية، وتبدأ الإصابة عادة في الأعصاب الصغيرة ثم تتقدم للعروق الرئيسي وإذا ما بدأت الإصابة في عنق الورقة فإن هذا العنق والعروق الرئيسة المجاورة تأخذ مائلاً للأحمر. كما تظهر على سوق النباتات الصغيرة بقعاً مشبعة بالماء، تكبر في الحجم وتبدو على شكل خطوط حمرة تمتد على طول الساق حيث يمكن أن تؤدي إلى تشقق بشرة وقشرة الساق (Snowdon، 2010) .

تبدأ الأعراض على القرون بظهور بقع مائية بيضوية الشكل على سطح القرون تكبر تدريجياً وتصبح داكنة وغائرة أو تكون البقع شريطية على طول غلاف القرن، مع ظهور إفرازات بكتيرية

كريمة إلى فضية اللون على القرون المصابة والأوراق والساق بعد 7-10 أيام من الإصابة بخلاف الإفرازات الصفراء التي تلاحظ في حال الإصابة باللفحة العادية؛ وإن أعراض الإصابة باللفحة الهالية يمكن أن تتداخل مع أعراض التبقع البني وذلك بسبب تغير حجم الهالة بتغير درجة الحرارة (Harveson وزملاؤه، 2005)..



شكل (5) A، B، C. أعراض مرض اللفحة الهالية على أوراق نبات الفاصولياء حيث يلاحظ بقع مائية على السطح السفلي للأوراق واصفرار بين عروق الورقة؛ D. بقع مائية على القرون تختلف في أحجامها

(المصدر (Howard F. Schwartz, Colorado State University, Bugwood.org)

يعد مرض اللفحة الهالية من الأمراض الخطيرة التي تصيب الفاصولياء عالمياً (شكل 6). حيث ينتشر المرض في أمريكا اللاتينية، في المناطق التي تتميز بدرجات حرارة معتدلة كجنوب جبال الانديز من البيرو وكولومبيا، البرازيل، كندا، روسيا، أسبانيا، و في اليمن، فلسطين، مصر، وفي فرنسا وألمانيا (Thomas و Zaumeyer، 1957)؛ و هو مسجل في تركيا (Ertugrul و Guven، 1998).



شكل (6) التوزيع الجغرافي و الانتشار العالمي لمرض اللفحة الهالية على الفاصولياء

المصدر <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap>

منها الفاصولياء *P. vulgaris* L، *P. lunatus*، *P. coccineus* و *V. Vigna* spp. (*radiata* and *V. unguiculata*)، ويُصيب أيضاً العديد من الأعشاب والانواع البرية مثل الكودزو *Pueraria lobata* (Lamichhane وزملاؤه، 2015).

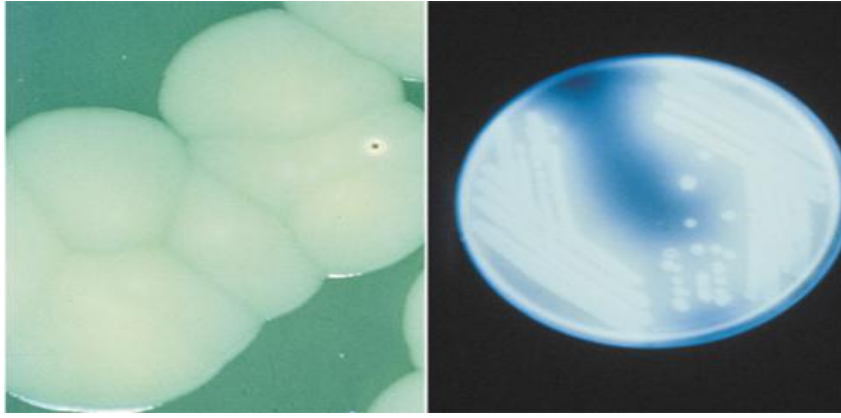
تحتفظ بكتيريا Psp بحيويتها في البذور المصابة لمدة أربع سنوات (Zaumeier، 1932)، تنتقل البكتيريا بواسطة البذور وقد سُجلت هذه النتيجة لأول مرة من قبل العالم Burkholder عام 1930، حيث تصل البكتيريا إلى القرون بواسطة الأمطار والري الرذاذي وتؤدي إلى إصابة البذور سطحياً فتبقى البكتيريا على سطحها حيث تنتقل عند إنبات البذور إلى الفلقات وتحدث الإصابة الأولية أو تصاب القرون جهازياً عبر الأوعية الناقلة فتصل البكتيريا إلى البذور وتصيبها داخلياً؛ وقد وُجد أن البكتيريا تحتفظ بحيويتها لمدة 9 أشهر في البقايا النباتية (Schuster و Coyne، 1975)، وتتواجد على نباتات الفاصولياء التلقائية والتي تظهر بوقت مبكر في بداية موسم النمو، ويوجد المسبب المرضي أيضاً بشكل سطحي Epiphytic وعلى أوراق النباتات من الفصيلة البقولية وغير البقولية (Harveson، 2009b). تفضل بكتيريا Psp المناخ الرطب البارد ودرجات حرارة تتراوح بين 17-20°C (Duncan وزملاؤه، 2014)، عندها تدخل البكتيريا النبات عبر الفتحات الطبيعية مثل المسام والثغور المائية أو عبر الجروح التي يتعرض لها النبات بفعل الأمطار والرياح وعمليات الخدمة وتنتشر العدوى بين الأوراق وبين النباتات بفعل الأمطار والرياح، كما يساهم الري الرذاذي في نشر العدوى (Arnold، 2011).

3- التبقع البني البكتيري: Bacterial brown spot

سُجل هذا المرض لأول مرة عام 1926، وقد حُدد أنذاك كمرض بكتيري جديد يصيب الفاصولياء وسُمي *Phytophthora vigna* var. *leguminophila* (Burkholder، 1930). لاحقاً تمت تسميته:

Pseudomonas syringae pv. *syringae* van Hal .

بكتيريا Pss هوائية التنفس، عصوية الشكل، سالبة الغرام، أبعادها 1.5 X 1.2-0.7 µm، غير متبوعة، تشكل على وسط الزرع مستعمرات دائرية، بيضاء كريمية، محدبة، سطحها أملس، كما تنتج البكتيريا صبغات وميضية على الوسط المغذي (King's B) (شكل 7).



شكل (7) شكل المستعمرات البكتيرية لبكتيريا Pss المسببة لمرض التبقع البني البكتيري على الفاصولياء

المصدر (Anne K. Vidaver and Patricia A. Lambrecht)

(Department of Plant Pathology, University of Nebraska)

لهذه البكتيريا القدرة على تحريض تجمد الماء بدرجات حرارة قريبة من الصفر المئوي (Navarro وزملاؤه، 2007). وجُد لهذا النمط الممرض 46 سلالة تصيب 15 نوعاً نباتياً (Cheng وزملاؤه، 1989). وتنتج البكتيريا السم البكتيري Syringomycin (lipodepsinonapeptides metabolite cyclic) وهو المسؤول عن الأذى والضرر للنبات وان Syringomycin هو احد عوامل القدرة الإمرضية للبكتيريا Pss والمورثات المسؤولة عن انتاجه Syr gene موجودة في Pss وغير موجودة في الطرز الأخرى (Quegley و Gross، 1994) .

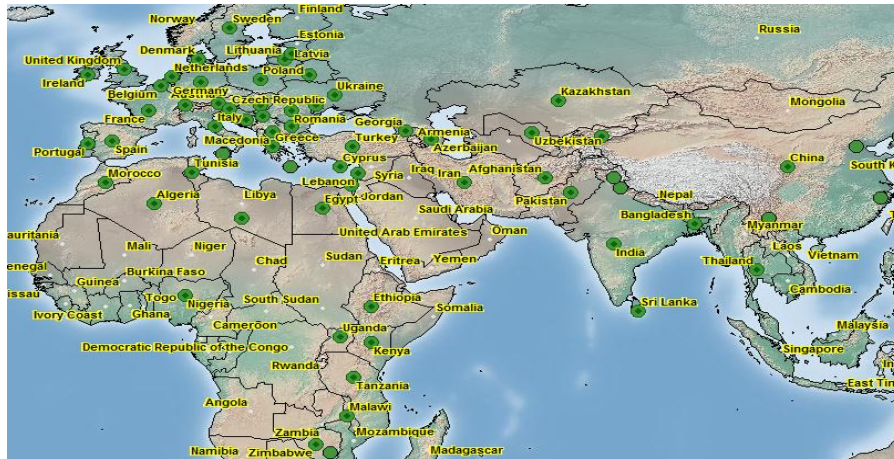
تظهر على الأوراق بقع مائية تختلف في حُجومها، ولكن بشكل عام تكون صغيرة الحجم على السطح السفلي للأوراق والتي قد تحاط أو لا تحاط بهالة ضيقة صفراء (Muedi، 2013). وقد تظهر مفرزات بكتيرية من هذه البقع، ويتطور المرض تتحول البقع إلى اللون البني وتتحد وتشكل بقع شريطية محددة لعروق الورقة، مراكز البقع القديمة تسقط وتبدو الأوراق المصابة مثقبة شكل (8).

على السوق يظهر بقعاً مائية إذا كانت الإصابة جهازية و تتحول إلى اللون البني، وتظهر على القرون بقع مائية صغيرة تتسع تدريجياً وتلتحم وتأخذ اللون البني المحمر، وإذا أصيبت القرون في مرحلة مبكرة يمكن أن تتشوه وتظهر عليها بقع حلقية أو مائية بنية اللون (Schwartz وزملاؤه، 2005) .



شكل (8) A. أعراض الإصابة ببكتيريا Pss المسببة لمرض التبقع البني البكتيري على أوراق الفاصولياء، بقع بنية صغيرة الحجم تتحد بشكل شريطية؛ C. بقع بنية على سوق النباتات المصابة؛ D. بقع حلقية غائرة على طول غلاف القرن (المصدر (Howard F. Schwartz, Colorado State University, Bugwood.org)

يعد مرض التبقع البني على الفاصولياء واسع الانتشار عالمياً (شكل 9)، حيث سُجل وجوده في الولايات المتحدة، البرازيل وفي كولورادو، متعدد العوائل حيث تصيب البكتيريا إضافة للفاصولياء: البازلاء، الفول، اللوبياء، فول الصويا، البصل، الشوندر السكري، الملفوف، الفليفلة، البندورة، الخس، التبغ، الذرة الصفراء، الرز، كما تصيب العديد من الأشجار المثمرة مثل البرتقال، الليمون، التفاح، المشمش، الدراق، وكذلك بعض الأشجار الحراجية مثل الليغستروم (Thomas و Zaumeyer، 1957).



شكل (9) التوزيع الجغرافي و الانتشار العالمي لمرض التبقع البني البكتيري على الفاصولياء (المصدر <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap>)

تتواجد بكتيريا Pss بكثرة في التربة، الماء و سطح النبات، و تمضي فترة الشتاء في البذور والبقايا النباتية (Hoitink وزملاؤه، 1968; Legard و Hunter، 1990)، على الرغم من أن عدوى البذور لا يعتقد أنها هامة من أجل حدوث الوبائية ولكن لها دور في إدخال البكتيريا الى مناطق جديدة. وقد وجد أن البكتيريا تحتفظ بحيويتها بشكل سطحي Epiphytic على أوراق النباتات البقولية والأعشاب الأخرى، ويلعب الري الرذاذي دوراً في نشرها وكذلك الامطار المصحوبة بالرياح القوية. وتنتشر البكتيريا بين الحقول بواسطة الأدوات الزراعية والعمال (Venette، 1982). درجة الحرارة المثالية للإصابة وتطور الأعراض تتراوح ما بين 28-30 °C (Harveson و Schwartz، 2007).

تنتقل بكتيريا Pss بين خلايا النبات المصاب وتزداد أعدادها بسرعة فائقة في الأوعية الناقلة وتتحرك نحو الأعلى والأسفل لتعم كامل أجزاء النبات؛ قد تخرج البكتيريا إلى سطح النبات عبر المسام لتعاود الدخول إلى أوراق وسوق جديدة عبر المسام (Harveson، 2007) وتقوم العوامل الفيزيائية بدور هام في زيادة أعداد البكتيريا الموجودة على سطح النبات، فقد وجد Hirano وزملاؤه (1996) أن أعداد بكتيريا Pss ازدادت عشرة أضعاف بعد 3 هطولات مطرية حادة منفصلة .

4- الذبول البكتيري: Bacterial wilt

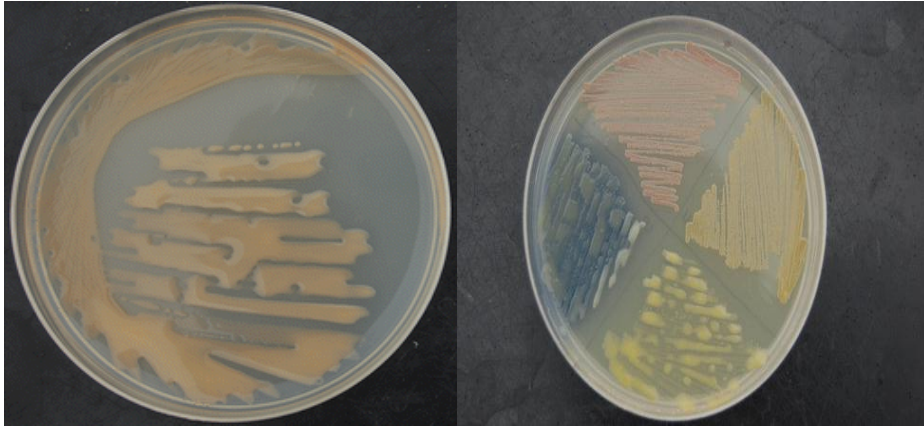
سُجل هذا المرض لأول مرة في جنوب داكوتا بالولايات المتحدة (Hedges، 1922) وتسببه البكتيريا:

Corynebacterium flaccumfaciens ssp. *flaccumfaciens* (Hedges) Dowson .

Syn: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* (Hedges) Collins 1983

وتنتمي البكتيريا للفصيلة *Microbacteriaceae* و الرتبة *Actinomycetales* والصف *Actinobacteria* .

بكتيريا Cff هوائية التنفس، مـوجبة الغرام، عصوية الشكل، توجد مفردة أو في أشفاغ ، أبعادها 0.3 - 0.5 X 0.6 - 3 ميكرون، متحركة بسياط عددها 1-3 تتوضع جانبياً أو قطبياً. تنمو بكتيريا Cff على أوساط الزرع وتشكل مستعمرات صفراء، دائرية، كاملة الحافة، ناعمة، مسطحة أو محدبة قليلاً. كما تنتج البكتيريا صبغات بألوان مختلفة كريمية إلى صفراء وأحياناً تكون بنفسجية أو برتقالية (شكل10)(EPPO/CABI، 1996). تنتج البكتيريا حموض ولا تنتج غاز H_2S من (الغلوكوز، المالتوز، اللاكتوز، السكروز، الفركتوز، رامينوز، غليسول)، سالبة اللوفان موجبة الكاتالاز، تحلل الجيلاتين ببطء (Komagata و Suzuki، 1986) .



شكل (10) المستعمرات البكتيرية للبكتيريا المسببة لمرض الذبول البكتيري على الفاصولياء، حيث يلاحظ افراز البكتيريا لصبغات بألوان مختلفة

تظهر أعراض الإصابة بالمرض على شكل ذبول الأوراق في ساعات النهار الحارة أو فترات الجفاف وتعود النباتات لحالتها الطبيعية في المساء، وذلك بسبب تواجد البكتيريا في الأوعية الناقلة للنبات حيث تعيق انتقال الماء داخل النبات مما يؤدي إلى ذبول الأوراق والتفافها ثم تساقطها (شكل 11). وفي بعض الحالات قد لا تعاني النباتات المصابة من أعراض الذبول بل تحمل الأوراق بقعاً ميتة تحيط بها هالة صفراء، تشبه أعراض الإصابة باللفحة العادية غير أن البقع الناتجة عن الذبول تكون حافتها غير منتظمة، ولا تترافق الإصابة ببقع مائية على الساق والأوراق كذلك التي تظهر عند الإصابة بمرض اللفحة العادية و الهالية (EPPO، 2011). وتكون البادرات حساسة جداً للإصابة وتصاب عندما تكون بطول 5 - 7.5 سم وتموت غالباً عند اصابتها (Harveson وزملاؤه، 2015).



الشكل (11) أعراض الذبول الناتجة عن الإصابة بمرض الذبول البكتيري على نبات الفاصولياء

وتكون الأعراض على القرون أوضح بكثير من إصابتها باللفحة العادية، حيث يظهر على القرون الناضجة المصابة بقعاً بلون أخضر زيتوني مقارنة بلون القرون الطبيعية التي تكون خضراء مصفرة وقد تحمل القرون التي تبدو سليمة بذوراً مصابة بالكامل وذلك لأن الإصابة وعائية، وفيما بعد قد يظهر على تلك القرون بقعاً سوداء. والبذور المصابة بالبكتيريا تكون مجعدة تحمل بقعاً صفراء إلى برتقالية اللون وفي الإصابات الشديدة تموت النباتات (Harveson وزملاؤه، 2005) .

العائل الاساسي هو الفاصولياء العادية *Phaseolus vulgaris* L. وتصيب أيضا فاصولياء الليما وفول الصويا والبازلاء واللوبياء. يعد مرض الذبول البكتيري نادر الحدوث ولكن لوحظ اصابات بشكل متكرر في السنوات الـ 30 الاخيرة في السهول العليا من الولايات المتحدة، وقد أُفيد بانتشار المرض في العديد من البلدان في مختلف انحاء العالم (الشكل12)، مثل تونس وتركيا واليونان ورومانيا وروسيا وبولندا و البرازيل (Zaumeyer و Thomas، 1957؛ EPPO/CABI، 1997). وفي عام 2005 وجد المرض في أربعة حقول مختلفة تقع على سواحل غرناطة في جنوب شرق اسبانيا (Gonzghez، 2005) وفي كندا (Huang وزملاؤه، 2006)؛ وإن Cff مدرجة ضمن القائمة A2 من أفات الحجر الصحي من قبل منظمة EPPO (EPPO/CABI، 1997) .



شكل(12) التوزيع الجغرافي والانتشار العالمي لمرض الذبول البكتيري على الفاصولياء

المصدر <http://www.plantwise.org/KnowledgeBank/PWMap>

تنتقل بكتيريا Cff بواسطة البذور التي قد تحملها داخلياً أو خارجياً، وتقاوم الجفاف ولذلك فقد تبقى حية في البذور من 5 - 24 سنة (Frison وزملاؤه، 1990). كما وجد أن للأعشاب وبقايا محصول الفاصولياء دوراً في حفظ البكتيريا ويلائمها درجات حرارة فوق 32 °C وظروف إجهاد مثل الجفاف، ودرجة الحرارة المثالية لنمو البكتيريا في وسط الزرع 28 °C (Harveson وزملاؤه، 2015). ولا تستطيع التشتية بشكل جيد في التربة (Coyne و Schuster، 1974)، ويمكن ان تنتقل الى النباتات عبر الجروح التي تحدث على النباتات بسبب عوامل جوية مختلفة او بسبب الخدمة الزراعية

(Zaumeyer وThomas، 1957). تدخل البكتيريا عبر الاوعية الناقلة إما من البذور الملوثة او الجروح الموجودة على السوق والاوراق وتتطور الاعراض بسرعة في ظروف الاجهاد ودرجات الحرارة العالية (Zaumeyer، 1932). واذا بقيت النباتات سليمة تصل البكتيريا جهازياً الى البذور وتتلون وقد تظهر القرون سليمة بالرغم من تلون البذور (Harveson وزملاؤه، 2011) .

5- المكافحة: Control

تعتمد طرائق مكافحة الأمراض البكتيرية على التدخل في دورة حياة المسبب المرضي في الوقت المناسب بهدف التخلص من مصادر العدوى ووسائل انتشارها وتخفيض أعداد البكتيريا على سطح النبات (أبو غرة و دوجي، 1996). والأمراض البكتيرية على الفاصولياء يمكن مكافحتها بشكل أكثر فاعلية بدمج العديد من الممارسات:

1. استخدام بذور سليمة خالية من الإصابة، إنتاج البذار في مناطق جافة غير ملائمة لتطور المرض (Osdaghi وزملاؤه، 2010)، ويجب فحص البذور والتأكد من خلوها من الإصابة الداخلية، فعدم وجود الأعراض لا يعطي مؤشر على عدم وجود إصابة. كما يمكن معاملة البذور بالمضادات الحيوية للبكتيريا مثل Streptomycin أو تعقيمها بواسطة هيبوكلوريت الصوديوم للقضاء على تلوث البذور خارجياً (Liang وزملاؤه، 1992) .

وتستخدم المعاملات الحرارية التي تفيد في تقليل أعداد البكتيريا إلا أن ذلك قد يكون على حساب نسبة الإنبات فيها (أبو غرة ودوجي، 1996)، حيث يمكن استخدام طريقة الحرارة الرطبة على درجة 52°C ورطوبة نسبية 45-55 % لمدة 20 دقيقة، أو طريقة الحرارة الجافة على درجة 60°C لمدة 23-32 ساعة (Samson و Grondeau، 1994). وأشار العالم Ralph (1976) ان غمر بذور الفاصولياء في محلول الستربتومايسين 0.02 لساعتين يمنع انتقال المسبب المرضي مع البذار ولكن المحلول يُخفض انبثاق البادرات بنسبة 20% مقارنة مع البذور المنقوعة بالماء .

2. التخلص من مصادر اللقاح كإزالة الاعشاب والبقايا النباتية والنباتات التلقائية حيث تفيد هذه الإجراءات بتخفيض مصادر العدوى و تحسين التهوية حول المحصول بحيث تجف النباتات بسرعة وهذا يقلل من فرص الانتشار والإصابة بالبكتيريا. تنظيم الري وعدم الإفراط فيه وتجنب الري الرذاذي واستخدام طريقة الري بالتنقيط التي تسمح بالتحكم بكمية المياه وتجنب زيادة الرطوبة الجوية؛ التسميد المتوازن وعدم التقريط بالتسميد الآزوتي . تعقيم الأدوات المستخدمة في العمليات الزراعية. تؤدي الحراثة العميقة إلى التخلص من البقايا النباتية المصابة وخفض تعداد البكتيريا و خاصة في المناطق المدارية (Natti، 1969) .

3. اتباع دورة زراعية تغيب عنها الفاصولياء مدة 2 – 3 سنوات في الحقول التي سُجل فيها إصابة بالمرض .

4. استخدام المكافحة البيولوجية، فقد وُجد Lupinine (مادة قلويدية ناتجة عن عمليات الاستقلاب الثانوية في النبات) من الترمس *Lupinus albus* و *L. luteus* لها تأثير مضاد للبكتيريا Psp (Muzquiz وزملاؤه، 1999). وتبين أن استخدام بعض أنواع بكتيريا التربة المتواجدة في اماكن زراعة الفاصولياء كان له أثر تثبيطي فعال ضد بكتيريا Xap (Zanatta وزملاؤه، 2007). وإن المعاملة ببكتيريا *Rahnella aquatilis* على النباتات كان له أثر تثبيطي فعال ضد بكتيريا Xap ويمكن استخدامها في المكافحة الحيوية لمرض اللفحة العادية البكتيرية، حيث أظهرت النباتات المعاملة محتوى عالي من المركبات الفينولية ونشاط عالي لأنزيم البيروكسيداز مقارنة مع النباتات غير المعاملة (Sallam، 2011).

5. المكافحة الكيميائية، باستخدام المركبات النحاسية كتطبيق وقائي، مثل مزيج بوردو ، اوكسي كلور النحاس، كبريتات النحاس، وإن المركبات النحاسية تكون اكثر فعالية كإجراء وقائي لحماية النباتات عندما تكون الظروف مواتية لتطور المرض، وأول تطبيق يجب ان يكون قبل ظهور الاعراض مع تكرار التطبيق بفاصل 7- 10 ايام ، رش ارضي او باستخدام معدات الرش الجوي بمعدلات 200-400 g/100 متر مربع، وتطبق ايضا بمرحلة الازهار وتكون القرون لمنع انتشار وتطور المرض على الاوراق والقرون. ولوحظ أن الرش المبكر والدوري لأوكسي كلوريد النحاس كان له فعالية كبيرة (Olivine، 1999) ويمكن استخدام الستربتومايسين في معاملة البذور لتقليل مستويات التلوث الخارجي واعطى نتائج جيدة، ويجب الانتباه الى عدم استخدام المضادات الحيوية رشحاً خوفاً من تشكل الطفريات وظهور المقاومة عند البكتيريا، إلا أن إجراء المكافحة بعد ظهور أعراض المرض لن يكون لها نتائج ايجابية.

6- زراعة الأصناف المقاومة أو المتحملة:

إن استخدام الاصناف المقاومة هو اجراء ضروري لإدارة الامراض البكتيرية بسبب عدم وجود طرق مكافحة كيميائية ناجعة، حيث يؤدي استخدامها الى خفض الخسائر الانتاجية وتقليل استخدام المبيدات الكيميائية والمضادات الحيوية ويُسهل نُظم برامج الادارة المتكاملة للأمراض (Fourie و زملاؤه، 2005؛ Singh و Munoz، 1999). أُجريت الكثير من الدراسات في العالم حول قابلية أصناف الفاصولياء للإصابة بالمرضات البكتيرية ولقد وُجد أن الاصناف تختلف في حساسيتها للإصابة، وتكون الاوراق في بعض الاصناف حساسة للإصابة بينما تكون القرون مقاومة، وهناك العديد من العوامل التي تؤثر على المقاومة مثل نظام الري الذي يؤثر على تطور الاعراض، حيث وجد العالم Webster وزملاؤه (1983) أن الظروف المناخية تؤثر على قابلية الإصابة ببكتيريا Xap عن طريق التأثير على نمو النبات والنضج وكان كلاً من الصنف المزروع من الفاصولياء

Jules والسلالة PI207262 متوسط المقاومة تجاه Xap عندما تزرع في مناطق ذات مناخ معتدل ولكنها حساسة للإصابة في المناطق المدارية .

في تركيا قام العديد من الباحثين بالبحث عن مصادر المقاومة تجاه الامراض البكتيرية وتم تسجيل بضعة اصناف من الفاصولياء مقاومة/أو متحملة قليلاً تجاه مرض اللفة الهالية ولكن لم يكن أيّاً منها مقاوم لمرض اللفة البكتيرية العادية (Dursun وزملاؤه، 2002)؛ أجريت دراسة تجريبية باستخدام 36 طراز وراثي وصنفين مزروعين من الفاصولياء و وُجد أن طراز واحد 36K كان مقاوم لكل من Psp،Xap وتُجرى دراسات من أجل التحقق من آلية المقاومة حيث يشكل هذا الطراز مصدراً هاماً من مصادر المقاومة (Donmez وزملاؤه، 2013) .

وفي ايران أُجريت دراسة واسعة على 29 سلالة من الفاصولياء وصنف مزروع لتقييم قابلية الإصابة بمرض اللفة البكتيرية العادية في ظروف البيوت المحمية وفي ظروف الحقل، وأشارت النتائج الى ان كل من السلالات Ks51103، BF13607، BF13608 كانت الأكثر مقاومة وكان الصنف المزروع Khomein والسلالات KS21479،KS31169 الأكثر حساسية ولم يكن أي من السلالات والاصناف منيعاً ضد الإصابة بهذا المرض ولقد تم اعتماد هذه السلالات في برامج التربية كمصادر للمقاومة تجاه مرض اللفة البكتيرية العادية (Osdaghi وزملاؤه، 2010) .

سُجل الاختلاف بالمقاومة ضمن الصنف الواحد في البرازيل حيث وُجد خلال اختبار 5 طرز وراثية تجاه الإصابة بالبكتريا المسببة لمرض اللفة العادية أن الطرازين Bac-6،A794 متفوقة في صفة مقاومة الاوراق تجاه الإصابة(Rodrigues وزملاؤه، 1999)، ايضاً قام Zapata وزملاؤه (2007) بإجراء تجربة باستخدام العديد من اصناف الفاصولياء و عزلات مختلفة من بكتيريا Xap وتم عدوى القرون والاوراق بشكل منفصل وُوجد فروق معنوية في مستويات الإصابة حيث كان الصنف PR 0443-38 مقاوماً للسلالة البكتيرية Xap-484 وحساساً للسلالة Xap 3353 على القرون ؛ في جنوب افريقيا تم تقييم قابلية العديد من الاصناف المزروعة من الفاصولياء للإصابة بـ كلاً من البكتيريا المسببة لمرض التبغ البني البكتيري واللفة الهالية واللفة البكتيرية العادية و وُجد أن العديد من الاصناف المختبرة أظهرت مقاومة حقلية لكل من مسببات مرض التبغ البني البكتيري واللفة الهالية، بينما كل الاصناف المدروسة كانت متوسطة الى عالية الحساسية للبكتيريا المسببة لمرض اللفة البكتيرية العادية (Fourie، 2011).

إن الطرق البيوكيميائية المستخدمة في هذا البحث تفيد في تحديد العامل الممرض على مستوى الجنس والنوع وتحت النوع ولا يمكن تمييز السلالات والطرز الوراثية للبكتيريا الا باستخدام الطرق المعتمدة على التقانات الجزيئية .

7- دراسة أولية للقرابة الوراثية للبكتيريا:

إن اختبارات البصمة الوراثية المعتمدة على السلاسل التكرارية repetitive-PCR يمكن استخدامها لتحديد النمط الوراثي والتنوع التصنيفي والتمييز بين تحت الانواع والسلالات عند المجتمعات البكتيرية (Seal و Hiett، 2009). ويعتمد مبدأ اختبارات البصمة الوراثية المعتمدة على Rep-PCR على استخدام بادئات الـ DNA المقابلة لتكرارات محفوظة في سلاسل تكرارية موجودة طبيعياً في الجينوم البكتيري (Louws وزملاؤه، 1994؛ Wieser و Busse، 2000). حيث وصفت العالم Versalovic وزملاؤه (1991) طريقة لتحديد البصمة الوراثية للجينوم البكتيري اعتماداً على فحص أنماط لسلاسل تكرارية موجودة في الجينوم البكتيري. وهناك مجموعتين رئيسيتين من السلاسل التكرارية التي تُستخدم لأغراض البصمة الوراثية، الأولى REP Repetitive extragenic palindromic (REP) وزنها 38 bp (Stern وزملاؤه، 1984)، الثانية Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) وزنها 126 bp (Hulton وزملاؤه، 1991). إن كلا من Rep و ERIC هي الأكثر شيوعاً للاستخدام في أغراض البصمة الوراثية إلا أنه وجد عنصر ثالث هو عنصر الـ Box أستخدم بدايةً في التمييز عند بكتيريا *Streptococcus pneumonia* (Martin وزملاؤه، 1992)، ولاحقاً وُجد عنصر الـ Box في العديد من الانواع البكتيرية (Kwon وزملاؤه، 1998).

يتم استخدام الـ DNA البكتيري في تقانات الـ Rep-PCR أو يمكن استخدام الخلايا البكتيرية نفسها بطريقة معدلة (Woods وزملاؤه، 1993)، وإن بصمة الـ ERIC أقل تعقيداً من الـ Rep ولكن استخدام كلاهما يعطي نتائج جيدة للتمييز على مستوى السلالات ويعطي نتائج أفضل من استخدام كل تقانة لوحدها، ومن السهولة دراسة التنوع الوراثي بين المجتمعات البكتيرية باستخدام تقانات Rep-PCR حيث يمكن تطبيقها على عدد كبير أو قليل من العزلات (Bean و Olive، 1999). وتُظهر تقانات Rep-PCR قابلية تطبيق أوسع على الانواع وتعطي قوة تمييزية أفضل من طرائق تحليل البلازميد وطرق البصمة الوراثية المعتمدة على Restriction endonuclease analysis of chromosomal DNA (REA) (Georghiou وزملاؤه، 1995). بمقارنة طريقة دراسة البصمة الوراثية بتقانة Rep-PCR مع غيرها من التقانات المستخدمة في دراسة التنوع الوراثي يمكن اعتبارها متفوقة على غيرها من الطرق (Bean و Olive، 1999).

و يمكن تمييز طرز وراثية متباينة باستخدام تقانات البصمة الوراثية المعتمدة على Rep-PCR حيثُ وصفت ثلاثة طُرز وراثية من بكتيريا *Xcp* وأيضاً طرازين وراثيين من بكتيريا *Xcpf* بناءً على الاختلافات في بصمة الـ Rep- pcr (Mkandawire وزملاؤه، 2004). وذكر Louws وزملاؤه (1994) عند دراسة عزلات مختلفة من *Xanthomonas* و *pseudomonas* ان استخدام تقانات البصمة الوراثية Rep-PCR هي طرق مناسبة وسريعة للتشخيص الجزيئي للبكتيريا الممرضة للنبات وبشكل خاص عند مستوى تحت النوع .

في دراسة قام بها Rico وزملاؤه (2003) في اسبانيا تم الحصول على 152 عزلة من بكتيريا *pseudomonas* من نباتات الفاصولياء، تبين ان 138 منها *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* المُسبب لمرض اللفة الهالية، و وُجد ان 95 عزلة منها غير قادرة على انتاج phaseolotoxin، وأظهرت عزلات *p.s.pv.phaseolicola* (Tox⁺ ، Tox⁻) اختلافاً وراثياً عند استخدام تقانات ERIC-PCR و AP- PCR حيث قُسمت الى مجموعتين وراثيتين متميزتين بناءً على امكانية انتاجها للسم البكتيري Phaseolotoxin (Oguiza وزملاؤه، 2004) .

7- الأهمية الاقتصادية للأمراض البكتيرية: Economic Importance

تُسبب الأمراض البكتيرية على الفاصولياء خسائر كبيرة في الانتاجية، بالإضافة الى انخفاض نوعية البذور، وإن الانتشار الواسع لهذه الامراض وصعوبة المكافحة بالإضافة إلى انتقال البكتيريا مع البذور واحتفاظها بحيويتها لفترة طويلة يجعل منها واحد من أهم المعوقات لإنتاج الفاصولياء في العالم.

أدت اللفة البكتيرية العادية في كينيا إلى فاقد في الغلة بنسبة 10- 75% (Makini و Danial، 1995). ويعتبر مرض اللفة الهالية مشكلة في مناطق زراعة الفاصولياء ذات المناخ المعتدل حيث تراوح الفاقد في الإنتاجية بين 23- 43 % في ولاية ميشيجان في الولايات المتحدة عند الإصابة باللفة الهالية تحت ظروف العدوى الاصطناعية، وكان التبّع البني البكتيري المرض الأكثر انتشاراً في جنوب افريقيا وسبب خسائر في الانتاجية تراوحت بين 93- 100%(Fourie، 2002). كما لا يوجد تقديرات للخسائر التي يحدثها المرض في امريكا اللاتينية مما يشير إلى قلة أهميته هناك (Zaumeyer و Thomas، 1957). وسُجل مرض الذبول البكتيري على محصول اللوبياء في ايران لأول مرة عام 2013، ووصلت شدة المرض في بعض الحقول الى 70% (Osdaghi وزملاؤه، 2015) .

في دراسة أُجريت في سوريا أشارت الى إصابة محصول الفاصولياء المزروع في المنطقتين الوسطى والساحلية بأمراض بكتيرية دون أن تُعرف هذه البكتيريا وتُحدد أنواعها، حيثُ بلغت اعلی نسبة إصابة وفق الاعراض التي تم ملاحظتها على القرون والاوراق في ريف حماة عام 2007 بحدود 78% (علوش، 2009).

مبررات البحث

نظراً للخسائر التي تسببها الأمراض البكتيرية على محصول الفاصولياء، ولأهمية هذا المحصول في سوريا، وعدم وجود دراسات واسعة حول مدى انتشار أمراض الفاصولياء البكتيرية في سوريا بإستثناء الدراسة التي أُشير إليها سابقاً .

كان لا بد من التطرق لهذا الموضوع والعمل على عزل وتعريف مسببات الأمراض البكتيرية المنتشرة على هذا المحصول في مناطق مختلفة من سوريا وتقييم قابلية بعض الأصناف المزروعة محلياً للإصابة بها ودراسة القرابة الوراثية بين العزلات.

أهداف البحث Objectives

1. عزل وتعريف مُسببات الأمراض البكتيرية على نبات الفاصولياء من مناطق مختلفة من سوريا.
2. دراسة قابلية بعض أصناف الفاصولياء المزروعة محلياً للإصابة بالبكتيريا.
3. دراسة أولية للقرابة الوراثية بين العزلات المُختبرة .

مواد وطرائق العمل

Materials and methods

1- جمع العينات: sample collection

جُمعت عينات نباتية ظهر عليها اعراضاً مشابهة لأعراض الأمراض البكتيرية على الفاصولياء بشكل عشوائي ومن أماكن مختلفة من البيوت البلاستيكية من محافظتي اللاذقية وطرطوس، كما جُمعت بعض العينات من محافظتي ريف دمشق و درعا. كذلك جُمع عدد كبير من عينات قرون الفاصولياء من اصناف مختلفة من الاسواق. وجمعت بذور فاصولياء جافة يظهر عليها أعراض مشابهة لأعراض الأمراض البكتيرية من أصناف و مصادر مختلفة. وتم خلال جمع العينات ملء اسطوانة لكل عينة تتضمن معلومات عن (المنطقة، الصنف، المادة النباتية)، ونُقلت العينات إلى مخبر ممرضات النبات البكتيرية في كلية الزراعة بجامعة دمشق وذلك بين عامي 2015-2016.

2- عزل وتعريف البكتيريا: Bacteria isolation and identification

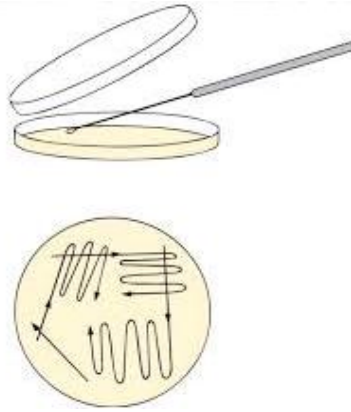
1- العزل من الأوراق: أُستخدمت طريقة الطحن للعزل من اوراق النباتات، حيث عُقم سطح الأوراق بالكحول 70%، ثم غسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم، وبواسطة مقص مُعقم تم اقتطاع النسيج المحيط بالبقعة المصابة وتم طحنها بواسطة هاون مُعقم مع القليل من الماء المقطر المُعقم، تُركت العينة في غرفة العزل مدة 10-20 دقيقة وذلك للسماح للبكتيريا بالانتشار في المحلول (Mohan و Schaad، 1987).

2- العزل من البذور: أُستخدمت طريقة الغمر لعزل البكتيريا من البذور حيث غُمرت العينة في حجم مناسب من محلول ملحي مُعقم NaCl (0.85%)، وقُدِّر الحجم المطلوب من المحلول الملحي باستخدام المعادلة التالية: $2.5 \times TSW = V_{NaCl}$ حيث TSW (وزن الالف بذرة) = وزن البذور/عدد البذور $\times 1000$ حُضنت العينات طوال الليل على درجة حرارة 4 °C، تم إجراء عملية رج للمعلق (20 ثانية) للحصول على معلق متجانس (Grimault وزملاؤه، 2014).

3- العزل من القرون: عُقت القرون بالكحول 70% ثم باستخدام مشروط مُعقم تم اقتطاع جزء من نسيج القرن المُصاب ووضع في هاون مُعقم ثم تم سحقه بوجود 5 ml من الماء المقطر المعقم؛ أو بطريقة الإغناء حيث وُضعت القرون المصابة في أطباق بتري مُعقمة بداخلها ورق ترشيح مُشبع بالماء المعقم وحُضنت على درجة 23 °C مدة 24 ساعة، عُرِلت البكتيريا من

الإفرازات الظاهرة على القرون حيث أُخذ جزء من الإفراز وُضع في 5 ml ماء مُقَطَّر مُعَقَّم ضمن انبوب اختبار وُرج جيداً للحصول على معلق متجانس (Cheng وزملاؤه، 1989).

أُخذ معلق بكتيري من المحاليل السابق ذكرها عند العزل من الاوراق و البذور والقرون و أُجريت التخفيفات اللازمة 1/10، 1/100، 1/1000، أُخذ 100 ميكرو لتر من كل التخفيفات ونُشر كل منها على طبق بتري يحوي على وسط مغذي عام YPGA (7 glucose، L/g 7 peptone) (شكل 13)، ثم حُصنت الأطباق على درجة حرارة 28°C . فُحصت الأطباق يومياً و أُختيرت المستعمرات البكتيرية وفقاً للعديد من الاسس منها شكلها ولونها وسرعة ظهورها ومن ثم أُخذت كل مستعمرة مفردة وخطت على وسط زرع للتأكد من نقاوتها. وحُفظت العزلات النقية بعد ترميزها ضمن انابيب Eppendorf مُعَقَّمة و بواقع ثلاث مُكررات لكل عزلة في وسط (Peptone 7g/l، Yeast Extract 7g/l) LB + Glycerol بنسبة 2:1 على درجة 20°C لحين إجراء الاختبارات اللاحقة (ابو غرة والدوجي، 1996).



شكل (13) نشر البكتيريا بطريقة التخطيط على وسط الزرع

3-العدوى الصناعية: Artificial Inoculation

أُجريت العدوى الاصطناعية لاختبارات القدرة الإمراضية وفرط الحساسية بتنمية العزلات البكتيرية على وسط King's B (1 L Distilled water، 20 g، proteose peptone #3 (Difco)، 1.5 g، 1.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 15 g agar، 10 mL glycerol، K_2HPO_4) على درجة حرارة 27°C لمدة 24 ساعة.

استُخدمت المستعمرات البكتيرية مباشرة في اختبار القدرة الإمراضية على القرون، فجمعت قرون فاصولياء (فرنسية رفيعة - مالطية) غضة بطول 8-10 cm؛ غُومت القرون بالكحول الايتيلي 70% ثم غُسلت ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم ووضعت على ورق نشاف لحين جفافها تحت المخلية، باستخدام اعواد تنظيف الاسنان المعقمة (Toothpick) تم أخذ جزء من المستعمرة البكتيرية وأحدثت ثقب أو وخز في نسيج القرن في 4 مواضع وبعمق 3 mm، كررت العدوى على 4 قرون

لكل عزلة، كما تم وخز اربعة قرون بنفس الطريقة باستخدام الماء المقطر المعقم كشاهد سلبي. ثم حُضنت القرون المعاملة في اواني زجاجية على درجة حرارة الغرفة بوجود الرطوبة، تم ملاحظة الاعراض يومياً ولمدة خمس ايام .حيث يشير تشكل بقع خضراء زيتية حول منطقة العدوى الى قدرة البكتيريا على اصابة الفاصولياء (Cheng وزملاؤه، 1989) .

لإختبار فرط الحساسية على التبغ ، زُرعت نباتات تبغ من صنف فرجينيا في صواني بلاستيكية وعند وصولها الى حجم مناسب تم تشيتل النباتات ونُقلت الى اصص بلاستيكية ضمن مخبر امراض النبات في ظروف الاضاءة والرطوبة والحرارة العادية؛ عند وصولها الى الحجم المناسب تم إجراء اختبار فرط الحساســــــــــــــــية، حيث تم تحضير معلقات بكتيرية ضمن الماء المقطر المعقم بتركيز 10^6 ml/cfu وتم الحقن بواسطة محقن طبي بدون ابرة في الفراغات بين الخلايا للورقة حيث تكون النتيجة موجبة عندما يلاحظ موت موضعي في الانسجة بعد 24-48 ساعة من العدوى (Klement وزملاؤه، 1964).

4- الاختبارات الكيميائية الحيوية: Biochemical Tests

تم إجراء العديد من الاختبارات لتوصيف وتعريف العزلات البكتيرية التي أثبتت قُدرتها على إصابة نبات الفاصولياء، منها اختبار صبغة غرام، انتاج الصبغات الوميضية، اختبار انتاج اللوفان، اختبار اسالة الجيلاتين، اختبار تحلل النشاء، اختبار تحلل الارجنين، ولتمييز انواع الجنس *Pseudomonas* تم إجراء اختبار القدرة على استهلاك السكريات (erythritol, mannitol, sorbitol) واختبار القدرة على تحريض التجمد .

1-4. اختبار الوميضية : Fluorescence test

تُفرز بعض انواع بكتيريا *Pseudomonas* صبغات وميضية تظهر بشكل واضح عند تعريض المزرعة البكتيرية للأشعة فوق البنفسجية. تُزرع البكتيريا حديثة النمو على طبق يحتوي على وسط King-B (20g DIFCO ، 10g Glycerol ، 4.7H₂O Mgso ، 1.5g Agar ، 1000m D.water) .

ثم يُعرض الطبق للأشعة فوق البنفسجية بطول موجة 366 نانومتر وذلك بعد تنمية المستعمرات لمدة 24-48 ساعة على حرارة 27 °C وتكون النتيجة موجبة عندما تظهر المستعمرة البكتيرية متألفة بلون وميض أخضر مائل للأصفر (King وزملاؤه، 1954) .

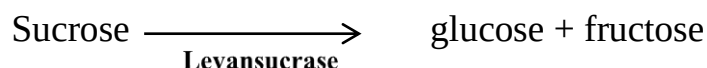
2-4. اختبار غرام : Gram staining

إن اختبار غرام من الاختبارات الهامة في تصنيف البكتيريا، وتعود هذه الاهمية الى الاختلاف في تركيب جدر الخلايا البكتيرية وخصائص هذه الجدر. يعتمد هذا الاختبار على استخدام هيدروكسيد

البوتاسيوم KOH حيث توضع قطرة من محلول KOH بتركيز 3% على شريحة زجاجية ويُحضر فيها معلق من مزرعة بكتيرية بعمر 24 ساعة، يمزج الخليط جيداً بواسطة ابرة الزرع، ويشير تشكل خيط لزج يربط بين المعلق البكتيري على الشريحة وبرة الزرع عند رفعها للأعلى الى كون البكتيريا سالبة الغرام، بينما انفصال هذا الخيط عن ابرة الزرع يدل على ان البكتيريا موجبة الغرام (Suslow وزملاؤه، 1982) .

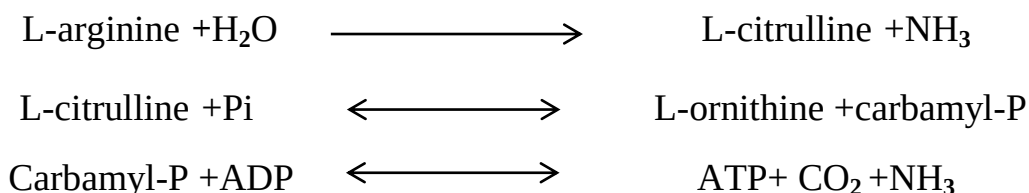
3-4. اختبار انتاج اللوفان : Levan production test

تستطيع بعض انواع البكتيريا ان تُجزئ السكروز بواسطة انزيم Levansucrase الى غلوكوز وفركتوز ومن ثم تُماكب سكر الفركتوز لتُشكل مركب اللوفان (Poly fructose) Levane. يتكون وسط الزرع من (Yeast extract 2g ، Peptone 5g ، NaCl 5g ، Sucrose 50g ، Agar 15g) ، بعد تمام انحلال المواد تُضبط حموضة الوسط عند pH=7.4 -7.2 ، ثم تُعقم على درجة 120 لمدة 20 دقيقة. بعد التعقيم توزع البيئة في اطباق بتري ثم تزرع البكتيريا حديثة النمو (بعمر 24 ساعة) في الاطباق بشكل خط بطول 1 سم ثم تُحضان على درجة حرارة 25 °C لمدة ثلاث أيام. تكون البكتيريا موجبة لأختبار اللوفان إذا اعطت نمواً بكتيرياً غزيراً مخاطياً ولامعاً محدب الشكل (Lelliott وزملاؤه، 1966) .



4-4. اختبار حلمهة الأرجنين: Arginine dihydrolase test

يُستخدم هذا الاختبار للتأكد من وجود انزيمين (Arginine deiminase ، ornithine trans carbamylase) يسمحان بنمو انواع *Pseudomonas* تحت شروط لا هوائية. هذه الانزيمات تولد طاقة ATP من خلال تحطم الأرجنين الى أورنثين مع توليد غاز ثاني اوكسيد الكربون مع النشادر، ويتحلل الأرجنين على مرحلتين حسب المعادلات:



يُطبق الاختبار من خلال زراعة البكتيريا في انابيب تحتوي وسط الزرع Thornley : (Arginine HCL 10g ، Phenol red 1g ، KH₂PO₄ 0.3 ، NaCl 5g ، Peptone 1g ، D.Water 1000ml ، Agar 3g) .

يُسخن الوسط مع التحريك حتى الذوبان ثم يضبط pH الى 7.2 ويكون اللون وردياً ويُوضع في انبوبين ثم يُعقمان بالأوتوغلاف على درجة 121 لمدة 20 دقيقة، وتُزرع البكتيريا بهما ويغطى احدهما ب 1 مل من زيت البارافين المُعقم وتحضن لمدة سبعة أيام. إن تغير اللون في كلا الانبوبين الى اللون الأحمر يشير ذلك الى تحطم الأرجنين ويكون التفاعل ايجابياً" أما إذا تغير اللون فقط في الانبوب الذي لا يحوي زيت بارافين(الوسط الهوائي) فتكون النتيجة سلبية(Thornley، 1960) .

5-4. اختبار اسالة الجيلاتين : Gelatin hydrolysis test

يستخدم هذا الاختبار للكشف عن وجود انزيم Gelatinase ، الجيلاتين هو بروتين ذو وزن جزيئي مرتفع، يأخذ الشكل الصلب على درجة حرارة أقل من 25 °C ويؤدي تحلل الجيلاتين بواسطة أنزيم Gelatinase الذي تفرزه بعض أنواع البكتيريا الى تجزئة البروتين مما يحدث تغيراً في صفاته الفيزيائية. يستخدم لهذا الاختبار عدة اوساط غذائية وعدة طرق منها اختبار الجيلاتين ضمن انابيب اختبار؛ يتكون وسط الاختبار من (Gelatin 120g ، Peptone 5g ، Yeast extract 3g)، تضبط حموضة الوسط عند PH=7، بعد انحلال المواد تُوزع البيئة في انابيب اختبار بمعدل 7 مل/ انبوب ثم تُعقم في الأوتوغلاف. يتم تجهيز معلق بكتيري تركيزه بحدود 10^8 خلية بكتيرية/مل ويُضاف الى كل انبوب 30 ميكرو ليتر من المعلق البكتيري، تحضن الانابيب على درجة حرارة 25 °C لمدة تصل الى 15 يوم توضع بعدها على درجة 6 لمدة 10 دقائق لكي يأخذ الجيلاتين الشكل الصلب (Harley، 2004). وبعد إخراج الانابيب من الثلاجة يُلاحظ حالتين:

الجلاتين في حالة سائلة دليل إفراز البكتيريا لإنزيم الجيلاتيناز (+)

الجلاتين في حالة صلبة دليل عدم إفراز البكتيريا لإنزيم الجيلاتيناز (-)

6-4. اختبار تحلل النشاء : Starch hydrolysis

يستخدم هذا الاختبار للكشف عن انتاج البكتيريا لأنزيم α - amylase ، يتألف النشاء من عديدات الجلوكوز، وهو يتركب من الاميلوز Amylose والاميلوبكتين Amylopectine، يهاجم أنزيم الأميلاز α - amylase الرابطة α 1/4 دون أن يؤثر على الرابطة α 1/6 فنحصل بذلك على مزيج من الدكسترين dextrine والمالتوز maltose و maltotriose. يتركب وسط الاختبار من (Yeast extract 5g، Peptone 5g، Soluble starch 20g، Agar 15g). يُعقم الوسط على درجة 120 لمدة 20 دقيقة ثم يُصب في اطباق بتري. تُزرع الاطباق بالبكتيريا على شكل خط بطول 1 cm وتُحضن على درجة 25 °C، بعد التحضين والحصول على نمو جيد للبكتيريا يضاف للأطباق ماء اليود اليودي (الليغول) الذي يلون النشاء باللون البني ويترك هالة غير ملونة حول البكتيريا التي تحلل النشاء (Lelliott و stead، 1987) .

7-4. استخدام السكريات البسيطة : Utilisation of carbohydrates

تؤدي أكسدة السكريات في الظروف الهوائية الى انتاج حمض البيروفيك الذي يجعل الوسط حامضياً. أستخدم وسط يحتوي على العناصر المعدنية مضافاً إليها مشعر ملون أزرق البروموثيمول bromothymol blue، و يمكن باستخدام هذا الوسط اختبار البكتيريا تجاه كثير من السكريات Mannitol، sorbitol، Erythritol وغيرها، يتكون وسط الاختبار A.R.J من ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1g، $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g، KCl 0.2 g، Agar 3g، Bromothymol blue 3g، (D.Water 1L .

سُخنت المواد السابقة ضمن حمام مائي حتى تمام ذوبان المكونات، ثم ضُبُطت حموضة الوسط عند $\text{pH}=7.2$ ، وعند هذه القيمة يكون لون الوسط أخضر مزرق، وُزِع الوسط ضمن انابيب اختبار بمعدل 5 مل /انبوب، ثم عُقمت في الأوتوغلاف على درجة 121 لمدة 20 دقيقة. ثم أُضيفت محاليل السكريات Mannitol، sorbitol، Erythritol والتي حُضرت أولاً بتركيز 10% لكل منها ثم عُقمت بترشيحها بواسطة مرشحات ميكروبية Millipore وأضيفت الى الانابيب التي تحتوي الوسط المغذي بحيث يصبح تركيز كل سكر في الوسط السابق 0.002 . لُقحت بعد ذلك الانابيب بالعزلات المراد اختبارها لكل سكر على حدا بإضافة 30 ميكرو لتر من معلق بكتيري بتركيز 10^7 ml/cfu ثم حُضنت الانابيب على حرارة 24°C ، أُخذت القراءات تباعاً ولمدة اسبوع من التحضين. فإذا تغير اللون في الانبوب الى اللون الأصفر فهذا يُشير إلى انتاج الحمض من اكسدة السكر المضاف للوسط وبالتالي استخدام البكتيريا للسكر (أبو غرة والدوجي، 1996).

8-4. اختبار القدرة على تحريض التجمد : Ice nucleation activity

تمتلك بعض انواع البكتيريا القدرة على تشكيل النواة التي تشجع تجمد الماء Ice nucleation INA activity عند درجات حرارة بين 0°C و -10°C (Maki وزملاؤه، 1974). حيث تحتوي جميع انواع البكتيريا التي تحرض على التجمد في اغشيتها الخارجية على INA proteins (Ice nucleation activity proteins). نُميت العزلات المراد اختبارها على وسط KB لمدة 3 ايام على درجة 17°C وحُضرت المعلقات البكتيرية من مستعمرات حديثة بحيث يكون تركيز المعلق بحدود 5×10^8 خلية بكتيرية/مل، حُضنت بعد ذلك المعلقات البكتيرية على درجة 4°C لمدة ساعة على الاقل وذلك للسماح لبروتينات INP بالتعبير عن نفسها بشكل كامل. وحُضرت عدة تخفيفات من المعلق البكتيري، أُخذ 20 ميكرون من المعلق الاساسي و 20 ميكرون من التخفيف الاول و وُضعت على طبق المنيوم مُعقم عائم في حمام مائي بارد بحيث تكون درجة الحرارة الاولى بحدود -2°C ثم يتم تخفيض درجة الحرارة تدريجياً بمعدل 1°C ، كما تم استخدام ماء مقطر معقم كشاهد سلبي وأُجري لكل عزلة مكررين، إن تشكل بلورات ثلجية يدل على ان البكتيريا تحرض تجمد الماء (Attard وزملاؤه، 2012).

5- تقييم قابلية أصناف الفاصولياء للإصابة: Susceptibility evaluation

*الأصناف: زُرع خمسة اصناف من الفاصولياء (kentucky wonder، Sais-blue lake، white هولندية معرشة، بلدية بيضاء صنوبرية، فاصولياء حمراء عيشة خانوم، بلدية مالطية) في اصص بلاستيكية وفي كل اصيص بذرتان، تحتوي تورب معقم وبواقع ثلاث مكررات لكل عذلة، ووُضعت في احواض الزراعة ضمن البيت الزجاجي في مركز مكافحة الحيوية في كلية الزراعة.

*العدوى الصناعية:

حُضرت المُعلقات البكتيرية للعزلات التي أثبتت قدرتها الإراضية وتم تعريفها بالاختبارات البيوكيميائية من مستعمرات حديثة النمو بعمر 24 ساعة نُميت على وسط KB حيث ضُبط تركيز المعلق حتى 10^8 cfu/ml. و أُجريت العدوى بعد 15 يوم من الزراعة برش النباتات بالمعلق البكتيري على الاوراق، بوجود شاهد سلبي برش النباتات بالماء المقطر المعقم و غُطيت النباتات بغطاء بلاستيكي شفاف لمدة 24 ساعة بعد العدوى مع مراعاة توفر الرطوبة الكافية ضمن البيت الزجاجي تم تقييم الاعراض على النباتات المختبرة باستخدام المقياس من 0-5 بناءً على النسبة المئوية من سطح الورقة التي تُغطيها البقع المرضية (Dursun وزملاؤه، 2002; Pastor-Corrales وزملاؤه، 1981) :

* سلم تقييم شدة الإصابة 0- 5 :

0- لا أعراض مرئية

1- بقع متماوتة تغطي 1-5% من سطح الورقة.

2- بقع متماوتة تغطي 6- 10 %

3- بقع متماوتة تغطي 11-25 %.

4- بقع متماوتة تغطي 26-50%

5- بقع متماوتة تغطي < 50 % من مساحة الورقة .

والصنف الذي لا تظهر عليه اعراض الإصابة صنف مقاوم resistant و حسب سلم تقييم الإصابة (Dursun وزملاؤه، 2002) :

0- R resistant (صنف مقاوم) ، 1- MR moderately resistant (متوسط المقاومة)

2- moderately susceptible MS (متوسط الحساسية)، 3- susceptible S (حساس)

4 : 5 highly susceptible HS (شديد الحساسية)

تم تحليل النتائج باستخدام برنامج التحليل الإحصائي SPSS.22 ، حيث أُستخدم اختبار Two way ANOVA واختبار دونكان .

6- استخلاص الـ DNA وتفاعل البصمة الوراثية Rep-PCR :

1-6 استخلاص الـ DNA : DNA extraction

أُستخلص الـ DNA من مُستعمرات بكتيرية حديثة النمو بعمر 24 ساعة باستخدام DNA wizard isolation and purification kit من شركة Promega وفق تعليمات الشركة الصانعة (ملحق 2) حُدثت سلامة الـ DNA بواسطة الرحلان الكهربائي على هلامة الآغاروز 1% المُضاف إليها ايتيديوم برومايد EtBr وباستخدام محلول منظم للرحلان 1X TBE (Tris base = 10xTBE ، Boric acid 55g ، 9.3g EDTA 1mM / distilled water L1) .

فُحصت الهلامة تحت الأشعة فوق البنفسجية بواسطة جهاز توثيق الهلامات Gel documentation system، ثم تم إجراء تمديد لـ DNA العزلات البكتيرية لاستخدامه في تفاعل الـ PCR .

2-6 تفاعل البصمة الوراثية REP-PCR : REP-PCR DNA fingerprinting

أُجري تفاعل البصمة الوراثية باستخدام تقانة Rep-PCR المُعتمد على السلاسل التكرارية الموجودة ضمن الجينوم البكتيري لـ DNA 21 عذلة بكتيرية بالإضافة الى DNA عزلتين *X.campestris* و *Pseudomonas savastanoi* باستخدام بادئات :

For 5'-IIIICGICGICATCIGGC-3' REP1R-I و

Rev 5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3' REP2-I (Wieser وزملاؤه، 2000)

واستخدام hot start gotaq Master Mix 2x (Promega)

على جهاز المدور الحراري (TECHNE TC-4000) وفق البرنامج التالي:

1- فصل السلسلتين denaturation: أي فصل الشريط المزدوج DNA إلى شريطين منفصلين ويتم ذلك من خلال تحطيم الروابط الهيدروجينية التي تربط بين القواعد النيتروجينية بين الشريطين، يتم فصل سلسلتي الـ DNA لمدة 7 دقائق لدورة واحدة تليها مرحلة مكررة 35 دورة [فصل السلسلتين denaturation على درجة حرارة 94 °C دقيقة واحدة.

- 2- التحام البادئات alignment : أي ارتباط كلا primers مع الشريطن المنفصلين على درجة حرارة 40 °C لمدة دقيقة .
- 3- الاستطالة extension : على درجة حرارة 72 °C لمدة 4 دقائق ثم مرحلة استطالة نهائية لمدة 16 دقيقة.

بعد اتمام برنامج الـ PCR لدوراته تم الكشف عن نواتج التفاعل على هلامة الاغاروز 2% ضمن محلول منظم الرحلان TBE، بالمقارنة مع مؤشر جزيئي (1kb Fermentas #SM033) ومؤشر جزيئي (bp100 Fermentas #SM032) وتطبيق تيار كهربائي 100 فولت لمدة ساعتين، فُحصت الهلامة تحت الاشعة فوق البنفسجية بعد غمرها بمحلول ايتيديوم برومايد بوساطة جهاز توثيق الهلامات Gel documentation system.

سُجلت نتائج الرحلان بتحديد الاوزان الجزيئية للحزم الناتجة من التضخيم بتقانة REP-PCR من خلال المؤشرات الجزيئية المستخدمة بإستخدام برنامج (Gel analyzer 2010a)، وُحدد وجود أو غياب الحزم بالنظام الثنائي (1,0) وحُسبت مصفوفة التشابه والتباعد بين العزلات حسب Nei (1978) باستخدام برنامج population genetic analysis (POPGENE version 1.32) ورُسمت شجرة التباين الوراثي باستخدام برنامج Treecon 1.3b باستخدام طريقة Neighbor joining وبالاتماد على معادلة Nei و Li (1979).

النتائج والمناقشة

Results and Discusion

1- تحري انتشار أمراض الفاصولياء البكتيرية: Survey of Bacterial pathogens

تم القيام بزيارات حقلية للمنطقة الساحلية: جبلة (العسالة، حميمة، الشنبطلية)، اللاذقية (برج اسلام)، وطرطوس خلال عامي 2015-2016، و جُمعت عينات من البيوت البلاستيكية ومن حقول مزرعة بالفاصولياء (زراعات مكشوفة). تم جمع عينات من مناطق ريف دمشق (سعسع) تظهر عليها اعراض مشابهة الى حد كبير لأعراض اللفحات البكتيرية على الفاصولياء. كما تم جمع عدد كبير من البذور الجافة من الاسواق والمحال التجارية والصيدليات الزراعية يظهر عليها تلون بني واصفرار يشتهه بإصابتها بمرضات بكتيرية.

تم جمع عدد كبير من القرون الخضراء من الاسواق (سوق الهال القديم، مساكن برزة) يظهر عليها بقع مشبعة بالماء وتقرحات بنية اللون خلال عامي الدراسة مع مراعاة تسجيل اماكن انتاج هذه الفاصولياء إن امكن (ملحق 1)، أحضرت العينات الى مخبر ممرضات النبات البكتيرية في كلية الزراعة بجامعة دمشق .

أظهرت نتائج التقصي الحقلي وجود مظاهر مرضية على نبات الفاصولياء مشابهة للأعراض الناتجة عن الاصابة بالبكتيريا الممرضة للنبات، حيث لوحظ وجود بقع نيكروزية على اوراق الفاصولياء محاطة بهالات صفراء اللون مختلفة في احجامها. كما لوحظ في بعض البيوت البلاستيكية وايضا في الزراعة المكشوفة وجود بقع بنية مائلة للون الاحمر صغيرة الحجم لا يتجاوز قطرها 2 mm تنتشر على الاوراق. في بعض الحقول ظهرت بقع بنية مائلة للأحمر على الاوراق والتحتت فيما بعد لتشكل لطخ كبيرة الحجم على سطح الورقة، (الشكل 14) يظهر بعض الاعراض المرضية التي ظهرت على نباتات الفاصولياء اثناء الجولات الحقلية وجمع العينات .



الشكل (14) بعض الأعراض المرضية التي ظهرت على نباتات الفاصولياء اثناء الجولات الحقلية، A- بقع نيكروزية على الاوراق محاطة بهالات صفراء اللون، B- بقع بنية محمرة على الاوراق

عند جمع قرون فاصولياء خضراء من الاسواق لوحظت بعض الاعراض تشابه اعراض الاصابة بالامراض البكتيرية مثل بقع مشبعة بالماء مختلفة في احجامها، و في الظروف الرطبة عند وضع القرون في اواني زجاجية تحتوي في اسفلها على الماء تتطور افرازات بكتيرية تخرج من مراكز البقع المائية المنتشرة على القرون وتكون الافرازات بلون فضي الى كريمي الشكل (15).



الشكل (15) قرون فاصولياء جُمعت من الاسواق تظهر عليها بقع مشبعة بالماء وافرازات بكتيرية كريمية اللون

2- عزل وتعريف البكتيريا: Isolation and identification

أدت عملية عزل البكتيريا من جميع العينات النباتية، الاوراق و البذور والقرون الخضراء التي جمعت من الاسواق الى الحصول على 125 عزلة كان منها 14 عزلة من البذار بنسبة 11%، 53 عزلة من الاوراق بنسبة 42% و 58 عزلة من القرون بنسبة 46% (جدول(1). بعض هذه العزلات تتصف مستعمراتها بأنها دائرية الشكل كريمية اللون محدبة كبيرة الحجم بقطر 4-6 mm وسريعة النمو على وسط الزرع ظهرت بعد 24 ساعة، عزلات تتصف مستعمراتها بأنها دائرية شفافة محدبة صغيرة الحجم بقطر 1-2 mm ظهرت بعد 2-3 ايام من العزل على وسط الزرع YPGA، كما ظهرت بعض العزلات البكتيرية والتي تتصف مستعمراتها بأنها صفراء اللون مخاطية القوام ظهرت بعد 2-3 ايام بقطر 1.5 mm . تمت عملية غربلة العزلات بإجراء اختبار فرط الحساسية على نبات التبغ أولاً، واختبار الوميضية، و بناءً على الصفات المورفولوجية (لون المستعمرات وشكلها) كانت معظم العزلات من جنس *Pseudomonas* و عزلة واحدة من جنس *Xanthomonas* .

جدول (1) العزلات البكتيرية التي تم الحصول عليها من جميع العينات المختبرة

المنطقة	المادة النباتية	عدد العزلات	النسبة المئوية
الساحلية والجنوبية وريف دمشق	اوراق	53	42%
الصيديات الزراعية والمحال التجارية	بذور	14	11%
الاسواق	قرون خضراء	58	46%
العدد الكلي للعزلات		125	

3- القدرة الأمراضية : Pathogenicity test

تُعد طريقة عدوى قرون الفاصولياء الغضة من اهم طرائق دراسة القدرة الأمراضية للبكتيريا المعزولة من النباتات المصابة لما تتميز به من السرعة ودقة النتائج، فقد وجد Cheng وزملاؤه (1989) عند اختبار 46 عزلة من البكتيريا PSS التي تصيب عوائل مختلفة (غير نبات الفاصولياء) انها لم تحدث اعراض تشعب بالماء على الفاصولياء باستثناء عزلة واحدة . بينت نتائج القدرة الأمراضية على القرون وجود 20 عزلة ممرضة لنبات الفاصولياء؛ معظم العزلات التي اثبتت قدرتها الأمراضية كانت قد عزلت من قرون خضراء حيث بعد وخز القرون ظهرت اعراض الاصابة (تشعب بالماء) Water soaking بعد 2-3 أيام في مواضع الوخز الشكل (16).

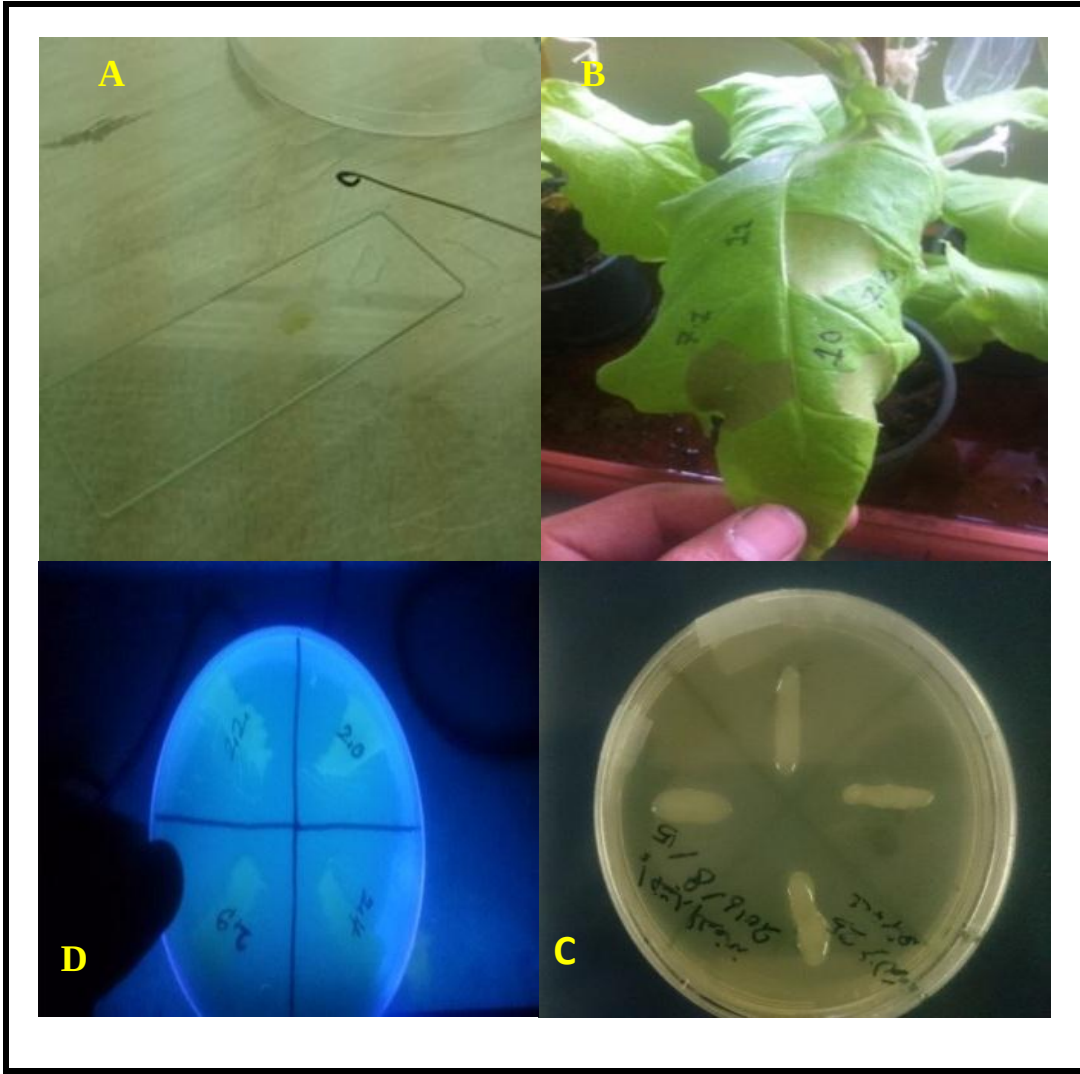
كانت اعراض العدوى اكثر وضوحاً على القرون الرفيعة (فرنسية مبلدة) وبدرجة اقل على القرون العريضة وربما يعود هذا الى سمك غلاف القرن عند الاصناف ذات القرون العريضة. ولم تظهر بقع مائية على بعض القرون وانما كانت عبارة عن بقع بنية صغيرة الحجم في موضع الوخز وبتحضير القرون في ظروف الرطوبة ظهرت افرازات بكتيرية كريمية اللون من مراكز البقع (الشكل 16) .



الشكل(16) بقع مائية على القرون المعدة بطريقة الوخز باستخدام اعواد تنظيف الاسنان(toothpick) ومستعمرات بكتيرية بعمر 24 ساعة بوجود شاهد وُخز بالماء المقطر المعقم

تعريف البكتيريا بالاختبارات البيوكيميائية :

تم اجراء العديد من الاختبارات للعزلات التي اثبتت قدرتها الإمراضية على نبات الفاصولياء، منها اختبار غرام، اختبار الوميضية، اختبار تحلل النشاء، اسالة الجيلاتين، اختبار تشكل اللوفان، اختبار حلمة الارجنين الجدول (4). (الشكل 17) يبين نتائج بعض الاختبارات البيوكيميائية.



الشكل (17) نتائج الاختبارات البيوكيميائية حيث A. اختبار غرام يُلاحظ وجود خيط متصل من المستعمرة البكتيرية بعد مزجها بقطرة من محلول KOH ، B. فرط الحساسية على نبات التبغ ووجود بقع متماوتة ظهرت بعد 48 ساعة دليل على ان العزلة هي ممرضة للنبات، C. اختبار انتاج اللوفان فالعزلات التي لديها القدرة على انتاج هذا الانزيم كانت ذات نمو كثيف ومقببة ومخاطية المظهر، D. اختبار الوميضية فالعزلات الشفافة الالامعة بعمر 24 ساعة اعطت وميضاً عند تعريضها للأشعة فوق البنفسجية بطول موجة 366 نانومتر.

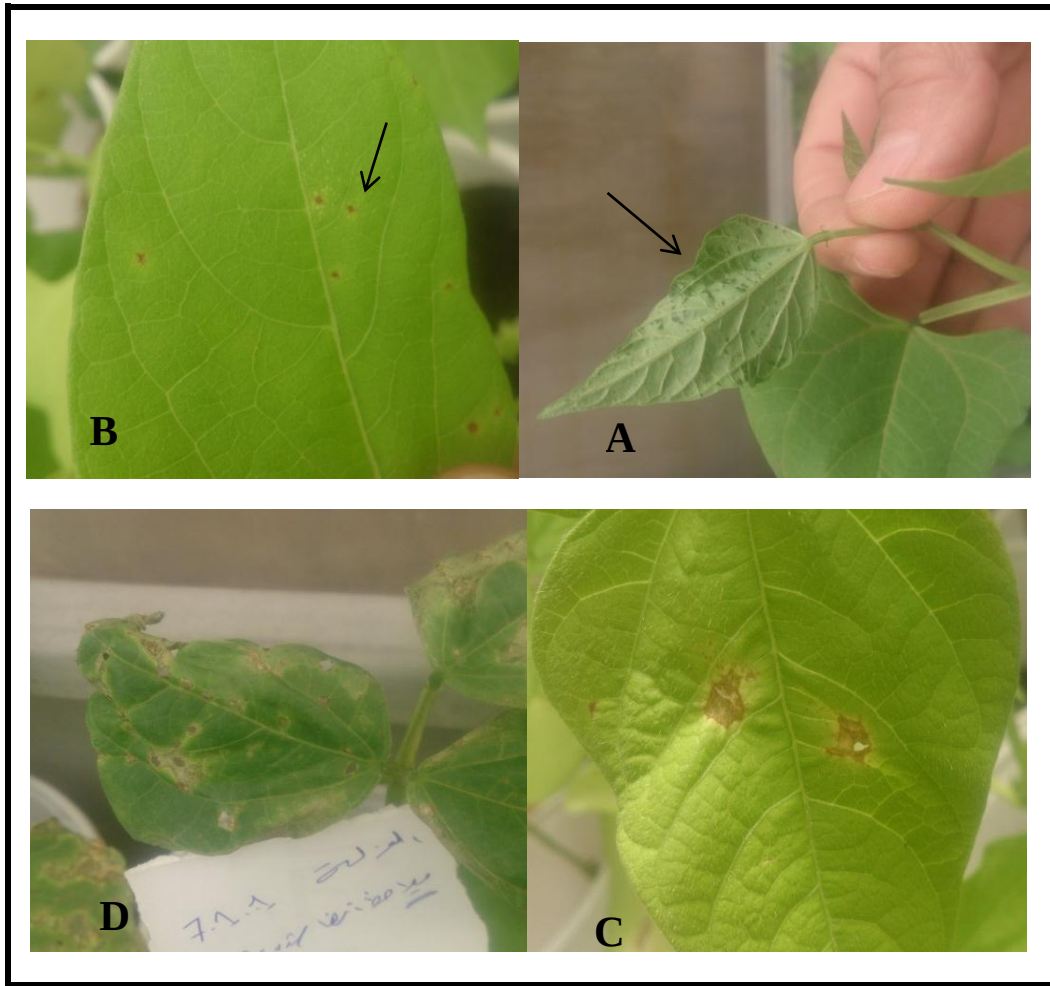
جدول(2) نتائج الاختبارات البيوكيميائية

Test Isolates	Gram test	Fluorescence	Levane production	Arginine dihydrolase	Gelatin liquefaction	Starch hydrolysis	Utilization of carbohydrates			Ice nucleation activity	Pathogenicity test	HR
							sorbitol	Mannitol	Erythritol			
، Psp.12 ، Psp.11 Psp.4.1.s Psp.21 ، Psp.19 ، Psp.20 ، Psp.24 ، Psp.28 ، Psp.22 Psp.33 ، Psp.7.1.1 ، Psp.29 ، Psp.6 ، Psp.5 ، Psp.4.1.g Psp.9، Psp.10،Psp.8 ، Psp.7.2	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+
Xap.7.3	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
Px.13	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+

من الجدول(2) كانت جميع عزلات *pseudomonas* لا تُحرض التجمد ولا تستطيع استهلاك السكريات المختبرة فهي بكتيريا *Pseudomonas savastanoi* pv. *Phaseolicola* المسبب لمرض اللفة الهالية حسب (Leliott ، 1966)، وكانت عذلة *Xap* هي *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* المسبب لمرض اللفة البكتيرية العادية سالبة الغرام، لا تسبب فرط حساسية على نبات التبغ ولا تنتج صبغات وميضية ولها القدرة على اسالة الجيلاتين (Schaad وزملاؤه، 2001) .

تقييم قابلية بعض الاصناف المزروعة للإصابة:

ظهرت أعراض العدوى الاصطناعية بطريقة الرش الرذاذي اليدوي لعزلات *psp.22*، *psp.8*، *psp.24*، *psp.29*، *psp.4.1.g*، *psp.6*، *psp.11*، *psp.4.1.s*، *psp.5*، *psp.33*، *psp.7.1.1*، *psp.7.2*، *Psp.12*، *psp.21*، *psp.20*، *psp.9*، *psp.10*، *psp.19*، *Xap.7.3* على خمسة اصناف فاصولياء اعتباراً من اليوم الخامس، حيث لوحظت على شكل بقع مائية على السطح السفلي للأوراق (الشكل 18.A)، والتي تطورت إلى بقع بنية اللون صغيرة الحجم (الشكل 18.B)، واستمر تطور الاعراض لتصبح البقع المتماوتة بحجم اكبر ومحاطة بهالات صفراء اللون (الشكل 18.C.D).



الشكل (18) تطور أعراض الإصابة على نباتات الفاصولياء المعداة بعزلات *Psp* و *Xap* بعد A: بعد 5 أيام، B: اسبوع c: 15 يوم D: 20 يوم من العدوى الاصطناعية

أُخذت النسبة المئوية للمساحة التي تغطيها البقع المرضية على النباتات المعداة بعد 20 يوم من العدوى الاصطناعية مقارنة مع شاهد مُعدى بالماء المقطر المعقم، وتم تقييم أعراض الإصابة (الشكل 19) بناء على النسبة المئوية من سطح الورقة التي تغطيها البقع المرضية وفق مقياس 0-5 (Dursun وزملاؤه، 2002؛ Pastor-Corrales وزملاؤه، 1981).



1



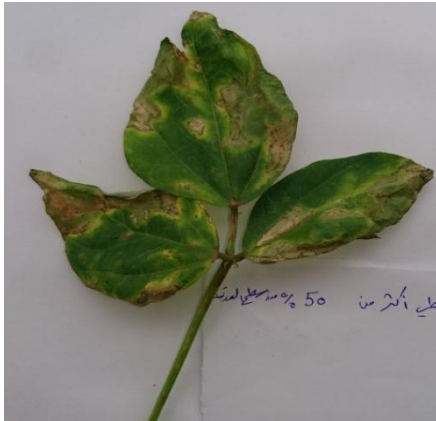
0



3



2



5

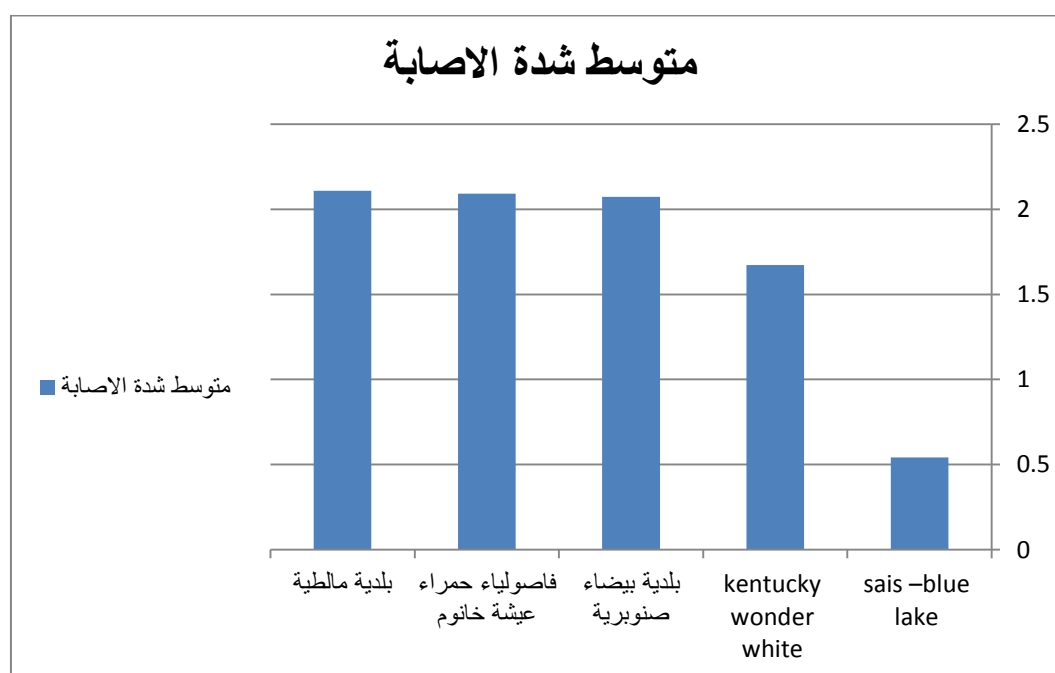


4

الشكل (19) شدة الإصابة حسب السلم 0-5، 0: لا أعراض مرئية، 1: بقع متماوتة تغطي 1-5% من سطح الورقة. 2: بقع متماوتة تغطي 6-10 % من سطح الورقة. 3: بقع متماوتة تغطي 11-25 % من سطح الورقة. 4: بقع متماوتة تغطي 26-50% من سطح الورقة. 5: بقع متماوتة تغطي أكثر من نصف مساحة الورقة < 50 % .

بينت نتائج التحليل الاحصائي باستخدام برنامج SPSS.22 قابلية معظم الاصناف المدروسة للإصابة بمعظم العزلات البكتيرية، كانت قيمة $P_value > 0.05$ عند $F = 3.393$ وبذلك يكون هناك فروق معنوية بين الاصناف في قابليتها للإصابة، وأجري اختبار دونكان لترتيب الاصناف حسب قابليتها للإصابة وتبين ان الصنف الايطالي sais –blue lake كان الاكثر مقاومة بفروق معنوية عن باقي الاصناف ومتوسط شدة الإصابة 0.54 ، يليه الصنف (kentucky wonder white) بفروق معنوية عن باقي الاصناف ومتوسط شدة الإصابة 1.67 . بينما كانت الاصناف البلدية (بلدية بيضاء صنوبرية، فاصولياء حمراء عيشة خانوم، بلدية مالطية) هي الاكثر حساسية للإصابة بفروق معنوية عن الصنفين الايطالي sais –blue lake و kentucky wonder white وبمتوسط شدة إصابة 2.07 ، 2.09 ، 2.10 على التوالي .

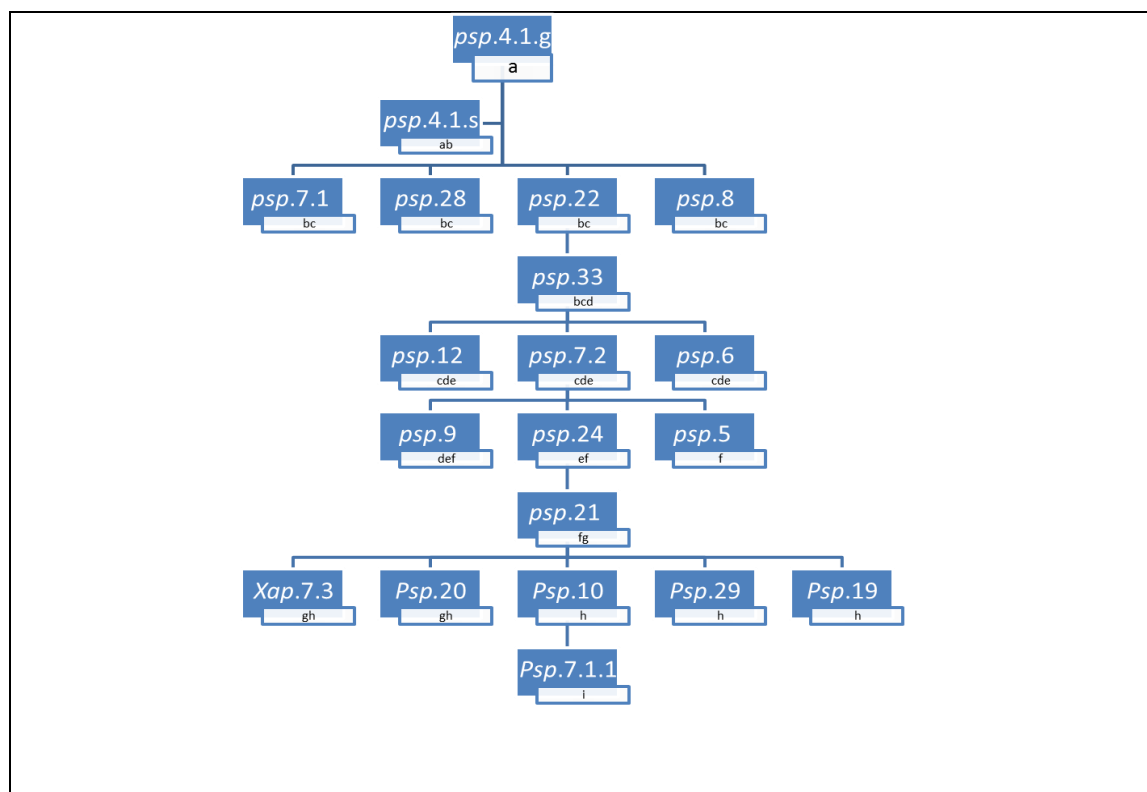
حيث يمكن تقسيم الاصناف الى ثلاث مجموعات حسب قابليتها للأصابة، تضم المجموعة الاولى الصنف الايطالي sais –blue lake وتضم المجموعة الثانية الصنف kentucky wonder white وتضم المجموعة الثالثة الاصناف البلدية (بلدية بيضاء صنوبرية، فاصولياء حمراء عيشة خانوم، بلدية مالطية) (الشكل 20) .



الشكل (20) مخطط يبين ترتيب الاصناف حسب قابليتها للإصابة بمقياس 5-0 (Dursun وزملاؤه)

كما أظهرت نتائج العدوى الاصطناعية اختلاف في شدة الاعراض الظاهرية على النباتات المختبرة ناتج عن الاختلاف في شراسة العزلات البكتيرية وهذا يتوافق مع ما أشار إليه Popovic وزملاؤه (2012) عند تقييم قابلية بعض الاصناف من الفاصولياء للإصابة ببكتيريا Xap حيث لوحظ اختلاف في الاعراض الظاهرية على النباتات المعدة . وأجري اختبار دونكان لترتيب شراسة العزلات وتبين ان

العزلة *psp.4.1.g* كانت الاقل شراسة بفروق معنوية عن باقي العزلات وبمتوسط شدة اصابة 0.25، بينما كانت العزلة *psp.7.1.1* الاكثر شراسة بفروق معنوية عن باقي العزلات وبمتوسط شدة اصابة 3.9 (الشكل 21) .



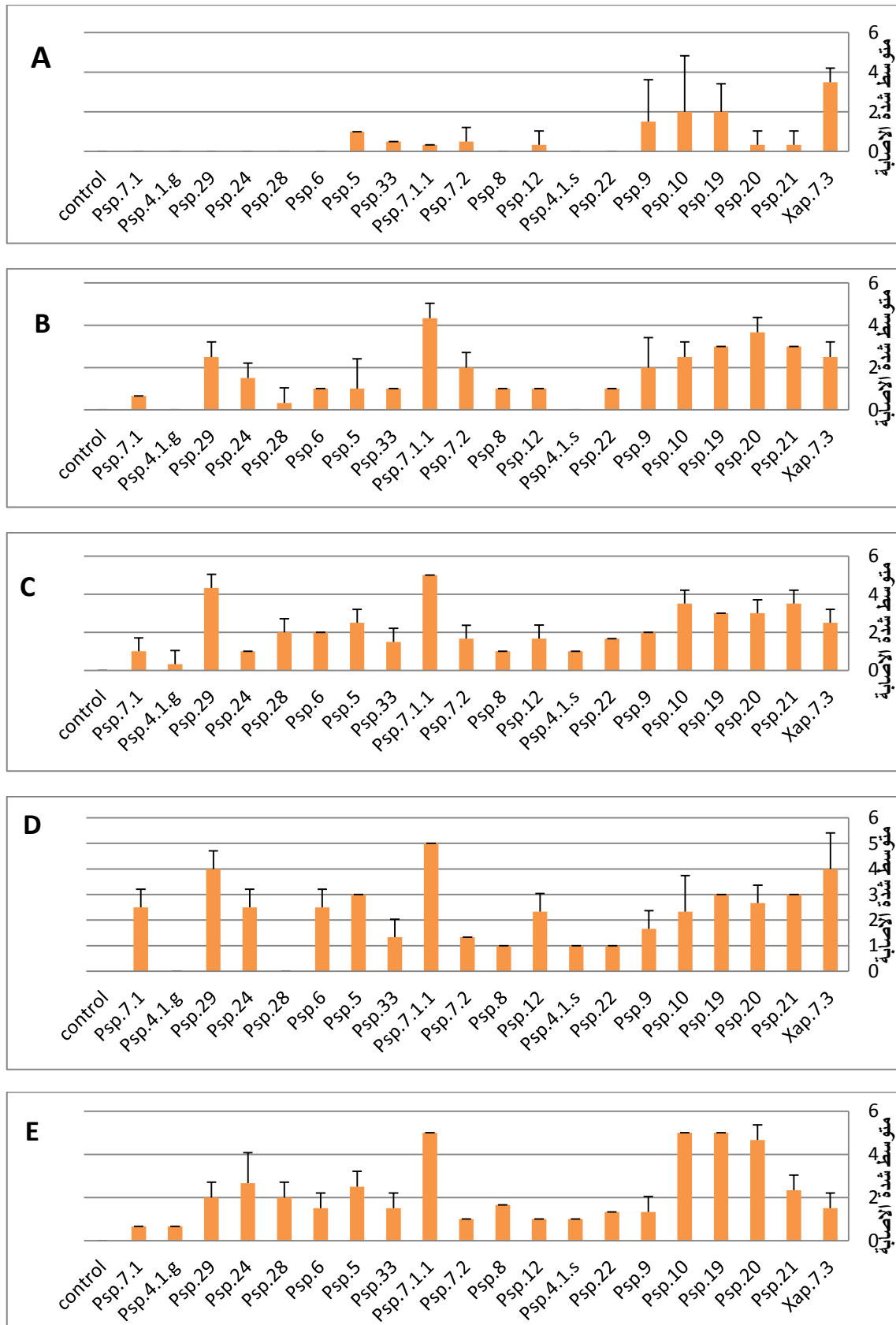
الشكل (21). ترتيب العزلات البكتيرية حسب شراستها من الاقل شراسة *psp.4.1.g* الى الاكثر شراسة *psp.7.1.1*

وكانت شدة الاصابة بكل من عزلات *Psp* و *Xap7.3* متباينة وهذا يتوافق مع ما أشار إليه Fourie (2011) عند تقييم قابلية العديد من الاصناف المزروعة من الفاصولياء للإصابة لكل من البكتيريا المسببة لكل من مرض التبغ البني البكتيري واللفحة الهالية واللفحة البكتيرية العادية فوجد أن العديد من الاصناف المختبرة أظهرت مقاومة حقلية لكل من مسببي اللفحة الهالية *Psp* والتبغ البني البكتيري *Pss* بينما كل الاصناف المدروسة كانت متوسطة الى عالية الحساسية للبكتيريا المسببة لمرض اللفحة البكتيرية العادية *Xap* .

لُوحظ اختلاف تفاعل العزلات مع الاصناف المختلفة فكان الصنف Sais blue lake مقاوماً لمعظم عزلات (*Psp*) *psp.6*، *psp.4.1.g*، *psp.29*، *psp.24*، *psp.22*، *psp.8*، *psp.28*، *psp.4.1.s*، *psp.11* بمتوسط شدة اصابة 0.00 الى متوسط المقاومة تجاه كل من *psp.5*، *psp.33*، *psp.7.1.1*، *psp.7.2*، *Psp.12*، *psp.21*، *psp.20* وبمتوسط شدة اصابة تراوح بين 0.33- 1 وكان متوسط الحساسية لكل من العزلات *psp.9*، *psp.10*، *psp.19*، بينما كان حساساً للبكتيريا *Xanthomonas* (*Xap.7.3*) الشكل (22). أما الصنف kentucky wonder white كان

مقاوماً لكل من *psp.4.1.g*، *psp.4.1.s* بينما كان متوسط المقاومة لكل من *psp.28*، *psp.22*، *psp.11*، *psp.6*، *psp.5*، *psp.33*، *Psp.12*، *psp.8* ومتوسط الحساسية لكل من العزلات *psp.9*، *psp.7.2*، *psp.24* وحساساً لكل من العزلات *psp.29*، *psp.10*، *psp.19*، *psp.21*، *psp.20*، وحساساً للبكتيريا *Xap.7.3* (Xap.7.3) وكان شديد الحساسية للعزلة *psp.7.1.1* الشكل (22) .

كانت الأصناف البلدية (بلدية بيضاء صنوبرية، فاصولياء حمراء عيشة خانوم، بلدية مالطية) والتي لم تظهر بينها فروق معنوية عالية الحساسية لأكثر العزلات شراسةً *psp.7.1.1* وبعضها كانت عالية الحساسية لـ العزلات *psp.19*، *psp.29*، *psp.10* ، وهي العزلات التي لم تظهر بينها فروق معنوية في شرستها وتلي العزلة *psp.7.1.1* من حيث الشراسة، وكانت هذه الاصناف متوسطة المقاومة للعزلات الأقل شراسةً *psp.4.1.g*، *psp.4.1.s*، *psp.11* . وكانت شديدة الحساسية للبكتيريا *Xap.7.3* الشكل (22) .



الشكل (22) متوسط شدة الإصابة الناتجة عن تفاعل عزلات *psp* و *Xap* مع الاصناف المدروسة: A: Amdoussa, B: sais blue lake, C: kentucky wonder white, D: بلدية بيضاء صنوبرية, E: مالطية بلدية.

ويُفسر هذا الاختلاف بالتباين الوراثي بين اصناف الفاصولياء المختبرة من جهة وبين العزلات البكتيرية من جهة اخرى، وبالتالي فإنها تختلف في قدرتها على احداث المرض باختلاف الصنف. حيث يمكن تقسيم العزلات في خمس مجموعات حسب قدرتها على اصابة الاصناف المدروسة جدول(3). عزلات المجموعة الأولى تصيب جميع الأصناف بدرجات متباينة حيث تختلف شدة الإصابة من صنف الى آخر، عزلات المجموعة الثانية تصيب جميع الاصناف ماعدا الصنف sais blue lake ، المجموعة الثالثة ضمت العزلة Psp.4.1.s حيث تصيب الاصناف البلدية ولا تصيب الصنف sais blue lake و الصنف Kentucky wonder white ، وضمت المجموعة الرابعة العزلة Psp.28 حيث لا تصيب الصنف sais blue lake والصنف بلدية بيضاء صنوبرية و تصيب باقي الاصناف بينما ضمت المجموعة الخامسة العزلة Psp.4.1.g والتي أصابت كل من الاصناف فاصولياء حمراء عيشة خانوم، بلدية مالطية ولم تُصيب باقي الاصناف المدروسة .

جدول(3) يبين استجابة الاصناف للإصابة المرضية عند رشها بمعلق بكتيري لعزلات Psp و Xap حيث + إصابة ، - عدم الإصابة .

المجموعة	العزلات	الاصناف	sais blue lake	Kentucky wonder white	بلدية بيضاء صنوبرية	فاصولياء حمراء عيشة خانوم	بلدية مالطية
1	Psp.19,Psp.10,Psp.9,Psp.33, Psp.5 Psp.7.2,Psp.7.1.1, Xap.7.3,Psp.12,Psp.21, Psp.20		+	+	+	+	+
2	Psp.11,Psp.29,Psp.24, Psp.8,Psp.6,Psp.22		-	+	+	+	+
3	Psp.4.1.s		-	-	+	+	+
4	Psp.28		-	+	-	+	+
5	Psp.4.1.g		-	-	-	+	+

وهذا يتوافق مع ما ذكره Taylor وزملاؤه (1996) حيث ميز تسع سلالات من بكتيريا *pseudomonas savastanoi* pv.*phaseolicola* بحسب قدرتها الامراضية على 8 اصناف من الفاصولياء.

القراءة الوراثية لعزلات *Xap* و *Psp*:

أُجري اختبار البصمة الوراثية المعتمد على تقانة REP-PCR على 19 عزلة بكتيرية تم تعريفها بالاختبارات البيوكيميائية واختبار القدرة الامراضية، 18 عزلة تتبع للنوع *pseudomonas savastanoi* pv *phaseolicola* وعزلة تتبع للنوع *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* ، و عزلة من : *pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* (*pss-f*) و عزلة من *X.campestris* pv. *Campestris* (*xcc*) من مخبر ممرضات النبات البكتيرية .

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل تقانة REP-PCR وجود 26 حزمة للعزلات المختبرة وكانت جميع الحزم Polymorphic (الشكل 23)، حُسبت اوزان هذه الحزم باستخدام برنامج Gelanalyzer2010a وتراوح اوزانها بين 110 bp الحزمة a و 3000 bp الحزمة n' (الجدول 4).

ظهرت الحزم ذات الاوزان 750 bp, 1050 bp, 1170 bp, 1480 bp عند اغلب عزلات *psp* وكانت الحزمة k' ذات الوزن الجزيئي (2500 bp) حزمة مميزة للعزلة *psp.6*، وكانت كل من الحزمة c (250 bp) و الحزمة e (431 bp) مميزة للعزلة *px.13* .

وكانت الحزم g' (725 bp)، n' (3000 bp) حزم مميزة لانواع الجنس *Xanthomonas* وظهرت عند كلاً من *X.campestris* pv. *Campestris* و للنوع *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* ، بينما كانت الحزمة d' (625 bp) والحزمة J' (1000 bp) مميزة للنوع *X.campestris* ، والحزمة h' (2750 bp) مميزة للنوع *xanthomonas axonopodis* pv. *Campestris* ، والحزمة phaseoi .

وأمكن تمييز النوع *Pseudomonas savastanoi* pv *savastanoi* بوجود الحزمة e' ذات الوزن 630 bp والحزمة c' ذات الوزن الجزيئي 500 bp .

وهذه النتائج توافق ما ذكره Cepnic و Gurel (2012) عند اجراء اختبار البصمة الوراثية باستخدام تقانة REP-PCR لـ 8 عزلات من *P. savastanoi* pv. *Savastanoi* و عزلتين *P. syringae* و 4 عزلات من *P. syringae* pv. *Phaseolicola* حيث أمكن تمييز عزلات *P. syringae* عن باقي العزلات عن طريق حزم التعددية الشكلية التي ظهرت بالرحلان الكهربائي. ولقد أثبتت القدرة التمييزية لتقانة REP-PCR بين تحت انواع *P. syringae* من قبل Kaluzna وزملاؤه (2010) .

جدول(4) الاوزان الجزيئية للحزم التي ظهرت في اختبار الـ Rep-PCR (bp)

الوزن الجزيئي (bp)	رمز الحزمة	الرقم
110	a	1
180	b	2
250	C	3
350	d	4
430	e	5
500	C'	6
550	f	7
625	D'	8
630	e'	9
725	g'	10
750	G	11
850	h	12
900	I	13
1000	J'	14
1050	j	15
1100	k	16
1170	L	17
1300	n	18
1480	o	19
1750	h'	20
1812	p	21
1900	q	22
2100	r	23
2500	K'	24
2750	m	25
3000	n'	26

حُسبت نسبة التشابه بين العزلات بالنظام الثنائي (0,1) حيث [1=الحزمة موجودة، 0= تشير الى غياب الحزمة] وباستخدام برنامج population genetic analysis (popgene version 1.32) . وبينت النتائج ان نسبة التشابه بين عزلات *psp* فيما بينها تراوحت بين 73% حتى 100% ، ونسبة التشابه مع بكتيريا *pss* تراوحت بين 53% حتى 69% ونسبة التشابه مع عزلات *Xanthomonas* تراوحت بين 42% حتى 61% جدول(5) .

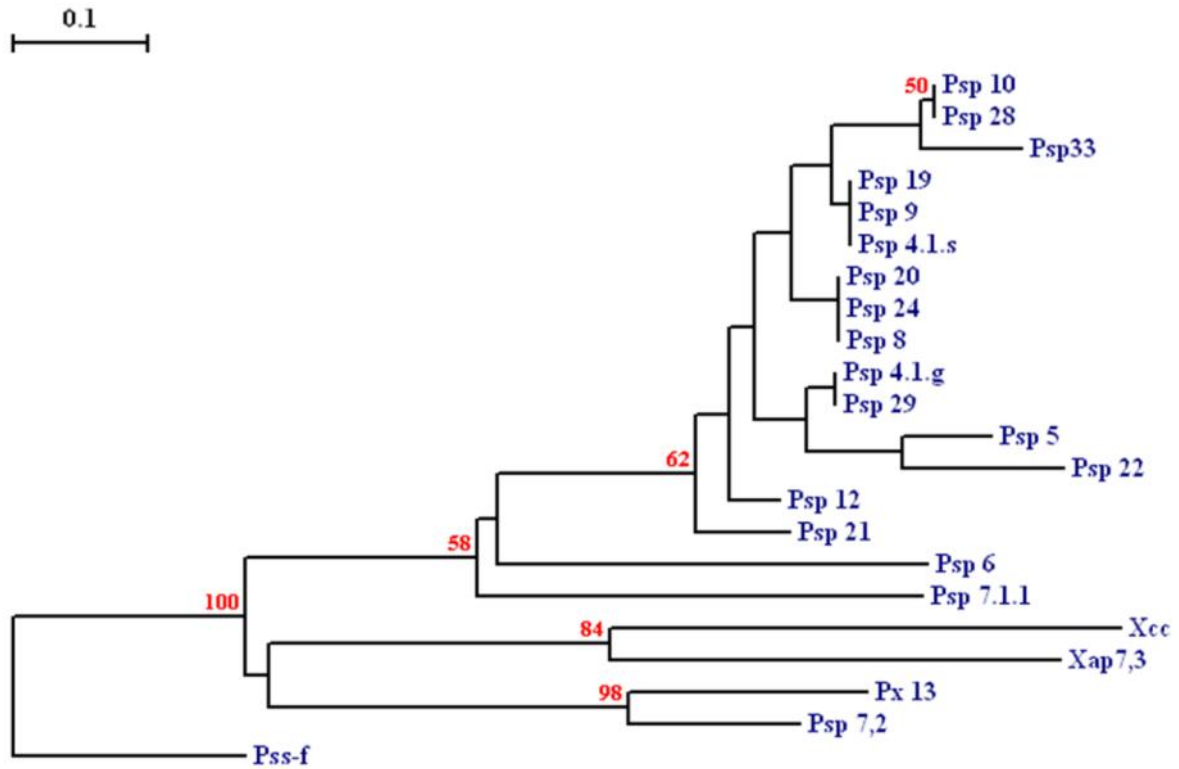
جدول (5) مصفوفة التشابه والتباين للعزلات المختبرة باستخدام برنامج POPGENE

pop ID	psp7.2	psp29	psp4.1.s	psp28	psp9	psp12	psp21	psp4.1.g	psp22	psp5	psp7.1.1	px13	psp10	psp19	psp8	psp24	psp6	psp20	psp-f	psp33	xap7.3	xcc
psp7.2	****	0.6923	0.6538	0.6923	0.6538	0.6538	0.6923	0.6923	0.7692	0.7692	0.7692	0.8846	0.6923	0.6538	0.6154	0.6154	0.6154	0.6154	0.6154	0.6923	0.6538	0.6923
psp29	0.3677	****	0.9615	0.9231	0.9615	0.9615	0.9231	1.0000	0.9231	0.9231	0.7692	0.5769	0.9231	0.9615	0.9231	0.9231	0.6923	0.9231	0.5385	0.8846	0.5000	0.6154
psp4.1.s	0.4249	0.0392	****	0.9615	1.0000	0.9231	0.8846	0.9615	0.8846	0.8846	0.7308	0.5385	0.9615	1.0000	0.9615	0.9615	0.7308	0.9615	0.5769	0.9231	0.4615	0.5769
psp28	0.3677	0.0800	0.0392	****	0.9615	0.8846	0.9231	0.9231	0.8462	0.9231	0.7692	0.5769	1.0000	0.9615	0.9231	0.9231	0.7692	0.9231	0.6154	0.9615	0.5000	0.6154
psp9	0.4249	0.0392	0.0000	0.0392	****	0.9231	0.8846	0.9615	0.8846	0.8846	0.7308	0.5385	0.9615	1.0000	0.9615	0.9615	0.7308	0.9615	0.5769	0.9231	0.4615	0.5769
psp12	0.4249	0.0392	0.0800	0.1226	0.0800	****	0.9615	0.9615	0.8846	0.8846	0.8077	0.5385	0.8846	0.9231	0.9615	0.9615	0.7308	0.9615	0.5769	0.8462	0.4615	0.5769
psp21	0.3677	0.0800	0.1226	0.0800	0.1226	0.0392	****	0.9231	0.8462	0.9231	0.8462	0.5769	0.9231	0.8846	0.9231	0.9231	0.7692	0.9231	0.6154	0.8846	0.5000	0.6154
psp4.1.g	0.3677	0.0000	0.0392	0.0800	0.0392	0.0392	0.0800	****	0.9231	0.9231	0.7692	0.5769	0.9231	0.9615	0.9231	0.9231	0.6923	0.9231	0.5385	0.8846	0.5000	0.6154
psp22	0.2624	0.0800	0.1226	0.1671	0.1226	0.1226	0.1671	0.0800	****	0.9231	0.7692	0.6538	0.8462	0.8846	0.8462	0.8462	0.6923	0.8462	0.5385	0.8077	0.5000	0.6154
psp5	0.2624	0.0800	0.1226	0.0800	0.1226	0.1226	0.0800	0.0800	0.0800	****	0.7692	0.6538	0.9231	0.8846	0.8462	0.8462	0.6923	0.8462	0.6154	0.8846	0.5000	0.6154
psp7.1.1	0.2624	0.2624	0.3137	0.2624	0.3137	0.2136	0.1671	0.2624	0.2624	0.2624	****	0.6538	0.7692	0.7308	0.7692	0.7692	0.7692	0.7692	0.6154	0.7308	0.6538	0.6923
px13	0.1226	0.5500	0.6190	0.5500	0.6190	0.6190	0.5500	0.5500	0.4249	0.4249	0.4249	****	0.5769	0.5385	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000	0.5769	0.5385	0.5385	0.5769
psp10	0.3677	0.0800	0.0392	0.0000	0.0392	0.1226	0.0800	0.0800	0.1671	0.0800	0.2624	0.5500	****	0.9615	0.9231	0.9231	0.7692	0.9231	0.6154	0.9615	0.5000	0.6154
psp19	0.4249	0.0392	0.0000	0.0392	0.0000	0.0800	0.1226	0.0392	0.1226	0.1226	0.3137	0.6190	0.0392	****	0.9615	0.9615	0.7308	0.9615	0.5769	0.9231	0.4615	0.5769
psp8	0.4855	0.0800	0.0392	0.0800	0.0392	0.0392	0.0800	0.0800	0.1671	0.1671	0.2624	0.6931	0.0800	0.0392	****	1.0000	0.7692	1.0000	0.6154	0.8846	0.4231	0.5385
psp24	0.4855	0.0800	0.0392	0.0800	0.0392	0.0392	0.0800	0.0800	0.1671	0.1671	0.2624	0.6931	0.0800	0.0392	0.0000	****	0.7692	1.0000	0.6154	0.8846	0.4231	0.5385
psp6	0.4855	0.3677	0.3137	0.2624	0.3137	0.3137	0.2624	0.3677	0.3677	0.3677	0.2624	0.6931	0.2624	0.3137	0.2624	0.2624	****	0.7692	0.6154	0.7308	0.5769	0.6154
psp20	0.4855	0.0800	0.0392	0.0800	0.0392	0.0392	0.0800	0.0800	0.1671	0.1671	0.2624	0.6931	0.0800	0.0392	0.0000	0.0000	0.2624	****	0.6154	0.8846	0.4231	0.5385
psp-f	0.3677	0.6190	0.5500	0.4855	0.5500	0.5500	0.4855	0.6190	0.6190	0.4855	0.4855	0.5500	0.4855	0.5500	0.4855	0.4855	0.4855	0.4855	****	0.5769	0.5769	0.5385
psp33	0.4249	0.1226	0.0800	0.0392	0.0800	0.1671	0.1226	0.1226	0.2136	0.1226	0.3137	0.6190	0.0392	0.0800	0.1226	0.1226	0.3137	0.1226	0.5500	****	0.4615	0.5769
xap7.3	0.4249	0.6931	0.7732	0.6931	0.7732	0.7732	0.6931	0.6931	0.6931	0.6931	0.4249	0.6190	0.6931	0.7732	0.8602	0.8602	0.5500	0.8602	0.5500	0.7732	****	0.7308
xcc	0.3677	0.4855	0.5500	0.4855	0.5500	0.5500	0.4855	0.4855	0.4855	0.4855	0.3677	0.5500	0.4855	0.5500	0.6190	0.6190	0.4855	0.6190	0.6190	0.5500	0.3137	****

وبالاعتماد على مصفوفة التشابه والتباين رُسمت شجرة التباين الوراثي باستخدام برنامج Treecon 1.3b باستخدام طريقة Neighbor joining وبالاعتماد على معادلة Nei و Li (1979) الشكل (24).

انقسمت شجرة القرابة الوراثية ذات الجذر المرسومة للعزلات بالاعتماد على تقانة REP-PCR الى عنقودين رئيسيين، حيث انقسم العنقود الاول الى تحت عنقودين ضم الاول العزلة *Xap7.3* والعزلة *Xcc* وضم تحت العنقود الثاني عزلات *Px13* والعزلة *pss7.2* . وانقسم العنقود الثاني ايضاً الى تحت عنقودين، ضم الاول العزلة *psp7.1.1* بينما انقسم تحت العنقود الثاني بدوره الى مجموعتين، الاولى ضمت العزلة *psp21* اما المجموعة الثانية انقسمت الى تحت مجموعتين ، تحت المجموعة الاولى ضمت العزلة *psp12* بينما انقسمت تحت المجموعة الثانية الى فرعين، الفرع الاول انقسم بدوره الى تحت فرعين ضم الاول العزلات *psp5* و العزلة *psp22* بينما ضم تحت الفرع الثاني عزلات *psp4.1.g* و *psp29* ، اما الفرع الثاني انقسم ايضاً الى تحت ثلاث فروع ضم الاول عزلات *psp20* ، *psp24* ، *psp8* ، وتحت الفرع الثاني ضم عزلات *psp19* ، *psp9* ، *psp4.1.s* ، اما تحت الفرع الثاني ضم العزلات *psp33* ، *psp28* ، *psp10* . ويظهر من النتائج ان عزلات Psp توزعت في تسع مجموعات وراثية .

قام Guti rrez وزملاؤه (2013) بدراسة التنوع الوراثي لطرز مختلفة من *Pseudomonas syringae* ووجدوا ان هناك قرابة وراثية بين عزلات *Pseudomonas syringae* pv *syringae* والمعزولة من نبات المانجو و *Pseudomonas syringae* pathovars الأخرى وعند رسم شجرة القرابة الوراثية انعزلت *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* في مجموعة بشكل مستقل عن باقي طرز *P.syringae* .



الشكل (24) شجرة القرابة الوراثية لعزلات *Xanthomonas pseudomonas savastanoi pv. phaseolicola* و *Xcc* مع عزلي *axonopodis pv. phaseoli* الناتجة عن اختبار البصمة الوراثية REP-PCR ورُسمت ببرنامج Treecon3b باستخدام طريق Neighbor joining وبالاتماد على معادلة Nei و Li (1979).

الاستنتاجات

- 1- عزل 20 عزلة بكتيرية ممرضة لنبات الفاصولياء جميعها من القرون من أصل 125 عزلة تم عزلها من مختلف العينات النباتية والقرون والبذور.
- 2- تبين من خلال الاختبارات البيوكيميائية ان 19 عزلة تنتمي للنوع *pseudomonas savastanoi pv. Phaseolicola* المسبب لمرض اللفة الهالية و عزلة واحدة تنتمي للنوع *Xanthomonas axonopodis pv phaseoli* المسبب لمرض اللفة البكتيرية العادية وهذا أول تسجيل لهذين النوعين من البكتيريا في سوريا.
- 3- تبين قابلية أصناف الفاصولياء المختبرة للإصابة بالبكتيريا وتبين ان الصنف الايطالي - sais blue lake كان الأكثر مقاومة يليه الصنف kentucky wonder white بينما كانت الاصناف البلدية (بلدية بيضاء صنوبرية، فاصولياء حمراء عيشة خانوم، بلدية مالطية) هي الأكثر حساسية للإصابة .
- 4- كما أظهرت نتائج العدوى الاصطناعية اختلاف في شراسة العزلات البكتيرية وتبين ان العزلة *psp.4.1.g* كانت الاقل شراسة بينما كانت العزلة *psp.7.1.1* الأكثر شراسة .
- 5- اكدت نتائج اختبار البصمة الوراثية نتائج الاختبارات البيوكيميائية حيث تجمعت عزلات *Psp* (18) عزلة في عنقود مستقل في تسع طرز وراثية و توزعت عزلة Xap في عنقود مستقل .

التوصيات

- 1- مسح حقلي وتقييم شدة المرض والاستمرار بالعزل لمعرفة التنوع الحيوي للبكتيريا الموجودة على النبات والبذور .
- 2- تحديد السلالات البكتيرية باستخدام الأصناف التفريقية.
- 3- استكمال الاختبارات الجزيئية لتوصيف السلالات البكتيرية .

المراجع

المراجع العربية :

- (1) أبو غرة، محمود، الدوجي، زياد (1996). أمراض البنات البكتيرية، كلية الزراعة، منشورات جامعة دمشق.
- (2) علوش، ميساء، (2009)، أمراض الفاصولياء البكتيرية في المنطقة الوسطى والساحلية، رسالة ماجستير ، كلية الزراعة ، جامعة البعث.
- (3) المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية، (2013). مديرية الإحصاء والتخطيط وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي ، الجمهورية العربية السورية.
- (4) بلال، حمزة؛ مهنا، أحمد؛ قبرصلي، ريم؛ 2014. أفات المحاصيل الحقلية. منشورات جامعة دمشق (423 صفحة) .

المراجع الاجنبية :

- 4) Aggour, A. R., Coyne, D. P., Vidaver, A. K., & Eskridge, K. M. (1989). Transmission of the common blight pathogen in bean seed. Journal of the American Society for Horticultural Science, 114(6), 1002-1008.
- 5) Akhavan, A., Bahar, M., Saeedi, G. H., & Lak, M. (2009). Factors affecting epiphytic population of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in epidemiology of bean common blight. JWSS-Isfahan University of Technology, 13(47), 265-276.Abstract.
- 6) Allen DJ, Buruchara RA, Smithson JB,. (1998). Diseases of common bean. In: Allen, D. J., & Lenné, J. M. (1998). The pathology of food and pasture legumes. CAB International.
- 7) Ariyaratne, H. M. (1997). Pathogenic variation for the halo blight bacterium and mapping of loci for multiple diseases in common bean. PhD diss. University of Nebraska, Lincoln.
- 8) Arnold, D. L., Lovell, H. C., Jackson, R. W., & Mansfield, J. W. (2011). *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*: from 'has bean'to supermodel. Molecular plant pathology, 12(7), 617-627.abstract.
- 9) Attard, E., Yang, H., Delort, A. M., Amato, P., Pöschl, U., Glaux, C., ... & Morris, C. E. (2012). Effects of atmospheric conditions on ice nucleation activity of *Pseudomonas*. Atmospheric Chemistry and Physics, 12(22), 10667-10677.
- 10) Beach SA. (1892). Some bean diseases.In: Schwartz, H. F. and Pastor Corrales, M. A. (eds.).Bean Production Problems in the Tropics. Second edition. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.726 P.bean improvement. *Crop Sci.*, 39: 80-89.

- 11) **Bennink, M. R. (2002).** Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. *Nutrition and cancer*, 44(1), 60-65.
- 12) **Bradbury, J. F. (1986).** Guide to plant pathogenic bacteria. CAB international.
- 13) **Buckler IV, E. S., Pearsall, D. M., & Holtsiord, T. P. (1998).** Climate, plant ecology, and Central Mexican Archaic subsistence. *Current Anthropology*, 39(1), 152-164.
- 14) **Bull, C. T., De Boer, S. H., Denny, T. P., Firrao, G., Fischer-Le Saux, M., Saddler, G. S., ... & Takikawa, Y. (2012).** List of new names of plant pathogenic bacteria (2008-2010). *Journal of Plant Pathology*, 94(1), 21-27.
- 15) **Burkholder, W. H. (1930).** Bacterial diseases of the bean. Cornell University, Agricultural Experiment Station; Ithaca, New York.
- 16) **Burkholder, W. H. (1926).** A new bacterial disease of the Bean. *Phytopathology*, 16(12).Abstract.
- 17) **CABI/EPPO,. (2014).** <http://www.cabi.org/isc/datasheet/56962>.
- 18) **Çepni, E., & Gürel, F. (2012).** Variation in extragenic repetitive DNA sequences in *Pseudomonas syringae* and potential use of modified REP primers in the identification of closely related isolates. *Genetics and molecular biology*, 35(3), 650-656.
- 19) **Cheng, G. Y., LEGARD, D., Hunter, J. E., & Burr, T. J. (1989).** Modified bean pod assay to detect strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* that cause bacterial brown spot of snap bean. *Plant disease*, 73(5), 419-423.
- 20) **Collins, M. D., & Jones, D. (1983).** Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov. *Microbiology*, 129(11), 3545-3548. Abstract.
- 21) **Delgado-Salinas, A., Thulin, M., Pasquet, R., Weeden, N., & Lavin, M. (2011).** Vigna (Leguminosae) sensu lato: The names and identities of the American segregate genera. *American Journal of Botany*, 98(10), 1694-1715.abstract.
- 22) **Donmez, M. F., Sahin, F., & Elkoca, E. (2013).** Identification of bean genotypes from Turkey resistance to common bacterial blight and halo blight diseases. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 12(4), 139-151.
- 23) **Duncan, R. W., Gilbertson, R. L., Lema, M., & Singh, S. P. (2014).** Inheritance of resistance to the widely distributed race 6 of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in common bean pinto US14HBR6. *Canadian Journal of Plant Science*, 94(5), 923-928.
- 24) **Dursun, A., Dönmez, M. F., & Şahin, F. (2002).** Identification of resistance to common bacterial blight disease on bean genotypes grown in Turkey. *European journal of plant pathology*, 108(8), 811-813.

- 25) **EPPO, (1998).** *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Distribution Maps of Quarantine Pests for Europe No. 283. Wallingford, UK, CAB International.
- 26) **EPPO, (2011).** *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. EPPO Bulletin, 41: 320–328. doi: 10.1111/j.1365-2338.2011.02496.x.
- 27) **EPPO/CABI, (1996) .** *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*. Data Sheets on Quarantine Pests.
- 28) **EPPO/CABI. (1997).** *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. Pages 991-994 in: Quarantine Pests for Europe, 2nd ed. I. M. Smith, D. G. McNamara, P. R. Scott, and H. Holderness, eds. CAB International, Wallingford, UK.
- 29) **Ertugrul, D., & Guven, K. (1998).** Serological Properties of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* Isolates Collected From Eskisehir. Turkish Journal of Biology, 22(2), 189-196.
- 30) **FAO, 2014.** <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- 31) **Ferreira, C. F., Pereira, M. G., Dos Santos, A. D. S., Rodrigues, R., Bressan-Smith, R. E., PioViana, A., & Daher, R. F. (2003).** Resistance to common bacterial blight in *Phaseolus vulgaris* L. recombinant inbred lines under natural infection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Euphytica, 134(1), 43-46.abstract.
- 32) **Fourie, D., Miklas, P., & Ariyaranthe, H. (2005, April).** Mapping three major genes conditioning resistance to six races of the halo blight pathogen in common bean. In World (p. 24).
- 33) **Fourie, D. (2011).** Susceptibility of South African dry bean cultivars to bacterial diseases. African Crop Science Journal, 19(4), 387-392.
- 34) **Fourie, D. (2002).** Distribution and severity of bacterial diseases on dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in South Africa. Journal of Phytopathology, 150(4-5), 220-226. Abstract.
- 35) **Freytag, G. F., & Debouck, D. G. (2002).** Taxonomy, distribution, and ecology of the genus *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionodeae) in North America, Mexico and Central America. Taxonomía, distribución y ecología del género *Phaseolus* (Leguminosae-Papilionodeae) en Norteamérica, México y Centroamérica. SIDA, Botanical Miscellany.
- 36) **Frison, E. A., Bos, L., Hamilton, R. I., Mathur, S. B., & Taylor, J. D. (1990).** Technical guidelines for the safe movement of legume germplasm. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- 37) **Gardan, L., Bollet, C., Ghorrah, M. A., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (1992).** DNA Relatedness among the Pathovar Strains of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* Janse (1982) and Proposal of *Pseudomonas savastanoi* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 42(4), 606-612.

- 38) **Gent, D. H., Lang, J. M., & Schwartz, H. F. (2005).** Epiphytic survival of *Xanthomonas axonopodis* pv. *allii* and *X. axonopodis* pv. *phaseoli* on leguminous hosts and onion. *Plant disease*, 89(6), 558-564.
- 39) **Gilbertson R.L., Maxwell D.P. (1992).** Common bacterial blight of bean. *Plant diseases of international importance. Volume II. Diseases of vegetables and oil seed crops.* [edited by Chaube, H.S.; Kumar, J.; Mukhopadhyay, A.N.; Singh, U.S.] Englewood Cliffs, New Jersey, USA; Prentice Hall, Inc., 18-39.
- 40) **Gilbertson, R. L., Rand, R. E., & Hagedorn, D. J. (1990).** Survival of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic strains of *X. campestris* in bean debris. *Plant Disease*, 74(4), 322-327..Abstract.
- 41) **Gilbertson, R. L., Rand, R. E., Carlson, E., & Hagedorn, D. J. (1988).** The use of dry-leaf inoculum for establishment of common bacterial blight of beans. *Plant disease*, 72(5), 385-389..Abstract.
- 42) **Gnanamanickam, S. S., & Patil, S. S. (1976).** Bacterial growth, toxin production, and levels of ornithine carbamoyltransferase in resistant and susceptible cultivars of bean inoculated with *Pseudomonas phaseolicola*. *Phytopathology*, 66(3), 290-294.
- 43) **González, A. J., Tello, J. C., & Rodicio, M. R. (2005).** Bacterial wilt of beans (*Phaseolus vulgaris*) caused by *Curtobacterium flaccumfaciens* in Southeastern Spain. *Plant disease*, 89(12), 1361-1361.
- 44) **Georghiou, P. R., Hamill, R. J., Wright, C. E., Versalovic, J., Koeuth, T., Watson, D. A., & Lupski, J. R. (1995).** Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital outbreak-associated strains by molecular techniques. *Clinical infectious diseases*, 20(1), 84-94.
- 45) **Grimault, V., Olivier, V., Rolland, M., Darrasse, A., & Jacques, M. A. (2014).** Detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* on *Phaseolus vulgaris* (bean). *International Rules for Seed Testing Annexe to Chapter 7: Seed Health Testing Methods*, (7-021), 7-021.
- 46) **Grondeau, C., Samson, R., & Sands, D. C. (1994).** A review of thermotherapy to free plant materials from pathogens, especially seeds from bacteria. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 13(1), 57-75. Abstract.
- 47) **Gutiérrez-Barranquero, J. A., Carrión, V. J., Murillo, J., Arrebola, E., Arnold, D. L., Cazorla, F. M., & de Vicente, A. (2013).** A *Pseudomonas syringae* diversity survey reveals a differentiated phylotype of the pathovar *syringae* associated with the mango host and mangotoxin production. *Phytopathology*, 103(11), 1115-1129.
- 48) **Hagedorn, D. J., & Inglis, D. A. (1986).** Handbook of bean diseases. A3374.
- 49) **Harley, J. P. (2004).** Laboratory exercises in microbiology. McGraw-Hill Science, Engineering & Mathematics.

- 50) Harveson, R. M., Schwartz, H. F., Urrea, C. A., & Yonts, C. D. (2015). Bacterial wilt of dry-edible beans in the central high plains of the US: past, present, and future. *Plant Disease*, 99(12), 1665-1677.
- 51) Harveson, R. M., & Schwartz, H. F. (2007). Bacterial diseases of dry edible beans in the Central High Plains. *Plant Health Prog.* doi, 10, 1094.
- 52) Harveson, R. M., Schwartz, H. F., and Urrea, C. A. (2011) . Bacterial wilt of dry beans in western Nebraska. NebGuide G05-1562-A (revised). Coop. Ext. Serv., Univ. of Nebr, Lincoln.
- 53) Harveson, R. M., Watkins, J. E., Giesler, L. J., and Chaky, J. L. (2005) . Dry bean disease profiles I (foliar and bacterial diseases). Ext. Circular Series No. EC05-1893, Univ. of Nebr., Lincoln.
- 54) Harveson, Robert M. (2009a)."Bacterial brown spot of Dry Beans in Nebraska."Lincoln Extension publications.
- 55) Harveson, Robert M. (2009b) . "Halo Blight of Dry Beans in Nebraska." Lincoln Extension publications. Retrieved December 16, 2014.
- 56) He, Y. (2010). Improved seed health tests for *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in common bean. Iowa State University.
- 57) Hedges, F. (1922). A bacterial wilt of the bean caused by *Bacterium flaccumfaciens* nov. sp. *Science* (Washington), 55, 433-434. abstract.
- 58) Hiett, K. L., & Seal, B. S. (2009). Use of repetitive element palindromic PCR (rep-PCR) for the epidemiologic discrimination of foodborne pathogens. *Molecular Epidemiology of Microorganisms: Methods and Protocols*, 49-58.
- 59) Hirano, S. S., Baker, L. S., & Upper, C. D. (1996). Raindrop momentum triggers growth of leaf-associated populations of *Pseudomonas syringae* on field-grown snap bean plants. *Applied and environmental microbiology*, 62(7), 2560-2566.
- 60) Hoitink, H. A., Hagedorn, D. J., & McCoy, E. (1968). Survival, transmission, and taxonomy of *Pseudomonas syringae* van Hall, the causal organism of bacterial brown spot of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Canadian journal of microbiology*, 14(4), 437-441..Abstract.
- 61) Huang, H. C., Erickson, R. S., Yanke, L. J., Chelle, C. D., & Mündel, H. H. (2006). First report of the purple variant of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, causal agent of bacterial wilt of bean, in Canada. *Plant Disease*, 90(9), 1262-1262.
- 62) Hulton, C. S. J., Higgins, C. F., & Sharp, P. M. (1991). ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular microbiology*, 5(4), 825-834.

- 63) Ishimaru, C., Eskridge, K. M., & Vidaver, A. K. (1991). Distribution analyses of naturally occurring epiphytic populations of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* on dry beans. *Phytopathology*, 81(3), 262-268.
- 64) Juhi, M., Singh, R. D., Jadon, V. S., & Gausain, M. P. (2010). Assessment of phenolic components and antioxidative activities of *Phaseolus vulgaris* L. *International Journal of Integrative Biology*, 9(1), 26-30.
- 65) Kaiser, W. J., & Vakili, N. G. (1978). Insect transmission of pathogenic *xanthomonads* to bean and cowpea in Puerto Rico. *Phytopathology*, 68(7), 1057-1063.
- 66) Kaluzna, M., Ferrante, P., Sobiczewski, P., & Scortichini, M. (2010). Characterization and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* from stone fruits and hazelnut using repetitive-PCR and MLST. *Journal of Plant Pathology*, 781-787.
- 67) Karavina, C., Mandumbu, R., Parwada, C., & Tibugari, H. (2011). A review of the occurrence, biology and management of common bacterial blight.
- 68) Karavina, C., Tigere, T. A., & Chihya, J. (2008). The contribution of soil and crop debris inocula to the outbreak of bacterial common blight in field beans (*Phaseolus vulgaris* L.) under Zimbabwean conditions. *Journal of Sustainable Development in Africa*, 10(3), 221.
- 69) Khlaif, H. M., & Qadous, N. S. (1995). Common blight of beans in the Jordan Valley: sources of inoculum. *Dirasat. Series B, Pure and Applied Sciences*, 22(3), 717-728. Abstract.
- 70) King, E. O., Ward, M. K., & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of *pyocyanin* and *fluorescin*. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 44(2), 301-307.
- 71) Klement, Z., Farkas, G. L., & Lovrekovich, L. (1964). Hypersensitive reaction induced by phytopathogenic bacteria in tobacco leaf. *Phytopathology*, 54(4), 474-+.
- 72) Komagata, K. & Suzuki, K. (1986). Genus *Curtobacterium* Yamada and Komagata 1972 425AL. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 2, pp. 1313±1317. Edited by P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams & Wilkins.
- 73) Kwon, D. H., El-Zaatari, F. A., Woo, J. S., Perng, C. L., Graham, D. Y., & Go, M. F. (1998). REP-PCR fragments as biomarkers for differentiating gastroduodenal disease-specific *Helicobacter pylori* strains. *Digestive diseases and sciences*, 43(5), 980-987.
- 74) Lamichhane, J. R., Messéan, A., & Morris, C. E. (2015). Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas syringae* species complex. *Journal of general plant pathology*, 81(5), 331-350.

- 75) Legard, D. E., & Hunter, J. E. (1990). Pathogenicity on bean of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* recovered from the phylloplane of weeds and from bean crop residue. *Phytopathology*, 80(10), 938-942.
- 76) Lelliott, R. A., & Stead, D. E. (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Blackwell Scientific Publications.
- 77) Lelliott, R. A., Billing, E., & Hayward, A. C. (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic *pseudomonads*. *Journal of Applied Microbiology*, 29(3), 470-489.
- 78) Liang, L. Z., Halloin, J. M., & Saettler, A. W. (1992). Use of polyethylene glycol and glycerol as carriers of antibiotics for reduction of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in navy bean seeds. *Plant disease*, 76(9), 875-879. Abstract
- 79) Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., & 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.
- 80) Maki, L. R., Galyan, E. L., Chang-Chien, M. M., & Caldwell, D. R. (1974). Ice nucleation induced by *Pseudomonas syringae*. *Applied microbiology*, 28(3), 456-459.
- 81) Makini, F.W., Danial, D.L. (1995). Bean production and constraints in Kenya with emphasis on diseases. Breeding for disease resistance with emphasis on durability. Proceedings of a regional workshop for eastern, central and southern Africa, held at Njoro, Kenya, October 2-6, 1994. 104-109
- 82) Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., ... & Morrison, D. A. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic acids research*, 20(13), 3479-3483.
- 83) Mkandawire, A. B., Mabagala, R. B., Guzmán, P., Gepts, P., & Gilbertson, R. L. (2004). Genetic diversity and pathogenic variation of common blight bacteria (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans*) suggests pathogen coevolution with the common bean. *Phytopathology*, 94(6), 593-603.
- 84) Mohan, S. K., & Schaad, N. W. (1987). An improved agar plating assay for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* and *P. s.* pv. *phaseolicola* in contaminated bean seed. *Phytopathology*, 77(10), 1390-1395.
- 85) Muedi, H. T. (2013). Breeding for resistance to bacterial brown spot of dry bean in South Africa. Doctorat thesis. Faculty of Natural and Agricultural Sciences.
- 86) Mutlu, N., Vidaver, A. K., Coyne, D. P., Steadman, J. R., Lambrecht, P. A., & Reiser, J. (2008). Differential pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains on bean genotypes with common blight resistance. *Plant disease*, 92(4), 546-554.

- 87) Muzquiz, M., Burbano, C., Ayet, G., Pedrosa, M. M., & Cuadrado, C. (1999).** The investigation of antinutritional factors in *Phaseolus vulgaris*. Environmental and varietal differences. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement, 3(4), 210-216.
- 88) Natti JJ., (1969) .** Control of bacterial diseases of bean, Summary report for the W-96 Project Committee Berkeley, California .
- 89) Navarro, F., Skroch, P., Jung, G., & Nienhuis, J. (2007).** Quantitative Trait Loci Associated with Bacterial Brown Spot in L. Crop science, 47(4), 1344-1353..
- 90) Nei, M. (1978).** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89(3):583-590.
- 91) Nei, M and Li, W-H. (1979).** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Genetics.76(10):5269-5273.
- 92) Oguiza, J. A., Rico, A., Rivas, L. A., Sutra, L., Vivian, A., & Murillo, J. (2004).** *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* can be separated into two genetic lineages distinguished by the possession of the phaseolotoxin biosynthetic cluster. Microbiology, 150(2), 473-482.
- 93) Olive, D. M., & Bean, P. (1999).** Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of clinical microbiology*, 37(6), 1661-1669.
- 94) Olivine Industries (Private) Limited: (1998/99) .** Dry Bean Production. Growers Instruction Sheet and Costing Guide. Harare, Zimbabwe.
- 95) Opio, F., & Male-Kayiwa, S. (1994).** The status of bean breeding in Uganda. Breeding for disease resistance with emphasis on durability. In Proceedings of Regional workshop for eastern, central, and southern Africa. Daniel, DL,(Ed). Ministry for Development Cooperation (DGIS), Netherlands (pp. 110-113).
- 96) Osdaghi, E., Alizadeh, A., Shams-Bakhsh, M., & Lak, M. R. (2010).** Evaluation of common bean lines for their reaction to the common bacterial blight pathogen. *Phytopathologia mediterranea*, 48(3), 461-468.
- 97) Osdaghi, E., Pakdaman Sardrood, B., Bavi, M., Akbari Oghaz, N., Kimiaei, S., & Hadian, S. (2015).** First report of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* causing cowpea bacterial wilt in Iran. *Journal of Phytopathology*, 163(7-8), 653-656. abstract.
- 98) Osdaghi, E., Shams-Bakhsh, M., Alizadeh, A., & Lak, M. R. (2010).** Study on common bean seed lots for contamination with *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by BIO-PCR technique. *Journal of Agricultural Technology*, 6(3), 503-513.
- 99) Patil, S. S., Hayward, A. C., & Emmons, R. (1974).** An ultraviolet-induced nontoxigenic mutant of *Pseudomonas phaseolicola* of altered pathogenicity. *Phytopathology*, 64(5), 590.

- 100) Popovic, T., Starovic, M., Aleksic, G., Zivkovic, S., Josic, D., Ignjatov, M., & Milovanovic, P. (2012).** response of different beans against common bacterial blight disease caused by *xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. bulgarian journal of agricultural science, 18(5), 701-707.
- 101) Porch, T. G., & Jahn, M. (2001).** Effects of high-temperature stress on microsporogenesis in heat-sensitive and heat-tolerant genotypes of *Phaseolus vulgaris*. Plant, Cell & Environment, 24(7), 723-731.
- 102) Quigley, N. B., & Gross, D. C. (1994).** Syringomycin production among strains of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*: conservation of the *syrB* and *syrD* genes and activation of phytotoxin production by plant signal molecules. molecular plant microbe interactions, 7, 78-78.
- 103) Ralph, W. (1976).** In: Schwartz HF, Pastor-Corralles MA, eds, Bean Production problems in the Tropics. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- 104) Rico, A., López, R., Asensio, C., Aizpún, M. T., Asensio-S.-Manzanera, M. C., & Murillo, J. (2003).** Nontoxigenic strains of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* are a main cause of halo blight of beans in Spain and escape current detection methods. *Phytopathology*, 93(12), 1553-1559.
- 105) Rodrigues, R., Leal, N. R., Pereira, M. G., & Lam-Sánchez, A. (1999).** Combining ability of *Phaseolus vulgaris* L. for resistance to common bacterial blight. Genetics and Molecular Biology, 22(4), 571-575.
- 106) Sabet, K. A., ISHAG, F., & KHALIL, O. (1969).** Studies on the bacterial diseases of Sudan crops. Annals of applied biology, 63(3), 357-369.
- 107) Saettler AW., (1991) .** Common bacterial blight. In: Hall R, ed. Compendium of Bean Diseases. St. Paul, USA: APS Press, 29-30.
- 108) Saettler, A. W., Cafati, C. R., & Weller, D. M. (1986).** Nonoverwintering of *Xanthomonas* bean blight bacteria in Michigan. Plant disease, 70(4), 285-287.
- 109) Sallam, N. M. (2011).** Biological control of common blight of bean (*Phaseolus vulgaris*) causedby *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* by using the bacterium *Rahnella aquatilis*. Archives of phytopathology and plant protection, 44(20), 1966-1975.abstract.
- 110) Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001).** Laboratory guide for the identification of plant pathogenic bacteria (No. Ed. 3). American Phytopathological Society (APS Press).
- 111) Schaad NW, Stall RE. (1980) .** *Xanthomonas*. In: Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. Schaad, N.M. (ed.). The American Phytopathological Society. APS. Press.St. Paul Minnesota. pp: 81-94.
- 112) Schuster, M. L and Coyne, D. P. (1975).** Survival factors of plant pathogenic bacteria. In: Schwartz, H. F. and Pastor Corrales, M. A. (eds.).Bean Production

Problems in the Tropics. Second edition. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 726 P.

113) Schuster, M. L., & Coyne, D. P. (1974). Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 12(1), 199-221.

114) Schwartz HF,. (1989) . Halo blight. In: Schwartz HF, Pastor-Corralles MA, eds, *Bean Production problems in the Tropics*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

115) Schwartz, H.F., Gent, D.H., Franc, G.D. and Harveson, R.M. (2005) . Bacterial brown spot. Colorado State University Co-operative Extension. [Available on internet] <http://hig.hplainsipm.org/HpIPMSearch/Docs/BacterialBrownSpot-DryBean.htm> [Access date: 06 December 2007].

116) Schwartz, H.F., Gent, D.H., Gary D. Franc and Robert M. Harveson, (2009) . Common Bacterial Blight. http://wiki.bugwood.org/HPIPM:Common_Bacterial_Blight .

117) Singh, S. P., & Munoz, C. G. (1999). Resistance to common bacterial blight among *Phaseolus* species and common bean improvement. *Crop Science*, 39(1), 80-89.

118) Singh, S. P., & Schwartz, H. F. (2010). Breeding common bean for resistance to diseases: a review. *Crop Science*, 50(6), 2199-2223..Abstract.

119) Smith, E. F. (1897). Description of *Bacillus phaseoli* n. sp. *Botanical Gazette*, 24, 192.

120) Snowdon Anna L. (2010) . A Colour Atlas of Post-Harvest Diseases and Disorders of Fruits and Vegetables, Vol.2.vegetables.university of Cambridge.page 112.

121) Steadman, J. R., Maier, C. R., Schwartz, H. F., & Kerr, E. D. (1975). Pollution of surface irrigation waters by plant pathogenic organisms. *Jawra Journal of the American Water Resources Association*, 11(4), 796-804. abstract.

122) Stern, M. J., Ames, G. F. L., Smith, N. H., Robinson, E. C., & Higgins, C. F. (1984). Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell*, 37(3), 1015-1026.

123) Suslow, T. V., Schroth, M. N., & Isaka, M. (1982). Application of a rapid method for Gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. *Phytopathology* (USA).

124) Sutton, M. D., & Wallen, V. R. (1970). Epidemiological and ecological relations of *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans* on beans in southwestern Ontario, 1961–1968. *Canadian Journal of Botany*, 48(7), 1329-1334.

125) Taylor, J. D., Teverson, D. M., Allen, D. J., & PASTOR-CORRALES, M. A. (1996). Identification and origin of races of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* from Africa and other bean growing areas. *Plant Pathology*, 45(3), 469-478..abstract.

- 126) Thornley, M. J. (1960).** The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *Journal of Applied Microbiology*, 23(1), 37-52.
- 127) Tormo, M. A., Gil-Exojo, I., de Tejada, A. R., & Campillo, J. E. (2004).** Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an α -amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *British journal of nutrition*, 92(5), 785-790.
- 128) Trujillo, G. E., & Saettler, A. W. (1980).** liquid semi-selective medium for *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans*.
- 129) Venette, J.R. (1982) .** How bacteria find their hosts. In: *Phytopathogenic prokaryotes*. Mount, M.S. and Lacy, G.H. eds. Academic Press, New York.
- 130) Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, R. (1991) .** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, 19(24), 6823-6831.
- 131) Webster, D. M., Temple, S. R., & Galvez, G. (1983).** Expression of resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in *Phaseolus vulgaris* under tropical conditions. *Plant Disease*, 67(4), 394-396.
- 132) Wieser, M and Busse, H-J. (2000).** Rapid identification of *Staphylococcus epidermidis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50(3):1087–1093.
- 133) Woods, C. R., Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, J. R. (1993).** Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *Journal of clinical microbiology*, 31(7), 1927-1931.
- 134) Young, J. M., & Triggs, C. M. (1994).** Evaluation of determinative tests for pathovars of *Pseudomonas syringae* van Hall 1902. *Journal of Applied Microbiology*, 77(2), 195-207.
- 135) Zanatta, Z. G., Moura, A. B., Maia, L. C., & Santos, A. S. D. (2007).** Bioassay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(3), 511-515.
- 136) Zapata, M., Beaver, J., & Porch, T. (2007).** Foliage, pod and internal seed infection of selected common bean lines when inoculated with two strains of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. *annual report-bean improvement cooperative*, 50, 117.
- 137) Zaumeyer WJ,. (1932) .** Comparative pathological histology of three bacterial diseases of bean. *J. Agric. Res.*, 44:605-632.
- 138) Zaumeyer, W. J., & Rex, H. (1957).** A monographic study of bean diseases and methods for their control. United States Department Of Agriculture; New Delhi.

139) Zaumeyer, W. J., & Rex, H. (1957). A monographic study of bean diseases and methods for their control. United States Department Of Agriculture; New Delhi.

مكان وتاريخ جمع العينة	المادة النباتية	الأعراض الظاهرية	العزلة
محال تجارية 16/3/2015	بذار فاصولياء مالطية	عليها تلون بني محمر	لا يوجد نمو بكتيري
محال تجارية 16/3/2015	بذار فاصولياء تيما رفيعة	عليها تلون بني فاتح	15.2.A
محال تجارية 16/3/2015	بذار فاصولياء بيضاء صنوبرية	عليها تلون بني	لا يوجد نمو بكتيري
محال تجارية 16/3/2015	بذار فاصولياء كلاوي	عليها اصفرار	لا يوجد نمو بكتيري
محال تجارية 16/3/2015	بذار فاصولياء عيشة خانوم حمراء مبرقشة	بذار منكشة	15.6.A 15.6.B
ريف اللاذقية 2015/4/16	اوراق من نباتات في مرحلة تشكل القرون صنف باكر بروزر هولندي	تماوت في طرف الورقة مع اصفرار كما يوجد بقع شاحبة	A.15.9
محال تجارية 16/3/2015	بذار فاصولياء صنوبرية بيضاء	عليها اصفرار	15.7.A 15.7.B
محال تجارية 16/3/2015	بذار فاصولياء عيشة خانوم حمراء مبرقشة	بذار منكشة وضعيفة	15.8.B
الاسواق 3/5/2015	قرون خضراء	عليها بقع مائية و بقع متماوتة بنية اللون	15.14.1 15.14.2 15.14.3
الاسواق 3/5/2015	قرون خضراء	تظهر عليها بقع بنية متماوتة كبيرة الحجم	15.15.1 15.15.2
الاسواق 3/5/2015	قرون خضراء	عليها بقع بنية صغيرة اللون ويقع كبيرة	15.16
الاسواق 4/5/2015	قرون خضراء	يظهر عليها بقع حلقة بنية اللون دائرية صغيرة الحجم	15.17
الاسواق - حمص 10/5/2015	بذور فاصولياء	بذور فاصولياء بلدية صنوبرية بيضاء اللون عليها تلون بني مصفر	15.19
الاسواق - حمص 10/5/2015	قرون خضراء	عليها بقع مائية تغطي معظم سطح القرن	15.20
محال تجارية 12/5/2015	بذور فاصولياء	بيضاء صنوبرية عليها تلون بني واصفرار	15.21
محال تجارية	بذور فاصولياء	بيضاء عليها تلون بني	----
محال تجارية	بذور فاصولياء	كلاوي عريضة عليها تلون بني	----

15.22	كلاوي بلدية وتظهر البذور منكمشة	بذور فاصولياء	محال تجارية 12/5/2015
15.23	بذور فاصولياء مالطية تبدو منكمشة وعليها ولا يظهر عليها اي تلون	بذور فاصولياء	محال تجارية 12/5/2015
15.24	بيضاء صنوبرية منكمشة وعليها اصفرار	بذور فاصولياء	محال تجارية 14/5/2015
15.29.1 15.29.2	يظهر عليها تماوت ويحيط بها هالات صفراء واسعة	عينات اوراق خضراء من الببوت المحمية الصنف فرنسية	طرطوس - اسقبولة 19/5/2015
15.30	يظهر عليها تماوت واصفرار بين عروق الورقة	عينات اوراق خضراء من نفس الموقع ومن بيت محمي ثاني	طرطوس - اسقبولة 19/5/2015
15.31.1 15.31.2	يظهر عليها بقع متماوتة واصفرار وهالات	عينات اوراق خضراء من نفس الموقع وبيت محمي ثالث	طرطوس - اسقبولة 19/5/2015
15.32.A.1 15.32.A.2	يظهر عليها بقع متماوتة صغيرة ويحيط بها هالات صفراء اللون	اوراق خضراء من ببوت محمية	طرطوس - جدية 20/5/2015
15.32.B	يظهر على الاوراق هالات صفراء واسعة واصفرار بين العروق	اوراق فاصولياء من بيت محمي ثاني	
15.32.C.1 15.32.C.2	يظهر عليها بقع حلقية الشكل متماوتة يحيط بها هالات صفراء اللون	اوراق فاصولياء	
15.33.1 15.33.2	يظهر عليها بقع متماوتة صغيرة ويحيط بها هالة ضيقة	اوراق فاصولياء من ببوت محمية	طرطوس - حصين البحر 20/5/2015
15.34.1 15.34.2	يظهر عليها بقع متماوتة عند حواف الورقة وحولها مناطق مصفرة	اوراق فاصولياء	
15.35.1 15.35.2	يظهر عليها بقع حلقية الشكل متماوتة يحيط بها هالات صفراء اللون	اوراق فاصولياء	
لا يوجد نمو بكتيري	يظهر عليها بقع متماوتة واصفرار وهالات صفراء اللون	اوراق فاصولياء	
15.40.1 15.40.2	يظهر عليها اصفرار وتماوت في طرف الورقة	اوراق فاصولياء	
15.42.1 15.42.2	يظهر عليها بقع مائية	قرون فاصولياء المصدر درعا، فرنسية	الاسواق 7/6/2015
15.43.1 15.43.2	يظهر عليها بقع متماوتة من مناطق مختلفة من القرن	قرون فاصولياء المصدر درعا، فرنسية	الاسواق 9/6/2015
15.44	يظهر عليها تحلل على طول غلاف القرن وبقع مائية متصلة مع بعضها البعض	قرون فاصولياء المصدر درعا، فرنسية	الاسواق 9/6/2015
15.45	عليها بقع مائية وبقع متماوتة بنية اللون صغيرة	قرون فاصولياء المصدر درعا، فرنسية	الاسواق 9/6/2015

لم يلاحظ اي نمو بكتيري	يظهر عليها بقع متماوتة محاطة بهالات صفراء اللون	اوراق فاصولياء من نباتات مزروعة ضمن البيت البلاستيكي	كلية الزراعة 30/6/2015
15.47	يظهر عليها بقع متماوتة صغيرة الحجم وغير محاطة بهالات صفراء اللون	اوراق فاصولياء من نباتات مزروعة ضمن البيت البلاستيكي	
15.48.1 15.48.2	يظهر عليها بقع متماوتة في مناطق مختلفة من الورقة وتحيط بها هالات صفراء اللون	اوراق فاصولياء	
لا يوجد نمو بكتيري	تظهر عليها بقع متماوتة محاطة بمناطق صفراء والاوراق مصفرة	اوراق فاصولياء	بساتين مساكن برزة 10/8/2015
15.50	يظهر عليها بقع متماوتة محاطة بهالات صفراء ضيقة	اوراق فاصولياء	
15.51	يظهر عليها مساحات صفراء بين عروق الورقة وتماوت على حواف الاوراق	اوراق	ريف القنيطرة 6/9/2015
15.52.1 15.52.2	يظهر عليها بقع متماوتة وتحيط بها هالات صفراء اللون	اوراق	
15.53	يظهر عليها بقع متماوتة محاطة بهالات صفراء اللون	اوراق	
15.54	يظهر عليها اصفرار بين عروق الورقة	اوراق	ريف درعا 7/9/2015
15.55.1 15.55.2	يظهر عليها بقع متماوتة محاطة بهالات صفراء اللون	اوراق	
15.56.1 15.56.2	يظهر عليها بقع متماوتة صغيرة الحجم ويوجد اصفرار بين عروق الورقة	اوراق	
15.57	يظهر عليها بقع متماوتة في الورقة وتحيط بها هالات	اوراق	
15.58	يظهر عليها بقع متماوتة مع اصفرار طولي بين العروق	اوراق	
15.59	يظهر عليها بقع متماوتة واصفرار حول البقع	اوراق	
15.60	عليها بقع متماوتة واصفرار بين عروق الورقة	اوراق	
15.61.1 15.61.2	يظهر عليها اصفرار بين عروق الورقة مع بقع متماوتة وهالات صفراء اللون تحيط بها	اوراق	ريف درعا 13/9/2015
15.62.1 15.62.2	يظهر عليها بقع بنية اللون متماوتة ويحيط بها هالات صفراء	اوراق	
15.63.1 15.63.2 15.63.3	تظهر عليها بقع متماوتة كثيرة العدد وصغيرة الحجم وتغطي كامل سطح الورقة	اوراق	طرطوس 20/10/2015
15.64.1 15.64.2 15.64.3	يظهر عليها بقع متماوتة صغيرة الحجم جدا وتحاط بهالات صفراء صغيرة	اوراق	
15.67.1 15.67.2	تظهر عليها بقع متماوتة صغيرة الحجم وتحاط بهالات صفراء صغيرة تنتشر على كامل سطح	اوراق	صافيتا - م.فائق

	الورقة		22/10/2015
15.73.1 15.73.2	يظهر عليها بقع متماوتة وتحيط بها هالات ضيقة	اوراق	
15.74.1 15.74.2	عليها بقع صغيرة متماوتة على كامل سطح الورقة	اوراق	
15.75.1 15.75.2	تظهر عليها بقع متماوتة والبذور التي بداخل القرون عليها تلون بني مصفر	قرون (الصنف فرنسية)	الاسواق 9/11/2015
15.76.1 15.76.2	عليها بقع متماوتة غائرة بنية اللون	قرون (الصنف فرنسية)	
15.79	يظهر تماوت على شكل نقط	اوراق	درعا 22/11/2015
لم يلاحظ اي نمو بكتيري خلال 96 ساعه	يظهر عليها تلون بني خفيف وبعض البذور منكشحة	بذار	الاسواق 4/3/2016
16.2	يظهر عليها تلون بني واصفرار	بذار	
16.3.1 16.3.2	عليها اعراض تلون واضح يشبه بإصابتها بمرض بكتيري	بذار	
16.4.1.s 16.4.1.k 16.4.2	عليها بقع مشبعة بالماء	قرون	الاسواق 7/4/2016
16.5	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء	قرون	
16.6	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء متصلة مع بعضها	قرون	
16.7.1 16.7.2 16.7.3	يظهر عليها بقع مائية تنتشر على طول غلاف القرن	قرون	
16.8	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء	قرون	
16.9	يظهر على القرون تحلل على طول غلاف القرن ويقع مائية متصلة	قرون	
16.10	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء	قرون	
16.11.1 16.11.2	يظهر عليها بقع مائية صغيرة وكبيرة الحجم	قرون - فرنسية المصدر حمص	سوق الهال القديم - 4/5/2016
16.12.1 16.12.2	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء	قرون	
16.13	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء	قرون	
16.14	يظهر عليها بقع مائية تنتشر على طول غلاف القرن	قرون	
16.15	تنتشر عليها بقع مائية تغطي كامل سطح القرن	قرون	
16.16	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء	قرون	
16.17	يظهر عليها بقع بنية صغيرة الحجم	قرون	
16.19	تظهر على القرون بقع مشبعة بالماء ومنتشرة بشكل كبير على غلاف القرن	قرون - فرنسية المصدر حمص	سوق مساكن برزة 23/5/2016
16.20	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء	قرون	

16.21	تظهر على القرون بقع مشبعة بالماء ومنتشرة بشكل كبير على غلاف القرن	قرون	
16.22.1 16.22.2	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء ويقع بنية اللون صغيرة	قرون	
16.23	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء	قرون	
16.24	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء وافرازات بكتيرية جافة على سطح القرون	قرون	سوق مساكن برزة 26/5/2016
16.25	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء وافرازات بكتيرية جافة على سطح القرون	قرون	
16.26	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء وافرازات بكتيرية على شكل قشور جافة	قرون	
16.27.1 16.27.2	يظهر عليها بقع بنية اللون صغيرة الحجم غائرة في القرن	قرون	
16.28	تظهر عليها بقع مائية وافرازات بكتيرية واضحة بيضاء كريمية	قرون	
16.29	يظهر عليها بقع مائية صغيرة الحجم واخرى كبيرة الحجم	قرون	
16.31	يظهر على القرون جروح غائرة بنية اللون	قرون	سوق مساكن برزة 29/5
16.32	تظهر عليها بقع مشبعة بالماء وتحتضن في بيئة LPGA ثم يتم تحضير معلق بكتيري من المزرعة	قرون	
16.33	يظهر عليها بقع مشبعة بالماء ، يحضن في طبق بتري يحتوي على وسط LPGA	قرون	
16.34	يظهر عليها بقع مائية ويقع بنية اللون صغيرة الحجم	قرون - فرنسية المصدر الساحل	سوق مساكن برزة 2/6/2016
16.35	عليها جروح بنية غائرة في غلاف القرن	قرون	
16.37	يظهر عليها بقع مائية	قرون - فرنسية المصدر طرطوس	سوق الهال القديم 7/6/2016
16.38	يظهر عليها بقع مائية وعليها افرازات بكتيرية بيضاء كريمية	قرون	

ملحق(1) نوع العينات ومصادر جمعها

Abstract

This study was conducted in order, to investigate some bacterial pathogens on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants in different regions of Syria, to isolate and to identify these pathogens using biochemical tests, and to evaluate the susceptibility of some locally grown cultivars.

Survey the coastal region and the countryside of Damascus and some markets during the years 2015-2016 shows the presence of like bacterial symptoms on beans .

A total of 125 isolates were obtained; twenty of their which isolate from bods were pathogene of bean .

Based on morphological Characters and biochemical tests,nineteen isolate were *pseudomonas savastanoi pv phaseolicola* and one isolate identified as *Xanthomonas axonopodis pv. Phaseoli* .

Five locally cultivated varieties were planted in green house under natural conditions; for evaluate their susceptibility to these isolates; The inoculation was carried out by spraying bacterial suspensions (10^8 cfu/ml) on leaves of 15-days- old plants; the results showed different degrees of susceptibility between cultivars and different degrees of aggressivity between isolates. The Italian sais blue lake cultivar was the most was resistant and the isolate *psp7.1.1* was the most aggressive.

The genetic relationship among these isoates was evaluated using REP-PCR technique in comparison with Xcc (*X.campestris pv. Campestris*) and pss (*Pseudomonas savastanoi pv savastanoi*) .The results of the electricphoresis showed the existence of 26 distinct bands with size ranged from 111 to 3000 bp. The similarity matrix was calculated using POPGENE 1.32 programme; The similarity between pseudomonas isolates ranged between 73% -100% and similarity with *Xanthomonas* isolates ranged from 42% to 61%.

The phylogenetic tree was constructed using Treecon 1.3programe and Neighbor joining method; the phylogenetic tree was divided to two clusters, one of them regroup pseudomonas isolates which distributed to nine genotypes, and the other regroup *Xanthomonas* isolates.

Damascus University
faculty of Agriculture
Plant Protection Department



Isolation and identification of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) bacterial pathogens in Syria and susceptibility evaluation of some cultivated varieties to infection

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

presented by

Ghassan Albeda

Teaching Assistant - Al-Furat University

Supervisor

Dr. M. ABU GHORRAH

Faculty of agriculture

co-supervisor

Dr. Aïda Jalloul

Faculty of agriculture

2017