

التوصيف الجزيئي لبكتيريا *Pseudomonas Savastanoi* pv. *Savastanoi* المعزولة من نبات الأس الشائع *Myrtus communis* L.

سارة حامد* د. ميساء الجودة** د. محمود أبو غرة***

الملخص

تم توصيف 10 عزلات من البكتيريا التي تم عزلها من 22 عينة ورمية جُمعت من جنبات الأس الشائع *Myrtus L. communis* والتي تظهر عليها أعراض الإصابة بمرض سل الزيتون olive knot disease بشكل طبيعي، وذلك من عدة مناطق من محافظتي اللاذقية وطرطوس. تم استخدام عدد من الاختبارات الحيوية الكيميائية LOPAT واختبار إنتاج الصبغة الوميضة على وسط King B كما تم استخدام تقانة PCR بهدف الكشف عن وجود المورثات *ptz* و *Iaal*. نتيجة لدراستنا، تؤكد الدراسة على أن البكتيريا المسببة للأورام على نبات الاس هي نفسها العامل المسبب لمرض سل الزيتون *Pseudomonas Savastanoi* pv. *Savastanoi*. كما كان اختبار PCR أكثر موثوقية بإثبات هوية الجراثيم في حين لم تكن الاختبارات الأخرى كإنتاج الصبغة الوميضة على وسط King B وبعض الاختبارات الحيوية الكيميائية المطبقة حاسمة بإثبات هوية جراثيم سل الزيتون *Olea sp.*

الكلمات المفتاحية: *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*، الأس، وسط King B، *Iaal*، *Ptz*، سل الزيتون.

* طالبة ماجستير، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

** الأستاذة المشرفة، قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، سورية.

*** لمشرف المشارك، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق.

Molecular characterization of *pseudomonas Savastanoi* pv. *Savastanoi* isolated from *Myrtus communis* L.

S- Hamed* Dr. M- Al joudah** Dr. M- Abo Gherra***

Abstract

Ten strains of bacteria were isolated from 22 tumoral samples collected from naturally infected *Myrtus communis* L. trees from across many locations in Latakia and Tartus. The bacteria was characterized by using a number of biochemical tests (LOPAT), fluorescent dye production on King B medium, and PCR technology to detect the presence of *ptz* and *Iaal* genes. As a result of our study, the bacteria isolated from *Myrtus communis* L. nodules was confirmed as *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*, the causative agent of olive knot. The PCR test was also more reliable in establishing the identity of the bacteria, while other tests such as fluorescent dye production on King B medium and biochemical tests were not conclusive in establishing the identity of the olive knot bacteria.

Key words: *Pseudomonas savastanoi* pv *Savastanoi* , *Myrtus communis* L. , King B , *IAAL* , *PTZ*, Olive Knot.

* Master student, Department of Plant Biology- Faculty of Sciences- Damascus University- Syria,

** Supervisor. Department of Plant Biology- Faculty of Sciences- Damascus University- Syria,

***Associate Supervisor. Pant Protection Department – Faculty of Agriculture- Damascus University- Syria.

1. المقدمة:

تعد بكتيريا (*PVS*) *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* العامل المسبب لمرض سل الزيتون Olive Knot الذي يصيب أشجار الزيتون *Olea sp.* مسبباً لها أضراراً جسيمة تنتهي بموت الشجرة لدى تطور الإصابة. تصيب هذه البكتيريا نباتات أخرى قد تكون تابعة للفصيلة الزيتونية *Oleaceae* مثل الدردار *Fraxinus sp.* أو لفصائل نباتية أخرى كالرمان *Punica granatum* والدفلة *Nerium oleander* (أبو غرة، 2004؛ وعيسى، 2010) وكذلك فقد تم تقديم نبات الرميميم السوري *Fontanesia phillyreoides* كمضيف جديد لسلاسل البكتيريا لأول مرة في دراسة أجريت في تركيا اعتماداً على تضخيم المورثتين *iaaL* و *Ptz* (Mirik et al., 2011).

تختلف أعراض الإصابة باختلاف المضيف، فبينما تظهر أعراض المرض على الزيتون على شكل أورام tumors أو عقد galls أو درنات knots غير منتظمة على الأغصان والفروع الفتية فقط، ونادراً ما تظهر على الأوراق أو الجذور (Varvaro & Surico, 1978)، تكون الأعراض على نبات الدردار على شكل بقع أو تقرحات على الأوراق والأغصان فقط دون تشكل الأورام (Iacobellis et al., 1998) تكون جراثيم (*PVS*) عسوية سالبة الغرام -Gr، هوائية، متحركة بواسطة واحد إلى أربعة سياط، تنمو في درجات حرارة تتباين من 5 إلى 35 °C والدرجة المثلى لنموها 23-26 °C. تُصنّف الجرثومة تبعاً لدليل Bergey's (Garrity et al., 2005) كما يلي:

Domain	Bacteria.
Phylum	Proteobacteria.
Class	Gammaproteo bacteria.
Order	Pseudomonadales.
Family	Pseudomonadaceae.
Genus	<i>Pseudomonas</i> .
Species	<i>Pseudomonas savastanoi</i> .
Sup-species	<i>Pseudomonas savastanoi</i> pv. <i>Savastanoi</i>

حددت دراسات كثيرة هوية هذه الجراثيم الممرضة اعتماداً على الطرائق التقليدية و لزمن طويل وأهمها زراعة البكتيريا على وسط King B، حيث تعطي صبغة وميضة لدى تعرضها للأشعة فوق البنفسجية (king *et al.*, 1954) متبوعة باختبار المقدرة الامراضية للجراثيم المعزولة، وأيضاً الاختبارات الحيوية الكيميائية وأهمها مجموعة اختبارات LAPOT (Lelliott *et al.*,) 1966. أما عن الاختبارات المصلية والمناعية المطبقة لتحديد هوية *PVS* فكان أهمها تفاعلات التراص الدقيق Microagglutination أو اختبار الانتشار المناعي Immunodifusion (Wilson and Magie , 1963; Ouchterlony, 1948); Abou Ghorrah, 1988; ; Smidt and kosuge, 1978; أبو غرة، 2004). إلا أنه مع التطور السريع لتقانات البيولوجية الجزيئية فقد تم اعتماد اختبارات التفاعل التسلسلي للبوليمراز (PCR) Polymerase chain reaction بهدف تضخيم المورثات المسؤولة عن تشكيل الورم *iaaM* و *iaaH* و *iaaL* والمميزة لجراثيم سل الزيتون (Hijazin and Khlaif, 2005; palm *et al.* , 1989; Penyalver *et al.* , 2000; Cinelli *et al.*, 2013; حيث ترمز هذه المورثات الأنزيمات-2 Tryptophan Indolacetamide hydrolase و monooxygenase و IAA-Lysinsynthethase التي تتوسط التفاعلات الكيميائية التي تنتج حمض الأندول الخلي وكذلك المورثة (*ipt* أو *ptz*) التي ترمز إنزيم Isopenetenyl transferase الذي يتوسط تفاعلات تشكيل هرمون السيبتوكينين. (Smidt and Kosuge 1978; Comai and Kosuge 1982; Surico *et al.* 1985).

محلّيًا، تم تحديد هوية هذه الجراثيم الممرضة لنباتات الزيتون والاس والدفلة والدردار من محافظتي طرطوس واللاذقية اعتماداً على الطرق الكيميائية الحيوية والمصلية المناعية متبوعة باختبارات المقدرة الإراضية للعزلات على المضيفات المختلفة (أبو غرة، 2004، وعيسى ، 2010) كما تم التوصيف الجزيئي لهذه البكتيريا الممرضة لسلاسل معزولة من الزيتون *Olea sp.* والياسمين الأصفر *Jasminum humile* في عدة محافظات سورية (الحنفي والجودة 2018، عجور والجودة 2020). لكن وعلى الرغم من خطورة المرض ومن الآثار الوخيمة

المتوقعة نتيجة لانتشاره السريع لا سيما في السنوات الأخيرة، ليس فقط إلى نباتات الزيتون وإنما إلى مضيفات نباتية أخرى منها نباتات ذات أهمية اقتصادية هامة كالرمان او نباتات أخرى تعد نواقل هامة للمرض تساهم بسرعة انتشاره كنبات الزينة الياسمين الأصفر ذو القيمة الجمالية (عجور والجودة ، 2020)، فإننا نجد قلة بالدراسات المحلية لتوصيف البكتريا من مضيفات أخرى غير الزيتون لاسيما على المستوى الجزيئي. لهذا فإن أهمية هذا البحث تعود لاعتماد المعيار الجزيئي بهدف توصيف الجراثيم المسببة لمرض سل الزيتون على نبات الأس الشائع *Myrtus communis* الذي ينتمي إلى الفصيلة الآسية *Myrtaceae* والذي يمتلك أهميته طبية وغذائية كبيرة حيث يستعمل كمضاد حيوي ولعلاج سوء الهضم وله دور قابض للأوعية الدموية ومطهر فيستعمل في علاج الجروح بالإضافة لاستعمال بذوره كتوابل بعد تجفيفها وطحنها (Marzieh et al, 2014)، إضافة إلى قيمته الجمالية والمعنوية للسوريين لا سيما أماكن زراعته في المناطق الساحلية.

مواد وطرائق البحث:

1. جمع العينات:

تم جمع عينات من أشجار الأس الشائع حيث تظهر على الأغصان عقد ورمية فتية طبيعياً وذلك من عدة مناطق في اللاذقية وطرطوس خلال الفترة الزمنية (2017-2019) ليكون المجموع الكلي للعينات 22 عينة ورمية. تم تسجيل كافة البيانات الخاصة بكل عينة، ليتم حفظ العينات في أكياس بلاستيكية ونقلها للمختبر لدراستها.

2. عزل الجراثيم:

تم كخطوة أولى تعقيم العقد الورمية من كل عينة خارجياً وذلك بغسلها بالماء المقطر والمعقم، ثم غسلها سطحياً بالكحول الايتيلي 70 % ليتبع غسلها مجدداً بالماء المقطر والمعقم عدة مرات. تم بعد ذلك إزالة الطبقة السطحية من الورم وتقطيعه بواسطة مشرط معقم ليوضع في 5 مل ماء مقطر معقم لمدة نصف ساعة مع الرج. تمت زراعة 100 µl من السائل ونشره على أطباق بتري تحوي الأغار المغذي Nutrient agar وحضنت في درجة حرارة 26 درجة

مئوية لمدة 48 ساعة. تم اختيار المستعمرات التي تبدي مواصفات شكلية نموذجية (مستعمرات بيضاء كريمية اللون مسطحة وناعمة) وأعطى لكل مستعمرة رقماً يدل عليها ليتم حفظها في وسط مغذي Nutrient Broth والجليسيرول وحفظها في درجة حرارة -20 درجة مئوية.

3. التوصيف المورفولوجي والحيوي الكيميائي للجراثيم المعزولة:

بعد الحضانة، تم التوصيف المورفولوجي لجميع المستعمرات النامية على أوساط الأغار المغذي Nutrient agar (Himedia, Mumbai, India) من حيث شكل المستعمرات ولونها ونمط الحواف ولزوجتها. ليتم بعدها تطبيق تلوين غرام والفحص تحت المجهر الضوئي. كما تمت زراعة العزلات على وسط King B agar (SIFIN, Berlin, Germany). تم تطبيق بعض الاختبارات الحيوية الكيميائية LOPAT المستعملة مرجعياً في توصيف السلالات وهي اختبار إنتاج الليفان Levan production، اختبار الأوكسيداز Oxidase، اختبار تحليل البكتين Potato soft rot، اختبار الحساسية المفرطة hypersensitivity على نبات التبغ Tabacum sp.

4. التوصيف الجزيئي للجراثيم:

تم توصيف السلالات المعزولة وتأكيد هويتها بالكشف عن وجود المورثتين المسؤولتين عن إنتاج حمض الأندول الخلي IaaL والسايكوكينات Ptz باستخدام أزواج من المرئسات الخاصة بكل مورثة (Penyalver et al., 2000; Moretti et al., 2008) (الجدول 1). وذلك بالاعتماد على إجراء تفاعل البلمرة المتسلسل PCR.

تم كخطوة أولى استخلاص DNA الجينومي للسلالات المعزولة باستخدام الطريقة الملحية حيث تم بالبداية تفكيك الجدار الخلوي للبكتيريا باستعمال محلول (EDTA 0.5، SDS 10%)، M، Tris HCl 1M) ثم ترسيب الدنا باستعمال الايزوبرانول البارد ثم الكحول 70%، ليتم حل DNA بـ 100 ميكروليتر من الماء و يحفظ في الدرجة -20 درجة مئوية لحين الاستخدام. تمت المعايرة الكمية والنوعية للدنا باستخدام مقياس نانو دروب (Nano Drop Spectrophotometer (Optizen-Korea) .

تم أخذ 50 نانوغرام من DNA المستخلص لإجراء تفاعل البلمرة المتسلسل Polymerase chain reaction وذلك باستخدام ReadyMix PCR kit (Kapa Biosystems). تم استخدام 10 μ M من كل برايمر و5 وحدات من أنزيم البوليميراز وذلك ضمن حجم نهائي 25 ميكروليتر للتفاعل. أجري التفاعل ضمن جهاز Genpro (BIOER) Thermal cycler واتباع البرنامج التالي:

5 دقائق على الدرجة 95°C يليها 35 دورة مؤلفة من 3 مراحل 94°C لمدة 30 ثانية يليها 69°C لمدة 45 ثانية لمورثة *iaaL* و54°C لمدة 45 ثانية لمورثة *ptz* ثم 72°C لمدة 50 ثانية يلي الدورات مرحلة الاستطالة النهائية 72°C لمدة 5 دقائق. تم ترحيل وفصل نواتج التفاعل على هلامة الأغاروز بتركيز 1% والملونة بملون Ethidium bromide في محلول 1X TBE buffer (Tris_Boric acid_EDTA) وباستخدام شدة فولتية بمقدار 100 v لمدة 35 دقيقة ثم جرى توثيق وتصوير الهلامات لرؤية العصابات الناتجة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية بجهاز (MicDoc cleaver).

الجدول 1: تسلسل المرئسات الخاصة بالمورثتين *iaaL*, *ptz*

<i>iaaL</i>	Forword	5'- GGCACCAGCGGCAACATCAA-3'	pb454
	Reverse	5- CGCCCTCGGAACTGCCATAC-3'	
<i>Ptz</i>	Forword	5'- TTATTCTTGAGGGGGGGTTC-3'	pb251
	Reverse	5'- CGATATCCGTCAATATCTT-3'	

النتائج والمناقشة:

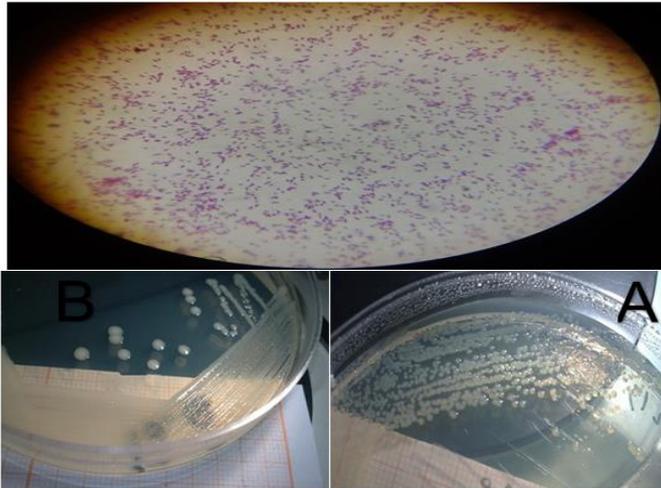
تم الحصول على 10 عزلات بكتيرية من أصل 22 عينة ورمية تم جمعها من جنبيات مصابة بشكل طبيعي من محافظتي اللاذقية وطرطوس، ويعزى عدم الحصول على عزلات من باقي العينات لوجود إصابات فطرية فيها أو كونها هرمة متخشبة. لاحظنا من خلال دراسة الصفات الخارجية للأورام اختلافاً واضحاً في أحجامها إلا أنها كانت عقد نظامية متجانسة شكلياً حيث

كانت جميعها كروية لونها بني، ومن حيث توزيعها كانت جميع العينات من الأغصان تحمل عقداً متباعدة وغير متجمعة على الفروع الجانبية. (الشكل.1).



الشكل.1: صورة توضح شكل بعض الأورام على عينة من نبات الآس الشائع.

وفقاً للمعيار المورفولوجي، ظهرت على وسط الأغار المغذي مستعمرات بكتيرية كروية محدبة منتظمة الحواف لماعة، إلا أننا وجدنا عدة أنماط لونية وهي كريمية شفافة وبيضاء كريمية كما تباينت أحجامها. تم تنقيتها وعند دراستها كانت جميعها بكتيريا عصوية قصيرة سالبة صبغة غرام (الشكل.2).



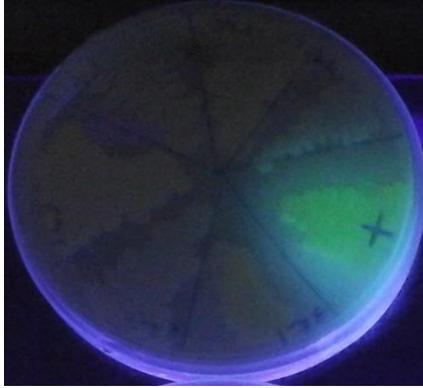
(الشكل.2): يوضح نتائج التوصيف المورفولوجي وتكوين غرام لبعض العزلات: أ. بكتيريا عصوية سالبة الغرام.

ب. المستعمرات الكريمية الشفافة لبكتيريا على وسط **Nutrient Agar**:

B - مستعمرات بيضاء كريمية

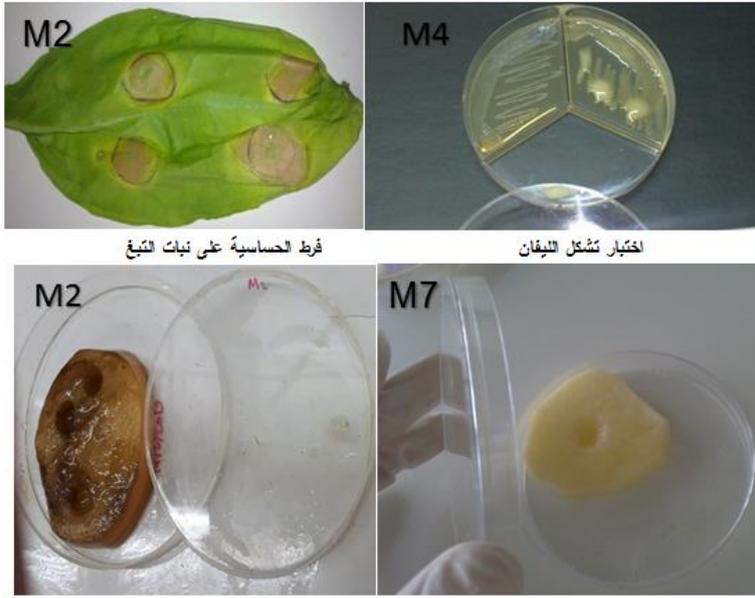
A - مستعمرات كريمية شفافة

لم تبد العزلات العشرة المدروسة مقدرة على إنتاج للصبغة الوميضة المميزة لجراثيم PVS بعد فحصها تحت الأشعة فوق البنفسجية، حيث أثبت اختبار King B هوية عزلة واحدة فقط من بين العزلات العشرة (الشكل.3).



(الشكل.3) : نتائج الصبغة الوميضة على وسط King B لبعض العزلات حيث توهجت مستعمرة واحدة فقط تحت UV وهي M8 وهي فقط الإيجابية للاختبار.

اختلفت نتائج الاختبارات الحيوية الكيميائية بشكل واضح بين العزلات (الجدول. 2) فقد أثبت اختبار الأوكسيداز هوية 9 عزلات إذ لم تتأكسد البكتريا وتغير لونها للبنفسجي فكانت سالبة اتجاه الاختبار. في حين أثبت اختبار تحلل البكتين هوية ثلاث عزلات فقط حيث لم تبدي تحللاً في أنسجة درنات البطاطا بعد حقنها بـ 24 ساعة أي كانت سلبية للاختبار، وأثبت اختبار تشكل الليفان هوية 6 عزلات لم تتحول إلى مستعمرات لزجة على الوسط أي سالبة الاختبار، في حين أثبت اختبار فرط الحساسية على نبات التبغ هوية العزلات العشرة فقد سببت تماوت أنسجة أوراق التبغ مكان الحقن بعد 24 ساعة (الشكل.4).



فطر الحساسية على نبات التبغ

اختبار تشغل الليفان

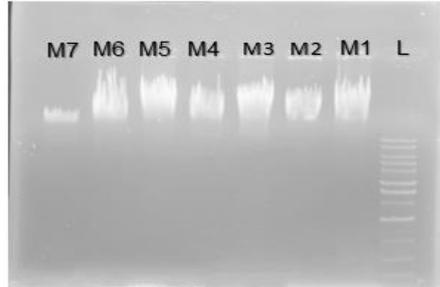
اختبار تحلل البكتين

الشكل 4: نتائج بعض الاختبارات الحيوية الكيميائية لبعض العزلات المدروسة:
أ- اختبار إنتاج الليفان: M8 إيجابية ب- فطر الحساسية على نبات التبغ: M2 إيجابية للاختبار
ج- تحلل البكتين: M7 سلبية و M2 إيجابية للاختبار.

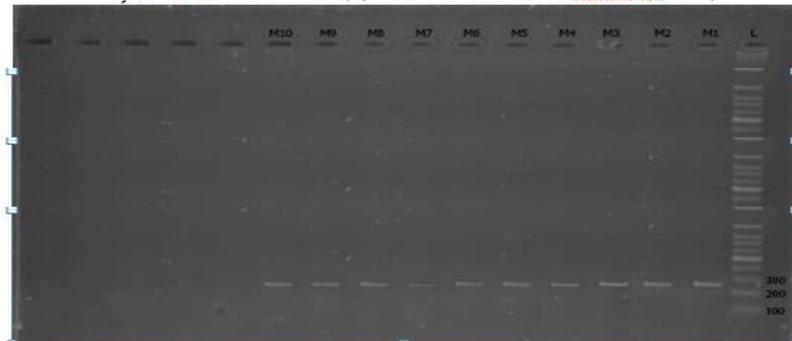
الجدول 2 نتائج جميع الاختبارات المطبقة على العزلات العشرة لتوصيف بكتيريا *P. savastanoi*

الاختبار	عدد العزلات	العزلات المشبّهة الهوية على أنها <i>PVS</i>
الاختبار المورفولوجي	7	M1, M4, M5, M6, M7, M9, M10
	3	M2 , M3 , M8
تلوين غرام	10	M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10
اختبار وسط <i>King B</i>	1	M8
الاختبارات الحيوية	9	M1, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10
	6	M2, M3, M5, M7, M8, M10
الاختبارات الكيميائية	3	M1, M3, M7
	10	M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10,
اختبار <i>PCR</i>	10	M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10
	10	M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, M9, M10

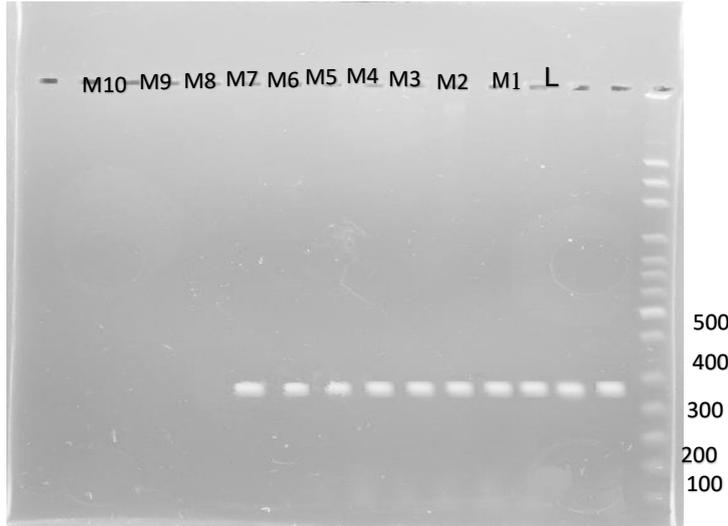
تم تأكيد هوية العزلات العشرة على أنها PVS وذلك اعتماداً على المعيار الجزيئي من خلال الكشف عن وجود المورثتين *iaal* و *ptz* معاً في عينات الـ DNA المستخلص من البكتيريا (الشكل.5) بتطبيق اختبار PCR.



(الشكل.5): gDNA نعد من السلالات المعزولة Ladder 1kb(L) المقياس المعياري



الشكل 6: نتائج تضخيم المورثة PTZ (pb251) من عينات الدنا الجينومي للعينات العشرة والبئر 1 هو المقياس المعياري Ladder 100pb



الشكل 7 مورثة IAAL (454pb) من عينات الدنا الجينومي للعينات العشرة والبئر 1 هو المقياس المعياري Ladder 100pb

تم في دراستنا هذه توثيق الإصابة على نبات الأس الشائع لأول مرة باستعمال تقانة الـ PCR إلى جانب الاختبارات الحيوية الكيميائية. سبق وأن قدمت دراسة محلية نبات الأس كمضيف جديد لجراثيم *P. Savastanoi Pv Savastanoi* بالاعتماد على الاختبارات الحيوية الكيميائية والمصلية فقط (أبو غرة، 2004) وبالاعتماد على الاختبارات الحيوية الكيميائية فقط (عيسى، 2010). كما وثقت دراسات عديدة هوية جراثيم *P. savastanoi* اعتماداً على اختبارات LOPAT لعالمية (Alvarez et al., 1998; Garrity et al., 2005; Lelliott et al., 1966). أما في دراستنا فقد أبدت هذه الاختبارات تبايناً كبيراً فيما بينها فبينما كانت العزلة M4 مثلاً سالبة للأوكسيداز وُحُددت بناء على الاختبار انها جراثيم سل زيتون لم تثبت باقي الاختبارات الحيوية هويتها وبالتالي لم تكن الاختبارات الحيوية الكيميائية حاسمة بتحديد هوية الجراثيم. في حين أثبت اختبار PCR هوية العزلات جميعها. فبالرغم من كلفتها المادية الأكبر نسبياً إلا أنها الأكثر حساسية ودقة في تحديد هوية الجراثيم وهذا ما أكدته دراسات محلية أخرى (الحنفي

والجودة، 2018) و دراسات في اسبانيا وإيطاليا والأردن حيث أكدت على أهمية الاختبارات الجزيئية، وبينت أن اختبار PCR أكثر حساسية بالكشف عن جراثيم سل الزيتون من الاختبارات الحيوية الكيميائية من جهة، كما أنه أقل تعقيداً من الاختبارات التقليدية التي تعتمد على عزل الجراثيم من الورم وزراعتها على الأوساط المغذية، تم تطبيق هذه الاختبارات الجزيئية للكشف عن النباتات المصابة التي لا تبدي أعراضاً ورمية وذلك بتطبيقها على عينات مأخوذة من ساق الأشجار مباشرة (Penyalver *et al.*, 2000; Saba and Al-Gharaibeh, 2008; Cinelli *et al.*, 2013).

بين (Hijazin and Khalif, 2005) أن فعالية وحساسية اختبار PCR في الكشف عن وجود المورثة IaaL بلغت 90% بينما كانت 55% بالنسبة لاختبار إنتاج الصبغة الوميضة على وسط King B، وبالتالي فقد كان الاختبار الجزيئي أكثر حساسية بالكشف عن الجراثيم *P. savastanoi*. كما أكدت (الحنفي والجودة، 2018) أن المعيار الجزيئي كان أكثر فعالية بالكشف عن جراثيم سل الزيتون من معيار النمو على الوسط King B والمعيار الكيميائي الحيوي بالرغم من تعدد اختباره وذلك اعتماداً على اختبارات الإحصاءات التشخيصية Diagnostic statistics، حيث أظهر وسط الكينغ B أقل قيمة حساسية Sensitivity في تحديد هوية الجراثيم وهي 15%، بينما أبدى كل من اختبار إرجاع الأرجنين والأوكسيداز واللوфан قيم حساسية 17.5%، 65% و 75% على الترتيب أقل من حساسية اختبار PCR التي كانت 100%. أما بالنسبة لاختبار فرط الحساسية على نبات التبغ فقد اثبت أن جميع العزلات المدروسة هي *P. savastanoi* الا أنه يحتاج إلى وقت طويل نسبياً وجهد كبير.

وبالنتيجة، لم يكن اختبار إنتاج الصبغة الوميضة والاختبارات الحيوية الكيميائية المطبقة في دراستنا حاسمة بإثبات هوية جراثيم سل الزيتون فقد أبدت تبايناً واضحاً في نتائج الاختبارات المختلفة ولذلك لم تكن هذه الاختبارات ذات موثوقية، قد تعزى هذه الاختلافات في حساسية الاختبارات الحيوية الكيميائية والجزيئية بالكشف عن هوية البكتريا إلى الاختلافات الوراثية بين العزلات المدروسة، نتيجة للتنوع الوراثي الذي يعود إلى الدور الكبير الذي تلعبه الطفرات

المتكررة لدى البكتيريا إضافة الى التأثير المحتمل للنقل الأفقي للحينات عند الجراثيم أو تبعاً للتوزع الجغرافي للعزلات.

الاستنتاجات:

1. جراثيم *pvs* تسبب أعراض مرض سل الزيتون على نبات الآس الشائع.
2. اختبار *pcr* أكثر دقة من الاختبارات الحيوية الكيميائية واختبار الصبغة الوميضة الذي اعتمد لفترة زمنية طويلة في توصيف جراثيم *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi*.

التوصيات:

- 1- إجراء عدوى اصطناعية على نبات الآس والتأكد من المقدرة الإمراضية للعزلات التي أبدت مواصفات نموذجية.
- 2- إجراء عدوى اصطناعية متصالبة مع مضيفات أخرى مثل الزيتون والرمان والياسمين بالإضافة للآس.
- 3- دراسة العلاقة الوراثية بين العزلات المختلفة وتنوعها الوراثي.

المراجع العربية:

- أبوغرة، محمود. (2004). تعريف البكتريا *pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* المعزولة من نبات الأس *Myrtu communis* في سوريا. جامعة دمشق، مجلة العلوم الزراعية، مجلد 20، عدد 1 ص 175-179.
- الحنفي، كوثر (2018). مقارنة نوعية وحساسية بعض الاختبارات الجزيئية والحيوية الكيميائية في الكشف عن العامل المسبب لمرض سل الزيتون في سورية، مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية.
- عجور، إيهاب (2020). الياسمين الأصفر *Jasminum humile* مضيف جديد لمرض سل الزيتون في سورية. مجلة جامعة البعث، سلسلة العلوم الأساسية، مجلد 42، عدد 24 ص 139-164.
- عيسى، سامر، (2010). دراسة انتشار مرض سل الزيتون *pseudomonas savastanoi pv. Savastanoi* على العوائل الطبيعية، وتقييم بعض أصناف الزيتون تجاه الإصابة. جامعة دمشق. كلية الهندسة الزراعية. قسم وقاية النبات.

المراجع الأجنبية:

- **ABU-GHORA, M. (1988).** Taxonomie et pouvoir pathogen de *Pseudomonas syringae pv Savastanoi*. These de doctorat . Universite d'Angers.France. p105- 116 .
- **Abu Ghurra, M. (2004).** Definition of bacteria *pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* isolated from myrtle *myrtus communis* in Syria. Damascus University, Journal of Agricultural Sciences, Volume 20, No. 1, pp. 175-179, in Arabic.
- **Alvarez. F.,Garcia de los Rios. J. E., Jimenez. P.,Rojas. A., Reche. P. and Troy. M. T.(1998).**phenotypic variability in different strains of *Pseudomonas savastanoi pv. savastanoi* isolated from different host. European Journal of plant pathology.104:603-609.
- **Bozkurt, I. A., Soylu .S., Mirik .M .,Ulubas. Serce.C .and Baysal .O. (2014).** Characterization of bacterial knot disease caused by *Pseudomonas*

- savastanoi pv. savastanoi on pomegranate (*Punica granatum* L.) trees: a new host of the pathogen . *Letters in applied Microbiology* .59. 520-527.
- **Cinelli, T., Rizzo, D., Marchi, G. and Surico, G. (2013).** First Report of Knot Disease Caused by *Pseudomonas savastanoi* on Sweet Olive in Central Italy. *Plant disease Journal*.v97(3).p419.
 - **Comai, L. and Kosuge, T. (1982).** Cloning and characterization of *iaaM*, a virulence determinant of *Pseudomonas savastanoi*. *Journal of Bacteriology*.149: 40-46.
 - **Garrity, G. M., Brenner, D. J., Krieg, N. R., Staley, J. T. (2005).** *Bergey's manual of systematic bacteriology*.2: 372-373.
 - **Hijazin, R. and Khlaif, H. (2005).** Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* from Olive and Other Hosts by Polymerase Chain Reaction (PCR). *Dirasat, agricultural sciences*. 32:71-77.
 - **Iacobellis, N. S., Caponero, A., and Evidente, A. (1998).** Characterization of *Pseudomonas syringae ssp. savastanoi* strains isolated from ash. *Plant Pathol.* 47, 73-83.
 - **King, E. O. Ward, M. K. and Raney, D. E. (1954).** Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *Journal of laboratory and clinical medicine*.44: 301-307.
 - **Lelliott, R. A., Billing, E. and Hayward, A. C. (1966).** A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonas. *J. Appl. Bacteriol.*29:470-489.
 - **Marzieh Qaraaty, Seyed Kamali, Fataneh Dabaghian And Others (2014),** Effect of myrtle fruit syrup on abnormal uterine bleeding: a randomized double-blind, placebo-controlled pilot study, *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, Issue 1, Folder 22, Page 45. Edited.
 - **Moretti, C., Ferrante, P., Hosni, T., Valentini, F., D'Onghia, A., Fatmi, M. and Buonauro, R. (2008).** characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains collected from Olive trees in different countries. *Pseudomonas syringae Pathovars and Related Pathogens*. © Springer Science + Business Media B.V:321-329.
 - **Mirik, M., Aysan, Y. and Sahin, F. (2011).** Characterization of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* strains isolated from several host plants in turkey and report of *Fontanesia* as a new host. *Journal of plant biology*. (93) 2 ,263-270.

- **Palm, C. J., Gaffney, T. and Kosuge, T. (1989).** Cotranscription of genes encoding indoleacetic acid production in *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. *Journal of Bacteriology*. 171: 1002-1009.
- **Penyalver, R., Garcia, A., Ferrer, A., Edson. & Lopez, M.(2000).** Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in Olive Plants by Enrichment and PCR. *Journal of applied and environmental Microbiology*. Vol66.No6.p:2673-2677.
- **Saba, J. Goussous., Al-Gharaibeh, A. Moath. (2008).** Isolation, characterization and PCR tests of the causal agent of Olive Knot Disease (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*) in North Jordan. *Jordan Journal of agricultural sciences*. volume4, No.1.
- **Smidt, M. and Kosuge, T.(1978).** The role of indole-3-acetic acid accumulation by alpha methyl tryptophan – resistant mutants of *pseudomonas savastanoi* in gall formation on oleanders. *Physiol. Plant Pathol*.13:203-214.
- **Surico, G. Iacobellis, N. S. and Sisto, A. (1985).** Studies on the role of indole-3-acetic acid and cytokinins in the formation of knots o olive and oleander plants by *Pseudomonas syringae* pv. *savastanoi*. *Physiol. Plant Pathol*. 26: 309-320.
- **Varvaro, L. and Surico, G. (1978).** Comportamento di diverse cultivares di olive (*Olea europaea* L.) all inoculazione artificiale con *Pseudomonas savastanoi* (E.F.Smith) Stevens. *Phytopathologia Mediterranea*. 17: 174