عزل وتعريف البكتيريا *Xanthomonas campestris*. pv. pruni المسببة لمرض تبقع أوراق أشجار اللوزيات بمنطقة الجبل الأخضر

فوزية مفتاح بونصيرة[1] فتحي سعد المسماري[1] وائل ياسين الدباغ[2]

DOI: https://doi.org/10.54172/mjsc.v10i1.502

الملخص

لوحظ أثناء المسح الميداني الذي أجري خلال عام 1997 لأمراض أشجار اللوزيات بضواحي مدينة البيضاء – بمنطقة الجبل الأخضر ، إصابة معظم أوراق أشجار كل من اللوز الحلو والبرقوق (العوينة) والخوخ والمشمش بمرض التبقع . وأثبتت الدراسات المعملية اللاحقة على الأمراضية والصفات الشكلية والوظيفية والكيموأحيائية مصاحبة البكتيريا *Xanthomonas campestris*. pv. pruni للأعراض المرضية . وعند دراسة الظروف البيئية الملائمة لنمو هذه العزلة تبين أن أفضل نمو لها كان عند درجة الحرارة 30°م والرقم الهيدروجيني (pH) 7.6 مقارنةً مع درجات الحرارة (10 ، 20 ، 35°م) والأرقام الهيدروجينية (3.6 ، 5.2 ، 8.4 ، 9.2 ، 10) الأخرى وأن نموها يتأثر سلبياً بزيادة التراكيز الملحية والسكرية إلى أن يثبط تماماً عند التركيز الملحي (5%) والمحلول السكري (60%) . كما أظهرت البكتيريا المقدرة على البقاء نشطة في الأنسجة النباتية المصابة لمدة ثمانية أشهر وفي البراعم الورقية والزهرية خلال فترة الشتاء . وعند اختبار المدى العوائلي لهذه البكتيريا ظهرت الأعراض النموذجية لمرض التبقع البكتيري على أوراق نباتات التفاح والخوخ والمشمش والبرقوق واللوز الحلو والورد بعد حقنها بلقاح تركيزه (1×10^8 خلية / مل) بينما لم تظهر أي أعراض مرضية على أوراق الكمثرى ومنتخبات من اللوز المر .

[1] قسم وقاية النبات ، كلية الزراعة ، جامعة عمر المختار ، ص.ب 919 البيضاء – ليبيا .

[2] قسم الأحياء ، كلية العلوم ، جامعة عمر المختار ، ص.ب 919 البيضاء – ليبيا .

© للمؤلف (المؤلفون)، يخضع هذا المقال لسياسة الوصول المفتوح ويتم توزيعه بموجب شروط ترخيص إسناد المشاع الإبداعي CC BY-NC 4.0

المقدمة

لقد حظيت أشجار الفاكهة بشكل عام واللوزيات ذات النواة الحجرية بشكل خاص باهتمام كبير بمنطقة الجبل الأخضر نظراً لأهميتها الاقتصادية وملاءمة كل من التربة والظروف المناخية للتوسع في زراعتها حيث ينمو بهذه المنطقة حالياً حوالي 600000 شجرة لوز حلو (*Prunus amygdalus*) و 500000 شجرة خوخ (*Prunus persica*) و 300000 شجرة برقوق (*Prunus domestica*) و 200000 شجرة مشمش (*Prunus armeniaca*) و 50000 شجرة كرز حلو (*Prunus avium*) . ووفقاً لقائمة الأمراض المسجلة ، تتعرض هذه الأشجار للإصابة بالعديد من المسببات المرضية البكتيرية والفطرية والفيروسية (Kiraly, et al, 1974 ، أمال ، 1999 ، عقل ، 1999) التي تتسبب في ظهور أعراض مرضية مختلفة مثل التدرنات وتقرحات الفروع والبراعم والانتفاخات على الأغصان والفروع وتبقعات الأوراق والثمار والموت الرجعي ولفحة الزهرات ، تؤدي إلى فاقد كبير في إنتاجيتها و / أو تقليل جودة ثمارها التسويقية .

ومن أهم الأمراض البكتيرية التي تصيب أغلب مزارع اللوزيات بالعالم ، مرض التبقع البكتيري الذي يطلق عليه أحياناً اسم الثقب البكتيري المتسبب عن البكتيريا *Xathomonas campestris* pv. pruni (Hayword, A. et. Al, 1965) . تظهر الأعراض الأولية للإصابة بهذه البكتيريا على هيئة بقع مائية باهتة اللون تتحول لاحقاً إلى بقع متحللة (Necrotic lesions) ذات لون بني أو أرجواني داكن ، تنفصل غالباً عن باقي الأنسجة السليمة وتسقط تاركةً مكانها ثقوباً على الأوراق . كما تؤدي الإصابة إلى إعاقة نمو البراعم وظهور تقرحات سطحية غائرة على السيقان . أما على الثمار فتظهر الأعراض على هيئة بقع منخفضة (أخاديد) تصل مساحتها أحياناً إلى 1سم^2 .

نظراً لأهمية هذه الأشجار الاقتصادية ، فقد هدفت هذه الدراسة لعزل وتعريف المسبب المرضي لتبقع أوراق الأشجار ذات النواة الحجرية بالمزارع الواقعة بضواحي مدينة البيضاء وكذلك دراسة الظروف البيئية الملائمة لنموه لاستنباط أفضل الطرائق لمكافحته والحد من انتشاره .

المواد وطرائق البحث

1- العزل والتنقية

تم فصل الأنسجة المصابة الواقعة بين حواف البقع الموضعية والأنسجة السليمة من الأوراق والثمار والأغصان بواسطة مقص معقم وقطعها إلى قطع دائرية صغيرة وفقاً لما ذكره Kiraly وآخرون (1974) وعقمت خارجياً بغمرها في محلول هيبو كلوريت الصوديوم التجاري بنسبة 1 : 9 لمدة دقيقة واحدة ثم غسلت بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات متتالية لإزالة بقايا هيبو كلوريت الصوديوم ونقلت

إلى هاون معقم وتم سحقها جيداً في 10 مل من محلول ملحي معقم (NaCl %0.9) وخففت العصارة الناتجة تخفيفاً متوالياً (1 : 10 ، 1 : 100 ...الخ) بإضافة محلول ملحي ونشر 0.1مل بطريقة التخطيط من كل تخفيف على أطباق بها أجار مغذي Nutrient Agar (NA) وحضنت الأطباق الملقحة بدرجة الحرارة 30°م لمدة يومين (Sahin et. Al, 1996) . نقلت المستعمرات البكتيرية المفردة إلى بيئة المرق المغذي Nutrient Broth (NB) ، وحضنت على درجة 30°م لمدة 24 ساعة وبعد التأكد من نقاوتها بتحضير شريحة من كل عزلة وصبغها بصبغة جرام تم نقلها إلى بيئة الآجار المغذي ثم إلى الآجار المائي لحفظها عند درجة 5°م ومن ثم تحضير اللقاح النشط منها عند إجراء التجارب اللاحقة .

2- تفاعل فرط الحساسية

تم إجراء هذا الاختبار وفقاً لما وصفه Kiraly وآخرون (1974) ، وذلك بزراعة نبات التبغ صنف *Nicotiana tobacum* cv. White Burley تحت ظروف البيت الزجاجي وعند وصول عمر الشتلات إلى 45-60 يوماً تم حقن نصف مساحة بعض الأوراق باللقاح البكتيري النشط للعزلات المتحصل عليها وذلك بدفع المعلق إلى المسافات البينية (Intercellular spaces) بواسطة إبرة حقن وحقنت المساحات المقابلة لها بالماء المقطر المعقم (شاهد) وحفظت تحت ظروف البيت الزجاجي من حيث درجة الحرارة والإضاءة والرطوبة لمدة 2-3 أيام ثم فحصت بملاحظة تكشف أعراض الموت الموضعي (Necrosis) والأعراض النموذجية لتفاعل فرط الحساسية .

3- القدرة الإمراضية

لاختبار القدرة الإمراضية للعزلات التي أعطت نتائج موجبة لتفاعل فرط الحساسية على أوراق نبات التبغ اتبعت الطرائق الآتية :

i- جمعت أوراق متجانسة الحجم من شتلات اللوز ، والخوخ والبرقوق ، بعمر 2-5 سنوات وتم تغطيتها بأكياس بلاستيكية لمدة 24 ساعة قبل إجراء العدوى ثم حقنت بطريقة تشبع الأنسجة بالتفريغ الهوائي وذلك باستخدام دورق مخروطي يحتوي على معلق بكتيري (1×10^8 خلية/مل) ذي أنبوبة جانبية معقمة متصل بمضخة تفريغ حيث تم غلق فوهة الدورق بإحكام بواسطة سدادة مطاطية وتشغيل المضخة لمدة 5 دقائق ، ثم سحب السدادة المطاطية بشكل مفاجئ للسماح للمعلق البكتيري بالدخول في المسافات البينية لأنسجة الأوراق . وباستعمال ملقط معقم أخرجت الأوراق من الدورق ووضع بعضها في أطباق بتري بها ورق ترشيح معقم مبلل بماء مقطر لتوفير الرطوبة المناسبة لنمو البكتيريا ووضعت الأوراق الأخرى في أطباق بتري تحوي آجار مغذي وحضنت

جميع الأطباق على درجة الحرارة 30°م لمدة أسبوع (Goodman, R.N., 1968, 1972) .

ii- جمعت أوراق سليمة من أشجار اللوزيات المختلفة وغسلت بالماء المقطر ثم وضعت في أطباق بتري على سطح الآجار المغذي الملقح بالبكتيريا الممرضة وحضنت الأطباق على درجة الحرارة 30°م ولمدة أسبوع .

iii- اختيرت شتلات متجانسة النمو والمساحة الورقية وباستخدام إبرة الحقن حقنت المسافات البينية لبعض أوراق الشتلات بمعلق بكتيري (1 × 10^8 خلية/مل) وفي نفس الوقت تم حقن مجموعة أخرى من الأوراق بماء مقطر معقم للمقارنة تحت الظروف الحقلية .

4- تعريف وتصنيف العزلات البكتيرية

لتعريف وتصنيف العزلات البكتيرية الممرضة أجريت سلسلة من التجارب لدراسة الصفات الشكلية والوظيفية والبيوأحيائية للمستعمرات البكتيرية النقية من حيث :

شكل الخلايا وترتيبها وصبغة جرام وحركة البكتيريا وتكوين الجراثيم (Cappuccino & Sherman, 1992) والنمو على البيئة التخصصية (Dhingra & Sinclair, 1995) والنمو على أقراص البطاطس (Stead & Lelliote, 1987) وتمييع الجيلاتين (سيالة ، 1990) وحل النشا (Kiraly et al., 1974) واختبار إنزيم الكتاليز (Catalase) ، اختبار إنزيم الأوكسيديز (Oxidase) وإنتاج إنزيم الديهيدروجنيز (Dehydrogenase) ، (Norris & Ribbon, 1971) واختزال النترات (Kiraly et al., 1974) Nitrate reductase وإنتاج الأندول وإنتاج الليفان Levan production (أبو الذهب والجعفري ، 1984) واختبار أكسدة لاكتات الكالسيوم والحل المائي للكازين (سيالة ، 1990) وتحلل اليوريا واختبار الأكسدة والتخمر OF (Lelliote & Stead, 1987) وإنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين (Kiraly et al., 1974) واختبار تخمر السكريات واستخدام الأحماض الأمينية ونزع مجموعة الكربوكسيل وإنتاج الأمين (Norris & Ribbon, 1971) .

5- دراسات على إمراضية البكتيريا وتأثير بعض العوامل البيئية على نموها

أ- بقاء البكتيريا في البراعم

لمعرفة مدى قدرة البكتيريا على البقاء في البراعم خلال فترة السكون في أشهر الشتاء تم جمع براعم ورقية وزهرية من أشجار اللوز الحلو بمنطقة البلنج خلال شهر فبراير وغمرها بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم التجاري المخفف (1 : 9) لمدة دقيقة ثم غسلها عدة مرات بالماء المقطر وسحقها في هاون مع الماء المقطر المعقم بمعدل (9مل/1 جرام) وعمل سلسلة من التخفيفات العشرية . بعد ذلك زرعت على وسط الآجار المغذي بطريقة التخطيط وحضنت على درجة الحرارة 30°م لمدة ثلاثة أيام وتم اختبار المستعمرات المفردة

وإعادة زراعتها على وسط من الآجار المغذي لغرض تنقيتها ودراسة خواصها الشكلية والوظيفية .

ب– بقاء البكتيريا في أنسجة النباتات المصابة

حقنت شتلات من أشجار الخوخ بالمعلق البكتيري بتركيز (1×10^8 خلية/مل) وعند ظهور الأعراض أخذت عينات من الأوراق وجففت وحفظت عند درجة حرارة الغرفة واختبرت مقدرة البكتيريا على البقاء حية وذلك بأخذ 0.1 جرام من الأنسجة النباتية المجففة وسحقها في هاون به 0.9 مل ماء مقطر معقم ثم إجراء سلسلة من التخفيفات العشرية . بعد ذلك أخذ 0.1 مل من كل تخفيف وأضيف إلى بيئة الآجار المغذي المحتوي على 1% دكستروز و 400 جزء من المليون من المضاد الحيوي ستربتومايسين ، وحضنت الأطباق على درجة الحرارة 30°م لمدة 3–5 أيام . وتم حساب عدد المستعمرات البكتيرية ، وكررت هذه التجربة شهرياً ولمدة تسعة أشهر (Goodman, 1972) .

ج– تقدير التعداد البكتيري في أنسجة النباتات المقاومة والحساسة

لتقدير تكاثر البكتيريا *Xanthomonas campestris* pv. pruni في أنسجة النباتات القابلة للإصابة والمقاومة لها أجريت هذه الدراسة على شتلات من البرقوق صنف Santarosa (حساس) وأخرى من صنف Stanley (مقاوم) واستخدمت طريقة (Kiraly et al., 1974) وذلك بحقن أوراق النباتات ببكتيريا نشطة (1×10^8 خلية/مل) ثم أخذ خمسة أقراص (قطر 1سم) بالثاقب المعدني على فترات زمنية يومياً ولمدة 9 أيام . وبعد غسل العينات بالماء المعقم سحقت في هاون به 10 مل ماء مقطر معقم وأجريت سلسلة من التخفيفات العشرية لكل فترة زمنية ثم زرعت على أوساط غذائية بطريقة التخطيط .

د– اختبار المدى العوائلي

لدراسة المدى العوائلي لهذه البكتيريا حقن في إحدى التجارب شتلات من التفاح والكمثرى والورد بعمر سنة بعد تغطيتها بأكياس من النايلون لمدة يومين لتوفير الرطوبة المناسبة بمعلق بكتيري نشط (1×10^8 خلية/مل) بطريقة الحقن ومتابعة ظهور الأعراض المرضية من عدمها بعد ثلاثة أسابيع من العدوى .

وفي تجربة أخرى زرعت بذور لوز تم الحصول عليها من قسم البستنة – جامعة عمر المختار بعد إجراء عملية تنضيد بارد رطب لها وذلك بغسلها ثم خلطها مع رمل ناعم مندى خالٍ من الأملاح ووضعها في أكياس بلاستيكية على درجة الحرارة 5°م لمدة شهر تقريباً ، وبعد إنبات البذور في وسط التنضيد زرعت في أكياس بلاستيكية (12 × 20سم) تحتوي على خليط من الرمل والطين والسماد الحيواني المعقم بنسبة (3 : 5 : 2) ثم نقلت الأكياس المزروعة إلى البيت الزجاجي (حنا ، 1984) وبعد مرور شهر ونصف تقريباً تم اختيار البادرات المتجانسة النمو وغطيت بواسطة أكياس بلاستيكية (نايلون) لتوافر الرطوبة لمدة 24 ساعة ثم رشت بمعلق بكتيري نشط (1 ×

10^8 خليـة/مل) وغطيـت مـرة أخـرى بالأكيـاس البلاستيكية وحضنت عند درجة الحرارة في البيت الزجاجي والتي كانت بين 30–35°م .

هـ– تأثير درجات الحرارة المختلفة

لتحديد درجة الحرارة المثلى لنمو العزلة البكتيرية استخدمت الطريقة التي وصفها سيالة (1990) وذلك بتحضير بيئة المرق المغذي وتوزيعها في أنابيب بواقع 10مل في كل أنبوبة وتعقيمها ثم تلقيحها بمعلق بكتيري نشط 1% وتحضينها على درجات حرارة مختلفة (10 ، 20 ، 30 و 35°م) ولمدة 4 أيام . استخدمت ثلاثة مكررات لكل معاملة ثم قدر النمو بقياس درجة التعكير (الامتصاصية) باستخدام جهاز المطياف الضوئي (Spectronic 20) على طول موجة 600 نانومتر وكذلك تقدير العدد الكلي للبكتيريا بطريقة الصب بالأطباق عند كل قراءة .

و– تأثير تراكيز مختلفة من الملوحة

لإجراء هذا الاختبار تم تحضير بيئة المرق المغذي المحتوية على نسب مختلفة من كلوريد الصوديوم (1 ، 2 ، 3 ، 4 و 5%) ثم وزعت في أنابيب بواقع 10 مل لكل أنبوبة وعقمت في المعقام ولقحت بمعلق بكتيري نشط بنسبة 1% وحضنت على درجة الحرارة 30°م لمدة 4 أيام . تم قياس درجة التعكير باستخدام المطياف الضوئي على الطول الموجي 600 نانومتر وللمقارنة استخدمت أنابيب بدون أي تركيز ملحي . استخدمت ثلاث مكررات لكل معاملة (سيالة 1990) .

ز– تأثير الرقم الهيدروجيني (pH)

لتحديد الرقم الهيدروجيني الأمثل لنمو البكتيريا تم تحضير بيئة المرق المغذي ، وتم ضبط رقمها الهيدروجيني إلى (3.6 ، 5.2 ، 7.6 ، 8.4 ، 9.2 ، 10) وفقاً لما وصفه سيالة (1990) وذلك بإضافة كميات مختلفة من المحاليل الحامضية والقاعدية . بعد ذلك وزعت المحاليل الخاصة بكل معاملة على أنابيب بواقع 10مل لكل أنبوبة وعقمت بالمعقام ثم لقحت بالبكتيريا النشطة بنسبة 1% وحضنت على درجة حرارة 30°م ولمدة 4 أيام . استخدمت ثلاثة مكررات لكل معاملة ، وتم قياس درجة التعكير بوساطة جهاز المطياف الضوئي عند الطول الموجي 600 نانومتر .

النتائج والمناقشة

الأعراض المرضية

تتسم الأعراض المرضية التي تمت ملاحظتها على أوراق أشجار اللوز الحلو والخوخ والبرقوق النامية بضواحي مدينة البيضاء بظهور بقع صغيرة دائرية غير منتظمة ذات لون بني أو أرجواني مع حدوث تشقق حول البقع أحيانا (شكل 1أ ، 1ب ، 1ج) وعلى الثمار لوحظ وجود بقع صغيرة دائرية الشكل بنية اللون منخفضة قليلاً عن

(أ)

(ب)

(ج)

(د)

شكل 1 يبين أعراض التبقع المتسبب عن البكتيريا *Xanthomonas campestris*. pv. *pruni* على : أوراق اللوز الحلو (أ) ، أوراق المشمش ، (ب) أوراق البرقوق ، (ج) وأعراض التنقر على الأفرع (د)

السطح ، كما لوحظ تنقر وتشقق على الأفرع الصغيرة وبقع ذات لون بني داكن أو أرجواني مسود (شكل 1د) .

عزل وتمييز العزلات البكتيرية وتفاعل فرط الحساسية

تم عزل وتنقية تسع عزلات بكتيرية من الأنسجة الواقعة بين حواف البقع الموضعية والأنسجة السليمة لأوراق اللوز والخوخ والبرقوق والمشمش والكرز ، أعطى ثمانية منها بعد 36–72 ساعة من الحقن ، الأعراض النموذجية لتفاعل فرط الحساسية والتي اتسمت بظهور مناطق مشبعة بالماء تحولت لاحقاً إلى مناطق ميتة وعند إعادة عزل البكتيريا على بيئة الآجار المغذي أعطت مستعمرات صفراء باهتة اللون لزجة ، ذات حواف دائرية ، مرتفعة قليلاً على سطح الوسط الغذائي مماثلة تماماً لمستعمرات البكتيريا *Xanthomonas campestris* (الشاهد) .

ويوضح الجدول (1) الصفات الشكلية للعزلات والتي تتمثل في وجود خلايا بكتيرية عصوية على هيئة سلاسل قصيرة (ثنائيات مفردة ، ومفردة) ، سالبة لصبغة جرام ، غير مكونة للجراثيم ، ومتحركة .

القدرة الإمراضية في البيت الزجاجي والمعمل

يوضح (الجدول 2) أن لجميع العزلات الموجبة لتفاعل فرط الحساسية القدرة على إحداث الإصابة عند حقنها أو رشها بتركيز (1×10^8 خلية/مل) تحت ظروف البيت الزجاجي على أوراق شتلات من اللوز الحلو (صلب ، هش) والخوخ (أملس ، وبري) والبرقوق (صفراء – حمراء) والمشمش ، واتسمت الأعراض المرضية بظهور بقع دائرية خضراء مصفرة باهتة اللون تتحول بتقدم الإصابة إلى اللون البني الداكن المحاط بهالة صفراء والتي تسقط عند جفافها تاركة ثقباً مكانها كما أظهرت نتائج

جدول 1 يوضح الصفات الشكلية للعزلات البكتيرية المصاحبة لأعراض تبقع أوراق أشجار اللوزيات

الاختبارات	البكتيريا المعزولة من الأنسجة			
	اللوز	البرقوق	الخوخ	المشمش
تفاعل صبغة جرام	–	–	–	–
شكل الخلايا	عصوية	عصوية	عصوية	عصوية
ترتيب الخلايا	سلاسل قصيرة	سلاسل قصيرة	سلاسل قصيرة	سلاسل قصيرة
الحركة	+	+	+	+
تكوين الجراثيم	–	–	–	–

+ إيجابية الاختبار – سالبة الاختبار

جدول 2 نتائج اختبارات القدرة الإمراضية لعزلات البكتيريا *Xanthomonas campestris*

البكتيريا	الاختبارات			
عزلات من أنسجة	تحضين شتلات معداه بالبكتيريا في البيت الزجاجي	تحضين أوراق معداه بالبكتيريا على أطباق بها أوراق ترشيح مبللة	أطباق بها آجار مغذي غير ملقح بالبكتيريا	تحضين أوراق غير معداه على أطباق بها آجار مغذي ملقح بالبكتيريا
اللوز	+	−	−	+
الخوخ	+	−	−	+
البرقوق	+	−	−	+
المشمش	+	−	−	+

+ إيجابية الاختبار − سالبة الاختبار

الاختبارات المعملية أن طريقة استخدام الأوراق السليمة الموضوعة على سطح الآجار المغذي الملقح بالبكتيريا مسبقاً هي أفضل الطرائق لاختبار القدرة الإمراضية حيث ظهرت أعراض مرضية واضحة بعد 4-5 أيام من الحقن في حين لم تظهر أعراض مرضية واضحة عند استخدام طريقة وضع الأوراق النباتية المحقونة بالمعلق البكتيري على أوراق ترشيح مبللة بالماء مباشرة أو على سطح الآجار المغذي .

تختلف هذه الملاحظات عن ما وجده العوامي (1996) بأن الطريقة التي وصفها Goodman, 1972 هي الأفضل لاختبار القدرة الإمراضية معملياً ، وهذا قد يعزى ولو جزئياً إلى الاختلاف في السلالات البكتيرية أو العوائل النباتية المستخدمة أو الاثنين معاً . بناءً على النتائج المتحصل عليها من التجارب الأولية في هذه الدراسة وكذلك من مراجعة الدراسات السابقة على أمراض التبقع البكتيري التي تصيب أشجار اللوزيات فإن احتمالية مصاحبة الجنس *Xanthomonas campestris* لهذا المرض بمنطقة الجبل الأخضر تكون أكثر من غيرها من الأجناس البكتيرية الأخرى . لذلك فلقد تم التركيز في الدراسات اللاحقة على الاختبارات التخصصية لهذا الجنس من البكتيريا .

الاختبارات التأكيدية (التخصصية) للعزلات البكتيرية الممرضة

النمو على أقراص البطاطس والبيئة التخصصية D5

أظهرت جميع العزلات البكتيرية القدرة على النمو على أقراص البطاطس إلا أن هناك تبايناً واضحاً في كثافة النمو حيث أعطت العزلة التي تم عزلها من اللوز الحلو نمواً كثيفاً وأعطت العزلة التي تم

عزلها من البرقوق نمواً متوسطاً ، بينما أظهرت باقي العزلات البكتيرية نمواً أقل من العزلات الأخرى . كما أظهرت جميع العزلات أيضاً القدرة على النمو على البيئة التخصصية (D5) حيث أعطت مستعمرات دائرية لزجة وعند فحصها مجهرياً كانت الخلايا في شكل سلاسل قصيرة ما عدا العزلة التي تم عزلها من اللوز الحلو من منطقة البلنج فكانت مفردة وفي شكل ثنائيات مفردة على التوالي . تتفق هذه النتائج مع ما ذكره Holt وآخرون (1994) .

الاختبارات الوظيفية والكيموأحيائية

يتضح من الجدول (3) أن للعزلات البكتيرية القدرة على حل النشا وإسالة الجيلاتين وأن جميعها موجبة لاختبار الكتاليز وإنتاج كبريتيد الهيدروجي وتحلل الكازين وأيضاً اختبار الأكسدة والاختزال (OF) وسالبة لاختبار اختزال النترات والأوكسيديز وتحلل اليوريا وإنتاج إنزيم الدايهيدروجنيز وإنتاج الأندول وأكسدة لاكتات الكالسيوم وهذه جميعاً تتفق مع ما ذكره كل من Bradbury, (1986) و Lilliote

جدول 3 نتائج بعض الاختبارات الوظيفية والكيموأحيائية لعزلات البكتيريا *Xanthomonas campestris*

البكتيريا المعزولة من أنسجة				الاختبارات	
المشمش	الخوخ	البرقوق	اللوز		
+	+	+	+	Gelatin liquefaction	تميع الجيلاتين
+	+	+	+	Starch hydrolysis	حل النشا
+	+	+	+	Catalases	الكتاليز
−	−	−	−	Oxidases	الأوكسيديز
−	−	−	−	Dehydrogenases	الهيدروجينيز
−	−	−	−	Nitrate reduction	اختزال النترات
−	−	−	−	Indole production	إنتاج الأندول
−	−	−	−	Levan formation	إنتاج الليفان
−	−	−	−	Oxidation of calcium lactate	أكسدة لاكتات الكالسيوم
+	+	+	+	Casin hydrolysis	حل الكازين
−	−	−	−	Hydrolysis of urea	تحلل اليوريا
+	+	+	+	Oxidative/fermantive (OF)	الأكسدة والاختزال
+	+	+	+	Hydrogen sulphide production	إنتاج كبريتيد الهيدروجين

+ إيجابية الاختبار − سالبة الاختبار

و Stead, (1987) و Holt وآخـرون (1994) في خصائص *Xanthomona campestris* بشكل عام ومع ما سجله Schaad, (1980) لخصائص البكتيريا *X. campestris* pv. *Pruni* بشكل خاص .

اختبار تخمر السكريات للعزلات البكتيرية

توضـح النتـائج المبينـة بالجـدول (4) أن جميع العزلات لها القدرة على إنتاج الحامض من مجموعة من السكريات (سكروز ، جلوكوز ، لاكتوز ، أرابينوز ، سيليبيوز ، فركتوز ، وزايلوز) بينما كانت جميعها ضعيفة لسكر المانوز وسالبة لتخمير سكر التريهالوز والرامنوز . إن قدرة هذه العزلات على تخمير السكريات السابقة وعدم قدرتها على تخمير القليل منها تتفق مع ما ذكره Holt وآخرون (1994) ومع ما دونه Bradbury (1986) عن خصائص البكتريا *Xanthomona campestris* .

جدول 4 اختبارات تخمر السكريات لعزلات البكتيريا *Xanthomonas campestris* المعزولة من اللوزيات

الاختبارات		البكتيريا المعزولة من أنسجة			
		اللوز	البرقوق	الخوخ	المشمش
السكروز	Sucrose	+	+	+	+
الجلوكوز	Glucose	+	+	+	+
اللكتوز	Lactose	+	+	+	+
المانوز	Mannose	−/+	−/+	−/+	−/+
الجلاكتوز	Galactose	+	+	+	+
التريهالوز	Trehalose	−	−	−	−
الأرابينوز	Arabinose	+	+	+	+
السيليبيوز	Cellobiose	+	+	+	+
الفركتوز	Fructose	+	+	+	+
الرامنوز	Rhamnose	−	−	−	−
الزايلوز	Xylose	+	+	+	+

+ إيجابية الاختبار −/+ متوسطة إلى ضعيفة − سالبة الاختبار

جدول 5 نتائج اختبارات مقدرة عزلات البكتيريا *Xanthomonas campestris* على استخدام الأحماض الأمينية

الاختبارات		البكتيريا المعزولة من أنسجة			
		اللوز	البرقوق	الخوخ	المشمش
جلوتاميك	Glutamic	+	+	+	+
ميثيونين	Methionine	+	+	+	+
برولين	Proline	–	–	–	–
تيروسين	Tyrosine	–	–	–	–
جلايسين	Glycine	–	–	–	–
أرجينين	Arginine	–	–	–	–
جلوتامين	Glutamine	–/+	–/+	–/+	–/+
أسبارتك	Aspartic	–	–	–	–
ليوسين	Leucine	–	–	–	–
الألينين	Alanine	+	+	+	+
أسباراجين	Asparagine	–	–	–	–
ثريونين	Threonine	–/+	–/+	–/+	–/+
تربتوفان	Tryptophan	+	+	+	+
هيستيدين	Histidine	–	–	–	–
سيستيين	Cysteine	–	–	–	–

+ إيجابية الاختبار –/+ متوسطة إلى ضعيفة – سالبة الاختبار

استخدام العزلات البكتيرية للأحماض الأمينية

توضح نتائج الاختبارات المدونة بالجدول (5) أن العزلات البكتيرية تحتاج في نموها إلى بعض الأحماض الأمينية التي يجب توفرها في الوسط الغذائي مثل (الجلوتاميك ، الميثونين ، الألنين ، والتربتوفان) بينما هناك مجموعة أخرى مثل (البرولين ، التيروسين ، الجلايسين ، والأرجنين ، والأسبارتك ، الليوسين ، الهستيدين ، والسستين) ليس من الضروري وجودها في الوسط الغذائي ، وكانت جميع العزلات ضعيفة للجلوتامين والثيرونين عند إضافة محاليل هذه الأحماض الأمينية إلى وسط المرق المغذى .

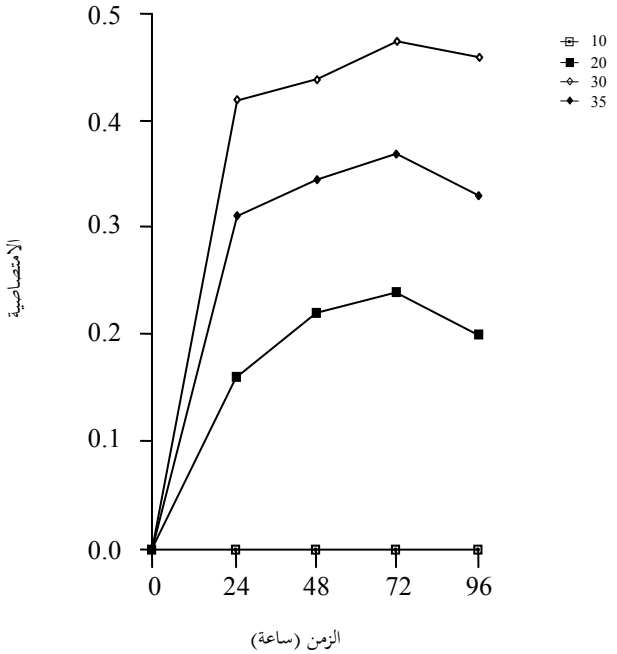
تتفق هذه النتائج أيضاً مع ما ذكره Holt et al., (1994) ومع ما ذكره

(1986) Bradbury في تصنيف البكتيريا *Xanthomonas campestris* .

تأثير بعض العوامل البيئية على نمو البكتيريا

أ- تأثير درجات الحرارة المختلفة على نمو البكتيريا

يوضح شكل (2) أنه بعد التحضين لمدة 24 ساعة حصلت زيادة واضحة في عدد الخلايا



شكل 2 يبين تأثير درجات الحرارة على نمو البكتيريا *Xanthomonas campestris*. pv. *pruni*

عند درجة الحرارة 20 ، 30 ، 35°م في حين لم يحصل أي زيادة عند درجة حرارة 10°م (على التوالي) واستمرت زيادة نمو البكتيريا بزيادة مدة التحضين إلى 72 ساعة بدرجة حرارة 30°م بينما لم يلاحظ زيادة ملحوظة عند 20 و 35°م بل على العكس حصل انخفاض واضح في هاتين الدرجتين بزيادة مدة التحضين لمدة 96 ساعة وكالسابق لم تطرأ أي زيادة ملحوظة في عدد الخلايا بدرجة 10°م ولنهاية مدة التحضين . يتضح من هذه الدراسة أن درجة الحرارة 30°م هي الأكثر ملاءمة لنمو هذه البكتيريا عند 72 ساعة مقارنةً مع درجات الحرارة الأخرى . ونظراً لأهمية معرفة درجات الحرارة المثلى

لنمو البكتيريا الممرضة للنبات وعلاقتها بالظروف البيئية الملائمة لحدوث المرض وتطوره فإن درجة الحرارة المثلى لنمو هذه البكتيريا يتفق مع ما لوحظ من انتشار للمرض بالمنطقة خلال فترة جمع العينات حيث كانت درجة الحرارة المسجلة خلال تلك الفترة تتراوح ما بين 25–30°م وفقا لتسجيلات محطة الأرصاد الجوية بمنطقة البلنج . وهذه تتفق مع ما ذكره كل من Kiraly وآخرين (1974) و Plessis– Du (1987) .

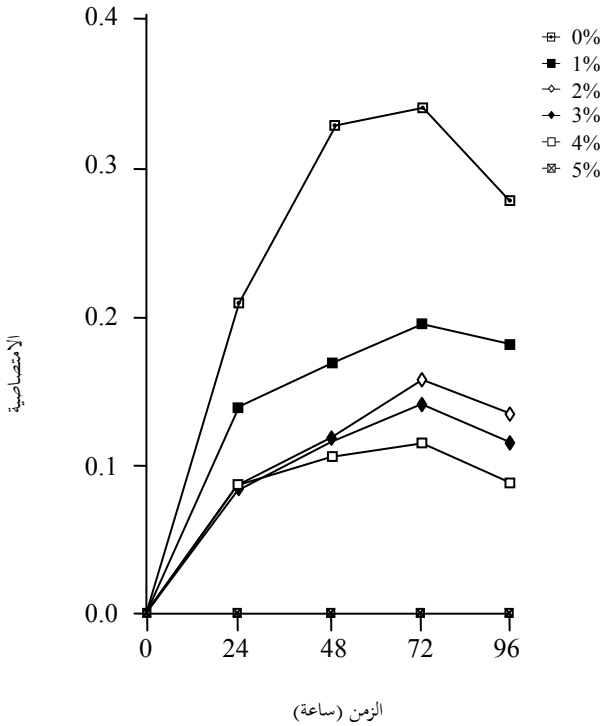
ب– تأثير تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم على نمو البكتيريا

يبين الشكل (3) تأثير تراكيز مختلفة من ملح كلوريد الصوديوم في المرق المغذي على نمو البكتيريا *Xanthomonas. Campestris* pv. *Pruni* حيث يتضح من نتائج هذه الدراسة حدوث تثبيط كامل لنمو البكتيريا عند التركيز الملحي 5% خلال فترات التحضين المختلفة ، وبالرغم من وجود فروقات في قراءة الامتصاصية بين التركيز الملحي 1% والشاهد إلا أنه لم يحصل تثبيط لنمو البكتيريا بدرجة كبيرة مقارنةً مع التراكيز الملحية الأخرى (4 ، 3 ، 2 %) حيث كانت أعلى درجة قراءة للامتصاصية (0.16) بعد 72 ساعة من التحضين كما يلاحظ أيضاً عدم حصول نمو بكتيري بدرجة جيدة في التراكيز الملحية (2 ، 3 و 4 %) مقارنةً بالتركيز الملحي 1% (0.19) والشاهد (0.34) وتتفق هذه النتائج مع ما ذكره Holt وآخرون (1994)

و Bradbury (1986) على نمو البكتيريا *Xanthomonas. Campestris* pv. *pruni* في التراكيز الملحية المختلفة .

ج– تأثير درجة الأس الهيدروجيني (pH)

يتضح من نتائج الدراسة الممثلة بيانياً بالشكل (4) أن معدل نمو البكتيريا *Xanthomonas. Campestris* pv. *pruni* يتأثر بدرجة كبيرة بالمستويات المختلفة من درجات الأس الهيدروجيني حيث كان أعلى معدل نمو (0.41) عند الأس الهيدروجيني 7.6 في حين لم يتعد (0.1) في المستويات الأخرى وأن البكتيريا تفضل النمو في الأوساط ذات الأس الهيدروجيني المتعادل أو القريب من القاعدية بينما يثبط نموها في الأوساط الحامضية والأوساط القاعدية . تتفق هذه النتائج مع ما وجده كل من أبو الذهب والجعراني (1984) ، وسيالة (1990) في أن أفضل نمو للبكتيريا *X. campestris* يكون عند درجات الأس الهيدروجيني القريب من التعادل .

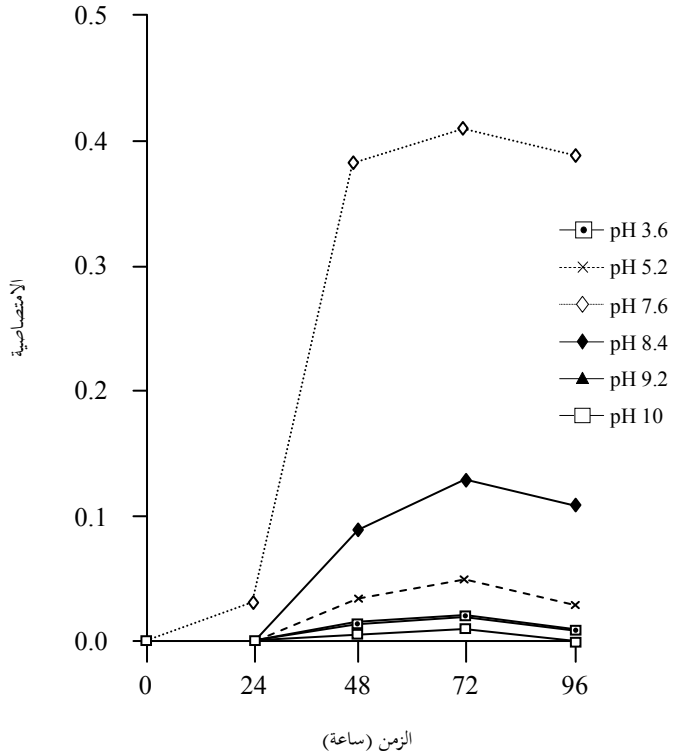


شكل 3 يبين تأثير تراكيز مختلفة من ملح الطعام (NaCl) على نمو بكتيريا *Xanthomonas campestris*. pv. *pruni*

د– تأثير تراكيز مختلفة من سكر السكروز

يتضح من نتائج هذه الدراسة أن معدل نمو البكتيريا يتأثر بدرجة كبيرة بتراكيز مختلفة من سكر السكروز شكل (5) فقد كانت هناك زيادة في عدد الخلايا خلال 24 ساعة في التراكيز (0.5 ، 10 ، 15 ، 30 %) وكان أعلى معدل نمو (0.75) عند التركيز 0.5% بعد 72 ساعة من التحضين ، وحدث تثبيط كامل عند التركيز 60% خلال الأزمنة (0–96 ساعة) مقارنة بالشاهد الذي أعطى أعلى معدل نمو عند 72 ساعة .

كما يتضح من هذه النتائج أن البكتيريا لا تتأثر بالتغيرات البسيطة في تراكيز السكر وأنها تنمو بشكل أفضل في التراكيز القليلة . تتفق هذه النتائج مع ما ذكره عبد الوهاب وآخرون (1980) وأبو الذهب والجعراني (1984) في أن بكتيريا *Xanthomonas campestris* تنمو جيداً في التراكيز السكرية القليلة .

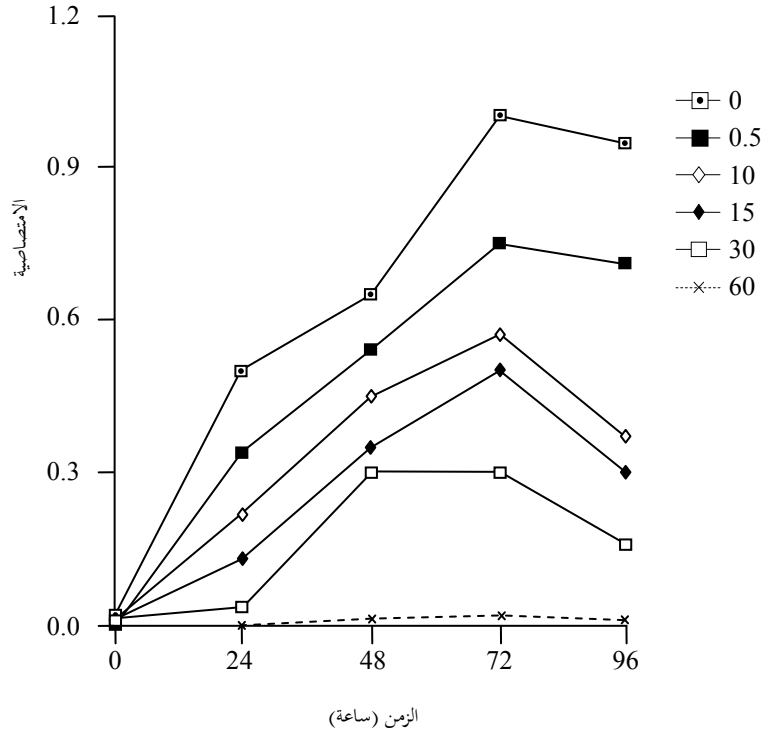


شكل 4 يبين تأثير الأس الهيدروجيني (pH) على نمو البكتيريا *Xanthomonas campestris*. pv. *pruni*

بعض الدراسات المتعلقة بالأمراضية

أ- بقاء البكتيريا في الأنسجة المصابة

يلاحظ من الشكل (6) أن أعداد خلايا البكتيريا في الأنسجة المجففة قد انخفض بشكل كبير خلال الشهرين الأولين من التخزين حيث وصل إلى (2.3×10^4 خلية/جرام من الأنسجة المصابة) مقارنةً مع التعداد الأول لعدد الخلايا (1.4×10^6 خلية/جرام من الأنسجة المصابة) ، ثم بدأ العدد البكتيري في الانخفاض ثانية اعتباراً من الشهر الرابع إلى الشهر الثامن وأعقبه انخفاض حاد بين الشهرين بالأنسجة النباتية لمدة تصل إلى ثمانية أشهر ، وهذه الفترة الزمنية تعد كافية لتوافر اللقاح بالحقل لإحداث العدوى عند توافر الظروف البيئية المناسبة . تتفق هذه النتائج مع ما وجده Jones و Scott (1986) والعوامي (1996) عن بقاء البكتيريا *X. campestris* في أوراق النباتات المصابة .



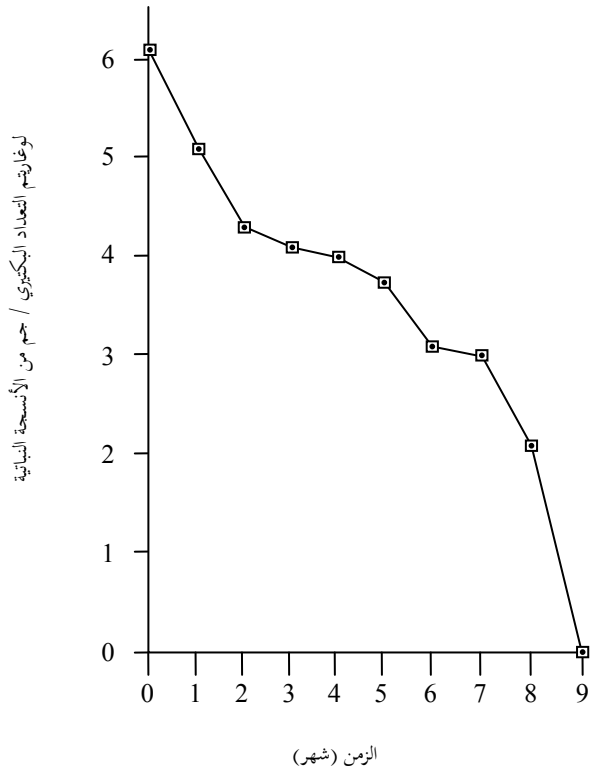
شكل 5 يبين تأثير تراكيز مختلفة من سكر السكروز على نمو البكتيريا *Xanthomonas campestris*. pv. *pruni*

ب– بقاء البكتيريا في البراعم

تبين نتائج هذه الدراسة مقدرة البكتيريا *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* على البقاء في البراعم الورقية والزهرية لأشجار اللوز الحلو خلال فترة السكون (شهر ديسمبر إلى شهر فبراير) والتي تعمل كمصدر للقاح الأولي لإحداث الإصابة لأجزاء النبات الأخرى عند توافر الظروف البيئية لنموها وهذا يتفق مع ما ذكره Anderson و Sherman (1995) وعبد الرحيم (1996) في أن البكتيريا *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* يمكنها أن تتواجد في البراعم الورقية لأشجار اللوزيات خلال فترة السكون .

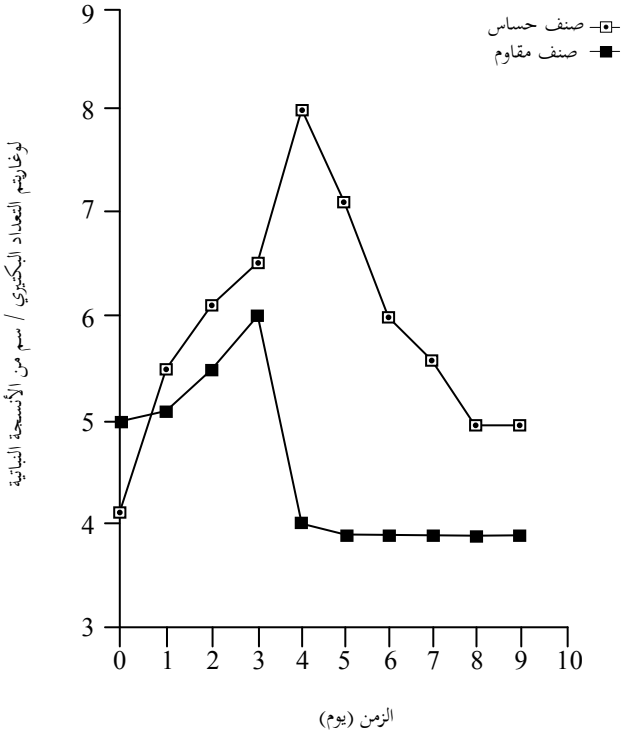
ج– تقدير التعداد البكتيري في النباتات الحاسة والمقاومة

توضح النتائج المبينة في الشكل (7) مقارنةً بين أعداد الخلايا البكتيرية في أنسجة نبات البرقوق الحساس صنف Sanat rosa والمقاوم صنف Stanley حيث يلاحظ حدوث زيادة في



شكل 6 يبين مقدرة البكتيريا *Xanthomonas campestris*. pv. *pruni* على البقاء في الأنسجة المصابة

عدد الخلايا البكتيرية في أنسجة الصنف الحساس خلال اليوم الأول والذي ارتفع من (1.2×10^4 خلية/مل) إلى (2.8×10^5 خلية/مل) ، بينما حدثت زيادة بسيطة في عدد الخلايا البكتيرية في أنسجة نبات البرقوق المقاوم خلال هذه الفترة . بعد ذلك أخذ التعداد البكتيري في الزيادة في الصنفين الحساس والمقاوم حيث وصل تعدادها إلى 3.1×10^6 و 1×10^6 خلية/مل على التوالي ثم حصلت زيادة واضحة لأعداد الخلايا البكتيرية في أنسجة الصنف الحساس 1×10^8 على العكس من ذلك فقد حصل انخفاض لأعداد الخلايا البكتيرية في الصنف المقاوم حيث وصل إلى 1×10^4 خلية/مل خلال اليوم الرابع . وعند متابعة التعداد البكتيري خلال الأيام اللاحقة ، لوحظ انخفاض تدريجي في العدد الكلي للخلايا البكتيرية بأنسجة النبات الحساس إلى اليوم الثامن من التحضين بينما لوحظ ثبات في التعداد البكتيري في أنسجة الصنف المقاوم خلال تلك الفترة ، وقد يعزى الانخفاض في



شكل 7 يبين التعداد البكتيري في أنسجة نبات العوينة الحساسة Santa rosa والمقام Stanley

التعداد البكتيري بأنسجة العائل المقاوم إلى المواد الفينولية وأكسدتها بواسطة الإنزيمات المسئولة عن ذلك ومن ثم إنتاج مركبات الكينونات (Quinone) التي تثبط نمو البكتيريا في الأنسجة النباتية . وتتفق هذه النتائج مع ما وجده Goodman وآخرون (1968) .

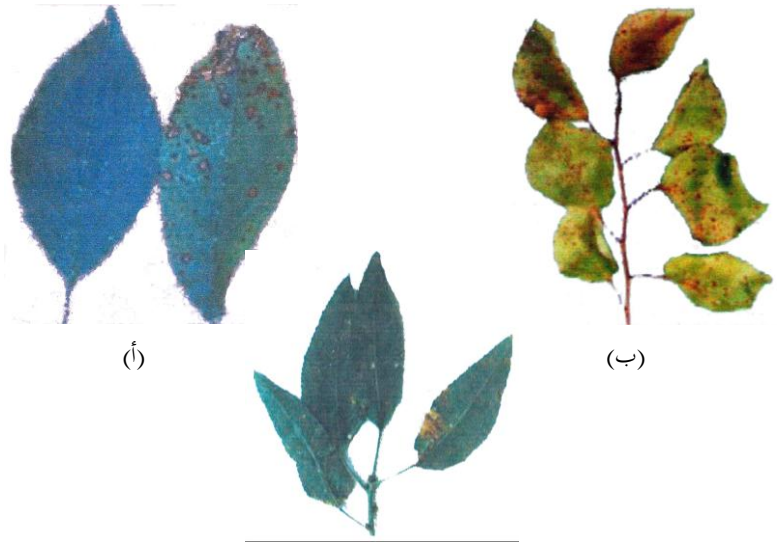
المدى العوائلي

يتضح من دراسة المدى العوائلي للبكتيريا *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* (جدول 6) أن للعزلات البكتيرية القدرة على إصابة كل من أوراق أشجار الخوخ ، والمشمش ، التفاح ، الكرز ، الورد وبعض أصناف البرقوق حيث ظهرت على النباتات الملقحة الأعراض النموذجية للمرض شكل (8-أ و ب) وكانت البكتيريا المعزولة من أنسجتها مماثلة في تفاعلها لصبغة جرام وترتيب خلاياها وحركتها وعدم تجرثمها للبكتيريا الملحقة في حين لم تظهر أعراض مرئية واضحة على أوراق كل من نبات الكمثرى وصنف البرقوق (Stanley) ومنتخبات من اللوز المر .

جدول 6 قابلية بعض أصناف نباتات العائلة الوردية للإصابة بالبكتيريا *Xanthomonas campestris*

العائل النباتي				القابلية للإصابة
الاسم العربي	الاسم الإنجليزي	الاسم اللاتيني	اسم الصنف	بالعزلات البكتيرية
البرقوق	Plum	*Prumus domestica*	Santarosa	+
البرقوق	Plum	*Prunus domestica*	Golden japanese	+
البرقوق	Plum	*Prunus domestica*	Stanley	–
الخوخ	Peach	*Prumus perisica*	Red haven	+
الخوخ	Peach	*Prumus perisica*	Nactarine	+
المشمش	Apricot	*Prunus armeniaca*	Sugar bar	+
اللوز الحلو	Almond	*Prunus amygdalus*		+
اللوز المر	Almond	*Prunus amygdalus*		–
الكمثرى	Pear	*Pyrus communis*	Santamaria	–
الكرز	Cherry	*Prunus avium*	Napoleon	+
التفاح	Apple	*Malus pumila*	Golden delicious	+
الورد	Rose	*Rosa* spp.		+

+ إيجابية الاختبار – سالبة الاختبار



(أ) (ب)

(ج)

شكل 8 يبين أعراض التبقع المتسبب عن البكتيريا *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* عند التلقيح لأوراق نبات : (أ) الورد ، (ب) التفاح ، (ج) اللوز

Association of the bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* with leaves spot disease in Green Mountin District

Fawzia M. Abonesira[1] **Fathi S. AlMesmari**[2] **Wail Y. AlDabbgh**[3]

Abstract

A survey conducted during spring 1997 of the diseases effecting stone fruit trees in Green Mountain district, revealed awide spread of leaf spot disease on Almond, Peach, Plum and Apricot trees. Subsequent studies on pathogenicity, morphological and physiobiochemical properties of the causal agent, indicated the association of the bacteria *xanthomonas campestris* pv. *pruni* with the disease symptoms. Studies on the host range showed that all isolates of the bacteria were able to infect and produce the typical disease symptoms on the leaves of peach, Amond, Plum, Cherry, Apple and Rose but not on the varity stanley of Plum and Bitter Almond varities. The bacterium was also found to survive the winter season in the flower buds and to retain its infectivity in diseased leave tissues for eight months which consequently provide a source of primary inoculm for spring infection of newly emerging leaves.

المراجع

أبو الذهب ، م والجعفراني ، م (1984) . البكتيريا : التمارين المعملية الأساسية ، دار المعارف القاهرة ، 130-177 .

العوامي ، ع (1996) ، دراسات على مرض التبقع البكتيري على نباتات الطماطم ، رسالة ماجستير ، كلية الزراعة ، جامعة عمر المختار ، 13-45 .

آمال أبو العلا (1999) ، فيروس جدري الخوخ على أشجار اللوزيات في مصر ، مجلة وقاية النبات العربية ، مجلد 17 ، 94 .

زكي ، س (1988) ، الميكروبيولوجيا التطبيقية المعملية ، مكتبة الأنجلو المصرية ، القاهرة ، 44-130 .

حنا ، د (1984) ، فاكهة المناطق المعتدلة ، مديرية دار الكتاب للطباعة والنشر ، جامعة الموصل ، العراق ، 25-60 .

[1] Biology Department.
[2] Plant Protection Department.
[3] Biology Department.

سيالة ، ع (1990) ، مذكرات في الدراسات البكتيريولوجية المعملية ، كلية العلوم ، جامعة الفاتح ، طرابلس ، 120–166 .

عبد الرحيم ، ع (1996) ، البكتيريا وأمراض النبات ، منشورات جامعة عمر المختار البيضاء ، 287–320 .

عبد الوهاب ، م (1989) ، الكائنات الدقيقة معملياً ، دار العرب للنشر والتوزيع ، القاهرة ، 100–167 .

عقل ، م (1999) ، الوضع الراهن للأمراض الفيروسية على أشجار اللوزيات . مجلة وقاية النبات العربية ، مجلد ، 17 ، 94 .

Anderson, P.C. and W.B. Sherman, (1995). New low chill peach and nectarine cultivars. University of Florida State Horticultural Society Meeting U.S.A 107: 1331-333.

Bradbury, J.F. (1986), Guide to plant pathogenic bacteria, CAB International Mycological Institute. Ferrylone, Kew. Surrey England.

Cappuccino, J.G. & Sherman, N (1992). Microbiology: Laboratory Manual. Rockland Community Collage, Suffern, New York.

Dhingra, O.D. & Sinclair, J.B. (1995). Basic Plant Pathology Methods. 2nd. ed. Lewis Publisher, Baco Raton, London.

Du-Plessis, H.J. (1987). Canker development on plum shoots following systemic movement of *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* from inoculated leaves. (Abst) Rev. plant pathol. 67: 379.

Fahy, P.C. (1983). Plant Bacterial Diseases, A diagnostic Guide. Academic Press INC. 107-188.

Goodman, R.N. (1968). The hypersensistive reaction in tobacco: Areflection of changes in host cell prmeability. Phyto pathol., 58: 872-873.

Goodman, R.N. (1972). Electrolyte leakge and membrane damage in relation to bacterial population, pH and ammonia in tobacco leaf tissue inoculated with *P. seudomonas pisi*. Phytopathology, 62: 1331-1334.

Hammerschlag, F.A. (1984). Optical evidence for an effect of culture filterates of *Xanthomonas campestris* on peach mesophlly cell memberanes. Plant. Sci. lett, 34: 295-304.

Hayword, A.C. et al., (1965). *Xanthomonas campestris* pv. *pruni* C.M.I. Description of Pathogenic Fungi & Bacteria. No. 50.

Holt, J. and S.T. William. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9th ed., Williams, U.S.A. 100-173.

Jindal, K.K. & R.C. Sharma. (1988). Occurrence of bacterial leaf spot of peach incited by *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. Rev. plant pathol. 1989. 68: 10.

Jones, J.B. and Scott. J.W. (1986). Hypersensitive response in tomato to *Xanthomonas campestris* pv.

spot of pepper. Plant. Dis., 80: 773-778.

Schaad, N.W. (1980). Laboratry guide for identification of plant pathogenic Bacteria. The American phytopathological Society.

Simeone, A.M. (1990). Observation on cultivar suscptibility of plum collection to natural infection by *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*. Rivista-di-frutticoltura-e-di-ortofloricoltura 52: 61-63.

Young, J.M. (1974). Effect of water on bacterial multiplication in plant tissue N.Z.J. Agric. Res., 17: 115-119.

Zehr, E.I.; Shepard, D.P. and W.C. Bridges. Bacterial spot of peach as influenced by water congestion, leaf wetness duration and temperture: plant-Dis., 80: 339-341.

vesicatoria. Plant Dis. 70: 337-339.

Kiraly, Z. Klement, Z. Solymosy, F. and Voros, J. (1974). Methods in plant pathology. Elsevier Scientific Publishing Company. 117-178.

Lelliott, R.A. and Stead, D.E. (1987). Methods for the diagnosis of plant pathogenic bacteria. Blackwell Scientific publications, London. 66-197.

Mulrrean, A.N. and Schroth, M.N. (1982). Ecology of *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis* on persian English walnuts. Phytopathol. 72: 434-438.

Norris, J.R. and Ribbons, J.R. (1971). Methods in Microbiology. Academic Press, London.

Sahin, F. and Miller, S.A. (1996). Characterization of Ohio strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Causal agent of bacterial