



جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

التشخيص الجزيئي والتحليل الجينومي الكامل لبكتيريا
Curtobacterium flaccumfaciens المصاحبة
لمرض الذبول البكتيري في أشجار الزيتون

شيماء ياسين طه محمود الحمداني

رسالة ماجستير

في

علوم حياة

بإشراف

الأستاذ المساعد

الدكتور غزوان قاسم حسن

المستخلص:

جمعت (100) من عقد أشجار الزيتون المصابة بمرض الذبول الاوراق من مناطق مختلفة من مدينة الموصل (حي العربي ، قرية الفاضلية ، ناحية بعشيقية ، جامعة الموصل) للفترة من 1/6/2023 ولغاية 1/8/2023، نقلت العينات في زجاجات معقمة إلى مختبرات قسم علوم الحياة لعزل وتشخيص الأنواع البكتيرية بالاعتماد على الفحص المجهرى والاختبارات الكيموحيوية والتشخيص الجزيئي. ظهرت سلالات بكتريا *C. flaccumfaciens* النامية على وسط الاكار المغذي بشكل عصيات قصيرة صفراء الى برتقالية اللون. فيما يخص الاختبارات الكيموحيوية كانت السلالات موجبة لصبغة كرام، مستعمرات متحركة ، سالبة الاوكسديز، موجبة الكتاليز. كما تم إجراء اختبار الحساسية البكتيرية للمضادات الحيوية بطريقة الانتشار القرصي باستخدام (9) مجاميع مختلفة من أقراص المضادات الحيوية. وأظهرت النتائج ان العزلات (SHGH1, SHGH2, SHGH3, SHGH4, SHGH5) كانت حساسة للمضادات الحيوية (Amikacin, Chloramphenicol, Gentamicin,) ومقاومة للمضادين (Ciprofloxacin, Meropenem, Trimethoprim Nitrofurantoin)، ومقاومة للمضادين Cefotaxime و Cefixime. تم تشخيص 17 عزلة جزيئيا لانواع بكتيرية مختلفة بالاعتماد على الجين 16S rRNA وبتقنية الـ PCR وهي (6 عزلات) تعود لبكتريا *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas reinekei*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus yunnanensis*, *Kosakonia sp* وكانت نسبة التطابق الوراثي 99%, 97%, 99%, 99%, 99%, 99%, 98%, 99%, 99%, 99%, 99%, 91%, 99%, 99%, 99%, 99% مع العزلات المسجلة في بنك الجينات كالاتي : 17 (ON209684, MT484165, KP898898, KR906476, CP041259, OP102635, MT622589, MH325270, MN410649, MH542248, MK883125, MK823239, MT124571, OR016663, MK999978, MN733227, OU957238) على التوالي ارتبطت بكتيريا SHGH *C. flaccumfaciens* من خلال دقائق كوخ بمرض الذبول البكتيري في أشجار الزيتون *O. europaea* الموجودة في الموصل/ العراق. تم تحليل تسلسل الجينوم الكامل لبكتريا SHGH *C. flaccumfaciens* وتحميله في بنك الجينات GenBank تحت رقم الانضمام JAUMSN000000000.1. يتكون الكروموسوم الدائري من 3,834,306 قاعدة

نيوكليوتيدية، و70.7% من محتوى GC، و4,176 تسلسلاً لترميز البروتين، و53 جيناً من الحمض النووي الرايبوسومي (rRNA)، و7 جينات من الحمض النووي الرايبوسومي (rRNA)، و42 جيناً من الحمض النووي الرايبوسومي الناقل (tRNA). استناداً إلى تقنية تهجين-DNA ، DNA سيليكيا، هناك 11 سلالة مرتبطة ارتباطاً وثيقاً بسلالة SHGH. أظهر تحليل تسلسل جين 16S rRNA أن سلالة SHGH لها تشابه بنسبة 100% مع جين *flaccumfaciens* C.LMG 36645. وتتشابه بنسبة 99% مع جين *Curtobacterium allii* 20TX0166. كشف تحليل سلالة SHGH مع أكثر من 100 تكرار في اختبار التمهيد Bootstrap test. كشف تحليل سلالة SHGH عن وجود العديد من الأنزيمات التي تشفر الجينات المرتبطة بالأمراضية مثل انزيمات pectatelyase, pectatelyser, serine proteinase, glycosyl hydrolase transferase علاوة على ذلك ، أظهر تحليل تسلسل الجينوم لسلالة SHGH أنها تحتوي على أنزيمات beta 1-4 glucanase و beta 1-4 xylenase ، وعدة سلاسل قصيرة glycosidase, peptidase ومناطق تحلل الكلايكو بوليمر المحتملة -dominains-glycopolymer- degrading potential والمشتقة من العائلي الاولي.

Abstract:

(100) olive tree nodes infected with wilt disease collected leaves from different areas of Mosul city (Al-Arabi neighborhood, Al-Fadiliya village, Bashiqa district, University of Mosul) for the period from 1/6/2023 to 1/8/2023, the samples were transferred in sterile bottles to the laboratories of the Department of Life Sciences to isolate and diagnose bacterial species based on microscopic examination, biochemical tests and molecular diagnosis. Strains of *C. flaccumfaciens* developing on the nutrient acaronia medium appeared as short yellow to orange bacilli. For biochemical tests, strains were Gram-positive, mobile colonies, oxidase negative, catalase-positive. The results showed that the isolates (SHGH1, SHGH2, SHGH3, SHGH4, SHGH5) were sensitive to antibiotics (Amikacin, Chloramphenicol, Gentamicin, Ciprofloxacin, Meropenem, Trimethoprim Nitrofurantoin), and resistant to Cefixime and Cefotaxime. 17 molecular isolates of different bacterial species were diagnosed based on the gene molecular isolates of different bacterial species were diagnosed based on the 16S rRNA gene and PCR technology (6 isolates) belonging to the bacteria *Curtobacterium flaccumfaciens*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus warneri*, *Pseudomonas koreensis*, *Pseudomonas reinekei*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas sp*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter cloacae*, *Micrococcus yunnanensis*, *Kosakonia sp* The genetic match ratio was (99%, 97%, 99%, 99%, 99%, 99%, 99%, 98%, 99%, 99%, 99%, 99%, 99%, 99%, 99%, 99%, 91%, 93%, 97%, 99%, 99%, 99%) with isolates recorded in the genebank as follows: 17 (ON209684, MT484165, KP898898, KR906476, CP041259, OP102635, MT622589, MH325270, MN410649, MH542248, MK883125, MK823239, MT124571, OR016663, MK999978, MN733227, OU957238,) respectively The bacterium

C.flaccumfaciens SHGH has been associated with through Koch hypotheses with leaf wilt disease in *O. europaea* (olive trees) . located in the connector, Iraq. The whole genome sequence of bacteria was analyzed. *C. flaccumfaciens* SHGH1 and uploaded into the Global Genbank under accession number JAUMSN000000000.1. The circular chromosome consists of 3,834,306 nucleotide bases, 70.7% GC content, and 4,176 Protein coding sequences, 53 RNA genes, 7 rRNA genes, and 42 tRNA genes. Based on the DNA silica hybridization technology, there are 11 strains closely related to the SHGH strain. 16S rRNA gene sequencing analysis showed that the SHGH strain had 100% similarity to the *C.flaccumfaciens* LMG 36645 gene and 99% similarity to the *Curtobacterium allii* gene 20TX0166 with more than 100 repetitions in the Bootstrap test. SHGH strain analysis revealed the presence of several enzymes that encode pathogen-related genes such as pectatolyase, pectatolyser, serine proteinase, glycosyl hydrolase transferase Furthermore, genome sequencing analysis of the SHGH strain showed that it contains beta 1-4-glucanase and beta 1-4 xylenase enzymes, several short glycosidase, peptidase and potential glycopolymer degradation areas dominains-glycopolymer- degrading potential derived from the protobacterio phage.

**University of Mosul
College of Education
For Pure Science**



**Molecular Diagnosis and Whole of *Curtobacterium
flaccumfaciens* Bacteria Associated with Bacterial
Wilt Disease in from *Olea europeae***

Shaimaa Yaseen Taha Mahmud Al-Hamdany

M.Sc. Thesis

Biology

Supervised By

Assistant Professor

Dr. Ghazwan Qasim Hasan

2024 A.D.

1446 A.H.