جامعة الموصل
كلية التربية للعلوم الصرفة

دراسة وراثية وجزيئية لبكتريا من جنس الـ *Xanthomonas* المعزولة من بعض العوائل النباتية المصابة في مدينة الموصل

آلاء سعيد شيت الدليمي

اطروحة دكتوراه
علوم الحياة / علم النبات

بإشراف
الأستاذ

الدكتور خالد دحام احمد

1438 هـ

2017 م

الخلاصة Abstract

تضمنت هذه الدراسة جمع نماذج لاوراق وسيقان وثمار الخضر المصابة بالبكتريا التي تعود الى عدد من العوائل النباتية في مدينة الموصل لمدة 4 اشهر من مناطق الدندان والرشيدية والباعة المتجولين للفترة من شهر تشرين الثاني الى نهاية كانون الاول في عام 2011، ومن شهر تشرين الاول الى نهاية تشرين الثاني في عام 2012. وقد تم الحصول على 87 عزلة بكتيرية من هذه العينات المصابة. شخصت العزلات البكتيرية باستخدام الصفات المظهرية والزرعية والاختبارات الكيموحيوية. واظهرت النتائج بأن (72.4 %)63 عزلة بكتيرية كانت سالبة لصبغة كرام Gram Negative isolate بينما كانت (27.6%)24 عزلة بكتيرية موجبة لصبغة كرام Gram Positive isolate. وهذه العزلات تعود الى الانواع الاتية : *Pseudomonas aeruginosa* و *Xanthomonas* spp. و *Serratia marcescens* و *Klebsiella oxytoca* و *Staphylococcus aureus* و *Bacillus cereus*.

استخدمت تقانة الـ Random Amplified Polymorphism DNA (RAPD-PCR) مع 10 بادئات عشوائية للكشف عن التباين الوراثي لعزلات بكتريا Xanthomonas. وكان ظهور مستوى التنوع الوراثي واطئاً مابين العزلات من نفس المصادر النباتية المصابة. بينما كان التنوع الوراثي يتولد بمستوى عالٍ مابين عزلات بكتريا Xanthomonas المعزولة من مصادر اصابة مختلفة.

فضلاً عن ذلك اختبرت مقاومة العزلات البكتيرية لـ 10 مضادات حيوية و5 من املاح المعادن الثقيلة واظهرت النتائج انماطاً مختلفة من المقاومة حيث كانت اعلى مقاومة لجميع العزلات البكتيرية للمضاد الحيوي الامبسلين (Ap) بمعدل 79.2%، اما بالنسبة لاملاح المعادن الثقيلة كانت اعلى مقاومة ولجميع العزلات البكتيرية لكلوريد الخارصين ($ZnCl_2$) بمعدل 91.8%. واستخدمت هذه الانماط المختلفة كعلائم وراثية مابين العزلات لانجاز التحول الوراثي والاقتران البكتيري. واظهرت تقانة كروماتوغرافي الطبقة الرقيقة Thin-Layer Chromatography (TLC) أنّ السكر المتعدد الخارج خلوي Extracellular Polysaccharide (EPS) له مكونات الزانثان.

اختيرت عزلات بكتيرية مختلفة لتوصيف محتوى الـ DNA البلازميدي لها باستخدام تقانة الترحيل الكهربائي في هلام الاكاروز Agarose Gel Electrophoresis. معظم العزلات تبين فيها حزمة واحدة فقط من الـ DNA البلازميدي بحجم اكبر من 16.841 كيلو قاعدة في هلام الاكاروز. فضلاً عن ذلك حددت مواقع الجينات مانحة المقاومة لبعض المضادات الحيوية وبعض املاح المعادن الثقيلة في عزلات بكتريا الزانثوموناس من خلال التحول الوراثي. اظهرت

النتائج ان جينات مانحة المقاومة للمضادات الحيوية تتراسايكلين (Tc) وكلورامفنيكول (Cm) وجينتامايسين (Gen) وارثرومايسين (Er) وستربتومايسين (Sm) وريفامبين (Rf) وملح المعدن الثقيل كلوريد الكادميوم ($CdCl_2$) واقعة على الـ DNA البلازميدي وبلغ تردد التحول الوراثي 0.11×10^{-5}.

اختيرت عزلات من الاجناس البكتيرية قيد الدراسة تعمل كواهبات في عمليات الاقتران البكتيري مع السلالات البكتيرية القياسية كمستلمات بعد ايجاد على الاقل عليمتين وراثيتين. نجحت معظم محاولات الاقتران للكشف عن قابلية محتوى الـ DNA البلازميدي للعزلات البكتيرية الواهبة على الحركة، الانتقال والتضاعف في البكتريا المستلمة وكان مدى تردد الاقتران من 0.12×10^{-6} الى 0.13×10^{-4}. كذلك انجزت عمليات الاقتران ما بين الاجناس البكتيرية المختلفة المعزولة من نفس منطقة الاصابة على النبات. اظهرت النتائج قابلية محتوى الـ DNA البلازميدي في الخلايا الواهبة على الحركة والانتقال خلال المجاميع البكتيرية المختلفة لصبغة كرام المشتركة في الاقتران وكان مدى تردد الاقتران من 0.10×10^{-6} الى 0.9×10^{-3}.

توصيف اخر لمحتوى الـ DNA البلازميدي لبكتريا الزانثوموناس تم دراستها. اظهرت النتائج أنّ العناصر القافزة الحاملة لصفة المقاومة للكلورامفنيكول (Cm) موجودة في محتوى الـ DNA البلازميدي وان هذا النوع لا يترك نسخة منه في الموقع الاصلي بعد التحفيز.

Abstract

The present study includes collection of samples of leaves, stems and vegetable infected by bacteria from vegetables that belong to many plant families in Mosul city. The collection lasts four months from Al-Danadan, Al-Rashidiya and Wandering sellers on November to end of December in 2011 and October to end of November in 2012. Eighty seven bacterial isolates were obtained from these infected samples. They were Identified using morphological, cultural characters and biochemical tests. The results revealed that 63(72.4%) of bacterial isolates are Gram negative while 24(27.6%) isolates are Gram positive. These bacteria belong to the following species, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas* spp., *Serratia marcescens*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*.

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD-PCR) reactions with 10 random primers were used to detect the genetic variations among Xanthomonas bacterial isolates. Genetic diversity values appear to be low among isolates from the same infected plant source which mean that they are related to each other. While high diversity value generated when Xanthomonas bacterial isolates are from different infected sources.

Furthermore, the resistance of the bacterial isolates understudy to (10) antibiotics and also to 5 salts of heavy metals were carried out. The results showed different patterns of resistance all bacterial isolates have highest resistance to Ampicillin (AP) with average of 79.2%, while for heavy metals salts highest resistance is for Zinc chloride ($ZnCl_2$) with average of 91.8%. These variation patterns will be used as genetic markers among isolates when performing genetic transformation and bacterial conjugation. In addition, Xanthomonas isolates differ in production of extracellular polysaccharide (EPS). Thin-layer

chromatography (TLC) revealed that the produced EPS has xanthan components .

Characterization of the plasmid DNA content of different chosen bacterial isolates were performed using gel electrophoresis technique. Most of isolates showed only one clear DNA band with size more than 16.841 kb appear in agarose gel. In addition, locations the genes conferring resistance to some antibiotic and heavy metals salts in *Xanthomonas* isolates, were determined by genetic transformation with frequency of $0.11x\ 10^{-5}$. Genes encoding resitance to antibiotics Tetracycline (Tc), Chloramphenicol (Cm), Gentamicin (Gen), Erythromycin (Er), Streptomycin (Sm), Rifampin (Rf) and to Cadmium chloride ($CdCl_2$) are located on their plasmid DNA content.

Bacterial isolates were chosen from each genus understudy for conjugation processes acting as donars with standard bacterial strains acting as recipients after using at least two suitable genetic markers. Most of conjugation trials were succeed which indicate that plasmid DNA content in donar isolates have the capability to mobilize, transfer and replicate in recipient bacteria with conjugation frequency ranges from $0.12x10^{-6}$ to $0.13x10^{-4}$. Also conjugation among different bacterial genera isolated from the same infected site on plant, were performed. The results showed that there is a capability for the plasmid DNA content in donars to mobilize and transfer with conjugation frequency $0.10x10^{-6}$ to $0.9x10^{-3}$, although different groups of Gram stain bacteria were included in conjugation experiments.

Another characterization for plasmid DNA content of Xanthomonas bacteria was added. Transposable element carrying chloramphenicol resistance appear to be found in plasmid DNA content and it is related to group that does not leave a copy of it in its original site after induction.

University of Mosul
College of Education
For Pure Science

Molecular and Genetic Study of Bacteria of Genus *Xanthomonas* Isolated from some Infected Plant Families in Mosul City

Alaa' Saeed Sheet Al-Delemy

Biology / Botany

Supervised By

Professor

Dr. Khalid Daham Ahmed

2017 A.D. **1438 A.H.**