توصيف عزلات بكتيريا التدرن التاجي *Agrobacterium tumefaciens* من بعض أنواع الأشجار المثمرة في سورية

عبد اللطيف محمد الغزاوي[1*]، محمود أبو غرة[2] ومحمد جمال مندو[1]

(1) إدارة بحوث وقاية النبات، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية؛ (2) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية.

*البريد الإلكتروني للباحث المراسل: ghazawi11@gmail.com

الملخص

الغزاوي، عبد اللطيف محمد، محمود أبو غرة ومحمد جمال مندو. 2026. توصيف عزلات بكتيريا التدرن التاجي *Agrobacterium tumefaciens* من بعض أنواع الأشجار المثمرة في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 44(2):134−141. https://doi.org/10.22268/AJPP-001393

جمعت 35 عينة ظهرت عليها أعراض أورام مرض التدرن التاجي من أشجار مثمرة مختلفة (إجاص، تفاح، لوز وتفاح قزمي) من محافظات القنيطرة وحمص والسويداء ودمشق في الفترة بين عامي 2020 و2021. عزلت 85 عزلة من هذه الأورام وأظهرت 46 عزلة منها قدرة إمراضية واضحة على أقراص الجزر والبطاطا/البطاطس، نبات عباد الشمس وثمار الكوسا، وكانت أشكال المستعمرات نموذجية في أوساط الزرع. أجريت الاختبارات البيوكيماوية والجزيئية على هذه العزلات بهدف توصيفها، وقد انتمت كل العزلات للنوع *Agrobacterium tumefaciens* وقسمت العزلات نتيجة للاختبارات البيوكيماوية إلى ثلاث أنماط حيوية biovars ممرضة: الأنماط 1 و2 ونمط متوسط بينهما. تم الكشف عن الممرض جزيئياً بواسطة اختبار PCR فاستخدمت البادئة VCF3/VCR3 التي تستهدف المورثة Virc وتكشف الأنواع الممرضة من *Agrobacterium* spp.، وتم التأكيد من خلال كشف مورثة الشراسة Vird2 بواسطة البادئة VIRD2A-VIRD2C. تم تحديد نمط الأوبين المحمول على البلاسميد باستخدام زوجين من البادئات المتخصصة وتبين أن جميع العزلات تتبع نمط النوبالين ولم تكتشف أي عزلة من نمط الأكتوبين.

كلمات مفتاحية: تدرن تاجي، نوبالين، *Agrobacterium tumefaciens*، PCR.

المقدمة

يعدّ مرض التدرن التاجي (Crown gall) المتسبب عن البكتيريا *Agrobacterium* spp. من أهم الأمراض البكتيرية المستوطنة في التربة التي تسبب مشاكل اقتصادية على مستوى العالم. يصيب هذا المرض بشكل رئيس النباتات ثنائية الفلقة وبعض نباتات وحيدة الفلقة (Kerr & Panagopoulos, 1977)، ويعدّ النوع *Agrobacterium tumefaciens* الأكثر خطورة على إنتاج العديد من الغراس في المشاتل ويسبب خسائر اقتصادية واسعة النطاق في إنتاج غراس أشجار الفاكهة وشجيرات الورد في كثير من البلدان (Pulawska, 2010؛ Young *et al.*, 2001). يمكن أن يصيب النوع *A. tumefaciens* بحدود 140 جنساً ضمن 90 عائلة نباتية معظمها من الأشجار المثمرة ذات النواة ونباتات الزينة والعليق، ويكون الضرر كبيراً على الغراس بعمر سنة أكثر منها على الغراس بعمر سنتين (Roberts & Boothroyd, 1975). تكمن خطورة المرض عند تكرار زراعة الغراس في المشتل نفسه لأن هذه البكتيريا من ساكنات التربة ولها مدى عوائلي واسع (Bradbury, 1986)، مما يقلل من جدوى اتباع الدورة الزراعية للحدّ من انتشاره (Roberts & Boothroyd, 1975).

تحوي الخلية البكتيرية لهذا الممرض بلاسميداً كبيراً محفزاً للورم (Ti plasmid) وهو المسبب للقدرة الإمراضية لاحتوائه على مورثات الشراسة التي تساهم في إرسال قطعة من الحمض النووي T-DNA تسبب انقساماً خلوياً غير منضبط في منطقة الإصابة وتشكل الأورام (Elwin *et al.*, 2008). تتلخص أعراض المرض بزيادة في حجم الخلايا النباتية المصابة (Hypertrophy) وزيادة عددها (Hyperplasia) (Kawaguchi *et al.*, 2017)، ويصنف البلاسميد بشكل تقليدي وفقاً لنوع الأوبينات (Christie & Gordon, 2015). بينت الدراسات السابقة وجود أكثر من نمط لبلاسميد بكتيريا التدرن التاجي ويحتاج التفريق بينها إلى استخدام الطرائق الجزيئية كاختبار PCR (Tan *et al.*, 2003).

بينت دراسة أولية انتشار المرض في المناطق الجنوبية والوسطى من سورية (غنام وأبو غرة، 2008). وبما أن زراعة الأشجار المثمرة كالتفاحيات (التفاح والإجاص)، واللوزيات (الدراق، اللوز والخوخ) منتشرة في جميع المحافظات في سورية، وليس ثمّة إشارات لوجود المرض في

https://doi.org/10.22268/AJPP-001393
© 2026 الجمعية العربية لوقاية النبات Arab Society for Plant Protection

مناطق أخرى مرجعية أو بحثية، لذلك هدف هذا البحث إلى عزل البكتيريا المسببة لمرض التدرن التاجي من أشجار فاكهة مختلفة وتفريقها وتحديد سلالاتها.

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات

جمعت العينات من نباتات الإجاص البذري عليها أورام صغيرة جداً من مشتل في القنيطرة خلال فترة قلع الغراس في المشاتل (شهر كانون الأول/ديسمبر وكانون الثاني/يناير) وأخذت عينات من التفاح القزمي المعمر مزروع في أرض دائمة في إحدى المشاتل في منطقة العدوي بدمشق. كذلك جمعت عينات من جذور أشجار لوز بعمر 12 سنة في منطقة خربة عواد في محافظة السويداء وكذلك من التفاح من محافظة حمص (وادي رباح) وذلك في عامي 2020 و2021، وضعت العينات في أكياس من البولي ايثلين وأعطي لكل عينة رقم وبيانات خاصة بها، مثل المحافظة والمنطقة والبستان أو المشتل والصنف وتاريخ الجمع، ونقلت إلى المختبر لعزل البكتيريا.

عزل البكتيريا

تم غسل العينات المصابة بماء الصنبور بشكل كثيف لإزالة الأتربة العالقة بشكل نهائي، ثم وضعت الأورام بعد تجفيفها في محلول هيبوكلوريد الصوديوم (ماء جافيل) بتركيز 1% لمدة دقيقتين ثم نقلت بشكل متتالي إلى أطباق بتري معقمة فيها ماء مقطر معقم، ليتم التخلص من آثار ماء جافيل، وضعت بعدها ضمن أطباق بتري معقمة وقطعت لقطع صغيرة ثم غمرت بماء مقطر معقم لعدة ساعات، أو وضعت عليها قطرات ماء مقطر معقم وتم هرسها بالهاون وتركت لمدة نصف ساعة. أخذت بعد ذلك قطرة من المعلق ونشرت في أوساط متخصصة لبكتيريا *Agrobacterium* spp. مثل (Roy & Sasser 1983) وسط RS ووسط YMACثم حضنت عند درجة حرارة 28°س لمدة 5 أيام ثم تم تنقيتها في وسط King B (Tolba & Soliman, 2014). تمّ حفظ العزلات في أنابيب أبندورف في وسط سائل Luria broth مع غليسرين معقم بتركيز 40% بعد ترقيمها، ثم وضعت في المجمدة.

اختبار القدرة الإمراضية

أجري اختبار القدرة الإمراضية باستخدام معلق بكتيري بتركيز 10^8 وحدة مشكلة للمستعمرة /مل من كل عزلة بكتيرية، حيث تم اجراء جرح على النبات ووضعت قطرة من المعلق البكتيري بواسطة محقن طبي معقم وبثلاثة مكررات للعزلة الواحدة. وضع المعلق البكتيري في ساق نبات عباد الشمس (*Helianthus annus*) (شتول بعمر 3 أسابيع) واستخدم نباتان للعزلة الواحدة، وحقن كل نبات في ثلاثة مواقع على الساق، وغلفت النباتات بأكياس بولي إيثيلين لمدة يومين. تمت تغطية مكان العدوى بالبارافيلم وتركت النباتات عند درجة حرارة المختبر لمدة 3 أسابيع بانتظار نتائج العدوى. أما أقراص الجزر، فقد وضعت ضمن أطباق بتري ووضع تحتها ورقة نشاف معقمة مبللة بماء مقطر معقم بهدف توفير رطوبة كافية، ووضع على سطحها 100 ميكروليتر من معلق بكتيري بتركيز 10^8 وحدة مشكلة للمستعمرة/مل على سطح القرص، ومن ثم حضنت لمدة تتراوح في حدود 2–3 أسابيع عند درجة حرارة 28°س. استخدمت ثلاثة مكررات للعزلة الواحدة على أقراص الجزر واستخدمت و الطريقة نفسها على درنات البطاطا/البطاطس، أما على ثمار الكوسا فقد تم تعقيمها وتثقيبها بإبرة معقمة وحقنها بالمعلق ذاته ووضعها في حجرة زجاجية رطبة (ناقوس) لمدة 3 أو 4 أسابيع (Bini *et al.,* 2008؛ Islam *et al*., 2010).

التوصيف الشكلي والكيميائي الحيوي /البيوكيميائي

وصفت العزلات البكتيرية من الناحية الشكلية (لون المستعمرة وشكلها وحجمها) كما أجري عليها مجموعة من الاختبارات الكيميائية الحيوية القياسية بهدف تمييز الأنماط الحيوية وأهمها صبغة غرام واختبار الأوكسيداز بالإضافة إلى استهلاك السكريات وإنتاج 3–كيتولاكتوز والكاتالاز وإنتاج الحمض من الإريثريتول والسكروز والنمو على 2 و 5% كلوريد الصوديوم والنمو عند درجتي حرارة 28 و 35°س (أبو غرة ودوجي، 1996؛ Moore *et al.,* 2001).

الكشف عن الممرض باستخدام اختبار PCR

تم استخلاص الـDNA بزراعة البكتيريا في وسط PDA لمدة 48 ساعة (Kawaguchi *et al*., 2005) وبعدها حلّت البكتيريا بماء مقطر معقم ثم تم تسخينها عند درجة حرارة 95°س لمدة 10 دقائق ثم برد المعلق بالثلج لمدة 5 دقيقة وثفلت عند سرعة 8000 دورة بالدقيقة لمدة 5 دقائق ثم أخذ الجزء الطافي الحاوي على DNA حتى يستخدم في اختبار الـ PCR أو للتخزين عند درجة حرارة −20°س (Kuzmanović *et al*., 2012).

استخدم زوج البادئات VCF3/VCR3 التي تكشف أنواع *Agrobacterium* الممرضة الحاملة للبلاسميد Ti أو Ri بطريقة colony PCR مباشرة (Suzaki *et al.*, 2004)، وتمّ استخدام زوج البادئات VIRD2A-VIRD2C والتي تكشف بشكل أساسي عن المورثة (VirD2) المسؤولة عن القدرة الامراضية في الممرض *A. tumefaciens* و *A. rhizogenes* (Haas *et al*., 1995). كما تم استخدام البادئات RBF-RBR و OCSF-OCSR لتمييز نمطي النوبالين والأكتوبين، على التوالي، في بلاسميد الممرض *Agrobacterium tumefaciens* (Tan *et al*., 2003). تم استخدام مزيج الإنزيم Taq Ready Mix 2X

بحجم تفاعل 20 ميكروليتر وتم تضخيم قطعة DNA المستهدفة مع زوج البادئات VCF3/VCR3 وفق البرنامج الحراري التالي: حرارة التنشيط 94°س لمدة 5 دقائق ثم 35 دورة 94 و 56 و 72°س لمدة دقيقة واحدة عند كل درجة حرارة والاستطالة النهائية 72°س لمدة 5 دقائق (Kuzmanović *et al.*, 2012).

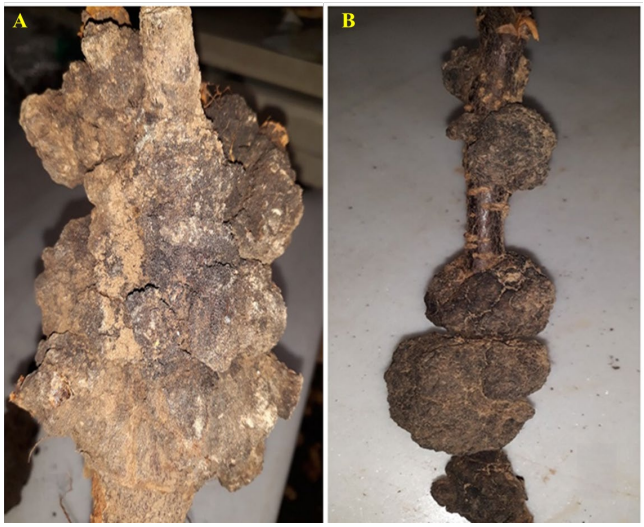
بالنسبة لزوج البادئات VIRD2A- VIRD2C فقد كانت حرارة التنشيط 94°س لمدة دقيقة عند 94°س، تلاها 40 دورة عند 94، 50 و 72°س لمدة دقيقة واحدة عند كل درجة حرارة، والاستطالة النهائية عند 72°س لمدة 5 دقائق (Haas *et al.*, 1995). وكانت حرارة التنشيط لزوج البادئات RBF-RBR 94°س لمدة دقيقتين، تلاها 35 دورة عند 94، 60 و 72°س لمدة دقيقة واحدة عند كل درجة حرارة، ثم الاستطالة النهائية عند 72°س لمدة 5 دقائق. وكانت حرارة التنشيط لزوج البادئات OCSF-OCSR 94°س لمدة 3 دقائق، تلاها 35 دورة عند 94 و 58 و 72°س لمدة دقيقة واحدة عند كل درجة حرارة، ثم الاستطالة النهائية عند 72°س لمدة 5 دقائق (Tan *et al.*, 2003).

وضعت نواتج التفاعل في جهاز الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة آجاروز بتركيز 2% وسلم جزيئي بتدريج 100 زوج قاعدي، وتم إجراء الرحلان الكهربي باستخدام تيار كهربائي 75 فولت لمدة 90 دقيقة، وتم تصوير النطاقات باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (Tolba & Soliman, 2014).

النتائج والمناقشة

جمع العينات

تم جمع 35 عينة منها 9 عينات من نباتات الإجاص البذري من مشتل في القنيطرة عليها أورام صغيرة جداً بلون بني على الجذور تراوح قطر الواحدة منها بين 0.5 و1 سم؛ تمّ أخذها خلال موسم قلع 2020. كما جمعت 16عينة تفاح قزمي من مشتل في منطقة العدوي بدمشق ظهرت عليها أورام صغيرة بلون بني في منطقة التاج وبعضها على الأفرع القريبة من الأرض ولا يتجاوز قطر الواحدة منها 1 سم، وعينتين من الساق الرئيسة، بالقرب من التاج، لشجرة تفاح معمرة في محافظة حمص. كما تم جمع 8 عينات خلال عام 2021 من بستان لوز عمره 12 عاماً في منطقة خربة عواد في محافظة السويداء، وهي مصابة بالتدرن التاجي وظهرت على جذور معظم الأشجار أورام كبيرة تجاوز قطر بعضها 10 سم (شكل A-1)، وظهرت الأورام على كل تفرعات الجذور بما فيها الجذر الرئيس، وبعض التفرعات ظهرت عليها أكثر من 5 كتل ورمية كبيرة (شكل B-1).



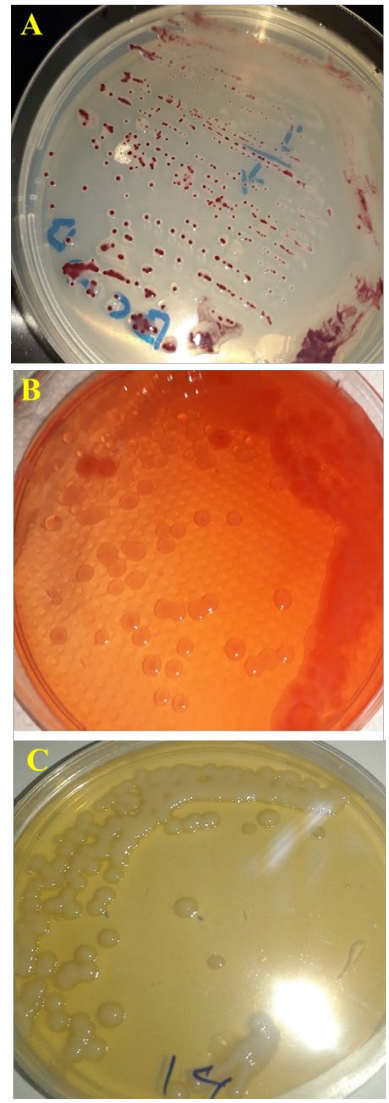
شكل 1. أعراض الإصابة على اللوز.
Figure1. Symptoms of Infection on Almond.

جدول 1. البادئات المستخدمة في اختبار PCR لكشف وتمييز بكتيريا التدرن التاجي (*Agrobacterium tumefaciens*).
Table. 1. Primers used in PCR for the detection and discrimination of crown gall bacterium, *Agrobacterium tumefaciens* isolates.

تخصص البادئة Primer specificity	طول الحزمة (زوج قاعدي) fragment Length (bp)	التسلسل Sequence	البادئات Primers
مورثة الشراسة VirC VirC gene	414	5’- GGG GCA GGA TGC GTT TTT GAG-3’ 5’- GAC GGC ACT GGG GCT AAG GAT-3’	VCF3 VCR3
مورثة الشراسة VirD2 VirD2 gene	224	5’-ATGCCCGATCGAGCTCAAGT-3’ 5’-TCGTCTGGCTGACTTTCGTCATAA-3’	VIRD2A VIRD2C
الأكتوبين Octopine type	298	5’-ATGGCTAAAGTGGCAATTTTGGG-3’ 5’-TCAGATTGAASTTCGCCAACTCG-3’	OCSF OCSR
النوبالين Nopaline type	200-206	5’-TGACAGGATATATTGGCGGGTAA-3’ 5’-TGCTCCGTCGTCAGGCTTTCCGA-3’	RBF RBR

عزل البكتيريا

تمّ عزل 85 عزلة بكتيرية من العوائل المختلفة (20 عزلة من الإجاص، 36 من التفاح القزمي، 21 من اللوز و 8 من التفاح) وكانت نموذجية من الناحية الشكلية في وسط RS، فكانت دائرية مسطحة قليلاً ومرتفعة قليلاً عن البيئة الزرعية، حوافها بيضاء منتظمة مخاطية قليلاً وذات مركز أحمر دموي مقبب في المركز فقط، قطرها 2–3 مم بعد 3–4 أيام (شكل A-2). بينما ظهرت على وسط YMAC شفافة دائرية مسطحة حوافها منتظمة مخاطية وذات مركز أحمر فاتح قطرها 3–5 مم بعد 3–4 أيام (شكل B-2) وكانت نصف شفافة على وسط PDA ودائرية مسطحة قليلاً تميل إلى المقبب، حوافها منتظمة مخاطية قليلاً قطرها 3–4 مم بعد 3–4 أيام (شكل C-2).

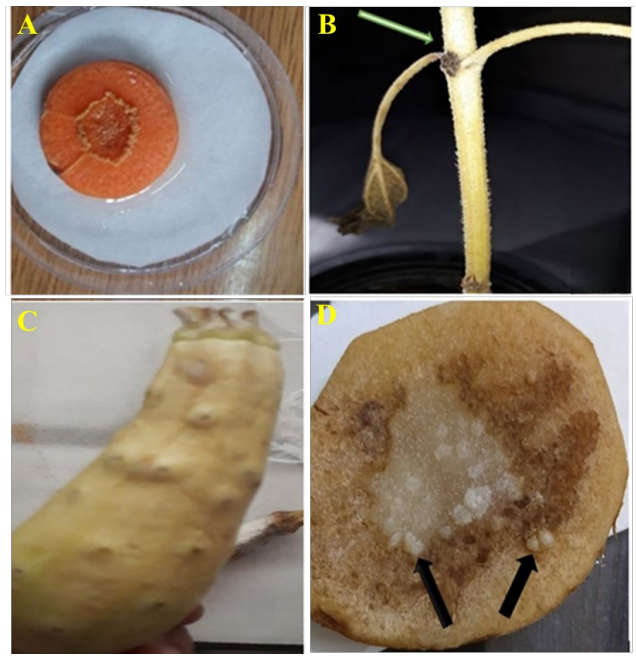


شكل 2. شكل نمو عزلات بكتيريا التدرن التاجي على الأوساط المختلفة؛ A= وسط RS، B= وسط YMAC، C= وسط PDA.

Figure 2. Morphology of isolates of crown gall bacterium on different growth media: A= RS, B= YMAC, C= PDA.

القدرة الإمراضية

أظهرت 46 عزلة (عزلتان من التفاح، 19 من التفاح القزمي، 15 من الإجاص و 10 من اللوز) (جدول 1) قدرة إمراضية واضحة على أقراص الجزر حيث تشكلت أورامٌ صغيرة على أقراص الجزر وبخاصة عند الحلقة الوعائية بعد أسبوعين من العدوى. كذلك بدأت تظهر الأورام على ثمار الكوسا وأقراص البطاطا/البطاطس بعد 3 أسابيع بشكل واضح. أما على عباد الشمس، فقد ظهرت الأعراض بعد 21–30 يوماً (شكل 3). كانت جميع العزلات الـ 46 ممرضة على أقراص الجزر و البطاطا/البطاطس وثمار الكوسا ونبات عباد الشمس. تم إعادة العزل من الأورام الصغيرة على شرائح الجزر ومن عباد الشمس على وسط RS لتظهر المستعمرات بشكل نموذجي بعد 5 أيام وذلك بهدف التأكد من فرضية كوخ (Tolba & Soliman, 2014).



شكل 3. أعراض العدوى ببكتيريا التدرن التاجي على: الجزر (A)، عباد الشمس (B)، ثمار الكوسا (C) أقراص البطاطا/البطاطس (D).

Figure 3. Symptoms of infection of *Agrobacterium tumefaciens* on carrot discs (A), sunflower (B), potato discs (C) and squash fruit (D).

الاختبارات البيوكيميائية

كانت كل العزلات الممرضة سالبة لصبغة غرام ومعظمها موجب تجاه الأوكسيداز ومتباينة في القدرة على تحمل 2 و 5% من NaCl، كما نمت كل العزلات عند درجة حرارة 28°س وليس عند 35°س وكانت متباينة لاختبار الكاتالاز واختبار انتاج 3-Ketolactose واستهلاك السكروز والإريثريتول. لذلك قسمت العزلات إلى ثلاث أنماط حيوية 1 و 2 وثالث متوسط بينهما (Moore *et al*;.2001) (جدول 2).

جدول 2. مصادر العزلات ونتائج الاختبارات البيوكيميائية على العزلات الممرضة.

Table 2. Isolates sources and results of biochemical tests on pathogenic isolates.

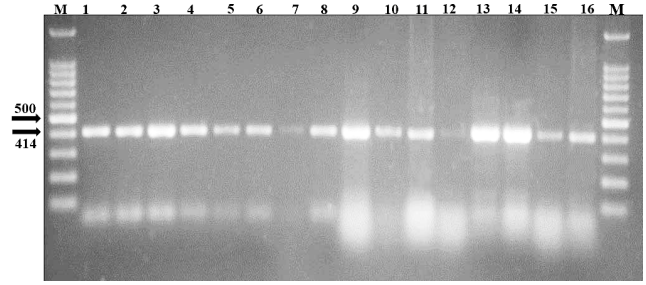
النمو على حرارة (°س) Growth at temp. (°C)		انتاج الحمض من Acid production from		انتاج الكاتالاز Catalase production	انتاج 3 كيتولاكتوز Production of 3 ketolactose	تحمل الملح NaCl tolerance		أوكسيداز Oxidase	اختبار غرام Gram test	رمز العزلة Isolate code	مصدر العزلة Isolate source
28	35	إيرثريتول Erythritol	سكروز Sucrose			%5	%2				
+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	PF1.1*	إجاص
+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	PF1.2*	Pear
+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	PF1.3*	
+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	PF3*	
+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	PF5.1	
+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	PF5.2**	
+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	PF6.1**	
+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	PF6.2**	
+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	PF7*	
+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	PF14	
+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	PF16.1**	
+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	PF19.2	
+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	PF21.1**	
+	-	+	+	+	-	-	+	+	-	PF21.3	
+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	PF22**	
+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	BC1.1	لوز
+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	BC1.2	Almond
+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	BC2.2*	
+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	BC2.3	
+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	BC3.1**	
+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	BC6.1	
+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	BC6.2	
+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	BC11.1*	
+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	BC11.3	
+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	BC12.2**	
+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	TK 1.2**	تفاح قزمي
+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	TK1.3**	Dwarf apple
+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	TK 2.1*	
+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	TK3.2*	
+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	TK 4*	
+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	TK 5.1**	
+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	TK 6.1	
+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	TK 7.1	
+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	TK 9.3	
+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	TK 10.1**	
+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	TK10.2**	
+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	TT2.2*	
+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	TT3.1**	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	TT3.3*	
+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	TT4.2	
+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	TT4.3**	
+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	TT5.1	
+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	TN1.1*	
+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	TN3.1*	
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	TH5.1*	تفاح
+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	TH5.2*	Apple

*= نمط حيوي 1، **= نمط حيوي 2، += نتيجة موجبة، - = نتيجة سلبية.

*= biovar 1, **= biovar 2, += positive result, -= negative result.

الكشف عن الممرض باستخدام اختبار PCR

أعطت جميع العزلات الممرضة حزمة واضحة بطول 414 زوج قاعدي بالنسبة للبادئات VCF3/VCR3 (شكل 4) وكذلك أعطت جميع العزلات حزمة واضحة بطول 224 زوج قاعدي بالنسبة للبادئات VIRD2A-VIRD2C (شكل 5)، وبالتالي فإن جميع العزلات كانت من النوع *A. tumefaciens* لأن *A. rhizogenes* يسبب مرض الجذور الشعرية ولا يسبب أوراماً.

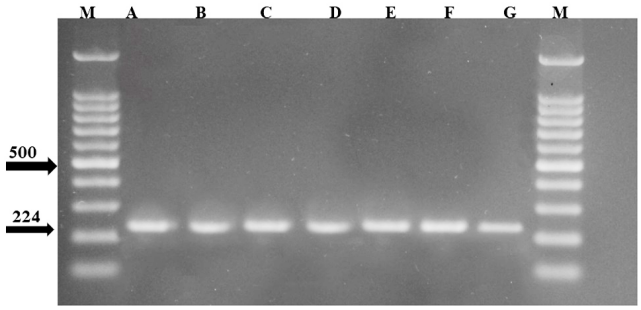


شكل 4. ناتج الرحلان الكهربائي لتفاعل PCR للكشف عن بكتيريا التدرن التاجي *Agrobacterium tumefaciens* بواسطة البادئات VCF3/VCR3. الخطوط 1 إلى 6 تمثل العزلات الممرضة المعزولة من اللوز، الخطوط 7 و 8 و 9 تمثل العزلات من الإجاص، الخطوط 10 إلى 14 تمثل التفاح القزمي، والخطوط 15 و 16 تمثل التفاح. الخط M يمثل سلم مؤشرات الحجم الجزيئي.

Figure 4. Electrophoresis results from PCR for the detection of crown gall bacteria *Agrobacterium tumefaciens* using primers VCF3/VCR3. Lanes 1 to 6 represent pathogenic isolates from almonds, lanes 7, 8, and 9 represent isolates from pears, lanes 10 to 14 represent dwarf apple and lanes 15 and 16 represent apple. Lane M represents molecular size markers.

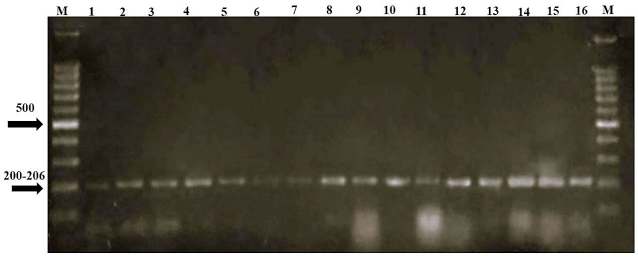
كان بلاسميد كل العزلات الممرضة المعزولة من التفاح والإجاص والتفاح القزمي واللوز من نمط النوبالين، حيث أظهرت جميعها باختبار PCR للبادئات RBF-RBR المميزة لنمط النوبالين للعامل الممرض *A. tumefaciens* حزمة بطول 200–206 زوج قاعدي (شكل 6)، ولم تكن أي عزلة من العزلات الممرضة من نمط الأكتوبين حيث تم تأكيد هذه النتيجة بواسطة البادئات OCSF-OCSR المميزة لنمط الأكتوبين للعامل الممرض *A. tumefaciens* والتي لم تظهر أي تفاعل مع العينات (Tan *et al.*, 2003).

أسفرت عملية العزل عن اختيار العديد من العزلات التي يشتبه مبدئياً في انتمائها إلى بكتيريا *A. tumefaciens* نظراً لعزلها من أورام كروية من النباتات ولأنها شكلت مستعمرات نموذجية في أوساط زرع انتخابية مختلفة. ويعد نشوء الأورام باختبار القدرة الإمراضية دليلاً واضحاً على انتماء العزلة إلى جنس *Agrobacterium*، وهذا ما أشارت إليه أبحاث سابقة (Smith & Townsend, 1907؛ Tolba & Soliman, 2014).



شكل 5. ناتج الرحلان الكهربائي لتفاعل PCR للكشف عن بكتيريا التدرن التاجي *Agrobacterium tumefaciens* بواسطة البادئات VIRD2A-VIRD2C. الخطوط A و B تمثل العزلات الممرضة المعزولة من اللوز، الخطوط C و D تمثل العزلات الممرضة من الإجاص، الخطوط E و F تمثل العزلات الممرضة من التفاح القزمي، والخط G يمثل عزلة ممرضة من التفاح. الخط M يمثل سلم مؤشرات الحجم الجزيئي.

Figure 5. Electrophoresis results from PCR for the detection of crown gall bacteria *Agrobacterium tumefaciens* using primers VIRD2A-VIRD2C. Lines A and B represent pathogenic isolates isolated from almond, lanes C and D represent pathogenic isolates from pear, lines E and F represent pathogenic isolates from dwarf apple and lane G represents pathogenic isolate from apple, Lane M represents molecular size markers.



شكل 6. ناتج الرحلان الكهربائي لتفاعل PCR بواسطة البادئات RBF-RBR المميزة لنمط النوبالين للممرض *Agrobacterium tumefaciens*. الخطوط 1 إلى 6 تمثل العزلات الممرضة المعزولة من اللوز، الخطوط 7 و 8 و 9 تمثل العزلات من الإجاص، الخطوط 10 إلى 14 تمثل التفاح القزمي، والخطوط 15 و 16 تمثل التفاح. الخط M يمثل سلم الحجم الجزيئي.

Figure 6. Electrophoresis results from PCR using RBF-RBR primers characteristic of the nopaline type of *Agrobacterium tumefaciens*. Lanes 1 to 6 represent pathogenic isolates isolated from almond, lanes 7, 8, and 9 represent isolates from pear, lanes 10 to 14 represent dwarf apple, and lanes 15 and 16 represent apple. Lane M represents molecular size markers.

أظهرت جميع العزلات الممرضة قدرة إمراضية واضحة على أقراص الجزر والبطاطا/البطاطس خلال مدّة قصيرة نسبياً مقارنة بنبات عباد الشمس وثمار الكوسا، وذلك ربما لتوفر شروط عدوى مناسبة أكثر

مثل ضبط درجة الحرارة والرطوبة في الحاضنة بالإضافة لتخريش أكبر للخلايا عند القطع بالسكين، مما يوفر بيئة مثالية للممرض. لم تظهر تباينات بالعدوى الصناعية على النباتات الدالة (أقراص الجزر وعباد الشمس وأقراص البطاطا/البطاطس وثمار الكوسا) فجميعها أظهرت عدوى واضحة (Otten *et al*., 2008). لقد كانت نسبة العزلات الممرضة 54% من المجموع الكلي للعزلات (46 من أصل 85) مما يتوافق مع ما نشر سابقاً مع اختلاف النسب (غنام وأبو غرة، 2008). وكانت جميع العزلات الممرضة متطابقة كلياً من الناحية الشكلية ومتباينة من جهة الاختبارات الكيميائية الحيوية/البيوكيميائية، مما يشير إلى وجود أنماط ممرضة مختلفة. ونتيجة للاختبارات الشكلية (الشكل في أوساط الزرع) والبيوكيميائية والقدرة الإمراضية فإن جميع العزلات كانت تابعة للنوع *Agrobacterium tumefaciens*، واستناداً إلى خصائصها البيوكيميائية أمكن تقسيم هذه العزلات البكتيرية إلى ثلاثة أنماط حيوية ممرضة (biovars): 16 عزلة للنمط الأول، 15 عزلة من النمط الثاني و 15 عزلة كانت صفاتها البيوكيميائية متوسطة بين النمطين السابقين، وتتوافق هذه النتيجة مع دليل تصنيف نشر سابقاً (Moore *et al*., 2001) لبكتيريا *A. tumefaciens*، وكذلك تتوافق مع دراسة سابقة (غنام وأبو غرة، 2008)، فضلاً عن نتائج أبحاث في دول الجوار كمصر والأردن (Fakhouri & Khlaif, 1996 ؛Al-Karablieh & Khlaif, 2002؛ Tolba & Soliman, 2014).

إن استخدام البادئات VCF3/VCR3 وبطريقة Colony PCR يختصر الكثير من الوقت والجهد، فهي تكشف وجود جميع أنواع *Agrobacterium* الممرضة وبسهولة، وكذلك فإن استخدام البادئات VirD2A-VirD2C يدعم هذه النتائج، كما أمكن معرفة نوع الأوبينات التي يحملها البلاسميد باستخدام البادئات RBF-RBR المميزة لنمط النوبالين والبادئات OCSF-OCSR المميزة لنمط الأكتوبين للممرض *A. tumefaciens* (Tan *et al*., 2003)، حيث كانت جميع عزلات اللوز والتفاح والإجاص والتفاح القزمي من نمط النوبالين رغم أن عددها كبير نسبياً ومن مناطق جغرافية مختلفة ومن عوائل مختلفة. وربما يشير هذا إلى أن العزلات السورية من نمط النوبالين فقط أو أنه يجب زيادة البحث في مناطق أخرى وعلى عوائل أخرى بهدف التوسع في تنميط بلاسميد بكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* التي تصيب الأشجار المثمرة في سورية. يعدّ هذا البحث أول تسجيل موثق جزيئياً لبكتيريا التدرن التاجي من النوع *Agrobacterium tumefaciens* في سورية.

Abstract

Al-Ghazzawi, A.M., M. Abou Ghorra and M.J. Mendo. 2026. Characterization of Crown Gall Bacteria *Agrobacterium tumefaciens* Isolates from Some Fruit Tree Species in Syria. Arab Journal of Plant Protection, 44(2):134-141. https://doi.org/10.22268/AJPP-001393

35 samples showing symptoms of crown gall disease tumors were collected from different fruit trees (pears, apples, almonds and dwarf apples) from the governorates of Quneitra, Homs, Swaidaa and Damascus during the period 2020-2021. 85 isolates were isolated from galls, 46 isolates of them were pathogenic on carrot and potato discs, squash fruit and sunflower plants and showed a typical colony shape on growth media. Biochemical and molecular tests were done on the isolates and all of them were found to belong to *Agrobacterium tumefacien*s, Isolates were segregated according to biochemical tests into three biovars: I, II and a third one in the middle. The pathogen was detected molecularly by PCR, using VCF3/VCR3 primers which target VirC gene located on the Ti plasmid, and can detect all tumorigenic strains of *Agrobacterium* spp., and this was confirmed by detecting the virulence gene Vird2 using VIRD2A-VIRD2C primers pair. Opine type carried on Ti plasmids was determined using two specific primers which showed that all isolates did belong to the nopaline type and none of the isolates tested belonged to the octopine type.

Keywords: Crown gall, PCR, *Agrobacterium tumefaciens,* nopaline.

Affiliation of authors: *A.M. Al-Ghazzawi[1], M. Abou Ghorra[2] and M.J. Mendo[1]. (1) Plant Protection Research Administration, General Commission for Scientific Agricultural Research, Damascus, Syria; (2) Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, University of Damascus, Syria. *Email address of the corresponding author: ghazawi11@gmail.com*

المراجع

أبو غرة، محمود وزياد دوجي. 1996. أمراض النبات البكتيرية. جامعة دمشق. 256 صفحة.

*[**Abou Ghorra, M. and Z. Doji.** 1996. Plant Bacterial Diseases. University of Damascus. 256 pp. (In Arabic)].*

غنام، محبة ومحمود أبو غرة. 2008. دراسة انتشار مرض التدرن التاج *Agrobacterium tumefaciens* في بعض المشاتل السورية وتحديد الطرز الحيوية للبكتريا الممرضة، مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، 24(1):313-326.

References

*[**Ghannam, M. and M. Abou Ghorra.** 2008. A study on the distribution crown gall (Agrobacterium tumefaciens) disease in some Syrian nurseries and determination of its pathogenic biotypes. Journal of Damascus University for Agricultural Sciences, 24(1):313-326. (In Arabic)].*

Al-Karablieh, N. and H. Khlaif. 2002. Occurrence and distribution of crown gall disease in Jordan. Phytopathologia Mediterranea, 41(3):226-234.

Bini, F., A. Kuczmog, P. Putnoky, L. Otten, C. Bazzi, T.J. Burr and E. Szegedi. 2008. Novel pathogen-specific

Moore, L.W., H. Bouzar and T.J. Burr. 2001. *Agrobacterium*. Pp. 17–35. *In:* Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. 3rd edition. N.W. Schaad, J.B. Jones and W. Chun (eds.). APS Press, St. Paul, MN, USA.

Otten, L., T. Burr and E. Szegedi. 2008. *Agrobacterium*: a disease-causing bacterium. Pp. 1-46. *In: Agrobacterium:* From Biology to Biotechnology. V. Citovsky and T. Tzfira (eds.). Springer, New York, NY, USA.

Pulawska, J. 2010. Crown gall of stone fruits and nuts, economic significance and diversity of its causal agents: tumorigenic *Agrobacterium* spp. Journal of Plant Pathology, 92(1):S87-S98.

Roberts, D.A. and C.W. Boothroyd. 1975. Fundamentals of Plant Pathology. *W.H. Freeman* and Company, San Francisco, CA, USA. 432 pp.

Roy, M.A. and M. Sasser. 1983. A medium selective for *Agrobacterium tumefaciens* biotype 3. Phytopathology, 73:810.

Smith, E.F. and C.O. Townsend. 1907. A plant-tumor of bacterial origin. Science, 25(643):671-673. https://doi.org/10.1126/science.25.643.671

Suzaki, K., K. Yoshida and H. Sawada. 2004. Detection of tumorigenic *Agrobacterium* strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. Journal of General Plant Pathology, 70(6):342-347. https://doi.org/10.1007/s10327-004-0133-8

Tan, B.S., J. Yabuki, S. Matsumoto, K. Kageyama and H. Fukui. 2003. PCR primers for identification of opine types of *Agrobacterium tumefaciens* in Japan. Journal of General Plant Pathology, 69(4):258-266. https://doi.org/10.1007/s10327-003-0044-0

Tolba, I.H. and M.A. Soliman. 2014. Phenotypic and molecular characterization of tumorigenic *Agrobacterium tumefaciens* strains isolated from rose plants in Egypt. Middle East Journal of Agriculture Research, 3(4):1002-1014.

Young, J.M., L.D. Kuykendall, E. Martínez-Romero, A. Kerr and H. Sawada. 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie et al. 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51(1):89-103. https://doi.org/10.1099/00207713-51-1-89

primers for the detection of *Agrobacterium vitis* and *Agrobacterium tumefaciens*. Vitis, 47(3):181-189. https://doi.org/10.5073/vitis.2008.47.181-189

Bradbury, J.F. 1986. Guide to Plant Pathogenic Bacteria. C.A.B. International Mycological Institute, Kew, UK. 332 pp.

Christie, P.J. and J.E. Gordon. 2015. The *Agrobacterium* Ti plasmids. Microbiology Spectrum, 2(6):1128. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.plas-0010-2013

Elwin, L., N. Wenner, L. Long and B. Overton. 2008. Crown gall of grape: understanding the disease, prevention and management. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA. 5 pp.

Fakhouri, W.D. and H. Khlaif. 1996. Biocontrol of crown gall disease in Jordan. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 23(1):17-22.

Haas, J.H., L.W. Moore, W. Ream and S. Manulis. 1995. Universal PCR primers for detection of phytopathogenic *Agrobacterium* strains. Applied and Environmental Microbiology, 61(8):2879-2884. https://doi.org/10.1128/AEM.61.8.2879-2884.1995

Islam, M.S., M.M. Akter, M.A. Rahman and M.F. Alam. 2010. Isolation of *Agrobacterium tumefaciens* strains from crown gall samples of dicot plants in Bangladesh. Current Research in Bacteriology, 3(1):27-36. https://doi.org/10.3923/crb.2010.27.36

Kawaguchi, A., K. Inoue, K. Tanina and M. Nita. 2017. Biological control for grapevine crown gall using nonpathogenic *Rhizobium vitis* strain ARK-1. Proceedings of the Japan Academy, Series B, 93(8):547-560. https://doi.org/10.2183/pjab.93.034

Kawaguchi, A., H. Sawada, K. Inoue and H. Nasu. 2005. Multiplex PCR for the identification of *Agrobacterium* biovar 3 strains. Journal of General Plant Pathology, 71(1):54-59. https://doi.org/10.1007/s10327-004-0160-5

Kerr, A. and C.G. Panagopoulos. 1977. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control. Journal of Phytopathology, 90(2):172-179. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1977.tb03233.x

Kuzmanović, N., K. Gašić, M. Ivanović, A. Prokić and A. Obradović. 2012. Identification of *Agrobacterium vitis* as a causal agent of grapevine crown gall in Serbia. Archives of Biological Sciences, 64(4):1487-1494. https://doi.org/10.2298/ABS1204487K

Received: July 31, 2024; Accepted: November 28, 2024

تاريخ الاستلام: 2024/7/31؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2024/11/28