مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية
مجلد 42 العدد 3(2026): 29-41

Damascus University Journal for Agricultural Sciences Vol 42-No.3 (2026): 29-41

مسح حقلي أولي وتوصيف جزيئي لعزلات من بكتريا التدرن التاجي Agrobacterium vitis من كروم العنب في محافظة السويداء جنوب سورية

عبد اللطيف محمد الغزاوي[1*]، محمود أبو غرة[2]، محمد جمال مندو[3]

1-طالب دكتوراه، أمراض نبات، إدارة بحوث وقاية النبات، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.
77abdghazzawi1@dmascusuniversity.ed.sy

2-أستاذ في قسم وقاية النبات، كلية الزارعة، جامعة دمشق.

3-باحث، أمراض نبات، إدارة بحوث وقاية النبات، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية.

الملخص:

نفذ مسح حقلي في كروم العنب في محافظة السويداء خلال عامي 2018 و2019 لتقصي وجود مرض التدرن التاجي. جمعت أربعين عينة ورم تدرن تاجي عزل منها 85 عزلة أظهرت 61 عزلة منها قدرة إمراضيه واضحة على أقراص الجزر وكانت أشكال المستعمرات نموذجية على أوساط الزرع. أجريت الاختبارات البيوكيماوية والجزيئية لـ 45 عزلة نموذجية تم اختيارها وكانت نتائجها شبه متطابقة، وقد انتمت كل العزلات للنوع Agrobacterium vitis ولم تكن أي عزلة تابعة لـ Agrobacterium tumefaciens. تم الكشف عن الممرض بواسطة البادئة VCF3/R3 التي تستهدف مورثة الشراسة Virc الموجودة على البلاسميد Ti القادرة على الكشف عن الممرض بكل أنواعه والبادئة PGR/ PGF التي تكشف المورثة (pehA) المنتجة لإنزيم polygalacturonase القادرة على تمييز النوع Agrobacterium vitis عن غيره. قسمت العزلات نتيجة للاختبارات الجزيئية (اختبار PCR) باستخدام ثلاثة أزواج من البادئات المتخصصة إلى 3 مجموعات: الأكتوبين بنسبة 80% والنوبالين بنسبة 7% الفيتوبين بنسبة 13%، ولم تحمل أي عزلة أكثر من أوبين واحد على بلاسميدها.

الكلمات المفتاحية: تدرن تاجي، كرمة، Agrobacterium vitis, PCR.

تاريخ الإيداع: 2024/02/13
تاريخ القبول: 2024/05/14

حقوق النشر: جامعة دمشق – سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص CC BY-NC-SA 04

Molecular Characterization and Survey for Some Isolates from Crown Gall Agrobacterium Vitis on Vineyards in As-Suwayda Governorate Southern Syria

Abdullatif Mouhammad AL Ghazzawi[1*], Mahmoud Abu Ghoura[2], Mouhammad Jamal Mando[3]

1-PhD student, General Commission for Scientific Agricultural Research, plant pathology. 77abdghazzawi1@dmascusuniversity.ed.sy
2-Pro, Dept. of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Damascus University, Damascus, Syria.
3-Dr, General Commission for Scientific Agricultural Research, plant pathology.

Received: 13/02/2024
Accepted: 14/05/2024

Copyright: Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract:

field Survey was carried out in grape vineyards in As-Suwayda governorate during 2018- 2019 for Crown gall disease. 40 samples of tumors were collected and 85 isolates were isolated. 61 isolates were clearly pytopathogenic on carrot discs and showed a typical morphological growth on media. Biochemical and Molecular testes were done on 45 selected strains and the results were almost identical and all the isolates were from Agrobacterium vitis and not to Agrobacterium tumefaciens. The pathogen was detected using VCF3/VCR3 Primers which target virC gene located on Ti plasmid and can detect all tumorigenic strains of Agrobacterium and PGF/PGR primers which detect the (pehA) gene responsible for polygalacturonase enzyme and discriminate A. vitis strains. Isolates were segregated according to molecular tests (PCR) with three specific primer pairs into three main groups, octopine group 80%, nopaline group 7% and vitopine group 13% and none of the isolate has more than one opine on Ti plasmid.

Keywords: Crown Gall, Agrobacterium Vitis, PCR, Vineyards.

المقدمـة:

يعد مرض التدرن التاجي مشكلة اقتصادية تواجه المزارع والمشاتل، ويتوجب على القائمين بالمشتل إتلاف الغراس المصابة وحرقها، وإذا تم تجاهلها وزرعت في البستان فإنها تكون ضعيفة النمو قليلة الإنتاج. حيث تعد بكتيريا مرض التدرن التاجي من ساكنات التربة وتبقى فيها حية لفترة طويلة من الزمن، لذلك يعد هذا المرض خطيرا لاتساع مداه العائلي الذي يصل إلى 391 جنس نباتي (Bradbury,1986,332). وأول من عزل الممرض من العنب في عام 1895من قبل Cavara (Lacroix and Citovsky,2013,491)، ويحدث المرض بشكل رئيس بسبب بكتريا Agrobacterium vitis ونادرا بسبب A. tumefaciens (Szegedi et al., 2005,52)، أما في سورية فتنتشر زراعة كرمة العنب في كل من دمشق وريفها، السويداء، القنيطرة، حمص، حماه، إدلب وحلب، حيث بلغ إجمالي المساحة المزروعة لعام 2022 في سورية نحو43772 هكتار بإنتاج وصل إلى نحو 229 ألف طن أما في السويداء فقد بلغ إجمالي المساحة المزروعة لعام 2022 نحو 9977 هكتار بإنتاج وصل إلى نحو 52 ألف طن (وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، 103،2022). إن انتشار مرض التدرن التاجي في كروم العنب أصبح شائعا خاصة في الكروم البعلية في محافظة السويداء وقد يرجع ذلك لقلة الاهتمام أو الجهل بطبيعة المرض وطرق انتقاله حيث أن الإصابة تحدث من نقطة صقيع أو جرح ميكانيكي ثم ينتشر المرض بشكل جهازي ويحرض الورم في الجروح الناتجة عن الالتواء والجروح في القصيبات وهذا يشرح اتساع الاصابة على العنب المجروح كممرض طبيعي أو انتقاله جهازياً حيث تم عزله من النسغ النازف (Burr andOtten,1999,53) كما ان الممرض يدخل في الجذور مع نهاية الشتاء وبداية الربيع ضمن شروط رطبة حيث أن الجذور المضغوطة يخرج من خشبها نسغ والذي يجذب البكتريا الى الجروح ويمكن عزل الممرض من سوق نبات بعمر سنة لكن نسبة كشف الممرض الناتجة عن القطع للسوق متغيرة بشكل كبير فهو يعكس توزع غير منتظم للبكتريا في العروق وحساسية طرق كشف البكتريا(Stover et al.1997,26) وتبقى بكتريا Agrobacterium vitis في بقايا أنسجة نبات الكرمة لمدة سنتين فتعيش رمية في حتى بعد إزالة النبات ولمحو أثر الممرض من حقول العنب بعد إزالة النبات يفضل ترك التربة بدون عائل للممرض (Burr et al., 1998,1289) وفي حالة الاصابة المرتفعة حتى التطعيم يفشل ويتأخر النمو ويخف الإنتاج وتموت النباتات خاصة في المناطق الباردة المنتجة للعنب ومن المثير للاهتمام ان الأورام معظمها على الساق (شكل 1) وبشكل نادر أو اقل على الجذور (Akgul et al., 2018,6229) كل الدراسات السابقة صنفت الممرض بشكل بيوكيميائي (غنام، 318،2008، أبو غرة ودوجي، 256،1996) لم تتطرق أي دراسة سابقة في سورية للتصنيف إلى مستوى النوع او تحت النوع جزيئيا وهذا هو هدف الدراسة.

المواد والطرائق:

المسح الحقلي:

تم تقصي انتشار مرض التدرن التاجي في كروم العنب في مناطق مختلفة من محافظة السويداء خلال عامي 2018 و2019، تم معاينة 20 غرسة من كل بستان وحسبت نسبة إصابة الجفنات في الكروم حسب المعادلة التالية (Tchymakov, 1974,7):

$$X = n \times 100 / N$$

حيث:

x : النسبة المئوية للإصابة

n: عدد الاشجار المصابة

N: عدد الاشجار المختبرة

وتم تقدير متوسط انتشار المرض في المنطقة باستخدام المعادلة التالية (Tchymakov, 1974,7):

متوسط انتشار المرض في المنطقة ٪ $= \sum(sp)/s$

حيث:

(sp) ∑: مجموع حاصل ضرب مساحة الكروم (م2) بما يوافقها من إصابة (%).

S: مجموع مساحة الكروم الممسوحة.

كانت الأصناف المزروعة هي السلطي والحلواني والبلدي والجبلي جمع منها 40 عينة تظهر عليها أعراض الإصابة بمرض التدرن التاجي. تم وضع العينات في أكياس من البولي ايثلين وأعطي لكل عينة رقم وبيانات خاصة بها مثل المحافظة والمنطقة والبستان ومساحة الحقل والصنف.

عزل البكتريا:

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 إطباق بتري معقمة فيها ماء مقطر معقم ليتم التخلص من آثار ماء جافيل ثم وضعت ضمن أطباق بتري معقمة وقطعت لقطع صغيرة ثم غمرت بماء مقطر معقم لعدة ساعات، أو عند هرسها بالهاون وضعت عليها قطرات ماء مقطر معقم لمدة نصف ساعة بعد ذلك أخذت قطرة من المعلق ونشرت على أوساط متخصصة لبكتريا .Agrobacterium sp مثل وسط RS (MgSO4x7H2O 0.2 g، KH2PO4 0.7 g، K2HPO4 0.9، adonitol 4 g، yeast extract 0.14، NaCl 0.2 g، H3BO3 1 g، agar 20 g) وبعد التعقيم والتبريد أضيف 80 ملغ من مادة Triphenyl tetrazolium chloride (Roy and Sasser 1983,810). أو وسط YMAC (Mannitol 10g, K2HPO4 0.5, MgSO4x7H2O 0.2 g, yeast extract 0.4 g, Congo Red"1 g⁄400 "10 ml, PH 7,Agar 12 g) ثم حضنت عند درجة حرارة 28 سيلزيوس لمدة 5 أيام ثم تم تنقيتها في وسط PDA أو وسط King B (Tolba and Zaki,2011,114) .تم حفظ العزلات في أنابيب أبندورف فيها وسط سائل Luria broth مع غليسرين معقم بتركيز 40 %بعد إعطائها أرقام تدل عليها ووضعت في المجمدة.

اختبار القدرة الإمراضية:

أجري اختبار القدرة الإمراضية على أقراص من الجزر ضمن أطباق بتري ووضع تحتها ورقة نشاف معقمة مبللة بماء مقطر معقم ووضع على سطحها 50 ميكروليتر من معلق بكتيري بتركيز 10^8 وحدة مشكلة للمستعمرة (cfu)/مل من كل عزلة بكتيرية باستخدام محقن طبي بثلاث مكررات للعزلة الواحدة أو أخذت حلقة (loop) من البكتيريا ونشرت على سطح شريحة الجزر أو وضعت شريحة الجزر على وسط آغار الماء بهدف توفير رطوبة كافية ثم حضنت لمدة تتراوح بين 2–3 أسابيع عند درجة حرارة 28 سيلزيوس فاذا ظهرت تدرنات على سطح قرص الجزر كانت العزلة ممرضة (Chen et al., 1999,238; Islam et al., 2010,150).

التوصيف الشكلي والبيوكيميائي:

وصفت العزلات البكتيرية من الناحية الشكلية (لون المستعمرة وشكلها وحجمها) كما أجري عليها مجموعة من الاختبارات البيوكيميائية: اختبار التنفس (Hugh and Leifson, 1953,25) وصبغة غرام (Suslow et al., 1982,918) واختبار الأوكسيداز (Kovacs, 1956,205) واختبار القدرة على تحمل 2% من محلول Nacl بالإضافة إلى استهلاك السكريات. (Goto and Motsumoto, 1987,133).

الكشف عن الممرض باستخدام اختبار PCR:

استخدم اختبار PCR للكشف والتمييز بين أنواع بكتريا التدرن التاجي المعزولة من العينات المصابة، فقد أجري الكشف عن مورثات شراسة متخصصة في الإمراضية ومورثات مسؤولة عن ترميز أنزيمات تحث النبات على تشكيل سكريات وأحماض أمينية متخصصة يمكن للبكتريا هضمها تدعى الأوبينات Opines والتي تصنف كيميائياً كمصدر طاقة ونتروجين.

تم استخلاص DNA من العزلات بحل البكتريا بماء مقطر معقم ثم تسخينها عند درجة حرارة 95 سيلزيوس لمدة عشر دقائق ثم برد المعلق بالثلج لمدة 5 دقيقة وثفلت عند سرعة 12000 دورة بالدقيقة لمدة 2 دقيقة ثم أخذ الجزء الطافي الحاوي على DNA (Tolba and Zaki., 2011,115). حيث تم تضخيم قطع DNA المستهدفة وفق البرنامج التالي:

– حرارة التنشيط 94 سيلزيوس لمدة 3 دقائق وفق تعليمات شركة KAPA BIOSYSTEMS الأمريكية لمزيج الإنزيم 2 X KAPA Taq Ready Mix

– 32 دورة مؤلفة من المراحل التالية:

– دقيقة واحدة عند درجة حرارة 92 سيلزيوس (الفصل).

– دقيقة واحدة حرارة الالتحام (جدول1).

– دقيقة ونصف عند درجة حرارة الاستطالة 72 سيلزيوس.

– 3 دقائق عند درجة حرارة الاستطالة النهائية 72 سيلزيوس (Canik Orel et al. 2016,45)، وكان حجم التفاعل 20 ميكروليتر باستخدام المزيج مضاعف (2X) وكل عينة بحاجة لـ 10 ميكروليتر من المزيج وواحد ميكروليتر من كل بادئة و5 ميكروليتر من DNA ويكمل الحجم الى20 ميكروليتر بالماء المقطر المعقم.

استخدمت البادئة VCF3/VCR3 لكشف المورثة المسؤولة عن القدرة الإمراضية في كل من Agrobacterium vitis و A. tumefaciens وتم استخدام DNA بطريقة الاستخلاص السابقة وبطريقة colony PCR (فقط مع هذه البادئة) بوضع جزء من المستعمرة بشكل مباشر بعمر 48 ساعة في مزيج تفاعل PCR بواسطة نكاشه أسنان معقمة (Suzaki et al., 2004,345)، بينما استخدمت البادئة PGF/ PGR لتضخيم مورثة DNA بطول 414 bp لتمييز A. vitis عن A. tumefaciens وهي متخصصة للكشف عن مورثة pehA polygalacturonase في Vitis. A أما البادئة OCTF/OCTR فتكشف مورثة اصطناع الأكتوبين (octopine) في A. vitis وكذلك تكشف البادئة NOPF/ NOPR مورثة اصطناع النوبالين (nopaline) في A. vitis أما مورثة اصطناع الفيتوبين (vitopine) في A. vitis فتم الكشف عنها بواسطة البادئة VisF/ VisR (جدول 1).

وضعت نواتج التفاعل في جهاز الرحلان الكهربائي باستخدام هلامه آغاروز بتركيز 1% من شركة PEL-FREEZ الأمريكية تم حله في محلول منظم (1X TBE Tris Boric Acid, EDTA) وتم إضافة صبغة SAFE RED من شركة KAPA BIOSYSTEMS الأمريكية ومعلم جزيئي بتدريج 100bp عند تيار كهربائي جهده 75 فولط لمدة ساعة ونصف (Tolba and Zaki., 2011,115).

الجدول 1: البادئات المستخدمة في اختبار PCR لكشف وتمييز أنواع بكتريا التدرن التاجي في كرمة العنب

البادئ	التسلسل	طول الحزمة (bp)	درجة حرارة الالتحام	المرجع
VCF3 VCR3	5’ – GGC GGG CGY GCY GAA AGR AAR ACY T – 3’ 5’ – AAG AAC GYG GNA TGT TGC ATC TYA C– 3’	414	52°C	(Suzaki et al., 2004,343)
PGF PGR	5’- GGG GCA GGA TGC GTT TTT GAG-3’ 5’- GAC GGC ACT GGG GCT AAG GAT-3’	466	56°C	(Szegedi and Botka 2002,38)
OCTF OCTR	5’GAA TAT GAG AAA TCC GTC TCG-3’ 5’-ACT CAG AGC TCG TGG CCT TG-3’	475	52°C	(Bini et al., 2008,184)
NOPF NOPR	5’-GCA AAC GTA AGT GTT GGA TC-3 5’- CAA GCG AAT ACT CGA GAC G-3’	394	52°C	(Bini et al.,2008,184)
VisF VisR	5’-CCG GCC ACT TCT GCT ATC TGA-3’ 5’-CCA TTC ACC CGT TGC TGT TAT T-3’	561	55°C	(Szegedi and Botka 2002,38)

النتائج:

المسح الحقلي:

بلغ عدد كروم العنب الممسوحة في محافظة السويداء 52 بستاناً شملت ثمانية قرى هي: الكفر 15، البلاطة 6 ومرج الدولة 7 وعتيل 8 وتل اللوز 1 وظهر الجبل 6 والمكسر 3 والظهير 7. كانت الإصابات على جميع الأصناف بشكل اورام شبه كروية اقطارها تتراوح بين 1 سم و4 سم تتدرج ألوانها بين اللون الكريمي الى الوردي والبني الغامق وأحيانا بلون أسود حسب عمر وحجم الدرنة بالإضافة لتشققات على طول الساق بلون أسود متفحم (شكل رقم 1).

الشكل رقم 1: أعراض الإصابة على جذع النبات

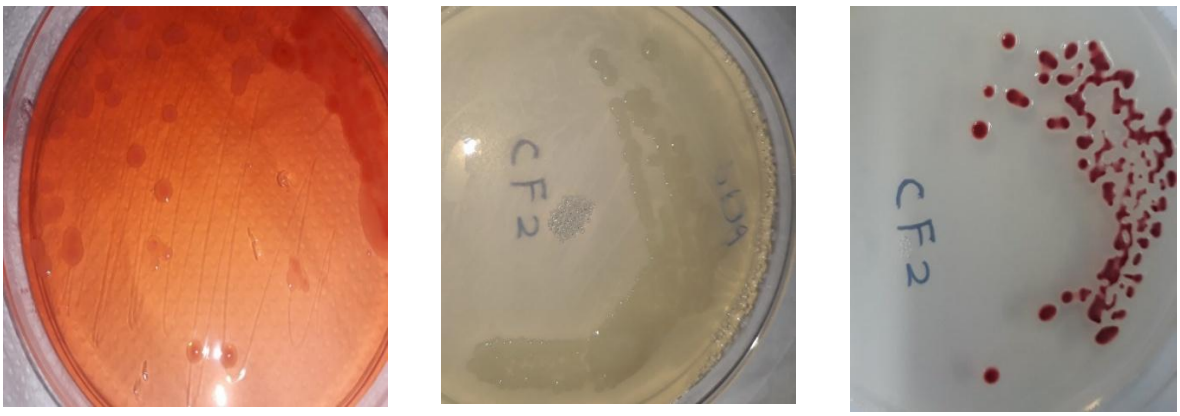
كان متوسط النسبة المئوية للكروم المصابة متقارباً خلال عامي المسح الحقلي فبلغ 33.37% عام 2018 و33.8% عام 2019، ولم توجد أي كروم مصابة في بعض المناطق مثل عتيل والبلاطة الغربية، وكان متوسط النسبة المئوية للنباتات المصابة 2.25% في عام 2018 و2.9% عام 2019 كما بلغ متوسط انتشار المرض 4% في عام 2018 و4.8 في عام 2019 (جدول 2) مما يشير الى زيادة تقدم المرض مع الوقت ولو بشكل بسيط سواء بزيادة نسبة النباتات المصابة ضمن الكرم الواحد او انتقال المرض الى كرم مجاور نتيجة تقليم غير مدروس ينقل العدوى او اكتشاف كروم جديدة مصابة مع زيادة عمليات المسح الحقلي.

الجدول 2: نتائج تقصي انتشار مرض التدرن التاجي في محافظة السويداء خلال عامي 2018-2019

القرية	عدد الكروم المدروسة		النسبة المئوية للكروم المصابة %		متوسط % النباتات المصابة		متوسط انتشار المرض %	
	الموسم		الموسم		الموسم		الموسم	
	2018	2019	2018	2019	2018	2019	2018	2019
الكفر	9	15	44	47	5	8	4.4	9.4
مرج الدولة	5	7	40	42	5	6	2.2	2.7
ظهر الجبل	6	6	33	33	2	3	1.3	1.3
البلاطة	6	6	0	0	0	0	0	0
تل اللوز	1	0	100	0	2	–	6	_
عتيل	7	8	0	0	0	0	0	0
الظهير	4	7	50	50	1	1	4	4
المكسر	0	3	0	33	–	2	0	3
المجموع	38	52						
			33.37	33.8	2.25	2.9	4	4.8

عزل البكتيريا:

بلغ عدد عزلات بكتيريا التدرن التاجي النموذجية المحفوظة 85 عزلة منها 72 عزلة من السويداء وكانت العزلات على وسط RS دائرية مسطحة قليلاً ومرتفعة قليلاً عن البيئة حوافها منتظمة مخاطية قليلاً وذات مركز أحمر مقبب في المركز فقط قطرها 2-3 ملم بعد 3-4 أيام (شكل رقم C,2)، بينما كانت على وسط YMAC شفافة دائرية مسطحة حوافها منتظمة مخاطية وذات مركز أحمر قطرها 3-4 ملم بعد 3-4 أيام (شكل رقم B,2) وكانت شافه (نصف شفافة) على وسط PDA ودائرية مسطحة قليلاً تميل إلى المقبب حوافها منتظمة مخاطية قليلاً قطرها 3-4 ملم بعد 3-4 أيام (شكل رقم A,2).

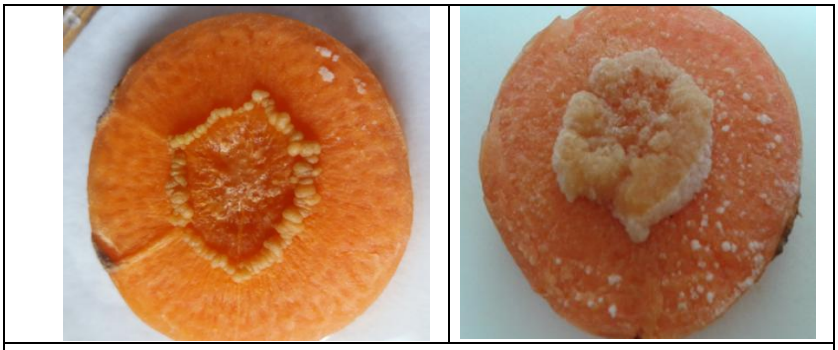


A (YMAC) بيئة B (PDA) بيئة C (RS)

الشكل رقم 2: شكل نمو عزلات بكتريا التدرن التاجي على الأوساط (البيئات) المختلفة

القدرة الإمراضية:

أظهرت 61 عزلة قدرة إمراضيه واضحة على أقراص الجزر حيث تشكلت أورام صغيرة على أقراص الجزر خاصة في عند الطقة الوعائية (شكل 3)، وتم اختيار 45 عزلة لمتابعة الاختبارات البيوكيميائية والجزيئية عليها.



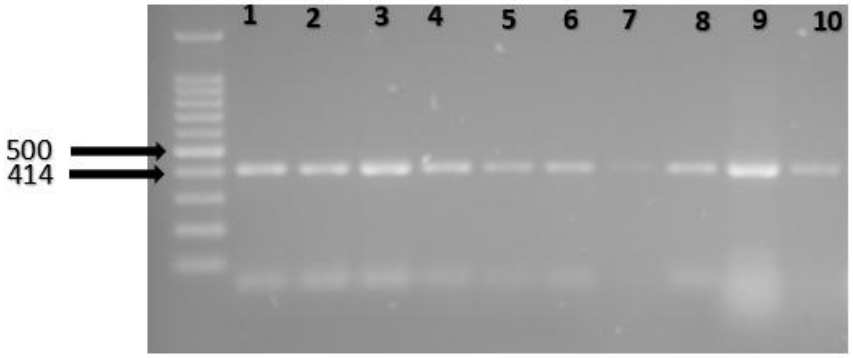
الشكل رقم 3: التدرنات على أقراص الجزر نتيجة العدوى ببكتيريا التدرن التاجي

الاختبارات البيوكيميائية:

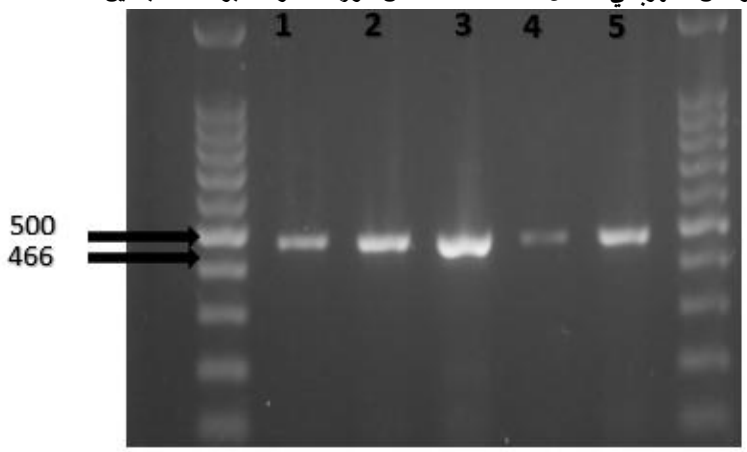
اجريت الاختبارات البيوكيميائية لـ 45 عزلة حيث كانت كل العزلات هوائية وسالبة لصبغة غرام وموجبة تجاه الأوكسيداز ولها القدرة على تحمل 2% فقط من NaCl وليس عند تركيز 5% ونمت عند درجة حرارة 35 سيلزيوس وتستهلك المانيتول بشكل واضح كسكر وأنتجت الحمض من السكروز.

الاختبارات الجزيئية:

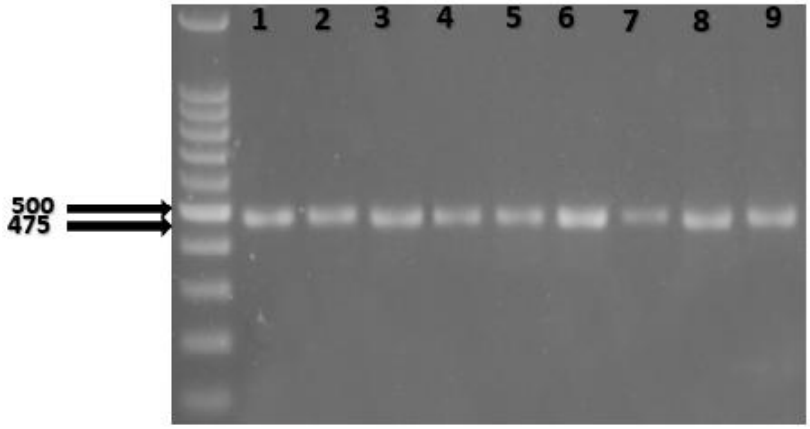
أعطت جميع العزلات حزمة واضحة بطول 414 bp بالنسبة للبادئة VCF3/R3 (شكل4) وحزمة واضحة بطول 466 bp بالنسبة للبادئة PGF/ PGR (شكل5) مما يدل على أنها تابعة للنوع A. vitis، كان منها 6 عزلات أعطت حزمة بطول 561 bp (VisF/ VisR) (شكل 8) وكذلك 3 عزلات من أعطت حزمة بطول 394bp (NOPF/ NOPR) (شكل7) أما باقي العزلات أعطت حزمة بطول 475bp (OCTF/OCTR) (شكل6).



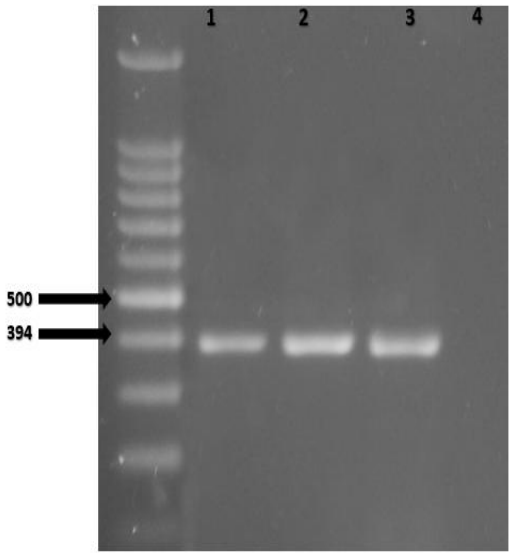
الشكل4: ناتج الرحلان الكهربائي لتفاعل PCR للكشف عن مورثة الشراسة بواسطة البادئين VCF3/R3 في A. vitis



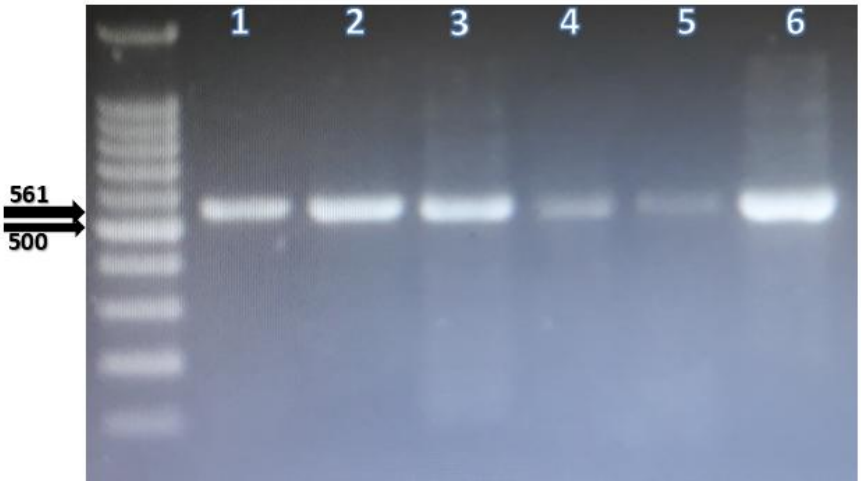
الشكل5: ناتج الرحلان الكهربائي لتفاعل PCR للكشف عن مورثة pehA polygalacturonase في A. vitis المميزة له بواسطة البادئين PGF/ PGR



الشكل6: ناتج الرحلان الكهربائي لتفاعل PCR للكشف عن مورثة انتاج الأكتوبين بواسطة البادئين (OCTF/OCTR) في A. vitis



الشكل7: ناتج الرحلان الكهربائي لتفاعل PCR للكشف عن مورثة انتاج النوبالين بواسطة البادئين (NOPF/ NOPR) في A. vitis



الشكل8: ناتج الرحلان الكهربائي لتفاعل PCR للكشف عن مورثة انتاج الفيتوبين بواسطة البادئين (VisF/ VisR) في A. vitis

المناقشة:

أظهرت نتائج المسح الحقلي الأولي للكروم المصابة في محافظة السويداء انتشار المرض في معظم مناطق زراعة العنب البعلي والأرضي وأدى التوسع في زيادة عملية المسح الى العثور على مناطق إصابة جديدة بالإضافة لزيادة توسع انتشار المرض في

الكروم المصابة أصلاً من سنة لأخرى لارتفاع شدة الاصابة أي أن المرض يكسب مناطق جديدة ولابد من الإشارة أن جميع المناطق التي تم زيارتها تزرع العنب بالطريقة الزاحفة الأرضية وهذا يسهم في زيادة تماس النبات مع الممرض الذي يعتبر من ساكنات التربة بما يزيد احتمالية تكرار الإصابة على أكثر من موقع في النبات الواحد.

لم تظهر بعض العزلات (16 عزلة) قدرة إمراضية رغم أن شكلها المورفولوجي كان نموذجياً على أوساط الزرع، وتم اختبار بعض هذه العزلات غير الممرضة (10عزلات) بواسطة البادئين VCF3/R3 و PGF/ PGR وأعطت واحدة فقط منها حزمة واضحة بطول 466 bp رغم أنها غير ممرضة مما يدل على أنها تابعة لـ A. vitis وقد تكون قد فقدت بلاسميدها بطريقة ما ولأن مورثة pehA المسؤولة عن انتاج Polygalacturonate موجودة على الكروموزوم وليس على البلاسميد الذي هو سبب تشكل الأورام على العائل(Rouhrazi and Rahimian,2012,559)، كانت جميع العزلات الممرضة متطابقة كلياً من الناحية المورفولوجية والبيوكيميائية.

صنفت العزلات حسب الاختبارات الجزيئية طبقاً لنوع البلازميد ومورثات الأوبينات التي يحملها. انتمت كل العزلات للنوع Agrobacterium vitis على الرغم أن المتوقع حسب المراجع أن تكون بعض العزلات الممرضة تابعة للنوع Agrobacterium tumefaciens (Argun et al. 2002,164; Szegedi et al., 2005,49)؛ ولذلك تم استخدام البادئة VCF3/R3 التي لها القدرة على كشف جميع أنواع بكتريا جنس Agrobacterium الممرضة (Suzaki et al., 2004,342) ولا بد من الإشارة الى أن هذه البادئة تكشف كل أنواع Agrobacterium حتى بطريقة Colony PCR (Kuzmanović et al., 2016,314)، وبما أن البادئة PGF/PGR أعطت حزمة واضحة بطول 466 bp لكل العزلات الممرضة فهذا يدل على أنها تابعة لـ A. vitis، كما أن حساسية هذه البادئة عالية للنوع A. vitis حيث تكشفه بكل وضوح عند برنامج التضخيم السابق.

وتشير النسب العالمية إلى أن العزلات من نمط الأكتوبين تشكل 60–70% من مجموع العزلات الممرضة و20–30% من العزلات من نمط النوبالين و5–10% من نمط الفيتوبين (Bini et al.,2008,187; Ridé et al., 2000,1822)، كذلك قسمت العزلات في بحثنا إلى 3 مجموعات حسب نوع الأوبين الموجود في بلاسميدها (TI) وباختلاف في النسب المئوية نتيجة للاختبارات الجزيئية فكانت 36 عزلة من أصل 45 من نمط الأكتوبين بنسبة 80% من العزلات الممرضة المختبرة، بينما كانت 6 عزلات من نمط الفيتوبين بنسبة 13% و3 عزلات من نمط النوبالين بنسبة 7%، ولم تظهر أي من العزلات وجود نوعين من الأوبينات في العزلة الواحدة باختلاف مع العزلات المصرية التي تحوي بعض عزلاتها على الفيتوبين والأكتوبين (Tolba and Zaki., 2011,119)، ومن المعلوم أنه يمكن لـ A. vitis إنتاج واستقلاب ثلاثة أنماط من الأوبينات,octopin, nopaline vitopine (Szegedi, 2003.39). ومن الناحية الإحصائية فإن وجود نسبة من العزلات الحاوية على مورثة الفيتوبين أكثر من العزلات التي تمتلك مورثة النوبالين يخالف الإحصائيات العالمية ولكنه يتوافق مع نتائج دول مجاورة مثل مصر وإيران ما عدا تركيا (Akgul et al., 2018,6236; Rouhrazi and Rahimian,2012,559; Tolba and Zaki,2011,118).

إن اختلاف تركيب TDNA من ناحية تواجد مورثات الشراسة ومن ناحية نوع الأوبينات ووجود أكثر من أوبين في البلاسميد الواحد له أثر في اختلاف شراسة العزلات البكتيرية وبالتالي تأثيره على حساسية أصناف العنب (Akgul et al., 2018,6236)، ولم توجد دراسة موثقة جزيئية لمرض التدرن التاجي حتى الآن على كرمة العنب في سورية، إذ تعد هذه الدراسة أول توصيف للعامل الممرض وأنماطه الممرضة، ولم تكن عملية المسح شاملة لذلك ننصح بتوسيعها فهناك مناطق كثيرة لم يشملها المسح حيث يعتقد بوجود أصابات فيها وذلك للتعمق في تنميط السلالات المحلية، وربما لو تم التوسع في جمع العينات وهذا ما هو مخطط له مستقبلاً فقد نحصل على أنماط أخرى من A. vitis تحمل أكثر من أوبين ضمن بلاسميدها أو النوع A. tumefaciens الممرض للكرمة. كما ينصح بإجراء دراسات حول تأثير تغير العوامل البيئية والمعاملات الزراعية على شدة ومدى انتشار المرض.

المراجع:

1. أبو غرة، محمود وزياد دوجي. (1996). أمراض النبات البكتيرية. جامعة دمشق. 256.

2. المجموعة الإحصائية السورية. (2022). مديرية الإحصاء والتخطيط، منشورات وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، مديرية الاقتصاد الزراعي، قسم الإحصاء، الجمهورية العربية السورية. 103.

3. غنام، محبة ومحمود أبو غرة. (2008). دراسة انتشار مرض التدرن التاجي Agrobacterium tumefaciens في بعض المشاتل السورية وتحديد الطرز الحيوية للبكتريا الممرضة، مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية، المجلد 24، العدد1. 326- 313.

4. Akgul, D.S., Ozyilmaz, U., Onder, S., Celik, S., Soltekin, R.O and Benlioglu, k. (2018). Susceptibility of grapevine cultivars and rootstocks to crown gall disease (rhizobium vitis) in the aegean region of turkey. Fresenius environmental bulletin, 27, 6229-6238.

5. Argun, N.; Momol, M. T., Maden, S., Momol, E. A., Reid, C. L., Celek, H and Burr, T. J. (2002). Characterization of Agrobacterium vitis strains isolated from Turkish grape cultivars in the Central Anatolia region. Plant Dis. 86, 162-166.

6. Bini. F., kuczmog, A., putnoky, P., otten, l., bazzi1, C., burr, t. J and szegedi, E. (2008). Novel pathogen-specific primers for the detection of Agrobacterium vitis. Vitis 47 (3), 181–189.

7. Bradbury, J. F. (1986). Guide to plant pathologies bacteria. Slough Britain: C.A.B. International Press.332.

8. Burr, J and Otten, L. (1999). Crown gall of grape: biology and disease management. Annual Review of Phytopathology, 37, 53- 80.

9. Burr, T.J., Bazzi, C., Süle. S and Otten. L. (1998). Crown gall of grape: biology and disease management, Plant Disease, Vol. 82 No. 12, 1288-1297.

10. Canik Orel, D., Karagoz, A., Durmaz, R and Ertunc, F. (2016). Phenotypic and molecular characterization of Rhizobium vitis strains from vineyards in Turkey. Phytopathology Mediterranean, 55(1), 41-53.

11. Chen, F.C., Hseu, S.H., Hung, S.T., Chen, M.C. and Lin, C.Y. (1999). Leaf, stem and crown galls on perennial asters caused by Agrobacterium tumefaciens in Taiwan. Botanical Bulletin of Academia Sinica, 40: 237-242.

12. Goto, M and Motsumoto, K. (1987). Erwinia carotovora subsp.wasbiae.subsp. nov.isolated from diseased rhizomes and fibrous roots of japanese horser adish international. Journal of Systematic Bacteriology, 37:130-135.

13. Hugh, R and Leifson, E. (1953). The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gram-negative bacteria. Journal of Bacteriology. 66:24-26.

14. Islam, M.S., Akter, M.M., Rahman, M.A and. Alam, M.F. (2010). Isolation of Agrobacterium tumefaciens strains from crown gall sample of dicot plants in Bangladesh. Current Research in Bacteriology, 3 (1): 27-36.

15. Kovacs, N. (1956). Identification of Pseudomonas pyocyanea by the oxidas reaction. Nature:178 -703.

16. Kuzmanovic, N´., Biondi, E., Ivanovic´, M., Prokic´, A., Zlatkovic´, N., Bertaccini, A and Obradovic, A. (2016). Evaluation OF Different Pcr Primers For Identification OF Tumorigenic Bacteria Associated with Grapevine Crown Gall. Journal of Plant Pathology 98 (2), 311-319.

17. Lacroix B and Citovsky V. (2013) Crown Gall Tumors. 2013, Elsevier Inc. volume 1, pp 491–493.

18. Rouhrazi, k and Rahimian, H. (2012). Characterization of Iranian grapevine isolates of rhizobium (agrobacterium) spp. Journal of Plant Pathology. 94 (3), 555-560.

19. Roy, M.A and Sasser, M. (1983). A medium selective Agrobacterium tumefaciens biotype 3. Phytopathology. 73, 810.

20. Ridé, M., Ridé, S., Petit, A., Bollet, C., Dessaux, Y and L. Gardan. (2000). Characterization of plasmid borne and chromosome encoded trait of Agrobacterium Biovar 1, 2 and 3 strains from France. Applied and Environmental Microbiology. 66, 1818–1825.

21. Suslow, T. V., Schrot, H. M and Isalca, M. (1982). Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. Phytopathology, 72(7):917 -918.
22. Szegidi, E., Bottka, S., Mikulas, J., Otten, L and Sule, S. (2005). Characterization of Agrobacterium tumefaciens strains isolated from grapevine. Vitis, 44, 49-54.
23. Szegedi, E. (2003). Opines in naturally infected grapevine crown gall tumors. Vitis 42, 39–41.
24. Szegedi, E and Bottka, S. (2002). Detection of A. vitis by polymerase chain reaction in grapevine bleeding sap after isolation on a semi selective medium. Vitis. 41, 37–42.
25. Suzaki, K., Yoshida, K and Sawada, H. (2004). Detection of tumorigenic Agrobacterium strains from infected apple saplings by colony PCR with improved PCR primers. J Gen Plant Pathol ,70:342–347.
26. Stover, E., Swartz, H and Burr, T. (1997). Crown gall formation in diverse collection of vitis genotypes inoculated with Agrobacterium vitis. American Journal of Enology Vatic. 48(1), p: 26- 32.
27. Tchymakov, A. E. (1974). Osnovnee methods of phytopathological researchs, Kolos, Moscow: 6-8.
28. Tolba, I.H and Zaki, M.F. (2011). Characterization of Agrobacterium vitis isolates obtained from galled grapevine plants in Egypt. Annals of Agricultural Science, 56(2), 113–119.