تحديد انتشار مرض التدرن التاجي وتعريف مسببه بمنطقة الجبل الأخضر في ليبيا

عزالدين محمد يونس العوامي ، محمد علي سعيد و نجية محمد جادالله.

قسم وقاية النبات – كلية الزراعة – جامعة عمر المختار– البيضاء – ليبيا .

الملخص

أجريت هذه الدراسة خلال العام (2007) حيث تم تقدير نسبة الإصابة بمرض التدرن التاجي على بعض أشجار الفاكهة في بعض المواقع بمنطقة الجبل الأخضر، وقد سجلت أعلى نسبة إصابة على شجيرات اللوز والتفاح والبرقوق في منطقة شحات بينما لم تسجل اي إصابة على الأشجار المزروعة في منطقة الوسيطة. ظهرت أعراض مرض التدرن التاجي على شكل تدرنات في منطقة التاج مع تقزم النباتات المصابة وضعفها العام وصغر حجم ثمارها. وتم الحصول على عزلات مختلفة لهذه البكتيريا من المناطق المختلفة وأجريت عليها اختبارات منها اختبار القدرة الأمراضية والاختبارات العامة والشكلية والفسيولوجية والبيوكيماوية والتي أثبتت جميعها أن البكتيريا المعزولة هي البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* .

المقدمة

تعد أشجار اللوزيات والتفاحيات من أهم المحاصيل التي تزرع في مناطق مختلفة من ليبيا خاصة في المناطق الساحلية وغريان وترهونة والجبل الأخضر (3). تصاب هذه الأشجار بالعديد من الأمراض الفطرية والبكتيرية والفيروسية ويعد مرض التدرن التاجي البكتيري من أهم وأخطر هذه الأمراض التي سجلت على مدى واسع من الانواع النباتية ويتسبب عن البكتيريا *Agrobacterium tumefaciens* (21) ينتشر هذا المرض على الكثير من الأشجار مثل التفاح والسفرجل والكمثرى والخوخ والمشمش والبرقوق واللوز (6، 14، 15) . وسجل الزيات وآخرون (4) هذا المرض في مناطق طرابلس والزاوية وبنغازي على شتلات الكافور والخوخ والتفاح والكمثرى والصنوبر. وذكر عبد الرحيم (6) تواجد مرض التدرن التاجي وانتشاره في

حوض البحر الأبيض المتوسط عامة حيث ينتشر على الشتول الصغيرة التي قد تصل نسبة الإصابة عليها الي 100% في بعض المشاتل. وقد اشار Agrios (8) الى ان نسبة الإصابة في بعض المشاتل المصابة تصل الي نسبة تتراوح احياناً بين 70–90%. وقد تمكن خليف (5) من عزل بكتيريا التدرن التاجي من جميع مناطق زراعة الأشجار في الأردن حيث لوحظ ازدياد المرض مع زيادة المساحة المزروعة بالأشجار المثمرة حيث عزلت البكتيريا الممرضة من أصول اللوزيات (اللوز المر ، دراق ، نكتارين ، خوخ وغيرها من العوائل) ، أصول التفاحيات (التفاح ، الأجاص ، السفرجل والأصل MM106) ، العنب ، الزيتون ، الرمان ، الخروب ، والورد. وهذا يفيد بانتشار المرض في جميع مناطق زراعة اشجار المثمرة بمعدلات إصابة مرتفعة على الأصناف المختلفة من اشجار الفاكهة إلا انه لا توجد دراسات لحصر وتعريف البكتيريا المسببة لها المرض بمنطقة الجبل الأخضر في ليبيا.وعموما تكمن خطورة هذا المرض الى صعوبة مكافحته حتى بالإجراءات الكيميائية (23). وعليه فقد استهدف هذا البحث الحصر الميداني لانتشار المرض في بعض المواقع بمنطقة الجبل الأخضر في ليبيا وعزل المسبب المرضي وتعريفه وإثبات علاقته بالأعراض المصاحبة للمرض كخطوة اولية للسيطرة عل انتشار المرض في منطقة الدراسة.

مواد وطرق البحث

تحديد انتشار الإصابة

لإجراء مسح ميداني لانتشار الإصابة بمرض التدرن التاجي على أشجار الفاكهة في منطقة الجبل الأخضر حددت عدة مواقع (الأكوام . ورادامة . شحات ـ بلغرا ـ الوسيطة ـ مسه) خلال موسم 2007، حيث اختيرت مزرعة في كل موقع مع تحديد الأنواع المزروعة من أشجار الفاكهة في كل منها (تفاح ، خوخ ، برقوق ، لوز) تحديد أربع خطوط من الأشجار في كل مزرعة مع تقدير نسبة الأشجار المصابة بالتدرن التاجي مع العدد الكلي في كل خط .

وقد تم حساب نسبة الإصابة تبعاً للمعادلة :

$$\text{نسبة الإصابة} = \frac{\text{عدد الأشجار المصابة}}{\text{المجموع الكلي}} \times 100$$

العزل من الاجزاء المصابة والتربة

جمعت عينات من أجزاء مصابة بالأورام على الأشجار وتم العزل منها بعد غسلها بالماء وتعقيمها سطحياً بغمرها في كحول 95% ثم سحقت في الهاون في وجود ماء مقطر معقم وتركت لفترة 30 دقيقة ، ثم خطط بعدها المعلق الناتج على بيئة (D_1) التخصصية و بيئة الآجار المغذي وحضنت الأطباق في الحضان على درجة حرارة 28ْ – 30ْ م لمدة 2 – 3 أيام، كما تم العزل من التربة باستخام طريقة التخفيفات مع نفس البيئات المغذية (4، 7).

تحضير اللقاح البكتيري :

لإجراء اختبار فرط الحساسية أو القدرة الأمراضية حضر لقاح من البكتيريا المعزولة بتنميتها على بيئة آلاجار المغذي وبعد 2 – 3 أيام من التحضين على درجة حرارة (28ْ –30ْ م) جهز معلق اللقاح البكتيري بتركيز 10^8 وحدة تكوين مستعمرة/مل (CFU) باستخدام طريقة التخفيفات وجهاز المطياف الضوئي (Spectrophotometer 6300) التي تعادل درجة امتصاصية 0.4 عند طول موجي 600 نانومتر (20) .

اختبار فرط الحساسية :

حقنت أوراق نبات التبغ صنف (White burly) بعمر أكثر من شهر باللقاح البكتيري وفحصت الأوراق بعد 24 ساعة لملاحظة ظهور الأعراض المتمثلة في الموت السريع للمناطق المحقونة من الأوراق والتي تمثل أعراض تفاعل فرط الحساسية (HR) (22).

اختبار القدرة الأمراضية :

أجرى اختبار القدرة الأمراضية للعزلات البكتيرية التي كانت إيجابية لاختبار فرط الحساسية بعدة طرائق :

1 . تلقيح شتلات الطماطم :

لقحت شتلات الطماطم بعمر 4 أسابيع بمعدل 3 شتلات لكل عزله وذلك بعمل جرح طولي في الساق عند الورقة الأولى بطول 2–3 ملم وعمق 1.0–1.5 ملم ثم تم إضافة 0.1 مل من اللقاح البكتيري عند تركيز 10^8 وحدة تكوين مستعمرة/مل (CFU) إلى الجرح وحضنت الشتلات في الصوبة ومتابعة تطور الأعراض المفترض ظهورها بعد شهر من التلقيح (11) .

2 . تلقيح شتلات اللوز :

أجرى اختبار القدرة الأمراضية على أصول اللوز بعمر 3 – 4 شهور حيث قطعت جذور الشتلات ووضعت في أصص بقطر 12.5 سم تحتوي على تربة معقمة مختلطة مع رمل معقم وبعد ذلك أضيف المعلق البكتيري بتركيز 10^8 وحدة تكوين مستعمرة/مل (CFU) بمعدل 100 مل/أصيص وقد أضيف هذا اللقاح بالقرب من الساق ثم تركت النباتات لمتابعة الأعراض خلال 3 شهور من الحقن (12).

3 . تلقيح شرائح الجزر :

غسلت كمية من الجزر بالماء جيداً ثم بالكحول الأيثلي بتركيز 70% وتركت لتجف ثم قطعت إلى شرائح بعرض 10 – 20 ملم ووضعت هذه الشرائح في أطباق بتري معقمة تحتوي على أوراق ترشيح مبللة بماء مقطر معقم ثم لقحت الشرائح باللقاح البكتيري عند تركيز 10^8 وحدة تكوين مستعمرة/مل (CFU) بواسطة إبرة الحقن مع تلقيح بعض منها بماء مقطر معقم كشاهد وحضنت على درجة حرارة (28ْ – 30ْ م) لمدة (10–14) يوم لملاحظة ظهور الأعراض (1).

الاختبارات الروتينية لتعريف وتصنيف البكتيريا

1. الصفات العامة والشكلية

اجريت اختبارات لمعرفة الكائن الممرض وتصنيفه منها تحديد شكل وترتيب الخلايا ، اختبار صبغة جرام ، اختبار الحركة وذلك باستخدام الطرائق التى وصفها **Kiraly** واخرون (18).

2. الصفات المزرعية

للتعرف على الصفات المزرعية للبكتيريا نميت على مجموعة مختلفة من البيئات الانتقائية وغير الانتقائية منها وهي بيئة الآجار المغذي وبيئة الآجار المغذي المضاف إليها 2% جلوكوز (4) ، والبيئة التخصصية (D_1) (17) وبيئة آجار أشبي (Ashby's agar) (4) وبيئة (YESA) مستخلص الخميرة والسكروز (12).

3. الخصائص الفسيولوجية والبيوكيميائية

تم دراسة هذه الخواص بحيث اشتمل ذلك اختبار الأوكسيديز (19) ، اختبار الكتاليز (7) واختبار تكوين مركب 3–كيتوجلوكسيد (4، 7، 22). من ناحية اخرى، استخدمت شرائط Himedia في أجراء بعض الاختبارات الفسيولوجية والبيوكيماوية لتعريف البكتيريا **(20)** فقد تم اختبار مقدرة البكتيريا على إنتاج إنزيم بيتا جلاكتوسيديز B-galyactosidase وأرجنين ديهدروليز Argenine Dehydrolase ، وليسين ديكربوكسيليز Lysine-Decarboxylase واورثنين ديكربوكسليز Ornithine-Decarboxylase ، واليوريز Urease ، تربتوفان دي امينيز Tryptophan-deaminase والجلاتينيز Gelatinase وكذلك مقدرة البكتيريا على استخدام السترات citrate وإنتاج كبريتد الهيدروجين (H_2S) والأستوين (Acetoin) والأندول Indole كما اختبرت قدرة البكتيريا على استخدام بعض السكريات والمواد الكربوهيدراتية كمصدر للكربون مثل الجلوكوز Glucose والمانيتول (Mannitol) وأنيوسيتول (Anesitol)

والســـوربيتول (Sorbitol) والرامنـــوز Rhamnose والســـكروز Sucrose الميلبيـــوز Melibiose الأميجدالين Amygdline والأرابينوز (Arabinose) .

النتائج والمناقشة

تقدير انتشار المرض بمواقع مختلفة في منطقة الجبل الاخضر:

لوحظ انتشار هذا المرض في عدة مواقع مختلفة من منطقة الجبل الأخضر (شكل 1) على أشجار التفاح ، اللوز ، البرقوق و الخوخ حيث كانت نسبة الإصابة على اللوز في منطقة شحات حوالي 42% ، بينما كانت أعلى نسبة إصابة على شجيرات التفاح في نفس المنطقة 48% وأقلها في منطقة مسه حيث لم تتعدى 13.7% ، أما بالنسبة لشجيرات الخوخ المزروعة في منطقة ورادمة فلم تتعدى نسبة الإصابة عليها 15% ، أما على البرقوق فقد سجلت أعلى نسبة إصابة حيث وصلت 51% في منطقة شحات وقلت في باقي المواقع (جدول 1) . وقد سبق وأن أشار عبد الرحيم (6) إلى وجود الإصابة بالتدرن التاجي على شتلات الكافور في منطقة الجبل الأخضر إلا أنه لم يحدد نسبة الإصابة على الأشجار المختلفة. وفي دراسة سابقة، لاحظ الزيات وآخرون (4) ظهور أعراض التدرن التاجي في ليبيا على شتلات الكافور والخوخ والتفاح والكمثرى والصنوبر ، وبالتالي يتضح أن هذه الدراسة هي أول محاولة لتحديد نسبة الإصابة بهذا المرض على أشجار الفاكهة المختلفة في منطقة الجبل الأخضر .

العزل والتعريف :

أوضحت عمليات العزل من الأجزاء المصابة ومن التربة تكرار وجود مستعمرات ذات لون أبيض إلى كريمي على بيئة الأجار المغذي ناعمة ومحدبة ودائرية الحافة ، وقد أعطيت هذه العزلات أرقام ورموز محددة وعند اجراء اختبار فرط الحساسية على هذه العزلات لتمييز الممرضه منها للنبات من غير الممرضة اتضح ان اغلب العزلات التمحصل عليها كانت ممرضة للنبات (جدول 2) . بعد ذلك تم اختبار قدرة العزلات الممرضة على أحداث الأعراض النموذجية لمرض

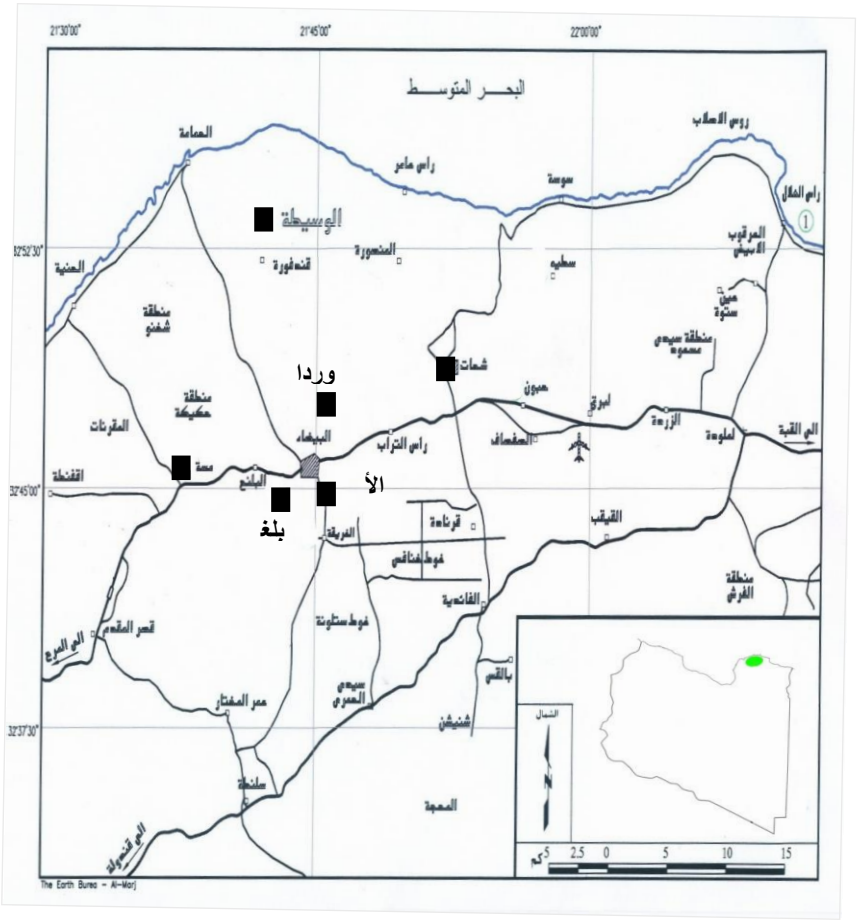
التدرن التاجي حيث اظهرت العزلات الموجبة لاختبار فرط الحساسية نتائج إيجابية على شتلات الطماطم بعمر شهر حيث كانت الأعراض واضحة بعد شهر من حقن البكتيريا وتمثلت في

ظهور أورام صغيرة مكان الحقن وكذلك كونت هذه العزلات أورام صغيرة في مكان حقنها في شرائح الجزر مقارنة بالشاهد بعد 10 أيام من حقنها (شكل 2 و 3) ولكنها لم تعطي أي نتيجة على شتلات اللوز المر خلال 4 شهور من حقن هذه الشتلات (جدول 2) . وقد يعزى عدم قدرة هذه العزلات على أعطاء أعراض على شتلات اللوز المر إلى أن بعض السلالات من هذه البكتيريا تستطيع أحداث العدوى على النباتات البديلة مثل شتلات الطماطم إلا أن هناك صعوبة في بعضها حيث لابد من حقنها في نفس نوع العائل المعزولة منه حيث سبب هذا التباين غير معروف ولكن عادة يعود إلى صفات البلازمد المحث للورم Ti-Plasmid (7) ، بعد ذلك وجب وصف البكتيريا من ناحية خواصها العامة و الشكلية والفسيولوجية والبيوكيماوية أتضح أن خلايا هذه البكتيريا صغيرة عصوية الشكل وذات حركة متوسطة إلى سريعة وسالبة لصبغة جرام وتوجد في خلايا مفردة ، هذه الصفات العامة والشكلية تتفق مع تلك التي ذكرها عدد من الباحثين للجنس *Agrobacterium* (4، 9، 16، 22) .

وعند دراسة خواصها المزرعية على بيئة (D_1) التخصصية لوحظ أن مستعمراتها صغيرة وذات حافة مستديرة وقوامها لزج ولونها سمائي فاتح يتحول إلى الأخضر الزيتوني وهذا يتفق مع ما ذكره Kado و Heskett (17) عند وصفه لنمو البكتيريا *Agrobacterium* على هذه البيئة . أما نموها على بيئة أجار الجلوكوز فتميزت بتكوين مستعمرات صغيرة بيضاء حافتها مستديرة قوامها لزج وتتحد أحياناً مع بعضها ، وهذا ما يميز مستعمرات هذا الجنس على بيئة أجار الجلوكوز (4) ، أما مستعمراتها على بيئة مستخلص الأجار والسكروز (YESA) فقد كانت ذات لون كريمي ومستديرة الحافة وقوامها لزج وهذا يتفق مع ما ذكره (12) عند وصفه مستعمرات هذا الجنس ، أما نموها على البيئة (Ashby's agar) فقد كان مميزاً حيث أتضح قدرة مستعمراتها على امتصاص اللون الأحمر المميز لصبغة أحمر الكونجو وهذا يؤيد ما ذكره (10، 13) عن مستعمرات البكتيريا *A. tumefaciens* على هذه البيئة.

وفيما يختص بالخواص الفسيولوجية والبيوكيماوية لهذه العزلات (جدول 3) فقد أتضح أن جميع العزلات موجبة لاختبار الكتاليز و الاوكسيديز و اختزال النترات وإنتاج غاز كبريتيد

الهيدروجين وتكوين مركب 3–كيتوجلوكسيد في حين كانت سالبة لإنتاج أنزيم بيتا جالاكتوسيديز واورثتين ديكربودكسيلز وأنزيم الجلاتينيز و اليوريز ولإنتاج أنزيم لوسين ديكربوكسليز عدا العزلة (A104) التي كانت موجبة لإنتاج الأنزيم الأخير كذلك وجد أن جميع هذه العزلات سالبة لإنتاج لاندول والأسيتون بينما كانت جميعها موجبة لاستخدام السترات ، أما بالنسبة لاستخدامها للسكريات والمواد الكربوهيدراتية كمصدر للكربون (جدول 4) تبين أن جميع العزلات تستخدم سكر الارابينوز والانيسيتيول والمانيتول والجلوكوز وكانت العزلات (A102 ، A103 ، A104) تستخدم السكروز والمانوز والرايبوز والتريهالوز خلافاً عن باقي العزلات التي لا تستخدمها . هذه الخصائص العامة والشكلية والفسيولوجية والبيوكيمائية تشير إلى أن العزلات التي أعطت الأعراض النموذجية لمرض التدرن التاجي عند إجراء اختبار القدرة لأمراضية تتبع البكتيريا *A. tumefaciens* حيث تتفق هذه الخصائص مع تلك التي ذكرها عدد من الباحثين (2، 4، 9، 16، 22). والاختلافات التي لوحظت بين العزلات في بعض الخصائص الفسيولوجية قد تشير إلى وجود سلالات مختلفة من البكتيريا في منطقة الدراسة تحتاج إلى دراسات إضافية توضح هذه الاختلافات.



شكل (1) مواقع دراسة مرض التدرن التاجي في مواقع مختلفة بمنطقة الجبل الأخضر .

جدول (1) نسبة الإصابة (%) بمرض التدرن التاجي في بعض المواقع بمنطقة الجبل الأخضر.

المنطقة	نسبة الإصابة (%)			
	تفاح	لوز	خوخ	برقوق
شحات	%48	%42	*	%51
وردامة	*	*	%15	%13.8
الأكوام	*	*	*	%20
بلغرا	%33.3	*	*	*
مسه	%13.75	*	*	%15
الوسيطة	%0	*	%0	*

* لا توجد أشجار في هذه بالمنطقة

جدول (2) تفاعل فرط الحساسية على أوراق التبغ واختبار القدرة الأمراضية على نباتات الطماطم واللوز وشرائح الجزر للعزلات المختلفة.

العزله	موقع العزل بمنطقة الجبل	تفاعل فرط الحساسية	اختبار القدرة الأمراضية		
			على	على اللوز	على الجزر
A 101	وردامة	+	+	–	+
A 102	وردامة	+	+	–	+
A 103	الأكوام	+	+	–	+
A 104	بلغرا	+	+	–	+
A 105	شحات	+	+	–	+
A 106	مسه	+	+	–	+
A 107	وردامة	–	*	*	*
A 108	الأكوام	–	*	*	*

(+)- أعطت أعراض الموت الموضعي . (–)- لم تعطي أعراض الموت الموضعي

* لم يجري الاختبار لأن البكتيريا غير ممرضة .

شكل (2) أعراض القدرة الأمراضية على شرائح الجزر.

شكل (3) أعراض القدرة الأمراضية على الطماطم.

جدول (3) نتائج الاختبارات الفسيولوجية والبيوكيماوية للعزلات المختلفة.

نوع الاختبار	العزلات البكتيرية					
	A 101	A 102	A 103	A 104	A 105	A 106
الاكسيديز (Oxidase)	+	+	+	+	+	+
الكتاليز (Catalase)	+	+	+	+	+	+
3–كيتوجلوكسيد (3-Ketolactose)	+	+	+	+	+	+
أنزيم بيتاجالاكتوسيديز (B-Glgcosidase)	–	–	–	–	–	–
أنزيم لوسين ديكربوكسيليز (Lusinc-decarboxylase)	–	–	–	+	–	–
أنزيم اورثينين ديكروبوكسليز (Ornithin-decarboxylase)	–	–	–	–	–	–
أنزيم الجلاتينيز (Gelatinas)	–	–	–	–	–	–
أنزيم اليوريز (Urease production)	–	–	–	–	–	–
غاز كبريتد الهيدروجين (H_2S)	+	+	+	+	+	+
الأندول (Indol production)	–	–	–	–	–	–
الأسيتون (Acetone)	–	–	–	–	–	–
اختزال النترات (Nitrate Reduction)	+	+	+	+	+	+
استخدام الستارات(Citrate)	+	+	+	+	+	+

جدول (4) استخدام البكتيريا لبعض السكريات كمصدر للكربون.

نوع السكر	العزلات البكتيرية					
	A 101	A 102	A 103	A 104	A 105	A 106
سكر الارابينوز (Arabinose)	+	+	+	+	+	+
سكر السوربيتول (Sorbitol)	+	+	+	+	+	+
سكر المانيتول (Manitol)	+	+	+	+	+	+
سكر الانيستول (Insoitol)	+	+	+	+	+	+
سكر التريهالوز (Trehalose)	–	+	+	+	–	–
سكر الرايبوز (Ribose)	–	–	+	+	–	–
سكر المانوز (Manose)	–	+	+	+	–	–
الجلوكوز (Glucose)	+	+	+	+	+	+
السكروز (Sucrose)	–	+	+	+	–	–
الاميجدالين (Amygdalin)	+	+	+	+	+	+

Distribution of Crown Gall Disease and Definition the Causal Agent in Jabel El-Akhdar Area.

Alawami, A. M., Said, M. A. and Jadallh, N. M.

Plant Protection Dept., Fac. Agric., Omar Al-mukhtar Univ., El-Beida, Libya.

Abstract

This study was conducted during the season (2007) to survey and estimate the percent of infection with crown gall disease on certain fruit trees in some regions of El-jabel El-akhdar area. The obtained results showed that the highest percentage of infection on almond, apple and plum trees were recorded in Shahat reagion, meanwhile there is no infection in El-wseata reagion. The symptoms of this disease included galls in crown site and the diseased trees were dwarfed, general weakness and produce small size fruits. Many isolates were obtained from different regions of El-jabel El-akhdar area. Cultural, Morphological, biochemical and physiological characters, as soon as, pathogenicity tests proved that the causel agent of this disease is the bacterium *Agrobacterium tumefaciens*.

المراجع

1- **أبـو الـذهب ، م. ك. والكسـير ، ح. م. والقـزاز ، س. أ. وشـعيب ، ع. ع. (1997)** علـم البكتيرات . الجزء الأول : دار المعارف – القاهرة .

2- **أبـو غـرة ، م. (1997)**. أمـراض النبـات البكتيريـة، منشـورات جامعـة دمشـق، دمشـق، 432 صفحة .

3- **أبوغنية ،ع . ج. (1986)**.أمراض المحاصيل البستانية ، منشورات جامعة الفاتح . طرابلس . 272 صفحة .

4- **الزيات، م. م. مؤمن، س. أ. و أبو الذهب، م. ك.(1974)**. مرض التدرن التاجي على نباتات الكافور في الجمهورية العربية الليبية ، مجلة البحوث الزراعية ، مجلد 2 : 99–166

5- **خليف ، ح. (2007)**. مرض التدرن التاجي في الأردن ، مجلة وقاية النبات العربية ، عدد 25 : 60 .

6- **عبد الرحيم ، ع . م . (1996)** . البكتيريا وأمراض النبات ، منشورات جامعة عمر المختار . البيضاء . 539 صفحة .

7- **فاهي ، ب. سي وبيرسلي، ج. جي.(1983)**. أمراض النبات البكتيرية دليل تشخيص ، ترجمة : فوزي سعد آدم ، منشورات جامعة . البيضاء . 392 صفحة .

8- Agrios, G. N.(1997). Plant pathology .4th ed . Academic press , New York.

9- Bradbury, J. F. (1986). Guide to plant pathogenic bacteria CAB international mycological institute, Ferrylon, kew surrey. England.

10- Breed, R. S.; Murray, E. G. D. and Smith, N. R. (1957) . Bergy,s manual of Determinative Bacteriology. Seventh Ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore Md. U.S.A .

11- Cooksey, D. A. and Moore, L. W. (1980) .Biological control of grown gall with Fungal and Bacterial . Antagonists . Physiopathology. 70 , 506-509 .

12- Dhanvantari, B. N. (1976). Biological control of grown gall of peach in South Western Ontario. Plant disease 60 , 549-551 .

13- Demaree, J. B. and Smith, N. B. (1952) . Blueberry galls caused by astrain of *Agrobacterium tumefaciens* . Phytoapthology. 42 : 88-90.

14- Escobar, M. A. and Dandekar, A.M. (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an

agent of disease. Trends in Plant Science 8(8): 380-386.

15- Goto, M . (1992) . Fundamentals of bacterial plant pathology San Diego . Academic Press .

16- Holt, J. G.; Krueg, N. R.; Sneath, P. H.; Staley, T. and Williams, S. T. (1994) . Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition . Williams Wilkins – Blatimore U.S.A .

17- Kado, C. I. and Heskett, M. G. (1970) . Selective media for isolation of *Agrobacterium, Corynedacterium, Erwinia, Pseudomonas*, and xanthomona s. Phtopathology. 60, 969-976 .

18- Kiraly , Z ., Z, Klement , F., Solymosy , and J., Voros (1974). Methods in plant pathology . Elsevier Scientific Publishing Company , Amsterdam , London , New York .

19- Kovcis, N. (1965) . Identification of *pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. Nature . London . 178,703 .

20- Lelliott, R. A. and Stead, D. E. (1987). Methods for the diagnosis of plant pathogcnic bacteria . Black well . Scientific publication, London .

21- Pacurar, D. I., Thordal-christen, H., Pacurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C. and Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. Physiological and Molecular Plant Pathology 76 (2): 76-81.

22- Schaad, N.W.; Jones, J. B. and Chun, W. (2001). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria . Aps press .

23- Tolba, I. H. and Soliman, M. A. (2013). Efficacy of native antagonistic bacterial isolates in biological control of crown gall disease in Egypt. Annals of Agriculture science 58 (1): 43-49.