

الكشف عن الفيتوبلازما المسببة لمرض البرعم الكبير على البندورة/الطماطم في سورية

حسن أحمد خليل¹، ريم نوفل يوسف¹، ناتاليا جيرسوف²، دامير بوغوتدينوف³، تاتيانا كاستلايفا² وصالح علي الدنكاوي¹

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة البعث، سورية، البريد الإلكتروني: hrmjh2012@gmail.com

(2) معهد الأبحاث العلمية لأمراض النبات لعموم روسيا الاتحادية، روسيا الاتحادية؛

(3) أكاديمية سامارا الحكومية الزراعية، روسيا الاتحادية.

الملخص

خليل، حسن أحمد ، ريم نوفل يوسف، ناتاليا جيرسوف، دامير بوغوتدينوف، تاتيانا كاستلايفا وصالح علي الدنكاوي. 2019. الكشف عن الفيتوبلازما المسببة لمرض البرعم الكبير على البندورة/الطماطم في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 37(1): 71-76.

منذ العام 2013 لوحظت أعراض مرضية شبيهة بأعراض مرض البرعم الكبير على نباتات البندورة/الطماطم (*Solanum lycopersicum* L.) المزروعة في الحقول المفتوحة في الريف الشرقي من محافظة حمص. تمثلت الأعراض على النباتات المصابة بتجعّد والتفاف الأوراق مع ظهور صبغات صفراء أو حمراء، تشوه البراعم الزهرية، تضخم كأس الزهرة والتحام السبلات على شكل (جرس)، تورق الأزهار وظهور أصبغة أنثوسيانية، تخشب الساق، ظهور نكروزات في لحاء الساق. في شهر أيلول/سبتمبر 2017 جُمعت 14 عينة بندورة/طماطم، 12 مصابة واثنان سليمتان (شاهد)، من بعض الحقول المفتوحة في قرى النزهة، الديبة والعاليات (30 كم شرق مدينة حمص). تم إثبات وجود الفيتوبلازما المسببة لمرض البرعم الكبير في 11 عينة، وأظهرت نتائج تحليل الـ RFLP باستخدام خمسة أنزيمات قطع (AluI, HhaI, MseI (TruII), Sau3AI, and TaqI) أنها تتبع مجموعة تورق البرسيم وتحت المجموعة 16SrVI-A والنوع *Candidatus Phytoplasma trifolii*. كلمات مفتاحية: بندورة، البرعم الكبير، فيتوبلازما تورق البرسيم، RFLP، 16SrVI-A، سورية.

المقدمة

والتكلفة المنخفضة للإنتاج نسبياً، وتساعد درجات الحرارة المعتدلة المزارعين في إنتاج البندورة على نطاق واسع في الحقول المفتوحة، إضافةً للمناخ المعتدل في المنطقة الساحلية الذي يُمكن من الزراعة المحمية دون استخدام أجهزة التدفئة للتحكم بظروف الإنتاج.

ويبلغت المساحة المزروعة بالبندورة في سورية 9184 هكتاراً لعام 2016، ووصل إنتاجها إلى 415393 طناً. أما عدد البيوت البلاستيكية المزروعة بالبندورة فكان 75172 بيتاً بمساحة 3007 هكتاراً حيث بلغ إنتاجها 451032 طناً (المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية، 2016).

تُصاب البندورة/الطماطم بمرض ستولبور الباندنجانيات المُتسبب عن الممرض *Candidatus Phytoplasma solani* (Sertkaya et al., 2007)، وينتشر المرض في المناطق الدافئة حيث يصيب البندورة والباندنجان والفليفلة والبطاطا/البطاطس، وبعض الأعشاب البرية كالمداة والهندباء والحلبلوب والذاتورة وغيرها (خليل، 2003)، كما تصاب البندورة أيضاً بأنواع أخرى من الفيتوبلازما (Amaral-Mello et al., 2006) وعالمياً تنتشر هذه الأمراض في الدول الأوروبية المطلّة على البحر المتوسط، وفي شمال قارة أفريقيا في المغرب ومصر وفي قارة آسيا والشرق الأدنى مثل تركيا، أذربيجان، لبنان، فلسطين المحتلة، الأردن،

تُعدّ البندورة/الطماطم (*Solanum lycopersicum* L.) من أهمّ محاصيل العائلة الباندنجانية حيث تحتل المرتبة الأولى في الإنتاج العالمي من الخضار وتشير تقديرات منظمة الأغذية والزراعة الدولية (FAO) إلى أن مجمل الإنتاج العالمي من البندورة/الطماطم بلغ 373 مليون طناً، حيث زُرعت في 44 دولة، وتعد أمريكا والصين وإيطاليا أكثر الدول المُنتجة للبندورة في العالم (FAO, 2017).

تلعب منتجات البندورة/الطماطم المصنّعة في دول حوض المتوسط والولايات المتحدة الأمريكية وأمريكا الوسطى الدور الرئيس في التجارة العالمية للبندورة، ويُستخدم ثلث إنتاجها في الصناعات التحويلية مما يجعلها في مقدّمة الخضار التصنيعية، وهي من أكثر الخضار استخداماً في تغذية الإنسان بسبب تعدّد طرائق استخدامها، حيث تُستهلك طازجة في السلطات وكماذّة مُنكّهة في معظم الأطباق (Cutler, 1998)، وتتميز ثمارها بقيمتها الغذائية (جلول وسمرة، 2004).

تُعدّ زراعة البندورة/الطماطم في سورية من أهم محاصيل الخضروات والتي تُشكّل مصدراً مهماً للدخل بسبب إنتاجيتها العالية

الشرقي لمحافظة حمص من أعراض شبيهة بهذا المرض، وبسبب الخسائر الكبيرة التي يُسببها للمزارعين، هدف هذا البحث إلى الكشف عن وجود الفيتوبلازما المُسببة لمرض البرعم الكبير على البندورة في بعض مناطق زراعتها في سورية بتحليل الحمض النووي الريبي منزوع الأوكسيجين (DNA) بطريقة تعدد أشكال قطع القطع المحدد (RFLP).

مواد البحث وطرائقه

جمع العينات

تم جمع العينات من خمسة حقول مزروعة بمحصول البندورة صنف شروق، موزعة في ثلاث قرى (النزهة، الدبية، العاليات) في منطقة الريف الشرقي من محافظة حمص، وتبعد عن مركز المحافظة حوالي 30 كم، وذلك في شهر أيلول/سبتمبر لعام 2017، حيث جُمعت 12 عينة من نباتات ظهرت عليها أعراض المرض النموذجية مثل اصفرار الأوراق والتورق وظاهرة البرعم الكبير (شكل 1)، ونباتان سليمان كشاهد لم تظهر عليهما أعراض المرض، ووضعت العينات في أكياس نايلون شفافة مثبته لمنع تعفنها ووضعت قفصاً ورقية مع العينات مدون عليها رقم العينة ومكان الجمع. تم إرسال العينات (المصابة والسليمة) إلى معهد أمراض النبات لعموم روسيا الاتحادية، موسكو بالبريد السريع من أجل الكشف عن وجود الفيتوبلازما بتقنية PCR حيث تم هناك تجذير الأجزاء النباتية المرسله ومن ثم زراعتها من جديد في أصص ضمن البيت الزجاجي لتصبح صالحة لإجراء الدراسات عليها فترة طويلة.



شكل 1. أعراض مرض البرعم الكبير على البندورة في أحد الحقول في سورية

Figure 1. Tomato big bud disease symptoms in a tomato field in Syria

وأرمينيا، ووجد أيضاً في أوكرانيا وفي غرب روسيا (Torres et al., 2014)، وعلى محاصيل مختلفة في إيران (Zibadost et al., 2016). وسُجّل وجود فيتوبلازما الستولبور في سورية على أشجار التفاح في محافظة السويداء حيث بلغت نسبة الإصابة 8.1% (الجبر، 2012)، وعلى العنب في الساحل السوري (Contaldo et al., 2011).

لاحظ بعض الباحثين ظهور أعراض الاصفرار ووجود البراعم المتضخمة والتورق على نبات البندورة في أربع مناطق في وسط إيطاليا وسُجّلت أعلى نسبة إصابة عام 1999 حيث بلغت 78%، أما في عام 2000 فوصلت نسبة الإصابة إلى 82% (Del Serrone et al., 2001). وفي لبنان ظهرت أعراض الاصفرار والتقرم وزيادة في نشاط البراعم الجانبية على نبات البندورة في 25% من الحقول المزروعة وبنسبة إصابة 2-8%، كما لوحظت هذه الأعراض على الفليفلة في 27% من الحقول المزروعة بنسبة 1-4% (Choueiri et al., 2007). وأشارت دراسة أخرى إلى وجود أعراض مشابهة لأعراض المرض في اليونان بنسبة إصابة 1-2% على البندورة المزروعة وقد وصلت في بعض الحالات إلى 70-80% (Vellios & Lioliopoulou, 2007).

تتمثل أعراض المرض النموذجية بتلون الفروع الحديثة وقم النباتات باللون الأحمر أو البنفسجي، وتظهر أوراق جديدة مشوهة ضيقة تشبه أوراق السرخس ومنتمية باتجاه الأعلى، أما الأوراق السفلية فتتلون باللون الأصفر وتتلون عروقها من الجهة السفلية باللون البنفسجي وتكون هذه الأوراق ذات ملمس خشن وسهلة الكسر، وعلى الأزهار والثمار يُلاحظ التحام الأوراق الكأسية للزهرة طولياً وازدياد حجمها، وتأخذ شكلاً يشبه الجرس، وتجفّ الأسدية وتكون المدقة قصيرة ومشوهة وتصبح البتلات صغيرة الحجم وتتلون باللون الأخضر والأزهار لا تعقد ولا تُشكل ثماراً. وفي حال حدوث الإصابة أثناء تشكل الثمار تكون الثمار المصابة عند النضج ذات لون أصفر أو برتقالي وتظهر في أسفلها شبكة من العروق يمكن رؤيتها بسهولة عبر قشرة الثمرة. ويُلاحظ في هذه الثمار نمو كبير للخلايا الخشبية في الأوعية الناقلة وتكون حجرات البذور صغيرة الحجم وتحتوي بذوراً ضامرة أو لا تحوي بذوراً نهائياً وهذا ما يجعل لب الثمرة مُتخشّباً وسيء الطعم وغالباً ما تكون الثمار المصابة غير قابلة للاستهلاك الطازج أو التصنيع. وتصل نسبة الفقد في الإنتاج بسبب الإصابة بهذا المرض إلى 30-40% (خليل، 2003).

تنتقل أمراض الفيتوبلازما بالتطعيم (Salehi et al., 2014)، وبوساطة الحامل (Choueiri et al., 2007) والعديد من نشاطات الأوراق مثل: *Macrostes quadripunctulatus* (Trivellone et al., 2005) *Anaceratagallia ribauti*.

نظراً لعدم وجود أي دراسة حول وجود أو عدم وجود مرض البرعم الكبير على البندورة في سورية، ولازدياد شكاوي مزارعي البندورة في الريف

استخلاص الـ DNA من العينات

تم استخلاص الـ DNA من العينات المدروسة وفق البروتوكول المُتبع في المعهد (Doyle & Doyle, 1987) مع بعض التعديلات تبعاً للخطوات الآتية:

تم طحن 0.3 غ من النسيج النباتي (من العروق الوسطى للأوراق) في 3 مل من المحلول الواقي (CTAB-cetyl trimethyl ammonium-bromide). نُقل 700 ميكروليتر من المستخلص إلى أنبوب سعة 1.5 مل وأضيف إليها 7 ميكروليتر إنزيم الريبونوكلياز A (100 مغ/مل) وحُصّن المزيج عند حرارة +65 درجة سلسيوس مدة 30 دقيقة، مع التحريك الدوري لمحتويات الأنبوب، بعد ذلك أُضيف للمزيج السابق الكلوروفورم وكحول إيزوأميل (1:1) بنسبة (1:24) وتم مزجه جيداً. نُقل المزيج لمدة 10 دقائق بسرعة 5000 دورة/د، ثم أخذ الجزء الطافي من الرشاحة (600 ميكروليتر) إلى أنبوب جديد وُخَلط بـ 400 ميكروليتر من الإيزوبروبانول، وحُصّن الخليط مدة 5 دقائق عند حرارة 20 درجة سلسيوس ثم نُقل لمدة 10 دقائق بسرعة 12000 دورة/الدقيقة. تم التخلص من الرشاحة الناتجة وذوّب الراسب بـ 0.3 مل من الإيثانول تركيز 80%، ثم نُقل لمدة 10 دقائق بسرعة 5000 دورة/د، ومن ثم تم التخلّص من الرشاحة. أُذيب الراسب بـ 0.3 مل من الإيثانول تركيز 70%، ثم نُقل لمدة 10 دقائق بسرعة 5000 دورة/دقيقة. من بعدها تم التخلّص من الرشاحة وأذيب الراسب بـ 0.3 مل من الإيثانول تركيز 70%. نُقل المحلول مرة أخرى لمدة 10 دقائق بسرعة 5000 دورة/دقيقة، وبعد ذلك تم التخلّص من السائل وجفّف الراسب هوائياً وحلّ في 200 ميكروليتر من المحلول المنظم (Tris- ethylene diamine TE acid tetraacetic).

اختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction

تم إجراء هذا الاختبار على مرحلتين : المرحلة الأولى اختبار PCR المباشر باستخدام البادئ P1/16S-SR (Dickinson & Hodgetts, 2013) حيث يقوم هذا البادئ بمضاعفة كامل المورثة 16S وكذلك القطعة بين المورثتين 16S و 23S وجزء بسيط من المورثة 23S (حجم نواتج هذه المرحلة من الاختبار حوالي 1.8 كيلو قاعدي) . كانت مراحل هذا الاختبار على الشكل التالي: 94 °س مدة 5 دقائق، 38 دورة (94 °س دقيقة واحدة، 55 °س لدقيقتين، 72 °س لمدة 3 دقائق)، والمرحلة النهائية 72 °س لمدة 8 دقائق. بعدها تم تقدير كمية ونوعية نواتج الـ PCR بطريقة الرحلان الكهربائي في هلام الأجاروز. المرحلة الثانية إجراء اختبار الـ PCR المتداخل (Nested PCR) على نواتج المرحلة الأولى بعد تمديدها بنسبة 1/20 باستخدام البادئين R16F2n/ R16R2

(حجم نواتج هذه المرحلة من الاختبار 1.2 كيلو قاعدي) (Lee et al., 1998)، كما تم أيضاً تقدير كمية ونوعية نواتج الـ PCR بطريقة الرحلان الكهربائي في هلام الأجاروز. استخدم كشاهد إيجابي في هذا الاختبار DNA فيتوبلازمي يتبع المجموعة 16SrX معزول من أشجار تفاح صنف اميروس مصابة بالفييتوبلازما.

طريقة تحليل تعدد أشكال قطع القطع المحدد Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) لتحديد المجموعة وتحت المجموعة للفييتوبلازما

عملت نواتج الـ PCR ذات الأحجام التي شوهدت بوضوح على هلام الأجاروز بخمس أنزيمات قطع وهي: Alu1- Hha1- Mse1- Taq1- Sau3A1 مع استخدام البادئات SR 16S- P1/ R16F2n/ R16R2 باستخدام الشركة المنتجة (Lee et al., 1998) بحسب توصيات الشركة المنتجة (Fermentas- Lithuania) وتم تمريرها في جهاز الرحلان الكهربائي (ساعة واحدة، 150 فولت).

واستخدم سلم المعلم الجزيئي (الماركر) Ox 174 DNA/ Br4R1 (Hae III- (Fermentas- Lithuania)، الذي يحوي تدرجات متزايدة في الحجم على النحو الآتي: 27- 118- 194- 234- 271- 281- 310- 603- 872- 1078- 1353 زوج قاعدي.

النتائج والمناقشة

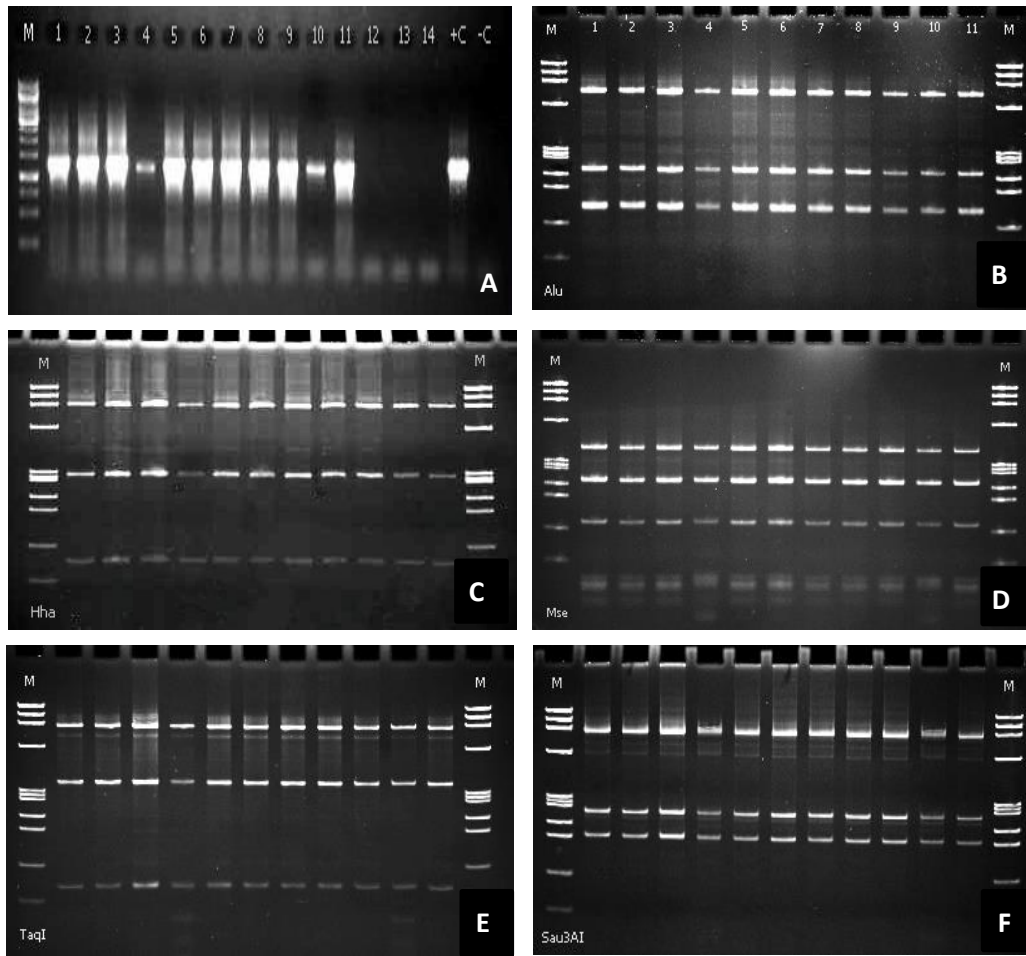
ظهرت على النباتات المدروسة أعراض النفاق وتجدد الأوراق مع تلون أصفر أو أحمر، بالإضافة إلى تضخم كأس الزهرة، والتحام سيلاته على شكل جرس، وعقم الأزهار وتورقها وظهور أصبغة أنثوسيانية عليها، وتعد هذه الأعراض نموذجية تميز مرض البرعم الكبير على البندورة.

بعد إجراء اختبار تفاعل البوليمراز المتسلسل المتداخل (Nested PCR) على الحمض النووي المعزول من العينات 1-11 تم الحصول على ناتج كامل ذي وزن جزيئي 1.2 كيلو قاعدي (شكل A2) بينما لم يتم الكشف عن وجود الفييتوبلازما في العينة 12 التي كانت تبدي أعراض إصابة واضحة وربما يعود السبب في هذه النتيجة غير المتوقعة إلى قلة تركيز الفييتوبلازما في الجزء المستخدم في عملية التجذير أو أن الحمض النووي المعزول منها لم يكن نقياً بالقدر الكافي واحتوى على مثبطات أعاق اختبار PCR . كما لم يتم إيجاد الحمض النووي للفييتوبلازما في العينتين 13 و 14 اللتان لم يظهر عليهما أية أعراض للمرض (شكل A2).

أظهرت نتائج تحليل RFLP أن نواتج الـ PCR للعينات 1-11 بعد تعريضها لخمس أنزيمات قطع أعطت حزماً (عُصابات) متشابهة

وجود الممرض. وحسب معلوماتنا فإن هذا هو التسجيل الأول للمرض في سورية (Khalil *et al.*, 2019). في عام 2011 ظهر أول منشور عن فيتوبلازما معزولة من سورية، ففي دراسة على العنب في الساحل السوري تبين وجود إصابة بمرض اصفرار العنب ناتج عن إصابة مختلطة بمجموعة 16SrXII والثانية تابعة لمجموعة تورق البرسيم 16SrVI (Contaldo *et al.*, 2011) وهي المجموعة التي أظهرت نتائج هذا البحث أن الفيتوبلازما المسببة للإصابة على البندورة تنتمي إليها، وفي تركيا ومنذ العام 2007 تم اكتشاف فيتوبلازما تتبع تحت المجموعة 16SrVI-A على السمس وأخرى تتبع مجموعة

تماماً، وبعد مقارنتها مع المراجع المتخصصة في تصنيف الفيتوبلازما (Lee *et al.*, 1998؛ Wei *et al.*, 2007). نستطيع الجزم وبدرجة كبيرة من الموثوقية أن الفيتوبلازما المكتشفة في عينات البندورة المدروسة تتبع النوع *Candidatus phytoplasma trifolii* على اعتبار أن نتائج الاختبار تتطابق مع مجموعة تورق البرسيم 16SrVI وتحت المجموعة 16SrVI-A (شكل 2 B-E). قد يعزى عدم ظهور فيتوبلازما تتبع مجموعات أخرى مثل مجموعة الستولبور 16SrXII ومجموعة اصفرار الأستر 16SrI وغيرها في العينات المدروسة إلى ضيق ومحدودية المنطقة الجغرافية التي أخذت منها العينات حيث كان الهدف فقط إثبات



شكل 2. A= نتائج تضخيم DNA بطريقة PCR. المسارات 1-12 لعينات البندورة التي أبدت أعراض إصابة بالفيتوبلازما، المساران 13 و14 لعينات البندورة بدون أعراض إصابة (شاهد). +C= شاهد موجب. -C= شاهد سالب. M= سلم المعلم يشمل قطع أحجامها من 250 إلى 10000 زوج قاعدي (من الأسفل إلى الأعلى). نتائج تحليل RFLP للعينات 1-11 بعد تعريضها لإنزيم القطع *AluI* (B)، إنزيم القطع *HhaI* (C)، إنزيم القطع *MseI* (D)، إنزيم القطع *TaqI* (E)، إنزيم القطع *Sau3AI* (F)، سلم المعلم الجزيني في تحت الأشكال B, C, D, E, F، يشمل قطع أحجامها من 72 إلى 1353 زوج قاعدي (من الأسفل إلى أعلى).

Figure 2. A= PCR amplification of the DNA from solbur-infected and healthy samples using primers R16F2n/R16R2 and P1/16S-SR. Tracks 1-12 are samples of tomato plants with big bud symptoms, tracks 13 and 14 are samples from healthy plants. C+= positive control, -C= Negative control, M= Molecular markers ladder of segments 250-10000 bp (from bottom to top). Results of RFLP analysis of samples 1-11 treated with restriction enzyme *AluI* (B), *HhaI* (C), *MseI* (D), *TaqI* (E), and *Sau3AI* (F). The molecular markers ladder used in the sub-figures B, C, D, E, F include sizes of 72-1353 bp (from bottom to top).

(Zibadost et al., 2016). وفي لبنان سُجل وجود 16SrVI على البندورة (Choueiri et al., 2007) وفي الأردن أيضاً سُجلت مجموعة تورق البرسيم 16SrVI على البندورة (Anfoka et al., 2003).
 نشير في الختام إلى أن مرض البرعم الكبير على البندورة ارتبط في البداية بالفيوتوبلازما التابعة لمجموعة اصفرار الأستر 16SrI إلا أنه وبعد ظهور التصنيف للفيوتوبلازما فقد ذُكرت عدة دراسات أن هذا المرض قد تسببه أيضاً فيوتوبلازما تتبع المجموعات 16SrII (Saqib et al., 2006) -16SrIII (Amaral-Mello et al., 2006) و 16SrX11 (Choueiri et al., 2007) (Sertkaya et al., 2007).

الستولبور 16SrXII على البندورة في محافظة أنطاكية على الحدود الحالية بين سورية وتركيا (Sertkaya et al., 2007). وبالإضافة إلى السمسم فقد تم اكتشاف الفيتوبلازما التابعة للمجموعة 16SrVI على الفليفلة (*Capsicum annum*) والبانجان (*Solanum melongena*) ونبات الفينكا (*Catharanthus roseus*) وكذلك في الحشرة الناقلة (*Orosius orientalis*) (Sertkaya et al., 2007). وفي عام 2017 تم اكتشاف فيوتوبلازما تتبع المجموعة 16SrVI وأخرى تتبع 16SrX11 على الخيار في ولاية فان جنوب شرق تركيا (Usta et al., 2017)، كما سُجل وجود تحت مجموعة 16SrX11-A وتحت مجموعة 16SrVI-A على البندورة (Usta et al., 2018). وفي إيران تم الكشف عن الفيتوبلازما

Abstract

H.A. Khalil, R.N. Yousef, N.V. Girsova, D.Z. Bogoutdinov, T.B. Kastalyeva and S.A. Aldenkawe. 2019. Detection of phytoplasma causing tomato big bud disease in Syria. Arab Journal of Plant Protection, 37(1): 71-76.

Since 2013, symptoms similar to those produced by the phytoplasma disease "Big bud" were observed on tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.) grown in the field in east of Homs city, Syria. Diseased plants were characterized by twisting, corrugated, yellowing or reddening of leaves. The sepals of the flowers acquired hypertrophied form, were fused together and created a bell-shaped sterile bud (phyllody) of green or anthocyanin color. The stems of the plants were lignified, and phloem necrosis was observed on the stem. In mid-September 2017, samples of 12 diseased and 2 healthy (control) tomato plants were collected from the Syrian province of Homs in the villages: Al-Nozha, Al-Diba, and Al-Aliyat (30Km east of the city of Homs). Phytoplasmas were detected in 11 diseased samples. RFLP analysis with restriction enzymes *AluI*, *HhaI*, *MseI* (*Tru1I*), *Sau3AI*, and *TaqI* showed that they all correspond to phytoplasmas of the Clover proliferation subgroup 16SrVI-A, or 'Candidatus phytoplasma trifolii' species.

Keywords: Tomato, big bud, phytoplasma, 16SrVI-A, RFLP, Syria.

Corresponding author: H.A. Khalil, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Al-Baath University, Homs, Syria, email: hrmjh2012@gmail.com

References

- diseases of solanaceous crops in Lebanon. European Journal of Plant Pathology, 118: 411-416.
- Contaldo, N., Z. Soufi and A. Bertaccin.** 2011. Preliminary identification of phytoplasmas associated with grapevine yellows in Syria. Bulletin of Insectology, 64: S217-S218.
- Cutler, K.D.** 1998. From Wolf Peach to Outer Space. www.bbg.org/gardening/kitchen/tomatoes/cutler.html.
- Del Serrone, P., C. Marzachi, M. Bragaloni and P. Galeffi.** 2001. Phytoplasma infection of tomato in central Italy. Phytopathologia Mediterranea, 40: 137-142.
- Dickinson, M. and J. Hodgetts (eds.).** 2013. Phytoplasma Methods and Protocols, Springer, 416 pp.
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle.** 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin, 19: 11-15.
- FAO.** 2017. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org>
- Khalil, H., R.N. Yousef, N.V. Girsova, D.Z. Bogoutdinov, T.B. Kastalyeva and S. Aldenkawe.** 2019. First report of tomato "Big bud" disease in Syria caused by 'Candidatus Phytoplasma trifolii' - related strain. Plant Disease, 103: 578. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-1057-PDN>

المراجع

- الجبر، خلدون.** 2012. الكشف عن فيتوبلازما تضاعف التفاح *Candidatus phytoplasma mali* في سورية. مجلة وقاية النبات العربية، 30: 130-128.
- المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية.** 2016. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي. مديرية الإحصاء والتخطيط، دمشق، سورية.
- جلول، أحمد وبيديع سمرة.** 2004. الخضار الصيفية (إنتاج الخضار- 2)، منشورات جامعة تشرين، سورية. 135 صفحة.
- خليل، حسن.** 2003. أمراض النبات، منشورات جامعة البعث، سورية. 430 صفحة.
- Amaral-Mello, A.P., I.P. Bedendo, E.W. Kitajima, L.E. Ribeiro and R. Kobori.** 2006. Tomato big bud associated with a phytoplasma belonging to group 16Sr III in Brazil. International Journal of Pest Management, 52: 233-237.
- Anfoka, G., A.B. Khalil and I. Fattash.** 2003. Detection and molecular characterization of a phytoplasma associated with big bud disease of tomatoes in Jordan. Journal of Phytopathology, 151: 223-227.
- Choueiri, E., P. Salar, F. Jreijiri, S. El-Zammar, R. Massaad, H. Abdul-Nour, J.M. Bove, J.L. Danet and X. Foissac.** 2007. Occurrence and distribution of 'Candidatus phytoplasma trifolii' associated with

- Usta, M., A. Guier and H. Sipahioğlu.** 2018. Molecular analysis of '*Candidatus Phytoplasma trifolii*' and '*Candidatus Phytoplasma solani*' associated with phytoplasma diseases of tomato (PDT) in Turkey. *International Journal of Agriculture and Biology*, 20: 1991-1996.
- Usta, M., A. Güller and H.M. Sipahioğlu.** 2017. Detection and Characterization of two Phytoplasma lineages on Cucumber (*Cucumis sativus* L.) with Same Symptomatology based on Virtual RFLP and Nucleotide Sequence Analysis of 16S rDNA. *YYÜ TAR BİL DERG (YYU J AGR SCI)*, 27: 299-308.
- Vellios, E. and F. Lioliopoulou.** 2007. Detection and characterization of phytoplasmas infecting tomato plants in Greece. *Bulletion of Insectology*, 60: 157-158.
- Wei, W., R.E. Davis, I.-M. Lee and Y. Zhao.** 2007. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1855–1867.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65000-0>
- Zibadost, S., M. Rastgou and S.A. Tazehkand.** 2016. Detection and molecular identification of '*Candidatus phytoplasma trifolii*' infecting some cultivated crops and vegetables in West Azerbaijan province, Iran. *Australasian Plant Disease Notes*, 11: 3.
<https://doi.org/10.1007/s13314-015-0188-8>
- Lee, I.M., D.E. Gundersen-Rindal, R.E. Davis and I. M. Bartoszyk.** 1998. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16SrRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal Systematic Bacteriology*, 48: 1153-1169.
- Saqib M., K.L. Bayliss and M.G.K. Jones.** 2006. Identification of sweet potato little leaf phytoplasma associated with *Vigna unguiculata* var. *sesquipedalis* and *Lycopersicon esculentum*. *Australasian Plant Pathology*, 35: 293-296.
- Salehi, E., M. Salehi, S.M. Taghavi and K.I. Jahromi.** 2014. A 16SrII-D phytoplasma strain associated with tomato witches' broom in Bushehr province, Iran. *Journal of Crop Protection*, 3: 377-388.
- Sertkaya, G., M. Martini, R. Musetti and R. Osler.** 2007. Detection and molecular characterization of phytoplasma infecting sesame and solanaceous crops in Turkey. *Bulletin of Insectology*, 60: S 141-142,
- Torres, E., A. Batlle, A. Lavina, J. Bech, A. Bertaccini and E. Sousa.** 2014. Review of occurrence of phytoplasmas in Spain, Portugal and Malta. Pages 58–61. In: *Phytoplasma and phytoplasma disease management: how to reduce their economic impact*. A. Bertaccini (ed.). COST Action FA0807, IPWG, Bologna, Italy.
- Trivellone, V., F. Pinzauti and B. Bagnoli.** 2005. *Reptalus quinquecostatus* (Dufour) (Auchenorrhyncha Cixiidae) as a possible vector of stolbur-phytoplasma in a vineyard in Tuscany. *Redia LXXXVIII*:103-108.

Received: November 26, 2018; Accepted: February 7, 2019

تاريخ الاستلام: 2018/11/26؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2019/2/7