الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
كلية الزراعة
قسم التقانات الحيوية

الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي
الهيئة العامة للتقانة الحيوية

دراسة كفاءة عزلات محلية من الفطر فائق التطفل *Ampelomyces quisqualis* Ces. ex Schlecht في مكافحة بعض أمراض البياض الدقيقي

رسالة مقدمة لنيل درجة الماجستير في التقانة الحيوية

إعداد

المهندس شادي حسين حمزة

إشـــــراف

أ. د. محمد فواز العظمة (مشرفاً مشاركاً)
أستاذ في قسم وقاية النبات
كلية الزراعة
جامعة دمشق

أ. د. وليد نفاع (مشرفاً)
أستاذ في قسم وقاية النبات
كلية الزراعة
جامعة دمشق

2022 م

تصريـــــــح

أصرح بأن هذا البحث "**دراسة كفاءة عزلات محلية من الفطر فائق التطفل *Ampelomyces quisqualis* Ces. ex Schlecht في مكافحة بعض أمراض البياض الدقيقي.**" لم يسبق أن قُبل للحصول على شهادة، ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

اسم المُرشَّح

شادي حسين حمزة

تاريخ: 2022/11/23

DECLARATION

This is to declare that, this work "**Studying the Efficiency of Local Isolates of the Hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* Ces. ex Schlecht in Controlling Some Powdery Mildew Diseases**" has not been being submitted concurrently for any other degree.

Candidate name

Shady Hussain Hamzeh

Date: 23/11/2022

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لنيل درجة الماجستير في التقانة الحيوية – كلية الزراعة – جامعة دمشق.

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirements for master degree in biotechnology in the faculty of Agriculture of Damascus University.

نوقشت هذه الأطروحة في جلسة علنية بتاريخ 2022/11/23 وأجيزت.

لجنة الحكم:

الأستاذ الدكتور وليد نفاع

الأستاذ الدكتورة نوال علي

الدكتورة عايدة جلول

شـــــــكر وتقديـــــــر

Acknowledgment

أتقدم بخالص وعميق الشكر للأستاذ الدكتور وليد نفاع والأستاذ الدكتور محمد فواز العظمة على تفضلهما بالإشراف على هذه الرسالة وتسخير كل معارفهم وخبراتهم العلمية للخروج بهذا البحث على أفضل صورة، كما أتقدم للدكتورة عايدة جلول بوافر الامتنان والشكر لتقديم خبرتها ومشورتها في المجال الجزيئي والمعلوماتية الحيوية وللدكتورة نوال علي من جامعة تشرين بجزيل الامتنان لمساعدتها وتقديم خبرتها في هذا البحث.

جزيل الشكر والمحبة للزملاء في الهيئة العامة للتقانة الحيوية ممثلة بالأستاذ الدكتور نزار عيسى والدكتور نورس الأبرص لما قدموه من تسهيلات، وشكر خاص للأستاذ الدكتور عصام قاسم المدير السابق للهيئة على ما قدمه خلال فترة توليه الإدارة وتفضله بقبول البحث كأحد محاور الهيئة البحثية.

والشكر الموصول للزميلة بثينة السلامة على تفانيها في تقديم كل ما يلزم من مساعدة في مخبر البيولوجيا الجزيئية في الهيئة وللزميل اسماعيل الصالح على مساعدته في توفير بعض برامج المعلوماتية الحيوية الضرورية والزميلة ردينا غانم على المساعدة في العمل بجامعة تشرين. والشكر الجزيل للزميل صياح من هيئة الطاقة الذرية على تكرمه في تنفيذ تحليل السلسلة. كما أتقدم للصديق والزميل الدكتور إيهاب زغيب بوافر الامتنان على مساعدته في إخراج هذه الرسالة. وعميق وخالص الشكر والامتنان للأخت العزيزة الدكتورة شعلة خاروف على مساعدتها في تفاصيل النشر العلمي. وكل من ساعد وقدم يد العون لإنجاح هذا البحث.

شهادة

نشهد بأن هذا العمل الموصوف في هذه الدراسة "دراسة كفاءة عزلات محلية من الفطر فائق التطفل ***Ampelomyces quisqualis*** **Ces. ex Schlecht** في مكافحة بعض أمراض البياض الدقيقي." هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح السيد شادي حسين حمزة بإشراف الدكتور وليد نفاع (أستاذ، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة بجامعة دمشق، دمشق، سورية) والدكتور محمد فواز العظمة (أستاذ، قسم وقاية النبات، كلية الزراعة بجامعة دمشق، دمشق، سورية)، وأن أي مرجع ورد في هذه الرسالة موثق في النص.

المرشح بإشراف

شادي حسين حمزة وليد نفاع محمد فواز العظمة

تاريخ: 2022/11/23

Certification

It is hereby certified that, the work described in this thesis "**Studying the Efficiency of Local Isolates of the Hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* Ces. ex Schlecht in Controlling Some Powdery Mildew Diseases**" is the result of Mr. Shady Hussain Hamzeh own investigations under the supervision of Dr. Walied Naffaa (Faculty of Agriculture, Damascus University, Damascus, Syria) and Dr. M. Fawaz Azmeh (Faculty of Agriculture, Damascus University, Damascus, Syria), and any reference of other researcher's work has been duly acknowledged in the text.

Candidate **Supervisores**

Shady Hussain Hamzeh **Dr. Walied Naffaa** **Dr. M. Fawaz Azmeh**

Date: 23/11/2022

الإهـــــــداء

لمن كانت بلسما للجراح ورفيقا للمعاناة وشريكا في الفرح والكره والضيق والفرج، النجمة التي بقيت تبرق في سماء عذاباتي في أوقات البعد والغربة، خليلتي وتوأم روحي .....

زوجتي الغالية رنا

أزهاري الجميلة ومن لا يطيب نهاري الا برؤية ابتساماتهم الملائكية البريئة، فلذات كبدي.....

أولادي الأعزاء ردين الغالي، وآدم ويارا الصغيرين

من أكن له كل الاحترام ومن كان لعائلتنا خيمة نحتمي بظلها، صخرة البيت وعامودها الجلمود.....

والدي العزيز

فيض الحنان وطيبةُ المعاني وذات اللمسات الرقيقة، من ذرفت الدموع لآلامنا وأفراحنا وتحملتنا طيلة فترة الصغر.....

أمي الطيبة

شركاء طفولتي و رفاق الصغر والكبر، من تقاسمت وإياهم لحظات اللعب والدراسة والبهجة والحزن، ومن أضحوا سنداً ومتكأ.....

أخوتي الأعزاء

لم تلدهم أمي، ولكن كانوا عنوان الأخوة والمحبة وعنوان الرجولة والانتماء، من وقفوا وقفة العز والشموخ والكبرياء وكانوا للوطن حماة واوفياء ومن قضى منهم في سبيل الكرامة واضحوا في دار الرجاء

..... إلى رفاق السلاح، الأحياء منهم والشهداء لكم مني ألف تحية

28فهرس المحتويات Table of Contents

رقم الفقرة	العنوان	رقم الصفحة
	الملخص Abstract	
	دراسة تمهيدية Preface study	
	مقدمة Introduction	1
	إشكالية البحث Problematic of the research	3
	أهداف البحث Research Targets	4
	أهمية البحث research importance	4
	دوافع ومسوغات البحث :research justifications	5
	محدوديات البحث Limits of the research	5
	الفصل الأول **الدراسة المرجعية** Literature review	
1-	الدراسة المرجعية Literature review	7
1-1	أمراض البياض الدقيقي وأهميتها الاقتصادية Powdery mildew diseases and its economic importance	7
2-1	تصنيف فطور البياض الدقيقي Taxonomy of powdery mildews	8
3-1	دورة حياة فطور البياض الدقيقي Life cycle of powdery mildew	9
4-1	الإجراءات المتبعة في مكافحة أمراض البياض الدقيقي والحد من انتشارها Procedures used to control powdery mildew diseases and limit their spread	10
5-1	المكافحة الحيوية لأمراض البياض الدقيقي Biological control of powdery mildew	12
-2	لمحة تاريخية عن الفطر فائق التطفل Historical background of hyperparasite *Ampelomyces quisqualis*	13
1-2	تصنيف الفطر فائق التطفل Taxonomy of the hyperparasite	16
2-2	آلية تأثير الفطر Mode of Action	17
3-2	دورة الحياة Life cycle of the hyperparasite	18
4-2	الطبيعة الرمية للفطر Saprophytic nature of the hyperparasite	20
5-2	التنوع الحيوي للفطر Biodiversity of *Ampelomyces quisqualis*	21

الفصل الثاني **المواد والطرائق** Materials and methods		
25	Material and Methods المواد والطرائق	3-
25	Samples collection جمع العينات	3-1
27	Isolation and morphological characterization العزل والتوصيف المورفولوجي	3-2
27	Molecular tests الاختبارات الجزيئية	3-3
28	Amplification of ITS region using PCR تضخيم منطقة ITS باستخدام تفاعل بوليميراز التتابعي	3-4
29	Agarose gel electrophoresis of PCR products الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة على هلامة أغاروز	3-5
29	PCR DNA Sequencing of PCR products تحديد التتابع النكليوتيدي لنواتج	3-6
30	Multiple sequence alignment and drawing the phylogenetic tree محاذاة سلاسل متعددة ورسم شجرة القرابة الوراثية	3-7
33	Artificial inoculation and efficiency tests of experimented isolates العدوى الاصطناعية واختبارات الكفاءة للعزلات المدروسة	3-8
34	Artificial inoculation using detached leaf assay العدوى الاصطناعية بطريقة الورقة المفصولة	3-8-1.
37	Preparation of different concentrations of spore suspensions تحضير التراكيز المختلفة للمعلقات البوغية	3-8-2.
37	Stasistical analysis التحليل الإحصائي	3-9
الفصل الثالث **النتائج والمناقشة** Results and discussion		
40	Results and discussion النتائج والمناقشة	4-
40	Field survey المسح الحقلي	4-1
42	Isolation and morphological characterization العزل والتوصيف المورفولوجي	4-2
42	Characteristics of *Ampelomyces* on natural hos خصائص الفطر *Ampelomyces* على عائله في الطبيعة	4-2-1.
46	Characteristics of *Ampelomyces* on culture Media خصائص الفطر *Ampelomyces* على وسط الزرع	4-2-2.
51	Molecular identification :(*Ampelomyces*) التعريف الجزيئي لعزلات الفطر	4-3

	of *Ampelomyces* isolates	
52	Sequence analysis تحليل نتائج التتابع النكليوتيدي	4-4
58	Phylogenetic analysis تحليل القرابة الوراثية	5-4
64	Artificial inoculation and العدوى الاصطناعية وتقييم كفاءة العزلات المدروسة efficiency evaluation of experimented isolates	6-4
64	على البياض الدقيقي المتطفل على نبات الميرمية *S. officinalis*	.1-6-4
66	على البياض الدقيقي المتطفل على الكرمة *V. venifera*	.2-6-4
68	على البياض الدقيقي المتطفل على اليقطين (القرعيات) *C. maxima*	.3-6-4
72	Results of statistical analysis نتائج التحليل الإحصائي	7-4
72	Concentrations comparison مقارنة التراكيز	.1-7-4
73	Isolates comparison مقارنة العزلات	.2-7-4
74	Mycohost comparison مقارنة العائل الفطري	.3-7-4
75	Tests of Between-Subjects Effects تأثير التفاعل بين العوامل	.4-7-4
78	Conclusion **الاستنتاجات**	5-
79	Suggestions and recommendations **المقترحات والتوصيات**	6-
80	References **المراجع**	7-

فهرس الجداول List of Tables

رقم الجدول	عنوان الجدول	رقم الصفحة
1	تسجيل ظهور مقاومة بعض فطور البياض الدقيقي وتاريخ أول مشاهدة لها تجاه زمر مختلفة من المبيدات الفطرية المطبقة في الحقل	11
2	مواقع المسح الحقلي وإحداثياتها وارتفاعها عن سطح البحر بالإضافة إلى معدلات الهطولات المطرية السنوية لبعض المدن الرئيسية	26
3	زوج البادئ المتخصص المستخدم في الدراسة والتتابع النكليوتيدي له مع درجة حرارة الإذابة المنصوح بها وحجم المنتج	28
4	تسلسلات ITS لسلالات وعزلات الفطر *Ampelomyces* التي جرى استخراجها من البنك الوراثي على NCBI، والتي استخدمت في دراسة القرابة الوراثية مع الأرقام التعريفية الخاصة بكل منها وأصلها الجغرافي ومصادر المعلومات	31 – 32 – 33
5	النباتات التي أجري عليها اختبار الكفاءة وأنواع البياض الدقيقي المتخصص في إصابة كل منها	34
6	مقياس شدة الإصابة بالفطر *Ampelomyces* على مستعمرات البياض الدقيقي	35
7	نتائج المسح الحقلي لمواسم 2019 و2020 و2021 في المناطق الساحلية والجنوبية	41
8	العينات الإيجابية التي رصد فيها الفطر *Ampelomyces*	42
9	أنماط العزلة Bah1 وتوصيف مستعمرات هذه الأنماط حسب اللون	47
10	الصفات المورفولوجية للعزلات الساحلية والجنوبية	49
11	رموز العزلات التي أُدخلت تحليل التتابع النكليوتيدي	50
12	نتائج مقارنة التتابع النكليوتيدي للعزلة NCBT-S.ham82 (الجنوبية) مع العزلات الأخرى (الساحلية) بوجود النوع *Epicoccum nigrum* عبر برنامج NCBI-BLAST	52
13	التتابع النيكليوتيدي للعزلات المدروسة كما تم تسجيلها في البنك الوراثي GenBank مع رموز وأرقام الدخول الخاصة بكل منها	55
14	العزلات المدروسة والعزلات المطابقة الناتجة عن برنامج NCBI - BLAST ومصادرها ونسبة التطابق بالإضافة لأرقام الدخول لكل منها في البنك الوراثي GenBank	57

15	نتائج العدوى الاصطناعية بالعزلتين S.ham82 و Bah1-G1 على أنواع البياض الدقيقي المتخصصة على الميرمية والكرمة واليقطين (القرعيات) عند 5 مستويات من تراكيز المعلقات البوغية.	69
16	تقييم كفاءة العزلتين المدروستين على الأنواع الثلاثة لفطور البياض الدقيقي المختبرة حسب مقياس شدة الإصابة	71
17	اختبار دونكن Duncan لمقارنة الاختلافات في متوسطات التراكيز	73
18	نتيجة اختبار مقارنة تأثير التراكيز المستخدمة في شدة الإصابة باستخدام تحليل Univariate Tests	73
19	نتيجة اختبار مقارنة تأثير العزلات المستخدمة في شدة الإصابة باستخدام تحليل Univariate Tests	74
20	نتيجة اختبار مقارنة تأثير العائل الفطري المستخدم في شدة الإصابة باستخدام تحليل Univariate Tests	74
21	مقارنة تأثير تفاعل العوامل المدروسة في شدة الإصابة Tests of Between-Subjects Effects	75

فهرس الأشكال List of Figures

رقم الشكل	عنوان الشكل	رقم الصفحة
1	دورة الحياة النموذجية لفطور البياض الدقيقي	10
2	رسومات توضيحية تعود لـ Tulasne والتي أعيد رسمها من قبل Moesz (1912)	14
3	رسوم توضيحية لآلية تطفل الفطر *Ampelomyces* داخل مشيجة البياض الدقيقي كما رسمها De Bary منذ عام 1870	15
4	دورة حياة الفطر *Ampelomyces quisqualis*	20
5	مواقع المسح الحقلي في المنطقتين الساحلية والجنوبية من سوريا	25
6	تمثيل رسومي للحجرة المُصَمَّمة لإجراء العدوى الاصطناعية بطريقة الورقة المفصولة	36
7	طريقة حساب المساحة المصابة وعدّ البكنيدات على الأوراق المصابة بفطور البياض الدقيقي المعاملة بالعزلات المدروسة.	38
8	المواقع التي تم رصد الفطر *Ampelomyces* فيها في كل من المنطقتين الساحلية والجنوبية	40
9	بكنيدات وأبواغ الفطر الفائق التطفل *A. quisqualis* على البياض الدقيقي على المدادة *E. convolvuli* في موقعي البهلولية وقسمين من الساحل السوري عند الفحص المجهري وبعد العزل	44
10	العزلة S.ham82 على الفطر *G. neosalviae* المسبب للبياض الدقيقي على الميرمية *S. officinalis*	45
11	الأشكال المختلفة لبكنيدات الفطر *Ampelomyces* sp. من العزلات المدروسة تبعاً للجزء المتطفَل عليه من فطور البياض الدقيقي	46
12	التباينات المظهرية بين مستعمرات العزلة Bah1	48
13	التباينات الشكلية اللونية لمستعمرات العزلة Bah1− *Ampelomyces* على وسط PDA	48
14	عزلات ممثلة لفرد واحد من بكنيد واحد للفطر *Ampelomyces*	50
15	حزم بوزن bp200 لنواتج PCR الناتجة عن تضخيم منطقة nrDNA-ITS باستخدام البادئ المتخصص AQ-F264/AQ-R462	51

16	المحاذاة المتعددة للتتابعات النكليوتيدية لعزلات الفطر *Ampelomyces* العشرة المختبرة كما أظهرها برنامجا ClustalX و BioEdit	53
17	شجرة القرابة الوراثية للعزلات والأنماط العشرة التي رسمت باستخدام برنامج PAUP بطريقة Neighbor joining	54
18	شجرة القرابة الوراثية على قاعدة 50% لتوافق الأغلبية (50% MajRule consensus tree)	62
19	بكنيدات المتطفل الفطري منتشرة على مستعمرات البياض الدقيقي على الميرمية *G. neosalviae* بعد العدوى الاصطناعية	65
20	مخطط بياني يمثل شدة الإصابة بالعزلتين S.ham82 و Bah1-G1 على الفطر *G. neosalviae*	65
21	نتائج العدوى الاصطناعية بالعزلتين S.ham82 و Bah1-G1 على كرمة العنب.	67
22	مخطط بياني يمثل شدة الإصابة بالعزلتين S.ham82 و Bah1-G1 على الفطر *E. necator*	67
23	نتائج العدوى الاصطناعية بالعزلة *Ampelomyces*-S.ham82 على البياض الدقيقي على اليقطين *E. cichoracearum*	69
24	مخطط بياني يمثل شدة الإصابة بالعزلتين S.ham82 و Bah1-G1 على الفطر *E. cichoracearum*	70
25	مخطط بياني (Histogram) يبين نتائج تفاعل العوامل المؤثرة في شدة الإصابة عند مجال تراكيز المعلقات البوغية المستخدم	77

فهرس الملحقات

رقم الملحق	عنوان الملحق	رقم الصفحة
1	بروتوكول تحديد التتابع النكليوتيدي وفق المتبع في هيئة الطاقة الذرية السورية (طريقة سانجر)	91
2	مخطط بياني لتفاعل العوامل المؤثرة (تركيز *عزلة مختبرة*عائل فطري) في شدة الإصابة حسب مخرجات	92

List of Abbreviations فهرس الاختصارات

µl	MicroLiter	ml	MilliLiter
µM	MicroMolar	MP	Maximum Parsimony
µm	MicroMeter	MSA	Multiple Sequence Alignment
AEC	Atomic Energy Commission of Syria	NCBI	National Center for Biotechnology Information
AQ10^{Tm}	*Ampelomyces quisqualis*- AQ10	NJ	Neighbor Joining
av.	Average	nrDNA-ITS	Internal Transcribed Spacer of Nuclear Ribosomal Deoxyribonucleic Acid
BDT	BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	nrRNA	Nuclear Ribosomal Ribonucleic Acid
BLAST	Basic Local Alignment of Search Tool	PAUP	Phylogenetic Analysis Using Parsimony
bp	Base pair	PCR	Polymerase Chain Reaction
CI	Consistency index	PDA	Potato Dextrose Agar
HI	Homoplasy index	RC	Rescaled consistency index
iTOL	Interactive Tree Of Life	RFLP	Restriction fragment length polymorphism
ITS	Internal Transcribed Spacer	RI	Retention index
MAFFT	Multiple Alignment using Fast Fourier Transform	SD	Standard Deviation
ML	Maximum Likelihood	TBE	Tris Boric EDTA

الملخص Abstract

تعد الفطور البكنيدية من جنس *Ampelomyces* العدو الحيوي الطبيعي لطيف واسع من فطور البياض الدقيقي. تنتشر هذه المتطفلات الفطرية في سورية انتشاراً طبيعياً، إلا أن الدراسات حول إمكانية استثمارها في استراتيجيات المكافحة الحيوية ما زالت مقتصرة على الدراسة البيئية. أجري من أجل ذلك مسح حقلي شمل ست محافظات توزعت على المنطقتين الساحلية والجنوبية. جُمعت 73 عينة نباتية مصابة بالبياض الدقيقي من 10 مواقع من المنطقة الجنوبية في 3 محافظات (دمشق وريف دمشق والسويداء)، إضافة إلى 20 موقعاً من المنطقة الساحلية في محافظتي اللاذقية وطرطوس. وجدت بكنيدات الفطر *Ampelomyces* في 5 عينات، إذ ظهرت في 4 عينات من المنطقة الساحلية متطفلة على نوعين من فطور البياض الدقيقي: *Erysiphe convolvuli* DC. على نبات المدادة *Convolvulus arvensis* L. و *E. heraclei* DC. على نبات *Ammi majus* L. وسُجل حدوث الفطر لأول مرة على البياض الدقيقي *Golovinomyces neosalviae* المتطفل على نبات الميرمية الشائعة *Salvia officinalis* L. في عينة وحيدة في دمشق. بينت نتائج عزل الفطر *Ampelomyces* من تلك العينات على وسط PDA والتوصيف المورفولوجي لها، وجود عزلتين من الفطر المتطفل في عينة من العينات الساحلية الخمسة. بلغ متوسط أبعاد البكنيدات والأبواغ الكونيدية على العائل الطبيعي في العزلات الساحلية 61.17 x 28.25µm و 6.85 x 3.57µm على الترتيب، في حين بلغت الأبعاد المذكورة 152.52 x 132.13µm و 8.75 x 3.3µm على وسط PDA. أما العزلة الجنوبية فقد سجلت متوسطات أبعاد البكنيدات والأبواغ الكونيدية على العائل الطبيعي 77.44 x 25.28µm و 8.11 x 3.88µm على الترتيب، بينما سجلت أبعاداً 125.27 x 115.95µm و 8.86 x 3.1µm على وسط PDA. أفضت دراسة التتابع النيكليوتيدي للعزلات المذكورة بالاعتماد على البادئ المتخصص AQ-R462 إلى تسجيل ست تسلسلات نيكليوتيدية لهذه العزلات في بنك المعلومات الوراثية الدولي بأرقام دخول رسمية. بينت دراسة القرابة الوراثية باستخدام تحاليل Maximum Parsimony و Maximum Likelihood أن العزلات المدروسة قد

وجدت ضمن السلالات العالمية المسجلة، إذ انضمت 3 عزلات في مجموعتين صريحتين مسجلة نسبة تشابه عالية تعادل أقلها 97 %، بينما ارتبطت العزلات الثلاث الباقية منفردةً في فروع أخوية (Sister branches) مع السلالات السابقة، وبنسب تطابق مختلفة. استناداً لبعض الاختلافات الشكلية التي ظهرت على وسط الزرع لإحدى العزلات المدروسة من المنطقة الساحلية (Bah1)، وُجِدَ أنه ليس هناك علاقة واضحة بالضرورة بين الخصائص المورفولوجية والجزيئية وبين الموقع الجغرافي والخصائص الفيزيولوجية المختلفة، إذ أظهرت عدد من العزلات تطابقاً تاماً في التتابع النيكليوتيدي على الرغم من الاختلافات الشكلية فيما بينها والظاهرة على وسط الزرع، ولم تشمل تلك الاختلافات أشكال البكنيدات وأبعادها وكذلك الأبواغ الكونيدية.

أظهرت نتائج معاملة الفطور *E. cichorasearum* DC. و*G. neosalviae* و*E. necator* Schwein. المسببة للبياض الدقيقي على اليقطين (*Cucurbita maxima* L.) والميرمية (*S. officinalis* L.) و كرمة العنب (*vitis venifera* L.) على الترتيب بالعزلة *Ampelomyces* NCBT-S.ham82 أن متوسط أعلى شدة إصابة كانت 205 و151.77 و61.88 بكنيد/سم^2 على التوالي عند العدوى بمعلق بوغي تركيزه 5.9 × 10^7 بوغة/مل. واقتصر تأثير العزلة NCBT-Bah1-G1 التطفلي على الفطر *E. necator* Schwein.، إذ بلغ متوسط أعلى شدة إصابة 116.25 بكنيد/سم^2 عند المعاملة بالتركيز السابق نفسه للمعلق البوغي، فيما لم تُظهر أي أثر تطفلي على فطري البياض الدقيقي الآخرين المدروسين.

إن هذه الدراسة هي تجربة في إمكانية استثمار عزلات محلية من الفطر *Ampelomyces quisqualis* Ces. في المكافحة الحيوية لفطور البياض الدقيقي بوجهها التطبيقي. كما سُجّل ارتباط الفطر المتطفل على عائل نباتي جديد وفي المنطقة الجنوبية من سورية لأول مرة على حد علمنا، وأظهرت العزلة المسجَّلة أداءً عالياً على نوعين من فطور البياض الدقيقي (على القرعيات والميرمية) و تأثيراً متوسطاً على نوع ثالث (على كرمة العنب).

الكلمات المفتاحية: *Ampelomyces quisqualis*، بياض دقيقي، تطفل فطري، عدوى اصطناعية

دراسة تمهيدية

Preface study

مقدمة Introduction

دخلت المكافحة الحيوية حيز التطبيق والتنفيذ على أسس علمية في ستينات القرن العشرين كإحدى الخطوات الأساسية في برنامج إدارة الآفات الزراعية، وقد أبدى هذا التطبيق نجاعته في زراعات عديدة على مستوى العالم (Younes *et al*., 2016).

إن تطبيق استراتيجية المكافحة الحيوية وعواملها يتطلب أن يؤخذ بالحسبان علم البيئة الذي يمكن تعريفه على أنه التنوع والوفرة في مجتمعات الكائن الحي وتفاعلاتها (ضمن النوع الواحد أو بين الأنواع المختلفة) التي تأتي استجابة لعوامل البيئة الطبيعية (Kevan & Shipp, 2017). لذا فإن اختيار عوامل المكافحة الحيوية يتطلب أن يتميز العدو الحيوي للكائن المراد مكافحته بعدد من المزايا التي يمكن تلخيصها بالنقاط التالية:

1. القدرة العالية على البحث عن الآفة الهدف.
2. درجة تخصصية عالية للعائل.
3. معدل تناسل عالي.
4. توقيت جيد للظهور مع العائل.
5. درجة عالية من التكيف مع مدى واسع من الظروف البيئية الجوية.
6. أن لا يتطفل أو يفترس أحياء أخرى نافعة أو غير ضارة تسبب تجنبه مهاجمة الآفات الضارة.
7. القدرة على التمييز بين العائل المناسب وغير المناسب.

لا تزال الشركات التجارية التي تعنى بتصنيع المبيدات الكيميائية لا توفر جهداً في التقليل من شأن المكافحة الحيوية (Kevan & Shipp, 2017) وإنتاج المستحضرات التي تعتمد على منتجات حيوية خالية من التراكيب الكيميائية على اعتبار أنها لا تدرّ حتى الآن أرباحاً بمستوى ما تقدمه المستحضرات الكيميائية وقلة تنوعها بالمقارنة مع مستحضرات المبيدات الكيميائية المتعددة.

لقد قدمت المنتجات الحيوية على مر القرنين المنصرمين نتائجَ جيدةً وواعدةً في مختلف بقاع العالم، ومثالها استخدام سلالات ضعيفة الشراسة (لكونها مصابة بالفيروسات) من *الفطر Chryphonectria parasitica* المسبب لمرض لفحة الكستناء في المكافحة الحيوية، التي لم ينجح استخدام المبيدات الكيميائية الفطرية لمكافحتها لصعوبة تطبيقها وارتفاع تكاليفها، ولأن استخدام المبيدات في الغابات مقيد في معظم البلدان (Milgroom & Cortesi, 2004). وآخر ما وثق هو التطفل المفرط للعزلة R23Bo العائدة للفطر *Cladosporium cladosporioides* على الفطر المسبب للصدأ الأصفر (المخطط) على القمح *Puccinia striiformis* f sp. *tritici* والتي يمكن استثمارها في المكافحة الحيوية لهذه الفطور (Zhang *et al.*, 2022).

محلياً أدخلت وزارة الزراعة في سورية برنامج المكافحة الحيوية حيز التنفيذ في تسعينات القرن المنصرم (بشير، 2020)، إذ استقدمت بعض المفترسات والطفيليات لمكافحة الذبابة البيضاء الصوفية *Aleurothrixus floccosus* Maskell في بساتين الحمضيات، كاستقدام العدو الحيوي *Cales noacki* Howard من إيطاليا عام 1992. وأبدت هذه التجربة نتائجَ إيجابيةً واضحةً بعد أن كانت هذه الآفة تبدي عناداً منقطع النظير تجاه مختلف المبيدات الكيميائية التي استخدمت لمكافحتها (فسخة، 2021).

ومن ناحية أخرى يوجد العديد من المفترسات والطفيليات التي تتغذى على طيف واسع من الآفات الحشرية والأمراض الفطرية في بلادنا، والتي تحتاج إلى عملية غربلة واسعة لدراسة إمكانية الاستفادة منها بدلاً من استقدام هذه الكائنات واستيرادها من الخارج على اعتبار أنها متكيفة ومتأقلمة سلفاً مع البيئة المحلية، وليس هناك مخاطر من عدم تكيفها وموتها، وبالتالي عدم استمراريتها والحيلولة دون الاستفادة منها.

لذا وعلى خلفية نجاح بعض التجارب المحلية كإنتاج المبيد الحيوي الفطري *Trichoderma harzianum* R.، والذي يتم إكثاره من سلالات محلية، تفتح الأبواب مشرعة لإطلاق مشروع يُعنى بغربلة السلالات والعزلات المحلية المختلفة، التي يعتقد أن لها تأثيراً في معالجة الآفات الزراعية المنتشرة في البلاد.

يشكل المتطفل الفطري المفرط *Ampelomyces quisqualis* على فطور البياض الدقيقي أحد المتطفلات الحيوية المنتشرة في البيئة السورية انتشاراً طبيعياً (يونس وآخرون، 2009). وقد حظيت سلالات محددة من هذا الفطر، ومنها السلالة AQ10™، بأفضلية انتخابها على مستوى العالم، وصنعت شركة Ecogen, Inc. (Langhorne, PA, USA) منها على سبيل المثال لا الحصر، مستحضرات تجارية أبدت فاعلية جيدة في مكافحة فطور البياض الدقيقي (Bélanger & Labbé, 2002; Daoust & Hofstein, 1996; Hofstein & Fridlender, 1994; Kiss, 2003; Paulitz & Bélanger, 2001).

وعليه فإن دراسة توزع هذا المتطفل الفطري وانتشاره في سورية، وإجراء الاختبارات اللازمة لغربلة العزلات والسلالات التي تبدي فاعلية في مكافحة فطور البياض الدقيقي يمكن أن تمثل خطوة إلى الأمام على أمل التمكن من إنتاج مبيد حيوي محلي بديلاً عن المبيدات الكيميائية ذات السمية والمخاطر على الإنسان والحيوان والبيئة.

تقدم هذه الرسالة في الدراسة التمهيدية وفصلها الأول نبذة عن أهمية هذا البحث وما تم التوصل إليه في الدراسات المرجعية حول موضوعه حتى الآن، والفوائد العلمية والتطبيقية التي يمكن أن تقدمه نتائجه. كما شمل الفصل الأول الأهداف التي توجهت إليها هذه الرسالة للحصول على النتائج المرجوة، لتمهد بذلك إلى الدخول في تفاصيل المواد والطرائق المستخدمة في فصلها الثاني، بحيث تفنّد التقنيات التي استخدمت في اختبارات التوصيف المورفولوجي والجزيئي واختبارات العدوى الاصطناعية لتقييم الكفاءة ضمن الشروط المخبرية. ويوضح الفصل الثالث والأخير النتائج التي تم الوصول إليها في هذه الرسالة وما يمكن استثماره منها في النواحي التطبيقية للمكافحة الحيوية لفطور البياض الدقيقي باستخدام المتطفل الفطري *Ampelomyces quisqualis*.

إشكالية البحث Problematic of the research

اقتصرت الدراسات السابقة في سورية على المتطفل الفطري *A. quisqualis* على دراسة الانتشار الطبيعي والبيئي لهذا المتطفل (يونس وآخرون، 2009)، إضافة إلى العزل والتعريف ببعض الصفات الشكلية

والمزرعية (علي وآخرون، 2008) دون الخوض بتفاصيل أكثر عمقاً تتعلق بإمكانية استثمار هذا المتطفل على صعيد المكافحة الحيوية لفطور البياض الدقيقي الممرضة للنبات. وعلى اعتبار أنه لم تُرشَّح حتى الوقت الحاضر سلالات أو حتى عزلات محلية من هذا الفطر للانطلاق منها أملاً في تطوير منتج حيوي محلي على غرار تجارب سابقة مثل تصنيع الفطر *T. harzianum* واستخدامه، الذي ينتجه مركز المكافحة الحيوية في محافظة حماه (الغاب)، فمن المفيد وضع الخطوات الأولى في طريق انتخاب سلالات محلية ذات كفاءة يمكن الوصول بها إلى نواة مبيد حيوي جديد يسهم في برامج الإدارة المتكاملة لمكافحة أمراض البياض الدقيقي في سورية.

أهداف البحث Research Targets

يهدف البحث إلى:

1. الحصول على عزلات محلية من الفطر *Ampelomyces* في المنطقتين الساحلية والجنوبية من سورية.
2. التوصيف المورفولوجي والجزيئي لهذه العزلات.
3. دراسة كفاءة العزلات المحلية المنتخبة في مكافحة الإصابة بنوعين من فطور البياض الدقيقي على أنواع نباتية مزروعة (القرعيات وكرمة العنب).

أهمية البحث Research importance

يعد الفطر *A. quisqualis* العدو الحيوي الأكثر شهرة والمستخدم ضد فطور البياض الدقيقي ممثلاً بالمبيد الحيوي الشهير تجارياً بالاسم AQ10™. وعلى خلفية وجوده وانتشاره طبيعياً في سورية، تبرز أهمية التحري عن وجود مثل هذه السلالات في بلادنا، وإمكانية الوصول إلى عزلات محلية من هذا الفطر، واختبار كفاءتها بالمقارنة مع هذه السلالة ما قد يمكننا بالمحصلة من تزويد برنامج إدارة الآفات الفطرية عامةً وأمراض البياض الدقيقي خاصةً ببرنامج مكافحة حيوية يكون عماده مبيداً حيوياً صديقاً للبيئة قد يُطَوَّر من تلك العزلات المنتخبة والمعزولة من بيئتنا المحلية.

دوافع ومسوغات البحث Research justifications

ينتشر العدو الحيوي والمتطفل الفطري *A. quisqualis* على فطور البياض الدقيقي على نطاق واسع عالمياً. وهناك بعض الدول التي استثمرت سلالات محددة انتخبتها من بيئتها المحلية في إنتاج مبيدات حيوية استخدمتها لمكافحة فطور البياض الدقيقي، ومثالها AQ10™ كما ذكر سابقاً (Bélanger & Labbé, 2002; Daoust & Hofstein, 1996; Hofstein & Fridlender, 1994; Kiss, 2003; Paulitz & Bélanger, 2001). تعد سورية إحدى بقاع العالم التي ينتشر فيها هذا المتطفل الفطري انتشاراً طبيعياً، وقد وثقت بعض الدراسات الانتشار الطبيعي لهذا الفطر في الساحل السوري، وعليه فإن المسوغات التي تتطلب تكثيف الدراسة والبحث لتحديد العزلات والسلالات المنتشرة في سورية وتقييم كفاءتها تبدو حاضرة بقوة، وتتطلب توفير الدعم اللازم للشروع بها بهدف الوصول إلى منتج محلي يمكن استثماره مبيداً حيوياً ذا فائدة تطبيقية في وجهات عدة:

1. في الزراعة العضوية بهدف تحسين السلع المعدة للتصدير أو الاستهلاك المحلي.
2. في الحدائق المنزلية فلا يُحبَذ استخدام المبيدات الكيماوية.
3. تخفيف التكلفة الناجمة عن الاعتماد على استيراد المبيدات الكيميائية واستخدامها في حال إنتاج المبيد الحيوي محلياً.

محدوديات البحث Limits of the research

في ضوء الدراسات التي أجريت على المتطفل الفطري *A. quisqualis* في سورية، كان لا بد من توسيع نطاق البحث لتشمل مناطق تتجاوز تلك التي أجري فيها التقصي عن هذا الفطر مسبقاً أملاً في إيجاد سلالة ما تخرق القيد المرتبط بالبيئة الرطبة التي يتطلبها وجود الفطر المذكور ونشاطه ليظهر فعاليته تجاه عائله الممرض فطور البياض الدقيقي.

الفصل الأول

الدراسة المرجعية

Literature review

1- الدراسة المرجعية Literature review

1-1- أمراض البياض الدقيقي وأهميتها الاقتصادية Powdery mildew diseases and their economic importance

تعد فطور البياض الدقيقي من ممرضات النبات واسعة الانتشار عالمياً، والمميزة عموماً بمشيجتها البيضاء ذات المظهر الدقيقي وما يتشكل عليها من حوامل وأبواغ كونيدية (Yarwood, 1978) .

يهدد البياض الدقيقي الكثير من المحاصيل المزروعة في الحقل أو في البيوت المحمية كالخضار القرعية، ومحاصيل القمح *Triticum aestivum* L. والشعير *Hordium vulgare* L. وكرمة العنب *Vitis vinifera* L. والتفاح *Malus domestica* Borkh. ونباتات الزينة مثل المرجان *Euonymus japonicas* Thunb. وغيرها، ويتسبب بخسائر اقتصادية كبيرة، وخفض كبير في الغلة (Jarvis *et al*., 2002; Jarvis & Slingsby, 1977) . فعلى القمح مثلاً، يحفز وجود البياض الدقيقي في مراحل مبكرة من موسم النمو ظهور الإشطاءات المتأخرة، التي تفشل لاحقاً في إنتاج البذور، وبالتالي فإن هذه السويقات غير المنتجة تتسبب في خفض الغلة الحبية، وانخفاض في القيمة الغذائية للمحصول بالنتيجة. ولذلك فإنه يمكن لمستويات قليلة من المرض أن تتسبب في خفض الغلة إذا ما أصابت أصنافاً قابلةً من القمح (Bowen *et al*., 1991; Everts & Leath, 1992)، إذ بلغت الخسائر الناجمة عن هذا الممرض في مصر مثلاً أكثر من 22.52% على الأصناف القابلة عند مستوى الإصابة الشديدة (Ashmawy *et al*., 2014) . ويعد البياض الدقيقي المتسبب عن الفطر *Golovinomyces*(=*Erysiphe*) *cichoracearum* (DC.)V.P. Heluta واحداً من أهم الأمراض التي تصيب نبات عباد الشمس *Helianthus annuus* L. ذي الأهمية الاقتصادية الكبيرة في إنتاج الزيوت المستخرجة من البذور في الهند، الذي يزرع على مساحة 0.56 مليون هكتار بإنتاج يصل إلى 0.42 مليون طن، إذ تسبب هذا الفطر بخسائر اقتصادية مهمة في الهند في السنوات الأخيرة، ويتناسب الفقد الحاصل في الغلة بفعل هذا الممرض مع شدة الإصابة، ويختلف اعتماداً على مرحلة نمو النبات التي تحدث فيها الإصابة (Dinesh *et al*., 2010). كما وصلت نسبة الخسائر في محصول فول الصويا المتسببة عن النوع *Erisyphe*

diffusa (=*Microsphaera*) في New South Wales جنوب استراليا إلى 20% في موسم 2014–2015، وسجل أكبر خفض في كمية الغلة الحبية على الإطلاق في الصنف Snowy[A] (Dunn & Gaynor, 2020).

محلياً، كشفت دراسة أجرتها الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – مركز بحوث القامشلي في العام 2011 نسب إصابة عالية بالبياض الدقيقي على القرعيات في شمال شرق سورية تراوحت بين 10–50% سببها النوعان *E. cichoracearum* DC. و *Sphaerotheca fuliginea* (يوسف وآخرون. 2016). ويعد البياض الدقيقي على الكرمة المتسبب عن الفطر *Erysiphe necator* Schwein. أحد أهم الأمراض التي تصيب كروم العنب في جنوب سورية، والذي يتسبب بخسائر بالغة في الغلة بسبب توافر الظروف البيئية لنموه وتطوره، ما يجعل استخدام المبيدات الكيميائية ضرورياً ومكثفا في معظم الأطوار الفينولوجية للكرمة بدءاً من مرحلة سكون البراعم وحتى نهاية الموسمً لحمايتها من المرض (Alimad *et al*., 2017) .

2-1- تصنيف فطور البياض الدقيقي Taxonomy of powdery mildews

تتبع فطور البياض الدقيقي إلى قسم الفطور الزقية Ascomycota وصف Plectomycetes ورتبة Erysiphales وعائلة Erysiphaceae، ويتبع لهذه العائلة العديد من الأجناس والأنواع التي تصيب عوائل نباتية مختلفة نذكر منها:

- *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* المسبب للبياض الدقيقي على القمح، بينما يسبب *B. graminis*. f. sp. *hordei* البياض الدقيقي على الشعير (Braun, 1987).
- *Microsphaera diffusa* المسبب للبياض الدقيقي على البقوليات، ويصيب فول الصويا (Bennett *et al*., 2014)
- *Erysiphe* (=*Uncinula*) *necator* Schwein. المسبب للبياض الدقيقي على كرمة العنب.

- *Leveillula taurica* على الباذنجانيات والبصل أو المعروف باسم *Oidiopsis taurica* والذي يصيب أيضا الأرضي شوكي (Arnaud, 1921).
- *Podosphaera leucotricha* المسبب للبياض الدقيقي على التفاح (Salmon, 1900).

إضافة إلى نوعين أساسيين يصيبان القرعيات هما:

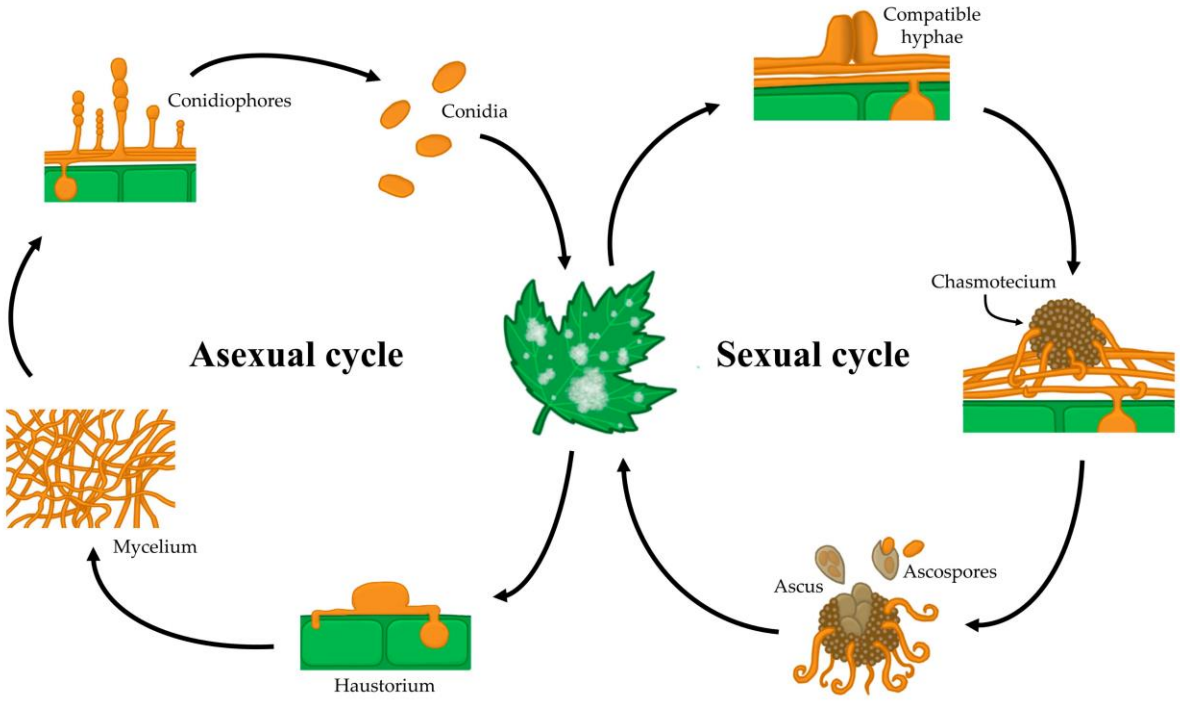
- *Podosphaera xanthii* وهي مرادفة للتسمية (*S. fuliginea =Sphaerotheca fusca*) (Braun & Takamatsu, 2000).
- *E. cichoracearum* DC.

3-1- دورة حياة فطور البياض الدقيقي Life cycle of powdery mildew

يتكاثر البياض الدقيقي جنسياً ولا جنسياً، وينتهي التكاثر الجنسي بتشكيل الأبواغ الزقية ascospores المتشكلة ضمن أجسام ثمرية (ثمار زقية مغلقة cleistothecia)، أو ما يطلق عليها حديثاً chasmothecia، إذ يوجد ضمن كل ثمرة زقية زق أو بضعة زقاق (أكياس زقية) asci. تنضج الثمار الزقية وتطلق أبواغها لتبدأ العدوى وإحداث إصابات جديدة. وتختلف الشروط الضرورية لنضج الأبواغ من نوع لآخر، ولكن عموماً تنمو فطور البياض الدقيقي في البيئات ذات الرطوبة المعتدلة ودرجات الحرارة المعتدلة (Huang *et al*., 2000)، وتشكل البيوت المحمية وسطاً جيداً لانتشاره (Keinath & DuBose, 2012).

أما التكاثر اللاجنسي فيتم عن طريق الأبواغ الكونيدية conidia التي تنتج على سطح النبات خلال موسم النمو، وهي تتطور على شكل أبواغ مفردة أو في سلاسل بوغية تنشأ على الحوامل الكونيدية conidiophores، والتي تنشأ بدورها من المشيجة المنتشرة على سطح النبات، وفي حال كون المشيجة داخل أنسجة النبات (الجنس *Leveillula*) تنبثق الحوامل الكونيدية عبر الثغور الورقية. غالباً ما تشكل حشرات المن التابعة لفصيلة Eriosomatinae وغيرها من الحشرات الماصة عوامل تساعد على انتقال البياض الدقيقي، وإحداث إصابات جديدة في بيئات جديدة، إلا أن الآلية الرئيسية لانتشار فطور البياض الدقيقي عموماً هي الأبواغ المحمولة بالرياح

wind-borne. وبالتالي فإن المصدر الأولي للعدوى هو الطرود العلمية المتشكلة في بداية الموسم من براعم مصابة من السنة السابقة في الظروف المحلية (Alimad *et al*., 2017) أو قد تكون الأبواغ الزقية كما تشير بعض الدراسات (Moyer *et al*. 2008; Taksonyi *et al*. 2010) ، أما المصدر الثانوي للعدوى فهي الأبواغ الكونيدية المحمولة في الهواء (Alimad *et al*., 2017؛ الرحمة، عبدالله ناصر. 1993).



الشكل (1): دورة الحياة النموذجية لفطور البياض الدقيقي (Vielba-Fernández *et al*., 2020)

4-1- الإجراءات المتبعة في مكافحة أمراض البياض الدقيقي والحد من انتشارها Procedures used to control powdery mildew diseases and limit their prevalence

طُوِّرَ العديدُ من الأصناف والطرز المقاومة والمتحملة للإصابة بفطور البياض الدقيقي لعدد من المحاصيل، ولكن استخدامها كان محدوداً، وتركز خاصةً على بعض الأشجار المثمرة والمحاصيل الخضرية كالبندورة *Lycopersicon esculentum* (Bélanger & Benyagoub, 1997)، ومحاصيل استراتيجية أخرى، وكانت معظم الطرز والهجن المتاحة عالية القابلية للإصابة بأمراض البياض الدقيقي

(Kiss, 2001) . وبالمقابل جرت محاولات عديدة لإطالة عمر فعالية المبيدات الكيميائية المستخدمة ضد فطور البياض الدقيقي، إلا أن هذه الفطور غالباً ما كانت تطور سلالات مقاومة للمبيدات المستخدمة ضدها بعد بضعة سنوات من تكرار استخدامها، وعدم تطبيقها تطبيقاً صحيحاً ضمن برامج مكافحة البياض الدقيقي. ويوضح الجدول (1) بداية ظهور السلالات المقاومة لزمر كيميائية مختلفة استخدمت لمكافحة أنواع مختلفة من فطور البياض الدقيقي.

جدول (1): تسجيل ظهور مقاومة بعض فطور البياض الدقيقي وتاريخ أول مشاهدة لها تجاه زمر مختلفة من المبيدات الفطرية المطبقة في الحقل (Vielba-Fernández *et al*., 2020).

Group Name	Active Ingredient	Year of Registration [1]	Resistant Pathogen	Date First Observed
Aryl-phenyl ketones	Metrafenone	2006	*B. graminis* f. sp. *tritici*	2009
			E. necator	2010
	Pyriofenone	2014	*P. xanthii*	2017
Aza-naphthalenes	Quinoxyfen	1996	*E. necator*	2002
			B. graminis f. sp. *tritici*	2003
			P. xanthii	2004
Hydroxy-(2-amino) pyrimidines	Dimethirimol	1968	*P. xanthii*	1970
	Ethirimol	1968	*B. graminis* f. sp. *hordei*	1971
	Bupirimate	1975	*P. xanthii*	1986
			G. cichoracearum	1990
Methyl-Benzimidazole Carbamates (MBC fungicides)	Benomyl	1968	*P. xanthii*	1967
			S. pannosa	1974
			E. necator	1977
			G. cichoracearum	2001
	Thiophanate-methyl	1971	*P. xanthii*	2002
			E. necator	2005
			G. cichoracearum	2005
Phosphorothiolates	Pyrazophos	1970	*P. xanthii*	1975
Quinone outside Inhibitors (QoI-fungicides)	Azoxystrobin	1992	*P. xanthii*	1998
			E. necator	1999
			G. cichoracearum	2010
			L. taurica	2015
	Kresoxim-methyl	1996	*P. xanthii*	1998
			B. graminis f. sp. *tritici*	1998
			B. graminis f. sp. *hordei*	2003
	Famoxadone	1998	*B. graminis* f. sp. *tritici*	2000

وبالتالي فإنّ القيود المتعلقة باستخدام المبيدات الفطرية والطرز المقاومة قادت إلى البحث عن طرائق بديلة للسيطرة على أمراض البياض الدقيقي، ومنها تركيز الجهود المتعلقة باستخدام عوامل المكافحة الحيوية (Kiss *et al*., 2004). كما أُجريت العديد من الدراسات حول كفاءة المنتجات من غير المبيدات الفطرية مثل الزيوت والأملاح والسيليكون المذاب وبعض المستخلصات النباتية الأخرى (Bélanger & Benyagoub, 1997; McGrath & Shishkoff, 1999; Pasini *et al*., 1997).

1-5- المكافحة الحيوية لأمراض البياض الدقيقي Biological control of powdery mildew

المكافحة الحيوية ببساطة، هي استخدام عوامل حيوية في إدارة الآفات. ويستخدم لذلك ما يسمى "عوامل المكافحة الحيوية" وهي كائنات حية (أو منتجات استقلابية من كائنات حية) تتدخل في الحيوية والقدرة التكاثرية لكائنات حية أخرى (Hajek *et al*., 2008).

اختُبِر العديد من عوامل المكافحة الحيوية لأمراض البياض الدقيقي، ومن ضمنها البكتيريا المحللة للفطور Mycolytic bacteria مثل *Bacillus subtillis* (Highland, 2000; Skidmore, 1976)، والمفترسات أو ملتهمات الفطور Mycophagous arthropods مثل عناكب النوع *Orthotydeus lambi* (English-Loeb *et al*., 1999; Yarwood, 1957)، ولكنها لم تُبدِ مظاهر واعدة للتطبيقات العملية في المكافحة (Kiss *et al*., 2004). كما درست كفاءة بعض الحشرات المتغذية على فطور البياض الدقيقي وإمكانية استخدامها في المكافحة الحيوية ومثالها حشرة أبي العيد ذو 22 نقطة *Psyllobora vigintiduopunctata* (Younes *et al*., 2015). ولكن بالمجمل تم الحصول على نتائج أفضل في تجارب المكافحة الحيوية التي استخدمت المتطفلات الفطرية Mycoparasite على البياض الدقيقي، ومنها الفطور البكنيدية العائدة للجنس *Ampelomyces*، التي استُخدمت إحدى سلالاتها (CNCM I-807) المعزولة في فلسطين المحتلة، في إنتاج المبيد الحيوي الأكثر شهرة تحت الاسم التجاري AQ10^{Tm} (Bélanger & Labbé, 2002; Daoust & Hofstein, 1996; Hofstein & Fridlender, 1994; Kiss, 2003; Paulitz & Bélanger, 2001).

تتحكم عدد من العوامل الحيوية واللاحيوية في نشاط تطفل الفطر *Ampelomyces* وفعاليته على فطور البياض الدقيقي باختلاف الظروف البيئية، حيث يمكن أن تحد بعض هذه الظروف من كفاءة الفطر التطفلية (Caffi *et al*., 2013)، فالسلالة AQ10^{Tm} أظهرت فعالية وكفاءة عالية في القدرة التطفلية ما أفضى إلى استخدامها في إنتاج مستحضر حيوي قابل للتطبيق، بينما فشلت سلالات أخرى في إثبات نفس الكفاءة تحت اختبارات المكافحة الحيوية، وكانت نتائجها غير مرضية (Angeli *et al*., 2012 ; Angeli *et al*., 2009).

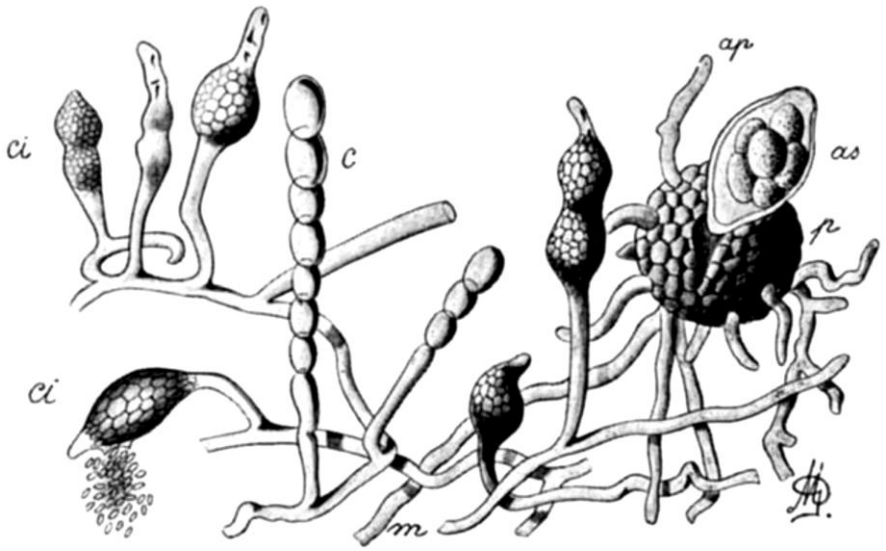
يذكر أن الفطر البكنيدي *Ampelomyces* قد رُصِدَ وعُزِل منذ عام 2005 في المنطقة الساحلية من سورية على امتداد الشريط الساحلي في محافظتي اللاذقية وطرطوس (علي وآخرون، 2008).

2- لمحة تاريخية عن الفطر *Ampelomyces quisqualis* فائق التطفل على فطور البياض الدقيقي Historical background of hyperparasite on Powdery mildews

يعد الفطر فائق التطفل *A. quisqualis* أقدم الأعداء الحيوية والمتطفلات المعروفة بشراستها تجاه فطور البياض الدقيقي التي تتبع لرتبة Erysiphales، وينتشر الفطر *Ampelomyces* انتشاراً واسعاً في البيئات الاستوائية والمعتدلة المناخ، كما يعد عامل المكافحة الحيوية الأول الذي استخدم ضد فطور البياض الدقيقي، حيث يتواجد عليها بشكل طبيعي متطفلاً على البنى الجنسية (Cleistothecia) واللاجنسية مثل المشيجة (hypha) والحوامل الكونيدية (conidiophore) والأبواغ الكونيدية conidia (Angeli *et al*., 2009; Kiss *et al*., 2004 ; Ranković, 1997).

وصّف Cesati (1852) الفطر البكنيدي المرتبط بمستعمرات البياض الدقيقي التي تغطي أوراق كرمة العنب *A. quisqualis* Ces. على أنه (Kiss *et al*., 2004)، ومنذ ذلك الوقت سُجّل الفطر بواسطة عدد من علماء الفطور تحت مسميات مختلفة، فأطلق عليه Riess (1852) التسمية *Byssocystis textilis* Riess.، بينما صاغ Ehrenberg (1853) له التسمية *Cicinobolus florentinus* Ehrenb.، وكان De Bary (1870)

هو أول من قام بدراسة تفصيلية للفطر، فنبذ كل التسميات السابقة التي أطلقها الباحثون على هذا الفطر وأعطاه التسمية *Cicinobolus cesatti*، كما أطلق عليه Fautrey (1890) التسمية *Cicinobolus humuli* Faut. بعض هؤلاء العلماء مثل Reiss و De Bary و Cesati ميزوا بوضوح أن هذه الفطور هي طفيليات على فطور البياض الدقيقي، بينما عدَّ آخرون مثل Tulasne (1856) و Von Mohl (1852) أن هذه البنى (الأوعية البكنيدية pycnidia والأبواغ الكونيدية conidia) هي جزء من دورة حياة فطور البياض الدقيقي كما كانوا يعتقدون (الشكل2) (Kiss *et al*., 2004).



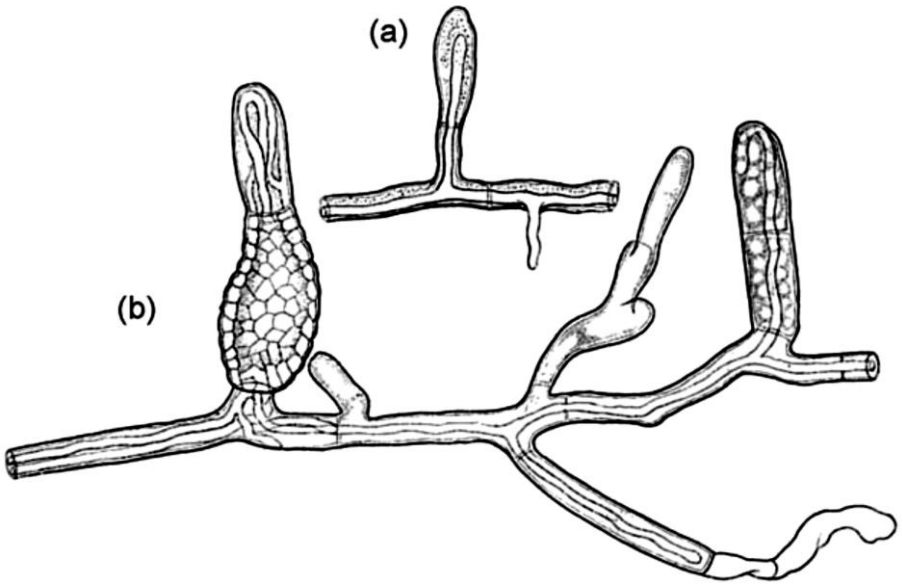
الشكل (2) رسومات توضيحية تعود لـ Tulasne (1856) والتي أعيد رسمها من قبل Moesz (1912) تظهر بكنيدات الفطر *Ampelomyces* كأحد التشكلات الثمرية لفطور البياض الدقيقي كما كانوا يعتقدون (Kiss *et al*., 2004) .

ci : *Cicinnobolus*, *c* : conidia, *m* : mycelium, *ap* : appendages, *as* : asci, *p* : perithecia

إن الدراسة الأولى لهذا الفطر التي قام بها De'Bary (1870)، التي كانت معظم مشاهداته فيها متطفلاً على النوع *Erysiphe galeopsidis* DC. والمتطفل بدوره على النبات *Galeopsis tetrahit*، قد أظهرت أن مشيجة الفطر *Ampelomyces*، التي قدر قطرها بنصف أبعاد مشيجة العائل، تنمو داخل خلايا مشيجة البياض الدقيقي من خلية إلى خلية من خلال فتحات الحواجز العرضية بين الخلايا وتتفرع قليلاً داخلها تفرعاً غير محدد، إذ تنتج أوعيتها البكنيدية في خلايا المشيجة والحوامل والأبواغ الكونيدية والثمار الأسكية للعائل

(الشكل3). كما أثبت تجريبياً بأن المشيجة النامية داخل الخلايا يمكن أن تنمو خارج خلايا العائل إذا وضعت في الماء لبضعة ساعات. وأظهرت تجارب الإلقاح المتصالب أن الطفيل *Ampelomyces* الذي جُمِع من أنواع محددة من البياض الدقيقي يمكن أن يشكل أوعية بكنيدية داخل مشيجة فطور البياض الدقيقي التابعة لأنواع أخرى (De'Bary, 1870; Falk *et al*., 1995; Kiss & Vajna, 1995; Philipp & Crüger, 1979 ; Sztejnberg *et al*., 1989) .

فيزيولوجياً، بيَّنَ Galper وآخرون (1985) أن الأوعية البكنيدية للفطر *Ampelomyces* تنشأ من خلايا متضخمة، أَطلق عليها Emmons (1930) اسم الخلايا الحويصلية (vesicular cells)، التي تتطور بعد انفصال الأبواغ.



الشكل (3) رسوم توضيحية لآلية تطفل الفطر *Ampelomyces* داخل مشيجة البياض الدقيقي كما رسمها De Bary منذ عام 1870. (a) مشيجة داخلية تعود للفطر *Ampelomyces* تنمو خارج مشيجة البياض الدقيقي التي يتطفل عليها، (b) بكنيد الفطر *Ampelomyces* ينمو داخل الحامل الكونيدي للبياض الدقيقي. (Kiss *et al*., 2004) .

وفي بعض الحالات تتشكل الأوعية البكنيدية من تشابك خيوط المشيجة الفطرية، لذا فإن استخدام الفطر *Ampelomyces* في المكافحة الحيوية يتطلب إكثار الكتلة الحيوية لهذه البنى الفاعلة في إحداث العدوى على

العائل، وبالتالي لا بد من توفير الشروط الملائمة والضرورية للحصول على الخلايا الحويصلية في وقت قصير نسبياً وباستخدام وسط تنمية قليل الكلفة وسهل التحضير (Manjunatha *et al*., 2020) . وقد كانت متطلبات درجة الحرارة المثلى لإنبات الأبواغ وتشكل البكنيدات على وسط Czapek agar 20 و25 س° على الترتيب، كما أن تلقيح نفس الوسط بمعلق بوغي ذي تركيز 10^6 بوغة/مل قد زاد من تشكل الأوعية البكنيدية بالمقارنة مع تراكيز أقل (10^5 و10^4 بوغة/مل)، إضافة إلى أن استخدام وسط مرق البطاطا والدكستروز potato dextrose broth (PDB) قد أظهر زيادة في تشكل الأبواغ الكونيدية بالمقارنة مع أوساط سائلة أخرى، كما أظهر تشكل مجاميع بكنيدية سوداء قاسية القوام، وبالمجمل أظهر استخدام وسط مرق البطاطا المحضَّر بتركيز 100غ/ل عوضاً عن التركيز الاعتيادي 200غ/ل إنتاجاً وفيراً للأبواغ الكونيدية اللازمة لإحداث العدوى ولمكافحة حيوية أكثر كفاءة بالنتيجة، فبدا هذا الوسط الأكثر بساطةً ومنافسةً واقتصاداً لإنتاج الكتلة الحيوية للفطر *A. quisqualis* (Bélanger & Labbé, 2002; Daoust & Hofstein, 1996; Hofstein & Fridlender, 1994; Kiss, 2003; Paulitz & Bélanger, 2001).

2-1- تصنيف الفطر *Ampelomyces* فائق التطفل Taxonomy of the hyperparasite

إن الجدل التصنيفي حول الجنس *Ampelomyces* بدأه Cesati (1852)، فاسم الجنس *Cicinobolus* بقي مستخدماً حتى عام 1870 (Donk, 1966)، إلا أن أولوية الاسم *Ampelomyces* بدت ملحوظة لدى Rogers (1959) و Speer (a1978) إضافة إلى أن بعض الباحثين قسموا هذا الجنس إلى أكثر من 40 وحدة تصنيفية، ولكن بالنتيجة فإن معظم الدراسات الحالية عدت أن هذا الجنس هو أحادي النوع، وأن *A.quisqualis* هو المتطفل الفطري البكنيدي الداخل خلوي الشائع لكل أنواع البياض الدقيقي على مستوى العالم، وبغياب الدراسات المفصلة سيبقى هذا الفطر تحت مسمى *Ampelomyces* (Kiss, 1997a) .

ينتمي النوع *A. quisqualis* إلى قسم الفطريات الزقية Ascomycota، وتحت قسم Pezizomycotina، وصف Dothideomycetes، وتحت صف Pleosporomycetidae، ورتبة Pleosporales، وعائلة Phaeosphaeriaceae (Angeli, 2017; Cesati, 1852; De'Bary, 1870) .

خضعت أنواع *Ampelomyces* spp. خلال العقود الأخيرة لإعادة تنظيم الوضع التصنيفي بالاعتماد على طبيعة نمو مستعمراتها في ظروف المختبر حيث قسمت إلى مجموعتين، تضم المجموعة الأولى السلالات سريعة النمو (ذات معدل نمو شعاعي 3–4 مم/ يوم) وتشمل النوع *Phoma glomerata* وأنواع من *Ampelomyces* spp.، بينما تضم المجموعة الثانية السلالات بطيئة النمو (ذات معدل نمو شعاعي 0.5–1 مم/ يوم) وتشمل باقي السلالات التي أطلق عليها هذا الاسم بمعناه المحدد *A. quisqualis* sensu stricto (Kiss, 1997b; Kiss & Nakasone, 1998).

2-2- آلية تأثير الفطر Mode of Action

كما يحدث في الفطور المتطفلة على النباتات، يجري اختراق الجدر الخلوية لخلايا العائل اختراقاً مماثلاً بوساطة عمليات أنزيمية ميكانيكية إذ سجل Sundheim و Kreklin (1982) بنىً شبيهةً بأعضاء الإلتصاق Appressoria في نقطة الإختراق. كما تم التعرف على أنزيمات تحلل خارج خلوية في أوساط الزرع السائلة لفطر *Ampelomyces*، والتي ربما تلعب دوراً في تحطم الجدر الخلوية لخلايا مشيجة البياض الدقيقي خلال عملية الاختراق (Philipp, 1985) . يقوم الفطر فائق التطفل *Ampelomyces* بالتأثير المباشر على العائل، إذ يغزو ويحطم سيتوبلازم خلاياه ويقتلها عبر التسبب بالتفكك والتحلل السريع للسيتوبلازم (Hashioka & Nakai, 1980). يثبط *Ampelomyces* تبوغ مشيجة البياض الدقيقي عندما يهاجم البنيات الجنسية واللاجنسية، وذلك عبر غزو مستعمراته وتحطيمه للحوامل البوغية conidiophores والثمار الزقية. تكون المراحل الأولى لهذا التطفل حتمية على ما يبدو، ويبدأ بموت السيتوبلاسم التي تم غزوها نتيجة تفاعلات التطفل على الخلايا عبر استهلاك طاقاتها الحيوية (Hashioka & Nakai, 1980; Sundheim & Krekling,

1982). لاحظ Philipp وآخرون (1984) أن مستعمرات البياض الدقيقي المُهاجَمة من قبل *Ampelomyces* استطاعت أن تتابع نموها الشعاعي أو التشعبي، ولكن تبوغها توقف حالما اخترق الفطر الفائق التطفل مشيجتها. والنتيجة نفسها أظهرها McGrath وShishkoff (2002) وهي أن الفطر *Ampelomyces* لا يستطيع إيقاف انتشار مستعمرات البياض الدقيقي مخبرياً، ولكنه يخفض من كمية الأبواغ المنتجة في كل مستعمرة.

ينجم عن مهاجمة *Ampelomyces* لفطور البياض الدقيقي انخفاض في التأثيرات السلبية للعامل الممرض على النبات العائل، إذ بين Abou-Foul وآخرون (1996) أن نباتات الخيار *Cucumber* sp. المصابة استعادت حيويتها بعد بدء المعاملة بالفطر *Ampelomyces*، وبعد ثمانية أيام من المعاملة بالمعلق البوغي للفطر *Ampelomyces* عاد محتوى الكلوروفيل ومستويات CO_2 في أوراق النباتات المعالجة إلى ما يشبه مثيلاتها عند الشاهد غير المصاب. كما لم يُكشف عن وجود منتجات سامة ناجمة عن تطفل *Ampelomyces* (Beuther *et al*., 1981 ; Kiss *et al*., 2004) على عكس بعض الفطور البكنيدية فائقة التطفل الأخرى مثل *Coniothyrium minitans* (Machida *et al*., 2001 ; McQuilken *et al*., 2003).

2-3- دورة الحياة Life cycle of the hyperparasite

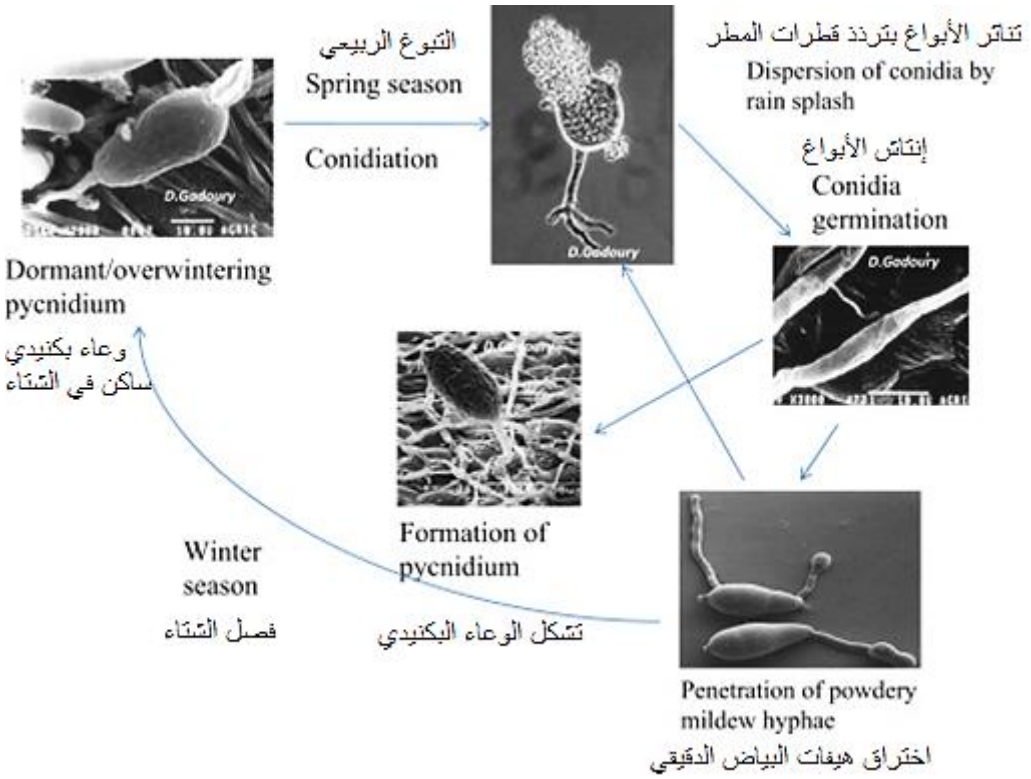
تتشكل الأبواغ البكنيدية Pycnidiospores للفطر *Ampelomyces* في أوعية بكنيدية متطورة داخل مشيجة فطور البياض الدقيقي (الشكل4). تتميز هذه الأبواغ بأنها وحيدة الخلية شفافة المظهر موجودة ضمن محتوى هلامي داخل الأوعية البكنيدية، وبوجود الماء تتضخم هذه المحتويات، وتنتفخ مسببة تمزق جدر هذه الأوعية في مناطق محددة منها (ostioles) مطلقة عبرها الأبواغ البكنيدية (Szentiványi & Kiss, 2003). تنتش الأبواغ بعد 10 – 20 ساعة في ظروف الرطوبة العالية، وهذا بدوره مرتبط بتركيز أبواغ *Ampelomyces* على الأوراق، حيث بين Gu وKo (1997) أن نسبة إنتاش الأبواغ تنخفض عند زيادة تركيز الأبواغ أكثر من 10^6 cfu/ml، وذلك بسبب آلية التثبيط الذاتي، وبعد إنتاشها تخترق مشيجة الفطر *Ampelomyces* مشيجة

البياض الدقيقي المجاورة لها أو القريبة منها، وتتابع نموها منتجة أوعيتها البكنيدية داخل خلايا الفطر العائل بعد 5 – 8 أيام.

تعزز ظروف الرطوبة العالية نمو الفطر الفائق التطفل وتبوغه داخل خلايا العائل (Jarvis & Slingsby, 1977; Philipp & Crüger, 1979)، ويمكن للأبواغ البكنيدية للفطر *Ampelomyces* أن تنتقل بين النباتات بواسطة رذاذ الأمطار أو الماء المتساقط من أسطح أوراق النباتات. كما يستطيع الفطر الانتقال لمسافات طويلة كقطع أو خيوط مشيجية داخل أبواغ فطور البياض الدقيقي المتطفل عليها (Jarvis & Slingsby, 1977; Speer, 1978b; Sundheim & Krekling, 1982; Philipp *et al*., 1984)، فعندما تحط أبواغ البياض الدقيقي المتطفل عليها والمحمولة بواسطة قطرات الماء بالقرب من أي مستعمرة أخرى تحت ظروف الرطوبة فإن مشائج الفطر الفائق التطفل ستنمو خارجاً وتخترق مشائج مستعمرة العائل الجديد. كما يمكن للفطر *Ampelomyces* أن ينتقل بعيداً عن عائله الفطري الأصلي والتطفل على أنواع أخرى من البياض الدقيقي. تنتج مشائج *Ampelomyces* أوعيتها البكنيدية غالباً ضمن الحوامل الكونيدية أو الثمار الزقية غير الناضجة لفطور البياض الدقيقي حيث تبدأ دورة الحياة من جديد عندما تنضج هذه الأوعية البكنيدية وتحرر أبواغها (Benuzzi & Baldoni, 2000).

حتى الوقت الحالي لم يعرف إلا القليل عن ماهية التشتية hibernation أو كيفية قضاء الفطر *Ampelomyces* طور السكون (Kiss *et al*., 2004). وجد كل من De'Bary (1870) و Emmons (1930) و Yarwood (1939) أنه من الممكن أن يشكل الفطر أوعية بكنيدية بشكل رمي على أنقاض أنسجة النباتات الميتة في نهاية الموسم، وافترضوا أنها شكل من أشكال التشتية التي يقضي فيها الفطر *Ampelomyces* طور سكونه في الطبيعة. ومن المحتمل أن تتناثر أبواغ *Ampelomyces* بواسطة الأمطار من الثمار الزقية المتطفل عليها في فصل الربيع، ومن ثم تنبت على الأوراق الفتية، وإذا وجدت مستعمرات من البياض الدقيقي في الجوار فإنها تخترقها وتغزو مشائجها (Falk *et al*., 1995). وبينت تجارب أخرى أن

المشائج الفطرية الساكنة للفطر *Ampelomyces* بنية اللون وذات الجدر السميكة، والتي تم توصيفها لأول مرة بوساطة De'Bary (1870)، يمكن أن تكون مصدر اللقاح الأولي للفطر *Ampelomyces* في ربيع الموسم التالي. بالتالي أظهرت الدراسات أن الأبواغ الكونيدية للفطر فائق التطفل *Ampelomyces* وخلايا الأوعية البكنيدية إضافة إلى المشيجة الساكنة المتشكلة داخل مشائج الفطر العائل من الموسم السابق، كلها يمكن أن تشكل بداية لدورة حياة الفطر فائق التطفل *Ampelomyces* في ربيع الموسم التالي (Kiss *et al*., 2004) .



الشكل (4): دورة حياة الفطر *Ampelomyces quisqualis* (Benuzzi & Baldoni, 2000)

2-4- الطبيعة الرمية للفطر Saprophytic nature of the hyperparasite

تعد مرحلة ما بعد التطفل بالنسبة للفطر *Ampelomyces* مبهمة المعالم، وبقيت الدراسات القديمة التي قدمها كل من Yarwood (1939) وDe'Bary (1870) حول كيفية قضاء الفطر طور سكونه غير قادرة على تفسير فيما إذا كان الفطر يقضي هذه المرحلة على بقايا أوراق النباتات المتساقطة المصابة بالبياض الدقيقي، أو

أنه يتفاعل مع الفطور القاطنة للتربة بعد تحلل أنسجة الأوراق الحاملة لبقايا البنيات العضوية المختلفة لمستعمرات البياض الدقيقي التي كان يتطفل عليها خلال موسم الربيع والصيف، إلا أن الطبيعة الرمية لهذا الفطر بدت جلية كأحد أساليب قضاء الفطر لطور سكونه وبقائه محتفظاً بحيويته للموسم القادم سواء على بقايا مستعمرات العائل الباقية على الأوراق النباتية الهرمة المتساقطة أو على التربة لكن دونما تبوغ، حيث ذكر أن الفطر *Ampelomyces* استطاع الاحتفاظ بحيويته وقدرته على البقاء حتى 21 يوماً على سطح النبات دون وجود عائله (البياض الدقيقي)، وتمكن من مهاجمة عائله حالما وُجِد بجواره بعد هذه المدة مباشرة (Nemeth *et al*., 2019). وقد عزز Németh (2019) نتائجه باستخدام التحوير الوراثي لسلالتين من *الفطر Ampelomyces* باستخدام البكتريا *Agrobacterium tumefaciens* الشائعة الاستخدام لهذا الغرض (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation)، وذلك من خلال تحميل مورثة بروتين الفلورية الخضراء GFP (green fluorescent protein) على السلالات المختبرة، ومن ثم فحصها بالمجهر المزود بآلية الكشف عن وميض الفلورة المنبثقة عن هذا البروتين.

2-5- التنوع الحيوي للفطر *Ampelomyces quisqualis* Biodiversity of

بدأت الدراسات التفصيلية للفطر *A. quisqualis* منذ خمسينيات القرن التاسع عشر، وجرى توثيق بيانات هذه الدراسات تباعاً في البنك الوراثي الدولي GenBank، وإعطاء هذه البيانات أرقاماً توثق تسجيل سلالات وعزلات الفطر الطفيل بعد كل دراسة جديدة له.

ذكرت الدراسات الجزيئية أن فرضية وجود أكثر من نوع للجنس *Ampelomyces* بالاعتماد على تحليل مناطق ITS الفاصلة بين المورثات المرمزة للرنا الريبوزومي (nrRNA) لبعض السلالات لا يبررها المستوى العالي للتنوع الوراثي الذي تبديه هذه السلالات، ولهذا السبب لم يكن هناك بدٌّ سوى اعتماد الثنائية *A. quisqualis* على أنها الممثل الاعتباري لهذا النوع المعقد (Kiss & Nakasone, 1998) . ويمثل هذا الفطر على مدار العقدين الماضيين نموذجاً عاماً للفطر أحادي النوع (Manjunatha *et al*., 2020)، حيث وثق

عديد من الباحثين التباينات الشكلية والمزرعية لعزلات متنوعة عديدة من الفطر *Ampelomyces* (Belsare *et al*., 1980; Kiss & Vajna, 1995; Mhaskar, 1974; Mhaskar & Rao, 1974). فقد سجل Kiss (a1997) مستوىً عالياً من التنوع الوراثي لحوالي 46 عزلة من الفطر *Ampelomyces* على مستوى العالم مستخدماً تقنية RFLP ومستهدفاً منطقة ITS من جزيء الحمض النووي الريبوزومي المرمز للـ rRNA (الريبوزومي)، وكان Rudakov (1979) قد قام بمراجعة للجنس *Ampelomyces* وافترض أن هناك ارتباطاً مع 17 نوعاً آخر، وقد اعتمد في تمييز تقسيماته هذه على الصفات المزرعية للفطر إضافة لشكل الأبواغ الكونيدية، لكن افتراض وجود هذه الأنواع لم تدعمه الدراسات الجزيئية التي أجريت عليها لاحقاً (Kiss & Nakasone, 1998; Sullivan & White, 2000; Szentiványi *et al*., 2005). وحتى جلاء الصورة حول الجدل التصنيفي لوجود أنواع للفطر *Ampelomyces* من عدمه، نصح Kiss (a1997) باستخدام الاسم *Ampelomyces* spp. للتعبير عن الوضع التصنيفي لهذا الجنس. كما أجرى Liang (2007) دراسة حول التنوع الوراثي للفطر *Ampelomyces* في الصين فوجد أن بعض تسلسلات ITS الفاصلة بين المورثات المرمزة لـ rRNA الريبوزومي قد تطابقت مع سلالات أوربية وأخرى أمريكية ما يعني أن توزعها واسع الانتشار عالمياً، في حين شكلت باقي العزلات مجموعة مستقلة في شجرة القرابة الوراثية. تتالت الدراسات التي توثق التنوع الوراثي للفطر *Ampelomyces*، فقد سجل Park وآخرون (2010) العلاقة التطورية لعزلات من كوريا باستخدام تحليلي Bayesian و Maximum Parsimony لتسلسلات من منطقة ITS rDNA ومورثة الأكتين Actin gene وُثق من خلالها عديداً من السلالات، ووصفت طبيعة العلاقة التطورية التي أفضت الى تأكيد أن الجنس المعقد *Ampelomyces* complex ما هو إلا مجموعة من النسائل المتقاربة، والتي لا تبرر عدها أنواعاً على الرغم من تأقلم عديد منها مع النزعة إلى شبه التخصص ببعض أنواع فطور البياض الدقيقي.

آخر ما وثق عن الدراسة الجزيئية للفطر *Ampelomyces* في دراسة نشرت في العام المنصرم يفيد بأن البنية الثنائية لأول جينوم تم تحليله لهذا الفطر تشير إلى أن المناطق الجينومية المتوازنة من GC يتخللها امتدادات أطول أو أقصر من المناطق الغنية بـ AT وهذه سمة مميزة للعديد من الفطور الممرضة للنبات وتقدم

دليلاً إضافياً يفيد بأن الأصل التطوري لفطور *Ampelomyces* قد يعود لفطور ممرضة للنبات، وتوفر هذه الدراسة مصدراً مهماً للدراسات المستقبلية على المستوى الوراثي لفك الشيفرة حول الآليات الجزيئية الكامنة وراء التفاعلات الطبيعية للثلاثية (فطر ممرض – نبات – فطر متطفل على الفطر الممرض للنبات) والاستفادة منها بالتالي في آليات المكافحة الحيوية (Huth *et al*., 2021) .

الفصل الثانـي

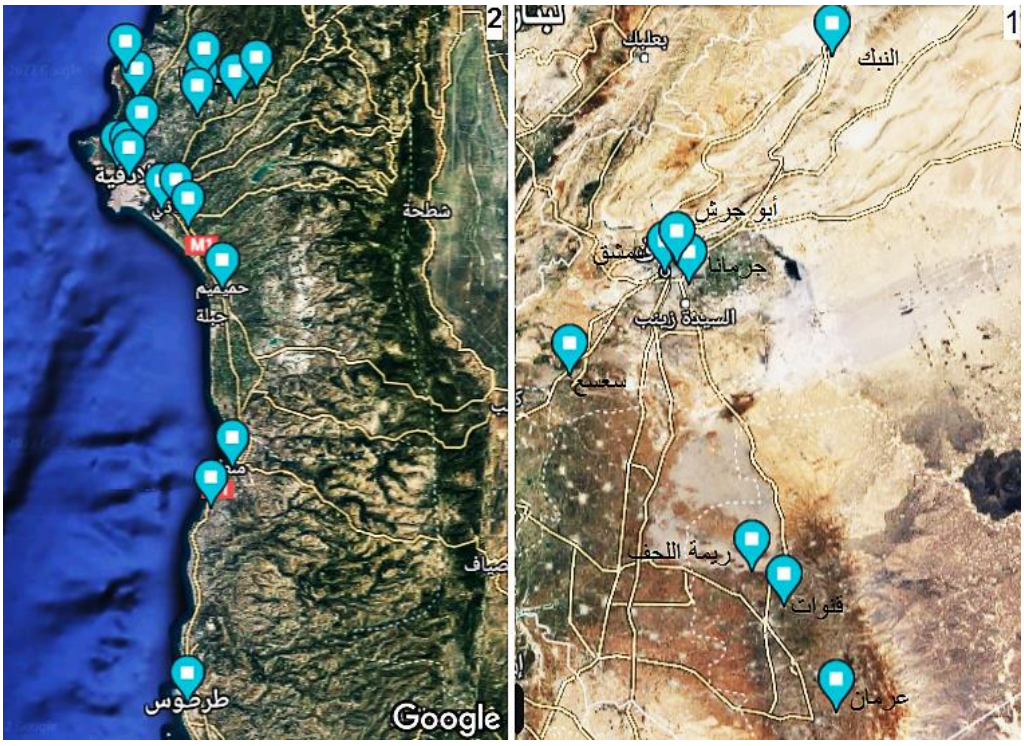
المواد والطرائق

Materials and methods

3- المواد والطرائق Material and Methods

3-1- جمع العينات Samples collection

أجريت عدة مسوحات حقلية خلال مواسم 2019 و2020 و2021، جرى من خلالها الكشف والتقصي عن وجود الفطر *Ampelomyces* على مستعمرات البياض الدقيقي المتطفلة على عوائل نباتية مختلفة سواء كانت برية أو مزروعة. جمعت العينات النباتية المصابة بالبياض الدقيقي من 10 مواقع في المنطقة الجنوبية من سورية توزعت على ثلاث محافظات (دمشق وريف دمشق والسويداء) ، كما جمعت من 20 موقعاً في المنطقة الساحلية توزعت على محافظتين (اللاذقية وطرطوس) (الشكل 5 والجدول 7). وضعت العينات في أكياس بولي إيثيلين، ثم نُقلت الى مخبر التنوع الحيوي – الهيئة العامة للتقانة الحيوية في دمشق لإجراء الفحص المجهري، والتثبت من وجود الفطر المتطفل على مستعمرات البياض الدقيقي لاستبقاء الحاملة منها للفطر الهدف واستبعاد الخالية منه.



الشكل (5): مواقع المسح الحقلي في المنطقتين الساحلية والجنوبية من سوريا

1) المنطقة الجنوبية. 2) المنطقة الساحلية. تبين العلامات على الشكل مواقع جمع العينات.

ويوثق الجدول (2) مواقع المسح الحقلي وإحداثياتها وارتفاعها عن سطح البحر.

جدول (2): مواقع المسح الحقلي وإحداثياتها وارتفاعها عن سطح البحر بالإضافة إلى معدلات الهطولات المطرية السنوية لبعض المدن الرئيسية

الموقع	الاحداثيات (العرض، الطول)	معدل الهطول المطري السنوي/مم	الارتفاع عن سطح البحر/م
دمشق	33.51°شمال، 36.29° شرق	207	701
جرمانا	33.49°شمال، 36.35°شرق		670
دمشق – ابو جرش	33.54°شمال، 36.31°شرق		718
النبك	34.02°شمال، 36.73°شرق	124	1272
سعسع	33.28°شمال، 36.02°شرق		888
السويداء	32.71°شمال، 36.57°شرق	328	1068
قنوات	32.75°شمال، 36.61° شرق		1235
ريمة اللحف	32.83°شمال، 36.53°شرق		860
عرمان	32.51°شمال، 36.76° شرق		1363
اللاذقية	35.53°شمال، 35.79°شرق	741	29
الكنيسات	35.62°شمال، 35.9° شرق		172
الشامية	35.64°شمال، 35.81° شرق		58
برج اسلام	35.67°شمال، 35.8° شرق		75
دمسرخو	35.55°شمال، 35.78° شرق		12
الدعتور	35.56°شمال، 35.79°شرق		18
القنجرة	35.58°شمال، 35.82° شرق		79
العمرونية	35.39°شمال، 35.98°شرق		72
مشقيتا	35.67°شمال، 35.9°شرق		251
البهلولية القرامة	35.65°شمال، 35.99°شرق		214
قسمين	35.63°شمال، 35.9° شرق		191
البهلولية	35.64°شمال، 35.96°شرق		191
حميميم – جبلة	35.4°شمال، 35.94° شرق		37
الهنادة	35.51°شمال، 35.87° شرق		73
البصة	35.5°شمال، 35.84° شرق		26
الصنوبر	35.48°شمال، 35.89° شرق		33
طرطوس	34.89°شمال، 35.89°شرق	837	20
طرطوس – الخراب	34.89°شمال، 35.88° شرق		14
بانياس	35.18°شمال، 35.95°شرق	870	31
حريصون	35.24°شمال، 35.97° شرق		23

المصدر: https://www.meteoblue.com-google maps– النشرة المطرية/موقع وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي

3-2- العزل والتوصيف المورفولوجي Isolation and morphological characterization

جرى التحري عن وجود الفطر *Ampelomyces* في مستعمرات البياض الدقيقي على العينات التي تم جمعها عن طريق التعرف على وجود بكنيدات الفطر باستخدام المجهر المجسم (Optic Ivymen System). وللتثبت من صحة التشخيص أجري فحص مجهري دقيق للبكنيدات باستخدام المجهر الضوئي (BIOBASE) من ناحية الشكل ومحتوى البكنيد من الأبواغ، وحُرّض خروجها بتمزيق جدار البكنيد عبر الضغط الخفيف على الساترة من أجل فحصها، والتأكد من هويتها الشكلية بالعودة للمراجع المتعلقة بهذا الخصوص (De'Bary, 1870; Kiss *et al*., 2004). أُجري فصل للعينات الإيجابية حسب الموقع، ووزعت الأجزاء النباتية الحاملة للفطر الهدف في أطباق بتري بقطر9سم، وتُركت مفتوحة عند درجة حرارة الغرفة لمدة أسبوع بغرض تجفيف العينة النباتية، ثم أُغلقت الأطباق، ووُضعت العينات في البراد لحين الاستخدام.

أجري العزل المخبري باستخدام إبرة باستور زجاجية كُيّفت لهذا الغرض بواسطة اللهب، واختير عدد من البكنيدات الناضجة تحت الساحة المجهرية، ونقلت إلى وسط آغار البطاطا والدكستروز PDA المحضر مسبقاً في أطباق بتري (9 سم) مع مراعاة فصل العينات حسب مكان جمعها، وتدوين رمز العينة وتاريخ العزل على كل طبق. حُضِنت الأطباق عند درجة حرارة 24±1 س° (يونس وآخرون، 2008) في الظلام، وروقبت الأطباق لتنقيتها تباعاً، ونُقلت كل 6–8 أسابيع على أطباق جديدة بغرض التجديد (Liang *et al*., 2007).

استُخدمت بغرض التوصيف المورفولوجي مكبرة ومجهر ضوئي لتمييز شكل البكنيدات، وموضع تشكلها على أجزاء وبُنى فطور البياض الدقيقي المختلفة (أبواغ، مشيجة، حوامل بوغية، أعضاء ثمريه)، وشكل الأبواغ البكنيدية وقياساتها البيومترية لـ 25 مكرر وحُسب المتوسط (av.) والانحراف المعياري (SD) للقراءات.

3-3- الاختبارات الجزيئية Molecular tests

استخدمت لهذا الغرض مستعمرات نقية تمثل كل مستعمرة عزلة نقية مأخوذة من بكنيد واحد. وحُضرت معلقات بوغية من كل من هذه العزلات بتركيز لا يقل عن 10^6 بوغة/مل باستخدام شريحة Neubauer

Haemocytometry ، وعُد كل من هذه المعلقات على أنه دنا قالب DNA template ممثل لكل عزلة على حدة لاستخدامها لاحقاً في تفاعلات تضخيم جزيئات الدنا باستخدام جهاز المدور الحراري بتقانة تفاعل بوليميراز التتابعي Polymerase Chain Reaction (PCR) وفي اختبارات السلسلة DNA sequencing.

3-4- تضخيم منطقة ITS باستخدام تفاعل بوليميراز التتابعي Amplification of ITS region using PCR

استخدم لهذه الغاية زوج من بادئ (مرئس) متخصص صُمّم من قبل Tollenaere (2014) لتعريف الجنس *Ampelomyces*:

الجدول (3): زوج البادئ المتخصص المستخدم في الدراسة والتتابع النكليوتيدي له مع درجة حرارة الإذابة المنصوح بها وحجم المنتج المتوقع

Oligonucleotide ID*	Primer sequence	Tm/c°	Product volume
AQ-F264	5'-GATGAAGAACGCAGCGAAAT-3'	58	≈ 200bp.
AQ-R462	5'-GCTGCCAATTGCTTTGAGAT-3'		

*primers made by Alpha DNA, USA. purified using HPLC

حُضّر التفاعل التالي: master mix 12.5µl (Alpha DNA, USA)، 1.25µl (10µM) لكل من زوج البادئ المذكور أعلاه، 5µl (معلق بوغي 10^6 بوغ/مل) كقالب لـ DNA ، 5µl ماء خالي من النكلوياز. كما أُجري على التفاعل بعض التعديلات لزيادة كفاءته وذلك بإضافة $Mgcl_2$ 0.5µl (10µM) و Taq 0.4µl polymerse (50U/µl) على حساب حجم master mix المستخدم ليصبح حجم التفاعل الكلي 25µl. صُمم برنامج PCR على النحو التالي: طور الفصل الأولي initial denaturation عند درجة حرارة 95 س° لمدة 7 دقائق، ثم 35 دورة على المراحل التالية (طور الفصل 95 س° لمدة دقيقة واحدة، طور الالتحام annealing 55 س° لدقيقة واحدة، طور الاستطالة elongation 72 س° لدقيقة واحدة)، يليه استمرار طور الاستطالة في الدورة

الأخيرة لمدة 10 دقائق لإتاحة الفرصة لاستكمال السلاسل. يليه تحضين عند درجة حرارة 4 س° لحين إجراء الرحلان الكهربائي أو السلسلة.

3-5- الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة على هلامة أغاروز Agarose gel electrophoresis of PCR products

أجري رحلان كهربائي لنواتج PCR للتأكد من تضخيم القطع المستهدفة، وظهور الحزم الممثلة للقطع المضخمة بالحجم المتوقع (≈200bp) على هلامة أغاروز (Agarose Gel) 1.5% في محلول TBE (1X) وأُضيفت صبغة RedSafe الآمنة لإظهار حزم DNA على الهلامة إلى جانب DNA ladder لتمييز الوزن الجزيئي للحزم الناتجة، وضُبط الرحلان الكهربائي على جهد 100 فولت لمدة 30–50 دقيقة. أُخذت صور النتائج بوسطة جهاز توثيق الهلامات Gel documentation system المزود بالأشعة فوق البنفسجية UV لإظهار الحزم المتوقعة.

3-6- تحديد التتابع النكليوتيدي لنواتج PCR DNA Sequencing of PCR products

أجري تحليل التتابع النيكليوتيدي لنواتج PCR المختارة وفقًا لطريقة سانجر (Sanger method) في هيئة الطاقة الذرية السورية (AEC) حسب البروتوكول المتبع في الهيئة (ملحق 1)، قُرِئت بيانات السلسلة (chromatogram) ومخرجاتها وجرى تصحيحها باستخدام برنامج Bio-Edit v.2.2.5.0 (Hall, 1999) لكل عينة على حدة. أودعت جميع تسلسلات الحمض النووي لمناطق ITS الناتجة في البنك الوراثي للمركز الوطني لمعلومات التقانات الحيوية GenBank (NCBI، http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez) وأعطيت أرقام مدخلات رسمية (Accession Numbers).

7-3- محاذاة سلاسل متعددة ورسم شجرة القرابة الوراثية Multiple sequence alignment and drawing the phylogenetic tree

هدفت دراسة القرابة الوراثة إلى إدخال العزلات المحلية المدروسة بين أقرب سلالات *Ampelomyces* العالمية المسجلة في البنك الوراثي، وتوثيق أنواع جديدة إن وُجدت. أجريت محاذاة مزدوجة ومتعددة Pairwise and multiple sequence alignment للسلاسل المدخلة في موقع NCBI مع السلالات القريبة مرتكزة على الخوارزميات المعتمدة في برنامج BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) للبحث في الموقع المذكور، وذلك مع السلالات المسجلة في الدراسات العالمية. ولأن التتابعات النكليوتيدية لسلالات *Ampelomyces* التي تحددها منطقة ITS عالية التنوع (Tollenaere *et al*., 2014) كان لا بُد من اقتصار البحث في خانة الكائن (Organism) على الجنس *Ampelomyces* في صفحة BLAST.

استُخدم لإجراء محاذاة سلاسل متعددة برنامج متاح على موقع NCBI وهو Multiple Sequence Alignment viewer v.1.21.0 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/msaviewer/) وبرنامج ClustalX v.2.0.8 (Kohli & Bachhawat, 2003)، ودُعم التحليل باستخدام برنامج MAFTT (Katoh & Standley, 2013)، فحُدّد 174 من متواليات (تسلسلات) ITS الإضافية والمعرفة على أنها *Ampelomyces* spp.، والتي تم الحصول عليها من البنك الوراثي GenBank مع أرقام الدخول (Accession Number) الخاصة بكل منها بما فيها العزلات قيد الدراسة ويوضح الجدول (4) هذه العزلات والسلالات ومصدرها والمراجع الخاصة بها. أنشئت شجرة القرابة الوراثية بواسطة برامج متخصصة PAUP*4.0a169 (Swofford, 1998; Swofford & Sullivan, 2003) وClustalX v.2.0.8 وإظهارها باستخدام برنامج خاص TreeViewX v. 0.5.0 (Page, 1996). و اختير النوع *Epiccocum nigrum* (accession No. OM236995) كمجموعة خارجية لهذه الشجرة.

جدول (4): تسلسلات ITS لسلالات وعزلات الفطر *Ampelomyces* التي جرى استخراجها من البنك الوراثي على NCBI، والتي استخدمت في دراسة القرابة الوراثية مع الأرقام التعريفية الخاصة بكل منها وأصلها الجغرافي ومصادر المعلومات

رقم التعريف في البنك الوراثي	المصدر، العام	الأصل الجغرافي، عام الجمع	رقم التعريف في البنك الوراثي	المصدر، العام	الأصل الجغرافي، عام الجمع
AF035780	Kiss & Nakasone (1998)	Hungary, 1990	GQ324114	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AF035781	Kiss & Nakasone (1998)	USA, 1931	GQ324115	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AF035782	Kiss & Nakasone (1998)	Canada, 1994	GQ324116	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AF035783™	Kiss & Nakasone (1998)	Occupied Palestine, unknown	GQ324117	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
			GQ324118	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AF126817	Sullivan & White (2000)	USA, 1998	GQ324119	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AF126818	Sullivan & White (2000)	USA, 1998	GQ324120	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007
AY663815	Szentiványi *et al*. (2005)	Hungary, 1995	GQ324121	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AY663816	Szentiványi *et al*. (2005)	Hungary, 2000	GQ324122	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AY663817	Szentiványi *et al*. (2005)	Germany, 2002	GQ324123	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AY663818	Szentiványi *et al*. (2005)	UK, 2002	GQ324124	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AY663819	Szentiványi *et al*. (2005)	UK, 2002	GQ324125	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AY663820	Szentiványi *et al*. (2005)	Germany, 2002	GQ324126	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AY663821	Szentiványi *et al*. (2005)	Hungary, 2002	GQ324127	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AY663822	Szentiványi *et al*. (2005)	France, 1995	GQ324128	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AY663823	Szentiványi *et al*. (2005)	UK, 1999	GQ324129	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
AY663824	Szentiványi *et al*. (2005)	UK, 1999	GQ324130	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490745	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324131	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490746	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324132	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490747	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324133	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490748	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324134	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490749	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324135	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490750	Liang *et al*. (2007)	China, 2003	GQ324136	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490751	Liang *et al*. (2007)	China, 2003	GQ324137	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490752	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324138	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490753	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324139	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490754	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324140	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490755	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324141	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490756	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324142	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490757	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324143	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490758	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324144	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490759	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324145	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490760	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324146	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006
DQ490761	Liang *et al*. (2007)	China, 2003	GQ324147	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007
DQ490762	Liang *et al*. (2007)	China, 2003	GQ324148	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007
DQ490763	Liang *et al*. (2007)	China, 2002	GQ324149	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007
DQ490764	Liang *et al*. (2007)	Germany, 2002	GU329995	Park *et al*. (2010)	Korea, 2008

DQ490765	Liang *et al*. (2007)	Germany, 2002	GU329996	Park *et al*. (2010)	Korea, 2008
GQ324066	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	GU329997	Park *et al*. (2010)	Korea, 2008
GQ324067	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	GU329998	Park *et al*. (2010)	Korea, 2008
GQ324068	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	GU329999	Park *et al*. (2010)	Korea, 2008
GQ324069	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	GU330000	Park *et al*. (2010)	Korea, 2008
GQ324070	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	GU330001	Park *et al*. (2010)	Korea, 2008
GQ324071	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	GU330002	Park *et al*. (2010)	Korea, 2008
GQ324072	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	GU330003	Park *et al*. (2010)	Korea, 2008
GQ324073	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HF913432*	Shinde & Thorat (2013), Didymella *glomerata*	India, 2013
GQ324074	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007			
GQ324075	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HM124935	Kiss *et al*. (2011)	Hungary, 2011
GQ324076	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HM124940	Kiss *et al*. (2011)	Hungary, 2011
GQ324077	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HM124943	Kiss *et al*. (2011)	Hungary, 2011
GQ324078	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HM124945	Kiss *et al*. (2011)	Hungary, 2011
GQ324079	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HM124946	Kiss *et al*. (2011)	Hungary, 2011
GQ324080	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HM124947	Kiss *et al*. (2011)	Hungary, 2011
GQ324081	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HM124949	Kiss *et al*. (2011)	Hungary, 2011
GQ324082	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HM125022	Kiss *et al*. (2011)	Hungary, 2011
GQ324083	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HM125025	Kiss *et al*. (2011)	Hungary, 2011
GQ324084	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HQ108035	Angeli (2012)	Switzerland, 1999
GQ324085	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HQ108047	Angeli (2012)	Switzerland, 1999
GQ324086	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	HQ108048	Angeli (2012)	Switzerland, 1999
GQ324087	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	JN417711	Pintye *et al*. (2012)	Italy, 2012
GQ324088	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	JN417717	Pintye *et al*. (2012)	Italy, 2012
GQ324089	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	JN417733	Pintye *et al*. (2012)	Italy, 2012
GQ324090	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	JN417738	Pintye *et al*. (2012)	Italy, 2012
GQ324091	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	JN417755	Pintye *et al*. (2012)	Italy, 2012
GQ324092	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	KJ934197*	Song (2014), Leptosphaeria sp.	China, 2014
GQ324093	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006			
GQ324094	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	KU986801	Hamim *et al*. (2017)	Morocco, 2013
GQ324095	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	KX033453	Parthasarathy (2016)	India, 2015
GQ324096	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	KX033456	Parthasarathy (2016)	India, 2015
GQ324097	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	KX033461	Parthasarathy (2016)	India, 2015
GQ324098	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	KX033462	Parthasarathy (2016)	India, 2015
GQ324099	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	KX033463	Parthasarathy (2016)	India, 2015
GQ324100	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	KX033464	Parthasarathy (2016)	India, 2015
GQ324101	Park *et al*. (2010)	Korea, 2005	KX033465	Parthasarathy (2016)	India, 2015
GQ324102	Park *et al*. (2010)	Korea,2006	KX033468	Parthasarathy (2016)	India, 2015
GQ324103	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	KX033469	Parthasarathy (2016)	India, 2015
GQ324104	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	KX033470	Parthasarathy (2016)	India, 2015
GQ324105	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	KX349481	Parthasarathy (2016)	India, 2015
GQ324106	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	KY367508	Ibrahim (2017)	Switzerland, 2013
GQ324107	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	MH997723	Perez (2018)	Chile, 2018

GQ324108	Park *et al*. (2010)	Korea, 2007	MK304213	Zhang (2018)	China, 2018
GQ324109	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	OM236995*	Yuan (2022), *Epicoccum nigrum*	China, 2020
GQ324110	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006			
GQ324111	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	U82449	Kiss & Nakasone (1998)	Canada, 1975
GQ324112	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	U82450	Kiss & Nakasone (1998)	Germany, unknown
GQ324113	Park *et al*. (2010)	Korea, 2006	U82451	Kiss & Nakasone (1998)	Germany, unknown

*أجناس قريبة وراثياً

TMسلالات مستخدمة كمبيدات حيوية تجارية

استخدم برنامج PAUP لدراسة القرابة الوراثية اعتماداً على نتائج تحاليل كل من Maximum parsimony و Maximum likelihood انطلاقاً من تحليل Neighbor joining لبناء شجرة القرابة الوراثية للعزلات المدروسة (Jill Harrison & Langdale, 2006). وباستخدام حساب الإجماع (computing consensus) للأشجار الناتجة عن البحث الاسترشادي (heuritic search)، رُسِمت شجرة القرابة على قاعدة الأغلبية 50% (50% Majurity rule) وحسبت متوسطات قيم مؤشرات Consistency Index و Retention index و Rescaled consistency index و Homoplasy index للأشجار الوراثية التي حققت أفضل معايير في تحليل Maximum parsimony (The most parsimonious trees). أجري تحليل Maximum likelihood بدءاً من شجرة القرابة الوراثية المعتمدة على تحليل Neighbor joining باستخدام اختبار HKY85 (Hasegawa, 1985) كما أجري أيضاً تحليل Bootstrap (100 iteration) ثم رسمت شجرة القرابة الوراثية بعد التحقق من تطابق نتائج التحاليل المذكورة باستخدام طريقة Maximum parsimony.

3-8- العدوى الاصطناعية واختبارات الكفاءة للعزلات المدروسة Artificial inoculation and efficiency tests of experimented isolates

أجريت العدوى الاصطناعية على مرحلتين، جرى في المرحلة الأولى اعتيان نباتات مصابة بفطور البياض الدقيقي المتخصصة في التطفل على نباتات اليقطين (ممثلة للقرعيات) والكرمة والميرمية (الجدول5)، وفي المرحلة الثانية العدوى بعزلات مختارة من عزلات الفطر *Ampelomyces* المدروسة.

جدول(5): النباتات التي أجري عليها اختبار الكفاءة وأنواع البياض الدقيقي المتخصص في إصابة كل منها

النبات	الاسم العلمي	فطر البياض الدقيقي المتخصص
اليقطين	*C. maxima* L.	*E. cichoracearum* DC.
الكرمة	*V. venifera* L.	*Erysiphe* (=*Uncinola*) necator Schwein.
الميرمية	*S. officinalis* L.	(Cabrera, 2010) *G. neosalviae*

زرعت بذور اليقطين *C. maxima* في صواني الإنبات المحملة مسبقاً بخلطة ترابية في البيت الزجاجي تضم تورب وتراب ورمل بنسبة 1:1:1 ، وبعد أن أصبحت الشتول في طور النقل (10 – 15 يوم) ، نُقِلت إلى أصص (نبات واحد في كل أصيص) بلاستيكية بقطر 11 سم. أما بالنسبة للكرمة والميرمية، فقد أخذت عقل من نباتات مزروعة مسبقاً، حيث استُقدِمت عقل الكرمة (أسود وبلدي) من مركز بحوث السويداء في ظهر الجبل، بينما استُخدمت عقل مأخوذة من نباتات الميرمية *S. officinalis* المزروعة في حديقة الهيئة العامة للتقانة الحيوية في اختبارات العدوى الاصطناعية.

3-8-1. العدوى الاصطناعية بطريقة الورقة المفصولة Artificial inoculation using detached leaf assay

أجريت اختبارات العدوى الاصطناعية لتقييم إمراضية الفطر *Ampelomyces* بطريقة الورقة المفصولة على اعتبارها أكثر سهولة بهدف التقييم المبدئي لكفاءة التطفل على فطور البياض الدقيقي في المخبر. اختيرت أوراق سليمة غضَّة، وُضِعت في طبق بتري (9 سم) بداخله ورقة نشاف مرطبة ومعقمة، أما فيما يتعلق بأوراق اليقطين فقد جرى تحضينها في وعاء بلاستيكي مغلق يتناسب مع حجم الورقة. لُقّحت الأوراق بواسطة نثر أبواغ جمعت من نباتات مصابة بفطر البياض الدقيقي المتخصص على كل نبات (جدول5) باستخدام فرشاة ناعمة معقمة، وحُضّنت بعد ذلك الأطباق عند درجة حرارة 21 س° ونظام إضاءة 16:8 حسب البروتوكول الموصى به من قِبَل (Nicot *et al*., 2002) . وبعد 9 أيام من الإلقاح وتطور الإصابة وظهور مشيجة البياض

الدقيقي لُقّحَت بؤر الإصابة بمعلق من عزلات الفطر *Ampelomyces* وبخمس تراكيز متدرجة بواقع مكررين لكل تركيز. ضُبِطت التراكيز على التمديدات 10^6، 10^7، $10^7\times1.9$، $10^7\times2.95$، $10^7\times5.9$ باستخدام شريحة العد المجهري Neubaure. أجري التلقيح على أوراق الميرمية بعد انتشار ميسيليوم البياض الدقيقي على كامل المسطح الورقي وبحجم 100µl، بينما أجري تلقيح بؤري في الكرمة واليقطين على مساحة من الورقة المصابة جرى تحديدها بواسطة قلم حبر ثابت على شكل حلقات دائرية الشكل (شكل 7) وبمعدل يتناسب مع التغطية الكاملة باللقاح لكامل المساحة المحددة بحجم يتراوح بين 50-60 µl يتناسب مع المساحة الملقحة (Legler *et al.*, 2016).

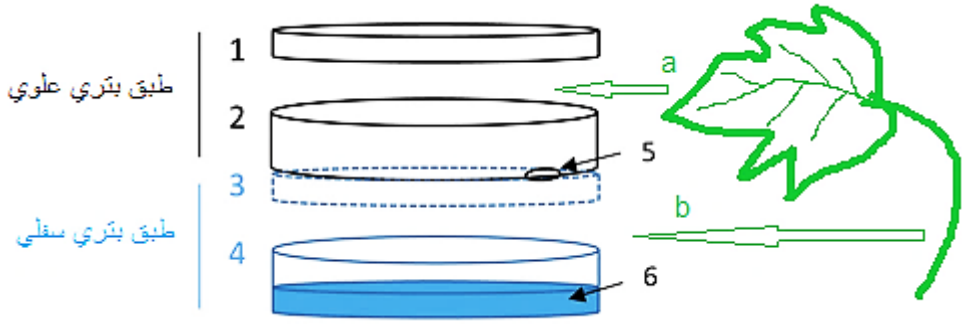
فُحصت البؤر الممثلة لمستعمرات البياض الدقيقي بعد 10–20 يوم من معاملتها بالعزلات المدروسة إضافة لمعاملة الشاهد بالماء المقطر المعقم وشاهد آخر تُرك دون معاملة (Mhaskar & Rao, 1974). استُخدم مقياس لتقييم شدة الإصابة حسب (Tollenaere *et al.*, 2014) كما هو مبين في الجدول (6):

الجدول (6): مقياس شدة الإصابة بالفطر *Ampelomyces* على مستعمرات البياض الدقيقي

المعيار	الوصف
'None'	لا يوجد بكنيدات
'Few'	بقعة أو اثنتين تحوي عدد قليل جداً من البكنيدات
'Moderate'	البكنيدات تغطي أقل من 75% من مساحة الإصابة بالبياض الدقيقي
'Many'	البكنيدات تغطي أكثر من 75% من مساحة الإصابة بالبياض الدقيقي

كما استُخدمت للعدوى بطريقة الورقة المفصولة طريقة معدّلة اعتمدت على ما وصفه Zang وآخرون (2019)، تمَّ من خلالها عمل حجرة مؤلفة من طبقي بتري وُضِعا فوق بعضهما بعضاً بحيث أُلصِق غطاء الطبق السفلي بقاعدة الطبق العلوي حرارياً كما هو موضح في الشكل (6)، وأُحدِثت فتحة في الطبقة الملتصقة على نفس المستوى وفي جهة جانبية من الحجرة المُصنّعة ليمر من خلالها عنق الورقة المستخدمة في العدوى بحيث أصبحت الحجرة مؤلفة من قسمين، شغل القسم العلوي سطح الورقة فيما خُصّص الجزء السفلي لعنق الورقة. مُلئَ

الطبق السفلي بـ 20ml ماء مقطر معقم ليساعد في بقاء الورقة نضرة لأطول مدة ممكنة وليساعد على توفير الرطوبة اللازمة لحدوث العدوى داخل الحجرة. استُخدم هذا التصميم للتحقق من القدرة التطفُّلية للعزلة *Ampelomyces* (S.ham82) على فطر البياض الدقيقي *G. neosalviae* المتطفل على نبات الميرمية S.*officinalis* (Hamzeh *et al* ., 2022) ، وذلك بتطبيق فرضية كوخ، حيث أجريت العدوى الاصطناعية بمعلق بوغي من العزلة المذكورة بتركيز 4.4×10^6 بوغة/مل عُومل بمعدل 2µl على جزء مصاب من سطح ورقة الميرمية، نُثِرت بعدها مباشرةً كمية قليلة من أبواغ البياض الدقيقي فوق موضع المعاملة بالمعلق السابق، وحُضّنَت الورقة المُعاملة بنوعي الفطر في الظلام لمدة 24 ساعة وعند درجة حرارة 25 س°، ثم نُقِلت إلى نظام إضاءة وظلام 12/12 (Zang *et al*., 2019).



الشكل (6): تمثيل رسومي للحجرة المُصَمَّمة لإجراء العدوى الاصطناعية بطريقة الورقة المفصولة (Hamzeh *et al*., 2022). (1) و (3) غطاءي طبقي البتري العلوي والسفلي. (2) و(4) قاعدتي طبقي البتري العلوية والسفلية. (5) فتحة محدثة في الطبقة الملتصقة (2 و3) مخصصة لمرور عنق الورقة. (6) ماء مقطر معقم. يشير السهم (a) إلى الحيز المخصص لسطح الورقة فيما يشير السهم (b) إلى الحيز المخصص لعنق الورقة.

نُقلت البكنيدات الناتجة عن العدوى الاصطناعية إلى وسط PDA كما ذُكر في فقرة العزل، وحضنت عند درجة 24±1 س°، وجرت مراقبة إنبات البكنيدات المعزولة ونموها. واعتُمدت هذه الطريقة في إجراء اختبارات العدوى الاصطناعية لتقييم كفاءة العزلتين المدروستين .

3-8-2. تحضير التراكيز المختلفة للمعلقات البوغية Preparation of different concentrations of spore suspensions

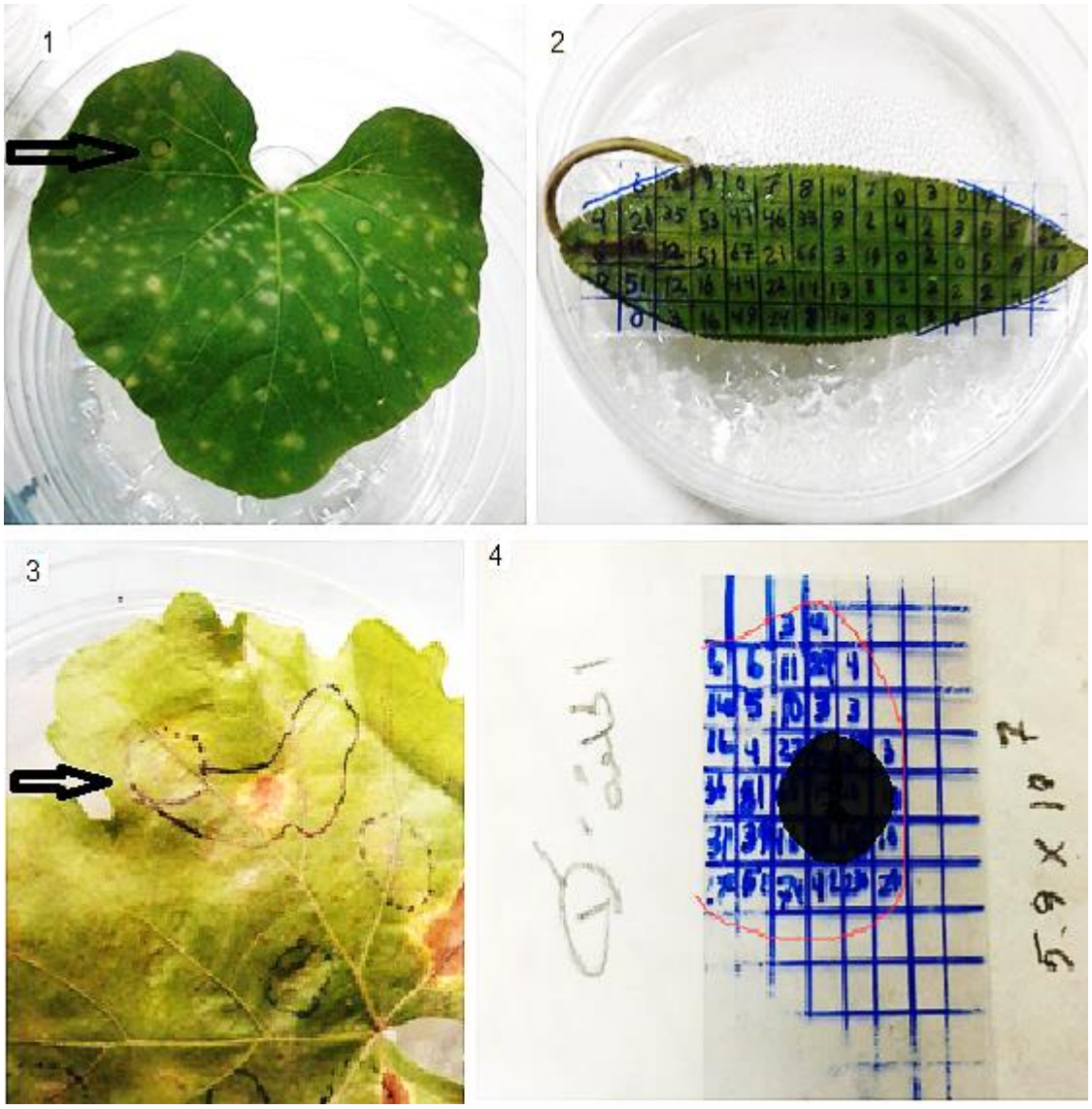
أخذت خزعات من مستعمرات الفطر *Ampelomyces* التي نميت على وسط PDA بعمر شهر وسطياً، وذلك من الإفرازات البوغية التي يمكن تمييزها بالفحص تحت التكبير أو حتى بالعين المجردة على سطح البكنيدات بعد نضجها، والتي قد تملأ كامل مسطح المستعمرة في حالة العزلات النشيطة التبوغ، ووضعت كميات من هذه الإفرازات من كل عزلة باستخدام إبرة العزل ذات الحلقة (loop) في أنبوب ابندورف 1.5ml يحوي 0.5ml ماء مقطراً معقماً، وحسب التركيز باستخدام شريحة العد كما ذكر أعلاه، وأجريت تمديدات تراوحت بين 10^6 وحتى 6×10^7 بوغة/مل. أجريت المعاملة بالمعلقات البوغية بعد رش المسطح النباتي المستهدف بماء مقطر يحوي Tween80 بنسبة 0.1% بهدف الترطيب وتحسين التصاق المعلق بالورقة، ثم أجريت بعد ذلك المعاملة بالتراكيز المختلفة من عزلات الفطر المتطفل.

3-9- التحليل الإحصائي Stasistical analysis

حسبت المسطحات الورقية عند العدوى بطريقة الورقة المفصولة باستخدام شريحة مجهرية قسمت الى مربعات (0.5×0.5) سم، ووضعت فوق الورقة المختبرة، وأجري عد البكنيدات في كل مربع (الشكل7-4 و2)، ثم حسبت شدة الإصابة على أوراق بلغت نسبة الإصابة فيها بالبياض الدقيقي *G. neosalviae* 100% (الشكل7-2) أو ضمن 4-5 مستعمرات من فطري البياض الدقيقي *E. necator* و*E. cichoracearum* (الشكل7-1 و3) جرى تحديدها على شكل حلقات بواسطة قلم حبر خاص ليتم معاملتها في مركز الحلقة بواسطة الميكروبيبت (Legler *et al*., 2016). تمثل هذ الحلقات مكررات على نفس المسطح الورقي.

أجري التحليل الإحصائي للبيانات بطريقة Univariate Tests من النموذج الخطي العام General Linear Model (GLM) للمقارنة بين قيم المتوسطات باستخدام برنامج SPSS كما استخدمت الاختبارات البعدية لأقل فرق معنوي (LSD) إضافة إلى اختبار دنكن (Duncan) للمقارنات المتعددة، حيث أجري إدخال البيانات وتحليلها على اعتبار شدة الإصابة متغير تابع dependent variable في حين أدخلت العوامل التالية: 1)

تراكيز المعلقات البوغية (n=5)، 2) نوع العائل الفطري (n=3)، 3) عدد العزلات المستخدمة في العدوى (n=2) كعوامل مؤثرة Factors لدراسة تأثيرها في شدة الإصابة Intensity. ودرست الفروق المعنوية بين البيانات عند مستوى معنوية 0.01.



الشكل (7): طريقة حساب المساحة المصابة وعدّ البكنيدات على الأوراق المصابة بفطور البياض الدقيقي المعاملة بالعزلات المدروسة. 1) و3) مستعمرات البياض الدقيقي على اليقطين والكرمة، وقد جرى تعليمها على شكل حلقات. تمثل الحلقات المنقطة في الصورة 3 المستعمرات المحددة قبل العدوى، بينما تمثل الامتدادات الناشئة عن هذه الحلقات انتشار الإصابة ببكنيدات الفطر المتطفل خارج منطقة العدوى. 2) شريحة مجهرية مقسمة على ورقة ميرمية مصابة بالفطر *G. neosalviae* بنسبة 100%. 4) شريحة مجهرية مقسمة تمثل اللطخة الداخلية مساحة الحلقة المعاملة قبل العدوى بينما تمثل الحلقة الخارجية امتداد الإصابة ببكنيدات الفطر المتطفل.

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Results and discussion

4- النتائج والمناقشة Results and discussion

4-1- المسح الحقلي Field survey

أظهر المسح الحقلي لـ 23 نوعاً نباتياً مصاباً بـ 16 نوعاً من فطور البياض الدقيقي موزعة على 7 أجناس، أن 5 عينات من أصل 73 عينة جُمعت في مواسم 2019 – 2020 – 2021 قد حملت بكنيدات الفطر *Ampelomyces*، وكان للمنطقة الساحلية الحصة الأكبر كما هو متوقع، وسُجلت على 4 عينات من العينات الخمسة الإيجابية في 3 مواقع (البهلولية – القرامة – قسمين)، بينما سُجل أول رصد للفطر *Ampelomyces* sp. على عينة واحدة في المنطقة الجنوبية (دمشق – أبو جرش). ويبين الجدول (7) مواقع المسح الحقلي والعوائل النباتية والفطرية التي تم الاعتيان منها في هذه المواقع.

رُصدت بكنيدات الفطر المتطفل في عينات المنطقة الساحلية على نوعين من فطور البياض الدقيقي، حيث سُجلت على الفطر *E. convolvuli* المتطفل على نبات المدادة *Convolvulus arvensis* في 3 عينات، بينما سُجلت في العينة الرابعة على الفطر *E. heracli* المتطفل على النبات العشبي *Ammi majus*. في حين كان التسجيل الأول لظهور الفطر *Ampelomyces* في المنطقة الجنوبية على الفطر *G. neosalviae* المتطفل على نبات الميرمية *S. officinalis* (جدول 7). ويوضح الشكل (8) أدناه المواقع التي رصدت فيها عزلات الفطر *Ampelomyces* على العينات الإيجابية التي تم جمعها من تلك المواقع.



الشكل (8): المواقع التي تم رصد الفطر *Ampelomyces* فيها في كل من المنطقتين الساحلية (A) والجنوبية (B).

موقع رصد الفطر الهدف

الجدول (7): نتائج المسح الحقلي لمواسم 2019 و2020 و2021 في المناطق الساحلية والجنوبية والعوائل النباتية والفطرية

المنطقة الساحلية								المنطقة الجنوبية				
نوع البياض الدقيقي	العائل النباتي	الموقع		نوع البياض الدقيقي	العائل النباتي	الموقع		نوع البياض الدقيقي	العائل النباتي	الموقع		
Erysiphe convolvuli DC.	*Convolvulus arvensis* L.	عمرونية	اللاذقية	*P. erigerontis* (Lev) U. Braun & T.Z. Liu	*C. bonariensis* (L.) Cronq.	اللاذقية	اللاذقية	*E. euonymi-japonici* (Viennot-Bourgin) Braun & Takamatsu	*Euonymus japonicas* Thunb.	أبو جرش	دمشق	
E. cichoracearum DC.	*Hibiscus esculentus* L.			*E. convolvuli* DC.	*C. arvensis* L.	القنجرة		*E. convolvuli* DC.	*Convolvulus sp.*L.			
Microsphaera alphitoides Griffon & Maubl.	*Quercus sp.*L.	برج إسلام		*E. convolvuli* DC.	*C. arvensis* L.	قرامة		*P. erigerontis* (Lev) U. Braun & T.Z. Liu	*C. bonariensis* (L.) Cronq.			
E. convolvuli DC.	*C. arvensis* L.	الدعتور		*E. cichoracearum* DC.	*H. esculentus* L.			*Golovinomyces neosalviae**	*Salvia officinalis* L.			
Phyllactinia guttata (Wallr.: Fr.) Lev`.	*Melia azedarach* L.	مشقيتا		*M. trifolii* (Grev.) U. Braun	*Trifolium sp.*L.			*E. euonymi-japonici* (Viennot-Bourgin) Braun & Takamatsu	*E. japonicas* Thunb.	كلية الهندسة الميكانيكية والكهربائية		
E. necator Schwein.	*Vitis vinifera* L.	دمسرخو		*E. convolvuli* DC.	*C. arvensis* L.	البهلولية		*E. convolvuli* DC.	*C. arvensis* L.	دمشق		
E. cichoracearum DC.	*Urospermum sp.* Scop.							*E. convolvuli* DC.	*C. arvensis* L.	سعسع	ريف دمشق	
E. cichoracearum DC., *Sphaerotheca fuliginea* Schlecht.	*Cucumis sativus* L.	جبلة - حميميم		*E. cichoracearum* DC.	*H. esculentus* L.			*S. fuliginea* Schlecht., *Oidium* (Blumer)	*Helianthus annuus* L.			
E. heraclei DC.	*Ainsworthia sp.* Bat. & Cif.			*E. heraclei* DC.	*A. majus* L.			*E. polygonii* DC.	*Polygonum sp.*L.	أفتريس		
Leveillula. Taurica (Lev`.) Arnaud	*Solanum sp.* L.	صنوبر		*P. erigerontis* (Lev) U. Braun & T.Z. Liu	*Conyza bonariensis* (L.) Cronq.			*E. convolvuli* DC.	*C. arvensis* L.	جرمانا		
E. heraclei DC.	*Ammi majus* L.	الهنادي		*E. convolvuli* DC.	*C. arvensis* L.	قسمين		*S. fuliginea* Schlecht., *E. cichoracearum* DC.	*C. maxima* Duchesne.			
E. convolvuli DC.	*C. arvensis* L.	رأس شمرا		*P. xanthii* (Castagne) U. Braun & Shishkoff	*C. pepo* L.			*S. fuliginea* Schlecht., *E. cichoracearum*	*C. pepo* L.			
Podosphaera xanthii (Castagne) U. Braun & Shishkoff	*Cucurbita maxima* Duchesne.	عكار	طرطوس	*E. cichoracearum* DC.	*H. esculentus* L.			*E. convolvuli* DC.	*C. arvensis* L.	النبك		
E. convolvuli DC.	*C. arvensis*	الخراب		*L.. Taurica* (Lev`.) Arnaud	*Capsicum sp.*L.	كنيسات		*E. convolvuli* DC.	*C. arvensis* L.	جبل عرمان	السويداء	
L. taurica (Lev`.) Arnaud	*S. lycopersicum* L.	بانياس										
L. taurica (Lev`.) Arnaud	*S. melongena* L.			*Golovinomyces inulae* U. Braun & H.D. Shin	*Inula sp.*L.			*E. necator* Schwein.	*V. vinifera* L.	قنوات		
L. taurica (Lev`.) Arnaud	*S. lycopersicum* L.	حريصون		*E. cichoracearum* DC.	*H. esculentus* L.	الشامية		*E. necator* Schwein.	*V. vinifera* L.	ريمة اللحف		
E. necator Schwein.	*V. vinifera* L.											

تمثل الخلايا باللون الغامق في الجدول العينات الإيجابية التي تم رصد الفطر *Ampelomyces* عليها في هذه الدراسة.

* تسجيل جديد للفطر *Ampelomyces* (Hamzeh *et al*., 2022)

الجدول (8): العينات الإيجابية التي رصد فيها الفطر *Ampelomyces*

موقع العينة	رمزها	العائل النباتي	العائل الفطري
اللاذقية – البهلولية	Bah1	المدادة	*E. convolvuli* DC.
		C. arvensis L.	
اللاذقية - البهلولية	Bah3	*Ammi majus* L.	*E. heraclei* DC.
اللاذقية - القرامة	KR1	المدادة	*E. convolvuli* DC.
		C. arvensis L.	
اللاذقية - قسمين	Kis1	المدادة	*E. convolvuli* DC.
		C. arvensis L.	
دمشق – أبو جرش	S.ham82	الميرمية	*Golovinomyces neosalviae*
		Salvia officinalis L.	

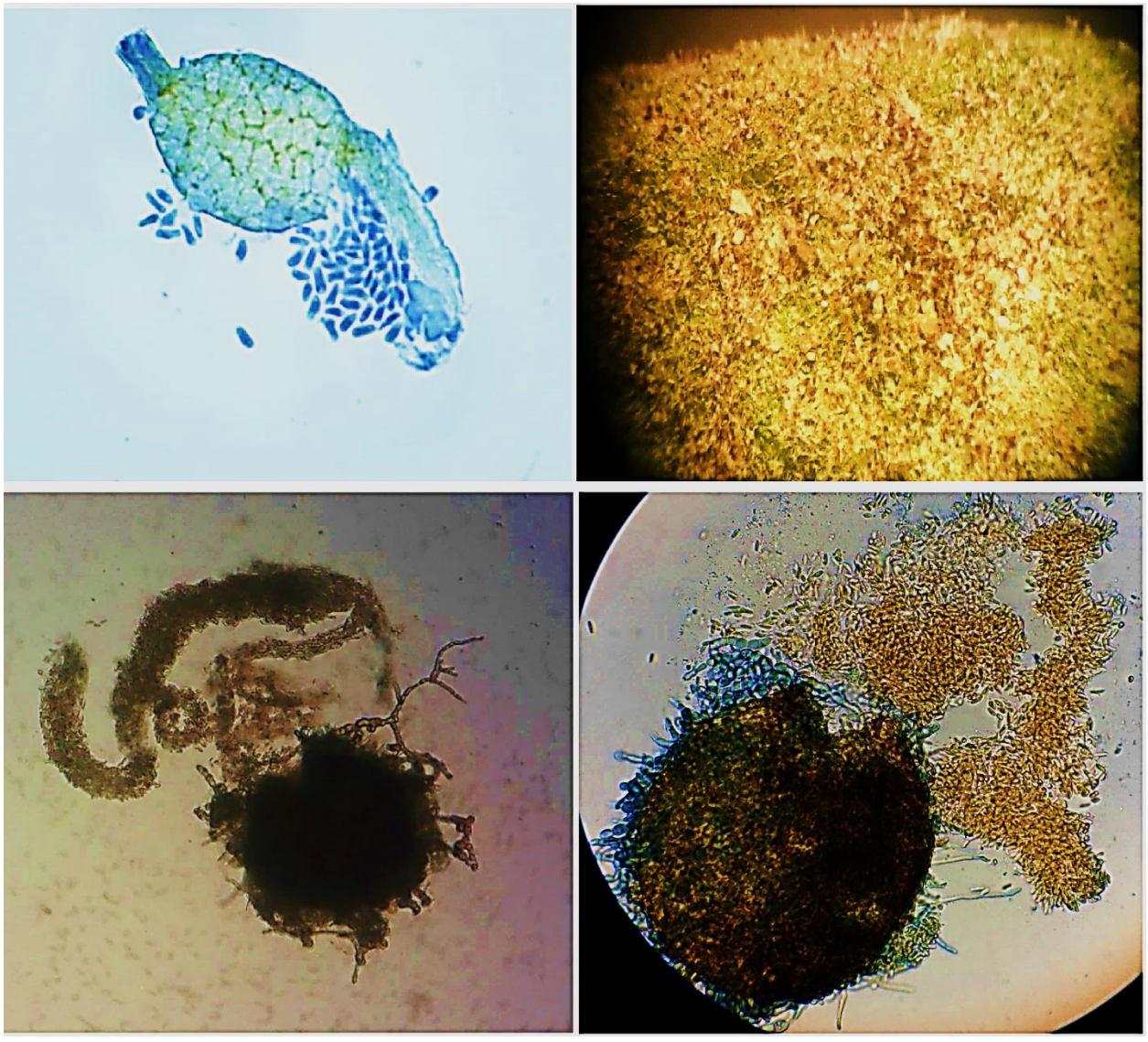
سُجل الفطر *A. quisqualis* على الفطر *G. neosalviae* المسبب للبياض الدقيقي على نبات الميرمية الشائع *S. officinalis* في المنطقة الجنوبية (دمشق) لأول مرة على مستوى الدراسة لهذا الفطر في سورية، ولم يسجل في الدراسات السابقة التي أجريت في سوريا من قبل Younes وآخرون (2016) وعلي وآخرون (2008)، أو حتى في الدراسات المماثلة على مستوى العالم (Lee *et al*., 2007; Liyanage *et al*., 2018). وقد وثق هذا التسجيل في نشرة علمية نتجت عن هذه الدراسة في المجلة العربية لوقاية النبات (Hamzeh *et al*., 2022).

4-2- العزل والتوصيف المورفولوجي Isolation and morphological characterization

4-2-1. خصائص الفطر *Ampelomyces* على عائله في الطبيعة Characteristics of *Ampelomyces* on natural host

أظهرت نتائج العزل من العينات الإيجابية أن جميع العزلات تعود للفطر *Ampelomyces* عند مقارنتها بالمراجع ذات الصلة (الشكل 9)، حيث أظهر الفحص المجهري أن البكنيدات المتشكلة على مستعمرات البياض الدقيقي المختلفة التي رُصِدت عليها هي تشكلات ثمريه بكنيدية تُحمل على سُويقات عندما تتشكل على حساب الحوامل البوغية أو الأبواغ الكونيدية التي اتخذت أشكالاً عدة تتراوح بين المغزلية والكمثرية والإهليلجية والبيضوية

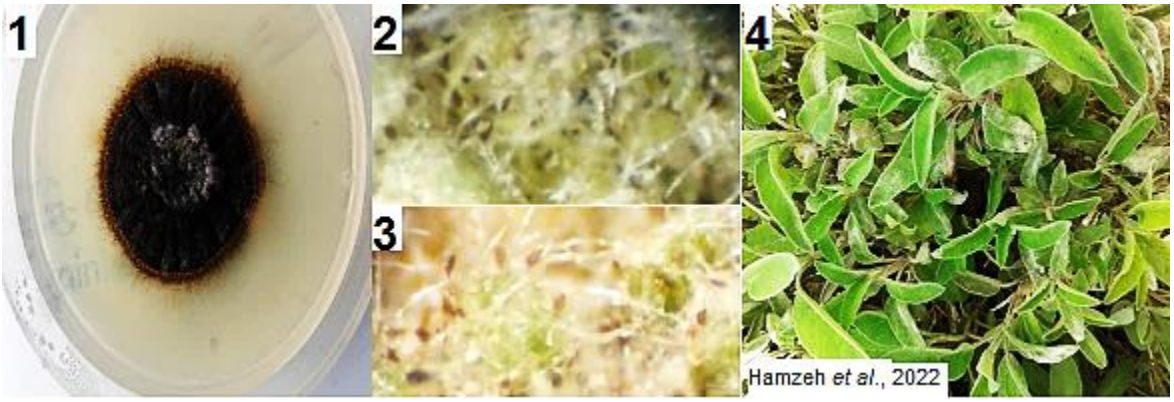
والكروية، تتدرج ألوانها من البني الفاتح في بداية تشكلها إلى البني والبني القاتم في طور النضج (الشكل 11). وهذا توافق مع ما وصفه (De'Bary, 1870; Kiss *et al*., 2004). وللتأكد من عدم الخلط بين الفطر الهدف (*Ampelomyces*) وبين الفطور الشبيهة به مثل *Phoma glomerata*، تم الاستعانة ببعض المراجع التي تحدد أهم الفروق بينهما، إذ بيَّن Kiss (2008) وGalper وآخرون (1985) أن وجود بكنيدات ذات سويقات (السويقات فعلياً هي بنى تعود للعائل تحوي بداخلها مشيجة الفطر المتطفل) تطوِر مستعمرات بمعدلات نمو بطيئة تميز فطور *Ampelomyces*، بينما تميز البكنيدات اللاطئة التي تنتج مستعمرات ذات معدل نمو أسرع الفطر *Phoma glomerata* (Boerema *et al*., 1965; White & Morgan, 1987) وقد أكد Sullivan & White (2000) هذا التمييز باختباراتهما على نوعي الفطرين المذكورين آنفاً، إذ تراوح معدل نمو مستعمرات الفطر *Ampelomyces* 0.8 ± 0.1 مم/يوم، بينما كان معدل نمو مستعمرات الفطر *Phoma glomerata* 8 ± 1 مم/يوم.



الشكل(9): بكنيدات وأبواغ الفطر الفائق التطفل *A. quisqualis* على البياض الدقيقي على المدادة *E. convolvuli* في موقعي البهلولية وقسمين من الساحل السوري عند الفحص المجهري وبعد العزل (التكبير×400) ما عدا العلوية اليمنى (×40) .

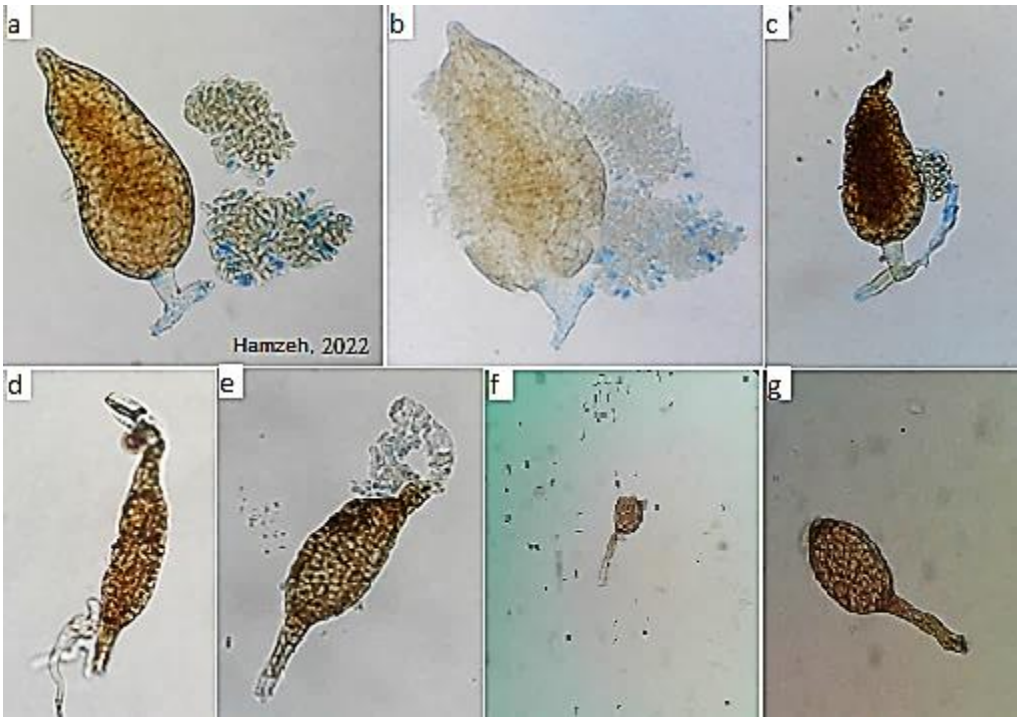
يظهر الشكل (10) بكنيدات العزلة S.ham82 على الفطر *G. neosalviae* المسبب للبياض الدقيقي على نبات الميرمية الشائع *S. officinalis*. كما بين الفحص المجهري أن الأبواغ البكنيدية التي تتحرر من داخل هذه التشكلات هي أبواغ منفصلة، وحيدة الخلية، شفافة المظهر، تأخذ بدورها أشكالاً عديدةً أيضاً تتراوح بين المتطاولة والبيضوية والكروية والدورقية والليمونية الشكل، وبعضها يكون منحنياً أو يأخذ شكل عصا البيسبول الشكل (11-a).

كان متوسط أبعاد البكنيدات في العزلة (S.ham82) (77.44 ± 17.16 x 25.28 ± 6.12, n = 20)µm، بينما متوسط أبعاد الأبواغ الكونيدية (8.11 ± 0.87 x 3.88 ± 0.51, n = 20)µm لنفس العزلة، وتوافقت هذه القياسات مع ما سجله Ranković (1997) فبلغت أبعاد البكنيدات والأبواغ الكونيدية (45 – 106 x 25.5 – 40.5)µm و(4.5 – 10.5 x 2.5 – 4.8)µm على الترتيب. فيما سجل متوسط أبعاد البكنيدات في العزلات الساحلية (61.17 ± 12.08 x 28.25 ± 7.45, n = 25)µm، ومتوسط أبعاد الأبواغ الكونيدية (6.85 ± 1.04 x 3.57 ± 0.63, n = 25)µm، وتوافقت هذه الأبعاد مع دراسة سابقة لعزلات من نفس المنطقة الجغرافية (G. Younes *et al.*, 2016)، إذ تراوحت أبعاد البكنيدات والأبواغ الكونيدية بين (42.54 – 83.64 x 28.68 – 25.12)µm و(5.88 – 8.83 x 3.85)µm على الترتيب، والقياسات المذكورة آنفاً مأخوذة من عينات على العائل الطبيعي (جدول 10).



الشكل(10): العزلة S.ham82 على الفطر *G. neosalviae* المسبب للبياض الدقيقي على الميرمية *S. officinalis*.

1) مستعمرة للعزلة S.ham82 على وسط PDA. 2) و3) بكنيدات العزلة S.ham82 على مستعمرات البياض الدقيقي على نبات الميرمية تحت عدسة المكبرة (التكبير×40). 4) أعراض الإصابة بالبياض الدقيقي من النوع *G. neosalviae* على نبات الميرمية *S. officinalis*



الشكل (11): الأشكال المختلفة لبكنيدات الفطر *Ampelomyces* sp. من العزلات المدروسة تبعاً للجزء المتطفَل عليه من فطور البياض الدقيقي. a) وb) وc) بكنيدات متشكلة في الحوامل البوغية conidiophore للعزلة S.ham82. d) بكنيدات متشكلة ضمن مشيجة العائل على العزلة S.ham82 e) وf) وg) بكنيدات تطورت داخل الأبواغ الكونيدية للعائل (العزلات Bah1 (e) وKR1 (f) وKis1 (g)). جميع الصور على درجة تكبير 400× عدا الصورة (b) تكبير 600×.

2-2-4. خصائص الفطر *Ampelomyces* على وسط الزرع Characteristics of *Ampelomyces* on culture Media

بدأت البكنيدات التي عُزلت على وسط الزرع PDA بالإنبات بعد 24 ساعة من الإلقاح، وبدأت مستعمراتها بتشكيل البكنيدات بعد مدة تراوحت بين 4–7 أيام وتوافق ذلك مع أبحاث سابقة (Németh *et al*., 2021).

أظهرت المستعمرات التي شكلتها عزلات الفطر *Ampelomyces* على وسط PDA بطبيعتها نمواً شعاعياً منتظم الحواف في بداية النمو، ثم يصبح قطاعياً مموجاً إلى غير منتظم الحواف مع التقدم في العمر في معظم العزلات. تراوحت ألوان المستعمرات بين تدرجات اللون البني إلى الأخضر والأخضر الزيتوني بشكل عام، كما تميزت مستعمرات الفطر بتشكيلها لميسيليوم مقسم، شفاف ولامع المظهر وتوافق ذلك مع ما ذكره Angeli (2012). وكان

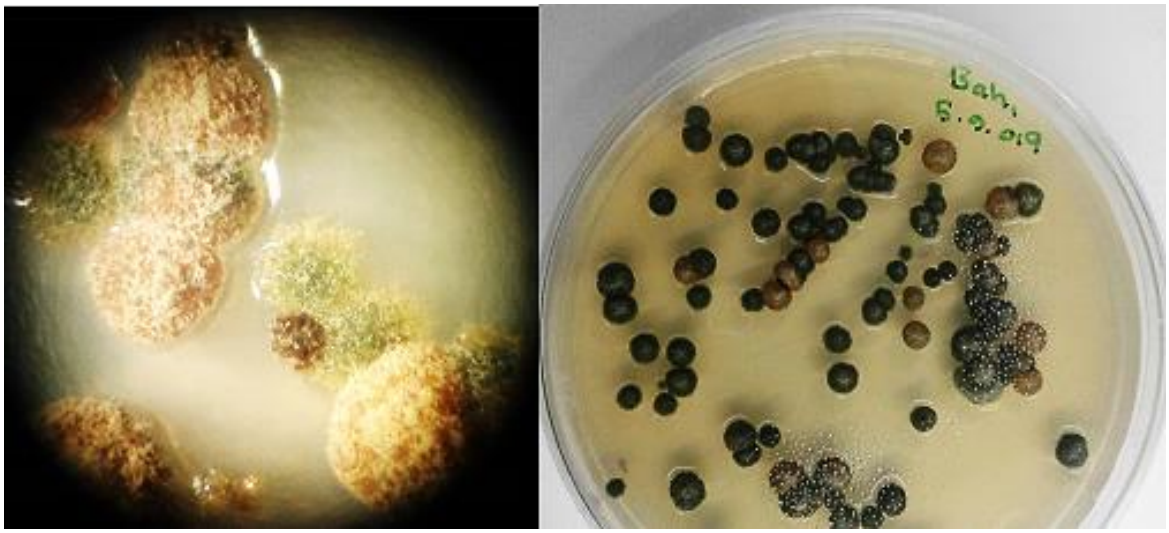
المعدل الوسطي لنمو كافة العزلات على وسط PDA يقارب 0.62 مم/يوم وتوافق ذلك مع دراسات سابقة (Kiss *et al*., 2004; Liang *et al*., 2007)، وهذا ما يدعو للتأكد من هوية الفطر إضافة للفحص المجهري، كما وتوافق معدل النمو المذكور مع المقياس (جيد) وفق تصنيف Mhaskar و Rao (1974) للعزلات التي درساها.

أظهرت العزلة Bah1 اختلافات في ألوان مستعمراتها متماثلة العمر (الشكل12) عندما نُميَت على الوسط PDA وتوافق ذلك مع دراسة سابقة (Mhaskar & Rao, 1974)، لذلك فُصِلت المستعمرات بناءً على ألوانها، وعُدَّت كل منها عزلة منفردة (الشكل13). وقسِّمت العزلة Bah1 نتيجةً لذلك إلى ستَّة أنماطٍ ظاهريةٍ 2Q، 3، S، W، II، III (جدول9).

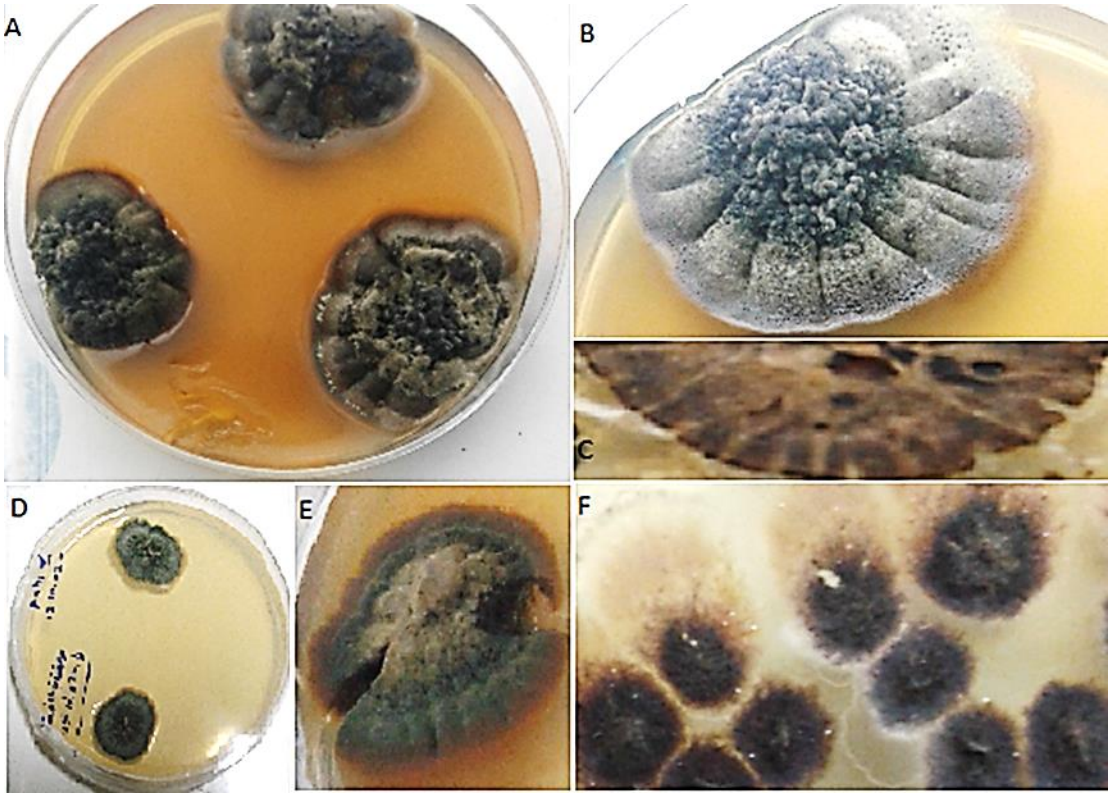
جدول (9): أنماط العزلة Bah1 وتوصيف مستعمرات هذه الأنماط حسب اللون (الشكل 13)

نمط العزلة Bah1	توصيف المستعمرة لونياً
2Q	أخضر عفني مع تدرجات رمادية خفيفة وحواف بنية اللون مع التقدم بالعمر (الشكل 13–A)
3	تدرجات رمادية مخضرة مع حواف متموجة رمادية مع التقدم بالعمر (الشكل 13–B)
S	أخضر فاتح مع حواف متموجة ذات لون بني فاتح إلى برتقالي مع التقدم في العمر وتلون أبيض باهت في مركز المستعمرة (الشكل 13–E)
W	أخضر مع حواف متموجة ذات لون أخضر غامق إلى بني مع التقدم في العمر وتلون أخضر غامق في مركز المستعمرة (الشكل 13–D)
II	بني غامق مع حواف غير منتظمة (الشكل 13–F)
III	مستعمرات بنية اللون مع حواف منتظمة (الشكل 13–C)

وقد توافقت توصيفات المستعمرات الشكلية مع دراسة سابقة أجريت على 10 عزلات من الفطر *Ampelomyces* المتطفل على البياض الدقيقي على نبات الباميا *Abelmoschus esculentus* (L.) Moench (Athira *et al*., 2017).



الشكل (12): التباينات المظهرية بين مستعمرات العزلة Bah1. (التكبير ×40) للصورة المجهرية.



الشكل(13): التباينات الشكلية اللونية لمستعمرات العزلة Bah1– *Ampelomyces* على وسط PDA. A) مستعمرات النمط 2Q، B) مستعمرة للنمط 3، C) مستعمرة للنمط III، D) مستعمرتان للنمط W، E) مستعمرة للنمط S، F) مستعمرات للنمط II.

اتخذت البكنيدات الناتجة على وسط الزرع في معظمها الشكل الكروي أو شبه الكروي، وسجل متوسط أبعادها على العزلة (S.ham82) µm(125.27 ± 42.34 x 115.95 ± 40.14, n = 25)، فيما بلغت في العزلات الساحلية µm(152.52 ± 89.27 x 132.13 ± 76.37, n = 25).

الجدول (10): الصفات المورفولوجية للعزلات الساحلية والجنوبية

الصفات المورفولوجية للعزلات الساحلية			
في الطبيعة		**على وسط** PDA	
البكنيدات	الأبواغ الكونيدية	البكنيدات	الأبواغ الكونيدية
61.17 ± 12.08 x 28.25 ± 7.45 µm n = 25	(6.85 ± 1.04 x 3.57 ±0.63) µm n = 25	(152.52 ± 89.27 x 132.13 ± 76.37) µm n = 25	(8.86 ± 1.65 x 3.18 ± 0.80) µm n = 25
المغزلية والكمثرية والإهليلجية والبيضوية والكروية، تتدرج ألوانها من البني الفاتح في بداية تشكلها إلى البني والبني القاتم في طور النضج	وحيدة الخلية منفردة وشفافة المظهر، وأخذت أشكالاً متطاولة ومنحنية وبيضوية ودورقية وشبه كروية إضافة إلى الشكل الليموني	اتخذت البكنيدات الناتجة على وسط الزرع في معظمها الشكل الكروي أو شبه الكروي	وحيدة الخلية منفردة وشفافة المظهر، وأخذت أشكالاً متطاولة ومنحنية وبيضوية ودورقية وشبه كروية إضافة إلى الشكل الليموني
الصفات المورفولوجية للعزلة الجنوبية (S.ham82)			
في الطبيعة		**على وسط** PDA	
البكنيدات	الأبواغ الكونيدية	البكنيدات	الأبواغ الكونيدية
(77.44 ± 17.16x 25.28 ± 6.12) µm n = 20	(8.11 ± 0.87 x 3.88 ± 0.51) µm n = 20	(125.27 ± 42.34 x 115.95 ± 40.14) µm n = 25	(8.86 ± 1.65 x 3.18 ± 0.80) µm n = 25
المغزلية والكمثرية والإهليلجية والبيضوية والكروية، تتدرج ألوانها من البني الفاتح في بداية تشكلها إلى البني والبني القاتم في طور النضج	وحيدة الخلية منفردة وشفافة المظهر، وأخذت أشكالاً متطاولة ومنحنية وبيضوية ودورقية وشبه كروية	اتخذت البكنيدات الناتجة على وسط الزرع في معظمها الشكل الكروي أو شبه الكروي	وحيدة الخلية منفردة وشفافة المظهر، وأخذت أشكالاً متطاولة ومنحنية وبيضوية ودورقية وشبه كروية

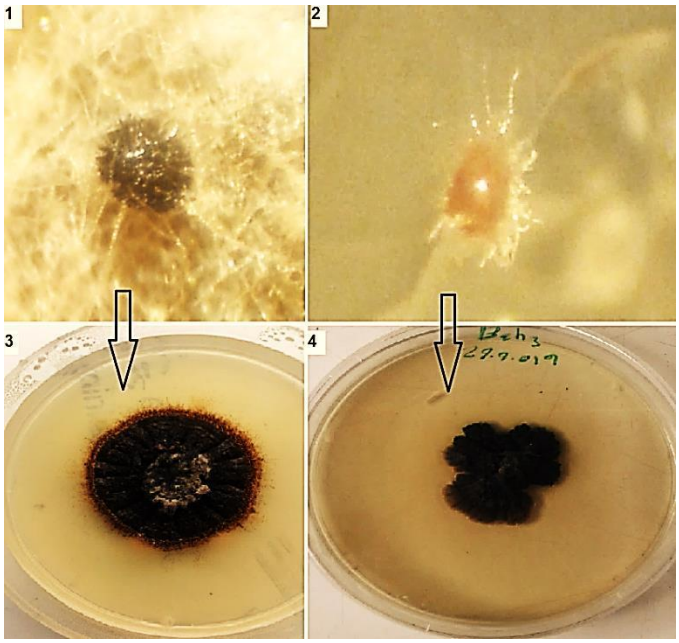
أما الأبواغ الكونيدية فقد كانت متشابهة شكلياً مع الأبواغ الناتجة عن البكنيدات المتشكلة على العائل الطبيعي في كونها وحيدة الخلية منفردة وشفافة المظهر، وأخذت أشكالاً متطاولة ومنحنية وبيضوية ودورقية وشبه كروية في العزلة S.ham82، وسجلت أبعاداً µm(8.86 ± 1.65 x 3.18 ± 0.80, n = 25)، بينما كانت في العزلات الساحلية شبيهة بسابقتها من حيث الشكل والبنية إضافة إلى الشكل الليموني، وسجلت متوسط أبعادٍ µm(8.75 ± 1.93 x

(3.3 ± 0.98, n = 25) (جدول 10)، وقد توافق التوصيف الشكلي الكروي وشبه الكروي للبكنيدات على وسط الزرع مع ما ذكره Mhaskar و Rao (1974) فيما سجلت الأبعاد قياساتٍ مختلفةً. وتوافقت توصيفات الأبواغ البكنيدية الشكلية مع العديد من الدراسات (Angeli *et al*., 2009; Athira *et al*., 2017; Kiss, 2008; Liang *et al*., 2007). فيما توافقت أبعاد هذه الأبواغ للعزلات المدروسة مع الدراسة التي أجرتها Athira (2017).

بعد الفصل الذي أجري للعزلة Bah1 نتيجة للتباينات الشكلية، أصبح مجموع العزلات التي ستدخل التحليل الجزيئي هو 10 عزلات:

جدول (11): رموز العزلات التي أُدخلت تحليل التتابع النكليوتيدي

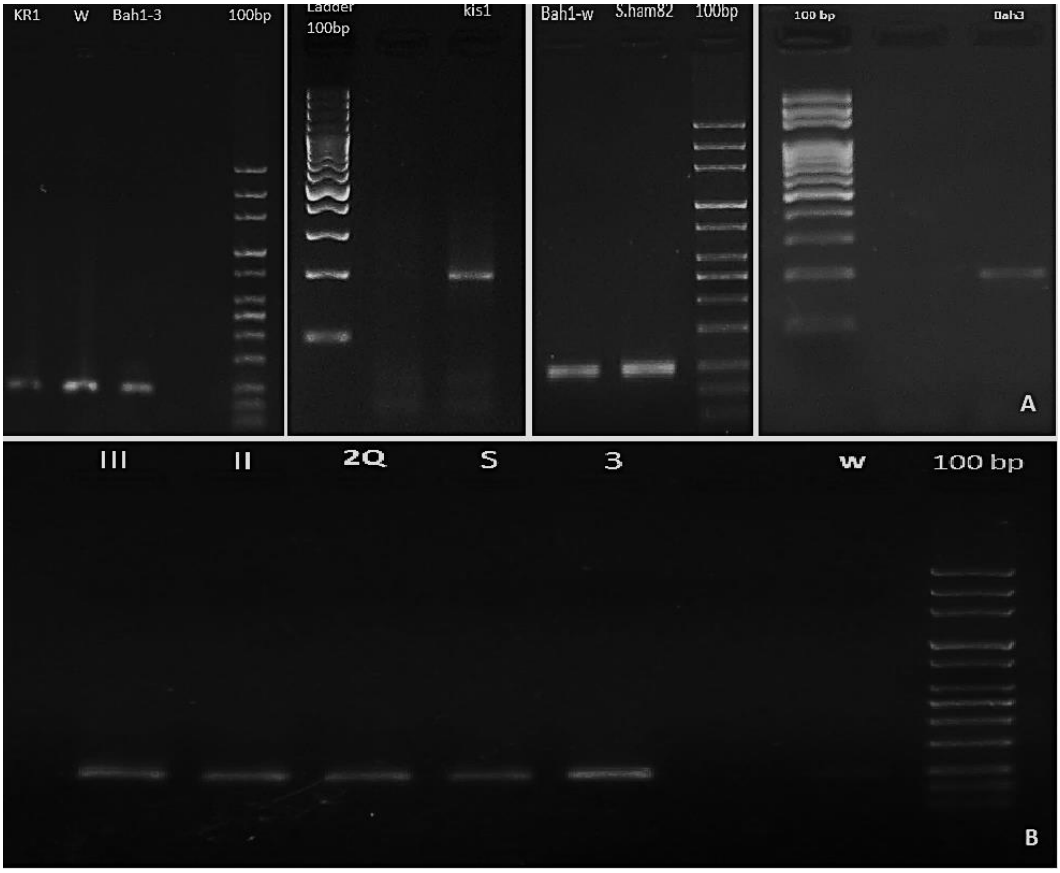
No.	Isolate code	No.	Isolate code	No.	Isolate code
1.	Bah1-2Q	4.	Bah1-W	**7.**	KR1
2.	Bah1-3	5.	Bah1-II	8.	S.ham82
3.	Bah1-S	6.	Bah1-III	9.	Bah3
				10.	Kis1



الشكل(14): عزلات وحيدة البكنيد للفطر *Ampelomyces*. 1) بكنيد وحيد من العزلة S.ham82 على وسط PDA (التكبير ×40). 2) بكنيد وحيد من العزلة Bah3 على العائل الطبيعي (التكبير ×40). 3) مستعمرة نقية للعزلة S.ham82 من بكنيد واحد. 4) مستعمرة نقية للعزلة Bah3 من بكنيد وحيد.

3-4- التعريف الجزيئي لعزلات الفطر (*Ampelomyces*): Molecular identification of *Ampelomyces* isolates

أظهر الرحلان الكهربائي لنواتج PCR المضخمة باستخدام البادئ المتخصص AQ-F264/AQ-R462 على هلامة آغاروز 1.5%، حزماً متطابقة بوزن جزيئي ≈200bp تتوافق مع الأوزان الجزيئية المتوقعة للقطع الناتجة في Primer BLAST، وكانت هذه الحزم ذات جودة فأعطت مؤشراً على إمكانية استخدام نواتج PCR في تحليل التتابع النيكليوتيدي Sequencing لاحقاً، ويبين الشكل (15) حزم نواتج PCR بعد عملية الرحلان الكهربائي للعزلات المدروسة.



الشكل(15): حزم بوزن 200bp لنواتج PCR الناتجة عن تضخيم منطقة nrDNA-ITS باستخدام البادئ المتخصص AQ-F264/AQ-R462 ومؤشر أوزان جزيئية 100bp، على هلامة آغاروز 1.5%. A) حزم نواتج PCR للعزلات المدروسة KR1، Kis1، S.ham82، Bah3 مقارنة بنمطين من العزلة Bah1 (W،3). B) حزم نواتج PCR لأنماط العزلة Bah1 المختلفة.

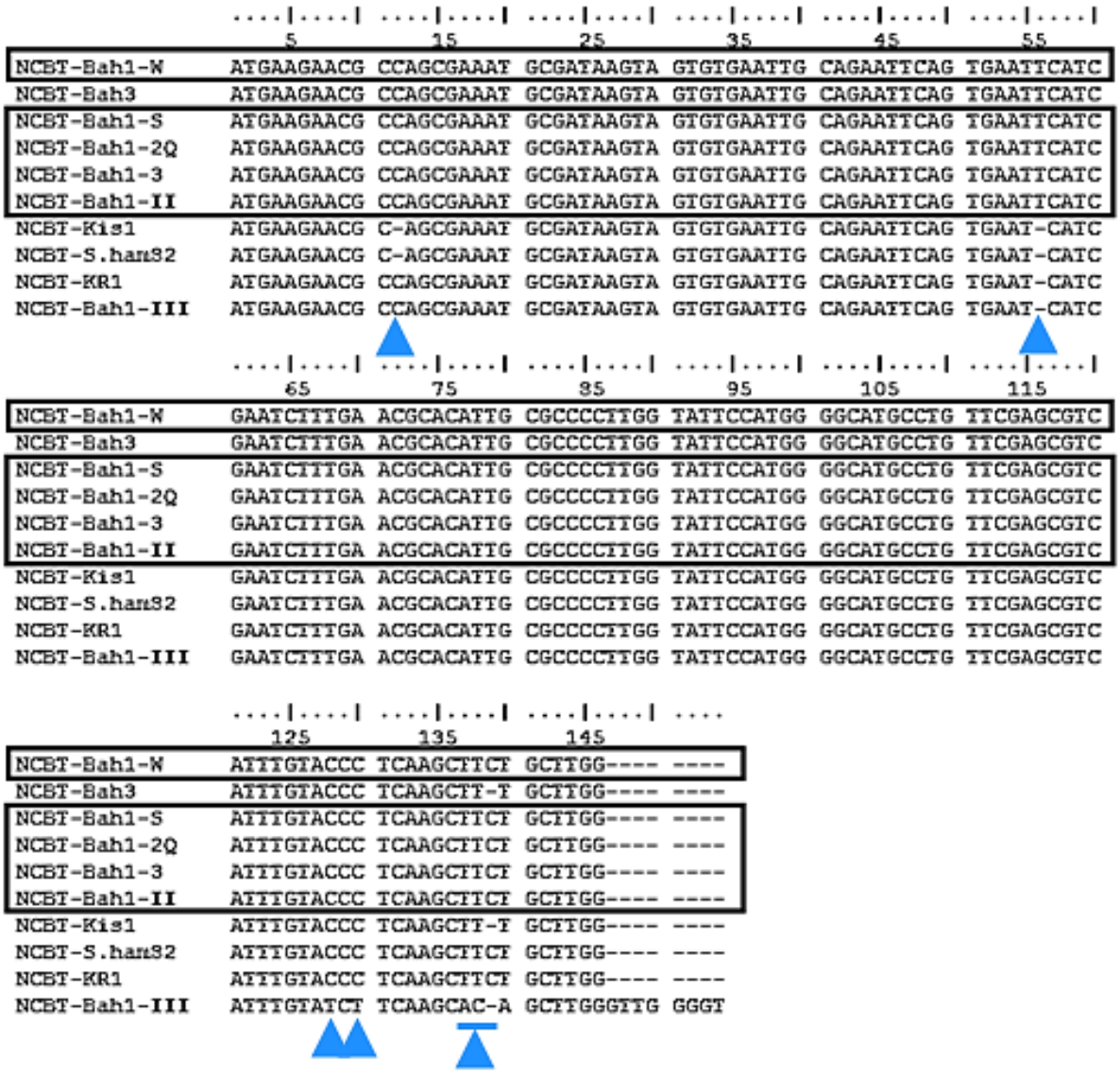
4-4- تحليل نتائج التتابع النكليوتيدي Sequence analysis

أجري تحليل التتابع النيكليوتيدي لمنتجات PCR التي ضُخمت بنجاح لعشرة عينات لتحديد القرابة الوراثية مع سلالات *Ampelomyces* باستخدام البادئ المتخصص (Revers orientation/AQ-R462) الذي يستهدف منطقتي 5.8S ribosomal RNA gene و Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2)، على اعتباره الأكثر تخصصاً، لأن البادئ (Forward/AQ-F264) يرتبط إلى منطقة ITS لأنواع أخرى من الفطريات. وبعد إصلاح مخطط كروماتوجرام باستخدام برنامجي BioEdit و ClustalX، أظهرت المحاذاة الكاملة Complete Alignment لأنماط العزلة Bah1 (II وS وW و2Q و3) المتباينة مورفولوجياً (الشكلين 12 و13 والجدول 9) تطابقاً تاماً في التتابع النكليوتيدي لهذه الأنماط، فيما انفرد النمط III بتسلسل نيكليوتيدي مختلف (الشكل 16) حيث بلغت نسب التطابق (Identity%) بين العزلة الجنوبية S.ham82 والعزلات الساحلية 98–99% وبنسبة أقل (96%) مع العزلة Bah1-III بينما كانت نسبة (Gaps%) بين 0–2%، وذلك في مقارنة أجريت بين التتابع النكليوتيدي للعزلة NCBT-S.ham82 (الجنوبية) المسجلة في هذه الدراسة لأول مرة على مستوى العائل والمنطقة الجغرافية، مع التتابعات النكليوتيدية للعزلات الأخرى (الساحلية) بوجود النوع *Epicoccum nigrum* باستخدام NCBI-BLAST (الجدول 12).

جدول (12): نتائج مقارنة التتابع النكليوتيدي للعزلة NCBT-S.ham82 (الجنوبية) مع العزلات الأخرى (الساحلية) بوجود النوع *Epicoccum nigrum* عبر برنامج NCBI-BLAST

Strand	Gaps %	Identities %	Expect E-value	Score	كود العزلة Isolate Code
Plus/Plus	0%	99%	3e-74	261	KR1
Plus/Plus	0%	99%	1e-73	259	Kis1
Plus/Plus	1%	99%	4e-73	257	Bah1-(W,S,3,2Q,II)
Plus/Plus	0%	99%	6e-72	254	OM236995*
Plus/Plus	2%	98%	7e-71	250	Bah3
Plus/Plus	1%	96%	7e-66	233	Bah1-III

* *Epicoccum nigrum*

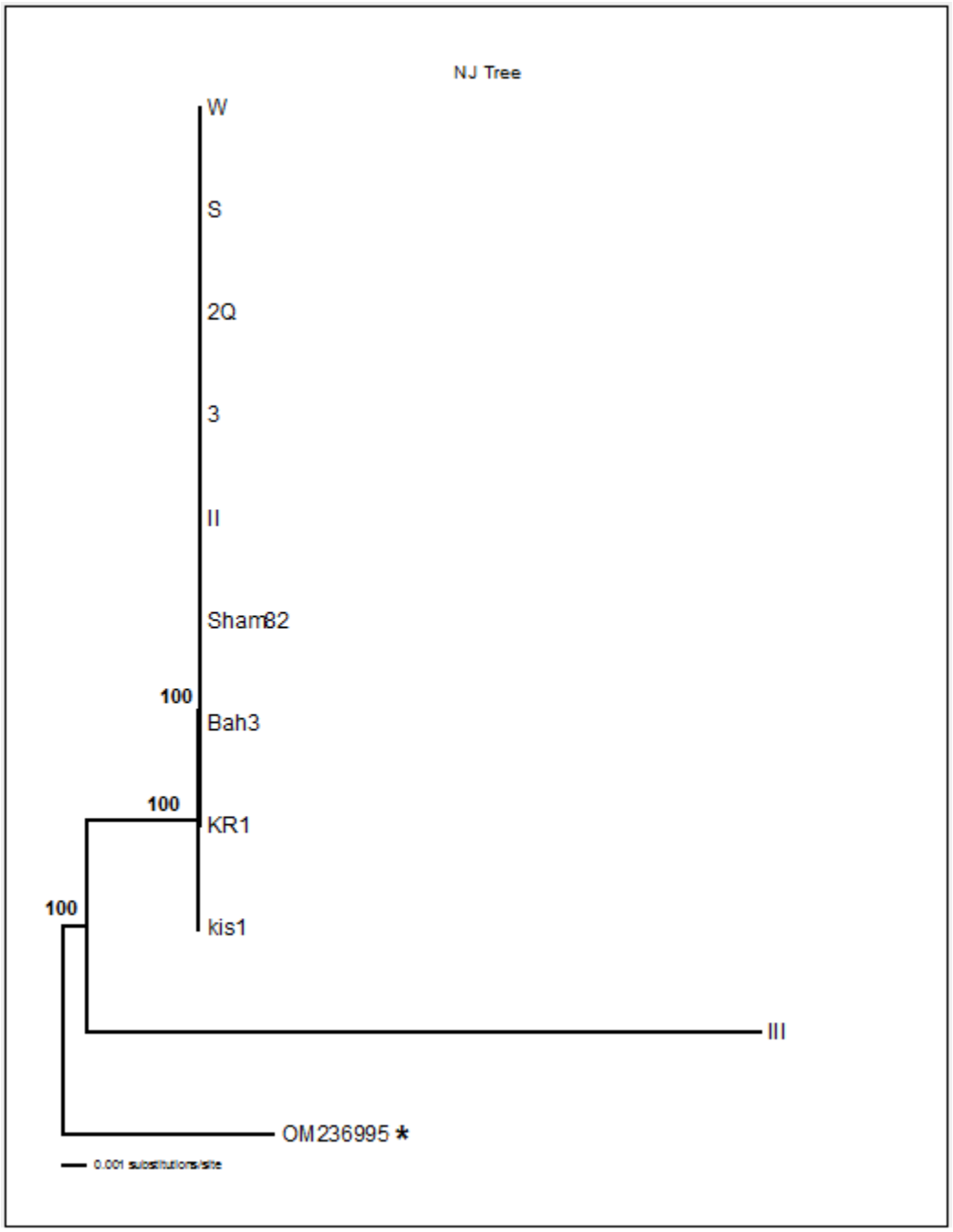


الشكل (16) المحاذاة المتعددة للتتابعات النكليوتيدية لعزلات الفطر *Ampelomyces* العشرة المختبرة كما أظهرها برنامجا ClustalX وBioEdit التي يظهر فيها التطابق التام بين الأنماط الخمس W وS وQ2 و3 وII (ضمن الصناديق السوداء) للعزلة Bah1.

▲ تشير الأسهم إلى مواقع الاختلافات في التسلسل النكليوتيدي.

رُسمت شجرة القرابة الوراثية للعزلات المختبرة بطريقة Neighbor joining باستخدام برنامج PAUP الشكل (17) ليتبين التطابق الوراثي في المنطقة المدروسة من ITS بين الأنماط الوراثية الخمسة المذكورة للعزلة Bah1 وقرابتها

الوراثية العالية مع باقي العزلات المدروسة، فيما عدا النمط Bah1-III الذي يبدو الأبعد وراثياً عن كافة العزلات والأنماط المدروسة.



الشكل (17): شجرة القرابة الوراثية للعزلات والأنماط العشرة التي رسمت بطريقة Neighbor joining باستخدام برنامج PAUP. تشير الأرقام على الفروع إلى قيم bootstrap (100 iteration). * مجموعة خارجية outgroup (*Epicoccum nigrum*).

دُمِجت التتابعات المتطابقة للأنماط الخمسة جميعاً كتسلسل واحد أطلق عليه Bah1-G1 واعتبرت عزلة واحدة لتسهيل الدراسة، فيما اعتبر النمط المختلف عزلة منفردة بذاتها أعطيت التسمية Bah1-III. قورنت السلاسل الناتجة مع نظيراتها في بنك المعلومات الوراثي عبر برنامج NCBI-BLAST وتبين أن العزلات موضوع الدراسة تعود للجنس *Ampelomyces*. أودعت التسلسلات النيكليوتيدية المصلحة في البنك الوراثي تحت أرقام دخول رسمية علماً أن التسلسلات المسجلة هي لسلاسل جزئية مفردة (DNA Linear, Partial Sequence) ويبين الجدول (13) رقم الدخول والكود الخاص بكل عزلة مع التسلسل النكليوتيدي.

الجدول (13): التتابع النكليوتيدي للعزلات المدروسة كما تم تسجيلها في البنك الوراثي GenBank مع رموز وأرقام الدخول الخاصة بكل منها تحت اسم الجنس *Ampelomyces* sp.

كود العزلة المسجلة في GenBank	رقم الدخول Accession No.	التتابع النكليوتيدي Sequence
NCBT-KR1	ON331777	ATGAAGAACGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTCG AGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTCTGCTTGG
NCBT-S.ham82	ON331778	ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTCG AGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTCTGCTTGG
NCBT-Bah3	ON331779	ATGAAGAACGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATT CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTC GAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGG
NCBT-Bah1-III	ON331780	ATGAAGAACGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTCG AGCGTCATTTGTATCTTCAAGCACAGCTTGGGTTGGGGT
NCBT-Kis1	ON331781	ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATC ATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTCG AGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGG
NCBT-Bah1-G1*	ON331782	ATGAAGAACGCCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATT CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCATGGGGCATGCCTGTTC GAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTCTGCTTGG

*أودعت الأنماط الخمسة (II و S و W و Q2 و 3) برقم وكود تعريفي واحد هو NCBT-Bah1-G1 (ON331782) نظراً للتطابق التام في تتابعاتها النيكليوتيدية

أجري تحليل المقارنة المتعدد Multiple Sequence Alignment باستخدام برنامج CLUSTALX كما جرى محاذاة جميع تسلسلات منطقة ITS الخاصة بالعزلات المدروسة بحجم 200bp≈ التي يستهدفها البادئ المذكور،

عن طريق ضبط المعلمة على مصفوفة الترجيح weight matrix "IUB-DNA" وضبط التكرار على "لتكرار كل خطوة محاذاة to iterate each alignment step ". حيث بينت المقارنة بين التتابعات النكليوتيدية للعزلات المدروسة، وبوجود النوع *Epicoccum nigrum* المستخدم كمجموعة خارجية (outgroup) في رسم شجرة القرابة الوراثية في هذه الدراسة وجود اختلافات بين هذه التتابعات (base substitutions and deletions) في المواقع 12 و56 و128 و130 و137 و138 و139 (الشكل 19). حيث تم اختيار النوع *Epicoccum nigrum* كمجموعة خارجية على اعتباره يشترك مع الفطر *Ampelomyces* في عدم وجود طور جنسي (telemorph) معروف له ولا يعرف له سوى الطور اللاجنسي (anamorph)، وعلى اعتباره ينتمي للجنس *Phoma* القريب تصنيفياً من الفطر *Ampelomyces* حيث يعد كلاهما متطفلات داخلية (Endophitic parasites) على البياض الدقيقي (Sullivan & White, 2000)، إضافة إلى أن للنوع *Epicoccum nigrum* استخدامات مشتركة كعامل حيوي في مجالات تحليل التتابع النكلييوتيدي لجزيء DNA والمورفولوجيا والفيزيولوجيا والتأشيب (Schol-Schwarz, 1959).

أظهرت المقارنة المتعددة (Multiple Sequence Alignment) لتسلسلات ITS المدخلة من GenBank مع العزلات المدروسة أن هذه العزلات تقترب من ثلاث سلالات محددة في GenBank بناءً على بحث NCBI-BLAST مع نسبة تطابق 98 ٪ على الأقل. حيث اقتربت العزلات الثلاث Bah1-G1 و KR1 و S.ham82 والتي أخذت تسلسلات ITS الخاصة بها أرقام الدخول ON331782 و ON331777 و ON331778 على الترتيب في GenBank، من العزلة التشيلية *Ampelomyces quisqualis* strain Chillan ذات الرقم التعريفي MH997723 في GenBank، والمعزولة من الفطر *Phyllactinia guttata* المسبب للبياض الدقيقي على البندق، وبنسبة تطابق بين تسلسلاتها 98% و98.62% و99.31% على الترتيب. بينما اقتربت العزلتان Bah3 و Kis1 واللتان أخذ تسلسلا ITS الخاصان بهما رقمي الدخول ON331779 و ON33178 على الترتيب في

GenBank، من العزلة الإيطالية *Ampelomyces* sp. LK-2012a strain Vitis9 ذات الرقم التعريفي JN417711 في GenBank، والمعزولة من الفطر *E. necator* المسبب للبياض الدقيقي على كرمة العنب، وبنسبتي تطابق بين تسلسليها 98.62% و100% على الترتيب. فيما انفردت العزلة Bah1-III والتي أخذ تسلسل ITS الخاص بها رقم الدخول ON331780 في GenBank، بقرابتها مع العزلة الإيطالية أيضاً *Ampelomyces* sp. LK-2012a strain Vitis69 ذات الرقم التعريفي JN417738 في GenBank، والمعزولة أيضاً من الفطر *E. necator* وبنسبة تطابق فيما بينهما 98.68% (الجدول 14).

جدول (14): العزلات المدروسة والعزلات المطابقة الناتجة عن برنامج NCBI- BLAST ومصادرها ونسبة التطابق بالإضافة لأرقام الدخول لكل منها في البنك الوراثي GenBank

رقم الدخول للسلالة المطابقة في البنك الوراثي	المطابقة%	نوع البياض الدقيقي المعزول منه	السلالات القريبة بحسب BLAST	العزلات المدروسة ورقم الدخول المُسجل (Accession number) في البنك الوراثي	
MH997723	98	powdery mildew on European hazelnut (*Phyllactinia guttata*), Chile	*Ampelomyces quisqualis* strain Chillan	NCBT-Bah1-G1, ON331782*	Bah1-II
	98				Bah1-s
	98				Bah1-w
	98				Bah1-2Q
	98				Bah1-3
	98.62			NCBT-KR1, ON331777*	
	99.31			NCBT-S.ham82, ON331778*	
JN417738	98.68	grapevine powdery mildew (*E. necator*), Italy	*Ampelomyces* sp. LK-2012a strain Vitis69	NCBT-Bah1-III, ON331780*	
JN417711	98.62	grapevine powdery mildew (*E. necator*), Italy	*Ampelomyces* sp. LK-2012a strain Vitis9	NCBT-Bah3, ON331779*	
JN417711	100	grapevine powdery mildew (*E. necator*), Italy	*Ampelomyces* sp. LK-2012a strain Vitis9	NCBT-Kis1, ON331781*	

* أرقام دخول Accession Number خاصة بعزلات الفطر *Ampelomyces* السورية المسجلة في البنك الوراثي GenBank في هذه الدراسة.

4-5- تحليل القرابة الوراثية Phylogenetic analysis

تم اختيار 174 سلسلة ITS تمثل 174 سلالة من GenBank بما فيها العزلات المدروسة استناداً إلى تحليل NCBI-BLAST. أظهر تحليل هذه التتابعات في برنامج PAUP باستخدام طريقة Maximum Parsimony وجود 171 نيكليوتيد ثابت constant من أصل 213 تمثل منطقة ITS المراد تحليلها، بينما كان عدد النيكليوتيدات المتغيرة 42 نيكليوتيد (17 parsimony-uninformative و25 parsimony-informative). كما نتج عن هذا التحليل (1447) شجرة، وباستخدام (computing consensus) للأشجار الناتجة عن البحث الاسترشادي (heuritic search) في برنامج PAUP، رُسِمت شجرة القرابة الوراثية على قاعدة توافق الأغلبية 50% (50% Majurity rule) كما هو مبين في الشكل (18). وكانت قيم مؤشرات CI = 0.98 و RI = 0.98 و RC = 0.96 و HI = 0.06 و طول الشجرة (tree length) = 78، وذلك وفق اختبار (Kishino & Hasegawa، 1989).

نتج عن تحليل Maximum Likelihood شجرتين، وكان متوسط طول الفرع في أفضلهما -lnL=702.435، كما أظهرت شجرة القرابة الوراثية التي رسمت بالاعتماد على نتائج أفضل شجرتين في كل من تحليلي Maximum Parsimony وMaximum Likelihood المُنفذَيْن في برنامج PAUP على قاعدة الأغلبية 50% (50% majrule consensus tree) أن السلالات المدخلة بما فيها العزلات المدروسة قد انتظمت في 4 عناقيد إضافة للمجموعة الخارجية (OM236995). ضم العنقود الأول (Clade I) 52 سلالة، 42 منها تنتمي الى مجموعة العزلات الكورية المعزولة من فطور الجنس *Podosphaera* في معظمها، و10 سلالات تعود لأنواع من فطور البياض الدقيقي المتطفلة على الفصيلة الوردية Rosaceae كما عرّفها Park (2010). تتطابق سلالات العنقود الأول بنسبة 97–100% للسلالات الـ 42 الكورية فيما بينها وبقيمة Bootstrap (100/100).

ضم العنقود الثاني (Clade II) كل من السلالتين AF126817 وAF126818 بنسبة تطابق (93.37%) وبقيم لـ Bootstrap (100/100)، وتعود هاتان السلالتان لمتطفلات على النوع *E. penicillata* معزولتان في الولايات المتحدة (Sullivan & White, 2000).

انضمت العزلات الست قيد الدراسة لهذا البحث إلى العنقود الثالث (Clade III). وانضمت العزلات Kis1 و Bah3 و Bah1-III بشكل صريح إلى مجموعتين من السلالات، ارتبطت العزلة Bah1-III ارتباطاً وثيقاً بالسلالتين JN417738 وHQ108035 بنسبة تطابق فيما بينها 98.68% وبقيمة داعمة لـ Bootstrap (100/100) مشكلة عنقوداً ثابتاً في كلتا الشجرتين المنفذتين وفق تحليلي Maximum Parsimony وMaximum Likelihood، وبالمثل كان للعزلتين Kis1 و Bah3 ارتباطٌ وثيقٌ ببعضهما بعضاً وبالسلالة JN417711 بنسبة تطابق فيما بينها 98.62 – 100% وبقيم Bootstrap (97/100). بينما أظهرت العزلات KR1 و S.ham82 و Bah1-G1 ارتباطاً مستقلاً ومنفرداً مشكلة تقارباً مع مجموعات أخرى بما نسميه بالفروع الأخوية Sister branch، وشكلت العزلة KR1 فرعاً أخوياً أولياً مستقلاً مع العنقود الثالث من الدرجة الأولى وشكلت العزلتان S.ham82 وBah1-G1 فروعاً مماثلة من الدرجة الثانية ما يعني أنهما أكثر تباعداً وراثياً من سابقتها بالمقارنة مع باقي سلالات المجموعة التي تنتمي إليها. شمل العنقود الثالث 3 تحت مجموعات (A وB وC). شملت تحت المجموعة A العزلتان Kis1 و Bah3 قيد الدراسة والسلالة JN417711، فيما ضمت تحت المجموعة B بدورها مجموعتين تضمنت الأولى سلالات كورية معزولة من عدة أنواع من الجنس *Erysiphe* والجنس *Golovinomyces*(Park *et al*., 2010)، فيما ضمت الثانية بمعظمها سلالات هنغارية معزولة من النوع *Arthrocladiella mougeotii* المتطفل على النوع النباتي *Lycium halimifolium* (Kiss *et al*., 2011)، إضافة إلى العزلة Bah1-III والسلالتين المرتبطتين بها بقرابة وثيقة: HQ108035 المعزولة من سويسرا (Angeli *et al*., 2012) ، والسلالة JN417738 المعزولة في إيطاليا من النوع *E. necator* (Pintye *et al*., 2012).

اما تحت المجموعة C، فقد ضمت مجموعة من السلالات الكورية المعزولة من الجنس *Golovinomyces*إضافة إلى مجموعة من السلالات الهندية المعزولة من أنواع مختلفة من فطور البياض الدقيقي المتطفلة على الورد والخيار والخردل وغيرها.

كما ضم العنقود الثالث مجموعة من الفروع الأخوية sister branch التي تنوعت بين سلالات تجارية مثل AF035783 (AQ10) و U82450 (Powder care, DSM 2222)، وسلالات صينية وأخرى تشيلية وإيطالية وأمريكية في إشارة لتباعدها الوراثي نسبياً عن المجموعات السابقة وتنوعها في عوائلها.

وضم العنقود الرابع والأخير (Clade IV) النوع *Peyronellaea* (=*Phoma*) *glomerata*، وهو أحد الأجناس القريبة جداً من الجنس *Ampelomyces* بالإضافة للسلالة KU986801 المعزولة كعينة بيئية في المغرب العربي من نبات القطلب *Arbutus unedo* (Hamim *et al*., 2017)، والعزلة MK304213 المعزولة كعينة من المحيط البيئي أيضاً لنبات *Ageratina adenophora* في الصين.

وبالنتيجة، خلصت دراسة القرابة الوراثية للعزلات قيد الدراسة إلى التالي:

- تنتمي العزلات Kis1 و Bah3 و Bah1-III إلى مجموعة ثابتة من السلالات (المذكورة أعلاه) حسب الدراسة الحالية ووفق المدخلات والبرامج المستخدمة.

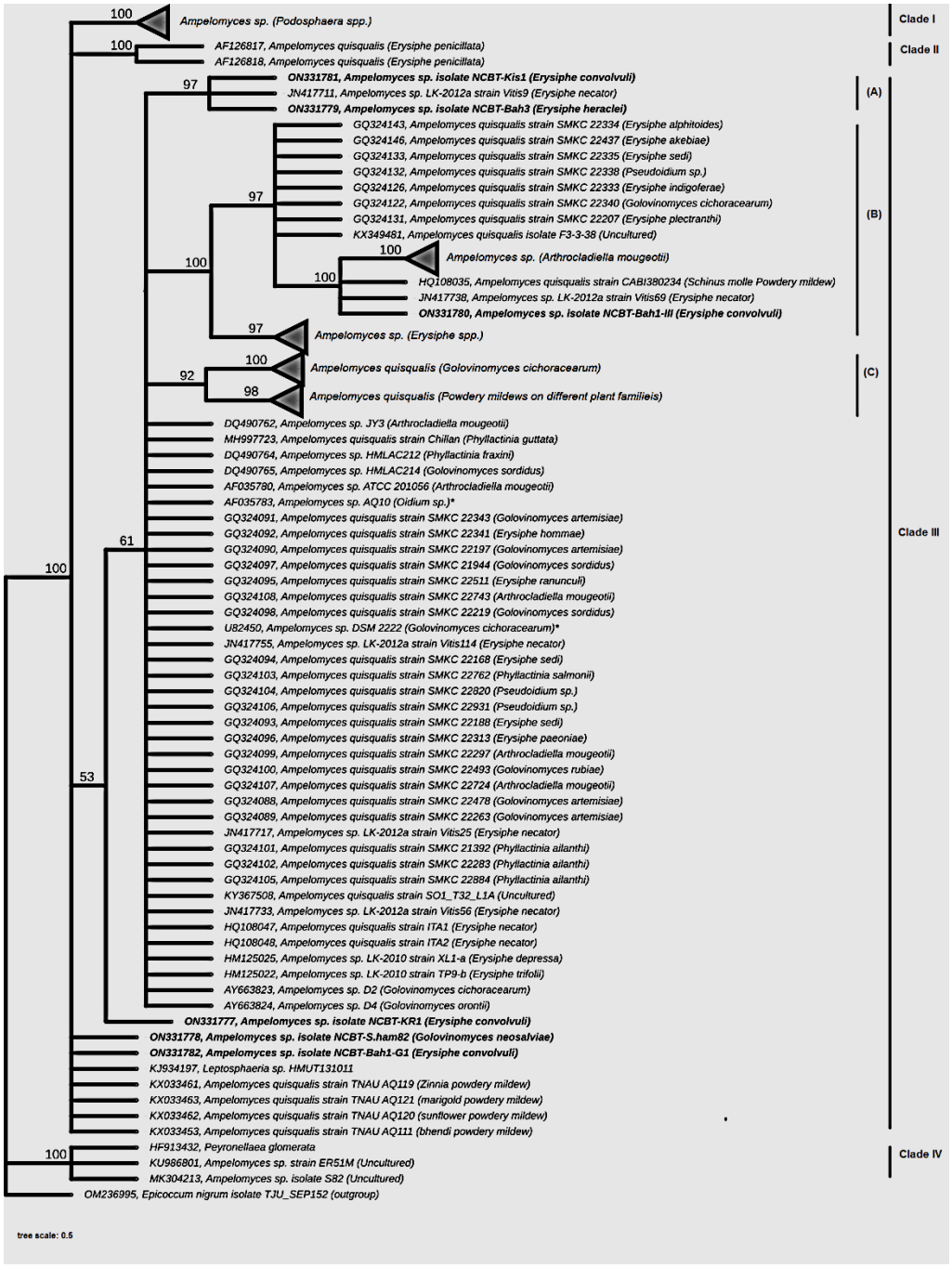
- تشكل العزلة KR1 بعداً وراثياً مستقلاً لمجموعة السلالات التي ارتبطت بها كفروع أخوية وكذلك شكلت العزلتان S.ham82 و Bah1-G1 بعداً وراثياً عن باقي السلالات من جهة وعن العزلة KR1 من جهة أخرى، وكانت العزلتان المذكورتان أكثر تقارباً فيما بينهما بحسب الشجرة التي رسمها تحليل MP، فيما أظهرت شجرة تحليل ML أن أطوال الفروع بين العزلات الثلاث كانت (0) في إشارة إلى تقاربها الوراثي الوثيق فيما بينها. يذكر أن

أداة البحث BLAST قد سجلت تقارباً للعزلات الثلاث السابقة مع السلالة التشيلية MH997723 والمعزولة من النوع *Phyllactinia guttata* المتطفل على نبات البندق الأوروبي *Corylus avellana*.

لقد أكدت جميع نتائج تحاليل القرابة الوراثية وشجرة القرابة الوراثية (الشكل 20) التي رُسمت استناداً إلى هذه التحاليل، القرابة الوراثية للعزلة Bah1-III مع السلالة *Ampelomyces* sp. LK-2012a strain Vitis69 والقرابة الوراثية للعزلتين Bah3 و Kis1 مع السلالة *Ampelomyces* sp. LK-2012a strain Vitis9. استناداً إلى هذه النتائج وبالعودة إلى التباين المظهري لمستعمرات عزلات *Ampelomyces* المدروسة على وسط PDA لابد من مناقشة هذه الاستقراءات من خلال حالة العزلة Bah1. حيث أُشير سابقاً أن هذه العزلة هي مؤلفة من 6 أنماط مظهرية هي 2Q، 3، S، W، II، III وتبين أن الأنماط الخمسة الأولى (أي باستثناء النمط III) متطابقة تماماً في التتابع النيكليوتيدي مما جعل من الضروري دمجها في عزلة واحدة أطلقنا عليها التسمية Bah1-G1 بينما كان للنمط السادس (III) تسلسل نيكليوتيدي مختلف تماماً عن نظرائه في نفس العزلة وجعل من الضروري فصله كعزلة مستقلة أطلقنا عليها التسمية Bah1-III. الجدير بالذكر أن الأنماط الستة المذكورة آنفاً عزلت من ورقة واحدة من نفس العينة النباتية وهي نبات المدادة المصاب بالبياض الدقيقي من النوع *E. convolvuli* وهذا ما يكسب الأمر أهميته من خلال مقارنة هذه البيانات والاستقراءات مع دراسة مهمة أجراها Angeli (2012) حول وجود أشكال فيزيولوجية مختلفة ضمن سلالات متنوعة وراثياً في الفطر *A. quisqualis* من خلال عدة نتائج توصل إليها في دراسته وهي:

1. في اقتباس النقطة الأولى يقول الباحث "تختلف أنواع *A. quisqualis* المعزولة من مناطق جغرافية مختلفة مورفولوجياً على مستوى المشيجة (mycelium) بينما لا يوجد هذا الاختلاف على مستوى البكنيدات (pycnidia) والأبواغ الكونيدية (conidia)". وهذا لا يتوافق حقيقة مع النتائج التي توصلنا إليها في هذه الدراسة من حيث أن الأنماط المختلفة مورفولوجياً التي ظهرت في العزلة Bah1 هي في الحقيقة أنماط تعود لعزلة وجدت في نفس العينة النباتية وعلى نفس العائل الفطري وفي نفس المنطقة الجغرافية والظروف البيئية.

شجرة القرابة الوراثية على قاعدة توافق الأغلبية 50% (50% Majority rule consensus tree) **حسب تحليل** Maximum Parsimony



الشكل (18): شجرة القرابة الوراثية على قاعدة (50% MajRule consensus tree) الناتجة عن 1447 شجرة وفق تحليل Maximum Parsimony باستخدام برنامج PAUP * 4.0a16 والتي تم ترميزها بواسطة برنامج iTOL . تمثل الأوراق Leaves المعلمة بالخط العريض الغامق عزلات الدراسة الحالية مع أرقام الدخول الخاصة بكل منها في GenBank وتمثل الأنواع بين قوسين فطور البياض الدقيقي العائل للسلالة(ات) المرافقة، كما تشير علامة * إلى سلالات تجارية مستخدمة كمبيدات حيوية. تبين الأرقام الواقعة فوق الفروع قيمة (Bootstrap value) التي تدعم أشجار القرابة الناتجة عن تحليل Maximum Parsimony.

الشجرة مجذرة الى النوع *Epiccocum nigrum*. تشير المثلثات في نهايات الفروع الى سلالات متطفلة على جنس محدد من البياض الدقيقي.

إضافة إلى أن الشكل الليموني لأبواغ الفطر *A. quisqualis* الكونيدية في العزلات الساحلية لم يلحظ في العزلة S.ham82 من المنطقة الجنوبية المختلفة جغرافياً.

2. وفي النقطة الثانية يقول الباحث أيضاً "أثرت درجات الحرارة بشكل كبير على نمو مستعمرات عزلات مختلفة من الفطر *A. quisqualis* في المختبر، وكان معدل نموها مرتبطاً ارتباطاً وثيقاً بلون هذه المستعمرات". وتخالف نتائج دراستنا الحالية هذه النتائج حيث ظهرت الاختلافات اللونية على هذه المستعمرات بالرغم من ثبات درجة الحرارة التي نُميت عليها في المختبر.

وبالإشارة إلى الارتباط الوثيق بين بعض العزلات الساحلية (KR1 و Bah1-G1) والمعزولة من البياض الدقيقي على المدادة *E. convolvuli* من جهة ، والعزلة الجنوبية S.ham82 المعزولة من البياض الدقيقي على الميرمية *G. neosalviae* من جهة ثانية في شجرة القرابة الوراثية نرى أن هناك توافقاً مع ما ذكرته الدراسة التي قامت بها Pintye وآخرون (2012) والتي تؤكد فيها أنه لا يوجد ما يثبت أن هناك علاقة وثيقة للفطر المتطفل *Ampelomyces* بنوع محدد من العوائل الفطرية حيث أكدت هذه الدراسة المرجعية أن النوع *E. necator* المسبب للبياض الدقيقي على العنب قد هوجم من سلالات متباعدة وراثياً من الفطر *A. quisqualis*. كما لا يوجد علاقة وثيقة تربط الفطر المذكور مع المنطقة الجغرافية التي عُزل منها وهذا توافق مع دراسة سابقة (Liang *et al.*, 2007) مع وجود استثناء لهذه الحالة في البياض الدقيقي على التفاح (Szentiványi *et al.*, 2005).

والنتيجة التي تم الوصول إليها من هذه القراءات هي أنه لا يوجد علاقة مباشرة بين التباينات الظاهرية التي تبديها مستعمرات *Ampelomyces* sp. على وسط الزرع PDA وبين الأصل الوراثي لهذه المستعمرات. لذا لا يمكن الاعتماد على البيانات المتعلقة بالاختلافات الظاهرية المزرعية للحصول على معلومات كافية عن طبيعة العزلة التي

في متناول أيدينا، وبالتالي لا يمكن تعريف هوية العزلة على مستوى النوع أو ما دون ذلك بدقة من خلال هذه البيانات.

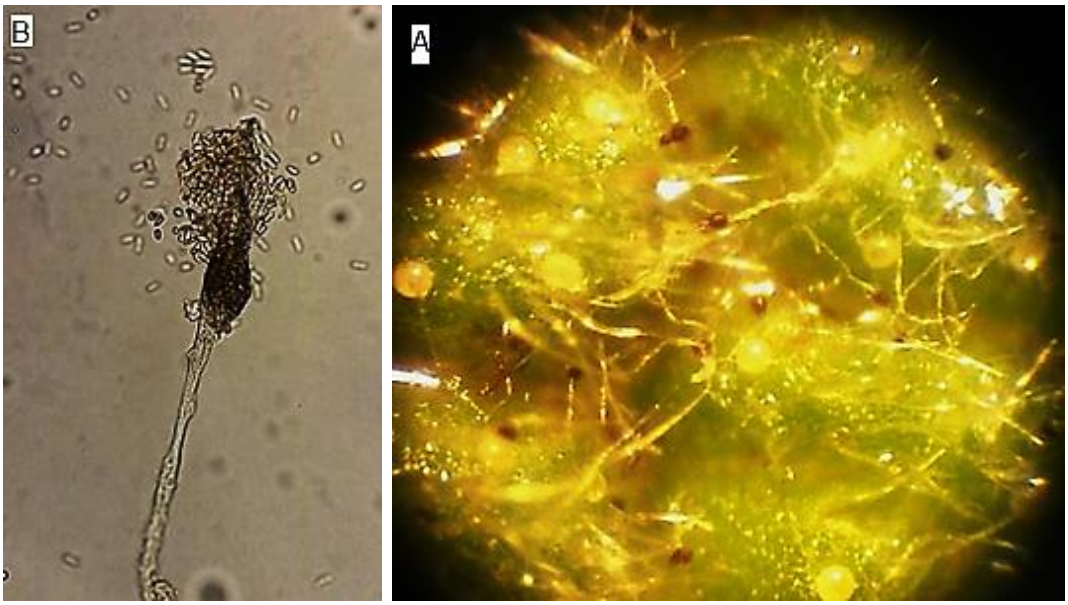
4-6- العدوى الاصطناعية وتقييم كفاءة العزلات المدروسة Artificial inoculation and efficiency evaluation of experimented isolates

بالاستناد إلى الدراسة الوراثية الآنفة اختيرت العزلتان S.ham82 و Bah1-G1 لمقارنة كفاءة التطفل فيما بينهما على عدة عوائل من فطور البياض الدقيقي، باعتبار أن كل منهما قد انتظم في فروع منفردة ومتباعدة وراثياً عن باقي العزلات من جهة وبالأخذ بعين الاعتبار الشروط البيئية المختلفة التي وجدت فيها هاتان العزلتان من جهة أخرى، حيث اعتُمدت العزلة Bah1-G1 كممثل عن عزلات المنطقة الساحلية والعزلة S.ham82 كممثل عن عينة المنطقة الجنوبية. نُحيت العزلات Kis1 و Bah3 و Bah1-III عن دراسة اختبارات الكفاءة استناداً إلى قرابتها الوثيقة بعزلات مدروسة مسبقاً، ولم يُشَر إلى دورٍ تطفلي مميزٍ لها على فطور البياض الدقيقي (Angeli *et al.*, 2012; Angeli *et al.*, 2009; Pintye *et al.*, 2012).

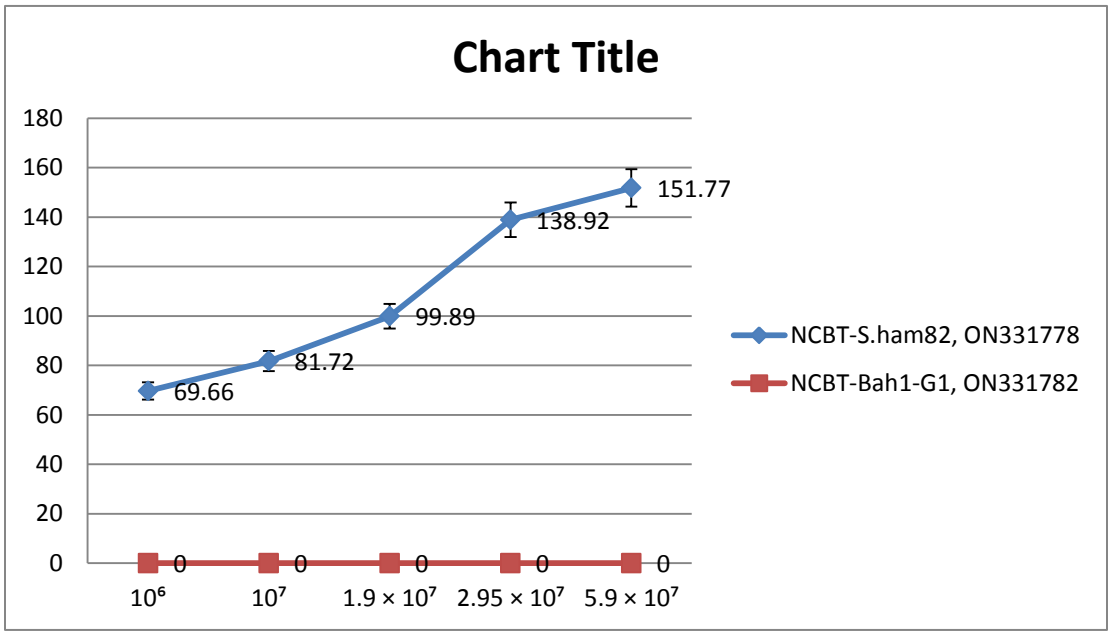
قُيِّمَت نتائج العدوى الاصطناعية بالعزلات المدروسة على أنواع الفطور الثلاثة المختبرة وفقاً للعائل النباتي كما يلي:

4-6-1. على البياض الدقيقي المتطفل على نبات الميرمية *S. officinalis*

أظهرت العدوى الاصطناعية بالعزلة S.ham82 على البياض الدقيقي المتطفل على نبات الميرمية كفاءة في تطور البكنيدات على الفطر *G. neosalviae* حيث بلغت أعلى شدة إصابة في عدد البكنيدات المتشكلة على مسطح مستعمرات البياض الدقيقي 153 بكنيد/سم^2 عند التلقيح بتركيز 5.9×10^7 بوغة/مل وبعد 11 يوماً من العدوى بينما كانت أقل شدة إصابة 69.33 و 79.54 بكنيد/سم^2 عند الإلقاح بتركيزي 10^6 و10^7 بوغة/مل وبعد 19 يوماً من العدوى. فيما لم تظهر أي إصابة عند العدوى بالعزلة Bah1-G1.



الشكل (19): A) بكنيدات المتطفل الفطري منتشرة على مستعمرات البياض الدقيقي على الميرمية *G. neosalviae* بعد العدوى الاصطناعية (×40). B) بكنيد معزول من المتطفل الفطري بعد العدوى الاصطناعية (التكبير ×400)

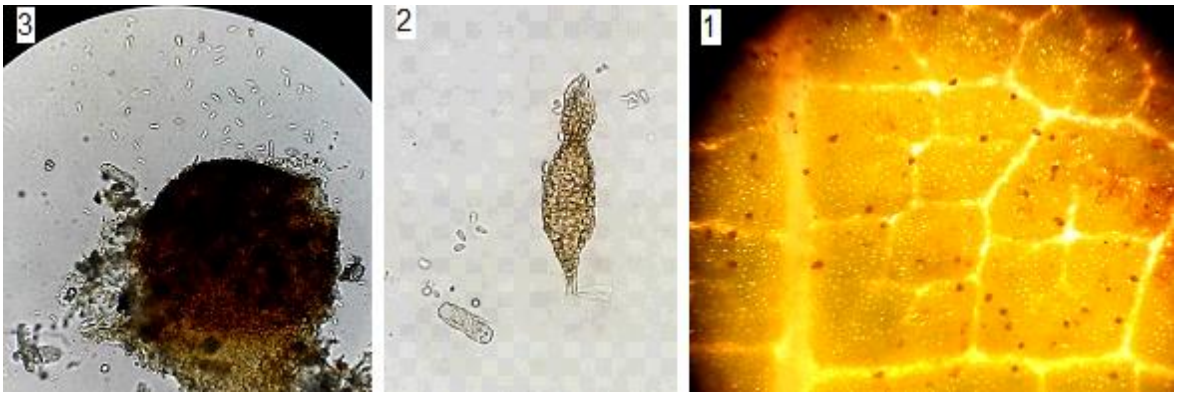


الشكل (20): مخطط بياني يمثل شدة الإصابة بالعزلتين S.ham82 و Bah1-G1 على الفطر *G. neosalviae*.

4-6-2. على البياض الدقيقي المتطفل على الكرمة *V. venifera*

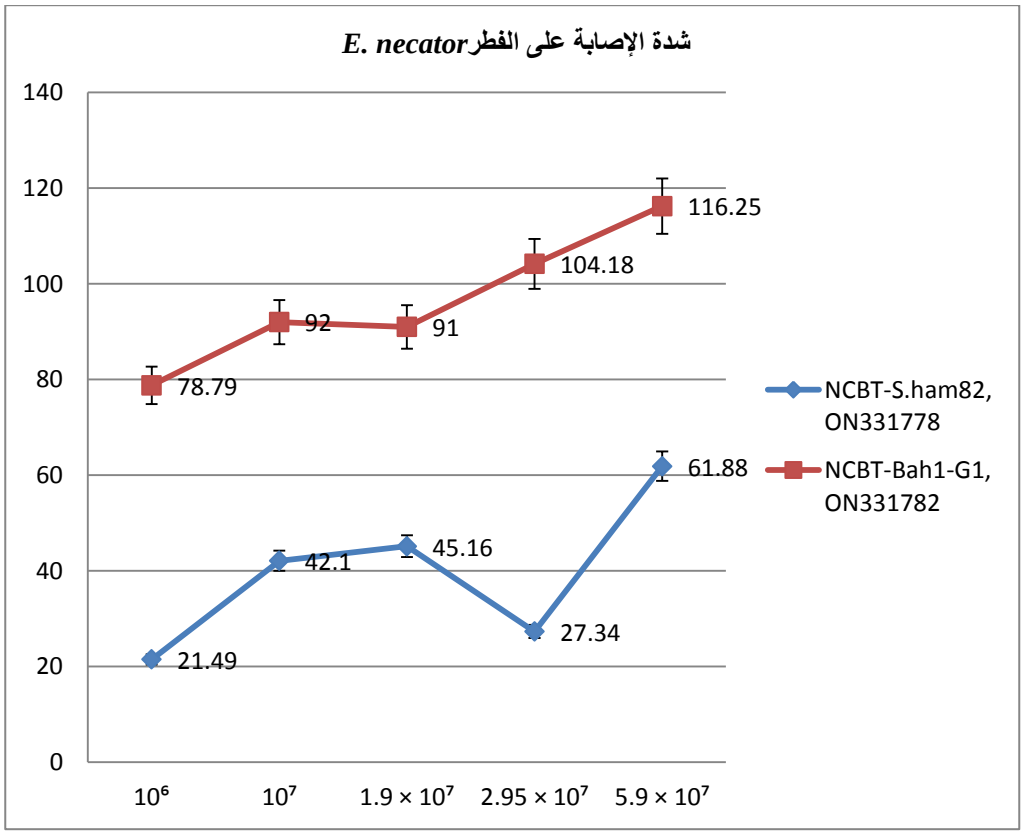
أظهرت نتائج العدوى الاصطناعية في هذه الدراسة على البياض الدقيقي على الكرمة *E. necator* إصابته بالعزلة S.ham82 ، و مُيّز هذا النشاط التطفلي عند الكشف عن الأجسام الثمرية cleistothecia للفطر المذكور، حيث كان واضحاً امتلاؤها بالأبواغ الكونيدية العائدة للفطر المتطفل (الشكل23)، وخلو محتواها من البنية المميزة للثمرة الزقية للفطر *E. necator* إضافة إلى البكنيدات التي انتشرت في مناطق العدوى الاصطناعية. ومن الجدير بالذكر أن المعاملة بالعزلة المذكورة وبالمجال المذكور لتراكيز المعلقات البوغية قد أظهر تشكلاً طفيفاً للأوعية البكنيدية على مستعمرات البياض الدقيقي، وبلغت أعلى شدة إصابة 63.22 بكنيد/سم^2 عند الإلقاح بالتركيز 5.9×10^7 بوغة/مل، وكانت أقل قيمة لشدة الإصابة عند التركيز 10^6 بوغة/مل هي 17.83 بكنيد/سم^2، بينما بلغت أعلى قيمة لمتوسط شدة الإصابة 61.88 بكنيد/سم^2 عند الإلقاح بالتركيز 5.9×10^7 بوغة/مل.

كما أظهرت العزلة Bah1-G1 بالمقابل نتيجة إيجابية في النشاط التطفلي على الفطر *E. necator* وذلك في مجال التراكيز المستخدمة. وبلغت أعلى شدة إصابة 132 بكنيد/سم^{2}عند المعاملة بالتركيز 5.9×10^7 بوغة/مل، و كانت أقلها 56.88 بكنيد/سم^2 عند الالقاح بالتركيز 10^6 بوغة/مل وكان أعلى متوسط شدة إصابة 116.25 بكنيد/سم^2 عند الإلقاح بالتركيز 5.9×10^7 بوغة/مل.



الشكل(21) نتائج العدوى الاصطناعية بالعزلتين S.ham82 و Bah1-G1 على كرمة العنب.

1) بكنيدات العزلة Bah1-G1 تغطي مساحة من مستعمرات البياض الدقيقي على الكرمة *E. necator*. (التكبير ×40) 2) بكنيد معزول من مستعمرات البياض الدقيقي على كرمة العنب بعد العدوى بالعزلة Bah1-G1 . 3) ثمرة زقية Clestothecia للفطر *E. necator* مصابة وقد خرجت منها أبواغ المتطفل الفطري (S.ham82) *Ampelomyces*. (التكبير ×400)



الشكل (22) مخطط بياني يمثل شدة الإصابة بالعزلتين S.ham82 و Bah1-G1 على الفطر *E. necator*.

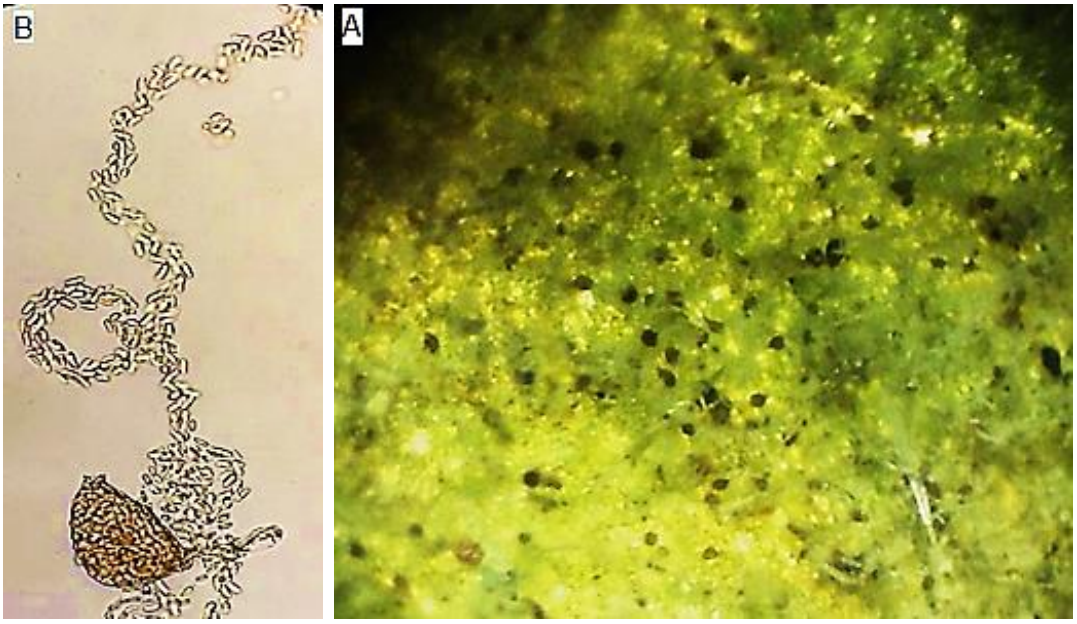
4-6-3. على البياض الدقيقي المتطفل على اليقطين (القرعيات) *C. maxima*

حققت المعاملة بالتركيز 5.6×10^7 بوغة/مل أعلى نتيجة في إحداث الإصابة بالعزلة – *Ampelomyces* S.ham82 على مستعمرات الفطر *E. cichoracerum* في ظروف العدوى الاصطناعية بطريقة الورقة المفصولة، وسجلت المعاملة بهذا التركيز شدة إصابة بلغت 240 بكنيد/سم^2 بينما سجلت المعاملة بالتركيزين 10^6 و10^7 بوغة/مل أدنى شدة إصابة (0) بكنيد/سم^2 وذلك بعد 10 أيام من العدوى. أما أعلى متوسط شدة إصابة فكان 187.5 بكنيد/سم^2 وذلك عند الإلقاح بالتركيز 5.6×10^7 بوغة/مل (جدول 15).

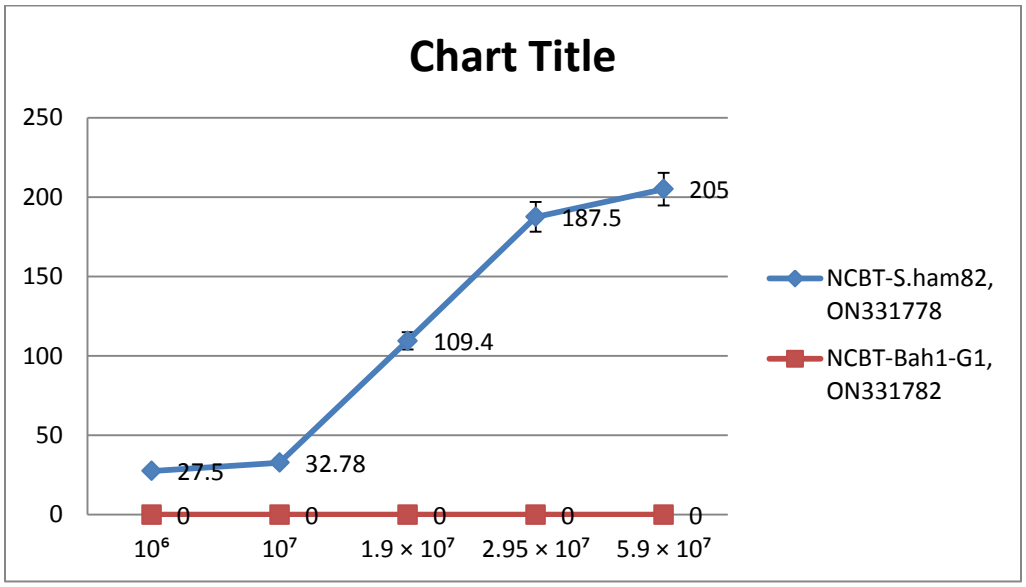
جدول (15): نتائج العدوى الاصطناعية بالعزلتين S.ham82 وBah1-G1 على أنواع البياض الدقيقي المتخصصة على الميرمية والكرمة واليقطين (القرعيات) عند 5 مستويات من تراكيز المعلقات البوغية.

العوامل المؤثرة						
التراكيز	متوسط شدة الإصابة على الفطر *G. neosalviae* بكنيد/سم^2		متوسط شدة الإصابة على الفطر *E. cichorasearum* بكنيد/سم^2		متوسط شدة الإصابة على الفطر *E. necator* بكنيد/سم^2	
	S.ham82	Bah1-G1	S.ham82	Bah1-G1	S.ham82	Bah1-G1
10^6	69.66	0	27.5	0	21.49	78.79
10^7	81.72	0	32.78	0	42.1	92
1.9×10^7	99.89	0	109.4	0	45.16	91
2.95×10^7	138.92	0	187.5	0	27.34	104.18
5.9×10^7	151.77	0	205	0	61.88	116.25

وقد توافقت نتائج شدة الإصابة مع دراسة أجراها Németh (2021) قام فيها بمعاملة العزلات التي درسها على الفطور المسببة للبياض الدقيقي على البندورة والبطيخ والبرسيم الأحمر والفريز مخبرياً. كما أظهرت نتائج يونس وآخرون (2009) للانتشار الطبيعي للفطر *A. quisqualis* على فطور البياض الدقيقي في الساحل السوري أن أعلى شدة إصابة سجلها الفطر المذكور على الفطر *E. cichoracearum* المسبب للبياض الدقيقي على نبات العضيد *Urospermum picroides* كانت 1100 بكنيد/سم^2 وبنسبة إصابة 80%، بينما كانت أدنى شدة إصابة قد سجلت (بكنيداً واحداً/سم^2) وبنسبة إصابة 0% على الفطر *Oidium amaranthi* على نبات *Amaranthus retroflexus*. في حين سجل Kiss (1998) في دراسة أخرى أجريت في هنغاريا ورومانيا على ما يقارب 570 عينة مثلت 27 نوعاً تعود لـ 9 أجناس من فطور البياض الدقيقي Erysiphaceae المتطفلة على 41 جنساً نباتياً، أن شدة الإصابة (intensity of mycoparasitism) بالفطر *Ampelomyces* تراوحت بين 0.15 – 65%. فيما لا يتوفر بيانات عن اختبارات عدوى اصطناعية في وقت سابق لعزلات محلية.



الشكل(23): نتائج العدوى الاصطناعية بالعزلة *Ampelomyces*-S.ham82 على البياض الدقيقي على اليقطين *E. cichoracearum*. A) بكنيدات تغطي مساحة من مستعمرات الفطر *E. cichoracearum*. (التكبير×40). B) بكنيد معزول من مستعمرات البياض الدقيقي على ورقة اليقطين (التكبير×400).



الشكل (24) مخطط بياني يمثل شدة الإصابة بالعزلتين S.ham82 و Bah1-G1 على الفطر *E. cichoracearum*.

قيمت شدة الإصابة بالعزلتين S.ham82 و Bah1-G1 حسب مقياس شدة الإصابة المذكور في الجدول (6) كما وصفت Tollenaere (2014). ويبين الجدول (16) نتائج هذا التقييم بناء على المساحة المغطاة ببكنيدات العزلات المدروسة على مستعمرات البياض الدقيقي.

عند المعاملة بالعزلة S.ham82 أظهر التركيز الأول 10^6 بوغة/مل تأثيراً متوسطاً لشدة الإصابة (Moderate) على فطر *G. neosalviae* بينما كان التأثير محدوداً (Few) على الفطرين *E. necator* و *E.cichorasearum*. كما أظهر التركيز 10^7 بوغة/مل تأثيراً شديداً (Many) على فطر *G. neosalviae* وتأثيراً محدوداً للإصابة (Few) على فطري *E.cichorasearum* و *E. necator*. فيما أبدت التراكيز الثلاثة المتبقية (1.9×10^7 و2.95×10^7 و5.9×10^7) بوغة/مل تأثيراً شديداً (Many) على فطري *G. neosalviae* و*E.cichorasearum* ومحدوداً (Few) على الفطر *E. necator* عند المعاملة بالتركيزين 1.9×10^7 و2.95×10^7 بوغة/مل، أما التركيز الأخير 5.9×10^7 بوغة/مل فقد أظهر تقييماً متوسطاً (Moderate) على الفطر الأخير.

أما تأثير العزلة Bah1-G1 فقد كان معدوماً على فطري *G. neosalviae* و*E.cichorasearum* (None) وذو تأثير شديد (Many) على الفطر *E. necator* عند كافة مجالات التراكيز المستخدمة.

وكان Németh (2021) قد أجرى دراسة على 8 عزلات يابانية من الفطر *Ampelomyces* أظهر من خلالها أن كل من عزلاته المدروسة قد تفاوتت في شدة إصابتها على 5 أنواع من فطور البياض الدقيقي وتدرجت إصابتها من 0 إلى > 100 بكنيد وذلك بعد 14 يوم من الإلقاح، حيث حققت كل عزلة إصابات مختلفة الشدة على 4 أنواع من البياض الدقيقي (*Pseudoidium neolycopersici, E. trifoliorum, Podosphaera aphanis, P. xanthii*) فيما لم تحدث أي من العزلات الثمانية إصابة على النوع *Blumeria graminis* f. sp.*hordei*.

جدول (16): تقييم كفاءة العزلتين المدروستين على الأنواع الثلاثة لفطور البياض الدقيقي المختبرة حسب مقياس شدة الإصابة

التراكيز	العزلات	العزلة S.ham82			العزلة Bah1		
	الفطور المعاملة	*G. neosalviae*	*E.cichorasearum*	*E. necator*	*G. neosalviae*	*E.cichorasearum*	*E. necator*
	10^6	moderate	Few	few	none	none	Many
	10^7	many	Few	few	none	none	Many
	1.9×10^7	many	Many	few	none	none	Many
	2.95×10^7	many	Many	few	none	none	Many
	5.9×10^7	many	Many	moderate	none	none	Many

ويظهر بالمجمل التركيز الأخير 5.9×10^7 بوغة/مل تأثيراً متفوقاً عند المعاملة بالعزلة الجنوبية S.ham82 على الفطور الثلاثة المدروسة الأمر الذي يجعله التركيز المنصوح به للمعاملة على مستوى الدراسة المخبرية الحالية. أما بالنسبة للعزلة الساحلية فقد أظهرت تراكيز معلقاتها الخمسة تأثيراً متفوقاً على الفطر *E. necator* علماً أنه لم يكن لها أي تأثير يذكر على الفطرين الآخرين المدروسين. هذا بالإضافة إلى الزيادة المطّردة الملحوظة لشدة

الإصابة ممثلة بعدد البكنيدات في وحدة المساحة بالتوازي مع كل زيادة في تراكيز المعلقات البوغية المستخدمة دون ملاحظة أي رد فعل تثبيطي لزيادة التركيز كما هو معلوم في دراسات سابقة (Gu & Ko, 1997) وذلك على مستوى هذه الدراسة.

4-7- نتائج التحليل الإحصائي Results of statistical analysis

اعتُمِد في استخلاص نتائج التحليل الإحصائي على مقارنة بيانات العوامل المؤثرة في شدة الإصابة Intensity كل على حدة، ومن ثم نتائج التفاعل بين جميع هذه العوامل مجتمعة.

4-7-1. مقارنة التراكيز Concentrations comparison

أظهر اختباري أقل فرق معنوي (LSD) و اختبار دنكن (Duncan) بين تراكيز المعلقات البوغية المطبقة والمرمّزة تصاعدياً من($C1=10^6$) إلى ($C5=5.9x10^7$)، أنه لا توجد فروق معنوية بين التركيزين C1 وC2 (P value=0.276) وكذلك الأمر بين التركيزين C2 وC3 (P value=0.044)، أيضاً بين التركيزين C3 وC4 (P value=0.021) وكذلك لم يكن هناك فروق معنوية بين التركيزين C4 وC5 (P value=0.105) من حيث التأثير في شدة الإصابة Intensity (جدول 17)، حيث كانت قيم الاحتمالية P value <0.01 في جميع المقارنات المذكورة، بينما كانت الفروق معنوية (P value <0.01) عند باقي المقارنات الثنائية بين التراكيز المذكورة، فتراوحت قيمة (P value) بين 0 و 0.003 وذلك عند مستوى معنوية 0.01.

والنتيجة الإجمالية بحسب الاختبارات السابقة وتحليل Univariate Tests أنه يوجد فروق معنوية بين التراكيز المستخدمة من حيث التأثير في شدة الإصابة (P value=0) إحصائياً وذلك عند مستوى معنوية 0.01 (جدول 18).

جدول (17): اختبار دونكن Duncan لمقارنة الاختلافات في متوسطات التراكيز

Intensity

	Conc	N	Subset			
			1	2	3	4
Duncan[a,b]	C1	12	32.9075[a]			
	C2	12	41.4342[ab]	41.4342[ab]		
	C3	12		57.5750[bc]	57.5750[bc]	
	C4	12			76.3250[cd]	76.3250[cd]
	C5	12				89.1508[d]
	Sig.		.276	.044	.021	.105

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
Based on observed means.
The error term is Mean Square(Error) = 354.042.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 12.000.
b. Alpha = .01.

جدول (18): نتيجة اختبار مقارنة تأثير التراكيز المستخدمة في شدة الإصابة باستخدام تحليل Univariate Tests

Univariate Tests

Dependent Variable: Intensity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	26393.895	4	6598.474	18.638	.000
Error	10621.251	30	354.042		

The F tests the effect of Conc. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

4-7-2. مقارنة العزلات Isolates comparison

أظهر جدول المقارنة المزدوجة Pairwise Comparisons وجدول اختبار Univariate Tests بين العزلات المدروسة أيضاً (جدول 19) فروقاً معنوية (P value=0) عند مستوى معنوية 0.01 من حيث التأثير في شدة الإصابة. والنتيجة أن لنوع العزلة المستخدمة تأثيراً معنوياً في شدة الإصابة Intensity وذلك عند مستوى الدلالة المذكور.

جدول (19): نتيجة اختبار مقارنة تأثير العزلات المستخدمة في شدة الإصابة باستخدام تحليل Univariate Tests

Univariate Tests

Dependent Variable: Intensity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	44816.281	1	44816.281	126.585	.000
Error	10621.251	30	354.042		

The F tests the effect of Isolate. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

4-7-3. مقارنة العائل الفطري Mycohost comparison

أظهر جدول المقارنة المزدوجة Pairwise Comparisons وجدول اختبار Univariate Tests بين الأنواع الفطرية العائلة المختبرة (جدول 20) أن الفروق لم تكن معنوية بين أنواع الفطور الثلاثة المختبرة *G. neosalviae* و *E. necator* و *E. cichorasearum* من حيث التأثر بشدة الإصابة، إذ كانت قيم P value = 0.737 و0.057 و0.027 كلها أكبر من مستوى الدلالة 0.01 وذلك في جميع المقارنات ويؤكد اختبار دنكن هذه النتيجة فبلغت قيمة الاحتمالية (P value=0.035) وكذلك اختبار LSD الذي أفرز نتائج مطابقة لجدول المقارنة المزدوجة.

جدول (20): نتيجة اختبار مقارنة تأثير العائل الفطري المستخدم في شدة الإصابة باستخدام تحليل Univariate Tests

Univariate Tests

Dependent Variable: Intensity

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Contrast	2229.264	2	1114.632	3.148	.057
Error	10621.251	30	354.042		

The F tests the effect of FunHost. This test is based on the linearly independent pairwise comparisons among the estimated marginal means.

والنتيجة أن شدة الإصابة intensity لا ترتبط بنوع الفطر المدروس والدلالة غير معنوية إحصائياً عند مستوى 0.01.

4-7-4. تأثير التفاعل بين العوامل Tests of Between-Subjects Effects

يوضح جدول مقارنة تأثير تفاعل العوامل المؤثرة في شدة الإصابة Tests of Between-Subjects Effects أن التفاعل بين جميع العوامل فيما بينها (نوع العزلة، التركيز، تفاعل العزلة والتركيز، تفاعل العزلة والعائل الفطري، تفاعل التركيز والعائل الفطري، تفاعل العوامل السابقة فيما بينها مجتمعة) قد أثر بالنتيجة معنوياً في شدة الإصابة، ومن جهة أخرى لم يشكل تفاعل عامل العائل الفطري لوحده تأثيراً معنوياً في شدة الإصابة (Pvalue=0.057)، مما يعني أن تأثير عزلات الفطر *Ampelomyces* المدروسة في شدة الإصابة غير مرتبط بالعائل الفطري الذي تهاجمه، وهذا يدعم التوجه السائد بأن هذا الفطر غير متخصص على نوع محدد من العوائل الفطرية، وأن اختلاف تأثيره لا يعدو كونه نوعاً من التفضيل العوائلي ليس إلا (جدول 21). وتوافق هذا مع نتائج عديد من الدراسات السابقة (Pintye *et al*., 2012).

جدول (21) مقارنة تأثير تفاعل العوامل المدروسة في شدة الإصابة

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Intensity

Source	Type III Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	209734.685[a]	29	7232.231	20.428	.000
Intercept	212261.518	1	212261.518	599.538	.000
Isolate	44816.281	1	44816.281	126.585	.000
Conc	26393.895	4	6598.474	18.638	.000
FunHost	2229.264	2	1114.632	3.148	.057
Isolate * Conc	17256.348	4	4314.087	12.185	.000
Isolate * FunHost	93301.635	2	46650.817	131.766	.000
Conc * FunHost	9549.274	8	1193.659	3.372	.007
Isolate * Conc * FunHost	16187.987	8	2023.498	5.715	.000
Error	10621.251	30	354.042		
Total	432617.454	60			
Corrected Total	220355.936	59			

a. R Squared = .952 (Adjusted R Squared = .905)

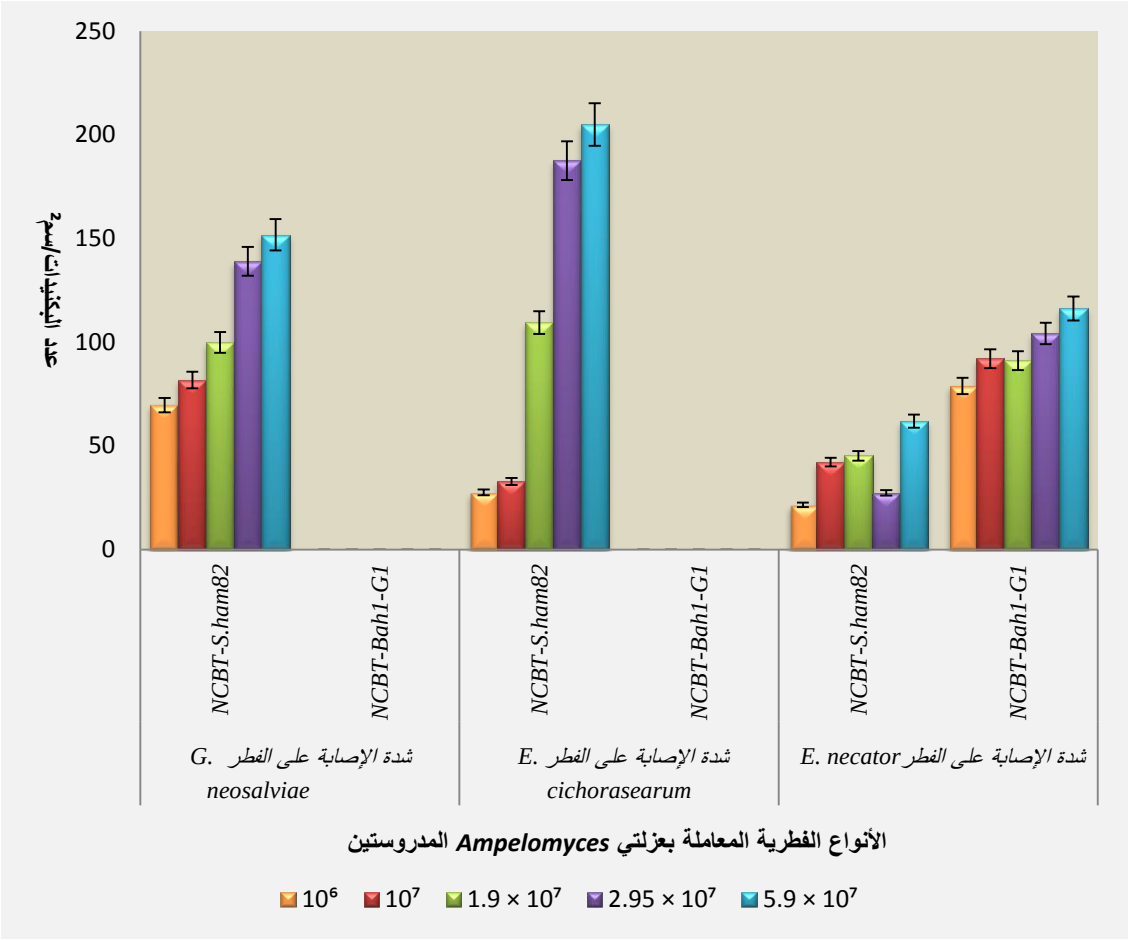
Isolate: العزلة، Conc: التركيز، FunHost: العائل الفطري، Intensity: شدة الإصابة

تشير علامة * إلى التفاعل بين العوامل المؤثرة في شدة الإصابة

يبين المخطط البياني في الشكل (27) تفاعل العوامل المؤثرة فيما بينها لناحية التأثير في عامل شدة الإصابة Intensity عند مستوى معنوية 0.01 . كما يبين الشكل الفروق غير المعنوية بين أنواع الفطور الثلاثة

المعاملة *G. neosalviae* و *E. cichoracearum* و *E. necator* عند المعاملة بالتراكيز المختلفة المطبقة من المعلقات البوغية للعزلتيين S.ham82 و Bah1-G1.

تشير النتائج أن العزلة S.ham82 قد تفوقت على العزلة الساحلية في قدرتها على تحقيق شدة إصابة أعلى من نظيرتها الساحلية إضافة إلى قدرتها على التأثير على طيف أوسع من أجناس البياض الدقيقي، فالعزلة S.ham82 المعزولة من الفطر *G. neosalviae* المتطفل على نبات الميرمية قد تمكنت من التأثير أيضاً وبنسبة جيدة على النوعين *E. cichoracearum* و *E. necator* المتطفلين على اليقطين (القرعيات) وكرمة العنب على الترتيب. وبالمقابل فإن للعزلة Bah1-G1 حظوظاً في التفوق على سابقتها في قدرتها على إحداث تأثير أكبر على النوع *E. necator* في شدة الإصابة وتشكيل أكثر اتساعاً للبكنيدات على سطح مستعمرات العائل، بينما كان تأثيرها غير مرئياً على النوعين الآخرين من الفطور العائلة المختبرة، ولكن يضاف إلى مكتبتها إن صح التعبير الفطر الذي عزلت منه وهو *E. convovuli*.



الشكل(25): مخطط (Histogram) يبين نتائج تفاعل العوامل المؤثرة في شدة الإصابة عند مجال تراكيز المعلقات البوغية المستخدم

لا بد من وجود طيف أوسع من الفطور العائلة لهذه العزلات لأن الدراسات المتتابعة على الفطر *A. quisqualis* تؤيد مرة بعد أخرى أن هذا الفطر غير متخصص على نوع محدد من فطور البياض الدقيقي، ما يؤكد ضرورة تسريع الخطى للتوسع في دراسته والوقوف على طيف أوسع من العزلات ذات الكفاءة التطفلية التي تمكن من الشروع في إنتاج المبيد الحيوي المحلي الأول من نوعه ضد أمراض البياض الدقيقي المنتشرة في سورية.

5- الاستنتاجات Conclusion

1. إن التسجيل الجديد للفطر فائق التطفل *Ampelomyces* sp. على الفطر *G. neosalviae* المسبب للبياض الدقيقي على الميرمية *S. officinalis* في المنطقة الجنوبية بعد أن كان قد سُجل في المنطقة الساحلية، يزيد من فرص استثماره في مختلف البيئات السورية. يعد هذا التسجيل الأول على هذا العائل محلياً وعالمياً على حد علمنا.
2. خلصت هذه الدراسة إلى توصيف عزلات من الفطر فائق التطفل *A. quisqualis* شكلياً، وجزيئياً اعتماداً على تسلسلات نيكليوتيدية جزئية من منطقة nrDNA-ITS باستخدام بادئ متخصص، وسجلت ستة تسلسلات نكليوتيدية للعزلات المدروسة بأرقام دخول رسمية (ON331782 – ON331777) في البنك الوراثي الدولي.
3. إن استخدام زوج البادئات المتخصص AQ-F264/AQ-R462 لم يسمح بإظهار بعض السلالات في برنامج البحث BLAST على موقع NCBI دون تحديد الكائن المستهدف، ما يشير إلى أن البادئ المذكور قد لا يستطيع أن يغطي التنوع الكبير الذي تبديه تسلسلات منطقة ITS عند سلالات الفطر *Ampelomyces* المختلفة مالم يكن هناك تحليل سلسلة Sequence analysis عالي الكفاءة يمكننا من الحصول على كامل التتابع النيكليوتيدي الذي يظهره هذا البادئ على حزم هلامة الآغاروز.
4. تباينت العزلتان NCBT-S.ham82 وNCBT-Bah1-G1 في كفاءتهماعلى فطور البياض الدقيقي الممرضة لكل من نباتات الميرمية والقرعيات والكرمة، مما يجعل هناك تكاملاً بين هاتين العزلتين فيما إذا اعتمدتا كنواة لمنتج يمكن استخدامه في برامج المكافحة المتكاملة لفطور البياض الدقيقي.

6- المقترحات والتوصيات Suggestions and recommendations

1. لابد من إجراء دراسات أكثر تعمقاً في فيزيولوجيا الفطر *Ampelomyces* على اعتباره أهم مكونات المكافحة الحيوية لأمراض البياض الدقيقي.
2. التحقق من إمكانية استثمار البادئ المتخصص AQ-F264/AQ-R462 بالشكل الأمثل، والبحث في تطويره ليتناسب مع التنوع الكبير في سلالات الفطر *Ampelomyces*، حيث من الممكن استخدامه في الكشف عن الإصابة الكامنة بالفطر *Ampelomyces* التي لا تظهر فيها البكنيدات.
3. التوسع في اختبارات الكفاءة للعزلتين المدروستين NCBT-S.ham82 و NCBT-Bah1-G1 لتشمل طيفاً أكبر من فطور البياض الدقيقي ولدعم ترشيح هاتين السلالتين وعلى الأخص السلالة الأولى على اعتبارها ظهرت في ظروف بيئية مختلفة عما هو معروف عن توزع الفطر *Ampelomyces* وانتشاره في البيئة السورية.
4. إجراء اختبارات حقلية ومخبرية لأكبر طيف ممكن من العزلات المحلية لأنه لا بد من وجود المزيد من العزلات ذات الكفاءة في مكافحة أمراض البياض الدقيقي على اعتبار أن السلالة التجارية AQ10™ معزولة من الأراضي الفلسطينية المحتلة ذات الامتداد الجغرافي والبيئي الواحد مع بلادنا.
5. إيلاء العزلة NCBT-S.ham82 الموثقة في البنك الوراثي GenBank بالرقم ON331778 نتيجةً لهذه الدراسة مزيداً من الاهتمام، والعمل على الاستفادة من خصائصها الفيزيولوجية التي مكنتها من الظهور كعزلة متحملة.

7- المراجع References

1) بشير، عبد النبي. (2020). واقع المكافحة الحيوية في القطر العربي السوري. **مجلة وقاية النبات العربية** (ملخص). مج: 38. عدد: 1. ص: 84-85.

2) الرحمة، عبدالله ناصر.1993. **أساسيات علم الفطريات**. الرياض: المملكة العربية السعودية. جامعة الملك سعود. ط3. ص:558.

3) علي، نوال، أحمد، محمد، ويونس، غيداء. (2008). عزل وتعريف النوع *Ampelomyces quisqualis* Ces. (Deuteromycetes: Sphaeropsidales) المتطفل على فطور البياض الدقيقي Erysiphaceae وتحديد تأثير بعض أوساط الاستنبات في نموه. **مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم البيولوجية**. 30 (2).

4) فسخة، شادي محمود. 2021. قياس تبني مزارعي الحمضيات/الموالح لممارسات الإدارة المتكاملة للآفات في محافظة طرطوس، سورية. **مجلة وقاية النبات العربية**. 39 (4): 66-72

5) يوسف، عمران، رمو، آلان، وشيخموس، سلطان. (2016). الحالة الراهنة لأمراض البياض الدقيقي على القرعيات في شمال شرقي سورية. **المجلة السورية للبحوث الزراعية**. 3 (1).

6) يونس، غيداء، علي، نوال، وأحمد، محمد. (2009). الإنتشار الطبيعي للمتطفل الفطري *Ampelomyces quisqualis* Ces. على فطور البياض الدقيقي في الساحل السوري. **مجلة وقاية النبات العربية**. 27: 66-72

7) Abo-Foul, S., Raskin, V. I., Sztejnberg, A., & Marder, J. B. (1996). Disruption of chlorophyll organization and function in powdery mildew-diseased cucumber leaves and its control by the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis*. **Phytopathology**, 86(2), 195-199.

8) Alimad, N., Naffaa, W., & Azmeh, F. (2017). Overwintering form of *Erysiphe necator*, the causal agent of grapevine powdery mildew in southern Syria. **Journal of Plant Protection Research**, 57(2).

9) Angeli, D., Maurhofer, M., Gessler, C., & Pertot, I. (2012). Existence of different physiological forms within genetically diverse strains of *Ampelomyces quisqualis*. **Phytoparasitica**, 40(1), 37-51.

10) Angeli, D., Pellegrini, E., & Pertot, I. (2009). Occurrence of *Erysiphe necator* chasmothecia and their natural parasitism by *Ampelomyces quisqualis*. **Phytopathology**, 99(6), 704-710.

11) Angeli, D., Valentini, F., Masiero, C., Giovannini, O., & Pertot, I. (2017). **Reducing primary inoculum sources of grapevine powdery mildew by the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis***. *IOBC/WPRS Bulletin 128*, 9-12. Retrieved from https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20193256990

12) Arnaud, G. (1921). Etude sur les champignons parasites (Parodiellinacees, inclus Erysiphees) (Vol. 7): **Librairie agricole de l'Institut national agronomique, Maurice-Mendel.**

13) Ashmawy, M., El-Orabey, W., Abu Aly, A. E.-A., & Shahin, A. (2014). Losses in grain yield of some wheat cultivars infected with powdery mildew. **Egyptian Journal of Phytopathology**, 42(1), 71-82.

14) Athira, K., Ragupathi, N., & Raguchander, T. (2017). Morphological characterization of *Ampelomyces* spp., a hyperparasite of Bhendi (Abelmoschus esculentus (L.) Moench) powdery mildew. **Journal of Applied and Natural Science**, 9(4), 1954-1957.

15) Bélanger, R., & Benyagoub, M. (1997). Challenges and prospects for integrated control of powdery mildews in the greenhouse. **Canadian Journal of Plant Pathology**, 19(3), 310-314.

16) Bélanger, R., & Labbé, C. (2002). Control of powdery mildews without chemicals: prophylactic and biological alternatives for horticultural crops. **The powdery mildews: a comprehensive treatise**, 256-267.

17) Belsare, S., Moniz, L., & Deo, V. (1980). hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* Ces. from Maharashtra State, India. **Biovigyanam**, 6, 173-176.

18) Bennett, J. M., Rhetoric, E., Hicks, D. R., Naeve, S. L., & Bennett, N. B. (2014). **The Minnesota Soybean Field Book** (PDF). St Paul, MN: University of Minnesota Extension, 33.

19) Benuzzi, M., & Baldoni, G. (2000). AQ10-a new biofungicide based on *Ampelomyces quisqualis* for powdery mildew control on grapes [Vitis vinifera L.]. **Informatore Fitopatologico** (Italy).

20) Beuther, E., Philipp, W. D., & Grossmann, F. (1981). Untersuchungen zum Hyperparasitismus von *Ampelomyces quisqualis* auf Gurkenmehltau (Sphaerotheca fuliginea). **Journal of Phytopathology**, 101(3), 265-270.

21) Boerema, G., Dorenbosch, M., & Van Kesteren, H. (1965). Remarks on species of *Phoma* referred to Peryonellaea. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, 4(1), 47-68.

22) Bowen, K. L., Everts, K. L., & Leath, S. (1991). Reduction in yield of winter wheat in North Carolina due to powdery mildew and leaf rust. **Phytopathology**, 81(5), 503-511.

23) Braun, U. (1987). **A monograph of the Erysiphales (powdery mildews)**. Beihefte zur Nova Hedwigia(89).

24) Braun, U., & Takamatsu, S. (2000). Phylogeny of *Erysiphe*, *Microsphaera*, *Uncinula* (*Erysiphe*ae) and *Cystotheca*, *Podosphaera*, *Sphaerotheca* (Cystotheceae) inferred from rDNA ITS sequences: some taxonomic consequences. **Schlechtendalia**, 4, 1-33.

25) Cabrera, M., Vobis, G., & Alvarez, R. (2010). Powdery mildew on Salvia *officinalis* in Corrientes, Argentina. **Mycosphere**, 1(4), 289-291.

26) Caffi, T., Legler, S. E., Bugiani, R., & Rossi, V. (2013). Combining sanitation and disease modelling for control of grapevine powdery mildew. **European Journal of Plant Pathology**, 135(4), 817-829.

27) Cesati, V. d. (1852). *Ampelomyces quisqualis* Ces. **Botanische Zeitung**, 10, 301-302.

28) Daoust, R., & Hofstein, R. (1996). ***Ampelomyces quisqualis*, a new biofungicide to control powdery mildew in grapes**, in Brighton Crop Protection Conference, Pest and Diseases. *British Crop Protection Council, Farnham, UK, 1*, 33-40.

29) De'Bary, A. (1870). *Eurotium*, *Erysiphe*, *Cicinnobolus*. Nebst Bemerkungen über die Geschlechtsorgane der Ascomyceten. **Abh. Senckenb. Naturf. Ges**, *7*, 361-455.

30) Dinesh, B., Kulkarni, S., Harlapur, S., Benagi, V., & Mallapur, C. (2010). Prevalence of powdery mildew in sunflower growing areas in northern Karnataka. **Journal of Plant Disease Sciences**, 5(2), 242-244.

31) Donk, M. (1966). *Cicinnobolus* Bary (Fungi, Sphaeropsidales). **Taxon**, 149-151.

32) Dunn, M. W., & Gaynor, L. G. (2020). Impact and control of powdery mildew on irrigated soybean varieties grown in Southeast Australia. **Agronomy**, 10(4), 514.

33) Ehrenberg, C. (1853). Weintraubenkrankheit. **Botanische Zeitung**, 11, 15-16.

34) Emmons, C. W. (1930). ***Cicinnobolus cesatii*, a study in host-parasite relationships**. Bulletin of the Torrey Botanical Club, 421-441.

35) English-Loeb, G., Norton, A. P., Gadoury, D. M., Seem, R. C., & Wilcox, W. F. (1999). Control of powdery mildew in wild and cultivated grapes by a tydeid mite. **Biological control**, 14(2), 97-103.

36) Everts, K., & Leath, S. (1992). Effect of early season powdery mildew on development, survival, and yield contribution of tillers of winter wheat. **Phytopathology** (USA).

37) Falk, S., Gadoury, D., Cortesi, P., Pearson, R., & Seem, R. (1995). Parasitism of Uncinula *necator* cleistothecia by the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis*. **Phytopathology** (USA), 85, 794-800.

38) Fautrey, F. (1890). *Cicinnobolus* humuli. **Revue Mycol**, 12(73), 176.

39) Galper, S., Sztejnberg, A., & Lisker, N. (1985). Scanning electron microscopy of the ontogeny of *Ampelomyces quisqualis* pycnidia. **Canadian journal of microbiology**, 31(10), 961-964.

40) Gu, Y., & Ko, W. (1997). Water agarose medium for studying factors affecting germination of conidia of *Ampelomyces quisqualis*. **Mycological Research**, 101(4), 422-424.

41) Hajek, A., Glare, T., & O'Callaghan, M. (2008). **Use of microbes for control and eradication of invasive arthropods** (Vol. 6): Springer Science & Business Media.

42) Hall, T. (1999). **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. Paper presented at the Nucleic Acids Symp. Ser.

43) Hamim, A., Miché, L., Douaik, A., Mrabet, R., Ouhammou, A., Duponnois, R., & Hafidi, M. (2017). Diversity of fungal assemblages in roots of Ericaceae in two Mediterranean contrasting ecosystems. **Comptes Rendus Biologies**, 340(4), 226-237.

44) Hamzeh, S., Nafaa, W., & Azmeh, F. (2022). Occurrence of the Hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* on *Golovinomyces neosalviae* (Erysiphaceae), Causal Agent of Powdery Mildew on Common Sage (*Salvia officinalis*). **Arab Journal for Plant Protection**, 40(2), 158-163. doi:10.22268/ajpp-040.2.158163

45) Hasegawa, M., Kishino, H., & Yano, T.-a. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. **Journal of molecular evolution**, 22(2), 160-174.

46) Hashioka, Y., & Nakai, Y. (1980). **Ultrastructure of pycnidial development and mycoparasitism of *Ampelomyces quisqualis* parasitic on Erysiphales [fungus**]. Transactions of the Mycological Society of Japan.

47) Highland, H. (2000). AgraQuests search for Serenade: The isolation and development of a new biocontrol pesticide for plant protection. **Phytopathology**, 90, S101.

48) Hofstein, R., Fridlender, B., 1994. **Development of production, formulation and delivery systems**. In: Brighton Crop Protection Conference, Pest and Diseases, Vol. 3. British Crop Protection Council, Farnham) UK, pp. 1273e1280.

49) Huang, X., Hsam, S., Zeller, F., Wenzel, G., & Mohler, V. (2000). Molecular mapping of the wheat powdery mildew resistance gene Pm24 and marker validation for molecular breeding. **Theoretical and Applied Genetics**, 101(3), 407-414.

50) Huth, L., Ash, G. J., Idnurm, A., Kiss, L., & Vaghefi, N. (2021). The "bipartite" structure of the first genome of *Ampelomyces quisqualis*, a common hyperparasite and biocontrol agent of powdery mildews, may point to its evolutionary origin from plant pathogenic fungi. **Genome Biology and Evolution**, 13(8), evab182.

51) Jarvis, W., Gubler, W., & Grove, G. (2002). **Epidemiology of powdery mildews in agricultural pathosystems**. The powdery mildews: a comprehensive treatise, 169-199.

52) Jarvis, W. R., & Slingsby, K. (1977). Control of powdery mildew of greenhouse cucumber by water sprays and *Ampelomyces quisqualis*. **Plant Disease Reporter**.

53) Jill Harrison, C., & Langdale, J. A. (2006). A step by step guide to phylogeny reconstruction. **The Plant Journal,** 45(4), 561-572.

54) Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. **Mol Biol Evol**, 30(4), 772-780. doi:10.1093/molbev/mst010

55) Keinath, A. P., & DuBose, V. B. (2012). Controlling powdery mildew on cucurbit rootstock seedlings in the greenhouse with fungicides and biofungicides. **Crop protection**, 42, 338-344.

56) Kevan PG, L Shipp (2017) Biological control as biotechnological amelioration and ecosystem intensification in managed ecosystems. **Reference Module in Life**

Sciences, Elsevier, 2017, ISBN: 978–0–12-809,633–8, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.09246-3.

57) Kiss, L. (1997a). Genetic diversity in *Ampelomyces* isolates, hyperparasites of powdery mildew fungi, inferred from RFLP analysis of the rDNA ITS region. **Mycological Research**, 101(9), 1073-1080.

58) Kiss, L. (1997b). *Graminicolous* powdery mildew fungi as new natural hosts of *Ampelomyces* mycoparasites. **Canadian journal of botany**, 75(4), 680-683.

59) Kiss, L. (1998). Natural occurrence of *Ampelomyces* intracellular mycoparasites in mycelia of powdery mildew fungi. **New Phytologist**, 140(4), 709-714.

60) Kiss, L. (2001). The Role of Hyperparasites in 1 2 Host Plant-Parasitic Fungi Relationships. Biotic interactions in plant-pathogen associations, 227.

61) Kiss, L. (2003). A review of fungal antagonists of powdery mildews and their potential as biocontrol agents. Pest Management Science: formerly Pesticide Science, 59(4), 475-483.

62) Kiss, L. (2008). **Intracellular mycoparasites in action: interactions between powdery mildew fungi and Ampelomyces**. Paper presented at the British Mycological Society Symposia Series.

63) Kiss, L., & Nakasone, K. K. (1998). Ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences do not support the species status of *Ampelomyces quisqualis*, a hyperparasite of powdery mildew fungi. **Current genetics**, 33(5), 362-367.

64) Kiss, L., Pintye, A., Kovacs, G. M., Jankovics, T., Fontaine, M. C., Harvey, N., . . . Shykoff, J. A. (2011). Temporal isolation explains host-related genetic differentiation in a group of widespread mycoparasitic fungi. **Molecular Ecology**, *20*(7), 1492-1507.

65) Kiss, L., Russell, J., Szentiványi, O., Xu, X., & Jeffries, P. (2004). Biology and biocontrol potential of *Ampelomyces* mycoparasites, natural antagonists of powdery mildew fungi. **Biocontrol Science and Technology**, 14(7), 635-651.

66) Kiss, L., & Vajna, L. (1995). New approaches in the study of the genus *Ampelomyces*, hyperparasites of powdery mildew fungi. **Environmental biotic factors in integrated plant disease control**, 301-304.

67) Kohli, D. K., & Bachhawat, A. K. (2003). CLOURE: Clustal Output Reformatter, a program for reformatting ClustalX/ClustalW outputs for SNP analysis and molecular systematics. **Nucleic acids research**, 31(13), 3501-3502.

68) Lee, S.-Y., Kim, Y.-K., Kim, H.-G., & Shin, H.-D. (2007). New hosts of *Ampelomyces quisqualis* Hyperparasite to powdery mildew in Korea. **Research in Plant Disease, 13**(3), 183-190.

69) Legler, S. E., Pintye, A., Caffi, T., Gulyás, S., Bohár, G., Rossi, V., & Kiss, L. (2016). Sporulation rate in culture and mycoparasitic activity, but not mycohost specificity, are the key factors for selecting *Ampelomyces* strains for biocontrol of grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*). **European Journal of Plant Pathology**, 144(4), 723-736.

70) Liang, C., Yang, J., Kovács, G. M., Szentiványi, O., Li, B., Xu, X., & Kiss, L. (2007). Genetic diversity of *Ampelomyces* mycoparasites isolated from different powdery mildew species in China inferred from analyses of rDNA ITS sequences. **Fungal Diversity**, 24, 225-240.

71) Liyanage, K. K., Khan, S., Brooks, S., Mortimer, P. E., Karunarathna, S. C., Xu, J., & Hyde, K. D. (2018). Morpho-Molecular Characterization of Two *Ampelomyces* spp. (Pleosporales) Strains Mycoparasites of Powdery Mildew of Hevea brasiliensis. **Front Microbiol**, 9, 12. doi:10.3389/fmicb.2018.00012

72) Machida, K., Trifonov, L. S., Ayer, W. A., Lu, Z. X., Laroche, A., Huang, H. C., . . . Zantige, J. L. (2001). 3(2H)-Benzofuranones and chromanes from liquid cultures of the mycoparasitic fungus *Coniothyrium minitans*. **Phytochemistry**, 58(1), 173-177. doi:10.1016/s0031-9422(01)00129-7

73) Manjunatha, L., Singh, S., Ravikumara, B., Reddy, G. N., & Senthilkumar, M. (2020). Chapter 44 - *Ampelomyces*. In M. S. K. N. Amaresan, K. Annapurna, Krishna Kumar, A. Sankaranarayanan (Ed.), **Beneficial Microbes in Agro-Ecology** (pp. 833-860): Academic Press.

74) McGrath, M., & Shishkoff, N. (1999). Evaluation of biocompatible products for managing cucurbit powdery mildew. **Crop protection**, 18(7), 471-478.

75) McQuilken, M. P., Gemmell, J., Hill, R. A., & Whipps, J. M. (2003). Production of macrosphelide A by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. **FEMS Microbiol Lett**, 219(1), 27-31. doi:10.1016/S0378-1097(02)01180-1

76) Mhaskar, D. (1974). Mycoparasite-*Ampelomyces* in artificial culture I. Morphology and cultural behaviour. **Mycopathologia et Mycologia applicat***a, 52*(1), 55-64.

77) Mhaskar, D., & Rao, V. (1974). The mycoparasite *Ampelomyces quisqualis* Ces. in artificial culture. II. Effect of environmental factors. **Phytopathologia Mediterranea**, 147-154.

78) Milgroom, M. G., & Cortesi, P. (2004). Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. **Annu Rev Phytopathol**, 42, 311-338. doi:10.1146/annurev.phyto.42.040803.140325

79) Moesz, G. (1912). Powdery mildew. **Urania**, 13(1), 15.

80) Moyer, M., Gadoury, D., Wilcox, W., & Seem, R. (2008). **Seasonal release of ascospores by Erysiphe necator**. In Phytopathology (Vol. 98, No. 6, pp. S109-S109). 3340 PILOT KNOB ROAD, ST PAUL, MN 55121 USA: AMER PHYTOPATHOLOGICAL SOC.

81) Németh, M. Z., Mizuno, Y., Kobayashi, H., Seress, D., Shishido, N., Kimura, Y., . . . Kakutani, K. (2021). *Ampelomyces* strains isolated from diverse powdery mildew hosts in Japan: their phylogeny and mycoparasitic activity, including timing and quantifying mycoparasitism of *Pseudoidium neolycopersici* on tomato. **PloS one**, 16(5), e0251444.

82) Nemeth, M. Z., Pintye, A., Horvath, A. N., Vagi, P., Kovacs, G. M., Gorfer, M., & Kiss, L. (2019). Green Fluorescent Protein Transformation Sheds More Light on a Widespread Mycoparasitic Interaction. **Phytopathology**, 109(8), 1404-1416. doi:10.1094/PHYTO-01-19-0013-R

83) Németh, M. Z., Pintye, A., Horváth, Á. N., Vági, P., Kovács, G. M., Gorfer, M., & Kiss, L. (2019). Green fluorescent protein transformation sheds more light on a widespread mycoparasitic interaction. **Phytopathology**, 109(8), 1404-1416.

84) Nicot, P. C., Bardin, M., & Dik, A. (2002). **Basic methods for epidemiological studies of powdery mildews**: culture and preservation of isolates, production and delivery of inoculum, and disease assessment. *The Powdery Mildews: a comprehensive treatise*, 83-99.

85) Page, R. D. (1996). Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Bioinformatics**, 12(4), 357-358.

86) Park, M. J., Choi, Y. J., Hong, S. B., & Shin, H. D. (2010). Genetic variability and mycohost association of *Ampelomyces quisqualis* isolates inferred from phylogenetic analyses of ITS rDNA and actin gene sequences. **Fungal Biol**, 114(2-3), 235-247. doi:10.1016/j.funbio.2010.01.003

87) Pasini, C., D'Aquila, F., Curir, P., & Gullino, M. L. (1997). Effectiveness of antifungal compounds against rose powdery mildew (Sphaerotheca pannosa var. rosae) in glasshouses. **Crop Protection**, 16(3), 251-256.

88) Paulitz, T. C., & Belanger, R. R. (2001). Biological control in greenhouse systems. **Annu Rev Phytopathol**, 39(1), 103-133. doi:10.1146/annurev.phyto.39.1.103

89) Philipp, W.-D., & Crüger, G. (1979). Mycoparasitism of *Ampelomyces quisqualis* on powdery mildew of cucumber and other vegetable species. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 129-142.

90) Philipp, W.-D., Grauer, U., & Grossmann, F. (1984). Additional investigations on biological and integrated control of cucumber powdery mildew in greenhouses by *Ampelomyces quisqualis*. **Journal of Plant Diseases and Protection**, 438-443.

91) Philipp, W. D. (1985). Extracellular enzymes and nutritional physiology of *Ampelomyces quisqualis* Ces., hyperparasite of powdery mildew, in vitro. **Journal of Phytopathology**, 114(3), 274-283.

92) Pintye, A., Bereczky, Z., Kovács, G. M., Nagy, L. G., Xu, X., Legler, S. E., . . . Rossi, V. (2012). No indication of strict host associations in a widespread mycoparasite: grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) is attacked by phylogenetically distant *Ampelomyces* strains in the field. **Phytopathology**, 102(7), 707-716.

93) Ranković, B. (1997). Hyperparasites of the genus shape *Ampelomyces* on powdery mildew fungi in Serbia. **Mycopathologia**, 139(3), 157-164.

94) Riess, H. (1852). ber Byssocystis textilis. **Hedwigia**, 1, 23.

95) Rogers, D. (1959). On Cicinobolus. **Mycologia**, 51(1), 96-98.

96) Rudakov, O. (1979). [Fungi of *Ampelomyces* Ces. ex Schlecht. genus].[Russian]. **Mikologiya i Fitopatologiya**.

97) Salmon, E. S. (1900). **A monograph of the Erysiphaceae** (Vol. 9): Torrey Botanical Club.

98) Schol-Schwarz, M. B. (1959). The genus *Epicoccum* link. **Transactions of the British Mycological Society**, 42(2), 149-IN143.

99) Shishkoff, N., & McGrath, M. (2002). AQ10 biofungicide combined with chemical fungicides or AddQ spray adjuvant for control of cucurbit powdery mildew in detached leaf culture. **Plant Disease**, 86(8), 915-918.

100) Skidmore, A. (1976). **Interactions in relation to biological control of plant pathogens**. In Microbiology of aerial plant surfaces (pp. 507-528): Elsevier.

101) Speer, E. (1978a). *Ampelomyces* Cesati (Fungi, Sphaeropsidales). **Taxon**, 27(5-6), 549-550.

102) Speer, E. (1978b). Beitrag zur morphologie von *Ampelomyces quisqualis* Ces. **Sydowia**, 31, 242-246.

103) Sullivan, R. F., & White Jr, J. F. (2000). *Phoma glomerata* as a mycoparasite of powdery mildew. **Applied and Environmental Microbiology**, 66(1), 425-427.

104) Sundheim, L., & Krekling, T. (1982). Host-parasite relationships of the hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* and its powdery mildew host Sphaerotheca fuliginea: I. Scanning electron microscopy. **Journal of Phytopathology**, 104(3), 202-210.

105) Swofford DL (1998) PAUP*: **Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods)** Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.

106) Swofford, D. L., & Sullivan, J. (2003). **Phylogeny inference based on parsimony and other methods using PAUP***. The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny, cáp, 7, 160-206.

107) Szentiványi, O., & Kiss, L. (2003). Overwintering of *Ampelomyces* mycoparasites on apple trees and other plants infected with powdery mildews. **Plant pathology**, 52(6), 737-746.

108) Szentiványi, O., Levente, K., Russell, J. C., Kovács, G. M., Varga, K., Jankovics, T., . . . Jeffries, P. (2005). *Ampelomyces* mycoparasites from apple powdery mildew identified as a distinct group based on single-stranded conformation polymorphism analysis of the rDNA ITS region. **Mycological Research**, 109(4), 429-438.

109) Sztejnberg, A., Galper, S., Mazar, S., & Lisker, N. (1989). *Ampelomyces quisqualis* for biological and integrated control of powdery mildews in occupied Palestine. **Journal of Phytopathology**, 124(4), 285-295.

110) Taksony, P., Tarczal, E., Maráczi, K., Holb, I., & Kocsis, L. (2010). Powdery mildew infection dependent on weather factors in vineyards near Keszthely in 2008. **International Journal of Horticultural Science**, 16(2), 55-59.

111) Tollenaere, C., Pernechele, B., Mäkinen, H., Parratt, S., Németh, M., Kovács, G., . . . Laine, A. L. (2014). A hyperparasite affects the population dynamics of a wild plant pathogen. **Molecular Ecology**, 23(23), 5877-5887.

112) Tulasne, L.-R. (1856). **Nouvelles observations sur les Erysiphe.** Reprint from Annales des Sciences Naturelles, Bot.

113) Tulasne, L. R. (1856). Nouvelles observations sur les *Erysiphe*. **Ann. Sci. Nat. Botanische Zeitung** 6, 299-324.

114) Vielba-Fernández, A., Polonio, Á., Ruiz-Jiménez, L., de Vicente, A., Pérez-García, A., & Fernández-Ortuño, D. (2020). Fungicide resistance in powdery mildew fungi. **Microorganisms**, 8(9), 1431.

115) Von mole, H. (1852). Die Traubenkrankheit. **Botanische Zeitung**, 10, 19-16, 31-33.

116) White Jr, J., & Morgan-Jones, G. (1987). Studies in the genus *Phoma*. VII. Concerning *Phoma glomerata*. **Mycotaxon** (USA).

117) Yarwood, C. (1978). History and taxonomy of powdery mildews. ***The Powdery Mildws***, 1-37.

118) Yarwood, C. E. (1939). An overwintering pycnidial stage of *Cicinnobolus*. **Mycologia**, 31(4), 420-422.

119) Yarwood, C. E. (1957). **Powdery mildews**. The Botanical Review, 23(4), 235-301.

120) Younes, G., Ahmad, M., & Ali, N. (2016). Mycoparasitism of *Ampelomyces quisqualis* Ces. ex Schlecht on Powdery Mildew Fungi in Syria. **Jordan Journal of Agricultural Sciences**, 12(1).

121) Younes, G. H., Ahmad, M., & Ali, N. (2015). Morphological, biological and ecological studies of the mycophagous ladybird Psyllobora vigintiduopunctata L.(Coleoptera: Coccinellidae) on powdery mildew fungi in the coastal region of Syria. **Jordan J Agric Sci**, 11, 483-493.

122) Zang, C., Lin, Q., Xie, J., Lin, Y., Yu, S., Zhao, K., & Liang, C. (2019). The biological control of the grapevine downy mildew disease using *Ochrobactrum* sp. **Plant Protection Science**, 56(1), 52-61.

الملحقات

ملحق (1): بروتوكول تحديد التتابع النكليوتيدي وفق المتبع في هيئة الطاقة الذرية السورية (طريقة سانجر)

أجري البروتوكول على عدة مراحل:

1. **المعالجة الأنزيمية** لإلغاء تنشيط البادئات والنيوكليوتيدات الزائدة عن طريق إضافة 2 ميكرولتر من محلول غسل أنزيمي (illustra ExoStar 1-Step, UK) إلى 5 ميكرولتر من منتج PCR لكل عينة، حيث فُعّل نشاط الإنزيمات عن طريق تحضين مزيج التفاعل في جهاز PCR على مرحلتين (عند 37 س° لمدة 15 دقيقة ، تلاها تحضين عند 80 س° لمدة 15 دقيقة) لتعطيل الإنزيمات.

2. **بمرحلة وسم قطعة DNA الهدف بالنكليوتيدات المتألقة** خضعت نواتج تفاعل بوليميراز السلسلي PCR Products المعالجة سابقاً لتفاعلات تحديد التتابع النكليوتيدي بدءاً بوسم DNA الهدف بالنكليوتيدات المتألقة وذلك باستخدام مادة BDT (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystem, USA) وحضر مزيج التفاعل (1 ميكرولتر محلول موقي Dilution Buffer، و1 ميكرولتر من مادة BDT، و1 ميكرولتر بادئ (AQ-R462, 10µM)، و1 ميكرولتر DNA و 6 ميكرولتر ماء خالي النيوكلياز RNase-free water، ليصبح الحجم النهائي للتفاعل 10µl وأجري التفاعل Cycle sequencing في جهاز التدوير الحراري وفق البرنامج (96 س° لمدة 10 ثوان و 55 س° لمدة 5 ثوان و 60 س° لمدة 5 ثوان ، 30 دورة).

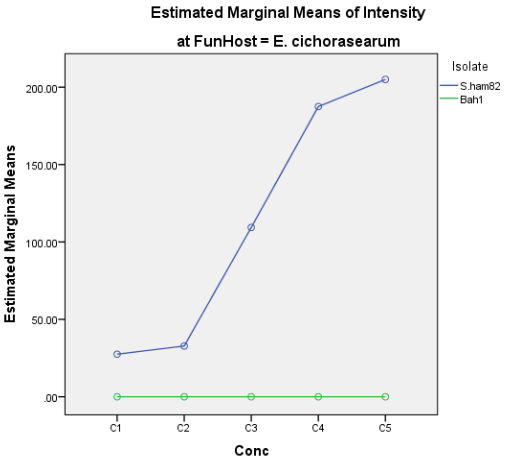
3. **مرحلة تنقية مزيج التفاعل الناتج Cycle sequencing** باستخدام أعمدة DyeEx للتخلص من نواتج التفاعلات السابقة (النكليوتيدات المتألقة والبادئ والأنزيم) الفائضة ، ثم جُفف لمدة 3–4 دقائق باستخدام مجفف دوراني تحت التفريغ CentriVap Concentrator.

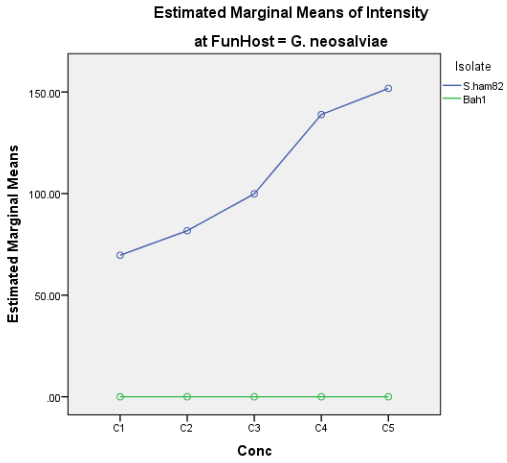
4. بعد ذلك **أُضيف Formamide** إلى المزيج الناتج لحل العينات المجففة والمساعدة في خطوات التمسُّخ اللاحقة (فصل السلاسل).

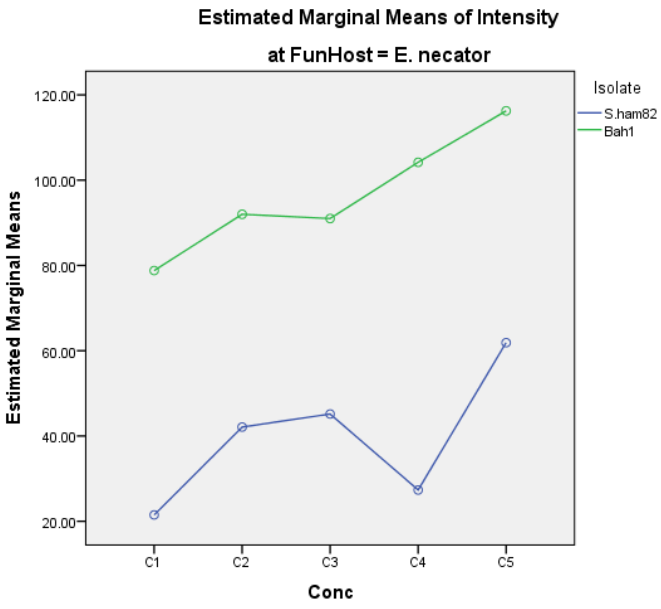
5. أجريت تفاعلات التتابع باستخدام جهاز تحديد التتابعات النيكليوتيدية ABI PRISM 301System (Applied Biosystem, USA) لفصل قطع DNA وذلك بترحيل كل عينة على حدة في وسط الفصل متعدد الأكريلاميد (POP6) ضمن أنبوب شعري وحيد. قُرِئت بيانات السلسلة (chromatogram) ومخرجاتها وجرى تصحيحها باستخدام برنامج Bio-Edit v.2.2.5.0 (Hall, 1999).

ملحق (2): مخطط بياني لتفاعل العوامل المؤثرة (تركيز*عزلة مختبرة*عائل فطري) في شدة الإصابة حسب مخرجات برنامج SPSS

Conc * Isolate * FunHost







Abstract

Pycnidial fungi of the genus *Ampelomyces* are recognized as natural enemies of a wide spectrum of powdery mildews. These mycoparasites are naturally occurring in Syria, but the investigations about the possibility of their investment in biocontrol strategies are limited to ecological studies. For this purpose, field surveillance was performed in 6 governorates of two regions (southern and coastal areas) . A total of 73 plant samples infected with powdery mildews were collected from 10 locations of the southern area in (Damascus, Damascus rural and Sweida governorates) in addition to 20 locations of the coastal area (Lattakia and Tartus governorates). *Ampelomyces* pycnidia were detected in 5 samples; four of which from coastal area were found parasiting two powdery mildew species; *Erysiphe convolvuli* on *Convolvulus arvensis* L. and *E. heraclei* on *Ammi majus*. In addition, a new occurrence on *Golovinomces neosalviae* infecting *Salvia officinalis* L. was recorded in one sample in Damascus. *Ampelomyces* pycnidia were successfully isolated from collected samples on PDA medium and their morphological characterization was carried out. As a result, two morphologically distinct isolates were found in one of the five specimens. Mean dimensions of coastal pycnidia and conidia on the natural host were 61.17 x 28.25 and 6.85 x 3.57µm respectively, while same measurements of 152.52 x 132.13 and 8.75 x 3.3µm were recorded on PDA. The southern isolate had mean dimensions of 77.44 x 25.28 and 8.11 x 3.88µm of pycnidia and conidia respectively on natural host, whereas the mean dimensions on PDA were 125.27 x 115.95 and 8.86 x 3.18µm. Nucleotide sequencing of the six isolates using the specific revers primer AQ-R462 revealed 6 sequences officially accessed in GenBank. Phylogenetic analysis using Maximum parsimony and Maximum likelihood criteria revealed that studied isolates were joined to internationally recognized related taxa. Three isolates joined exactly two groups with high similarity of at least 97%. The three other isolates formed independent branch sisters with the three previous isolates in different identity percentages. Based on some morphological differentiations in culture of one coastal isolate (Bah1), no clear relationship could be necessarily obtained between this isolate's morphological and molecular versus geographical and physiological characteristics. Although several isolates showed identical nucleotide sequences, they had variable color morphology in culture and these variations did not relate with neither the morphology nor the size of pycnidia and conidia.

Artificial infection of the mycoparasite on three powdery mildews was carried out using detached leaf assay in vitro. Treating *E. cichorasearum*, *G. neosalviae* and *E. necator* (the causal agent of powdery mildews on *Cucurbita maxima* L., *S. officinalis* and *vitis*

venifera L. respectively) with isolate NCBT-S.ham82 of *Ampelomyces* resulted in the higher parasitism intensity means of 205, 151.77 and 61.88 pycnidia/cm^2 respectively at the suspension concentration of 5.9×10^7 conidia/ml. Impact of isolate NCBT-Bah1-G1 was only recorded on *E. necator* with a high intensity mean of 116.25 pycnidia /cm^2 at the same previous spore concentration. No impact of this isolate was observed on the other two studied powdery mildews.

This study is an attempt for the investment of the mycoparasite *Ampelomyces quisqualis* in bio-controlling powdery mildews. Also, a new mycoparasite/host plant combination was recorded in southern Syria, for the first time worldwide in the best of our knowledge, and this new isolate showed high performance on two powdery mildews (on cucurbits and *Salvia officinalis*) and moderate impact on the third one (grapevine).

Key words: *Ampelomyces quisqualis*, powdery mildews, mycoparasitism, artificial infection.

Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Agriculture
Deprtment of Biotechnology

Syrian Arab Republic
Ministry of Higher Education
National Commission of Biotechnology

Studying the Efficiency of Local Isolates of the Hyperparasite *Ampelomyces quisqualis* Ces. ex Schlecht in Controlling Some Powdery Mildew Diseases

A dissertation submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of master in biotechnology

By:

Shady Hussain Hamzeh

Supervisor

Prof. Walid Naffaa
Faculty of Agriculture
Damascus Univrsity

Co-supervisor

Prof. M. Fawaz Azmeh
Faculty of Agriculture
Damascus University

2022