

تقصي انتشار والتنوع ضمن مجتمع الفطر *Botrytis cinerea* على بعض محاصيل الخضار المحمية في الساحل السوري

لبنى سهيل ديبية¹، عمر حمودي² وأحمد محمد مهنا³

(1) قسم وقاية النبات، كلية الزراعة، جامعة دمشق، سورية، البريد الإلكتروني: A.M.Mouhanna@gmail.com؛ (2) مركز البحوث العلمية الزراعية، اللاذقية، سورية؛ (3) الجامعة السورية الخاصة (SPU)، كلية الطب، سورية.

الملخص

ديبية، لبنى سهيل، عمر حمودي وأحمد محمد مهنا. 2020. تقصي انتشار والتنوع ضمن مجتمع الفطر *Botrytis cinerea* على بعض محاصيل الخضار المحمية في الساحل السوري. مجلة وقاية النبات العربية، 38(3): 187-199.

أجري مسح حقلي خلال الموسمين الزراعيين 2016/2015 و 2017/2016 بهدف تقصي انتشار فطر العفن الرمادي على بعض محاصيل الخضار المحمية في الساحل السوري. أظهرت الدراسة انتشار الفطر *B. cinerea* في كلا الموسمين وعلى مختلف محاصيل الخضار المزروعة من البندورة/الطماطم، الكوسا والباندجان حيث بلغت نسبة البيوت المحمية المصابة 60.48% و 54.76% خلال الموسمين 2016 و 2017، على التوالي. أظهرت عزلات الفطر (48 عزلة) والتي عزلت من محاصيل ومواقع مختلفة تبايناً فيما بينها من حيث القدرة الإراضية وشدة الإصابة على ثمار التفاح، حيث ظهرت القدرة الإراضية العالية عند عزلتين تم جمعها من محصول البندورة/الطماطم في كل من دوير الخطيب (جبلة) وحريصون (بانياس)، والقدرة الإراضية الضعيفة جداً عند 4 عزلات جمعت من محصولي الكوسا والباندجان من عين العروس (اللاذقية)، مجدلون البحر (طرطوس)، سلورين (الفرادحة) وقرير (بانياس). ترافق تباين القدرة الإراضية لعزلات العفن الرمادي المدروسة مع ظهور تباين وراثي واضح فيما بينها وذلك عند استخدام كل من تقانة Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) و Inter Simple Sequence Repeats (ISSR). بالنسبة لتقانة RAPD، بلغ العدد الكلي للحزم المضخمة 71 حزمة وجد بينها 62 حزمة متعددة شكلياً بنسبة تعددية شكلية وصلت إلى 87.65% وذلك عند استخدام 12 بادئة عشوائية، في حين أعطت البادئات الست المستخدمة في تقانة ISSR 48 حزمة مضخمة، بينها 42 حزمة متعددة شكلياً بمتوسط 7 حزم متعددة شكلياً لكل بادئة وبنسبة تباين 87.5%. تفوقت تقانة RAPD في إظهار التباين الوراثي بين العزلات الفطرية على تقانة ISSR، حيث توزعت العزلات الفطرية في 6 مجموعات، في حين اقتصر توزع العزلات في ثلاث مجموعات في تقانة ISSR. لم يظهر أي تأثير لنوع المحصول والعامل الجغرافي في تباين عزلات الفطر *B. cinerea* فيما بينها وراثياً، أو في قدرتها الإراضية.

كلمات مفتاحية: *B. cinerea*، الساحل السوري، المحاصيل المحمية، RAPD، ISSR.

المقدمة

لحماية المحاصيل من الإصابة بالفطر *B. cinerea* في عام 2013 بحوالي 310 مليون دولار (De Miccolis Angelini et al., 2016). من الناحية الوراثية يعد الفطر *B. cinerea* مثال نموذجي في دراسة مصادر التباين والتنوع الوراثي في الفطور الممرضة للنبات (Fillinger & Elad, 2016)، ولقد أدت هذه التباينات الوراثية ضمن مجتمع الفطر إلى ظهور صفة المقاومة لمختلف المبيدات الكيميائية المستخدمة في مكافحته.

يملك الفطر *B. cinerea* فرصاً أكبر في الانتشار وإحداث الإصابة على محاصيل الخضار المحمية بالمقارنة مع المحاصيل الحقلية، ويعود ذلك إلى عدة عوامل منها بنية البيوت المحمية والمواد المستخدمة فيها، طرائق الزراعة، كثرة الأيدي العاملة التي تحفز على نقل الأبواغ الكونيدية من نبات لآخر، والعمليات الزراعية من تقليم وحصاد متكرر مما يسبب جروح سهلة الاختراق من قبل أبواغ الفطر

يعد الفطر *Botrytis cinerea* Per المسبب لمرض العفن الرمادي ثاني أهم مسببات الأمراض الفطرية في علم أمراض النبات الجزئي من الناحية الاقتصادية والعلمية (Dean et al., 2012). تعود الأهمية الاقتصادية للفطر إلى الخسائر الفادحة التي يلحقها في العديد من المحاصيل المهمة في مختلف أنحاء العالم والتي يصعب تقديرها بدقة بسبب مداه العوائل الواسع، حيث يهاجم فطر *B. cinerea* ما يقارب 568 جنس من النباتات الوعائية Tracheophytes وتنتمي غالبية هذه الأنجاس النباتية إلى قسم النباتات البذرية، وبعضها ينتمي لقسم النباتات اللازهريّة (Fillinger & Elad, 2016). قدرت التكلفة العالمية

تم احتساب نسبة انتشار المرض ضمن البيت المحمي من خلال فحص 25 نباتاً بشكل عشوائي من كل بيت، وفق العلاقة التالية:

$$\text{نسبة الإصابة في البيت المحمي \%} = \frac{\text{عدد النباتات المصابة}}{\text{عدد النباتات الكلي}} \times 100$$

وتم حساب النسبة المئوية لانتشار المرض في البيوت المحمية (تردد المرض) وفق العلاقة التالية:

$$\text{نسبة البيوت المحمية المصابة \%} = \frac{\text{عدد البيوت المحمية المصابة}}{\text{عدد البيوت المحمية الممسوحة}} \times 100$$

جمع العينات وعزل الفطر *B. cinerea*

جمعت العينات من النباتات التي أظهرت أعراض الإصابة بالعفن الرمادي حيث شوهدت الأعراض على شكل أعفان على الثمار وتقرحات على السوق في مناطق التقليم وقص الأوراق ومنطقة اتصال الثمار بالعنق ولفحة وتبقعات رمادية على الأزهار والأوراق، وذلك من المواقع الثمانية المدروسة ومن محاصيل البندورة والكوسا والبادنجان، ووضعت في أكياس من الورق مرقمة وسجلت عليها البيانات التالية: مكان وتاريخ الجمع والنوع النباتي ثم نقلت إلى مختبر أمراض النبات في كلية الزراعة في جامعة دمشق وحفظت في البراد لحين الاستخدام. تم عزل الفطر على مستنبت بطاطا دكستروز آغار (PDA) مضافاً إليها المضاد الحيوي Streptomycin Sulphate (عن طريق إذابة 0.6 غ من المضاد الحيوي/100 مل ماء مقطر ثم إضافة 1 مل من المحلول إلى المستنبت)، من الأنسجة المصابة بعد غسلها وتقطيعها، ثم تعقيمها بمحلول هيبوكلوريت الصوديوم 1% لمدة 5 دقائق وغسلها بالماء المقطر وتجفيفها. وحضرت مزارع فطرية من كل عزلة بدءاً من بوغة واحدة، وحضنت لمدة أسبوع عند درجة حرارة 22 °س. تم تشخيص الفطر *B. cinerea* مخبرياً باستخدام المجهر الضوئي بالاعتماد على الخصائص المورفولوجية للفطر من خلال شكل الميسليوم (المشيجة)، وشكل الحوامل البوغية العنقودية المميزة للفطر *B. cinerea* وشكل الأبواغ ووجود الأجسام الحجرية ضمن أطباق البتري (Holz et al., 2007).

اختبار القدرة الإراضية

استخدمت ثمار التفاح من الصنف Golden Delicious لاختبار القدرة الإراضية للعزلات المدروسة والبالغ عددها 48 عزلة فطرية، حيث أن فطر *B. cinerea* يسبب خسائر اقتصادية على التفاح أثناء التخزين (Samuel et al., 2012). وحُضر المعلق البوغي لفطر *B. cinerea* من خلال جمع الأبواغ الكونيدية بواسطة ماء معقم من سطح مستعمرة

(Elad et al., 2007). تختلف وبائية مرض العفن الرمادي على محاصيل البيوت المحمية عنها على المحاصيل الحقلية والبساتينية، حيث أن قابلية التنبؤ عن المرض تكون أكثر في الحقل وأقل اعتماداً فيها على الطقس في الزراعة المحمية (Aleid & Wubben, 2007).

تلقي الزراعة المحمية اهتماماً ملحوظاً في سورية حيث يبلغ عدد البيوت البلاستيكية 157 ألف بيت بلاستيكي في عام 2018 (المجموعة الإحصائية السنوية، 2018)، حيث تتميز بزيادة الإنتاجية لمحاصيل الخضار ونباتات الزينة وذلك على مدار العام. أشارت الاستطلاعات الميدانية على مدار أربع سنوات (2014-2017) إلى انتشار مرض العفن الرمادي ضمن البيوت المحمية مسبباً خسائر في الإنتاج وأضرار كبيرة على المحاصيل (وفق معطيات غير منشورة من قبل العاملين في الوحدات الإرشادية المنتشرة في الساحل السوري).

على الرغم من أهمية الفطر *B. cinerea* عالمياً إلا أن المعلومات المتوفرة قليلة عن مدى انتشاره وتنوعه الوراثي في سورية، لذلك هدفت هذه الدراسة إلى تقصي انتشار الفطر *B. cinerea* على محاصيل البندورة/الطماطم، الكوسا والبادنجان ضمن البيوت المحمية في الساحل السوري، وعزل الفطر الممرض ودراسة القدرة الإراضية ومدى التنوع الوراثي بين بعض عزلاته، مما يوفر معلومات أولية ومحلية عن فطر العفن الرمادي في سورية.

مواد البحث وطرائقه

تقصي انتشار الإصابة بالعفن الرمادي

أجري مسح حقلّي بهدف تقصي انتشار مرض العفن الرمادي في البيوت المحمية المزروعة بمحاصيل الخضار المختلفة (البندورة/الطماطم، الكوسا، والبادنجان) في الساحل السوري، من خلال زيارات دورية خلال الموسمين الزراعيين 2015/2016 و2016/2017 في مرحلة النضج الثمري وخلال الفترة الممتدة بين كانون الأول/ديسمبر ونيسان/أبريل، حيث تكون الظروف المناخية من حرارة منخفضة ورطوبة عالية مناسبة لانتشار مرض العفن الرمادي. شملت الدراسة 158 بيتاً بلاستيكيّاً في عام 2016 ضمت 80 بيتاً في محافظة اللاذقية موزعة في قرى دوير الخطيب والقبو وسلورين وعين العروس، و78 بيتاً في محافظة طرطوس موزعة في قرى مجدلون البحر وبيت كمونة وحريصون وقرير. أما في عام 2017، فقد شملت الدراسة 144 بيتاً بلاستيكيّاً ضمت 69 و75 بيتاً في كل من محافظتي اللاذقية وطرطوس، على التوالي، توزعت في المواقع المذكورة آنفاً والتي تمت زيارتها خلال الموسم السابق.

للتخلص من بقايا الكحول، ومن ثم أُذيب الراسب في الماء المعقم الخالي من أنزيمات النيوكلياز وحُصِن عند حرارة -30 °س لحين الاستخدام. تم التأكد من سلامة DNA غير المقطع بترحيبه على هلامة الأغاروز 1%، كما تم حساب تركيز DNA باستخدام جهاز مقياس الطيف الضوئي.

البيانات المستخدمة وتقنية تضخيم DNA المتعدد شكلياً RAPD وتكرار التسلسلات البسيطة البينية ISSR

لدراسة التنوع الوراثي استخدمت تقانة التضخيم العشوائي لل DNA المتعدد شكلياً Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD-PCR) واستخدم فيها 18 بادناً عشوائياً، وتقنية مكررات التسلسلات البسيطة البينية Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) واستخدم فيها 10 بادئات (جدول 1).

أجري تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في حجم قدره 25 ميكرو لتر باستخدام Master mix (Promega)، واستخدم الدور الحراري peqSTAR 96 Universal Gradient، حيث تمت برمجته لتقانة RAPD وفق ما يلي: دورة واحدة عند 94 °س لمدة خمس دقائق، ثم 45 دورة تحت الشروط التالية: 94 °س لمدة 30 ثانية و 40 °س لمدة 30 ثانية و 72 °س لمدة دقيقتين. أنهى التفاعل عند حرارة 72 °س لمدة عشر دقائق. كما تمت برمجة الدور الحراري لتقنية ISSR كما يلي: دورة واحدة عند 94 °س لمدة خمس دقائق، ثم 45 دورة بالشروط التالية: 94 °س لمدة 45 ثانية و 48 °س لمدة 45 ثانية و 72 °س لمدة دقيقة ونصف، وأنهى التفاعل أيضاً عند 72 °س لمدة عشر دقائق. فصلت نواتج عملية التضخيم على هلامة الأغاروز 1.5% والتي تحوي بروميد الإيثيديوم في محلول رحلان 1X TBE. وتقت النتائج بتصوير الهلامة باستخدام الأشعة فوق البنفسجية.

التحليل الإحصائي

حللت النتائج باستخدام برنامج XLSTAT إصدار 2012 (Addinsoft, 2012)، حيث حللت نتائج المسح الحقلية لمرض العفن الرمادي ونتائج القدرة الإراضية لبعض العزلات الفطرية باستخدام اختبار one way ANOVA (Kruskal-Wallace) ومقارنة الفروق بين المتوسطات بحساب أقل فرق معنوي LSD عند مستوى معنوية 5%. كما حللت نتائج التوصيف الجزيئي إحصائياً، حيث أُشير لوجود الحزمة 1 وغيابها 0 ورُسم مخطط التحليل العنقودي اعتماداً على مصفوفة التشابه (Similarity Matrix) لمعامل Jaccard's coefficient (Rohlf, 1993)، وحُسب التباين بين مجموعات التحليل العنقودي.

بعمر 14 يوماً، ثم صفيت بوساطة عدة طبقات من الشاش المعقم لإزالة قطع الميسليوم، وضبط تركيز المعلق بوساطة شريحة ميليمترية Thoma-Kammer (Marienfeld, Germany) إلى التركيز 10^7 بوغ/مل بإضافة ماء مقطر معقم.

تم إعداد شرائح التفاح المعقمة بالكحول الإيثيلي 70% بحقنها بالمعلق البوغي بمعدل ثلاثة مكررات لكل عذلة بما فيها معاملة الشاهد غير المعدة، حيث حقن النصف الأيمن من شريحة التفاح بـ 200 ميكرو لتر من المعلق البوغي في كل ثقب وبعمق 10 مم، بينما حقن النصف الأيسر بالماء المقطر المعقم، وحضنت لمدة أربعة أيام ضمن غرفة العزل المعقمة عند حرارة 21 °س. وبعد ذلك تم قياس قطر دائرة تحلل الأنسجة باستخدام السلم التالي: 1 = عذلة ذات قدرة إراضية ضعيفة جداً، حيث كان قطر دائرة تحلل الأنسجة في حدود 1.9-2.0 مم؛ 2 = عذلة ذات قدرة إراضية ضعيفة، حيث كان قطر دائرة تحلل الأنسجة في حدود 2-5 مم؛ 3 = عذلة ذات قدرة إراضية متوسطة، حيث كان قطر دائرة تحلل الأنسجة في حدود 5-10 مم؛ 4 = عذلة ذات قدرة إراضية عالية، حيث كان قطر دائرة تحلل الأنسجة في حدود 10-15 مم؛ 5 = عذلة ذات قدرة إراضية عالية جداً، حيث كان قطر دائرة تحلل الأنسجة في حدود 15-20 مم.

استخلاص الحمض النووي للفطر

اختيرت 18 عذلة من عزلات الفطر *B. cinerea*، بحيث اختلفت العزلات فيما بينها من حيث الموقع والعائل النباتي والقدرة الإراضية. استخلص DNA الفطر *B. cinerea* وفق الخطوات الموصى بها من قبل Hofman & Winston (1987). تتلخص طريقة الاستخلاص بقشط المشيجة الفطرية من الطبقة البتري ووضعها في أنبوب أبنودورف يحوي كرات زجاجية أقطارها (212-300 ميكرومتر)، ثم أُضيف 700 ميكرو لتر من محلول (2% Triton-x 100، 1% SDS، 100 ميلي مول NaCl، 10 ميلي مول Tris-HCL، 150 ميلي مول EDTA) و 500 ميكرو لتر من محلول الاستخلاص (كلوروفورم وإيزو أميل الكحول 24:1). وضعت الأنابيب على هزاز ميكانيكي لمدة خمس دقائق عند أعلى سرعة، تلاها طرد مركزي للعينات بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة خمس دقائق، ثم أخذ 500 ميكرو لتر من الجزء العلوي الرائق ونقل إلى أنبوب أبنودورف جديد وأضيف 500 ميكرو لتر من خلاص الصوديوم (3 M, pH 5.2) و 1 مل من الإيثانول المبرد 96% لترسيب DNA، حُصِنَت الأنابيب في المجمدة عند حرارة -20 °س لمدة 30 دقيقة، ثم وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق بسرعة 12000 دورة/دقيقة. وتم التخلص من الرائق وغسل الراسب مرتين بالإيثانول 70%. جُففت الأنابيب في جو المختبر

جدول 1. التباين الوراثي لـ 12 بادئة في تقانة RAPD و 6 بادئات في تقانة ISSR والتي تمت دراستها على عزلات الفطر *B. cinerea* المعزولة من عوائل نباتية مختلفة وعدة مواقع في الساحل السوري.

Table 1. Genetic Diversity revealed by using 12 RAPD-PCR primers and 6 ISSR primers by testing *B. cinerea* isolates from different host plants collected from many locations along the Syrian Coast.

% للتعددية الشكلية % Polymorphism	الحزم المتعددة شكلياً Polymorphic fragments	الحزم المضخمة Amplified fragments	التتابع النيكلوتيدي Sequence 5' to 3'	البادئ Primer
RAPD				
85.71	6	7	5' GAGGATCCCT 3'	OPF-02
85.71	6	7	5' ACGGTACCAG 3'	OPF-12
83.30	5	6	5' TGTAGCTGGG 3'	OPH-09
100.00	6	6	5' TCTCAGCTGG 3'	OPH-16
85.71	6	7	5' AATCGGGCTG 3'	OPA-04
85.71	6	7	5'GTGATCGCAG 3'	OPA-10
80.00	4	5	5' CAATCGCCGT 3'	OPA-11
100.00	4	4	5' CAGCACCCAC 3'	OPA-13
80.00	4	5	5' TTCCGAACCC 3'	OPA-15
100.00	5	5	5' GTTGCGATCC 3'	OPA-20
85.71	6	7	5' ACTGGCCTGA 3'	OPA-07
80.00	4	5	5' CCCGATTCGG 3'	OPE-13
87.65	62	71		Total المجموع
	5.2	5.9		Average المتوسط
ISSR				
100.00	9	9	5' GACACGACACGACAC 3'	(GACAC) ₃
100.00	5	5	5' GACAGACAGACAGACA 3'	(GACA) ₄
88.89	8	9	5' TCCTCCTCCTCCTCC 3'	(TCC) ₅
77.78	7	9	5' AGGAGGAGGAGGAGGAGG 3'	(AGG) ₆
75.00	6	8	5' ACTGACTGACTGACTG 3'	(ACTG) ₄
87.50	7	8	5' AGAGGTGGGCAGGTG 3'	ISSR
87.50	42	48		Total المجموع
	7	8		Average المتوسط

النتائج

المسح الحقل

خلال موسم 2017 بين المواقع المدروسة لمحصول البندورة/الطماطم. أما بالنسبة لمحصول الكوسا، فقد بلغت نسبة البيوت المحمية المصابة 78.64% و 73.73% وبمتوسط إصابة 11.35% و 10.58% خلال الموسمين 2016 و 2017، على التوالي (جدول 3). وقد تباينت نسب الإصابة بالعفن الرمادي على محصول الكوسا بين المواقع المدروسة وذلك في كلا الموسمين 2016 و 2017 حيث بلغت أعلى نسبة إصابة في موقع بيت كمونة 15%، وأقل نسبة إصابة 8% في مجدولون البحر خلال الموسم 2016 في حين سجلت أعلى نسبة إصابة خلال الموسم 2017 في موقعي سلورين ومجدولون البحر بنسبة بلغت 13.3% لكل منهما، بينما ظهرت أقل نسبة إصابة في كل من القبو وبيت كمونة بنسبة 8%. أما بالنسبة لمحصول الباذنجان، فلم تظهر النتائج وجود فروق معنوية في نسبة الإصابة بين المواقع المدروسة في كلا الموسمين، في حين بلغ متوسط نسبة الإصابة 5.4% و 5.8%، ونسبة عدد البيوت المحمية المصابة 43.2% و 35.5% خلال الموسمين 2016 و 2017، على التوالي (جدول 4).

بينت نتائج المسح الحقل ظهور أعراض الإصابة بالفطر *B. cinerea* في كلا الموسمين الزراعيين 2016 و 2017 وعلى مختلف المحاصيل المحمية في المواقع المدروسة، حيث شوهدت أعراض المرض على شكل أعفان على الثمار وتقرحات على السوق في مناطق التقليل وقص الأوراق ومنطقة اتصال الثمار بالعنق ولفحة وتبقعات رمادية على الأزهار والأوراق. بالنسبة لمحصول البندورة/الطماطم، بلغت نسبة البيوت المحمية المصابة (تردد المرض) 59.61% و 55.06%، وبمتوسط نسبة إصابة 6.53% و 7.63% خلال الموسمين 2016 و 2017، على التوالي (جدول 2). وقد أظهرت النتائج وجود فروق معنوية في نسبة الإصابة بين المواقع المدروسة خلال موسم 2016، حيث سجلت أعلى نسبة إصابة في موقع دوير الخطيب 10.4% بالمقارنة مع بقية المواقع المدروسة بينما سجلت أقل نسبة إصابة 4% في موقع قريز، في حين لم تظهر فروق معنوية في نسبة الإصابة

جدول 2. مواقع المسح الحقلية والنسب المئوية للإصابة بمرض العفن الرمادي على محصول البندورة/الطماطم المحمي في الساحل السوري خلال الموسمين 2016 و2017.

Table 2. Sampling sites and infection rate of gray mold in greenhouse tomato along the Syrian coast, during 2016 and 2017 growing seasons.

نسبة الإصابة % of infection		نسبة البيوت المحمية المصابة % of greenhouses infected		عدد البيوت المحمية المصابة No. of greenhouses infected		عدد البيوت المحمية الممسوحة No. of greenhouses surveyed		Location	الموقع
2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016		
Lattakia اللاذقية									
6.4 a	10.4 a	66.7	54.6	6	6	9	11	Dweer Alkhateeb	دوير الخطيب
6.0 a	5.6 b	77.7	71.4	4	5	6	7	Alkabo	القبو
8.0 a	7.2 ab	50.0	62.5	3	5	6	8	Saloren	سلورين
5.3 a	5.6 b	37.5	55.6	3	5	8	9	Aen Alarous	عين العروس
Tartous طرطوس									
9.3 a	6.0 b	42.9	66.7	3	4	7	6	Majdaloun Albahr	مجدلون البحر
10.0 a	6.7 b	60.0	37.5	3	3	5	8	Beit Kammunah	بيت كمونة
10.0 a	6.7 b	50.0	85.7	4	6	8	7	Hrisson	حريصون
6.0 a	4.0 b	66.7	42.9	4	3	6	7	Qreir	قرير
				30	37	55	63	Total	المجموع
				Average				المتوسط	
7.63	6.53	55.06	59.61						
5.645	3.779							LSD _{0.05}	

القيم المتبوعة بأحرف متشابهة في العمود نفسه لا يوجد بينها فروق معنوية عند احتمال 5%.

Values followed by the same letters in the same column are not significantly different at P=0.05.

جدول 3. مواقع المسح الحقلية والنسب المئوية للإصابة بمرض العفن الرمادي على محصول الكوسا المحمي في الساحل السوري خلال الموسمين 2016 و2017.

Table 3. Sampling sites and infection rate of gray mold in squash greenhouses along the Syrian coast, during 2016 and 2017 growing seasons.

نسبة الإصابة % of infection		نسبة البيوت المحمية المصابة % of greenhouses infected		عدد البيوت المحمية المصابة No. of greenhouses infected		عدد البيوت المحمية الممسوحة No. of greenhouses surveyed		Location	الموقع
2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016		
Lattakia اللاذقية									
10.0 abc	12.8bc	71.4	75.0	5	6	7	8	Dweer Alkhateeb	دوير الخطيب
8.0 c	9.0 ab	100.0	100.0	4	4	4	4	Alkabo	القبو
13.3 a	10.0 ab	60.0	66.7	3	4	5	6	Saloren	سلورين
9.3 ab	13.3 bc	100.0	85.7	6	6	6	7	Aen Alarous	عين العروس
Tartous طرطوس									
13.3 a	8.0 c	50.0	75.0	3	6	6	8	Majdaloun Albahr	مجدلون البحر
8.0 c	15.0 a	66.7	80.0	4	4	6	5	Beit Kammunah	بيت كمونة
10.7 abc	10.7 abc	75.0	66.7	6	6	8	9	Hrisson	حريصون
12.0 bc	12.0 abc	66.7	80.0	4	4	6	5	Qreir	قرير
				35	40	48	52	Total	المجموع
				Average				المتوسط	
10.58	11.35	73.73	78.64						
3.319	4.399							LSD _{0.05}	

القيم المتبوعة بأحرف متشابهة في العمود نفسه لا يوجد بينها فروق معنوية عند احتمال 5%.

Values followed by the same letters in the same column are not significantly different at P=0.05.

جدول 4. مواقع المسح الحقلية والنسب المئوية للإصابة بمرض العفن الرمادي على محصول الباذنجان المحمي في الساحل السوري خلال الموسمين 2016 و2017.

Table 4. Sampling sites and infection rate of gray mold in eggplant greenhouses along the Syrian coast, during 2016 and 2017 growing seasons.

نسبة الإصابة % of infection		نسبة البيوت المحمية المصابة % of greenhouses infected		عدد البيوت المحمية المصابة No. of greenhouses infected		عدد البيوت المحمية الممسوحة No. of greenhouses surveyed		Location	الموقع
2017	2016	2017	2016	2017	2016	2017	2016		
اللاذقية Lattakia									
8.0 a	6.0 a	40.0	60.0	2	3	5	5	Dweer Alkhateeb	دوير الخطيب
6.7 a	4.0 a	50.0	33.3	3	2	6	6	Alkabo	القبو
8.0 a	6.0 a	25.0	40.0	1	2	4	5	Saloren	سلورين
8.0 a	4.0 a	33.3	25	1	1	3	4	Aen Alarous	عين العروس
طرطوس Tartous									
5.3 a	6.0 a	42.9	33.3	3	2	7	6	Majdaloun Albahr	مجدلون البحر
4.0 a	5.3 a	50.0	50.0	3	3	6	6	Beit Kammunah	بيت كمونة
6.7 a	8.0 a	42.9	37.5	3	3	7	8	Hrisson	حريصون
0	4.0 a	0.0	66.7	0	2	3	3	Qreir	قرير
				16	18	41	43	Total	المجموع
				5.8	5.4	35.5	43.2	Average	المتوسط
4.456		4.307						LSD _{0.05}	

القيم المتبوعة بأحرف متشابهة في العمود نفسه لا يوجد بينها فروق معنوية عند احتمال 5%.

Values followed by the same letters in the same column are not significantly different at P=0.05.

التنوع الوراثي

نتائج اختبار RAPD

أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي لـ DNA العزلات الفطرية التحام 12 بادئة من البادئات المستخدمة في موقع واحد أو أكثر من جينوم الفطر *B. cinerea*. تراوح عدد الحزم الناتجة عن كل بادئة ما بين 4-7 حزمات بمتوسط 5.9 حزمة لكل بادئة. بلغ العدد الكلي للحزم المضخمة 71 حزمة يوجد بينها 63 حزمة متعددة شكلياً بمتوسط 5.3 حزمة متباينة لكل بادئة ونسبة تعددية شكلية وصلت إلى 87.65%. بلغت أعلى نسبة مئوية للتعددية الشكلية عند كل من البادئات OPA-13 و OPH-16 بنسبة وصلت إلى 100% في حين أعطي كل بادئة 4 و 6 حزم متعددة شكلياً على التوالي، بينما لم تتجاوز التعددية الشكلية النسبة 80% لكل من البادئات OPA-11، OPA-15 و OPE-13 في حين أعطت كل منها 4 حزم متعددة شكلياً (جدول 6). يُظهر كل من شكل 1 الحزم المضخمة الناتجة عن التحام كل من البادئات OPA-04 و OPA-13 في موقع واحد أو أكثر من جينوم الفطر *B. cinerea*.

اختبار القدرة الإمراضية

ظهرت أعراض العدوى الاصطناعية بالفطر *B. cinerea* على شرائح التفاح على هيئة بقع مائية تحولت إلى اللون البني لاحقاً، اتسعت وامتدت داخل الأنسجة مع تقدم الزمن. تباينت القدرة الإمراضية لمختلف العزلات الفطرية المدروسة من منطقة لأخرى ومن عائل نباتي لآخر، وذلك اعتماداً على تباين شدة الإصابة للعزلات الفطرية على ثمار التفاح وفق سلم الإصابة المستخدم (1-5)، حيث سجلت أعلى شدة إصابة عند عزلات الفطر T1 و T18 المأخوذة من محصول البندورة /الطماطم في كل من موقع دوير الخطيب وحريصون، على التوالي، في حين سجلت أقل شدة إصابة عند عزلات الفطر S7، S9، E4 و E13 المأخوذة من محصولي الكوسا والباذنجان في كل من عين العروس، مجدلون البحر، سلورين وقرير، على التوالي (جدول 5).

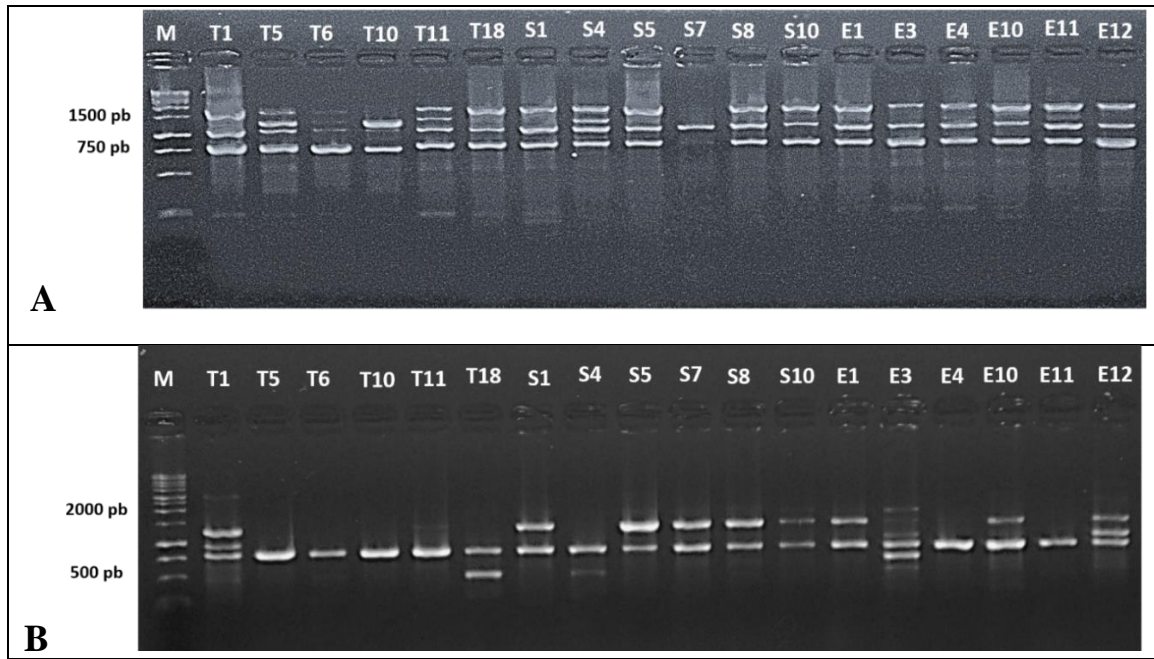
جدول 5. القدرة الإمراضية لعزلات الفطر *B. cinerea* المعزولة من محاصيل الخضار المحمية في الساحل السوري وفق السلم 1- 5 لاختبار تم على ثمار التفاح.

Table 5. Pathogenicity of *B. cinerea* isolates from greenhouse vegetable crops along the Syrian coast based on a 1-5 scale of disease severity on apple fruits.

		شدة الإصابة وفق سلم 5-1					
Pathogenicity	القدرة الإمراضية	Severity (1-5 scale)	رمز العزلة Code	Plant Host	العائل النباتي	Location	الموقع
High	عالية	4.00 a	T1	Tomato	بندورة/طماطم	Dweer Alkhateeb	دوير الخطيب
Medium	متوسطة	3.00 abc	T2	Tomato	بندورة/طماطم	Dweer Alkhateeb	دوير الخطيب
Weak	ضعيفة	2.67 bcde	T3	Tomato	بندورة/طماطم	Dweer Alkhateeb	دوير الخطيب
Medium	متوسطة	3.00 abcd	S1	Squash	كوسا	Dweer Alkhateeb	دوير الخطيب
Medium	متوسطة	3.00 abcd	S2	Squash	كوسا	Dweer Alkhateeb	دوير الخطيب
Weak	ضعيفة	2.67 bcde	E1	Eggplant	باندنجان	Dweer Alkhateeb	دوير الخطيب
Weak	ضعيفة	2.00 def	E2	Eggplant	باندنجان	Dweer Alkhateeb	دوير الخطيب
Weak	ضعيفة	2.3 cdef	T4	Tomato	بندورة/طماطم	Alkabo	القبو
Medium	متوسطة	3.00 abcd	T5	Tomato	بندورة/طماطم	Alkabo	القبو
Weak	ضعيفة	2.33 cdef	S3	Squash	كوسا	Alkabo	القبو
Medium	متوسطة	3.00 abcd	S4	Squash	كوسا	Alkabo	القبو
Weak	ضعيفة	2.00 def	E3	Eggplant	باندنجان	Alkabo	القبو
Medium	متوسطة	3.33 abc	T6	Tomato	بندورة/طماطم	Saloren	سلورين
Weak	ضعيفة	2.33 cdef	T7	Tomato	بندورة/طماطم	Saloren	سلورين
Medium	متوسطة	3.00 abcd	T8	Tomato	بندورة/طماطم	Saloren	سلورين
Medium	متوسطة	3.33 abc	S5	Squash	كوسا	Saloren	سلورين
Very weak	ضعيفة جداً	1.33 f	E4	Eggplant	باندنجان	Saloren	سلورين
Weak	ضعيفة	2.30 cdef	E5	Eggplant	باندنجان	Saloren	سلورين
Medium	متوسطة	3.33 abc	T9	Tomato	بندورة/طماطم	Aen Alarous	عين العروس
Weak	ضعيفة	2.67 bcde	T10	Tomato	بندورة/طماطم	Aen Alarous	عين العروس
Weak	ضعيفة	2.33 cdef	S6	Squash	كوسا	Aen Alarous	عين العروس
Very weak	ضعيفة جداً	1.33 f	S7	Squash	كوسا	Aen Alarous	عين العروس
Weak	ضعيفة	2.33 cdef	E6	Eggplant	باندنجان	Aen Alarous	عين العروس
Weak	ضعيفة	2.00 def	E7	Eggplant	باندنجان	Aen Alarous	عين العروس
Weak	ضعيفة	2.67 bcde	T11	Tomato	بندورة/طماطم	Majdaloun Albahr	مجدلون البحر
Weak	ضعيفة	2.67 bcde	T12	Tomato	بندورة/طماطم	Majdaloun Albahr	مجدلون البحر
Weak	ضعيفة	2.00 def	T13	Tomato	بندورة/طماطم	Majdaloun Albahr	مجدلون البحر
Weak	ضعيفة	2.67 bcde	S8	Squash	كوسا	Majdaloun Albahr	مجدلون البحر
Very weak	ضعيفة جداً	1.33 f	S9	Squash	كوسا	Majdaloun Albahr	مجدلون البحر
Very weak	ضعيفة جداً	1.67 ef	E8	Eggplant	باندنجان	Majdaloun Albahr	مجدلون البحر
Weak	ضعيفة	2.67 bcde	E9	Eggplant	باندنجان	Majdaloun Albahr	مجدلون البحر
Weak	ضعيفة	2.67 bcde	T14	Tomato	بندورة/طماطم	Beit Kammunah	بيت كمونة
Weak	ضعيفة	2.67 bcde	T15	Tomato	بندورة/طماطم	Beit Kammunah	بيت كمونة
Weak	ضعيفة	2.33 cdef	S10	Squash	كوسا	Beit Kammunah	بيت كمونة
Weak	ضعيفة	2.00 def	S11	Squash	كوسا	Beit Kammunah	بيت كمونة
Weak	ضعيفة	2.00 def	E10	Eggplant	باندنجان	Beit Kammunah	بيت كمونة
Medium	متوسطة	3.00 abcd	T16	Tomato	بندورة/طماطم	Hrisson	حريصون
Weak	ضعيفة	2.00 def	T17	Tomato	بندورة/طماطم	Hrisson	حريصون
High	عالية	4.00 a	T18	Tomato	بندورة/طماطم	Hrisson	حريصون
Weak	ضعيفة	2.00 def	S12	Squash	كوسا	Hrisson	حريصون
Very weak	ضعيفة جداً	1.67 ef	S13	Squash	كوسا	Hrisson	حريصون
Very weak	ضعيفة جداً	1.67 ef	E11	Eggplant	باندنجان	Hrisson	حريصون
Weak	ضعيفة	2.33 cdef	T19	Tomato	بندورة/طماطم	Qreir	قرير
Medium	متوسطة	3.00 abcd	T20	Tomato	بندورة/طماطم	Qreir	قرير
Medium	متوسطة	3.33 abc	T21	Tomato	بندورة/طماطم	Qreir	قرير
Weak	ضعيفة	2.00 def	S14	Squash	كوسا	Qreir	قرير
Very weak	ضعيفة جداً	1.67 ef	E12	Eggplant	باندنجان	Qreir	قرير
Very weak	ضعيفة جداً	1.33 f	E13	Eggplant	باندنجان	Qreir	قرير
		1.253					أقل فرق معنوي LSD

القيم المتبوعة بأحرف متشابهة في نفس العمود لا يوجد بينها فروق معنوية عند احتمال 5%.

Values followed by the same letters in the same column are not significantly different at P=0.05.



شكل 1. نتائج التضخيم باستخدام البادئ OPA-13 (A) و البادئ OPA-4 (B) مع المادة الوراثية للفطر *B. cinerea* وفصل الناتج كهربائياً على هلامة أغاروز 1.5%. M = سلم معياري لحجم قطع الدنا.

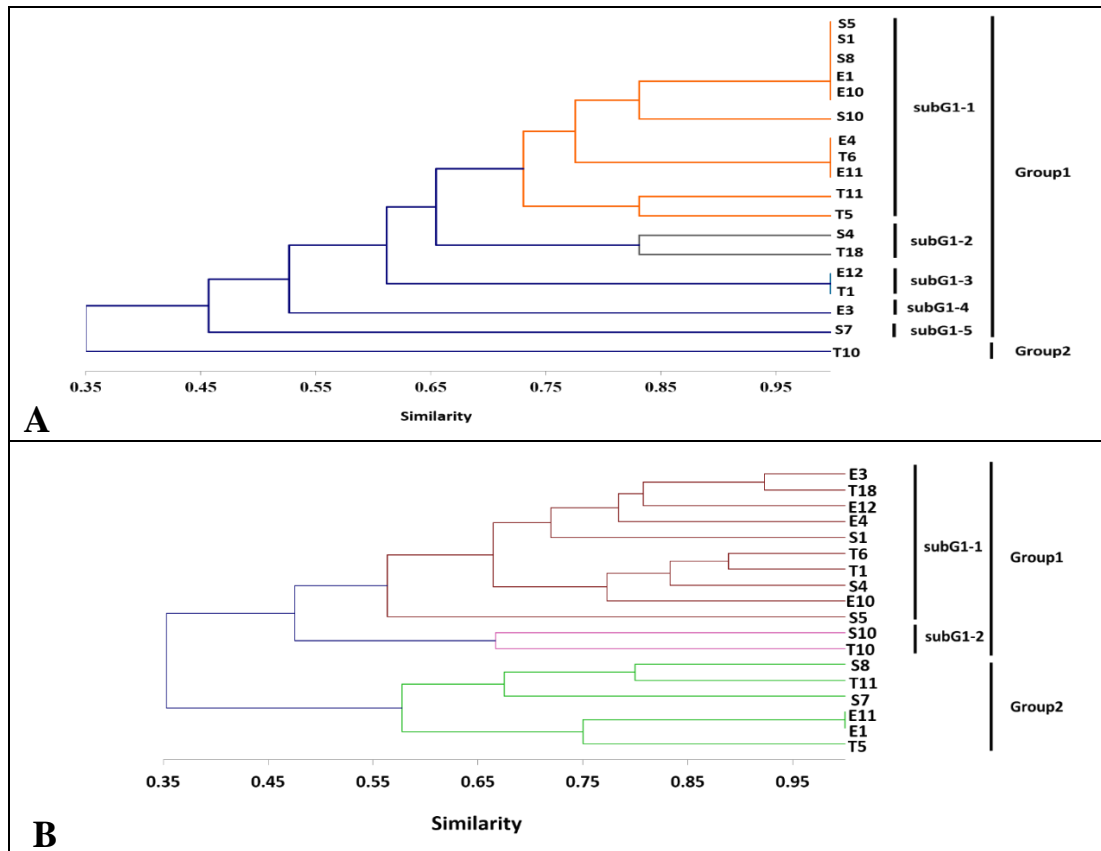
Figure 1. Amplification results of using primer OPA-13 (A) and primer OPA-4 (B) with DNA of *B. cinerea* and separated electrophoretically on 1.5% agarose gel. M= DNA ladder of 100 bp.

تباين 87.5%. بلغت أقل نسبة مئوية للتعددية الشكلية 75% عند البادئة (ACTG)₄ الذي أعطى 6 حزم متعددة شكلياً، في حين بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 100% عند كل من البادئات (GACAC)₃ و (GACA)₄ والذي أعطى كل منهما 9 و 5 حزم متعددة شكلياً، على التوالي (جدول 6). يُظهر كل من الشكل 3 الحزم المضخمة الناتجة عن التحام كل من البادئات (GACAC)₃ و (GACA)₄ في موقع واحد أو أكثر من جينوم الفطر *B. cinerea*. أظهر التحليل العنقودي المعتمد على مصفوفة التشابه (Similarity Matrix) لمعامل Jaccard's coefficient وذلك لنواتج تقنية ISSR على جينوم عزلات الفطر *B. cinerea* انقسام العزلات الفطرية إلى مجموعات عكست درجة القرابة الوراثية فيما بينها، حيث انقسمت أيضاً العزلات المدروسة إلى مجموعتين رئيسيتين عند قيمة تشابه 35% (شكل B-2)، وانقسمت المجموعة الأولى G1 البالغ نسبتها 66.67% من العزلات المدروسة إلى تحت مجموعتين، شكلت كل من تحت المجموعة الأولى subG1-1 ما نسبته 83.33% وتحت المجموعة الثانية subG1-2 ما نسبته 16.67% من عزلات المجموعة الأولى G1. في حين شكلت المجموعة الثانية G2 ما نسبته 33.33% من العزلات المدروسة.

أظهر التحليل العنقودي المعتمد على مصفوفة التشابه (Similarity Matrix) لمعامل Jaccard's coefficient لنواتج تقانة RAPD على جينوم عزلات الفطر *B. cinerea* انقسام العزلات الفطرية إلى مجموعات عكست درجة القرابة الوراثية فيما بينها، حيث انقسمت العزلات المدروسة إلى مجموعتين رئيسيتين عند قيمة تشابه 35% (شكل A-2) وانقسمت المجموعة الأولى G1 والتي نسبتها 94.5% من العزلات المدروسة إلى خمس تحت مجموعات، شكلت تحت المجموعة الأولى subG1-1 ما نسبته 64.72% من عزلات المجموعة G1، وشكلت كل من تحت المجموعة الثانية subG1-2 والثالثة subG1-3 ما نسبته 11.76%، أما تحت المجموعة الرابعة subG1-4 والخامسة subG1-5 فشكلت كل منهما نسبة 5.88% من عزلات المجموعة G1. في حين انفصلت العزلة T10 مشكلة المجموعة الثانية G2 وينسبة 5.5% من العزلات المدروسة.

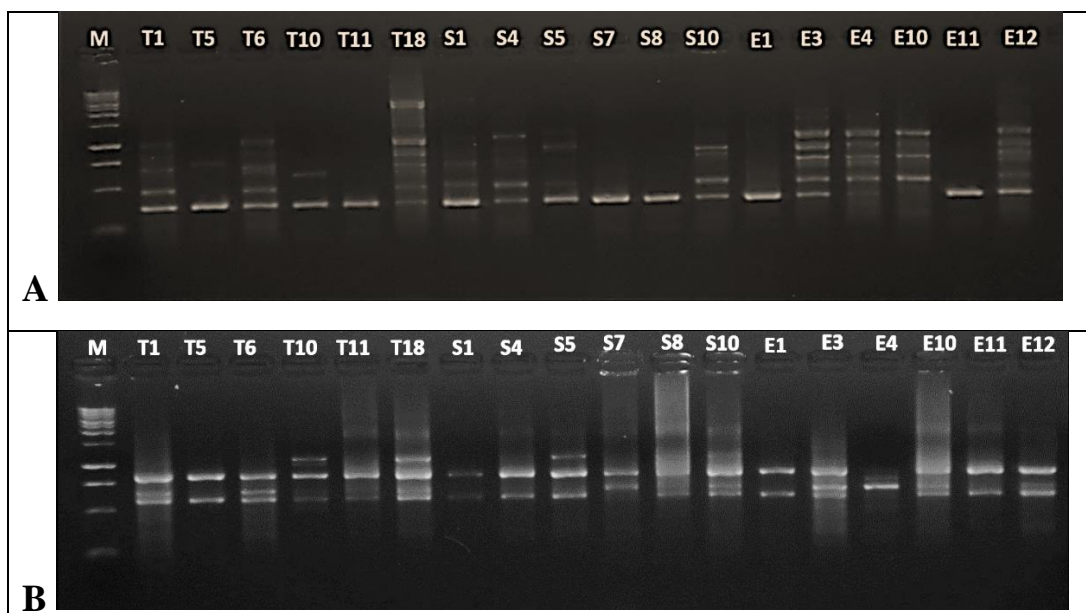
نتائج اختبار ISSR

تمكنت ستة بادئات من الالتحام في موقع واحد أو أكثر من جينوم الفطر *B. cinerea*، حيث أعطت 48 حزمة مضخمة من بينها 42 حزمة متعددة شكلية بمتوسط 7 حزم متعددة شكلياً لكل بادئة وينسبة



شكل 2. التحليل العنقودي على عزلات الفطر *B. cinerea* اعتماداً على نتائج RAPD (A) و ISSR (B). (Group = مجموعة، SubG = تحت مجموعة).

Figure 2. Cluster analysis of *B. cinerea* isolates with RAPD (A) and ISSR (B).

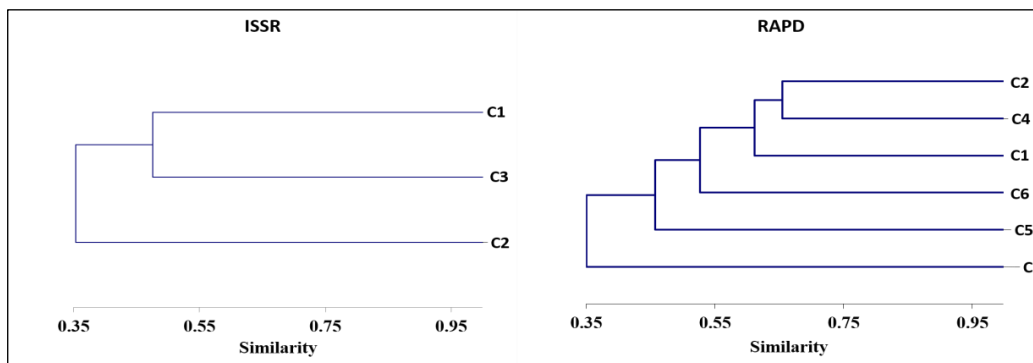


شكل 3. نتائج التضخيم باستخدام البادئة (GACA)₄ (A) و البادئ (GACAC)₃ (B) مع المادة الوراثية للفطر *B. cinerea* والفصل الكهربائي على هلامة أغاروز 1.5% M = سلم معياري لحجم الدنا.

Figure 3. Amplification results of using primer (GACA)₄ (A) and (GACAC)₃ (B) with DNA of *B. cinerea* followed by separation electrophoretically on 1.5% agarose gel. M= DNA ladder of 100 bp.

مما يبين وجود ارتباط منخفض بين نتائج التقنيتين، حيث اختلف تجمع العزلات الفطرية ضمن مجموعات في تقانة RAPD عن تجمعها في تقانة ISSR في التحليل العنقودي. وبالمقارنة بين الشجرة الوراثية الناتجة عن تقانة RAPD مع تلك الناتجة عن تقانة ISSR يتبين أن تقانة RAPD كانت أكثر كفاءة في إظهار التباين الوراثي بين العزلات الفطرية من تقانة ISSR، حيث توزعت العزلات الفطرية في 6 مجموعات في حين اقتصر توزع العزلات في ثلاث مجموعات في تقانة ISSR (شكل 4).

بينت نتائج التحليل العنقودي وشجرة القرابة الوراثية لكل من تقانتي RAPD و ISSR أن كل تحت مجموعة من عزلات الفطر *B. cinerea* تضم عزلات تختلف في عوائلها وتوزعها الجغرافي وقدرتها الإراضية (جدول 6). كما أظهرت النتائج عدم التطابق بين نتائج RAPD و ISSR، حيث لم تتجمع العزلات المدروسة سواء المتشابهة أو المختلفة وراثياً فيما بينها بشكل متشابه عند استخدام كلتا التقانيتين. أظهر استخدام اختبار Mantel بين مصفوفتي التشابه وفق معامل Jaccard لنتائج كل من تقانة RAPD و ISSR ($P > 0.064$ ، $P > 0.05$).



شكل 4. التحليل العنقودي لعزلات الفطر *B. cinerea* في كل من تقانة RAPD و ISSR. **Figure 4.** Cluster analysis of *B. cinerea* isolates with RAPD and ISSR.

جدول 6. مجموعات التحليل العنقودي لكل من تقانة RAPD و ISSR والنسبة المئوية لكل مجموعة. **Table 6.** Grouping resulted from cluster analysis of RAPD and ISSR and its percentages.

نسبة المجموعة	نسبة تحت المجموعة	رمز العزلة الفطرية	المجموعات وتحت المجموعات
Group percentage	Subgroup percentage	Isolate Code	Groups and subgroups
94.50	64.72	T5, T6, T11, S1, S5, S8, S10, E1, E4, E10, E11	subG1-1
	11.76	S4, T18	subG1-2
	11.76	E12, T1	subG1-3
	5.88	E3	subG1-4
	5.88	S7	subG1-5
	100.00	17	Total G1 مجموع
5.50	100.00	T10	G2
		1	Total G2 مجموع
100.00		18	Total G1+G2 مجموع
ISSR			
66.67	83.33	T1, T6, T18, S1, S4, S5, E3, E4, E10, E12	subG1-1
	16.67	T10, S10	subG1-2
	100.00	12	Total G1 مجموع
33.33	100.00	T5, T11, S7, S8, E1, E11	G2
		6	Total G2 مجموع
100.00		18	Total G1+G2 مجموع

الأكسجين التفاعلية (Reactive Oxygen Species) التي تؤدي إلى حدوث الانفجار التأكسدي (Oxidative burst) وموت الخلايا المبرمج (Programmed cell death) (Kim et al., 2008).

بينت نتائج الدراسة إظهار الفطر *B. cinerea* تبايناً وراثياً بين العزلات المدروسة من الساحل السوري حيث بلغت نسبة التشابه الوراثي 35% بين العزلات عند استخدام كلتا التقنيتين RAPD و ISSR، وهذا يتفق مع العديد من الأبحاث التي بينت كفاءة تقانة RAPD و ISSR في إظهار مستوى التباين الوراثي ضمن مجتمع الفطر *B. cinerea* (Mirzaei et al., 2014؛ Bardin et al., 2014؛ Kumari et al., 2014؛ Wessels et al., 2013؛ 2009)، وذلك في العديد من الدول سواء المجاورة منها تركيا (Palot et al., 2018) أو غير المجاورة كإسبانيا (Alfonso et al., 2000). تعود أسباب المرونة الوراثية ضمن مجتمع الفطر *B. cinerea* إلى امتلاكه مشيخة من النمط Heterothallic (Groves & Loveland, 1953)، ووجود أعداد كبيرة من المجموعات المتوافقة خضرياً VCG Vegetative Compatibility Group ضمن الفطر *B. cinerea* (Beever & Weeds, 2004)، بالإضافة إلى وجود مصادر ثانوية للتباين الوراثي وهي العناصر الوراثية المتحركة Transposable Elements TEs، البلاسميدات Plasmid، والفيروسات الفطرية Mycovirus (De Miccolis Angelini et al., 2012؛ Hiratsuka et al., 1987؛ Pearson & Bailey, 2013). إضافة إلى تحديد التباينات الوراثية استخدمت التقانات الجزيئية لإظهار العلاقة بين العزلات المدروسة وتحديد العامل المسؤول عن توزيعها ضمن مجموعات متباينة، فقد أظهرت الدراسة عدم وجود تأثير للعامل الجغرافي أو العائل النباتي أو القدرة الإمراضية على التباين الوراثي بين عزلات الفطر *B. cinerea* على مستوى الساحل السوري، وهذا يؤكد ما ذكرته دراسات سابقة عن التكيف العالي في التوزيع الجغرافي والمدى العوائل للفطر *B. cinerea* (Leyrouas et al., 2015؛ Fillinger & Elad, 2016).

بينت نتائج البحث انتشار الفطر *B. cinerea* على مختلف محاصيل الخضار المحمية المدروسة في الساحل السوري من البندورة/الطماطم والكوسا والباذنجان وبنسب إصابة مختلفة تراوحت ما بين 5.2% و 6.7% في البيت المحمي الواحد. كما ظهر الفطر *B. cinerea* في جميع البيوت المحمية بمختلف المناطق المدروسة بنسب مختلفة من البيوت المحمية المصابة تراوحت من 20% إلى 72.7%، وهذا يتفق مع العديد من التقارير التي بينت المدى العوائل والجغرافي الواسع للفطر *B. cinerea* (Elad et al., 2016). على الرغم من أن الظروف البيئية الساحلية وبخاصة ضمن البيوت المحمية من رطوبة عالية ودرجات حرارة معتدلة تعد مثالية للإصابة بفطر العفن الرمادي إلا أن التفاوت في نسب وشدة الإصابة الفطرية الذي ظهر في هذه الدراسة يعود إلى اختلاف المزارعين في الساحل السوري في عنايةهم والتزامهم بالعمليات الزراعية وطرائق ومواعيد مكافحة المطلوبة لمنع انتشار الفطر *B. cinerea*.

كما بينت الدراسة اختلاف القدرة الإمراضية لعزلات الفطر *B. cinerea* المدروسة والتي جمعت من محاصيل ومناطق جغرافية مختلفة في الساحل السوري حيث تراوحت قدرتها الإمراضية ما بين الضعيفة جداً والعالية دون أن يؤثر العائل أو الموقع الجغرافي على شدة المرض، ويعود هذا الاختلاف في القدرة الإمراضية لعزلات الفطر *B. cinerea* المدروسة إلى تباين العزلات الفطرية في عوامل القدرة الإمراضية التي تتمثل بإفرازه لأنواع مختلفة من الأنزيمات Cutinases، Pectinases و Cellulases التي تسهم في اختراق وتفتيك الجدر الخلوية للأنسجة السليمة (Kars et al., 2005؛ Ten Have et al., 2002)، والسوموم مثل Botrydial التي تؤدي إلى اصفرار الخلايا وموتها مما يسهل عملية الاختراق والانتشار من قبل الفطر ضمن الأنسجة النباتية (Deighton et al., 2001)، والمركبات ذات الوزن الجزيئي المنخفض مثل حمض الأوكساليك Oxalic acid (Manteau et al., 2003)، وأنواع

Abstract

Dibeh, L.S., O. Hammodi and A.M. Mouhanna. 2020. Survey and genetic variation among *Botrytis cinerea* isolates collected from protected crops along the Syrian Coast. Arab Journal of Plant Protection, 38(3): 187-199.

Survey of gray mold on some protected vegetables along the Syrian Coast was conducted during the 2015/2016 and 2016/2017 growing seasons. The study showed the spread of *B. cinerea* in both seasons on various vegetable crops such as tomato, squash and eggplant. The percentage of greenhouses affected was 60.48% and 54.76% during the 2016 and 2017 seasons, respectively. *B. cinerea* isolates collected from different crops and sites showed a variation in their pathogenicity and severity when tested on apple fruits. High pathogenicity level appeared in two isolates collected from tomato in each of Dweer Al-Khateeb and Hrisson locations, whereas very low pathogenicity level appeared in four isolates collected from squash and eggplant in Aen Alarous, Majdaloun Albahr, Saloren and Qreir locations. Variation in pathogenicity among of studied gray mold isolates was associated with genomic variation when tested by RAPD and ISSR. For RAPD, the total amplified fragments number was 71 and contained 62 polymorphic fragments with polymorphism rate of 87.65% when 12 random primers were used. Whereas the total amplified fragments number was 48 and contained 42 polymorphic fragments with polymorphism rate

87.5% when 6 primers were used with ISSR. RAPD showed higher capacity in showing genomic variation than ISSR among *B. cinerea* isolates, which were distributed to six classes with RAPD and three classes with ISSR. There was no effect of crop type and geographic factor and pathogenicity on genomic variation among *B. cinerea* isolates.

Keywords: *B. cinerea*, Costal Syrian, Protected crops, RAPD and ISSR.

Corresponding author: Ahmad Mouhanna, Plant Protection Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, Syria, Email: A.M.Mouhanna@gmail.com

References

المراجع

- Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (eds.). 2007. *Botrytis*: biology, pathology and control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_17
- Elad, Y., I. Pertot, A.M.C. Prado and A. Stewart. 2016. Plant hosts of *Botrytis* spp. Pages 413-486. In: *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. F. Sabine and Y. Elad (eds.). Springer International Publishing Switzerland.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_20
- Fillinger, S. and Y. Elad (eds.). 2016. *Botrytis – the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Springer International Publishing Switzerland.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Groves, J.W. and C.A. Loveland. 1953. The connection between *Botryotinia fuckeliana* and *Botrytis cinerea*. *Mycologia*, 45: 415–425.
<https://doi.org/10.1080/00275514.1953.12024279>
- Hiratsuka, K., S. Namba, S. Yamashita and Y. Doi. 1987. Linear plasmid-like DNAs in the fungus, *Botrytis cinerea*. *Japanese Journal of Phytopathology*, 53: 638–642.
<https://doi.org/10.3186/jjphytopath.53.638>
- Hofman, C.S. and F. Winston. 1987. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous Plasmids for transformation of *Esherichia coli*. *Gene*, 57: 267-272.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90131-4](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90131-4)
- Holz, G., S. Coertze and B. Williamson. 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surface. Pages 9-27. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_2
- Kars, I., G H. Krooshof, L. Wagemakers, R. Joosten, J.A.E. Benen and J.A. van Kan. 2005. Necrotizing activity of five *B. cinerea* Endopolygalacturonases produced in *Pichia pastori*. *The Plant Journal*, 43: 213-225.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2005.02436.x>
- Kim, K.S., J.Y. Min and M.B. Dickman. 2008. Oxalic acid is an elicitor of plant programmed cell death during *Sclerotinia sclerotiorum* disease development. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21: 605-612.
<https://doi.org/10.1094/mpmi-21-5-0605>
- المجموعة الإحصائية السنوية. 2018. وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي، سورية.
- Addinsoft, 2012. XLSTAT 2012: data analysis and statistics software for Microsoft Excel. Addinsoft, Paris, France.
- Aleid, J.D. and J.P. Wubben 2007. Epidemiology of *Botrytis cinerea* diseases in greenhouses. Pages 319-333. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_17
- Alfonso, C., R. Raposo and P. Melgarejo. 2000. Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathology*, 49: 243–251.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00452.x>
- Bardin, M., V. Decognet and P.C. Nicot. 2014. Remarkable predominance of a small number of genotypes in greenhouse populations of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 104: 859–864.
<https://doi.org/10.1094/phyto-10-13-0271-r>
- Bever, R.E. and P.L. Weeds. 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. Pages 29-52. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_3
- De Miccolis Angelini, R.M., C. Rotolo, M. Masiello, S. Pollastro, H. Ishii and F. Faretra. 2012 Genetic analysis and molecular characterization of laboratory and field mutants of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) resistant to QoI fungicides. *Pest Management Science*, 68: 1231–1240.
<https://doi.org/10.1002/ps.3281>
- De Miccolis Angelini, R.M., S. Pollastro and F. Faretra. 2016. Genetics of *Botrytis cinerea*. Pages 35-53. In: *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. F. Sabine and Y. Elad (eds.). Springer International Publishing Switzerland.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_3
- Dean, R., J.A.L. Van Kan and Z.A. Pretorius. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13: 414–430.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Deighton, N., I. Muckenschnabel, A. J. Colmenares, I. G. Collado and B. Williamson. 2001 Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 57: 689–692.
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00088-7](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00088-7)

- Pearson, M.N. and A.M. Bailey.** 2013 Viruses of *Botrytis*. *Advances in Virus Research*, 86: 249-272.
<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394315-6.00009-x>
- Rohlf, F.J.** 1993. NTSYS-pc, Numerical taxonomy and multivariate analysis system, v. 1.80. Applied Biostatistics Inc., NY.
- Samuel, S., T. Veloukas and A. Papavasileiou.** 2012. Differences in frequency of transposable elements presence in *Botrytis cinerea* populations from several hosts in Greece. *Plant Disease*, 96: 1286-1290.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-01-12-0103-RE>
- Ten Have, A., K.B. Tenberg, J.A.E. Benen, P. Tudzynski, J. Visse and J.A.L. van Kan.** 2002. The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens. Pages 341-358. In: *Agricultural Applications. The Mycota (A Comprehensive Treatise on Fungi as Experimental Systems for Basic and Applied Research)*, vol 11. F. Kempken (ed). Springer, Berlin, Heidelberg.
https://doi.org/10.1007/978-3-662-03059-2_17
- Wessels, B.A., S.C. Lamprecht, C.C. Linde, P.H. Fourie and L. Mostert.** 2013. Characterization of the genetic variation and fungicide resistance in *Botrytis cinerea* populations on rooibos seedlings in the Western Cape of South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 136: 407-417.
<https://doi.org/10.1007/s10658-013-0175-x>
- Kumari, S., P. Tayal, E. Sharma and R. Kapoor.** 2014. Analyses of genetic and pathogenic variability among *Botrytis cinerea* isolates. *Microbiological Research*, 169: 862-872.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.02.012>
- Leyrouas, C., F. Bryone, M. Duffaud, C. Troulet and P.C. Nicot** 2015. Assessing host specialization of *Botrytis cinerea* on lettuce and tomato by genotypic and phenotypic characterization. *Plant Pathology*, 64: 119-127.
<https://doi.org/10.1111/ppa.12234>
- Manteau, S., S. Abouna, B. Lambert and L. Legendre.** 2003. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 359-366.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2003.tb01076.x>
- Mirzaei, S., E.M. Goltapeh, M. Shams-Bakhsh, N. Safaie and M. Chaichi.** 2009. Genetic and phenotypic diversity among *Botrytis cinerea* isolates in Iran. *Journal of Phytopathology*, 157: 474-482.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01518.x>
- Palot, I., G. Sülü, A. Kitapçı, E. Gümrükçü and O. Baysal.** 2018. Molecular fingerprinting of *Botrytis cinerea* population structure from different hosts. *Derim*, 35: 121-134.
<https://doi.org/10.16882/derim.2018.410051>

Received: September 3, 2019; Accepted: August 8, 2020

تاريخ الاستلام: 2019/9/3؛ تاريخ الموافقة على النشر: 2020/8/8