مقایسه شدت بیماری‌زایی جدایه‌های *Botrytis cinerea* جمع‌آوری شده از میزبان‌های سبزی و صیفی در منطقه ورامین و مقاومت آنها به قارچ‌کش‌های متداول

Comparison of pathogenicity of *Botrytis cinerea* isolates collected from vegetable and summer hosts in Varamin region and their resistance to common fungicides

هانیه ظفر[۱] و وحید زرین نیا[۲]*

دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۴ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

چکیده

بیماری کپک خاکستری با عامل قارچی (*Botrytis cinerea* (tel*: Botryotinia fuckeliana*، در قسمت انتهایی دم میوه (دمگاه) گیاهان سبزی و صیفی رشد می‌کند. عامل بیماری به صورت (اسکلروت) در خاک، میسلیوم در بقایای آلوده گیاهی و همچنین به‌صورت اسپورهای غیر جنسی در هوا بقاء خود را حفظ می‌کند. این قارچ پلی‌فاژ در محصولات سبزی و صیفی گلخانه ای مانند گوجه‌فرنگی، فلفل، خیار و بادمجان تحت شرایط هوای خنک و مرطوب بیماری ایجاد می‌کند. در این پژوهش، نمونه‌برداری طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ از گلخانه‌های منطقه ورامین انجام و شناسایی قارچ *Botrytis cinerea* در محیط کشت اختصاصی BSM صورت گرفت. به منظور بررسی مورفولوژی قارچ، ساختار پرگنه، شکل کنیدی، تیپ ریسه‌ها و اسپور و اسکلروت مطالعه شد. تنوع پراکندگی این قارچ در سطح کلنی‌ها در محیط کشت و اثرات مقاومت به سه سم بنومیل، کاربندازیم و فن‌هگزامید با ایجاد گروه‌های مختلف قارچ *B. cinerea* بررسی گردید. همبستگی داده‌های به‌دست آمده در نرم افزار SPSS مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که این قارچ دارای تنوع مورفولوژی و مقاومتی قابل ملاحظه‌ای در شهرستان ورامین است که در تولید ارقام سبزی و صیفی مقاوم نسبت به بیماری پوسیدگی خاکستری و همچنین ارزیابی میزان تنوع موجود در مورفولوژی قارچ و خصوصیات بیماری‌زایی این قارچ در نواحی ورامین و مناطق مشابه با جغرافیای منطقه ورامین استفاده خواهد شد.

واژگان کلیدی: کپک خاکستری، مورفولوژی، مقاومت سموم

مقدمه

گیاهان سبزی و صیفی نقش بسیار اساسی در زندگی بشر دارند و بسیاری از عناصر ضروری و ویتامین های مورد نیاز از این گیاهان تأمین می‌شوند. بنابراین حفظ این گیاهان از اهمیت زیادی برخوردار بوده و سلامتی انسان و سایر جانوران به این گیاهان وابسته است (الهی‌نیا، ۱۳۸۴). متأسفانه اغلب تولیدکنندگان سبزی و صیفی با پاتوژن‌ها به دو صورت بیمارگرهای زنده (مسری) شامل بیماری‌های قارچی، ویروسی، باکتریایی و غیره و بیمارگرهای غیرزنده (غیر مسری) مانند کمبود مواد غذایی، سرمازدگی، آلودگی هوا، کمبود رطوبت، زیادی نور و غیره در گیاهان آشنا نیستند و لذا به درستی نمی‌توانند بیماری‌های گیاهان را تشخیص دهند؛ در حالی‌که مدیریت بیماری‌ها در درجه اول نیاز به تشخیص صحیح بیماری‌ها و عوامل ایجادکننده آنها دارد (الهی‌نیا، ۱۳۸۴).

بیماری کپک خاکستری توسط قارچ *Botrytis cinerea* Pers. با فرم جنسی *Botryotinia fuckeliana* ایجاد می‌شود.

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین-پیشوا، ورامین، ایران
۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی و علوم صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
نویسنده مسئول مکاتبات: Zarrinnia@gmail.com

قارچ *Botrytis cinerea* یک عامل بیمارگر غیراختصاصی گیاهی بوده و قادر است علائم سوختگی یا پوسیدگی را در بسیاری از گیاهان ایجاد نماید. این قارچ می‌تواند مشکلی جدی در محصولات سبزی و صیفی گلخانه‌ای مانند گوجه‌فرنگی، فلفل، خیار و بادمجان تحت شرایط هوای خنک و مرطوب ایجاد کند (O'Neill *et al.*, 1997). این قارچ در اوایل بهار و اواخر پائیز گوجه‌فرنگی و سایر محصولات گلخانه‌ای آسیب‌های جدی وارد می‌کند (Stall, 1991). این قارچ دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و به محصولات جالیزی نیز خسارات اوانی وارد می‌کند. مناسب‌ترین درجه حرارت برای رشد قارچ *B. cinerea* دمای ۲۰ درجه سلسیوس است؛ آلودگی در انبارهایی که به‌طور طبیعی سرد هستند و یا روی محصولات بعد از برداشت و در زمان حمل و نقل و حتی در صفر درجه سلسیوس نیز توسعه می‌یابد (الهی‌نیا، ۱۳۸۴).

این قارچ با گسترش جهانی، میزبان‌های فوق‌العاده زیادی دارد؛ لذا موانع زیادی در مسیر تلاش برای مدیریت این بیمارگر بر روی طیف گسترده‌ای از میزبان‌ها، با توجه به تنوع مورفولوژیکی و ژنتیکی قارچ وجود دارد (Fournier *et al.*, 2002؛ Williamson *et al.*, 2007). این قارچ می‌تواند به شکل کنیدیوم و ساپروفیت و یا به شکل میسلیوم بر روی بافت های رو به زوال گیاه زنده بماند و برای مدت طولانی تر، اندام‌های مقاوم‌تری بنام اسکلروت تولید می‌کند که در بقایای مرده گیاه زنده می‌مانند (Staats *et al.*, 2005؛ Williamson *et al.*, 2007).

در این مطالعه، به دلیل تنوع مورفولوژی بالای قارچ *B. cinerea* از نظر تیپ ریسه‌ها و اسپورها و اسکلروت‌ها، تنوع پراکندگی این گونه در سطح کلنی‌ها در محیط کشت بررسی گردید و اثرات مقاومت به سه سم متداول شامل بنومیل، کاربندازیم و فن‌هگزامید با ایجاد گروه‌های مختلف قارچ *B. cinerea* مطالعه شد. محتمل است یافته های حاصل از این مطالعه برای ایجاد ارقام سبزی و صیفی مقاوم به بیماری پوسیدگی خاکستری و همچنین جهت ارزیابی میزان تنوع موجود در مرفولوژی قارچ و خصوصیات بیماری‌زایی این قارچ در نواحی ورامین و مناطق مشابه با جغرافیای منطقه ورامین استفاده گردد.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌برداری، جداسازی و شناسایی

این پژوهش در آزمایشگاه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین ـ پیشوا در سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ انجام شد. قارچ‌های بیماری‌زا از گلخانه‌های منطقه ورامین در سه ایستگاه جوادآباد، فلات، پیشوا و قلعه‌سین نمونه برداری شدند. به این ترتیب که در هر مزرعه و یا خطوط کشت در گلخانه، تک‌تک بوته‌ها بررسی و از ناحیه ساقه و برگ و میوه‌های آلوده نمونه‌برداری شد. در هر گلخانه با توجه به نوع کشت از گل و میوه‌های رسیده و بوته‌های هرس شده که معمولاً آلودگی در آنها بیشتر دیده می شد؛ نمونه‌برداری صورت گرفت. قارچ *B. cinerea* جدا شده از هر بوته آلوده به‌عنوان یک جدایه در نظر گرفته شد. نمونه‌ها در پاکت‌های مخصوص جهت نگهداری وکشت دادن به آزمایشگاه انتقال داده شد. روی پاکت‌ها نام محصول و گلخانه و سایر مشخصات نمونه‌ها ثبت شد. به منظور جداسازی و تأیید شناسایی قارچ *B. cinerea* از محیط کشت اختصاصی *Botrytis cinerea* selective medium=BSM استفاده شد (Edwards and Seddon, 2001). مواد تشکیل‌دهنده این محیط کشت شامل گلوکز، $NaNO_3$، K_2HPO_2، $7H_2O$، $MgSO_4$، KCl، pentachloronitrobenzene، chloramphenicol، سم مانب، رزبنگال، تانیک اسید، آگار و ماده سود می‌باشد (Edwards and Seddon, 2001). کلید شناسایی قارچ بر اساس قارچ‌های ناقص و با پیروی از منابع معتبر صورت گرفت (Chilvers and du Toit, 2006).

آزمون اثبات بیماری‌زایی

به منظور اثبات بیماری‌زایی قارچ *B. cinerea* ابتدا جدایه خالصی از قارچ تهیه شد و از گیاه لوبیا به‌عنوان میزبان محک استفاده گردید. در این آزمایش، ابتدا لوبیای حساس رقم پاک چند روز در آب خیسانده و در گلدان و در شرایط گلخانه‌ای کشت داده شد؛ بعد از ۳-۲ هفته، چند برگ از لوبیا انتخاب و در محیط PDA در تشتک‌های پتری ۸ سانتی‌متری حاوی کلرامفنیکل قرار داده شد و سپس سوسپانسیون خالص محیط حاوی PDB (Dextros Broth Potato)

از قارچ به مقدار $۱۰^{۶}$ اسپور تهیه گردید؛ از سوسپانسیون اسپور خالص قارچ به مقدار یک میکرولیتر بر روی هر برگ گیاه لوبیا به‌صورت قطره‌ای ریخته و علایم در روزهای سوم و پنجم و هفتم ثبت گردید (Korolev *et al.*, 2008).

عملیات تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ عامل بیماری

ابتدا قارچ عامل بیماری مربوط به هر ایزوله در چهار پتری حاوی محیط PDA کشت داده شد. پس از مشاهده اسپورها بر روی محیط کشت و رشد کامل قارچ در پتری‌ها، ۲ سی‌سی از آب مقطر استریل به محیط کشت اضافه شد و سپس با اسکالپل استریل بر روی محیط کشت حاوی عامل بیماری تراشیده شد و به کمک تنظیف استریل، اسپورهای خالص جداسازی شد. سپس اسپورها بر روی لام هموسیتومتری در سه تکرار شمارش شد تا غلظت اسپور به میزان $۱۰^{۶}$ برسد و پس از آن با سمپلر به‌صورت یک قطره به برگ گیاهان انتقال داده شد (شکل ۱) (Korolev *et al.*, 2008). تجزیه و تحلیل آماری داده‌های مربوط به هر جدایه و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS انجام شد.

شکل ۱- تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ *Botrytis cinerea*

Fig. 1. Preparation of *Botrytis cinerea* fungus spore suspension

ارزیابی خصوصیات مرفولوژیکی قارچ *B.cinerea*

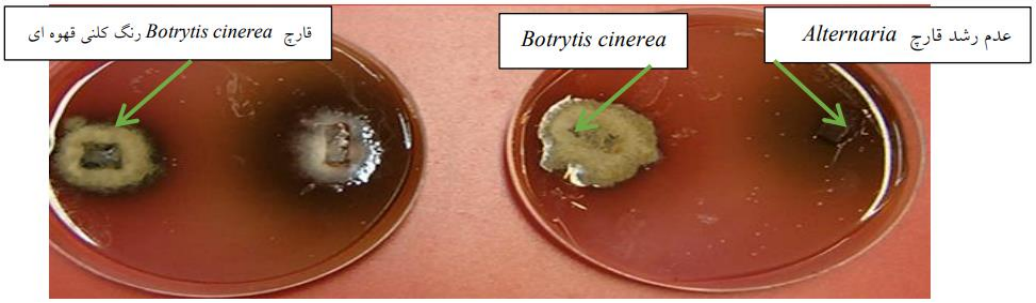
در این آزمون خصوصیات کلنی و اسپور اسکلروت به‌صورت کشت چند روز ایزوله‌های قارچی بررسی شد. پس از گذشت چهار روز از رشد کلنی ها، اندازه‌گیری کلنی و اسپورها و تولید اسکلروت طی بازه ۵ روز، ۱۲روز، ۲۰روز و ۲۸ روز با توجه به مقیاس های مورد نظر اندازه گیری شد و در اعداد صفر (بدون کلنی) تا ۴ نمره داده شدند؛ به‌طور مثال، ۱ = <۲۵٪ از مساحت کلنی در نظر گرفته شد (Korolev *et al.*, 2008).

ارزیابی مقاومت به قارچ‌کش ها

در ارزیابی مقاومت قارچ *B. cinerea* به قارچ‌کش‌ها، سموم در غلظت معین به محیط کشت غذایی اضافه شده و سپس قارچ *B. cinerea* در ظروف پتری کشت شد. قارچ‌کش‌های مورد استفاده عبارت بودند از کاربندازیم، بنومیل و فن‌هگزامید در غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر ماده فعال. به منظور انجام این آزمایش یک قرص ۵ میلی‌متری از حاشیه کلنی قارچ *B. cinerea* برداشته و در مرکز یک تشتک پتری ۹ سانتی‌متری حاوی محیط کشت PDA به همراه هر یک از قارچ‌کش‌های نامبرده در غلظت‌های مشخص کشت داده شد و سپس در دمای ۲۲-۲۰ درجه سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. سپس قطر هر کلنی قارچی پس از ۴ روز اندازه‌گیری شد (Korolev *et al.*, 2008). در این آزمایش نزدیک به ۵۰ جدایه قارچ خالص شده از *Botrytis cinerea* از میزبان‌های مختلف شامل فلفل دلمه‌ای، گوجه‌فرنگی، خیار و بادمجان جداسازی شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به ازای هر تیمار سه تکرار و هر تکرار شامل شاهد و سه ظرف پتری بود (Korolev *et al.*, 2008).

نتایج

نتایج بر روی محیط کشت اختصاصی BSM همراه با نمونه شاهد از قارچ .*Alternaria* spp نشان داد که تنها قارچ *Botrytis cinerea* در این محیط رشد کرد و رنگ کلنی آن به نارنجی و قهوه ای تغییر یافت و رنگ کلنی در گونه های دیگر بر روی این محیط کشت متفاوت بود. احتمالاً سایر گونه های *Botrytis* به‌علت وجود مواد ساختاری محیط کشت، رشد خیلی کمی دارند (شکل ۲). همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود، تنها قارچ *Botrytis cinerea* رشد کرده و این مشاهدات بر اختصاصی بودن این محیط کشت دلالت دارد.



شکل ۲- رشد قارچ *Botrytis cinerea* در مقابل قارچ Alternaria در محیط کشت اختصاصی BSM
Fig. 2. Growth of *Botrytis cinerea* versus Alternaria in BSM specific medium

مطالعه بیماری‌زایی

در تمام آزمایشات مربوط به بیماری‌زایی از گیاه لوبیا رقم پاک و از روش مایه‌زنی (De tach) برای تمامی جدایه‌ها استفاده گردید. علایم ایجاد شده روی رقم مذکور تا حدی با سایر گیاهان میزبان متفاوت بود. اولین علایم طی ۵-۳ روز پس از مایه‌زنی آشکار شدند. ارزیابی کلی در مورد قارچ بیمارگر ۸-۷ روز پس از اسپورپاشی انجام گرفت. علایم به‌صورت نقاط ریز سرسنجاقی آشکار شد. در روزهای بعد، این نقاط به تدریج توسعه یافته و به رنگ قهوه‌ای تغییر رنگ داد و در برخی موارد سبب از بین رفتن و سوختگی یک برگ شد (شکل ۳). در تمام آزمایش‌های فوق، قارچ‌های تلقیح شده شناسایی شدند.

شکل ۳- علائم حاصل از *B. cinerea* بر روی برگ سالم حاوی سوسپانسیون اسپور (A) و برگ آلوده شده (B)
Fig. 3. Symptoms of *B. cinerea* on a healthy leaf containing a spore suspension (A) and an infected leaf (B)

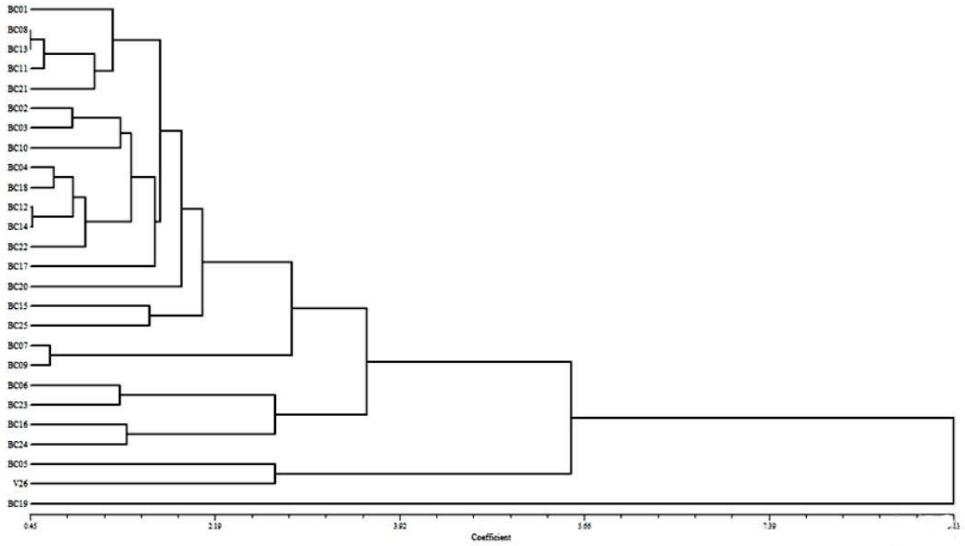
در این مطالعه ۵۰ جدایه از میزبان‌های آلوده به *B. cinerea* جمع‌آوری گردید. نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس داده‌های حاصل از بیماری‌زایی جدایه‌ها نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین جدایه‌های مورد بررسی از نظر شدت بیماری‌زایی بود (جدول ۱). همچنین نتایج نشان داد که زمان بـــر میـزان بـیـمـاری‌زایی سویه‌های *B. cinerea* اثر معنی‌دار داشت؛ ولی اثر متقابل زمان و سویه در سـطح احتمال ۵ درصـد معنی‌دار نبـود (احتمال= ۰/۷۳۸، سطح معنی‌داری= ۰/۸۸۴) (جدول ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس توان بیماری‌زایی جدایه های *B. cinerea* طی زمان با استفاده از روش ANOVA

Table 1. Variance analysis of pathogenicity of *B. cinerea* isolates over time using ANOVA method

S.O.V.	منابع تغییرات	درجه آزادی Degree of Freedom	مجموع مربعات Sum of Squares	مربعات میانگین Mean of Squares	F	سطح معناداری Significance
Isolate	جدایه	25	282.026	11.281	7.832	0.00
Time	زمان	3	471.80	157.060	109.042	0.00
Time×isolate	زمان × جدایه	75	85.074	1.134	0.738	0.884
Error	خطا	208	299.596	1.440		

نتایج حاصل از آزمون دندوگرام نشان داد که جدایه BC-19 با اختلاف معنی‌دار نسبت به سایر سویه‌ها بیشترین سطح بیماری‌زایی را از خود نشان داد (شکل ۴).



شکل ۴- دندروگرام حاصل شدت بیماری‌زایی *B. cinerea* بر روی گیاه لوبیا رقم پاک. بیشترین شدت بیماری‌زایی در جدایه BC-۱۹ از شهرستان پیشوا با اختلاف معنی‌دار نسبت به سایر جدایه‌ها مشاهده شد.

Fig. 4. Dendrogram of pathogenic intensity of *B. cinerea* on bean plant of Pak variety. The highest pathogenic intensity was observed in 19BC isolate from Pishva city with a significant difference compared to other isolates .

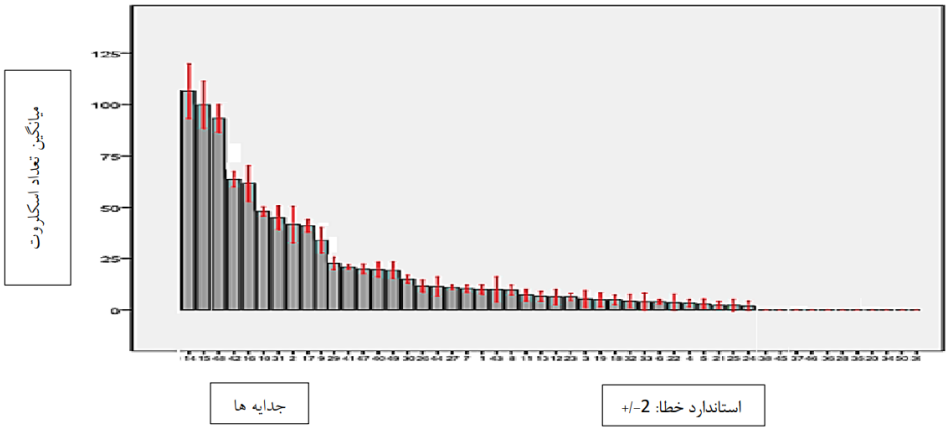
ارزیابی خصوصیات اسکلروت‌های قارچ *Botrytis cinerea*

بررسی میانگین تعداد اسکلروت‌ها نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی *B. cinerea* علی‌رغم شرایط یکسان رشدی از نظر تعداد اسکلروت برابر نبودند. بیشترین تعداد اسکلروت مربوط به جدایه‌های شماره ۱۴، ۱۵ و ۴۵ و کمترین آن مربوط به جدایه‌های ۳۸-۴۵-۳۷-۴۸-۲۸-۳۵-۲۰-۳۴-۳۹ و ۵۰ بود (شکل ۵).

ارزیابی مقاومت به قارچ‌کش‌ها

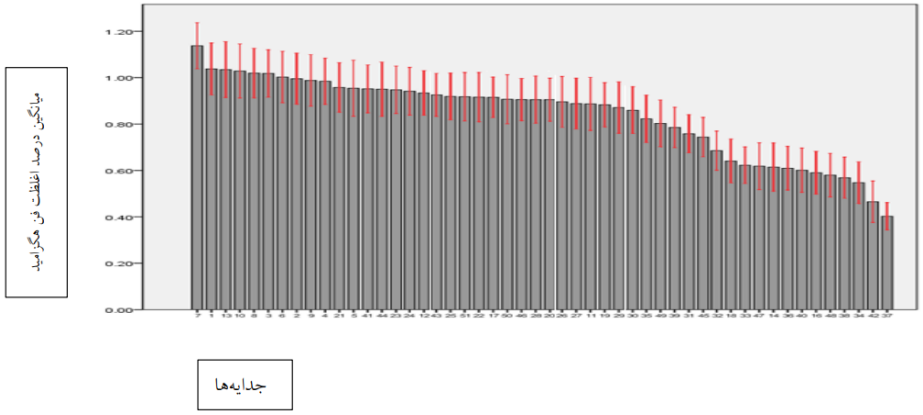
بر اساس یافته‌های حاصل از این تحقیق قارچ‌کش فن‌هگزامید در گونه *B. cinerea* از نظر مورفولوژیکی متمایز بود. جدایه‌های گونه *B. cinerea* نسبت به این قارچ‌کش از خود حالت حساس و نیمه‌حساس نشان دادند. در ارزیابی مقاومت قارچ *B. cinerea* به قارچ‌کش فن‌هگزامید، در مقدارهای معین در محیط کشت مشخص شد که جدایه‌های قارچ مورد بررسی نسبت به قارچ‌کش فن‌هگزامید سطح متنوعی از مقاومت را با اختلاف معنی‌دار داشتند؛ همچنین نتایج نشان داد

که قطر کلنی در سویه ۳۷ تحت تأثیر این قارچ‌کش با اختلاف معنی‌داری با سایر جدایه‌ها کمترین میزان رشد و در جدایه شماره ۷ بیشترین میزان رشد را داشت (شکل ۶).



شکل ۵- میانگین تعداد اسکلروت‌های حاصل از جدایه های *B. cinerea*

Fig. 5. The average number of sclerotia obtained from *B. cinerea* isolates



شکل ۶- میانگین رشد قطر کلنی جدایه‌ها تحت تأثیر فن‌هگزامید

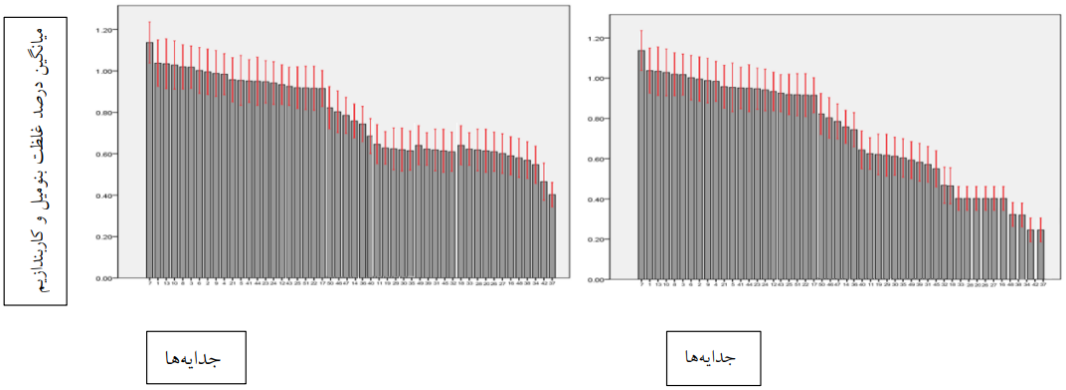
Fig. 6. Average colony diameter growth of isolates under the influence of phenhexamide

بررسی میزان حساسیت جدایه‌های جمع‌آوری شده از منطقه ورامین به قارچ‌کش بنومیل نشان داد که در جدایه‌های ۳۷ و ۴۲ کمترین میانگین قطر کلنی قارچ در محیط کشت ثبت گردید؛ سایر جدایه‌ها با اختلاف معنی‌دار، قطر کلنی بیشتری داشتند؛ در تیمار با بنومیل، جدایه ۷ بیشترین قطر کلنی را داشت. همچنین بررسی میزان حساسیت جدایه‌ها نسبت به قارچ‌کش کاربندازیم نشان داد که کمترین میانگین قطر کلنی در جدایه ۳۷ و ۴۲ بدون اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. در مقابل بیشترین قطر کلنی قارچ در جدایه ۷ ثبت گردید (شکل ۷).

بحث

با توجه به اهمیت موضوع، مطالعه طبقه‌بندی، زیست بوم‌شناسی، زیست‌شناسی مولکولی و همچنین مطالعه در مورد روش‌های پیشگیری و کنترل بیماری‌های ناشی از گونه‌های جنس *Botrytis* بر روی گیاهان میزبان مدنظر بسیاری از محققین قرار دارد. قارچ *Botrytis cinerea* می‌تواند یک مشکل جدی در محصولات سبزی و صیفی گلخانه‌ای مانند گوجه‌فرنگی، فلفل، خیار و بادمجان تحت شرایط هوای سرد و خنک و مرطوب بیماری ایجاد کند (O'Neill *et al*., 1997). *B. cinerea* عامل کپک خاکستری، یک قارچ نکروتروف و گونه‌ای مرکب است که باعث بوجود آمدن بیماری قبل و بعد از برداشت در حداقل ۲۳۵ گونه گیاهی می شود. این قارچ تنوع ژنوتیپی و

فنوتیپی غیرمعمولی را نشان می دهد که باعث سازگاری سریع آن به شرایط محیطی و سموم شده است (Giraud *et al*., 1997).



شکل ۷- میانگین رشد قطر کلنی جدایه‌ها تحت تیمار با سم بنومیل (راست) و سم کاربنداریم (چپ)

Fig. 7. Average colony diameter growth of isolates treated with benomyl (right) and carbendazim (left)

از مهمترین دلایل تنوع در جمعیت‌های قارچی می‌توان به فرایندهایی همچون هتروکاریوزیس، آنیوپلوئیدی، ترانسپوزون‌ها، جهش‌های خودبه‌خودی، تولیدمثل جنسی و غیرجنسی اشاره نمود (Wessels, 2012؛ Naranjo-Ortiz and Gabaldon, 2020). مطالعه روی میزان تنوع جمعیت در یک جامعه قارچی نقش مهمی در توسعه استراتژیهای لازم برای تولید یک رقم با مقاومت پایدار خواهد داشت (Hyde *et al.*, 2024). در این تحقیق، بین توان بیماری‌زایی جدایه‌ها و گروه‌های سازگاری رویشی رابطه معنی‌دار (در سطح احتمال ۵ درصد) و معکوس مشاهده شد، به این معنی که جدایه‌هایی با قدرت بیماری‌زایی بالاتر در گروه‌های سازگاری رویشی با فراوانی کمتر حضور داشتند.

با توجه به اهمیت بیماری کپک خاکستری و گسترش سریع *B. cinerea* در دماهای معمولی سردخانه‌ها و به دلیل انتشار از میوه‌ها و سایر محصولات آلوده به محصولات سالم مجاور آنها در سردخانه، می‌تواند موجب خسارت هنگفت شود. در سال‌های اخیر میزان فروش محصولات قارچ‌کش بر علیه *Botrytis* spp.، ۱۲-۲۵ میلیون دلار آمریکا بوده است (Elad *et al*., 2007). با توجه به خسارتی که این قارچ بر روی محصولات کشاورزی وارد می‌کند، مدیریت آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این راستا شناخت قارچ کمک شایانی به اتخاذ روش‌های مدیریتی می‌نماید. تا کنون روش‌های مختلفی در تاکسونومی گونه‌های این جنس به‌کار رفته است، این روش‌ها اغلب شامل روش‌های مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، سرولوژیکی، مولکولی و ارتباط میزبانی می‌باشد (Cheung *et al.*, 2020). اگرچه مطالعات بیوشیمیایی فراوانی روی جنس *Botrytis* صورت پذیرفته است، اما تعداد کمی در تاکسونومی به‌کار برده شده‌اند. موفقیت روش‌های سرولوژیک نیز بیشتر در تشخیص و به میزان کمتری در تعیین سطح آلودگی ناشی از *Botrytis* به‌کار رفته است (Dewey and Yohalem, 2004). به‌طور کلی توصیف گونه‌های قارچ *Botrytis* بیشتر براساس خصوصیات مورفولوژیک و محیطی صورت پذیرفته و گونه‌ها براساس ارتباط میزبانی نامگذاری شده‌اند. خصوصیات مورفولوژیک تحت شرایط محیطی قرار می‌گیرند و بنابراین در مفید بودن آنها تردید وجود دارد. در شناسایی مبتنی بر مورفولوژی نیاز به کشت عامل بیماری روی محیط آگار این امر علاوه بر زمان‌بر بودن آن، معمولاً بعد از ظهور علائم صورت گرفته و قادر به تشخیص آلودگی‌های پنهان نیست. علاوه بر این، خصوصیات مورفولوژیک هنوز هم کاربرد فراوانی در تشخیص گونه‌های جنس *Botrytis* داشته و تنها در سال‌های اخیر تمایل به استفاده از روش‌های مولکولی در این زمینه افزایش یافته است. در این تحقیق نیز از روش‌های مورفولوژیک جهت شناسایی گونه در ۵۰ جدایه مختلف *Botrytis* که از میزبان‌های مختلف جداسازی شده بودند، استفاده شد.

به‌طور کلی به‌دلیل طبیعت چند هسته‌ای کنیدی و سلول‌های هیف، جدایه‌های *Botrytis* تمایل به تغییر دائمی در نسل‌های متوالی (در آزمایشگاه و مزرعه) داشته و تغییرات ژنوتیپی و فنوتیپی در *B. cinerea* معمول است (Elad *et al*., 2007). این قارچ تنوع ژنوتیپی و فنوتیپی غیرمعمولی را نشان می‌دهد که باعث سازگاری سریع آن به شرایط محیطی و سموم شده است (Giraud *et al.*, 1997). علت اصلی شهرت *B. cinerea* به‌عنوان یک قارچ متنوع غیرمعمول، وجود تیپ‌های رشدی مشخص از لحاظ موفولوژیک است. سه تیپ عمومی در این قارچ عبارتند از: مسیلیومی، اسپورزا و اسکلروتی (Steentjes *et al.*, 2021). این مورفوتیپ‌ها تا زمانی که تجدید کشت با استفاده از ریسه صورت بگیرد، پایدارند؛ اما تجدید کشت به‌وسیله تک اسپور منجر به ایجاد کلونی‌هایی می‌شود که از والدین و سایر تک کلون‌ها متمایزند (Beever and Weeds, 2004). برخی از دانشمندان دو تیپ اصلی میسلیومی و اسکلروتی را برای این قارچ در نظر گرفته و تیپ اسپورزا زیر مجموعه این دو گروه تلقی می‌شود (Meng *et al*., 2020).

یکی از عوامل دیگری که باعث ایجاد تغییرات ژنتیکی و فنوتیپی در قارچ *B.cinerea* می‌گردد، وجود عناصر ترانسپوزونی (Transposable elements) در برخی از استرین‌های این قارچ است. عناصر ترانسپوزونی، در حقیقت توالی‌هایی کوتاه از بازهای DNA هستند که پس از ورود به ساختار ژن، ساختمان آن را به‌هم می‌زنند و موجب جهش می‌شوند. ترانسپوزن‌های قارچی می‌توانند برای گونه‌های فاقد فرم جنسی، تنوع ژنتیکی گسترده‌ای ایجاد کنند (Martinez *et al*., 2005؛ Porquier *et al.*, 2021).

در این مطالعه طی بررسی بر روی رشد ۵۰ جدایه از قارچ *B. cinerea*، مشاهده گردید که رشد کلنی از روز دوم بعد از کشت آغاز شده و طی ۶-۴ روز تا قطر ۲-۱ سانتی‌متر در تمامی جدایه‌ها رسید. بعد از روز ششم ضخامت قارچ بیشتر شده و همچنین در برخی از جدایه‌ها از روز چهارم اسپورزایی نیز انجام گرفت؛ از روز هفتم به بعد اسکلروت‌ها شروع به رشد نمودند. میرزایی و همکاران ۳۶۳ جدایه از جنس *Botrytis* را از سراسر ایران از روی گیاهان مختلف جمع‌آوری نمودند (Mirzaei *et al.*, 2009). به منظور شناسایی گونه‌های این جنس در درجه اول از خصوصیات مورفولوژیک، نظیر طول کنیدیوفور، اندازه کنیدی و اسکلروت و در درجه بعدی از ارتباط میزبانی استفاده شد و هشت گونه از قارچ *Botrytis* شناسایی گردید، که عبارتند از: *B. porri*، *B. pelargonii*، *B. paeoniae*، *B. gladiolorum*، *B. convoluta*، *B. faba*، *B. cinerea* و *B. aclada*. به‌علاوه بررسی ساختار جمعیت قارچ *B. cinerea* در ایران در طی دوره‌های متناوب به منظور تعیین درصد پویایی جمعیت و ارزیابی امکان ظهور نژادهای جدید بیماری‌زا به منظور کاهش اثرات ناشی از بیماری کپک پوسیدگی خاکستری پیشنهاد می‌گردد (Mirzaei *et al.*, 2009). به جهت تنوع قابل ملاحظه در میزان رشد جدایه‌ها و همچنین شدت بیماری‌زایی، داده‌های این تحقیق با نتایج میرزایی و همکاران مطابقت دارد. در نتایج این تحقیق نیز اختلاف معنی‌دار از نظر شدت بیماری‌زایی بین جدایه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان ورامین مشاهده گردید. یافته‌های محققین نشان‌دهنده وجود تنوع قابل ملاحظه در فراوانی و ریخت‌شناسی اسکلروت و میسلیوم‌های حاصل از جدایه‌های *B. cinerea* در سراسر دنیا است؛ در مطالعه‌ای بر روی جدایه‌های این قارچ در صربستان، چهار تیپ میسلیوم و چهار تیپ اسکلروت در بین ۱۳۰ جدایه *B. cinerea* مشاهده گردید؛ علاوه بر این درصد فراوانی تولید اسکلروت در جدایه‌های مختلف با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نشان داد (Pesic *et al.*, 2014). نتایج این تحقیق با یافته‌های مطالعه از نظر تنوع در فراوانی تولید اسکلروت مطابقت دارد. در تحقیق حاضر جدایه‌های ۱۴، ۱۵ و ۴۵ بیشترین درصد فراوانی تولید اسکلروت را به خود اختصاص دادند. نتایج مشابهی از ۵۰ جدایه حاصل از باغات تمشک سیاه در کلمبیا به‌دست آمد که با یافته‌های تحقیق حاضر همراستاست (Isaza *et al.*, 2019).

با توجه به این‌که ظهور هر نژاد جدید در طی فرایند گونه‌زایی بیمارگر صرف نظر از گرایش این گونه‌زایی به سمت افزایش یا کاهش قدرت بیماری‌زایی در تعامل با تنوع ژنتیکی گیاه میزبان و همچنین اثرات غیرمستقیم بر سایر اکوسیستم مرتبط با میزبان گیاهی ذکر شده است.

از نظر میزان حساسیت نسبت به قارچ‌کش‌های متداول، تحقیقات متعددی در این زمینه بر روی قارچ *B. cinerea* انجام گرفته است و در اغلب موارد مقاومت چندگانه جدایه‌های مختلف این بیمارگر نسبت به قارچ‌کش‌ها گزارش شده

است (Rupp *et al.*, 2017). اولین گزارش از مقاومت جدایه‌ای *B. cinerea* نسبت به قارچ‌کش بنومیل از تمشک‌های آلوده در صربستان اعلام گردید (Tanovic and Ivanovic, 2010)؛ در این تحقیق ۱۳۰ جدایه از قارچ *B. cinerea* تحت تیمار با غلظت ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر از بنومیل قرار گرفته و نه جدایه کاملاً مقاوم معرفی شدند؛ جدایه‌های مقاوم به بنومیل نسبت به تیوفانات متیل نیز مقاوم بودند؛ نتایج این تحقیق با یافته‌های مطالعه حاضر به لحاظ وجود سطوحی از مقاومت در بین جدایه‌های *B. cinerea* مطابقت دارد. در مطالعه مشابهی در ایران، سطوح مختلفی از مقاومت جدایه‌های *B. cinerea* نسبت به قارچ‌کش بنومیل در ۱۰۳ جدایه جمع‌آوری شده از استان آذربایجان غربی مشاهده شد (امینی و ابرین‌بنا، ۱۳۹۵)؛ که با یافته های حاصل از تحقیق حاضر مطابقت دارد.

در مطالعات دیگری میزان حساسیت جدایه‌های مختلف *B. cinerea* نسبت به قارچ‌کش کاربندازیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در یکی از تحقیقات انجام شده نشان داد که بیش از ۹۵ درصد جدایه‌های *B cinerea* نسبت به قارچ‌کش کاربندازیم مقاوم هستند و بروز سه جدایه مختلف در سه جایگاه ژنی متفاوت مسئول ایجاد چنین مقاومتی شناخته شد (He *et al.*, 2020). در مطالعه مشابه دیگری، استفاده از کاربندازیم برعلیه کپک خاکستری به دلیل مقاومت جدایه‌های قارچ بیمارگر بی‌اثر شناخته شد (Sautua *et al.*, 2019). در ایران نیز مقاومت این قارچ نسبت به کاربندازیم مورد تأیید قرار گرفته است (Amini *et al.*, 2023)؛ این محققین نشان دادند به‌علت مقاومت *B. cinerea* نسبت به تمام قارچ‌کش‌های گروه بنزیمیدازول، استفاده از قارچ‌کش‌های این گروه مانند بنزیمیدازول می بایست با احتیاط بسیار زیاد در برنامه های مدیریت تلفیقی آفت انجام گیرد. نتایج حاصل از تحقیق حاضر از نظر مقاومت جدایه‌های جمع‌آوری شده از منطقه ورامین نسبت به کاربندازیم با تحقیقات پیش از آن مطابقت دارد.

به‌طور مشابه در تحقیقات بسیاری به مطالعه میزان مقاومت جدایه‌های *B cinerea* نسبت به قارچ‌کش فن‌هگزامید پرداخته شده است. امینی و ابرین‌بنا (۱۳۹۵) میزان مقاومت جدایه‌های *B. cinerea* در آذربایجان غربی را نسبت به فن‌هگزامید بررسی و این قارچ‌کش را برعلیه جدایه‌های موجود در استان اثربخش معرفی نمودند. در مطالعه مشابه دیگری نیز ۸۹ درصد از جدایه‌های جمع‌آوری شده *B. cinerea* از باغات بلوبری در ایالت میشیگان، ایالات متحده آمریکا، نسبت به فن‌هگزامید حساس تشخیص داده شدند (Abbey *et al.*, 2024). در مطالعه دیگری تنها ۲۲ درصد از جدایه‌های *B. cinerea* نسبت به فن‌هگزامید حساس معرفی شدند (Notte *et al.*, 2021). در تحقیق حاضر سطوح متفاوتی از حساسیت نسبت به فن‌هگزامید در *B. cinerea* مشاهده گردید که از این‌رو با نتایج تحقیقات مشابه مطابقت دارد. با توجه به مقاومت نسبی جدایه‌های مختلف *B. cinerea* نسبت به قارچ‌کش‌های متداول، بهتر آن است که از ترکیب یا تلفیق قارچ‌کش‌ها متعلق به گروه‌های شیمیایی مختلف برای مدیریت این بیمارگر استفاده گردد. نتایج حاصل از مطالعات مشابه نیز از کاربرد تلفیقی قارچ‌کش‌ها حمایت می‌کنند (Ebrahimzadeh and Abrinbana, 2019). در تحقیق مشابه دیگری نیز به دلیل شیوع مقاومت چندگانه جدایه‌های *B. cinerea* نسبت به قارچ‌کش‌های مختلف، کاربرد مخلوطی از قارچ‌کش‌ها برعلیه این بیمارگر توصیه گردید (Rupp *et al.*, 2017) که از این نظر با نتایج حاصل از این تحقیق همراستاست.

منابع References

امینی، ر. و ابرین‌بنا، م. ۱۳۹۵. مقاومت برخی جدایه‌های *Botrytis cinerea* نسبت به قارچ‌کش‌های بنومیل، ایپرودیون و فن‌هگزامید در استان آذربایجان غربی. پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی ۵(۱): ۲۰۷-۱۹۵.

الهی نیا، ع. ۱۳۸۴. بیماری‌های سبزی و صیفی و روش‌های مبارزه با آنها. چاپ اول، انتشارات دانشگاه گیلان، رشت.

Abbey, J.A., Alzohairy, S.A., Neugenauer, K.A., Hatlen, R.J. and Miles, T.D. 2024. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* and identification of *Botrytis* species associated with blueberry in Michigan. Frontiers in Microbiology 15: 1425392. https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1425392.

Amini, M.M., Mirzaei, S. and Heidari, A. 2023. A growing threats threat: investigating the high incidence of benzimidazole fungicides resistance in Iranian *Botrytis cinerea* isolates. PLos One 18(11): e0294530.

Beever, R.E. and Weeds, P.L. 2004 Taxonomy and Genetic Variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. Pp: 29-52. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delan, N. (Eds.). Botrytis: Biology, Pathology and Control, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht,

Cheung, N., Tian, L., Liu, X. and Li, X. 2020. The destructive fungal pathogen *Botrytis cinerera*-insights from genes studied with mutant analysis. Pathogens 9(11): 923.

Chilvers, M.I. and du Toit, L.J. 2006. Detection and identification of *Botrytis* species associated with neck rot, scape blight, and umbel blight of onion. Online. Plant Health Progress; https://doi.org/10.1094/PHP-2006-1127-01-DG .

Delc´an, J. and Melgarejo, P. 2002. Mating behaviour and vegetative compatibility in Spanish populations of *Botrytotinia fuckeliana*. European Journal of Plant Pathology 108: 391-400.

Ebrahimzadeh, F. and Abrinbana, M. 2019. Activity of fungicide mixtures against *Botrytis cinerea* isolates resistant to benzimidazoles, strobilurins and dicarboximides. Annals of Applied Biology 174(3): 301-312.

Edwards, S.G. and Seddon, B. 2001. Selective media for the specific isolation of *Botrytis cinerea.* Letters in Applied Microbiology 32: 63-66.

Elad, Y. Williamson, B. Tudzynski, P. and Delen, N. 2007. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems: an introduction. In: Elade, Y., Williamson, P., Tudzinski, P. and Delen. N. Botrytis: Biology, Pathology and control. Springer Publishers. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_1.

Fournier, E., Giraud, T., Loiseau, A., Vautrin, D., Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J.M. and Brygoo, Y. 2002. Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus *Botrytis cinerea* (Ascomycota). Molecular Ecology Notes 2(3): 253-255.

Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P. and Brygoo, Y. 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. Molecular Biology Evolution 14:1177-1185.

He, L., Cui, K., Li, T., Song, Y., Liu, N., Mu, W. and Liu, F. 2020. Evolution of the resistance of *Botrytis cinerea* to carbendazim and the current efficacy of carbendazim against gray mold after long-term discontinuation. Plant Disease 104(6): 1647-1653.

Hyde, K.D., Balrdin, P., Chen, Y., Thilini Chethana, K.W., De Hoog, S., Doilom, M., de Farias, A.R.G., Gonçalves, M.F., Gonkhom, D., Gui, H. and Hilário, S. 2024. Current trends, limitations and future research in the fungi? Fungal Diversity 125: 1-71.

Isaza, L., Zuluaga, Y.P. and Marulanda, M.L. 2019. Morphological, pathogenic and genetic diversity of *Botrytis cinerea* Pers. In blackberry cultivations in Colombia. Revista Brasileira de Fruticultura 41(6). https://doi.org/10.1590/0100-29452019490.

Korolev, N., Elad, Y. and Katan, T. 2008. Vegetative compatibility grouping in *Botrytis* cinerea using sulphate non- utilizing mutant. European Journal of Plant Pathology 122: 369-383**.**

Martinez, F., Dubos, B. and Fermaud, M. 2005. The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. Phytopathology 95: 692-700.

Meng, L., Mestdagh, H., Ameye, M., Audenaert, K., Hofte, M. and van Labeke, M.C. 2020. Phenotypic variation of *Botrytis cinerea* isolates is influenced by spectral light quality. Frontiers in Plant Science 11: 1233.

Mirzaei, S., Mohammadi Goltapeh, E., Shams-Bakhsh, M., Safaie, N. and Chaichi, M. 2009. Genetic and phenotypic diversity among *Botrytis cinerea* isolates in Iran. Journal of Phytopathology 157(7-8): 474-482.

Naranjo-Ortiz, M.A. and Gabaldon, T. 2020. Fungal evolution: cellular, genomic and metabolic complexity. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society 95(5): 1198-1232.

Notte, A.M., Plaza, V., Marambio-Alvarado, B., Olivares-Urbina, L., Poblete-Morales, M., Silva-Moreno, E. and Castillo, L. 2021. Molecular identification and characterization of *Botrytis cinerea* associated to the endemic flora and semi-desert climate in Chile. Current Research in Microbial Sciences 2: 100049

O'Neill, T.M., Shtienberg, D. and Elad, Y. 1997. Effect of some host and microclimate factors on infection of tomato stems by *Botrytis cinerea*. Plant Disease 81(1): 36-40.

Pesic, B., Hrustic, J., Mihajlovic, M., Grahovac, M. and Delibasic, G. 2014. *Botrytis cinerea* in raspberry in Serbia: morphological and molecular characterization. Pesticidi I Fitomedicina 29: 237-247.

Porquier, A., Tisserant, C., Salinas, F., Glassi, C., Wange, L., Enard, W., Hauser, A., Hahn, M. and Weiberg, A. 2021. Retrotransposons as pathogenicity factors of the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*, Genome Biology 22: 225. https://doi.org/10.1186/s13059-021-02446-4.

Rupp, S., Weber, R.W.S., Rieger, D., Detzel, P. and Hahn, M. 2017. Spread of *Botrytis cinerea* strains with multiple fungicide resistance in German horticulture. Frontiers in Microbiology 7: 2075. http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.02075.

Sautua, F.J., Baron, C., Perez-Hernandez, O.P. and Carmona, M.A. 2019. First report of resistance to carbendazim and procymidone in *Botrytis cinerea* from strawberry, blueberry and tomato in Argentina. Crop Protection 125. https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104879.

Staats, M., van Baarlen, P. and van Kan, J.A.L. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. Molecular Biology and Evolution 22(2): 333-346.

Stall, R.E. 1991. Gray Mold. Pp. 16-17. In: Jones, J.B., Jones, J.P., Stall, R.E. and Zitter, T.A. (eds.). Compendium of Tomato Diseases. American Phytopathological Society Press, st. Paul, M.N.

Steentjes, M.B.F., Scholten, O.E. and van Kan, J.A.L. 2021. Peeling the onion: towards a better understanding of *Botrytis* disease of onion. Phytopathology 111(3): 464-473.

Tanovic, B. and Ivanovic, M. 2010. First report of occurrence of benomyl resistance in *Botrytis cinerea* isolates on raspberry in Serbia. 94(4): 486. https://doi.org/10.1094/pdis-94-4-0486c.

Wessels, B.A. 2012. Genetic characterization and fungicide resistance profiles of *Botrytis cinerea* in rooibos nurseries and pear orchards in the Western Cape of South Africa. Master's thesis, Stellenbosch University, South Africa.

Williamson, B. Tudzynski, B. Tudzynski, P. and Van Kan, J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology 8: 561-580.

Comparison of pathogenicity of *Botrytis cinerea* isolates collected from vegetable and summer hosts in Varamin region and their resistance to common fungicides

H. Zafar[1] and V. Zarinnia[2*]

Received: 4 Jan., 2024 Accepted: 5 Mar., 2024

ABSTRACT

The gray mold disease of *Botrytis cinerea* (tel: *Botryotinia fuckeliana*), in the end part of the tail of the soft and watery fruit, turns green and shriveled. The disease agent maintains its survival in the form of sclerotia in the soil, mycelium in contaminated plant residues, and also in the form of asexual spores in the air. This polyphagous fungus causes disease in vegetable and summer greenhouse products such as tomatoes, peppers, cucumbers and eggplants under cool and humid conditions. In this research, sampling was done during 2013-2014 from the greenhouses of Varamin region and identification of *Botrytis cinerea* fungus was done in BSM special culture medium. In order to study the morphology of the fungus, the structure of the progeny, the shape of the conidia, the type of filaments, and the spores and sclerotia were studied. The distribution pattern of this fungus on the surface of the colonies in the culture medium and the effects of resistance to the three fungicides benomyl, carbendazim and fenhexamid were investigated by creating different groups of *B. cinerea*. The correlation of the obtained data was evaluated in SPSS software. The results of the data analysis showed that this pathogen has a considerable morphological diversity and resistance in Varamin city, which is useful in the production of vegetable and summer cultivars resistant to gray rot disease, as well as evaluating the diversity in fungus morphology and disease-causing characteristics of this pathogen in Varamin areas, and similar areas to the geography of Varamin region will be used.

Key words: Gray mold, morphology, resistance to chemicals

1. Former Msc. Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Food Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Corresponding author: Zarrinnia@gmail.com