

## مقایسه شدت بیماری زایی 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<sup>۱</sup> و وحید زرین نیا<sup>۲\*</sup>

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 به صورت اسپوره‌های غیر جنسی در هوا بقاء خود را حفظ می‌کند. این قارچ پلی‌فاژ در محصولات سبزی و صیفی گلخانه‌ای مانند گوجه‌فرنگی، لفل، 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 ریشه‌ها 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 ویتامین‌های 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 حالی که 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 بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده 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: Zarrinia@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 پاییز 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 میسلیم بر روی بافت‌های رو به زوال گیاه زنده بماند و برای مدت طولانی‌تر، اندام‌های مقاوم‌تری بنام اسکروت تولید می‌کند که در بقایای مرده گیاه زنده می‌مانند (Williamson et al., 2007؛ Staats et al., 2005).

در این مطالعه، به دلیل تنوع مورفولوژی بالای قارچ *B. cinerea* از نظر تیپ ریشه‌ها و اسپورها و اسکروت‌ها، 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 یافته‌های حاصل از این مطالعه برای ایجاد ارقام سبزی و صیفی مقاوم به بیماری پوسیدگی خاکستری و همچنین جهت ارزیابی میزان تنوع موجود در مورفولوژی 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 - 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 می‌شد؛ 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 و کشت 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،  $\text{NaNO}_3$ ،  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ،  $7\text{H}_2\text{O}$ ،  $\text{KCl}$ ،  $\text{MgSO}_4$ ،  $\text{pentachloronitrobenzene}$ ،  $\text{chloramphenicol}$ ، 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) ساخته شد.

از قارچ به مقدار  $10^6$  اسپور تهیه گردید؛ از سوسپانسیون اسپور خالص قارچ به مقدار یک میکرولیتر بر روی هر برگ گیاه لوبیا به صورت 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 تنظیم استریل، اسپورهای خالص جداسازی شد. سپس اسپورها بر روی لام هموسیتومتری در سه تکرار شمارش شد تا غلظت اسپور به میزان  $10^6$  برسد و پس از آن با سمپلر به صورت 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*

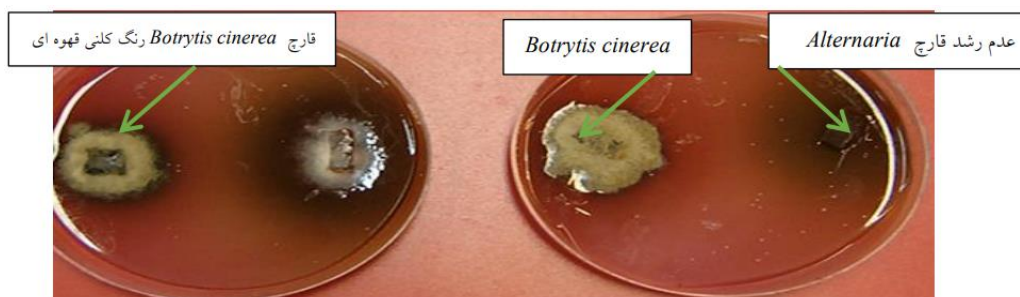
در این آزمون خصوصیات کلنی و اسپور اسکروت به صورت کشت چند روز ایزوله‌های قارچی بررسی شد. پس از گذشت چهار روز از رشد کلنی‌ها، اندازه‌گیری کلنی و اسپورها و تولید اسکروت طی بازه ۵ روز، ۱۲ روز، ۲۰ روز و ۲۸ روز با توجه به مقیاس‌های مورد نظر اندازه‌گیری شد و در اعداد صفر (بدون کلنی) تا ۴ نمره داده شدند؛ به‌طور مثال،  $1 > 25\%$  از مساحت کلنی در نظر گرفته شد (Korolev et al., 2008).

### ارزیابی مقاومت به قارچ‌کش‌ها

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 قهوه‌ای تغییر یافت و رنگ کلنی در گونه‌های دیگر بر روی این محیط کشت متفاوت بود. احتمالاً سایر گونه‌های *Botrytis* به علت وجود مواد ساختاری محیط کشت، رشد خیلی کمی دارند (شکل ۲). همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، 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 بیماری زایی

در تمام آزمایشات مربوط به بیماری زایی از گیاه لوبیا رقم پاک و از روش مایه‌زنی (De tach) برای تمامی جدایه‌ها استفاده گردید. علائم ایجاد شده روی رقم مذکور تا حدی با سایر گیاهان میزبان متفاوت بود. اولین علائم طی ۳-۵ روز پس از مایه‌زنی آشکار شدند. ارزیابی کلی در مورد قارچ بیمارگر ۷-۸ روز پس از اسپورپاشی انجام گرفت. علائم به صورت 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.



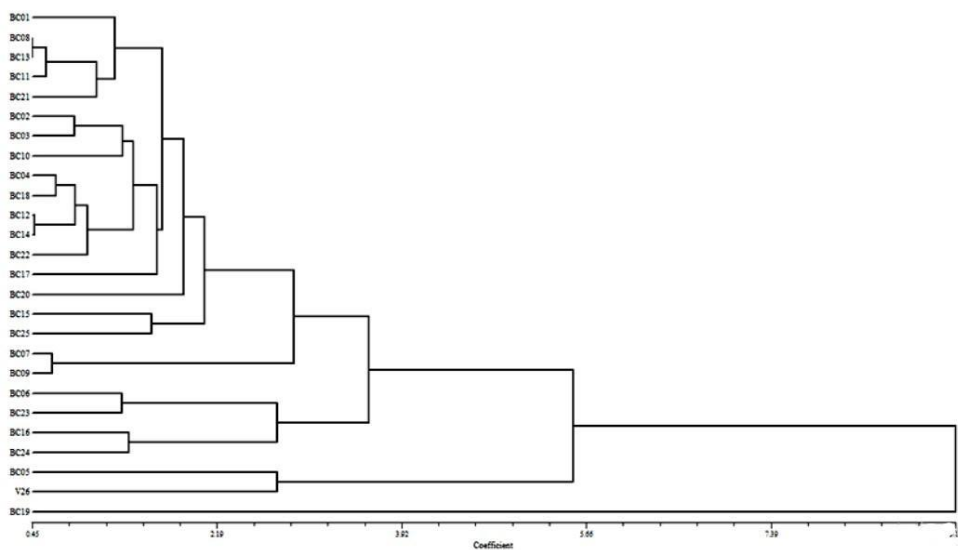
شکل ۳- علائم حاصل از *B. cinerea* بر روی برگ سالم حاوی سوسپانسیون اسپور (A) و برگ آلوده شده (B)  
Fig. 3. Symptoms of *B. cinerea* on a healthy leaf containing a spore suspension (A) and an infected leaf (B)

در این مطالعه ۵۰ جدایه از میزبان‌های آلوده به *B. cinerea* جمع‌آوری گردید. نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس داده‌های حاصل از بیماری زایی جدایه‌ها نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین جدایه‌های مورد بررسی از نظر شدت بیماری زایی بود (جدول ۱). همچنین نتایج نشان داد که زمان بر میزان بیماری زایی سویه‌های *B. cinerea* اثر معنی‌دار داشت؛ ولی اثر متقابل زمان و سویه در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار نبود (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-19 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 .

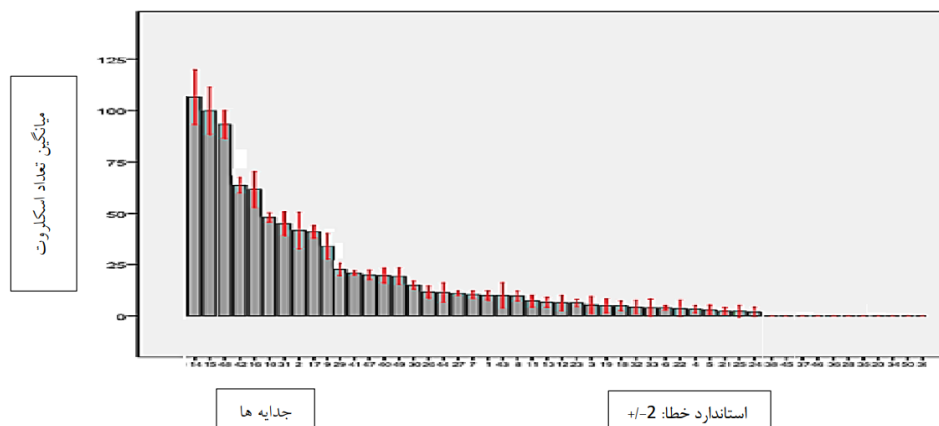
#### ارزیابی خصوصیات اسکروت‌های قارچ *Botrytis cinerea*

بررسی میانگین تعداد اسکروت‌ها نشان داد که جدایه‌های مورد بررسی *B. cinerea* علی‌رغم شرایط یکسان رشدی از نظر تعداد اسکروت برابر نبودند. بیشترین تعداد اسکروت 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

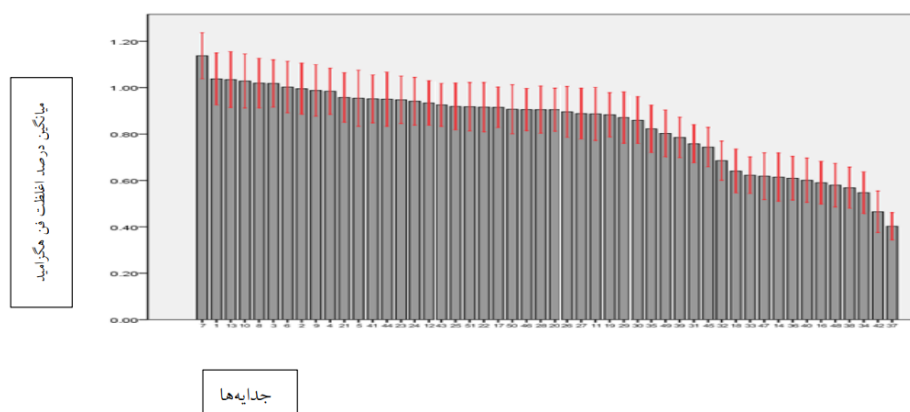
بر اساس یافته‌های حاصل از این تحقیق قارچ‌کش فن‌هگزامید در گونه *B. cinerea* از نظر مورفولوژیکی متمایز بود. جدایه‌های گونه *B. cinerea* نسبت به این قارچ‌کش از خود حالت حساس و نیمه‌حساس نشان دادند. در ارزیابی مقاومت قارچ *B. cinerea* به قارچ‌کش فن‌هگزامید، در مقادارهای معین در محیط کشت مشخص شد که جدایه‌های 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 اسکروت‌های حاصل از جدایه‌های *B. cinerea*

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



شکل ۶- میانگین رشد قطر کلنی جدایه‌ها تحت تأثیر فن‌هگزامید

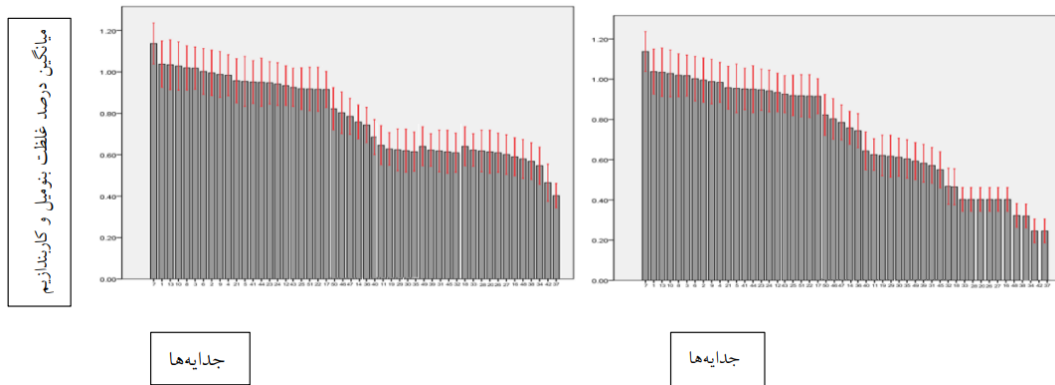
Fig. 6. Average colony diameter growth of isolates under the influence of phenhexamide

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، زیست‌بوم‌شناسی، 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 صیفی‌گلخانه‌ای 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 می‌شود. این قارچ تنوع ژنوتیپی و

فنتویی 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 کاربندازیم (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 به کار 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 به کار برده شده‌اند. موفقیت روش‌های سرولوژیک نیز بیشتر در تشخیص و به میزان کمتری در تعیین سطح آلودگی ناشی از *Botrytis* به کار 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 زمان بر 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 مورفولوژیک است. سه تیپ عمومی در این قارچ عبارتند از: مسیلیومی، اسپورزا و اسکروتی (Steentjes et al., 2021). این مورفوتیپ‌ها تا زمانی که تجدید کشت با استفاده از ریشه 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 مسیلیومی و اسکروتی 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 ۴-۶ 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 اسکروت‌ها 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 اسکروت و در درجه بعدی از ارتباط میزبانی استفاده شد و هشت گونه از قارچ *Botrytis* شناسایی گردید، که عبارتند از: *B. paeoniae*، *B. pelargonii*، *B. porri*، *B. cinerea*، *B. convoluta*، *B. gladiolorum*، *B. faba*، *B. aclada* و 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 اسکروت 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 اسکروت در بین ۱۳۰ جدایه *B. cinerea* مشاهده گردید؛ علاوه بر این درصد فراوانی تولید اسکروت 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 اسکروت مطابقت دارد. در تحقیق حاضر جدایه‌های ۱۴، ۱۵ و ۴۵ بیشترین درصد فراوانی تولید اسکروت 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 جدایه‌های *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 یافته‌های 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 بر علیه 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 به علت مقاومت *B. cinerea* نسبت به تمام قارچ‌کش‌های گروه بنزیمیدازول، استفاده از قارچ‌کش‌های این گروه مانند بنزیمیدازول می‌بایست با احتیاط بسیار زیاد در برنامه‌های 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 بر علیه جدایه‌های موجود در استان اتریش 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 بر علیه این بیمارگر توصیه گردید (Rupp et al., 2017) که از این نظر با نتایج حاصل از این تحقیق هم‌راستاست.

## References

## منابع

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): ۱۹۵-۲۰۷.

الهی‌نیا، 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 *Botryotinia 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., Tudzynski, P. and Delen. N. *Botrytis: Biology, Pathology and control*. Springer Publishers. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3\\_1](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 Baaren, 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<sup>1</sup> and V. Zarrinnia<sup>2\*</sup>

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