



## مقاله پژوهشی

# مطالعه تنوع گونه‌های جنس *Botrytis* جدا شده از گیاهان مختلف در استان آذربایجان غربی و شهرستان سنندج (استان کردستان)

حسین نبی‌زاده<sup>۱</sup>، عبدالله احمدپور<sup>۲\*</sup> و یوبرت قوستا<sup>۱</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۲۷)

## چکیده

جنس *Botrytis P. Micheli ex Pers.* یکی از بیمارگرهای همه‌جازی است که با ایجاد بیماری‌های مخرب، سبب بروز خسارت‌های مهم اقتصادی در تعداد زیادی از گیاهان در سراسر دنیا می‌شود. بر اساس مطالعات جامع ریخت‌شناختی همراه با تبارشناسی مولکولی در حال حاضر ۳۸ گونه و یک دورگه در این جنس قرار داده شده‌اند. به منظور شناسایی گونه‌های این جنس از میزبان‌های مختلف گیاهی، گیاهان دارای علائم آلودگی به این قارچ از باغات و گلخانه‌ها در شهرستان‌های ارومیه، میاندوآب، سردشت و پیرانشهر (استان آذربایجان غربی) و سنندج (استان کردستان) جمع‌آوری شدند. در مجموع تعداد ۲۷۱ جدایه از گیاهان انگور (۱۶۸ جدایه)، توت‌فرنگی (۴۴ جدایه)، سیب (۱۸ جدایه)، گیاهان زینتی شامل شمعدانی، آلوئه‌ورا و کاکتوس (۳۹ جدایه) و کلم سفید (دو جدایه) به دست آمد. بر اساس مقایسه ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تجزیه و تحلیل تبارشناختی نواحی ژنومی *G3PDH*، *HSP60* و *RPB2* سه گونه شامل *B. cinerea*، *B. prunorum* و *B. sinoviticola* شناسایی گردید. گونه *B. prunorum* با ۱۲۵ جدایه، فراوانترین گونه و گونه‌های *B. cinerea* با ۱۱۶ جدایه و *B. sinoviticola* با ۳۰ جدایه در رتبه‌های بعدی از نظر فراوانی قرار گرفتند. گونه *B. prunorum* گونه جدید برای بیوتای قارچی ایران است و گیاهان انگور، توت‌فرنگی، سیب و شمعدانی میزبان‌های جدید برای این گونه معرفی می‌شوند. همچنین، گیاهان انگور و سیب میزبان‌های جدیدی برای گونه *B. sinoviticola* گزارش می‌شوند. نتایج آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب از گونه‌های شناسایی شده روی برگ‌ها و میوه‌های انگور رقم بی‌دانه سفید نشان داد که جدایه‌های گونه‌های *B. cinerea* و *B. prunorum* به ترتیب بیشترین و کمترین شدت بیماری‌زایی را روی برگ‌ها و میوه‌ها نشان دادند و جدایه‌های گونه *B. sinoviticola* شدت بیماری‌زایی متوسطی داشتند. هیچ رابطه مشخصی بین بیماری‌زایی، سرعت رشد و تیپ پرگنه جدایه‌ها و نوع میزبان گیاهی جداسازی شده مشاهده نگردید. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گونه *B. prunorum* می‌تواند به دلیل فراوانی بالای مشاهده شده در برخی از میزبان‌ها و نیز وقوع آن روی میزبان‌های جدید به عنوان بیمارگر مهم عامل پوسیدگی خاکستری در نواحی مورد مطالعه مطرح شود.

کلیدواژه: *Botrytis*، گونه مرکب، کپک خاکستری، تبارشناسی چندژنی، بیماری‌زایی

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a.ahmadpour@urmia.ac.ir

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

۲. استادیار مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه، میاندوآب، ایران.



## Research Article

## Study on the diversity of *Botrytis* spp. from different plants in West Azarbaijan province and Sanadaj city (Kurdistan province)

H. Nabizadeh<sup>1</sup>, A. Ahmadpour<sup>2\*</sup>, and Y. Ghosta<sup>1</sup>

(Received: 13.1.2022; Accepted: 16.2.2022)

### Abstract

The genus *Botrytis* P. Micheli ex Pers., is a cosmopolitan plant pathogenic fungus, causing destructive plant diseases and significant crop losses in a wide variety of plant species all over the world. According to comprehensive morphological and molecular phylogenetic studies, at present, 38 species and one hybrid are included in this genus. In order to identification of *Botrytis* species from different crop plants, symptomatic plants were collected from different orchards and greenhouses in Urmia, Miyandoab, Sardasht and Piranshahr (West Azarbaijan province) and Sanandaj (Kurdistan province). Totally, 271 *Botrytis* isolates were recovered from grapevine (168 isolates), strawberry (44 isolates), apple (18 isolates), ornamental plants (Geranium, Aloe vera and Cacti) (39 isolates) and white-headed cabbage (2 isolates). Based on comparison of morphological characteristics and phylogenetic analyses using sequences of three protein-coding genes *G3PDH*, *HSP60* and *RPB2*, three species including *Botrytis cinerea*, *B. prunorum* and *B. sinoviticola* were identified. *Botrytis prunorum* with 125 isolates was the most prevalent species followed by *B. cinerea* (116 isolates), and *B. sinoviticola* (30 isolates). *Botrytis prunorum* is a new species to Iran mycobiota and apple, grapevine, geranium and strawberry are introduced as new hosts (*matrix nova*) for this species. Also, apple and grapevine are reported here as new hosts for *B. sinoviticola*. Results of pathogenicity tests of the selected isolates from the identified species on leaves and berries of Thompson seedlees grape showed that isolates of *B. cinerea* and *B. prunorum* had the highest and lowest aggressiveness on both leaves and fruits, respectively and *B. sinoviticola* isolates had moderate aggressiveness. There was not any relationship between the isolate growth rate, colony type, aggressiveness and the type of plant host. The results of this study showed that *B. prunorum* can be a significant gray mold pathogen in the studied area being observed in higher proportion and distribution and its presence on new plant species.

**Keywords:** *Botrytis*, complex species, gray mold, multigene phylogeny, pathogenicity

\* Corresponding author's E-mail: a.ahmadpour@urmia.ac.ir

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Iran.

2. Higher Education Center Shahid Bakeri Miyandoab, Urmia University, Miyandoab, Iran.

## مقدمه

بوده و اصولاً به گیاهان تک‌لپه‌ای یا دولپه‌ای حمله می‌کنند، اما برخی از گونه‌ها دارای دامنه میزبانی وسیعی می‌باشند و گیاهان متعلق به ۱۷۰ تیره گیاهی را مورد حمله قرار می‌دهند که از بین آنها، بیش از ۱۴۰۰ گونه متعلق به گیاهان کشت شده هستند (Williamson *et al.* 2007, Elad *et al.* 2016, Valero-Jiménez *et al.* 2019, Esterio *et al.* 2020, Garfinkel 2021, Prasannath *et al.* 2021, Richards *et al.* 2021). بیماری‌های ایجاد شده توسط گونه‌های این جنس به طور معمول به نام پوسیدگی خاکستری خوانده می‌شوند هر چند برخی گونه‌ها می‌توانند بیماری‌هایی مانند سوختگی شکوفه‌ها، لکه برگ، سوختگی برگ، پوسیدگی گردن پیاز و پوسیدگی حبه‌های سیر را ایجاد کنند (Ellerbrock & Lorbeer 1977, Dugan *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2008, 2009, 2010, Walker *et al.* 2011, Harper *et al.* 2019). بسیاری از گونه‌ها، تعداد زیادی کنیدیوم غیرجنسی را در نوک کنیدی‌برهای منشعب تولید می‌کنند که بسته به دما، رطوبت، فعالیت میکروبی و قرار گرفتن در معرض نور عمر کوتاهی دارند (Carisse *et al.* 2012, Nassr & Barakat 2013).

شناسایی گونه‌ها در جنس *Botrytis* اصولاً بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی و کشت از قبیل ریخت‌شناسی پرگنه، شکل و اندازه اسپورها، تعداد، سازماندهی و اندازه سختینه‌ها و ریخت‌شناسی ریشه روی محیط‌های کشت استوار بوده است (Hennebert 1973, Jarvis 1980, Li *et al.* 2012, Lorenzini & Zapparoli 2014). در بازنگری جنس *Botrytis* و جنس‌های مشابه با آن، ۲۲ گونه در جنس *Botrytis* شناسایی شدند (Hennebert 1973). با این وجود، بیشتر گونه‌ها از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناختی به هم شبیه بوده و سطوح بالایی از تنوع ریخت‌شناختی در

جنس *Botrytis* P. Micheli ex Pers. از اولین جنس‌های شناخته شده در شاخه آسکومیکوتا است که برای اولین بار در سال ۱۷۲۹ توسط میشلی توصیف شد و در سال ۱۸۰۱ توسط پرسون با گونه تیپ *B. cinerea* Pers. معتبر گردید (Hennebert 1973, Walker 2016, He *et al.* 2021). گونه‌های این جنس از شایع‌ترین و زیان‌بارترین بیمارگرهای گیاهی در جهان بوده و از تمامی اقلیم‌ها گزارش شده‌اند. آنها سبب خسارت اقتصادی به عملکرد محصول در مزارع و گلخانه‌ها می‌شوند و به عنوان بیمارگرهای مهم پس از برداشت محصولات مختلف مانند میوه‌ها، گل‌های شاخه بریده، گیاهان پیازدار و حتی بذرها شناخته شده‌اند به نحوی که خسارت سالیانه آنها در مقیاس جهانی حدود ۱۰۰-۱۰ میلیارد دلار برآورد شده است (Elad *et al.* 2007, Boddy 2015). گونه‌های جنس *Botrytis* به عنوان بیمارگرهای مهاجم مرده‌پرور (نکروتروفیک) شناخته می‌شوند که از نظر زیست‌شناسی، بوم‌شناسی، دامنه میزبانی، آزارگری و ویژگی‌های ریخت‌شناختی با هم تفاوت دارند. برخی از گونه‌ها نیز به عنوان گونه‌های درون‌زی (اندوفیت) بدون نشانه در داخل میزبان خود رشد می‌کنند و گونه *B. deweyae* van Kan, R.B. Terhem & Grant-Downt. در مراحل اولیه آلودگی میزبان‌ها هیچگونه نشانه مشهودی از بیماری را بروز نمی‌دهد و می‌تواند از بافت‌های تازه رشد کرده میزبان جداسازی شود، اما در زمان رسیدن میزبان لکه‌های بافت‌مرده را در آن ایجاد می‌کند (Barnes & Show 2003, Shipunov *et al.* 2008, Sowley *et al.* 2010, Grant-Downton *et al.* 2014, Shaw *et al.* 2016). بسیاری از گونه‌ها دارای دامنه میزبانی محدود (اختصاصی میزبان)

*Taraxacum officinale* (L.) Weber ex *stoebe* L. و *Paeonia* F.H.Wigg. بدون نشانه آلودگی و گیاهان بیمار *lactiflora* Pall. Shipunov *et al.* (2008, Shaw *et al.* 2016, Garfinkel *et al.* 2019).  
 بر اساس اطلاعات موجود، در حال حاضر ده گونه از جنس *Botrytis* در ایران و از روی ۴۰ میزبان گیاهی گزارش شده است (Mirzaei *et al.* 2008, Ershad 2009, Sadeghi *et al.* 2018). اطلاع از ترکیب جمعیتی یا گونه‌های بیمارگر برای اجرای موثر اقدامات مدیریتی بیماری بسیار مهم هستند زیرا واکنش گونه‌های مختلف در برابر ترکیبات شیمیایی قارچ‌کش، روابط میزبان-بیمارگر، وضعیت زیست‌شناسی و همه‌گیری آنها، علیرغم حضور در یک کنج بوم‌شناختی (niche)، ممکن است متفاوت باشد (Plesken *et al.* 2015, Esterio *et al.* 2020).  
 توجه به اهمیت بیماری‌شناسی گونه‌های جنس *Botrytis* در گیاهان مختلف، وجود گونه‌های متفاوت در یک کنج بوم‌شناختی، استفاده از داده‌های مولکولی در جهت شناسایی صحیح گونه‌ها و عدم اطلاع کافی از وجود و تنوع گونه‌های این جنس در گیاهان مختلف در سطح استان آذربایجان غربی، ضرورت دارد مطالعات متمرکزی در جهت شناسایی و تعیین وضعیت فراوانی و پراکنش گونه‌ها در گیاهان مختلف در سطح استان انجام شود. لذا مطالعه حاضر با هدف جداسازی و شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی گونه‌های جنس *Botrytis* از میزبان‌های مختلف گیاهی در استان آذربایجان غربی و شهرستان سنندج (استان کردستان)، تعیین فراوانی و پراکنش گونه‌ها در مناطق مورد بررسی و مشخص کردن بیماریزایی جدایه‌های گونه‌های شناسایی شده روی برگ‌ها و میوه‌های انگور رقم بی‌دانه سفید انجام گرفته است.

یک گونه تشخیص داده می‌شود. علاوه بر آن شرایط کشت بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی تأثیر زیادی دارد و در تجدید کشت جدایه‌ها، این ویژگی‌ها پایدار نمی‌مانند (Lorenz *et al.* 1983, Martinez *et al.* 2003, Garfinkel *et al.* 2021, Garfinkel 2019). به همین دلیل روش‌های مولکولی بر مبنای تکثیر و توالی‌یابی DNA برای شناسایی گونه‌ها توسعه یافتند و در حال حاضر به طور گسترده‌ای برای تشخیص و تعیین حدود گونه‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند (Staats *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2010, 2016, Walker *et al.* 2011, Saito *et al.* 2016, Zhong *et al.* 2019, Garfinkel 2021, He *et al.* 2021, Richards *et al.* 2021). این مطالعات در بردارنده توالی‌های نواحی ITS-rDNA و توالی‌های ژن‌های رمزکننده پروتئین مانند گلیسرآلدئید-۳-فسفات دهیدروژناز (*G3PDH*)، پروتئین شماره ۶۰ شوک گرمایی (*HSP60*)، دومین زیر واحد بزرگ آر‌ان‌ای پلیمراز دو وابسته به دی‌ان‌ای (*RPB2*) و پروتئین‌های شماره یک و دو القاء‌کننده اتیلن و بافت‌مردگی (*NEP1* و *NEP2*) بوده‌اند (Staats *et al.* 2005, Garfinkel *et al.* 2017, Garfinkel 2021, Richards *et al.* 2021). همچنین توالی ناحیه ITS برای تعیین حدود گونه‌ها در جنس *Botrytis* مفید و قابل استفاده نبوده و تنها برای تمایز جنس *Botrytis* از سایر جنس‌ها در تیره *Sclerotiniaceae* استفاده شده است (Beever & Weeds 2007, Walker 2016, He *et al.* 2021). در حال حاضر نتایج مطالعات ریخت‌شناسی همراه با تبارشناسی مبتنی بر چند ژن، وجود ۳۸ گونه همراه با یک گونه دورگه (گونه *B. allii* Munn، دورگه حاصل از تلاقی گونه‌های *B. aclada* و *B. byssoidea* J.C. Walker Fresen. را مشخص کرده‌اند (Garfinkel *et al.* 2019, Garfinkel 2021, He *et al.* 2021, Prasannath *et al.* 2021) و ۱۷ گونه تعیین نام نشده از گیاهان *Centaurea*

## مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی، خالص‌سازی و نگاهداری  
جدایه‌های قارچی

نمونه‌برداری به صورت تصادفی از باغات، مزارع و گلخانه‌های تحت کشت گیاهان مختلف از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی و شهرستان سنندج در استان کردستان طی تابستان و پاییز سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۷ انجام گرفت. نمونه‌ها از گیاهان دارای نشانه‌های آلودگی مانند پوسیدگی خاکستری، سوختگی و لکه برگی تهیه و داخل پاکت کاغذی حاوی مشخصات به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی قارچ‌ها از بافت‌های آلوده از روش محفظه مرطوب استفاده شد. برای این منظور در تعدادی از نمونه‌ها، بافت‌ها بدون شستشو و ضدعفونی سطحی در داخل ظروف پلاستیکی یکبار مصرف تمیز و حاوی سه لایه از دستمال کاغذی سترون خیس شده با آب مقطر سترون قرار داده شدند و در بقیه موارد، ابتدا نمونه‌ها با آب جاری به آرامی شسته شدند، سپس به مدت دو دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی سطحی شده و پس از شستشو با آب مقطر سترون در داخل ظروف ذکر شده قرار گرفتند. ظروف در شرایط دمای اتاق به مدت ۱-۲ هفته نگاهداری شدند و در فواصل ۴۸ ساعته مورد بررسی قرار گرفتند. پس از رشد قارچ‌ها روی بافت‌های گیاهی، توده‌های اسپورها و یا گاهی میسلیم‌های دارای ویژگی‌های شاخص جنس *Botrytis* با استفاده از سوزن ظریف و سترون برداشته و در محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA، شرکت Merck، ۳۹ گرم در یک لیتر آب مقطر) کشت شدند. قارچ‌های رشد کرده به تشتک‌های پتری جدید حاوی محیط کشت آب-آگار دو درصد (2% WA) منتقل شدند و به روش تک

اسپور یا نوک ریشه خالص‌سازی شدند. رشد جدایه‌ها روی قطعات کاغذ صافی سترون و لوله‌های آزمایش حاوی محیط کشت PDA در شرایط دمای اتاق به مدت یک هفته انجام گرفت و نمونه‌ها در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگاهداری شدند.

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های جنس *Botrytis*

به منظور مطالعه ویژگی‌های ریخت‌شناختی، جدایه‌ها در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA کشت شدند و در انکوباتور با دمای  $20 \pm 2$  درجه سلسیوس به مدت ۷ تا ۱۰ روز نگاهداری گردیدند. پس از رشد و اسپورزایی، لام‌های میکروسکوپی مناسب از آنها تهیه شد. شناسایی گونه‌ها با استفاده از توصیفات و نیز کلیدهای شناسایی معتبر گونه‌ها بر مبنای ویژگی‌هایی از قبیل رنگ و نحوه رشد پرگنه، وجود یا عدم وجود سختینه، ابعاد و شکل کنیدی‌برها و کنیدیوم‌ها انجام گرفت (Zhang et al. 2010, 2016, Walker et al. 2011, Saito et al. 2016, Zhong et al. 2019, He et al. 2021). جدایه‌های منتخب از گونه‌های شناسایی شده در کلکسیون قارچ‌های مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور (تهران) (IRAN) و تمامی جدایه‌ها در کلکسیون قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ارومیه (FCCUU) نگاهداری می‌شوند.

## مطالعات مولکولی

## استخراج DNA و تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر

دی‌ان‌ای ژنومی از جدایه‌های قارچی و از میسلیم‌های تازه و رشد یافته روی محیط کشت PDA برای مدت ۱۰-۷ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس بر اساس روش ژانگ و استفنسون (Zhong & Steffenson 2001) استخراج گردید. انگشت‌نگاری DNA بر اساس روش ISSR-PCR

جدول ۱. مشخصات آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه

**Table 1. Characteristics of the primers used in this study**

Locus	Primer name	Primer sequences (5'→3')	Product size (bp)	Annealing temperature	Reference
<i>RPB2</i>	RPB2for	GATGATCGTGATCATTTCGG	1200	60	Staats <i>et al.</i> 2005
	RPB2rev	CCCATAGCTTGCTTACCCAT			
<i>G3PDH</i>	G3PDHfor	ATTGACATCGTCGCTGTCAACGA	900	57	Staats <i>et al.</i> 2005
	G3PDHrev	ACCCCACTCGTTGTCGTACCA			
<i>HSP60</i>	HSP60for	CAACAATTGAGATTTGCCACAAG	1100	57	Staats <i>et al.</i> 2005
	HSP60rev	GATGGATCCAGTGGTACCGAGCAT			
ISSR	BOT ISSR4	CACCACCACCACCAC	-	49	Ma & Michailides 2005

Documentation (مدل Glit، تایوان) عکسبرداری انجام گرفت. الگوی بانندی جدایه‌ها بررسی و باندهای حاصله به صورت صفر (برای عدم حضور باند) و یک (برای حضور باند) کدهی شدند و دندروگرام مربوطه با استفاده از نرم‌افزار NTSYSpc-2.02e (Rohlf, 1998) و الگوریتم unweighted pair group method with (UPGMA) arithmetic mean) بر اساس ضریب تشابه دایس رسم شد. بر اساس ترکیب ویژگی‌های ریخت‌شناختی و دندروگرام حاصل از الگوی بانندی آغازگر Bot ISSR4، تعداد ۳۲ جدایه برای مطالعات تبارشناسی انتخاب گردید (جدول ۲).

در این مطالعه، ابتدا ژن *RPB2* در ۳۲ جدایه منتخب تکثیر و توالی‌یابی گردید. سپس بر اساس تبارنمای ترسیم شده (شکل ۵) و ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌ها، ژن‌های *G3PDH* و *HSP60* نیز در ۱۵ جدایه تکثیر و توالی‌یابی شدند. از جفت آغازگرهای *G3PDHfor*، *G3PDHrev* برای تکثیر بخشی از ژن *G3PDH*، آغازگرهای *HSP60for*، *HSP60rev* برای تکثیر بخشی از ژن *HSP60* و آغازگرهای *RPB2for* و *RPB2rev* برای تکثیر بخشی از ژن *RPB2* در جدایه‌های منتخب استفاده شد (Staats *et al.* 2005). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم نهایی ۳۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس

و با استفاده از آغازگر Bot ISSR4 طبق توصیف ما و میکائیلیدیس (Ma & Michailides 2005) انجام گرفت. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم ۱۰ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر از آغازگر (۰/۵ پیکومول)، چهار میکرولیتر مسترمیکس آماده (Taq DNA polymerase 2X Master Mix Red, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, Ampliqon Company, Denmark)، حدود ۱۰ نانوگرم DNA جدایه قارچی و چهار میکرولیتر آب دیونیزه سترون تهیه گردید. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل (SimpliAmp, Applied Biosystems, USA) و با اعمال دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه جهت واسرشت‌سازی اولیه و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۵۰ ثانیه، دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. توالی نوکلئوتیدی آغازگرها در جدول ۱ درج شده است. آغازگرها توسط شرکت متابیون (Metabion Corp.) آلمان تأمین شدند. محصولات تکثیر یافته روی ژل آگارز یک درصد همراه با نشانگر اندازه‌ای DNA (Exel Band DNA Ladder 100bp+3 kb به شماره DM2300) الکتروفورز شدند و با استفاده از دستگاه

جدول ۲. جزئیات جدایه‌ها و توالی‌های استفاده شده در تجزیه و تحلیل‌های تبارشناختی در این مطالعه

Table 2. Details of isolates and sequences used in phylogenetic analyses in this study

Species	Isolate/strain	Host	GenBank accession number			Reference
			<i>G3PDH</i>	<i>HSP60</i>	<i>RPB2</i>	
<i>Botrytis aclada</i>	PRI006	<i>Allium</i>	AJ704993	AJ716051	AJ745665	Staats et al. 2005
	MUCL3106	<i>Allium</i>	AJ704991	AJ716049	AJ745663	Staats et al. 2005
<i>B. allii</i>	MUCL403	<i>Allium</i>	AJ704996	AJ716055	AJ745666	Staats et al. 2005
<i>B. byssoidea</i>	MUCL94	<i>Trifolium</i>	AJ704998	AJ716059	AJ745670	Staats et al. 2005
<i>B. californica</i>	X655	<i>Vitis vinifera</i>	KJ937069	KJ937059	KJ937049	Saito et al. 2016
	X503	<i>Vitis vinifera</i>	KJ937068	KJ937058	KJ937048	Saito et al. 2016
<i>B. calthae</i>	CBS175.63	<i>Caltha</i>	AJ704999	AJ716060	AJ745671	Staats et al. 2005
	MUCL1089	<i>Caltha</i>	AJ705000	AJ716061	AJ745672	Staats et al. 2005
<i>B. caroliniana</i>	CA3	<i>Rubus fruticosus</i>	JF811586	JF811589	JF811592	Li et al. 2012
	CB15	<i>Rubus fruticosus</i>	JF811584	JF811587	JF811590	Li et al. 2012
<i>B. cinerea</i>	SAS405	<i>Vitis vinifera</i>	AJ705005	AJ716066	AJ745678	Staats et al. 2005
	B05.10	<i>Vitis vinifera</i>	AJ705002	AJ716063	AJ745674	Staats et al. 2005
<i>B. cinerea</i>	BB4	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465805	This study
<i>B. cinerea</i>	E20	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465806	This study
<i>B. cinerea</i>	K7	<i>Vitis vinifera</i>	MW465777	MW465790	MW465807	This study
<i>B. cinerea</i>	K20=IRAN 4282C	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465834	This study
<i>B. cinerea</i>	R5	<i>Vitis vinifera</i>	MW473717	MW465791	MW465808	This study
<i>B. cinerea</i>	R8	<i>Vitis vinifera</i>	MW465778	MW465792	MW465809	This study
<i>B. cinerea</i>	R14	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465810	This study
<i>B. cinerea</i>	S1	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465811	This study
<i>B. cinerea</i>	S8	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465812	This study
<i>B. cinerea</i>	A1	<i>Fragaria ananassa</i>	MW465779	MW465793	MW465835	This study
<i>B. cinerea</i>	P7=IRAN 4283C	<i>Fragaria ananassa</i>	MW465780	MW465794	MW465813	This study
<i>B. cinerea</i>	P13	<i>Fragaria ananassa</i>	-	-	MW465814	This study
<i>B. cinerea</i>	D2	<i>Pelargonium</i>	-	-	MW465815	This study
		<i>hirsutum</i>	MW465781	MW465795	MW465816	This study
<i>B. cinerea</i>	DD11	<i>Pelargonium</i>	MW465782	MW465796	MW465817	This study
<i>B. cinerea</i>	SH	<i>Zantedeschia</i>	-	-	MW465818	This study
		<i>aethiopica</i>	-	-	MW465819	This study
<i>B. cinerea</i>	AL	<i>Aloe vera</i>	-	-	MW465819	This study
<i>B. convoluta</i>	9801	<i>Iris</i>	AJ705007	AJ716068	AJ745679	Staats et al. 2005
	MUCL11595	<i>Iris</i>	AJ705008	AJ716069	AJ745680	Staats et al. 2005
<i>B. croci</i>	MUCL436	<i>Crocus</i>	AJ705009	AJ716070	AJ745681	Staats et al. 2005
<i>B. deweyae</i>	CBS134649	<i>Hemerocallis</i>	HG799521	HG799519	HG799518	Grant-Downton. et al. 2014
<i>B. elliptica</i>	BE9610	<i>Lilium</i>	AJ705011	AJ716072	AJ745683	Staats et al. 2005
	BE9714	<i>Lilium</i>	AJ705012	AJ716073	AJ745684	Staats et al. 2005
<i>B. eucalypti</i>	CFCC51322	<i>Eucalyptus</i>	KX301018	KX301022	KX301026	Liu et al. 2016
	CGMCC3.18028	<i>Eucalyptus</i>	KX301020	KX301024	KX301028	Liu et al. 2016
<i>B. euroamericana</i>	AK10	<i>Paeonia × lactiflora</i>	KX266727	KX266733	KX266739	Garfinkel et al. 2017
<i>B. fabae</i>	B83	<i>Vitis vinifera</i>	KC191677	KC191678	KC191679	Garfinkel et al. 2017
	CBS109.57	<i>Faba</i>	AJ705013	AJ716074	AJ745685	Staats et al. 2005
<i>B. fabiopsis</i>	MUCL98	<i>Faba</i>	AJ705014	AJ716075	AJ745686	Staats et al. 2005
	BroadbeanBC-2	<i>Vicia</i>	EU519211	EU514482	EU514473	Zhang et al. 2010
<i>B. ficariarum</i>	BroadbeanBC-13	<i>Vicia</i>	EU563109	EU563100	EU563115	Zhang et al. 2010
	CBS176.63	<i>Ficaria</i>	AJ705015	AJ716076	AJ745687	Staats et al. 2005
	MUCL376	<i>Ficaria</i>	AJ705016	AJ716077	AJ745688	Staats et al. 2005

Table 2. Continued

Species	Isolate/strain	Host	GenBank accession number			Reference
			<i>G3PDH</i>	<i>HSP60</i>	<i>RPB2</i>	
<i>B. fragariae</i>	U14_H3	<i>Fragaria</i>	KX429701	KX429694	KX429708	Rupp <i>et al.</i> 2017
	D11_H_R4	<i>Fragaria</i>	KX429702	KX429695	KX429709	Rupp <i>et al.</i> 2017
<i>B. galanthina</i>	MUCL435	<i>Galanthus</i>	AJ705018	AJ716079	AJ745689	Staats <i>et al.</i> 2005
	MUCL3204	<i>Galanthus</i>	AJ705017	AJ716078	AJ745690	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>B. gladiolorum</i>	9701	<i>Gladiolus</i>	AJ705019	AJ716080	AJ745691	Staats <i>et al.</i> 2005
	MUCL3865	<i>Gladiolus</i>	AJ705020	AJ716081	AJ745692	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>B. globosa</i>	MUCL444	<i>Allium</i>	AJ705022	AJ716083	AJ745693	Staats <i>et al.</i> 2005
	MUCL21514	<i>Allium</i>	AJ705021	AJ716082	AJ745694	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>B. hyacinthi</i>	1	<i>Hyacinthus</i>	AJ705023	AJ716084	AJ745695	Staats <i>et al.</i> 2005
	MUCL442	<i>Hyacinthus</i>	AJ705024	AJ716085	AJ745696	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>B. mali</i>	BPI412756	<i>Malus</i>	EF367129	-	-	O'Gorman <i>et al.</i> 2008
	BPI411770	<i>Malus</i>	EF367121	-	-	O'Gorman <i>et al.</i> 2008
<i>B. medusae</i>	B-555	<i>Vitis vinifera</i>	MH732861	MH732866	MH732870	Harper <i>et al.</i> 2019
<i>B. narcissicola</i>	MUCL18857	<i>Narcissus</i>	AJ705025	AJ716086	AJ745698	Staats <i>et al.</i> 2005
	MUCL2120	<i>Narcissus</i>	AJ705026	AJ716087	AJ745697	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>B. paeoniae</i>	3	<i>Paeonia</i>	AJ705027	AJ716088	AJ745699	Staats <i>et al.</i> 2005
	MUCL16084	<i>Paeonia</i>	AJ705028	AJ716089	AJ745700	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>B. pelargonii</i>	CBS497.50	<i>Pelargonium</i>	AJ704990	AJ716046	AJ745662	Staats <i>et al.</i> 2005
	MUCL1152	<i>Pelargonium</i>	AJ705029	AJ716090	AJ745701	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>B. polyblastis</i>	CBS287.38	<i>Narcissus</i>	AJ705030	AJ716091	AJ745702	Staats <i>et al.</i> 2005
	MUCL21492	<i>Narcissus</i>	AJ705031	AJ716092	AJ745703	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>B. polygoni</i>	Poly-1	<i>Fallopia convolvulus</i>	MG846496	MG846501	MG846506	He <i>et al.</i> 2021
	Poly-2	<i>Fagopyrum esculentum</i>	MG846497	MG846502	MG846507	He <i>et al.</i> 2021
<i>B. polyphyllae</i>	YN1	<i>Paris polyphyllae</i>	MG387957	MG431978	MG431975	Zhong <i>et al.</i> 2019
	YN3	<i>Paris polyphyllae</i>	MG387959	MG431980	MG431977	Zhong <i>et al.</i> 2019
<i>B. porri</i>	MUCL3234	<i>Allium</i>	AJ705032	AJ716093	AJ745704	Staats <i>et al.</i> 2005
	MUCL3349	<i>Allium</i>	AJ705033	AJ716094	AJ745705	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>B. prunorum</i>	Bpru-8	<i>Prunus domestica</i>	KP339979	KP339993	KP339986	Ferrada <i>et al.</i> 2016
	Bpru-21	<i>Prunus domestica</i>	KP339980	KP339994	KP339987	Ferrada <i>et al.</i> 2016
<i>B. prunorum</i>	BB3	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465820	This study
<i>B. prunorum</i>	BN3	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465821	This study
<i>B. prunorum</i>	E3=IRAN 4281C	<i>Vitis vinifera</i>	MW465783	MW465799	MW465822	This study
<i>B. prunorum</i>	C2	<i>Fragaria ananassa</i>	-	-	MW465823	This study
<i>B. prunorum</i>	P20= IRAN 4280C	<i>Fragaria ananassa</i>	MW465784	MW465800	MW465824	This study
<i>B. prunorum</i>	X7	<i>Malus domestica</i>	MW465785	MW465801	MW465825	This study
<i>B. prunorum</i>	X14	<i>Malus domestica</i>	MW465786	MW465802	MW465826	This study
<i>B. prunorum</i>	X15= IRAN 4278C	<i>Malus domestica</i>	MW465787	MW465803	MW465827	This study
<i>B. prunorum</i>	DD8= IRAN 4279C	<i>Pelargonium hirsutum</i>	MW465788	MW465804	MW465828	This study
<i>B. pseudocinerea</i>	10091	<i>Vitis vinifera</i>	JN692414	JN692400	JN692428	Zhou <i>et al.</i> 2014
	X1303	<i>Vitis vinifera</i>	KJ796654	KJ796658	KJ796650	Saito <i>et al.</i> 2014
<i>B. pyriformis</i>	SedsarBC-1	<i>Sedum sarmentosum</i>	KJ543484	KJ543488	KJ543492	Zhang <i>et al.</i> 2016
	SedsarBC-2	<i>Sedum sarmentosum</i>	KJ543485	KJ543489	KJ543493	Zhang <i>et al.</i> 2016
<i>B. ranunculi</i>	CBS178.63	<i>Ranunculus</i>	AJ705034	AJ716095	AJ745706	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>B. sinoallii</i>	OnionBC-23	<i>Allium</i>	EU519217	EU514488	EU514479	Zhang <i>et al.</i> 2010
	OnionBC-59	<i>Allium</i>	FJ169646	FJ169658	FJ169678	Zhang <i>et al.</i> 2010



Table 2. Continued

Species	Isolate/strain	Host	GenBank accession number			Reference
			<i>G3PDH</i>	<i>HSP60</i>	<i>RPB2</i>	
<i>B. sinoviticola</i>	GBC-3-2b	<i>Vitis vinifera</i>	JN692411	JN692397	JN692425	Zhou <i>et al.</i> 2014
	GBC-5	<i>Vitis vinifera</i>	JN692413	JN692399	JN692427	Zhou <i>et al.</i> 2014
<i>B. sinoviticola</i>	BH8	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465829	This study
<i>B. sinoviticola</i>	BN13	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465836	This study
<i>B. sinoviticola</i>	BN4	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465830	This study
<i>B. sinoviticola</i>	CX3	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465831	This study
<i>B. sinoviticola</i>	E10=IRAN 4284C	<i>Vitis vinifera</i>	MW473718	MW465797	MW465832	This study
<i>B. sinoviticola</i>	K19	<i>Vitis vinifera</i>	-	-	MW465833	This study
<i>B. sinoviticola</i>	X12	<i>Malus domestica</i>	MW465789	MW465798	-	This study
<i>B. sphaerosperma</i>	MUCL21481	<i>Allium</i>	AJ705035	AJ716096	AJ745708	Staats <i>et al.</i> 2005
	MUCL21482	<i>Allium</i>	AJ705036	AJ716097	AJ745709	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>B. squamosa</i>	PRI026	<i>Allium</i>	AJ705039	AJ716100	AJ745707	Staats <i>et al.</i> 2005
	MUCL1107	<i>Allium</i>	AJ705037	AJ716098	AJ745710	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>B. tulipae</i>	BT9830	<i>Tulipa</i>	AJ705041	AJ716102	AJ745713	Staats <i>et al.</i> 2005
	BT9001	<i>Tulipa</i>	AJ705040	AJ716101	AJ745712	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>M. fructigena</i>	9201	-	AJ705043	AJ716047	AJ745715	Staats <i>et al.</i> 2005
<i>S. sclerotiorum</i>	484	-	AJ705044	AJ705044	AJ716048	Staats <i>et al.</i> 2005

## تجزیه و تحلیل‌های تبارشناختی

پس از دریافت نتایج توالی‌یابی، کروماتوگرام مربوط به هر توالی با استفاده از نرم‌افزار Chromas Pro ver. 1.7.6 (<http://www.technelysium.com.au>) مشاهده و در صورت لزوم به صورت دستی ویرایش شدند. توالی‌های ویرایش شده با استفاده از ابزار جستجوی BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.* 1997) با توالی‌های موجود در بانک داده‌های ژن (GenBank) مقایسه شدند و توالی‌های دارای بیشترین شباهت همراه با توالی‌های تیپ یا شاخص گونه‌های این جنس که در منابع مختلف ذکر شده‌اند (Staats *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2010, Walker *et al.* 2011, Saito *et al.* 2016, Zhong *et al.* 2019, He *et al.* 2021) تجزیه و تحلیل‌های تبارشناختی ذخیره شدند. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار بر خط MAFFT version 7 (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server>) هم‌ردیف شدند (Kato *et al.* 2019) و بهترین مدل جایگزینی

آماده (Taq DNA polymerase 2X Master Mix Red, 2 mM MgCl, Ampliqon Company, Denmark) یک میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها (۰/۵ پیکومول)، دو میکرولیتر DNA قارچ و ۱۶ میکرولیتر آب مقطر سترون انجام گرفت. برای تکثیر از چرخه دمایی: پنج دقیقه و اسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۳۵ چرخه شامل ۴۵ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۴۵ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سلسیوس برای آغازگرهای *G3PDH* و *HSP60* و دمای ۶۰ درجه سلسیوس برای آغازگر *RPB2*، ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و یک چرخه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه استفاده شد. محصولات تکثیر شده روی ژل آگارز یک درصد الکتروفورز شدند و خالص‌سازی و تعیین توالی آنها توسط شرکت BGI (Beijing Genomics Institute, China) انجام گرفت.

## بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های گونه‌های شناسایی شده *Botrytis* روی برگ و میوه انگور رقم بی‌دانه سفید

برای بررسی و مقایسه شدت بیماری‌زایی، تعدادی از جدایه‌ها از هر سه گونه *B. cinerea* (۱۱ جدایه)، *B. prunorum* (۱۲ جدایه) و *B. sinoviticola* (نه جدایه) بر اساس مناطق و میزبان‌های مختلف گیاهی انتخاب و روی محیط کشت PDA کشت داده شدند (جدول ۴). از برگ‌های تازه و جوان و میوه‌های کاملاً رسیده انگور رقم بی‌دانه سفید برای آزمون‌ها استفاده شد. سعی گردید اندازه برگ‌ها و میوه‌های مورد استفاده تا حد امکان هم‌اندازه باشند. نمونه‌های برگ‌ها و میوه‌های سالم و بدون هیچ‌گونه نشانه آلودگی از یکی از باغات شهرستان میاندوآب جمع‌آوری شدند و با آب جاری شیر به خوبی شست‌شده شدند. این نمونه‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم نیم درصد برای مدت دو دقیقه ضدعفونی سطحی و بلافاصله سه بار با آب مقطر سترون آبکشی شدند. نمونه‌های برگ و میوه در داخل ظروف یکبار مصرف حاوی سه لایه از دستمال کاغذی سترون و خیس قرار داده شدند. مایه‌زنی برگ‌ها در سه مکان روی هر برگ و با استفاده از قرص میسلومی به قطر شش میلی‌متر که از حاشیه پرگنه‌های در حال رشد فعال جدایه‌ها تهیه شدند، انجام گرفت. مایه‌زنی میوه‌های انگور به همان روش انجام گرفت به نحوی که در هر ظرف شش حبه انگور و روی هر کدام از حبه‌ها نیز یک قرص میسلومی گذاشته شد. عمل مایه‌زنی روی برگ‌ها و میوه‌ها بدون اعمال زخم روی آنها صورت گرفت. ظروف مایه‌زنی شده در شرایط آزمایشگاه با دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس نگهداری شدند و قطر بخش آلوده شده (تغییر رنگ‌یافته) در برگ‌ها پس از ۹۶ ساعت و برای میوه‌ها پس از ۱۲۰ ساعت یادداشت‌برداری گردید (Acosta Morel et al.

MrModeltest v. 2.2 (Nylander 2004) تعیین گردید. تبارنماها با استفاده از روش‌های حداکثر احتمال (Maximum Likelihood) و روش بیژین (Bayesian) ترسیم شدند. برای ترسیم تبارنما به روش حداکثر احتمال از نرم‌افزار RAxML v. 8.0.0 (Stamatakis 2014) استفاده شد و برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در تبارنما، شاخص اعتبارسنجی (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار محاسبه گردید. کلیه صفات مورد بررسی به عنوان صفات نامرتب (unordered) و با وزن برابر و مکان‌های خالی در توالی‌ها به عنوان اطلاعات از دست رفته (Missing data) در نظر گرفته شدند. در طی بررسی‌های تبارشناختی، هیچ یک از صفات حذف نگردید. در ترسیم تبارنما به روش بیژین از نرم‌افزار MrBayes v. 3.2.5 (Ronquist et al. 2012) استفاده شد و تجزیه و تحلیل‌های بیژین با استفاده از الگوریتم MCMC (Markov Chain Monte Carlo) برای چهار زنجیره به طور همزمان از یک تبارنمای تصادفی اولیه و پارامتر گرمایی ۰/۱۵ با استفاده از احتمالات پیش‌فرض راه‌اندازی شد. برای هر ماتریس دو اجرای جداگانه به منظور دستیابی به نمونه‌های دقیق از توزیع احتمال پسین (Posterior Probabilities) اجرا شد و از هر هزار نسل، یک تبارنما ذخیره شد. در نهایت پس از تکمیل تجزیه و تحلیل‌های مربوطه، ۲۵ درصد اولیه تبارنماهای ذخیره شده سوزانده شد و تبارنماهای ایجاد شده با استفاده از نرم‌افزار FigTree v. 1.4.4 (Rambaut 2019) مشاهده شدند. توالی‌های مربوط به جدایه‌های مختلف از گونه‌های توالی‌یابی شده در بانک داده‌های ژن ثبت و شماره دستیابی آنها اخذ گردید (جدول ۲).

جدول ۳. مشخصات مربوط به میزبان، مکان و تعداد جدایه‌ها در هر کدام از گونه‌های شناسایی شده جنس *Botrytis*

**Table 3. Characteristics related to host, locality and the number of isolates in each identified *Botrytis* species**

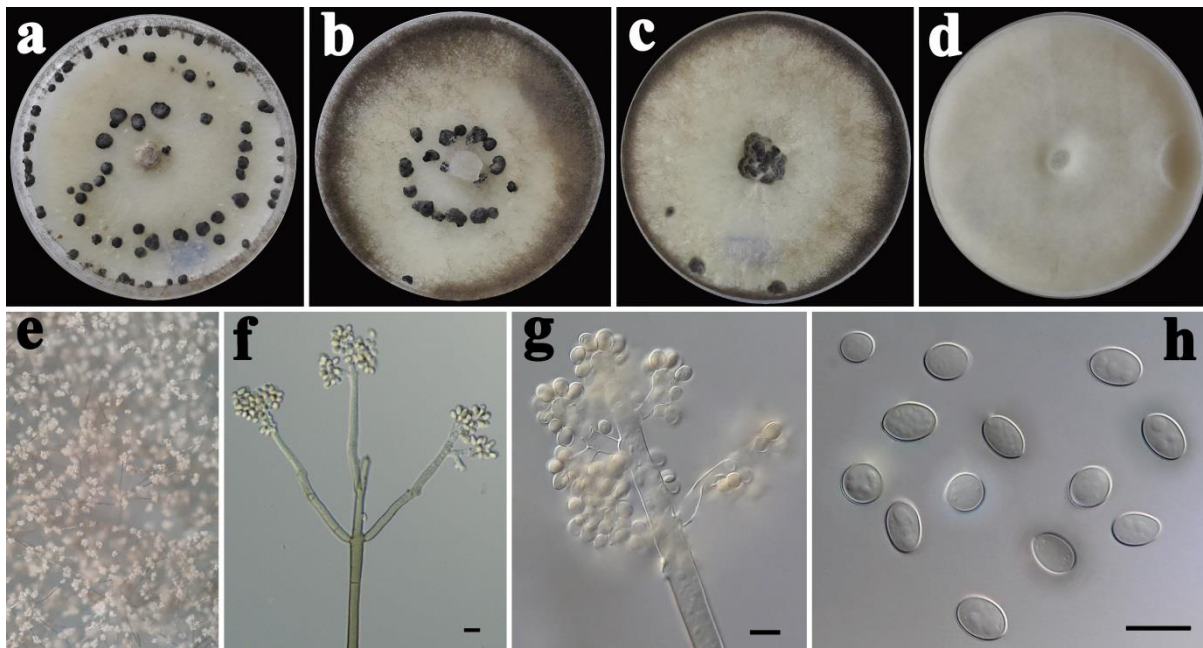
Host	Sampling region	Number of isolates	Identified species		
			<i>B. cinerea</i>	<i>B. prunorum</i>	<i>B. sinoviticola</i>
Grapevine	Urmia (Lake road)	19	4	6	9
	Urmia (Emamzadeh)	18	13	3	2
	Urmia (Serow road)	28	9	18	1
	Miyandoab (Barough)	18	2	8	8
	Miyandoab (Baktash, Orchard 1)	38	5	29	4
	Miyandoab (Baktash, Orchard 2)	16	—	14	2
	Miyandoab (Baktash, Orchard 3)	11	3	7	1
	Miyandoab (Baktash, Orchard 4)	4	—	4	—
	Miyandoab (Chaharborj)	6	—	5	1
	Sardast	8	5	3	—
Strawberry	Piranshahr	2	—	2	—
	Urmia (greenhouse)	20	19	1	—
Ornamental plants	Sanandaj, Kordestan field)	24	12	12	—
	Miyandoab	39	32	7	—
Apple	Urmia	15	8	5	2
	Miyandoab	3	2	1	—
cabbage	Urmia	2	2	—	—
Total		271	116	125	30

## نتایج

### جداسازی قارچ‌ها

در این مطالعه ۲۷۱ جدایه از جنس *Botrytis* از میزبان‌های مختلف گیاهی شامل خوشه‌های انگور، میوه توت‌فرنگی، برگ گیاهان زینتی، شاخه‌ها و میوه سیب و کلم سفید از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی و شهرستان سنندج در استان کردستان جداسازی گردید (جدول ۳). با مطالعه ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تبارشناسی جدایه‌ها، سه گونه از این جنس شامل *B. cinerea*، *B. prunorum* و *B. sinoviticola* شناسایی گردید. گونه *B. prunorum* با ۱۲۵ جدایه (۴۶/۱ درصد کل جدایه‌ها) به‌عنوان گونه با فراوانترین تعداد جدایه مشخص گردید و گونه‌های *B. cinerea* با ۱۱۶ جدایه (۴۲/۸ درصد) و گونه‌ی *B. sinoviticola* با ۳۰ جدایه (۱۱/۱ درصد) در رتبه‌های بعدی از نظر فراوانی جدایه‌ها

(*al.* 2019). شاخص آلودگی در میوه‌ها بر اساس معیار رتبه‌بندی سایتو و همکاران (Saito *et al.* 2016) شامل صفر (بدون آلودگی)، یک (کمتر از ۲۵ درصد پوسیدگی سطح حبه)، دو (بین ۲۵ تا ۵۰ درصد پوسیدگی سطح حبه)، سه (بین ۵۰ تا ۷۵ درصد پوسیدگی سطح حبه) و چهار (بیشتر از ۷۵ درصد پوسیدگی سطح حبه) در نظر گرفته شد. آزمون‌های بیماری‌زایی روی برگ‌ها و میوه‌ها در سه تکرار انجام گرفت و تمام آزمون‌ها دو بار دیگر تکرار شدند. داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS 9.1 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. آزمون نرمال بودن داده‌ها با نرم‌افزار مذکور بررسی گردید و تبدیل داده‌ها بر اساس فرمول  $(\sqrt{X} + 0.5)$  انجام گرفت. تجزیه و تحلیل واریانس داده‌ها با استفاده از آزمون ANOVA و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال آماری ۵ درصد انجام گرفت.



شکل ۱. گونه *Botrytis cinerea* (a-d) انواع پرگنه در محیط کشت PDA پس از گذشت ۷ روز. (e-g) کنیدی‌بر و وزیکل، (h) کنیدیوم‌ها. مقیاس = 20 μm

**Fig 1. *Botrytis cinerea*: a-d) Colony types on PDA medium after 7 days. e-g) Conidiophore and vesicle; h) Conidia. Scale bar = 20 μm**

کنیدیوم‌ها تک یاخته‌ای، معمولاً گرد تا تخم مرغی، با سطح صاف، کم‌رنگ تا قهوه‌ای روشن، با هیلوم مشخص و به ابعاد  $10-16 \times 4-6$  میکرومتر می‌باشند. سختینه‌ها منفرد تا مجتمع، به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه، گرد، مستطیلی و یا بدون شکل مشخص، به طول  $10-1/5$  میلی‌متر بوده و در اغلب جدایه‌ها به صورت پراکنده یا در دایره‌های هم‌مرکز در بخش مرکزی یا حاشیه تشک پتری تشکیل شدند (شکل ۱). به غیر از دو جدایه که پرگنه آنها از نوع کنیدیومی (Conidial type, C) و در یکی از جدایه‌ها از نوع میسلیمی (Mycelial type, M) بود، در ۱۱۳ جدایه باقیمانده پرگنه از نوع سختینه‌ای-کنیدیومی (Sclerotial-Conidial type, SC) مشخص گردید.

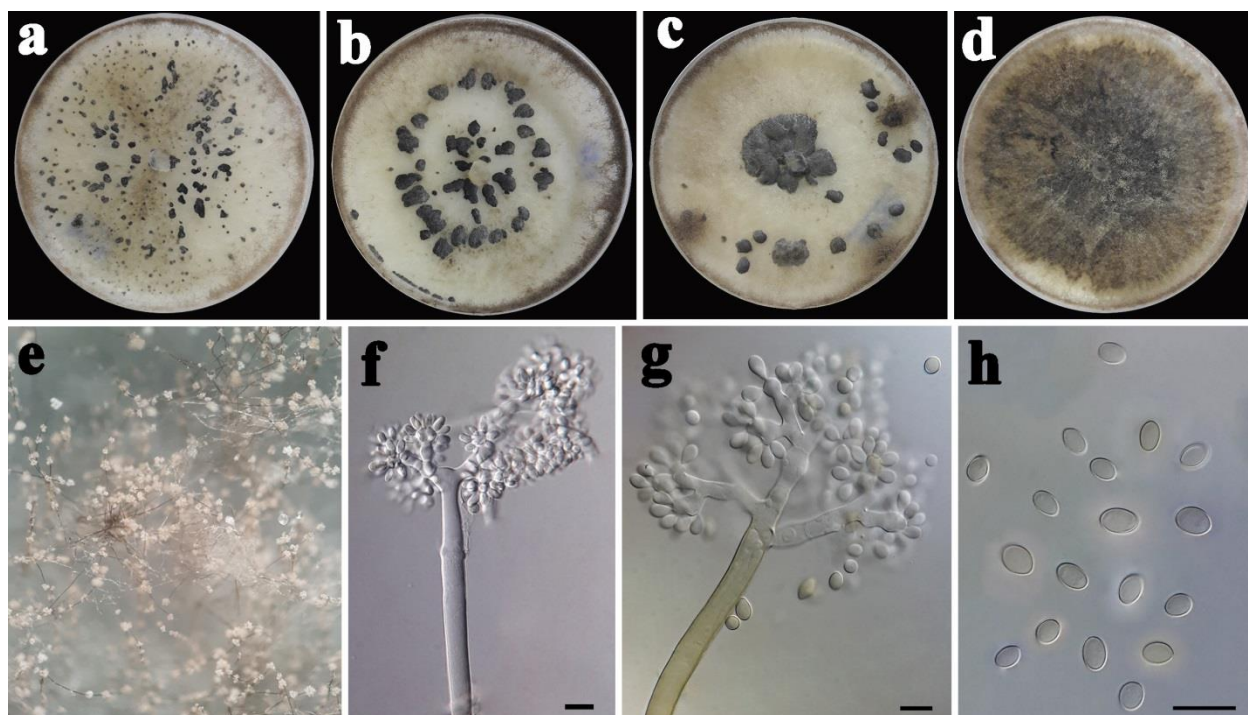
نمونه‌های بررسی شده: ۴۱ جدایه از انگور (ارومیه، میان‌دوآب و سردشت)؛ ۳۱ جدایه از توت‌فرنگی (ارومیه و سنندج)؛ ۳۲ جدایه از گیاهان زیتنی (میان‌دوآب) شامل

قرار گرفتند (جدول ۳).

توصیف گونه‌های شناسایی شده

***Botrytis cinerea* Pers., Syn. meth. fung. (Göttingen) 2: 690 (1801)**

قطر رشدی پرگنه در جدایه‌های مختلف این گونه روی محیط کشت PDA و دمای ۲۰ درجه سلسیوس پس از گذشت پنج روز برابر با ۷۸-۳۰ میلی‌متر است. پرگنه به رنگ خاکستری و با ریشه‌های هوایی فراوان می‌باشد. کنیدی‌برها دراز، دارای بندهای عرضی، منفرد، در بخش قاعده‌ای به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره و رو به سمت انتها کم‌رنگ‌تر، به ابعاد  $34-16 \times 3650-525$  میکرومتر و در بخش انتهایی به صورت متناوب منشعب می‌شوند. یاخته کنیدی‌زا متورم، کنیدیوم‌ها به صورت دسته‌های خوشه‌ای و هم‌زمان روی استریگما تشکیل می‌شوند.



شکل ۲. گونه *Botrytis prunorum* (a-d) انواع پرگنه در محیط کشت PDA پس از گذشت ۷ روز، (e-g) کنیدی‌بر و وزیکل، (h) کنیدیوم‌ها. مقیاس = 20 μm

Fig 2. *Botrytis prunorum*: a-d) Colony types on PDA medium after 7 days; e-g) Conidiophore and vesicle; h) Conidia. Scale bar = 20 μm

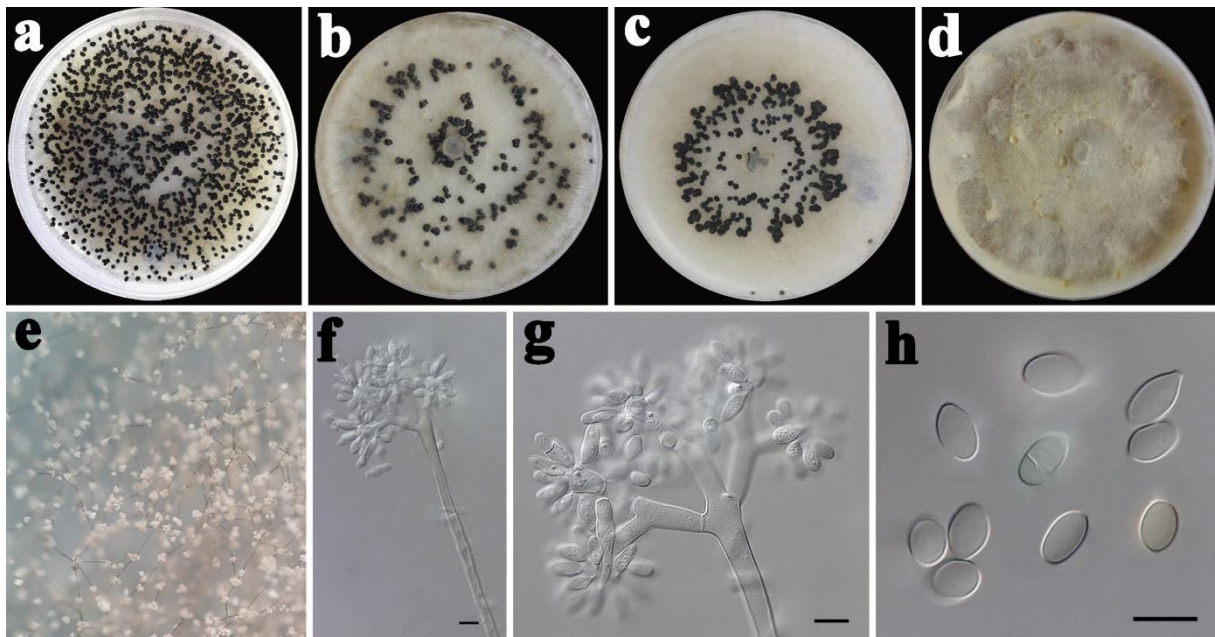
میکرومتر و در بخش انتهایی به صورت نامنظم منشعب می‌شوند. یاخته کنیدی‌زا متورم، کنیدیوم‌ها به صورت دسته‌های خوشه‌ای و همزمان روی استریگما تشکیل می‌شوند. کنیدیوم‌ها یک یاخته‌ای، با سطح صاف، اغلب تخم‌مرغی شکل، گاهی گرد تا بیضوی، بی‌رنگ تا قهوه‌ای روشن، با هیلوم تا حدی برجسته و به ابعاد  $10-18 \times 3-5$  میکرومتر می‌باشند. سختینه‌ها معمولاً بدون شکل خاص، گاهی تخم‌مرغی تا مستطیلی شکل، به رنگ قهوه‌ای تیره، به طول ۱۰-۱ میلی‌متر بوده و در بیشتر جدایه‌ها به صورت پراکنده در سطح محیط کشت تشکیل می‌شوند ولی در برخی جدایه‌ها در بخش مرکزی پرگنه و گاهی به صورت دایره‌هم‌مرکز مرکب از سختینه‌های منفرد و یا مجتمع تشکیل شدند (شکل ۲). نوع پرگنه به غیر از پنج جدایه که از نوع کنیدیومی (C) بود در بقیه ۱۲۰ جدایه مورد بررسی

شمعدانی (۲۸ جدایه)، آلوئه‌ورا (یک جدایه)، بگونیا (یک جدایه)، کاکتوس (یک جدایه) و یک جدایه از گیاه زیتنی ناشناخته؛ ۱۰ جدایه از سیب (ارومیه و میان‌دوآب)؛ دو جدایه از کلم سفید (ارومیه) (جدول ۳).

***Botrytis prunorum* E.E. Ferrada and Latorre, in Ferrada, Latorre, Zoffoli and Castillo, *Phytopathology* 106(2): 159 (2015)**

قطر رشدی پرگنه در جدایه‌های این گونه روی محیط کشت PDA و دمای ۲۰ درجه سلسیوس پس از گذشت پنج روز برابر با ۷۵-۴۰ میلی‌متر می‌باشد. پرگنه به رنگ خاکستری مایل به قهوه‌ای و با تعداد کمتری ریشه‌های هوایی است. کنیدی‌برها دراز، دارای بندهای عرضی، منفرد، در بخش قاعده‌ای به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای و رو به انتها کم‌رنگ‌تر، به ابعاد  $12-32 \times 190-2250$





شکل ۳. گونه *Botrytis sinoviticola* (a-d) انواع پرگنه در محیط کشت PDA پس از گذشت ۷ روز، (e-g) کنیدی بر و وزیکل، (h) کنیدیوم‌ها. مقیاس = 20 μm

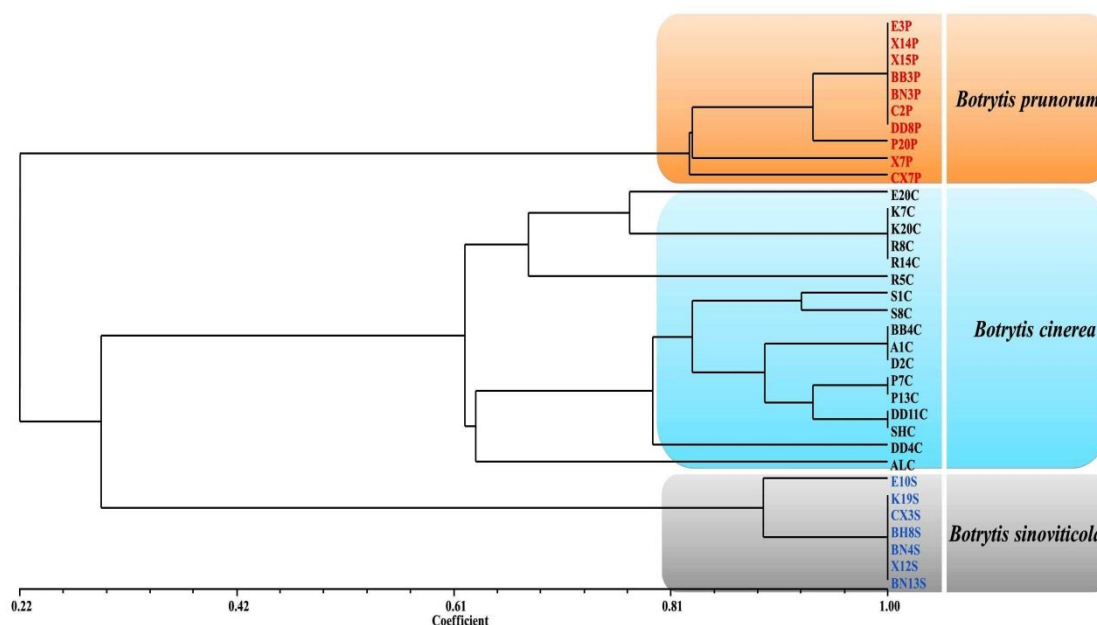
Fig 3. *Botrytis sinoviticola*: a-d) Colony types on PDA medium after 7 days; e-g) Conidiophore and vesicle; h) Conidia. Scale bar = 20 μm

کم‌رنگ‌تر و به ابعاد ۱۶-۳۶ × ۲۱۷۵-۲۵۰ میکرومتر می‌باشند. یاخته کنیدی‌زا متورم و کنیدیوم‌ها به صورت دسته‌های خوشه‌ای و همزمان روی استریگما تشکیل می‌شوند. کنیدیوم‌ها اصولاً تک یاخته‌ای، ندرتاً دو یاخته‌ای، بی‌رنگ تا قهوه‌ای کم‌رنگ، اغلب بیضی شکل تا تخم‌مرغی و به ابعاد ۵-۹ × ۵-۱۸ میکرومتر می‌باشند. سختینه‌ها در بیشتر جدایه‌ها به صورت دواپر هم‌مرکز و در برخی از جدایه‌ها در حاشیه پرگنه، به صورت منفرد تا مجتمع تشکیل می‌شوند و کروی تا بیضی شکل، به رنگ قهوه‌ای تا قهوه‌ای تیره و به طول ۳-۵ میلی‌متر (کوچکتر از دو گونه قبلی) می‌باشند (شکل ۳). در غالب جدایه‌ها (۲۵ جدایه)، نوع پرگنه از نوع سختینه‌ای-کنیدیومی (SC)، در چهار جدایه از نوع میسلیمی (M) و در یک جدایه از نوع کنیدیومی (C) مشخص گردید (شکل ۳).

از نوع سختینه‌ای-کنیدیومی (SC) مشخص گردید. نمونه‌های بررسی شده: ۹۹ جدایه از انگور (ارومیه، میاندوآب، سردشت و پیرانشهر)؛ ۱۳ جدایه از توت‌فرنگی سنندج و ارومیه؛ شش جدایه از گیاه شمعدانی و یک جدایه از گیاه زیتنی ناشناخته (میاندوآب)؛ شش جدایه از سیب (ارومیه و میاندوآب) (جدول ۳).

***Botrytis sinoviticola* J. Zhang, Y.J. Zhou and G.Q. Li, Mycologia 106(1): 51 (2014)**

قطر رشدی پرگنه در جدایه‌های این گونه در محیط کشت PDA و دمای ۲۰ درجه سلسیوس و پس از گذشت پنج روز برابر با ۷۵-۵۰ میلی‌متر است. پرگنه به رنگ سفید مایل به زرد تا خاکستری و با تعداد کمتری از ریشه‌های هوایی است. کنیدی‌برها راست، منفرد، دارای بندهای عرضی، با انشعابات متناوب در بخش انتهایی، در بخش قاعده‌ای به رنگ خاکستری تا قهوه‌ای و رو به سمت انتها



شکل ۴. دندروگرام به دست آمده بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه دایس در نرم‌افزار NTSYSpc-2.02e برای ۳۴ جدایه‌ی منتخب از جنس *Botrytis* با استفاده از آغازگر Bot ISSR4

Fig 4. Dendrogram obtained based on UPGMA algorithm and Dice similarity coefficient in NTSYSpc-2.02e software for 34 selected isolates of *Botrytis* using Bot ISSR4 primer

نتایج تکثیر بخشی از ژن‌های *G3PDH*، *HSP60* و *RPB2* در جدایه‌های منتخب، به ترتیب قطعاتی به اندازه‌های ۸۹۳، ۹۴۰ و ۹۹۱ جفت باز را ایجاد کرد. در بررسی تبارنمای ترسیم شده به روش حداکثر احتمال و بر اساس توالی ژن *RPB2*، ۳۲ جدایه مورد بررسی در سه دودمان متمایز قرار گرفتند (شکل ۵). جدایه‌های *C2*، *B. prunorum* (جدایه‌های *K20*، *SH*، *DD4*، *P13*، *S8*، *R8*)، *B. cinerea* (جدایه‌های *K19*، *CX3*، *BN13*، *BN4*) و *B. sinoviticola* (جدایه‌های *BH8*) در کنار جدایه‌های گونه *B. prunorum* قرار گرفتند (شکل ۵).

نمونه‌های بررسی شده: ۲۸ جدایه از انگور (ارومیه و میاندوآب) و دو جدایه از سیب (ارومیه) (جدول ۳).

#### شناسایی مولکولی

دندروگرام مربوط به نتایج انگشت‌نگاری ISSR-PCR (با آغازگر Bot ISSR4) برای گروه‌بندی اولیه در ۲۷۱ جدایه قارچی مشخص کرد که جدایه‌های بررسی شده بر اساس الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه دایس در سطح تشابه ۶۱ درصدی در سه خوشه متمایز قرار گرفتند که خوشه اول شامل ۱۰ جدایه، خوشه دوم شامل ۱۷ جدایه و خوشه سوم شامل هفت جدایه مربوط به جدایه‌های منتخب هر سه گونه بود (شکل ۴). با توجه به اینکه این اطلاعات برای تعیین ماهیت آرایه‌بندی جدایه‌ها کافی نبودند از اطلاعات توالی‌های نواحی ژنومی *G3PDH*، *HSP60* و *RPB2* برای شناسایی گونه‌ها استفاده شد.





گرفتند. بیشترین شدت بیماریزایی روی برگ‌های انگور مربوط به جدایه‌های گونه *B. cinerea* (S1, K7, K20 و P7) بود، ضمن اینکه پنج جدایه (سه جدایه BH34, BB4 و X4 از گونه *B. cinerea* و دو جدایه K4 و BN3 از گونه *B. prunorum*) قادر به ایجاد بیماری روی برگ‌ها نبودند. علاوه بر آن، با وجودی که همه جدایه‌ها در هر سه گونه مورد بررسی قادر به ایجاد بیماری روی میوه‌ها بودند اما بیشترین شدت بیماریزایی مربوط به جدایه‌های K7, K20, BH34 و X4 از گونه *B. cinerea* و جدایه P20 از گونه *B. prunorum* و کمترین شدت بیماریزایی نیز مربوط به جدایه‌های X7, S2, DD8 و BN3 از گونه *B. prunorum* ثبت گردید (جدول ۴). ارتباط خاص تخصص‌یافتگی میزبانی بین جدایه‌های مربوط به میزبان‌های مختلف گیاهی مشاهده نگردید و جدایه‌های به‌دست آمده از میزبان‌های مختلف قادر به ایجاد بیماری روی برگ‌ها (به استثنای پنج جدایه) و میوه‌های انگور بودند. همچنین، رابطه مشخصی بین بیماریزایی جدایه‌ها، سرعت رشد و تیپ پرگنه جدایه‌ها و نوع میزبان گیاهی مشاهده نشد (جدول ۴).

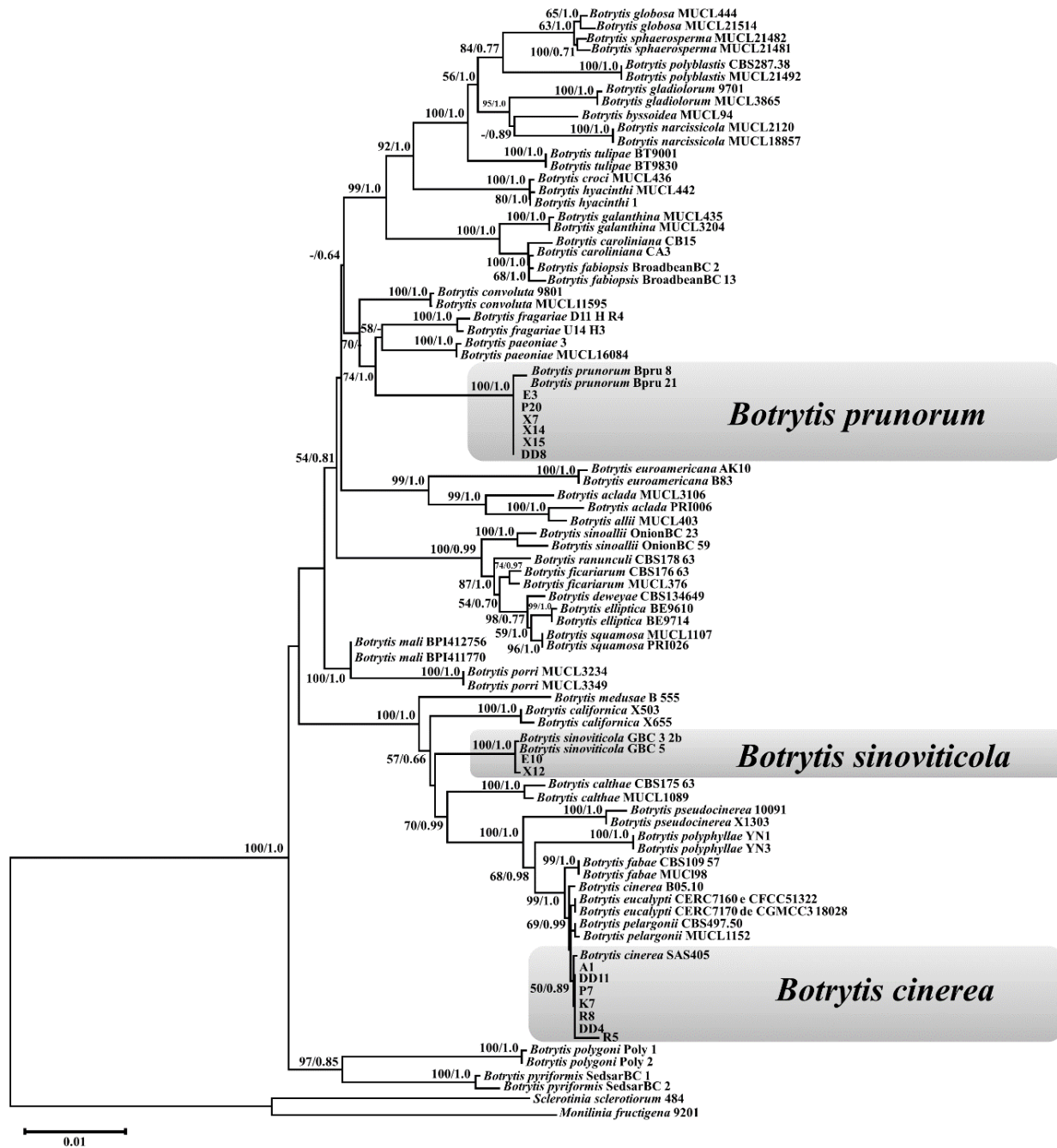
## بحث

گونه‌های جنس *Botrytis* به عنوان یکی از مهمترین بیمارگرهای گیاهان در بسیاری از محصولات مهم کشاورزی، هم در طول فصل رشدی گیاه و هم پس از برداشت محصول، در سرتاسر دنیا شناخته شده‌اند و خسارت‌های اقتصادی زیادی را به تولیدکنندگان وارد می‌کند (Garfinkel et al. 2019, He et al. 2021). تنوع در گونه‌های *Botrytis* از نظر ویژگی‌های ریخت‌شناختی، آزارگری و دامنه میزبانی/اختصاصیت میزبانی دیده می‌شود. شناسایی درست گونه‌های بیمارگر به دلیل تفاوت‌های

MrModeltest v. 2.2، مدل SYM+I+G برای ژن‌های *G3PDH* و *HSP60* و مدل GTR+I+G برای ژن *RPB2* به عنوان بهترین مدل‌ها مشخص شدند. تجزیه و تحلیل‌های تبارشناختی بر اساس ترکیب توالی هر سه ناحیه ژنومی به روش‌های بیژین (BI) و حداکثر احتمال (ML) تبارنمایی با ساختارهای مشابه را ایجاد کرد. در این مطالعه تبارنمای حاصل از روش حداکثر احتمال به عنوان مبنا انتخاب گردید (شکل ۶). در تبارنمای حاصل نیز جدایه‌های R5, DD4, R8, K7, P7, DD11 و A1 با مقادیر اعتبارسنجی/احتمال پسین ۰/۸۹ و ۵۰ در کنار جدایه گونه *B. cinerea*، جدایه‌های X12 و E10 با مقادیر اعتبارسنجی/احتمال پسین ۱ و ۱۰۰ در کنار جدایه‌های گونه *B. sinoviticola*، جدایه‌های DD8, X15, X14, X7, P20 و E3 با مقادیر اعتبارسنجی/احتمال پسین ۱ و ۱۰۰ در کنار جدایه‌های گونه *B. prunorum* قرار گرفتند (شکل ۶).

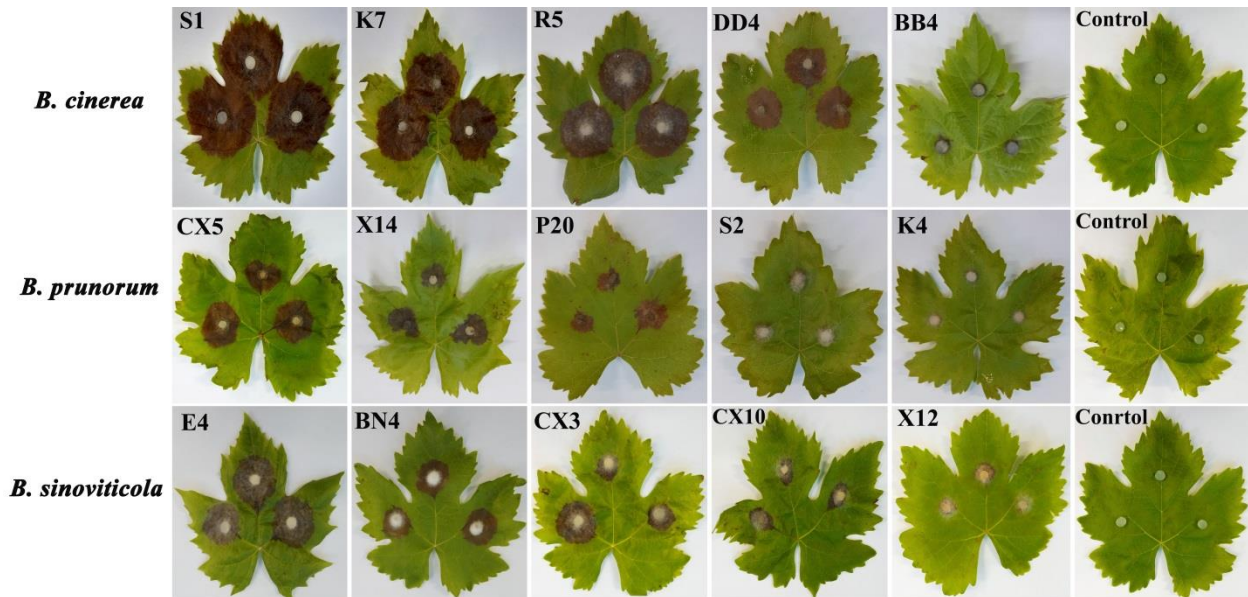
## شدت بیماریزایی جدایه‌های گونه‌های *Botrytis* روی برگ‌ها و میوه‌های انگور

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به بیماریزایی ۳۲ جدایه منتخب بررسی شده از سه گونه *B. prunorum* (۱۲) جدایه)، *B. cinerea* (۱۱ جدایه) و *B. sinoviticola* (نه جدایه) روی برگ‌ها و میوه‌های انگور نشان داد از نظر آماری تفاوت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بین شدت بیماریزایی جدایه‌های این گونه‌ها روی برگ‌ها و میوه‌های انگور وجود دارد (شکل‌های ۷ و ۸ و جدول ۴). جدایه‌های گونه‌های *B. cinerea* و *B. prunorum* به ترتیب بیشترین و کمترین شدت بیماریزایی را روی برگ‌ها و میوه‌های انگور ایجاد نمودند (جدول ۴) و جدایه‌های گونه *B. sinoviticola* در حد متوسط بین دو گونه مذکور قرار



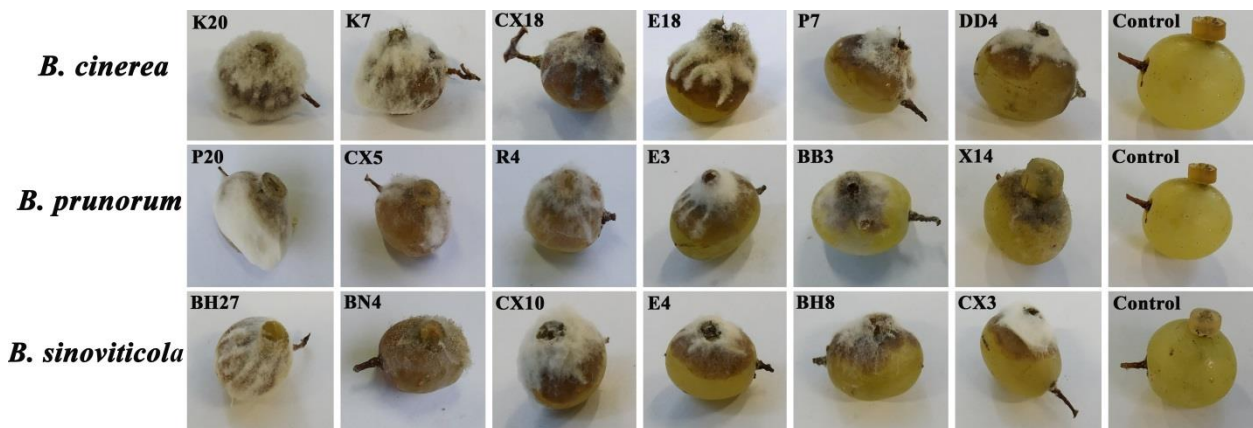
شکل ۶. تبارنمای گونه‌های جنس *Botrytis* با استفاده از روش حداکثر احتمال (ML) با نرم‌افزار RAxML v. 8.0.0 بر مبنای ترکیب توالی‌های سه ژن *G3PDH*، *HSP60* و *RPB2*. گونه‌های *Sclerotinia sclerotiorum* و *Monilinia fructigena* به عنوان آرایه‌های خارجی استفاده شده‌اند. اعداد بالای هر شاخه درصد اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار و مقدار احتمال پسین (PP) در تجزیه و تحلیل بیژین را نشان می‌دهند.

Fig 6. Phylogenetic tree of *Botrytis* spp. using Maximum Likelihood (ML) method with RAxML v. 8.0.0 software based on combined DNA sequences of *G3PDH*, *HSP60* and *RPB2*. *Monilinia fructigena* and *Sclerotinia sclerotiorum* were used as out-group taxa. The numbers above each branch indicate the bootstrap percentage of 1000 replicates and Posterior Probability (PP) values in Bayesian analysis, respectively.



شکل ۷. بیماریزای جدایه‌های گونه‌های *B. cinerea*، *B. prunorum* و *B. sinoviticola* روی برگ‌های انگور رقم بی‌دانه سفید ۹۶ ساعت پس از آلوده‌سازی و نگهداری در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس

Fig 7. Pathogenicity of *B. cinerea*, *B. prunorum* and *B. sinoviticola* isolates on Thompson seedless grape leaves after 96 hrs. of post-inoculation and incubation at  $25 \pm 2$  °C



شکل ۸. بیماریزای جدایه‌های گونه‌های *B. cinerea*، *B. prunorum* و *B. sinoviticola* روی میوه‌های انگور بی‌دانه سفید ۱۲۰ ساعت پس از آلوده‌سازی و نگهداری در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس

Fig 8. Pathogenicity of *B. cinerea*, *B. prunorum* and *B. sinoviticola* isolates on Thompson seedless grape berries after 120 hrs. of post-inoculation and incubation at  $25 \pm 2$  °C

DNA در تعیین حدود گونه‌ها، تغییرات زیادی در آرایه‌بندی این جنس رخ داد و چندین گونه جدید که زیستگاه هم‌بوم با گونه‌های نامگذاری شده قبلی داشتند، توصیف و شناسایی گردیدند (Walker et al. 2011, Saito et al. 2016, Rupp et al. 2017). گونه‌های تازه توصیف

زیست‌شناسی و تنوع در بیماریزایی آنها روی گیاهان مختلف، دارای اهمیت اساسی در طراحی راهکارهای موثر مدیریتی است. پس از بازنگری جنس *Botrytis* در سال ۱۹۷۳ بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و کشت (Henebert 1973)، و به دنبال آن استفاده از داده‌های توالی

جدول ۴: ویژگی‌های جدایه‌های گونه‌های *B. cinerea*، *B. prunorum* و *B. sinoviticola* مایه‌زنی شده روی برگ‌ها و میوه‌های انگور بی‌دانه سفید

**Table 4. Characteristics of *B. cinerea*, *B. prunorum* and *B. sinoviticola* isolates inoculated on the leaves and berries of Thompson seedless grape**

Species	Isolate	Region	Host	Colony diam. (mm)*	Morphotypes**	Mean of lesion diam. on leaves***	Mean of disease index on fruits***
<i>B. cinerea</i>	BB4	Miyandoab	Grapevine	75	SC	00.00 <sup>o</sup>	2.66±0.75 <sup>bcd</sup>
<i>B. cinerea</i>	R5	Urmia	Grapevine	34	M	31.50±0.14	1.66±0.25 <sup>efgh</sup>
<i>B. cinerea</i>	K7	Urmia	Grapevine	70	SC	39.66±0.05 <sup>ab</sup>	4±0.00 <sup>a</sup>
<i>B. cinerea</i>	S1	Sardasht	Grapevine	75	SC	44.66±0.13 <sup>a</sup>	3.33±0.40 <sup>abc</sup>
<i>B. cinerea</i>	BH34	Miyandoab	Grapevine	57	SC	00.00 <sup>o</sup>	4±0.00 <sup>a</sup>
<i>B. cinerea</i>	CX18	Barough	Grapevine	70	SC	26.83±0.18 <sup>de</sup>	3.50±0.22 <sup>ab</sup>
<i>B. cinerea</i>	E18	Urmia	Grapevine	75	SC	26.83±0.40 <sup>def</sup>	3.16±0.37 <sup>abcd</sup>
<i>B. cinerea</i>	K20	Urmia	Grapevine	60	SC	37.33±0.41 <sup>bc</sup>	4±0.00 <sup>a</sup>
<i>B. cinerea</i>	DD4	Miyandoab	Geranium	71	SC	21.50±0.35 <sup>efgh</sup>	2.33±0.40 <sup>defg</sup>
<i>B. cinerea</i>	P7	Urmia	Strawberry	75	SC	33.33±0.28 <sup>c</sup>	2.66±0.40 <sup>bcd</sup>
<i>B. cinerea</i>	X4	Urmia	Apple	75	SC	00.00 <sup>o</sup>	3.83±0.40 <sup>a</sup>
<i>B. prunorum</i>	S2	Sardasht	Grapevine	75	SC	12.66±0.20 <sup>ijklmn</sup>	1.50±0.27 <sup>gh</sup>
<i>B. prunorum</i>	E3	Urmia	Grapevine	45	SC	13±0.35 <sup>ijklm</sup>	2.33±0.25 <sup>defg</sup>
<i>B. prunorum</i>	K4	Urmia	Grapevine	55	SC	00.00 <sup>o</sup>	3.50±0.27 <sup>ab</sup>
<i>B. prunorum</i>	BN3	Miyandoab	Grapevine	70	SC	00.00 <sup>o</sup>	1.50±0.27 <sup>gh</sup>
<i>B. prunorum</i>	R4	Urmia	Grapevine	40	SC	11.33±0.20 <sup>lmn</sup>	3.16±0.49 <sup>abcd</sup>
<i>B. prunorum</i>	BB3	Miyandoab	Grapevine	60	SC	9.66±0.10 <sup>mn</sup>	1.66±0.25 <sup>efgh</sup>
<i>B. prunorum</i>	CX5	Barough	Grapevine	72	SC	19.50±0.31 <sup>ghi</sup>	3.66±0.25 <sup>a</sup>
<i>B. prunorum</i>	DD8	Miyandoab	Geranium	50	SC	11.33±0.24 <sup>lmn</sup>	1.50±0.41 <sup>gh</sup>
<i>B. prunorum</i>	P20	Urmia	Strawberry	70	SC	14.66±0.22 <sup>ijkl</sup>	3.83±0.20 <sup>a</sup>
<i>B. prunorum</i>	X7	Urmia	Apple	45	SC	7.66±0.10 <sup>n</sup>	1.33±0.25 <sup>h</sup>
<i>B. prunorum</i>	X14	Urmia	Apple	75	SC	18.83±0.36 <sup>ghi</sup>	2.33±0.25 <sup>defg</sup>
<i>B. prunorum</i>	X15	Urmia	Apple	75	SC	15.66±0.23 <sup>ijkl</sup>	2.16±0.37 <sup>efgh</sup>
<i>B. sinoviticola</i>	E4	Urmia	Grapevine	67	SC	22.83±0.17 <sup>efg</sup>	2.50±0.27 <sup>cdef</sup>
<i>B. sinoviticola</i>	BH8	Miyandoab	Grapevine	60	SC	16.33±0.23 <sup>hijk</sup>	2.33±0.25 <sup>defg</sup>
<i>B. sinoviticola</i>	BH27	Miyandoab	Grapevine	50	SC	12.83±0.19 <sup>ijklm</sup>	3.33±0.40 <sup>abc</sup>
<i>B. sinoviticola</i>	CX10	Barough	Grapevine	75	SC	15.66±0.33 <sup>ijkl</sup>	2.50±0.27 <sup>cdef</sup>
<i>B. sinoviticola</i>	CX3	Barough	Grapevine	73	SC	16.66±0.28 <sup>hij</sup>	2.33±0.25 <sup>defg</sup>
<i>B. sinoviticola</i>	BN4	Miyandoab	Grapevine	72	SC	19.83±0.40 <sup>ghi</sup>	3.16±0.37 <sup>abcd</sup>
<i>B. sinoviticola</i>	E10	Urmia	Grapevine	65	SC	32±0.09 <sup>cd</sup>	2.66±0.25 <sup>bcd</sup>
<i>B. sinoviticola</i>	X12	Urmia	Apple	60	C	11.83±0.05 <sup>ijklmn</sup>	2.16±0.20 <sup>efgh</sup>
<i>B. sinoviticola</i>	X17	Urmia	Apple	75	SC	11.83±0.16 <sup>klmn</sup>	2.66±0.25 <sup>bcd</sup>

\* Colony diameter on PDA media after 7 days at 20±2 °C.

\*\* Morphotypes: Mycelial (M), Conidial (C) and Sclerotial-Conidial (SC) types.

\*\*\* The means (± Standard Deviation) with dissimilar letters show statistically significant difference at  $P \leq 0.05$  in each column.

بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و توالی‌های مربوط به سه ژن کارآمد رمز کننده پروتئین، سه گونه *B. cinerea*، *B. prunorum* و *B. sinoviticola* شناسایی شدند. از ۱۶۸ جدایه به‌دست آمده از خوشه‌های انگور هر سه گونه *B. prunorum* (با ۹۹ جدایه)، *B. cinerea* (با ۴۱ جدایه) و

شده بر اساس تفاوت‌ها در بیماری‌زایی و مقاومت به برخی از قارچ‌کش‌ها از بقیه گونه‌ها متمایز می‌شوند. در این مطالعه تعداد ۲۷۱ جدایه متعلق به این جنس از گیاهان دارای نشانه‌های بیماری در مناطق مختلف استان آذربایجان غربی و سنندج (استان کردستان) جداسازی شد و پس از

*cinerea* از میوه‌های انار دارای علائم کپک خاکستری پس از برداشت در کالیفرنیا و یونان شناسایی شدند (Testempasis et al. 2020). در نمونه‌های جدا شده از یونان، فراوانی این سه گونه به نسبت یکسان برآورد گردید در حالیکه در نمونه‌های جدا شده از کالیفرنیا، فراوانی گونه *B. cinerea* بیشتر از بقیه بود. در این مطالعه شیوع بالای گونه *B. pseudocinerea* در میوه‌های انار به ویژگی‌های همه‌گیری‌شناسی بیماری و توان بالای این گونه در ایجاد آلودگی‌های پنهان نسبت داده شده است. به نظر می‌رسد سیستم‌های کشت و پرورش گیاهان (گلخانه، باغات و مزارع)، نوع میزبان گیاهی، زمان فصل و مناطق نمونه‌برداری در تنوع گونه‌ای جدایه‌های جنس *Botrytis* تأثیر می‌گذارند (Walker et al. 2011, Johnston et al. 2014, Acosta Morel et al. 2019, Testempasis et al. 2020). گونه *B. cinerea* یکی از بیمارگرهای شدیداً تطبیق‌پذیر و مرده‌پرور است که می‌تواند هر نوع اندام یا بافت گیاهی را در تمام مراحل رشدی مورد حمله قرار دهد و دارای دامنه میزبانی بسیار وسیعی است (Staats et al. 2005, Mirzaei et al. 2008, Farr & Rossman 2022). علاوه بر آن، این گونه تعداد بیشماری اسپور غیرجنسی تولید می‌کند که به سادگی توسط باد، حشرات و فعالیت‌های انسان پراکنده می‌شوند و منجر به گسترش وسیع آن گشته و مدیریت بیماری را مشکل می‌کند (Acosta Morel et al. 2019). هر چند این گونه قبلاً به عنوان یک گونه منفرد شناخته می‌شد اما مطالعات در سال‌های اخیر مرکب بودن (Complex species) آن را مشخص کرد و وجود لااقل یک گونه مخفی (*B. pseudocinerea*) که با *B. cinerea* دارای زیستگاه هم‌بوم بود، مشخص گردید (Walker et al. 2011, Plesken et al. 2015). به دلیل شباهت زیاد صفات ریخت‌شناختی،

*B. sinoviticola* (با ۲۸ جدایه) جداسازی شد. دو گونه *B. sinoviticola* و *prunorum* از گیاهان سیب و دو گونه *B. cinerea* و *B. prunorum* نیز از گیاهان توت‌فرنگی و شمعدانی جداسازی گردیدند (جدول ۳). حضور بیش از یک گونه از جنس *Botrytis* از یک میزبان گیاهی در مطالعات متعدد و روی گیاهانی مانند انگور، توت‌فرنگی، سیب، انار و سایر گیاهان گزارش شده است (Walker et al. 2011, Grant-Downton et al. 2014, Zhou et al. 2014, Ferrada et al. 2016, Saito et al. 2016, Garfinkel et al. 2017, Rupp et al. 2017, Acosta Morel et al. 2019, Zhong et al. 2019, Testempasis et al. 2020, He et al. 2021). در مطالعه انجام شده در کشور آلمان و برای مشخص کردن گونه‌های جنس *Botrytis* مرتبط با میوه‌ها و گیاهان سبزی، دو گونه *B. pseudocinerea* و *B. cinerea* جداسازی و شناسایی شدند. نتایج این مطالعه نشان داد که *B. pseudocinerea* گونه متداول بوده و در برخی موارد فراوانی آن بیشتر از گونه *B. cinerea* است (Plesken et al. 2015). همچنین مشخص شد که فراوانی گونه *B. pseudocinerea* در باغات مورد بررسی با تیمارهای قارچ‌کش همبستگی منفی داشت و به دلیل حساسیت این گونه در برابر بسیاری از ترکیبات قارچ‌کش، در مکان‌هایی که از قارچ‌کش‌ها استفاده شده بود، فراوانی گونه *B. cinerea* (به دلیل مقاومت جدایه‌های آن در برابر اغلب قارچ‌کش‌ها) بیشتر دیده می‌شد. در مطالعه دیگری چهار گونه از جنس *Botrytis* شامل *B. cinerea*، *B. pseudocinerea*، *B. prunorum* و *B. californica* از باغات انگور در اسپانیا جداسازی و شناسایی شد و گونه *B. cinerea* به عنوان گونه شایع مشخص گردید (Acosta Morel et al. 2019). گونه‌های *B. cinerea*، *B. pseudocinerea* و گروه S از گونه *B.*

و اندام‌های مسن گل‌ها) نسبت به میوه‌های بالغ و نیز اهمیت کاربرد قارچ‌کش‌ها، در فصل بهار با فراوانی بیشتری دیده می‌شود در حالی که گونه *B. cinerea* هم در فصل بهار و هم پاییز فراوانی بیشتری داشته است و از این‌رو شاید زمان نمونه‌برداری در تعیین فراوانی جدایه‌ها موثر باشد ( Martinez et al. 2003, Johnston et al. 2014, Zhou et al. 2014). در مطالعه حاضر و بر اساس بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی مبتنی بر توالی‌های سه ناحیه ژنومی، گونه *B. prunorum* با بیشترین تعداد جدایه‌های به دست آمده به عنوان گونه متداول شناسایی گردید. همچنین بر اساس اطلاعات نگارندگان، این گونه اولین بار برای بیوتای قارچی ایران گزارش می‌شود و گیاهان سیب، توت‌فرنگی و شمعدانی میزبان‌های جدید (*matrix nova*) برای آن در ایران و دنیا گزارش می‌شوند. ( Mirzaei et al. 2008, Ershad 2009, Farr & Rossman 2022).

گونه *B. sinoviticola* برای اولین بار در سال ۲۰۱۴ میلادی توسط ژو و همکاران (Zhou et al. 2014) و به عنوان عامل بیماری کپک خاکستری انگور گزارش شده است. ویژگی بارز ریخت‌شناختی متمایز کننده آن از دو گونه قبلی، تشکیل سختینه‌های فراوان، گرد و کوچک روی محیط کشت PDA و اسپورهایی با سطح دارای زوائد پرزدار در بررسی با میکروسکوپ الکترونی ذکر شده است. گونه *B. sinoviticola* در ایران از میوه انار جداسازی و گزارش شده است (Sadeghi et al. 2018)، هر چند توصیفی از ویژگی‌های ریخت‌شناختی آن ارائه نگردیده است. در این مطالعه این گونه از گیاهان انگور و سیب جداسازی و شناسایی گردید و سیب به عنوان میزبان جدید برای آن در دنیا گزارش می‌شود (Farr & Rossman 2022).

مطالعات تبارشناختی بر مبنای توالی‌های چندژنی (ژن‌های *G3PDH*, *HSP60* و *RPB2*) برای تمایز گونه‌های جنس *Botrytis* لازم است ( Ferrada et al. 2016, Harper et al. 2019, Garfinkel 2021).

فرادا و همکاران (Ferrada et al. 2016) و استریو و همکاران (Esterio et al. 2020) بیان کرده‌اند که گونه *B. prunorum* به دلیل داشتن پرگنه‌های سفید مایل به زرد، کنیدی‌برهای کوتاه‌تر و فشرده در بخش پایه، کنیدیوم‌هایی به ابعاد کوچکتر، اسپورزایی کمتر و سختینه‌های کوچکتر از گونه *B. cinerea* متمایز می‌شود. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که وقتی تعداد بیشتری از جدایه‌ها از میزبان‌های مختلف مورد بررسی قرار می‌گیرند بسیاری از این ویژگی‌های به ظاهر متمایزکننده در جدایه‌های مطالعه شده از هر دو گونه، دارای همپوشانی زیادی هستند و نمی‌توانند به عنوان صفات معتبر ریخت‌شناختی برای تمایز این دو گونه مورد استفاده قرار گیرند. گونه *B. prunorum* برای اولین بار به عنوان عامل بیماری سوختگی شکوفه‌های آلوی ژاپنی (*Prunus salicina* Lindl.) در کشور شیلی جداسازی و گزارش گردید (Ferada et al. 2016). علاوه بر آن، این گونه به عنوان عامل مولد بیماری‌های پوسیدگی میوه کیوی در شیلی (Elfar et al. 2017)، پوسیدگی انتهای گلگاه میوه گلابی اروپایی در سردخانه ( Ferrada et al. 2020) و سوختگی شکوفه‌های انگور در شیلی گزارش شده است (Esterio et al. 2020). در این مطالعات گونه *B. prunorum* همراه با گونه *B. cinerea* از یک زیست‌بوم، ولی با فراوانی کمتر، جداسازی شده است. دلایل فراوانی بیشتر گونه *B. cinerea* نسبت به سایر گونه‌ها مشخص نیست، هر چند ذکر شده است که برخی گونه‌ها مانند *B. pseudocinerea* به دلیل کارایی بالاتر در کلنیزه کردن اندام‌های مسن گیاهان (بافت‌های رویشی مرده

سبب کاهش بیشتر کیفیت محصول شده‌اند. قدرت تهاجمی پایین‌تر جدایه‌های گونه *B. prunorum* در مقایسه با گونه *B. cinerea* در مطالعات آکوستا مورل و همکاران (Acosta Morel et al. 2019) نیز ذکر شده است و برخی از جدایه‌ها قادر به ایجاد بیماری روی برگ‌ها و میوه‌های انگور نبودند. در مطالعه حاضر نیز پنج جدایه از گونه *B. cinerea* قادر به ایجاد بیماری روی برگ‌های تیمار شده انگور نبودند. در بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های گونه *B. sinoviticola* روی برگ‌ها و میوه‌های انگور مشخص شد که جدایه‌های این گونه تنها در صورت زخمی کردن برگ‌ها و میوه‌های انگور سبب ایجاد بیماری در آنها شدند، در صورتیکه جدایه‌های گونه *B. cinerea* سبب آلوده شدن بافت‌های زخم شده و بدون زخم مورد بررسی گردیدند (Zhou et al. 2014).

در مجموع، مطالعه حاضر نشان داد که علاوه بر گونه *B. cinerea*، که در منابع به عنوان فراوانترین گونه مرتبط با پوسیدگی خاکستری ذکر می‌شود، گونه‌های *B. prunorum* و *B. sinoviticola* نیز در زیستگاه‌های هم‌بوم وجود دارند و حتی فراوانی گونه *B. prunorum* در مقایسه با دو گونه دیگر بیشتر است. استفاده از داده‌های توالی‌های ژن *RPB2* و یا ترکیب توالی‌های سه ژن *HSP60*، *G3PDH* و *RPB2* به دلیل همپوشانی اغلب ویژگی‌های ریخت‌شناختی گونه‌های این جنس برای شناسایی صحیح گونه‌ها مورد نیاز است. نتایج مطالعه ما نشان داد که گونه *B. prunorum* می‌تواند به عنوان بیمارگر مهم مرتبط با پوسیدگی خاکستری مطرح شود که با فراوانی بالای آن در گیاهان بررسی شده و نیز جداسازی آن روی میزبان‌های قبلاً گزارش نشده تأیید می‌شود. مطالعات بیشتر برای شناسایی صحیح گونه‌های جنس *Botrytis* در گیاهان مختلف، اهمیت بیماری‌زایی و خسارت‌زایی آنها، بررسی تنوع

نتایج خوشه‌بندی الگوی باندهای تکثیر یافته در روش ISSR-PCR با آغازگر Bot ISSR4 با نتایج تجزیه و تجلیل‌های تبارشناختی بر اساس توالی سه ناحیه ژنومی در تفکیک گونه‌های *B. cinerea*، *B. prunorum* و *B. sinoviticola* مطابقت داشتند و بنابراین می‌توان از این روش و با استفاده از آغازگر Bot ISSR4 برای غربالگری و تمایز جدایه‌های گونه‌های جنس *Botrytis* استفاده کرد. علاوه بر آن، در مطالعه حاضر مشخص گردید که ژن *RPB2* دارای کارایی مناسبی برای تفکیک گونه‌های *B. cinerea*، *B. prunorum* و *B. sinoviticola* از هم می‌باشد و تبارنمای ترسیم شده بر مبنای توالی این ژن با تبارنمای حاصل از تلفیق ژن‌های *HSP60*، *G3PDH*، *RPB2* مطابقت دارد. لذا در صورت وجود تعداد زیادی جدایه برای مطالعات شناسایی و برای شناسایی سریع و کاهش هزینه‌ها می‌توان آنها را با نشانگر ISSR گروه‌بندی نمود و بر اساس توالی ژن *RPB2* شناسایی گونه را انجام داد.

نتایج آزمون‌های بیماری‌زایی نشان داد که در مجموع، جدایه‌های گونه *B. cinerea* بیشترین شدت بیماری‌زایی را داشتند و جدایه‌های گونه‌های *B. sinoviticola* و *B. prunorum* از نظر شدت بیماری‌زایی در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند و با نتایج مطالعات محققین دیگر همخوانی داشتند. مطالعات استریو و همکاران (Esterio et al. 2020) نشان داد که جدایه‌های گونه *B. prunorum* در مقایسه با گونه *B. cinerea* از بیماری‌زایی و قدرت تهاجمی پایین‌تری برخوردار هستند و در برابر بوس‌کالید و سیپرودینیل/فلودیوکسونیل حساس هستند هر چند کاهش حساسیت آنها به قارچکش فن‌هگزامید دیده شده است. با این وجود، زخم‌های ناشی از جدایه‌های گونه *B. prunorum* روی میوه‌های انگور، ورود سایر بیمارگرهای با بیماری‌زایی بالا از جمله *B. cinerea* را تسهیل کرده و



## سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند مراتب سپاس خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه ارومیه به خاطر فراهم آوردن امکانات، هزینه و تجهیزات آزمایشگاهی اعلام دارند.

ژنتیکی و حساسیت یا مقاومت آنها در برابر قارچ‌کش‌های مورد استفاده در منطقه و سایر مناطق کشور لازم است تا بتوان از این اطلاعات در مدیریت موثر بیماری استفاده کرد.

## منابع

- Acosta Morel W., Marques-Costa T.M., Santander-Gordón D., Anta Fernández F., Zabalgoeazcoa I., Vázquez de Aldana B.R., Sukno S.A., Díaz-Mínguez J.M. and Benito E.P. 2019. Physiological and population genetic analysis of *Botrytis* field isolates from vineyards in Castilla y León, Spain. *Plant Pathology* 68: 523–536.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Miller W. and Lipman D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25: 3389–3402.
- Barnes S.E. and Shaw M.W. 2003. Infection of commercial hybrid primula seeds by *Botrytis cinerea* and latent disease spread through the plants. *Phytopathology* 93: 573–578.
- Beever R.E. and Weeds P.L. 2007. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. pp. 29–52. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. (eds.). *Botrytis: biology, pathology and control*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Boddy L. 2015. Pathogens of autotrophs. pp. 245–292. In: Watkinson S.C., Boddy L. and Money N.P. (eds.). *The Fungi*. Elsevier, Waltham, MA.
- Carisse O., Levasseur A. and Van der Heyden H. 2012. A new risk indicator for *Botrytis* leaf blight of onion caused by *Botrytis squamosa* based infection efficiency of airborne inoculum. *Plant Pathology* 61: 154–1164.
- Dugan F.M., Hellier B.C. and Lupien L. 2007. Pathogenic fungi in garlic seed cloves from the United States and China, and efficacy of fungicides against pathogens in garlic germplasm in Washington State. *Journal of Phytopathology* 155: 437–445.
- Elad Y., Pertot I., Prado, A.M.C. and Stewart A. 2016. Plant Hosts of *Botrytis* spp. pp. 413–486. In: Fillinger S. and Elad Y. (eds.). *Botrytis—the Fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Springer International Publishing Switzerland.
- Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. 2007. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems—an introduction. pp. 1–8. In: Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. and Delen N. (eds.). *Botrytis: biology, pathology, and control*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Elfar K., Riquelme D., Zoffoli J.P. and Latorre B.A. 2017. First report of *Botrytis prunorum* causing fruit rot on kiwifruit in Chile. *Plant Disease* 101: 388.
- Ellerbrock L.A. and Lorbeer J.W. 1977. Etiology and control of onion flower blight. *Phytopathology* 67: 1550–1559.
- Ershad D. 2009. *Fungi of Iran*. 3rd ed. Agricultural Research, Education & Extension Organization, Publication. No. 10, Tehran, 531 p.
- Esterio M., Osorio-Navarro C., Carreras, C., Azócar M., Copier C., Estrada V., Rubilar M. and Auger J. 2020. *Botrytis prunorum* associated to *Vitis vinifera* blossom blight in Chile. *Plant Disease* 104: 2324–2329.
- Farr D.F. and Rossman A.Y. 2022. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrived January 4, 2022, from <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>
- Ferrada E.E., Latorre B.A., Zoffoli J.P. and Castillo A. 2016. Identification and characterization of *Botrytis* blossom blight of Japanese plums caused by *Botrytis cinerea* and *B. prunorum* sp. nov. in Chile. *Phytopathology* 106: 155–165.
- Ferrada E.E., Naranjo P., Briceño E.X., Lolas M. and Díaz. G.A. 2020. Occurrence of *Botrytis prunorum* causing calyx-end rot in european pear fruits during cold storage in Chile. *Plant Disease* 104: 590.
- Garfinkel A.R. 2021. The history of *Botrytis* taxonomy, the rise of phylogenetics, and implications for species recognition. *Phytopathology* 111: 437–454.



- Garfinkel A.R., Coats K.P., Sherry D.L. and Chastagner G.A. 2019. Genetic analysis reveals unprecedented diversity of a globally-important plant pathogenic genus. *Scientific Reports* 9: 6671.
- Garfinkel A.R., Lorenzini M., Zapparoli G. and Chastagner G.A. 2017. *Botrytis euroamericana*, a new species from peony and grape in North America and Europe. *Mycologia* 109: 495–507.
- Grant-Downton R.T., Terhem R.B., Kapralov M.V., Mehdi S., Roudriguez-Enriquez M.J., Gurr S.J., van Kan J.A.L. and Dewey F.M. 2014. A novel *Botrytis* species is associated with a newly emergent foliar disease in cultivated *Hemerocallis*. *Plos One* 9(6): e89272.
- Harper L.A., Derbyshire M.C. and Lopez-Ruiz F.J. 2019. Identification and characterization of *Botrytis medusae*, a novel cryptic species causing grey mold on wine grapes in Australia. *Plant Pathology* 68: 939–953.
- He S.Q., Wen Z.H., Bai B., Jing Z.Q. and Wang X. W. 2021. *Botrytis polygoni*, a new species of the genus *Botrytis* infecting Polygonaceae in Gansu, China. *Mycologia* 113: 78–91.
- Hennebert G.L. 1973. *Botrytis* and *Botrytis*-like genera. *Persoonia* 7: 183–204.
- Jarvis W.R. 1980. Taxonomy. pp. 1–18. In: Coley-Smith, J.R. Verhoeff, K. Jarvis, W.R. (eds.). *The biology of Botrytis*. Academic Press Inc., London.
- Johnston P.R., Hoksbergen K., Park D. and Beever R.E. 2014. Genetic diversity of *Botrytis* in New Zealand vineyards and the significance of its seasonal and regional variation. *Plant Pathology* 63: 888–898.
- Katoh K., Rozewicki J. and Yamada K.D. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 108: 1–7.
- Li X., Kerrigan J., Chai W. and Schnabel G. 2012. *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia* 104: 650–658.
- Liu Q., Li G., Li J. and Chen S. 2016. *Botrytis eucalypti*, a novel species isolated from diseased *Eucalyptus* seedlings in South China. *Mycological Progress* 15: 1057–1079.
- Lorenz D.H. 1983. Investigations on the morphological variability and the pathogenicity of *Botrytis cinerea* and *Botryotinia fuckeliana* Whetz. *Journal of Plant Diseases and Protection* 90: 622–633.
- Lorenzini M. and Zapparoli G. 2014. An isolate morphologically and phylogenetically distinct from *Botrytis cinerea* obtained from withered grapes possibly represents a new species of *Botrytis*. *Plant Pathology* 63: 1326–1335.
- Ma Z. and Michailides T.J. 2005. Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. *Plant Disease* 89: 1083–1089.
- Martinez F., Blancard D., Lecomte P., Levis C., Dubos B. and Fermaud M. 2003. Phenotypic differences between vacuina and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 109: 479–488.
- Mirzaei S., Goltapeh E.M., Shams-Bakhsh M. and Safaie N. 2008. Identification of *Botrytis* spp. on plants grown in Iran. *Journal of Phytopathology* 156: 21–28.
- Nassr S. and Bakarar R. 2013. Effect of factors on conidium germination of *Botrytis cinerea* in vivo. *International Journal of Plant and Soil Science* 2: 41–54.
- Nylander J.A.A. 2004. MrModeltest v2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Plesken C., Weber R.W., Rupp S., Leroch M. and Hahn, M. 2015. *Botrytis pseudocinerea* is a significant pathogen of several crop plants but susceptible to displacement by fungicide-resistant *B. cinerea* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 81: 7048–7056.
- Prasannath K. Shivas R.G. Galea V.J. Akinsanmi O.A. 2021. Novel *Botrytis* and *Cladosporium* species associated with flower diseases of Macadamia in Australia. *Journal of Fungi* 7: 898.
- Rambaut A. 2019. FigTree, a graphical viewer of phylogenetic trees. Available from: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- Richards J.K., Xiao C.L., and Jurick W.M. 2021. *Botrytis* spp.: A contemporary perspective and synthesis of recent scientific developments of a widespread genus that threatens global food security. *Phytopathology* 111: 432–436.
- Rohlf F.J. 1998. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.02 User Guide.
- Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D.L., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M.A. and Huelsenbeck J.P. 2012. MrBayes 3: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.

- Rupp S., Plesken C., Rumsey S., Dowling M., Schnabel G., Weber R.W.S., Schnabel G., Weber, R.W.S. and Hahn M. 2017. *Botrytis fragariae*, a new species causing gray mold on strawberries, shows high frequencies of specific and efflux-based fungicide resistance. *Applied and Environmental Microbiology* 83: e00269–17.
- Sadeghi A., Atghia O. and Javan-Nikkhah M. 2018. Occurrence of *Botrytis sinoviticola* Zhang, Zhou & Li on pomegranate fruit. *Proceedings of the 23<sup>rd</sup> Iranian Plant Protection Congress*, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, p 440–441.
- Saito S., Margosan D., Michailides T.J. and Xiao C.L. 2016. *Botrytis californica*, a new cryptic species in the *B. cinerea* species complex causing gray mold in blueberries and table grapes. *Mycologia* 108: 330–343.
- Shaw M.W., Emmanuel C.J., Emilda D., Terhem R.B., Shafia A., Tsamaidi D., Emblow M. and van Kan J.A.L. 2016. Analysis of cryptic, systemic *Botrytis* infections in symptomless hosts. *Frontiers in Plant Science* 7: 625.
- Shipunov A., Newcombe G., Raghavendra A.K.H. and Anderson C.L. 2008. Hidden diversity of endophytic fungi in an invasive plant. *American Journal of Botany* 95: 1096–1108.
- Sowley E.N.K., Dewey F.M. and Shaw M.W. 2010. Persistent, symptomless, systemic, and seedborne infection of lettuce by *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 126: 61–71.
- 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: 333–346.
- Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313.
- Testempasis S., Puckett R.D., Michailides T.J. and Karaoglanidis G.S. 2020. Genetic structure and fungicide resistance profile of *Botrytis* spp. populations causing postharvest gray mold of pomegranate fruit in Greece and California. *Postharvest Biology and Technology* 170: 111319.
- Valero-Jiménez C.A., Veloso J., Staats M. and van Kan J.A.L. 2019. Comparative genomics of plant pathogenic *Botrytis* species with distinct host specificity. *BMC Genomics* 20: 203.
- Walker A.S., Gautier A., Confais J., Martinho D. and Viaud M. 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 101: 1433–1445.
- Walker A.S. 2016. Diversity within and between species of *Botrytis*. pp. 91–125. In: Fillinger, S. and Elad, Y. (eds.). *Botrytis—The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing Switzerland.
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. and Vankan J.A. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8: 561–580.
- Zhang J., Li G.Q. and Jiang D.H. 2009. First report of garlic leaf blight caused by *Botrytis porri* in China. *Plant Disease* 93: 1216.
- Zhang J., Yang H., Yu Q., Wu M., Yang L., Zhuang W.Y., Chen W.D. and Li G.Q. 2016. *Botrytis priformis* sp. nov. a novel and likely saprophytic species of *Botrytis*. *Mycologia* 108: 682–696.
- Zhang J., Zhang L., Li G.Q., Yang L., Jiang D.H., Zhuang W.Y. and Huang H.C. 2010. *Botrytis sinoallii*, a new species of the gray mold pathogen on *Allium* crops in China. *Mycoscience* 51: 421–431.
- Zhang J., Zou Q., Li G.Q., Jiang D.H. and Huang H.C. 2008. First report of onion bulb rot caused by *Botrytis aclada* in China. *Plant Disease* 92: 1133.
- Zhong S. and Steffenson B.J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 91: 469–476.
- Zhong S., Zhang J. and Zhang G.Z. 2019. *Botrytis polyphyllae*: a new *Botrytis* species causing gray mold on *Paris polyphylla*. *Plant Disease* 103: 1721–1727.
- Zhou Y.J., Zhang J., Wang X.D., Yang L., Jiang D.H., Li G.Q., Hsiang T. and Zhuang W.Y. 2014. Morphological and phylogenetic identification of *Botrytis sinoviticola*, a novel cryptic species causing gray mold disease of table grapes (*Vitis vinifera*) in China. *Mycologia* 106: 45–56.