ردیابی جهش‌های ژنی مرتبط با مقاومت به بنزیمیدازول‌ها و استروبیلورین‌ها در جدایه‌های *Botrytis cinerea* جمع‌آوری شده از انگور در استان آذربایجان غربی

وفا رضایی راد[۱]، مسعود ابرین‌بنا[۲*] و سعید رضایی[۳]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

۲- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

۳- استادیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران.

* مسئول مکاتبه: m.abrinbana@urmia.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۱۹

چکیده

کنترل شیمیایی با استفاده از قارچ‌کش‌ها مهم‌ترین روش کنترل *Botrytis cinerea* در محصولات مختلف به شمار می‌رود. ولی مدیریت موثر این قارچ مستلزم وجود اطلاعاتی در زمینه وجود و فراوانی سویه‌های مقاوم به قارچ‌کش‌ها و میزان مقاومت و نیز جهش‌های مرتبط با بروز مقاومت است. در این تحقیق حساسیت ۱۰۳ جدایه *B. cinerea* که از تاکستان‌های مناطق مختلف استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شده بودند، نسبت به کاربندازیم و آزوکسی‌استروبین مورد ارزیابی قرار گرفت. در بین جدایه‌های مورد بررسی، ۳۹ جدایه (۳۸ درصد) به کاربندازیم و ۳۵ جدایه (۳۴ درصد) نسبت به آزوکسی‌استروبین خیلی مقاوم بودند. توالی‌یابی بخشی از ژن بتاتوبولین نشان داد که در سویه‌های مقاوم به کاربندازیم، جهش از GAG به GCG اتفاق افتاده است که منجر به جایگزینی آلانین با اسید گلوتامیک در کدون ۱۹۸ و بروز فنوتیپ Ben R1 می‌شود. بررسی توالی بخشی از ژن *cyt b* مشخص نمود که سویه‌های مقاوم به آزوکسی‌استروبین، یک جهش نقطه‌ای از GGT به GCT داشتند که موجب جایگزینی آلانین با گلایسین در کدون ۱۴۳ می‌شود. همچنین یکی از جدایه‌های حساس به آزوکسی‌استروبین دارای اینترون Bcbi-143/144 بلافاصله پس از کدون ۱۴۳ در ژن *cyt b* بود. نتایج نشان داد که استفاده از قارچ‌کش‌های گروه‌های بنزیمیدازول و استروبیلورین در مدیریت *B. cinerea* در تاکستان‌های منطقه قابل توصیه نیست. البته با توجه به اینکه سویه‌های مقاوم به بنزیمیدازول‌ها دارای فنوتیپ Ben R1 بودند، می‌توان از دی‌اتوفن‌کارب یا زوکسامید به همراه یکی از قارچ‌کش‌های بنزیمیدازولی استفاده کرد و سویه‌های حساس و مقاوم را به طور موثری کنترل نمود.

واژه‌های کلیدی: بتاتوبولین، پوسیدگی خاکستری، سیتوکروم *b*، مقاومت به قارچ‌کش.

مقدمه

قارچ *Botrytis cinerea* Pers. به عنوان یکی از مهمترین بیمارگرهای گیاهی به شمار می‌رود که با ایجاد بیماری پوسیدگی خاکستری در بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی، خسارت قابل توجهی را در مزرعه و نیز پس از برداشت به محصولات مختلف از جمله انگور وارد می‌کند. با اینکه روش‌های مختلفی برای کنترل این بیمارگر توصیه شده است (پیرسون و گوهین ۱۹۸۸) ولی کنترل شیمیایی با استفاده از قارچ‌کش‌ها، مهمترین و موثرترین روش کنترل این بیماری در تاکستان‌ها در نظر گرفته می‌شود (الاد و همکاران ۲۰۰۴، ویلیامسون و همکاران ۲۰۰۷). تاکنون قارچ‌کش‌های حفاظتی و سیستمیک متعدد متعلق به گروه‌های مختلف برای کنترل *B. cinerea* در انگور توصیه شده است که قارچ‌کش‌های سیستمیک به دلیل کنترل موثرتر عامل بیماری، به طور گسترده در برنامه‌های مدیریت بیماری مورد استفاده قرار گرفته است. تا

Archive of SID

www.SID.ir

اواسط دهه ۱۹۹۰، بنزیمیدازول‌ها[1] بیشترین قارچ‌کش‌های سیستمیک مورد استفاده در برنامه‌های مدیریت کپک خاکستری بودند. از سموم این گروه می‌توان بنومیل[2] و کاربندازیم[3] را نام برد که با اتصال به پروتئین بتاتوبولین[4] و غیرفعال کردن آن، موجب ایجاد اختلال در فرآیندهای مرتبط با پروتئین مذکور به ویژه تقسیم سلولی می‌شوند. در سال‌ها و دهه‌های بعد، سموم متعدد دیگری نیز برای کنترل *B. cinerea* به کار گرفته شدند که از جمله آنها می‌توان به استروبیلورین‌ها[5] یا بازدارنده‌های خارجی کوئینون[6] مانند آزوکسی‌استروبین[7] و کرزوکسیم‌متیل[8] اشاره کرد که با اتصال به سایت خارجی موئینون در کمپلکس آنزیمی سیتوکروم *bc1*[9]، تنفس سلولی قارچ را مختل می‌کنند (لروکس و همکاران ۲۰۰۲، لروکس ۲۰۰۷).

قارچ *B. cinerea* به عنوان بیمارگری با پتانسیل بالا از نظر مقاومت به قارچ‌کش‌ها شناخته شده است که مقاومت آن بسته به قارچ‌کش، می‌تواند به صورت کیفی و یا کمّی باشد. بنابراین، با اینکه قارچ‌کش‌های سیستمیک به طور موثری بیماری پوسیدگی خاکستری را کنترل می‌کنند، ولی استفاده بی‌رویه و پی‌درپی از این سموم باعث گزینش سویه‌های مقاوم و در نهایت مقاوم شدن جمعیت‌های قارچ می‌گردد به‌طوری که در نهایت قارچ‌کش مورد نظر در کنترل بیماری بی‌اثر می‌شود (برنت و هولومون ۲۰۰۷، هان ۲۰۱۴).

جدایه‌های *B. cinerea* مقاوم به بنزیمیدازول‌ها، سطوح مختلفی از مقاومت را از خود نشان می‌دهند. بر همین اساس سه فنوتیپ BenR1، BenR2 و BenR3 برای آنها معرفی شده است که به ترتیب مقاومت خیلی زیاد، متوسط و کم نسبت به بنزیمیدازول‌ها دارند. همچنین در مقایسه با سویه‌های حساس به بنزیمیدازول‌ها، جدایه‌های متعلق به فنوتیپ BenR1 به دی‌اتوفن‌کارب[10] و زوکسامید[11] حساس‌تر می‌باشند در حالی که دو فنوتیپ دیگر نسبت به این قارچ‌کش‌ها مقاوم هستند (لروکس و همکاران ۱۹۹۹، لروکس و همکاران ۲۰۰۲، ژانگ و همکاران ۲۰۱۰). در بین فنوتیپ‌های شناسایی شده، BenR1 و BenR2 پراکنش وسیع‌تری دارند و از کشورهای مختلف گزارش شده‌اند (لروکس ۲۰۰۷، فیلینجر و واکر ۲۰۱۶). با توجه به اینکه مقاومت *B. cinerea* به بنزیمیدازول‌ها به صورت کیفی و به دلیل وجود جهش نقطه‌ای مشخص در نوکلئوتیدهای خاصی از ژن پروتئین هدف این قارچ‌کش‌ها یعنی بتاتوبولین می‌باشد، مطالعاتی در زمینه ارتباط این جهش‌ها با فنوتیپ‌های مقاومت انجام گرفته است. نتایج این بررسی‌ها نشان داده است که در فنوتیپ Ben R1، در کدون ۱۹۸ ژن بتاتوبولین، جهش از GAG (اسید آمینه اسید گلوتامیک در جدایه‌های حساس) به GCG (اسید آمینه آلانین) و یا در تعداد معدودی از جهش‌یافته‌های آزمایشگاهی به GGG (اسید آمینه گلایسین) اتفاق افتاده است. همچنین بروز فنوتیپ Ben R2 به دلیل جهش نقطه‌ای از TTC (اسید آمینه فنیل‌آلانین در جدایه‌های حساس) به TAC (اسید آمینه تیروزین) در کدون ۲۰۰ بروز می‌کند و در Ben R3 نیز GAG (اسید آمینه اسید گلوتامیک در جدایه‌های حساس) با GTG (اسید آمینه والین) در کدون ۱۹۸ ژن بتاتوبولین جایگزین شده است (یاردن و کاتان ۱۹۹۳، لروکس و همکاران ۲۰۰۲، زیوگاس و همکاران ۲۰۰۹، ژانگ و همکاران ۲۰۱۰، فیلینجر و واکر ۲۰۱۶).

مقاومت *B. cinerea* به استروبیلورین‌ها به صورت کمّی و یا کیفی است. مقاومت کمّی به دلیل وجود یک آنزیم اکسیداز جایگزین[12] در برخی جدایه‌های قارچ است که به دلیل ایجاد سطوح پایینی از مقاومت و نیز کارآیی کم این آنزیم در تولید انرژی مورد نیاز قارچ، وجود جدایه‌هایی با این نوع مقاومت مشکل جدّی در کنترل بیمارگر ایجاد نمی‌کند (وود و هولومون ۲۰۰۳). ولی

[1] Benzimidazoles
[2] Benomyl
[3] Carbendazim
[4] β-tubulin
[5] Strobilurins
[6] Quinone outside inhibitors
[7] Azoxystrobin
[8] Kresoxim-methyl
[9] Cytochrome *bc1* enzyme
[10] Dietrhofencarb
[11] Zoxamide
[12] Alternative oxidase

Archive of SID

www.SID.ir

مقاومت کیفی *B. cinerea* نسبت به استروبیلورین‌ها که به دلیل جهش نقطه‌ای از GGT (اسید آمینه آلانین در جدایه-های حساس) به GCT (گلایسین) در کدون ۱۴۳ ژن پروتئین هدف این قارچ‌کش‌ها یعنی *cyt b* ایجاد می‌شود، خیلی قوی‌تر و قاطع‌تر از مقاومت کمّی است و وجود سویه‌هایی با این نوع مقاومت در جمعیت‌های قارچ، کنترل آن را با مشکل مواجه می‌کند (گیسی و همکاران ۲۰۰۲، دیسینگ و همکاران ۲۰۰۸، فرناندز-اورتونو و همکاران ۲۰۰۸، سیروتزکی ۲۰۱۵). در برخی جدایه‌های *B. cinerea* یک اینترون به نام Bcbi-143/144 در بین کدون‌های ۱۴۳ و ۱۴۴ ژن *cyt b* شناسایی شده است (بانو و همکاران ۲۰۰۹) و بررسی اثر جهش‌ها در بیان ژن *cyt b* حاوی این اینترون، ثابت کرده است که هر نوع جهش در کدون ۱۴۳ منجر به عدم حذف این اینترون در مراحل فرآوری mRNA و عدم تولید کمپلکس آنزیمی سیتوکروم *bc1* سالم و وظیفه‌مند می‌شود و در نتیجه قارچ از بین می‌رود (والیرس و همکاران ۲۰۱۱). به همین دلیل همه جدایه‌های دارای این اینترون به استروبیلورین-ها حساس هستند (بانو و همکاران ۲۰۰۹).

نتایج برخی مطالعات (امینی ۱۳۹۳، امینی و ابرین‌بنا ۱۳۹۵) نشان داده است که سویه‌های *B. cinerea* مقاوم به قارچ‌کش‌های گروه‌های بنزیمیدازول‌ها، دی-کربوکسیمیدها[1]، استروبیلورین‌ها و هیدروکسی آنیلیدها[2] در تاکستان‌های استان آذربایجان غربی با فراوانی‌های مختلف وجود دارند و بعضی از جدایه‌ها نسبت به چند گروه از این سموم مقاوم بودند. در تحقیق مذکور، مقاومت جدایه‌ها نسبت به قارچ‌کش‌ها با استفاده از یک غلظت متمایزکننده[3] مورد بررسی گرفت و به همین دلیل اطلاعاتی در زمینه میزان مقاومت به سموم مذکور و جهش‌های مرتبط با مقاومت در جدایه‌های *B. cinerea* در استان وجود ندارد. بنابراین تحقیق حاضر با هدف تعیین سطح مقاومت به قارچ‌کش‌های کاربندازیم و آزوکسی-استروبین و شناسایی جهش‌های مربوط به ژن هدف آنها در سویه‌های مقاوم انجام گرفت.

[1] Dicarboximides
[2] Hydroxyanilides
[3] Discriminatory dose

مواد و روش‌ها

جدایه‌های *B. cinerea*

تعداد ۱۰۳ جدایه قارچ *B. cinerea* از کلکسیون قارچی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شد (جدول ۱). این جدایه‌ها در طی سال‌های ۱۳۹۰ و ۱۳۹۱ از خوشه-های انگور آلوده در تاکستان‌ها و سردخانه‌های مختلف استان آذربایجان‌غربی جمع‌آوری شده‌اند و حساسیت آنها نسبت به چهار گروه قارچ‌کشی از جمله بنزیمیدازول‌ها و استروبیلورین‌ها و از طریق کشت روی محیط کشت حاوی یک دز متمایزکننده بنومیل و کرزوکسیم‌متیل بررسی شده است (امینی ۱۳۹۳، امینی و ابرین‌بنا ۱۳۹۵).

بررسی حساسیت و میزان مقاومت جدایه‌های *B. cinerea* نسبت به قارچ‌کش کاربندازیم

برای بررسی حساسیت و میزان مقاومت جدایه‌های *B. cinerea* نسبت به کاربندازیم، روش ژانگ و همکاران (۲۰۰۹) مورد استفاده قرار گرفت. بدین منظور، پس از تهیه‌ی محیط‌های کشت سترون سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA[4])، مقادیر مناسب کاربندازیم (پودر وتابل[5] ۶۰ درصد با نام تجاری کاربندازیم، ساخت شرکت شیمی کشاورز ایران) به آنها افزوده شد تا غلظت‌های ۱، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ماده‌ی موثره بدست آید. سپس حلقه‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی در حال رشد فعال در حاشیه‌ی پرگنه‌های دو روزه‌ی هر جدایه قارچ برداشته شد و روی PDA حاوی غلظت‌های مختلف قارچ‌کش و نیز فاقد قارچ‌کش (شاهد) به نحوی قرار داده شد که پرگنه با محیط کشت تماس داشته باشد. هر جدایه در سه تشتک حاوی هر کدام از غلظت‌های کاربندازیم و نیز سه تشتک پتری شاهد کشت شد. پس از ۷۲ ساعت گرماگذاری با دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوس در شرایط تاریکی، جدایه‌هایی که در محیط کشت PDA شاهد، رشد کردند ولی روی محیط‌های کشت حاوی قارچ‌کش‌ها رشد نکرده بودند به عنوان حساس در نظر گرفته شدند. همچنین جدایه‌هایی که علاوه بر شاهد،

[4] Potato dextrose agar
[5] Wettable powder

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- تعداد جدایه‌های ***Botrytis cinerea*** به دست آمده در هر منطقه، تعداد و فراوانی (درصد) جدایه‌های مقاوم به کاربندازیم و آزوکسی‌استروبین + اسید سالیسیلیک هیدروکسامید، و جدایه‌هایی دارای مقاومت چندگانه به هر دو قارچ‌کش

Table 1- No. of *Botrytis cinerea* isolates obtained from each region, no. and frequency (percentage) of the isolates resistant to carbendazim and azoxystrobin + salicylhydroxamic acid, and the isolates with multiple resistance to both fungicides

City (شهر)	Region (منطقه)	No. of isolates (تعداد جدایه‌ها)	Carbendazim (کاربندازیم)		Azoxystrobin + salisylhydroxamic acid (آزوکسی‌استروبین + اسید سالیسیلیک هیدروکسامید)		Carbendazim and azoxystrobin (کاربندازیم و آزوکسی‌استروبین)	
			No. (تعداد)	Frequency (فراوانی)	No. (تعداد)	Frequency (فراوانی)	No. (تعداد)	Frequency (فراوانی)
Urmia (ارومیه)	Zeinalloo (زینالو)	8	5	63	4	50	3	37
	Vicinity of airport (مجاورت فرودگاه)	12	11	92	10	83	4	33
	Kahriz (کهریز)	21	2	10	2	10	1	4
	Ghareh bagh (قره‌باغ)	6	1	17	0	0	0	0
	Emamzadeh (امامزاده)	8	1	13	0	0	0	0
	Gardabad (گردآباد)	6	2	33	3	50	0	0
	Balou packinghouse (سردخانه بالو)	14	9	64	9	64	1	7
	Zeinalloo packinghouse (سردخانه زینالو)	9	4	44	5	55	4	44
Salmas (سلماس)	-	10	0	0	1	10	0	0
Satdasht (سردشت)	-	9	4	44	1	12	1	11
Overall (کلّ)		103	39	38	35	34	14	14

Archive of SID

www.SID.ir

روی PDA حاوی یک میلی‌گرم بر لیتر کاربندازیم نیز رشد کرده ولی روی محیط‌های کشت حاوی ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر رشد نکردند، به عنوان جدایه‌هایی با مقاومت کم در نظر گرفته شدند. جدایه‌های که روی PDA حاوی یک و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر کاربندازیم رشد کرده ولی در محیط کشت حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر سمّ رشد نکرده بودند، به عنوان جدایه‌هایی با مقاومت متوسط، و جدایه‌هایی که در PDA حاوی یک، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کاربندازیم رشد کردند، به عنوان جدایه-های خیلی مقاوم منظور شدند. این آزمایش‌ها دو بار تکرار شدند.

بررسی حساسیت و میزان مقاومت جدایه‌های *B. cinerea* نسبت به قارچکش آزوکسی‌استروبین

برای ردیابی سویه‌های مقاوم به آزوکسی‌استروبین، دزهای متمایزکننده‌ی مختلفی از یک تا ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر مورد استفاده قرار گرفته است. در این تحقیق از سه غلظت یک (ایشیئی و همکاران ۲۰۰۹، اسدالهی و همکاران ۲۰۱۳)، ۱۰ (چاتزیمیدوپولوس و همکاران ۲۰۱۳) و ۱۰۰ (جیانگ و همکاران ۲۰۰۹، لو و همکاران ۲۰۱۶) میلی‌گرم بر لیتر ماده‌ی موثره آزوکسی‌استروبین (سوسپانسیون غلیظ شده[1] ۲۵ درصد با نام تجاری کوادریس[2]، ساخت شرکت Syngenta) استفاده شد تا سطوح مقاومت احتمالی نسبت به این قارچکش در سویه‌های مقاوم تعیین گردد. همچنین به محیط‌های کشت حاوی قارچکش و شاهد (فاقد قارچکش)، ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک هیدروکسامید[3] (ساخت شرکت Sigma) نیز اضافه شد تا آنزیم اکسیداز جایگزین را غیرفعال کند (وود و هولومون ۲۰۰۳، جیانگ و همکاران ۲۰۰۹، اسدالهی و همکاران ۲۰۱۳، چاتزیمیدوپولوس و همکاران ۲۰۱۳، لو و همکاران ۲۰۱۶). هر جدایه طبق روشی که در بالا ذکر گردید، در سه تشتک حاوی هر کدام از غلظت‌های آزوکسی-استروبین و نیز سه تشتک پتری شاهد کشت شد. پس از گرماگذاری تشتک‌ها به مدّت ۷۲ ساعت در دمای ۲۳ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی، قطر رشد پرگنه در تشتک‌ها در دو جهت عمود بر هم اندازه‌گیری شد و میانگین رشد در هر تشتک محاسبه گردید. جدایه‌هایی که میانگین رشد آنها روی PDA حاوی یک، ۱۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آزوکسی‌استروبین همراه با ۱۰۰ میلی-گرم بر لیتر اسید سالیسیلیک هیدروکسامید، بیش از ۵۰ درصد شاهد بود، به عنوان جدایه‌های خیلی مقاوم در نظر گرفته شدند. جدایه‌هایی که میانگین رشد آنها در محیط‌های کشت حاوی یک و ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر بیش از ۵۰ درصد شاهد ولی در تشتک حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر کمتر از ۵۰ درصد بود، به عنوان جدایه‌هایی با مقاومت متوسط در نظر گرفته شدند. در جدایه‌هایی که میانگین رشد پرگنه فقط در محیط کشت حاوی یک میلی-گرم بر لیتر بیش از ۵۰ درصد شاهد بود به عنوان جدایه‌هایی با مقاومت کم و جدایه‌هایی که رشد پرگنه در تشتک‌های حاوی هر سه غلظت آزوکسی‌استروبین کمتر از ۵۰ درصد شاهد بود، حساس به قارچکش در نظر گرفته شدند. کلّ این آزمایش‌ها دو بار تکرار شدند.

استخراج DNA و تکثیر و توالی‌یابی بخشی از ژن های بتاتوبولین و *cyt b* در جدایه‌های *B. cinerea*

در این قسمت از تحقیق، بخشی از ژن های بتاتوبولین و *cyt b* که به ترتیب ژن های پروتئین هدف کاربندازیم و آزوکسی‌استروبین می‌باشند، در همه سویه‌های مقاوم و پنج جدایه حساس به قارچکش‌ها تکثیر و توالی‌یابی شدند. به منظور تهیه‌ی میسلیوم جهت استخراج DNA ژنومی، جدایه‌ها روی محیط کشت PDA کشت شدند و تشتک‌های پتری به انکوباتور با دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوس و شرایط تاریکی انتقال یافتند. پس از هفت روز، توده میسلیومی هر جدایه قارچ به طور مجزا با استفاده از اسکالپل سترون جمع‌آوری و به کمک نیتروژن مایع در هاون چینی خرد شدند. استخراج DNA با استفاده از Genomic DNA Purification Kit (ساخت شرکت Thermo Fisher Scientific) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، انجام گردید.

بخشی از ژن بتاتوبولین با استفاده از آغازگرهای Bcb-F (5’-CACTGAGGGTGCTGAGCTTGT-3’) و

[1] Suspension concentrate
[2] Quadris
[3] Salicylhydroxamic acid

Archive of SID

www.SID.ir

(5’-GAAGCGGCCATCATGTTCTTA-3’) Bcb-R (ژانگ و همکاران ۲۰۱۰) طی واکنش PCR تکثیر شد و برای تکثیر قسمتی از ژن *cyt b* آغازگرهای BccytF (5'-AGAGGTATGTACTATGGATC-3') و PWcytR (5'-AGGTATAGATCTTAATATAGC-3') (ایشیئی و همکاران ۲۰۰۹) مورد استفاده قرار گرفت. واکنش‌های PCR با حجم ۲۵ میکرولیتر برای هر نمونه حاوی ۱X بافر PCR، ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومولار از هر نوکلئوتید، سه پیکومولار از هر کدام از آغازگرها، یک واحد آنزیم Taq پلی‌مراز، حدود ۱۰ نانوگرم DNA و مقدار مناسب آب مقطر سترون تهیه شد. چرخه دمایی شامل پنج دقیقه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴°C سپس ۳۵ چرخه که در هر کدام یک دقیقه دمای ۹۴°C، ۵۰ ثانیه دمای ۵۲°C برای آغازگرهای Bcb-F و Bcb-R و دمای ۵۰°C برای آغازگرهای BccytF و PWcytR، و ۵۰ ثانیه دمای ۷۲°C بود. در نهایت یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. خالص‌سازی و تعیین توالی محصولات PCR در شرکت Macrogene (کره جنوبی) انجام گرفت.

به منظور مقایسه توالی ژن ها و اسید آمینه‌ها در سویه‌های مقاوم و حساس و نیز شناسایی جهش‌ها و تغییرات اسید آمینه‌ای عامل مقاومت به قارچکش‌ها، توالی‌های بتاتوبولین و *cyt b* بدست آمده در این تحقیق، به همراه توالی‌های ژن ها و اسید آمینه‌های مرجع در جدایه‌های مقاوم و حساس به بنزیمیدازول‌ها و استروبیلورین‌ها به طور مجزا در نرم‌افزار Clustal X v.2 (تامسون و همکاران۱۹۹۷) همردیف[1] شدند.

نتایج و بحث

از مجموع ۱۰۳ جدایه‌ی مورد بررسی در این تحقیق، تعداد ۳۹ جدایه (۳۸ درصد) نسبت به کاربندازیم مقاوم و ۶۴ جدایه (۶۲ درصد) حساس بودند (جدول ۱). فراوانی سویه‌های مقاوم به قارچکش از صفر درصد در سلماس تا ۹۲ درصد در تاکستانی در اطراف فرودگاه ارومیه، متفاوت بود. همه جدایه‌هایی که در این تحقیق مقاوم به کاربندازیم شناخته شدند، در مطالعات قبلی نیز نسبت به بنومیل مقاوم بودند (امینی، ۱۳۹۳؛ امینی و ابرین‌بنا، ۱۳۹۵). با توجه به اینکه کاربندازیم و بنومیل جزو قارچ-کش‌های گروه بنزیمیدازول‌ها هستند و پروتئین هدف مشابهی دارند (لروکس و همکاران ۲۰۰۲)، مقاومت تقاطعی[2] جدایه‌های مقاوم نسبت به این دو قارچکش قابل پیش‌بینی بود. با بررسی رشد رویشی جدایه‌ها روی محیط کشت حاوی کاربندازیم و فاقد قارچکش (شاهد) مشخص گردید که جدایه‌های حساس فقط در تشتک‌های پتری شاهد رشد کردند در حالی که جدایه‌های مقاوم قادر به رشد روی محیط کشت حاوی هر سه غلظت قارچکش نیز بودند و کاهش قابل توجهی در میزان رشد آنها مشاهده نشد. بنابراین، همه ۳۹ جدایه مقاوم به عنوان سویه‌های خیلی مقاوم به بنزیمیدازول‌ها شناخته شدند. بنزیمیدازول‌ها از جمله اولین قارچکش‌های سیستمیکی می‌باشند که برای کنترل پوسیدگی خاکستری در محصولات مختلف از جمله انگور توصیه شده و از سال‌ها قبل در سطح وسیع مورد استفاده قرار گرفته‌اند. همچنین با توجه به اینکه این سموم از لحاظ احتمال بروز مقاومت، جزو قارچکش‌های پرخطر[3] می-باشند، سویه‌های *B. cinerea* مقاوم به بنزیمیدازول‌ها تقریباً از همه مناطق و کشورهای مورد بررسی گزارش شده است. ولی برخلاف مقاومت بالایی که در همه سویه‌های مقاوم در استان آذربایجان غربی مشاهده گردید، در همه موارد سویه‌هایی با درجات مختلفی از مقاومت به این قارچکش‌ها و با فراوانی متفاوت گزارش شده است. در بین فنوتیپ‌های مختلف مقاومت نیز دو فنوتیپ Ben R1 و Ben R2 در سطح وسیعی در مناطق مورد بررسی ردیابی شده است (لروکس و همکاران ۲۰۰۲، لروکس ۲۰۰۷، لروکس و همکاران ۲۰۱۰، فیلینجر و واکر ۲۰۱۶).

آغازگرهای Bcb-F و Bcb-R یک قطعه DNA در حدود ۵۹۰ جفت باز مربوط به بخشی از ژن بتاتوبولین را در همه سویه‌های مقاوم و حساس به کاربندازیم تکثیر کردند. مقایسه توالی این جدایه‌ها با توالی‌های X73133

[1] Align

[2] Cross resistance

[3] High risk

Archive of SID

www.SID.ir

در جدایه حساس (یاردن و کاتان ۱۹۹۳) و توالی U27198 در جدایه مقاوم (پارک و همکاران ۱۹۹۷) به بنزیمیدازول‌ها نشان داد که کدون ۱۹۸ در همه سویه-های حساس GAG، و در همه سویه‌های مقاوم به GCG بود، در حالی که توالی ژن در سایر قسمت‌های مورد بررسی، در جدایه‌های حساس و مقاوم مشابه بود. مقایسه توالی اسید آمینه این قسمت از ژن بتاتوبولین در جدایه‌های حساس و مقاوم نیز مشخص نمود که کدون ۱۹۸ در جدایه‌های حساس اسید گلوتامیک بود که در همه سویه‌های مقاوم به اسید آمینه آلانین تغییر یافته است. در سایر قسمت‌ها، توالی اسید آمینه در جدایه‌های حساس و مقاوم مشابه بود. تاکنون جهش‌های مختلفی در کدون‌های ۱۹۸ و ۲۰۰ بتاتوبولین به عنوان عامل بروز مقاومت به بنزیمیدازول‌ها در *B. cinerea* گزارش شده است. این جهش‌ها با فراوانی‌های متفاوت در جمعیت‌های این قارچ در مناطق و کشورهای مختلف ردیابی شده‌اند. با اینکه در همه موارد، بیش از یک نوع جهش در جدایه‌های موجود در یک منطقه مشاهده شده است امّا در بین آنها جهش از GAG به GCG (اسید گلوتامیک به آلانین) در کدون ۱۹۸ پراکنش و گسترش بیشتری دارد. این تغییر در کدون ۱۹۸ بتاتوبولین باعث بروز فنوتیپ Ben R1 در جدایه‌های حاوی این جهش می-شود و بالاترین سطح مقاومت به بنزیمیدازول‌ها را ایجاد می‌کند ولی در مقابل، موجب افزایش حساسیت قارچ نسبت به دو قارچکش دی‌اتوفن‌کارب و زوکسامید می-شود (یاردن و کاتان ۱۹۹۳، لروکس و همکاران ۲۰۰۲، لروکس ۲۰۰۷، زیوگاس و همکاران ۲۰۰۹، و همکاران ۲۰۱۰، مالاندراکیس و همکاران ۲۰۱۱، فیلینجر و واکر ۲۰۱۶، لو و همکاران ۲۰۱۶). در همه جدایه‌های مقاومی که از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شده بود، توالی کدون ۱۹۸، GCG بود. بنابراین به نظر می‌رسد که سویه‌های مقاوم قارچ در استان فقط دارای این نوع جهش هستند ولی این احتمال نیز وجود دارد که جدایه‌هایی با جهش‌های دیگر نیز در جمعیت‌های قارچ در تاکستان‌های استان وجود داشته باشد، ولی به دلیل فراوانی کم آنها و تعداد محدود جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق، سویه‌های مذکور ردیابی نشدند. همچنین بررسی توالی ژن بتاتوبولین، نتایج بررسی‌های فنوتیپی جدایه‌ها مبنی بر مقاومت خیلی زیاد جدایه‌ها نسبت به این گروه از قارچکش‌ها را تایید کرد و مشخص نمود که همه جدایه‌های مقاوم، فنوتیپ Ben R1 داشتند. بنابراین با توجه به پراکنش وسیع و فراوانی بالای سویه‌های مقاوم با فنوتیپ Ben R1 در تاکستان‌های استان و نیز مقاومت خیلی بالای آنها نسبت به بنزیمیدازول‌ها، استفاده از این گروه قارچکش‌ها به تنهایی برای کنترل کپک خاکستری انگور در منطقه قابل توصیه نیست. ولی به دلیل حساسیت زیاد جدایه‌های این فنوتیپ نسبت به دی‌اتوفن‌کارب و زوکسامید، توصیه می‌شود لااقل یکی از این دو قارچکش در ایران ثبت و به همراه بنزیمیدازول‌ها در برنامه‌های مدیریت بیماری در منطقه مورد استفاده قرار گیرد تا بتوان ضمن بهره‌گیری از سموم بسیار موثر بنزیمیدازولی، سویه‌های خیلی مقاوم به این قارچکش‌ها را نیز کنترل نمود.

ارزیابی حساسیت جدایه‌ها نسبت به آزوکسی-استروبین همراه با اسید سالیسیلیک هیدروکسامید نشان داد که فراوانی سویه‌های مقاوم به این قارچکش کمتر از کاربندازیم بود به طوری که در بین ۱۰۳ جدایه مورد بررسی، تعداد ۳۵ جدایه (۳۴ درصد) مقاوم و ۶۸ جدایه (حدود ۶۶ درصد) حساس شناسایی گردید (جدول ۱). بجز نمونه‌های تاکستان‌های قره‌باغ و امامزاده، سویه-های مقاوم به آزوکسی‌استروبین در بین جدایه‌های سایر مناطق شناسایی گردید که بیشترین فراوانی در جدایه-های جمع‌آوری شده از اطراف فرودگاه ارومیه با فراوانی ۸۳ درصد مشاهده شد. کمترین فراوانی مقاومت در جدایه‌های کهریز و سلماس با ۱۰ درصد شناسایی شد. (جدول ۱). همه جدایه‌هایی که در این تحقیق مقاوم به آزوکسی‌استروبین شناخته شدند، در مطالعه قبلی نیز نسبت به کرزوکسیم‌متیل مقاوم بودند (امینی، ۱۳۹۳). بنابراین سویه‌های مقاوم دارای مقاومت تقاطعی نسبت به این قارچکش‌ها بودند زیرا آزوکسی‌استروبین و کرزوکسیم‌متیل هر دو جزو قارچکش‌های گروه استروبیلورین‌ها هستند و پروتئین هدف مشابهی دارند (بارتلت و همکاران ۲۰۰۲). تا چند سال پیش، حساسیت جدایه‌های *B. cinerea* نسبت به استروبیلورین‌ها کمتر

Archive of SID

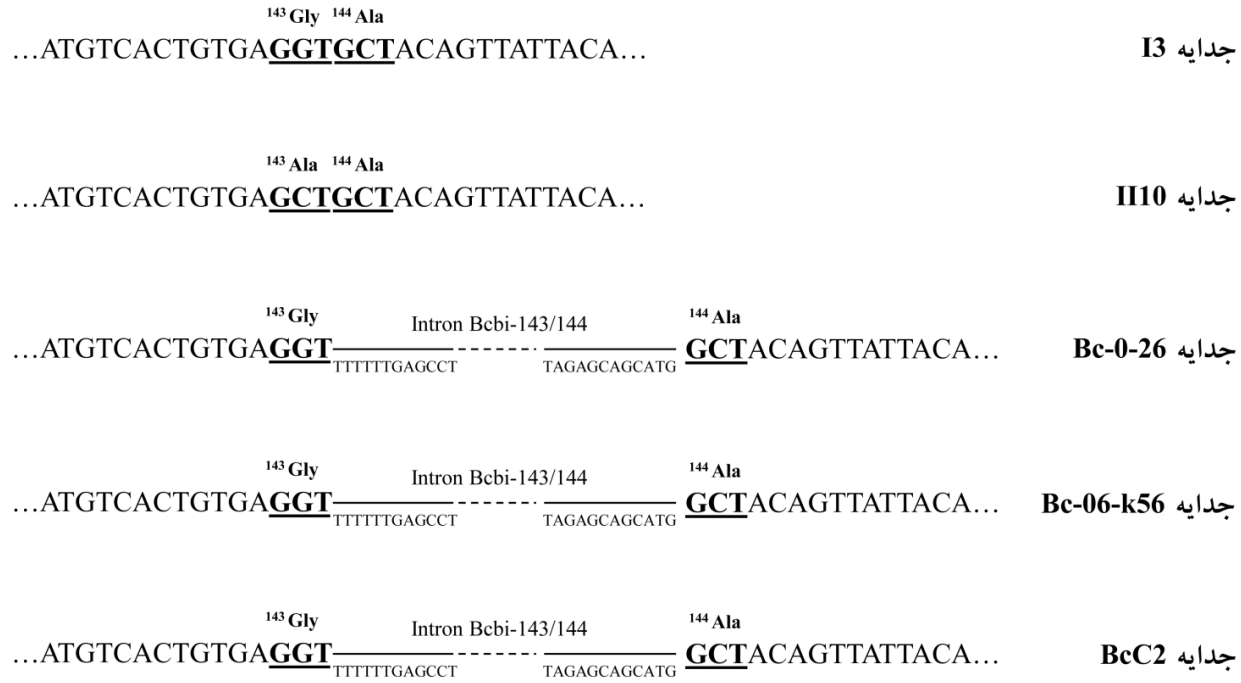
www.SID.ir

بررسی شده بود و در مواردی فقط سویه‌های جهش-یافته مقاوم در شرایط آزمایشگاهی تهیه شده و مورد مطالعه قرار گرفته بود (ماراکوقلو و همکاران ۲۰۰۶). ولی در طی حدود یک دهه اخیر، سویه‌های مقاوم به این گروه از قارچ‌کش‌ها در جمعیت‌های مزرعه‌ای این بیمارگر نیز شناسایی و گزارش شده است (بانو و همکاران ۲۰۰۹، ایشیئی و همکاران ۲۰۰۹، ساموئل و همکاران ۲۰۱۱، آنجلینی و همکاران ۲۰۱۴، اسدالهی و همکاران ۲۰۱۳، چاتتزیمیدوپولوس و همکاران ۲۰۱۳، لو و همکاران ۲۰۱۶). با اینکه فراوانی سویه‌های مقاوم به استروبیلورین‌ها تا حدود ۵۲ درصد (ساموئل و همکاران ۲۰۱۱) نیز مشاهده شده است، ولی در اغلب موارد، فراوانی آنها حتی در باغات و مزارعی با سابقه چندین سال سم‌پاشی با این گروه از سموم، خیلی کمتر گزارش شده است. نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد، با اینکه آزوکسی‌استروبین و حتی سایر قارچ‌کش‌های استروبیلورین‌ها برای کنترل پوسیدگی خاکستری در استان آذربایجان غربی و حتی سایر مناطق کشور توصیه نشده و برای کنترل این بیماری مورد استفاده قرار نگرفته است، سویه‌های مقاوم به این گروه از سموم با فراوانی نسبتاً بالا، به طور گسترده در تاکستان‌های اغلب مناطق استان پراکنده می‌باشند. از بین قارچ‌کش‌های این گروه، کرزوکسیم‌متیل و تریفلوکسی‌استروبین برای کنترل سفیدک پودری و لکه سیاه سیب در ایران توصیه شده است و باغداران استان آذربایجان غربی نیز در سطح گسترده‌ای از این سموم استفاده می‌کنند. بنابراین با توجه به اینکه سیب و انگور از محصولات عمده استان می‌باشند و باغ‌های این دو محصول اغلب در مجاورت یکدیگر هستند و *B. cinerea* نیز یک بیمارگر پلی‌فاژ است که قادر به ایجاد آلودگی در سیب نیز می‌باشد (کیم و زیائو ۲۰۱۰، یین و همکاران ۲۰۱۲)، احتمال دارد سم-پاشی باغ‌های سیب با دو قارچ‌کش مذکور، منجر به گزینش سویه‌های مقاوم این قارچ به عنوان بیمارگر غیرهدف و افزایش فراوانی آنها در منطقه شده است. با بررسی رشد رویشی جدایه‌ها روی محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف آزوکسی‌استروبین و فاقد قارچ‌کش (شاهد) نیز مشخص گردید که جدایه‌های حساس فقط در تشتک‌های پتری شاهد رشد کردند در حالی که میانگین رشد جدایه‌های مقاوم روی محیط کشت حاوی هر سه غلظت قارچ‌کش بیش از ۵۰ درصد شاهد بود و در اغلب این جدایه‌ها کاهش قابل توجهی در میزان رشد آنها مشاهده نشد. بنابراین، همه ۳۵ جدایه مقاوم به عنوان سویه‌های خیلی مقاوم به استروبیلورین‌ها شناخته شدند. با اینکه در یک دهه اخیر مطالعاتی در زمینه بررسی میزان حساسیت جدایه‌های *B. cinerea* نسبت به استروبیلورین‌ها در شرایط مزرعه‌ای انجام گرفته است (بانو و همکاران ۲۰۰۹، ایشیئی و همکاران ۲۰۰۹، ساموئل و همکاران ۲۰۱۱، آنجلینی و همکاران ۲۰۱۳، اسدالهی و همکاران ۲۰۱۳، چاتتزیمیدوپواوس و همکاران ۲۰۱۳، لو و همکاران ۲۰۱۶)، ولی در موارد معدودی سطوح مقاومت به این قارچ‌کش‌ها تعیین شده است. اسدالهی و همکاران (۲۰۱۳) تعداد ۱۵۷ جدایه این بیمارگر را که از محصولات مختلف در مجارستان جمع‌آوری کرده بودند، از طریق کشت روی PDA حاوی غلظت‌های متمایز کننده آزوکسی‌استروبین بررسی کردند که از این تعداد، ۲۸ جدایه (۱۸ درصد) خیلی مقاوم و ۴۸ جدایه (۳۰ درصد) را به عنوان سویه‌هایی با مقاومت کم گزارش کردند. در تحقیق دیگری، ۱۲۰ جدایه *B. cinerea* جدا شده از سیب‌های آلوده در باغات و سردخانه‌های آمریکا مورد بررسی قرار گرفت که از بین آنها، سه جدایه خیلی مقاوم و یک جدایه به عنوان سویه‌ای با مقاومت کم گزارش گردید (کیم و زیائو ۲۰۱۰). علیرغم اینکه در بین جدایه‌های مجارستان و آمریکا جدایه‌هایی با مقاومت‌های کم و بالا نسبت به استروبیلورین‌ها گزارش شده است، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که همه جدایه‌های مقاومی که از استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شده بودند، مقاومت خیلی بالایی نسبت به این گروه از قارچ‌کش‌ها نشان دادند. البته احتمال دارد سویه‌هایی با سطوح مقاومت کمتر با فراوانی کم نیز در بین جمعیت‌های قارچ در استان وجود داشته باشد که در این تحقیق شناسایی نشد.

آغازگرهای BccytF و PWcytR یک قطعه DNA به طول حدود ۵۶۵ جفت باز مربوط به بخشی از ژن *cyt b* را در همه سویه‌های مقاوم و چهار جدایه حساس به

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- ساختار ژن در قسمتی از *cyt b* در جدایه‌های *Botrytis cinerea* دارای اینترون Bcbi-143/144 در بین کدون‌های ۱۴۳ و ۱۴۴ یا فاقد آن. جدایه I3: حساس به استروبیلورین‌ها و فاقد اینترون Bcbi-143/144 (لروکس و همکاران ۲۰۱۰)، جدایه II10: مقاوم به استروبیلورین‌ها و فاقد اینترون Bcbi-143/144 (لروکس و همکاران ۲۰۱۰)، جدایه‌های Bc-0-26 و Bc-06-k56: حساس به استروبیلورین‌ها و دارای اینترون Bcbi-143/144 (بانو و همکاران ۲۰۰۹) و جدایه BcC2: حساس به استروبیلورین‌ها و دارای اینترون Bcbi-143/144 که از استان آذربایجان غربی جداسازی شده است و در این تحقیق توالی‌یابی گردید.

Figure 1. Gene structure in part of *Cyt b* in *Botrytis cinerea* isolates with or without Bcbi-143/144 intron between codons 143 and 144. Isolate I3: sensitive to strobilurins and without Bcbi-143/144 intron (Leroux *et al.*, 2010), Isolate II10: resistant to strobilurins and without Bcbi-143/144 intron (Leroux *et al.*, 2010), Isolates Bc-0-26 and Bc-06-k56: sensitive to strobilurins with Bcbi-143/144 intron (Banno *et al.*, 2009) and isolate BcC2: sensitive to strobilurins with Bcbi-143/144 intron that has been isolated from West Azarbaijan province and sequenced in this study.

آزوکسی‌استروبین تکثیر کردند ولی در جدایه حساس BcC2 که از تاکستان اطراف فرودگاه ارومیه جداسازی شده بود، یک قطعه DNA به طول حدود ۱۷۶۹ تکثیر شد.مقایسه این توالی در جدایه BcC2 با توالی‌های AB428335 و AB427166 در جدایه‌های حساس (Bc-0-26 و Bc-06-k56) دارای اینترون Bcbi-143/144 (بانو و همکاران ۲۰۰۹) و توالی‌های FJ217742 و FJ217741 به ترتیب در جدایه‌های حساس (I3) و مقاوم (II10) فاقد اینترون (لروکس و همکاران ۲۰۱۰) نشان داد که ژن *cyt b* در این جدایه حساس نیز حاوی اینترونی به طول ۱۲۰۵ جفت بازی بین کدون‌های ۱۴۳ و ۱۴۴ بود (شکل ۱). نتایج مطالعات مختلف نشان داده‌اند که جدایه‌های دارای این اینترون با فراوانی‌های مختلف در جمعیت‌های این قارچ وجود دارند و در همه موارد، جدایه‌های دارای این اینترون، نسبت به استروبیلورین‌ها حساس بودند. جیانگ و همکاران (جیانگ و همکاران ۲۰۰۹) با بررسی ۱۸۴ جدایه *B. cinerea* که از گیاهان مختلف در ایالات متحده و چین جمع‌آوری شده بودند، اینترون Bcbi-143/144 را در ۷۹ جدایه شناسایی کردند. در تحقیق

Archive of SID

www.SID.ir

دیگری ساختار ژن *cyt b* در ۲۶۴ جدایه این بیمارگر در ایالات متحده مطالعه شد و اینترون مذکور در کمتر از ۱۰ درصد از جدایه‌ها مشاهده گردید (یین و همکاران ۲۰۱۲). همچنین از بین ۷۶ جدایه‌ای که در چین مورد بررسی قرار گرفت، تعداد ۳۸ جدایه حاوی این اینترون در ژن *cyt b* بودند (لو همکاران ۲۰۱۶). نتایج تحقیق حاضر نیز نشان داد که جدایه‌هایی با اینترون Bcbi-143/144 در تاکستان‌های آذربایجان غربی وجود دارد ولی با توجه به اینکه در این مطالعه فقط پنج جدایه حساس مورد بررسی قرار گرفت، وجود و فراوانی این اینترون در سایر جدایه‌های حساس مشخص نیست.

مقایسه توالی بخشی از ژن *cyt b* در جدایه‌های حساس و مقاوم جدا شده از تاکستان‌های استان آذربایجان غربی، با توالی‌های FJ217741 در سویه مقاوم و FJ217741 در سویه حساس (لروکس و همکاران ۲۰۱۰) به استروبیلورین‌ها نشان داد که کدون ۱۴۳ در همه سویه‌های حساس GGT و در همه سویه‌های مقاوم GCT می‌باشد، در حالی که توالی ژن در سایر قسمت‌های مورد بررسی، در جدایه‌های مقاوم و حساس (بجز جدایه دارای اینترون Bcbi-143/144) مشابه بود. مقایسه توالی اسید آمینه این قسمت از ژن *cyt b* در جدایه‌های حساس و مقاوم با توالی‌های ACL50592 در سویه مقاوم و ACL50593 در سویه حساس (لروکس و همکاران ۲۰۱۰) نیز مشخص نمود که کدون ۱۴۳ در جدایه‌های حساس گلایسین بود که در همه سویه‌های مقاوم به اسید آمینه آلانین تغییر یافته است. با اینکه چندین جهش در کدون‌های مختلف ژن *cyt b*، به عنوان عامل مقاومت به استروبیلورین‌ها در گونه‌های مختلف قارچ‌های بیماریزای گیاهی گزارش شده است، ولی در *B. cinerea* فقط جهش از GGT (اسید آمینه گلایسین در جدایه‌های حساس) به GCT (اسید آمینه آلانین) در کدون ۱۴۳ شناسایی شده است که مقاومت بالایی نسبت به این قارچکش‌ها ایجاد می‌کند (گیسی و همکاران ۲۰۰۲، فرناندز–اورتونو و همکاران ۲۰۰۸، سیروتزکی ۲۰۱۵). جدایه‌های مقاوم به استروبیلورین‌ها که دارای این نوع جهش در ژن *cyt b* می‌باشند، با فراوانی‌های مختلف در جمعیت‌های مزرعه‌ای این قارچ گزارش شده است (بانو و همکاران ۲۰۰۹، ایشیئی و همکاران ۲۰۰۹، جیانگ و همکاران ۲۰۰۹، ساموئل و همکاران ۲۰۱۱، آنجلینی و همکاران ۲۰۱۳، اسدالهی و همکاران ۲۰۱۳، لو و همکاران ۲۰۱۶). یافته‌های این تحقیق نیز نشان داد که همه جدایه‌های مقاوم به آزوکسی‌استروبین که از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی جمع‌آوری شده بودند، دارای این نوع جهش در کدون ۱۴۳ هستند که موجب بروز مقاومت بالا به این قارچکش و در کلّ استروبیلورین‌ها شده است.

ارزیابی واکنش ۱۰۳ جدایه *B. cinerea* نسبت به کاربندازیم و آزوکسی‌استروبین نشان داد که تعداد ۱۴ جدایه (حدود ۱۴ درصد) دارای مقاومت چندگانه[1] بودند و نسبت به هر دو قارچکش مقاومت نشان دادند (جدول ۱). این جدایه‌ها در بین نمونه‌های جمع‌آوری شده از شش تاکستان و سردخانه ردیابی شدند که بیشترین فراوانی (۴۴ درصد) در سردخانه زینالو و کمترین فراوانی (۴ درصد) در بین نمونه‌های تاکستان کهریز مشاهده شد. مقاومت چندگانه جدایه‌های *B. cinerea* به قارچکش‌هایی با گروه‌ها و مکانیسم‌های اثر متفاوت، قبلاً از سایر کشورهای دنیا نیز گزارش شده است (لروکس و همکاران ۲۰۰۲، لروکس و همکاران ۱۹۹۹، میرسیوتیس و همکاران ۲۰۰۷، کورولف و همکاران ۲۰۱۱،) که باعث ایجاد محدودیت در کاربرد این سموم می‌شود و کنترل این بیمارگر را با مشکل مواجه می‌کند.

در مجموع در این تحقیق، با بررسی‌های فنوتیپی و توالی‌یابی ژن های هدف بنزیمیدازول‌ها و استروبیلورین‌ها، فراوانی بالای سویه‌های خیلی مقاوم *B. cinerea* در تاکستان‌های مناطق مورد بررسی در استان آذربایجان غربی به اثبات رسید. بنابراین استفاده از این دو گروه قارچکش به تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر در مدیریت بیماری پوسیدگی خاکستری انگور در منطقه قابل توصیه نیست. با توجه به اینکه سویه‌های مقاوم به بنزیمیدازول‌ها دارای فنوتیپ Ben R1 بودند، توصیه می‌شود دی‌اتوفن‌کارب یا زوکسامید در ایران به ثبت برسند و به همراه یکی از قارچکش‌های بنزیمیدازولی مورد استفاده قرار گیرند تا سویه‌های حساس و مقاوم به طور

[1] Multiple resistance

Archive of SID

www.SID.ir

موثری کنترل شوند. البته با توجه به احتمال وجود فنوتیپ‌های Ben R2 و Ben R3 در منطقه و مقاومت آنها نسبت به بنزیمیدازول‌ها، دی‌اتوفن‌کارب و زوکسامید، بایستی این قارچ‌کش‌ها در قالب برنامه‌های ضدمقاومت به قارچ‌کش (استفاده از سمومی با نقطه اثر متفاوت به صورت مخلوط با هم یا به صورت متناوب) مورد استفاده قرار گیرند تا این فنوتیپ‌ها گزینش نشده و فراوانی آنها در جمعیت افزایش پیدا نکند.

منابع

امینی ر، ۱۳۹۳. ارزیابی حساسیت جدایه‌های *Botrytis cinerea* جمع‌آوری شده از تاکستان‌های استان آذربایجان غربی نسبت به چهار قارچ‌کش سیستمیک. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

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، جلد پنجم، شماره ۱. صفحه‌های ۱۹۵ تا ۲۰۷.

Angelini RMM, Rotolo C, Masiello M, Gerin D, Pollastro S and Faretra F, 2014. Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. Pest Management Science 70(12): 1785–1796.

Asadollahi M, Szojka A, Fekete E, Karaffa L, Takács F, Flipphi M, and Sándor E, 2013. Resistance to QoI fungicide and cytochrome b diversity in the Hungarian *Botrytis cinerea* population. Journal of Agricultural Science and Technology 15(2): 397–407.

Banno S, Yamashita K, Fukumori F, Okada K, Uekusa H, Takagaki M, Kimura M and Fujimura M, 2009. Characterization of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome gene. Plant Pathology 58(1): 120–129.

Bartlett DW, Clough JM, Godwin JR, Hall AA, Hamer M and Parr-Dobrzanski B, 2002. The strobilurin fungicides. Pest Management Science 58(7): 649–662.

Brent KJ and Hollomon DW, 2007. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be Managed?. Fungicide Resistance Action Committee: FRAC Monograph No. 1.

Chatzidimopoulos M, Papaevaggelou D and Pappas AC, 2013. Detection and characterization of fungicide resistant phenotypes of *Botrytis cinerea* in lettuce crops in Greece. European Journal of Plant Pathology 137(2): 363–376.

Elad Y, Williamson B, Tudzynski P and Delen N, 2004. *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. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.

Fernández-Ortuño D, Torés JA, de Vicente A and Perez-García A, 2008. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. International Microbiology 11(1): 1–9.

Fillinger S and Walker A, 2016. Chemical control and resistance management of *Botrytis* diseases. Pp 189–216 In: Fillinger S and Elad Y (eds.) *Botrytis*- The Fungus, The Pathogen and Its Management in Agricultural Systems. Springer, Switzerland.

Gisi U, Sierotzki H, Cook A and McCaffery A, 2002. Mechanisms influencing the evolution of resistance to QoI inhibitor fungicides. Pest Management Science 58(9): 859–867.

Hahn M, 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. Journal of Chemical Biology 7(4): 133–141.

Archive of SID

www.SID.ir

Ishii H, Fountaine J, Chung W, Kansako M, Nishimura K, Takahashi K and Oshima M, 2009. Characterisation of QoI-resistant field isolates of *Botrytis cinerea* from citrus and strawberry. Pest Management Science 65(8): 916–922.

Jiang J, Ding L, Michailides TJ, Li H and Ma Z, 2009. Molecular characterization of azoxystrobin-resistant isolates of *Botrytis cinerea*. Pesticide Biochemistry and Physiology 93(2): 72–76.

Kim YK and Xiao CL, 2010. Resistance to pyraclostrobin and boscalid in populations of *Botrytis cinerea* from stored apples in Washington State. Plant Disease 94(5): 604–612.

Leroux P, 2007. Chemical control of *Botryti*s and its resistance to chemical fungicides. Pp 195–217 In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P and Delen N (eds.) *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.

Leroux P, Chapeland F, Desbrosses D and Gredt M, 1999. Patterns of cross-resistance to fungicides in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) isolates from French vineyards. Crop Protection 18(10): 687–697.

Leroux P, Fritz R, Debieu D, Albertini C, Lanen C, Bach J, Gredt M and Chapeland F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. Pest Manegment Science 58(9): 876–888.

Leroux P, Gredt M, Leroch M and Walker AS, 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. Applied and Environmental Microbiology 79(19): 6615–6630.

Lu XH, Jiao XL, Hao JJ, Chen AJ and Gao WW, 2016. Characterization of resistance to multiple fungicides in *Botrytis cinerea* from Asian ginseg in northern China. European Journal of Plant Pathology 144(3): 467–476.

Malandrankis A, Markoglou A and Ziogas B, 2011. Molecular characterization of benzimidazole-resistant *B. cinerea* field isolates with reduced or enhanced sensitivity to zoxamide and diethofencarb. Pesticide Biochemistry and Physiology 99(1): 118–124.

Markoglou AN, Malandrankis AA, Vitoratos AG and Ziogas BN, 2006. Characterization of laboratory mutants of *Botrytis cinerea* resistant to QoI fungicides. European Journal of Plant Pathology 115(2): 149–62.

Park SY, Jung OJ, ChungYR and Lee CW, 1997. Isolation and characterization of a benomyl-resistant form of beta-tubulin-encoding gene from the phytopathogenic fungus *Botryotinia fuckeliana*. Molecular Cells 7(1): 104–109.

Pearson RC and Goheen AC, 1988. Compendium of Grape Diseases. APS Press, USA.

Samuel S, Papayiannis LC, Veloukas T, Hahn M and Karaoglanidis GS, 2011. Evaluation of the G143E mutation and cyt b intron presence in the *cytochrome bc-1* gene conferring QoI resistance in *Botrytis cinerea* populations from several hosts. Pest Management Science 67(8): 1029–1039.

Sierotzki H, 2015. Respiration inhibitors. Pp: 119–143 In: Ishii H and Hollomon DW (eds.) Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Springer, Tokyo, Japan.

Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F and Higgins DG, 1997. The Clustal X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 25(24): 4876–4882.

Vallières C, Trouillard M, Dujardin G and Meunier B, 2011. Deleterious effect of Q_o inhibitor compound resistance-conferring mutation G143A in the intron containing cytochrome *b* gene and mechanisms for bypassing it. Applied and Environmental Microbiology 77(6): 2088–2093.

Williamson B, Tudzynski B, Tudzinski P and Vankan JA, 2007. *Botrytis cinerea*: the case of grey mould disease. Molecular Plant Pathology 8(5): 561–580.

Archive of SID

www.SID.ir

Wood PM and Hollomon DW, 2003. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Q_O site of complex III. Pest Management Science 59(5): 499–511.

Yarden O and Katan T, 1993. Mutations leading to substitutions at amino acids 198 and 200 of beta-tubulin that correlate with benomyl-resistance phenotypes of field strains of *Botrytis cinerea*. Phytopathology 83(12): 1478–1483.

Yin YN, Kim YK and Xiao CL, 2012. Molecular characterization of pyraclostrobin resistance and structural diversity of the cytochrome *b* gene in *Botrytis cinerea* from apple. Phytopathology 102(3): 315–322.

Zhang CQ, Hu JL, Wei FL and Zhu GN, 2009. Evolution of resistance to different classes of fungicides in *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables in China. Phytoparasitica 37(4): 351–359.

Zhang CQ, Liu SY and Zhu GN, 2010. Detection and characterization of benzimidazole resistance of *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables. European Journal of Plant Pathology 126(4): 509–515.

Ziogas BN, Nikou D, Markoglou AN, Malandrakis AA Vontas J, 2009. Identification of a novel point mutation in the β-tubulin gene of *Botrytis cinerea* and detection of benzimidazole resistance by a diagnostic PCR-RFLP assay. European Journal of Plant Pathology 125(1): 97–107.

Archive of SID

www.SID.ir

Detection of Gene Mutations Associated with Resistance to Benzimidazoles and Strobilurins in *Botrytis cinerea* Isolates from Grape in West Azarbaijan Province

V Rezaee Rad[1], M Abrinbana[2*] and S Rezaee[3]

[1]Former MSc Student, Department of Plant Pathology, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2]Assisstant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran.
[3]Assisstant Professor, Department of Plant Pathology, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[*]Corresponding author: m.abrinbana@urmia.ac.ir

Received: 25 February 2018 Accepted: 9 June 2019

Abstract

Chemical control using fungicides is considered as the most important method to control *Botrytis cinerea* in different crops. However, effective management of this pathogen requires information on presence and frequency of fungicide-resistant strains and levels of resistance as well as mutations associated with the resistance. In this research, sensitivity of 103 *B. cinerea* isolates collected from vineyards in different regions of West Azarbaijan province was assessed to carbendazim (60 WP) and azoxystrobin (25 SC). Among the studied isolates, 39 (38%) and 35 (34%) isolates were highly resistant to carbendazim and azoxystrobin, respectively. Partial sequencing of the beta tubulin gene indicated that in carbendazim-resistant strains GAG had changed to GCG which led to the substitution of glutamic acid by alanine at the codon position 198 and subsequently appearance of Ben R1 phenotype. Analysis of the partial *cyt b* gene sequence revealed that in azoxystrobin-resistant strains GGT had changed to GCT (point mutation) leading to substitution of glycine by alanine at the codon position 143. Further, one of the azoxystrobin-sensitive isolates had Bcbi-143/144 intron immediately after codon 143 in *cyt b*. The results indicated that application of benzimidazole and strobilurin fungicides groups are not recommended for *B. cinerea* management in the vineyards of the region. However, given that benzimidazole-resistant strains had Ben R1 phenotype, benzimidazole fungicides can be used with diethofencarb or zoxamide as a mixture partner to effectively control both sensitive and resistant strains.

Keywords: Beta tubulin, Cytochrome *b*, Fungicide resistance, Gray mold.

Archive of SID

www.SID.ir