



مقاله پژوهشی

گزارشی از گونه مرکب *Botrytis cinerea* همراه با گیاهان دانه‌ریز بلک‌بری، بلوبری، رازبری و کیوی در استان گیلان، ایران

فاطمه قهرمانی^۱، مهرناز نیک^۱، محمدجواد پورمقدم^۱، صدیقه موسی‌نژاد^{۱*}، محمود قاسم‌نژاد^۲ و سیداکبر خداپرست^{۱**}

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۴، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۸/۱۵)

چکیده

گونه *Botrytis cinerea* Pers. یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای میوه‌های انباری، سبزیجات، گیاهان زینتی و گلخانه‌ای به شمار می‌آید. این گونه در دامنه حرارتی متنوعی، از مناطق معتدل خنک تا مناطق نیمه گرمسیری قابلیت رشد دارد. در این مطالعه گیاهان بلک‌بری (*Rubus fruticosus* L.)، بلوبری (*Vaccinium corymbosum* L.) و رازبری (*Rubus idaeus* L.) با نشانه‌های لکه‌برگی دمی‌برگ و ساقه، از باغات مختلف و همچنین میوه‌های انبار شده کیوی (*Actinidia chinensis* Planch.) با نشانه‌های پوسیدگی میوه از سردخانه‌ها در استان گیلان مورد بررسی قرار گرفتند. در مجموع تعداد ۲۵ جدایه با ویژگی‌های جنس *Botrytis* از گیاهان بلک‌بری (یک جدایه)، رازبری (چهار جدایه)، بلوبری (۱۰ جدایه) و میوه‌های کیوی (۱۰ جدایه) به دست آمد. بر اساس تلفیق ویژگی‌های ریخت‌شناختی و داده‌های مولکولی بر مبنای توالی بخشی از ژن *G3PDH*، همه جدایه‌ها به عنوان گونه مرکب *Botrytis cinerea* شناسایی شدند. بر اساس این نتایج، گیاهان بلک‌بری، بلوبری و رازبری به عنوان میزبان‌های جدید برای این گونه مرکب در ایران معرفی می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی میوه، کپک خاکستری، شناسایی، قارچهای میتوسپوریک، فیلوژنی

*بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسندگان اول و دوم ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه گیلان.

**مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: blumeria2015@gmail.com; khodaparast@guilan.ac.ir

^۱گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران



DOI: 10.22034/ijpp.2024.2021808.458

Research Article

Association of *Botrytis cinerea* species complex with small-seeded plants of blackberry, blueberry, raspberry, and kiwifruit in Guilan Province, Iran

Fatemeh Ghahremani^{1*}, Mehrnaz Nik¹, Mohammad Javad Pourmoghaddam², Sedigheh Mousanejad³, Mahmood Ghasemnezhad⁴ and Seyed Akbar Khodaparast^{5**}

(Received: 04.09.2024; Accepted: 05.11.2024)

Abstract

Botrytis cinerea Pers. is one of the most important pathogens of stored fruits, vegetables, ornamental and greenhouse plants. This species can grow in various temperatures, from cool temperate to subtropical regions. In this study, blackberry (*Rubus fruticosus* L.), blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.), and raspberry (*Rubus idaeus* L.) with the symptoms of leaf spot and stem from different orchards, as well as stored kiwi fruits (*Actinidia chinensis* Planch.) with the symptoms of fruit rot from cold stores in Guilan province were investigated. A total of 25 isolates with characteristics of the genus *Botrytis* spp. were obtained from blackberry (one isolate), raspberry (four isolates), blueberry (10 isolates), and kiwi fruits (10 isolates). Based on the combination of morphological characteristics and molecular data based on the partial sequence of *G3PDH* gene, all isolates were identified as *Botrytis cinerea* species complex. Based on these results, blackberry, blueberry, and raspberry plants are introduced as new hosts for this species complex in Iran.

Keywords: fruit rot, gray mold, identification, mitosporic fungi, phylogeny

* A part of the MSc. thesis of the first and second author submitted to the Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

**Corresponding author's E-mail address: khodaparast@guilan.ac.ir; blumeria2015@gmail.com

¹ MSc. student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

² PostDoc Researcher, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

³ Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

⁴ Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

⁵ Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran

مقدمه

شده‌اند که به نظر می‌رسد تمام آنها بیمارگر نیمه‌زیوپارور باشند به‌جز گونه *B. pyriformis* که پوده‌زی (سپروفیت) است (Hyde et al. 2014, Zhou et al. 2014, Zhang et al. 2020, Richards et al. 2016). رده‌بندی سنتی گونه‌های جنس *Botrytis* اغلب بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی از قبیل ظاهر پرگنه، ابعاد و رنگ اسکروت‌ها، الگوی تشکیل و پراکنش اسکروت‌ها روی محیط کشت، قطر میسلیم‌ها، ابعاد کنیدیوفورها و شکل و اندازه کنیدیوم‌ها و تا حدودی بر اساس وابستگی میزبانی استوار بوده است. با وجود این، هر چند این ویژگی‌ها برای تمایز برخی از گونه‌ها کمک‌کننده است، اما اغلب گونه‌ها از نظر این ویژگی‌ها شبیه به هم بوده و غیرقابل تمایز هستند (Beever & Weeds 2007, Mirzaei et al. 2007, Aktaruzzaman et al. 2017, Notte et al. 2021, Orozco-Mosqueda et al. 2023). در حال حاضر کلید شناسایی جامع برای تشخیص همه گونه‌های این جنس وجود ندارد. از اینرو در سالهای اخیر توالی‌یابی برخی از ژن‌ها برای رده‌بندی این قارچ مورد استفاده قرار گرفته است (Staats et al. 2005, Li et al. 2012, Zhou et al. 2014, Dumin et al. 2020, Nabizadeh et al. 2021, Orozco-Mosqueda et al. 2023). اولین طبقه‌بندی جامع گونه‌های *Botrytis* توسط استاتس و همکاران (Staats et al. 2005) در سال ۲۰۰۵ با استفاده از توالی‌های سه ناحیه ژنی گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (*G3PDH*)، پروتئین گرما شوک ۶۰ (*HSP60*) و زیرواحد دوم آر آن آ پلی مرز (*RPB2*) انجام گرفت. در مطالعات بعدی استفاده از نواحی ژنی *NEP1* و *NEP2* پیشنهاد گردید (Staats et al. 2007, Hyde et al. 2014, Dumin et al. 2020). بر اساس طبقه‌بندی مولکولی، گونه‌های *Botrytis* در دو دودمان فیلوژنتیکی دسته‌بندی می‌شوند. دودمان نخست شامل گونه‌هایی با دامنه میزبانی وسیع که عمدتاً گیاهان دولپه‌ای را آلوده می‌کنند. شامل گونه‌های *B. cinerea*،

قارچ *Botrytis cinerea* Pers. متعلق به تیره *Sclerotiniaceae* و راسته *Helotiales* است که به عنوان یک قارچ نیمه‌زیوپارور (Hemibiotroph)، هوازاد، با دامنه میزبانی وسیع در سراسر جهان و به عنوان عامل ایجاد کننده بیماری پوسیدگی یا کپک خاکستری شناخته می‌شود (Williamson et al. 2007, Orozco-Mosqueda et al. 2023). همچنین این گونه از مهم‌ترین بیمارگرهای غده‌ها، میوه‌ها، برگ‌ها و گل‌ها در گیاهان زینتی، سبزی و صیفی و دیگر محصولات مهم کشاورزی و از مهم‌ترین عوامل پوسیدگی‌های پس از برداشت محصولات مختلف می‌باشد (Elad et al. 2016, Orozco-Mosqueda et al. 2023). جنس *Botrytis* باعث از بین رفتن بافت زنده گیاهی می‌شود و حتی پس از تخریب و مرگ بافت گیاهی می‌تواند به رشد خود ادامه دهد و به‌صورت میسلیم یا کنیدیوم برای مدت‌های طولانی زنده مانده و منبع آلودگی‌های بعدی گردد (Fekrikohan et al. 2021, 2022). به دلیل اهمیت خسارت‌زایی، گونه *B. cinerea* به عنوان یکی از ده بیمارگر مهم گیاهان از دیدگاه اثرات اقتصادی گسترده و تاثیرات علمی طبقه‌بندی شده است (Dean et al. 2012). این قارچ دارای دامنه میزبانی وسیعی است که تا به امروز ۱۶۰۶ گونه گیاهی به عنوان میزبان این قارچ معرفی شده‌اند که از بین میزبان‌های مهم اقتصادی، می‌توان به گوجه‌فرنگی، توت‌فرنگی، گلابی، گیلاس، بادمجان، انگور و فلفل اشاره کرد (Abbey et al. 2019; Poveda et al. 2020, Singh et al. 2023). همچنین طبق برآوردها، کپک خاکستری به عنوان دومین عامل اصلی خسارت محصولات گیاهی شناخته می‌شود که سالانه در حدود ۱۰ تا ۱۰۰ میلیارد دلار در میوه‌ها و سبزیجات برداشت‌شده در سراسر جهان خسارت به بار می‌آورد (Hua et al. 2018, Bu et al. 2021). تاکنون بیش از ۳۰ گونه در *Botrytis* شناسایی

تهیه شد. در مورد نمونه‌های سردخانه‌ای، سبدهای محتوی میوه مورد بررسی قرار گرفتند و میوه‌های دارای علائم پوسیدگی جمع‌آوری شدند. تمام نمونه‌ها داخل کیسه‌های پلاستیکی و ظرف‌های درب‌دار قرار گرفتند و پس از زدن برچسب حاوی مشخصات شامل تاریخ نمونه‌برداری، محل نمونه‌برداری و نوع محصول به آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه گیلان منتقل شدند و تا زمان کشت، در یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

در مورد نمونه‌های تمشک، در ابتدا به منظور کاهش آلودگی سطحی، نمونه‌ها زیر آب جاری شیر شسته شدند. سپس با استفاده از اسکالپل سترون، از حد فاصل قسمت سالم و آلوده دمبرگ و ساقه، چند قطعه نیم سانتی‌متر مربعی جدا شد. نمونه‌ها در زیر هود در سه بازه زمانی متفاوت ۱/۵، ۲ و ۳ دقیقه به صورت جداگانه به وسیله هیپوکلریت سدیم نیم درصد ضدعفونی شده و در سه مرحله یک دقیقه‌ای با آب مقطر سترون شستشو شدند. سپس این قطعات بین کاغذ صافی استریل آبگیری شدند. تعداد سه تا چهار قطعه از نمونه‌ها در هر تشتک پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA، شرکت Ibresco) و آنتی‌بیوتیک‌های آموکسی‌سیلین و تتراسایکلین (۲۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. تشتک‌ها به مدت ۷ تا ۱۴ روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس با تناوب نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی قرار داده شدند. تشتک‌های پتری به طور منظم بازدید شدند و بخش کوچکی از پرگنه‌های رشد کرده با مشخصات جنس *Botrytis* با استفاده از سوزن سترون برداشته شده و به تشتک حاوی PDA جدید منتقل شدند.

در مورد کیوی، میوه‌های کیوی دارای نشانه‌های پوسیدگی توسط استریومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. از پرگنه‌های قارچی دارای مشخصات جنس *Botrytis* بر اساس رنگ پرگنه و اندام‌های باردهی غیرجنسی، مقدار کمی از اندام‌های باردهی شامل کنیدیوفور و کنیدیوم و ریشه‌های قارچ با استفاده از سوزن سترون

pseudocinerea A.S. Walker, A. Gautier, J. Confais, D. Martinho, M. Viaud, P. Lepêcheur, J. Dupont, E. Fournier و گونه‌هایی با دامنه میزبانی اختصاصی شامل گونه‌های *B. calthae* Hennebert, *B. fabae* Sardiña و *B. sinoviticola* J. Zhang, Y.J. Zhou and G.Q. Li و *B. eucalypti* Q.L. Liu and S.F. Chen گونه *B. pelargonii* Røed از نظر ژنتیکی بسیار نزدیک و غیرقابل تمایز از *B. cinerea* می‌باشد. دودمان دوم که از لحاظ فیلوژنتیکی متنوع‌تر و شامل میزبان‌های تک‌لپه‌ای اختصاصی و دو لپه‌ای اختصاصی با دامنه میزبانی محدود می‌باشند (Staats et al. 2005, 2007, Hyde et al. 2014, Liu et al. 2016). با ابداع روش‌های مولکولی و استفاده از توالی‌یابی ژنومی، مشکلات مربوط به طبقه‌بندی سنتی در قارچ‌ها تا حد زیادی برطرف شده‌اند. با توجه به اهمیت گونه‌های *Botrytis* در ایجاد پوسیدگی اندام‌های گیاهی و بنابر مشاهداتی از وقوع این بیماری روی چند میوه دانه ریز و کیوی، در این مطالعه اقدام به جمع‌آوری و شناسایی این قارچ از روی این میزبانها بر اساس ریخت‌شناسی و توالی بخشی از ژن *G3PDH* در استان گیلان شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری و جداسازی قارچ

نمونه‌برداری به صورت تصادفی از باغ‌های زیر کشت انواع تمشک شامل بلک‌بری (*Rubus fruticosus* L.)، رازبری (*Rubus idaeus* L.) و بلوبری (*Vaccinium corymbosum* L.) و نیز از سردخانه‌های نگهداری کیوی (*Actinidia chinensis* Planch.) موجود در استان گیلان طی تابستان و پاییز سال‌های ۱۴۰۱-۱۳۹۹ انجام گرفت. نمونه‌ها از مزارع تمشک و بلوبری از بوته‌هایی با علائم خشکیدگی بوته، لکه‌برگی دمبرگ و بافت مردگی ساقه

شکل، ابعاد و الگوی تشکیل اسکروت‌ها توسط استریومیکروسکوپ مدل ZSM 1001 ساخت شرکت صایران بررسی و ثبت گردید. پس از تهیه اسلایدهای مناسب از ساختارهای باردهی هر یک از جدایه‌ها (با محلول اسید لاکتیک ۵۰ درصد)، آنها توسط میکروسکوپ نوری Olympus BH2 بررسی شدند و ابعاد ۵۰ کنیدیوم و ۱۰ کنیدیوفور اندازه‌گیری شد. عکس‌های میکروسکوپی به وسیله میکروسکوپ نوری Leica مجهز به دوربین دیجیتالی Canon با بزرگ‌نمایی‌های 40X و 100X تهیه شد. ویژگی‌های ثبت شده با منابع موجود مورد مقایسه قرار گرفتند (Chilvers & du Toilet 2006, Mirzaei et al. 2007, Aktaruzzaman et al. 2017, Fekrikohan et al. 2022).

مطالعات مولکولی

استخراج DNA و تکثیر ناحیه ژنومی مورد نظر

با بررسی منابع مختلف (Staats et al. 2005, Liu et al. 2021, Prasannath et al. 2021, He et al. 2016) معلوم شد توالی بخشی از ژن گلیسرآلدهید-۳-فسفات دهیدروژناز (*G3PDH*) یکی از خط شناسه‌های مولکولی مناسب برای تشخیص گونه‌های این جنس است. لذا برای کمک به تشخیص ریخت‌شناختی، این ژن به کمک جفت آغازگرهای *G3PDHfor* (ATTGACATCGTCTGTCAACGA) و *G3PDHrev* (آغازگر معکوس) (ACCCCACTCGTTGTCGTACCA) (آغازگر معکوس) تکثیر و توالی‌یابی شد (Staats et al. 2005). به این منظور از روش ترمولایزیز (Zhang et al. 2010) برای استخراج DNA استفاده شد. ابتدا پرگنه‌های قارچ در تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۳-۴ روز نگهداری شدند. مقدار کمی از میسلیم از سطح محیط کشت جمع‌آوری شد و به ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه سترون در یک لوله میکروساترفیوژ ۱/۵ میکرولیتری اضافه شد. سپس با سرعت ۱۳۰۰۰ (جی) به مدت یک دقیقه

برداشته شده و مستقیماً در محیط کشت PDA کشت گردید (Azevedo et al. 2020). تشتک‌های پتری به مدت ۱۰-۷ روز داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند. خاص‌سازی کلیه جدایه بر اساس روش نوک ریشه یا تک اسپور انجام گرفت.

برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌ها از روش کاغذ صافی سترون استفاده شد. بدین صورت که پس از خالص‌سازی جدایه‌ها، در شرایط سترون و زیر هود، هر جدایه روی محیط کشت PDA که از قبل قطعات ریز شده کاغذ صافی سترون روی آن قرار گرفته بودند، کشت شدند و داخل انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۲ ساعت نگهداری شدند. پس از رشد پرگنه قارچ و گسترش رشد آن روی قطعات کاغذ صافی، قطعات کاغذ صافی محتوی پرگنه قارچ با استفاده از پنس سترون از محیط PDA جدا و داخل تشتک سترون قرار داده شد. تشتک‌ها در محیط عاری از آلودگی به مدت دو تا چهار روز نگهداری شدند تا رطوبت کاغذ محتوی پرگنه گرفته و کاغذهای صافی خشک شوند. سپس با استفاده از پنس سترون کاغذهای صافی داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ سترون گذاشته شدند و در نهایت در داخل فریزر با دمای ۲۰- درجه سلسیوس در آزمایشگاه قارچ‌شناسی دانشگاه گیلان قرار داده شدند. همچنین جدایه‌های منتخب در کلکسیون قارچ‌های موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور (تهران) (IRAN) برای نگهداری ارسال شدند.

شناسایی ریخت‌شناسی

بدین منظور ویژگی‌های ریخت‌شناسی مهم در تعیین گونه مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار، حلقه‌های پنج میلی‌متری از کشت در حال رشد فعال جدایه‌ها برداشته شد و در تشتک پتری نه سانتی متری حاوی PDA کشت شدند. تشتک‌های پتری در شرایط با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند. ویژگی‌های ماکروسکوپی پرگنه مانند رنگ، سرعت رشد پرگنه، رنگ،

میکرولیتر، حاوی ۱۵ میکرولیتر مسترمیکس (Ampliqon (company, Denmark)، آغازگر مستقیم (غلظت ۱۰ پیکومول) ۱/۲ میکرولیتر، آغازگر معکوس (غلظت ۱۰ پیکومول) ۱/۲ میکرولیتر، ۲/۴ میکرولیتر محلول DNA و ۱۰/۲ میکرولیتر آب تهیه شد. واکنش PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل (MG32-0801-014, Bioneer) و با اعمال برنامه دمایی شامل واسرشت سازی اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس (۵ دقیقه)، واسرشت سازی در ۹۴ درجه (۳۰ ثانیه)، اتصال آغازگرها در ۶۴ درجه (۳۰ ثانیه)، بسط آغازگرها در ۷۲ درجه (۹۰ ثانیه) و بسط نهایی در ۷۲ درجه (۱۰ دقیقه) انجام گردید. به منظور ارزیابی نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، الکتروفورز افقی در ژل آگارز با غلظت ۱/۲ درصد انجام شد. بعد از مشاهده نوار DNA در محدوده مورد نظر (حدود ۹۰۰ bp)، ۲۰ میکرولیتر از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به منظور توالی‌یابی به شرکت توپاز ژن کاوش ارسال گردید.

سانتریفیوژ شد. با استفاده از سمپلر، آب داخل لوله جمع‌آوری شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محلول لایزیز به لوله میکروسانتریفیوژ حاوی میسلیم قلی اضافه شد. سرانجام مخلوط به مدت ۲۰-۳۰ دقیقه در یک حمام آبی در دمای ۸۵ درجه سلسیوس نگهداری گردید. در این شرایط DNA از سلولهای قارچی خارج و در محلول معلق خواهد شد. لذا از همین محلول به طور مستقیم برای پی سی آر استفاده شد. در صورت نیاز لوله حاوی DNA ژنومی تا زمان استفاده های بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. مواد مخلوط لایزیز شامل ۵۰ میلی‌مول بر لیتر سدیم فسفات با pH برابر با ۷/۴، ۱ میلی‌مول بر لیتر اتیلن‌دی‌آمین تتراستیک اسید (EDTA) و ۵٪ گلیسرول بود. قبل از استفاده، محلول لایزیز به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شد و سپس در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Zhang et al. 2010). مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز در حجم ۳۰

جدول ۱. جزئیات توالی‌ها و جدایه‌های استفاده شده در تجزیه و تحلیل تبارشناختی. جدایه‌های توالی‌یابی شده در این مطالعه به صورت حروف سیاه مشخص شده است. نمونه های تیب با حرف T نشان داده شده اند

Table 1. Details of isolates and sequences used in the phylogenetic analyses. Isolates in bold were isolated/sequenced in the present study. All the type materials are marked with T

| Species | Isolate/strain number | Host | GenBank accession number (<i>G3PDH</i>) | Reference |
|---------------------------------|--------------------------|------------------------------------|---|------------------------|
| <i>Botrytis californica</i> | X655 ^T | <i>Vitis vinifera</i> | KJ937069 | Saito et al. 2016 |
| <i>Botrytis calthae</i> | CBS 175.63 | <i>Caltha</i> sp. | AJ704999 | Staats et al. 2005 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | SAS405 | <i>Vitis vinifera</i> | AJ705005 | Staats et al. 2005 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | B05.10 | <i>Vitis vinifera</i> | AJ705002 | Staats et al. 2005 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | IRAN 4283C | <i>Fragaria ananassa</i> | MW465780 | Nabizadeh et al. 2021 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | K7 | <i>Vitis vinifera</i> | MW465777 | Nabizadeh et al. 2021 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | DD4 | <i>Pelargonium hirsutum</i> | MW465781 | Nabizadeh et al. 2021 |
| <i>Botrytis cinerea</i> | IRAN 4970C | <i>Vaccinium corymbosum</i> | PQ672165 | This study |
| <i>Botrytis cinerea</i> | IRAN 4971C | <i>Rubus idaeus</i> | PQ672166 | This study |
| <i>Botrytis cinerea</i> | F28 | <i>Rubus idaeus</i> | PQ672169 | This study |
| <i>Botrytis cinerea</i> | IRAN 4977C | <i>Actinidia chinensis</i> | PQ672167 | This study |
| <i>Botrytis cinerea</i> | IRAN 4978C | <i>Actinidia chinensis</i> | PQ672168 | This study |
| <i>Botrytis eucalypti</i> | CERC 7170 ^T | <i>Eucalyptus</i> sp. | KX301020 | Liu et al. 2016 |
| <i>Botrytis fabae</i> | MUCL 98 ^T | <i>Faba</i> sp. | AJ705014 | Staats et al. 2005 |
| <i>Botrytis macadamiae</i> | BRIP 72259a ^T | <i>Macadamia integrifolia</i> | MZ344226 | Prasannath et al. 2021 |
| <i>Botrytis medusae</i> | B-555 ^T | <i>Vitis vinifera</i> | MH732861 | Harper et al. 2019 |
| <i>Botrytis pelargonii</i> | CBS 497.50 ^T | <i>Pelargonium</i> sp. | AJ704990 | Staats et al. 2005 |
| <i>Botrytis polygoni</i> | Poly-3 ^T | <i>Fallopia convolvulus</i> | MG846498 | He et al. 2021 |
| <i>Botrytis polyphyllae</i> | YN1 | <i>Paris polyphyllae</i> | MG387957 | Zhong et al. 2019 |
| <i>Botrytis pseudocinerea</i> | VD110 ^T | <i>Vitis vinifera</i> | KR030052 | Zhou et al. 2014 |
| <i>Botrytis pyriformis</i> | SedsarBC-1 ^T | <i>Sedum sarmentosum</i> | KJ543484 | Zhang et al. 2016 |
| <i>Botrytis sinoviticola</i> | GBC-3-2b ^T | <i>Vitis vinifera</i> | JN692411 | Zhou et al. 2014 |
| <i>Monilinia fructigena</i> | 9201 | unknown | AJ705043 | Staats et al. 2005 |
| <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | 484 | unknown | AJ705044 | Staats et al. 2005 |

واکاوی فیلوژنتیکی

داده‌های خام توالی‌های نوکلئوتیدی با استفاده از نرم افزار 7 MEGA v. (Kumar et al. 2016) بررسی و ویرایش شدند. توالی نوکلئوتیدی حاصل با توالی‌های معتبر موجود در پایگاه داده‌های ژن NCBI (جدول ۱) با استفاده از ابزار جستجوی BLASTn مقایسه شدند و توالی جدایه‌های تیپ (در صورت وجود) و نیز توالی‌های معتبر گونه‌های این جنس از پایگاه داده‌های NCBI دریافت و به همراه توالی‌های بدست آمده در این تحقیق، برای رجبندی و واکاوی فیلوژنتیک استفاده شدند. رجبندی توالی‌ها با استفاده از نرم افزار آنلاین 7 MAFFT v. (Katoh et al. 2019) (<https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>) انجام گردید. همچنین ویرایش نهایی در نرم افزار 7 MEGA v. برای بهبود رجبندی توالی‌ها انجام شد. رسم تبارنما بر مبنای استنتاج حداکثر احتمال (Maximum Likelihood) با استفاده از نرم افزار RAXML (Stamatakis 2006) در برنامه 1.3 raxmlGUI (Silvestro & Michalak 2012) قابل اجرا هستند، انجام شد. در این واکاوی فیلوژنتیک از معیارهای ML + rapid bootstrap، مدل با جایگزینی GTRGAMMA و آزمون اعتبار سنجی (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار استفاده شد.

نتایج و بحث

در این مطالعه ۲۵ جدایه از جنس *Botrytis* از بلک‌بری (*Rubus fruticosus*)، رازببری (*Rubus idaeus*)، بلوبری (*Vaccinium corymbosum*) و کیوی (*Actinidia chinensis*) از مناطق مختلف استان گیلان جداسازی شد. از میان این جدایه‌ها، پنج جدایه که دارای بیشترین تنوع و تفاوت ریخت‌شناسی از لحاظ ویژگی‌های ظاهری کلنی و همچنین اندازه کنیدیوفور، کنیدیوم و اسکلرت بودند، برای توالی‌یابی ژن *G3PDH* انتخاب شدند. بعد از ویرایش

توالی‌ها و جستجو در بانک ژن، رجبندی توالی‌های معتبر به همراه جدایه‌های مطالعه شده در این تحقیق انجام شد. نتایج نشان داد که توالی جدایه‌های مورد مطالعه (توالی جدایه‌های IRAN 4971C, IRAN 4970C, IRAN 4978C, 4977C و F28، به طول ۸۶۹ جفت باز) از ژن *G3PDH* با توالی نمونه‌های معتبر (نمونه‌های تیپ یا مطالعات معتبر) موجود در بانک ژن از گونه مرکب *Botrytis cinerea* همپوشانی تقریباً کامل دارد. توالی یک جدایه (IRAN 4971C) نسبت به سایر جدایه‌های این گونه مرکب دارای تنها تفاوت در یک باز در شماره ۱۸۱ رجبندی بود (شکل ۲). همچنین تبارنمای گونه‌های جنس *Botrytis* با استفاده از روش حداکثر احتمال (ML) بر مبنای توالی ژن *G3PDH* نشان داد که کلیه جدایه‌های این مطالعه در یک گروه و در کنار توالی‌های معتبری از *B. cinerea*، *B. eucalypti*، *B. macadamiae* Prasannath, Akinsanmi and R.G. و *B. pelargonii* Shivas با حمایت ۸۳ درصد قرار گرفتند (شکل ۳).

گونه مرکب *B. cinerea* شامل چهار گونه *B. cinerea*، *B. eucalypti*، *B. macadamiae* و *B. pelargonii* می‌باشد. دو گونه *B. eucalypti* و *B. macadamiae* در سالهای اخیر به ترتیب از روی *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis* و *Macadamia integrifolia* معرفی شده‌اند (Prasannath et al. 2021, Liu et al. 2016). مقایسه ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی گونه‌هایی که از این مجموعه گونه‌ای به عنوان گونه جدید معرفی شده‌اند و از گونه *B. cinerea* جدا شده‌اند، نشان می‌دهد که این گونه‌ها دارای همپوشانی کامل در ویژگی‌های ریخت‌شناسی از جمله اندازه کنیدیوم، کنیدیوفور و اندازه اسکلروت با گونه *B. cinerea* می‌باشند. تفاوت اندکی که محققان فوق (Prasannath et al. 2021, Liu et al. 2016) در اندازه کنیدیومها و سرعت رشد کلنی اعلام کرده‌اند قابل

به شدت مورد سوال قرار گرفته است (Pereira et al. 2023, Dissanayake1 et al. 2024). در این دو مطالعه تعداد زیادی از گونه های *Diaporthe* به ویژه آنهایی که در سالهای اخیر در مقالات متعدد گزارش شده‌اند، مورد بازبینی قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال تعداد زیادی از آرایه‌های گونه مرکب *D. arecae* (بیش از ۵۰ گونه) که اغلب آنها بر اساس مطالعات مولکولی در سالهای اخیر معرفی شده‌اند و در این گونه مرکب قرار می‌گیرند با این گونه مترادف شده‌اند (Pereira et al. 2023). به نظر می‌رسد آنچه که این محققان اظهار داشته‌اند از پشتوانه علمی بیشتر برخوردار است به ویژه اینکه از ابزارهای قدرتمندتری مثل مفهوم تشخیص گونه فیلوژنتیک بر اساس تطابق نسب‌شناسی (Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition) برای تعریف حد و مرز گونه استفاده کرده‌اند. از اینرو به نظر می‌رسد گونه‌هایی که در مطالعات اخیر از *B. cinerea* جدا شده‌اند نیاز به بازنگری مجدد دارند و لذا با توجه به این موارد ما جدایه‌های به دست آمده در این مطالعه را متعلق به این گونه مرکب می‌دانیم و کماکان در گونه *B. cinerea* قرار داده و در اینجا با این نام معرفی و شرح می‌دهیم.

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

پرگنه در ابتدا مسطح و به رنگ سفید، به مرور کرم رنگ، پس از مدتی به رنگ زیتونی-خاکستری، قهوه‌ای-خاکستری و یا قهوه‌ای روشن تغییر رنگ می‌دهد. طی ۳ تا ۵ روز رشد پرگنه به ۹۰ میلی‌متر در تشتک حاوی محیط کشت PDA می‌رسد. تولید اندام‌های اسپورزایی حدوداً از روز چهارم شروع می‌شود. اغلب جدایه‌ها تولید اسکروت می‌کنند، اسکروت‌ها منفرد یا مجتمع، سیاه، گرد، بیضوی تا بدون شکل مشخص و به ابعاد ۰/۳۸-۵/۴ × ۰/۶-۶۷/۳ میلی‌متر (میانگین = ۲/۱ × ۲/۸ میلی‌متر) هستند. کنیدیوفورها بلند، با سطح صاف، در پایه

چشم‌پوشی است و به نظر نمی‌رسد برای تفکیک این گونه‌ها مفید باشد. همچنین مقایسه توالی دو ژن *HSP60* و *RPB2* که به همراه ژن *G3PDH* در آنالیزهای چندژنی این جنس مورد استفاده قرار می‌گیرد، نشان می‌دهد که گونه‌های این گونه مرکب دارای تنها تفاوت در دو جایگاه نوکلئوتیدی ۵۵ و ۱۸۵ در رجبندی ناحیه ژنی *HSP60* (شامل ۹۷۶ جفت باز) می‌باشند. لازم به ذکر است که یکی از این تفاوت‌ها بین گونه *B. cinerea* با شماره MUCL70 و P7 و گونه‌های (*B. macadamiae*, *B. eucalypti*) و *B. pelargonii* مشترک است. همچنین در ژن *RPB2* حداکثر تفاوت در ۷ جایگاه بازی بین کلیه گونه‌های این گونه مرکب مشاهده شده است. واکاوی‌های فیلوژنتیک که توسط این محققان ارائه شده است کاملاً موید این نکته هست که این گونه‌ها به شدت به هم نزدیک بوده و از نظر مولکولی فاقد حمایت‌های قوی هستند. به عنوان مثال در شکل ۹ ارائه شده در مقاله لیو و همکاران (Liu et al. 2016) که بر اساس پنج ژن (*NEP1*, *HSP60*, *G3PDH*, *NEP2* و *RPB2*) انجام شده است سه گونه *B. cinerea*, *B. eucalypti* و *B. pelargonii* کاملاً در یک گروه با حمایت بالا قرار گرفته‌اند. به ویژه رابطه دو گونه *B. cinerea* و *B. pelargonii* بسیار بغرنج است. گونه *B. macadamiae* نیز به تازگی بر اساس واکاوی فیلوژنتیک سه ژن (*HSP60*, *G3PDH* و *RPB2*) معرفی شده است (Prasannath et al. 2021). در شکل ۲ مقاله پریسانانت و همکاران (۲۰۲۱) سه گونه *B. eucalypti*, *B. macadamiae* و *B. pelargonii* همراه با *B. cinerea* در یک گروه بسیار همگن قرار گرفته‌اند. در این شکل اگرچه *B. macadamiae* در یک زیرگروه با فاصله ژنتیکی بسیار اندک قرار گرفته است اما رابطه سه گونه *B. cinerea*, *B. eucalypti* و *B. pelargonii* بغرنج‌تر است و کاملاً غیرقابل تفکیک هستند. معرفی گونه‌های قارچی بر اساس چنین واکاوی‌های فیلوژنتیک ضعیف اخیراً

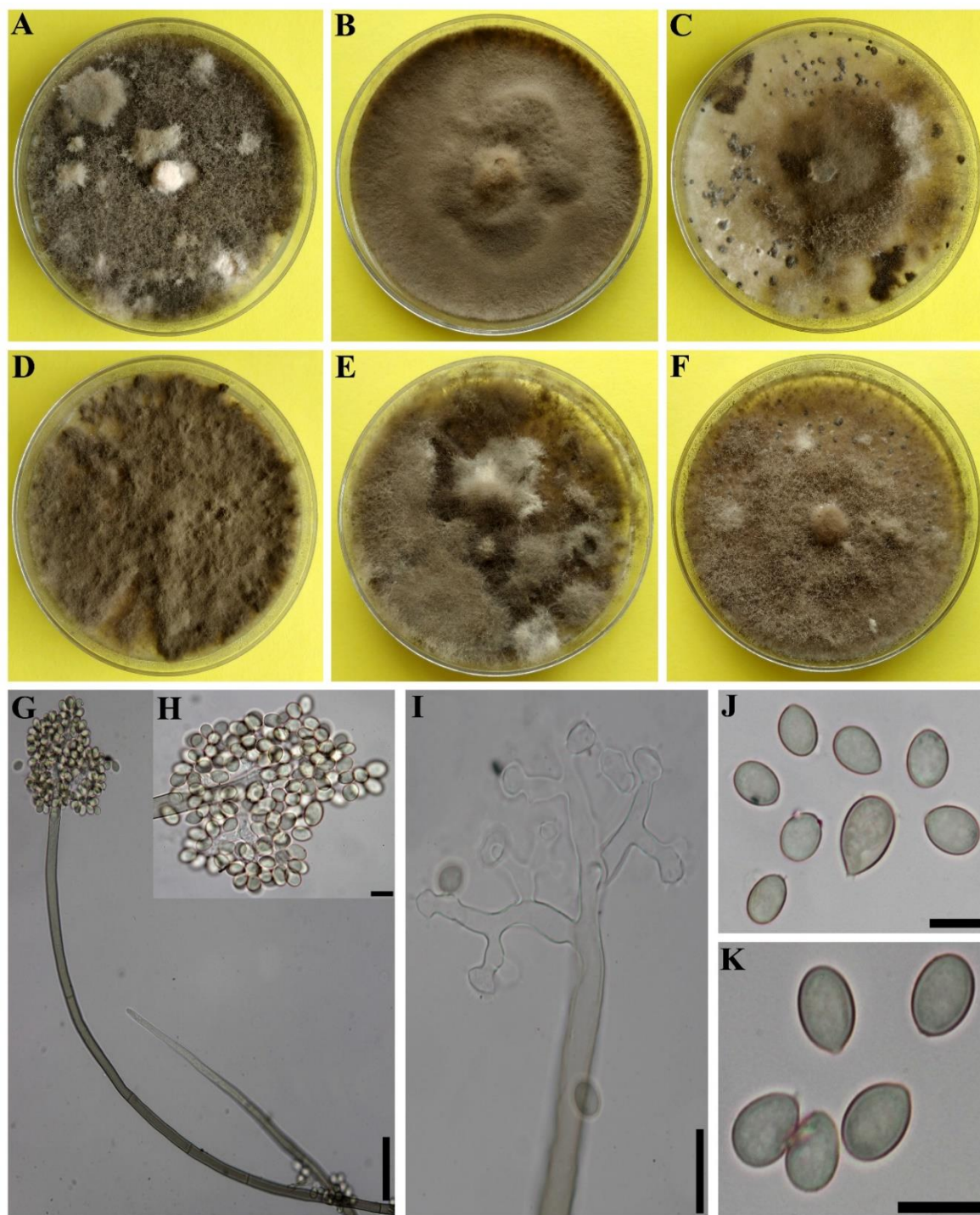
سیب، سیب‌زمینی، شمعدانی، کاج، کلزا، کلم وحشی، کیوی، گل آفتابگردان، گل صد تومانی، گل محمدی، گلابی، گلابول، گوجه‌فرنگی، گندم، لوبیا، لیمو ترش، لیمو شیرین، میخک، نارنج، و نخود در ایران جداسازی و شناسایی شده است (Mirzaee et al. 2007, Mirtalebi et al. 2017, Ershad 2022). گونه *B. cinerea* یکی از مهمترین بیماری‌های پس از برداشت محصولات مختلف از جمله رز، انگور، توت‌فرنگی، گوجه‌فرنگی، کیوی و گلابی در ایران است، اگر چه آمار دقیقی از میزان خسارت این بیمارگر وجود ندارد (Naeimi & Zaer. 2014, Mirtalebi et al. 2017).

در این مطالعه *B. cinerea* از روی سه میزبان جدید بلک‌بری، بلوبری و رازبری از ایران جمع‌آوری و تشخیص داده شد. اگرچه پیش از این میوه کیوی به عنوان میزبان این قارچ از ایران گزارش شده بود (Taheri et al. 2008) اما جمع‌آوری‌های مجدد ما نشان داد که کم و بیش این قارچ در سردخانه‌ها می‌تواند سبب آسیب به میوه کیوی شود. اگرچه میوه کیوی در انبار با دمای 1 ± 0 (Schroder & Fletcher 1967) یا ۲-۳ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۵-۹۰ درصد قابل نگهداری بوده و بیش از مدت چهار ماه پایداری، ثبات و کیفیت خود را حفظ می‌کند و دمای مناسب رشد *B. cinerea* ۲۳ تا ۲۵ درجه سلسیوس است، اما در دمای ۲- درجه سلسیوس نیز رشد اندکی دارد لذا بیماری پوسیدگی میوه ناشی از این قارچ در مراحل مختلف انبارداری، انتقال، بازاریابی و مصرف می‌تواند به محصول خسارت وارد نماید (Mousakhah et al. 2009). امید است اطلاعاتی که از این مطالعه به دست آمده است و نیز اطلاعات بیشتری که در ارتباط با زیست‌شناسی، شرایط رشد و تنوع ژنتیکی این قارچ در آینده به دست می‌آیند برای مدیریت و کنترل این بیماری مفید باشند.

بدون انشعاب، قطورتر و تیره‌تر و در قسمت انتهایی منشعب و قهوه‌ای کم‌رنگ تا بی‌رنگ، به ابعاد $3/6-16/8 \times 192-1920$ میکرومتر (میانگین $10/2 \times 1056$ میکرومتر)، با وزیکل‌های متمایز در انتهای انشعابات و استریگماها که کنیدیوم‌ها روی آنها تشکیل می‌شوند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ تا قهوه‌ای روشن، تخم مرغی، گرد تا نسبتاً گرد و گاهی بیضی شکل، و به ابعاد $2/4-12 \times 3/6-24$ میکرومتر (میانگین $9/2 \times 6/4$ میکرومتر) هستند (شکل ۱).

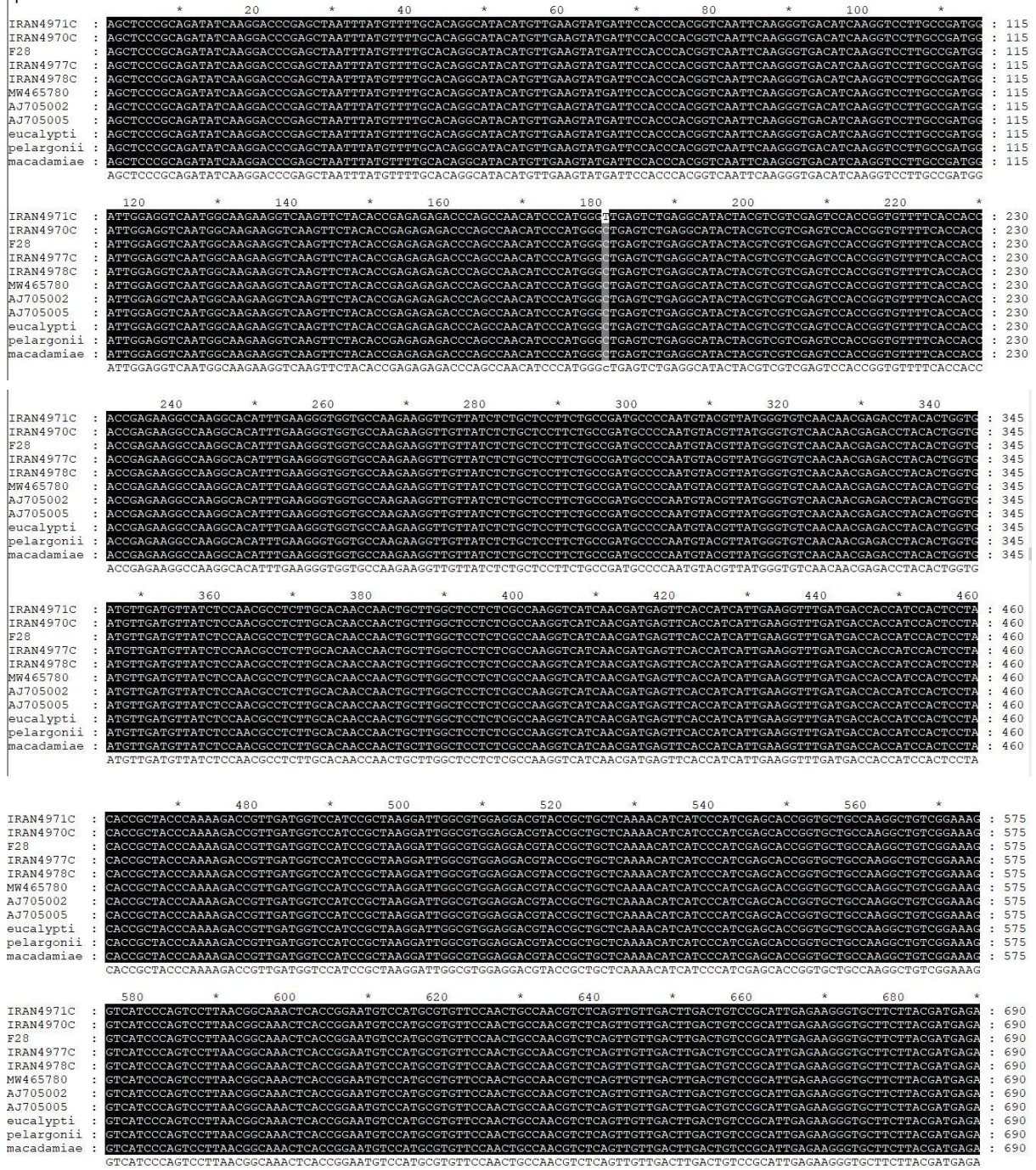
نمونه‌های بررسی‌شده: ایران، استان گیلان، شهرستان بندر انزلی، از روی دمبرگ *Vaccinium corymbosum*، آذر ماه ۱۴۰۱، جمع‌آوری‌کننده فاطمه قهرمانی (IRAN 4970C)؛ استان گیلان، شهرستان فومن، روستای لولمان، از روی دمبرگ *Rubus ideaus*، آبان ماه ۱۴۰۱، جمع‌آوری‌کننده فاطمه قهرمانی (IRAN 4971C)؛ استان گیلان، شهرستان فومن روستای لولمان، از روی دمبرگ *Rubus ideaus*، مرداد ماه ۱۴۰۱، جمع‌آوری‌کننده فاطمه قهرمانی (F28)؛ استان گیلان، شهرستان فومن روستای لولمان، از روی دمبرگ *Rubus fruticosus*، مرداد ماه ۱۴۰۱، جمع‌آوری‌کننده فاطمه قهرمانی؛ استان گیلان، شهرستان رودسر، روستای نوده، از روی میوه *Actinidia chinensis* اردیبهشت ماه ۱۳۹۹، جمع‌آوری‌کننده مهرناز نیک (IRAN 4977C)؛ استان گیلان، شهرستان رودسر، روستای نوده، از روی میوه *Actinidia chinensis*، خرداد ماه ۱۳۹۹، جمع‌آوری‌کننده مهرناز نیک (IRAN 4978C).

بر اساس اطلاعات و منابع موجود، در حال حاضر ده گونه از جنس *Botrytis* در ایران و از روی ۴۰ میزبان گیاهی گزارش شده‌اند (Nabizadeh et al. 2021, Ershad 2022). گونه *B. cinerea*، از دامنه وسیعی از گیاهان مانند رز، اسپرس، انگور، بگونیا، بادام‌زمینی، باقلا، به، پامچال، پیاز، توت‌فرنگی، خیار، خرزهره، رز، زیتون، سوسن، سویا،



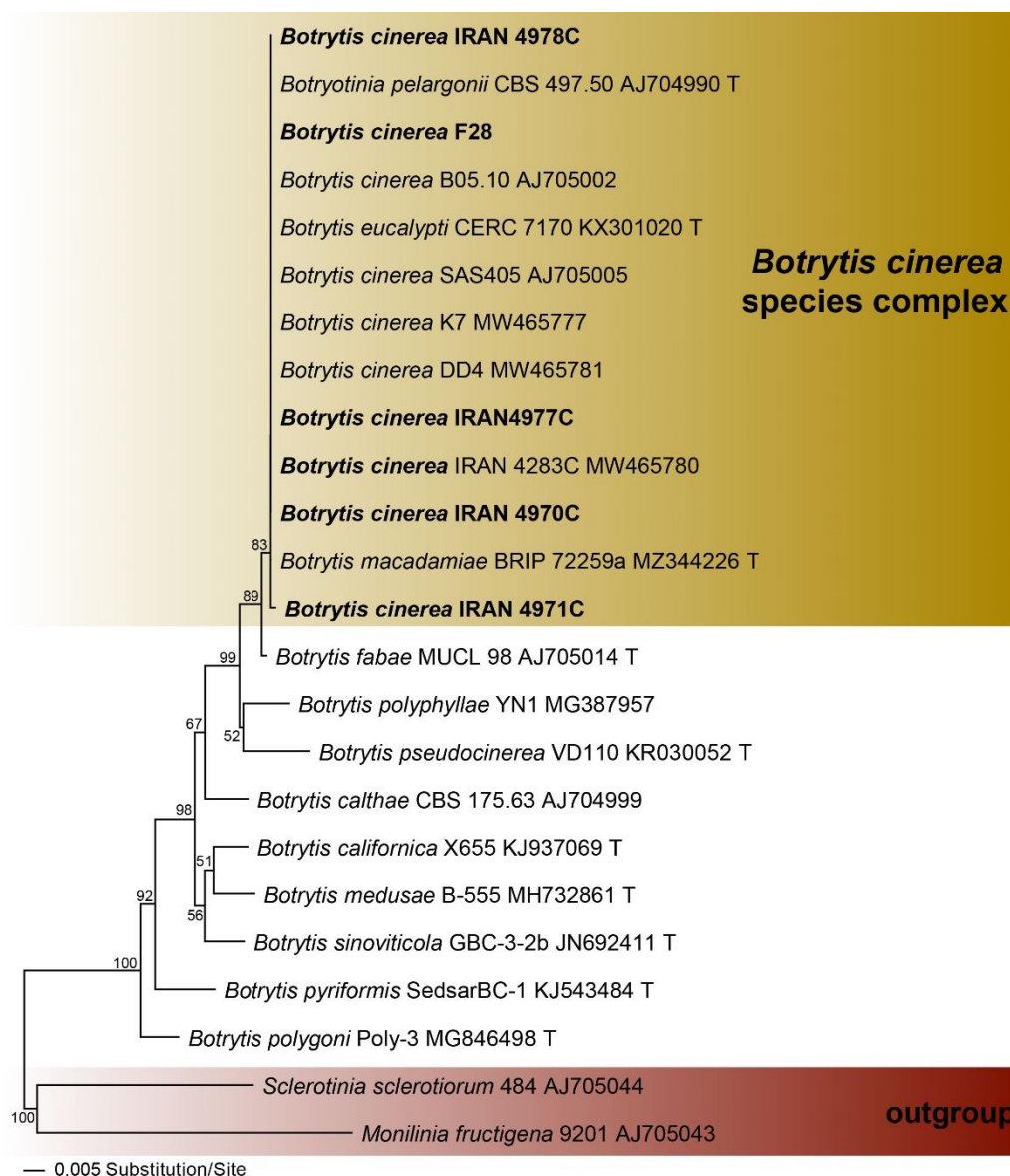
شکل ۱. گونه *Botrytis cinerea*: A-F) کولنی‌های جدا شده‌های مختلف در محیط کشت PDA پس از گذشت ۲۰ روز، G-I) کنیدیوفور، وزیکل‌ها، استریگماها و کنیدیوم‌ها، J-K) کنیدیوم‌ها. مقیاس برای G = ۵۰ میکرومتر، I = ۲۰ میکرومتر و H، J، K = ۱۰ میکرومتر.

Fig 1. *Botrytis cinerea*: A-F) Colonies of different isolates on PDA medium after 20 days, G-I) Conidiophore, vesicles, sterigma, and conidia, J-K) Conidia. Scale bar G= 50 μ m, I= 20 μ m, H, J-K= 10 μ m.



شکل ۲. رج‌بندی توالی بخشی از ژن *G3PDH* جدایه‌های منتخب از این مطالعه (IRAN 4971C, IRAN 4970C) به همراه توالی‌های معتبردریافت شده از بانک ژن (NCBI) مرتبط با گونه مرکب *Botrytis cinerea* (F28 و IRAN 4978C, 4977C)

Fig 2. Sequence alignment of selected isolates of *Botrytis cinerea* species complex from this study (IRAN 4970C, IRAN 4971C, IRAN 4977C, IRAN 4978C and F28) along with authentic sequences obtained from GenBank (NCBI)



شکل ۳. تبارنمای گونه‌های جنس *Botrytis* با استفاده از روش حداکثر احتمال (ML) بر مبنای بخشی از توالی ژن *G3PDH*. گونه‌های *Monilinia fructigena* و *Sclerotinia sclerotiorum* به عنوان آرایه‌های خارجی استفاده شده‌اند. جدایه‌های توالی‌یابی شده در این مطالعه با حروف پررنگ مشخص شده‌اند. اعداد در بالا یا پایین هر شاخه درصد اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهند و اعداد بالای ۵۰ درصد آورده شده‌اند.

Fig 3. Phylogenetic tree of *Botrytis* spp. using maximum likelihood (ML) method based on part of *G3PDH* gene sequences. *Monilinia fructigena* and *Sclerotinia sclerotiorum* were used as outgroup taxa. Strains sequenced in this study are in bold. ML bootstrap support values above 50% are given above or below the branches.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان به‌خاطر فراهم آوردن امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی و همچنین انجمن علمی قارچ‌شناسی ایران که مساعدتشان در روند پیشبرد کار مؤثر بوده است، تشکر و قدردانی می‌گردد.

مطالعه حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول و دوم ارائه شده به دانشگاه گیلان است که

References

منابع

- Abbey J.L., Percival D., Abbey L., Asiedu S.K., Prithiviraj B. and Schilder A. 2019. Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*) – prospects and challenges. *Biocontrol Science and Biotechnology* 3: 207–228. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1548574>
- Aktaruzzaman M.D., Afroz T., Hong S.J. and Kim B.S. 2017. Identification of *Botrytis cinerea* the cause of post-harvest gray mold on broccoli in Korea. *Research in Plant Disease* 23: 372–378. <https://doi.org/10.5423/RPD.2017.23.4.372>
- Azevedo D.M., Martins S.D., Guterres D.C., Martins M.D., Araújo L., Guimarães L.M. and Furtado G.Q. 2020. Diversity, prevalence and phylogenetic positioning of *Botrytis* species in Brazil. *Fungal Biology* 124: 940–957. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2020.08.002>
- Beever R.E. and Weeds P.L. 2007. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. pp. 29–52. In: Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen (Eds.). *Botrytis: biology, pathology and control*. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Bu S., Munir S., He P., Li Y., Wu Y., Li X., Kong B., He P. and He Y. 2021. *Bacillus subtilis* L1-21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control* 157: 104568. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104568>
- Chilvers M.I. and du Toit L.J. 2006. Detection and identification of *Botrytis* species associated with neck rot, scape blight, and umbel blight of onion. *Plant Health Progress* 7: 1. <https://doi.org/10.1094/PHP-2006-1127-01-DG>
- Dean R., Van Kan J.A.L., Pretorius Z.A., Hammond-Kosack K.E., Di Pietro A., Spanu P.D., Rudd J.J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. and Foster G.D. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dissanayake A.J., Zhu J.T., Chen Y.Y., Maharachchikumbura S.S., Hyde K.D. and Liu J.K. 2024. A re-evaluation of *Diaporthe*: refining the boundaries of species and species complexes. *Fungal Diversity* 126: 1–125. <https://doi.org/10.1007/s13225-024-00538-7>
- Dumin W., Seo Y.H., Park M.J., Park J.H. and Back C.G. 2020. First report of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of bush basil in Korea. *New Disease Reports* 41: 33. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2020.041.03>
- Elad Y., Vivier M. and Fillinger S. 2016. *Botrytis*, the Good, the Bad and the Ugly. pp. 1–15. In: S. Fillinger and Y. Elad (Eds.). *Botrytis—the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing Switzerland. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_1
- Ershad D. 2022. Fungi and fungal analogues of Iran. Ministry of Agriculture, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Iranian Research Institute of Plant Protection, Iran. 695 pp.
- Fekrikohan S., Sharifnabi B. and Javan-Nikkhah M. 2021. Genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates in different plant hosts and localities using ISSR molecular markers. *Mycologia Iranica* 8: 59–68. DOI:10.22043/MI.2022.357601.1209
- Fekrikohan S., Atashi Khalilabad A., Fotouhifar Kh. and Sharifnabi B. 2022. First report of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata* on *Pelargonium grandiflorum* in Iran. *Mycologia Iranica* 9: 105–115. Doi:10.22043/MI.2022.360139.1234
- 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. <https://doi.org/10.1111/ppa.13005>

- 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. <https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1809288>
- Hua L., Yong C., Zhanquan Z., Boqiang L., Guozheng Q. and Shiping T. 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety* 2(3): 111–119. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
- Hyde K.D., Nilsson R.H., Alias S.A., Ariyawansa H.A., Blair J.E., Cai L., de Cock A.W.A.M., Dissanayake A.J., Glockling S.L., Goonasekara I.D., Gorczyca M., Hahn M., Jayawardena R.S., van Kan J.A.L., Laurence M.H., Löve C.A., Li X., Liu J.K., Maharachchikumbura S.S.N., Manamgoda D.S., Martin F.N., McKenzie E.H.C., McTaggart A.R., Mortimer P.E., Nair P.V.R., Pawłowska J., Rintoul T.L., Shivas R.G., Spies C.F.J., Summerell B.A., Taylor P.W.J., Terhem R.B., Udayanga D., Vaghefi N., Walther G., Wilk M., Wrzosek M., Xu J.C., Yan J. and Zhou N. 2014. One stop shop: backbones trees for important phytopathogenic genera: I: *Botrytis*. 2014. *Fungal Diversity* 67: 21–125. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-014-0298-1>
- Katoh K., Rozewicki J. and Yamada K.D. 2019. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20(4): 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kumar S., Stecher G. and Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- 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. <https://doi.org/10.3852/11-218>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1229-1>
- Mirtalebi M. and Mostoefizade-Ghalamfarsa R. 2017. Integrated management of gray mold disease. *Plant Pathology Science* 6: 43–57. <http://dx.doi.org/10.29252/pp.s.6.2.43>
- Mirzaei S., Mohammadi Goltapeh E. and Shams-bakhsh M. 2007. Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 3: 65–76.
- Mousakhah M., Jamali A., Khodaparast S.A. and Olia M. 2009. Identification of important Kiwi pathogenic fungi in Guilan Province. Master thesis. University of Shahrekord.
- Nabizadeh H., Ahmadpour A. and Ghosta Y. 2021. Study on the diversity of *Botrytis* spp. isolated from different plants in West Azarbaijan Province and Sanadaj city (Kurdistan Province). *Iranian Journal of Plant Pathology* 57(3): 237–262. doi: 10.22034/ijpp.2022.546768.380
- Naeimi S. and Zare R. 2014. Evaluation of indigenous *Trichoderma* spp. isolates in biological control of *Botrytis cinerea*, the causal agent of strawberry gray mold disease. *Biocontrol in Plant Protection* 1: 55–74. Doi:10.22092/BCPP.2013100609
- Notte A.M., Plaza V., Marambio-Alvarado B., Olivaries-Urbina L., Problete-Morales M., Silva-Moreno M. and Castillo L. 2021. Molecular identification and characterization of *Botrytis cinerea* associated to the endemic flora of semi- desert climate in Chile. *Current Research in Microbial Sciences* 2: 100049. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100049>
- Orozco-Mosqueda M.D.C., Kumar A., Fadiji A.E., Babalola O.O., Puopolo G. and Santoyo G. 2023. Agroecological management of the grey mould fungus *Botrytis cinerea* by plant growth-promoting bacteria. *Plants* 12: 12030637. <https://doi.org/10.3390/plants12030637>
- Pereira D.S., Hil rio S., Gonçalves M.F. and Phillips A.J. 2023. *Diaporthe* species on palms: molecular re-assessment and species boundaries delimitation in the *D. arecae* species complex. *Microorganisms* 11: 2717. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11112717>
- Poveda J., Barquero M. and González-Andr s M. 2020. Insight into the microbiological control strategies against *Botrytis cinerea* using systemic plant resistance activation. *Agronomy* 10: 1822. <https://doi.org/10.3390/agronomy10111822>

- Prasannath K., Shivas R.G., Galea, V.J. and Akinsanmi O.A. 2021. Novel *Botrytis* and *Cladosporium* species associated with flower diseases of *Macadamia* in Australia. *Journal of Fungi* 7: 898. <https://doi.org/10.3390/jof7110898>
- Richards J., Xiao C.L. and Jurick W.M. 2020. *Botrytis* spp.: a contemporary perspective and synthesis of recent scientific developments of a widespread genus that threatens global food security. *Phytopathology*. 111: 432–436. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-20-0475-IA>
- 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. <https://doi.org/10.3852/15-165>
- Schroeder C.A. and Fletcher W.A. 1967. The Chinese gooseberry (*Actinidia chinensis*) in New Zealand. *Economic Botany* 21: 81–92.
- Silvestro D and Michalak I. 2012. raxmlGUI: A graphical front-end for RAxML. *Organisms, Diversity & Evolution* 12(4): 335–337. <https://doi.org/10.1007/s13127-011-0056-0>
- Singh R., Caseys C. and Kliebenstein D.J. 2023. Genetic and molecular landscapes of the generalist phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 25: e13404. <https://doi.org/10.1111/mpp.13404>
- 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. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi020>
- Staats M., van Baarlen P., Schouten A., van Kan J.A.L. and Bakker F.T. 2007. Positive selection in phytotoxic protein-encoding genes of *Botrytis* species. *Fungal Genetics and Biology* 44: 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.07.003>
- Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22(21): 2688–2690. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>
- Taheri H., Fifaii R. and Ershad J. 2008. Identification of fungus agents that cause kiwi fruit rots in cool storages. *Pajouhesh & Sazandegi* 81: 34–39.
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P. and Van Kan J.A.L. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Disease* 8: 561–580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Zhang Y.J., Zhang S., Liu X., Wen H.A. and Wang M. 2010. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains. *Letters in Applied Microbiology* 51(1): 114–118. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02867.x>
- 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. <https://doi.org/10.3852/15-340>
- 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. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1284-RE>
- 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. <https://doi.org/10.3852/13-032>