

## مقاومت برخی جدایه‌های *Botrytis cinerea* نسبت به قارچ‌کش‌های بنومیل، ایپرودیون و فن‌هگزامید در استان آذربایجان غربی

رحمان امینی<sup>۱</sup> و مسعود ابرین‌بنا<sup>۲\*</sup>

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه.

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

\* مسئول مکاتبه: [abrinbana@gmail.com](mailto:abrinbana@gmail.com)

تاریخ پذیرش: ۹۴/۱۱/۱۲

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱

### چکیده

بیماری کپک خاکستری که عامل آن قارچ *Botrytis cinerea* می‌باشد، از بیماری‌های مهم انگور در سراسر دنیا به شمار می‌رود. با اینکه این بیماری در سال‌های اخیر در استان آذربایجان غربی اهمیت یافته است و خسارت‌های قابل توجهی را به این محصول مهم وارد می‌کند، ولی تاکنون هیچ قارچ‌کشی برای کنترل آن ثبت نشده است. در این تحقیق حساسیت ۱۰۳ جدایه این قارچ که از تاکستان‌های مناطق مختلف استان جداسازی گردیده بود، نسبت به قارچ‌کش‌های بنومیل، ایپرودیون و فن‌هگزامید در شرایط درون‌شیشه‌ای و با استفاده از دز متمایز کننده قارچ‌کش‌ها، مورد بررسی گرفت. نتایج بررسی‌ها نشان داد که جدایه‌های مقاوم به بنومیل و ایپرودیون در سطح وسیعی در نواحی مورد مطالعه وجود دارند به طوری که بجز سلماس که جدایه‌های مقاوم به بنومیل وجود نداشت، جدایه‌های مقاوم به قارچ‌کش‌ها با درصد‌های متفاوت در سایر مناطق ردیابی شدند. جدایه‌های مقاوم به فن‌هگزامید با فراوانی کم در شش منطقه نمونه‌برداری شناسایی گردید. جدایه‌هایی با مقاومت چندگانه نسبت به دو قارچ‌کش نیز در در مناطق مورد بررسی پراکنده بودند. به نظر می‌رسد سمپاشی‌هایی که با بنومیل و ایپرودیون و یا با قارچ‌کش‌هایی با نحوه اثر مشابه و به منظور کنترل سایر بیماری‌ها در انگور انجام گرفته است، منجر به گزینش جدایه‌های مقاوم *B. cinerea* به عنوان بیمارگر غیرهدف و افزایش فراوانی آنها شده است. نتایج نشان داد که استفاده از بنومیل و ایپرودیون یا قارچ‌کش‌های با نحوه اثر مشابه در کنترل بیماری در اغلب مناطق استان غیرموثر و فن‌هگزامید در صورتی که به ثبت برسد و مورد استفاده قرار گیرد، موثر خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: انگور، کپک خاکستری، قارچ‌کش، مقاومت به قارچ‌کش، مقاومت چندگانه.

### مقدمه

سبز به منظور تهویه بهتر و کاهش رطوبت نسبی هوا به ویژه در اطراف خوشه‌ها و کنترل شیمیایی از جمله روش‌هایی هستند که برای کنترل *B. cinerea* در انگور توصیه شده است (پیرسون و گوهرین ۱۹۸۸، ویلیامسون و همکاران ۲۰۰۷). با توجه به اینکه روش‌های زراعی کنترل فقط موجب کاهش نسبی شدت بیماری می‌شوند و رقمی با مقاومت بالا نیز در انگور شناسایی و توصیه نشده است، سمپاشی با سموم قارچ‌کش مهم‌ترین و موثرترین روش کنترل کپک

قارچ *Botrytis cinerea* Pers. از خانواده Sclerotiniaceae و راسته Helotiales، عامل بیماری کپک خاکستری در بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی است که خسارت قابل توجهی را در مزارع و باغات و نیز پس از برداشت به محصولات مختلف از جمله انگور وارد می‌کند. استفاده از ارقام مقاوم، مصرف محتاطانه کود-های ازت‌دار، حذف برگ‌های اطراف خوشه‌ها و هرس

(برنت و هولومون ۲۰۰۷، کورولف و همکاران ۲۰۱۱، واکر و همکاران ۲۰۱۳).

با توجه به اینکه بیماری کپک خاکستری انگور در سال‌های اخیر در باغ‌های انگور استان آذربایجان غربی به صورت خیلی شدید شایع شده است و به عنوان یک مشکل جدی این محصول قبل از برداشت و به ویژه پس از برداشت و در طول انبارداری در سردخانه‌ها مطرح می‌باشد، کنترل آن با روش‌های موثر از جمله کنترل شیمیایی ضروری به نظر می‌رسد. با اینحال، تاکنون هیچ قارچ‌کشی برای کنترل این بیماری در تاکستان‌های ایران توصیه نشده است. چندین قارچ‌کش موثر بر علیه *B. cinerea*، برای کنترل سایر بیمارگرها در محصولات مختلف غیر از انگور در ایران به ثبت رسیده است ولی توصیه این سموم برای کنترل کپک خاکستری انگور بدون اطلاع از حساسیت جمعیت‌های قارچ در باغ‌های انگور استان، منطقی به نظر نمی‌رسد. بر همین اساس، تحقیق حاضر با هدف تعیین وجود و فراوانی سویه‌های مقاوم به قارچ‌کش‌های بنومیل، ایپرودیون و فن‌هگزامید در جدایه‌های *B. cinerea* جمع‌آوری شده از تاکستان‌های مناطق مختلف استان آذربایجان غربی انجام گرفته است. لازم به ذکر است که فن‌هگزامید که از قارچ‌کش‌های موثر علیه کپک خاکستری انگور در مناطق و کشورهای مختلف دنیا ذکر شده است (هان ۲۰۱۴)، هنوز در ایران به ثبت نرسیده است.

#### مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های

#### *B. cinerea*

نمونه‌برداری از خوشه‌های انگور دارای علائم مشکوک به آلودگی به *B. cinerea* از تاکستان‌ها و سردخانه‌های مناطق مختلف استان آذربایجان غربی انجام گرفت (جدول ۱). نمونه‌برداری از تاکستان‌ها در طی ماه‌های شهریور تا آبان ماه سال ۱۳۹۱ انجام گرفت و نمونه‌های میوه‌های سردخانه‌ها در طی ماه‌های

خاکستری در تاکستان‌ها می‌باشد (الاد و همکاران ۲۰۰۴، ویلیامسون و همکاران ۲۰۰۷). قارچ‌کش‌های حفاظتی و سیستمیک متعددی برای کنترل *B. cinerea* در انگور در مناطق مختلف دنیا توصیه شده است که از قارچ‌کش‌های حفاظتی می‌توان به مانکوزب<sup>۱</sup> و کاپتان<sup>۲</sup> و از سموم سیستمیک به قارچ‌کش‌های گروه-های بنزیمیدازول<sup>۳</sup> مانند بنومیل<sup>۴</sup>، دی‌کربوکسیمید<sup>۵</sup> مانند ایپرودیون<sup>۶</sup> و هیدروکسی آنیلید<sup>۷</sup> مانند فن-هگزامید<sup>۸</sup> اشاره کرد. با اینکه قارچ‌کش‌های سیستمیک در مقایسه با سموم تماسی در کنترل کپک خاکستری موثرتر می‌باشند ولی استفاده مکرر از این قارچ‌کش‌ها باعث گزینش سویه‌های مقاوم قارچ و در نهایت مقاوم شدن جمعیت‌های قارچ می‌گردد، به‌طوریکه قارچ‌کش مورد نظر در کنترل بیماری بی‌اثر می‌شود (برنت و هولومون ۲۰۰۷، هان ۲۰۱۴).

به منظور توصیه قارچ‌کش‌های مناسب برای کنترل بیماری در یک منطقه، اطلاع از وجود و فراوانی سویه‌های<sup>۹</sup> مقاوم به قارچ‌کش ضروری است. که برای اینکار بایستی جدایه‌های قارچ از منطقه مورد نظر جمع‌آوری و مورد بررسی قرار گیرند. ردیابی سویه‌های مقاوم اغلب از طریق کشت جدایه‌های قارچ در غلظت‌های مختلف قارچ‌کش و محاسبه مقادیر EC<sub>50</sub> انجام می‌گیرد. البته در مواردی که یک دز متمایز کننده<sup>۱۰</sup> از یک قارچ‌کش در یک بیمارگر تعیین شده باشد، می‌توان با کشت جدایه‌ها در آن غلظت یا دز مشخص قارچ‌کش، سویه‌های مقاوم و حساس را از همدیگر تفکیک کرد که در این حالت در وقت و هزینه هم صرفه‌جویی می‌شود

<sup>1</sup>Mancozeb

<sup>2</sup>Thiram

<sup>3</sup>Benzimidazole

<sup>4</sup>Benomyl

<sup>5</sup>Dicarboximide

<sup>6</sup>Iprodione

<sup>7</sup>Hydroxyanilide

<sup>8</sup>Fenhexamid

<sup>9</sup>Strains

<sup>10</sup>Discriminatory dose

و افزودن غلظت‌های مناسب مربوط به هر قارچ‌کش، حلقه‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه در حال رشد فعال پرگنه‌های سه روزه از هر جدایه قارچ برداشته شد و در وسط تشتک‌های پتری به نحوی قرار داده شد که پرگنه با محیط کشت تماس داشته باشد. تشتک‌های پتری به مدت سه روز در انکوباتور با دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوس و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. جدایه‌هایی که روی محیط کشت حاوی قارچ‌کش رشد کردند به عنوان سویه مقاوم در نظر گرفته شدند (کورولف و همکاران ۲۰۱۱). در این آزمایش‌ها برای هر تیمار (ترکیب جدایه-قارچ‌کش) سه تکرار در نظر گرفته شد و تمامی آزمایش‌ها یک بار دیگر تکرار شدند.

#### بررسی شایستگی<sup>۲</sup> جدایه‌های *B. cinerea* مقاوم و حساس به قارچ‌کش‌ها

برای مقایسه شایستگی جدایه‌های حساس و مقاوم به قارچ‌کش، جدایه‌های مقاوم به یک قارچ‌کش، جدایه‌های مقاوم به دو قارچ‌کش و دو جدایه حساس انتخاب شدند. بدین منظور سه مشخصه شایستگی شامل میزان رشد روی محیط کشت، درصد جوانه‌زنی هاگ‌ها و شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی کوتیلدون‌های خیار مورد بررسی قرار گرفت (ژانگ و همکاران ۲۰۰۹، سان و همکاران ۲۰۱۰).

برای تعیین میزان رشد، جدایه‌های منتخب روی محیط کشت PDA با ۵ تکرار (تشتک پتری هشت سانتی‌متری) کشت شدند و بعد از سه روز نگهداری در انکوباتور با دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوس و در شرایط تاریکی، رشد پرگنه قارچ در دو جهت عمود بر هم اندازه‌گیری شد. سپس به منظور تحریک جدایه‌ها به هاگزایی، تشتک‌های پتری در شرایط با دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوسو زیر نور سفید فلورسنت با چرخه نوری ۱۶ ساعت در شبانه‌روز، به مدت هفت روز

بهمن و اسفند سال ۱۳۹۰ جمع‌آوری شدند. هر کدام از نمونه‌ها در پاکت‌های کاغذی مجزا قرار داده شده و بعد از ثبت مشخصات هر نمونه روی پاکت، به آزمایشگاه منتقل گردیدند. برای جداسازی قارچ عامل بیماری، خوشه‌ها در ظروف پلاستیکی شفاف حاوی یک عدد کاغذ صافی مرطوب سترون قرار داده شدند و برای حفظ رطوبت در داخل ظروف و تسهیل در رشد قارچ، درب آنها بسته شد. ظروف مذکور در محیط آزمایشگاه نگهداری شدند و هر روز مورد بررسی قرار گرفتند. پس از رشد قارچ روی حبه‌ها و دم میوه-ها، بخشی از پرگنه قارچ به وسیله سوزن باریک و سترون برداشته شد و به محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA)<sup>۱</sup> انتقال یافت (لنوکس و اسپاتس ۲۰۰۳). خالص‌سازی جدایه‌ها از طریق تک‌هاگ کردن انجام شد. نگهداری طولانی مدت جدایه‌های خالص در لوله‌های پلاستیکی درب‌دار حاوی محیط کشت PDA در یخچال با دمای چهار درجه‌ی سلسیوس انجام گرفت. جدایه‌ها با استفاده از مشخصات ریخت‌شناختی و طبق روش میرزایی و همکاران (۲۰۰۸) شناسایی شدند.

#### ردیابی سویه‌های *B. cinerea* مقاوم به قارچ‌کش‌های بنومیل، ایپرودیون و فن‌هگزامید

ردیابی سویه‌های *B. cinerea* مقاوم از طریق کشت روی محیط کشت حاوی دز متمایز کننده هر کدام از قارچ‌کش‌های بنومیل (با نام تجاری Benomyl، ساخت شرکت Agro-Chemie مجارستان)، ایپرودیون (با نام تجاری Rovral، ساخت شرکت Bayer آلمان) و فن-هگزامید (با نام تجاری Teldor، ساخت شرکت Bayer آلمان) انجام گرفت. غلظت‌های متمایز کننده برای قارچ‌کش‌های بنومیل و فن‌هگزامید ۰/۱ میلی‌گرم ماده موثره بر لیتر و برای قارچ‌کش ایپرودیون یک میلی‌گرم ماده موثره بر لیتر بود. پس از تهیه محیط‌های کشت PDA

<sup>۲</sup>Fitness<sup>۱</sup>Potato dextrose agar

جدول ۱- محل‌های نمونه‌برداری، تعداد خوشه و تعداد جدایه‌های *Botrytis cinerea* جداسازی شده.

شهرستان	منطقه	تعداد خوشه	تعداد جدایه
ارومیه	زینالو	۲۰	۸
ارومیه	اطراف فرودگاه	۲۰	۱۲
ارومیه	کهریز	۳۰	۲۱
ارومیه	قره‌باغ	۲۰	۶
ارومیه	امامزاده	۱۵	۸
ارومیه	گردآباد	۱۰	۶
ارومیه	بالو (سردخانه)	۱۵	۱۴
ارومیه	زینالو (سردخانه)	۱۵	۹
سلماس	-	۲۵	۱۰
سردشت	-	۲۰	۹
کل		۱۹۰	۱۰۳

روی کوتیلدون‌های خیار تعیین گردید. بدین منظور، بذره‌های خیار در گلدان‌های پلاستیکی در گلخانه با دمای  $22 \pm 3$  درجه‌ی سلسیوس رشد داده شدند و پس از ۱۲ روز کوتیلدون‌ها از گیاهچه‌های خیار جدا شدند. سپس در مرکز هر کوتیلدون یک زخم کوچک با استفاده از سوزن سترون ایجاد گردید و یک حلقه ۵ میلی‌متری از حاشیه پرگنه‌های سه روزه در حال رشد و فعال جدایه قارچ روی محل زخم قرار داده شد طوری که پرگنه قارچ به طور مستقیم با سطح زخم تماس داشته باشد. برای هر جدایه ۵ کوتیلدون مایه‌زنی گردید. در تیمار شاهد از حلقه‌های ۵ میلی‌متری محیط کشت PDA بدون قارچ استفاده شد. کوتیلدون‌های مایه‌زنی شده، روی کاغذهای صافی سترون مرطوب در داخل ظروف پلاستیکی درب‌دار انتقال یافتند و بعد از بستن درب آنها، در دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوس در شرایط تاریکی نگهداری شدند. بعد از گذشت چهار روز، قطر لکه‌های حاصل از مایه‌زنی

نگهداری شدند. هاگ‌ها با ریختن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون در سطح پرگنه‌ها و خراش دادن سطحی آنها جمع‌آوری شدند و پس از عبور دادن از دو لایه پارچه ممل، سوسپانسیون هاگ‌ها تهیه گردید. سوسپانسیون‌ها با استفاده از لام هماسیتومتر در غلظت حدود  $1 \times 10^6$  هاگ در هر میلی‌لیتر تنظیم شدند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون هاگ هر جدایه روی محیط کشت آب-آگار دو درصد پخش گردید و بعد از نگهداری در انکوباتور با دمای ۲۳ درجه‌ی سلسیوس در شرایط تاریکی به مدت ۱۲ ساعت، درصد جوانه‌زنی هاگ‌ها با بررسی ۱۰۰ هاگ از سه محل مختلف در هر تشتک پتری در زیر میکروسکوپ نوری ثبت گردید. هاگ‌هایی به عنوان جوانه‌زده در نظر گرفته شدند که طول لوله تندش آنها برابر با طول هاگ یا بزرگتر از آن بود. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و تمام آزمایش‌ها یک بار دیگر تکرار شدند. شدت بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب با بررسی آلودگی

نمونه‌های اطراف فرودگاه در ارومیه شناسایی گردید به طوری که از ۱۲ جدایه تنها یک جدایه حساس و بقیه (۹۲ درصد) نسبت به این قارچ‌کش مقاوم بودند. بعد از جدایه‌های اطراف فرودگاه، نمونه‌های سردخانه بالو و جدایه‌های جمع‌آوری شده از تاکستان زینالو در ارومیه به ترتیب با ۶۴ و ۶۳ درصد دارای بیشترین فراوانی سویه‌های مقاوم به بنومیل بودند (جدول ۲).

**مقاومت جدایه‌های *B. cinerea* نسبت به ایپرودیون**  
ارزیابی جدایه‌ها با دز متمایز کننده ایپرودیون مشخص نمود که سویه‌های مقاوم به این قارچ‌کش با فراوانی متفاوت در همه مناطق نمونه‌برداری وجود دارند (جدول ۲). از ۱۰۳ جدایه مورد بررسی، تعداد ۳۴ جدایه (۳۳ درصد) به عنوان جدایه‌های مقاوم به این قارچ‌کش مشخص شدند. جدایه‌های منطقه زینالو ارومیه با ۵۰ درصد، در مقایسه با سایر مناطق دارای نسبت بالاتری از جدایه‌های مقاوم بودند. درصد جدایه‌های مقاوم به قارچ‌کش ایپرودیون در نمونه‌های مناطق گردآباد و قره‌باغ با ۱۶ درصد کمترین فراوانی را داشتند (جدول ۲).

**مقاومت جدایه‌های *B. cinerea* نسبت به فن‌هگزامید**  
بررسی حساسیت جدایه‌های قارچ نسبت به فن-هگزامید نشان داد که ۹۴ جدایه (۹۱ درصد) به این قارچ‌کش حساس و ۹ جدایه (۹ درصد) نسبت به آن مقاوم بودند (جدول ۲). جدایه‌های مقاوم به این قارچ-کش در شش منطقه شناسایی گردید که در بین آنها نمونه‌های منطقه امامزاده ارومیه با ۲۷ درصد دارای بیشترین فراوانی جدایه‌های مقاوم بود.

روی کوتیلدون‌ها اندازه‌گیری و ثبت گردید (ژانگ و همکاران ۲۰۰۹، سان و همکاران ۲۰۱۰). تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار GenStat نسخه ۹ انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال یک درصد، آزمون<sup>۱</sup> SNK مورد استفاده قرار گرفت.

## نتایج

### جدایه‌های قارچی

در این مطالعه از تعداد ۱۸۰ خوشه نمونه‌برداری شده از مناطق مختلف استان آذربایجان غربی، تعداد ۱۰۳ جدایه با مشخصات قارچ جنس *Botrytis* جداسازی و خالص‌سازی گردید (جدول ۱). مطالعات ریخت‌شناختی جدایه‌ها بر طبق روش استاندارد شناسایی گونه‌های این جنس معلوم کرد که کلیه جدایه‌ها به گونه *B. cinerea* تعلق داشتند. در برخی موارد علاوه بر گونه *B. cinerea* قارچ‌های متعلق به جنس‌های *Penicillium* و *Aspergillus* نیز جداسازی شدند.

### مقاومت جدایه‌های *B. cinerea* نسبت به بنومیل

از ۱۰۳ جدایه مورد بررسی، تعداد ۶۴ جدایه (۶۲ درصد) به بنومیل حساس و ۳۹ جدایه (۳۸ درصد) مقاوم بودند (جدول ۲). در بین مناطق و محل‌های مورد بررسی، همه جدایه‌های حاصل از شهرستان سلماس نسبت به بنومیل حساس بودند و در جدایه‌های حاصل از سایر مناطق نمونه‌برداری، جدایه‌های مقاوم به نسبت‌های مختلف ردیابی شدند. عدم شناسایی جدایه‌های مقاوم در نمونه‌های سلماس می‌تواند بیانگر حساسیت جمعیت قارچ نسبت به بنومیل و در کل<sup>۱</sup> بنزیمیدازول‌ها در تاکستان‌های آن شهرستان باشد ولی الزاماً نشان‌دهنده عدم وجود جدایه‌های مقاوم در آن منطقه نیست. بیشترین فراوانی سویه‌های مقاوم در

<sup>۱</sup>Student- Newman- Keuls

جدول ۲- تعداد جدایه‌های *Botrytis cinerea* در هر منطقه و تعداد و فراوانی جدایه‌های مقاوم به بنومیل، ایپرودیون و فن‌هگزامید.

منطقه	مقاوم به بنومیل		مقاوم به ایپرودیون		مقاوم به فن‌هگزامید		جدایه‌های بررسی شده
	تعداد	فراوانی (درصد)	تعداد	فراوانی (درصد)	تعداد	فراوانی (درصد)	
زینالو (ارومیه)	۸	۶۳	۴	۵۰	۱	۱۳	۸
اطراف فرودگاه (ارومیه)	۱۲	۹۲	۵	۴۱	۲	۱۷	۱۲
کهریز (ارومیه)	۲۱	۱	۷	۳۳	۰	۰	۲۱
قره‌باغ (ارومیه)	۶	۱۷	۱	۱۶	۱	۱۷	۶
امامزاده (ارومیه)	۸	۱۳	۳	۳۷	۳	۳۷	۸
گردآباد (ارومیه)	۶	۳۳	۱	۱۶	۰	۰	۶
سردخانه بالو (ارومیه)	۱۴	۶۴	۵	۳۵	۰	۰	۱۴
سردخانه زینالو (ارومیه)	۹	۴۴	۳	۳۳	۰	۰	۹
سلماس	۱۰	۰	۲	۲۰	۱	۱۰	۱۰
سردشت	۹	۴۴	۳	۳۷	۱	۱۱	۹
تعداد کل <sup>۱</sup>	۱۰۳	۳۸	۳۴	۳۳	۹	۹	۱۰۳

درصد در نمونه‌های زینالو ارومیه وجود داشت (جدول ۳).

**شایستگی جدایه‌های مقاوم و حساس به قارچ‌کش‌ها**  
برای مقایسه شایستگی جدایه‌های حساس و مقاوم، تعداد ۱۳ جدایه (BC1 تا BC13) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۴). نتایج تجزیه واریانس داده‌های اجزای شایستگی جدایه‌ها نشان داد که جدایه‌ها از لحاظ شاخص‌های شایستگی با همدیگر اختلاف آماری معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) داشتند. در مقایسه میانگین شاخص‌ها نیز جدایه‌ها در گروه‌های مختلف آماری (سطح احتمال آماری یک درصد) قرار گرفتند (جدول ۴).

### مقاومت چندگانه<sup>۱</sup> جدایه‌ها به قارچ‌کش‌های مورد بررسی

در این مطالعه تعدادی از جدایه‌های *B. cinerea* دارای مقاومت چندگانه بودند و همزمان نسبت به دو قارچ‌کش مقاومت نشان دادند اما مقاومت همزمان به سه قارچ‌کش در هیچ کدام از جدایه‌ها مشاهده نشد (جدول ۳). فراوانی مقاومت‌های دوگانه به قارچ‌کش‌ها بسته به ترکیب قارچ‌کش‌ها و منطقه جداسازی متفاوت بود. در مجموع جدایه‌های مقاوم به بنومیل و ایپرودیون پراکنش وسیع‌تری در مناطق مورد بررسی داشتند و در شش منطقه مشاهده شدند. بیشترین فراوانی مقاومت دوگانه در مناطق مورد بررسی نیز مربوط به سویه‌های مقاوم به بنومیل و ایپرودیون بود که به میزان ۳۸

<sup>۱</sup>Multiple resistance

جدول ۳- تعداد جدایه‌های *Botrytis cinerea* در هر منطقه و تعداد و فراوانی جدایه‌هایی با مقاومت دوگانه به قارچ‌کش‌های بنومیل، ایپرودیون و فن‌هگزامید.

ایپرودیون و فن‌هگزامید		بنومیل و فن‌هگزامید		بنومیل و ایپرودیون		جدایه‌های بررسی شده منطقه	
تعداد فراوانی (درصد)	تعداد فراوانی (درصد)	تعداد فراوانی (درصد)	تعداد فراوانی (درصد)	تعداد فراوانی (درصد)	تعداد فراوانی (درصد)		
۰	۰	۰	۰	۳۸	۳	۸	زینالو (ارومیه)
۰	۰	۰	۰	۲۵	۳	۱۲	اطراف فرودگاه (ارومیه)
۰	۰	۰	۰	۵	۱	۲۱	کهریز (ارومیه)
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۶	قره‌باغ (ارومیه)
۱۳	۱	۱۳	۱	۰	۰	۸	امامزاده (ارومیه)
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۶	گردآباد (ارومیه)
۰	۰	۰	۰	۷	۱	۱۴	سردخانه بالو (ارومیه)
۰	۰	۰	۰	۲۲	۲	۹	سردخانه زینالو (ارومیه)
۰	۰	۰	۰	۰	۰	۱۰	سلماس
۰	۰	۱۱	۱	۱۱	۱	۹	سردشت
۱	۱	۲	۲	۱۱	۱۱	۱۰۳	کل

به فن‌هگزامید (BC7) و یک جدایه مقاوم به ایپرودیون و فن‌هگزامید (BC13) تفاوت معنی‌داری نداشتند. یکی از جدایه‌های مقاوم به بنومیل و ایپرودیون (BC9) کمترین درصد جوانه‌زنی را داشت (جدول ۴).

#### بحث

بنزیمیدازول‌ها از جمله اولین قارچ‌کش‌های سیستمیک هستند که در نقاط مختلف دنیا برای کنترل *B. cinerea* مورد استفاده قرار گرفته‌اند و مقاومت جمعیت‌های قارچ به آنها به خصوص پس از چند سال سم‌پاشی، به دفعات از کشورهای مختلف گزارش شده است به طوری که فراوانی سویه‌های مقاوم تا بیش از ۸۰ درصد نیز گزارش شده است (بیور و همکاران ۱۹۸۹، لروکس و همکاران ۱۹۹۹، یورمن و جفرز ۱۹۹۹، کورولف و همکاران ۲۰۱۱). نتایج این تحقیق نشان داد که فراوانی سویه‌های مقاوم به بنزیمیدازول-ها در بعضی تاکستان‌های منطقه با فراوانی آنها در باغات و تاکستان‌های سم‌پاشی شده در سایر کشورها قابل مقایسه و حتی در مواردی بیشتر است.

از لحاظ شدت بیماریزایی (قطر لکه) روی کوتیلدون‌های خیار، جدایه‌های حساس (BC1 و BC2) و یک جدایه مقاوم به بنومیل و فن‌هگزامید (BC11) دارای بیشترین میانگین بودند و در یک گروه آماری قرار گرفتند. همچنین دو جدایه مقاوم به بنومیل (BC3 و BC4) کمترین شدت بیماریزایی را داشتند. مقایسه میانگین قطر رشد پرگنه روی محیط کشت PDA نیز مشخص نمود که یکی از جدایه‌های حساس (BC2) و یک جدایه مقاوم به ایپرودیون و فن‌هگزامید (BC13) دارای بیشترین مقدار رشد بودند و در یک گروه مجزا قرار گرفتند اگرچه از نظر آماری با یک جدایه مقاوم به فن‌هگزامید (BC8)، دو جدایه مقاوم به ایپرودیون (BC5 و BC6) و دیگر جدایه حساس (BC1) تفاوت معنی‌داری نداشتند. جدایه مقاوم به بنومیل و ایپرودیون (BC10) دارای کمترین قطر رشد بود. همچنین یک جدایه حساس (BC1) و یک جدایه مقاوم به ایپرودیون (BC5) بیشترین درصد جوانه‌زنی را اگر داشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند. این دو جدایه، از نظر آماری با دیگر جدایه حساس (BC2)، یک جدایه مقاوم

جدول ۴- میانگین مشخصات شایستگی جدایه‌های *B. cinerea* مورد بررسی.

جدایه	فنوتیپ	قطر زخم (سانتی‌متر)	قطر پرگنه (سانتی‌متر)	جوانه‌زنی اسپور (درصد)
BC1	حساس	۲/۷a*	۳/۶۲abc	۸۵a
BC2	حساس	۲/۸۵a	۳/۷۸a	۸۲ab
BC3	مقاوم به بنومیل	۱/۱۲e	۳/۴۴d	۷۶de
BC4	مقاوم به بنومیل	۰/۹۵e	۲/۹۶e	۷۶de
BC5	مقاوم به ایپرودیون	۱/۹۴bc	۳/۶۳abc	۸۵a
BC6	مقاوم به ایپرودیون	۱/۱۶de	۳/۶۱abc	۸۰bc
BC7	مقاوم به فن‌هگزامید	۱/۹bc	۳/۵۸bcd	۸۱abc
BC8	مقاوم به فن‌هگزامید	۱/۳۸de	۳/۷۵ab	۷۹bcd
BC9	مقاوم به بنومیل و ایپرودیون	۱/۳۶de	۲/۴۴cd	۷۲f
BC10	مقاوم به بنومیل و ایپرودیون	۱/۲۳de	۲/۵۳f	۷۴ef
BC11	مقاوم به بنومیل و فن‌هگزامید	۲/۶۹a	۲/۹۸e	۷۸cde
BC12	مقاوم به بنومیل و فن‌هگزامید	۱/۶bc	۲/۸۳e	۷۴ef
BC13	مقاوم به ایپرودیون و فن‌هگزامید	۲/۱۲b	۳/۷۸a	۸۱abc

\*: در هر ستون، میانگین‌های دارای حروف مشابه از نظر آماری در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

فراوانی سویه‌های مقاوم گزارش شده از برخی نقاط دنیا نیز بیشتر است.

فن‌هگزامید یکی از قارچ‌کش‌های موثر بر علیه *B. cinerea* است که در بسیاری از کشورها بر علیه بیماری کپک خاکستری در محصولات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده مداوم از فن‌هگزامید نیز همانند سایر قارچ‌کش‌های سیستمیک، فشار گزینشی بر جمعیت‌های بیمارگر وارد می‌کند و موجب افزایش فراوانی جدایه‌های مقاوم می‌شود به طوری که در تاکستان‌ها تا ۲۷ درصد (لاتوره و تورس ۲۰۱۲) و در سایر محصولات تا حدود ۴۴ درصد (امیری و همکاران ۲۰۱۳) مقاومت در جدایه‌های قارچ گزارش شده است. البته در موارد معدودی فراوانی سویه‌های مقاوم بسیار بالا و حتی تا ۱۰۰ درصد نیز مشاهده شده است (وبر ۲۰۱۰). با توجه به اینکه فن‌هگزامید در ایران به ثبت نرسیده است و در استان آذربایجان غربی و حتی در سایر استان‌های کشور مورد استفاده قرار نگرفته است، فراوانی پایین سویه‌های مقاوم که در این تحقیق شناسایی شد قابل پیش‌بینی بود زیرا جمعیت‌های

ایپرودیون و در حالت کلی قارچ‌کش‌های گروه دی-کربوکسیمیدها جزو سمومی هستند که پس از بنزیمیدازول‌ها برای کنترل کپک خاکستری در محصولات مختلف توصیه شدند. اما با توجه به اینکه *B. cinerea* از جمله قارچ‌های با پتانسیل تکاملی بالا است، سم‌پاشی‌های مکرر با این گروه از قارچ‌کش‌ها نیز باعث گزینش و افزایش فراوانی جدایه‌های مقاوم در جمعیت‌های بیمارگر شده است. در زمینه فراوانی سویه‌های مقاوم به دی‌کربوکسیمیدها گزارش‌های متفاوتی از کشورهای مختلف وجود دارد به طوری که از حدود ۱۰ درصد در تاکستان‌های ایتالیا (پانیانکو و همکاران ۲۰۱۵) تا ۹۵ درصد در تاکستان‌های آفریقای جنوبی (فوری و هولز ۲۰۰۱) و در سایر محصولات مانند گوجه‌فرنگی تا بیش از ۸۶ درصد (رودریگز و همکاران ۲۰۱۴) نیز گزارش شده است. یافته‌های تحقیق حاضر مشخص نمود که جدایه‌های مقاوم به ایپرودیون با فراوانی نسبتاً بالا در تاکستان‌های استان آذربایجان غربی وجود دارند به طوری که درصد این سویه‌ها از



*B. cinerea* در معرض این قارچ‌کش قرار نگرفته و تحت فشار گزینشی نیز نبوده‌اند.

مقاومت چندگانه یا مقاومت یک جدایه قارچی به بیش از یک قارچ‌کش با مکانیسم اثر متفاوت که در جدایه‌های *B. cinerea* مورد بررسی ردیابی شد، از نقاط مختلف دنیا نیز گزارش شده است. مقاومت به بنزیمیدازول‌ها و دی‌کربوکسیمیدها از رایج‌ترین مقاومت‌های چندگانه شناسایی شده در این بیمارگر است (نورث‌اور و ماتتونی ۱۹۸۶، یورمن و جفرز ۱۹۹۹، رودریگز و همکاران ۲۰۱۴، یین و همکاران ۲۰۱۵). وجود جدایه‌هایی با مقاومت چندگانه، باعث ایجاد محدودیت در مدیریت بیمارگر با استفاده از قارچ‌کش‌ها می‌شود و استفاده از ترکیبات مذکور به صورت مخلوط و یا متناوب را با مشکل مواجه می‌کند.

درصد بالای جدایه‌های مقاوم به بنومیل و ایپرودیون که در نمونه‌های برخی از تاکستان‌ها مشاهده شد، با فراوانی‌هایی که در سایر کشورها از تاکستان‌ها و مزرعه‌های سمپاشی شده گزارش شده است (بیور و همکاران ۱۹۸۹، فوری و هولز ۲۰۰۱، لروکس و همکاران ۱۹۹۹، رودریگز و همکاران ۲۰۱۴، یورمن و جفرز ۱۹۹۹، کورولف و همکاران ۲۰۱۱)، مشابه بود. این دو قارچ‌کش در ایران برای کنترل بیماری‌های قارچی محصولات مختلف بجز انگور به ثبت رسیده‌اند ولی به طور رسمی برای کنترل کپک خاکستری ناشی از قارچ *B. cinerea* در محصولات مختلف و نیز بیماری‌های قارچی انگور توصیه نشده‌اند. بر اساس اطلاعات نگارندگان، بعضی از باغداران استان از قارچ‌کش‌های گروه بنزیمیدازول به ویژه بنومیل و کاربندازیم و نیز ترکیب کاربندازیم همراه با ایپرودیون برای کنترل بیماری‌هایی مانند سفیدک پودری انگور استفاده می‌کنند. بنابراین به نظر می‌رسد سمپاشی با ترکیبات توصیه نشده فوق، جمعیت‌های قارچ *B. cinerea* را نیز به عنوان بیمارگر غیرهدف تحت تاثیر قرار داده است و باعث گزینش جدایه‌های مقاوم در جمعیت‌های قارچ در بعضی تاکستان‌ها و

افزایش فراوانی آنها شده است. این فرضیه با مقایسه فراوانی سویه‌های مقاوم به دو قارچ‌کش مذکور با فراوانی سویه‌های مقاوم به فن‌هگزامید بیشتر قوت می‌گیرد زیرا فن‌هگزامید تاکنون در آذربایجان غربی و حتی سایر استان‌های کشور استفاده نشده است و به دلیل عدم فشار گزینشی ناشی از آن، فراوانی سویه‌های مقاوم به این ترکیب در مجموع خیلی پایین است. همچنین با توجه به اینکه عامل بیماری قادر است محصولات دیگر را نیز آلوده کند، این احتمال نیز وجود دارد سمپاشی‌هایی که با این قارچ‌کش‌ها در محصولات دیگر در باغ‌ها و گیاهان مجاور و یا در گلخانه‌ها انجام گرفته است، موجب گزینش سویه‌های مقاوم *B. cinerea* به عنوان بیمارگر غیرهدف شده است و جدایه‌های مذکور از آن محصولات به تاکستان‌ها انتقال یافته‌اند.

نتایج بررسی‌های تحقیق حاضر نشان داد که در حالت کلی مقاومت به ایپرودیون و فن‌هگزامید تاثیری در شایستگی قارچ ندارد زیرا ارتباط مشخصی بین مقاومت به این قارچ‌کش‌ها با شایستگی جدایه‌ها وجود نداشت (جدول ۴). به نظر می‌رسد مقاومت به بنومیل و در حالت کلی بنزیمیدازول‌ها موجب کاهش شایستگی بیمارگر شده است زیرا جدایه‌هایی که فقط به بنومیل یا به بنومیل همراه با قارچ‌کش دیگر مقاوم بودند دارای میانگین شاخص‌های شایستگی پایینی بودند. در بین آنها جدایه BC11 (مقاوم به بنومیل و فن‌هگزامید) استثنا بود زیرا شدت بیماریزایی آن با جدایه‌های حساس تفاوت معنی‌داری نداشت اگر چه میانگین قطر رشد پرگنه و درصد جوانه‌زنی هاگ آن پایین بود. این نتایج با یافته‌های کورولف و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد که نشان دادند مقاومت به ایپرودیون تاثیری در شایستگی سویه‌های *B. cinerea* جدا شده از انگور ندارد در حالی که مقاومت به بنومیل باعث کاهش شایستگی آنها می‌شود. در مطالعه‌ای دیگر، تفاوتی در شایستگی جدایه‌های مقاوم به بنزیمیدازول‌ها با جدایه‌های حساس مشاهده نشد در حالی که در جدایه‌های

بیشتر) به عنوان خطر بالا در نظر گرفته شده است (اشنابل و همکاران ۲۰۱۵). بر اساس این معیار، نتایج تحقیق حاضر می‌تواند برآورد مناسبی از وجود و فراوانی سویه‌های مقاوم به قارچ‌کش‌ها در اغلب محل‌های مورد بررسی باشد. با توجه به اینکه فراوانی سویه‌های مقاوم به بنومیل و ایپرودیون در اغلب محل‌ها نزدیک به ۲۰ یا بیش از ۲۰ درصد بود، به نظر می‌رسد جمعیت‌های قارچ در استان دارای پتانسیل تکاملی و قدرت سازگاری بالا هستند و خطر بروز مقاومت به این قارچ‌کش‌ها بالا است. بنابراین با عنایت به این موضوع و با توجه به فراوانی بالای جدایه‌های مقاوم به بنومیل و ایپرودیون و به ویژه وجود سویه‌هایی با مقاومت دوگانه نسبت به این دو قارچ‌کش، استفاده از آنها در کنترل بیماریگر در این منطقه قابل توصیه نیست. همچنین با توجه به اینکه شایستگی جدایه‌های مقاوم به ایپرودیون مشابه سویه‌های حساس است، حتی در صورت عدم سمپاشی با این قارچ‌کش نیز مقاومت به آن در جمعیت‌های قارچ پایدار خواهد بود ولی به دلیل کاهش شایستگی سویه‌های مقاوم به بنزیمیدازول‌ها، در صورت عدم استفاده از این قارچ‌کش‌ها، از لحاظ تئوریک بایستی فراوانی آنها در جمعیت‌ها کاهش یابد و به مرور زمان نسبت به این گروه از قارچ‌کش‌ها حساس شوند (برنت و هولومون ۲۰۰۷، میکابریز و مکدونالد ۲۰۱۵).

با توجه به اینکه سویه‌های مقاوم به فن‌هگزامید در اغلب مناطق یا ردیابی نشدند و یا فراوانی آنها بالا نبود، این قارچ‌کش می‌تواند به عنوان یک سم مناسب در کنترل بیماری در منطقه مدّ نظر قرار گیرد و در آینده به ثبت برسد. با این حال وجود سویه‌های مقاوم به فن‌هگزامید با فراوانی ۱۰ درصد یا بیشتر در سلماس، سردشت و بعضی مناطق در اطراف ارومیه نیز بیانگر خطر بروز مقاومت به این قارچ‌کش در جمعیت‌های قارچ می‌باشد. بنابراین در صورت توصیه و استفاده از این قارچ‌کش، بایستی احتیاط لازم صورت گیرد و در قالب برنامه‌های ضد مقاومت به

مقاوم به ایپرودیون، قدرت بیماریزایی و قطر رشد پرگنه در مقایسه با جدایه‌های حساس کمتر بود (کالاماراکیس و همکاران ۲۰۰۰). در زمینه اثر مقاومت به فن‌هگزامید در شایستگی *B. cinerea* نیز گزارش‌های متفاوتی وجود دارد به طوری که در جدایه‌های مقاومی که از محصولات مختلف جمع‌آوری شدند، ارتباطی بین مقاومت به این قارچ‌کش و اجزای شایستگی مشاهده نشد (ژانگ و همکاران ۲۰۰۷) در حالی که در سویه‌های جهش یافته آزمایشگاهی مقاوم، قدرت بقاء در شرایط نامساعد، تولید هاگ و درصد جوانه‌زنی هاگ کاهش یافته است (زیوگس و همکاران ۲۰۰۳، بیلارد و همکاران ۲۰۱۲). این تفاوت‌ها می‌تواند مربوط به جهش‌های مختلف در توالی ژن‌های پروتئینی مورد هدف این قارچ‌کش‌ها باشد زیرا با وجود اینکه جهش در قسمت‌های مختلف ژن‌های مذکور باعث بروز مقاومت به قارچ‌کش مورد نظر می‌شود ولی جهش در بعضی نوکلئوتیدها شایستگی قارچ را تحت تاثیر قرار می‌دهد (زیوگس و همکاران ۲۰۰۳، ما و همکاران ۲۰۰۷، زیوگس و همکاران ۲۰۰۹، بیلارد و همکاران ۲۰۱۲). بنابراین، به نظر می‌رسد سویه‌های مقاوم به بنزیمیدازول‌ها در استان آذربایجان غربی دارای جهش‌هایی هستند که موجب کاهش شایستگی آنها می‌شود هر چند برای اثبات این فرضیه، بهتر است شایستگی جدایه‌های بیشتری مورد بررسی قرار گیرد و ژن پروتئین هدف آنها یعنی بتاتوبولین نیز توالی‌یابی و جهش‌های منجر به مقاومت به بنزیمیدازول‌ها شناسایی گردد.

به منظور پایش و ردیابی سویه‌های مقاوم به قارچ‌کش در جمعیت‌های *B. cinerea* بررسی تعداد ۱۰ جدایه از هر محل توصیه شده است و در صورتی که یک جدایه (۱۰ درصد) مقاوم به قارچ‌کش یافت شود، خطر<sup>۱</sup> بروز مقاومت در آن جمعیت، متوسط و وجود تعداد دو جدایه مقاوم و یا بیشتر (۲۰ درصد و یا

<sup>۱</sup>Risk

هگزامید مورد بررسی قرار گیرد و کارآیی آن در کنترل این بیمارگر نیز مشخص گردد. همچنین توصیه می‌شود حساسیت جدایه‌های *B. cinerea* به سایر قارچ‌کش‌های با نقطه اثر متفاوت که در ایران وجود دارند نیز ارزیابی شود تا قارچ‌کش‌های مناسب و موثر دیگری برای کنترل بیماری کپک خاکستری انگور در استان توصیه گردد.

قارچ‌کش به ویژه به صورت مخلوط یا متناوب با قارچ‌کش‌های حفاظتی یا سموم سیستمیک با نقطه اثر متفاوت مورد استفاده قرار گیرد. قارچ‌کش فن‌هگزامید علاوه بر *B. cinerea* روی گونه‌های *Sclerotinia* نیز موثر است. با توجه به اینکه پوسیدگی اسکروتینیایی از بیماری‌های بسیار مهم آفتابگردان در استان آذربایجان غربی می‌باشد، بهتر است حساسیت جدایه‌های *S. clerotiorum* در استان نیز نسبت به فن-

### منابع

- Amiri A, Heath SM and Peres NA, 2013. Phenotypic characterization of multifungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in Florida. *Plant Disease*, 97(3):393-401.
- Beever RE, Laracy EP and Park HA, 1989. Strains of *Botrytis cinerea* resistant to dicarboximide and benzimidazole fungicides in New Zealand vineyards. *Plant Pathology*, 38(3): 427-437.
- Billard A, Fillinger S, Leroux P, Lachaise H, Beffa R and Debieu D, 2012. Strong resistance to the fungicide fenhexamid entails a fitness cost in *Botrytis cinerea*, as shown by comparisons of isogenic strains. *Pest Management Science*, 68(5): 684-691.
- Brent KJ and Hollomon DW, 2007. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How can it be Managed?. Fungicide Resistance Action Committee: FRAC Monograph No. 1.
- 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.
- Fourie PH and Holz G, 1998. Frequency of dicarboximide resistant strains of *Botrytis cinerea* in South African table grape vineyards and influence of spray schedules on resistant sub-populations. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 19(1): 3-9.
- 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.
- Kalamarakis AE, Petsikos-Panagiotarou N, Mavroidis B and Ziogas BN, 2000. Activity of fluazinam against strains of *Botrytis cinerea* resistant to benzimidazoles and/or dicarboximides and to a benzimidazole-phenylcarbamate mixture. *Journal of Phytopathology*, 148(7-8):449-455.
- Korolev N, Mamiev M, Zahavi T and Elad Y, 2011. Screening of *Botrytis cinerea* isolates from vineyards in Israel for resistance to fungicides. *European Journal of Plant Pathology*, 129(4): 591-608.
- Latorre BA and Torres R, 2012. Prevalence of isolates of *Botrytis cinerea* resistant to multiple fungicides in Chilean vineyards. *Crop Protection*, 40(1): 49-52.
- Lennox CL and Spotts RA, 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, 87(6): 645-649.
- 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.

- Ma Z, Yan L, Luo Y and Michailides TJ, 2007. Sequence variation in the two-component histidine kinase gene of *Botrytis cinerea* associated with resistance to dicarboximide fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88(3): 300-306.
- Mikaberidze A and McDonald BA, 2015. Fitness cost of resistance: impact on management. Pp. 77-89 In: Ishii H and Hollomon DW (eds.) *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer, Tokyo, Japan.
- Mirzaei S, Mohammadi Goltapeh E, Shams-Bakhsh M and Safaie N, 2008. Identification of *Botrytis* spp. on plants grown in Iran. *Journal of Phytopathology*, 156(1): 21-28.
- Northover J and Matteoni JA, 1986. Resistance of *Botrytis cinerea* to benomyl and iprodione in vineyards and greenhouses after exposure to the fungicides alone or mixed with captan. *Plant Disease*, 70(5): 398-402.
- Panebianco A, Castello I, Cirvilleri G, Perrone G, Epifani F, Ferrara M, Polizzi G, Walters DR and Vitale A, 2015. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. *Crop Protection*, 77(1): 65-73.
- Pearson RC and Goheen AC, 1988. *Compendium of Grape Diseases*. APS Press.
- Rodríguez A, Acosta A and Rodríguez C, 2014. Fungicide resistance of *Botrytis cinerea* in tomato greenhouses in the Canary Islands and effectiveness of non-chemical treatments against gray mold. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(9): 2397-2406.
- Schnabel G, Hu, MJ and Fernández-Ortuño, D, 2015. Monitoring resistance by bioassay: relating results to field use using culturing methods. Pp. 281-293 In: Ishii H and Hollomon DW (eds.) *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer, Tokyo, Japan.
- Sun HY, Wang HC, Chen Y, Li HX, Chen CJ and Zhou MG, 2010. Multiple resistance of *Botrytis cinerea* from vegetable crops to carbendazim, diethofencarb, procymidone, and pyrimethanil in China. *Plant Disease*, 94(5): 551-556.
- Walker AS, Micoud A, Rémuson F, Grosman J, Gredt M and Leroux P, 2013. French vineyards provide information that open ways for effective resistance management of *Botrytis cinerea* (grey mold). *Pest Management Science*, 69(6): 667-678.
- Weber RWS, 2010. Occurrence of Hydr3 fenhexamid resistance among *Botrytis* isolates in Northern German soft fruit production. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 117(4): 177-179.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P and Vankan JA, 2007. *Botrytis cinerea*: the case of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5): 561-580.
- Yin D, Chen X, Hamada MS, Yu M, Yin Y and Ma Z, 2015. Multiple resistance to QoIs and other classes of fungicides in *Botrytis cinerea* populations from strawberry in Zhejiang Province, China. *European Journal of Plant Pathology*, 141(1): 169-171.
- Yourman LF and Jeffers NS, 1999. Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 83(6): 569-575.
- 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, Zhu JW, Wei FL, Liu SY and Zhu GN, 2007. Sensitivity of *Botrytis cinerea* from greenhouse vegetables to DMIs and fenhexamid. *Phytoparasitica*, 35(3): 300-313.
- Ziogas BN, Markoglou AN and Malandrakis AA, 2003. Studies on the inherent resistance risk to fenhexamid in *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109(4): 311-317.
- Ziogas BN, Nikou D, Markoglou AN, Malandrakis AA and Vontas J, 2009. Identification of a novel point mutation in the  $\beta$ -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.

## Resistance of Some *Botrytis cinerea* Isolates to Fungicides Benomyl, Iprodione and Fenhexamid in West Azarbaijan Province

R Amini<sup>1</sup> and M Abrinbana<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Former MSc Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University.

<sup>2</sup>Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University.

\*Corresponding author: [abrinbana@gmail.com](mailto:abrinbana@gmail.com)

Received: 23 Sep 2015

Accepted: 1 Feb 2016

### Abstract

Gray mold, caused by *Botrytis cinerea*, is one of the most important diseases of grape worldwide. Although, it has recently become a major problem in West Azarbaijan province causing significant yield losses, no fungicide has been registered to control the disease. In current study, susceptibility of 103 *B. cinerea* isolates collected from vineyards in different regions of the province was assessed to three fungicides including benomyl, iprodione and fenhexamid using discriminatory doses of fungicides in *in vitro* conditions. Results indicated that isolates resistant to benomyl and iprodione were widely distributed across the surveyed regions at different frequencies, whereas the isolates resistant to benomyl were not detected in the samples collected from Salmas. Isolates resistant to fenhexamid were detected at low frequency in six sampling locations. The results also showed that the isolates with multiple resistances to two fungicides were widely distributed in the studied regions. It is likely that application of benomyl and iprodione or fungicides with similar mode of action to control fungal diseases in grape other than gray mold, have resulted in selection of *B. cinerea* strains resistant to these fungicides as non-target pathogen leading to increase in their frequencies. The results revealed that the use of benomyl and iprodione or fungicides with similar mode of action would be ineffective to control the disease, while fenhexamid seems to be an alternative and effective fungicide to be registered and used to control the disease.

**Keywords:** Gray mold, Fungicide, Fungicide resistance, Multiple resistances.