

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

A *Botrytis cinerea* genetikai diverzitása és fungicid rezisztenciája

Genetic diversity of *Botrytis cinerea* and its relevance in the development of fungicide resistance

Mojtaba Assadollahi

Témavezetők:

Dr. Karaffa Levente, Dr. Karaffa Erzsébet Mónika



DEBRECENI EGYETEM
Juhász-Nagy Pál doktori iskolája

Debrecen, 2013.

1. Bevezetés

A *Botrytis cinerea* Pers. Fr. (teleomorph: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel), a szürkerothadás kórokozója minden évben jelentős gazdasági kárt okoz világszerte a termesztett növényeken. Napjainkban a *B. cinereát* fajkomplexnek tekintik, melyben korlátozott az egyes csoportok közötti közötti génáramlás (Giraud *et al.*, 1997; Albertini *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003, 2005). Több gén molekuláris genetikai vizsgálata alapján két filogenetikai csoportra (I-es csoportra és II-es csoportra) különítették el a *B. cinereát* (Albertini *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003). Transzpozon tartalmuk alapján az eddig leírt I-es csoportba tartozó izolátumok kizárólag *vacuma* (egyik leírt transzpozont sem tartalmazó) genotípusúak voltak, míg a I-es csoportba tartozó izolátumok között voltak *transposa* (mindkét leírt transzpozont tartalmazó), *flipper* (csak Flipper transzpozont tartalmazó), *boty* (csak Boty transzpozont tartalmazó) és *vacuma* típusúak is. (Ma & Michailides, 2005; Isenegger *et al.*, 2008). A DNS polimorfizmus és a vegetatív kompatibilitás vizsgálatok alapján az I-es csoport genetikai diverzitása kisebb, mint a II-es csoporté. A két csoport között morfológiai, egyéb fenotípusos különbségeket is leírtak, és eltérő gazdnövénykörrel rendelkeznek (Fournier *et al.*, 2005). Ezen felül az I-es csoportba tartozó gombák főként tavasszal, míg a II-es csoportba tartozók a teljes vegetációs időszakban izolálhatóak voltak (Fournier *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2005). A termelők különböző fungicidek alkalmazásával próbálnak védekezni a szürkerothadást okozó *B. cinerea* ellen, de egyre gyakrabban jelennek meg a különböző fungicidekkel szemben rezisztens törzsek (Esterio *et al.*, 2007). Az emberi egészségre, és a környezetre gyakorolt hatások miatt egyre nő a peszticidek használatával szembeni negatív társadalmi megítélés. az új, hatékonyabb technológiák kidolgozásához elengedhetetlen, hogy megfelelő

információt szerezzünk a szabadföldi *B. cinerea* populációk fungicid rezisztenciájának dinamikájáról (Yoon *et al.*, 2008).

Világszerte több tanulmány született már a *B. cinerea* populációkról (Giraud *et al.*, 1997; Alfonso *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2002; Ma & Michailides, 2005). Fournier és Giraud (2008) a *B. cinerea* II-es csoportján belül jelentős eltérést találtak szőlőről és szederről származó izolátumok között a mikroszatellit szekvenciákon alapuló genetikai vizsgálatokkal, amelyek korlátozott génáramlást mutattak az azonos termőhelyről, de eltérő gazdanövényről származó szimpatikus populációk között. Rajaguru és Shaw (2010) Angliában, valamint Muñoz *et al.* (2010) Argentínában hasonlóképpen eltérést találtak a különböző gazdanövényekről származó *B. cinerea* populációk között. Ugyanakkor Karchani-Balma *et al.* (2008) mikroszatellit markerek alapján nem talált eltérést a különböző gazdanövényekről származó tunéziai populációk között.

Célunk volt a magyarországi *B. cinerea* populációk jobb megismerése. Ehhez meghatároztuk az I-es, és II-es csoportba tartozó *B. cinerea* mintákat, és több genetikai paraméter felhasználásával összehasonlítottuk az egyes csoportba tartozó magyarországi izolátumokat. Vizsgáltuk az egyes markerek közötti különbségeket a populációgenetikai elemzésekben, és meghatároztuk az egyes populációk diverzitását. Tanulmányoztuk a magyarországi *B. cinerea* izolátumok QoI fungicidekkel szembeni rezisztenciájának elterjedését, és a rezisztencia genetikai alapját. Összehasonlítottuk az I-es, és II-es csoportba tartozó *B. cinerea* minták patogenitását. Vizsgáltuk a két különböző gazdanövényről (szamócáról és málnáról) izolált, szimpatikus, II-es csoportba tartozó *B. cinerea* populációk genetikai struktúráját három különböző genetikai marker (PCR-RFLP, mikroszatellit fragment nagyság és egy miniszatellit szekvencia) segítségével.

2. Eredmények és értékelésük

2.1. Az I-es és II-es csoport összehasonlítása

A *Bc-hch* fragment PCR-es amplifikációját követő *HhaI* restrikciós endonukleázzal történt emésztése alapján két különböző mintázat jelent meg. A *Bc-hch* fragment PCR-RFLP profilja alapján a mindössze 13 törzs (az összes izolátum 14%-a) tartozott a *B. cinerea* I-es csoportjába. Ezeket 2008 áprilisa és június eleje közötti időszakban izoláljuk repcéről és szamócáról. A β -*tubulin* szekvenciák parszimónia elemzése alapján az I-es csoportba tartozó izolátumok elkülönültek a II-es csoportba tartozóktól. A β -*tubulin* szekvenciák elemzésével kapott eredmények alátámasztották a PCR-RFLP alapján beazonosított 13 izolátum I-es csoportba tartozását.

Transzpozon elemek jelenlétét minden I-es csoportba tartozó izolátumnál detektáltunk, a II-es csoportba tartozó minták közül is mindössze egy izolátumból hiányzott. Az I-es csoportba tartozó izolátumok nagy többsége (92%) csak a Boty transzpozont tartalmazta, míg a II-es csoport izolátumai között a leggyakoribb genotípusok a mindkét transzpozont tartalmazó *transposa* (62%), és a csak Boty-t tartalmazó *boty* (34%) voltak. Néhány (2 db – 1,26%) II-es csoportba tartozó törzs csak Flipper transzpozont tartalmazott. Az I-es csoportba tartozó izolátumok nem rendelkeztek tipikus, megkülönböztető mikroszatellit alléllal az öt vizsgált mikroszatellit lokusz egyikén sem, és nem voltak az I-es, vagy II-es csoportra jellegzetes mikroszatellit haplotípusok sem. Az I-es csoportnál kisebb volt az öt mikroszatellit alapján számított allélszám és a genetikai diverzitás, de a II-es csoportban jóval több minta elemzését végeztük el. Elsőként sikerült kimutatni a *B. cinerea* I-es csoportjának (*'B. pseudocinerea'*) jelenlétét nem Nyugat-Európából származó *B. cinerea* mintákban, ami alapján feltételezhető, hogy a csoport képes volt átjutni olyan földrajzi akadályokon, mint az Alpok, és megtelepedni a Kárpát-medencében. A repce, mint új

gazdanövény került meghatározásra a *B. cinerea* I-es csoportjába tartozó mintáknál. A korábbi eredményekhez (Fournier *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2005) hasonlóan, az I-es csoportba tartozó izolátumok a vegetációs időszak elején, tavasszal voltak jelen a fertőzött növényeken. Szintén korábbi eredményekhez hasonlóan (Fournier and Giraud, 2008; Karchani-Balma *et al.*, 2008; Rajaguru and Shaw, 2010), a II-es csoport izolátumai nagyobb genetikai diverzitást mutattak, mint az I-es csoport. Az eredmények alapján a II-es csoport izolátumai nagyobb adaptációs potenciállal rendelkeznek (pl. új gazdanövényen való megtelepedés), tehát általánosságban valószínűleg eredményesebb patogének. A molekuláris markerek közül eredményeink alapján a transzpozonok jelenléte, nem alkalmas a populációk szerkezetének meghatározására, és a *B. cinerea* fajkomplexen belül az egyes csoportok elkülönítésére.

A több gén filogenetikai vizsgálata alapján („genealogical concordance of the phylogenetic species recognition”) elkülönített két testvérfaj között valószínűsíthető kismértékű információáramlás, így a teljes elkülönülését eredményeink nem támasztják alá.

2.2. A *Botrytis cinerea* fungicid rezisztenciája

Azoxistrobint tartalmazó táptalajon teszteltük a 157 Magyarországi izolátum QoI fungicid rezisztenciáját. Huszonnyolc (18%) a nagymértékben rezisztens (HR), negyvennyolc (30%) a kismértékben rezisztens (LR) izolátumok közé tartozott, míg a minták többsége, nyolcvanegy (52%) érzékeny (S) volt az azoxistrobina két napos 25 °C-os, két napos inkubációt követően.

A magyarországi *B. cinerea* izolátumok *cyt b* gén szekvenciájában nagy variabilitás volt megfigyelhető. A *cytb-BcF/cytb-BcR* primer párral két különböző nagyságú fragmentum szaporodott fel. A hosszabb, ~ 1750-bp nagyságú fragment, ami egy alternative intron jelenlétét bizonyított,

negyvennyolc (29%) izolátumnál volt megfigyelhető. A kisebb, ~ 560-bp, alternatív intron nélküli fragment 106 (68%) izolátumból volt felszaporítható. Öt mintában (3%) mind a nagyobb, mind a kisebb fragmentum kimutatható volt, ami a B, cinerea izolátumok heteroplazmiáját jelzi.

A *cyt b* gén *cytb-BcF/cytb-BcR* primer párral felszaporított PCR ampikonjainak szekvencia elemzése azt mutatta, hogy hat S fenotípusú izolátumban a GGT, „vad” típusú kodon, míg négy HR fenotípusú izolátumban a GCT kodon volt megtalálható a 143. pozícióban.

A *cytb-BcF/cytb-BcR* primer párral történt amplifikációt követő *SatI* restrikciós endonukleázos emésztés (PCR-RFLP) eredményei megerősítették *BcAR-F/BcAR-R* primer párokkal végzett (G143A) allél-specifikus amplifikációk eredményét. Sem az I-es csoport mintáinak, sem, a II-es csoport azoxistrobinra érzékeny mintáinak ampikonjainál nem volt emésztés. Ugyanakkor mind a tizennyolc HR fenotípusú II-es izolátum ~560-bp fragmentuma emésztődött. Ugyanezeknél a törzseknél adott pozitív eredményt az allélspecifikus PCR.

A G143A pontmutáció helyére tervezett allélspecifikus PCR-t a *BcAR-F/BcAR-R* primerekkel végeztük, ami csak a rezisztenciát eredményező mutáció esetén sikeres. A specifikus teszt azt mutatta, hogy csak a HR izolátumoknál történ amplifikáció, melyben 260 bp nagyságú szakasz szaporodott fel, de az S és LR fenotípusú *B. cinerea* mintáknál nem. A primer pár tehát specifikus volt a pontmutációt tartalmazó HR izolátumokra.

Összességében, a várakozásoknak megfelelően, a PCR reakcióval felszaporított *cyt b* fragmentekben kimutatható volt a a G-ről C-re történő mutáció miatt glicinről alaninra cserélődése a 143. pozícióban (G143A) a magyarországi, QoI rezisztenciával rendelkező, II-es csoportba tartozó, szabadföldi *B. cinerea* minták többségében. Minden olyan izolátum,

amelyben a G-ról C-re történő mutáció mind PCR-RFLP-vel, mind az allélspecifikus PCR-rel kimutatható volt, nagymértékű rezisztenciát mutatott azoxistrobinnal szemben.

A *cyt b* gén fragmentumok eltérő nagysága, alapján az I-es csoportba tartozó alternatív intron a magyarországi szabadföldi izolátumok jelentős részében (>32%). Néhány II-es csoportba tartozó izolátumnál mindkét (a ~560-bp nagyságú, és a ~ 1750-bp) fragmentum felszaporodott, ami a monospóras izolátumok heteroplazmiáját jelzi. Másrészt négy II-es csoportba tartozó HR fenotípust mutató minta *cyt b* génjében is kimutatható volt az alternatív intron jelenléte (a heteroplazmia detektálása nélkül). Az azoxistrobin rezisztenciát mutató minták jelentős részénél (a huszonnyolc HR izolátum közül ötnél) nem tudtuk kimutatni a G143A mutációt.

2.3. Az I-es és II-es csoport patogenitása

Eredményeink alapján az II-es csoport nagyobb patogenitású, mint az I-es csoport. Tehát az I-es és a II-es csoport kompetitív képessége a patogenitás szempontjából különbözött.

2.4. Két különböző gazdanövényről származó *B. cinerea* populációk összehasonlítása

Összesen 490 II-es csoportba tartozó *B. cinerea* izolátumot vizsgáltunk. A mintáknak először két kóroló szekvencia (a *nitrát reduktáz*, és az *ADP/ATP transzlokáz*) PCR-rel felszaporított fragmentumának restrikciós endonukleázzal történő hasítási képét (RFLP) nézzük meg. Mindkét gén PCR-RFLP analízse során két-két allélt kaptunk. Mindegyik mintázat megegyezett a korábban francia és chilei *B. cinerea* izolátumoknál leírtakkal (Giraud *et al.*, 1997, Muñoz *et al.*, 2002). A mikroszatek lelemzése az öz SSR lókuszon 167 különböző haplotípust eredményezett a vizsgált 469

izolátumnál. Az ATPáz kódoló *atp1* intronjának miniszatellit tartalmazó fragmentjét felszaporítottuk és szekvenáltattuk. Az elemzésbe bevont 490 izolátum között harminchét haplotípus fordult elő. A három különböző adat (a nitrát reductáz, és az ADP/ATP transzlokáz PCR-RFLP mintázata, a miniszatellit szekvenciák, és a mikroszatellit fragment nagyság) alapján a különböző populációk szerkezete hasonló volt a Nei-féle géndiverzitás, és a Shannon információs index alapján, valamint a haplotípus diverzitás alapján. Meg kell azonban jegyeznünk, hogy a kisebb mintaszám esetén mindig kisebb volt a diverzitás mértéke. A differenciációs index (G_{st}) és a génáramlás értékei alapján a szimpatikus populációk közötti különbség (elkülönülés) volt megfigyelhető. Ugyanakkor a differenciáció mértéke függött mind a mintaszám, mind az izolálás éve. A populációk genetikai paramétereit az elemzésben használt adatok polimorfizmusának mértéke is befolyásolta.

A megvizsgált, II-es csoportba tartozó mintáknál mind a négy transzpozon genotípus megtalálható volt, ami jelezte, hogy a különböző gazdanövényről származó izolátumoknál a transzpozon elemek genetikai áramlásának nincs akadályozva. Ezen túlmenően a „data-mining” elemzés alapján sem volt informatív a transzpozon tartalom, és nem használható a vizsgált *B. cinerea* populációk elkülönítésére. Eredményeinkhez hasonlóan nem lehetett összefüggést találni a transzpozonok előfordulása, és a *B. cinerea* testvérfajok, a gazdanövény specifikciás, vagy más paraméterek között (Muñoz *et al.*, 2002; Ma and Michailides, 2005; Váczy *et al.*, 2008). A PCR-RFLP markerek felhasználásával a *B. cinerea* II-es csoportba tartozó izolátumok a fertőzött gazdanövények szerinti elkülönülést mutatott (Giraud *et al.*, 1999; Muñoz *et al.*, 2002). Elemzéseinkben három különböző adatscsoportból (a nitrát reductáz, és az ADP/ATP transzlokáz PCR-RFLP mintázata, a miniszatellit szekvenciák, és a mikroszatellit fragment nagyság)

számított F-statisztika és génáramlás alapján a szamócáról és málnáról származó minták elkülönülést mutattak. Az adatok „data-mining”-al tötént elemzése is szignifikáns különbséget mutatott a különböző gazdanövényekről származó szimpatikus *B. cinerea* populációk között. A leginformatívabb markernek a mikroszatellitek bizonyultak, míg a transzpozonok ezzel az elemzési módszerrel sem bizonyultak informatívnak, és alkalmasnak a populációk közötti különbségek kimutatására. A mikrosatellit adatok Bayesian analízisével szintén kimutathatóak volt a differenciálódás. A gazdanövények eltérő fenológiai tulajdonságai, az időjárási hatások, valamint a *B. cinerea* fertőzéssel szembeni érzékeny fenofázis (virágzás, gyümölcsérés) eltérő ideje miatt csak kevés mintát tudtunk gyűjteni mindkét gazdanövényről ugyanazon időpontban. Termesztőberendezésekben lévő paradicsom kultúrákon már leírták a széllel terjedő *B. cinerea* spórák migrációjának szerepét, az egymást követő populációk, gyors változásának kialakításában (Alfonso *et al.*, 2000; Decognet *et al.*, 2009). A növények fenológiai változásai, és a fungicidek alkalmazásának hatására bekövetkező gyors váltás a Bayesian elemzéssel elkülöníthető két populáció között jól megfigyelhető volt 2008-ban, és 2009-ben. A szabadföldi *B. cinerea* populációkban is hasonló tendenciák voltak megfigyelhetőek, mint a termesztőberendezésekben. Számos paraméter (pl.: a növények eltérő fenológiai állapota, aminek hatására a széllel terjedő spórák eltérő mértékben tudják kolonizálni az egyes gazdanövényeket) befolyásolhatja a szimpatikus *B. cinerea* populációk gazdanövény specifitását. A gombapopulációk gyors megváltozását tapasztaltuk az egymást követő fungicides kezelések után, ami szintén alátámasztotta azt a hipotézist, hogy a levegőben található, a fogékony gazdanövényt újonnan kolonizáló *B. cinerea* populációk konidiumai játszottak szerepet a gazdanövényről izolált populációk megváltozásában. Az egyes *B. cinerea*

variánsok eltérő gazdanövény specifikitása szintén szerepet játszhat azonban ezekben a folyamatokban.

Összefoglalás

Elsőként sikerült kimutatni a *B. cinerea* I-es csoportjának ('*B. pseudocinerea*') jelenlétét nem Nyugat-Európából származó *B. cinerea* mintákban, ami alapján feltételezhető, hogy a csoport képes volt átjutni olyan földrajzi akadályokon, mint az Alpok, és megtelepedni a Kárpát-medencében. A repce, mint új gazdanövény került meghatározásra a *B. cinerea* I-es csoportjába tartozó mintáknál. A β -*tubulin* szekvenciák filogenetikai elemzése alapján a Magyarországi izolátumok ugyanabba a csoportba (clade) kerültek, mint a korábban azonosított Nyugat-Európai I-es csoportba tartozó izolátumok. A szimpatikusan előforduló *B. cinerea* testvérfajokat populációgenetikai megközelítések, és fenotipikus markerek alapján is jellemeztük. A populációgenetikai analízis fajokon belül nagymértékű diverzitást, és a fajok közötti génáramlás hiányát mutatta.

Vizsgáltuk a magyarországi szabadföldi *B. cinerea* izolátumok Qo inhibitorokkal (QoI) szembeni érzékenységét. Az izolátumok több, mint 20%-a mutatott rezisztenciát. Sikerült kimutatni a QoI hatáshelyén, a mitokondriális *citokróm b* génben a nagymértékű rezisztenciát eredményező g-ről c-re történő pontmutációt a 143. kodonon, ami a glicin alaninre cserélődését eredményezi (G143A). A magyarországi I-es és II-es *B. cinerea* csoportok további vizsgálata alapján gyakran megfigyelhető egy I-es típusú intron előfordulása a 143., glicint kódoló triplettet követően a *cyt b* génben. A különböző *cytb* allélokat hordozó, eltérő mitokondriális DNS együttes előfordulása (heteroplazmia) szintén megfigyelhető volt több monospóras izolátumban is.

Elvégeztük észak-magyarországi szimpatikus szamóca és málna gazdanövényekről, három egymást követő évben izolált II-es csoportba tartozó *B. cinerea* populációk elemzését. A standard populációgenetikai paramétereket három genetikai adatscsoporttal ((i) a *nitrát reduktáz*, és az *ADP/ATP transzlokáz* PCR-RFLP mintázata, (ii) a miniszatellit szekvenciák, és (iii) a mikroszatellit fragment nagyság) is elvégeztük. A Nei-féle géndiverzitás, és a haplotípus diverzitás alapján a különböző populációk szerkezete hasonló volt. Az F statisztika (F_{st} , G_{st}) és a génáramlás a szimpatikus populációk elkülönülését jelezte. A populációk genetikai paramétereit az elemzésben használt adatok polimorfizmusának mértéke is befolyásolta. Az adatok „data-mining”-al töltött elemzése alapján a mikroszatellitek bizonyultak a leginformatívabb genetikai markernek. Eredményeink alapján valószínűsíthető a gazdaspecificitás, és a polifág kórokozó szimpatikus differenciálódása az évelő növényeken.

Új tudományos eredmények:

I. Elsőként sikerült kimutatni a *B. cinerea* I-es csoportjának (*B. pseudocinerea*) jelenlétét nem Nyugat-Európából származó *B. cinerea* mintákban, ami alapján feltételezhető, hogy a csoport képes volt átjutni olyan földrajzi akadályokon, mint az Alpok, és megtelepedni a Kárpát-medencében.

II. A repce, mint új gazdanövényként jelent meg a *B. cinerea* I-es csoportjába tartozó mintáknál.

III. A szimpatikusan előforduló *B. cinerea* testvérfajokat populációgenetikai megközelítések, és fenotipikus markerek alapján is jellemeztük. A populációgenetikai analízis fajokon belül nagymértékű diverzitást, és a fajok közötti génáramlás hiányát mutatta.

IV. A magyarországi I-es és II-es *B. cinerea* izolátumokban gyakran volt megfigyelhető egy I-es típusú intron előfordulása a 143., glicint kódoló tripletet követően a *cyt b* génben.

V. A különböző *cyt b* allélok hordozó, eltérő mitokondriális DNS együttes előfordulása (heteroplazmia) szintén megfigyelhető volt több magyarországi monospóras izolátumban.

VI. A II-es csoportba tartozó *B. cinerea* izolátumok gazdaspecifikus, szimpatikus divergenciája volt megfigyelhető három genetikai adatszóporttal ((i) a *nitrát reductáz*, és az *ADP/ATP transzlokáz* PCR-RFLP mintázata, (ii) a miniszatellit szekvenciák, és (iii) a mikroszatellit fragment nagyság) is végezett analízis alapján.

VII. A „data-mining” elemzése alapján a mikroszatellit lokuszok voltak a leginformatívabb genetikai markernek a II-es csoportba tartozó *B. cinerea* izolátumok gazdanövény szerinti elkülönítésében.

Genetic diversity of *Botrytis cinerea* and its relevance in the development of fungicide resistance

PhD Thesis

Mojtaba Assadollahi

1. Introduction

The necrotrophic fungus *Botrytis cinerea* Pers. Fr. (teleomorph *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel) is the causal agent of grey mould in many economically important crops. Several studies have suggested that *B. cinerea* is not one clearly defined species but rather a species complex, with a restricted gene flow between different cryptic genetic groups (Giraud *et al.*, 1997; Albertini *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003, 2005). Based on molecular studies of different nuclear genes *B. cinerea* populations are grouped into two different clades in the various gene phylogenies, group I and group II, i.e., phylogenetic species (Albertini *et al.*, 2002; Fournier *et al.*, 2003). Described group I isolates are exclusively from the *vacuma* transposon type, while group II can feature *transposa*, *flipper* (containing only Flipper), *boty* (containing only Boty) or *vacuma* genotype (Ma & Michailides, 2005; Isenegger *et al.*, 2008). DNA polymorphism and vegetative incompatibility studies revealed that the genetic diversity is lower in group I than group II. In addition, the two groups present differences in morphology, phenotypic characteristics and host range (Fournier *et al.*, 2005). Moreover, group I isolates have been mainly found in spring on

grapevine, group II isolates have been collected both in spring and in fall (Fournier *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2005).

Resistance of *B. cinerea* to fungicides already occur worldwide (Esterio *et al.*, 2007). Moreover, there is an ever increasing negative public perception regarding the impact of pesticide use on human health and the environment. In order to establish strategies for sustainable fungicide management on the field, information on the population dynamics of fungicide resistance of pathogens is essential (Yoon *et al.*, 2008).

Genetic structure of *B. cinerea* populations were studied several time (Giraud *et al.*, 1997; Alfonso *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2002; Ma & Michailides, 2005). Recently, Fournier and Giraud (2008) reported a significant genetic structure variation within *B. cinerea* group II comparing samples isolated from two natural host plants, grapevine and bramble, using microsatellite markers. That indicated a restricted gene flow, even in sympatry. Similarly, Rajaguru and Shaw (2010) and Muñoz *et al.* (2010) found genetic differentiation and diversity correlations between hosts and locations in populations of *B. cinerea* in southern England and Argentina, respectively. On the other hand, Karchani-Balma *et al.* (2008) studied the genetic structure of *B. cinerea* populations in Tunisia on different hosts in various regions using microsatellite markers but could not detect a clear correlation between the plant host and fungal differentiation.

The aims of this thesis were to provide a better understanding of Hungarian *B. cinerea* populations firstly, by recognizing and distinguishing group I and group II *B. cinerea* isolates in Hungary using several genetic markers and comparing their suitability for assessing the population structure and diversity of this widespread plant pathogenic fungus. Secondly, molecular mechanisms of QoI fungicide resistance and genetic basis of this resistance were investigated in Hungarian *B. cinerea*. Furthermore, pathogenicity of

group I and group II of *B. cinerea* were examined. Thirdly, we investigated the genetic structure of *B. cinerea* group II sympatric populations, infecting two cultivated perennial hosts (strawberry and raspberry) in the open field in Hungary. We employed three different molecular methods (RFLP analysis microsatellites and a minisatellite) to study the population genetics during three years.

2. Results and Discussion

2. 1. Comparison of group I and group II

The electrophoresis profile of a PCR-amplified *Bc-hch* fragment digested with the *Hha*I endonuclease resulted in two distinct restriction patterns. The PCR-RFLP profile of the *Bc-hch* locus suggested that only 13 strains (14% of all) belonged to the group I *B. cinerea* cryptic species isolated from oilseed rape and strawberries in April, May and early June in 2008. The parsimony analysis of the *β-tubulin* sequences clearly separates group I from group II. The *β-tubulin* sequence analyses supported the results of *Bc-hch* PCR-RFLP results, identifying the same 13 isolates as belonging to the group I cryptic species.

Transposable elements were detected in the entire group I collection and in all but one of the group II isolates. The large majority (92%) of group I isolates harbored only the Boty transposon, while *transposa* (62%) and *boty* (34 %) were the most frequent genotypes encountered among the group II isolates. Few group II isolates (2 strains) carried only the Flipper element (2.5%). We could not detect any transposon-specific hybridization in one of the group II isolates (1.26%).

All group I isolates did not carry any typical allele for any of the five microsatellite loci and no indistinguishable microsatellite haplotypes were found between group I and II isolates. The number of alleles and the genetic

diversity appeared lower for all five microsatellites in group I, but it should be noted that we analyzed far more group II isolates.

We described for the first time the existence of the *B. cinerea* group I ('*B. pseudocinerea*') cryptic species outside of Western Europe, possibly suggesting that it was able to spread beyond geographic barriers such as the Alps and to settle in the Carpathian Basin. In addition, oilseed rape was identified as a new host for *B. cinerea* group I. Group I strains were present at spring, in agreement with other studies (Fournier *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2005). In agreement with previous studies (Fournier and Giraud, 2008; Karchani-Balma *et al.*, 2008; Rajaguru and Shaw, 2010), group II isolates showed higher genetic diversity than group I strains. This finding suggests a higher adaptive potential (e.g. towards new hosts), and in general may indicate that these strains are more successful pathogens. Our results indicated that molecular markers based on transposon content alone has limited value on defining population structures and are not useful in *B. cinerea* cryptic speciation either.

The results did not confirmed the complete separation of that the two cryptic species previously determined with genealogical concordance of the phylogenetic species recognition using multiple gene sequences, and suggesting the possibility of information exchange between them.

2. 2. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea*

A total of 157 Hungarian *B. cinerea* isolates were tested for QoI fungicide resistance on media containing azoxystrobin. Twenty eight (18 %) isolates were classified as highly resistant (HR) and forty eight (30 %) exhibited a low resistance (LR) while the majority of the isolates, eighty one (52 %) were sensitive (S) to azoxystrobin when the plates were incubated at 25 °C for two days. High azoxystrobin resistance was exclusively encountered

amongst group II strains, while group I isolates, with one exception, were all classified as sensitive to the QoI.

A major sequence variation in the *cyt b* gene was observed among the Hungarian *B. cinerea* isolates. The primer pair *cytb*-BcF/*cytb*-BcR amplified two different PCR fragments. The larger ~ 1750-bp fragment, indicated the presence of the alternative intron and was amplified in forty six (29 %) isolates. The smaller ~ 560-bp fragment, without the alternative intron, was generated in 106 (68 %) isolates. Interestingly, five (3 %) isolates gave rise to both PCR fragments indicating the occurrence of *cyt b* heteroplasmy in the Hungarian *B. cinerea* population.

Analysis of the sequences of the *cyt b* PCR products amplified with *cytb*-BcF/*cytb*-BcR from six S strains and four HR strains showed that the wild-type GGT codon of the glycine at position 143 was present in S isolates where a GCT codon occurred in the HR isolates.

PCR-RFLP analysis was carried out by digesting the *cytb*-BcF/*cytb*-BcR amplification products with *SatI* restriction enzyme to confirm the results from (G143A) allele-specific PCR with BcAR-F/BcAR-R primer pairs. None of the *cyt b* PCR fragments generated from group I strains and azoxystrobin-sensitive (S) group II isolates were digested following enzyme treatment, whereas the ~ 560-bp *cyt b* fragments from eighteen HR group II strains were digested. The same strains were also identified with (G143A) allele-specific PCR.

Based on the point mutation G143A, a pair of allele-specific primers BcAR-F + BcAR-R were developed for the detection of *B. cinerea* isolates having this mutation. A specificity test showed that the primer pair amplified a 260 bp fragment only from the HR isolates, but not from any other S and LR isolates of *B. cinerea*, which indicated that the primer pair was specific to the HR isolates having the point mutation.

In conclusion, as it was expected, PCR-amplified cytochrome *b* gene fragments of many QoI-resistant field isolates showed the mutational change causing the glycine to alanine (Ala) (G143A) substitution and presence of the resistance-conferring G-to-C mutation was thus confirmed in Hungarian group II populations. All isolates, where the G-to-C mutation could be detected with both PCR-RFLP and allele-specific PCR, showed high resistance against azoxystrobin. PCR fragment length analysis of *cyt b* strongly suggested the presence of the alternative group I intron in a considerable part (> 32 %) of the Hungarian *B. cinerea* field isolate collection. Some group II isolates gave rise to both fragments (~ 1750 bp and ~ 560 bp), which could imply *cyt b* heteroplasmy in monosporic isolates. On the contrary, four HR group-II strains were identified in this study that possessed the alternative intron (without detectable heteroplasmy) in the *cyt b* gene. Remarkably, a considerable number of group-II strains (nine of twenty eight HR strains) exhibited high azoxystrobin resistance where the resistance-conferring G143A substitution could not be evidenced.

2. 3. Pathogenicity of group I and group II

The results showed that the pathogenicity of group II is stronger than pathogenicity of group I. On the other hand, group I and group II are different in competitive ability in terms of pathogenicity.

2. 4. Comparison of *B. cinerea* populations isolated from two host plants

Altogether, 490 of group II *B. cinerea* isolates were analyzed. Isolates were first analyzed with RFLPs by amplifying two coding sequences (the genes encoding a *nitrate reductase* and an *ADP/ATP translocase*) and PCR amplicons were then digested with restriction enzymes. Two different alleles were identifiable for both genes with PCR-RFLP analysis. The sizes of the

RFLP-fragments of both genes found in all distinct types of Hungarian isolates were essentially identical to those detected in French and Chilean *B. cinerea* isolates (Giraud *et al.*, 1997, Muñoz *et al.*, 2002). Microsatellite analysis at five SSR loci produced 167 haplotypes among the 469 isolates screened. Also, the fragment of the intron of the ATPase gene *atp1* containing the minisatellite was amplified and sequenced. Thirty-seven haplotypes among the 490 isolates could be detected. According to three different datasets (PCR-RFLP pattern of *ADP-ATP translocase* and *nitrate reductase* genes, MSB1 minisatellite sequence data, and fragment size of five microsatellite loci) the structure of the different populations was similar as indicated by Nei's gene diversity and Shannon's information index, and also by haplotype diversity. It should be noted, that a reduced sample size was accompanied by reduced population diversity. The computed index of differentiation (G_{st}) and gene flow indicated differentiation within the sympatric populations. However, the differentiation was also affected by the sample size and the year of isolation. Population genetic parameters were also influenced by the level of polymorphism of the datasets.

The detection of all four possible transposon genotypes in Hungarian group II isolates in this work indicated that there is no significant barrier to gene flow of transposons or any relevant difference among isolates from the different host plants under study. Moreover, data-mining analysis did not identify transposon content information as particularly important or even indicative for the differentiation of *B. cinerea* populations. Similar to our present results, weak correlations were found between transposon frequency or type and the *B. cinerea* cryptic species, host specificity, or other observed variation within *B. cinerea* populations (Muñoz *et al.*, 2002; Ma and Michailides, 2005; Váczy *et al.*, 2008). Using PCR-RFLP markers, several studies (Giraud *et al.*, 1999; Muñoz *et al.*, 2002) indicated that *B. cinerea*

group II populations are structured according to infected host plants, i.e., isolates from the same host exchange genes more frequently with each other than with isolates from another host. In this work, we employed three different data sets and conclude that the F statistic results, and gene flow strongly suggested differentiation within the sympatric populations on strawberry and raspberry. Data mining analysis corroborated that there were significant differences between the *B. cinerea* sympatric populations infecting the two hosts. The most informative markers turned out to be the microsatellites, while transposons were not informative and suitable for population differentiation in our study. The Bayesian analysis of the microsatellite data set highlighted the basis of differentiation. Because of the different phenological characteristics of the perennial hosts, the influence of meteorology, and variable sensitivity during the annual life cycle (flowering, fruit maturation) for *B. cinerea* infection, only a restricted number of isolates could be collected at the same time from the two hosts. The importance of spore migration and a subsequent, rapid change in *B. cinerea* populations in tomato greenhouses has been noticed previously (Alfonso *et al.*, 2000; Decognet *et al.*, 2009). The rapid shift in predominance between two population clusters with the progress of the annual phenology and after fungicide application(s) in 2008 and, particularly, in 2009 indicated that the same phenomena occurred with open-field hosts on adjacent fields. Sympatric specificity of *B. cinerea* growing on different hosts may be influenced by several parameters, like differences in the phenology of the hosts, as populations of migrating spores encounter host plants in a different phenophase. The sudden change of fungal population observed following fungicide treatment of infected plants supports the hypothesis that a change of the *B. cinerea* population in the air, in the form of vegetative spores, could

result in an abrupt change of *B. cinerea* populations on hosts. However, eventual host preferences of *B. cinerea* variants may also play a role.

Summary

We described for the first time the existence of the *B. cinerea* group I ('*B. pseudocinerea*') cryptic species outside of Western Europe, in Hungary, possibly suggesting that it was able to spread beyond geographic barriers such as the Alps and to settle in the Carpathian Basin. In addition, oilseed rape was identified as a new host for *B. cinerea* (group I). Phylogenetic analysis of partial β -*tubulin* sequences put these Hungarian isolates into the same clade with Western-European group I isolates collected earlier. Sympatric *B. cinerea* cryptic species were analyzed using a population genetic approach and phenotypic markers. Population genetics analysis revealed a high level of diversity within each species and a lack of gene flow between them.

Sensitivity of the Hungarian *B. cinerea* field isolates to a QoI inhibitor (QoI) fungicide azoxystrobin was screened in this study. Resistance has been reported in more than 20 % isolates. In various QoI-resistant monosporic *B. cinerea* isolates from Hungary, a G-to-C point mutation was identified in the mitochondrial gene that encodes the QoI target, cytochrome *b*, resulting in a glycine to alanine substitution at position 143 (G143A). Analysis of Hungarian group I and group II strains further indicated the frequent occurrence of an additional group I-type intron in the *cytb* gene directly downstream of the glycine-143 codon. Mutual presence of distinct mitochondrial DNAs specifying different *cytb* alleles (heteroplasmy) has also been detected in monosporic strains.

We analyzed populations of group II *B. cinerea* on sympatric strawberry and raspberry cultivars in North-East of Hungary for three years growing seasons. Standard population genetic data were computed from three different data sets: (i) PCR-RFLP pattern of *ADP-ATP translocase* and *nitrate reductase* genes, (ii) MSB1 minisatellite sequence data, and (iii) fragment size of five microsatellite loci. The structures of the different populations were similar as indicated by Nei's gene diversity and haplotype diversity. The F statistics (F_{st} , G_{st}), and the gene flow indicated ongoing differentiation within sympatric populations. The population genetic parameters were influenced by polymorphisms within the three data sets. Data mining analysis pointed towards the five microsatellite loci as the most defining markers to study differentiation in all isolates. The results suggest the occurrence of host-specific, sympatric divergence of generalist phytoparasites in perennial hosts.

New scientific results:

I. We described for the first time the existence of the *B. cinerea* group I ('*B. pseudocinerea*') cryptic species outside of Western Europe, in Hungary, possibly suggesting that it was able to spread beyond geographic barriers such as the Alps and to settle in the Carpathian Basin.

II. Oilseed rape was identified as a new host for *B. cinerea* (group I).

III. Sympatric *B. cinerea* cryptic species were analyzed using a population genetic approach and phenotypic markers. Population genetics analysis revealed a high level of diversity within each species and a lack of gene flow between them.

IV. Analysis of Hungarian group I and group II strains indicated the frequent occurrence of an additional group I-type intron in the *cytb* gene directly downstream of the glycine-143 codon.

V. Mutual presence of distinct mitochondrial DNAs specifying different *cytb* alleles (heteroplasmy) has also been detected in Hungarian monosporic strains.

VI. The occurrence of host-specific, sympatric divergence of group II *B. cinerea* populations in perennial hosts (strawberry and raspberry) were proved with the molecular population biology analysis of three different data sets: (i) PCR-RFLP pattern of *ADP-ATP translocase* and *nitrate reductase* genes, (ii) MSB1 minisatellite sequence data, and (ii) fragment size of five microsatellite loci.

VII. Data mining analysis pointed the five microsatellite loci as the most defining markers to study differentiation of *B. cinerea* group II isolates from different hosts (strawberry and raspberry).

Irodalomjegyzék / References

- Albertini, C., Thebaud, G., Fournier, E. and Leroux, P., 2002. Eburicol 14a-demethylase gene (*cyp51*) polymorphism and speciation in *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 106: 1171-1178.
- Alfonso, C., Raposo, R. and Melgarejo, P. 2000. Genetic diversity in *Botrytis cinerea* populations on vegetable crops in greenhouses in south-eastern Spain. *Plant Pathology*, 49: 243-251.
- Decognet, V., Bardin, M., Trottin-Caudal, Y., Nicot, P.C. 2009. Rapid change in the genetic diversity of *Botrytis cinerea* populations after the introduction of strains in a tomato glasshouse. *Phytopathology*, 99: 185-193.
- Esterio, M., Auger, J., Ramos, C. and García, H. 2007. First report of fenhexamid resistant isolates of *Botrytis cinerea* on grapevine in Chile. *Plant Disease*, 91: 768.
- Fournier, E., Giraud, T. and Brygoo, Y. 2005. Partition of the *Botrytis cinerea* complex in France using multiple gene genealogies. *Mycologia*, 97: 1251-1267.
- Fournier, E. and Giraud, T. 2008. Sympatric genetic differentiation of a generalist pathogenic fungus, *Botrytis cinerea*, on two different host plants, grapevine and bramble. *Journal of Evolutionary Biology*, 21: 122–32.
- Fournier, E., Levis, C., Fortin, D., Leroux, P., Giraud, T. and Brygoo, Y., 2003. Characterization of *Bc-hch*, the *Botrytis cinerea* homolog of the *Neurospora crassa* *het-c* vegetative incompatibility locus, and its use as a population marker. *Mycologia*, 95: 251-261.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P. and Brygoo, Y. 1997. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular and Biological Evolution* 14: 1177-1185.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., LoBuglio, K. and Brygoo, Y. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology*, 89: 967- 973.
- Isenegger, D. A., Ades, P. K., Ford, R. and Taylor, P. W. J. 2008. Status of the *Botrytis cinerea* species complex and microsatellite analysis of transposon types in South Asia and Australia. *Fungal Diversity*, 29: 17-26.

- Karchani-Balma, S., Gautier, A., Raies, A. and Fournier, E. 2008. Geography, plants, and growing systems shape the genetic structure of Tunisian *Botrytis cinerea* populations. *Phytopathology*, 98: 1271–9.
- Ma, Z. H. and Michailides, T. J. 2005. Genetic structure of *Botrytis cinerea* populations from different host plants in California. *Plant Disease*, 89: 1083-1089.
- Martinez, F., Dubos, B. and Fermaud, M. 2005. The role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology*, 95: 692–700.
- Muñoz, C., Talquenca, S. G., Oriolani, E. and Combina, M. 2010. Genetic characterization of grapevine-infecting *Botrytis cinerea* isolates from Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27: 66–70.
- Muñoz, G., Hinrichsen, P., Brygoo, Y. and Giraud, T. 2002. Genetic characterization of *Botrytis cinerea* populations in Chile. *Mycological Research*, 106: 594-60.
- Rajaguru, B. A. P. and Shaw, M. W. 2010. Genetic differentiation between hosts and locations in populations of latent *Botrytis cinerea* in southern England. *Plant Pathology*, 59: 1081–90.
- Váczy, K. Z., Sándor, E., Karaffa, L., Fekete, E., Fekete, É., Árnayasi, M., Czeglédi, L., Kövics, G. J., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P. 2008. Sexual recombination in the *Botrytis cinerea* populations in Hungarian vineyards. *Phytopathology*, 98: 1312–9.
- Yoon, C. S., Ju, E. H., Yeoung, Y. R. and Kim, B. S. 2008. Survey of fungicide resistance for chemical control of *Botrytis cinerea* on paprika. *Plant Pathol. J.*, 24: 447-452.

International, peer-reviewed publications related to the thesis / A doktori értekezés témájához kapcsolódó nemzetközi, referált közlemények

Asadollahi, M., Fekete, E., Karaffa, L., Flippi, M., Árnási, M., Esmaili, M., Váczy, K., Sándor, E. (2013): Comparison of *Botrytis cinerea* populations isolated from two open-field cultivated host plants. *Microbiological Research* (in press) <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.12.008>. **IF: 2.308**

Asadollahi, M., Szojka, A., Fekete, E., Karaffa, L., Takács, F., Flippi, M., Sándor, E. (2013): Quinol oxidation inhibitor (QoI) fungicide resistance and cytochrome *b* diversity in the Hungarian *Botrytis cinerea* population. *Journal of Agricultural Science and Technology* Vol. 15 (2): (in press). **IF: 0.436**

Fekete, É., Fekete, E., Irinyi, L., Karaffa, L., Árnási, M., **Asadollahi, M.**, Sándor, E. (2012): Genetic diversity of a *Botrytis cinerea* cryptic species complex in Hungary. *Microbiological Research* 167, 283-291. **IF: 2.308**

Other publications related to the thesis / A doktori értekezés témájához kapcsolódó további közlemények

Asadollahi, M., Fekete, É., Fekete, E., Karaffa, L., Irinyi, L., Sándor, E., (2010): Cytochrome *b* diversity of Hungarian *Botrytis cinerea* strains. *Acta Agraria Debreceniensis*, 39, 18-21.

Szojka, A., **Asadollahi, M.**, Fekete, É., Fekete, E., Karaffa, L., Irinyi, L., Sándor, E., (2011): Q-PCR analysis of the resistance of Hungarian *Botrytis cinerea* isolates toward Azoxystrobin. *Acta Agraria Debreceniensis*, 43, 41-44.

Takács, F., **Asadollahi, M.**, Sándor, E., (2011): Azoxystrobin resistance of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. Isolates. *Acta Agraria Debreceniensis*, 43, 56-63.

Asadollahi, M., Fekete, É., Fekete, E., Karaffa, L., Sándor, E., (2011): Pathogenicity differences between group I and group II of *Botrytis cinerea*. *Acta Agraria Debreceniensis*, 43, 81-85.

Poster and oral presentations related to the thesis

M. Asadollahi, É. Fekete, E. Fekete, L. Karaffa, L. Irinyi, E. Sándor (2010): Cytochrome *b* diversity of Hungarian *Botrytis cinerea* strains. *Power of Microbes in Industry and Environment*, 22-25 Sep. Malinska, Croatia. (Poster Presentation)

É. Fekete, L. Irinyi, **M. Asadollahi**, E. Fekete, L. Karaffa, E. Sándor (2010): Possible genetic information exchange between *Botrytis cinerea* group I and II isolates in Hungary. *Power of Microbes in Industry and Environment*, 22-25 Sep. Malinska, Croatia. (Poster Presentation)

É. Fekete, **M. Asadollahi**, L. Irinyi, E. Fekete, L. Karaffa, E. Sándor (2010): Differences between sympatric *Botrytis cinerea* populations in Hungary. *Power of Microbes in Industry and Environment*, 22-25 Sep. Malinska, Croatia. (Poster Presentation)

M. Asadollahi, É. Fekete, E. Fekete, L. Irinyi, L. Karaffa, M. Árnási, A. Szójka, G. Kövics, E. Sándor (2011): Comparison of *Botrytis cinerea* populations isolated from two cultivated host plants. 15th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles, September 27 - 30, 2011, Marseilles, France, Abstract Book pp 135. (Poster Presentation)

Fekete É., Fekete E., Irinyi L., Karaffa L., Árnási M., **Asadollahi M.**, Kövics Gy.J., Sándor E. (2011): Genetic diversity within the cryptic species of *Botrytis cinerea* causing grey mold on different crops in Hungary. 15th Evolutionary Biology Meeting at Marseilles, September 27 - 30, 2011, Marseilles, France, Abstract Book pp 74-75. (Poster Presentation)

Asadollahi M., Fekete É., Fekete E., Irinyi L., Karaffa L., Árnási M., Szójka A., Kövics Gy.J., Sándor E. (2011): Comparison of *Botrytis cinerea* populations isolated from two cultivated host plants. *Botrytis-Sclerotinia* Post-Genome workshop, 15th-17th September 2011, Lyon, France, Abstract Book pp 27. (Poster Presentation)

Asadollahi, M. (2012): Bayesian algorithm for better understanding population structures and changes. Conference on Innovative Information Technologies in Agriculture, 21th-22th September, Debrecen, Hungary. (Oral Presentation)

Papers unrelated to the thesis

Javidnia, K., Miri, M., **Assadollahi, M.**, Gholami, M. and Ghaderi, M. (2009): Screening of selected plants growing in Iran for antimicrobial activity. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 33 (4), 329-333. **IF: 0.01**

Firuzi, O., **Asadollahi, M.**, Gholami, M., Javidnia, K., (2010): Composition and biological activities of essential oils from four *Heracleum* species. *Food Chemistry*, 122, 117-122. **IF: 3.655**

Javidnia, k., Miri, M., **Assadollahi, M.**, (2011): Constituents of the essential oil of *Berula angustifolia* (L.) Mertens & W. D. Koch from Iran. *Chemistry of Natural Compounds*, 46 (6), 990-991. **IF: 1.029**

Jassbi, A. R., **Asadollahi, M.**, Masroor, M., Schuman, M. C., Mehdizadeh, Z., Soleimani, M., Miri, R. (2012): Chemical Classification of the Essential Oils of the Iranian *Salvia* Species in Comparison to their Botanical Taxonomy. *Chemistry & Biodiversity*, 9 (7): 1254-71. **IF: 1.804**

Jassbi, A. R., **Asadollahi, M.**, Reisnejadian, S. Miri, R. 2013: Essential oil of *Tanacetum dumosum* as new source for fragranol. *Chemistry of Natural Compounds* (accepted). **IF: 1.029**

Jassbi, A., Ghaedi, M., Mirzaei, Y., **Asadollahi, M.**, Miri, R. (2012): Isolation and structural elucidation of natural products in *Euphorbia erythradenia*. *Research in Pharmaceutical Sciences*, 7(5): 755.

Jassbi, A. R., Miri, R., Masroorbabanari, M, **Asadollahi, M.** HPLC-DAD-ESIMS Analyses of *Hyoscyamus niger* and *H. reticulatus* for their Antioxidant Constituents, *Natural Product Research* (submitted).

Jassbi, A. R., Miri, R., **Asadollahi, M.** Javanmardi, N., Firuzi, O. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial effects of nine species of woundwort (*Stachys*) plants. *Pharmaceutical Biology*, (submitted).

Firuzi, O., Miri, R., **Asadollahi, M.**, Eslami, S., Jassbi, A. R. Iranian sages as sources for cytotoxic, antioxidant and antimicrobial natural products. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (submitted).