

بررسی تنوع ژنوتیپی در جدایه‌های *Phytophthora capsici* متعلق به

استانهای مختلف ایران*

Investigation of genotypic variation among *Phytophthora capsici* isolates recovered from different provinces of Iran

سیده معصومه زمانی، عزیزاله علیزاده** و ناصر صفایی

گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

پذیرش ۱۳۸۶/۶/۱۹

دریافت ۱۳۸۵/۸/۱۰

چکیده

پوسیدگی طوقه، ریشه و بلایت فیتوفتورایی ناشی از *Phytophthora capsici* از بیماریهای مهم محصولات زراعی می‌باشد. به منظور مطالعه تنوع و یا همسانی موجود در ساختار ژنتیکی جمعیت *P. capsici* در ایران، از مجموع ۷۹ جدایه جمع‌آوری شده این قارچ، تعداد ۲۹ جدایه نماینده که بیشترین تنوع را در ویژگی‌های ریخت‌شناسی داشتند انتخاب شده، از نظر پلی‌مورفیسم DNA حاصل از نشانگرهای RAPD و ISSR مورد بررسی قرار گرفتند. از میان ۱۲ آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی مورد بررسی، پنج آغازگر براساس وضوح، تکرارپذیری و تعداد باندهای پلی‌مورفیک به همراه آغازگر ۲۷ نوکلئوتیدی ISSR انتخاب شده، مورد استفاده قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل خوشه‌ای الگوی باندهای بدست آمده از پنج آغازگر تصادفی نشان داد که این آغازگرها در سطح تشابه ۵۵ درصد جدایه‌ها را به دو گروه تقسیم نمودند. گروه اول ۲۴ و گروه دوم ۷۶ درصد از جدایه‌ها را در بر گرفتند. این ترکیب از آغازگرهای تصادفی با قرار دادن جدایه‌های فارس و خوزستان در گروه اول و سایر جدایه‌ها در گروه دوم توانست جدایه‌های نواحی گرمسیری را از سایر جدایه‌ها تفکیک نماید. نتایج حاصل از آنالیز

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشگاه تربیت مدرس

** مسئول مکاتبه

خوشه‌ای با آغازگر ISSR نشان داد که در سطح تشابه ۴۰ درصد جدایه‌ها به چهار گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول ۱۷/۵ و سایر گروه‌ها هر یک ۲۷/۵ درصد از جدایه‌ها را در بر گرفتند. جدایه‌های مازندران و گلستان در گروه اول، جدایه‌های فارس و خوزستان به همراه یک جدایه از قزوین در گروه دوم، جدایه‌های اردبیل و آذربایجان شرقی در گروه سوم و جدایه‌های تهران و قزوین در گروه چهارم جای گرفتند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل الگوهای باندهای حاصل از آغازگرهای تصادفی و آغازگر ISSR در سطح تشابه ۵۵ درصد جدایه‌ها را به پنج گروه تقسیم نمود. گروه اول جدایه‌های مازندران و گلستان، گروه دوم جدایه‌های فارس و خوزستان، گروه سوم یک عدد از جدایه‌های قزوین، گروه چهارم جدایه‌های آذربایجان شرقی و اردبیل و گروه پنجم جدایه‌های تهران و قزوین را در بر گرفت و درصد فراوانی جدایه‌های هر گروه به ترتیب ۱۷/۵، ۲۴، ۳/۵، ۲۷/۵ و ۲۷/۵ درصد بود. این اولین مطالعه در زمینه تنوع ژنتیکی جمعیت‌های ایرانی *P. capsici* توسط نشانگرهای RAPD و ISSR می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تنوع، ژنوتیپی، جمعیت، *Phytophthora capsici*

مقدمه

فیتوفتورا (*Phytophthora*) جنسی مهم از بیمارگرهای گیاهی اُمیست است (Brasier 1992). این جنس دارای ۶۷ گونه‌ی شناخته شده می‌باشد که همگی آن‌ها از بیمارگرهای مهم گیاهی و از عوامل پوسیدگی ریشه، ساقه، برگ و میوه روی طیف وسیعی از گیاهان میزبان (بیش از هزاران گونه گیاهی) از جمله تعداد زیادی از درختان، گیاهان زیتنی و گیاهان زراعی در جهان هستند و سالانه موجب میلیاردها دلار خسارت در سراسر دنیا می‌گردند (Erwin & Ribeiro 1996, Brasier 1992). یکی از گونه‌های مهم اقتصادی در این جنس *Phytophthora capsici* Leonian می‌باشد. این بیمارگر موجب بیماری‌های بلایت فیتوفتورایی بسیار مخرب روی محصولات کدوینان، سیب‌زمینیان، همچنین محصولاتی مثل لوبیا، چغندر، شلغم، کاکائو، پاپایا و بسیاری از دیگر محصولات مهم در جهان می‌گردد (Erwin & Ribeiro 1996, Ristaino & Johnston 1999, Babadoost, Lamour & Hausbeck 2000, Hausbeck & Lamour 2004, 2004) و به صورت یک تهدید جدی برای تولیدکنندگان

محصولات زراعی درآمده است (Tamietti & Valentino 2001).

تاکسونومی و نام‌گذاری *P. capsici* برای سالیان متممادی مورد بحث بوده است. تعدادی از محققین معتقد بودند که گونه *P. palmivora* MF4 باید تحت گونه *P. capsici* معرفی شود چراکه شباهت‌های ریخت‌شناسی زیادی بین این دو گروه وجود دارد (Kunimoto et al. 1976). از طرف دیگر کاسیری (Kasiri 1978) یک گروه از جدایه‌های *P. palmivora* MF4 را از کاکائو به دلیل آنتوژنی اسپورانژیوم و نحوه جوانه‌زنی اسپور آن‌ها در وارپته‌ای به نام *P. capsici* var. *vannusa* قرار داد. مطالعات بعدی توسط علیزاده (Alizadeh 1983) ضمن رد نمودن این نظریه کاسیری (Kasiri 1978)، نشان داد که به دلیل اشتراک در بسیاری از خصوصیات پایدار و قابل تشخیص، جدایه‌های این دو گروه می‌بایست تحت یک گونه با نام *P. capsici* طبقه‌بندی شوند. به این ترتیب با اصلاح توصیف این گونه، جدایه‌های *P. palmivora* MF4 که روی کاکائو و فلفل سیاه بیماری‌زا هستند، در این گونه قرار گرفتند (Tsao & Alizadeh 1988). از طرفی سایر محققین گونه جدیدی به نام *P. tropicalis* را برای جدایه‌هایی از فلفل سیاه، کاکائو، ماکادامیا، پاپایا و دیگر جدایه‌های مناطق گرمسیری پیشنهاد نمودند (Aragaki & Uchida 1992, Uchida & Aragaki 1989). با وجود این مطالعات صورت گرفته هنوز جایگاه تاکسونومیک این گونه به روشنی مشخص نشده و از آنجایی که مرزهای این گونه بسیار گسترده شده است؛ تفاوت‌های زیادی بین جمعیت‌های آن وجود دارد (Tamietti & Valentino 2001). به‌طور مثال تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های این قارچ از مناطق مختلف جغرافیایی کشت محصولات، در سراسر جهان گزارش شده است (Babadoost 2004). علاوه بر این، مطالعات ایزوزایمی نیز نشان داده است که *P. capsici* از نظر ژنتیکی گونه پیچیده‌ای بوده و تنوع زیادی بین جمعیت‌های آن به چشم می‌خورد (Alizadeh 1983, Mchau & Coffey 1995, Oudemans & Coffey 1991).

یکی از مهمترین دلایل عدم موفقیت در مدیریت بیماری‌های گیاهی مربوط به ناقص بودن اطلاعات ما در مورد ساختار ژنتیکی جمعیت‌های بیمارگر می‌باشد و بالا بردن اطلاعات در این زمینه مسلماً در اتخاذ روش‌های موثر کنترل و تنظیم استراتژی‌های کنترل کارآمدتر نقش خواهد داشت (Tamietti & Valentino 2001, Martin & English 1997). از طرف دیگر جمعیت

بیمارگرها رو به تکامل است چراکه باید با تغییرات محیطی، از جمله تناوب زراعی، کاربرد ارقام مقاوم، قارچ‌کش‌ها و آبیاری سازگاری حاصل کنند؛ بنابراین اگر بخواهیم استراتژی‌های کنترل موثر واقع شوند می‌بایست به جای تمرکز روی حالت انفرادی و ویژه، جمعیت‌ها را هدف قرار دهیم (McDonald 1997).

سابقاً یافتن تمایز در جمعیت قارچ‌های مختلف توسط بررسی معیارهای ریخت‌شناسی، بیماری‌زایی، تیپ‌های آمیزشی مختلف و خصوصیات فیزیولوژیک صورت می‌گرفت، اما در میان جدایه‌های مختلف از یک گونه خاص که احتمالاً خیلی شبیه و دارای ویژگی‌های یکسان هستند یافتن صفات مناسب متمایزکننده می‌تواند مشکل و یا غیرممکن باشد و نیاز به تخصص بالائی دارد (Ristaino & Johnston 1999). از طرف دیگر زمان‌بر، محدود و تغییرپذیر بودن خصوصیات ریخت‌شناسی بسته به شرایط رشدی (Zentmyer *et al.*, Tsao & Sisemore 1978)، به محققین اجازه داد تا در این خصوص از نشانگرها و خصوصیات مولکولی ثابت استفاده کنند. به منظور بررسی تنوع ژنتیکی این قارچ محققین در کشورهای مختلف جهان تحقیقات گسترده‌ای انجام داده‌اند. در ایران اگرچه قارچ *P. capsici* از میزبان‌های مختلف از جمله فلفل (Ershad & Hille 1975, Ommati & Karimi 1998)، بادمجان (Fassihiani & Ershad 1988)، خیار (Alavi & Saber 1985)، کدو (Mansoori & Banihashemi 1982, 1989, Banihashemi & Fatehi 1989)، گیلاس و هلو (Alizadeh & Agharafee 1998) و میخک (Mirabolfathy & Ershad 1998) گزارش شده است، اما اطلاع دقیقی در خصوص تنوع جمعیت‌های این قارچ در دست نیست.

در این پژوهش تعیین تنوع موجود بین جدایه‌های ایرانی این قارچ به کمک نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR برای اولین بار در کشور صورت گرفت و این امر مهمترین قدم در مدیریت صحیح این بیمارگر در کشور به شمار می‌رود.

روش بررسی

جداسازی بیمارگر

طی فصول زراعی سال‌های ۸۴-۱۳۸۲ ضمن بازدید از مزارع، باغات و گل‌خانه‌های استان‌های آذربایجان شرقی، اردبیل، اصفهان، تهران، خوزستان، قزوین، گلستان و مازندران

نمونه‌های گیاهی (ریشه، طوقه و میوه) مشکوک به آلودگی فیتوفتورایی از میزبان‌های احتمالی *P. capsici*؛ مثل فلفل، خیار، کدو، گوجه‌فرنگی، بادمجان، هندوانه و غیره به همراه مقداری از خاک منطقه‌ی ریزوسفر گیاه آلوده جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل گردید.

برای جداسازی بیمارگر از بافت ریشه و طوقه، قطعاتی از حد فاصل قسمت‌های آلوده و سالم از این بافت‌ها در محیط کشت نیمه اختصاصی PARPH (عصاره‌ی آرد ذرت و آگار به همراه ۰،۰۱ میلی‌گرم پیماریسین، ۲۵۰ میلی‌گرم آمپیسیلین، ۰،۰۱ میلی‌گرم ریفامپیسین، ۰،۰۱ میلی‌گرم پنتاکلرونیتروبنزن، ۰،۰۵ میلی‌گرم هیمکسازول و ۰،۰۵ میلی‌گرم بنومیل، (Babadoost & Islam 2002) کشت و در ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت دو تا سه روز نگهداری گردید. بعد از این مدت از نوک ریشه واقع در حاشیه پرگنه قارچ برداشته و به محیط کشت عمومی سیب‌زمینی - دکستروز - آگار (عصاره ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم آگار، ۱۰ گرم دکستروز) منتقل شد (Ribeiro 1978).

به منظور جداسازی *P. capsici* از میوه‌ها، پس از ضدعفونی سطحی میوه با اتانول ۷۰٪، قطعاتی از پوست میوه از حاشیه لکه برداشته، در محیط PARPH کشت و در ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. در مواردی که قارچ روی میوه تولید لایه سفید رنگی (متشکل از میسلیم و اسپورانژیوم قارچ) نموده بود؛ جداسازی قارچ با کشیدن یک لوپ به این پودر سفید رنگ و بعد انتقال آن به محیط PARPH صورت گرفت (Ribeiro 1978).

به منظور جداسازی بیمارگر از خاک ریزوسفر گیاهان بیمار سوسپانسیون خاک به نسبت یک (خاک): سه (آب مقطر سترون) تهیه (Ribeiro 1978)، سپس قطعاتی به قطر یک سانتیمتر از برگ‌های کامل و تازه لیمو یا نارنج بریده و به تعداد ۱۰ عدد در ظروف حاوی سوسپانسیون خاک شناور و دو یا سه روز بعد قطعات برگ‌گی دارای لکه‌های آسوخته پس از آبگیری کامل، به محیط نیمه اختصاصی PARPH منتقل شدند (Ribeiro 1978).

خالص‌سازی بیمارگر و نگهداری آن

برای تهیه جدایه خالص قارچ از روش تک زئوسپور استفاده شد (Lamour & Hausbeck 2000). نگهداری کشت‌های خالص در لوله‌های شیب‌دار حاوی محیط PDA در دمای اتاق (Islam et al. 2004) و تجدید کشت قارچ‌ها هر ۱۵ روز یا حداکثر به صورت ماهیانه (Lamour & Hausbeck 2001) صورت گرفت.

برای نگهداری بلند مدت قارچ، ۱۰ عدد دیسک پنج میلیمتری از حاشیه فعال پرگنه قارچ جدا و به تنهایی یا همراه با چند عدد بذر شاهدانه‌ی جوشانده شده، در لوله‌های سرپوش‌دار ریخته و پس از افزودن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون، در ۱۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد (Lamour & Hausbeck 2000).

انتخاب متنوع‌ترین افراد جمعیت براساس خصوصیات ریخت‌شناسی

پس از بررسی و اندازه‌گیری ابعاد ساختارهای رویشی و زایشی شامل طول و عرض اسپورانژیوم، قطر اگونیوم، طول و عرض آنتریدیوم و قطر و ضخامت دیواره‌ی اسپور در هر جدایه، تنوع فنوتیپی جدایه‌ها با استفاده از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای داده‌های ریخت‌شناسی بدست آمده در نرم افزار MVSP (ساخت شرکت Kovach در انگلستان)، به کمک روش UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic average) و بر اساس ضریب اقلیدسی تعیین و دندروگرام مربوطه رسم گردید.

در مرحله بعدی کار بر اساس این دندروگرام متنوع‌ترین جدایه‌ها انتخاب و برای تولید توده میسلیمی، استخراج DNA و سپس مطالعات مولکولی به کار گرفته شدند.

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Phytophthora capsici*

۱- استخراج DNA

برای تکثیر میسلیوم هر یک از جدایه‌ها حلقه میسلیمی به قطر پنج میلیمتر از حاشیه فعال پرگنه‌ی قارچ به درون بطری‌های کشت بافت حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع عصاره سیب‌زمینی (عصاره‌ی ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی در یک لیتر آب مقطر) منتقل شد. بطری‌ها به مدت پنج روز، در ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، روی شیکر انکوباتوردار با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و در شرایط تاریکی قرار گرفتند (Islam et al. 2004). با استفاده از پمپ اخلاء، قیف بوختر و کاغذ صافی تمیز؛ محیط مایع و حلقه‌های آگار محیط جامد، از میسلیوم خالص هر جدایه جدا گردید و میسلیوم به دست آمده دو بار با آب مقطر سترون شسته، پس از خشک کردن کامل آن با استفاده از کاغذ صافی، درون لوله‌های فالكون ۵۰ میلی‌لیتری در فریزر ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند.

به منظور استخراج DNA، ابتدا سه روش استفاده از فنل- کلروفرم، استفاده از محلول CTAB (Cetyl Three methyl Amonium Bromide) و استفاده از محلول نمکی DNA مطابق

روش صفایی و همکاران (Safaie et al. 2005) روی تعدادی از جدایه‌ها به‌عنوان الگو مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله بعد مناسب‌ترین روش انتخاب و برای استخراج DNA از سایر جدایه‌ها به‌کار گرفته شد.

برای اطمینان از موفقیت عمل استخراج DNA و بررسی کمیت و کیفیت DNA استحصالی پنج میکرولیتر از محلول DNA با یک میکرولیتر بافر رنگ 6X (۹۰ میلی‌گرم برموفنل بلو، ۶۰ میلی‌لیتر گلیسرول، ۱/۷۵۳ گرم EDTA و ۴۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) مخلوط گردید و در ژل آگارز یک و نیم درصد الکتروفورز شد. همچنین برای تعیین غلظت DNA استخراج شده، از دستگاه بیوفتومتر استفاده شد.

۲- تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Phytophthora capsici* با استفاده از نشانگر RAPD

به منظور انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) برای تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. capsici* با استفاده از نشانگر RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)، ابتدا ۱۲ آغازگر تصادفی ده نوکلئوتیدی ساخت شرکت سیناژن در ایران، روی تعدادی از جدایه‌ها به عنوان DNA الگو، مورد بررسی قرار گرفتند. فهرست آغازگرهای مورد استفاده و توالی ۳' - ۵' آن‌ها به قرار زیر است:

OPA-03: AGTCAGCCAC **OPA-14:** TCTGTGCTGG **OPB-13:** TTCCCCCGTC
OPA-04: AATCGGGCTG **OPA-16:** AGCCAGCGAA **OPC-09:** CTCACCGTCC
OPA-10: GTGATCGCAG **OPA-18:** AGGTGACCGT **OPD-03:** GTGACATGCC
OPA-11: CAATCGCCGT **OPB-04:** GGACTGGAGT **OPD-04:** TCTGGTGAGG

از میان ۱۲ آغازگر مورد بررسی، بر اساس تکثیر موفقیت‌آمیز، تکرارپذیری و تولید قطعات پلی‌مورفیک و واضح DNA؛ بهترین آغازگرها که پلی‌مورفیسم DNA را در بین جدایه‌ها بهتر از بقیه نشان می‌دادند، برای آزمایش‌های PCR انتخاب شدند.

مقادیر حجمی هریک از مواد به کار رفته در یک واکنش PCR همانند روش صفایی و همکاران (Safaie et al. 2005) بود و واکنش PCR و تکثیر DNA در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل ۱۴/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، ۲ میکرولیتر بافر (10X) PCR، ۰/۴ میکرولیتر از محلول ۱۰ میلی مول dNTPs حاوی ۲/۵ میلی مول از هریک از dNTPها، ۰/۶ میکرولیتر محلول حاوی ۵۰ میلی مول $MgCl_2$ ، ۰/۵ میکرولیتر محلول حاوی پنج واحد آنزیم

Taq DNA polymerase، یک میکرولیتر محلول حاوی ۱۰ پیکومول آغازگر و یک میکرولیتر حاوی مقدار تقریبی ۲۰ نانوگرم DNA قالب انجام گرفت.

چرخه‌ی دمایی برای واکنش PCR و تکثیر قطعات DNA مطابق روش اسلام و همکاران (Islam et al. 2004) تنظیم گردید: ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، پنج دقیقه؛ یک چرخه. ۳۶ درجه‌ی سانتی‌گراد، دو دقیقه؛ یک چرخه. ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، دو دقیقه؛ یک چرخه. ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، یک دقیقه؛ ۳۶ درجه‌ی سانتی‌گراد، یک دقیقه؛ ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، دو دقیقه؛ ۴۴ چرخه. ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، ده دقیقه؛ یک چرخه.

برای مشاهده محصول PCR، الکتروفورز با ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام گرفت. برای این منظور، ۱/۵ گرم آگارز در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر (IX) TBE (۹۰ میلی‌مولار تریس، ۹۰ میلی‌مولار اسید بوریک و دو میلی‌مولار EDTA) توسط حرارت حل گردید. زمانی که دمای ژل به حدود ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد رسید، پنج میکرولیتر از محلول اتیدیوم بروماید (Ethidium bromide) با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، به آن اضافه و خوب مخلوط شد. ده میکرولیتر از محصول هر واکنش همراه دو میکرولیتر بافر رنگ ۶X در این ژل با ولتاژ ۸۰ ولت به مدت دو ساعت رانده شد. برای تخمین اندازه فرآورده‌های تکثیر شده طی واکنش PCR، از نشانگر نردبان ژنومی ۱۰۰ جفت بازی استفاده گردید.

با استفاده از دستگاه فتوگرافی محل قطعات DNA تفکیک شده روی ژل عکسبرداری و تصویر ژل تحت یک فایل در کامپیوتر ذخیره شد تا قطعات حاصل ارزیابی و اندازه آن‌ها تعیین گردد. عمل PCR حداقل دو بار برای هر جدایه تکرار گردید و فقط قطعاتی از DNA که باند خوبی از آن‌ها روی ژل دیده می‌شد، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

به منظور تجزیه و تحلیل و نمره‌دهی (Scoring) داده‌های حاصل از الکتروفورز، وزن هر یک از باندهای DNA که به خوبی روی ژل قابل رویت بودند، با استفاده از نرم افزار Photo-capt ساخت شرکت Vilber Lourmat در فرانسه و بر اساس وزن باندهای نشانگر نردبان ژنومی تعیین شد. برای ایجاد ماتریس شباهت بین جدایه‌ها، وجود و یا عدم وجود هر یک از باندها به صورت اعداد یک و صفر (یک برای وجود هر باند DNA و صفر برای عدم وجود آن) تعیین و در نرم‌افزار Exel ثبت گردید. بر اساس نتیجه ماتریس شباهت که با استفاده از ضریب

تشابه جاکارد بدست آمده بود، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای به کمک روش UPGMA در نرم افزار MVSP، دندروگرام مربوط به هر آغازگر به طور جداگانه و نیز دندروگرام مربوط به مجموع آغازگرها رسم گردید.

۳- تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *Phytophthora capsici* با استفاده از نشانگر ISSR

به منظور تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. capsici* با استفاده از نشانگر (ISSR (Inter Simple Sequence Repeats، تکثیر قطعات DNA ژنوم قارچ با استفاده از یک آغازگر میکروستلاپت به نام PcMs که از روی توالی قطعات تکرار شونده طراحی شده بود، استفاده گردید. توالی نوکلئوتیدی این آغازگر به صورت 7(GTC) می‌باشد. نحوه آماده‌سازی مخلوط PCR، مواد مورد استفاده و حجم‌های به کار رفته از این مواد همانند روش ذکر شده در مورد آغازگرهای تصادفی تنظیم گردید.

در این مورد دو چرخه‌ی دمایی برای واکنش PCR پیاده گردید. در برنامه اول چرخه‌ها به صورت: ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد، دو دقیقه؛ یک چرخه. ۹۶ درجه‌ی سانتی‌گراد، یک دقیقه؛ ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، یک دقیقه؛ ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، دو دقیقه؛ ۳۵ چرخه. ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، ده دقیقه؛ یک چرخه و در برنامه دوم چرخه‌ها به صورت: ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، پنج دقیقه؛ یک چرخه. ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، دو دقیقه؛ یک چرخه. ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، دو دقیقه؛ یک چرخه. ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، یک دقیقه؛ ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، یک دقیقه؛ ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، دو دقیقه؛ ۴۴ چرخه. ۷۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، ده دقیقه؛ یک چرخه، تنظیم شده بود.

برای تفکیک قطعات DNA تکثیر شده توسط این آغازگر روی ژل آگارز و مشاهده تصویر ژل همانند روش ذکر شده در مورد آغازگرهای تصادفی عمل گردید. با این تفاوت که در اینجا برای تخمین وزن قطعات تکثیر شده، از نشانگر نردبان ژنومی یک کیلو بازی استفاده شد. عمل PCR سه مرتبه برای هر جدایه تکرار گردید و تنها قطعاتی از DNA که باند واضحی روی ژل داشتند، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

به منظور نمره‌دهی داده‌های حاصل از الکتروفورز و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای آن‌ها همانند روش ذکر شده در مورد آغازگرهای تصادفی، ابتدا از ماتریس داده‌ها که بر اساس باندهای

مشترک روی ژل از صفر و یک تشکیل شده بود، برای ایجاد ماتریس شباهت بین جدایه‌ها بر اساس ضریب تشابه جاکارد استفاده شد. بر اساس نتیجه ماتریس شباهت، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای به روش UPGMA در نرم افزار MVSP انجام و دندروگرام مربوط آغازگر میکروستلایت PcMs به طور جداگانه و نیز دندروگرام مربوط به مجموع آغازگرهای تصادفی و این آغازگر رسم گردید تا بهترین حالتی که تنوع ژنتیکی بین جدایه‌ها را به خوبی نشان می‌دهد، تعیین گردد.

نتیجه

جدا سازی بیمارگر

از ۳۴۰ نمونه گیاهی جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کشور مجموعاً ۷۹ جدایه از *P. capsici* از میزبانهای بادمجان (*Solanum melongena L.*)، خیار (*Cucumis sativus L.*)، فلفل (*Capsicum annum L.*)، گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum L.*)، کدو (*Cucurbita pepo L.*) و هندوانه (*Citrullus Citrullus L.*) به دست آمد.

انتخاب متنوع‌ترین افراد جمعیت بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی

با اندازه‌گیری ابعاد ساختارهای رویشی و زایشی شامل طول و عرض اسپورانژیوم، قطر اگونیوم، طول و عرض آنترییدیوم و قطر و ضخامت دیواره‌ی اسپور در ۷۹ جدایه‌ی بدست آمده از *P. capsici* و رسم دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل خوشه‌ای این داده‌های ریخت‌شناسی مشخص گردید که بین ۷۹ جدایه مذکور، سطح بالایی از تنوع در ابعاد ساختارهای رویشی و زایشی وجود دارد. اما این تنوع فنوتیپی هیچ همبستگی معنی‌داری با مناطق جمع‌آوری جدایه‌ها و یا با میزبانهای آنها نداشته و در گروه‌های مختلف این دندروگرام جدایه‌هایی از مناطق و میزبانهای مختلف جای گرفتند. از روی این دندروگرام ۲۸ جدایه که بیشترین تنوع را در ویژگی‌های ریخت‌شناسی داشتند انتخاب و به همراه جدایه شاهد از آمریکا، برای استخراج DNA و سپس مطالعات مولکولی به کار گرفته شدند (جدول ۱). جدایه‌های دارای علامت ستاره، از جناب آقای دکتر بنی‌هاشمی (دانشگاه شیراز) دریافت شده‌اند. شکل ۱ نیز دندروگرام مربوط به تنوع ریخت‌شناسی در این جمعیت که با استفاده از نرم افزار MVSP، به کمک روش UPGMA و بر اساس ضریب اقلیدسی ترسیم شد را نشان

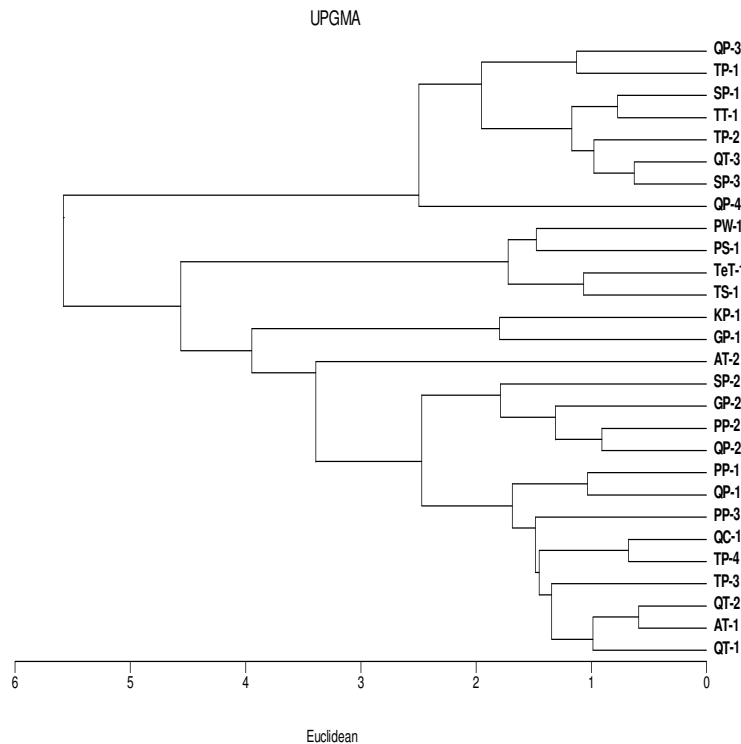
می‌دهد.

جدول ۱- مشخصات ۲۸ جدایه‌ی *Phytophthora capsici* که از لحاظ ریخت‌شناسی بیشترین تنوع را داشتند

Table 1. Characteristics of 28 isolates of selected isolates of *Phytophthora capsici* on the basis of morphological diversified characters

کد جدایه / Isolate code	میزبان / Host	منشاء / Source	محل جمع‌آوری / Location
QT1	Tomato/ <i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Root	Qazvin
QT2	Tomato/ <i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Root	Qazvin
QT3	Tomato/ <i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Root	Qazvin
QC1	Cucumber/ <i>Cucumis sativus</i> L.	Root	Qazvin
QP1	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	Qazvin
QP2	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Soil	Qazvin
QP3	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	Qazvin
QP4	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	Qazvin
TP1	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	East Azarbayejan
TP2	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	East Azarbayejan
TP3	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	East Azarbayejan
TT1	Tomato/ <i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Root	East Azarbayejan
TP4	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Soil	East Azarbayejan
TS1	Squash/ <i>Cucurbita pepo</i> L.	Root	East Azarbayejan
AT1	Tomato/ <i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Root	Ardebil
AT2	Tomato/ <i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Soil	Ardebil
PP1	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	Fars
PP2	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	Fars
PP3	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Crown	Fars
PS1	Squash/ <i>Cucurbita pepo</i> L.	Crown	Fars
PW1	Watermelon/ <i>Citrullus citrullus</i> L.	Root	Fars
KP1	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	Khouzestan
AMP	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	California
TeT1	Tomato/ <i>Lycopersicon esculentum</i> L.	Root	Tehran
SP1	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	Mazandaran
SP2	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	Mazandaran
SP3	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	Mazandaran
GP1	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Soil	Golestan
GP2	Pepper/ <i>Capsicum annum</i> L.	Root	Golestan

* جدایه‌های اخذ شده از دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز



شکل ۱- دندروگرام مربوط به تنوع ریخت‌شناسی در ۲۸ جدایه‌ی منتخب *Phytophthora capsici*.
 Fig 6. Dendrogram depicting morphological diversity of 28 selected isolates of *Phytophthora capsici*.

تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Phytophthora capsici*

۱- استخراج DNA

از میان روش‌های ذکر شده، روش استفاده از محلول نمکی DNA به علت عدم استفاده از مواد سمی و خطرناک و نیز وقت‌گیر نبودن آن به کار گرفته شد و با استفاده از این روش DNA ۲۹ جدایه استخراج گردید. پس از بررسی مقدار DNA بدست آمده با استفاده از دستگاه بیوفتومتر مقادیر DNA جدایه‌ها بین ۱/۵ تا ۵ میکروگرم در میکرولیتر اندازه‌گیری شد. به جهت هماهنگ کردن جدایه‌ها از نظر غلظت DNA، با استفاده از آب دیونیزه سترون غلظت DNA در تمامی جدایه‌ها به یک میکروگرم در میلی‌لیتر رسانیده شد.

۲- تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Phytophthora capsici* با استفاده از نشانگر RAPD

از میان ۱۲ آغازگر تصادفی مورد بررسی، ۵ آغازگر OPA03، OPA04، OPB13، OPC09 و OPD04 انتخاب و برای آزمایش‌های PCR به کار گرفته شدند. هیچ کدام از پنج آغازگر انتخاب

شکل ۲- الگوی DNA تکثیر شده در گروه‌های اثرنگاری شده با استفاده از آغازگر OPD-04 با نشانگر مولکولی RAPD-PCR، در ۲۹ جدایه‌ی *Phytophthora capsici*: L: نشانگر نردبان ژنومی ۱۰۰ جفت بازی و NG: کنترل منفی.

Fig 2- DNA fingerprinting of 29 isolates of *Phytophthora capsici* based on random amplification using OPD-04 primer. L: DNA ladder 100 bp and NG: Negative Control.

۷۵ شده و به کار رفته روی ۲۹ جدایه مورد بررسی، به تنهایی قادر به مشخص نمودن تمام جدایه‌ها به عنوان ژنوتیپ‌های متفاوت نبودند؛ اما با استفاده از مجموع این پنج آغازگر مجموعاً

باند برای ۲۹ جدایه به دست آمد که توانست پلی مورفیسم DNA این ۲۹ جدایه را به خوبی نشان دهد. شکل ۲ الگوی پدید آمده توسط یکی از این پنج آغازگر (آغازگر OPD-04) را نشان می دهد.

دندروگرام حاصل از این ۷۵ باند که بر اساس ضریب جاکارد به دست آمد، در سطح تشابه ۵۵ درصد جدایه ها را به دو گروه تقسیم نمود (شکل ۳).

شکل ۳- دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی ۲۹ جدایه ی *Phytophthora capsici* با استفاده از پنج آغازگر تصادفی شامل؛ OPA-03، OPA-04، OPB-13، OPC-09 و OPD-04، براساس روش UPGMA و ضریب جاکارد.

Fig 3. Dendrogram depicting genetic diversity of 29 isolates of *Phytophthora capsici* using five random primers (OPA-03, OPA-04, OPB-13, OPC-09 and OPD-04), by UPGMA method and Jaccard' s coefficient.

گروه اول با درصد فراوانی ۲۴ درصد در برگیرنده جدایه‌های فارس، خوزستان و جدایه‌ی کالیفرنیا و گروه دوم با درصد فراوانی ۷۶ درصد در برگیرنده جدایه‌های استان‌های آذربایجان شرقی، اردبیل، تهران، قزوین، گلستان و مازندران بود. به این ترتیب این ترکیب از آغازگرهای تصادفی با قرار دادن جدایه‌های فارس و خوزستان در گروه اول و سایر جدایه‌ها در گروه دوم توانست جدایه‌های نواحی گرمسیری را از سایر جدایه‌ها تفکیک نماید.

۳- تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Phytophthora capsici* با استفاده از نشانگر ISSR

همانطور که در بخش روش بررسی ذکر شد، در این مورد دو برنامه دمایی برای واکنش PCR اجرا گردید. با استفاده از برنامه اول، تعداد باندهای کم و نسبتاً غیرواضحی به دست می‌آمد و از طرف دیگر بعضی قطعات تکثیر شده DNA تکرار پذیر نبودند؛ اما نتیجه‌ی بهتر با استفاده از برنامه دمایی دوم به دست آمد؛ همچنین پس از بررسی برای یافتن بهترین دمای اتصال، مشخص شد که در ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد آغازگر بالاترین اتصال را دارد، لذا در طول آزمایش برای انجام واکنش PCR و تکثیر قطعات DNA با استفاده از آغازگر میکروستلایت PcMs، از برنامه دوم و با دمای اتصال ۶۸ درجه‌ی سانتی‌گراد استفاده شد.

آغازگر میکروستلایت PcMs توانست به خوبی پلی‌مورفیسم DNA این ۲۹ جدایه را نشان دهد و بر خلاف آغازگرهای تصادفی، به تنهایی قادر به مشخص نمودن تمام جدایه‌ها به عنوان ژنوتیپ‌های متفاوت بود. شکل ۴ الگوهای پدید آمده توسط این آغازگر را نشان می‌دهد. تعداد باندهای قابل ارزیابی تولید شده توسط این آغازگر ۳۲ عدد و اندازه آنها بین ۱۵۰۰ تا ۵۷ جفت باز بود.

نتایج حاصل از آنالیز خوشه‌ای با آغازگر میکروستلایت PcMs براساس ضریب جاکارد نشان داد که در سطح تشابه ۴۰ درصد جدایه‌ها به چهار گروه تقسیم می‌شوند (شکل ۵).

گروه اول با درصد فراوانی ۱۷/۵ درصد شامل جدایه‌های مازندران و گلستان، گروه دوم با درصد فراوانی ۲۷/۵ درصد شامل جدایه‌های فارس، خوزستان و جدایه کالیفرنیا به همراه یکی از جدایه‌های قزوین، گروه سوم با درصد فراوانی ۲۷/۵ درصد شامل جدایه‌های اردبیل و آذربایجان شرقی و گروه چهارم نیز با درصد فراوانی ۲۷/۵ درصد شامل جدایه‌های تهران و قزوین بود.

شکل ۴- الگوی DNA تکثیر شده در گروههای اثرنگاری شده با استفاده از آغازگر میکروستلایت PcMs با نشانگر مولکولی RAPD- PCR، در ۲۹ جدایه‌ی *L. Phytophthora capsici*: نشانگر نردبان ژنومی یک کیلو بازی و NG: کنترل منفی.

Fig 4. DNA fingerprinting of 29 isolates of *Phytophthora capsici* based on random amplification using PcMs primer. L: DNA ladder 1kb and NG: Negative Control.

نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل الگوهای ۱۰۷ باند حاصل از مجموع آغازگرهای تصادفی و آغازگر میکروستلایت PcMs نشان داد که براساس ضریب جاکارد، در سطح تشابه ۵۵ درصد جدایه‌ها در پنج گروه قرار می‌گیرند (شکل ۴).

شکل ۵- دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی ۲۹ جدایه *Phytophthora capsici* با استفاده از آغازگر میکروستلایت PcMs، براساس روش UPGMA و ضریب جاکارد.

Fig 5. Dendrogram depicting genetic diversity of 29 isolates of *Phytophthora capsici* using PcMs primer, by UPGMA method and Jaccard' s coefficient.

گروه اول با درصد فراوانی ۱۷/۵ درصد، جدایه‌های مازندران و گلستان، گروه دوم با درصد فراوانی ۲۴ درصد، جدایه‌های فارس، خوزستان و جدایه کالیفرنیا، گروه سوم با درصد فراوانی ۳/۵ درصد، یک عدد از جدایه‌های قزوین، گروه چهارم با درصد فراوانی ۲۷/۵ درصد، جدایه‌های آذربایجان شرقی و اردبیل و گروه پنجم نیز با درصد فراوانی ۲۷/۵ درصد جدایه‌های تهران و قزوین را در بر گرفت. در سطح تشابه ۸۰ درصد تعداد گروهها به ۱۷ عدد افزایش یافت.

شکل ۶- دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی ۲۹ جدایه *Phytophthora capsici* با استفاده از پنج آغازگر تصادفی (OPA-03، OPA-04، OPB-13، OPC-09 و OPD-04) و آغازگر میکروستلایت PcMs، براساس روش UPGMA و ضریب جاکارد.

Fig 6. Dendrogram depicting genetic diversity of 29 isolates of *Phytophthora capsici* using five random primers (OPA-03, OPA-04, OPB-13, OPC-09 and OPD-04) and PcMs primer, by UPGMA method and Jaccard's coefficient.

بحث

در سال‌های اخیر با پیشرفت تکنولوژی مولکولی و امکان مطالعه دقیق تنوع ژنومی در میکروارگانیسم‌ها، ابزار لازم برای شناسایی تنوع ژنتیکی درون افراد یک گونه به خوبی فراهم شده است. قارچ عامل بیماری بلایت فیتوفتورایی به علت اهمیتی که دارد از این پیشرفت دور نمانده و در اکثر نقاط دنیا موضوع تحقیقات مختلف مولکولی بوده است. در تحقیق حاضر آنالیز خوشه‌ای الگوهای باندهای حاصل از مجموع آغازگرهای تصادفی، ۲۹ جدایه *P. capsici* را در سطح تشابه ۵۵ درصد بر اساس فاصله‌ی جغرافیایی آن‌ها به دو گروه ژنتیکی تقسیم نمود. در گروه اول جدایه‌های فارس و خوزستان و در گروه دوم سایر جدایه‌ها (که فاصله

جغرافیایی زیادی با گروه اول داشتند) جای گرفتند.

وجود تنوع ژنتیکی بین جدایه‌های *P. capsici* متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف توسط محققین مختلفی گزارش شده است. لامور و هازبک (Lamour & Hausbeck 2001) پس از جمع‌آوری جدایه‌هایی از نواحی جنوب غربی، مرکزی و شمال غربی ایالت میشیگان و بررسی ژنتیک این جدایه‌ها با استفاده از نشانگر AFLP گزارش نمودند که بین جدایه‌های *P. capsici* متعلق به مناطق مختلف میشیگان تنوع ژنتیکی وجود دارد. همچنین نتایج تحقیق دیگری در سال ۲۰۰۲ توسط همین افراد (Lamour & Hausbeck 2002) حاکی از وجود سطح بالایی از تنوع ژنتیکی بین جمعیت‌های *P. capsici* متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف در این ایالت بود. مطالعات کرسی و همکاران (Kersey et al. 2005) نیز روی جدایه‌های فلفل‌سبز از مناطق مختلف نیومکزیکو با استفاده از نشانگر AFLP، تنوع ژنتیکی بالایی را بین جدایه‌های متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف آشکار کرد و نتایج این بررسی حاکی از وجود جمعیت‌های مختلفی از *P. capsici* در مناطق مختلف این ایالت بود.

ارتباط بین مناطق جمع‌آوری جدایه‌ها و گروه‌بندی ژنتیکی آن‌ها در برخی از دیگر گونه‌های فیتوفتورا و همچنین در برخی جنس‌های دیگر امیست نیز گزارش شده است. به طور مثال در مورد گونه *P. infestans* پس از بررسی اختلاف ژنتیکی موجود بین جدایه‌هایی از مناطق مختلف با استفاده از نشانگر RAPD و نیز AFLP، مشخص گردید که بین جدایه‌های متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف تنوع ژنتیکی وجود دارد (Abu-El Samen et al. 2003). مالویک و پرسیک (Malvick & Percich 1998) پس از مطالعه تنوع ژنوتیپی جدایه‌های *Aphanomyces euteiches* (بیمارگر دیگری از امیست‌ها) متعلق به مناطق مرکزی و غربی ایالت متحده امریکا، گزارش نمودند که بین گروه‌های RAPD و مناطق جغرافیایی جدایه‌ها همبستگی وجود دارد.

اضافه نمودن الگوهای بانندی حاصل از آغازگر میکروستلایت PcMs به الگوهای بانندی آغازگرهای تصادفی و تجزیه و تحلیل ۱۰۷ الگوی بانندی حاصله از این آغازگرها، با دقت بالاتری جدایه‌های متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف را از هم جدا نمود. این ترکیب از آغازگرها با تقسیم جدایه‌ها در سطح تشابه ۵۵ درصد به پنج گروه ژنتیکی مجزا و قرار دادن

جدایه‌های مازندران با گلستان، فارس با خوزستان، آذربایجان شرقی با اردبیل و تهران با قزوین در یک گروه توانست ضمن مجزا نمودن جدایه‌های متعلق به نواحی با فواصل جغرافیایی طولانی‌تر از یکدیگر، جدایه‌های متعلق به مناطق جغرافیایی نزدیک به هم را در یک گروه قرار دهد. این مسئله ممکن است این گونه توجیه گردد؛ از آن جایی که شرایط اقلیمی در شهرهای نزدیک، مشابه یکدیگر است، شرایط برای گسترش و تکثیر ژنوتیپ‌های مشابه مهیا می‌باشد؛ چراکه مسلماً تکثیر و انتشار یک یا چند ژنوتیپ خاص در طول فصل زراعی احتیاج به رطوبت، دما، هوای ابری و میزان بارندگی خاصی دارد. بین جدایه‌های قزوین که در گروه پنجم قرار گرفته بودند و تک جدایه گروه سوم از قزوین قطعات مشترک DNA وجود داشت؛ اما نتیجه به دست آمده از انگشت‌نگاری DNA با استفاده از مجموع آغازگرهای RAPD و ISSR، وجود دو منشاء ورودی متفاوت را برای این جدایه‌ها دور از انتظار نمی‌داند.

آغازگر ISSR به کار رفته در این بررسی قبلاً توسط تیان و بابادوست (Tian & Babadoost 2003) به منظور بررسی تنوع ژنوتیپی جدایه‌های *P. capsici* جمع‌آوری شده از محصولات زراعی در ایالت ایلینویز، به همراه نشانگر AFLP به کار گرفته شده بود. در بررسی آن‌ها آنالیز خوشه‌ای، جدایه‌ها را به چهار گروه ژنتیکی تقسیم نمود. این گروه‌بندی ژنتیکی نیز همانند تحقیق حاضر بر اساس مناطق جمع‌آوری جدایه‌ها بود و به عبارت دیگر تفاوت معنی‌داری از نظر ژنتیکی بین جدایه‌های مناطق جغرافیایی مختلف وجود داشت.

عدم تطابق کامل بین گروه‌های ژنتیکی بر اساس نشانگر RAPD با گروه‌های ژنتیکی حاصل از نشانگر ISSR در این تحقیق دور از انتظار و تعجب برانگیز نیست، چراکه هریک از این دو روش تنوع ژنتیکی را در نواحی مختلف ژنوم مورد بررسی قرار می‌دهند. میکروستلایت‌ها توالی‌های تکراری ساده را که در ژنوم پراکنده هستند، تکثیر می‌کنند و لوکوس‌های نشانگر RAPD در کل ژنوم توزیع شده‌اند. پرایمرهای ۱۰ نوکلئوتیدی قادرند که به هر ناحیه‌ای از ژنوم که دارای توالی سازگار با آن‌ها می‌باشد متصل گردند و بین دو جدایه زمانی که محل اتصال در یکی از آن‌ها نیست و یا تغییر یافته است اما در دیگری این محل اتصال وجود دارد، پلی‌مورفیسم نشان دهند. عدم ارتباط بین الگوهای حاصل از نشانگرهای DNA مختلف توسط دیگر محققین نیز گزارش شده است. بطور مثال پورویس و همکاران

(Purvis *et al.* 2001) پس از بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. infestans* توسط نشانگرهای AFLP و RFLP و نیز آبو-ال سامن و همکاران (Abu-El Samen *et al.* 2003) پس از بررسی تنوع ژنوتیپی جدایه‌ها دیگری از همین گونه توسط نشانگرهای AFLP و RAPD گزارش نمودند که بین گروه‌های ژنتیکی ایجاد شده توسط نشانگرهای مختلف ارتباطی وجود ندارد.

هدف اصلی این تحقیق بررسی تنوع ژنوتیپی جمعیت‌های ایرانی قارچ *P. capsici* با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR بود. بررسی فنوتیپی جمعیت‌های مذکور در حقیقت کلیدی برای یافتن اولیه متنوع‌ترین افراد جمعیت از لحاظ ریخت‌شناسی بود. پس از انتخاب ۲۸ جدایه که از لحاظ ریخت‌شناسی بالاترین تنوع را داشتند و رسم دندروگرام مربوط به داده‌های ریخت‌شناسی آنها (شکل ۱) مشخص شد که ارتباطی بین گروه‌بندی ریخت‌شناسی با گروه‌بندی ژنتیکی این جدایه‌ها بر اساس نشانگرهای RAPD و ISSR وجود ندارد.

نتایج تحقیق حاضر مبنی بر عدم ارتباط بین تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی جدایه‌ها مطابق با یافته‌های دیگر دانشمندان می‌باشد. بطور مثال ادمنز و کافی (Oudemans & Coffey 1991) پس از بررسی تنوع ژنوتیپی جدایه‌های *P. capsici* بیان نمودند که اختلافات ریخت‌شناسی الزاما در این گونه مطابق با اختلافات ژنتیکی نیست. همچنین نتایجی مشابه در مورد گونه *P. infestans* گزارش شده است: لبرتون و آندریون (Lebreton & Andriovon 1998) ارتباط آشکاری را بین فنوتیپ‌ها و ژنوتیپ‌های *P. infestans* نیافتند؛ ماهوکو و همکاران (Mahuku *et al.* 2000) نیز گزارش کردند که همبستگی معنی‌داری بین گروه‌های ایجاد شده توسط نشانگر RAPD و گروه‌های حاصل از داده‌های فنوتیپی در *P. infestans* وجود ندارد. همچنین مالویک و پرسیک (Malvick & Percich 1998) اعلام کردند که تنوع ژنوتیپی در جدایه‌های *A. euteiches* مرتبط با اختلاف فنوتیپی آنها نیست.

در این پژوهش تعیین تنوع موجود در جدایه‌های ایرانی *P. capsici* توسط نشانگرهای مولکولی برای اولین بار در کشور صورت گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده، تنوع ژنتیکی بالایی بین جمعیت‌های ایرانی *P. capsici* وجود دارد و این موضوع با بررسی خصوصیات فنوتیپی و نشانگرهای مولکولی RAPD و ISSR در این پژوهش به اثبات رسیده است. بر خلاف تنوع ژنتیکی بالای بین جدایه‌های مربوط به مناطق جغرافیایی مختلف، نتایج این تحقیق

تنوع زیادی را در جدایه‌های مربوط به هر استان به اثبات نرساند؛ بنابراین در اتخاذ راهکار مناسب برای مبارزه با این بیمارگر بایستی این مسئله مدنظر باشد. بخصوص از آن جایی که مشخص گردید تنوع ژنتیکی موجود مربوط به مناطق جغرافیایی جدایه‌هاست، طی انتخاب ارقام مقاوم به *P. capsici* گیاهان یک منطقه باید در برابر جدایه‌های بیمارگر همان منطقه بررسی گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله نگارندگان از جناب آقای دکتر ضیاءالدین بنی‌هاشمی، استاد گرانقدر گروه گیاهپزشکی دانشگاه شیراز، به دلیل ارسال تعدادی از جدایه‌های *Phytophthora capsici* صمیمانه تشکر می‌نمایند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (33-37) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: سیده معصومه زمانی، عزیزاله علیزاده و ناصر صفایی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

References

- ABU-EL SAMEN, A. E., SECOR, G. A. and GUDMESTAD, N. C. 2003. Genetic variation among asexual progeny of *Phytophthora infestans* detected with RAPD and AFLP markers. **Plant Pathol.** **52**: 314-325.
- ALAVI, A. and SABER, M. 1985. Pathogenicity of *Phytophthora capsici* on marrow and cucumber. **Phytophthora Newsletter** **13**: 1-2.
- ALIZADEH, A. 1983. Comparative Morphology and Reproductive Physiology of *Phytophthora capsici* and *P. palmivora* MF4 from Black Pepper and Other Hosts. Ph. D. Thesis, University of California, Riverside. 249 pp.
- ALIZADEH, A. and AGHARAFEE, S. 1998. The causes of stone fruit trees decline in Tehran provinces. **Proc. of the 13th Iran. Plant Protec. Cong.** 23- 27 Aug., Karaj, Iran. p. **232**.
- ARAGAKI, M. and UCHIDA, J. Y. 1992. Recent finding in *Phytophthora capsici* (*P. tropicalis* complex) (Abstract). **Phytopathology** **82**: 1164.
- BABADOOST, M. 2004. Phytophthora blight: A serious threat to cucurbit industries. <http://www.apsnet.org/online/feature/cucurbit/>.
- BABADOOST, M. and ISLAM, S. Z. 2002. Phytophthora blight on pumpkin. Plant Health Progress doi: 10. 1094/ PHP-2002-1216- 01-DG.
- BANIHASHEMI, Z. and FATEHI, J. 1989. Reaction of cucurbit to *Phytophthora drechsleri* and *Ph. capsici* in greenhouse. **Proc. of the 9th Iran. Plant Protec. Cong.** 9- 14 Sept., Mashhad, Iran. p. 90.
- BOCCAS, B. R. 1981. Interspecific crosses between closely related heterothallic *Phytophthora* species. **Phytopathology** **71**: 60-65.
- BRASIER, C. M. 1992. Evolutionary biology of *Phytophthora*, Part I: Genetic system, sexuality and the generation of variation. **Annual Review of Phytopathology** **30**: 153-71.
- ERSHAD, D. and HILLE, M. 1975. Study of pepper root rot in Iran. **Iran. J. of Plant Pathol.** **11**: 21-29.
- ERWIN, D. C. and RIBEIRO, O. K. 1996. *Phytophthora* Disease Worldwide. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. 562 pp.
- FASSIHIANI, A. and ERSHAD, D. 1988. Occurrence of black stem disease of egg plant in Iran. **Iran. J. of Plant Pathol.** **24**: 11-17.
- HAUSBECK, M. K. and LAMOUR, K. H. 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. **Plant Dis.** **88**: 1292- 1303.

- ISLAM, S. Z., BABADOOST, M., LAMBERT, K. N., NDEME, A. and FOULY, H. M. 2004. Characterization of *Phytophthora capsici* isolates from processing pumpkin in Illinois. **Plant Dis.** **89**: 191-197.
- KAOSIRI, T. 1978. Morphological, taxonomic and cytological studies of *Phytophthora palmivora*. Ph. D. Thesis, University of California, Riverside.
- KERSEY, R. K., SANOGO, S., CARPENTER, J. and BOSLAND, P. 2005. Determination of genetic diversity of *Phytophthora capsici* isolates in New Mexico with AFLP markers. **Molecular Ecology** **2**: 15-19.
- KUNIMOTO, R. K., ARAGAKI, M. HUNTER, J. E. and KO, W. H. 1976. *Phytophthora capsici*, corrected name for the cause of phytophthora blight of macadamia racemes. **Phytopathology** **66**: 546-548.
- LAMOUR, K. H. and HAUSBECK, M. K. 2000. Mefenoxam insensitivity and the sexual stage of *Phytophthora capsici* in Michigan cucurbit fields. **Phytopathology** **90**: 396-400.
- LAMOUR, K. H. and HAUSBECK, M. K. 2001. Investigating the spatiotemporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan. **Phytopathology** **91**: 973-980.
- LAMOUR, K. H. and HAUSBECK, M. K. 2002. The spatiotemporal genetic structure of *Phytophthora capsici* in Michigan and implications for disease management. **Phytopathology** **92**: 681-684.
- LEBERTON, L. and ANDRIVON, D. 1998. French isolates of *Phytophthora infestans* from potato and tomato differ in phenotype and genotype. **European Journal of Plant Pathology** **104**: 583-94.
- MAHUKU, G., PETERS, R. D., PLATT, H. W. and DAAYF, F. 2000. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Phytophthora infestans* isolates collected in Canada during 1994-96. **Plant Pathol.** **49**: 252-60.
- MALVICK, D. K. and PERCICH, J. A. 1998. Genotypic and pathogenic diversity among pea-infecting strains of *Aphanomyces euteiches* from the central and western United States. **Phytopathology** **88**: 915-921.
- MANSOORI, B. and BANIHASHEMI, Z. 1982. Evaluation cucurbit seedling resistance to *Phytophthora drechsleri*. **Plant Dis.** **66**:373-376.
- MARTIN, F. N. and ENGLISH, J. T. 1997. Population genetics of soilborne fungal plant pathogens (Introduction). **Phytopathology** **87**: 446-447.
- MCDONALD, B. A. 1997. The population genetics of fungi: Tools and techniques. **Phytopathology** **87**: 448-453.

- MCHAU, G. R. A. and COFFEY, M. D. 1995. Evidence for the existence of two subpopulations in *Phytophthora capsici* and a redescription of the species. **Mycological Research** **99**: 89- 102.
- MIRABOLFATHY, M. and ERSHAD, D. 1998. Phytophthora root and stem rot of several ornamental plants in central and northern provinces of Iran. **Iranian Journal of Plant Pathology** **34**: 47-55.
- OMMATI, F. and KARIMI, A. R. 1998. Etiology of pepper root rot. **Proc. of the 13th Iran. Plant Protec. Cong.** 23- 27 Aug., Karaj, Iran. **p. 173.**
- OUDEMANS, P. and COFFEY, M. D. 1991. A revised systematics of twelve papillate *Phytophthora* species based on isozyme analysis. **Mycological Research** **95**:1025-1046.
- PURVIS A. I., PIPE N. D., DAY J. P., SHATTOCK R. C., SHAW D. S. and ASSINDER S. J. 2001. AFLP and RFLP (RG57) fingerprints can give conflicting evidence about relatedness of isolates of *Phytophthora infestans*. **Mycological Research** **105**: 1321-30.
- RIBEIRO, O. K. 1978. **A Source Book of the Genus *Phytophthora***. Cramer, Vaduz, Liechtenstein. 417 pp.
- RISTAINO, J. B. and JOHNSTON, S. A. 1999. Ecologically based approaches to management of phytophthora blight on bell pepper. **Plant Dis.** **83**: 1080- 1089.
- SAFAIE, N., ALIZADEH, A., SAIDI, A., RAHIMIAN, H. and ADAM, G. 2005. Molecular characterization and genetic diversity among Iranian populations of *Fusarium graminearum*, the causal agent of wheat headblight. **Iran. J. of Plant Pathol.** **41**: 171-189.
- TAMIETTI, G. and VALENTINO, D. 2001. Physiological characterization of a population of *Phytophthora capsici* Leon. from northern Italy. **Plant Pathol.** **83**: 199-205.
- TIAN, D. and BABADOOST, M. 2003. Genetic variation among isolates of *Phytophthora capsici* from Illinois. **Phytopathology** **93**: S84.
- TSAO, P. H. 1991. The identities, nomenclature and taxonomy of *Phytophthora* isolates from black pepper. Pages 185-211 in: Diseases of Black Pepper. **Proc. Int. Pepper Comm. Workshop Black Pepper Dis.**, Goa, India. Y. R. Sarma and T. Premkumor, eds.
- TSAO, P. H. and ALIZADEH, A. 1988. Recent advances in the taxonomy and nomenclature of the so- called *Phytophthora palmivora* MF4 occurring on cocoa and other tropical crops. **Proceedings of 10th International Cocoa Research Conference.** Santo Domingo, 17-23 May 1987, p. 441-445.

- TSAO, P. H. and SISEMORE, D. J. 1978. Morphological variability in *Phytophthora parasitici* (*P. nicotianae*) isolates from citrus, tomato and tobacco. (Abstract). **Phytopathological News 12**: 213.
- UCHIDA, J. Y. and ARAGAKI, M. 1989. Comparison of pepper isolates of *Phytophthora capsici* from New Mexico to other solanaceous and non- solanaceous isolates. (Abstract). **Phytopathology 79**: 1212.
- ZENTMYER, G. A., KLURE, L. J. and POND, E. C. 1979. The influence of temperature and nutrition on formation of sexual structures by *Phytophthora cinnamomi*. **Mycologia 71**: 55- 67.
-

Address of authors: S. M. ZAMANI, A. ALIZADEH and N. SAFAIE, Plant Pathology
Department of College Agriculture, Tarbiat Modarres University

Archive of SID