

## شناسایی و ردیابی *Phytophthora erythroseptica* و دورگ‌های آن با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

بنفشه صفایی فراهانی<sup>۱\*</sup>، رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا<sup>۲</sup> و آزاده حبیبی<sup>۳</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۰/۶)

### چکیده

گونه‌ی *Phytophthora erythroseptica* عامل پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی، یکی از اُمیست‌های بیماری‌زای گیاهی است که خسارت اقتصادی قابل توجهی را در مزرعه و انبار وارد می‌کند. به منظور شناسایی و ردیابی دقیق و حساس *P. erythroseptica*، شش توالی هسته-ای و میتوکندریایی برای طراحی آغازگرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل شباهت زیاد توالی‌های *P. erythroseptica* به خویشاوندان نزدیکش، تنها یک توالی هسته‌ای (*TigA*) برای طراحی آغازگرهای اختصاصی مناسب تشخیص داده شد. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده، شیوه‌ای از واکنش زنجیره‌ای ساده و تودرتو برای شناسایی و ردیابی *P. erythroseptica* ابداع شد. اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده با استفاده از مجموعه‌ای از گونه‌های فیتوفتورا متعلق به تبارهای فیلوژنتیکی مختلف و نیز خویشاوندان نزدیک *P. erythroseptica* ارزیابی شد. ردیابی *P. erythroseptica* در دی‌ان‌ای خالص بیمارگر و دی‌ان‌ای استخراج شده از بافت‌های گیاهی آلوده شامل سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و اسفناج با استفاده از آغازگرها با موفقیت انجام شد. آغازگرهای اختصاصی ۱۰ پیکوگرم از دی‌ان‌ای خالص *P. erythroseptica* را در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده ردیابی کردند، با این حال واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو، حساسیت آغازگرها را حداقل صد برابر افزایش داد. همچنین، آغازگرهای اختصاصی قادر به ردیابی *P. erythroseptica* به عنوان والد پدری یا مادری در جدایه‌های دورگ بودند؛ این ویژگی به شناسایی یکی از والدین در دورگ‌های *P. erythroseptica* کمک شایانی می‌کند.

کلیدواژه: اُمیکوتا، پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز.

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: b.safae@areeo.ac.ir

۱. استادیار، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شیراز، ایران.
۲. استادیار، بخش گیاه‌پزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز ۷۱۴۴۱۶۵۱۸۶، ایران.
۳. استادیار، گروه تنوع زیستی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران.

## Identification and detection of *Phytophthora erythroseptica* and its hybrids using specific primers

B. Safaiefarahani<sup>1\*</sup>, R. Mostowfizadeh-Ghلامfarsa<sup>2</sup>, and A. Habibi<sup>3</sup>

(Received: 16.10.2019; Accepted: 17.12.2019)

### Abstract

*Phytophthora erythroseptica*, the causal agent of potato pink rot, is one of the oomycete plant pathogens that causes significant losses in field and storage. In order to develop a sensitive and rapid method for detection and identification of *P. erythroseptica*, six nuclear and mitochondrial gene regions were investigated to design species-specific primers. Due to the high similarity of *P. erythroseptica* sequences to its closely related species, only one nuclear region, *TigA*, was appropriate to design specific primers. Using specific primers, a simple as well as a nested-PCR based method was developed for the identification and detection of *P. erythroseptica*. The specificity of designed primers was examined using a collection of *Phytophthora* species from different phylogenetic clades as well as close relatives of *P. erythroseptica*. In addition to pure DNA, designed primers detected *P. erythroseptica* in infected plant tissues including potato, tomato and spinach. Specific primers detected 10 pg of *P. erythroseptica* pure DNA, however, nested PCR increased primers sensitivity at least 100 times. Moreover, specific primers designed in this study were able to detect *P. erythroseptica* as the maternal or paternal parent species in hybrid isolates that would make a significant help to recognize one of the parental species in hybrids of *P. erythroseptica*.

**Keywords:** *Oomycota*, potato pink rot, polymerase chain reaction

---

\*Corresponding author's E-mail: b.safae@areeo.ac.ir

1. Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Shiraz, Iran.
2. Professor, Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz 7144165186, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Biodiversity, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.

## مقدمه

آمیزشی در گونه‌های فیتوفتورا همیشه ثابت نیست به طوری که پدیده‌ی هم‌تالی در چندین گونه‌ی دگرتال فیتوفتورا از جمله *P. drechsleri* که خویشاوند نزدیک *P. erythroseptica* است گزارش شده است (Mortimer et al. 1977). مشاهده‌ی رفتار هم‌تالی در جدایه‌های خاصی از گونه‌هایی که به طور معمول دگرتال هستند ممکن است ناشی از وجود یک کروموزوم اضافی (Fyfe & Shaw 1977, Mortimer et al. 1992)، وجود یک آران‌ای خارج کروموزومی (Judelson et al. 2010)، شرایط محیطی مانند وجود ترکیب‌های گیاهی یا قارچی خاص (Brasier 1971)، (Royle & Hickman 1964, Zentmyer et al. 1979)، نگهداری طولانی‌مدت در محیط‌های کشت (Tsao et al. 1980)، آسیب‌های فیزیکی (Reeves & Jackson 1974) و مواد موجود در قارچ‌کش‌ها (Groves & Ristaino 2000) باشد.

دورگ‌ها، نتاج حاصل از آمیزش میان دو گونه‌ی متفاوت هستند. دورگ‌شدن فرایند تکاملی مهمی در گیاهان است و در سازگاری با محیط نقش دارد (Soltis & Soltis 2009) اما این فرایند در قارچ‌ها و شبه قارچ‌ها کمتر شناخته شده است (Schardl & Craven 2003). در جنس فیتوفتورا، دورگ شدن بین گونه‌ای تنها در سال‌های اخیر مورد بررسی قرار گرفته است اما این فرایند در تکامل گونه‌های فیتوفتورا نقش مهمی دارد (Bertier et al. 2013). دورگ‌های فیتوفتورا، در اغلب موارد خصوصیات ریخت‌شناختی متمایزی با والدین خود ندارند لذا استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی آن‌ها ضروری است (Nirenberg et al. 2009, Yang et al. 2014). به طور معمول تشخیص گونه‌های والدی دورگ‌ها با هم‌سانه‌سازی توالی‌های هسته‌ای انجام می‌شود (Burgess 2015, Safaiefarahani et al. 2016) اما به دلیل پیچیدگی و

پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی ناشی از *Phytophthora erythroseptica* Pethybridge هر ساله در مناطق مختلف جهان خسارت اقتصادی قابل توجهی را به سیب‌زمینی در مزرعه و انبار وارد می‌کند (Lambert & Salas 2001, Peters et al. 2005, Secor & Gudmestad 1999, Vargas & Nielsen 1972). غده‌های سیب‌زمینی آلوده به این بیمارگر پس از بریده شدن و قرار گرفتن در معرض هوا ابتدا صورتی و در نهایت سیاه‌رنگ می‌شوند. این تغییر رنگ ناشی از اکسید شدن ترکیبات فنلی موجود در غده‌ی سیب‌زمینی است (Grisham et al. 1983). علی‌رغم خسارت قابل توجه *P. erythroseptica* روی سیب‌زمینی، دامنه‌ی میزبانی این بیمارگر محدود به سیب‌زمینی نبوده و قادر است گیاهان دیگری مانند گندم، جو، برنج و وحشی، نیشکر، گوجه‌فرنگی، اسفناج، بادمجان، برنج، شبدر، یونجه، هویج، لاله، رزماری و پسته را نیز آلوده کند (Delshad et al. 2020, Erwin & Ribeiro 1996, Gillings & Letham 1988).

بر اساس واکاوی‌های فیلوژنتیکی، *P. erythroseptica* به تبار هشت فیتوفتورا تعلق دارد و خویشاوند نزدیک *P. cryptogea* Pethybridge and *drechsleri* Tucker و *P. pseudocryptogea* Safaiefarahani, و Lafferty Blair (Mostowfizadeh, Hardy & T. I. Burgess et al. 2008, Kroon et al. 2004, Martin et al. 2014, Safaiefarahani et al. 2015). این گونه‌ها خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک مشابهی دارند و راه تمایز *P. erythroseptica* از خویشاوندان نزدیک آن بررسی رفتار آمیزشی است؛ زیرا گونه‌ی *P. erythroseptica* رفتار آمیزشی هم‌تالی را نشان می‌دهد در حالی که سه گونه‌ی دیگر اغلب دگرتال هستند (Erwin & Rebeir 1996, Safaiefarahani et al. 2015, Tucker 1931). اما رفتار

با توجه به خسارت اقتصادی *P. erythroseptica* ( Taylor et al. 2004, Yellareddygar et al. 2016 )، زمان گیر و مستعد خطا بودن شناسایی این گونه با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک ( Erwin & Rebeir 1996, Mortimer et al. 1977, Safaiefarahani 1931, Tucker et al. 2015 ) و یک‌نواختی و عدم وجود تنوع درون گونه‌ای قابل توجه در سطح مولکولی بین جدایه‌های این گونه ( Safaiefarahani & Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2018 )، استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ره‌یافتی منطقی برای شناسایی و ردیابی سریع و دقیق *P. erythroseptica* خواهد بود. هدف از انجام این پژوهش طراحی آغازگرهای اختصاصی و بهینه سازی شیوه استفاده از آن‌ها برای شناسایی و ردیابی *P. erythroseptica* و دورگ‌های آن است.

## مواد و روش‌های بررسی

### جدایه‌ها

در این پژوهش، ۸۰ جدایه از گونه‌های مختلف فیتوفتورا متعلق به مجموعه‌ی بخش گیاه‌پزشکی دانشگاه شیراز و مرکز مطالعات و مدیریت فیتوفتورا در دانشگاه مرداک استرالیا برای انجام آزمون‌های مختلف انتخاب شد (جدول ۱). والدین پدری و مادری جدایه‌های دورگ مورد استفاده در این پژوهش، پیش از این شناسایی و دورگ بودن جدایه‌ها اثبات شده است ( Safaiefarahani et al. 2016 ). جدایه‌ها روی محیط کشت CMA (عصاره‌ی ۴۰ گرم پودر ذرت، ۱۶ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر) کشت و در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شدند.

هزینه‌ی نسبتاً زیاد هم‌سانه‌سازی، استفاده از روش‌های ساده‌تر و ارزان‌تر مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی گونه‌های والدی دورگ‌ها بسیار مفید خواهد بود.

نخستین گام در مدیریت بیماری‌های گیاهی تشخیص سریع و دقیق عامل بیماری‌زا است (Fry 2012). به طور سنتی شناسایی گونه‌های فیتوفتورا اغلب بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک بوده است؛ اما تعداد این خصوصیات محدود و دامنه‌ی آن‌ها گاهی بسیار متغیر است. این موضوع سبب بروز مشکلاتی در شناسایی و تمایز گونه‌های این جنس از یک‌دیگر می‌شود ( Erwin & Ribeiro 1996, Stamps et al. 1990, Tucker 1931, Waterhouse 1963 ). پیشرفت‌های اخیر در استفاده از روش‌های مولکولی با رفع این مشکل، سبب افزایش قابل توجه تعداد گونه‌های توصیف شده‌ی جنس فیتوفتورا شده است (Yang et al. 2017). در میان روش‌های مولکولی، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روشی سریع و حساس برای شناسایی و ردیابی گونه‌های فیتوفتورا است (Cooke et al 2007, Ward et al. 2004). تا کنون مناطق حفاظت شده‌ی متفاوتی از ژنوم هسته‌ای و سیتوپلاسمی گونه‌های مختلف فیتوفتورا مانند فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی ( internal transcribed spacers = ITS )، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ ( heat shock protein 90 )، بتا توبولین (β-tubulin)، وای پی تی (Ypt) و سیتوکروم سی اکسیداز (cytochrome c oxidase) برای طراحی آغازگرهای اختصاصی به کار رفته است ( Durán et al. 2009, Li et al. 2014, Martin et al. 2004, Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2012, Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Banihashemi 2015, Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Mirsoleimani 2013, Silvar et al. 2005, Zolanvari et al. 2017 ).

جدول ۱. جدایه‌های *Phytophthora* spp. مورد استفاده در این پژوهش برای بررسی اختصاصیت آغازگرهاTable 1. *Phytophthora* spp. isolates used to evaluate primers specificity.

Species	Isolate	Hosts	Location
<i>P. arecae</i>	SCR18	-	-
<i>P. asparagi</i>	SCR21	-	-
<i>P. botryosa</i>	SCR21	-	-
<i>P. cactorum</i>	SCR27	<i>Rubus idaeus</i>	Wales
<i>P. cambivora</i>	SCR67	<i>R. idaeus</i>	Scotland
<i>P. capsici</i>	SCR103	<i>Piper nigrum</i>	India
<i>P. cinnamomi</i>	SCR115	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	Netherlands
<i>P. citricola</i>	SCR130	<i>R. idaeus</i>	Scotland
<i>P. citrophthora</i>	SCR179	<i>Actinidia</i> sp.	Chile
<i>P. cryptogea</i>	SCR206	-	England
	SCR230	<i>Rubus idaeus</i>	England
	SUC613	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	USA
<i>P. drechsleri</i>	SCR232	<i>Beta vulgaris</i>	USA
	SCR236	<i>Solanum tuberosum</i>	Argentina
<i>P. erythroseptica</i>	090NB	<i>S.tuberosum</i>	Canada
	SCR240	<i>S.tuberosum</i>	Netherland
	SCR241	<i>S.tuberosum</i>	Australia
	266-2	<i>S.tuberosum</i>	USA
	217-1	<i>S.tuberosum</i>	USA
	IICA2-3	<i>S.tuberosum</i>	USA
	IICO1-4	<i>S.tuberosum</i>	USA
	SUC655	<i>S.tuberosum</i>	USA
	MUC820	<i>S.tuberosum</i>	Iran
	MUC821	<i>S.tuberosum</i>	England
	MUC822	<i>S.tuberosum</i>	England
	MUC823	<i>S.tuberosum</i>	Netherlands
	MUC824	<i>S.tuberosum</i>	Netherlands
	MUC825	<i>S.tuberosum</i>	Australia
	MUC826	<i>S.tuberosum</i>	Australia
	MUC827	<i>S.tuberosum</i>	Canada
	MUC828	<i>S.tuberosum</i>	Canada
	MUC829	<i>S.tuberosum</i>	Canada
	MUC830	<i>S.tuberosum</i>	USA
	MUC831	<i>S.tuberosum</i>	USA
	MUC832	<i>S.tuberosum</i>	USA
	MUC833	<i>S.tuberosum</i>	USA
	MUC834	<i>S.tuberosum</i>	USA
	MUC835	<i>S.tuberosum</i>	USA
	MUC836	<i>S.tuberosum</i>	USA
	MUC837	<i>S.tuberosum</i>	USA
<i>P. pseudocryptogea</i>	SUC620	<i>Solanum melongena</i>	Iran
	SUC633	<i>S. melongena</i>	Iran
	VHS5380	<i>Xanthorrhoea preissii</i>	Australia
	DDS3612	<i>Banksia cirsioides</i>	Australia
	VHS16118	<i>Isopogon buxifolius</i>	Australia
<i>P. gonapodyides</i>	SUC660	-	-
<i>P. hydropathica</i>	SUC1012	-	-
<i>P. infestance</i>	Sc 03.26.3.3	<i>Solanum tuberosum</i>	Scotland
<i>P. inundata</i>	SCR644	<i>Salix</i> sp.	England
<i>P. irrigate</i>	SUC2317	-	-
<i>P. katsurae</i>	SCR389	<i>Theobroma cacao</i>	N. Sulawasi
<i>P. meadii</i>	SCR400	-	-

Table 1. Continued.

Species	Isolate	Hosts	Location
<i>P. medicaginis</i>	SCR407	<i>Medicago sativa</i>	Iran
<i>P. melonis</i>	SUD26	<i>Cucumis melo</i>	Iran
<i>P. nicotianae</i>	SCR468	<i>Citrus</i> sp.	Trinidad
<i>P. palmivora</i>	SCR526	<i>Hevea brasiliensis</i>	Thailand
<i>P. parsiana</i>	SUC25	<i>Pistacia vera</i>	Iran
<i>P. pistaciae</i>	SUD44	<i>P. vera</i>	Iran
<i>P. quercina</i>	SCR541	<i>Quercus robur</i>	Germany
<i>P. ramorum</i>	Alex1	<i>Rhododendron</i> sp.	Scotland
<i>P. soja</i>	SCR555	<i>Glycine max</i>	USA
<i>P. tropicalis</i>	7Ga	<i>Piper nigrum</i>	USA
<i>P. cryptogea</i> × <i>P. erythroseptica</i>	WAC6627	-	Australia
	SUC654	-	-
	SUC636	-	USA
<i>P. erythroseptica</i> × <i>P. pseudocryptogea</i>	PS1	<i>S. tuberosum</i>	Iran
	PS4	<i>S. tuberosum</i>	Iran
	PS9	<i>S. tuberosum</i>	Iran
<i>P. pseudocryptogea</i> × <i>P. sansomeana</i>	SUC622	<i>B. vulgaris</i>	Iran
	SUC623	<i>B. vulgaris</i>	Iran
	SUC628	<i>B. vulgaris</i>	Iran
<i>P. cryptogea</i> × <i>P. pseudocryptogea</i>	SUC605	<i>Gerbera jamesonii</i>	France
<i>P. pseudocryptogea</i> × <i>P. cryptogea</i>	SUC607	<i>Ozothamnus vagans</i>	England
	SUC608	-	-
	SUC614	<i>Gerbera jamesonii</i>	France
	SUC630	<i>B. vulgaris</i>	Iran
	SUC641	<i>Rosmarinus officinalis</i>	France
	SCR1086	-	Poland
	SCR1087	-	Poland
	SCR1088	-	Poland

### استخراج دی‌ان‌ای

به کمک نیتروژن مایع، به مدت ۲۴ ساعت سرماخشک شد. استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از بافر CTAB حاوی پروتئیناز کی و آرآن‌آز مطابق روش اندجیک و همکاران (Andjic et al. 2007) انجام شد.

### طراحی آغازگرها

توالی‌های چهار ناحیه‌ی هسته‌ای شامل فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی (ITS)، بتاتوبولین (BT)، تیگ‌ای (*TigA*) و پروتئین شوک حرارتی ۹۰ (HSP 90) و دو توالی میتوکندریایی شامل زیرواحد یک سیتوکروم سی اکسیداز (COX I) و زیر واحد یک NADH دهیدروژناز (NADH I) مربوط به گونه‌های مختلف فیتوفتورا و متعلق

هر یک از جدایه‌های مورد آزمون روی محیط کشت CMA کشت شده و پس از پنج روز از حاشیه‌ی جوان هر یک از پرگنه‌ها شش قطعه به قطر تقریبی پنج میلی‌متر جدا و به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر عصاره‌ی سترون شده‌ی سیب‌زمینی منتقل شد. فلاسک‌ها به مدت ۱۲ روز در تاریکی و ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفتند سپس محتویات هر فلاسک در ظروف سترون خالی و پرگنه‌ها با استفاده از آب مقطر سترون شسته شد. میسلیم‌های موجود در هر پرگنه با استفاده از سوزن‌های سترون از قطعات محیط‌کشت آگاردار جدا شده، داخل ریزلوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفت و پس از یخ زدن

(BSA)، ۱۰۰ میکرومول انواع نوکلئوتید (dNTPs)، ۲ میکرومول  $MgCl_2$ ، ۱ میکرومول از هر آغازگر، ۰/۴ واحد *Taq* دی‌ان‌ای پلیمراز (Fisher Biotech, Australia) و ۱۰۰ نانوگرم دی‌ان‌ای هدف انجام شد. برای اطمینان از عدم آلودگی مواد مصرفی، در کلیه واکنش‌ها نمونه فاقد دی‌ان‌ای به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

بهترین دمای هم‌جوشی برای آغازگرها با استفاده از شیب دمایی (بین ۵۶ تا ۶۷ درجه‌ی سلسیوس) در اطراف دمای گداز ( $T_m$ ) ارزیابی شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ساده، با واسرشتگی اولیه (initial denaturation) به مدت ۱۲۰ ثانیه در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس آغاز شد. سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشتگی (denaturation) در ۹۴ درجه‌ی سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، هم‌جوشی در دامنه‌ی ذکر شده برای ۴۵ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس برای ۶۰ ثانیه و گسترش نهایی (final extension) در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس برای ۳۰۰ ثانیه انجام شد.

به منظور بالا بردن حساسیت آغازگرهای منتخب، امکان انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تودرتو با استفاده از آغازگرهای *Tig\_FY* و *G3PDH\_rev* (Blair et al. 2008) به عنوان آغازگرهای خارجی در یک واکنش مجزا و آغازگرهای اختصاصی طراحی شده ژن *TigA* در این پژوهش به عنوان آغازگرهای داخلی در واکنش دوم مورد ارزیابی قرار گرفت. شرایط انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تودرتو مانند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ساده انتخاب شد.

نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ساده و تودرتو با الکتروفورز در ژل یک درصد آگارز حاوی ۰/۰۰۵٪ اتیدیوم بروماید در بافر TBE (۱۰/۸ گرم تریس، ۰/۳۷ گرم EDTA، ۵/۵ گرم اسید بوریک، آب مقطر تا حجم یک لیتر) به مدت یک ساعت و در ۸۰ ولت تأیید و قطعات

به مطالعه‌های پیشین (Blair et al. 2008, Cooke et al. 2000, Kroon et al. 2004, Martin et al. 2004, Safaiefarahani et al. 2015) از بانک ژن استخراج شد. هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها به روش دستی و با استفاده از نرم افزار GeneiousPro v4.8.1 (Drummond et al. 2010) انجام شد. توالی‌های هم‌ردیف‌سازی شده با استفاده از Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)

برای طراحی آغازگرهای اختصاصی *P. erythrosetptica* مورد ارزیابی قرار گرفت به گونه‌ای که قطعه‌ی فزون‌سازی شده‌ی حاصل از دو آغازگر دست‌کم ۱۰۰ جفت باز داشته باشد. پس از طراحی آغازگرها، خصوصیات کلیدی آن‌ها مانند دمای گداز ( $T_m = \text{melting temperature}$ )، خود جور شوندگی (self complementarity) و درصد G-C استفاده از Oligo Calculator (<http://biotools.nubic.nor.thwestern.edu/OligoCalc.html>) مورد ارزیابی قرار گرفت (Kibbe 2007). پس از طراحی، ساخت آغازگرها توسط شرکت متابیون (آلمان) انجام شد.

#### واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ساده و تودرتو

به منظور بیشینه کردن میزان فزون‌سازی قطعه‌ی هدف و جلوگیری از تولید قطعات غیر اختصاصی، شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل دمای هم‌جوشی (annealing)، زمان مراحل هم‌جوشی و گسترش (extension)، تعداد چرخه‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، غلظت آغازگرها و  $MgCl_2$  بهینه‌سازی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسیکلر (Peltier Thermal cycler, England) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ۲۵ میکرولیتر واکنش شامل ۳ میکرولیتر از بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (Fisher Biotech, Australia)، ۱۰۰ میکرومول بی‌اس‌ای

دی‌ان‌ای زیر پرتو فرابنفش بررسی شد.

### ارزیابی اختصاصیت آغازگرها

برای ارزیابی اختصاصیت آغازگرها، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دی‌ان‌ای گونه‌ها و دورگ‌های مختلف فیتوفتورا (جدول ۱) انجام شد و قطعات حاصل از فزون سازی مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور علاوه بر خویشاوندان نزدیک *P. erythroseptica* جدایه‌هایی از سایر گونه‌ها و دورگ‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت که متعلق به تبارهای فیلوژنتیکی مختلف و نماینده‌ی تنوع موجود در جنس فیتوفتورا بودند. همچنین، میزان اختصاصیت آغازگرها در برابر مجموعه‌ی ژنومی تمامی گونه‌های توصیف شده‌ی فیتوفتورا موجود در بانک ژن (GenBank, NCBI, USA; [Online] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PrimerBlast>) با استفاده از برنامه (Ye et al. 2012) و به صورت درون رایانه‌ای (*in silico*) ارزیابی شد.

### ارزیابی حساسیت آغازگرها

غلظت‌های دقیقی از دی‌ان‌ای مورد آزمون با دامنه‌ی ۱۰۰ نانوگرم ( $10^{-9}$ ) تا ۱۰ فمتوگرم ( $10^{-15}$ ) با استفاده از میکرواسپکتروفوتومتری تهیه و حساسیت آغازگرها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده و تودرتو بررسی شد.

### ردیابی بیمارگر در بافت آلوده گیاهی

گیاهچه‌های دو تا سه هفته‌ای گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*)، بادمجان (*Solanum melongena*) و اسفناج (*Spinacia oleracea*) با استفاده از جدایه‌های SCR241 (*P. erythroseptica*)، SUC636 (*P.*

*P. erythroseptica* × *P. cryptogea*) و PS4 (*P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea*) به طور جداگانه مایه‌زنی شدند (Safaiefarahani et al. 2013). پس از بروز علائم آلودگی، قطعاتی به وزن ۰/۵ گرم از بافت آلوده گیاهان برداشته و برای استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از بافر CTAB حاوی پروتئیناز کی و آرآن‌آز مورد استفاده قرار گرفت (Andjic et al. 2007). دی‌ان‌ای به دست آمده برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده و تودرتو به روشی که پیش از این ذکر شد به کار رفت.

### توالی‌سنجی قطعات فزون‌سازی شده

پس از فزون‌سازی توالی‌ها با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، خالص‌سازی محصولات پی‌سی‌آر با استفاده از ستون‌های Sephadex G-50 و با استفاده از روش ساکالیدیس و همکاران (Sakalidis et al. 2011) انجام شد و دی‌ان‌ای خالص شده توسط شرکت AGRF (Australian Genome Research Facility) (استرالیا، پرت) توالی‌سنجی گردید.

### نتایج

#### طراحی آغازگرها

از بین توالی‌های بررسی شده تنها ژن *TigA* برای طراحی آغازگر مناسب تشخیص داده شد. با استفاده از این ژن، آغازگر پیش‌سو (forward) با طول ۲۰ نوکلئوتید و توالی 5'-CAGCACATCTTCGTGGACGA-3' و آغازگر برگشتی (reverse) با طول ۱۹ نوکلئوتید و توالی 3'-CGACACGACAGCCTTCTCG-5' طراحی شد. آغازگرهای پیش‌سو و برگشتی به ترتیب *TigA-EF* و *TigA-ER* نام‌گذاری شدند. بهترین دمای هم‌جوشی برای



سازی شده کاملاً مشابه قطعه‌ی مورد انتظار حاصل از فزون سازی آغازگرهای اختصاصی است.

### بحث

در این پژوهش یک جفت آغازگر اختصاصی با استفاده از توالی ناحیه‌ی *TigA* طراحی شد که قادر به شناسایی و ردیابی *P. erythroseptica* و دورگ‌های  $\times P. cryptogea$  *P. erythroseptica*  $\times P.$  و *Pseudocryptogea* بود. سایر توالی‌های هسته‌ای و میتوکندریایی مورد بررسی در این پژوهش، به دلیل عدم وجود تمایز کافی با سایر گونه‌های فیتوفتورا برای طراحی آغازگرهای اختصاصی مناسب تشخیص داده نشد. علیرغم طراحی آغازگرهای اختصاصی برای گونه‌های مختلف فیتوفتورا مانند *P. capsici* (Silvar et al. 2005)، *P. drachsleri* (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Mostowfizadeh- 2015)، *P. inundata* (Banihashemi 2015)، *P. melonis* (Ghalamfarsa 2012)، *P. pinifolia* (Duran et al. 2009) و *P. pistaciae* (Mirsoleimani 2013)، به دلیل شباهت زیاد توالی‌های *erythroseptica* به خویشاوندان نزدیک آن پژوهش‌هایی که پیش از این برای طراحی آغازگرهای اختصاصی این گونه انجام شده موفقیت‌آمیز نبوده است به گونه‌ای که آغازگرهای طراحی شده قادر به تمایز *P. erythroseptica* از خویشاوندان نزدیک آن به ویژه *P. cryptogea* نبوده‌اند (Cullen et al. 2007, Tooley et al. 1997). مستوفی‌زاده قلمفرسا و بنی‌هاشمی (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Banihashemi 2015) جفت آغازگری طراحی کردند که *P. cryptogea/P. erythroseptica* را از سایر گونه‌های فیتوفتورا متمایز می‌کرد اما قادر به شناسایی اختصاصی این

آغازگرها با استفاده از شیب دمایی در اطراف دمای گداز ( $T_m$ )، ۶۴ درجه‌ی سلسیوس تعیین شد.

### اختصاصیت و حساسیت آغازگرها

اندازه‌ی مورد انتظار برای قطعه‌ی فزون‌سازی شده با استفاده از آغازگرهای *TigA-ER* و *TigA-EF* ۶۵۶ جفت باز بود که در تمام جدایه‌های *P. erythroseptica* و دورگ‌های  $\times P. cryptogea$  *P. erythroseptica* و *P. pseudocryptogea*  $\times P. erythroseptica$  مشاهده شد در حالی که این قطعه در سایر جدایه‌های مورد آزمون، فزون‌سازی نشد (شکل ۱). ارزیابی درون رایانه‌ای در برابر مجموعه‌ی ژنومی تمامی گونه‌های توصیف شده‌ی فیتوفتورا موجود در بانک ژن نیز نشان داد آغازگرهای مورد آزمون، اختصاصی *P. erythroseptica* و دورگ‌های آن بوده و قادر به فزون سازی قطعه‌ای در سایر گونه‌های فیتوفتورا نیستند.

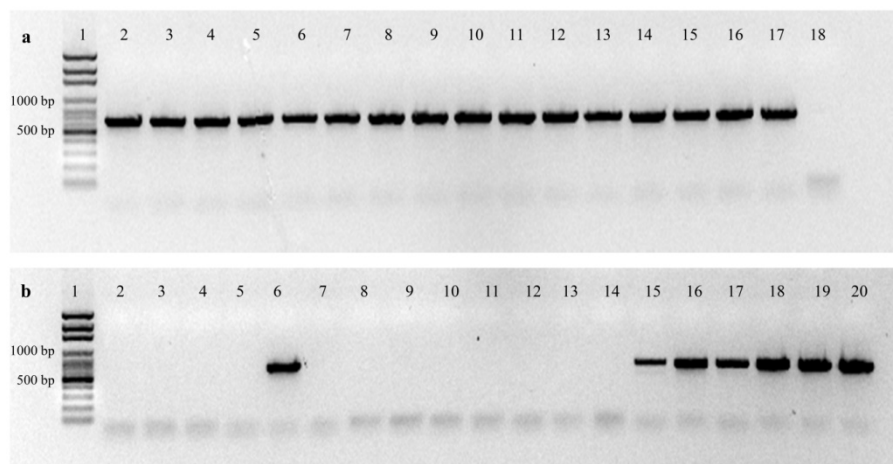
میزان حساسیت آغازگرهای طراحی شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده و تودرتو در جدول ۲ نشان داده شده است.

### ردیابی بیمارگر در بافت آلوده گیاهی

آغازگرهای طراحی شده قادر به ردیابی *P. erythroseptica* و دورگ‌های  $\times P. cryptogea$  *P. erythroseptica*  $\times P.$  و *Pseudocryptogea* در بافت آلوده‌ی میزبان توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده و تودرتو بودند (جدول ۳).

### توالی‌سنجی قطعات فزون‌سازی شده

جستجوی BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) نتایج توالی‌سنجی نشان داد توالی تمامی قطعات فزون-



شکل ۱- نمونه‌ای از نقوش الکتروفورز حاصل از قطعات فزون‌سازی شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در جدایه‌های مختلف *P. erythroseptica* و دورگ‌های آن و مقایسه آن با سایر گونه‌ها و دورگ‌های خویشاوند. بالا: (۱) نشانگر دی‌ان‌ای، (۲) *P. erythroseptica*: 090NB (۳) *P. erythroseptica*: SCR240 (۴) *P. erythroseptica*: SCR241 (۵) *P. erythroseptica*: 266-2 (۶) *P. erythroseptica*: 217-1 (۷) *P. erythroseptica*: IICA2-3 (۸) *P. erythroseptica*: IICO1-4 (۹) *P. erythroseptica*: SUC655 (۱۰) *P. erythroseptica*: MUC820 (۱۱) *P. erythroseptica*: MUC821 (۱۲) *P. erythroseptica*: MUC823 (۱۳) *P. erythroseptica*: MUC825 (۱۴) *P. erythroseptica*: MUC827 (۱۵) *P. erythroseptica*: MUC830 (۱۶) *P. erythroseptica*: MUC832 (۱۷) *P. erythroseptica*: MUC836 (۱۸) شاهد منفی. پایین: (۱) نشانگر دی‌ان‌ای، (۲) شاهد منفی، (۳) *P. erythroseptica*: MUC832، (۴) *P. drechsleri*: SCR232، (۵) *P. pseudocryptogea*: SUC620، (۶) *P. cryptogea*: SCR230، (۷) *P. pseudocryptogea* × *P. sansomeana*: SUC622، (۸) *P. pseudocryptogea* × *P. sansomeana*: SUC623، (۹) *P. pseudocryptogea* × *P. cryptogea*: SUC607، (۱۰) *P. pseudocryptogea* × *P. cryptogea*: SUC605، (۱۱) *P. pseudocryptogea* × *P. cryptogea*: SUC614، (۱۲) *P. pseudocryptogea* × *P. cryptogea*: SUC641، (۱۳) *P. pseudocryptogea* × *P. cryptogea*: SCR21086، (۱۴) *P. pseudocryptogea* × *P. cryptogea*: SUC641، (۱۵) *P. cryptogea* × *P. erythroseptica*: WAC6627، (۱۶) *P. cryptogea* × *P. erythroseptica*: SUC654، (۱۷) *P. cryptogea* × *P. erythroseptica*: SUC636، (۱۸) *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea*: PS1، (۱۹) *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea*: PS4، (۲۰) *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea*: PS9

Fig 1. An example of the electrophoretic patterns of the fragments amplified in polymerase chain reaction using different isolates of *P. erythroseptica* and its hybrids compared to other related species and hybrids. a: (1) DNA ladder, (2) *P. erythroseptica*: 090NB, (3) *P. erythroseptica*: SCR240, (4) *P. erythroseptica*: SCR241, (5) *P. erythroseptica*: 266-2, (6) *P. erythroseptica*: 217-1, (7) *P. erythroseptica*: IICA2-3, (8) *P. erythroseptica*: IICO1-4, (9) *P. erythroseptica*: SUC655, (10) *P. erythroseptica*: MUC820, (11) *P. erythroseptica*: MUC821, (12) *P. erythroseptica*: MUC823, (13) *P. erythroseptica*: MUC825, (14) *P. erythroseptica*: MUC827, (15) *P. erythroseptica*: MUC830, (16) *P. erythroseptica*: MUC832, (17) *P. erythroseptica*: MUC836, (18) negative control. b: (1) DNA ladder, (2) negative control, (3) *P. drechsleri*: SCR232, (4) *P. cryptogea*: SCR230, (5) *P. pseudocryptogea*: SUC620, (6) *P. erythroseptica*: MUC833, (7) *P. pseudocryptogea* × *P. sansomeana*: SUC622, (8) *P. pseudocryptogea* × *P. sansomeana*: SUC623, (9) *P. pseudocryptogea* × *P. sansomeana*: SUC628, (10) *P. cryptogea* × *P. pseudocryptogea*: SUC605, (11) *P. pseudocryptogea* × *P. cryptogea*: SUC607, (12) *P. pseudocryptogea* × *P. cryptogea*: SUC614, (13) *P. pseudocryptogea* × *P. cryptogea*: SUC641, (14) *P. pseudocryptogea* × *P. cryptogea*: SCR21086, (15) *P. cryptogea* × *P. erythroseptica*: WAC6627, (16) *P. cryptogea* × *P. erythroseptica*: SUC654, (17) *P. cryptogea* × *P. erythroseptica*: SUC636, (18) *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea*: PS1, (19) *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea*: PS4, (20) *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea*: PS9

جدول ۲. اثر مقدار دی‌ان‌ای الگو (در میکرولیتر نمونه) از *Phytophthora erythroseptica*، *P. cryptogea* × *P. erythroseptica* و *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea* بر کیفیت محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده و تودرتو با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی.

**Table 2. Effect of *Phytophthora erythroseptica*, *P. cryptogea* × *P. erythroseptica* and *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea* template DNA quantity (per µl sample) on PCR product quality on simple and nested-PCR using species-specific primers.**

Primer sets	DNA Quantity <sup>a</sup>									
	100 ng	10 ng	1 ng	500 pg	100 pg	50 pg	10 pg	1 pg	100 fg	10 fg
<b><i>P. erythroseptica</i></b>										
EF&ER	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-
N <sup>b</sup> - EF&ER	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-
<b><i>P. cryptogea</i> × <i>P. erythroseptica</i></b>										
EF&ER	+++	++	++	+	+	+	-	-	-	-
N- EF&ER	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-
<b><i>P. erythroseptica</i> × <i>P. pseudocryptogea</i></b>										
EF&ER	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-	-
N- EF&ER	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	-

+++ = Very good band. ++ = Good band. + = Reasonable band. - = No band.

<sup>a</sup> ng = nano ( $10^{-9}$ ) gram. pg = pico ( $10^{-12}$ ) gram. fg = femto ( $10^{-15}$ ) gram.

<sup>b</sup> N= Nested PCR with corresponding universal primer pairs (Tig\_FY & G3PDH\_rev).

جدول ۳. ردیابی *Phytophthora erythroseptica*، *P. cryptogea* × *P. erythroseptica* و *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea* در گیاهان مختلف مایه‌زنی شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (EF و ER) در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده و تودرتو.

**Table 3. Detection of *Phytophthora erythroseptica*, *P. cryptogea* × *P. erythroseptica* and *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea* in different inoculated plants using PCR species-specific primers (EF&ER) in simple and nested polymerase chain reaction.**

Common name	Scientific name	Inoculated by	PCR detection by	
			EF&ER	N <sup>a</sup> -EF&ER
Tomato	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>P. erythroseptica</i>	++	+++
		<i>P. cryptogea</i> × <i>P. erythroseptica</i>	+	++
		<i>P. erythroseptica</i> × <i>P. pseudocryptogea</i>	++	+++
Eggplant	<i>Solanum melongena</i>	<i>P. erythroseptica</i>	+	++
		<i>P. cryptogea</i> × <i>P. erythroseptica</i>	+	+++
		<i>P. erythroseptica</i> × <i>P. pseudocryptogea</i>	+	++
Spinach	<i>Spinacia oleracea</i>	<i>P. erythroseptica</i>	++	+++
		<i>P. cryptogea</i> × <i>P. erythroseptica</i>	++	+++
		<i>P. erythroseptica</i> × <i>P. pseudocryptogea</i>	++	+++

+++ = Very good band. ++ = Good band. + = Reasonable band.

<sup>a</sup> N= Nested PCR with corresponding universal primer pairs.

تنها نیمی از ماده‌ی ژنتیکی دورگ را تشکیل می‌دهند (Schardl & Craven 2003, Soltis & Soltis 2009). بنابراین میزان دی‌ان‌ای موجود در جدایه‌های دورگ که به والد *P. erythroseptica* تعلق داشته کمتر از جدایه‌های غیر دورگ بوده است و این امر سبب کاهش میزان حساسیت آغازگرها در ردیابی دورگ‌های *P. cryptogea* × *P. erythroseptica* و *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea* در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده شده است. جفت آغازگر مورد آزمون، در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو حساسیت بیش‌تری از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده داشته و قادر به ردیابی ۱۰۰ فمتوگرم از دی‌ان‌ای *P. erythroseptica* و دورگ‌های *P. cryptogea* × *P. erythroseptica* و *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea* بودند. این افزایش حساسیت به این دلیل است که واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو با استفاده از محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده به عنوان هدف، قادر به ردیابی مقادیر کمتری از دی‌ان‌ای هدف است (Wanger et al. 2017). افزایش حساسیت در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو در آغازگرهای اختصاصی *P. melonis* (Zolanvari et al. 2017)، *P. pistaciae* (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Mirsoleimani 2013) و *P. inundata* (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Mirsoleimani 2013) و *P. drachsleri* (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Banhashemi 2015) نیز گزارش شده است.

دورگ‌شدن بین گونه‌ای در جنس فیتوفتورا در سال‌های اخیر مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده که این فرآیند نقش مهمی در تکامل گونه‌های فیتوفتورا دارد (Bertier et al. 2013, Burgess 2015). تا کنون دورگ‌های متعددی در تبار ۱ (Bonants et al. 2000, Goss et

دو گونه از یک‌دیگر نبود و تمایز این دو گونه نیاز به استفاده از آنزیم برشی *Mnl I* داشت. در مقابل، بررسی اختصاصیت جفت آغازگر طراحی شده در پژوهش حاضر نشان داد که این آغازگرها اختصاصی *P. erythroseptica* و دورگ‌های آن بوده و قادر به فزون‌سازی قطعه‌ای در سایر گونه‌های فیتوفتورا و دورگ‌هایی که یکی از والدینشان *P. erythroseptica* نباشد نیستند. علاوه بر این آغازگرهای فوق قادر به شناسایی و ردیابی تمامی جدایه‌های *P. erythroseptica* متعلق به نواحی جغرافیایی مختلف بودند.

جفت آغازگر طراحی شده در این پژوهش قادر به ردیابی ۱۰ پیکوگرم از دی‌ان‌ای *P. erythroseptica* در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده بودند که نشان می‌دهد حساسیت آن از حساسیت آغازگرهای اختصاصی *P. pinifolia* (Duran et al. 2009)، *P. capsici* (Silvar et al. 2005)، *P. melonis* (Zolanvari et al. 2017) و از حساسیت آغازگرهای اختصاصی *P. pistaciae* (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Mirsoleimani 2013) و *P. inundata* (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2012) و *P. drachsleri* (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Banhashemi 2015) بیش‌تر است. این تفاوت در میزان حساسیت آغازگرها، علاوه بر توالی آن‌ها ممکن است ناشی از اختلاف در شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و تعداد چرخه‌های واکنش باشد (Drenth et al. 2006). در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده، میزان حساسیت آغازگرها در دورگ‌های *P. cryptogea* × *P. erythroseptica* و *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea* کمتر از *P. erythroseptica* و معادل با ۵۰ پیکوگرم بود. کم‌تر بودن حساسیت به این دلیل است که در دورگ‌های بین گونه‌ای فیتوفتورا، هر یک از والدین

*P. erythroseptica* × *P. cryptogea* در دورگ‌های *P. erythroseptica* × *P. erythroseptica* و *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea* هستند. گونه‌ی *P. erythroseptica* در دورگ *P. erythroseptica* × *P. cryptogea* والد پدری و در دورگ *P. erythroseptica* × *P. pseudocryptogea* والد مادری است. شناسایی این گونه در هر دو جدایه‌ی دورگ نشان می‌دهد آغازگر طراحی شده قادر به شناسایی هر دو والد مادری و پدری در جدایه‌های دورگ است. این موضوع ناشی ماهیت هسته‌ای ژن مورد استفاده برای طراحی آغازگر است. با توجه به این که واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی روشی سریع‌تر، ساده‌تر و ارزان‌تر از همسانه‌سازی ژن‌ها است، استفاده از این آغازگرها کمک بزرگی به شناسایی جدایه‌های دورگ *P. erythroseptica* خواهد بود که یکی از والدین آن‌ها *P. erythroseptica* باشد.

آغازگرهایی که در این پژوهش معرفی شدند، شناسایی *P. erythroseptica* و دورگ‌های آن و نیز ردیابی این بیمارگرها را در بافت‌های آلوده گیاهی، در مدت زمان کوتاهی امکان پذیر می‌کنند. این آغازگرها اختصاصیت بالایی داشته، در سایر گونه‌ها و دورگ‌های فیتوفتورا هیچ قطعه‌ای را فزون‌سازی نمی‌کنند. در مجموع، استفاده از این آغازگرها علاوه بر کمک به تشخیص گونه والدی در جدایه‌های دورگ، برای اثبات وجود بیمارگر در گیاهان آلوده و انجام اقدامات مدیریتی مفید خواهد بود.

al. 2011, Hurtado-Gonzales et al. 2009, Man in't Veld et al. 2007, Man in't Veld et al. 2012, Burgess 2015, Nagel ) ۶ تبار (Nirenberg et al. 2009, Bertier et al. ) ۷ تبار (et al. 2013, Yang et al. 2014, Husson et al. 2015, Ios et al. 2006, Stamler Bertier et al. 2013, ) ۸ تبار (et al. 2016 (Safaiefarahani et al. 2016) و تبار ۹ (Oh et al. 2013) فیتوفتورا گزارش شده است. این دورگ‌ها حاصل از در کنار هم قرار گرفتن گونه‌هایی هستند که پیش‌تر در اثر گونه‌زایی دگر بوم به وجود آمده‌اند ( Bertier et al. 2013, ) ۲۰۰۸, Burgess 2015, Stuckenbrock et al. 2013). دورگ‌های فیتوفتورا با نوترکیبی آلل‌ها و ژن‌های دو والد و تکامل سریع آن‌ها، دامنه‌ی میزبانی متفاوتی با والدین خود دارند و می‌توانند تهدید جدیدی برای کشاورزی باشند ( Bertier et al. 2013, Man in't Veld et al. 2012, Man in't Veld et al. 2012). مدیریت بیماری‌های گیاهی ناشی از دورگ‌های فیتوفتورا نیازمند شناسایی صحیح آن‌ها است. اما اغلب دورگ‌های فیتوفتورا از نظر خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک به والدین خود شباهت دارند و شناسایی آن‌ها تنها با استفاده از روش‌های مولکولی شامل توالی‌سنجی و همسانه‌سازی ژن‌های هسته‌ای و میتوکندریایی امکان‌پذیر است ( Bertier et al. 2013, Burgess 2015, Goss et al. 2011, Hurtado-Gonzales et al. 2009, Man et al. 2007, Man in't Veld et al. 2012, Nagel et al. 2013, Nirenberg et al. 2009, Yang et al. 2014). مطالعه‌ی حاضر نشان داد جفت آغازگرهای طراحی شده قادر به شناسایی والد *P.*

## منابع

- Andjic V., Cortinas M.N., Hardy G.E.St. J., Wingfield M.J. and Burgess T.I. 2007. Multiple gene genealogies reveal important relationships between species of *Phaeophleospora* infecting Eucalyptus leaves. FEMS Microbiology Letters 268: 22-33.
- Bertier L., Leus L., D'hondt L., de Cock A.W. and Höfte M., 2013. Host adaptation and speciation through hybridization and polyploidy in *Phytophthora*. PloS one 8: e85385.
- Blair J.E., Coffey M.D., Park S.Y., Geiser D.M. and Kang, S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora*

- utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45: 266–277.
- Bonants P.J.M., Hagenaar-de Weerd M., Man in't Veld W.A. and Baayen R.P. 2000. Molecular characterization of natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*. *Phytopathology* 90: 867–874.
- Brasier C.M. 1971. Induction of sexual reproduction in single A2 isolates of *Phytophthora* species by *Trichoderma viride*. *Nature New Biology* 231: 283.
- Brasier C.M. 2008. The biosecurity threat to the UK and global environment from international trade in plants. *Plant Pathology* 57:792–808.
- Brasier C.M., Kirk S.A., Delcan J., Cooke D.E.L., Jung T. and Man in't Veld W.A. 2004. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees. *Mycological Research* 108: 1172–1184.
- Burgess T.I. 2015. Molecular characterization of natural hybrids formed between five related indigenous clade 6 *Phytophthora* species. *PLoS One* 10: p.e0134225.
- Cooke D.E., Schena L. and Cacciola S.O. 2007. Tools to detect identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems. *Journal of Plant Pathology* 89: 13–28.
- Cooke D.E.L., Drenth A., Duncan J.M., Wagel, G. and Brasier C.M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30: 17–32.
- Cullen D.W., Toth I.K., Boonham N., Walsh K., Barker I. and Lees A.K., 2007. Development and validation of conventional and quantitative polymerase chain reaction assays for the detection of storage rot potato pathogens, *Phytophthora erythroseptica*, *Pythium ultimum* and *Phoma foveata*. *Journal of Phytopathology* 155: 309–315.
- Delshad D., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R, Safaifarrahani B. 2020. Potential host range and the effect of temperature on the pathogenicity of *Phytophthora pseudocryptogea* and its close relatives from clade 8a. *Journal of Plant Pathology* (In press).
- Drenth A., Wagels G., Smith B., Sendall B., O'Dwyer C., Irvine G. and Irwin JA. 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australasian Plant Pathology* 35: 147–159.
- Drummond A.J., Ashton B., Buxton S., Cheung M., Cooper A., Heled J., Kearse M., Moir R., Stones-Havas S., Sturrock S., Thierer T. and Wilson A. 2010. Geneious v5.1, Available from <http://www.geneious.com>.
- Durán A., Slippers B., Gryzenhout M., Ahumada R., Drenth A., Wingfield B.D. and Wingfield M.J. 2009. DNA-based method for rapid identification of the pine pathogen, *Phytophthora pinifolia*. *FEMS Microbiology Letters* 298: 99–104.
- Erwin D.C. and Ribeiro O.K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press. American Phytopathological Society. St. Paul, Min., USA.
- Fry W.E. 2012. Principles of Plant Disease Management. Academic Press., USA. 378 pp.
- Fyfe A.M. and Shaw D.S. 1992. An analysis of self-fertility in field isolates of *Phytophthora infestans*. *Mycological Research* 96: 390-394.
- Gillings M.R. and Letham D.B. 1988. *Phytophthora erythroseptica* causing wilting and stunting of tomato. *Australian Plant Pathology*.18: 3–5.
- Goss E.M, Cardenas M.E., Myers K, Forbes G.A., Fry W.E, Restrepo S, Grünwald N.J., 2011. The plant pathogen *Phytophthora andina* emerged via hybridization of an unknown *Phytophthora* species and the Irish potato famine pathogen, *P. infestans*. *PloS One* 6: e24543.
- Grisham M.P., Taber R.A. and Barnes L.W. 1983. *Phytophthora* rot of potatoes in Texas caused by *Phytophthora parasitica* and *P. cryptogea*. *Plant Disease* 67: 1259–1261.
- Groves C.T. and Ristaino J.B. 2000. Commercial fungicide formulations induce in vitro oospore formation and phenotypic change in mating type in *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 90: 1201-1208.
- Hurtado-Gonzales O.P., Aragon-Caballero L.M., Flores-Torres J.G., Man in't Veld W. and Lamour K.H., 2009. Molecular comparison of natural hybrids of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum* infecting loquat trees in Peru and Taiwan. *Mycologia* 101: 496–502.
- Husson C., Aguayo J., Revellin C., Frey P., Ioos R. and Marc ais B. 2015. Evidence for homoploid speciation in *Phytophthora alni* supports taxonomic reclassification in this species complex. *Fungal Genetics and Biology* 77: 12–21.

- Ioos R., Andrieux A., Marc ais B. and Frey P., 2006. Genetic characterization of the natural hybrid species *Phytophthora alni* as inferred from nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Fungal Genetics and Biology* 43: 511–529.
- Judelson H.S., Ah-Fong A.M.V. and Fabritius A. 2010. An RNA symbiont enhances heat tolerance and secondary homothallism in the oomycete *Phytophthora infestans*. *Microbiology* 156: 2026–2034.
- Kibbe W. A. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator?. *Nucleic Acids Research* 35: 43–46.
- Kroon L.P.N.M., Bakker F.T., Van Den Bosch G.B.M., Bonants P.J.M. and Flier W.G., 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* 41: 766–782.
- Lambert D.H. and Salas B. 2001. Pink rot. Pp. 33-34. *In: Compendium of Potato Diseases*, (Stevenson, W.R., Loria, R., Franc, G.D. & Weingartner D.P). St. Paul: The American Phytopathological Society Press.
- Li B., Liu P., Xie S., Yin R., Weng Q. and Chen Q. 2014. Specific and sensitive detection of *Phytophthora nicotianae* by nested PCR and loop-mediated isothermal amplification assays. *Journal of Phytopathology* 163: 185–193.
- Man in't Veld W.A., de Cock A.W.A.M. and Summerbell R.C. 2007. Natural hybrids of resident and introduced *Phytophthora* species proliferating on multiple new hosts. *European Journal of Plant Pathology* 117: 25–33.
- Man in't Veld W.A., Rosendahl K.C.H.M. and Hong C. 2012. *Phytophthora serendipita* sp. nov. and *P. pelgrandis*, two destructive pathogens generated by natural hybridization. *Mycologia* 104: 1390–1396.
- Martin F.N., Blair J.E. and Coffey M.D. 2014. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology* 66: 19–32.
- Martin F.N., Tooley P.W. and Blomquist C. 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology* 94: 621–631.
- Mortimer A.M. and Shaw D.S. and Sansome. A. 1977. Genetical studies of secondary homothallism in *Phytophthora drechsleri*. *Archives of Microbiology* 111: 255-259.
- Mostowfzadeh-Ghalamfarsa R. 2012. Species-specific detection of *Phytophthora inundata* by simple and nested-PCR. *Iranian Journal of Plant Pathology* 48: 69–80.
- Mostowfzadeh-Ghalamfarsa R. and Banihashemi Z. 2015. Species-specific PCR identification and detection of *Phytophthora drechsleri*, *P. cryptogea* and *P. erythroseptica*. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51: 542–552.
- Mostowfzadeh-Ghalamfarsa R. and Mirsoleimani Z. 2013. Species-specific identification and detection of *Phytophthora pistaciae*, the causal agent of pistachio gummosis. *Phytopathologia Mediterranea* 52: 30–45.
- Nagel J.H., Gryzenhout M., Slippers B., Wingfield M.J., Hardy G.S.J., Stukely M.J. and Burgess T.I. 2013. Characterization of *Phytophthora* hybrids from ITS clade 6 associated with riparian ecosystems in South Africa and Australia. *Fungal Biology* 117: 329–347
- Nirenberg H.I., Gerlach W.F. and Grafenhan T. 2009. *Phytophthora* × *pelgrandis*, a new natural hybrid pathogenic to *Pelargonium grandiflorum* hort. *Mycologia* 101: 220-231.
- Oh, E., Gryzenhout, M., Wingfield, B.D., Wingfield, M.J. and Burgess, T.I. 2013. Surveys of soil and water reveal a goldmine of *Phytophthora* diversity in South African natural ecosystems. *IMA Fungus*, 4: 123–131.
- Peters, R.D., Clark, R.J., Coffin, A.D., Sturz, A.V., Lambert, D.H. and Miller, J.S., 2005. Limited genetic diversity in North American isolates of *Phytophthora erythroseptica* pathogenic to potato based on RAPD analysis. *Plant Disease* 89: 380–384.
- Reeves R.J. and Jackson R.M. 1974. Stimulation of sexual reproduction by *Phytophthora* by damage. *Microbiology* 84: 303–310.
- Royle D.J. and Hickman C.J. 1964. Observations on *Phytophthora cinnamomi*. *Canadian Journal of Botany* 42: 300–318.
- Safaiefarahani B. and Mostowfzadeh-Ghalamfarsa R. 2018. Phylogeny, morphological and physiological characterization of *Phytophthora erythroseptica* isolates, the causal agents of potato pink rot in different geographic regions. *Iranian Journal of Plant Pathology* 54: 1–13.
- Safaiefarahani B., Mostowfzadeh-Ghalamfarsa R. and Cooke D.E., 2013. Characterisation of *Phytophthora inundata* according to host range, morphological variation and multigene molecular

- phylogeny. *Phytopathologia Mediterranea* 51: 46-65.
- Safaiefarahani B., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R., Hardy G.E. and Burgess T.I. 2016. Species from within the *Phytophthora cryptogea* complex and related species, *P. erythroseptica* and *P. sansomeana*, readily hybridize. *Fungal biology* 120: 975-987.
- Safaiefarahani B., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R., Hardy G.S.J. and Burgess T.I. 2015. Re-evaluation of the *Phytophthora cryptogea* species complex and the description of a new species, *Phytophthora pseudocryptogea* sp. nov. *Mycological progress* 14: 1-12.
- Sakalidis M.L., Hardy G.E.S. and Burgess T.I. 2011. Endophytes as potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*: a focus on the Botryosphaeriaceae. *Fungal Ecology* 4: pp.1-14.
- Schardl C.L. and Craven K.D. 2003. Interspecific hybridization in plant-associated fungi and oomycetes: a review. *Molecular Ecology* 12: 2861-2873.
- Secor G.A. and Gudmestad N.C. 1999. Managing fungal diseases of potato. *Canadian Journal of Plant Pathology* 21: 213-221.
- Silvar C., Duncan J.M., Cooke D.E., Williams N.A., Díaz J. and Merino F. 2005. Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. *European Journal of Plant Pathology* 112: 43-52.
- Soltis P.S. and Soltis D.E. 2009. The role of hybridization in plant speciation. *Annual Review of Plant Biology* 60: 561-588.
- Stamler, R.A., Sanogo, S., Goldberg, N.P. and Randall, J.J., 2016. *Phytophthora* species in rivers and streams of the southwestern United States. *Applied Environmental Microbiology* 82: 4696-4704.
- Stamps D.J., Waterhouse G.M., Newhook F.T. and Hall G.S. 1990. Revised Tabular Key to the Species Of *Phytophthora*. *Mycological paper* 62. CAB. International Mycological Institute. UK.
- Stukenbrock E.H. 2013. Evolution, selection and isolation: a genomic view of speciation in fungal plant pathogens. *New Phytologist* 199: 895-907.
- Taylor R.J., Salas B., and Gudmestad N.C. 2004. Differences in etiology affect mefenoxam efficacy and the control of pink rot and leak tuber diseases of potato. *Plant Disease* 88: 301-307.
- Tooley P.W., Bunyard B.A., Carras M.M. and Hatziloukas E., 1997. Development of PCR primers from internal transcribed spacer region 2 for detection of *Phytophthora* species infecting potatoes. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1467-1475.
- Tsao P.H., Vgale R., Hobbs H. and Farih A. 1980. Control of homotallic oospore formation in *Phytophthora parasitica* by culture manipulation. *Transactions of the British Mycological Society* 71: 153-156.
- Tucker, C.M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. University of Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin.
- Vargas L.A. and Nielsen L.W., 1972. *Phytophthora erythroseptica* in Peru: Its identification and pathogenesis. *American Journal of Potato Research* 49: 309-320.
- Wanger A., Chavez V., Huang R., Wahed A., Dasgupta A. and Actor J.K., 2017. *Microbiology and Molecular Diagnosis in Pathology*. Elsevier., USA. 304 pp.
- Ward E., Foster S.J., Fraaije B.A. and McCartney H.A. 2004. Plant pathogen diagnostics: immunological and nucleic acid-based approaches. *Annals of Applied Biology* 145: 1-16.
- Waterhouse G.M. 1963. Key to the Species of *Phytophthora* de Bary. *Mycological paper* 92. CAB International Mycological Institute. UK.
- Yang X., Richardson P.A. and Hong C. 2014. *Phytophthora* × *stagnum* nothosp. nov., a new hybrid from irrigation reservoirs at ornamental plant nurseries in Virginia. *PloS one*, 9: p.e103450..
- Yang X., Tyler B.M. and Hong C. 2017. An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. *IMA Fungus* 8: 355-384.
- Ye J., Coulouris G., Zaretskaya I., Cutcutach, I., Rozen, S. and Madden, T.L. 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13: 134-145.
- Yellareddygar S.K., Pasche J.S., Taylor R.J., Hua S. and Gudmestad N.C. 2016. Beta regression model for predicting the development of pink rot in potato tubers during storage. *Plant Disease* 100: 1118-1124.
- 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: 55-65.



Zolanvari S.M, Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R. and Dadkhodaie A. 2017. Molecular identification and detection of *Phytophthora melonis* based on nuclear and cytoplasmic genome. Iranian Journal of Plant Pathology 53: 97-117.