

فیلوژنتیک، خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک جدایه‌های *Phytophthora erythroseptica* عامل پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی در مناطق جغرافیایی مختلف*

بنفشه صفایی فراهانی^۱ و رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا^{۲*}

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۵/۷)

چکیده

پوسیدگی صورتی ناشی از *Phytophthora erythroseptica* بیماری خاک‌برد مهمی در سیب‌زمینی است که سبب بروز خسارت قابل توجهی در مزرعه و انبار می‌شود. مجموعه‌ای از جدایه‌های *P. erythroseptica* به دست آمده از مناطق تولید سیب‌زمینی در چهار قاره‌ی مختلف شامل آمریکا، آسیا، اروپا و استرالیا مورد ارزیابی‌های فیلوژنتیکی، ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک قرار گرفت. در تمام درخت‌های فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس توالی‌های هسته‌ای (فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی، بتاتوبولین و پروتئین شوک حرارتی ۹۰) و میتوکندریایی (زیرواحد یک سیتوکروم اکسیداز سی) و درخت برآیند توالی‌های هسته‌ای، جدایه‌های *P. erythroseptica* همراه با جدایه‌ی تیپ، یک دودمان فیلوژنتیکی مجزا تشکیل دادند. همچنین هیچ‌گونه تنوع ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک در جدایه‌ها مشاهده نشد. کلیه‌ی جدایه‌ها هم‌تال بوده، آنتریدیوم‌های انتهایی پیراماده، آگونیوم‌های گرد و ناپرساز و اسپورانژیوم‌های بدون پستانک، بیضی تا تخم‌مرغی شکل تولید کردند. نتایج نشان که داد جدایه‌های *P. erythroseptica* متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف از نظر خصوصیات فیلوژنتیکی و ریخت‌شناختی یک‌نواخت‌اند. این یکنواختی ممکن است ناشی از طبیعت هم‌تال *P. erythroseptica* یا انتشار یک همسانه‌ی منفرد توسط غده‌های آلوده‌ی سیب‌زمینی باشد.

کلیدواژه: آُمیکوتا، چندشکلی تک نوکلوتیدی، فیلوژنی

* بخشی از رساله‌ی دکتری نگارنده‌ی نخست به راهنمایی دکتر رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز.

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rmostofi@shirazu.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. استاد، بخش گیاه‌پزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز ۷۱۴۴۱۶۵۱۸۶، ایران.

Phylogeny, morphological and physiological characterization of *Phytophthora erythroseptica* isolates, the causal agents of potato pink rot in different geographic regions

B. Safaiefarahani¹ and R. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa^{2*}

(Received: 27.5.2018; Accepted: 29.7.2018)

Abstract

Pink rot, caused by *Phytophthora erythroseptica*, is an important soil-borne disease of potato causes significant losses in the field and storage. A selection of *P. erythroseptica* isolates from potato-growing regions in four continents including America, Asia, Europe and Australia was assessed using phylogenetic, morphological and physiological analyses. In all nuclear (internal transcribed spacers, β -tubulin and heat shock protein 90) and mitochondrial (cytochrome c oxidase subunit I) trees as well as combined nuclear and mitochondrial tree, *P. erythroseptica* isolates formed a separate phylogenetic lineage containing the type isolate. Additionally, no morphological and physiological diversities were observed among the isolates. All isolates were homothallic and produced amphigynous terminal antheridia and globose aplerotic oogonia as well as non-papillate and ellipsoid to ovoid sporangia. The results showed that *P. erythroseptica* isolates belonged to different geographic regions are phylogenetically and morphologically similar. This uniformity could be due to the homothallic nature of *P. erythroseptica* or distribution of a single clone of pathogen by infected potato.

Keywords: Oomycota, single nucleotide polymorphism , phylogeny

*Corresponding author's E-mail: rmostofi@shirazu.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.

مقدمه

شوند، به طوری که گونه‌ی *P. erythroseptica* رفتار آمیزشی هم‌تالی را نشان می‌دهد در حالی که دو گونه‌ی دیگر اغلب دگرتال هستند (Tucker 1931, Erwin & Rebeir 1996, Safaiefarahani et al. 2015). با این حال رفتار آمیزشی در گونه‌های فیتوفتورا همیشه ثابت نیست و ممکن است تحت تأثیر شرایط محیطی مانند وجود ترکیب‌های گیاهی یا قارچی خاص، نگهداری طولانی‌مدت در محیط‌های کشت، آسیب‌های فیزیکی و مواد موجود در قارچ‌کش‌ها تغییر کند (Reeves & Jackson 1974, Tsao et al. 2010, Judelson et al. 1980). تغییرپذیری رفتار آمیزشی در گونه‌های فیتوفتورا و شباهت سایر خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک *P. erythroseptica* به گونه‌های خویشاوند آن، ممکن است سبب شناسایی نادرست این گونه شود.

پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی، ناشی از *P. erythroseptica* یک بیماری انباری مهم سیب‌زمینی در سرتاسر دنیاست. هیچ روشی به تنهایی برای مدیریت این بیماری مؤثر نیست، اما با استفاده از راهبردهای ترکیبی شامل ارقام مقاوم و روش‌های زراعی و شیمیایی می‌توان بیماری را تا حدود زیادی مدیریت نمود. تنوع بیمارگر، نقش مهمی در موفقیت راهبردهای مدیریت آن به ویژه گسترش ارقام مقاوم دارد (Vargas & Nielsen 1972, Secor & Gudmestad 1999, Lambert & Salas 2001, Peters et al. 2005). در سال‌های اخیر واکاوی دودمان‌های چندزنی برای بررسی خویشاوندی بیمارگرهای گیاهی، مانند جنس فیتوفتورا، مورد استفاده قرار گرفته است (Cooke & Lees 2004, Martin et al. 2014). هدف از انجام این پژوهش، بررسی خصوصیات فیلوژنتیکی، ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک جدایه‌های *P. erythroseptica* متعلق به مناطق جغرافیایی مختلف است.

جنس فیتوفتورا از مهم‌ترین جنس‌های بیماری‌زای گیاهی است که سبب خسارت اقتصادی قابل توجهی در سراسر دنیا می‌شود (Kroon et al. 2012). تا کنون نزدیک به ۱۲۰ گونه در این جنس شناسایی شده است که اغلب آن‌ها بیمارگر گیاهی هستند (Martin et al. 2014). گونه‌های فیتوفتورا بر اساس کلید شناسایی واترهاوس (Waterhouse 1963) به شش گروه ریخت‌شناختی و بر اساس واکاوی‌های فیلوژنتیکی توالی‌های هسته‌ای و میتوکندریایی به ۱۰ تبار مختلف تقسیم می‌شوند (Kroon et al. 2004, Blair et al. 2008, Martin et al. 2014).

گونه‌ی *Phytophthora erythroseptica* Pethybridge یکی از مهم‌ترین گونه‌های فیتوفتورا است که در سال ۱۹۱۳ به عنوان عامل پوسیدگی صورتی غده‌های سیب‌زمینی شناسایی و توصیف شد (Pethybridge 1913). نام پوسیدگی صورتی توصیف‌کننده‌ی رنگ صورتی است که در غده‌های آلوده هنگامی که غده بریده شده و در معرض هوا قرار می‌گیرد بعد از ۱۵ تا ۳۰ دقیقه قابل مشاهده است (Jones 1945). واکاوی‌های فیلوژنتیکی نشان داده است که *P. erythroseptica* به تبار هشت فیتوفتورا تعلق دارد و خویشاوند نزدیک *Phytophthora cryptogea* Pethybridge and Lafferty و *Phytophthora pseudocryptogea* Safaiefarahani, Mostowfizadeh, Hardy & T. I. Burgess محسوب می‌شود (Kroon et al. 2004, Blair et al. 2008, Martin et al. 2014, Safaiefarahani et al. 2015). علاوه بر خویشاوندی فیلوژنتیکی، این گونه‌ها خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیک مشابهی دارند و همگی در گروه شش واترهاوس (Waterhouse 1963) قرار می‌گیرند. این سه گونه فقط بر اساس رفتار آمیزشی از یکدیگر متمایز می‌-

جدول ۱- جدایه‌های *Phytophthora erythroseptica* به کار رفته در این پژوهش، محل جداسازی و رس‌شمار آن‌ها در بانک ژن

Table 1. Isolates of *Phytophthora erythroseptica* examined in this study, their origin and their GenBank accession numbers

Isolate code	Location	GenBank Accession no.			
		COXI	HSP90	ITS	TUB
MUC820	Iran	MG196189	MG196207	MG196225	MG196243
MUC821	England	MG196190	MG196208	MG196226	MG196244
MUC822	England	MG196191	MG196209	MG196227	MG196245
MUC823	Netherlands	MG196192	MG196210	MG196228	MG196246
MUC824	Netherlands	MG196193	MG196211	MG196229	MG196247
MUC825	Australia	MG196194	MG196212	MG196230	MG196248
MUC826	Australia	MG196195	MG196213	MG196231	MG196249
MUC827	Canada	MG196196	MG196214	MG196232	MG196250
MUC828	Canada	MG196197	MG196215	MG196233	MG196251
MUC829	Canada	MG196198	MG196216	MG196234	MG196252
MUC830	USA-Maine	MG196199	MG196217	MG196235	MG196253
MUC831	USA-Washington	MG196200	MG196218	MG196236	MG196254
MUC832	USA-Idaho	MG196201	MG196219	MG196237	MG196255
MUC833	USA-Minnesota	MG196202	MG196220	MG196238	MG196256
MUC834	USA-Minnesota	MG196203	MG196221	MG196239	MG196257
MUC835	USA-North Dakota	MG196204	MG196222	MG196240	MG196258
MUC836	USA-California	MG196205	MG196223	MG196241	MG196259
MUC837	USA-North Carolina	MG196206	MG196224	MG196242	MG196260

COXI= cytochrome c oxidase subunit I; HSP90= heat shock protein 90; ITS= internal transcribed spacers of rDNA; TUB= β -tubulin

(جدول ۲) منتقل شدند. تشتک‌های پتری به مدت پنج روز در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شده و الگوی رشد پرگنه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به منظور اندازه‌گیری رشد شعاعی، قطعاتی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی پرگنه‌های پنج روزه‌ی بیمارگر جدا و به تشتک‌های پتری حاوی محیط‌کشت CMA منتقل شد. تشتک‌های پتری در دماهای صفر، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۳ و ۳۵ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفته، میانگین رشد شعاعی برای هر جدایه محاسبه شد.

ریخت‌شناسی اسپورانژیوم

به منظور تشکیل اسپورانژیوم، قطعاتی از حاشیه‌ی پرگنه‌های پنج روزه‌ی بیمارگر جدا و به تشتک‌های پتری حاوی محیط‌کشت CMA منتقل شد. پس از سه روز، ۱۰ عدد بذر شاهدانه‌ی سترون (جوشانده شده در فلاسک

مواد و روش‌های بررسی

جدایه‌ها

در این پژوهش، ۱۸ جدایه متعلق به مجموعه‌ی مرکز مطالعات و مدیریت فیتوفتورا در دانشگاه مرداک استرالیا برای انجام آزمون‌های مختلف انتخاب شد. جدایه‌های از غده‌های سیب‌زمینی آلوده به پوسیدگی صورتی در کشورهای ایران، انگلستان، هلند، استرالیا، کانادا و ایالت‌های ماین، واشنگتن، آیداهو، مینسوتا، داکوتای شمالی، کالیفرنیا و کارولینای شمالی ایالات متحده آمریکا جداسازی شده بودند (جدول ۱).

ریخت‌شناسی پرگنه و رشد شعاعی

قطعاتی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی پرگنه‌های پنج روزه‌ی بیمارگر جدا و به‌طور جداگانه به تشتک‌های پتری حاوی محیط‌کشت CMA، HSA، PDA، CA و MEA

جدول ۲- روش تهیهی محیط‌کشت‌های به کار رفته در این پژوهش

Table 2. Recipes of media used in this study

Media	Recipes
Carrot agar (CA)	Carrot extract 250 g L ⁻¹ ; agar 15 g L ⁻¹
Corn meal agar (CMA)	Ground corn extract 40 g L ⁻¹ ; agar 15 g L ⁻¹
French beans agar (FBA)	Ground French bean 30 g L ⁻¹ ; agar 15 g L ⁻¹
Hemp seed agar (HSA)	Ground hemp seed extract 60 g L ⁻¹ ; agar 15 g L ⁻¹
Malt extract agar (MEA)	Malt extract 25 g L ⁻¹ ; agar 15 g L ⁻¹
Potato dextrose agar (PDA)	Potato extract 300 g L ⁻¹ ; dextrose 20 g L ⁻¹ ; agar 15 g L ⁻¹
Pea broth agar (PBA)	Pea extract 125 g L ⁻¹ ; agar 15 g L ⁻¹

به قطر تقریبی یک سانتی‌متر از حاشیه‌ی پرگنه‌ی پنج روزه‌ی جدایه‌ی مورد آزمون جدا شده و در کف یک تشتک پتری قرار داده شد. سپس روی آن یک قطعه با قطر مشابه از محیط کشت HSA و یک قطعه با قطر مشابه از پرگنه‌ی تیپ آمیزشی استاندارد قرار گرفت. به منظور بررسی هم‌تال بودن جدایه‌ها، هر جدایه با خودش نیز تلاقی داده شد. حاشیه‌ی تشتک‌های پتری با استفاده از نوار پارافیلیم بسته شده، به مدت ۲۱ روز در تاریکی و ۲۰ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفت. پس از تشکیل اندام‌های جنسی، خصوصیات ریخت‌شناختی آگونیوم‌ها، آنتریدیوم‌ها و آسپورها بررسی شد.

آزمون بیماری‌زایی در غده‌های سیب‌زمینی

غده‌های سیب‌زمینی پس از شست‌وشو با آب معمولی، با استفاده از الکل اتیلیک ۹۶٪ ضدعفونی سطحی شدند. سپس قطعات شش میلی‌متری از بافت غده جدا شده، قطعاتی به همین اندازه از حاشیه‌ی جوان پرگنه‌های بیمارگر در زخم‌های ایجاد شده قرار گرفت و قطعات بریده شده‌ی غده‌ها به محل اولیه‌ی خود برگردانده و محل زخم با استفاده از نوارپارافیلیم بسته شد (Tuker 1931). غده‌های شاهد با استفاده از قطعات محیط کشت CMA فاقد بیمارگر مایه‌زنی شدند. غده‌ها در پاکت‌های کاغذی گذاشته شده، در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفتند. نتایج

حاوی آب‌مقطر سترون به مدت ۱۰ دقیقه روی حرارت مستقیم) در اطراف پرگنه قرار داده شد. بذرها پس از ۲۴ ساعت به تشتک‌های پتری حاوی عصاره‌ی خاک ۱۰٪ غیر-سترون (Mircetich & Matheron 1976) منتقل شده، تشتک‌های پتری به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت زیر نور دائم فلورسان (حدود ۱۰۰۰ لوکس) و در ۲۰ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند (Schmitthenner 1973). پس از تشکیل اسپورانژیوم و رنگ‌آمیزی با استفاده از لاکتوفنل و اسیدفوشین ۱۰٪ (Mitchell & Knanwischer-Mitchell 1992)، شکل کلی، وجود یا عدم وجود پستانک و طول و عرض اسپورانژیوم‌ها مورد بررسی و اندازه‌گیری قرار گرفت.

سیستم آمیزشی و خصوصیات آگونیوم، آنتریدیوم و آسپور

سیستم آمیزشی جدایه‌های مورد آزمون، با استفاده از روش ساندریچ دو طرفه تعیین شد (Mitchell & Knanwischer-Mitchell 1992). بدین منظور تیپ‌های آمیزشی استاندارد A1 (PH-2-9-92) و A2 (PH-2-15-92) از *P. capsici* Leonian (مجموعه‌ی بخش گیاه-پزشکی دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شیراز) و جدایه‌های مورد آزمون به طور جداگانه در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت HSA (جدول ۲) کشت شدند. قطعاتی

Table 3. Primers used in this study

Target DNA	Primer name	Primer sequence (5'→3')	Reference
Cytochrome c oxidase subunit I	COXF4N	GTATTTCTTCTTTATTAGGTGC	Kroon <i>et al.</i> 2004
	COXR4N	CGTGAACATAATGTTACATATAC	
ITS	ITS6	GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG	Cooke <i>et al.</i> 2000
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White <i>et al.</i> 1990
β -tubulin	TUBUF2	CGGTAACAACACTGGGCCAAGG	Kroon <i>et al.</i> 2004
	TUBUR1	CCTGGTACTGCTGGTACTCAG	
Heat shock protein 90	HSP90_F1int	CAAGGTGATCCCGGACAAGGC	Blair <i>et al.</i> 2008
	HSP90_R2	CGTGTCTGACAGCAGCCAGA	

ترانوئیدی شده‌ی داخلی (آی‌تی‌اس)، بتاتوبولین، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ و زیر واحد یک سیتوکروم سی اکسیداز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۳) و طبق شرایط دمایی و مخلوط واکنش گزارش شده برای هر آغازگر (Cooke *et al.* 2000, Kroon *et al.* 2004, Blair *et al.* 2008) انجام شد. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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 دی‌ان‌ای زیر پرتو فرابنفش بررسی شد. محصولات پی‌سی-آر با استفاده از ستون‌های Sephadex G-50 و مطابق روش ساکالیدیس و همکاران (Sakalidis *et al.* 2011) خالص‌سازی و توسط شرکت AGRF (Australian Genome Research Facility) (استرالیا، پرت) توالی‌سنجی گردید.

ویرایش توالی‌های دی‌ان‌ای، برآورد فراسنجه‌های مدل و رسم درخت فیلوژنتیکی

ویرایش و هم‌ردیف‌سازی توالی‌های به دست آمده به روش دستی و با استفاده از نرم افزار GeneiousPro v4.8.1 (Drummond *et al.* 2010) انجام شد. رشته‌های برآیند با مقایسه‌ی نسخه‌های مستقیم و معکوس شده‌ی هر

پنج تا ۱۰ روز پس از مایه زنی با کشت بافت‌های آلوده روی محیط کشت CMA-PARP بررسی شد (Mostowfizadeh-Ghalmfarsa *et al.* 2006).

استخراج دی‌ان‌ای

از حاشیه‌ی جوان پرگنه‌ی هر یک از جدایه‌های مورد آزمون، قطعاتی به قطر تقریبی پنج میلی‌متر جدا و به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر عصاره‌ی سترون شده‌ی سیب‌زمینی منتقل شد. فلاسک‌ها به مدت پنج روز در تاریکی و ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از خالی کردن محتویات هر فلاسک در ظروف سترون، پرگنه‌ها با استفاده از آب مقطر سترون شسته شده، میسلیم‌ها با استفاده از سوزن‌های سترون از قطعات محیط کشت آگاردار جدا شد. میسلیم‌ها داخل ریزلوله‌های ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفت و پس از یخ زدن به کمک نیتروژن مایع، به مدت ۲۴ ساعت سرماخشک شدند. استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از محلول کلروفرم و مطابق روش اندجیک و همکاران (Andjic *et al.* 2007) انجام شد.

فزون‌سازی و توالی‌سنجی دی‌ان‌ای

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای نواحی فاصله‌ی

جدول ۴- میانگین اندازه‌ی ریشه، اندام‌های تولیدمثلی جنسی و غیرجنسی (میکرومتر) در جدایه‌های *Phytophthora erythroseptica* به کار رفته در این پژوهش

Table 4. Average measures (mean \pm standard deviation) of hyphae, sexual and asexual reproduction organs (μm) of *Phytophthora erythroseptica* isolates used in this study

Isolate	Hyphae	Sporangia	Sporangial length: breadth ratio	Oogonia	Oospores	Antheridia
MUC820	3.65 \pm 0.58	(44.25 \pm 2.80) \times (31.10 \pm 2.31)	1.42	35.85 \pm 3.30	32.05 \pm 2.97	10.63 \pm 1.97
MUC821	3.82 \pm 0.56	(39.45 \pm 2.16) \times (26.85 \pm 1.95)	1.46	37 \pm 2.66	32.61 \pm 2.26	10.47 \pm 2.11
MUC822	3.87 \pm 0.55	(45.15 \pm 3.26) \times (28.70 \pm 2.84)	1.57	37.28 \pm 2.77	33.28 \pm 2.49	11.26 \pm 1.85
MUC823	4.07 \pm 0.59	(39.60 \pm 2.62) \times (26.85 \pm 1.90)	1.47	35.57 \pm 2.97	31.66 \pm 2.65	12.10 \pm 1.62
MUC824	4.09 \pm 0.89	(41.15 \pm 3.09) \times (28.55 \pm 2.95)	1.44	35.09 \pm 3.36	31.09 \pm 2.91	10.68 \pm 1.94
MUC825	4.35 \pm 0.79	(45.45 \pm 2.92) \times (31.10 \pm 2.12)	1.46	33.28 \pm 2.96	29.09 \pm 2.86	11.84 \pm 1.83
MUC826	3.92 \pm 0.73	(41.10 \pm 2.44) \times (28.50 \pm 3.03)	1.44	34.42 \pm 3.95	30.52 \pm 3.86	11.57 \pm 2.03
MUC827	4.27 \pm 1	(42.90 \pm 2.61) \times (26.45 \pm 2.87)	1.62	31.90 \pm 2.82	27.57 \pm 2.13	10.42 \pm 1.42
MUC828	3.75 \pm 0.76	(44.45 \pm 3.11) \times (27.40 \pm 2.90)	1.62	37.47 \pm 2.97	33.28 \pm 3.06	10.63 \pm 1.49
MUC829	3.32 \pm 0.67	(39.85 \pm 3.43) \times (25.45 \pm 2.21)	1.56	37.57 \pm 2.63	32.47 \pm 2.52	11.21 \pm 2.29
MUC830	4.12 \pm 0.84	(46.65 \pm 3.01) \times (31.75 \pm 2.63)	1.46	36.09 \pm 3.65	32 \pm 3.36	11.84 \pm 2.06
MUC831	3.80 \pm 0.65	(40.20 \pm 3.53) \times (27.15 \pm 2.75)	1.48	33.52 \pm 3.38	29.71 \pm 3.33	12.21 \pm 2.01
MUC832	3.87 \pm 0.45	(46.45 \pm 3.13) \times (30.15 \pm 3.06)	1.54	33.28 \pm 3.19	29.38 \pm 3.05	12.68 \pm 1.73
MUC833	3.65 \pm 0.62	(42.25 \pm 2.26) \times (28.05 \pm 2.74)	1.50	36.52 \pm 3.72	32.66 \pm 3.41	11.73 \pm 2.02
MUC834	3.82 \pm 0.65	(46.10 \pm 3.91) \times (30.70 \pm 2.71)	1.50	35.28 \pm 3.19	31.95 \pm 3.15	11.31 \pm 2.28
MUC835	4.02 \pm 0.65	(39.45 \pm 3.31) \times (24.70 \pm 3.16)	1.59	32.47 \pm 2.97	28.61 \pm 2.95	11.47 \pm 2.24
MUC836	3.80 \pm 0.73	(44.80 \pm 4.08) \times (28.30 \pm 3.29)	1.58	35.47 \pm 3.21	31.38 \pm 2.87	10.21 \pm 2.27
MUC837	3.77 \pm 0.67	(42.65 \pm 3.43) \times (28.55 \pm 3.77)	1.49	35.52 \pm 3.42	31.66 \pm 3.19	10.84 \pm 2.45

روشن و فاقد دیواری عرضی تولید کردند. آماس‌های ریشه کروی تا نامنظم بوده، فراوانی آن‌ها در محیط‌کشت‌های مایع زیاد و در محیط‌کشت‌های جامد اندک بود. میانگین قطر ریشه‌ی تمامی جدایه‌های به کار رفته در این پژوهش $3/96 \pm 0/71$ میکرومتر بود که به تفکیک برای هر یک از جدایه‌ها در جدول ۴ آورده شده است. جدایه‌ها در محیط-کشت CMA پرگنه‌ی یک‌نواخت، در محیط‌کشت PDA و پرگنه‌ی گل‌داوودی و در محیط‌کشت‌های CA، HSA و MEA پرگنه‌ی گل‌سرخ‌ی یا یکنواخت تولید کردند (شکل ۱). میانگین رشد شعاعی (میلی‌متر در روز) جدایه‌های فیتوفتورای بررسی شده در این پژوهش روی محیط‌کشت CMA و دماهای مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. دمای کمینه، بهینه و بیشینه‌ی رشد به ترتیب سه، ۲۵ و ۳۳ درجه‌ی سلسیوس بود.

هیچ یک از جدایه‌های بررسی شده در این پژوهش قادر به تولید اسپورانژیوم در محیط‌کشت جامد نبودند. اما

توالی، به دست آمد و پس از ثبت در بانک ژن (GenBank, NCBI, USA; [Online]) رس‌شمار آن‌ها اخذ شد. فراسنجه‌های مدل شامل فراسنجه‌های میزان ناهمگونی (rate heterogeneity) و جایگزینی (substitution)، نسبت‌مورد انتظار گذار به تراگشت (transition/transversion ratios)، پراکنش گامای فراسنجه‌ی آلفا و لگاریتم طبیعی احتمال به روش جانگ و برجس (Jung & Burgess 2009) برآورد شد. درخت‌های فیلوژنتیکی با استفاده از رهیافت بیسی (Bayesian) و توسط نرم‌افزار GeneiousPro v4.8.1 رسم و توسط نرم‌افزار ATV (Zmasek & Eddy 2001) ویرایش و نمایش داده شد.

نتایج

تمام جدایه‌های بررسی شده در این پژوهش، ریشه‌های

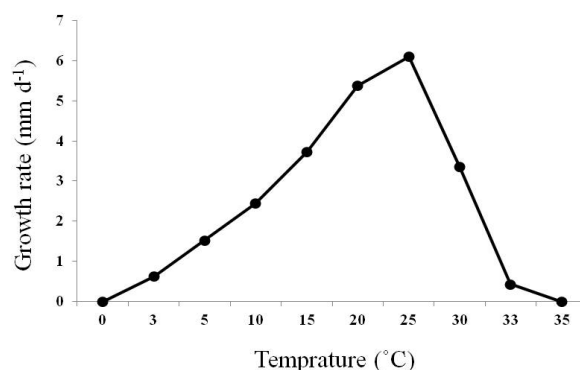


شکل ۱- ریخت‌شناسی پرگنه‌ی *Phytophthora erythroseptica* (جدایه‌ی MUC827) بعد از ۱۰ روز در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس. ردیف بالا (از چپ به راست) PDA، CMA و MEA؛ ردیف پایین (از چپ به راست) CA و HSA

Fig. 1. Colony morphology of *Phytophthora erythroseptica* (isolate MUC827) after 10 d at 25 °C; top: (from left to right) PDA, CMA, and MEA; bottom: (from left to right) CA and HSA

بیضی شکل تا گلابی شکل (شکل ۳) بودند. تمامی جدایه‌ها دارای افزولش داخلی (تو در تو) و خارجی و اسپورانژیوفور ساده و به ندرت هم‌پایه (sympodial) بودند. میانگین اندازه‌ی اسپورانژیوم‌ها $(28/43 \pm 3/32) \times (42/88 \pm 3/97)$ میکرومتر (بیشینه $33/61 \times 22/34$ میکرومتر و کمینه $52/21 \times 35/46$ میکرومتر) و میانگین نسبت طول به عرض آن‌ها $1/51$ بود (جدول ۴).

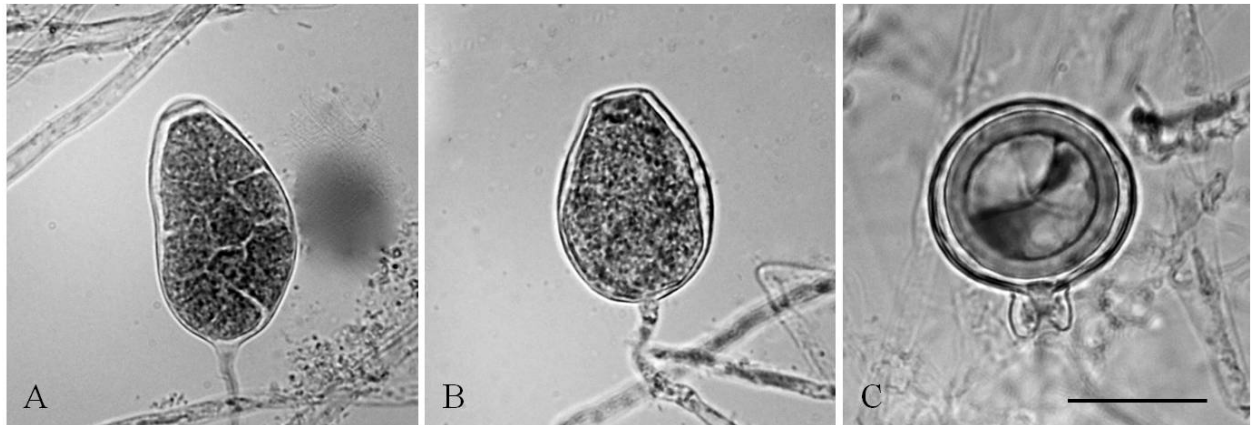
تمامی جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش هم‌تال بوده، برای تولید اسپور نیازی به تیپ‌های آمیزشی A1 و A2 نداشتند. تمامی جدایه‌ها آنتریدیوم‌های منفرد و پیراماده، آگونیوم‌های کروی و اسپورهای گرد و ناپرساز تولید کردند (شکل ۳). میانگین اندازه آنتریدیوم‌ها، آگونیوم‌ها و اسپورها در جدایه‌های مورد بررسی به ترتیب $31/08 \pm 3/32$ و $35/20 \pm 3/55$ ، $11/28 \pm 2/06$



شکل ۲- میانگین رشد شعاعی جدایه‌های *Phytophthora erythroseptica* به کار رفته در این پژوهش روی محیط کشت CMA در صفر تا ۳۵ درجه‌ی سلسیوس

Fig. 2. Average radial growth rate of *Phytophthora erythroseptica* isolates used in this study on CMA at 0-35 °C

استفاده از بذر شاهدانه همراه با عصاره‌ی خاک غیرسترون منجر به تشکیل اسپورانژیوم شد. در تمام جدایه‌های مورد بررسی، اسپورانژیوم‌ها بدون پستانک، تخم‌مرغی شکل،



شکل ۳. ریخت‌شناسی اسپورانژیوم (A, B)، اُوسپور، اُگونیم و آنتریودیوم (C) *Phytophthora erythroseptica* (جدایه‌ی MUC827). خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر

Fig. 3. Morphology of the sporangium (A, B) oospore, oogonium and antheridium (C) of *Phytophthora erythroseptica* (isolate MUC827). Bar = 20 μ m

منجر به تکثیر قطعه‌ای با اندازه‌ی تقریبی ۹۷۰ جفت باز شد. در تمامی درخت‌های فیلوژنتیکی رسم شده بر اساس نواحی هسته‌ای، میتوکندریایی و برآیند نواحی هسته‌ای (شکل ۴) جدایه‌های *P. erythroseptica* فاقد هر گونه چندشکلی تک نوکلئوتیدی^۱ بودند و همگی همراه با جدایه تیپ در یک گروه فیلوژنتیکی مجزا قرار گرفتند. این دودمان خویشاوند نزدیک *P. cryptogea* و *P. pseudocryptogea* بوده، احتمال پس‌آیند بیسی برای آن در درخت‌های فیلوژنتیکی مختلف ۷۲٪ تا ۱۰۰٪ بود (شکل ۴).

بحث

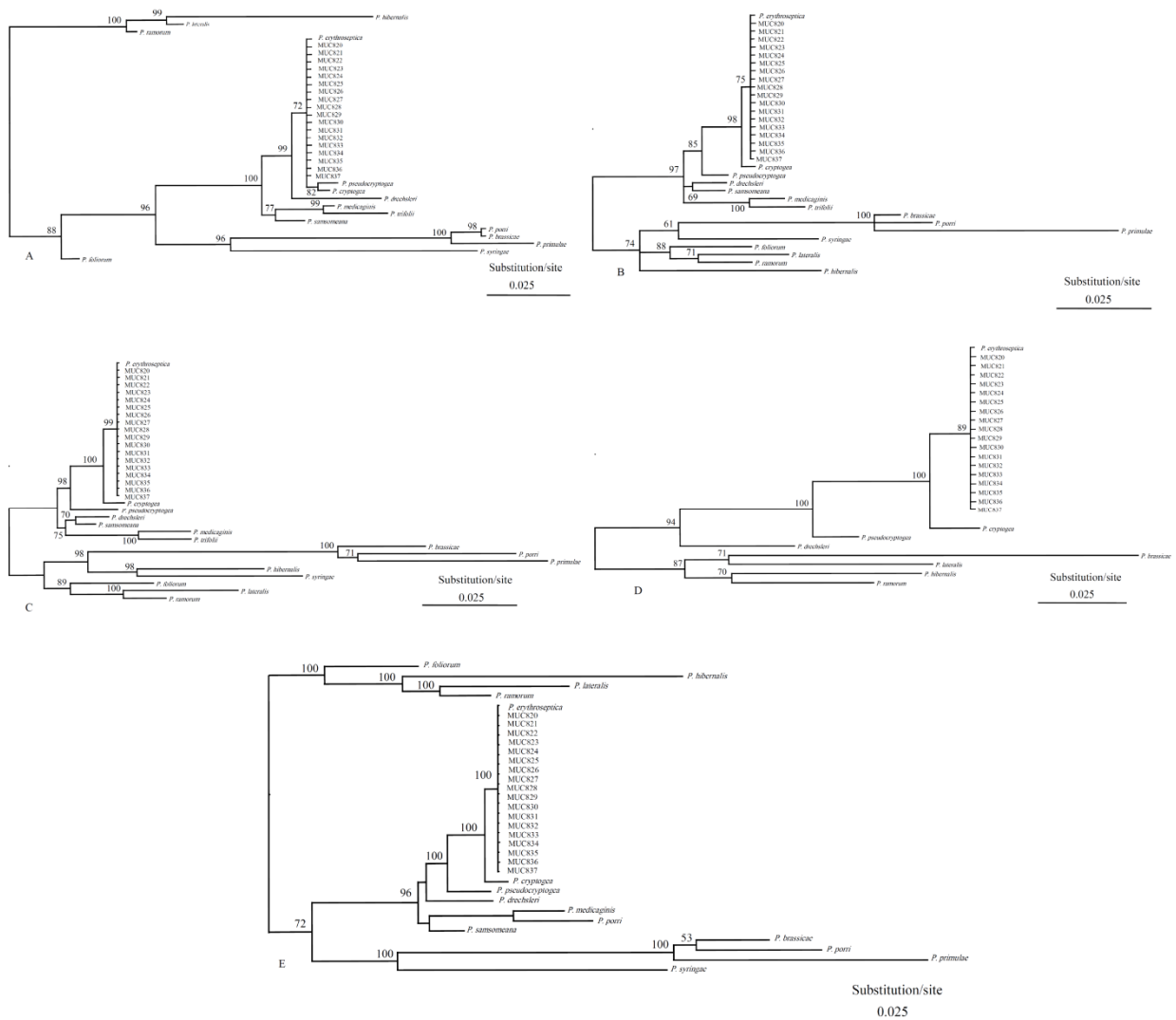
پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی ناشی از *P. erythroseptica* هر ساله سبب بروز خسارت قابل توجهی در نقاط مختلف دنیا می‌شود (Vargas & Nielsen 1972, Secor & Gudmestad 1999, Lambert & Salas 2001, Petersen et al. 2005). در گذشته، مهار شیمیایی روش غالب مدیریت این بیماری بوده است؛ اما با توجه به مقاوم شدن

بود. میانگین اندازه‌ی اندام‌های تولیدمثلی برای هر یک از جدایه‌ها به تفکیک در جدول ۴ آورده شده است.

تمام جدایه‌ها قادر به پیشروی و ایجاد پوسیدگی صورتی در غده‌های سیب‌زمینی بودند. علائم آلودگی در غده‌ها به صورت لهیده و قهوه‌ای شدن بافت غده پنج تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی مشاهده شد. بافت غده‌ها پس از بریده شدن و قرار گرفتن در معرض جریان هوا به رنگ صورتی درآمد و عامل بیماری مجدداً از مرز بین نواحی آلوده و سالم جداسازی شد. طبق گزارش مستوفی‌زاده قلمفرسا و همکاران (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa et al. 2006)، تمامی جدایه‌های *P. erythroseptica*، *P. cryptogea* و *P. drechsleri* قادر به ایجاد پوسیدگی صورتی در غده‌های سیب‌زمینی هستند که نتایج ما یافته‌های این پژوهشگران را تأیید می‌کند.

پس از فزون‌سازی دی‌ان‌ای مربوط به نواحی هسته‌ای آی‌تی‌اس، بتاتوبولین و پروتئین شوک حرارتی ۹۰، قطعاتی به ترتیب به اندازه‌ی تقریبی ۸۶۰، ۹۸۰ و ۱۷۰۰ جفت باز به دست آمد. فزون‌سازی دی‌ان‌ای در ناحیه‌ی میتوکندریایی زیرواحد یک سیتوکروم سی اکسیداز نیز

¹ single nucleotide polymorphism = SNP



شکل ۴- روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های *Phytophthora erythroseptica* و اعضای مهم تبار هشت فیتوفتورا. (A) فاصله‌ی ترانوسی شده-ی داخلی دی‌ان‌ای ریوزومی؛ (B) بتاتوبولین؛ (C) پروتئین شوک حرارتی ۹۰؛ (D) زیر واحد یک سیتوکروم سی اکسیداز؛ (E) برایند نواحی هسته‌ای. احتمال پس‌آیند بیسی (درصد) نزدیک محل انشعاب هر شاخه نشان‌داده شده است.

Fig 4. Phylogenetic relationship of *Phytophthora erythroseptica* isolates with major members of *Phytophthora* clade 8. (A) internal transcribed spacers; (B) β -tubulin; (C) heat shock protein 90; (D) Cytochrome c oxidase subunit I; (E) combined nuclear regions. Bayesian posterior probabilities (%) are shown next to the branch points.

روش‌های مهار پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است (Etebarian et al. 2000, Wicks et al. 2000, Peters et al. 2003, Taylor et al. 2006, Venkataramana et al. 2010). مطالعات مختلفی

برخی جدایه‌های *P. erythroseptica* به سموم رایج حاوی متالاکسیل و مفنوکسام، افزایش نگرانی‌ها درباره‌ی مصرف سموم شیمیایی و علاقه به جایگزینی روش‌های حافظ محیط‌زیست، استفاده از ارقام مقاوم به عنوان یکی از

انجام دگرآمیزی درون گونه‌ای نیز هستند (Förster et al. 1995, Tyler et al. 1994). دگرآمیزی درون گونه‌ای میان جدایه‌های مختلف *P. erythroseptica* تاکنون در شرایط آزمایشگاهی به اثبات نرسیده است؛ بنابراین *P. erythroseptica* احتمالاً به دلیل خویش‌آمیزی‌های مکرر در طبیعت، ماهیتی به شدت خالص (homozygote) دارد. در نتیجه عدم وجود تنوع ژنتیکی میان جدایه‌های *P. erythroseptica* می‌تواند ناشی از طبیعت هم‌تال آن‌ها باشد. علاوه بر این، گزارش شده است که *P. erythroseptica* به عنوان عامل پوسیدگی صورتی سیب-زمینی می‌تواند از طریق غده‌های آلوده‌ی سیب‌زمینی منتقل شود (Cunliffe et al. 1977). بنابراین انتشار یک همسانه-ی منفرد *P. erythroseptica* توسط غده‌های آلوده‌ی سیب‌زمینی در مناطق جغرافیایی مختلف می‌تواند دلیل دیگری برای یک‌نواختی مشاهده شده در جدایه‌های *P. erythroseptica* باشد.

در نهایت یافته‌های این پژوهش نشان داد که جدایه‌های *P. erythroseptica* جدا شده از غده‌های سیب‌زمینی در قاره‌های آسیا، اروپا، استرالیا و آمریکا از نظر خصوصیات ریخت‌شناختی و فیلوژنتیکی یک‌دست هستند که می‌تواند ناشی از طبیعت هم‌تال *P. erythroseptica* یا انتشار یک همسانه‌ی منفرد توسط غده‌های آلوده‌ی سیب‌زمینی در مناطق مختلف باشد. علیرغم یک‌نواختی ژنتیکی، مطالعات بیش‌تری برای مقایسه‌ی دامنه‌ی میزبانی و شدت بیماری-زایی جدایه‌های *P. erythroseptica* متعلق به مناطق جغرافیایی و میزبان‌های مختلف لازم است.

درباره‌ی میزان حساسیت و مقاومت ارقام مختلف سیب-زمینی به *P. erythroseptica* انجام شده است (Peters et al. 2004, Taylor et al. 2008, Thompson et al. 2007, Fitzpatrick-Peabody & Lambert 2011). در این پژوهش وجود تنوع در ویژگی‌های ریخت‌شناختی و توالی‌های نواحی هسته‌ای فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی، بتاتوبولین و پروتئین شوک حرارتی ۹۰ و ناحیه‌ی میتوکندریایی زیرواحد یک سیتوکروم سی اکسیداز، مورد بررسی قرار گرفت.

مطالعات بسیار اندکی درباره‌ی بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های *P. erythroseptica* در جهان انجام شده است. در سال ۲۰۰۵، پیترز و همکاران (Peters et al. 2005) مجموعه‌ای از جدایه‌های *P. erythroseptica* را از مناطق مهم تولید سیب‌زمینی در آمریکای شمالی برای بررسی تنوع ژنتیکی با روش فزون‌سازی تصادفی دی‌ان‌ای چندشکل (random amplification of polymorphic DNA=RAPD) مورد استفاده قرار دادند. اگرچه جدایه‌ها از نظر خاستگاه جغرافیایی و حساسیت به مفنوکسام با یک‌دیگر تفاوت داشتند، نتایج پژوهش آن‌ها نشان داد که جدایه‌ها فاقد تنوع ژنتیکی هستند. واکاوی‌های فیلوژنتیکی ما نیز نشان داد که جدایه‌های *P. erythroseptica* یک-نواخت و فاقد هر گونه چندشکلی تک نوکلئوتیدی هستند که نتایج مطالعات پیترز و همکاران (۲۰۰۵) را تأیید می‌کند.

گونه‌ی *P. erythroseptica* گونه‌ای هم‌تال است که به تنهایی و بدون نیاز به تیپ آمیزشی سازگاز قادر به انجام تولیدمثل جنسی است. برخی اُمیست‌های هم‌تال، مثل *P. sojae*، علیرغم توانایی در انجام خویش‌آمیزی، قادر به

- 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.
- Blair J. E., Coffey M. D., Park S., 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.
- Cooke D. E. L., Drenth A., Duncan J. M., Eagels G. and Brasier C. M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related Oomycetes. *Fungal Genetics and Biology* 30: 17–32.
- Cooke D. E. L. and Lees A. K. 2004. Markers, old and new, for examining *Phytophthora infestans* diversity. *Plant Pathology* 53:692–704.
- 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>.
- Erwin D. C. and Ribeiro O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA.
- Etebarian H. R., Scott E. S. and Wicks T. J. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potential biological control agents for *Phytophthora erythroseptica*. *European Journal of Plant Pathology* 106: 329–337.
- Fitzpatrick-Peabody E. R. and Lambert D. H. 2011. Methodology and assessment of the susceptibility of potato genotypes to *Phytophthora erythroseptica*, causal organism of pink rot. *American Journal of Potato Research* 88: 105–113.
- Förster H., Tyler B. M. and Coffey, M.D. 1994. *Phytophthora sojae* races have arisen by clonal evolution and by rare outcrosses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 7: 780–791.
- Jones W. 1945. Pink rot disease of potatoes in British Columbia. *Scientific Agriculture* 25: 597–600.
- 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.
- Kroon L. P. N. M., Bakker F. T., Vanden Bosch G. B. M., Bonants P. J. M. and Flier W.G. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequence. *Fungal Genetics and Biology* 71: 766–782.
- Kroon L. P. N. M., Brouwer H., de Cock A. W. A. M. and Govers F. 2012. The Genus *Phytophthora* Anno 2012. *Phytopathology* 102: 348–364.
- 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.
- Martin F. N., Blair J. E. and Coffey M. D. 2014. Combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology* 66: 19–32.
- Mircetich S. M. and Matheron M. E. 1976. *Phytophthora* root and crown rot of cherry trees. *Phytopathology* 66: 549–558.
- Mitchell D. J. and Kannwischer-Mitchell E. 1992. *Phytophthora*. Pp. 31-38. *In: Soilborne Phytopathogenic Fungi* (Singleton, L., Mihail, S.D. & Rush, C.M). APS Press. USA.
- Mostowfzadeh-Ghalamfarsa R., Cooke D. E. L. and Banihashemi Z. 2006. Potato pink rot: a criterion for discrimination of *Phytophthora melonis* from *P. drechsleri*. *Iranian Journal of Plant Pathology* 41: 191–201.
- Peters R. D., Arsenault W. J. and Sturz A. V. 2003. Use of mefenoxam to control pink rot [*Phytophthora erythroseptica*] of potato in Prince Edward Island. *Canadian Journal of Plant Pathology* 25: 33–40.
- Peters R. D., Arsenault W. J. and Sturz A. V. 2004. Tuber response of six potato cultivars to inoculation with *Phytophthora erythroseptica*, the causal agent of pink rot. *Canadian Journal of Plant Pathology* 26: 63–69.
- 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.
- Pethybridge G. H., 1913. On the rotting of potato tubers by a new species of *Phytophthora* hit herto undescribed. *Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society* 13:529–565.
- Reeves R. J. and Jackson R. M. 1974. Stimulation of sexual reproduction by *Phytophthora* by damage.

- Microbiology 84: 303–310.
- Safaiefarahani B., Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R., Hardy G. S. J. & 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.
- Schmitthenner A. F. 1973. Isolation and identification methods for *Phytophthora* and *Pythium*. Pages 94-110. In: Proc Woody Ornamental Dis. Workshop. Univ. Mo. Columbia. 128 pp.
- Secor G. A. and Gudmestad N. C. 1999. Managing fungal diseases of potato. Canadian Journal of Plant Pathology 21: 213–221.
- 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 75: 153–156.
- Taylor R. J., Pasche J. S. and Gudmestad N. C. 2006. Biological significance of mefenoxam resistance in *Phytophthora erythroseptica* and its implications for the management of pink rot of potato. Plant Disease 90: 927–934.
- Taylor R. J., Pasche J. S. and Gudmestad N. C. 2008. Susceptibility of eight potato cultivars to tuber infection by *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* and its relationship to mefenoxam-mediated control of pink rot and leak. Annals of Applied Biology 152: 189–199.
- Tyler B. M., Förster H. and Coffey M. D. 1995. Inheritance of avirulence factors and restriction fragment length polymorphism markers in outcrosses of the oomycete *Phytophthora sojae*. Molecular Plant-microbe Interactions 84: 515–523.
- Thompson A. L., Taylor R. J., Pasche J. S., Novy R. G. and Gudmestad N. C. 2007. Resistance to *Phytophthora erythroseptica* and *Pythium ultimum* in a potato clone derived from *S. berthaultii* and *S. etuberosum*. American Journal of Potato Research 84:149–160.
- Tucker C. M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. University of Missouri Agricultural Experiment Station Research Bulletin 153: 207.
- Vargas L. A. and Nielsen L. W., 1972. *Phytophthora erythroseptica* in Peru: Its identification and pathogenesis. American Journal of Potato Research 49: 309–320.
- Venkataramana C., Taylor R. J., Pasche J. S. and Gudmestad N. C. 2010. Prevalence of mefenoxam resistance among *Phytophthora erythroseptica* Pethybridge isolates in Minnesota and North Dakota. American Journal of Potato Research 87: 521–530.
- Waterhouse G. M. 1963. Key to the Species of *Phytophthora* de Bary. Mycological paper 92. CAB International Mycological Institute. UK.
- Wicks T. J., Davoren C. W. and Hall B. H. 2000. Fungicidal control of *Phytophthora erythroseptica*: The cause of pink rot on potato. American Journal of Potato Research 77: 233–240.
- Zmasek C. M. and Eddy S.R. 2001. ATV: display and manipulation of annotated phylogenetic trees. Bioinformatics 17: 383–384.