

## بررسی خصوصیات مولکولی و ریخت‌شناختی عامل پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی در انبارهای استان فارس\*

### Molecular and morphological characterization of the causal agent of potato pink rot in potato stores in Fars Province

بنفشه صفایی فراهانی<sup>۱</sup>، رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا<sup>۱\*</sup>، جایلز هاردی<sup>۲</sup> و ترینا برجس<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۸/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۹)

#### چکیده

نمونه‌برداری از غده‌های سیب‌زمینی آلوده به پوسیدگی صورتی در انبارهای استان فارس منجر به جداسازی تعدادی جدایه‌ی فیتوفتورا شد که شباهت کاملی با هیچ‌یک از عوامل شناخته شده‌ی ایجاد کننده‌ی پوسیدگی صورتی نداشتند. واکاوی ژن‌های سه ناحیه‌ی هسته‌ای (فاصله‌ی ترانوسیسی شده‌ی داخلی (آی‌تی‌اس)، بتاتوبولین و پروتئین شوک حرارتی ۹۰) و یک ناحیه‌ی میتوکندریایی (زیر واحد یک سیتوکروم سی اکسیداز) نشان داد این جدایه‌ها دورگی از *Phytophthora erythroseptica* و *P. cryptogea* هستند. واکاوی فیلوژنتیکی بر اساس رهیافت بیسی نشان داد که جدایه‌های عامل پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی همراه با گونه‌های *P. erythroseptica* و *P. cryptogea* GII در گروهی تک نیا و مستقل از سایر اعضای مهم تبار هشت فیتوفتورا قرار می‌گیرند. همسانه‌سازی ژن بتاتوبولین با تولید توالی‌های والدی، طبیعت دورگ این جدایه‌ها را تأیید کرد. این جدایه‌ها دارای اسپورانژیوم‌های بدون پاییل، بیضی تا تخم‌مرغی شکل، اُسپورهاى گرد و ناپرساز و آتریدیوم‌های انتهایی، منفرد و پیراماده بودند. جدایه‌های به دست آمده با وجود تفاوت‌های مشاهده شده، از نظر خصوصیات ریخت‌شناختی شباهت زیادی به والد مادری‌شان یعنی *P. erythroseptica* داشتند.

کلیدواژه: اُمیکوتا، توالی‌سنجی، دورگ شدن

\* بخشی از پایان نامه دکتری نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

\*\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: [rmostofi@shirazu.ac.ir](mailto:rmostofi@shirazu.ac.ir)

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

۲- به ترتیب استاد و دانشیار مرکز مطالعات و مدیریت فیتوفتورا، دانشگاه مرداک استرالیا

## Molecular and morphological characterization of the causal agent of potato pink rot in potato stores in Fars Province

B. SAFAIEFARAHANI<sup>1</sup>, R. MOSTOWFIZADEH-GHALAMFARSA<sup>1\*</sup>, G.E.ST.J. HARDY<sup>2</sup> and T.I. BURGESS<sup>2</sup>

(Received: 16.12.2014; Accepted: 28.2.2015)

### Abstract

While sampling from potato tubers infected with potato pink rot in Fars province's potato stores, several *Phytophthora* isolates were recovered which differed from those known to cause pink rot. Various gene analyses including three nuclear (internal transcribed spacers (ITS),  $\beta$ -tubulin and heat shock protein 90) and one mitochondrial (cytochrome c oxidase subunit I) gene regions showed these isolates were hybrids between *Phytophthora cryptogea* and *P. erythroseptica*. Phylogenetic analysis using Bayesian approach showed the causal agent of potato pink rot, *P. erythroseptica* and *P. cryptogea* GII form a monophyletic group which is independent of major members of *Phytophthora* clade 8. Cloning of the  $\beta$ -tubulin region produced both parental  $\beta$ -tubulin sequences and confirmed the hybrid nature of these isolates. Isolates produced non-papillate and ellipsoid to ovoid sporangia, globose and aplerotic oogonia, and amphigynous terminal antheridia. While there were some differences, based on morphological characteristics, these isolates were most similar to their maternal parent, *P. erythroseptica*.

**Keywords:** *Oomycota*, sequencing, hybridization

---

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

1. Department of Plant Protection, College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran, 7144165186.  
rmostofi@shirazu.ac.ir

2. Centre for Phytophthora Science and Management, School of Veterinary and Life Sciences, Murdoch University, Murdoch, WA 6150, Australia

## مقدمه

اخیر آغاز شده است. تا کنون چهار دورگ مصنوعی

(Donahoo & Lamour 2008, English et al. 1999, Ersek et al. 1995, Goodwin & Fry 1994, May et al. 2003) و دوازده دورگ طبیعی (Bertier et al. 2013, Brasier et al. 1999, Brasier et al. 2004, Gomez-Alpizar et al. 2008, Goss et al. 2011, Ioos et al. 2006, Man in't Veld et al. 2007, Man in't Veld et al. 2012, Nagel et al. 2013, Nirenberg et al. 2009, Oliva et al. 2010, Yang et al. 2014) در جنس فیتوفتورا گزارش شده است. زمانی که این دورگ‌های طبیعی، پایدار و دارای خصوصیات ثابت باشند، پس از تعیین خصوصیات ریخت‌شناختی و مولکولی به عنوان گونه‌ی جدید توصیف می‌گردند. در میان دورگ‌های بین گونه‌ای جنس فیتوفتورا که به عنوان گونه‌ی جدید توصیف شده‌اند می‌توان به *P. alni* Brasier & S.A. Kirk (Brasier et al. 2004) *Phytophthora ×serendipita*، (Man in't Veld et al. 2007) *Phytophthora ×pelgrandis* (Man in't Veld et al. 2012) و *Phytophthora ×stagnum* (Yang et al. 2014) اشاره کرد.

گونه‌های فیتوفتورا به دامنه‌ی وسیعی از گیاهان حمله کرده، منجر به خسارت اقتصادی می‌شوند (Erwin & Ribeiro 1996, Martin et al. 2012). در میان بیماری‌های ناشی از گونه‌های فیتوفتورا، پوسیدگی صورتی یکی از بیماری‌های مهم سیب‌زمینی در سرتاسر دنیاست (Erwin & Ribeiro 1996, Lambert & Salas 2001). اگرچه عامل ایجاد این بیماری در ابتدا *P. erythroseptica* Pethybr. گزارش شد (Hooker 1981, Pethybridge 1913)، مطالعات بعدی نشان داد سایر گونه‌های فیتوفتورا مانند *P. cryptogea* Pethybr. & Laff. (1919) و *P. parasitica drechsleri* و برخی دودمان‌های (Dastur 1913) نیز قادر به تولید پوسیدگی صورتی سیب-

جنس فیتوفتورا از مهم‌ترین جنس‌های بیماری‌زای گیاهی است و تاکنون نزدیک به ۱۲۰ گونه در این جنس شناسایی شده است (Martin et al. 2014). گونه‌های این جنس بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی به ۶ گروه (Waterhouse 1963) و بر اساس واکاوی‌های فیلوژنتیکی توالی‌های هسته‌ای و میتوکندریایی به ۱۰ تبار تقسیم می‌شود (Blair et al. 2008, Cooke 2000, Kroon et al. 2004, Martin et al. 2014). روش‌های سنتی تشخیص گونه‌های فیتوفتورا مبتنی بر ویژگی‌های ریخت‌شناختی است. علیرغم تعداد زیاد کلیدهای موجود (به عنوان مثال Gallegly & Hong 2008, Stamps et al. 1990, Tucker 1931, Waterhouse 1963)، تشخیص گونه‌های فیتوفتورا با استفاده از این کلیدها هنوز مشکل به نظر می‌رسد؛ زیرا تعداد نسبتاً اندکی خصوصیت ریخت‌شناختی وجود دارد که تشخیص گونه بر پایه‌ی آن انجام می‌شود. همچنین این خصوصیات دارای تنوع زیادی بوده، هم‌پوشانی آن‌ها در گونه‌ها نیز مشاهده شده است (Erwin 1983, Forster et al. 1990, Garrettson-Cornell 1989, Mills et al. 1991).

فناوری حاصل از مطالعات مولکولی ابزار مهمی برای تأیید اعتبار گونه‌های فیتوفتورا فراهم کرده است. استفاده از این روش‌ها به سرعت در حال گسترش بوده، منجر به توصیف گونه‌های جدیدی مانند *P. gemini* Man in't Veld, K. Rosend., H. Brouwer & De Cock و *himalsilva* Vettr., Brasier & A. Vannini و گونه‌های دورگ در جنس فیتوفتورا شده است (Yang et al. 2014). اگرچه گونه‌های فیتوفتورا از نخستین گونه‌های توصیف شده در بین بیمارگران گیاهی هستند، مطالعات دربار‌ه‌ی دورگ شدن بین‌گونه‌ای در این جنس تنها در سال‌های

هیچ صفت متمایز کننده‌ی ریخت‌شناختی یا فیزیولوژیکی بین دودمان‌های *P. cryptogea* وجود ندارد و جداسازی این دودمان‌ها تنها با استفاده از واکاوی‌های مولکولی امکان‌پذیر است.

با وجودی که تاکنون هیچ یک از عوامل ایجاد کننده‌ی پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی از استان فارس گزارش نشده‌اند (Ershad 2009)، در طی نمونه برداری از انبارهای سیب‌زمینی استان فارس تعدادی جدایه‌ی فیتوفتورا از غده‌های آلوده به پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی به دست آمد که از نظر خصوصیات ریخت‌شناختی و مولکولی شباهت کاملی با هیچ یک از گونه‌های توصیف شده‌ی فیتوفتورا نداشت. هدف از انجام این مطالعه شناسایی و بررسی خصوصیات مولکولی و ریخت‌شناختی جدایه‌های فیتوفتورای به دست آمده از غده‌های سیب‌زمینی آلوده به پوسیدگی صورتی در انبارهای استان فارس بود.

## مواد و روش‌های بررسی

### جداسازی

نمونه برداری از انبارهای سیب‌زمینی شهرستان اقلید در استان فارس در سال ۱۳۹۲ انجام شد و غده‌هایی با علائم پوسیدگی نرم و لهیدگی به آزمایشگاه منتقل شد. پس از گندزایی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪، غده‌ها برش داده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگه‌داری شدند. قطعات پنج میلی‌متری از بافت آلوده‌ی غده‌هایی که رنگدانه‌ی صورتی در آن‌ها پدیدار شده بود به محیط‌کشت نیمه انتخابی CMA-PARP (CMA): عصاره‌ی ۴۰ گرم ذرت خرد شده، ۱۵ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر؛ حاوی ۰/۰۲ گرم در لیتر دلواسید، ۰/۵ گرم در لیتر آمپی-سیلین، ۰/۰۱ گرم در لیتر ریفامپین و ۰/۱ گرم در لیتر

زمینی هستند (Grisham et al. 1983, Mostowfizadeh-Ghalamfarsa et al. 2006, Rowe & Schmittener 1977). نام پوسیدگی صورتی توصیف کننده‌ی 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.

گونه‌ی *P. erythroseptica* نخستین بار در سال ۱۹۱۳ به عنوان عامل پوسیدگی صورتی غده‌های سیب‌زمینی شناسایی و توصیف شد (Pethybridge 1913). شش سال بعد یعنی در سال ۱۹۱۹، گونه‌ی *P. cryptogea* به عنوان عامل پوسیدگی ریشه‌ی گوجه‌فرنگی در ایرلند توصیف شد (Pethybridge & Lafferty 1919). مطالعات ابتدایی نشان داد که این دو گونه خصوصیات ریخت‌شناختی مشابهی با یکدیگر داشته و هر دو اسپورانژیوم‌های بدون پاییل، بیضی شکل، تخم مرغی، گلابی وارونه یا غیرمنظم و آنتریدیوم‌های پیراماده تولید می‌کنند. تنها صفت متمایز کننده در این دو گونه رفتار هم‌تال در *P. erythroseptica* است (Erwin & Ribeiro 1996, Tucker 1931). مطالعات فیلوژنتیکی با استفاده از توالی‌های هسته‌ای و میتوکندریایی نشان داده است که گونه‌های *P. cryptogea* و *P. erythroseptica* هر دو به تبار هشت تعلق داشته، با یکدیگر خویشاوندی نزدیک دارند (Blair et al. 2008, Cooke 2000, Kroon et al. 2004, Martin et al. 2014). مستوفی‌زاده قلمفرسا و همکاران (Mostowfidadeh-Ghalamfarsa et al. 2010) با استفاده از واکاوی‌های دودمان‌های چند ژنی نشان دادند که *P. erythroseptica* یک گونه‌ی یک‌دست است در حالی که *P. cryptogea* دارای تنوع درون گونه‌ای بوده، سه دودمان مجزا در آن قابل مشاهده است که به صورت *P. cryptogea* GI، *P. cryptogea* GII و *P. cryptogea* GIII نام‌گذاری شدند.

(PCNB) منتقل شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش نوک ریشه انجام شد و جدایه‌های خالص شده به لوله‌های حاوی محیط‌کشت CMA منتقل و در ۱۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند (Singleton et al. 1992).

### خصوصیات ریخت‌شناختی اسپورانژیوم

برای تحریک جدایه‌ها به تولید اسپورانژیوم، از بذور شاهدانه (*Cannabis sativa*) استفاده شد. بدین منظور ابتدا بذور شاهدانه به مدت ۱۰ دقیقه در آب مقطر جوشانده شده، پس از سرد شدن در حاشیه‌ی پرگنه‌ی بیمارگر در محیط‌کشت CMA قرار گرفت. پس از ۲۴ ساعت بذور شاهدانه به تشتک پتری حاوی ۲۰ میلی‌لیتر عصاره‌ی خاک ۱۰٪ (Mircetich & Matheron 1976) غیرسترون منتقل شده، به مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت زیر نور دائم فلورسان و در ۲۰ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شد. پس از تشکیل اسپورانژیوم و رنگ آمیزی با استفاده از لاکتوفنل و اسیدفوشین ۱۰٪ (Mitchell & Knanwischer- 1992)، اسپورانژیوم‌ها از نظر شکل کلی و وجود یا عدم وجود پایپل بررسی و طول و عرض آن‌ها با استفاده از میکروسکوپ نوری اندازه‌گیری شد.

### سیستم آمیزشی و خصوصیات آگونیوم، آنتریدیوم و آسپور

به منظور تعیین تیپ آمیزشی جدایه‌ها، روش ساندریچ دو طرفه به کار رفت (Mitchell & Knanwischer- 1992). بدین منظور جدایه‌های مورد بررسی و تیپ‌های آمیزشی استاندارد A1 (PH-2-9-92) و A2 (PH-2-15-92) از *P. capsici* Leonian (مجموعه‌ی بخش گیاه‌پزشکی دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه شیراز) روی

محیط‌کشت HSA (عصاره‌ی ۶۰ گرم شاهدانه، ۱۵ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر) کشت شدند. در یک تشتک پتری خالی و سترون یک بلوک به قطر هشت میلی-متر از پرگنه‌ی جدایه‌ی مورد آزمون قرار داده شد و روی آن به ترتیب یک بلوک به قطر هشت میلی‌متر از محیط-کشت HSA و یک بلوک به قطر هشت میلی‌متر از پرگنه-ی تیپ آمیزشی استاندارد قرار گرفت. به منظور بررسی هم‌تال بودن جدایه‌ها، هر جدایه با خودش نیز تلاقی داده شد. تشتک‌های پتری در ۲۰ درجه‌ی سلسیوس و در تاریکی نگهداری شدند. بررسی هفتگی به منظور تشکیل اندام‌های جنسی انجام گرفت و خصوصیات ریخت-شناختی آگونیوم، آنتریدیوم و آسپور بررسی شد.

### آزمون بیماری‌زایی در غده‌های سیب‌زمینی

پس از ضدعفونی سطحی غده‌ها با استفاده از الکل اتیلیک ۷۰٪، قطعات شش میلی‌متری از بافت غده جدا شد و قطعاتی به همین اندازه از حاشیه‌ی جوان پرگنه‌های بیمارگر در زخم‌های ایجاد شده قرار گرفت. قطعات بریده شده‌ی غده‌ها به محل اولیه‌ی خود برگردانده شده، محل زخم با استفاده از نوارچسب و پارافیلیم بسته شد. غده‌ها به مدت پنج تا ۱۰ روز در ۲۵ درجه‌ی سلسیوس سلسیوس با و تاریکی نگهداری شدند. نتایج پس از مایه زنی با مشاهده‌ی علائم و کشت بافت‌های آلوده روی محیط‌کشت CMA-PARP بررسی شد (Mostowfzadeh- 2006). (Ghalamfarsa et al. 2006)

### استخراج دی‌ان‌ای

قطعاتی به قطر تقریبی پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی جوان پرگنه‌ها جدا و به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰

Table 1. Primers used in this study.

Target sequence توالی هدف	Primer name نام آغازگر	Primer sequence توالی آغازگر	Source منبع
Cytochrome c oxidase subunit I ITS	COXF4N	5'GTATTTCTTCTTTATTAGGTGC3'	Kroon <i>et al.</i> 2004
	COXR4N	5'CGTGAACATAATGTTACATATAC3'	
$\beta$ -Tubulin	ITS6	5'GAAGGTGAAGTCGTAACAAGG3'	Cooke <i>et al.</i> 2000
	ITS4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'	White <i>et al.</i> 1990
	TUBUF2	5'CGGTAACAACACTGGGCCAAGG3'	Kroon <i>et al.</i> 2004
Heat shock protein 90	TUBUR1	5'CCTGGTACTGCTGGTACTCAG3'	Blair <i>et al.</i> 2008
	HSP90_F1int	5'CAAGGTGATCCCGGACAAGGC3'	
	HSP90_R2	5'CGTGTCTGACAGCAGCCAGA3'	

پلیمرز برای نواحی فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی (آی-تی‌اس)، بتاتوبولین، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ و زیر واحد یک سیتوکروم سی اکسیداز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) و شرایط دمایی که پیش از این برای هر آغازگر گزارش شده بود (Blair *et al.* 2008, Cooke *et al.* 2000, Kroon *et al.* 2004) 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. 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.

#### ویرایش توالی‌های دی‌ان‌ای و واکاوی فیلوژنتیکی

ویرایش و همردیف‌سازی توالی‌های به دست آمده به روش دستی و با استفاده از نرم افزار Geneious Pro v4.8.1 (Drummond *et al.* 2010) انجام شد. با مقایسه‌ی

میلی لیتر عصاره‌ی سترون شده‌ی سیب‌زمینی منتقل شده، فلاسک‌ها به مدت پنج روز در تاریکی و ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از پنج روز محتویات هر فلاسک در ظروف پتری سترون خالی و پرگنه‌ها با استفاده از آب مقطر سترون شسته شد. میسلیم‌ها با استفاده از سوزن‌های سترون از قطعات محیط‌کشت آگاردار جدا شده، داخل ریزلوله‌های ۱/۵ میلی لیتری قرار گرفت و پس از یخ زدن به کمک ازت مایع، به مدت ۲۴ ساعت سرماخشک شدند. استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از محلول کلروفرم مطابق روش اندجیک و همکاران (Andjic *et al.* 2007) انجام شد.

#### فزون‌سازی و توالی‌سنجی دی‌ان‌ای

مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز حاوی ۱۰۰ نانوگرم از دی‌ان‌ای قالب، یک میکرومول از هر آغازگر، ۱۰۰ میکرومول dNTPs، ۰/۴ واحد Taq DNA polymerase (فیشر، بریتانیا)، ۱/۵ میکرومول MgCl<sub>2</sub>، ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (۲۰۰ میلی‌مول Tris-HCl با pH=۸ و ۵۰۰ میلی‌مول KCl) و ۱۰۰ میکرومول BSA (bovine serum albumine) برای واکنش‌های ۲۵ میکرولیتری تهیه شده، واکنش زنجیره‌ای

غریبال آبی / سفید تشخیص داده شدند. پرگنه‌های سفید پس از برداشته شدن از محیط کشت برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای T7 و SP6 (Nagel et al. 2013) تحت شرایط دمایی گزارش شده توسط طراحان استفاده شدند. ده محصول پی‌سی‌آر پس از خالص‌سازی توالی‌سنجی شدند (Sakalidis et al. 2011).

## نتایج

جداسازی، خصوصیات اسپورانژیوم، آگونیوم، آنتریدیوم و اُسپور

پس از نمونه برداری از انبارهای سیب‌زمینی استان فارس ۱۰ جدایه‌ی فیتوفتورا از غده‌های آلوده به پوسیدگی صورتی به دست آمد (جدول ۲). اسپورانژیوم‌های این جدایه‌ها فاقد پاییل، اغلب بیضی شکل یا تخم مرغی شکل بودند. میانگین اندازه‌ی اسپورانژیوم‌ها  $(3/07 \pm)$   $(26/95 \times 41/04 \pm 3/83)$  میکرومتر (بیشینه  $33/20 \times 52$  میکرومتر و کمینه  $26 \times 34/8$  میکرومتر) و میانگین نسبت طول به عرض  $1/52$  بود (شکل ۱، جدول ۳).

تمام جدایه‌های مورد آزمایش هم‌تال بوده، به تنهایی و بدون نیاز به تیپ‌های آمیزشی A1 و A2 قادر به تشکیل اُسپور بودند. اُسپورها گرد و ناپرساز بوده، میانگین اندازه‌ی آن‌ها  $(37/60 \pm 3/65) \times (41/16 \pm 3/33)$  میکرومتر محاسبه شد. آنتریدیوم‌ها منفرد، پیراماده با میانگین عرض  $1/18 \pm 12/20$  میکرومتر بودند (شکل ۱). میانگین اندازه‌ی اُسپور و آنتریدیوم برای هر جدایه در جدول ۳ آورده شده است.

آزمون بیماری‌زایی در غده‌های سیب‌زمینی

تمام جدایه‌های بررسی شده در این پژوهش، جدایه‌ی

نسخه‌ی مستقیم و معکوس شده، رشته‌ی برآیند به دست آمد و پس از ارائه به بانک ژن (GenBank, NCBI, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> [Online]) رس‌شمار آن‌ها اخذ شد. داده‌های حاصل از توالی‌یابی ناحیه‌ی آی-تی‌اس متعلق به جدایه‌های عامل پوسیدگی صورتی سیب-زمینی و جدایه‌های معتبر *P. GII* و *P. erythroseptica* همراه با توالی ناحیه‌ی آی-تی‌اس متعلق به اعضای تبار هشت فیتوفتورا (اخذ شده از بانک ژن) به منظور رسم درخت فیلوژنتیکی به کار رفت. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار MrBayes v3.1 (Ronquist & Huelsenbeck 2003)، با ره‌یافت بیسی و مطابق روش جانگ و برجس (Jung & Burgess 2009) رسم شد.

## همسانه‌سازی

به منظور تأیید دورگ بودن جدایه‌ها، قطعات فزون-سازی شده‌ی ژن بتاتوبولین در پلاسמיד باکتریایی pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector System (پرومگا، ایالات متحد آمریکا) همسانه سازی شدند. ابتدا یاخته‌های پذیرنده‌ی *Escherichia coli* JM109 با استفاده از پلاسמידهای نوترکیب، تراریخت شده، به تشتک‌های حاوی محیط کشت Luria-Bertani (LB) agar (۱۰ گرم تریپتون، ۵ گرم عصاره‌ی مخمر، ۵ گرم NaCl، ۱۵ گرم آگار، آب مقطر تا حجم یک لیتر) حاوی ۱۰۰ میلی گرم در لیتر آمپی‌سیلین، ۰/۵ میلی مول آی‌پی‌تی‌جی (-isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside = IPTG) و ۸۰ میلی گرم در لیتر ۵ برومو-۴ کلرو-۳ ایندول بتا دی‌گالاکتوپیرانوزید (-5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside) منتقل شدند. تشتک‌ها به مدت یک شب در ۳۷ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفتند و پرگنه‌های تراریخت با استفاده از

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های به کار رفته در این مطالعه و رس‌شمار آن‌ها در بانک ژن.

**Table 2. Isolates used in this study and their accession numbers in the GenBank database.**

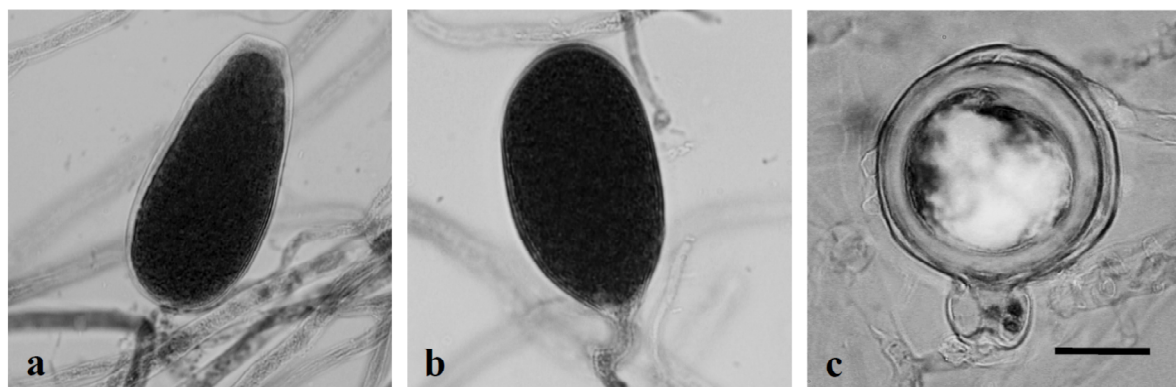
Species گونه	Isolate code جدایه	Host میزبان	Year of isolation سال جداسازی	Location محل جداسازی	Accessions <sup>1</sup> رس‌شمار			
					ITS آی‌تی‌اس	TUB بتا توبولین	COXI سیتوکروم اکسیداز سی	HSP 90 پروتئین شوک حرارتی ۹۰
<i>P. erythroseptica</i>	SUC655	Potato	1992	USA	KP099905	KP099917	KP099922	KP099927
<i>P. cryptogea</i> GII	SUC633	Eggplant	1985	Iran- Yasuj	KP099906	KP099918	KP099923	KP099928
	PS1	Potato	2012	Iran- Eghlid	KP099907	KP099919	KP099924	KP099929
	PS2	Potato	2012	Iran- Eghlid	KP099908	NP	NP	NP
<i>P. erythroseptica</i>	PS3	Potato	2012	Iran- Eghlid	KP099909	NP	NP	NP
<i>×P. cryptogea</i>	PS4	Potato	2012	Iran- Eghlid	KP099910	KP099920	KP099925	KP099930
GII	PS5	Potato	2012	Iran- Eghlid	KP099911	NP	NP	NP
	PS6	Potato	2012	Iran- Eghlid	KP099912	NP	NP	NP
	PS7	Potato	2012	Iran- Eghlid	KP099913	NP	NP	NP
	PS8	Potato	2012	Iran- Eghlid	KP099914	NP	NP	NP
	PS9	Potato	2012	Iran- Eghlid	KP099915	KP099921	KP099926	KP099931
	PS10	Potato	2012	Iran- Eghlid	KP099916	NP	NP	NP

COXI= cytochrome c oxidase subunit I; ITS= internal transcribed spacers of rDNA; TUB=  $\beta$ -tubulin; HSP90= heat shock protein 90, NP= Not performed.

جدول ۳- میانگین اندازه‌ی اندام‌های تولید مثلی جنسی و غیرجنسی (میکرومتر) در جدایه‌های فیتوفتورای به کار رفته در این مطالعه.

**Table 3. Average measure of sexual and asexual reproduction organs ( $\mu\text{m}$ ) of *Phytophthora* isolates used in this study.**

Isolate code جدایه	Sporangia اسپورانژیوم	Oospores اُوسپور	Antheridia عرض آنترییدیوم
PS1	(39.75 $\pm$ 2.60) $\times$ (26.52 $\pm$ 2.84)	(41.20 $\pm$ 3.36) $\times$ (38.40 $\pm$ 4.13)	11.46 $\pm$ 1.02
PS2	(40.44 $\pm$ 4.05) $\times$ (27.71 $\pm$ 3.68)	(40.19 $\pm$ 3.14) $\times$ (37.76 $\pm$ 4.15)	11.71 $\pm$ 1.16
PS3	(39.09 $\pm$ 3.77) $\times$ (25.32 $\pm$ 2.46)	(41.48 $\pm$ 3.80) $\times$ (39.45 $\pm$ 3.15)	13.01 $\pm$ 2.44
PS4	(40.39 $\pm$ 3.54) $\times$ (27.18 $\pm$ 3.18)	(41.98 $\pm$ 3.02) $\times$ (39.13 $\pm$ 2.91)	11.63 $\pm$ 0.90
PS5	(43.02 $\pm$ 3.69) $\times$ (26.21 $\pm$ 3.78)	(39.72 $\pm$ 3.60) $\times$ (37.52 $\pm$ 3.89)	12.16 $\pm$ 1.11
PS6	(40.16 $\pm$ 3.51) $\times$ (27.01 $\pm$ 2.28)	(41.84 $\pm$ 3.64) $\times$ (38.32 $\pm$ 3.29)	12.26 $\pm$ 0.78
PS7	(39.47 $\pm$ 3.73) $\times$ (26.76 $\pm$ 3.70)	(41.17 $\pm$ 4.39) $\times$ (38.54 $\pm$ 3.20)	12.38 $\pm$ 0.83
PS8	(41.14 $\pm$ 3.68) $\times$ (26.67 $\pm$ 2.86)	(40.55 $\pm$ 2.87) $\times$ (36.63 $\pm$ 3.41)	12.60 $\pm$ 0.52
PS9	(42.23 $\pm$ 2.86) $\times$ (26.77 $\pm$ 2.79)	(42.12 $\pm$ 4.12) $\times$ (37.99 $\pm$ 4.37)	12.51 $\pm$ 0.84
PS10	(44.74 $\pm$ 4.26) $\times$ (29.39 $\pm$ 2.34)	(41.53 $\pm$ 3.32) $\times$ (38.20 $\pm$ 4.34)	12.35 $\pm$ 0.66



شکل ۱- ریخت‌شناسی اسپورانژیوم (a, b)، اُوسپور، اُگونیوم و آنتریدیوم (c) جدایه‌ی دورگ بین *Phytophthora erythroseptica* و *P. cryptogea* (PS9). خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر.

**Fig. 1.** Characteristics of the sporangium (a, b) oospore, oogonium and antheridium (c) of hybrid isolates between *Phytophthora erythroseptica* and *P. cryptogea* (PS9). Bar = 20  $\mu$ m.

تی‌اس گونه‌های معتبر فیتوفتورا، اخذ شده از پایگاه داده-های فیتوفتورا (<http://www.phytophthoradb.org>) (داده‌ها نشان داده نشده است)، مشخص کرد که این جدایه‌ها به میزان ۹۹٪ به *P. erythroseptica* و نیز به دودمان دوم *P. cryptogea* (*P. cryptogea* GII) شباهت دارند. به منظور کسب نتایج دقیق، علاوه بر جدایه‌های به دست آمده از انبارهای سیب‌زمینی یک جدایه‌ی معتبر از *P. cryptogea* GII (SUC633) و یک جدایه‌ی معتبر از *P. erythroseptica* (SUC655) نیز برای تمام ژن‌های مورد مطالعه (آی‌تی‌اس، بتاتوبولین، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ و زیر واحد یک سیتوکروم سی اکسیداز) توالی‌سنجی شد. پس از هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها مشخص شد که جدایه‌های به دست آمده از انبارهای سیب‌زمینی در ناحیه‌ی آی‌تی‌اس در مقایسه با دو گونه‌ی *P. cryptogea* GII و *P. erythroseptica*، در چهار نوکلئوتید، ناخالص (*heterozygote*) هستند. همچنین در حالی که در توالی *P. erythroseptica* در جایگاه‌های شماره ۱۲۳ و ۱۳۱ شکاف (gap) دیده می‌شود، جدایه‌های مورد مطالعه در این دو

معتبری از *P. cryptogea* GII (SUC633) و جدایه‌ی معتبر از *P. erythroseptica* (SUC655) 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. عامل بیماری مجدداً از مرز بین نواحی آلوده و سالم جداسازی شد. در صد آلودگی در غده‌های سیب‌زمینی برای همه‌ی جدایه‌ها ۱۰۰٪ بود.

واکاوی چندشکلی در توالی آی‌تی‌اس، بتاتوبولین، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ و زیر واحد یک سیتوکروم سی اکسیداز

فزون سازی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس در ۱۰ جدایه‌ی به دست آمده از انبارهای سیب‌زمینی، منجر به تکثیر قطعه‌ای به طول تقریبی ۸۰۰ جفت باز شد. در بررسی‌های اولیه، هم‌ردیف‌سازی توالی آی‌تی‌اس این جدایه‌ها با توالی آی-



شکل ۲- الکتروفروگرام بخشی از ژن پروتئین شوک حرارتی ۹۰ در جدایه‌های SUC655 (*Phytophthora erythroseptica*), SUC633 (*P. cryptogea* GII) و PS1, PS4, PS9 (دورگ بین *P. erythroseptica* و *P. cryptogea* GII). پیکان‌های سیاه نشان دهنده‌ی جایگاه‌های ناخالص هستند.

**Fig. 2.** Trace electropherograms from one part of the heat shock protein 90 gene in SUC655 (*Phytophthora erythroseptica*), SUC633 (*P. cryptogea* GII), PS1, PS4 and PS9 (hybrid between *P. erythroseptica* and *P. cryptogea* GII) isolates. Black arrows show heterozygote sites.

ترتیب دارای نه و ۲۶ نوکلئوتید ناخالص هستند (جدول ۴؛ شکل ۲). جدایه‌ها در ژن بتاتوبولین به میزان ۹۸٪ به هر دو گونه‌ی *P. erythroseptica* و *P. cryptogea* GII شباهت داشتند. میزان شباهت به این گونه‌ها در ژن پروتئین شوک حرارتی ۹۰ نیز ۹۸٪ بود.

مقایسه‌ی قطعه‌ی فزون‌سازی شده‌ی زیر واحد یک سیتوکروم سی اکسیداز در جدایه‌های مورد مطالعه با توالی‌های متعلق به گونه‌های معتبر فیتوفتورا (داده‌ها نشان داده نشده است) مشخص کرد که این توالی‌ها کاملاً با توالی متعلق به *P. erythroseptica* مشابهت داشته، فاقد هر گونه نوکلئوتید ناخالص است.

#### واکاوی فیلوژنتیکی

تبارنمای به دست آمده از توالی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس نشان داد جدایه‌های عامل پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی همراه با گونه‌های *P. erythroseptica* و *P. cryptogea* GII در گروهی مستقل از سایر اعضای تبار هشت فیتوفتورا قرار

جایگاه فاقد شکاف بودند و بنابراین طول ناحیه‌ی آی‌تی‌اس در آن‌ها با *P. cryptogea* GII برابر و دو نوکلئوتید از *P. erythroseptica* بیش‌تر بود (جدول ۴). هم‌ردیف‌سازی این توالی‌های آی‌تی‌اس در ۱۰ جدایه‌ی به دست آمده از انبارهای سیب‌زمینی نشان داد که تمام جدایه‌ها توالی مشابهی در این ناحیه دارند. بنابراین توالی سنجی سایر ژن‌ها (بتاتوبولین، پروتئین شوک حرارتی ۹۰ و زیر واحد یک سیتوکروم سی اکسیداز) تنها با استفاده از سه جدایه انجام شد.

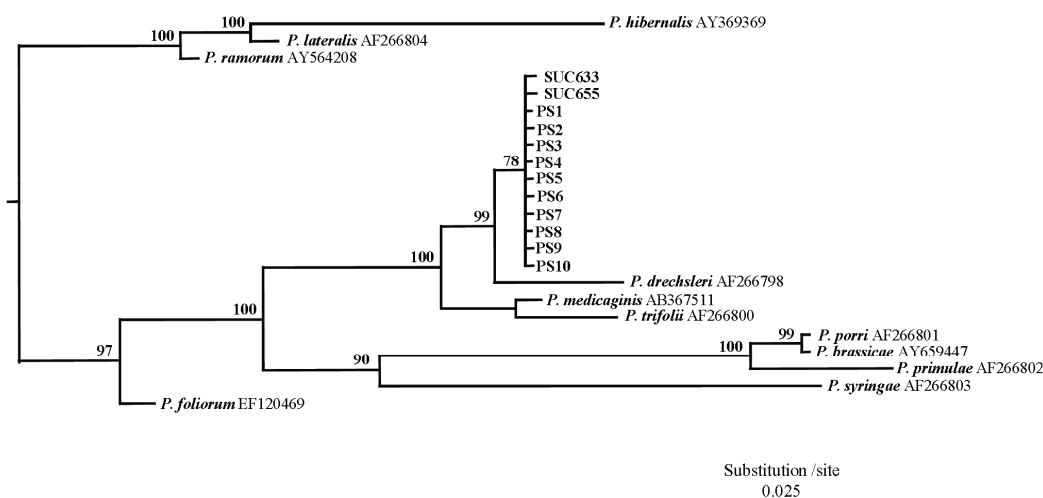
واکنش زنجیره‌ای پلیمراس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن بتاتوبولین و پروتئین شوک حرارتی ۹۰ به ترتیب قطعاتی به طول تقریبی ۹۰۰ و ۱۷۰۰ جفت باز تولید کرد. هم‌ردیف‌سازی این توالی‌ها با توالی‌های متعلق به گونه‌های معتبر فیتوفتورا (داده‌ها نشان داده نشده است) مشخص کرد که این جدایه‌ها به دو گونه‌ی *P. cryptogea* GII و *P. erythroseptica* شباهت دارند ولی نسبت به آن‌ها در ژن بتاتوبولین و پروتئین شوک حرارتی ۹۰ به

جدول ۴- مقایسه‌ی جایگاه‌های نوکلئوتیدی متغیر در توالی جدایه‌های فیتوفتورای به کار رفته در این مطالعه.

Table 4. Comparison of variable sites in sequences of *Phytophthora* isolates used in this study

Variable sites جایگاه متغیر	Isolates (GenBank Accession) جدایه (رس‌شمار در بانک ژن)				
	SUC655*	SUC633	PS1	PS4	PS9
ITS	KP099905	KP099906	KP099907	KP099910	KP099915
37	T	C	Y	Y	Y
56	T	C	Y	Y	Y
123	-	T	T	T	T
131	-	C	C	C	C
582	G	A	R	R	R
714	T	C	Y	Y	Y
$\beta$ -tubulin	KP099917	KP099918	KP099919	KP099920	KP099921
111	A	C	M	M	M
207	C	T	Y	Y	Y
363	A	C	M	M	M
381	C	G	S	S	S
426	T	C	Y	Y	Y
502	C	T	Y	Y	Y
633	C	T	Y	Y	Y
744	T	C	Y	Y	Y
750	T	G	K	K	K
Heat shock protein 90	KP099927	KP099928	KP099929	KP099930	KP099931
45	T	C	Y	Y	Y
50	C	A	M	M	M
77	A	C	M	M	M
335	C	T	Y	Y	Y
347	C	T	Y	Y	Y
392	A	G	R	R	R
509	T	C	Y	Y	Y
542	G	C	S	S	S
629	G	C	S	S	S
683	G	A	R	R	R
773	C	G	S	S	S
782	C	T	Y	Y	Y
866	A	G	R	R	R
965	T	C	Y	Y	Y
1022	C	T	Y	Y	Y
1032	T	C	Y	Y	Y
1034	G	T	K	K	K
1100	T	C	Y	Y	Y
1154	A	G	R	R	R
1190	T	A	W	W	W
1209	A	G	R	R	R
1268	T	A	W	W	W
1271	C	T	Y	Y	Y
1442	G	C	S	S	S
1514	C	T	Y	Y	Y
1523	T	C	Y	Y	Y

\*SUC655= *Phytophthora erythroseptica*; SUC633= *P. cryptogea* GII; PS1, PS4 and PS9= *P. erythroseptica* × *P. cryptogea* GII. A= Adenine; C= Cytosine; G= Guanine; T= Thymine; R= A or G; Y= C or T; S= G or C; W= A or T; K= G or T; M= A or C.



شکل ۳- روابط فیلوژنتیکی جدایه‌های عامل پوسیدگی صورتی سیب‌زمینی (PS1-PS10) با *Phytophthora erythroseptica* (SUC655)، *P. cryptogea* GII (SUC633) و اعضای مهم تبار هشت فیتوفتورا بر مبنای توالی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس و با استفاده از رهیافت بیسی. احتمال پس‌آیند بیسی (درصد) محل انشعاب هر شاخه نشان داده شده است.

**Fig. 3. Phylogenetic relationship of the causal agents of potato pink rot (PS1-PS10) with *Phytophthora erythroseptica* (SUC655), *P. cryptogea* GII (SUC633) and major members of *Phytophthora* clade 8 using ITS sequences. Bayesian posterior probabilities (%) are shown next to the branch points.**

پوسیدگی صورتی جداسازی شده بود، به عنوان دورگی از *P. erythroseptica* و *P. cryptogea* GII تشخیص داده شد. قرار گرفتن جدایه‌های عامل پوسیدگی صورتی سیب-زمینی همراه با گونه‌های *P. erythroseptica* و *P. cryptogea* در گروهی مستقل از سایر اعضای تبار هشت فیتوفتورا در تبارنمای رسم شده با استفاده از توالی ناحیه‌ی آی‌تی‌اس، ضمن تأیید خویشاوندی این جدایه‌ها با *P. erythroseptica* و *P. cryptogea* GII، عدم وجود شباهت کامل میان این جدایه‌ها و رگه‌های والدی (*P. erythroseptica* و *P. cryptogea*) را نشان داد. در میان دورگ‌های بین گونه‌ای جنس فیتوفتورا تا کنون هیچ گزارشی از دورگ شدن بین این دو گونه منتشر نشده است. از نظر خصوصیات ریخت‌شناختی، شکل اسپورانژیوم‌ها به آنچه پیش از این برای *P.*

می‌گیرند. احتمال پس‌آیند بیسی (Bayesian posterior probability) برای این گروه ۷۸٪ بود (شکل ۳).

#### واکاوی توالی همسانه‌های بتاتوبولین

پس از توالی‌سنجی ۱۰ همسانه از ژن بتاتوبولین برای هر جدایه، هم‌ردیف‌سازی قطعات نشان داد که تعدادی از قطعات فزون‌سازی شده کاملاً به ژن بتاتوبولین متعلق به گونه‌ی *P. cryptogea* GII و تعدادی نیز کاملاً به ژن بتاتوبولین متعلق به گونه‌ی *P. erythroseptica* شباهت دارند. بنابراین آلل‌های ژن بتاتوبولین متعلق به هر دو والد (*P. erythroseptica* و *P. cryptogea* GII) به‌طور جداگانه به دست آمد.

#### بحث

عامل بیماری که از غده‌های سیب‌زمینی با علائم

فیتوفتورا، می‌بایست هم از توالی‌های هسته‌ای و هم از توالی‌های میتوکندریایی استفاده کرد (Nirenberg et al. 2009). با توجه به نوکلئوتیدهای ناخالص مشاهده شده در توالی‌های هسته‌ای به کار رفته در این مطالعه (آی‌تی‌اس، بتاتوبولین و پروتئین شوک حرارتی ۹۰) (جدول ۴)، این توالی‌ها به خوبی طبیعت دورگ جدایه‌ها را نشان می‌دهند. همسانه‌سازی ژن بتاتوبولین نیز با تولید آل‌های والدی این دورگ‌ها، که مشابه *P. erythrosetica* و *P. cryptogea* است، دورگ بودن این جدایه‌ها را تأیید می‌کند. بر خلاف توالی‌های هسته‌ای، هیچ نوکلئوتید ناخالصی در توالی میتوکندریایی مورد مطالعه (زیر واحد یک سیتوکروم سی اکسیداز) مشاهده نشد و این توالی کاملاً مشابه توالی *P. erythrosetica* بودند. با توجه به توارث مادری ژن‌های میتوکندریایی (Whittaker et al. 1994)، تشابه توالی زیر واحد یک سیتوکروم سی اکسیداز در جدایه‌های دورگ و *P. erythrosetica* نشان می‌دهد که *P. erythrosetica* والد مادری این جدایه‌ها بوده است.

اگرچه در ابتدا گزارش شد که رفتار آمیزشی در گونه‌های فیتوفتورا توسط یک ژن‌گاه هسته‌ای کنترل می‌شود (Judelson et al. 1995, Fabritius & Judelson 1997)، مطالعات بعدی نشان داد که این ژن‌های میتوکندریایی - و نه هسته‌ای - هستند که تیپ آمیزشی را در گونه‌های فیتوفتورا کنترل می‌کنند (Gu & Ko 2005). در مطالعه‌ی ما، شباهت رفتار آمیزشی جدایه‌های دورگ با رفتار آمیزشی والد مادری‌شان (*P. erythrosetica*) کنترل رفتار آمیزشی توسط ژن‌های میتوکندریایی را تأیید می‌کند.

سازوکار دورگ شدن بین‌گونه‌ای در فیتوفتورا هنوز کاملاً شناخته نشده است. در مطالعه‌ی ما این پرسش مطرح شد که چگونه یک گونه‌ی هم‌تال مثل *P. erythrosetica*

*P. cryptogea* GII و *erythrosetica* گزارش شده است (Erwin & Ribeiro 1996, Mostowfidadeh-Ghalamfarsa et al. 2010). شبیه است. میانگین اندازه‌ی اسپورانژیوم (۴۱/۰۴×۲۶/۹۵ میکرومتر) به میانگین گزارش شده برای *P. erythrosetica* (۴۴/۲۰×۲۷/۲۰ میکرومتر) (Erwin & Ribeiro 1996) نزدیک است، اما از میانگین گزارش شده برای *P. cryptogea* GII (۳۵/۴۶×۲۳/۳۰ میکرومتر) (Mostowfidadeh-Ghalamfarsa et al. 2010) بزرگ‌تر است. رفتار آمیزشی هم‌تال کلیه‌ی جدایه‌ها به *P. erythrosetica* شباهت دارد و میانگین اندازه‌ی اسپورها (۴۱/۱۶×۳۷/۶۰ میکرومتر) در مقایسه با *P. erythrosetica* (۳۴/۹۰ میکرومتر) (Erwin & Ribeiro 1996) و *P. cryptogea* GII (۳۴/۰۲ میکرومتر) (Mostowfidadeh-Ghalamfarsa et al. 2010) بزرگ‌تر است. به طور کلی جدایه‌های مورد بررسی از نظر خصوصیات ریخت‌شناختی تشابه بیشتری به *P. erythrosetica* داشتند.

علیرغم وجود تفاوت‌های جزئی در اندازه‌ی اسپورانژیوم‌ها و اسپورها، خصوصیات ریخت‌شناختی مهم این جدایه‌ها، که به طور سنتی برای تشخیص گونه به کار می‌روند، تشابه زیادی به *P. cryptogea* و *P. erythrosetica* دارد و با توجه به هم‌تال بودن جدایه‌ها، روش سنتی با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی منجر به تشخیص اشتباه جدایه‌ها به عنوان *P. erythrosetica* می‌شود. بنابراین همانگونه که در مورد سایر دورگ‌های بین‌گونه‌ای جنس فیتوفتورا گزارش شده است (Nirenberg et al. 2009, Yang et al. 2014)، استفاده از روش‌های مولکولی برای شناسایی این دورگ‌ها ضروری است.

به منظور شناسایی جدایه‌های دورگ در جنس

است (Nirenberg et al. 2009). در جدایه‌های مورد مطالعه‌ی ما، احتمالاً پس از مخلوط شدن میسلیم دو گونه، آنتریدیوم‌های *P. cryptogea* قبل از آگونیوم‌های آن تولید شده، بنابراین به جای آگونیوم‌های خود، آگونیوم‌های *P. erythroseptica* را بارور کرده است. شواهد به دست آمده از واکاوی زیر واحد یک ژن سیتوکروم سی اکسیداز و معرفی *P. erythroseptica* به عنوان گونه‌ی مادری جدایه‌های دورگ تأییدی بر این ادعاست.

والدین دورگ‌های طبیعی بین‌گونه‌ای که تا کنون در جنس فیتوفتورا گزارش شده است، در تمام موارد به تبارهای مشابه تعلق داشتند و تنها والدین دورگ *P. capsici* × *P. nicotiana* که به طور مصنوعی و در آزمایشگاه تولید شده است متعلق به تبارهای متفاوت هستند (English et al. 1999). والدین جدایه‌های بررسی شده در مطالعه‌ی ما، نه تنها هر دو به تبار هشت گونه‌های فیتوفتورا (Blair et al. 2008) تعلق دارند، بلکه خویشاوندی نزدیکی نیز با یک‌دیگر داشته، دارای جد مشترک‌اند (Mostowfidadeh-Ghalmfarsa et al. 2010). وجود دورگ‌های بین‌گونه‌ای در این گونه‌ها نشان می‌دهد علیرغم جدایی تکاملی آن‌ها، جدایی تولیدمثلی هنوز به طور کامل در این دو گونه انجام نگرفته است. جدایی تولید مثلی، بسته به مدل گونه‌زایی، می‌تواند در مراحل ابتدایی یا انتهایی گونه‌زایی رخ دهد. در واقع، جدایی تولید مثلی در گونه‌زایی هم‌بوم (sympatric speciation) مهم‌ترین و حیاتی‌ترین مرحله را تشکیل می‌دهد، در حالی که در گونه‌زایی دگر‌بوم (allopatric speciation) محصولی جانبی از واگرایی ژنتیکی است (Giraud et al. 2008, Kohn 2005). با توجه به خویشاوندی نزدیک *P. erythroseptica* و *P. cryptogea* احتمالاً فرایند گونه‌زایی برای این گونه‌ها به صورت

می‌تواند دگرآمیزی انجام دهد؟ رفتار آمیزی در گونه‌های فیتوفتورا به صورت هم‌تالی و دگرتالی است. گونه‌های هم‌تال قادراند تولیدمثل جنسی را به تنهایی شروع کنند در حالی که گونه‌های دگرتال برای آغاز تولید مثل جنسی به برهمکنش دو تیپ آمیزی A1 و A2 نیاز دارند. این تیپ‌های آمیزی همگانی (universal) هستند؛ یعنی A1 متعلق به یک گونه، با A2 گونه‌های دیگر سازگار است. تولید مثل جنسی در فیتوفتورا نیاز به دو فرایند مشخص و مجزا دارد که شامل تولید هورمون و واکنش به هورمون است. وجود تیپ آمیزی مخالف برای تولید یک هورمون اختصاصی ضروری است (Judelson 2007, Ko 1978, Ko 1988, Ko 2007). در ابتدا تصور می‌شد که واکنش به این هورمون، سبب می‌شود که تولید مثل جنسی توسط خود فرد آغاز شود و هیچ گونه انتقال ماده‌ی ژنتیکی بین جدایه‌های A1 و A2 رخ نمی‌دهد (Boccas 1981, Boccas & Zentmyer 1976, Chang & Ko, 1993, Erselius & Shaw 1982)، اما مطالعات بعدی به ویژه یافتن جدایه‌های دورگ اثبات کرده است که دگرآمیزی و انتقال ماده‌ی ژنتیکی در حین تولیدمثل جنسی فیتوفتورا امری امکان‌پذیر اما نادر است. گونه‌های هم‌تال فیتوفتورا دارای هر دو هورمون دخیل در تولیدمثل جنسی و پذیرنده‌های آن‌ها هستند و بنابراین به لحاظ نظری، دگرآمیزی بین گونه‌های هم‌تال نیز غیرممکن نیست؛ به طوری که اثبات شده است که دگر آمیزی در *P. sojae*، که یک گونه‌ی هم‌تال است، رخ می‌دهد (Tyler et al. 1995, Whisson et al. 1994). دورگ شدن بین یک گونه‌ی دگرتال و یک گونه‌ی هم‌تال فیتوفتورا پیش از این نیز گزارش شده است. به عنوان مثال *Phytophthora pelgrandis* × حاصل دورگ شدن بین یک گونه‌ی هم‌تال (*P. cactorum*) و یک گونه‌ی دگرتال (*P. nicotianae*)

پوسیدگی صورتی در غده‌های سیب‌زمینی مورد مطالعه قرار گرفته است. بدیهی است مطالعات بیشتر برای تعیین دامنه‌ی میزبانی این جدایه‌ها، بررسی پراکنش آن‌ها در نقاط مختلف کشور و میزان خسارت ناشی از آن‌ها مورد نیاز است.

دگرپوم انجام شده و جدایی تولیدمثلی هنوز به طور کامل بین این دو گونه ایجاد نشده است. به بیان دیگر فرایند تفکیک تکاملی بین این دو گونه، هنوز به نقطه‌ی نرسیده که ژنوم آن‌ها دیگر با هم سازگار نباشد. دورگ‌های بررسی شده در این مطالعه، از غده‌های آلوده‌ی سیب‌زمینی به دست آمدند و بیماری‌زایی آن‌ها تنها از لحاظ توانایی تولید

## منابع

- Andjic V., Cortinas M. N., Hardy G. E. S. 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. A. M. and Höfte M. 2013. Host adaptation and speciation through hybridization and polyploidy in *Phytophthora*. *PLOS ONE* 8(12): e85385. doi:10.1371/journal.pone.0085385.
- Boccas B. R. 1981. Interspecific crosses between closely related heterothallic *Phytophthora* species. *Phytopathology* 71: 60-65.
- Boccas B. R. and Zentmyer G. A. 1976. Genetical studies with interspecific crosses between *Phytophthora cinnamomi* and *Phytophthora parasitica*. *Phytopathology* 66: 477-484.
- 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.
- Brasier C. M., Cooke D. E. L. and Duncan J. M. 1999. Origin of a new *Phytophthora* pathogen through interspecific hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 5878-5883.
- Brasier C. M., Kirk S. A., Delcan J., Cooke D. E. L., Jung T. 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.
- Chang T. T. and Ko W. H. 1993. Evidence for absence of hybridization in crosses between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora parasitica*. *Mycological Research* 97: 675-678.
- 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.
- Donahoo R. S. and Lamour K. H. 2008. Interspecific hybridization and apomixes between *Phytophthora capsici* and *Phytophthora tropicalis*. *Mycologia* 100: 911-920.
- 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>.
- English J. T., Laday M., Bakonyi J., Schoelz J. E. and Ersek T. 1999. Phenotypic and molecular characterization of species hybrids derived from induced fusion of zoospores of *Phytophthora capsici* and *Phytophthora nicotianae*. *Mycological Research* 103:1003-1008.
- Ersek T., English J. T. and Schoelz J. E. 1995. Creation of species hybrids of *Phytophthora* with modified host ranges by zoospore fusion. *Phytopathology* 85: 1343-1347.
- Erselius L. T. and Shaw D. S. 1982. Protein and enzyme differences between *Phytophthora palmivora* and *P. megakarya*: Evidence for self-fertilization in pairing of the two species. *Transactions of the British Mycological Society* 78: 227-238.
- Ershad D. J. 2009. Fungi in Iran. Iranian Research Institute of Plant Protection, Iran. 531p
- Erwin D. C. 1983, Variability within and among species of *Phytophthora*, pp. 149-165. In: D. C. Erwin, S. Bartnicki- Gaescia and P. H. Tsao (Eds.). *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology and Pathology*. APS Press, USA.

- Erwin D. C. and Ribeiro O. K. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. APS Press. American Phytopathological Society, USA. 562 p.
- Fabritius A. L. and Judelson H. S. 1997. Mating type loci segregate aberrantly in *Phytophthora infestans* but normally in *Phytophthora parasitica*: Implications for models of mating type determination. *Current Genetics* 32:60-65.
- Forster H., Oudemans P. and Coffey M. D. 1990. Mitochondrial and nuclear DNA diversity within six species of *Phytophthora*. *Experimental Mycology* 14: 18-31.
- Gallegly M. E. and Hong C. 2008. *Phytophthora* Identifying Species by Morphology and DNA Fingerprints. APS Press, USA. 158 p.
- Gerrettson-Cornell L. 1989. A compendium and classification of the species of the genus *Phytophthora* de Bary by the canons of the traditional taxonomy. Forestry Commission New South Wales, Technical Paper 45.
- Giraud T., Refregier G., Le Gac M., De Vienn D. M. and Hood M. E. 2008. Speciation in fungi. *Fungal Genetics and Biology* 45: 791-802.
- Gomez-Alpizar L. H. U., Oliva R., Forbes G. and Ristaino J. B. 2008. Phylogenetic relationships of *Phytophthora andina*, a new species from the highlands of Ecuador that is closely related to the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Mycologia* 100: 590-602.
- Goodwin S. B. and Fry W. E. 1994. Genetic analyses of interspecific hybrids between *Phytophthora infestans* and *Phytophthora mirabilis*. *Experimental Mycology* 18: 20-32.
- Goss E. M., Cardenas M. E., Myers K., Forbes G. A., Fry W. E., Restrepo S. and 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. doi:10.1371/journal.pone.0024543.
- 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: 1258-1261.
- Gu Y. H. and Ko W. H. 2005. Evidence for mitochondrial gene control of mating types in *Phytophthora*. *Canadian Journal of Microbiology* 51: 934-940.
- Ios R., Andrieux A., Marc 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.
- Hooker W. J. 1981. Compendium of Potato Diseases. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA. 123p.
- Judelson H. S. 2007. Sexual reproduction in plant pathogenic Oomycetes: Biology and impact on disease, pp. 445-458. In: J. Heitman, J. Kronstad, L. Taylor, and L. Casselton (Eds.). *Sex in Fungi: Molecular Determination and Evolutionary Implications*. ASM Press, USA.
- Judelson H. S., Spielman L. J. and Shattock R. C. 1995. Genetic mapping and non-mendelian segregation of mating type loci in the oomycete, *Phytophthora infestans*. *Genetics* 141: 503-512.
- Ko W. H. 1978. Heterothallic *Phytophthora*: Evidence for hormonal regulation of sexual reproduction. *Journal of General Microbiology* 107: 15-18.
- Ko W. H. 1988. Hormonal heterothallism and homothallism in *Phytophthora*. *Annual Review of Phytopathology* 26: 57-73.
- Ko W. H. 2007. Hormonal regulation of sexual reproduction in *Phytophthora*. *Botanical Studies* 48: 365-375.
- Kohn L. M. 2005. Mechanisms of fungal speciation. *Annual Review of Phytopathology* 43: 279-308.
- 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.
- Lambert D. H. and Salas B. 2001. Pink rot, pp. 33-34. In: W. R. Stevenson, R. Loria, G. D. Franc, and D. P. Weingartner, (Eds.). *Compendium of Potato Diseases*. American Phytopathological Society Press, USA.
- 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., Brouwer H. and de Cock A. W. A. M. 2011. *Phytophthora gemini* sp. nov., a new species isolated from the halophilic plant *Zostera marina* in the Netherlands. *Fungal Biology*

- 115: 724-732.
- Man In't Veld W. A., Rosendahl K. C. H. M. and Hong C. 2012. *Phytophthora*  $\times$  *serendipita* sp. nov. and *P. pelgrandis*, two destructive pathogens generated by natural hybridization. *Mycologia* 104: 1390-1396.
- Martin F. N., Abad G., Balci Y. and Ivors K. 2012. Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs. *Plant Disease* 96: 1080-1103.
- 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.
- May K. J., Drenth A. and Irwin J. A. G. 2003. Interspecific hybrids between the homothallic *Phytophthora sojae* and *Phytophthora vignae*. *Australasian Plant Pathology* 32: 353-359.
- Mircetich S. M. and Matheron M. E. 1976. *Phytophthora* root and crown rot of cherry trees. *Phytopathology* 66: 549-558.
- Mills S. D., Forster H. and Coffey M. D. 1991. Taxonomic structure of *Phytophthora cryptogea* and *P. drechsleri* based on isozyme and mitochondrial DNA analysis. *Mycological Research* 95: 31-48.
- Mitchell D. J. and Kannwischer-Mitchell E. 1992. *Phytophthora*, pp. 31-38. In: L. Singleton, S. D. Mihail and C. M. Rush (Eds.). *Soilborne Phytopathogenic Fungi*. APS Press, USA.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R., Cooke D. E. L. and Banihashemi Z. 2006. Potat pink rot: A criterion for discrimination of *Phytophthora melonis* from *P. drechsleri*. *Iranian Journal of Plant Pathology* 41: 191-201.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa R., Panabieres F., Banihashemi Z. and Cooke D. E. L. 2010. Phylogenetic relationship of *Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff and *P. drechsleri* Tucker. *Mycological Research* 114: 325-339.
- Nagel J. H., Gryzenhout M., Slippers B., Wingfield M. J., Hardy G. E. S. J., Stukely M. J. C. 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 Graefenhan T. 2009. *Phytophthora*  $\times$  *pelgrandis*, a new natural hybrid pathogenic to *Pelargonium grandiflorum* hort. *Mycologia* 101: 220-231.
- Oliva R. F., Kroon L. P. N. M., Chacon G., Flier W. G., Ristaino J. B. and Forbes J. A. 2010. *Phytophthora andina* sp. nov., a newly identified heterothallic pathogen of solanaceous hosts in the Andean highlands. *Plant Pathology* 59: 613-625.
- Pethybridge G. H. 1913. On the rotting of potato tubers by a new species of *Phytophthora* having a method of sexual reproduction hitherto undescribed. *Scientific Proceedings of Royal Dublin Society* 13: 529-565.
- Pethybridge G. H. and Lafferty H. A. 1919. A disease of tomato and other plants caused by a new species of *Phytophthora*. *Scientific Proceedings of Royal Dublin Society* 15: 487-505.
- Rowe R. C. and Schmitthenner A. F. 1977. Potato pink rot in Ohio caused by *Phytophthora erythroseptica* and *P. cryptogea*. *Plant Disease Reporter* 61:807-810.
- Sakalidis M. L., Hardy G. E. ST. J. and Burgess T. I. 2011. Endophytes and potential pathogens of the baobab species *Adansonia gregorii*; a focus on the Botryosphaeriaceae. *Fungal Ecology* 4: 1-14.
- Singleton L. L., Mihail J. D. and Rush C. M. 1992. *Methods for Research on Soilborn Phytopathogenic Fungi*. APS Press, USA. 265 p.
- 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.
- Tucker C. M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. *Missouri Agricultural Experiment Station Bulletin* 153: 207.
- Tyler B. M., Forster 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* 8: 515-523.
- Vettraino A. M., Brasier C. M., Brown A. V. and Vannini A. 2011. *Phytophthora himalsilva* sp. nov. an unusually phenotypically variable species from a remote forest in Nepal. *Fungal Biology* 115: 275-287.
- Waterhouse G. M. 1963. *Key to the Species of Phytophthora* de Bary. CAB International Mycological Institute, USA. 92 p.
- Whisson S. C., Drenth A., Maclean D. J. and Irwin J. A. G. 1994. Evidence for outcrossing in *Phytophthora sojae* and linkage of a DNA marker to two avirulence genes. *Current Genetics* 27: 77-82.

- Whittaker S. L., Assinder S. J. and Shaw D. S. 1994. Inheritance of mitochondrial DNA in *Phytophthora infestans*. *Mycological Research* 98: 569-575.
- 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(7): e103450. doi:10.1371/journal.pone.0103450