استفاده از قابلیت نشانگرهای ملکولی در بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های فلفل زینتی و خوراکی مقاوم و حساس به بیماری بوته‌میری *Phytophthora capsici*

لیلا محمدباقری*[۱]، مهدی نصراصفهانی[۲]، وحید عبدوسی[۳] و داود نادری[۴]

[۱*]گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم و تحقیقات تهران؛ [۲]بخش تحقیقات گیاه پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، ایران؛ [۳]گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه علوم و تحقیقات تهران؛ [۴]گروه باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان اصفهان.

*نویسنده مسئول: leila.hasti.mohamadbaghery@gmail.com

چکیده

فلفل (*Capsicum* sp.) از جمله گیاهانی است که به‌دلیل تنوع‌زیاد، مصارف فراوانی از قبیل زینتی، خوراکی و دارویی دارد. به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ۳۷ ژنوتیپ مختلف فلفل، شامل انواع ژنوتیپ‌های فلفل‌زینتی و خوراکی مقاوم و حساس به بیماری بوته‌میری *Phytophthora capsici*، از نشانگرهای ISSR شامل ۲۰ آغازگر استفاده شد. نتایج نشان داد که ۱۹ آغازگر از ۲۰ آغازگر مورد استفاده باندهای چندشکل نشان دادند. در مجموع ۱۸۸ باند تولید شد که ۱۸۵ باند چندشکل بودند. متوسط درصد چندشکلی در نشانگرهای ISSR، ۹۸/۵ بود و به‌طور متوسط ۹/۹ باند چندشکل در هر آغازگر تولید شد. درصد چندشکلی از ۷۸ تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی ۰/۴۴۹ بود.

بیشترین ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌های 20GreenP-PBI و 21OrnP-Banana به ترتیب فلفل سبز و فلفل زینتی موزی (۰/۹۲) مشاهده شد. از میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی ژنوتیپ‌های 11BlockyP-YToran، 19OrnP-PBI، 23CherryP-Orsh، 32OrnP-China و 37ChilP-Paleo مقاوم بودند که همه این ارقام در چهار گروه ژنتیکی متفاوت قرار گرفتند..

کلمات کلیدی: فلفل دلمه‌ای، فیتوفترا، *Capsicum* sp.، ISSR.

مقدمه

نشانگر ISSR یکی از نشانگرهای DNA مبتنی بر PCR است. جهت تکثیر DNA ژنومی به‌وسیله تکنیک ISSR از یک آغازگر ترکیبی حاصل از توالی‌های میکروساتلایت استفاده می‌شود که انتهای '۵ یا '۳ آن به وسیله توالی یک تا سه نوکلوتیدی محدود شده باشد (Reddy et al., 2002). نشانگرهای ISSR ابزار شناسایی معتبری در مطالعه روی تنوع ژنتیکی فلفل است. تنوع ژنتیکی ۵ گونه فلفل تحت کشت با استفاده از این نشانگرها بررسی و گزارش شده است که این گونه‌ها در گروه‌های متفاوتی قرار گرفتند. *C. annuum*، *C. Chinese* و *C. frutescence* در یک گروه و *C. baccatum* و *C. pubescens* در گروهی دیگر قرار داشتند (Lijun and Xuexiao, 2012). در یک پژوهش دیگر، ۲۸ ژنوتیپ فلفل شامل ۷ لاین مادری و ۲۱ هیبرید حاصل از آن‌ها، با استفاده از نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفته و گزارش شد که دندروگرام حاصل از نتایج این نشانگرها، دارای ۷ گروه شامل لاین‌های مادری بوده است. آن‌ها نشانگر ISSR را به‌عنوان یک ابزار قوی برای شناسایی و رده‌بندی ملکولی فلفل توصیه کردند (Refaat and Elgarhy, 2007). نشانگرهای ISSR قادرند تنوع ژنتیکی بیشتری را در لاین‌های فلفل تشخیص دهند و برای تعیین تنوع ژنتیکی بین لاین‌هایی که قرابت نسبی بسیار نزدیکی به هم دارند، مناسب‌تر است (Xuejun et al., 2007). ۱۳ لاین از ۵ گونه فلفل زراعی با استفاده از نشانگرهای ISSR مورد بررسی قرار گرفت. از ۱۶ آغازگر ISSR ۹۴ باند به‌دست آمد. جهت تعیین اصالت برندهای معروف بذر فلفل تند در بازار هندوستان از نشانگرهای ISSR استفاده شده است (Kumar et al., 2001). با استفاده از نشانگرهای

IrHC2019

ملکولی ISSR، ۴ رقم و گونه فلفل از جنس *Capsicum* مورد بررسی قرار گرفته و تغییرپذیری بالایی در بین این ژنوتیپ‌ها مشاهده شد (Dias et al., 2013). با توجه به موارد فوق و اهمیت موضوع و این که تاکنون بررسی‌های جامع و کاملی در این خصوص در کشور انجام نشده است، لذا در این پژوهش، بررسی‌هایی با هدف تعیین تنوع ژنتیکی برخی از ژنوتیپ‌های فلفل مقاوم و حساس به بوته‌میری *P. capsici* و در نهایت انتخاب ژنوتیپ‌های مستعد جهت توسعه برنامه‌های اصلاحی آتی انجام گردیده است.

مواد و روش‌ها

به‌منظور بررسی تنوع ژنتیکی ژنوتیپ‌های مختلف فلفل مقاوم و حساس به بوته‌میری با استفاده از نشانگرهای ISSR، آزمایشی با ۳۷ ژنوتیپ فلفل زینتی و خوراکی، در گلخانه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان به اجرا درآمد. ژنوتیپ‌های مورد بررسی، براساس آزمایشات مایه‌زنی در چهار گروه مقاوم، نیمه‌مقاوم، نیمه‌حساس و حساس گروه‌بندی شدند (Esfahani et al., 2012). بذر ژنوتیپ‌های مورد نظر (جدول ۱) از منابع ذی‌صلاح داخلی و خارجی تهیه و پس از ضدعفونی در سینی‌های کشت حاوی پیت‌ماس کشت و مراقبت‌های لازم از قبیل آبیاری و کنترل دمای محیط در آن‌ها انجام شد.

جدول ۱- فهرست ژنوتیپ‌های مورد بررسی شامل شماره ژنوتیپ، نام ثبت شده و واکنش به بوته‌میری *Phytophthora capsici*

شماره ژنوتیپ	مشخصات	نام مشخصه رقم	واکنش به بوته‌میری	شماره ژنوتیپ	مشخصات	نام مشخصه رقم	واکنش به بوته‌میری
1	زینتی- F2- مجارستانی	1OrnP-F2Hun	PS	20	سبز	20GreenP-PBI	PS
2	دلمه‌ای	2BP-PBI	S	21	زینتی- موزی‌شکل	21OrnP-Banana	PS
3	بلوکی- قرمز- زامبونی	3BlockyP-RZam	PS	22	دلمه‌ای- زرد- هیبرید- دربی	22BP-YDerby	PS
4	دلمه‌ای	4BP-12-Eastern	PS	23	گیلاسی- اورشلیم	23CherryP-Orsh	R
5	دلمه‌ای- بونانزا	5BP-Bonanza	PS	24	دلمه‌ای ۳۰۱	24BP-301	S
6	دلمه‌ای	6BP-Sums	PS	25	کشیده- کوچک	25LongP-Small	PS
7	بلوکی- قرمز- هورا RZ	7BlockyP-RHoraRZ	PS	26	دلمه‌ای- قرمز- هیبرید- استارلت	26BP-RStarlet	S
8	زینتی- ایرانی- کد ۶۵۷	8OrnP-IR657	PR	27	تند- فوگو	27ChilP-Fogo	PS
9	کشیده- مخروطی- سبز کم‌رنگ- سیرنا	9LongConicP-Gsirna	S	28	دلمه‌ای- RnineRhzne	28BP-RnineR	S
10	سبز- شیرین- گانگا	10SweetP-Ganga	S	29	دلمه‌ای 60D	29BP-60D	PS
11	بلوکی- زرد- تورانتو RZ	11BlockyP-YToran	R	30	زینتی- F2- الوان- هلندی	30OrnP-F2NethAlv	PR
12	زرد- بیلا	12YP-Billa	PS	31	نارنجی- آرانکیا	31OrP-Arankia	S
13	کشیده- رویان	13LongP-Royan	PS	32	زینتی- چینی	32OrnP-China	R
14	زینتی	14OrnP-PBI	PS	33	شمشیری- شیرین	33GladiateP	S
15	گیلاسی- شیرین	15SweetP-cherry	PR	34	بلوکی- لیریکا	34BlockyP-Lirika	PS
16	زینتی	16OrnP-PBI	PR	35	بلوکی- زرد- باچاتا	35BlockyP-YBachata	PS
17	زینتی- مخروطی- بنفش- آمریکایی	17OrnP-ConPurUSA	PS	36	نارنجی- پارامو	36OrP-Paramo	PS
18	زینتی- مخروطی- بنفش- ایتالیایی	18OrnP-ConPurItaly	PS	37	تند- پالئو	37ChilP-Paleo	R
19	زینتی	19OrnP-PBI	R				

R: مقاوم؛ S: حساس؛ PR: نیمه‌مقاوم؛ PS: نیمه‌حساس.

پس از سبزشدن بذور و اعمال مدیریت خزانه از قبیل آبیاری، تغذیه و مبارزه با آفات و بیماری‌های احتمالی، ۴۰ روز پس از کشت بذر نشاءها به گلدان‌های با حجم پنج کیلوگرمی حاوی خاک و ماسه سترون منتقل و در شرایط دمایی گلخانه ۲±۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۸۰-۶۰ درصد قرار داده شد. با نمونه‌گیری از برگ‌های جوان گیاهان

IrHC2019

یک‌ماهه در رأس گیاه قبل از گلدهی، نسبت به استخراج DNA براساس روش CTAB انجام شد (Rogers and Bendich, 1998). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد (Qing-zhe et al., 2011) و برای دمای اتصال از اطلاعات جدول ۲ برای هر آغازگر استفاده شد. پس از انجام PCR برای هر آغازگر، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۲-۱/۵ درصد بارگذاری و قطعات تکثیرشده از هم تفکیک شدند. پس از امتیازبندی باندهای حاصل از الکتروفورز، با استفاده از نرم‌افزار NTSYS گروه‌بندی ژنوتیپ‌های مورد بررسی صورت پذیرفت.

جدول ۲- آماره‌های تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای ISSR در ژنوتیپ‌های فلفل با استفاده از ۲۰ آغازگر

ردیف	کد آغازگر	توالی (3'--5')	دمای اتصال (°C)	تعداد کل باند	تعداد باند چندشکل	درصد چندشکلی	محتوای اطلاعات چندشکلی	شاخص نشانگری
1	MBP-1	$CG(A)_7$	50	-	-	-	-	-
2	MBP-2	$(GAC)_3GC$	44	10	10	100	0.413	4.13
3	MBP-3	$(CTC)_3GC$	44	6	6	100	0.479	2.87
4	MBP-4	$(GTG)_3GC$	44	10	10	100	0.498	4.98
5	MBP-6	$(GACA)_3$	50	11	11	100	0.469	5.16
6	MBP-7	$(CA)_6AG$	45	11	11	100	0.412	4.53
7	MBP-8	$(GT)_6GG$	45	10	10	100	0.499	4.99
8	MBP-9	$(GT)_6CC$	42	10	10	100	0.446	4.46
9	MBP-10	$(GTG)_4RC$	50	7	9	78	0.482	3.37
10	MBP-11	$GC(GCC)_4$	50	13	14	93	0.458	5.95
11	MBP-12	$TA(CAG)_4$	50	11	11	100	0.406	4.47
12	MBP-13	$(GA)_6GG$	44	9	9	100	0.440	3.96
13	MBP-14	$(GA)_6CC$	44	8	8	100	0.431	3.45
14	MBP-15	$(GACA)_3GC$	50	4	4	100	0.499	2.00
15	MBP-16	$(AGTG)_3GG$	50	13	13	100	0.355	4.62
16	MBP-17	$(GT)_8YG$	50	10	10	100	0.454	4.54
17	MBP-18	$CTC(GT)_8$	47	12	12	100	0.496	5.95
18	MBP-19	$(GT)_8CTC$	50	4	4	100	0.499	2.00
19	MBP-20	$(CCA)_7$	47	8	8	100	0.427	3.42
20	MBP-21	$(CGA)_7$	50	18	18	100	0.367	6.61
			میانگین	9.9	9.7	98.5	0.449	4.29
			کل	188	185	-	-	-

Y: Pyrimidine, R: Purin.

نتایج و بحث

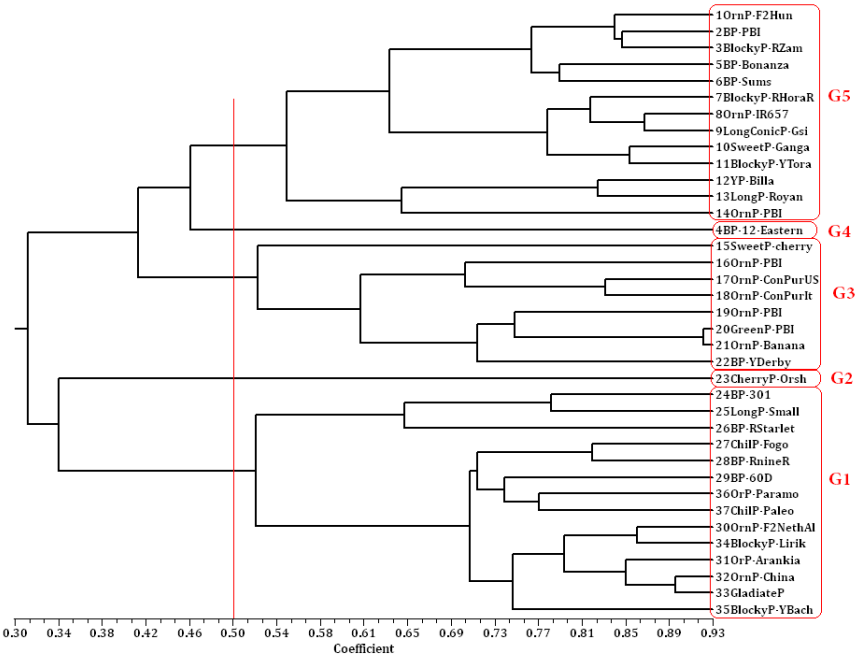
ژنوتیپ‌های مورد بررسی، براساس آزمایشات مایه‌زنی در چهار گروه مقاوم، نیمه‌مقاوم، نیمه‌حساس و حساس گروه‌بندی شدند. به‌منظور گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها بر اساس داده‌های مولکولی، از سه ضریب تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس برای برآورد فاصله ژنتیکی استفاده شد. پس از رسم دندروگرام با هر یک از ضرایب مذکور، ضریب کوفنتیک محاسبه شد که بر این اساس ضریب تشابه جاکارد به‌عنوان بهترین ضریب تشابه و الگوریتم UPGMA به‌عنوان بهترین الگوریتم خوشه‌بندی بر مبنای نشانگرهای ISSR مورد استناد قرار گرفتند. نتایج تجزیه نشانگرهای ISSR نشان داد ۱۹ آغازگر از ۲۰ آغازگر مورد استفاده در این آزمایش، الگوی نواری مشخص داشتند که در مجموع ۱۸۸ نوار نمره‌دهی شد که ۱۸۵ نوار چندشکل بودند. تعداد نوارها از ۴ نوار برای آغازگرهای MBP-15 و MBP-19 تا ۱۸ نوار برای آغازگر MBP-21 متغیر بود که نشان‌دهنده توانایی این آغازگرها در تفکیک ژنوتیپ‌ها بود. درصد چندشکلی از ۷۸ درصد برای آغازگر MBP-10 با کمترین درصد چندشکلی تا ۱۰۰ درصد برای ۱۷ آغازگر به‌کاررفته با بیشترین درصد چندشکلی متغیر بود و میانگین چندشکلی ۹۸/۵ درصد محاسبه شد (جدول ۲). میزان شاخص نشانگری (MI)، بین ۲/۰۰ تا ۶/۶۱ متغیر بود و آغازگر MBP-21 با ۶/۶۱ واحد، دارای بیشترین شاخص نشانگری بود که حاکی از کارایی بالای این آغازگر در بروز چندشکلی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه در این پژوهش بود. متوسط محتوای اطلاعات چندشکلی (PIC) ۰/۴۴۹ بود. بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی در آغازگرهای MBP-8، MBP-15 و MBP-19 (۰/۴۹۹) و کمترین آن در آغازگر MBP-16 (۰/۳۵۵) مشاهده شد. بنابراین، آغازگرهای MBP-8، MBP-15 و MBP-19 با بیشترین مقدار PIC، بهتر از بقیه آغازگرها

IrHC2019

توانستند فاصله ژنتیکی ژنوتیپ‌های مورد مطالعه را مشخص کنند (جدول ۲). در این رابطه، بیشترین ضریب تشابه بین ژنوتیپ‌های 20GreenP-PBI و 21OrnP-Banana به ترتیب فلفل سبز و فلفل زینتی موزی (۰/۹۲) مشاهده شد (شکل ۱). بر اساس دندروگرام شکل ۱، ژنوتیپ‌ها به پنج گروه تقسیم‌بندی شدند.

نتایج حاصل از نشانگرهای ISSR نشان داد بیشترین محتوای اطلاعات چندشکلی در آغازگرهای MBP-8، MBP-15 و MBP-19 (۰/۴۹۹) و کمترین آن در آغازگر MBP-16 (۰/۳۵۵) مشاهده شد. در استفاده از آغازگر MBP-1 با توالی $CG(A)_7$ هیچ‌گونه باندی تکثیر نشد. بر خلاف این نتایج، دیاز و همکاران (۲۰۱۳) در استفاده از این آغازگر ۲۵ باند مشاهده نمود که ۲۴ باند آن چندشکل بودند. شاید کوتاه‌بودن طول این آغازگر مانع از اتصال آن شده و امکان تکثیر قطعات مورد نظر فراهم نشده باشد. از طرفی، دیاز و همکاران (۲۰۱۳) در استفاده از آغازگر MBP-19 با توالی $(GT)_8CTC$ هیچگونه چندشکلی مشاهده نکردند. اما، در پژوهش حاضر، ۴ باند تکثیرشده توسط این آغازگر همگی چندشکل بودند.

مشابه با یافته‌های یک پژوهش (Sheeja et al., 2013) در خصوص مشاهده ۱۰۰ درصد چندشکلی در استفاده از آغازگر MBP-15 با توالی $(GACA)_3GC$)، در پژوهش حاضر نیز آغازگر مذکور ۱۰۰ درصد چندشکلی نشان داد. در مجموع، ۹۸/۴ درصد چندشکلی در استفاده از آغازگرها در پژوهش حاضر مشاهده شد. درصد چندشکلی در یافته‌های دیگر محققان نظیر دیاز و همکاران (۲۰۱۳) (۹۱/۲ درصد) و احمد (۲۰۱۳) (۶۰ درصد) نیز بالا گزارش شده است. در پژوهش حاضر، نشانگرهای ملکولی ISSR ، ابزار قدرتمندی برای تشریح شباهت ژنتیکی و تنوع میان ژنوتیپ‌های مختلف فلفل مورد بررسی بودند. ارتباط ژنتیکی و تنوع مشاهده‌شده بین ژنوتیپ‌های فلفل برای برنامه‌های اصلاحی کنونی و آتی به‌منظور انتخاب والدین مناسب مفید هستند. از میان ژنوتیپ‌های مورد بررسی ژنوتیپ‌های 11BlockyP-YToran، 19OrnP-PBI، 23CherryP-Orsh، 32OrnP-China و 37ChilP-Paleo مقاوم بودند که همه این ارقام در چهار گروه ژنتیکی متفاوت قرار گرفتند.



شکل ۱- تجزیه خوشه‌ای حاصل از الگوی چندشکلی ۳۷ ژنوتیپ فلفل مقاوم و حساس به بوته‌میری با استفاده از نشانگرهای ISSR، نرم‌افزار NTSYS، الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکارد

IrHC2019

منابع

Ahmed, S.M. 2013. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers in the evaluation of genetic polymorphism of Egyptian *Capsicum* L. hybrids. Afr. J. Biotechnol. 12(7): 665-669.

Dias, G.B., V.M. Gomes, T.M.S. Moraes, U.P. Zottich, G.R. Rabelo, A.O. Carvalho, M. Moulin, L.S.A. Goncalves, R. Rodrigues and M. Da-Cunha. 2013. Characterization of *Capsicum* species using anatomical and molecular data. Genet. Mol. Res. 12(4): 6488-6501.

Esfahani, M.N., M. Chatraee, S. Shafizadeh and S. Jalaji. 2012. Evaluation of resistance of cucurbit and cucumber cultivars to *Phytophthora drechsleri* in Greenhouse. Iranian Seed and Plant Improvement J. 28(3): 407-417.

Kumar, L.D., M. Kathirvel, G.V. Rao and J. Nagaraju. 2001. DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays. Forensic Sci. Int. 116(1): 63-68.

Lijun, O. and Z. Xuexiao. 2012. Inter simple sequence repeat analysis of genetic diversity of five cultivated pepper species. Afr. J.Biotechnol. 11(4): 752-757.

Qing-zhe, Z., M. Jin-gui, Z. Ying-hua, Y. Zhendan and X. Bin. 2011. Optimization for ISSR reaction system of Pepper by orthogonal design. Southwest China J. Agri. Sci. 3.

Reddy, M.P., N. Sarla and A.A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica, 128: 9-17.

Refaat, M.H. and H.A.S. Elgarhy. 2007. Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on ISSR-PCR markers in Pepper (*Capsicum annuum*. L.). Ann. Agri. Sci. Moshtohor.

Rogers, O.S. and A.J. Bendich. 1998. Extraction of DNA plant tissue, plant molecular. In: Gelvin SB, Schilpe RA, Verna DS (ed.): Plant Mol. Biol. Manual. pp. A6:1-10. Kluwer Academic Publishers, Dordecht.

Sheeja, T.E., G. Uma, B. Sasikumar, K.V Saji and P.R. Rahul. 2013. Genetic diversity study in *Piper* spp. using inter simple sequence repeat (ISSR) markers. J. Spices and Aromatic Crops. 22(2): 111-119.

Xuejun, C., C. Zhifang, C. Jingfeng, L. Qunfeng and G. Hong. 2007. Genetic diversity of pepper germplasm with RAPD, ISSR and phenotypic data. Acta Bot. Sin. 27 (4).

Molecular markers ability in genetic diversity of ornamental and edible Peppers resistant and susceptible to damping-off disease (*Phytophthora capsici*)

Leila Mohammad Bagheri[*1], Mehdi Nasr-Esfahani[2], Vahid Abdossi[3] and Davood Naderi[3]

[1] Horticulture Department, Agricultural Faculty, Science and Research University of Tehran; [2]Plant Protection Research Department, Agriculture and Natural Resource Research and Education Center of Isfahan, AREEO, Isfahan, Iran; [3]Horticulture Department, Agricultural Faculty, Science and Research University of Tehran and Khorasgan Esfahan, respectively, Iran.

[*]*Corresponding Author: leila.hasti.mohamadbaghery@gmail.com*

Abstract

Pepper (*Capsicum* sp.) is having numerous variations with abundant utilizations such as ornamental, food and pharmaceutical usages. In this study, the genetic diversity of 37 ornamental and edible pepper genotypes resistant and susceptible to damping-off disease, *Phytophthora capsici*, were analyzed by 21 ISSR primers. Results indicated that 19 primers out of 20 ones produced distinct and clear polymorphic bands. Totally, 188 bands were produced, out of which 185 bands were polymorphic. The polymorphism mean percent (P%) was 98.5% ranging from 78% to 100%, and the mean production of 9.9 bands per primers. The average mean for polymorphism information content (PIC) was 0.449. The greatest similarity coefficient of 0.92 was observed between pepper cv. 20GreenP-PBI and 21OrnP-Banana so called Green pepper and Banana-shaped ornamental pepper respectively. Out of 37 screened pepper genotypes, only 11BlockyP-YToran, 19OrnP-PBI, 23CherryP-Orsh, 32OrnP-China and 37ChilP-Paleo genotypes were the resistant ones to damping-off, which were place in four different molecular groups.

***Keywords*:** Bell pepper, *Capsicum* sp., ISSR, *Phytophthora*.

IrHC2019