

گوناگونی مورفوژنتیکی نژادگان‌های فلفل زینتی و خوراکی متتحمل و حساس به

بیماری بوته‌میری^۱ (*Phytophthora capsici*)

Morpho-Genetic Diversity of tolerant and Susceptible Ornamental and Edible Pepper Genotypes to Damping-off Disease (*Phytophthora capsici*)

لیلا محمدباقری، مهدی نصر اصفهانی^{*}، وحید عبدالوسی و داود نادری^۲

چکیده

فلفل (Capsicum sp.) از جمله گیاهانی است که بهدلیل گوناگونی زیاد، بهصورت زینتی، خوراکی و دارویی مصرف دارد. برای بررسی گوناگونی ژنتیکی ۳۷ نژادگان مختلف فلفل، شامل انواع نژادگان‌های فلفل‌زینتی و خوراکی متتحمل و حساس به بیماری بوته‌میری *Phytophthora capsici*، از نشانگرهای ریخت‌شناسی و ISSR بهترتبه با ۴۷ ویژگی و ۲۰ آغازگر استفاده شد. نتیجه‌های تجزیه نشانگرهای ISSR نشان داد که ۱۹ آغازگر از ۲۰ آغازگر مورد استفاده، باندهای چندشکل نشان دادند. در مجموع ۱۸۸ نوار تولید شد که ۱۸۵ نوار چندشکل بودند. میانگین درصد چندشکلی در نشانگرهای ISSR ۹۸/۵ بود و به طور میانگین ۹/۹ نوار چندشکل در هر آغازگر تولید شد. درصد چندشکلی از ۷۸ تا ۱۰۰٪ متغیر بود. میانگین محظوی داده‌های چندشکلی ۴۴۹/۰ بود. براساس نتیجه‌های تجزیه ISSR، نژادگان‌ها به ۵ گروه اصلی تقسیم شدند. ویژگی‌های ریخت‌شناسی نیز نژادگان‌ها را به ۵ گروه تقسیم نمود. ضریب همبستگی بین ضرایب تشابه مولکولی و ریخت‌شناسی غیرمعنی دار بود. نتیجه‌های بررسی تحمل به بیماری بوته‌میری نشان داد پنج نژادگان متتحمل شامل رقم‌های کد ۱۱، ۱۹، ۲۲، ۲۳ و ۳۷ از گروه فلفل‌های زینتی و کشیده بودند. در بررسی ارتباط بین گوناگونی ژنتیکی و میزان تحمل به بیماری، پنج نژادگان متتحمل به جز رقم کد ۳۷ در یک گروه ریخت‌شناسی و همگی در چهار گروه مولکولی متفاوت قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: ریخت‌شناسی، فلفل دلمه‌ای، فایتوفترا، *Capsicum sp.*, ISSR.

مقدمه

فلفل (Capsicum sp.) یک سبزی میوه‌ای می‌باشد که نقش قابل توجهی در تغذیه انسان داشته و از اهمیت ویژه‌ای در جهان برخوردار است. از سویی، با توجه به سمی بودن و همچنین زیبایی برخی گونه‌ها و نژادگان‌های فلفل، این گیاه کاربرد زینتی نیز دارد. شمار بسیار زیادی گونه و رقم زینتی فلفل وجود دارند که از اهمیت دارویی نیز برخوردارند. بررسی روابط ژنتیکی و ریخت‌شناسی بین این نژادگان‌ها و نیز بررسی میزان تحمل و حساسیت آن‌ها به بیماری بوته‌میری، بیان زن مقاوم و توالی ژئی از مهم‌ترین جنبه‌های علمی و عملی در خصوص این نژادگان‌ها هستند (۱۸).

بیماری بوته‌میری فایتوفترا، از مهم‌ترین بیماری‌های فلفل محسوب می‌شود. این بیماری در فلفل و کدو توسط عامل بیماری‌زای قارچی *Phytophthora capsici* بوجود می‌آید. پوسیدگی ریشه و طوفه و بوته‌میری فلفل یکی از شایع‌ترین بیماری‌های فلفل است. این بیماری دارای اهمیت جهانی بوده و تاکنون از کشورهای مختلف گزارش شده است، به طوری که

تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۲۱

۹۷/۱/۲۷ - تاریخ دریافت:

۲- بهترتبه دانشجوی دکترای علوم باغبانی گرایش گیاهان زینتی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، بخش تحقیقات گیاه پرشنگی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و تربیت کشاورزی، اصفهان، استادیار گروه علوم باغبانی دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران و دانشیار گروه علوم باغبانی و عضو باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد اصفهان (خوارسگان)، اصفهان، ایران.

* نویسنده مسئول، پست الکترونیک: (mne2011@gmail.com).

به عنوان دومین بیماری مخرب در بیشتر محصول‌های کشاورزی در جهان گزارش شده است (۲۲). در ایران اولین بار ارشاد و منفرد (۱) پوسیدگی ریشه و طوقه را از مزرعه‌های مختلف فلفل گزارش کردند. پس از آن قلی طلوعی و همکاران (۲) دو گونه از قارچ *Fusarium* و یک گونه از قارچ‌های *Phytophthora* و *Rhizoctonia* را به عنوان عامل اصلی ایجاد بیماری جداسازی و گزارش کردند.

نشانگر (ISSR) یکی از نشانگرهای DNA مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) است. برای تکثیر DNA ژنومی با فن ISSR از یک آغازگر ترکیبی به دست آمده از توالی‌های میکروساتلاتیت استفاده می‌شود که انتهایی^۵ یا ۳' آن به وسیله توالی یک تا سه نوکلئوتیدی محدود شده باشد. نشانگرهای ISSR ابزار شناسایی معتبری در مطالعه گوناگونی ژنتیکی فلفل می‌باشند. در پژوهشی، ۲۸ نژادگان فلفل شامل ۷ رگه مادری و ۲۱ دورگه به دست آمده از آن‌ها، با استفاده از نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفته و گزارش شد که دندروگرام به دست آمده از نتیجه‌های این نشانگرهای آن‌ها، با استفاده از نشانگر ISSR مورد ارزیابی بود. آن‌ها نشانگر ISSR را به عنوان یک ابزار قوی برای شناسایی و روهدندی مولکولی فلفل دارای ۷ گروه شامل رگه‌های مادری بود. آن‌ها نشانگر ISSR را به عنوان یک ابزار قوی برای شناسایی و روهدندی مولکولی فلفل پیشنهاد کردند (۱۸). نشانگرهای ISSR می‌توانند گوناگونی ژنتیکی بیشتری را در رگه‌های فلفل تشخیص دهند و برای سنجش گوناگونی ژنتیکی بین رگه‌هایی که قرابت نسبی بسیار نزدیکی به هم دارند، مناسب‌تر است (۲۵). از ۵ گونه فلفل زراعی، ۱۳ رگه با استفاده از نشانگرهای RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA RAPD) و ۲۸ ویژگی ISSR ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت. از ۲۳ آغازگر RAPD و ۱۶ آغازگر ISSR به ترتیب ۰۹۰ و ۹۴ نوار به دست آمد. در مجموع، مشخص شد که نشانگرهای ISSR در صد چندشکلی بیشتری در گونه *C. annuum* نسبت به RAPD داشتند و شمار آلل موثر، شاخص شانون، هتروزیگوستی و ضریب گوناگونی ژنتیکی به دست آمده از نشانگرهای ISSR بیشتر از RAPD بوده است. در این بررسی، همبستگی معنی‌داری بین دندوگرام‌های به دست آمده از نشانگرهای مولکولی و ریخت‌شناسی دیده شد. هم‌چنین، گونه *C. annuum* نسبت به بقیه گونه‌ها در گروه مجزایی قرار گرفت (۲۵). برای سنجش اصالت بذرهای تجاری معروف فلفل تند در بازار هندستان از نشانگرهای ISSR استفاده شده است (۱۴).

در ارزیابی گوناگونی ژنتیکی در گونه *C. annuum* L. با استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر PCR، ۲۴ نژادگان فلفل از این گونه با استفاده از نشانگرهای RAPD و ISSR بررسی و این دو نشانگر، ابزارهای معتبری برای بررسی گوناگونی ژنتیکی این گونه فلفل معرفی شده‌اند (۱۷). در یک پژوهش گزارش شد که گوناگونی ژنتیکی نژادگان‌های *C. baccatum* به طور معنی‌داری زیر تاثیر پراکنش جغرافیایی آن‌ها قرار می‌گیرد. در بین ۴۰ ویژگی ریخت‌شناسی مورد بررسی، ویژگی‌های وزن میوه، قطر میوه و طول دمگل بیشترین سهم را در جداسازی نژادگان‌های وحشی و اهلی شده از این گونه فلفل به خود اختصاص دادند (۴).

ویژگی‌های گل و نشانگرهای مولکولی ابزارهای مفیدی برای توصیف ویژگی‌های اختصاصی گونه‌های فلفل و شناسایی ذخایر ژنتیکی آن هستند. بر این اساس ۲۲ رگه از ۶ گونه فلفل با استفاده از ویژگی‌های رنگ گل و نشانگرهای RAPD و ISSR گروه‌بندی شدند (۲۳). با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و بررسی‌های کالبدشناسی ۴ رقم و گونه فلفل از جنس *Capsicum* مورد بررسی قرار گرفته و تغییرپذیری بالایی در بین این نژادگان‌ها دیده شد. اگرچه گونه‌های مورد بررسی، گوناگونی ریخت‌شناسی و مولکولی زیادی نشان دادند، اما این گوناگونی در ویژگی‌های کالبدشناسی آن‌ها دیده نشد، به طوری که برخی تغییرهای کالبدشناسی بین گونه‌های *C. chinense*, *C. annuum*, *C. baccatum* و *C. frutescens* از نظر بروگ، بذر و میوه وجود داشت (۸). با استفاده از ۱۰ آغازگر ISSR شش دورگه بین گونه‌های فلفل *C. annuum* و *C. frutescens* مورد بررسی قرار گرفته و با استفاده از ضریب دایس فاصله ژنتیکی ۰/۰۲۵ دیده شد (۳). در بررسی گوناگونی ژنتیکی بین ۷۴ رگه فلفل سیاه با استفاده از نشانگرهای ISSR مشخص شد که ضریب تشابه ژنتیکی بین این رگه‌ها بین ۰/۵۴۸ تا ۰/۹۷۶ بود. هم‌چنین، فاصله ژنتیکی درون گونه‌ای بین ۰/۰۱۰ تا ۰/۰۲۸۰ بدست آمد (۱۳). در پژوهشی دیگر نیز از نشانگرهای ISSR برای بررسی گوناگونی ژنتیکی ۲۷ گونه فلفل سیاه استفاده و آن‌ها در ۶ خوش‌دسته‌بندی شدند (۲۱). در مطالعه گوناگونی ژنتیکی برخی نژادگان‌های فلفل تند، ۱۲ ویژگی کمی مورد ارزیابی قرار گرفته و با استفاده از روش تجزیه به مولفه‌های اصلی، بیشترین واگرایی در ویژگی‌های عملکرد هر بوته، عرض بوته، شاخه‌های ثانویه، ارتفاع بوته و شمار بذر در میوه دیده شد (۱۱).

با توجه به موارد بالا، اهمیت موضوع و این که تاکنون بررسی‌های جامع و کاملی در این زمینه در کشور انجام نشده است، بنابراین در این پژوهش، بررسی‌هایی با هدف سنجش گوناگونی ژنتیکی برخی از نژادگان‌های فلفل متتحمل و حساس به بوته‌میری *P. capsici* و ارزیابی رابطه ژنتیکی آن‌ها با استفاده از روش‌های تجزیه ریخت‌شناسی و مولکولی شامل نشانگرهای ISSR و در پایان انتخاب نژادگان‌های مستعد برای پیشرفت برنامه‌های بهبودآمیزی آنی انجام گردیده است.

مواد و روش‌ها

برای بررسی گوناگونی ژنتیکی نژادگان‌های مختلف فلفل متتحمل و حساس به بوته‌میری با استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناسی و ISSR آزمایشی در قالب یک طرح به طور کامل تصادفی با ۳۷ تیمار (شامل نژادگان‌های فلفل زینتی و خوارکی) با ده تکرار (بوته)، در گلخانه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی اصفهان در دو فاز به اجرا درآمد.

بذر نژادگان‌های مورد نظر (جدول ۱) از منابع معتبر داخلی و خارجی تهیه و پس از گندزدایی، در سینی‌های کشت حاوی پیتماس کشت و مراقبت‌های لازم مانند آبیاری و کنترل دمای محیط در آن‌ها انجام شد. پس از تنزیبدن بذرها و اعمال مدیریت خزانه مانند آبیاری، تغذیه و مبارزه با آفات‌ها و بیماری‌های احتمالی، ۴۰ روز پس از کاشت بذر، یک نشاء به گلدان‌های پنج لیتری حاوی خاک، کود و ماسه (۱:۱:۱) که درون اتوکلاو در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس و در فشار ۱/۵ اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه سترون شده بود، منتقل شد و در شرایط دمایی گلخانه 25 ± 2 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۰ تا ۸۰٪ قرار داده شد. در این مرحله نسبت به یادداشت‌برداری ویژگی‌های رویشی گیاه براساس توصیف‌نامه اقدام شد (۵). پس از آغاز فاز زایشی، ویژگی‌های ریخت‌شناسی گل و میوه نیز بر اساس توصیف‌نامه بررسی گردید (۵) (ویژگی‌های نوشته شده در جدول ۳).

جدول ۱- فهرست نژادگان‌های فلفل مورد بررسی شامل شماره نژادگان، نام ثبت شده، شرکت و واکنش به بوته‌میری *Phytophthora capsici*

Table 1. The list of used pepper genotypes including genotype number, registered name, company, and reaction to *Phytophthora capsici*.

| S/No | ردیف | مشخصات Genotype | شماره نژادگان Properties No. | شرکت Company | نام مشخصه رقم Genotype registered name | واکنش به بوته‌میری Reaction to <i>P. capsici</i> |
|------|------|---|-------------------------------------|-----------------|--|---|
| 1 | 18 | Zinetti - Makhrooti - Benfesh - Aitaliabi | Ornamental-Conical-Purple- Italian | PBI | 18OrnP-ConPurItaly | PS |
| 2 | 8 | Zinetti - Aryan - کد ۶۵۷ | - | - | 8OrnP-IR657 | PR |
| 3 | 30 | Zinetti - F2 - Alwan - هلندی | Ornamental-F2-Alvan-Dutch | PBI | 30OrnP-F2NethAlv | PR |
| 4 | 14 | Zinetti | Ornamental | PBI | 14OrnP-PBI | PS |
| 5 | 19 | Zinetti | Ornamental | PBI | 19OrnP-PBI | R |
| 6 | 16 | Zinetti | Ornamental | PBI | 16OrnP-PBI | PR |
| 7 | 21 | - Zinetti - موزی شکل | Ornamental-Banana-shaped | - | 21OrnP-Banana | PS |
| 8 | 32 | - Zinetti - چینی | Ornamental-Chinese | - | 32OrnP-China | R |
| 9 | 17 | Zinetti - Makhrooti - Benfesh - Amerikabi | Ornamental-Conical-Purple- American | PBI | 17OrnP-ConPurUSA | PS |
| 10 | 1 | Zinetti - F2 - Magarstani | Ornamental-F2-Hungry | PBI | 1OrnP-F2Hun | PS |

جدول ۱ - ادامه...

Table 1. Continued...

| S/No | ردیف Genotype No. | مشخصات Properties | شرکت Company | نام مشخصه رقم Genotype registered name | واکنش به بوته‌میری Reaction to <i>P. capsici</i> |
|------|-------------------------|--|-----------------|--|---|
| 11 | 35 | بلوکی- زرد- باچاتا Blocky-Yellow-Bachata | - | 35BlockyP-YBachata | PS |
| 12 | 3 | بلوکی- فرمز- زامبونی Blocky-Red-Zambuni | - | 3BlockyP-RZam | PS |
| 13 | 7 | بلوکی- قرمز- هورا Blocky-Red-HoraRZ | SeR | 7BlockyP-RHoraRZ | PS |
| 14 | 11 | RZ بلوکی- زرد- تورانتو Blocky-Yellow-TorontoRZ | SeR | 11BlockyP-YToran | R |
| 15 | 34 | بلوکی- لیریکا Blocky-Lirika | - | 34BlockyP-Lirika | PS |
| 16 | 15 | گیلاسی- شرین Cherry-Sweet | - | 15SweetP-cherry | PR |
| 17 | 23 | گیلاسی- اورشلیم Cherry-Jerusalem | - | 23CherryP-Orsh | R |
| 18 | 12 | زرد- بیلا Yellow-Billa | Syngenta | 12YP-Billa | PS |
| 19 | 31 | نارنجی- آرانکیا Orange-Arankia | - | 31OrP-Arankia | S |
| 20 | 36 | نارنجی- پارامو Orange-Paramo | Siminis | 36OrP-Paramo | PS |
| 21 | 20 | سبز Green | PBI | 20GreenP-PBI | PS |
| 22 | 13 | کشیده- رویان Long-Royan | - | 13LongP-Royan | PS |
| 23 | 25 | کشیده- کوچک Long-Small | - | 25LongP-Small | PS |
| 24 | 9 | کشیده- مخروطی- سبز کمرنگ- سیرنا Long-Conical-Pale Green-Sirna | PBI | 9LongConicP-Gsirna | S |
| 25 | 27 | تند- فوگو Chili-Fogo | - | 27ChilP-Fogo | PS |
| 26 | 37 | تند- پائو Chili-Paleo | EWSI | 37ChilP-Paleo | R |
| 27 | 33 | شمშیری- شرین Gladiate-Sweet | ES | 33GladiateP | S |
| 28 | 10 | سبز- شرین- گانگا Green-Sweet-Ganga | EWSI | 10SweetP-Ganga | S |
| 29 | 2 | دلمه‌ای Bell Pepper | PBI | 2BP-PBI | S |
| 30 | 4 | دلمه‌ای Bell Pepper | ES | 4BP-12-Eastern | PS |
| 31 | 5 | دلمه‌ای- بونanza Bell Pepper-Bonanza | - | 5BP-Bonanza | PS |
| 32 | 6 | دلمه‌ای Bell Pepper | SuS | 6BP-Sums | PS |

جدول ۱- ادامه...

Table 1. Continued...

| S/No | ردیف Genotype No. | مشخصات Properties | شماره نژادگان Genotype No. | شرکت Company | نام مشخصه رقم Genotype registered name | واکنش به بوته‌میری Reaction to <i>P. capsici</i> |
|------|-------------------------|---|----------------------------------|-----------------|--|---|
| 33 | 22 | دلمه‌ای-زرد-دورگه-دری | - | 22BP-YDerby | PS | |
| 34 | 24 | Bell Pepper-Yellow-Hybrid-Derby دلمه‌ای ۳۰۱ | - | 24BP-301 | S | |
| 35 | 26 | Bell Pepper-301 دلمه‌ای-قرمز-دورگه-استارلت | - | 26BP-RStarlet | S | |
| 36 | 28 | Bell Pepper-Red-Hybrid-Starlet RnineRhzne دلمه‌ای- | - | 28BP-RnineR | S | |
| 37 | 29 | Bell Pepper-Rnine Rhzne دلمه‌ای 60D | - | 29BP-60D | PS | |
| | | Bell Pepper-60D | | | | |

: شرکت پاکان بذر، SeR: شرکت سپاهان رویش، EWSI: شرکت بین‌المللی بذر شرق غرب، ES: شرکت بذر شرقی، SuS: شرکت بذر سامس، R: محمل، S: حساس، PR: نیمه محمل، PS: نیمه حساس.

PBI: Pakan Bazar-e-Isfahan Co., SeR: Sepahan Ruyesh Co., EWSI: East West Seed International Co., ES: Eastern Seed Co., SuS: Sums Seed Co., R: Resistant, S: Susceptible, PR: Partially Resistant, PS: Partially Susceptible.

نمونه‌گیری از برگ‌های جوان گیاهان یکماهه در نوک گیاه پیش از گلدهی و استخراج آن‌ها براساس روش CTAB انجام شد (۱۹). برای سنجش کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب از دستگاه‌های نانودرآپ (کمپانی TBE ۱X Thermo T, Scientific کشور آمریکا) و الکتروفورز افقی (شرکت ارکا طب روهام، کشور ایران) با ۷٪ و بافر ۰.۱٪ استفاده شد. غلظت نهایی DNA استخراج شده برای انجام PCR، ۴۰ نانوگرم بود (۲۴).

جدول ۲- آغازگرهای ISSR مورد استفاده جهت بررسی گوناگونی ژنتیکی نژادگان‌های فلفل شامل نام آغازگر، توالی آغازگر و دمای اتصال.

Table 2. ISSR primers used for genetic diversity assessment of pepper genotypes, including the primer names, primers sequence, and annealing temperature.

| S/No. | ردیف Primer name | نام آغازگر Primer sequence | توالی آغازگر Primers sequence | دمای اتصال Annealing temperature (°C) |
|-------|---------------------|---------------------------------------|---|--|
| 1 | MBP-1 | 5'-CG AAAAAAA-3' | 5'-CG AAAAAAA-3' | 50 |
| 2 | MBP-2 | 5'-GAC GAC GAC GC-3' | 5'-GAC GAC GAC GC-3' | 44 |
| 3 | MBP-3 | 5'-CTC CTC CTC GC-3' | 5'-CTC CTC CTC GC-3' | 44 |
| 4 | MBP-4 | 5'-GTG GTG GTG GC-3' | 5'-GTG GTG GTG GC-3' | 44 |
| 5 | MBP-6 | 5'-GACA GACA GACA-3' | 5'-GACA GACA GACA-3' | 50 |
| 6 | MBP-7 | 5'-CA CA CA CA CA AG-3' | 5'-CA CA CA CA CA AG-3' | 45 |
| 7 | MBP-8 | 5'-GT GT GT GT GT GT GG-3' | 5'-GT GT GT GT GT GT GG-3' | 45 |
| 8 | MBP-9 | 5'-GT GT GT GT GT GT CC-3' | 5'-GT GT GT GT GT GT CC-3' | 42 |
| 9 | MBP-10 | 5'-GTG GTG GTG GTG RC-3' | 5'-GTG GTG GTG GTG RC-3' | 50 |
| 10 | MBP-11 | 5'-GC GC CGC CGC CGC C-3' | 5'-GC GC CGC CGC CGC C-3' | 50 |
| 11 | MBP-12 | 5'-TACA GCA GCA GCA G-3' | 5'-TACA GCA GCA GCA G-3' | 50 |
| 12 | MBP-13 | 5'-GA GA GA GA GA GA GG-3' | 5'-GA GA GA GA GA GA GG-3' | 44 |
| 13 | MBP-14 | 5'-GA GA GA GA GA GA CC-3' | 5'-GA GA GA GA GA GA CC-3' | 44 |
| 14 | MBP-15 | 5'-GACA GACA GACA GC-3' | 5'-GACA GACA GACA GC-3' | 50 |
| 15 | MBP-16 | 5'-AGTG AGTG AGTG GG-3' | 5'-AGTG AGTG AGTG GG-3' | 50 |
| 16 | MBP-17 | 5'-GT GT GT GT GT GT GT YG-3' | 5'-GT GT GT GT GT GT GT YG-3' | 50 |
| 17 | MBP-18 | 5'-CTC GT GT GT GT GT GT GT-3' | 5'-CTC GT GT GT GT GT GT GT-3' | 47 |
| 18 | MBP-19 | 5'-GT GT GT GT GT GT GT CTC-3' | 5'-GT GT GT GT GT GT GT CTC-3' | 50 |
| 19 | MBP-20 | 5'-CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA-3' | 5'-CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA-3' | 47 |
| 20 | MBP-21 | 5'-CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA-3' | 5'-CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA-3' | 50 |

Y: Pyrimidine, R: Purin.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد (۲۴) و برای دمای اتصال از داده‌های جدول ۲ برای هر آغازگر استفاده شد. پس از انجام PCR برای هر آغازگر، محصول PCR روی ژل آگارز ۲% بارگذاری و قطعه‌های تکثیرشده از هم جداسازی شدند.

نمونه‌گیری از برگ‌های جوان گیاهان یکماهه در نوک گیاه پیش از گلدھی و استخراج DNA آن‌ها براساس روش CTAB انجام شد (۱۹). برای سنجش کمیت و کیفیت DNA استخراج شده بهترین از دستگاه‌های نانودراب (کمپانی Thermo T, Scientific کشور آمریکا) و الکتروفوروز افقی (شرکت ارکا طب روهام، کشور ایران) با ژل ۱% و بافر TBE ۱X استفاده شد. غلظت نهایی DNA استخراج شده برای انجام PCR، ۴۰ نانوگرم بود (۲۴). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) انجام شد (۲۴) و برای دمای اتصال از داده‌های جدول ۲ برای هر آغازگر استفاده شد. پس از انجام PCR برای هر آغازگر، محصول PCR روی ژل آگارز ۲% بارگذاری و قطعه‌های تکثیرشده از هم جداسازی شدند.

جدول ۲- آغازگرهای ISSR مورد استفاده جهت بررسی گوناگونی ژنتیکی نژادگان‌های فلفل شامل نام آغازگر، توالی آغازگر و دمای اتصال.

Table 2. ISSR primers used for genetic diversity assessment of pepper genotypes, including the primer names, primers sequence, and annealing temperature.

| S/No. | Primer name | نام آغازگر ردیف | توالی آغازگر Primers sequence | دمای اتصال Annealing temperature (°C) |
|-------|-------------|--------------------|-----------------------------------|--|
| 1 | MBP-1 | | 5'-CG AAAAAAA-3' | 50 |
| 2 | MBP-2 | | 5'-GAC GAC GAC GC-3' | 44 |
| 3 | MBP-3 | | 5'-CTC CTC CTC GC-3' | 44 |
| 4 | MBP-4 | | 5'-GTG GTG GTG GC-3' | 44 |
| 5 | MBP-6 | | 5'-GACA GACA GACA-3' | 50 |
| 6 | MBP-7 | | 5'-CA CA CA CA CA CA AG-3' | 45 |
| 7 | MBP-8 | | 5'-GT GT GT GT GT GT GG-3' | 45 |
| 8 | MBP-9 | | 5'-GT GT GT GT GT GT CC-3' | 42 |
| 9 | MBP-10 | | 5'-GTG GTG GTG GTG RC-3' | 50 |
| 10 | MBP-11 | | 5'-GC GC CGC CGC CGC C-3' | 50 |
| 11 | MBP-12 | | 5'-TACA GCA GCA GCA G-3' | 50 |
| 12 | MBP-13 | | 5'-GA GA GA GA GA GA GG-3' | 44 |
| 13 | MBP-14 | | 5'-GA GA GA GA GA GA CC-3' | 44 |
| 14 | MBP-15 | | 5'-GACA GACA GACA GC-3' | 50 |
| 15 | MBP-16 | | 5'-AGTG AGTG AGTG GG-3' | 50 |
| 16 | MBP-17 | | 5'-GT GT GT GT GT GT GT YG-3' | 50 |
| 17 | MBP-18 | | 5'-CTC GT GT GT GT GT GT GT-3' | 47 |
| 18 | MBP-19 | | 5'-GT GT GT GT GT GT GT CTC-3' | 50 |
| 19 | MBP-20 | | 5'-CCA CCA CCA CCA CCA CCA CCA-3' | 47 |
| 20 | MBP-21 | | 5'-CGA CGA CGA CGA CGA CGA CGA-3' | 50 |

Y: Pyrimidine, R: Purin.

پس از امتیازبندی باندهای به دست آمده از الکتروفورز، با استفاده از نرمافزار NTSYS گروه‌بندی نژادگان‌های بررسی شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی امتیازبندی، خوشبندی و مقایسه میانگین شد و رابطه آن با نتیجه‌های مولکولی مقایسه شد (۲۴). همبستگی بین ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی با استفاده از ضرایب تشابه به دست آمد و به کارگیری نرمافزار SPSS 16.0 بررسی شد. ویژگی‌های مربوط به رشد رویشی و عملکرد در قالب به‌طور کامل تصادفی تجزیه و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD انجام و برای تجزیه داده‌ها از نرمافزار SAS 9.1 استفاده شد.

جدول ۳- گروه‌بندی نژادگان‌های به دست آمده از مقایسه میانگین ویژگی‌های ریخت‌شناسی.

Table 3. Grouping of genotypes resulted from mean comparison of morphological traits.

| ردیف S/No. | Morphological trait | ویژگی ریخت‌شناسی | شماره گروه Group number [†] | وضعیت گروه Group situation |
|---------------|---------------------|------------------------------------|---|-------------------------------|
| 1 | | عادت رشد گیاه | 1 | a |
| 2 | | ارتفاع ساقه | 16 | a-p |
| 3 | | رنگدانه آنتوسیانین گره | 2 | a-b |
| 4 | | Node anthocyanin pigment intensity | 5 | a-e |
| 5 | | کرکدار بودن گره | 3 | a-c |
| 6 | | طول پهنهک | 13 | a-m |
| 7 | | عرض پهنهک | 12 | a-l |
| 8 | | نسبت طول به عرض پهنهک | 3 | a-c |
| 9 | | Leaf green color intensity | 4 | a-d |
| 10 | | براق بودن برگ | 4 | a-d |
| 11 | | وضعیت دمگل | 2 | a-b |
| 12 | | unripe fruit color | 3 | a-c |
| 13 | | وضعیت میوه | 2 | a-b |
| 14 | | طول میوه | 11 | a-k |
| 15 | | قطر میوه | 8 | a-h |
| 16 | | نسبت طول به قطر میوه | 7 | a-g |
| 17 | | شكل میوه در برش طولی | 5 | a-e |
| 18 | | شكل میوه در برش عرضی | 2 | a-b |
| 19 | | Exocarp wavy in fruit base | 3 | a-c |
| 20 | | Exocarp wavy except in fruit base | 3 | a-c |
| 21 | | سطح میوه | 1 | a |
| 22 | | Ripened fruit color | 3 | a-c |
| 23 | | Hollow in fruit base | 2 | a-b |
| 24 | | حفره در قاعده میوه | 3 | a-c |
| 25 | | عمق حفره | 4 | a-d |
| 26 | | شکل نوک میوه | 12 | a-l |
| 27 | | Fruit tip shape | 1 | a |
| | | Fruit tail length | | |
| | | وضعیت کاسه‌گل | | |

منبع (۵)

+ ویژگی ریخت‌شناسی با شمار گروه‌بندی بیشتر، گوناگونی بیشتری بین نژادگان‌های مورد بررسی نشان داد.

[†]Morphological trait with more group number, showed more diversity between the evaluated genotypes.

نتایج

نژادگان‌های مورد بررسی، براساس آزمایش‌های مایه‌زنی در چهار گروه متتحمل، نیمه‌متتحمل، نیمه‌حساس و حساس گروه‌بندی شدند. بر این اساس، نژادگان‌های ۱۱، ۱۹، ۲۳، ۳۲ و ۳۷ متتحمل، نژادگان‌های ۸، ۱۵، ۱۶ و ۳۰ نیمه‌متتحمل، نژادگان‌های ۱، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۷، ۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۵، ۲۷، ۲۹ و ۳۶ نیمه‌حساس و نژادگان‌های ۲، ۹، ۱۰، ۲۴، ۲۶، ۳۸، ۳۱ و ۳۳ حساس بودند (جدول ۱).

نتیجه‌های تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از بررسی ۲۷ ویژگی ریخت‌شناسی نشان داد که در همه ویژگی‌های مورد بررسی (به جز عادت رشد بوته، نسبت طول به عرض پهنهک برگ و سطح میوه) اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ بین نژادگان‌های مورد بررسی دیده شد (نتیجه‌ها نمایش داده نشده است). بیشترین گوناگونی بهتر ترتیب در ویژگی‌های طول ساقه، طول پهنهک، طول دم میوه، عرض پهنهک، طول و قطر میوه، نسبت طول به قطر میوه، شکل میوه در برش طولی و شدت

رنگدانه آنتوسيانین گره دیده شد. همان طور که در جدول ۳ دیده می‌شود، در ویژگی‌های امتيازدهی، نژادگان‌ها به چند گروه محدود تقسیم‌بندی شدند ولی در ویژگی‌های اندازه‌گیری شده، گروه‌بندی‌ها متعدد بود. بیشترین گروه‌بندی در ویژگی‌های طول ساقه، طول و عرض پهنهک، طول دم میوه، طول میوه، قطر میوه و نسبت طول به قطر میوه دیده شد ($P<0.01$).

برای گروه‌بندی نژادگان‌ها بر اساس تبدیل داده‌های ریخت‌شناسی به صفر و یک، از ضرایب تشابه تطابق ساده، جاکارد و دایس برای برآورد فاصله ژنتیکی استفاده شد. پس از رسم دندروگرام با هر یک از ضرایب گفته شده، ضرایب کوفنتیک (همبستگی بین ماتریس تشابه و دندروگرام به دست آمده) در نرم‌افزار NTSYS محاسبه شد. بر این اساس ضرایب تشابه جاکارد به عنوان بهترین ضرایب تشابه و الگوریتم UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) برای ریخت‌شناسی (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) انتخاب شد. بر اساس دندروگرام نمایش داده شده در شکل ۱، نژادگان‌ها به پنج گروه تقسیم‌بندی شدند:

گروه اول: نژادگان‌های ۲۴ و ۳۶ که هر دو فلفل دلمه‌ای یکی سبز و دیگری نارنجی بودند با ضرایب تشابه ۰/۴۵ و ۰/۴۰ در یک گروه قرار گرفتند. گروه دوم: نژادگان‌های ۲، ۱۰، ۳، ۱۰، ۵، ۲۶، ۵، ۲۸، ۱۲، ۶، ۲۶، ۳۱، ۹، ۱۵، ۷، ۲۸، ۳۴ و ۲۲ که از رقم‌های مختلف دلمه‌ای و قلمی و بلوكی بودند با هم در یک گروه فرعی قرار گرفته و ضرایب تشابه آن‌ها بین ۰/۵۰ تا ۰/۷۴ بود. گروه سوم: نژادگان‌های ۲۵ و ۲۹ و ۳۳ در یک گروه قرار داشتند و ضرایب تشابه آن‌ها بین ۰/۴۶ تا ۰/۵۰ بود. گروه چهارم: نژادگان‌های ۱۳، ۲۰، ۳۷، ۲۷ و ۲۱ در یک گروه قرار داشتند و ضرایب تشابه آن‌ها بین ۰/۴۶ تا ۰/۵۷ بود. گروه پنجم: ۱۳ نژادگان باقی‌مانده در یک گروه قرار داشتند و ضرایب تشابه آن‌ها بین ۰/۴۷ تا ۰/۹۳ بود (شکل ۱).

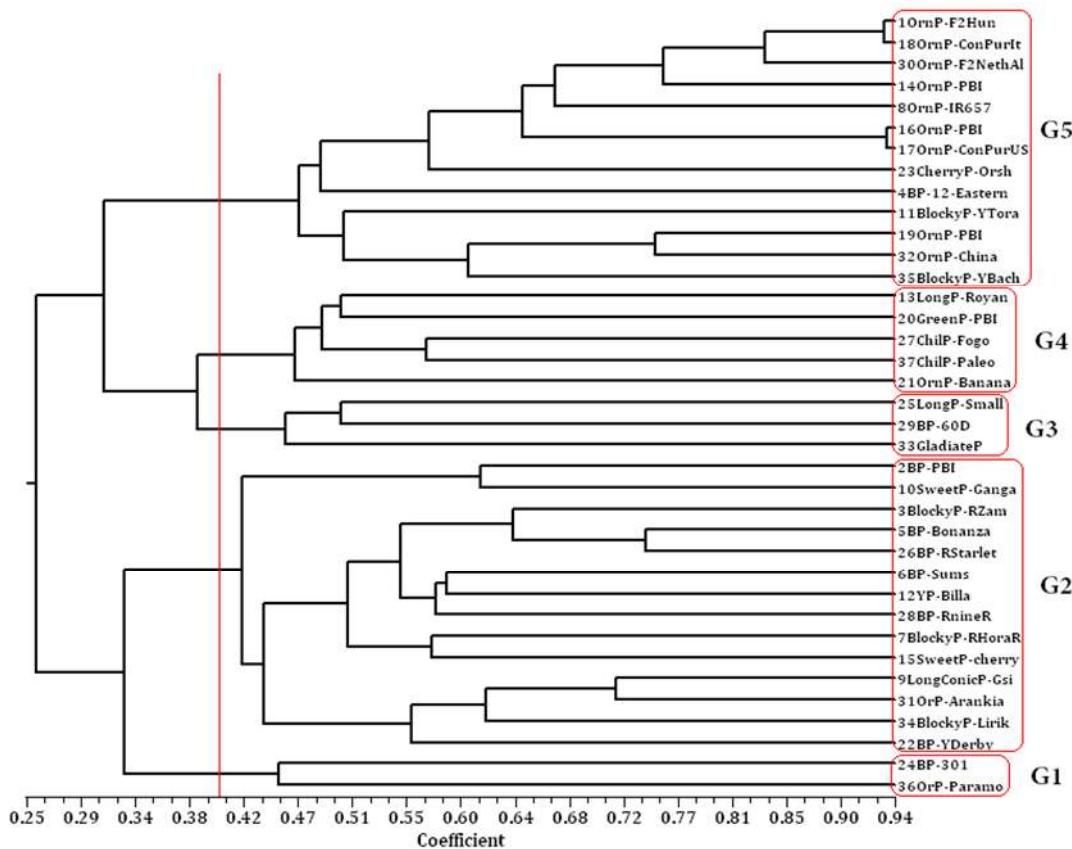


Fig. 1. Cluster analysis obtained from morphological characteristics of 37 tolerance and susceptible to *Phytophthora capsici* genotypes of pepper.

شکل ۱- تجزیه خوشای بدهست آمده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی در ۳۷ نژادگان فلفل متتحمل و حساس به بوته‌میری.

نتیجه‌های تجزیه نشانگرهای ISSR نشان داد ۱۹ آغازگر از ۲۱ آغازگر مورد استفاده در این آزمایش، الگوی نواری مشخص داشتند (شکل ۲) که در مجموع ۱۸۸ نوار نمره‌دهی شد که ۱۸۵ نوار چندشکل بودند. شمار نوارها از ۴ نوار برای آغازگرهای MBP-15 و ۱۹ MBP-18 تا نوار برای آغازگر MBP-21 متغیر بود که نشان‌دهنده توانایی این آغازگرهای در جداسازی نژادگان‌ها بود. درصد چندشکلی از ۷۸٪ برای آغازگر MBP-10 با کمترین درصد چندشکلی تا ۱۰۰ درصد برای آغازگر ۱۷ به کاررفته با بیشترین درصد چندشکلی متغیر بود و میانگین چندشکلی ۹۸/۵ درصد محاسبه شد (جدول ۴).

میزان شاخص نشانگری (MI)، بین ۰/۰۰ تا ۶/۶۱ متغیر بود و آغازگر ۲۱ MBP با ۶/۶۱ واحد، دارای بیشترین شاخص نشانگری بود که نشان از کارایی بالای این آغازگر در بروز چندشکلی نژادگان‌های مورد مطالعه در این پژوهش بود. میانگین محتوای داده‌های چندشکلی (PIC) ۰/۴۴۹ بود. بیشترین محتوای داده‌های چندشکلی در آغازگرهای MBP-8 و MBP-15 و MBP-19 (۰/۴۹۹) و کمترین آن در آغازگر MBP-16 (۰/۳۵۵) دیده شد. بنابراین، آغازگرهای MBP-8 و MBP-15 و MBP-19 با بیشترین مقدار PIC، بهتر از بقیه آغازگرها توانستند فاصله ژنتیکی نژادگان‌های مورد مطالعه را مشخص کنند (جدول ۴). برای گروه‌بندی نژادگان‌ها 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 گفته شده، ضریب کوفنتیک محاسبه شد که بر این اساس ضریب تشابه جاکارد به عنوان بهترین ضریب تشابه و الگوریتم UPGMA به عنوان بهترین الگوریتم خوشبندی بر مبنای نشانگرهای ISSR مورد استناد قرار گرفتند. بر اساس ماتریس تشابه مولکولی، ضرایب تشابه بین نژادگان‌های مورد بررسی بین ۰/۳۱ تا ۰/۹۲ متغیر بود. در این رابطه، بیشترین ضریب تشابه بین نژادگان‌های ۲۰ و ۲۱ به ترتیب فلفل سبز و فلفل زینتی موزی (۰/۹۲) دیده شد (شکل ۳).

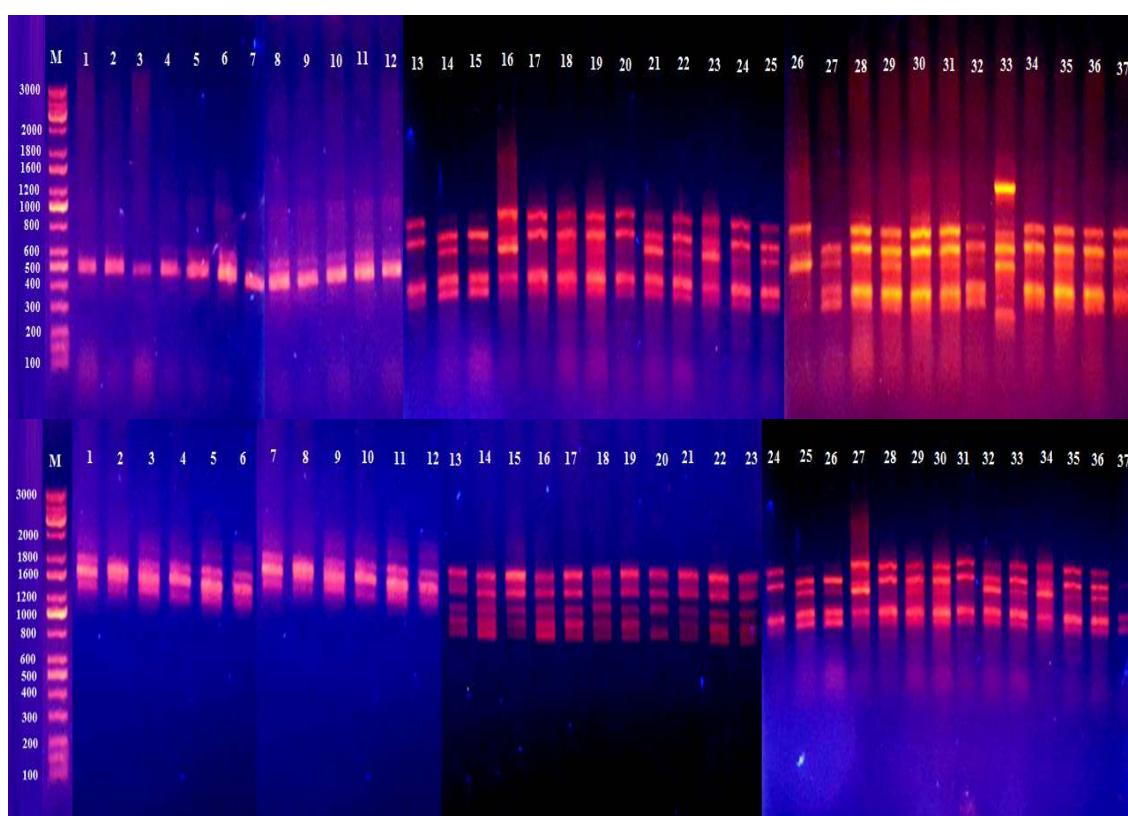


Fig. 2. Banding pattern resulted from LMB-20 (above) and LMB-15 (below) primers. M: Size Marker (100-3000 bp); Lane 1-37: the studied pepper genotypes according to Table 1.

شکل ۲ - الگوی نواری به دست آمده از آغازگرهای LMB-20 و LMB-15 (بالا) و LMB-15 (پایین). M: سایز نشانگر ۱۰۰-۳۰۰۰ جفت‌باز، چاهک‌های ۱ تا ۳۷: نمونه نژادگان‌های مورد بررسی براساس جدول ۱.

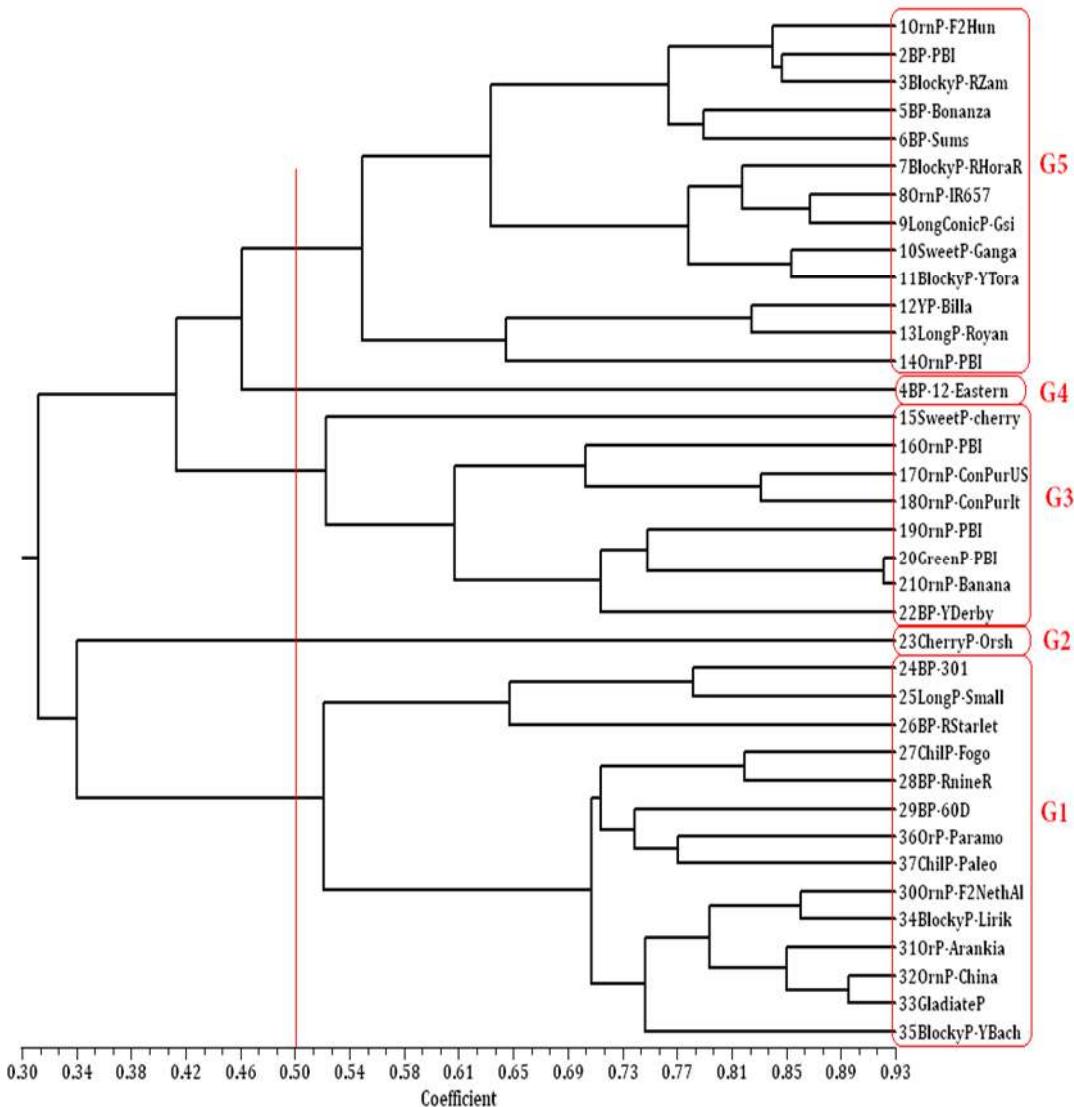


Fig 3. Cluster analysis obtained from polymorphism pattern of 37 tolerance and susceptible pepper genotypes to *Phytophthora capsici* by ISSR markers using NTSYS software and UPGMA algorithm and Jaccard similarity coefficient.

شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای به دست آمده از الگوی چندشکلی ۳۷ نژادگان فلفل متحمل و حساس به بوته‌میری با استفاده از نشانگرهای NTSYS نرم‌افزار، الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه جاکار.

بر اساس دندروگرام شکل ۳، نژادگان‌ها به پنج گروه تقسیم‌بندی شدند: گروه اول: نژادگان‌های ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳، ۳۴، ۳۵ که هر دو گروه فلفل خوراکی و زینتی با ضریب تشابه آن با بقیه نژادگان‌ها ۰/۹۰ تا ۰/۹۰۰ در یک گروه قرار گرفتند. گروه دوم: نژادگان کد ۲۳ به تنها‌یی در این گروه قرار داشت و ضریب تشابه آن با بقیه نژادگان‌ها ۰/۳۱ تا ۰/۳۴ بود. گروه سوم: نژادگان‌های ۱۵، ۱۶، ۱۷، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲ در یک گروه قرار داشتند و ضریب تشابه آن‌ها بین ۰/۹۲ تا ۰/۹۳ بود. گروه چهارم: نژادگان کد ۴ به تنها‌یی در یک گروه قرار داشت و ضریب تشابه آن با بقیه نژادگان‌ها بین ۰/۴۶ تا ۰/۴۷ بود. گروه پنجم: نژادگان‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ در یک گروه قرار داشتند و ضریب تشابه آن‌ها بین ۰/۸۷ تا ۰/۹۴ بود (شکل ۳).

جدول ۴- آماره‌های گوناگونی ژنتیکی نشانگرهای ISSR در نژادگان‌های فلفل با استفاده از ۱۹ آغازگر.

Table 4. Genetic diversity statistics of ISSR markers in pepper genotypes using 19 primers.

| ردیف S/No. | کد آغازگر Primer code | شمار کل باند TBN | شمار نوار چندشکل PBN | درصد چندشکل P % | محتوای داده‌های چندشکلی PIC | شاخص نشانگری MI |
|---------------|--------------------------|---------------------|----------------------------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------|
| 1 | MBP-2 | 10 | 10 | 100 | 0.413 | 4.13 |
| 2 | MBP-3 | 6 | 6 | 100 | 0.479 | 2.87 |
| 3 | MBP-4 | 10 | 10 | 100 | 0.498 | 4.98 |
| 4 | MBP-6 | 11 | 11 | 100 | 0.469 | 5.16 |
| 5 | MBP-7 | 11 | 11 | 100 | 0.412 | 4.53 |
| 6 | MBP-8 | 10 | 10 | 100 | 0.499 | 4.99 |
| 7 | MBP-9 | 10 | 10 | 100 | 0.446 | 4.46 |
| 8 | MBP-10 | 9 | 7 | 78 | 0.482 | 3.37 |
| 9 | MBP-11 | 14 | 13 | 93 | 0.458 | 5.95 |
| 10 | MBP-12 | 11 | 11 | 100 | 0.406 | 4.47 |
| 11 | MBP-13 | 9 | 9 | 100 | 0.440 | 3.96 |
| 12 | MBP-14 | 8 | 8 | 100 | 0.431 | 3.45 |
| 13 | MBP-15 | 4 | 4 | 100 | 0.499 | 2.00 |
| 14 | MBP-16 | 13 | 13 | 100 | 0.355 | 4.62 |
| 15 | MBP-17 | 10 | 10 | 100 | 0.454 | 4.54 |
| 16 | MBP-18 | 12 | 12 | 100 | 0.496 | 5.95 |
| 17 | MBP-19 | 4 | 4 | 100 | 0.499 | 2.00 |
| 18 | MBP-20 | 8 | 8 | 100 | 0.427 | 3.42 |
| 19 | MBP-21 | 18 | 18 | 100 | 0.367 | 6.61 |
| میانگین | | 9.9 | 9.7 | 98.5 | 0.449 | 4.29 |
| کل | | 188 | 185 | - | - | - |

TBN: Total Band Number, PBN: Polymorphic Band Number, P%: Polymorphism Percent, PIC: Polymorphism Information Content, MI: Marker Index.

نتایج‌های به دست آمده از آزمون تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز تا حد زیادی همسو با نتایج‌های به دست آمده از نشانگرهای ISSR بود و نژادگان‌های مورد بررسی به پنج گروه دسته‌بندی شدند (شکل ۴). هیچ رابطه معنی‌داری بین نشانگرهای ریخت‌شناسی و مولکولی در این پژوهش دیده نشد ($r=0.020^{ns}$).

در گروه‌بندی نژادگان‌ها براساس تلفیق داده‌های ریخت‌شناسی، مولکولی و واکنش به بیماری بوته‌میری ناشی از قارچ *Phytophthora capsici*، دندروگرام نمایش داده شده در شکل ۵ به دست آمد. طبق این دندروگرام، نژادگان‌ها در سه گروه اصلی قرار گرفتند. در گروه اول، همه نژادگان‌های متتحمل و نیمه‌متتحمل، در گروه دوم همه نژادگان‌های حساس و در گروه سوم همه نژادگان‌های نیمه‌حساس قرار گرفتند. حضور نژادگان متتحمل کد ۳۷ در گروه نیمه‌حساس‌ها نشان داد که این نژادگان با وجود تفاوت در واکنش به بیماری بوته‌میری نسبت به بقیه هم‌گروه‌های خود، از نظر ژنتیکی و ریخت‌شناسی شباهت‌های بسیار زیادی به نژادگان‌های نیمه‌حساس داشت (شکل ۵).

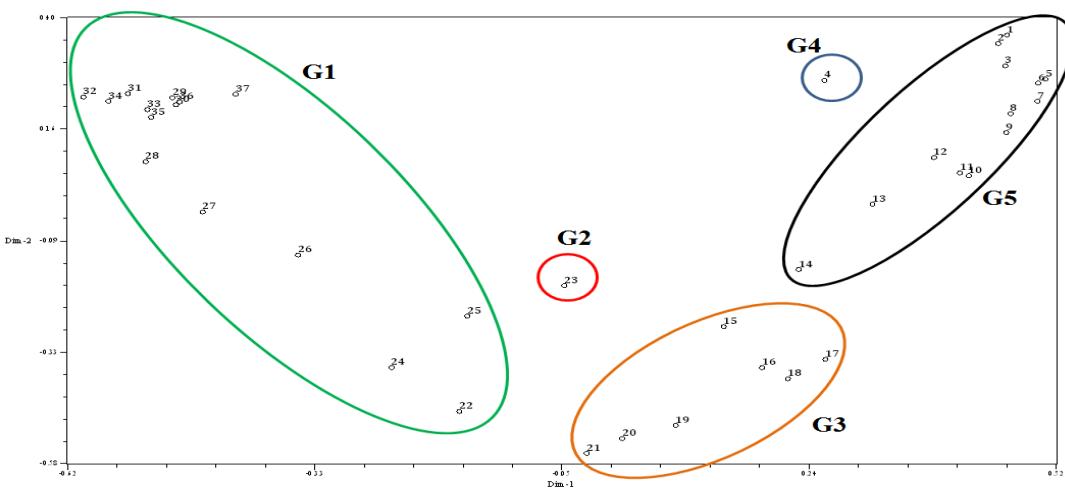


Fig. 4. Two-dimensional diagram for principal coordinate analysis in pepper genotypes using ISSR markers. G1, G2, G3, G4 and G5: Genotype grouping.

شکل ۴- دیاگرام به دست آمده از تجزیه به مولفه های اصلی در نژادگان های فلفل با استفاده از نشانگرهای ISSR (G1 تا G5): گروه بندی نژادگان ها).

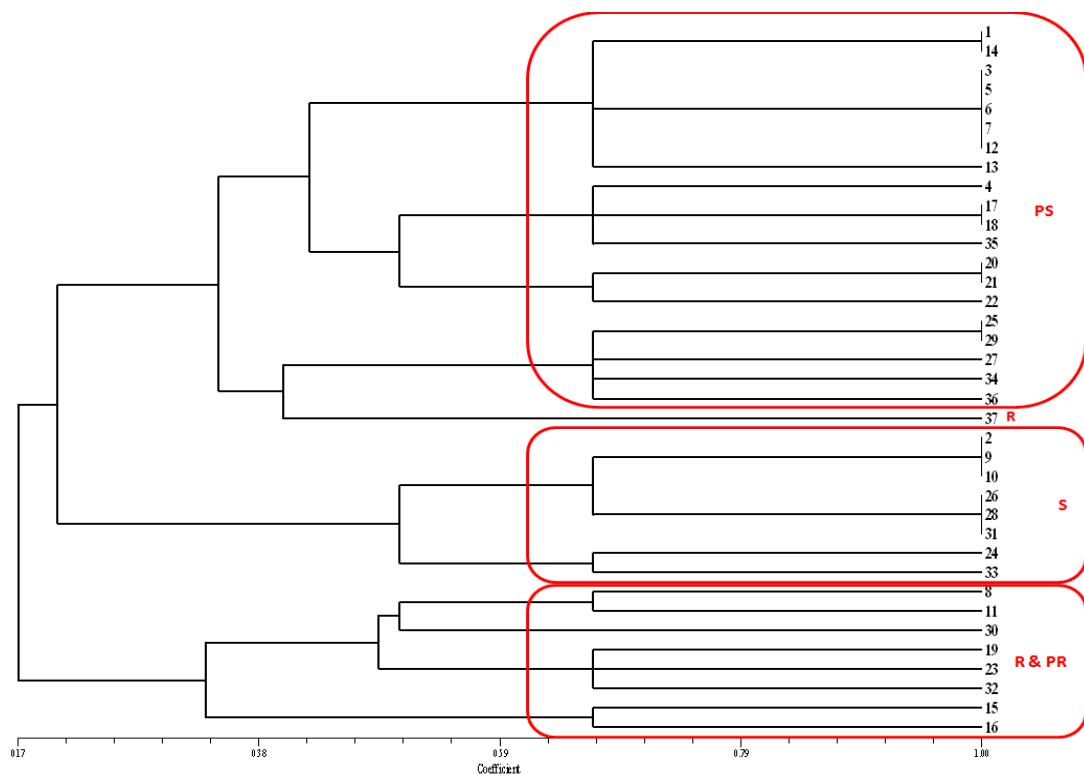


Fig. 5. Dendrogram designed for 37 ornamental and edible pepper genotypes using combined data from ISSR and morphological markers as well as grouping based on tolerance to *Phytophthora capsici* based on UPGMA algorithm and Dice similarity coefficient. R: Resistant, S: Susceptible, PR: Partially Resistant, PS: Partially Susceptible.

شکل ۵- دندروگرام طراحی شده برای ۳۷ نژادگان زینتی و خوراکی فلفل با ترکیب داده های به دست آمده از نشانگرهای ریخت شناسی و ISSR و همچنین گروه بندی براساس تحمل به بوته میری با استفاده از الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه دایس (R: متحمل، S: حساس، PR: نیمه متحمل، PS: نیمه حساس).

بحث

در بین ویژگی‌های ریخت‌شناسی مورد بررسی، برخی ویژگی‌ها بیشترین گوناگونی را در بین نژادگان‌ها نمایان کردند که از آن جمله می‌توان به ویژگی‌های طول ساقه، طول پهنهک، طول دم میوه، عرض پهنهک، طول و قطر میوه، نسبت طول به قطر میوه، شکل میوه در برش طولی و شدت رنگدانه آنتوسیانین گره اشاره کرد. شاخص شکل پهنهک از جمله ویژگی‌هایی بود که گوناگونی چشمگیری در بین نژادگان‌ها نشان نداد. در گزارشی، Dias و همکاران (۸) نیز بیان نمود که در استفاده از شاخص شکل برگ جداسازی چشمگیری بین نژادگان‌های فلفل مشاهده نشد.

نژادگان‌ها از نقطه نظر رنگ و شکل میوه به ۲ تا ۷ گروه تقسیم شدند. فلفل‌ها گوناگونی زیادی در رنگ و شکل میوه از خود نشان می‌دهند (۱۶). در بررسی گوناگونی بین گونه‌ها و رقم‌های فلفل، گوناگونی زیادی از نظر رنگ و شکل بین آن‌ها دیده شد (۸). با این حال، گزارش شده است که همپوشانی نزدیکی بین ویژگی‌های ریخت‌شناسی گونه‌های مختلف فلفل وجود دارد که منجر به شناسایی آن‌ها به عنوان یک گونه مرکب توسط پژوهشگران شده است (۲۵). Albrecht و همکاران (۴) گزارش کردند در بین ۴۰ ویژگی ریخت‌شناسی مورد بررسی، ویژگی‌های قطر میوه و طول دم میوه بیشترین سهم را در جداسازی بین نژادگان‌های وحشی و اهلی شده فلفل داشتند که با نتایج پژوهش حاضر نیز نژادگان‌های مورد بررسی از نظر قطر میوه و طول دم میوه به ترتیب به ۸ و ۱۲ گروه تقسیم‌بندی شدند. گوناگونی زیاد قابل دیدن در بین نژادگان‌های مورد بررسی از نظر ارتفاع بوته در پژوهش حاضر با یافته‌های Hasan و همکاران (۱۱) همخوانی داشت. آن‌ها نیز در بررسی گوناگونی ژنتیکی برخی نژادگان‌های فلفل تند، بیشترین واگرایی را در ویژگی ارتفاع بوته دیدند.

گوناگونی بالای دیده شده در طول و قطر میوه و شاخص شکل میوه در پژوهش حاضر با یافته‌های Cebula و همکاران (۶) روی رقم‌های مختلف فلفل شیرین مطابقت دارد. در بررسی گوناگونی ریخت‌شناسی نژادگان‌های مختلف فلفل در مکریک گزارش شد در ویژگی‌های طول و قطر و شاخص شکل میوه، طول و عرض برگ، ارتفاع بوته و تراکم شاخصاره بیشترین گوناگونی بین نژادگان‌ها دیده شد (۲۴). این نتیجه‌ها با یافته‌های به دست آمده در پژوهش حاضر همخوانی دارد بهطوری که در پژوهش حاضر نیز گوناگونی بالایی در ویژگی‌های یاد شده بین نژادگان‌های مورد بررسی دیده شد. گزارش شده است که موقعیت گل، وضعیت کلاله، رنگ میوه رسیده، میزان تندی، ارتفاع بوته و شکل میوه از مهم‌ترین ویژگی‌هایی هستند که بیشترین گوناگونی را بین نژادگان‌های فلفل ایجاد نمودند (۱۵). همچنین ویژگی‌های ارتفاع بوته، ضخامت ساقه و طول میوه را به عنوان ویژگی‌های مفید برای انتخاب نژادگان‌های پرمحصول فلفل در برنامه‌های بهنزاوی معرفی شده است (۲۰). از طرفی Geleta و همکاران (۱۰) فقط در ویژگی اندازه میوه بین نژادگان‌های فلفل مورد بررسی گوناگونی دیدند. در مورد ویژگی‌های ریخت‌شناسی، پژوهشگران دیگر نیز ویژگی‌های مختلفی مانند عملکرد میوه در هر بوته، شمار میوه در هر بوته و ارتفاع بوته را در ایجاد گوناگونی در فلفل گزارش نموده‌اند (۱۲).

نتیجه‌های به دست آمده از نشانگرهای ISSR نشان داد بیشترین محتوای داده‌های چندشکلی در آغازگرهای MBP-8 و MBP-15 و MBP-19 (۰/۴۹۹) و کمترین آن در آغازگر MBP-16 (۰/۳۵۵) دیده شد. در استفاده از آغازگر MBP-1 با توالی CG(A)₇ هیچ‌گونه نواری تکثیر نشد. برخلاف این نتیجه‌ها، Dias و همکاران (۸) در استفاده از آغازگر ۲۵ نوار دیدند که ۲۴ نوار آن چندشکل بودند. شاید کوتاه‌بودن طول این آغازگر مانع از اتصال آن شده و امکان تکثیر قطعه‌های مورد نظر فراهم نشده باشد. از سویی، در پژوهش Dias و همکاران (۸) استفاده از آغازگر MBP-19 با توالی CTC₈(GT)₈ چندشکلی به همراه نداشت. اما، در پژوهش حاضر، ۴ نوار تکثیرشده توسط این آغازگر همگی چندشکل بودند. مشابه با یافته‌های پژوهشی (۲۱) در خصوص دیده شدن ۱۰۰٪ چندشکلی در استفاده از آغازگر MBP-15 با توالی GC₃(GACA)₃ در پژوهش حاضر نیز این آغازگر ۱۰۰ درصد چندشکلی نشان داد. در مجموع، ۹۸/۴ درصد چندشکلی با استفاده از آغازگرهای به کار رفته در پژوهش حاضر دیده شد. درصد چندشکلی در یافته‌های دیگر پژوهشگران مانند Dias و همکاران (۸) و Ahmed (۳) نیز بالا (به ترتیب، ۹۱/۲٪ و ۶۰٪) گزارش شده است.

نبوت رابطه معنی دار بین نشانگرهای ریخت شناسی و مولکولی در این پژوهش ($r=0.020^{ns}$), در گزارش دیگر پژوهشگران روی فلفل نیز وجود دارد. به طور مشابه، Dias و همکاران (۸) نیز ارتباط معنی داری بین داده های به دست آمده از نشانگرهای ISSR و ویژگی های کالبدشناسی گیاه ندیدند. آن ها، نشانگرهای ISSR را برای تشخیص سطح های بالای از چندشکی در بین نژادگان های مختلف فلفل مناسب معرفی کردند. اما، این نشانگرها نتوانستند نشان دهنده ویژگی های کالبدشناسی گیاه باشند. در مقابل، ارتباط معنی داری بین ویژگی های ریخت شناسی و مولکولی (RAPD) نژادگان های فلفل گزارش شده است (۷). موفقیت در جداسازی بین نژادگان های فلفل با استفاده از نشانگرهای ISSR در پژوهش حاضر، با یافته های دیگر پژوهشگران نیز همخوانی دارد (۱۴) که به طور موفقیت آمیز توانستند با استفاده از نشانگرهای ISSR همانند نشانگرهای AFLP و RAPD، گوناگونی ژنتیکی و ارتباط فیلوزنتیکی بین نژادگان های مختلف فلفل را بستجند. جداسازی ایجاد شده بین نژادگان های مورد بررسی، با استفاده از روش تجزیه به مولفه های اصلی (PCA) به طور دقیق گروه بندی انجام شده با استفاده از نشانگرهای ISSR را تأیید نمود. همانگی بین نتیجه های به دست آمده از نشانگرهای ISSR و تجزیه به مولفه های اصلی، در گزارش دیگر پژوهشگران نیز دیده شده است (۲۱).

نتیجه گیری

نشانگرهای مولکولی ISSR و ریخت شناسی، ابزار قدرتمندی برای تشریح گوناگونی و شباهت ژنتیکی میان نژادگان های مختلف فلفل مورد بررسی بودند. ارتباط ژنتیکی و گوناگونی دیده شده بین نژادگان های فلفل برای برنامه های به نژادی کنونی و آتی برای انتخاب والدین مناسب مفید هستند. از میان نژادگان های مورد بررسی نژادگان های ۱۱، ۱۹، ۳۲، ۳۷ و ۳۷ متحمل بودند که همه این رقم ها به جز رقم کد ۳۷ در یک گروه ریخت شناسی و همگی در چهار گروه ژنتیکی متفاوت قرار گرفتند. در پایان پیشنهاد می شود بررسی تحمل به بیماری بوته میری بین ژنوتیپ های مختلف فلفل، به روشنی در دو مرحله نشاپی و بلوغ انجام شود. پژوهش با هدف سنجش گوناگونی ژنتیکی نژادگان های فلفل متحمل و حساس به بوته میری *P. capsici* و ارزیابی رابطه ژنتیکی آن ها با استفاده از روش های تجزیه ریخت شناسی و مولکولی شامل نشانگرهای ISSR و در پایان انتخاب نژادگان های مستعد برای پیشرفت برنامه های به نژادی آتی الزامی به نظر می رسد. در پژوهش حاضر، می توان از ژن های جدید مقاومت جهت انتخاب استراتژی های مناسب مدیریت بیماری و به نژادی در مقابل *P. capsici* از طریق دورگ گیری یا انتقال ژن توسط سیستم اگروباکتریوم و تکنیک های مرسوم فیزیکی و شیمیابی استفاده شود. شامل ژن های XLOC_023615 XLOC_021386 XLOC_021200 XLOC_021757 و XLOC_004633 که به طور موثری می تواند برای تفکیک ژنوتیپ های حساس و متحمل به بیماری بوته میری ناشی از *P. capsici* مورد استفاده قرار گیرند.

References

منابع

۱. ارشاد، ج و ه. منفرد. ۱۳۵۴. بررسی بوته میری فلفل در ایران. بیماری های گیاهی، ۱۱: ۲۹-۲۱.
۲. قلی طلوعی، س، ا. باباطاهری، ی. قوستا و م. صدقی. ۱۳۸۸. جداسازی، تشخیص و بررسی بیماری زایی عوامل قارچی پوسیدگی ریشه و طوقه فلفل در استان آذربایجان غربی. مجله دانش کشاورزی، ۱۹(۲): ۱۱۸-۱۱۰.
3. 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.
4. Albrecht, E., D. Zhang, A.D. Mays, R.A. Saftner and J.R. Stommel. 2012. Genetic diversity in *Capsicum baccatum* is significantl influenced by its eco-geographical distribution. BMC Genet. 13:68 doi: 10.1186/1471-2156-13-68.
5. Anonymous. 2006. National guideline for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability in Sweet pepper, Hot pepper, Paprika and Chili. Seed and Plant Certification and Registration Institute, 55 p.
6. Cebula, S., A. Jakubas, A. Sekara, A. Kalisz and A. Pohl. 2015. The relationship between morphological features and nutritive value of sweet Pepper fruits. Acta Sci. Pol. Hortorum. Cultus. 14(4):79-91.
7. Costa, F.R., T.N.S. Pereira, C.P. Sudre and R. Rodrigues. 2009. RAPD markers and morpho-agronomic traits in determining genetic diversity among chili peppers and sweet peppers. Cienc. Rural. 39: 696-704.

8. 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.
9. 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 Improv. J. 28(3): 407-417.
10. Geleta, L.F., M.T. Labuschagne and C.D. Viljoen. 2005. Genetic variability in Pepper (*Capsicum annuum* L.) estimated by morphological data and amplified fragment length polymorphism markers. Biod.Cons. 14: 2361-2375.
11. Hasan, M.J., M.U. Kulsum, M.Z. Ullah, M.M. Hossain AND M.E. Mahmud. 2014. Genetic diversity of some Chili (*Capsicum annuum* L.) genotypes. Int. J. Agri. Res. Innov. Tech. 4(1): 32-35.
12. Ibrahim, M., V.M. Ganiger and S.T. Yenjerappa. 2001. Genetic variability, heritability, genetic advance and correlation studies in chilli. Karnataka J. Agri. Sci. 14: 784-787.
13. Jiang, Y. and J.P. Liu. 2011. Analysis of genetic diversity of *Piper* spp. in Hainan Island (China) using inter-simple sequence repeat ISSR Markers. Afr. J. Biotechnol. 10(66): 14731-14737.
14. Kumar, L.D., M. Kathirvel, G.V. Rao and J. Nagaraju. 2001. DNA profiling of disputed chilli samples (*Capsicum annuum*) using ISSR-PCR and FISSR-PCR marker assays. Forensic Sci. Int. 116(1): 63-68.
15. Padilha, H.K., E.E. Sosinski and R.L. Barbieri. 2016. Morphological diversity and entropy of peppers (*Capsicum baccatum* and *Capsicum chinense*, Solanaceae). Int. J. Current Res. 8(12): 42758-42766.
16. Patel, A.S., N. Sasidharan, G.V. Ashish and K. Viny. 2011. Genetic relation in *Capsicum annuum* [L.] cultivars through microsatellite markers: SSR and ISSR. Electronic J. Plant Breed. 2(1):67-76.
17. Rana, M., R. Sharma, P. Sharma, S.V. Bhardwaj and M. Sharma. 2014. Estimation of genetic diversity in *Capsicum annuum* L. germplasm using PCR-based molecular markers. Natl. Acad. Sci. Lett. 37(3): 295-301.
18. 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. 45:1565-1579.
19. 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, Dordrecht.
20. Saleh, B.K., R.W. Kasili, E.G. Mamati, W. Araial and A.B. Nyende. 2016. Diversity of Pepper (*Capsicum* spp.) genotypes from Eritrea assessed by morphological traits. J. Agri. Sci. 8(4): 156-168.
21. 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 Arom. Crops, 22(2): 111-119.
22. Thabuis, A., V. Lefebvre, G. Bernard, A.M. Daubeze, T. Phaly, E. Pochard and A. Palloix. 2004. Phenotypic and molecular evaluation of a recurrent selection program for a polygenic resistance to *Phytophthora capsici* in pepper. TheoR. Appl. Genet. 109: 342-351.
23. Thul, S.T., M.P. Darokar, A.K. Shasany and S.P.S. Khanuja. 2012. Molecular profiling for genetic variability in *Capsicum* species based on ISSR and RAPD markers. Mol. Biotechnol. 51(2): 137-147.

24. Velazquez-Ventrua, J.C., C. Márquez-Quiroz, E. delaCruz-Lázaro, R. Osorio-Osorio and P. Preciado-Rangel. 2018. Morphological variation of wild peppers (*Capsicum* spp.) from the state of Tabasco, Mexico. Emirates J. Food Agri. 30(2): 115-121.
25. 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): 584-587.

Morpho-Genetic Diversity of Tolerance and Susceptible Ornamental and Edible Pepper Genotypes against Damping-Off Disease (*Phytophthora capsici*)

L. Mohammad Bagheri, M. Nasr-Esfahani*, V. Abdossi and D. Naderi¹

Pepper (*Capsicum* sp.) with numerous variations having abundant utilizations such as ornamental, food and pharmaceutical aspects. In this research, the genetic diversity of 37 resistant and susceptible ornamental and edible pepper genotypes to damping-off disease, caused by *Phytophthora capsici*, was analyzed by 47 morphological attributes and 20 ISSR primers. Results of ISSR assay indicated that 19 primers out of 20 primers produced scorable polymorphic bands. Totally, 188 bands were produced, which 185 bands were polymorphic. The polymorphism mean percent (P%) in ISSR markers was 98.5% and on average, 9.9 bands were produced using each primer. Polymorphism percent varied from 78% to 100%. Average of polymorphism information content (PIC) was 0.449. Based on the results of ISSR analysis, the genotypes were divided into five main groups. Morphological attributes also divided the genotypes into five distinct groups. Correlation between molecular and morphological similarity coefficients was non-significant. The screening results of resistance to damping-off disease demonstrated that five genotypes including 11BlockyP-YToran, 19OrnP-PBI, 23CherryP-Orsh, 32OrnP-China and 37ChilP-Paleo, which have the lowest mortality at seedling and maturity stages, were belong to ornamental and long peppers groups. The correlation coefficient of genetic diversity and resistant of the related genotypes to damping-off, *Phytophthora capsici* clustered the five resistant genotypes except 37ChilP-Paleo in one morphological group and all five genotypes were placed in four different molecular groups.

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

1. Ph.D. Student, Department of Horticultural Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Associate Professor of Plant Protection, Research Department of Agriculture and Natural Resource Research and Education Center of Esfahan, AREEO; Assistant Professor of Department of Horticultural Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, and Associate Professor of Horticulture Department and Member of Young Researchers Club, Islamic Azad University, Isfahan (Khorasan) Branch, Iran, respectively.

* Corresponding author, Email: (mne2011@gmail.com).