

## گوناگونی مورفونژنتیکی نژادگان‌های فلفل زینتی و خوراکی متحمل و حساس به

### بیماری بوته‌میری (*Phytophthora capsici*)<sup>۱</sup>

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

لیلا محمدباقری، مهدی نصر اصفهانی\*، وحید عبدوسی و داود نادری<sup>۲</sup>

#### چکیده

فلفل (*Capsicum* sp.) از جمله گیاهانی است که به دلیل گوناگونی زیاد، به صورت زینتی، خوراکی و دارویی مصرف دارد. برای بررسی گوناگونی ژنتیکی ۳۷ نژادگان مختلف فلفل، شامل انواع نژادگان‌های فلفل زینتی و خوراکی متحمل و حساس به بیماری بوته‌میری *Phytophthora capsici*، از نشانگرهای ریخت‌شناسی و ISSR به ترتیب با ۴۷ 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 محتوای داده‌های چندشکلی ۰/۴۴۹ 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 غیرمعنی‌دار بود. نتیجه‌های بررسی تحمل به بیماری بوته‌میری نشان داد پنج نژادگان متحمل شامل رقم‌های کد ۱۱، ۱۹، ۲۳، ۳۲ و ۳۷ از گروه فلفل‌های زینتی و کشیده بودند. در بررسی ارتباط بین گوناگونی ژنتیکی و میزان تحمل به بیماری، پنج نژادگان متحمل 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 ژن مقاوم و توالی ژنی 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* به وجود می‌آید. پوسیدگی ریشه و طوقه 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

۱- تاریخ دریافت: ۹۷/۱/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۸/۷/۲۱

۲- به ترتیب دانشجوی دکتری علوم باغبانی گرایش گیاهان زینتی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج 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 (خوراسگان)، اصفهان، ایران.

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

به‌عنوان 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 قلی‌طلوعی و همکاران (۲) دو گونه از قارچ *Fusarium* و یک گونه از قارچ‌های *Rhizoctonia* و *Phytophthora* را به‌عنوان عامل اصلی ایجاد بیماری جداسازی و گزارش کردند.

نشانگر (Inter Simple Sequence Repeats) ISSR یکی از نشانگرهای DNA مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) است. برای تکثیر DNA ژنومی با فن ISSR از یک آغازگر ترکیبی به‌دست آمده از توالی‌های میکروساتلایت استفاده می‌شود که انتهای 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 به‌دست آمده از آن‌ها، با استفاده از نشانگر ISSR مورد ارزیابی قرار گرفته و گزارش شد که دندروگرام به‌دست آمده از نتیجه‌های این نشانگرها، دارای ۷ گروه شامل رگه‌های مادری بود. آن‌ها نشانگر ISSR را به‌عنوان یک ابزار قوی برای شناسایی و رده‌بندی 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 (Random Amplified Polymorphic DNA RAPD) و ۲۸ ویژگی ریخت‌شناسی مورد بررسی قرار گرفت. از ۲۳ آغازگر RAPD و ۱۶ آغازگر ISSR به‌ترتیب ۲۰۹ و ۹۴ نوار به‌دست آمد. در مجموع، مشخص شد که نشانگرهای ISSR درصد چندشکلی بیشتری در گونه *C. annuum* نسبت به RAPD داشتند و شمار آلل موثر، شاخص شانون، هتروزیگوسیتی و ضریب گوناگونی ژنتیکی به‌دست آمده از نشانگرهای ISSR بیشتر از RAPD بوده است. در این بررسی، همبستگی معنی‌داری بین دندوگرام‌های به‌دست 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 هندوستان 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* به‌طور 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 اهلی‌شده 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، به‌طوری که برخی تغییرهای کالبدشناسی بین گونه‌های *C. annuum*، *C. baccatum*، *C. chinense* و *C. frutescens* از نظر برگ، 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 ۰/۲۵ 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 ۰/۱۰۴ تا ۰/۲۸۰ به‌دست آمد (۱۳). در پژوهشی دیگر نیز از نشانگرهای ISSR برای بررسی گوناگونی ژنتیکی ۲۷ گونه فلفل سیاه استفاده و آن‌ها در ۶ خوشه دسته‌بندی 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 متحمل 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 بهنژادی آتی انجام گردیده است.

## مواد و روش‌ها

برای بررسی گوناگونی ژنتیکی نژادگان‌های مختلف فلفل متحمل و حساس به بوته‌میری با استفاده از نشانگرهای ریخت‌شناسی و ISSR، آزمایشی در قالب یک طرح به‌طور کامل تصادفی با ۳۷ تیمار (شامل نژادگان‌های فلفل زینتی و خوراکی) 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 تنزیدن بذرها و اعمال مدیریت خزانه مانند آبیاری، تغذیه و مبارزه با آفت‌ها 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  $25 \pm 2$  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*.

| ردیف<br>S/No | شماره نژادگان<br>Genotype No. | مشخصات<br>Properties                                                    | شرکت<br>Company | نام مشخصه رقم<br>Genotype registered name | واکنش به<br>بوته‌میری<br>Reaction to<br><i>P. capsici</i> |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 1            | 18                            | زینتی - مخروطی - بنفش - ایتالیایی<br>Ornamental-Conical-Purple- Italian | PBI             | 18OrnP-ConPurItaly                        | PS                                                        |
| 2            | 8                             | زینتی - ایرانی - کد ۶۵۷<br>Ornamental-Iranian-657                       | -               | 8OrnP-IR657                               | PR                                                        |
| 3            | 30                            | زینتی - F2 - الوان - هلندی<br>Ornamental-F2-Alvan-Dutch                 | PBI             | 30OrnP-F2NethAlv                          | PR                                                        |
| 4            | 14                            | زینتی<br>Ornamental                                                     | PBI             | 14OrnP-PBI                                | PS                                                        |
| 5            | 19                            | زینتی<br>Ornamental                                                     | PBI             | 19OrnP-PBI                                | R                                                         |
| 6            | 16                            | زینتی<br>Ornamental                                                     | PBI             | 16OrnP-PBI                                | PR                                                        |
| 7            | 21                            | زینتی - موزی شکل<br>Ornamental-Banana-shaped                            | -               | 21OrnP-Banana                             | PS                                                        |
| 8            | 32                            | زینتی - چینی<br>Ornamental-Chinese                                      | -               | 32OrnP-China                              | R                                                         |
| 9            | 17                            | زینتی - مخروطی - بنفش - آمریکایی<br>Ornamental-Conical-Purple- American | PBI             | 17OrnP-ConPurUSA                          | PS                                                        |
| 10           | 1                             | زینتی - F2 - مجارستانی<br>Ornamental-F2-Hungry                          | PBI             | 1OrnP-F2Hun                               | PS                                                        |

جدول ۱- ادامه...

Table 1. Continued...

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

جدول ۱- ادامه...

Table 1. Continued...

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

PBI: شرکت پاکان‌بذر، SeR: شرکت سپاهان رویش، EWSI: شرکت بین‌المللی بذر شرق غرب، ES: شرکت بذر شرقی، SuS: شرکت بذر سامس، R: متحمل، S: حساس، PR: نیمه‌متحمل، PS: نیمه‌حساس.

PBI: Pakan Bazr-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 DNA آن‌ها براساس روش CTAB انجام شد (۱۹). برای سنجش کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به‌ترتیب از دستگاه‌های نانودراپ (کمپانی Thermo T, Scientific، کشور آمریکا) و الکتروفورز افقی (شرکت ارکا طب روهم، کشور ایران) با ژل ۱٪ و بافر TBE 1X استفاده شد. غلظت نهایی DNAهای 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.

| ردیف<br>S/No. | نام آغازگر<br>Primer name | توالی آغازگر<br>Primers sequence | دمای اتصال<br>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 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 GG-3'          | 44                                       |
| 13            | MBP-14                    | 5'-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-3'    | 47                                       |
| 20            | MBP-21                    | 5'-CGA CGA CGA CGA CGA CGA-3'    | 50                                       |

Y: Pyrimidine, R: Purin.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (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 ۲-۱/۵٪ بارگذاری و قطعه‌های تکثیرشده از هم جداسازی شدند.

نمونه‌گیری از برگ‌های جوان گیاهان یک‌ماهه در نوک گیاه پیش از گلدهی و استخراج DNA آن‌ها براساس روش CTAB انجام شد (۱۹). برای سنجش کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به‌ترتیب از دستگاه‌های نانودراپ (کمپانی Thermo T, Scientific کشور آمریکا) و الکتروفورز افقی (شرکت ارکا طب روهم، کشور ایران) با ژل ۱٪ و بافر TBE 1X استفاده شد. غلظت نهایی DNAهای استخراج شده برای انجام PCR، ۴۰ نانوگرم بود (۲۴). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (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 ۲-۱/۵٪ 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.

| ردیف<br>S/No. | نام آغازگر<br>Primer name | توالی آغازگر<br>Primers sequence  | دمای اتصال<br>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 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 GT-3' | 47                                       |
| 18            | MBP-19                    | 5'-GT 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 به‌دست آمده از الکتروفورز، با استفاده از نرم‌افزار NTSYS گروه‌بندی نژادگان‌های بررسی شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی براساس امتیازبندی، خوشه‌بندی و مقایسه میانگین شد و رابطه آن با نتیجه‌های مولکولی مقایسه شد (۲۴). همبستگی بین ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی با استفاده از ضرایب تشابه به‌دست آمد و به‌کارگیری 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 به‌دست آمده از مقایسه میانگین ویژگی‌های ریخت‌شناسی.

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

| ردیف<br>S/No. | Morphological trait                 | ویژگی ریخت‌شناسی                       | شماره گروه<br>Group number <sup>†</sup> | وضعیت گروه<br>Group situation |
|---------------|-------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------|
| 1             | Plant growth habit                  | عادت رشد گیاه                          | 1                                       | a                             |
| 2             | Stem length                         | ارتفاع ساقه                            | 16                                      | a-p                           |
| 3             | Node anthocyanin pigment            | رنگ‌دانه آنتوسیانین گره                | 2                                       | a-b                           |
| 4             | Node anthocyanin pigment intensity  | شدت رنگ‌دانه آنتوسیانین گره            | 5                                       | a-e                           |
| 5             | Node woolly                         | کرکدار بودن گره                        | 3                                       | a-c                           |
| 6             | Lamina length                       | طول پهنک                               | 13                                      | a-m                           |
| 7             | Lamina width                        | عرض پهنک                               | 12                                      | a-l                           |
| 8             | Lamina length/width                 | نسبت طول به عرض پهنک                   | 3                                       | a-c                           |
| 9             | Leaf green color intensity          | شدت رنگ سبز برگ                        | 4                                       | a-d                           |
| 10            | Leaf shining                        | براق بودن برگ                          | 4                                       | a-d                           |
| 11            | Peduncle situation                  | وضعیت دمگل                             | 2                                       | a-b                           |
| 12            | unripe fruit color                  | رنگ میوه نارس                          | 3                                       | a-c                           |
| 13            | Fruit situation                     | وضعیت میوه                             | 2                                       | a-b                           |
| 14            | Fruit length                        | طول میوه                               | 11                                      | a-k                           |
| 15            | Fruit diameter                      | قطر میوه                               | 8                                       | a-h                           |
| 16            | Fruit length/diameter               | نسبت طول به قطر میوه                   | 7                                       | a-g                           |
| 17            | Fruit shape in longitudinal section | شکل میوه در برش طولی                   | 5                                       | a-e                           |
| 18            | Fruit shape in latitudinal section  | شکل میوه در برش عرضی                   | 2                                       | a-b                           |
| 19            | Exocarp wavy in fruit base          | موج‌دار بودن برون‌بر در قاعده میوه     | 3                                       | a-c                           |
| 20            | Exocarp wavy except in fruit base   | موج‌دار بودن برون‌بر بجز در قاعده میوه | 3                                       | a-c                           |
| 21            | Fruit surface                       | سطح میوه                               | 1                                       | a                             |
| 22            | Ripened fruit color                 | رنگ میوه رسیده                         | 3                                       | a-c                           |
| 23            | Hollow in fruit base                | حفره در قاعده میوه                     | 2                                       | a-b                           |
| 24            | Hollow depth                        | عمق حفره                               | 3                                       | a-c                           |
| 25            | Fruit tip shape                     | شکل نوک میوه                           | 4                                       | a-d                           |
| 26            | Fruit tail length                   | طول دم میوه                            | 12                                      | a-l                           |
| 27            | Calyx situation                     | وضعیت کاسه‌گل                          | 1                                       | a                             |

منبع (۵)

<sup>†</sup> ویژگی ریخت‌شناسی با شمار گروه‌بندی بیشتر، گوناگونی بیشتری بین نژادگان‌های مورد بررسی نشان داد.<sup>†</sup> Morphological trait with more group number, showed more diversity between the evaluated genotypes.

## نتایج

نژادگان‌های مورد بررسی، براساس آزمایش‌های مایه‌زنی در چهار گروه متحمل، نیمه‌متحمل، نیمه‌حساس و حساس گروه‌بندی شدند. بر این اساس، نژادگان‌های ۱۱، ۱۹، ۲۳، ۳۲ و ۳۷ متحمل، نژادگان‌های ۸، ۱۵، ۱۶ و ۳۰ نیمه‌متحمل، نژادگان‌های ۱، ۳، ۴، ۵، ۷، ۱۲، ۱۳، ۱۴، ۱۷، ۱۸، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۵، ۲۷، ۲۹، ۳۴، ۳۵ و ۳۶ نیمه‌حساس و نژادگان‌های ۲، ۹، ۱۰، ۲۴، ۲۶، ۳۸، ۳۱ و ۳۳ حساس بودند (جدول ۱).

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

رنگدانه آنتوسیانین گره دیده شد. همان طور که در جدول ۳ دیده می شود، در ویژگی های امتیازدهی، نژادگان ها به چند گروه محدود تقسیم بندی شدند ولی در ویژگی های اندازه گیری شده، گروه بندی ها متعدد بود. بیشترین گروه بندی در ویژگی های طول ساقه، طول و عرض پهنک، طول دم میوه، طول میوه، قطر میوه و نسبت طول به قطر میوه دیده شد ( $P < 0.01$ ).

برای گروه بندی نژادگان ها بر اساس تبدیل داده های ریخت شناسی 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، ضریب کوفنتیک (همبستگی بین ماتریس تشابه و دندروگرام به دست آمده) در نرم افزار NTSYS محاسبه شد. بر این اساس ضریب تشابه جاکارد به عنوان بهترین ضریب تشابه و الگوریتم UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) بهترین الگوریتم خوشه بندی بر مبنای ویژگی های ریخت شناسی مورد استفاده قرار گرفتند. بر اساس ماتریس تشابه به دست آمده از داده های ریخت شناسی، ضرایب تشابه بین نژادگان های مورد بررسی بین ۰/۲۶ تا ۰/۹۳ متغیر بود. بیشترین شباهت ریخت شناسی، بین نژادگان های ۱۶ و ۱۷ و نیز بین نژادگان های ۱ و ۱۸ (۰/۹۳) که همگی زینتی بودند، دیده شد (شکل ۱). بر اساس دندروگرام نمایش داده شده در شکل ۱، نژادگان ها به پنج گروه تقسیم بندی شدند:

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

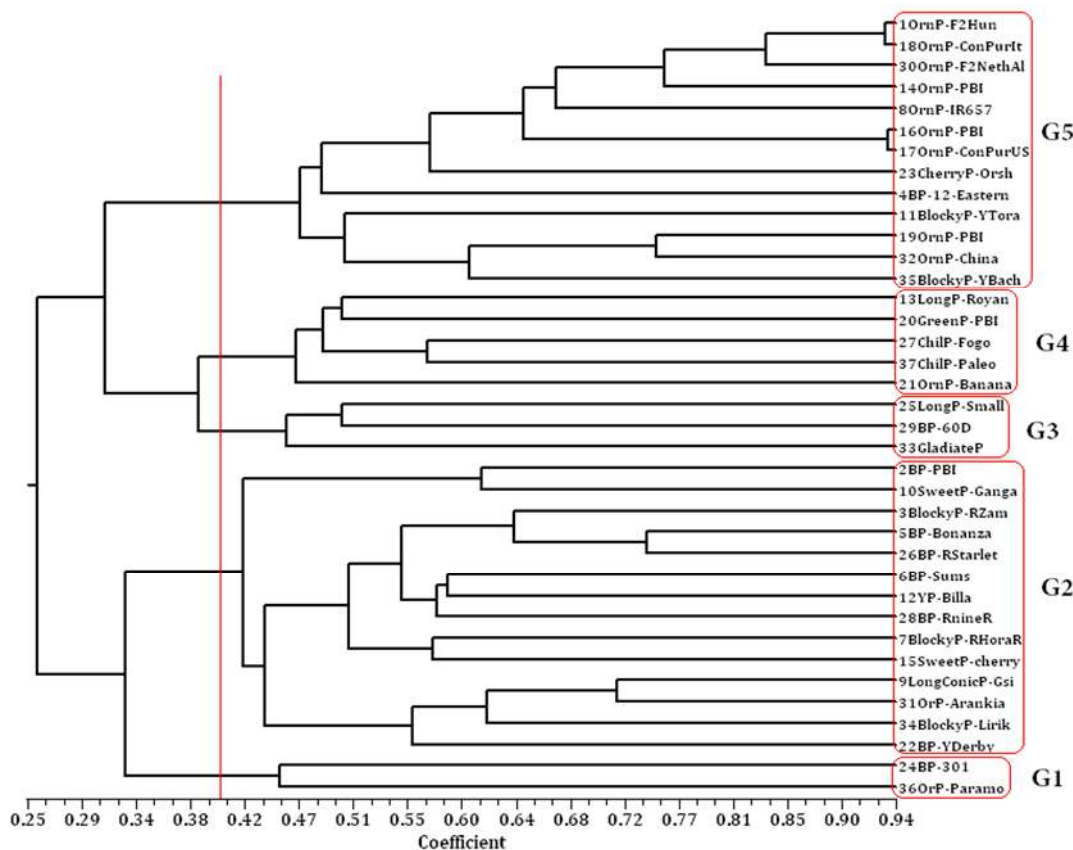


Fig. 1. Cluster analysis obtained from morphological characteristics of 37 tolerance and susceptible to *Phytophthora capsici* genotypes of pepper.

شکل ۱- تجزیه خوشه ای به دست آمده از ویژگی های ریخت شناسی در ۳۷ نژادگان فلفل متحمل و حساس به بوته میری.

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 MBP-19 تا ۱۸ نوار برای آغازگر MBP-21 متغیر بود که نشان‌دهنده توانایی این آغازگرها در جداسازی نژادگان‌ها بود. درصد چندشکلی از ۷۸٪ 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 ۴).

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 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، MBP-15 و MBP-19 (۰/۴۹۹) و کمترین آن در آغازگر MBP-16 (۰/۳۵۵) دیده شد. بنابراین، آغازگرهای MBP-8، 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 به‌عنوان بهترین ضریب تشابه و الگوریتم UPGMA به‌عنوان بهترین الگوریتم خوشه‌بندی 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 به‌ترتیب فلفل سبز و فلفل زینتی موزی (۰/۹۲) دیده شد (شکل ۳).

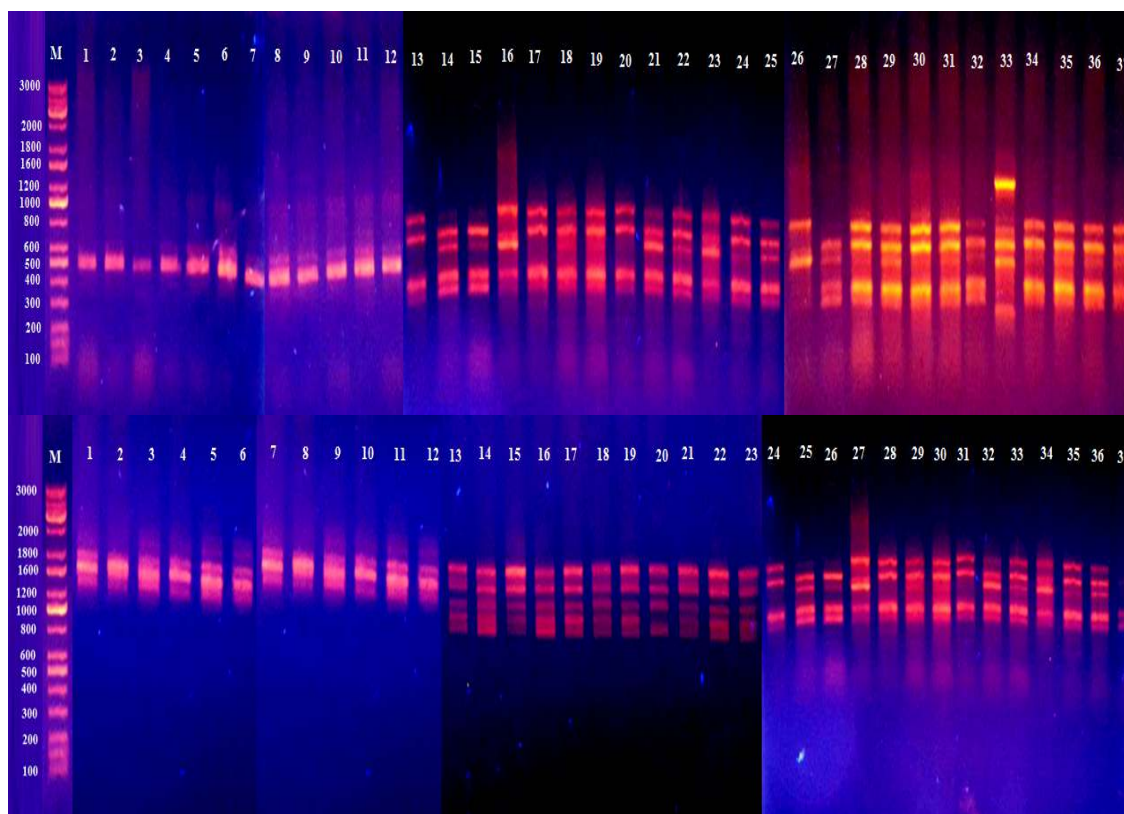


Fig. 2. Banding pattern resulted from LMB-20 (above) and LMB-15 (below) primers. M: Size Marker (100-3000 bp); Lane 1-37: the studied pepper genotypes according to Table 1.

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

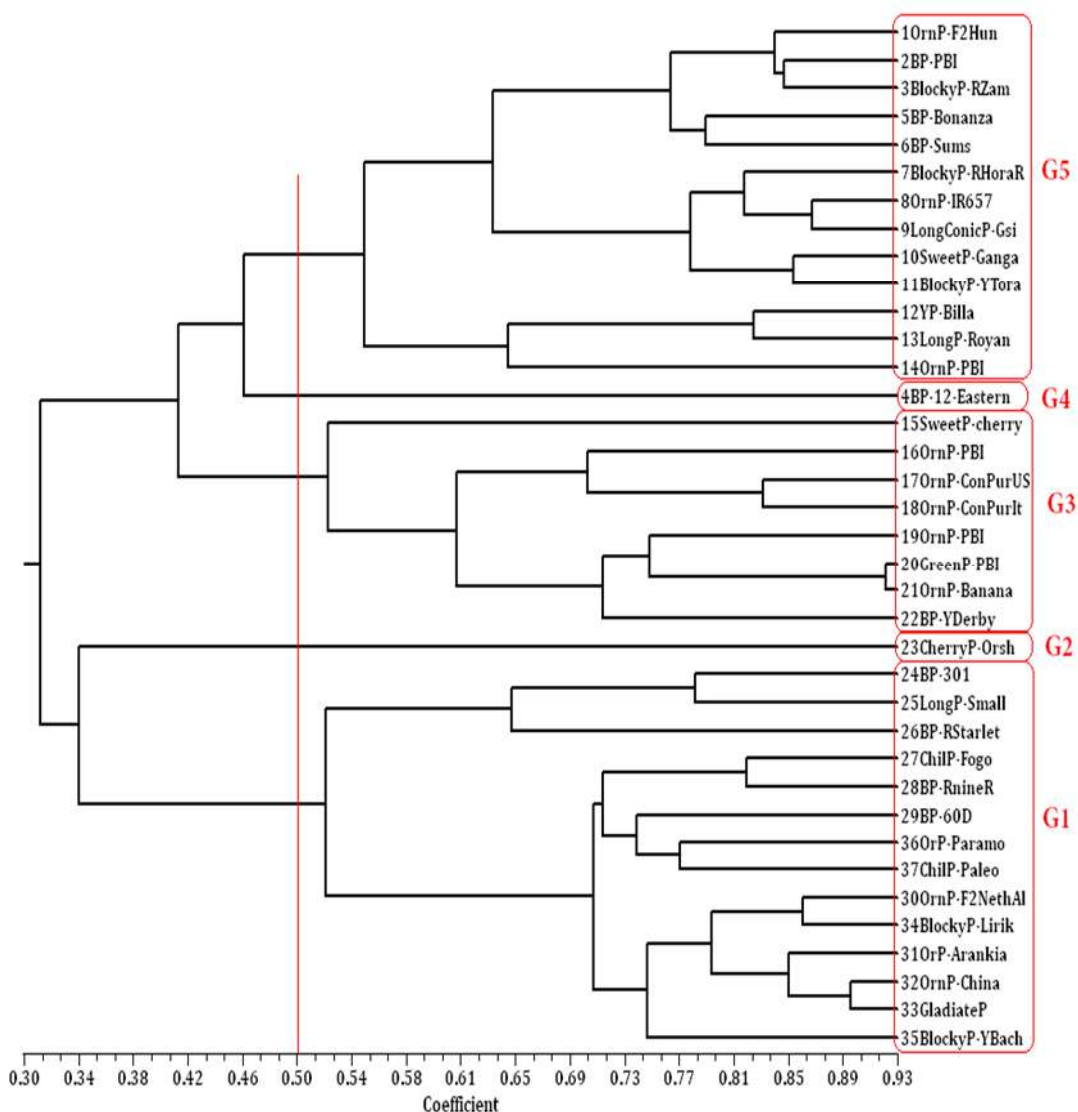


Fig 3. Cluster analysis obtained from polymorphism pattern of 37 tolerance and susceptible pepper genotypes to *Phytophthora capsici* by ISSR markers using NTSYS software and UPGMA algorithm and Jaccard similarity coefficient.

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

بر اساس دندروگرام شکل ۳، نژادگان‌ها به پنج گروه تقسیم‌بندی شدند: گروه اول: نژادگان‌های ۲۴، ۲۵، ۲۶، ۲۷، ۲۸، ۲۹، ۳۰، ۳۱، ۳۲، ۳۳ و ۳۵ که هر دو گروه فلفل خوراکی و زینتی با ضریب تشابه ۰/۶۵ تا ۰/۹۰ در یک گروه قرار گرفتند. گروه دوم: نژادگان کد ۲۳ به‌تنهایی 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 و ۲۲ در یک گروه قرار داشتند و ضریب تشابه آن‌ها بین ۰/۳۱ تا ۰/۹۲ بود. گروه چهارم: نژادگان کد ۴ به‌تنهایی در یک گروه قرار داشت و ضریب تشابه آن با بقیه نژادگان‌ها بین ۰/۳۱ تا ۰/۴۶ بود. گروه پنجم: نژادگان‌های ۱، ۲، ۳، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲، ۱۳ و ۱۴ در یک گروه قرار داشتند و ضریب تشابه آن‌ها بین ۰/۶۴ تا ۰/۸۷ 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<br>S/No. | کد آغازگر<br>Primer code | شمار کل باند<br>TBN | شمار نوار<br>چندشکل<br>PBN | درصد<br>چندشکلی<br>P % | محتوای داده‌های<br>چندشکلی<br>PIC | شاخص نشانگری<br>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               |
| Mean میانگین  |                          | 9.9                 | 9.7                        | 98.5                   | 0.449                             | 4.29               |
| Total کل      |                          | 188                 | 185                        | -                      | -                                 | -                  |

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

نتیجه‌های به‌دست‌آمده از آزمون تجزیه به مولفه‌های اصلی نیز تا حد زیادی همسو با نتیجه‌های به‌دست‌آمده 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 به‌دست آمد. طبق این دندروگرام، نژادگان‌ها در سه گروه اصلی قرار گرفتند. در گروه اول، همه نژادگان‌های متحمل و نیمه‌متحمل، در گروه دوم همه نژادگان‌های حساس و در گروه سوم همه نژادگان‌های نیمه‌حساس قرار گرفتند. حضور نژادگان متحمل 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).

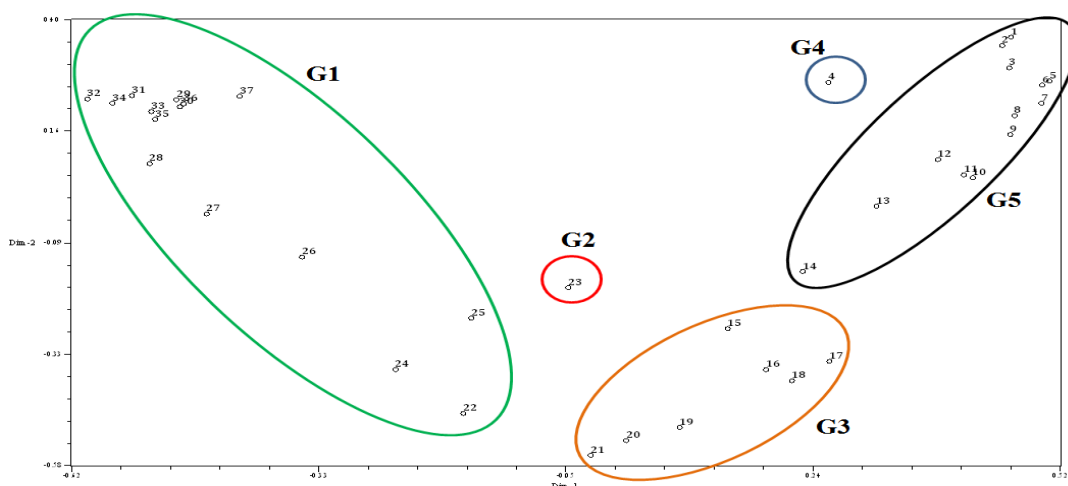


Fig. 4. Two-dimensional diagram for principal coordinate analysis in pepper genotypes using ISSR markers. G1, G2, G3, G4 and G5: Genotype grouping.

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).

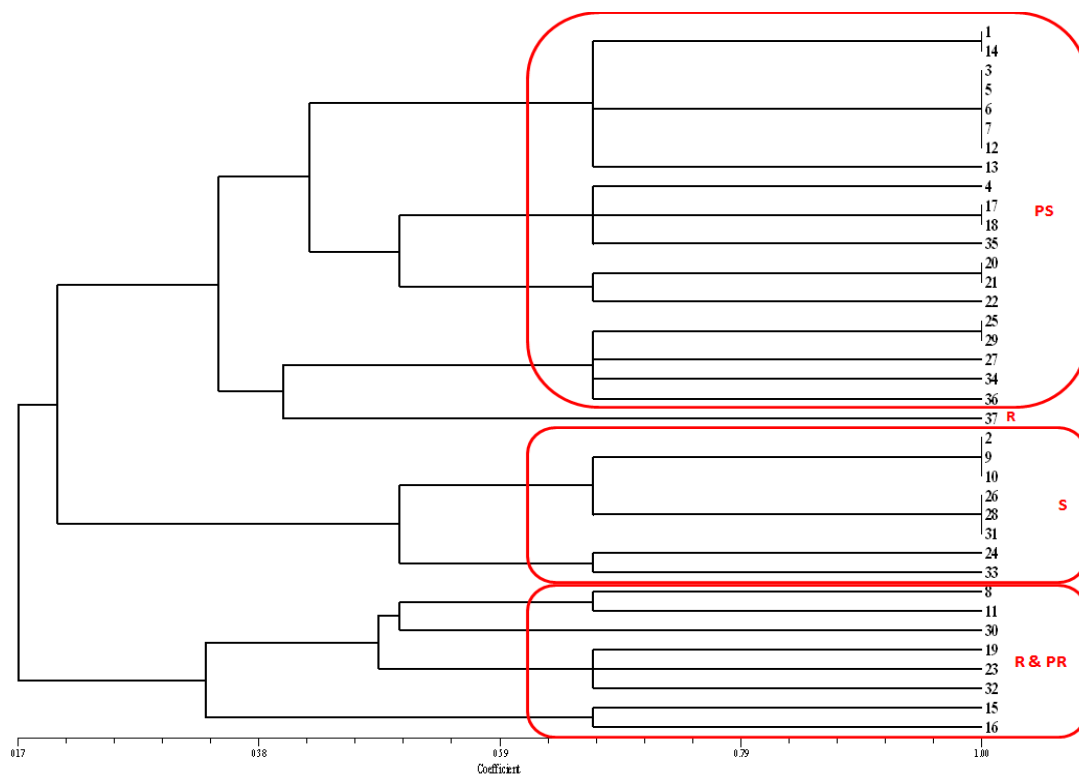


Fig. 5. Dendrogram designed for 37 ornamental and edible pepper genotypes using combined data from ISSR and morphological markers as well as grouping based on tolerance to *Phytophthora capsici* based on UPGMA algorithm and Dice similarity coefficient. R: Resistant, S: Susceptible, PR: Partially Resistant, 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 پوتهمیری با استفاده از الگوریتم UPGMA و ضریب تشابه دایس (R: متحمل، S: حساس، PR: نیمه متحمل، PS: نیمه حساس).

## بحث

در بین ویژگی های ریخت شناسی مورد بررسی، برخی ویژگی ها بیشترین گوناگونی را در بین نژادگان ها نمایان کردند که از آن جمله می توان به ویژگی های طول ساقه، طول پهنک، طول دم میوه، عرض پهنک، طول و قطر میوه، نسبت طول به قطر میوه، شکل میوه در برش طولی و شدت رنگدانه آنتوسیانین گره اشاره کرد. شاخص شکل پهنک از جمله ویژگی هایی بود که گوناگونی چشمگیری در بین نژادگان ها نشان داد. در گزارشی، Dias و همکاران (۸) نیز بیان نمود که در استفاده از شاخص شکل برگ جداسازی چشمگیری بین نژادگان های فلفل مشاهده نشد.

نژادگان ها از نقطه نظر رنگ و شکل میوه به ۲ تا ۷ گروه تقسیم شدند. فلفل ها گوناگونی زیادی در رنگ و شکل میوه از خود نشان می دهند (۱۶). در بررسی گوناگونی بین گونه ها و رقم های فلفل، گوناگونی زیادی از نظر رنگ و شکل بین آن ها دیده شد (۸). با این حال، گزارش شده است که هم پوشانی نزدیکی بین ویژگی های ریخت شناسی گونه های مختلف فلفل وجود دارد که منجر به شناسایی آن ها به عنوان یک گونه مرکب توسط پژوهشگران شده است (۲۵). Albrecht و همکاران (۴) گزارش کردند در بین ۴۰ ویژگی ریخت شناسی مورد بررسی، ویژگی های قطر میوه و طول دم میوه بیشترین سهم را در جداسازی بین نژادگان های وحشی و اهلی شده فلفل داشتند که با نتایج پژوهش حاضر هم خوانی دارد. در پژوهش حاضر نیز نژادگان های مورد بررسی از نظر قطر میوه و طول دم میوه به ترتیب به ۸ و ۱۲ گروه تقسیم بندی شدند. گوناگونی زیاد قابل دیدن در بین نژادگان های مورد بررسی از نظر ارتفاع بوته در پژوهش حاضر با یافته های Hasan و همکاران (۱۱) همخوانی داشت. آن ها نیز در بررسی گوناگونی ژنتیکی برخی نژادگان های 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 یافته های Cebula و همکاران (۶) روی رقم های مختلف فلفل شیرین مطابقت دارد. در بررسی گوناگونی ریخت شناسی نژادگان های مختلف فلفل در مکزیک گزارش شد در ویژگی های طول و قطر و شاخص شکل میوه، طول و عرض برگ، ارتفاع بوته و تراکم شاخساره بیشترین گوناگونی بین نژادگان ها دیده شد (۲۴). این نتیجه ها با یافته های به دست آمده در پژوهش حاضر همخوانی دارد به طوری که در پژوهش حاضر نیز گوناگونی بالایی در ویژگی های یاد شده بین نژادگان های مورد بررسی دیده شد. گزارش شده است که موقعیت گل، وضعیت کلالة، رنگ میوه رسیده، میزان تندی، ارتفاع بوته و شکل میوه از مهم ترین ویژگی هایی هستند که بیشترین گوناگونی را بین نژادگان های فلفل ایجاد نمودند (۱۵). همچنین ویژگی های ارتفاع بوته، ضخامت ساقه و طول میوه را به عنوان ویژگی های مفید برای انتخاب نژادگان های پرمحصول فلفل در برنامه های به نژادی معرفی شده است (۲۰). از طرفی Geleta و همکاران (۱۰) فقط در ویژگی اندازه میوه بین نژادگان های فلفل مورد بررسی گوناگونی دیدند. در مورد ویژگی های ریخت شناسی، پژوهشگران دیگر نیز ویژگی های مختلفی مانند عملکرد میوه در هر بوته، شمار میوه در هر بوته و ارتفاع بوته را در ایجاد گوناگونی در فلفل گزارش نموده اند (۱۲).

نتیجه های به دست آمده از نشانگرهای ISSR نشان داد بیشترین محتوای داده های چندشکلی در آغازگرهای MBP-8، 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)<sub>7</sub> هیچ گونه نواری تکثیر نشد. بر خلاف این نتیجه ها، Dias و همکاران (۸) در استفاده از این آغازگر ۲۵ نوار دیدند که ۲۴ نوار آن چندشکل بودند. شاید کوتاه بودن طول این آغازگر مانع از اتصال آن شده و امکان تکثیر قطعه های مورد نظر فراهم نشده باشد. از سویی، در پژوهش Dias و همکاران (۸) استفاده از آغازگر MBP-19 با توالی CTC<sub>8</sub>(GT) هیچ گونه چندشکلی به همراه نداشت. اما، در پژوهش حاضر، ۴ نوار تکثیر شده توسط این آغازگر همگی چندشکل بودند. مشابه با یافته های پژوهشی (۲۱) در خصوص دیده شدن ۱۰۰٪ چندشکلی در استفاده از آغازگر MBP-15 با توالی GC<sub>3</sub>(GACA)<sub>3</sub>، 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 یافته های دیگر پژوهشگران مانند Dias و همکاران (۸) و Ahmed (۳) نیز بالا (به ترتیب، ۹۱/۲٪ و ۶۰٪) گزارش شده است.

نبود رابطه معنی‌دار بین نشانگرهای ریخت‌شناسی و مولکولی در این پژوهش ( $r=0.020^{ns}$ )، در گزارش دیگر پژوهشگران روی فلفل نیز وجود دارد. به‌طور مشابه، Dias و همکاران (۸) نیز ارتباط معنی‌داری بین داده‌های به‌دست آمده از نشانگرهای ISSR و ویژگی‌های کالبدشناسی گیاه ندیدند. آن‌ها، نشانگرهای ISSR را برای تشخیص سطح‌های بالایی از چندشکلی در بین نژادگان‌های مختلف فلفل مناسب معرفی کردند. اما، این نشانگرها نتوانستند نشان دهنده ویژگی‌های کالبدشناسی گیاه باشند. در مقابل، ارتباط معنی‌داری بین ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی (RAPD) نژادگان‌های فلفل گزارش شده است (۷). موفقیت در جداسازی بین نژادگان‌های فلفل با استفاده از نشانگرهای ISSR در پژوهش حاضر، با یافته‌های دیگر پژوهشگران نیز همخوانی دارد (۱۴) که به‌طور موفقیت‌آمیزی توانستند با استفاده از نشانگرهای ISSR همانند نشانگرهای AFLP و RAPD، گوناگونی ژنتیکی و ارتباط فیلوژنتیکی بین نژادگان‌های مختلف فلفل را بسنجند. جداسازی ایجادشده بین نژادگان‌های مورد بررسی، با استفاده از روش تجزیه به مولفه‌های اصلی (PCA) به‌طور دقیق گروه‌بندی انجام‌شده با استفاده از نشانگرهای ISSR را تأیید نمود. هماهنگی بین نتیجه‌های به‌دست‌آمده از نشانگرهای ISSR و تجزیه به مولفه‌های اصلی، در گزارش دیگر پژوهشگران نیز دیده شده است (۲۱).

### نتیجه‌گیری

نشانگرهای مولکولی ISSR و ریخت‌شناسی، ابزار قدرتمندی برای تشریح گوناگونی و شباهت ژنتیکی میان نژادگان‌های مختلف فلفل مورد بررسی بودند. ارتباط ژنتیکی و گوناگونی دیده‌شده بین نژادگان‌های فلفل برای برنامه‌های به‌نژادی کنونی و آتی برای انتخاب والدین مناسب مفید هستند. از میان نژادگان‌های مورد بررسی نژادگان‌های ۱۱، ۱۹، ۲۳، ۳۲ و ۳۷ متحمل بودند که همه این رقم‌ها به‌جز رقم کد ۳۷ در یک گروه ریخت‌شناسی و همگی در چهار گروه ژنتیکی متفاوت قرار گرفتند. در پایان پیشنهاد می‌شود بررسی تحمل به بیماری بوته‌میری بین ژنوتیپ‌های مختلف فلفل، به روشنی در دو مرحله ناشی و بلوغ انجام شود. پژوهش با هدف سنجش گوناگونی ژنتیکی نژادگان‌های فلفل متحمل 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 به‌نژادی آبی الزامی به نظر می‌رسد. در پژوهش حاضر، می‌توان از ژن‌های جدید مقاومت جهت انتخاب استراتژی‌های مناسب مدیریت بیماری و به‌نژادی در مقابل *P. capsici* از طریق دورگ‌گیری یا انتقال ژن توسط سیستم اگروباکتريوم و تکنیک‌های مرسوم فیزیکی و شیمیایی استفاده شود. شامل ژن‌های XLOC\_023615، XLOC\_004633، XLOC\_021386، XLOC\_021200 و XLOC\_021757 که به‌طور موثری می‌تواند برای تفکیک ژنوتیپ‌های حساس و متحمل به بیماری بوته‌میری ناشی از *P. capsici* مورد استفاده قرار گیرند.

### References

### منابع

۱. ارشاد، ج. و ه. منفرد. ۱۳۵۴. بررسی بوته‌میری فلفل در ایران. بیماری‌های گیاهی، ۱۱: ۲۹-۲۱.
۲. قلی‌طلوعی، س.، ا. باباطاهری، ی. قوستا و م. صدقی. ۱۳۸۸. جداسازی، تشخیص و بررسی بیماری‌زایی 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 significantly 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, Dordecht.
20. Saleh, B.K., R.W. Kasili, E.G. Mamati, W. Araia 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. Naderi<sup>1</sup>**

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; Assistance 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 (Khorasgan) Branch, Iran, respectively.

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