

شناسایی و ردیابی مولکولی *Phytophthora melonis* براساس ژنوم هسته‌ای و

میتوکندریایی*

سیده معصومه ذوالانواری^۱، رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا^{۱*} و علی دادخدایی^۱

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱/۲۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۱۸)

چکیده

گونه‌ی بیمارگر گیاهی *Phytophthora melonis* از نظر ریخت‌شناختی به برخی گونه‌های بدون پستانک جنس *Phytophthora* به‌خصوص *P. drechsleri* شباهت دارد و بنابراین تفکیک این آرایه‌های هم‌گرا دشوار است. این پژوهش به منظور طراحی آغازگرهای اختصاصی *P. melonis* بر اساس ژنوم هسته‌ای و میتوکندریایی، بررسی اختصاصیت آن‌ها در برابر سایر گونه‌های هم‌گرا، و بهینه‌سازی استفاده از این آغازگرها برای ردیابی *P. melonis* انجام شد. برای طراحی آغازگرهای اختصاصی گونه‌ی *P. melonis* نه ژن هسته‌ای و چهار ژن میتوکندریایی از نظر تفاوت نوکلئوتیدی مناسب بودند، بنابراین سیزده آغازگر اختصاصی طراحی و خصوصیات آن‌ها بهینه‌سازی گردید. ردیابی *P. melonis* با استفاده از پنج جفت از آغازگرهای اختصاصی در بافت مایه‌زنی شده‌ی گیاهان میزبان آن شامل خیار، خربزه، هندوانه، چغندرقد و پسته انجام شد. با استفاده از آغازگرهای طراحی شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو، تا سطح یک درصد مایه‌ی بیماری‌زا در خاک آلوده و زئوسپورهای بیمارگر تا غلظت ۱۰ زئوسپور در میلی‌لیتر در آب آلوده ردیابی شدند. با بررسی اختصاصیت و حساسیت آغازگرهای طراحی شده، کارآمدترین آن‌ها مجموعه‌ی ITS-M2 (ترکیب آغازگرهای ITS-MF1 و ITS-MR2) در نظر گرفته شد. دمای هم-جوشی بهینه‌سازی شده برای این مجموعه ۶۸ درجه‌ی سلسیوس بود. به نظر می‌رسد استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو با استفاده از مجموعه‌ی ITS-M2 به همراه آغازگرهای عمومی ITS4 و ITS6 در نقش آغازگرهای خارجی در حدود ۱۰^۶ برابر حساس‌تر از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مستقیم است. آزمون زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه‌ی طراحی شده، قادر به ردیابی هم‌زمان سه گونه‌ی بیمارگر شامل *P. melonis*، *P. drechsleri* و *P. nicotianae* بود. آزمایش‌ها نشان داد که آغازگرهای طراحی شده ابزاری کارآمدی برای ردیابی *P. melonis* در بافت گیاه، خاک و آب آلوده هستند.

کلیدواژه: اُمیکوتا، آغازگر اختصاصی، پوسیدگی ریشه، ردیابی، شناسایی

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: rmostofi@shirazu.ac.ir

۱. به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، استاد بیماری‌شناسی گیاهی و دانشیار اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز

Molecular Identification and Detection of *Phytophthora melonis* Based on Nuclear and Cytoplasmic Genome

S. M. Zolanvari¹, R. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa^{1*} and A. Dadkhodaie²

(Received: 12.4.2017; Accepted: 8.6.2017)

Abstract

The plant pathogen *Phytophthora melonis* is morphologically similar to some other non-papillate *Phytophthora* spp. especially *P. drechsleri* and therefore it is difficult to discriminate these convergent taxa. This study was performed to design specific primers based on nuclear and cytoplasmic genome, examine their specificity against other convergent species, and optimize the specific primers' conditions to detect *P. melonis*. Nine nuclear and four cytoplasmic genes were appropriate to design thirteen specific primers based on their nucleotide polymorphism. PCR conditions were optimized. *Phytophthora melonis* were detected by specific primers in inoculated plants such as cucumber, watermelon, melon, sugar beet and pistachio. All specific primers detected pathogen in 1:100 (pathogen: soil) inoculated soil. Up to 10 zoospores per milliliter were detected using nested polymerase chain reaction. ITS-MF1 and ITS-MR2 (ITS-M2 set, from internal transcribed spacers of rRNA gene) were selected as the most efficient primers based on their specificity and sensitivity. The optimized annealing temperature for this primer set was 68 °C. It seemed that nested PCR by ITS-M2 primer set together with the universal primers ITS6 and ITS4 as external primers is at least 10⁶ times more sensitive than simple PCR. Multiplex polymerase chain reaction simultaneously detected the three cucurbits' pathogens including *P. melonis*, *P. nicotianae* and *P. drechsleri*. This study showed that the designed primers could be effective tools for detection of *P. melonis* isolates from infected tissues, and infested water and soil.

Keywords: detection, identification, *Oomycota*, root rot, specific primers

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

1. Department of Plant Protection, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran, 7144165186.

2. Department of Crop Production and Plant Breeding, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran, 7144165186.

مقدمه

P. drechsleri دگر تال هستند و پیشنهاد کردند که *P. melonis* باید به عنوان هم‌نامی برای *P. drechsleri* مطرح شود. با این حال بررسی‌های مولکولی بر اساس ژنوم ریپوزمی نشان داد که جدایه‌هایی از جنس *Phytophthora* که از کدویان ایران جداسازی شده بودند همگی به گونه‌ی *P. melonis* تعلق دارند که قبلاً به اشتباه *P. drechsleri* شناسایی شده بودند (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa et al. 2012). خاستگاه این اشتباه در تشخیص، ناشی از صفات همگرایی ریخت‌شناختی و توانایی رشد هر دو گونه در ۳۵ درجه‌ی سلسیوس بوده است. رشد یا عدم رشد در ۳۵ درجه‌ی سلسیوس از ویژگی‌های ضروری در جداسازی گونه‌ی *P. drechsleri* و *P. melonis* از سایر گونه‌های *Phytophthora* به حساب می‌آید (Esmaili & Banihashemi 2008).

ویژگی‌هایی وجود دارد که به کمک آن‌ها می‌توان دو گونه‌ی *P. drechsleri* و *P. melonis* را از یکدیگر تفکیک کرد. جدایه‌های *P. drechsleri* منجر به مرگ گیاهچه‌های گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) می‌شوند، اما *P. melonis* روی گلرنگ بیماری‌زا نیست (Mirtalebi & Banihashemi 2006). به منظور تفکیک آزمایشگاهی جدایه‌های دو گونه‌ی *P. melonis* و *P. drechsleri* از معیار توانایی پوسیدگی صورتی در سیب‌زمینی نیز استفاده شده است. کلیه‌ی جدایه‌های *P. drechsleri* در غده‌ی سیب‌زمینی تولید پوسیدگی صورتی می‌کنند، در صورتی که هیچ‌کدام از جدایه‌های *P. melonis* قادر به تولید پوسیدگی صورتی نیستند (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa et al. 2005). این معیارها فقط قادر به تشخیص دو گونه‌ی مذکور از یکدیگرند و آن‌ها را از سایر گونه‌ها به خصوص گونه‌هایی که در برخی صفات همگرایی ریخت‌شناختی یا فیزیولوژیکی با آن‌ها اشتراک

گونه‌ی *Phytophthora melonis* Katsura از آمیست‌های بیمارگر گیاهی است که در گونه‌های مختلف کدویان (Cucurbitaceae)، پسته (*Pistacia vera* L.) و چغندر قند (*Beta vulgaris* L.) بیماری ایجاد می‌کند (Mirabolfathy et al. 2001; Mostowfizadeh-Ghalamfarsa et al. 2012). کاتسورا (Katsura 1968) نخستین بار گونه‌ی *P. melonis* را در ژاپن از گیاه خیار بیمار جداسازی کرد که افزون بر خیار، روی هندوانه و کدوتنبل نیز بیماری‌زا بود. پس از آن بیماری‌های مشابهی به شکل سرخشکیدگی و پوسیدگی ریشه و طوقه در کدویان مناطق مختلف از جمله مصر، ایران، ترکیه و چین گزارش شد. در خاورمیانه این بیمارگر به عنوان *P. drechsleri* (El-Helaly et al. 1968; Ershad & Mostowfipoor 1969; Maden & Karahan 1980; Banihashemi & Fatehi 1989) و در چین و تایوان به نام *P. melonis* گزارش شد (Lu & Gong 1982; Chang et al. 1983; Ho et al. 1984; Ho 1986). گونه‌ی *P. melonis* همچنین از باغ‌های پسته‌ی استان کرمان جداسازی و به عنوان یکی از عوامل اصلی انگومک پسته در ایران معرفی شده است (Mirabolfathy et al. 2001). دو گونه‌ی *P. drechsleri* و *melonis* بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی از یکدیگر قابل تفکیک نیستند. هو و همکاران (Ho et al. 1984) جدایه‌های *Phytophthora* از خیار را بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی به نام *P. drechsleri* شناسایی کردند. آن‌ها جدایه‌های خیار از ایران، ژاپن، تایوان و چین را تحت شرایط مشابه کشت داده و نتیجه گرفتند که *P. drechsleri* و *P. melonis* از نظر خصوصیات ریخت‌شناختی و فیزیولوژیکی مشابه هستند. آن‌ها عقیده داشتند که دو گونه *P. melonis* و *P.*

تشخیص *P. melonis* در ریشه‌ی گیاه بیمار، آب و خاک آلوده به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده و تودرتو^۶ و همچنین بررسی امکان ایجاد واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه^۷ برای ردیابی همزمان گونه‌های مختلف *Phytophthora* در کدو بیان است.

مواد و روش‌ها

فعال‌سازی، خالص‌سازی و نگه‌داری

در این پژوهش از جدایه‌های بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز استفاده شد (جدول ۱). برای فعال‌سازی جدایه‌ها از مایه‌زنی آن‌ها به میوه‌ی سیب استفاده شد. پس از آلوده شدن سیب، مرز بین بافت سالم و آلوده به محیط‌کشت CMA-PARP (Jeffers & Martin 1968) منتقل و برای خالص‌سازی از روش نوک‌ریسه استفاده شد. پس از رشد پرگنه‌های خالص، پرگنه‌ها به منظور تشخیص قطعی، مجدداً با استفاده از بذور شاهدانه، طعمه‌گذاری شد و مورد شناسایی قرار گرفت (Gallegly & Hong 2008). جدایه‌های خالص شده به لوله‌های حاوی محیط‌کشت CMA (عصاره‌ی ۴۰ گرم ذرت خرد شده، ۱۵ گرم آگار و آب مقطر تا حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر) منتقل و در ۱۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد (Mihail *et al.* 1992).

استخراج دی‌ان‌ای

جدایه‌ها ابتدا روی محیط‌کشت CMA کشت شدند. قطعاتی به قطر تقریبی پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی جوان پرگنه‌ها جدا شدند و به فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر عصاره‌ی سترون شده‌ی سیب‌زمینی (عصاره‌ی ۳۰۰ گرم سیب‌زمینی در یک لیتر آب،

دارند، تفکیک نمی‌کنند. از طرفی برخی از این ویژگی‌ها مانند پوسیدگی صورتی بستگی مستقیمی به دمای آزمون دارد (Mostowfzadeh-Ghalamfarsa *et al.* 2005). روش‌های موجود برای شناسایی و تفکیک این بیمارگرها وقت‌گیرند و از آن‌ها نمی‌توان در ردیابی بیمارگر در بافت، خاک و آب آلوده استفاده کرد. بنابراین استفاده از روش‌هایی که دقت، سرعت و پایداری لازم را دارند الزامی به نظر می‌رسد.

یکی از شیوه‌هایی که به کمک آن از خطای تشخیص سنتی می‌توان جلوگیری کرد، استفاده از مناطق حفاظت شده‌ی ژنومی است که علاوه بر مشخص کردن روابط فیلوژنتیکی بین گونه‌ها، به طراحی ابزار تشخیص مولکولی نیز کمک می‌کند. برای این منظور می‌توان از مناطق مختلف ژنوم هسته‌ای و سیتوپلاسمی استفاده کرد. برخی از مناطق حفاظت شده که برای گونه‌های مختلف *Phytophthora* دارای درون مایه‌ی تشخیصی و ردیابی بوده‌اند، مانند: فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی ژن آرانی^۱ ریوزومی^۱، خوشه‌ی ژنی زیرواحد یک و دو سیتوکروم سی اکسیداز، نواحی بین ژنی^۲ در دی‌ان‌ای میتوکندریایی و ژن پروتئین ذخیره‌ی Lpv، برای طراحی آغازگرهای اختصاصی استفاده شده است (Kong *et al.* 2003; Martin *et al.* 2004; Silvar *et al.* 2005; Schena & Cooke 2006)، اما به نظر می‌رسد از سایر نواحی حفاظت شده، مانند بتاتوبولین^۳، سازه‌ی امتداد ترجمه‌ی یک آلفا^۴ و ژن زیرواحد یک دی‌هیدروژناز^۵ دی‌ان‌ای^۵ نیز برای طراحی آغازگرهای اختصاصی برای تشخیص و ردیابی گونه‌های مختلف می‌توان استفاده کرد (Kroon *et al.* 2004).

هدف از این پژوهش طراحی آغازگرهای اختصاصی برای *P. melonis* بر اساس ژنوم هسته‌ای و میتوکندریایی و بهینه‌سازی شیوه‌ی استفاده از این آغازگرها برای

جدول ۱. فهرست جدایه‌های *Phytophthora spp.* استفاده شده در این پژوهشTable 1. List of *Phytophthora spp.* isolates used in this study

| Species | Isolate | Host | Location | Year of isolation |
|--------------------------|------------|---------------------------------|-------------|-------------------|
| <i>P. melonis</i> | PH-6.57.05 | <i>Cucumis sativus</i> | Ahwaz | 2002 |
| | PH-6.45.93 | <i>Cucumis sativus</i> | Bandar abas | 1993 |
| | PH-6.62.05 | <i>Cucumis sativus</i> | Fars | 2002 |
| | PH-6.52.03 | <i>Pistacia vera</i> | Rafsanjan | 2003 |
| | PH-6.64.05 | <i>Beta vulgaris</i> | Ahwaz | 2002 |
| | PH-6.61.05 | <i>Cucumis sativus</i> | Fars | 2002 |
| <i>P. arecae</i> | SCR18 | | | |
| <i>P. asparagi</i> | SCR21 | | | |
| <i>P. botryose</i> | SCR25 | | | |
| <i>P. cactorum</i> | SCR27 | <i>Rubus idaeus</i> | Wells | 1985 |
| <i>P. cambivora</i> | SCR67 | <i>Rubus idaeus</i> | Scotland | 1985 |
| <i>P. capsici</i> | 2-8-87 | | | |
| <i>P. cinnamomi</i> | SCR115 | <i>Chamaecyparis lawsoniana</i> | Netherlands | 1993 |
| <i>P. citricola</i> | SCR133 | <i>Rubus idaeus</i> | Scotland | 1989 |
| <i>P. citrophthora</i> | SCR179 | <i>Actinidia sp.</i> | China | 1989 |
| <i>P. cryptogea</i> | SCR204 | <i>Abies nobilis</i> | Ireland | |
| <i>P. drechsleri</i> | SCR236 | <i>Solanum tuberosum</i> | Argentina | 1949 |
| <i>P. erythroseptica</i> | SCR241 | <i>Solanum tuberosum</i> | Netherlands | |
| <i>P. gonapodyides</i> | SUC6 | | | |
| <i>P. hydropathica</i> | 1012 | | | |
| <i>P. inundata</i> | SCR644 | <i>Salix sp.</i> | Britain | |
| <i>P. irrigate</i> | 23J7 | | | |
| <i>P. katsurae</i> | SCR388 | | | |
| <i>P. meadii</i> | SCR400 | | | |
| <i>P. medicaginis</i> | 10-2-81 | | | |
| <i>P. melonis</i> | SCR455 | | | |
| <i>P. nicotianae</i> | SCR468 | <i>Citrus sp.</i> | Thrinadad | |
| <i>P. palmivora</i> | SCR526 | <i>Hevea brasiliensis</i> | Thailand | |
| <i>P. parsiana</i> | SUC25 | | | |
| <i>P. pistaciae</i> | 11-1-05 | | | |
| <i>P. quercina</i> | SCR541 | <i>Quercus robur</i> | Germany | |
| <i>P. ramorum</i> | Alex1 | <i>Rhododendron sp.</i> | Scotland | 2004 |
| <i>P. richardiae</i> | SCR551 | <i>Zantedeschia sp.</i> | Netherlands | |
| <i>P. sojae</i> | SCR555 | <i>Glycine max</i> | America | |
| <i>P. tropicalis</i> | 7Ga | | | |

ش—دند (& Mostowfizadeh-Ghalamfarsa 2011). استخراج دی‌ان‌ای از عصاره‌ی یاخته به دست آمده، با استفاده از کیت DNA™-PLUS (سیناژن، ایران) طبق شیوه‌نامه‌ی شرکت سازنده انجام گرفت. کمیت دی‌ان‌ای استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ مدل ام-دی ۱۰۰۰ (نانودراپ تکنولوژی، ایالت متحد آمریکا) در طول موج ۲۶۰ نانومتر بررسی شد.

(pH=۶/۲)، منتقل شدند، فلاسک‌ها به مدت پنج روز در تاریکی و ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. محتویات هر فلاسک در تشتک پتری سترون، خالی و پرگنه‌ها با استفاده از آب مقطر سترون شسته شد. میسلیم‌ها داخل لوله‌های اپندورف ۱/۵ میلی‌لیتری قرار گرفتند و پس از یخ زدن با نیترژن مایع، به مدت ۲۴ ساعت سرماخشک شدند. میسلیم سرماخشک شده‌ی هر جدایه با استفاده از هموزنایزر و چند دانه ماسه‌ی سترون به خوبی ساییده

طراحی آغازگرهای اختصاصی

ارسال شد.

برای حداکثر کردن میزان فزون‌سازی قطعه‌ی هدف و همچنین جلوگیری از تولید قطعات غیراختصاصی، شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بررسی شد. شرایطی از قبیل غلظت آغازگرها و $MgCl_2$ ، دمای هم‌جوشی^{۱۹}، زمان مراحل هم‌جوشی و گسترش^{۲۰}، تعداد چرخه‌های واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و غلظت ژل، بهینه‌سازی شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ۲۵ میکرولیتر واکنش شامل ۲/۵ میکرولیتر از بافر واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (۲۰۰ میلی‌مول Tris-HCl با pH=۸ و ۵۰۰ میلی‌مول KCl)، ۱۰۰ میکرومول از بی‌اس‌ای^{۲۱}، ۱۰۰ میکرومول از هر dNTPs، ۲/۵ میکرومول از $MgCl_2$ ، ۱ میکرومول از هر آغازگر، ۰/۴ واحد از Taq دی‌ان‌ای پلی‌مرز و ۱۰۰ نانوگرم از دی‌ان‌ای هدف انجام شد. (Mostowfizadeh & Ghalamfarsa & Mirsoleimani 2013). برای فزون‌سازی ژن‌های تک‌نسخه‌ای غلظت $MgCl_2$ تا سطح ۳/۵ مولار افزایش داده شد.

در این آزمون برای اطمینان از عدم آلودگی مواد مصرفی و واکنش‌ها، در هر دور آزمایش، نمونه‌ی شاهد فاقد دی‌ان‌ای به کار برده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای عمومی و اختصاصی طراحی شده انجام شد. چرخه‌های دمایی و میزان دما طبق گزارش طراحان آغازگرهای عمومی یا بر اساس آزمایش‌های انجام شده در مورد آغازگرهای اختصاصی تنظیم و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از دستگاه ترموسیکلر (Peltier Thermal cycler، انگلستان) انجام شد. بهترین دمای هم‌جوشی هر آغازگر با استفاده از شیب دمایی در اطراف T_m در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به دست آمد.

برای طراحی آغازگرهای اختصاصی گونه‌ی *P. melonis* ژن‌های مربوط به دو گروه ژن‌های هسته‌ای شامل بتا توبولین، دی‌ان‌ای ریبوزومی ۲۸ اس^۸، پروتئین ۱۰ ال ریبوزومی ۶۰ اس^۹، سازه‌ی امتداد ترجمه‌ی یک آلفا، اینولاز^{۱۰}، فاصله‌ی ترانویمی شده‌ی داخلی ژن آرانی ریبوزومی، پروتئین ۹۰ شوک حرارتی^{۱۱}، ژن تیگ ای^{۱۲} و الیستین^{۱۳}، و ژن‌های میتوکندریایی شامل خوشه‌ی ژنی زیرواحد یک و دو سیتوکروم سی اکسیداز، زیرواحد نه نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید دهیدروژناز^{۱۴}، پروتئین اس ده ریبوزومی چهل اس^{۱۵} و زیرواحد پیش‌پروتئین ترانس‌لوکاز غشایی^{۱۶} نامزد شدند (Cooke et al. 2000; Kroon et al. 2004; Blair et al. 2008; Martin et al. 2014).

توالی ژن‌های مورد نظر گونه‌های مختلف *Phytophthora* از بانک ژن استخراج شد. با استفاده از نرم‌افزار ClustalX (Thompson et al. 1997) ردیف‌سازی توالی‌های مختلف هسته‌ای و سیتوپلاسمی گونه‌ی مورد نظر انجام شد و آغازگرهای اختصاصی طراحی شدند. این ردیف‌سازی باید افزون بر نشان دادن تنوع بین گونه در گونه‌های مختلف *Phytophthora*، در برگیرنده‌ی دامنه‌ی تغییرات و تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای گونه‌های هدف نیز باشند. برای انتخاب آغازگرها، در میان ردیف‌های به دست آمده، نواحی یگانه، به صورت چشمی یا با نرم‌افزار Primer3 (Rozen & Skaletsky 2000) ردیابی شد، به نحوی که قطعه‌ی فزون‌سازی شده‌ی حاصل از دو آغازگر با اندازه‌ای بیش از ۱۰۰ جفت‌باز باشد. همچنین معیارهای طراحی آغازگر از قبیل دمای گداز^{۱۷}، خودجورشوندگی^{۱۸} و همچنین درصد G-C در نظر گرفته شد. پس از طراحی، اطلاعات آغازگرها برای ساخت به شرکت متابیون (آلمان)

تودرتو (ر.ک. ادامه‌ی مطلب) سنجیده شد.

ردیابی بیمارگر با استفاده از آغازگرها ردیابی در بافت آلوده‌ی گیاه

برای آزمون‌های بیماری‌زایی، از گیاهچه‌های دو هفته‌ای میزبان‌های مختلف شامل خیار (*Cucumis sativus* L.)، خربزه (*Cucumis melo* L.)، هندوانه (*Citrullus vulgaris* L.) و همچنین نهال‌های چهار هفته‌ای پسته (*Pistacia vera* L.) استفاده شد. گیاهچه‌ها با ورمیکولیت حاوی عصاره‌ی شاهدانه (۲۰۰ گرم ورمیکولیت و ۱۲۰ میلی لیتر عصاره‌ی ۶۰ گرم شاهدانه‌ی خرد شده در یک لیتر آب) و مایه‌زنی شده‌ی با *P. melonis*، مایه‌زنی شدند. پس از بیمار شدن گیاهچه‌ها، از بافت‌های آلوده و سالم گیاهچه‌ها پس از سرماخشک شدن مطابق روش پیش‌گفته استخراج دی‌ان‌ای صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده و تودرتو (ر.ک. ادامه‌ی مطلب) با استفاده از دی‌ان‌ای به دست آمده و آغازگرهای طراحی شده انجام شد.

ردیابی در خاک آلوده

برای بررسی امکان ردیابی مولکولی جدایه‌های بیمارگر در خاک، نمونه‌های خاک به نسبت وزنی یک به دو، چهار، ده و صد با میسلیم سرماخشک شده مخلوط شد. نمونه‌های نیم گرمی از خاک با ۵۰۰ میکرولیتر بافر سی‌تب^{۲۳} (۰/۱۲۱ گرم تریس، ۰/۰۷۴ گرم ای‌دی‌تی‌ای^{۲۴}، ۰/۸۱۸ گرم نمک‌طعام، ۰/۲ گرم سی‌تب، آب مقطر سترون تا حجم ۱۰ میلی‌لیتر) مخلوط شده، با استفاده از ماسه‌ی سترون، ساییده و یک‌دست شد. نمونه‌ها به مدت یک ساعت در ۶۵ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفته، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰ دور سانتی‌فیوژ شدند. پس از برداشتن ۲۰۰

موفقیت تکثیر با الکتروفورز در ژل آگارز ۱٪ در بافر ×۱ TBE (۱۰/۸ گرم تریس، ۰/۳۷ گرم EDTA، ۵/۵ گرم اسید بوریک، آب مقطر تا حجم یک لیتر) حاوی ۰/۰۵٪ اتیدیوم برمایید مورد بررسی قرار گرفت. نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در ژل آگارز به مدت یک ساعت و در ۸۰ ولت تأیید شد و قطعات دی‌ان‌ای زیر پرتو فرابنفش و با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری BIO-CAPT عکس برداری شد. اندازه‌ی نوارهای به دست آمده در مقایسه با یک نشانگر دی‌ان‌ای ۱۰۰ جفت‌بازی (Gene Ruler؛ فرمتاز، بریتانیا) تخمین زده شد.

ارزیابی اختصاصیت و حساسیت آغازگرها اختصاصیت آغازگرها

برای تعیین میزان اختصاصیت آغازگرها در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز از دی‌ان‌ای ژنومی گونه‌های مختلف *Phytophthora* استفاده شد (جدول ۱). این گونه‌ها معرف دامنه‌ای از تغییرات فیلوژنتیکی بین گونه‌ای در این جنس هستند و از روی قطعات به دست آمده از تکثیر آن‌ها با آغازگرهای اختصاصی، قضاوت نهایی صورت گرفت. میزان اختصاصیت آغازگرها همچنین به صورت درون-رایانه‌ای^{۲۲} با استفاده از برنامه‌ی PrimerBlast (Ye et al. 2012) در برابر مجموعه‌ی ژنومی موجود در بانک ژن (GenBank, NCBI, USA; [Online]) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) سنجیده شد.

حساسیت آغازگرها

غلظت‌های دقیقی از دی‌ان‌ای هدف به کمک میکرواسپکتروفوتومتري و با دامنه‌ی ۱۰۰ نانوگرم (۱۰^{-۹} گرم) تا ۱۰ فیکوگرم (۱۰^{-۱۵} گرم) تهیه و حساسیت آغازگرها با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده و

میکرولیتر از رانشین، استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از کیت DNGTM-PLUS (سینازن، ایران) و به روش توصیه شده توسط تولیدکننده انجام گرفت. رسوب دی‌ان‌ای در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر سترون حل و در ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگه‌داری شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده صورت گرفت (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Mirsoleimani 2013).

بررسی امکان استفاده از شیوه‌ی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو

برای بالا بردن ضریب ردیابی آغازگرهای طراحی شده، امکان استفاده از شیوه‌ی تودرتوی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به کمک آغازگرهای عمومی هسته‌ای و میتوکندریایی آمیست‌ها (جدول ۲) به‌عنوان آغازگر خارجی در یک واکنش مجزا و آغازگرهای اختصاصی به‌عنوان آغازگر داخلی در واکنش دوم ارزیابی شد. شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو مانند واکنش زنجیره‌ی پلیمرز ساده انتخاب گردید. حد سنجش و حساسیت روش با شیوه‌های پیش‌گفته ارزیابی شد.

بررسی امکان طراحی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه برای ردیابی آلودگی توأم گونه‌های بیمارگر

از آن‌جا که هر یک از کدوییان افزون بر *P. melonis* ممکن است مورد حمله‌ی چندین گونه از *Phytophthora* قرار بگیرند، یافتن روشی که بتواند به‌طور همزمان چند گونه‌ی بیمارگر را تشخیص دهد ضروری به نظر می‌رسد. بدین منظور امکان طراحی سیستمی از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه با استفاده از آغازگرهای منتخب بررسی شد. برای طراحی یک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه برای ردیابی گونه‌های *P. melonis*، *P. drechsleri* و *P. nicotianae* از آغازگرهای عمومی ITS4 و ITS6 (جدول ۲)، جفت آغازگرهای اختصاصی *P. melonis* شامل ITS-

جدایه‌ها روی محیط‌کشت HSA (عصاره‌ی ۶۰ گرم شاهدانه‌ی خرد شده، ۱۵ گرم آگار و آب مقطر تا حجم یک لیتر) کشت داده شد، پس از ظهور اسپورانژیوم، ۳۰ بلوک از حاشیه‌های فعال محیط‌کشت برداشته و برای ۲۴ تا ۳۰ ساعت در ۲۰ میلی‌لیتر از عصاره‌ی خاک سترون (۱۰۰ گرم خاک در یک لیتر آب مقطر و فیلتر شدن پس از ۲۴ ساعت در دمای اتاق) زیر نور فلورسان در دمای اتاق نگهداری شد. مخلوط زئوسپور برای جداسازی ریشه و آگار با کاغذ صافی، فیلتر شد. برای به دست آوردن محلول غلیظ زئوسپور، یک میلی‌لیتر از محلول اصلی در ریزلوله‌های اپندورف در ۱۰۰۰ دور در دقیقه برای یک دقیقه سانتریفیوژ گردید. زئوسپور با محلول لاکتوفنول کاتن بلو ۰/۱ درصد سیست شد و غلظت زئوسپور با استفاده از هموسیتمتر زیر میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۱۰۰× تعیین گردید. از محلول غلیظ زئوسپور سایر رقت‌ها (۱۰ تا ۱۰^۵) تهیه و به منظور استفاده از زئوسپورها برای استخراج دی‌ان‌ای محتوی درون هر لوله‌ی اپندورف مدت یک دقیقه ورتکس گردید تا زئوسپورها به سیست تبدیل شود. سپس رقت‌های تهیه شده با استفاده از روش سانتریفیوژ کردن برای استخراج دی‌ان‌ای مورد استفاده قرار گرفت (Kong

ردیابی در آب آلوده

۱۰۴

MF1 و ITS-MR2 (طراحی شده در این پژوهش)، جفت آغازگرهای اختصاصی *P. drechsleri* شامل ITS-DF2 (5' ITS-DR2 و (CTC TAT CAT GGC GAC CGC C 3' (5' CAC CAG TCC ATC CCG CCG 3') Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Banihashemi (2015) و همچنین جفت آغازگرهای اختصاصی *P. nicotianae* شامل PNF (5' CCA CCA CGC AGC) (AAA CTG CGG C 3' و PNR (5' TTG AGT ACC) (AGG CCG CTC GTA G 3' Kong et al. 2003) استفاده شد.

نتایج

طراحی آغازگر اختصاصی

از بین ژن‌های بررسی شده فاصله‌ی ترانویسی شده‌ی داخلی ژن آر‌ان‌ای ریبوزومی، اینولاز، ژن تیگ‌ای، پروتئین ۱۰ ال ریبوزومی ۶۰ اس، زیرواحد پیش‌پروتئین ترانس‌لوکاز غشایی، زیرواحد نیکوتین‌آمید آدنین دی‌نوکلئوتید دهیدروژناز برای طراحی آغازگر اختصاصی از نظر تفاوت نوکلئوتیدی ناحیه‌ی انتخاب شده برای طراحی آغازگر اختصاصی برای گونه‌ی *P. melonis* مناسب بودند. بر اساس این ژن‌ها سیزده آغازگر اختصاصی طراحی شد. نام و مشخصات آغازگرها در جدول ۳ و شرایط دمایی بهینه‌سازی شده برای هر جفت آغازگر در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در جدول ۴ آمده است.

میزان حساسیت آغازگرهای اختصاصی طراحی شده

حد نهایی و میزان حساسیت آغازگرها برای هر جفت آغازگر طراحی شده با استفاده از سری رقت‌های دی‌ان‌ای در جدول ۵ آمده است (شکل ۱). حساسیت واکنش

جدول ۲. آغازگرهای عمومی به کار رفته برای فرودسازی دی‌ان‌ای گونه‌های مختلف *Phytophthora*

Table 2. Universal primers used to amplify DNA of *Phytophthora* spp.

| Target DNA | Primer | Orientation | Primer sequence | Annealing | | Reference |
|---|--------|-------------|--------------------------------------|------------------|----------|----------------------|
| | | | | Temperature (°C) | Time (s) | |
| Internal transcribed spacers 1, 2 and 5.8S gene of rDNA | ITS6 | Forward | 5' GAA GGT GAA GTC GTA ACA AGG 3' | 55 | | Cooke et al. 2000 |
| | ITS4 | Reverse | 5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3' | | | White et al. 1990 |
| NADH dehydrogenase subunit 9 (<i>nad9</i>) | NAD9-F | Forward | 5' TAC AAC AAG AAT TAA TGA GAA C 3' | 61 | | Martin & Coffey 2012 |
| | NAD9-R | Reverse | 5' GTT AAA ATT TGT ACT ACT AAC AT 3' | | | |
| Preprotein translocase membrane subunit (<i>secY</i>) | SECY-F | Forward | 5' TCT ATC GTG TTT ACC AAT TTC 3' | 61 | | Martin 2008 |
| | SECY-R | Reverse | 5' TAA CAA ATG GAT CTT TAA AA 3' | | | |

جدول ۳. آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای شناسایی و ردیابی *Phytophthora melonis*

Table 3. The specific primers designed in this study for identification and detection of *Phytophthora melonis*

| Primer ^a | Primer sequence | orientation | Target DNA | Accession number ^b | Primer location ^c | Length (bp) |
|---------------------|-------------------------------------|-------------|------------|-------------------------------|------------------------------|-------------|
| ITS-MF1 | 5' TCC TCC TCG TGG GGA ACT G 3' | Forward | ITS | AY659672 | 134-152 | 19 |
| ITS-MR1 | 5' CGG TTC ACC AGC CCA TAC CA 3' | Reverse | ITS | AY659672 | 694-675 | 20 |
| ITS-MR2 | 5' CCA ATT GAG ATG CTA CCT CCA 3' | | | | 830-810 | 21 |
| TIG-MF1 | 5' GCC GCT GAG AAG ACG CGC A 3' | Forward | TIG | EU079717 | 532-550 | 19 |
| TIG-MR1 | 5' AAG GGC AAT GCC AGC GCT A 3' | Reverse | TIG | EU079717 | 1602-1584 | 19 |
| ENL-MF1 | 5' TGA CCG TTT CAT GGT CGA GG 3' | Forward | ENL | EU079714 | 192-210 | 20 |
| ENL-MR1 | 5' CGA CAC GCC CAG AAT GGC A 3' | Reverse | ENL | EU079714 | 285-267 | 19 |
| RPL-MF1 | 5' CAA CTT CCA CAT GCG CAT CCG C 3' | Forward | RPL | EU079711 | 234-255 | 22 |
| RPL-MR1 | 5' ACG RGC GGC GAC ACC CGA A 3' | Reverse | RPL | EU079711 | 369-351 | 19 |
| SEY-MF1 | 5' GAT TTT CAC AGA TAT AAT TCC C 3' | Forward | SEY | JF770772 | 372-393 | 22 |
| SEY-MR1 | 5' CAC CAC CAG ATA TGA TAA AT 3' | Reverse | SEY | JF770772 | 657-638 | 20 |
| ND9-MF1 | 5' GAT ATA TAA ATA CCG TTA CG 3' | Forward | NAD | JF771938 | 115-134 | 20 |
| ND9-MR1 | 5' CAT CCT GAT TTA AGA AGA 3' | Reverse | NAD | JF771938 | 604-587 | 18 |

^a ENL= Enolase; ITS= Internal transcribed spacers 1, 2 and 5.8S gene of rDNA; NAD= NADH dehydrogenase subunit 9; RPL= 60S ribosomal protein L10 gene; SEY= Preprotein translocase membrane subunit (secY); TIG= Triosephosphate isomerase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (tigA) gene; ^b Reference to the GenBank accession containing the DNA sequence, on which the primer is based. ^c Reference to the location of the primer within the original DNA sequence.

برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای گونه‌های مختلف *Phytophthora* در جدول ۶ نشان داده شده است. کلیدی آغازگرهای مختلف طراحی شده برای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با دی‌ان‌ای به دست آمده از جدایه‌های مختلف *P. melonis* قطعه‌ی مورد نظر را تولید کردند. از میان آغازگرهای طراحی شده، آغازگرهای ITS-M1 (مجموعه- ITS- MF1 و ITS- MR1)، ITS-M2 (مجموعه- ITS-

زنجیره‌ای پلیمرز ساده با آغازگرهای طراحی شده حداکثر بین یک نانوگرم تا یک پیکوگرم دی‌ان‌ای در میکرولیتر بود، در حالی که واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو توانست در دامنه‌ای بین یک پیکوگرم تا ۱۰ فمتوگرم دی‌ان‌ای در میکرولیتر را به کمک آغازگرهای طراحی شده ردیابی کند.

ارزیابی اختصاصیت آغازگرها

نتایج ارزیابی اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده

جدول ۴: شرایط بهینه‌سازی شده واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای شناسایی و ردیابی

*Phytophthora melonis***Table 4. Optimized PCR conditions of species-specific primers for identification and detection of *Phytophthora melonis***

| Primer ^a | Initial denaturation | Number of cycles | Denaturation | Annealing | Extension | Final Extension | Length (bp) ^b |
|---------------------|----------------------|------------------|--------------|-----------|-----------|-----------------|--------------------------|
| ITS-M1 | 95(120) ^c | 30 | 95(20) | 69(25) | 72(60) | 72(600) | 561 |
| ITS-M2 | 95(120) | 30 | 95(20) | 68(25) | 72(60) | 72(600) | 697 |
| TIG-M1 | 94(120) | 35 | 94(30) | 69(30) | 72(60) | 72(600) | 1071 |
| ENL-M1 | 94(120) | 35 | 94(30) | 69(30) | 72(60) | 72(600) | 94 |
| RPL-M1 | 94(120) | 35 | 94(30) | 69(30) | 72(60) | 72(600) | 136 |
| SEY-M1 | 94(120) | 35 | 94(30) | 59(30) | 72(60) | 72(600) | 286 |
| ND9-M1 | 94(120) | 35 | 94(30) | 55(30) | 72(60) | 72(600) | 490 |

^a ENL-M1= ENL MF1 & ENL-MR1; ITS-M1= ITS-MF1 & ITS-MR1; ITS-M2= ITS-MF1 & ITS-MR2; ND9-M1= ND9-MF1 & ND9-MR1; RPL-M1= RPL-MF1 & RPL-MR1; SEY-M1= SEY-MF1 & SEY-MR1; TIG-M1= TIG-MF1 & TIG-MR1.

^b Average amplicon length.

^c Temperature °C' (time 's').

جدول ۵: اثر کمیت دی‌ان‌ای الگو (در میکرولیتر نمونه) *Phytophthora melonis* بر کیفیت محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده و

تودرتو با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی

Table 5. The effect of *Phytophthora melonis* template DNA quantity (per µl sample) on simple and nested-PCR product quality using the species-specific primers.

| Primer sets ^a | DNA Quantity ^b | | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------------------|-------|------|--------|--------|-------|-------|------|--------|-------|
| | 100 ng | 10 ng | 1 ng | 500 pg | 100 pg | 50 pg | 10 pg | 1 pg | 100 fg | 10 fg |
| ITS-M1 | +++ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ITS-M2 | +++ | ++ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| TIG-M1 | +++ | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ENL-M1 | +++ | ++ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| RPL-M1 | +++ | ++ | - | - | - | - | - | - | - | - |
| SEY-M1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | + | - | - |
| ND9-M1 | +++ | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ | ++ | + | - | - |
| N ^c -ITS-M1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | + | + |
| N-ITS-M2 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| N-SEY-M1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ |
| N-ND9-M1 | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | - |

+++ = Very good. ++ = Good. + = Reasonable. - = No band.

^a ENL-M1= ENL MF1 & ENL-MR1; ITS-M1= ITS-MF1 & ITS-MR1; ITS-M2= ITS-MF1 & ITS-MR2; ND9-M1= ND9-MF1 & ND9-MR1; RPL-M1= RPL-MF1 & RPL-MR1; SEY-M1= SEY-MF1 & SEY-MR1; TIG-M1= TIG-MF1 & TIG-MR1.

^b ng = nano (10^{-9}) gram. pg = pico (10^{-12}) gram. fg = femto (10^{-15}) gram.

^c N= Nested PCR with corresponding universal primer pairs.

ارزیابی درون‌رایانه‌ای (PRL-MR1 و PRL-MF1)، مجموعه‌ی ژنومی موجود در بانک ژن نیز داده‌های به دست آمده از آزمایش‌ها را تأیید کرد.

ENL-MF1 (مجموعه‌ی ENL-M1، (ITS-MR2 و MF1 و ND9-MF1 (مجموعه‌ی ND9-M1، (ENL-MR1 و ND9-MR1 تنها گونه‌ی *P. melonis* را تکثیر کردند. به جز تکثیر کلیه‌ی گونه‌ها توسط PRL-M1 (مجموعه‌ی

جدول ۶. فزون‌سازی توالی‌های دی‌ان‌ای از گونه‌های مختلف *Phytophthora* با جفت‌آغازگرهای اختصاصی طراحی شده برای

Phytophthora melonis

Table 6. Amplification of *Phytophthora* spp. DNA with species-specific primers designed for *Phytophthora melonis*

| Species | Isolate | Primer sets ^a | | | | | | |
|--------------------------|--------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | ITS-M1 | ITS-M2 | TIG-M1 | ENL-M1 | RPL-M1 | SEY-M1 | ND9-M1 |
| <i>P. arecae</i> | SCR18 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. asparagi</i> | SCR21 | - | - | - | - | + | + | - |
| <i>P. botryosa</i> | SCR25 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. cactorum</i> | SCR27 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. cambivora</i> | SCR67 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. capsici</i> | 2-8-87 | - | - | + | - | + | - | - |
| <i>P. cinnamomi</i> | SCR115 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. citricola</i> | SCR165 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. citrophthora</i> | SCR179 | - | - | + | - | + | - | - |
| <i>P. cryptogea</i> | SCR204 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. drechsleri</i> | SCR236 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. erythrosetpica</i> | SCR241 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. gonapodyides</i> | SUC6 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. hydropathica</i> | 1012 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. infestance</i> | sc 03.26.3.3 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. inundata</i> | SCR644 | - | - | + | - | + | - | - |
| <i>P. irrigate</i> | 23J7 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. katsurae</i> | SCR388 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. meadii</i> | SCR400 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. medicaginis</i> | 10-2-81 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. melonis</i> | PH-6.57.05 | + | + | + | + | + | + | + |
| | PH-6.45.93 | + | + | + | + | + | + | + |
| | PH-6.62.05 | + | + | + | + | + | + | + |
| | PH-6.52.03 | + | + | + | + | + | + | + |
| | PH-6.64.05 | + | + | + | + | + | + | + |
| | PH-6.61.05 | + | + | + | + | + | + | + |
| <i>P. nicotianae</i> | SCR468 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. palmivora</i> | SCR526 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. parsiana</i> | SUC25 | - | - | + | - | + | - | - |
| <i>P. pistaciae</i> | 11-1-05 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. quercina</i> | SCR541 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. ramorum</i> | Alex1 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. richardiae</i> | SCR551 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. sojae</i> | SCR555 | - | - | - | - | + | - | - |
| <i>P. tropicalis</i> | 7Ga | - | - | - | - | + | - | - |

+ = Positive PCR product. - = Negative PCR product.

^a **ENL-M1**= ENL MF1 & ENL-MR1; **ITS-M1**= ITS-MF1 & ITS-MR1; **ITS-M2**= ITS-MF1 & ITS-MR2; **ND9-M1**= ND9-MF1 & ND9-MR1; **RPL-M1**= RPL-MF1 & RPL-MR1; **SEY-M1**= SEY-MF1 & SEY-MR1; **TIG-M1**= TIG-MF1 & TIG-MR1.

ردیابی بیمارگر در بافت آلوده گیاهی

واکنش زنجیره‌ای پلیمراس تودرتو موجب بهبود کیفیت بصری نوارهای آغازگرهای اختصاصی طراحی شده گردید.

به کمک آغازگرهای طراحی شده بیمارگر در بافت‌های آلوده‌ی میزبان‌های مختلف با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراس ساده ردیابی شد (جدول ۷ و شکل ۲). استفاده از

شکل ۱. نمونه‌ای از نقوش الکتروفورز حاصل از قطعات فزون‌سازی شده با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده (بالا) و تودرتو (پایین) با رقت‌های مختلف دی‌ان‌ای *Phytophthora melonis* با استفاده از آغازگرهای SEY-MR و SEY-MF. ۱- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی ۲ تا ۱۱- رقت دی‌ان‌ای *P. melonis* استفاده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برابر با ۱۰۰، ۱۰، ۱ نانوگرم، ۵۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۱۰، ۱ پیکوگرم، ۱۰۰ و ۱۰ فمتوگرم در میکرولیتر

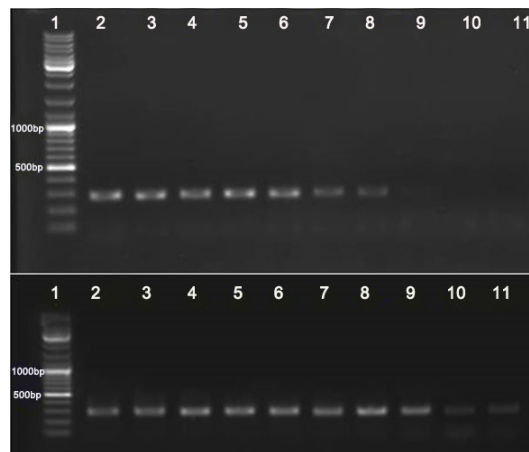
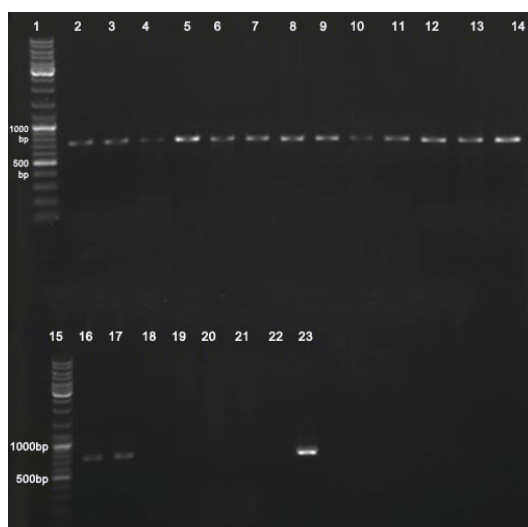


Fig 1. An example of the electrophoretic patterns of the fragments amplified by simple (above) and nested (bottom) PCR using SEY-MR and SEY-MF primers. 1: 100 bp DNA marker; 2-11: Serial dilutions of *Phytophthora melonis* DNA per μ l sample (100, 10 and 1 ng; 500, 100, 50, 10 and 1 pg; 100 and 10 fg)



شکل ۲. نمونه‌ای از نقوش الکتروفورز حاصل از ردیابی بیمارگر در بافت گیاهی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بافت‌های ریشه گیاهان آلوده مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Phytophthora melonis* با استفاده از آغازگرهای ITS-MR2 و ITS-MF1. ۱- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی ۲ تا ۴- بافت ریشه‌ی آلوده‌ی چغندر قند مایه‌زنی شده با جدایه‌های PH-6.52.03، PH-6.61.05 و PH-6.64.05 و PH-6.64.05 و PH-6.61.05. ۵ تا ۷- بافت ریشه‌ی آلوده‌ی هندوانه مایه‌زنی شده با جدایه‌های PH-6.52.03، PH-6.61.05 و PH-6.64.05. ۸ تا ۱۰- بافت ریشه‌ی آلوده‌ی خیار مایه‌زنی شده با جدایه‌ی PH-6.52.03، PH-6.61.05 و PH-6.64.05. ۱۱ تا ۱۳- بافت ریشه‌ی آلوده‌ی خربزه مایه‌زنی شده با جدایه‌های PH-6.52.03، PH-6.61.05 و PH-6.64.05. ۱۴- بافت ریشه‌ی آلوده‌ی پسته مایه‌زنی شده با جدایه‌ی PH-6.52.03. ۱۵- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی ۱۶ و ۱۷- بافت ریشه‌ی آلوده‌ی پسته مایه‌زنی شده با جدایه‌های PH-6.61.05 و PH-6.64.05. ۱۸ تا ۲۲- بافت سالم ریشه‌ی چغندر قند، هندوانه، خیار، خربزه و پسته ۲۳- شاهد مثبت، دی‌ان‌ای جدایه‌ی PH-6.52.03

Fig 2. An electrophoresis pattern example of *Phytophthora melonis* isolates detected in infected tissues of inoculated plants using PCR with ITS-MF1 and ITS-MR2 specific primers. 1: 100 bp DNA marker; 2-4: infected sugar beet roots inoculated by PH-6.52.03, PH-6.61.05, and PH-6.64.05 isolates; 5-7: infected watermelon roots inoculated by PH-6.52.03, PH-6.61.05, and PH-6.64.05 isolates; 8-10: infected cucumber roots inoculated by PH-6.52.03, PH-6.61.05, and PH-6.64.05 isolates; 11-13: infected melon roots inoculated by PH-6.52.03, PH-6.61.05, and PH-6.64.05 isolates; 14: infected pistachio roots inoculated by PH-6.52.03 isolate; 15: 100 bp DNA marker; 16-17: infected pistachio roots inoculated by PH-6.61.05, and PH-6.64.05 isolates; 18-22: healthy tissues of sugar beet, watermelon, cucumber, melon and pistachio roots; 23: positive control, DNA of PH-6.52.03 isolate

جدول ۷. ردیابی *Phytophthora melonis* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در گیاهان مختلف مایه‌زنی شده

Table 7. Detection of *Phytophthora melonis* using PCR species-specific primers in different inoculated plants

| Family | Common name | Scientific name | Isolate inoculated | PCR detection by | | | | |
|-----------------------|-------------|---------------------------|--------------------|------------------|--------|--------|--------|--------|
| | | | | ITS-M1 | ITS-M2 | ENL-M1 | ND9-M1 | SEY-M1 |
| <i>Anacardiaceae</i> | pistachio | <i>Pistacia vera</i> | PH-6.52.03 | + | +++ | ++ | + | + |
| | | | PH-6.61.05 | + | ++ | + | + | + |
| | | | PH-6.64.05 | ++ | ++ | + | + | + |
| <i>Chenopodiaceae</i> | sugar beet | <i>Beta vulgaris</i> | PH-6.52.03 | ++ | ++ | ++ | + | + |
| | | | PH-6.61.05 | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| | | | PH-6.64.05 | ++ | ++ | ++ | ++ | + |
| <i>Cucurbitaceae</i> | watermelon | <i>Citrullus vulgaris</i> | PH-6.52.03 | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| | | | PH-6.61.05 | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| | | | PH-6.64.05 | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| | melon | <i>Cucumis melo</i> | PH-6.52.03 | +++ | +++ | ++ | ++ | +++ |
| | | | PH-6.61.05 | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ |
| | | | PH-6.64.05 | +++ | +++ | ++ | +++ | +++ |
| | cucumber | <i>Cucumis sativus</i> | PH-6.52.03 | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| | | | PH-6.61.05 | ++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| | | | PH-6.64.05 | +++ | ++ | + | +++ | ++ |

+++ = Very good; ++ = Good; + = Reasonable.

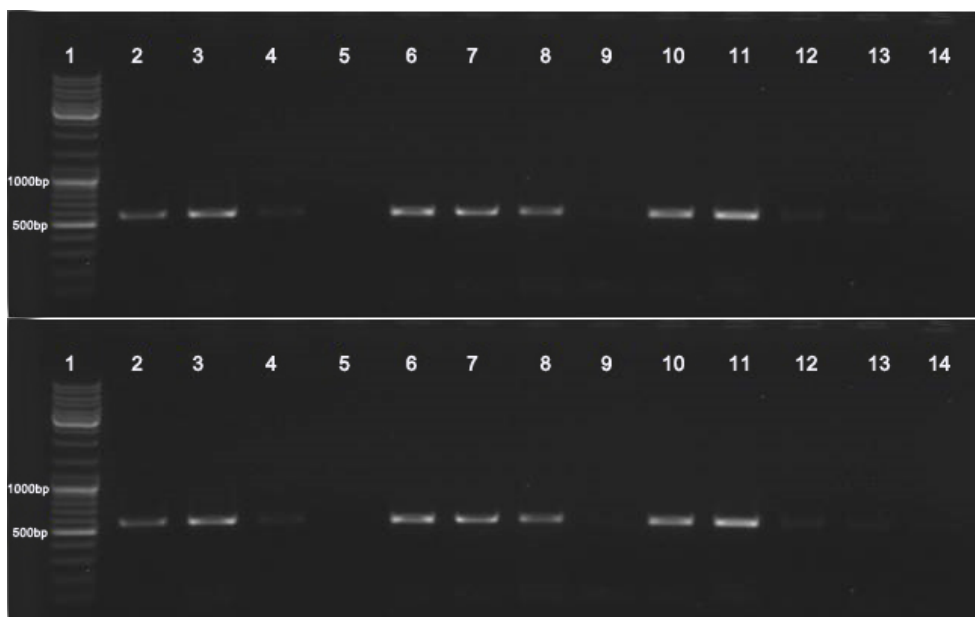
^a **ENL-M1**= ENL MF1 & ENL-MR1; **ITS-M1**= ITS-MF1 & ITS-MR1; **ITS-M2**= ITS-MF1 & ITS-MR2; **ND9-M1**= ND9-MF1 & ND9-MR1; **SEY-M1**= SEY-MF1 & SEY-MR1.

ردیابی بیمارگر از آب آلوده

پس از تهیه‌ی رقت‌های مختلف از سوسپانسیون زئوسپور از $10^5 \times 7$ تا 10^7 زئوسپور در هر میلی‌لیتر، مراحل اولیه استخراج دی‌ان‌ای با استفاده از روش سانتریفیوژ کردن سوسپانسیون زئوسپور انجام شد. نتایج ردیابی غلظت‌های مختلف زئوسپور واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده و تودرتو در جدول ۸ آمده است. با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده و آغازگرهای عمومی آن‌ها در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو زئوسپورهای بیمارگر تا غلظت 10^7 زئوسپور در میلی‌لیتر در آب آلوده ردیابی شد.

ردیابی بیمارگر در خاک مایه‌زنی شده با جدایه‌های *P. melonis*

پس از استخراج دی‌ان‌ای از نسبت‌های یک به دو، چهار، ده و صد مخلوط بیمارگر و خاک، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده برای همه‌ی نمونه‌ها و نیز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو برای نمونه‌هایی که نوار آن‌ها در ژل الکتروفورز وضوح کمی داشتند و یا بدون نوار بودند، انجام و بیمارگر ردیابی شد (شکل ۳). با استفاده از همه‌ی آغازگرهای طراحی شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو تا سطح یک درصد وزنی مایه‌ی بیماری‌زا در خاک آلوده ردیابی شد.



شکل ۳. نمونه‌ای از نقوش الکتروفورز حاصل از ردیابی جدایه‌های *Phytophthora melonis* در خاک مایه‌زنی شده با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده با آغازگرهای ITS-MR1 و ITS-MF1.
 ۱- نشانگر مولکولی ۱۰۰ جفت‌بازی ۲ تا ۵- خاک آلوده‌ی مایه‌زنی شده با جدایه‌ی PH-6.52.03 به نسبت یک به یک، یک به چهار، یک به ده و یک به صد؛ ۶ تا ۹- خاک آلوده‌ی مایه‌زنی شده با جدایه‌ی PH-6.61.05 به نسبت یک به یک، یک به چهار، یک به ده و یک به صد؛ ۱۰ تا ۱۳- خاک آلوده‌ی مایه‌زنی شده با جدایه‌ی PH-6.64.05 به نسبت یک به یک، یک به چهار، یک به ده و یک به صد ۱۴- شاهد منفی، آب مقطر.

Fig 3. An electrophoresis pattern example of *Phytophthora melonis* isolates detected in infested soil using PCR with ITS-MF1 and ITS-MR2 specific primers. 1: 100 bp DNA marker; 2-5: inoculated soil by PH-6.52.03 isolate with a ratio of 1:1, 1:4, 1:10, and 1:100; 6-9: inoculated soil by PH-6.61.03 isolate with a ratio of 1:1, 1:4, 1:10, and 1:100; 10-13: inoculated soil by PH-6.64.03 isolate with a ratio of 1:1, 1:4, 1:10, and 1:100; 14: negative control, distilled water.

آزمون زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه

بحث

پژوهش‌های پیشین نشان دادند که *P. melonis* گونه‌ای یکنواخت است و تنوع درون گونه‌ای قابل توجهی در سطح مولکولی بین جدایه‌های کدویان یا در مقایسه با جدایه‌هایی از سایر میزبان‌ها وجود ندارد (Mostowfizadeh-Ghalamfarsa & Banhashemi 2012). از طرفی روش‌های سنتی بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی برای تشخیص گونه‌های *Phytophthora* بسیار وقت‌گیرند و به مهارت بسیار زیادی در تمایز بین

برای طراحی واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه برای ردیابی هم‌زمان گونه‌های *P. melonis*، *P. drechsleri* و *P. nicotianae*، با بررسی‌های انجام شده دمای هم‌جوشی ۶۸ درجه‌ی سلسیوس در نظر گرفته شد. با کاربرد توأم آغازگرهای استفاده شده و دمای هم‌جوشی به دست آمده، در هر نمونه بسته به دی‌ان‌ای قالب موجود در آن نوار اختصاصی دیده شد (جدول ۹). نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه در نمونه‌های شاهد منفی بود.

melonis بر اساس ژن‌های هسته‌ای و میتوکندریایی ۱۳ آغازگر اختصاصی طراحی شد و خصوصیات آن‌ها بهینه‌سازی گردید. قبل از استفاده از آغازگرهای طراحی شده بعضی ویژگی‌های ساختاری و شیمیایی که در کارایی آن‌ها مؤثر بود از جمله درصد *G-C*، دمای T_m ، طول محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، تشکیل ساختار ثانویه، تعداد *G-C* در انتهای ۳' و طول آغازگر بررسی شدند.

آزمایش‌ها نشان داد که جفت آغازگرهای TIG-M1 (مجموعه‌ی TIG-F1 و TIG-R1) و RPL-M1 (مجموعه‌ی RPL-F1 و RPL-R1) برای *P. melonis* اختصاصی نیستند. جفت آغازگر TIG-M1 علاوه بر *P. melonis* گونه‌های *P. citrophthora*، *P. capsici*، *P. inundata* و *P. parsiana* را نیز ردیابی کرد. گرچه ارزیابی‌های اولیه با استفاده از توالی‌های ژنومی بانک ژن جفت آغازگر RPL-M1 را مناسب نشان داد، نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در تمام گونه‌های *Phytophthora* مثبت بود. این احتمال وجود دارد که تعداد اندک نوکلئوتیدهای اختصاصی جفت آغازگر TIG-M1 موجب چنین پدیده‌ای شده باشد.

جفت آغازگر SEY-M1 علاوه بر *P. melonis*، *P.*

جدول ۸. ردیابی *Phytophthora melonis* (جدایه‌ی PH-6.64.05) در سوسپانسیون زئوسپور با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده و تودرتو با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی

Table 8. Detection of *Phytophthora melonis* (isolate PH-6.64.05) in zoospore suspension with simple and nested-PCR using species-specific primers

| Primer sets ^a | Zoospore concentration (ml ⁻¹) | | | | | |
|--------------------------|--|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|
| | 7 × 10 ⁵ | 7 × 10 ⁴ | 10 ⁴ | 10 ³ | 10 ² | 10 |
| ITS-M1 | ++ | - | - | - | - | - |
| ITS-M2 | ++ | ++ | - | - | - | - |
| ENL-M1 | ++ | + | - | - | - | - |
| SEY-M1 | ++ | + | - | - | - | - |
| ND9-M1 | + | - | - | - | - | - |
| N ^b -ITS-M1 | +++ | +++ | + | + | + | + |
| N-ITS-M2 | ++ | ++ | ++ | ++ | + | + |
| N-SEY-M1 | +++ | ++ | + | + | + | + |
| N-ND9-M1 | ++ | + | - | - | - | - |

+++ = Very good; ++ = Good; + = Reasonable; - = No band.

^a ENL-M1= ENL MF1 & ENL-MR1; ITS-M1= ITS-MF1 & ITS-MR1; ITS-M2= ITS-MF1 & ITS-MR2; ND9-M1= ND9-MF1 & ND9-MR1; SEY-M1= SEY-MF1 & SEY-MR1; TIG-M1= TIG-MF1 & TIG-MR1.

^b N= Nested PCR with corresponding universal primer pairs.

گونه‌ها نیاز دارند. بنابراین شناسایی مولکولی *P. melonis* و طراحی آغازگرهای اختصاصی برای تشخیص جدایه‌های آن رهیافتی منطقی به نظر می‌رسد.

برای طراحی آغازگرهای اختصاصی گونه‌ی *P.*

جدول ۹. نتایج آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه با استفاده از جفت‌آغازگرهای اختصاصی گونه‌های *Phytophthora*

P. drechsleri و *P. melonis*، *P. nicotianae*

Table 9. Multiplex PCR results using *Phytophthora drechsleri*, *P. melonis* and *P. nicotianae* species-specific primers

| DNA | Specific band | | | |
|---|---|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| | ca 900 bp ITS <i>Phytophthora</i> spp. | 567 bp <i>P. drechsleri</i> | 697 bp <i>P. melonis</i> | 239 bp <i>P. nicotianae</i> |
| <i>P. drechsleri</i> | + | + | - | - |
| <i>P. melonis</i> | + | - | + | - |
| <i>P. nicotianae</i> | + | - | - | + |
| <i>P. drechsleri</i> + <i>P. melonis</i> | + | + | + | + |
| + <i>P. nicotianae</i> | + | + | + | + |
| <i>P. capsici</i> (control) | + | - | - | - |
| Distilled water | - | - | - | - |

+ = Positive reaction; - = No band.

اختصاصیت آغازگر PmY1F و PmY1R روی گونه‌های همگرا مثل *P. drechsleri* و *P. pistaciae* و حتی سایر گونه‌های تبار ۷ گونه‌های *Phytophthora* (Martin et al. 2014) سنجیده نشده است.

آزمون جفت آغازگرهای طراحی شده به خصوص جفت آغازگر برگزیده ITS-M2 نشان داد که به خوبی دی‌ان‌ای بیمارگر را در بافت گیاه میزبان ردیابی می‌کنند. در اکثر موارد استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو موجب بهبود کیفیت نوارهای قابل مشاهده در ژل آگارز شد. استفاده از این روش به دلیل ردیابی غلظت‌های پایین بیمارگر در بافت میزبان می‌تواند به عنوان یک هشدار زود هنگام در نظر گرفته شود. با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو با آغازگرهای برگزیده تا غلظت ۱۰ ژئوسپور در میلی‌لیتر *P. melonis* ردیابی شد. بونانت و همکاران (Bonants et al. 1997) با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو توانستند *P. fragariae* را از نمونه‌ی آب آلوده تا رقت ۲۰ ژئوسپور در میلی‌لیتر ردیابی کنند در حالی که لوس و همکاران (Loos et al. 2005) *P. alni* را تا رقت ۱۹۰ ژئوسپور در ۵۰ میلی‌لیتر آب آلوده‌ی رودخانه ردیابی کردند.

استفاده از واکنش پلیمرز چندگانه نشان داد که آغازگرهای برگزیده *P. melonis* به سهولت می‌توانند همراه با سایر آغازگرهایی که دمای هم‌جوشی نزدیک دارند، استفاده شده و شناسایی خود را به خوبی انجام دهند. استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه در مورد سایر گونه‌های *Phytophthora* و برای انواع زیست‌بوم‌های کشاورزی و طبیعی نیز گزارش شده است (Winton & Hansen 2001; Martin et al. 2004; Langrell et al. 2011; Li et al. 2011).

نواحی آی‌تی‌اس دارای تنوع بین‌گونه‌ای مناسبی برای

asparagi را نیز ردیابی کرد. با این حال این دو گونه در یک تبار قرار ندارند (*P. melonis* در تبار ۷ و *P. asparagi* در تبار ۶ گونه‌های *Phytophthora* قرار دارند) و ویژگی‌های ریخت‌شناختی این دو گونه نیز مشابه نیست. بنابراین استفاده از این مجموعه منطقی به نظر می‌رسد. در میان آغازگرهای طراحی شده، بالاترین میزان حساسیت را آغازگر ITS-M2 داشت و توانست *P. melonis* را تا رقت ۱۰ نانوگرم در میکرولیتر در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده تا رقت ۱۰ فمتوگرم در میکرولیتر با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو ردیابی کند.

چن و همکاران (Chen et al. 2013) نیز *P. melonis* را با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو و با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی PmY1F و PmY1R از بافت خیار و خاک آلوده تا رقت ۱۰ فمتوگرم بر میکرولیتر ردیابی کردند. آن‌ها برای طراحی این آغازگر اختصاصی از ژن Ypt1 استفاده کردند. اطلاعات ژن Ypt1 در مورد سایر گونه‌های *Phytophthora* وجود ندارد و تاکنون هیچ‌گونه مطالعات فیلوژنتیکی هم روی این ژن انجام نشده است. از طرف دیگر ژن Ypt1 تک‌نسخه‌ای است و احتمال تکثیر و به تبع آن حساسیت آغازگرهای طراحی شده بر اساس آن کم‌تر از ژن‌های چند نسخه‌ای مانند توالی‌های آی‌تی‌اس است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ساده با

PmY1F و PmY1R قادر به ردیابی رقت ۱۰ پیکوگرم بر میکرولیتر است و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو با این آغازگرها ۱۰ فمتوگرم بر میکرولیتر را ردیابی می‌کند. این در حالی است که آغازگرهای SEY-M1 و NAD9-M1 طراحی شده در این پژوهش بیمارگر را با واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تا رقت ۱ پیکوگرم بر میکرولیتر و آغازگرهای ITS-M2 و SEY-M1 در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز تودرتو تا رقت ۱۰ فمتوگرم بر میکرولیتر ردیابی کردند.

دومرحله‌اى (Grote et al. 2002; Silvar et al. 2005) امکان‌پذیر شده است. از طرفى دو ناحیه‌ى فاصله‌ى ترانویسى شده‌ى داخلى ژن آرناى ریبوزومى و زیرواحد یک سیتوکروم سی اکسیداز، به عنوان توالى بارکد برای گونه‌هاى *Phytophthora* پیشنهاد شده‌اند (Robideau et al. 2011). بنابراین برترى این دو ناحیه در تحقیق حاضر برای ابداع نشانگرهاى مولکولى برگزیده موجه به نظر مى‌رسد.

امروزه پیشرفت‌هاى قابل ملاحظه‌اى در زمینه‌ى ابداع نشانگرهاى مولکولى رخ داده است. ژن‌هاى خانه‌دارى^{۲۵} به دلیل ثبات در سطح درون‌گونه‌اى، ابزار مناسبى برای طراحی و ساخت نشانگرهاى تشخیصى اختصاصى گونه هستند. از این رو ابداع روش‌هاىی برای دستیابى راحت‌تر به دى‌ان‌اى بیمارگر، دسترسی به روش‌هاىی با تجهیزات تخصصى و مهارت‌هاى فنى کم‌تر سبب افزایش فرصت‌ها برای استفاده گسترده‌تر از فن‌آوری‌هاى نوین مانند نشانگرهاى مولکولى خواهد شد. آزمون آغازگرهاى طراحی شده در این تحقیق در شرایط طبیعى و با استفاده از بافت گیاهان آلوده در مزرعه نیز مى‌تواند به ارزیابى کارایى و دقت ابزار تولید شده کمک کند.

تکثیر (Cooke et al. 1996; Cooke & Duncan 1997) و یا دورگ شدن (Lee et al. 1993) هستند. این ناحیه به صورت توأم از نواحى بسیار حفاظت شده و متغیر تشکیل شده و برای مقایسه‌هاى درون و بین‌گونه‌اى مناسب است. به نظر مى‌رسد در هر گونه این ناحیه بسیار مجزا و تک‌ریخت باشد به همین دلیل ابزار مناسبى برای موجوداتى مانند شاخه‌ى Oomycota محسوب مى‌شود (Drenth et al. 2006). از طرفى تعداد نسخه‌ى فراوان در ژنوم (بین ۱۰۰ تا ۲۰۰) موجب بالا رفتن حساسیت آن هنگام استفاده به عنوان نشانگر ردیابى مى‌گردد. به همین دلیل جفت آغازگرهاى برگزیده در این پژوهش بر اساس این ناحیه بوده‌اند. تاکنون پژوهش‌هاى قابل توجهى استفاده از این نواحى ژنومى را برای طراحی و ساخت آغازگرهاى اختصاصى گزارش کرده‌اند (مثلاً: Bonants et al. 1997; Drenth et al. 1999; Grote et al. 2002; Ippolito et al. 2002). همچنین استفاده از شیوه‌ى واکنش زنجیره‌اى پلیمرز تودرتو به کمک آغازگرهاى عمومى مبتنى بر دى‌ان‌اى ریبوزومى در آمیست‌ها مانند آغازگرهاى DC6/ITS (Cooke et al. 2000) و PHYTO (Silvar et al. 2005) یا آغازگر عمومى *Phytophthora* spp. (al. 2000) به دو روش یک‌مرحله‌اى و (Cooke & Duncan 1997)

منابع

- Banihashemi, Z., and Fatehi, J. 1989. Reaction of cucurbit cultivars to *Phytophthora drechsleri* and *P. capsici* in greenhouse. In Proceedings of the 9th Iranian Plant Protection Congress, (pp. 9-14). Mashhad, Iran.
- Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S. Y., Geiser, D. M., and Kang, S. 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. *Fungal Genetics and Biology* 45(3):266-277.
- Bonants, P., Hagenaar-de Weerd, M., van Gent-Pelzer, M., Lacourt, I., Cooke, D., and Duncan, J. 1997. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction. *European Journal of Plant Pathology* 103(4):345-355.
- Chang, H. S. 1983. Crop diseases incited by *Phytophthora* fungi in Taiwan. *Plant Protection Bulletin, Taiwan* 25(4):231-237.
- Chen, Q., Li, B., Liu, P., Lan, C., Zhan, Z., and Weng, Q. 2013. Development and evaluation of specific PCR and LAMP assays for the rapid detection of *Phytophthora melonis*. *European Journal of Plant Pathology* 137(3):597-607.

- Cooke, D. E. L., Drenth, A., Duncan, J. M., Wagels, G., and Brasier, C. M. 2000. A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related *oomycetes*. *Fungal Genetics and Biology* 30(1):17-32.
- Cooke, D. E. L., Kennedy, D. M., Guy, D. C., Russell, J., Unkles, S. E., and Duncan, J. M. 1996. Relatedness of group I species of *Phytophthora* as assessed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPDs) and sequences of ribosomal DNA. *Mycological Research* 100(3):297-303.
- Cooke, D. E., and Duncan, J. M. 1997. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on ITS1 and ITS2 sequences of the ribosomal RNA gene repeat. *Mycological Research* 101(06):667-677.
- Drenth, A., Wagels, G., Irwin, J. A. G., Liew, E. C. Y., and Maclean, D. J. 1999. DNA based methods for the detection of *Phytophthora* species. Australia Patent Number 16330/97.
- Drenth, A., Wagels, G., Smith, B., Sendall, B., O'Dwyer, C., Irvine, G., and Irwin, J. A. G. 2006. Development of a DNA-based method for detection and identification of *Phytophthora* species. *Australasian Plant Pathology* 35(2):147-159.
- El-Helaly, A. F., Assawah, M. W., Elarosi, H. M., and Wasfy, E. E. H. 1968. Fruit rots of vegetable marrow in Egypt (United Arab Republic). *Phytopathologia Mediterranea* 7:107-115.
- Ershad, J., and Mostofipour, P. 1969. Root rot of cucurbits in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 5:38-45.
- Esmaili, S. E., and Banihashemi, Z. 2008. The role of *phytophthora melonis* and *P. drechsleri* in cucurbit root rot in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 44:54-72.
- FAOSTAT. 2013. FAO Statistics Division 2012. Retrieved from <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>, 01 May 2014.
- Gallegly, M.E., ChuanXue, H. and Hong, C. 2008. *Phytophthora*: identifying species by morphology and DNA fingerprints. APS Press, 158 pp. USA.
- Grote, D., Olmos, A., Kofoet, A., Tuset, J. J., Bertolini, E., and Cambra, M. 2002. Specific and sensitive detection of *Phytophthora nicotianae* by simple and nested-PCR. *European Journal of Plant Pathology* 108(3):197-207.
- Ho, H. H. 1986. *Phytophthora melonis* and *P. sinensis* synonymous with *P. drechsleri* *Mycologia* 78:907-912.
- Ho, H. H., Jiayun, L., and Longyin, G. 1984. *Phytophthora drechsleri* causing blight of *Cucumis* species in China. *Mycologia* 76:115-121.
- Ippolito, A., Schena, L., and Nigro, F. 2002. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus roots and soils by nested PCR. *European Journal of Plant Pathology* 108(9):855-868.
- Jeffers, S.N. and Martin, S.B. 1968. Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. *Plant Disease* 70:1035-1043.
- Katsura, K. 1968. On *Phytophthora melonis* n. sp. of cucumber. *Annals of Phytopathological Society of Japan* 34:167.
- Kong, P., Hong, C. X., and Richardson, P. A. 2003. Rapid detection of *Phytophthora cinnamomi* using PCR with primers derived from the Lpv putative storage protein genes. *Plant Pathology* 52(6):681-693.
- Kroon, L. P. N. M., Bakker, F. T., Van Den Bosch, G. B. M., Bonants, P. J. M., and Flier, W. G. 2004. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Fungal Genetics and Biology* 41(8):766-782.
- Langrell, S. R., Morel, O., and Robin, C. 2011. Touchdown nested multiplex PCR detection of *Phytophthora cinnamomi* and *P. cambivora* from French and English chestnut grove soils. *Fungal Biology* 115(7):672-682.
- Lee, S. B., White, T. J., and Taylor, J. W. 1993. Detection of *Phytophthora* species by oligonucleotide hybridization to amplified ribosomal DNA spacers. *Phytopathology* 83(2):177-181.
- Li, M., Asano, T., Suga, H., and Kageyama, K. 2011. A multiplex PCR for the detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and a survey of their occurrence in strawberry production areas of Japan. *Plant Disease* 95(10):1270-1278.
- Loos, R., Husson, C., Andrieux, A., and Frey, P. 2005. SCAR-based PCR primers to detect the hybrid pathogen *Phytophthora alni* and its subspecies causing alder disease in Europe. *European Journal of Plant Pathology* 112(4):323-335.
- Lu, J. Y., and Gong, L. Y. 1982. Studies on identification and biological characters of the causal organism of cucumber blight in Nanjing. *Journal of Nanjing Agriculture College* 3:23-38.
- Maden, S., and Karahan, O. 1980. New root and foot-rot disease of melons (*Phytophthora dreschsleri* Tucker) in central Anatolia and its pathogenicity on common melon cultivars in this region. *Journal of Turkish*

- Phytopathology 9:49-55.
- Martin, F. N. 2008. Mitochondrial haplotype determination in the oomycete plant pathogen *Phytophthora ramorum*. *Current Genetics* 54(1):23-34.
- Martin, F. N., and Coffey, M. D. 2012. Mitochondrial haplotype analysis for differentiation of isolates of *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 102(2):229-239.
- Martin, F. N., Blair, J. E., and Coffey, M. D. 2014. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. *Fungal Genetics and Biology* 66:19-32.
- Martin, F. N., Tooley, P. W., and Blomquist, C. 2004. Molecular detection of *Phytophthora ramorum*, the causal agent of sudden oak death in California, and two additional species commonly recovered from diseased plant material. *Phytopathology* 94(6):621-631.
- Mihail, J. D., Rush, C. M., Singleton, L. L., Edited by Larry, L. S., Jeanne, D. M., and Charles, M. R. 1992. *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi*. St. Paul, MN, USA: APS Press.
- Mirabolfathy, M., Cooke, D. E., Duncan, J. M., Williams, N. A., Ershad, D., and Alizadeh, A. 2001. *Phytophthora pistaciae* sp. nov. and *P. melonis*: the principal causes of pistachio gummosis in Iran. *Mycological Research* 105(10):1166-1175.
- Mirtalebi, M., and Banihashemi, Z. 2006. Reaction of safflower cultivars to *Phytophthora drechsleri* and *P. melonis*. In *Proceedings of the 17th Iranian Plant Protection Congress*, (p. 262). Karaj, Iran.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. 2011. *Molecular phylogenetics of Phytophthora cryptogea and P. drechsleri: a multiple gene genealogy approach*. Germany: Lambert Academic.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., and Banihashemi, Z. 2012. A revision of Iranian *Phytophthora drechsleri* isolates from cucurbits based on multiple gene genealogy analysis. In *Proceedings of the 20th Iranian Plant Protection Congress*, (p. 399). Shiraz, Iran.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., and Banihashemi, Z. 2015. Species-specific PCR identification and detection of *Phytophthora drechsleri*, *P. cryptogea* and *P. erythroseptica*. *Iranian Journal of Plant Pathology* 51(4):541-553.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., and Mirsoleimani, Z. 2013. Species-specific identification and detection of *Phytophthora pistaciae*, the causal agent of pistachio gummosis. *Phytopathologia Mediterranea* 52(1):30-45.
- Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R., Banihashemi, Z., and Cooke, D. E. L. 2005. Potato pink rot: a criterion for discrimination of *Phytophthora melonis* from *P. drechsleri*. *Iranian Journal of Plant Pathology* 41:191-201.
- Robideau G.P., de Cock A.W.A.M., Coffey M.D., Volgmayr H., Brouwer H., Bala K., Chitty D.W., Desaulniers N., Eggertson Q.A., Gachon C.M., Hu C.H., Kupper F.C., Rintoul T.L., Sarhan E., Verstappen E. C., Zhang Y., Bonants P. J., Ristaino J. B. and Lévesque A. C. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources* 11:1002-1011.
- Rozen, S., and Skaletsky, H. 1999. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols* 132:365-386.
- Schena, L., and Cooke D. E. L. 2006. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a "molecular tool box" for the detection and characterization of *Phytophthora* species. *Journal Microbiology Methods* 67:70-85.
- Silvar, C., Duncan, J. M., Cooke, D. E. L., Williams, N. A., Díaz, J., and Merino, F. 2005. Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. *European Journal of Plant Pathology* 112(1):43-52.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. 1997. The CLUSTAL-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25(24):4876-4882.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., and Taylor, J. W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., & White T.J. (Eds.), *PCR protocols: a guide to methods and applications*, (pp. 315-322). Academic Press, Inc., New York. USA.
- Winton, L. M., and Hansen, E. M. 2001. Molecular diagnosis of *Phytophthora lateralis* in trees, water, and foliage baits using multiplex polymerase chain reaction. *Forest Pathology* 31(5):275-283.
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., and Madden, T. L. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13(1):1.

پی‌نوشت‌ها

- 1 . internal transcribed spacers of rRNA gene
- 2 . intergenic spacers of mtDNA
- 3 . β -tubulin
- 4 . translation elongation factor 1 α
- 5 . NADH dehydrogenase subunit 1
- 6 . nested PCR
- 7 . multiplex PCR
- 8 . 28 S ribosomal DNA
- 9 . 60 S ribosomal protein L10
- 10 . enolase
- 11 . heat shock protein 90
- 12 . tpi A (triosephosphate isomerase/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
- 13 . elicitin
- 14 . NADH dehydrogenase subunit 9 (*nad9*)
- 15 . 40 S ribosomal protein S10 (*rps10*)
- 16 . preprotein translocase membrane subunit (*secY*)
- 17 . melting temperature = T_m
- 18 . self complementarity
- 19 . annealing temperature
- 20 . extension
- 21 . bovine serum albomine (BSA)
- 22 . *in silico*
- 23 . cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)
- 24 . ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)
- 25 . housekeeping genes