

ردیابی ژن‌های مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی در ارقام گوجه‌فرنگی با استفاده از نشانگر CAPS

بهار مرید^{۱*} و شهاب حاج منصور^۲

چکیده

بیماری‌های فوزاریومی در اغلب مناطق کشت گوجه‌فرنگی باعث کاهش تولید عملکرد این محصول می‌شوند. بهترین روش کنترل این بیماری تهیه و استفاده از ارقام مقاوم به فوزاریوم است. انتخاب فنوتیپی ارقام مقاوم گوجه‌فرنگی کاری پیچیده و بسیار زمان‌بر می‌باشد. نشانگرهای مولکولی که با ژن مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی پیوستگی دارند، می‌توانند برای غربال کردن مواد ژنتیکی مقاوم به این بیماری مورد استفاده قرار گرفته و در برنامه‌های به‌نژادی گوجه‌فرنگی کمک نمایند. در این مطالعه نشانگر CAPS به نام TAO1902 در ۲۷ رقم تجاری گوجه‌فرنگی برای شناسایی ارقام دارای ژن مقاوم I-2 به نژاد ۲ قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* که قدرت بیماری‌زایی بالایی در ایران دارد، مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا DNA به روش CTAB استخراج شد و سپس PCR-RFLP با استفاده از آنزیم‌های برشی *RsaI* و *FokI* به منظور بررسی وجود یا عدم وجود آلل I-2 در ارقام گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار گرفت. یک نوار ۵۰۰ جفت بازی در پاسخ به آنزیم *RsaI* و دو نوار ۳۹۰ و ۴۰۰ جفت بازی در واکنش با آنزیم *FokI* تشکیل شد. نتایج نشان داد که از ۲۷ رقم مورد بررسی، ۱۴ رقم مقاوم هموزیگوت و ۱۳ رقم حساس بودند. ارزیابی آزمون بیماری‌زایی نشان داد که ارقامی از گیاه گوجه‌فرنگی که قطعه مربوط به ژن مقاوم I-2 را تکثیر کرده بودند، فاقد هر نوع علائم بیماری بودند، اما گیاهانی که این قطعه ژنی را نداشتند علائم بیماری را با شدت‌های مختلف نشان دادند. در مجموع از میان ۲۷ رقم و هیبرید گوجه‌فرنگی مورد بررسی، هفت رقم و هفت هیبرید نسبت به قارچ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* مقاومت نشان دادند، بنابراین این ارقام در مناطقی که نژاد ۲ در آن‌ها غالب است، قابل توصیه می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: فوزاریوم، ژن مقاومت، ژن I-2، انتخاب بر مبنای نشانگر، پژمردگی فوزاریومی.

تاریخ دریافت: ۹۱/۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۱/۵/۲۴

۱- استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تاکستان، ایران، * b.morid@tiau.ac.ir

۲- کارشناس ارشد اصلاح نباتات، گروه بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

مقدمه

بیماری پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول است که همه ساله در سراسر جهان خسارت زیادی به تولیدکنندگان گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esoulentum* Mill.) وارد می‌کند. عامل بیماری *Fusarium oxysporum* Schlecht, f. *lycopersici* sp. است که یک قارچ خاکزاد بوده و در اغلب مناطق کاشت گوجه‌فرنگی در دنیا وجود دارد و باعث کاهش محصول می‌شود (Staniaszek et al., 2007). (2007) علایم بیماری این است که قسمتی از برگ‌های جوان شروع به زرد شدن نموده و این زردی کم کم گسترش یافته و پهنک برگ را فرا می‌گیرد. زردی برگ‌ها ممکن است به یک یا چند برگ و فقط در یک سمت گیاه محدود شود. با توسعه بیماری و لکه‌های زرد، برگ‌ها در وسط نکروزه می‌شوند و از ناحیه آلوده خشک شده و در نهایت گیاه پژمرده و از بین می‌رود. علایم بیماری روی بافت آوندی و ساقه بوته بیمار نیز مشاهده می‌شود. ساقه بیمار تغییر رنگ داده و به رنگ قهوه‌ای درآمده و به تدریج این تغییر رنگ افزایش می‌یابد. ریشه‌های گیاه آلوده نیز پوسیده شده و حجم آن‌ها کم می‌شود و به رنگ قهوه‌ای تیره در می‌آید. پوسیدگی ریشه‌ها، طوقه و ساقه و نکروزه شدن بافت آوندی موجب پژمردگی و مرگ کامل گیاه می‌شود. بنابراین بوته‌های آلوده در مزرعه کاملاً خشک شده و از بین می‌روند (McGrath et al., 1987; Malhorta and Washist, 1993). سه نژاد فیزیولوژیکی اختصاصی میزبان، به نام‌های نژاد ۱، نژاد ۲ و نژاد ۳ برای این گونه توصیف شده است (Alexander and Tucker, 1945; Booth, 1971; Grattidge and O'Brien, 1982). نژادهای ۱ و ۲ به صورت همه‌گیر در اغلب نقاط دنیا وجود دارند، ولی نژاد ۳ محدود به بعضی از مناطق می‌باشد (Steven and Rick, 1986). نژاد ۳ از ایران نیز گزارش شده است.

با توجه به اینکه گوجه‌فرنگی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی در جهان به‌شمار می‌رود و پژمردگی آوندی فوزاریومی از مهم‌ترین بیماری‌های این محصول به‌شمار می‌رود، کنترل این بیماری ضروری است. کنترل این عامل

بیماری‌زا اساساً به سه روش انجام می‌شود: روش‌های زراعی، کاربرد قارچ‌کش‌ها و استفاده از ارقام مقاوم (Baron & Frusciante, 2007). چهار ژن به نام‌های I-1، I-2 و I-3 برای مقاومت اختصاصی نژاد نسبت به این بیمارگر روی ژنوم گوجه‌فرنگی مکان‌یابی شده‌اند که ژن I-2 در گونه وحشی *L. pimpinellifolium* شناسایی شده است و باعث مقاومت به نژاد ۲ این گونه می‌شود (Stall and Walter, 1965). توالی این ژن شناسایی و گزارش شده است (Barone, 2003). استانیازسک و همکاران (Staniaszek, 2007) بر مبنای این توالی نشانگر CAPS با نام TAO1902 را طراحی کردند که با استفاده از آن توانستند ارقام مقاوم به نژاد ۲ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* را شناسایی کنند. استفاده از این نشانگر روشی مفید برای انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم گوجه‌فرنگی می‌باشد. تانیولاک و آکاله (Tanyolac and Akkale, 2010) ژن‌های مقاوم را با استفاده از نشانگرهای RAPD و CAPS در لاین‌های نسل F₃ گوجه‌فرنگی برای پوسیدگی فوزاریومی ریشه و پژمردگی فوزاریومی بررسی کردند و لاین‌های حساس و مقاوم را شناسایی و غربال نمودند. امروزه سعی بر این است که استفاده از سموم شیمیایی به دلیل آلودگی‌های زیست محیطی و خطرات جدی که برای مصرف‌کنندگان ایجاد می‌کند با استفاده از ارقام مقاوم جایگزین شوند. انتخاب فنوتیپی ارقام مقاوم گوجه‌فرنگی کاری پیچیده و بسیار زمان‌بر می‌باشد (Lindhout, 2002). استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA در برنامه‌های اصلاح گیاهان تجاری، کمک بزرگی برای انتقال سریع و کارآمد صفات مهم کشاورزی به ارقام و هیبریدهای مورد دلخواه می‌باشد (Tanksley et al., 1989; Lindhout, 2002). از آنجایی که مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی برای تولید قابل اطمینان مواد غذایی بسیار مهم می‌باشد، بنابراین به منظور کنترل این بیماری استفاده از ارقام مقاوم توصیه شده است. برای شناسایی ارقام مقاوم می‌توان از نشانگرهایی استفاده کرد که به جایگاه‌های ژنی مقاوم به بیماری متصل می‌شوند. بنابراین می‌توان از آن‌ها برای برنامه‌های اصلاحی انتخاب بر مبنای نشانگرها استفاده نمود. در دسترس بودن نشانگرهای مبتنی بر PCR برای بسیاری از ژن‌های مقاوم اجازه می‌دهد تا انتخاب بر مبنای نشانگر برای مقاومت در گوجه فرنگی به‌صورت

طوقه و ریشه و ساقه‌های اولیه انجام شد. نمونه‌های آلوده به آزمایشگاه منتقل شدند و جداسازی قارچ از بافت‌های آلوده انجام شد (Kim et al., 2001). در نهایت پرگنه‌هایی که به گونه *F. oxysporum* شباهت داشتند به منظور خالص‌سازی تک اسپور شدند.

شناسایی گونه *F. oxysporum*

گونه *F. oxysporum* بر اساس مورفولوژی پرگنه و مشخصات زایشی شامل فیالیدها، ماکروکنیدی‌ها، میکروکنیدی‌ها و کلامیدوسپورها شناسایی می‌شود (Gerlach and Nirenberg, 1982). پس از خالص‌سازی، جدایه‌هایی که متعلق به جنس فوزاریوم بودند، به منظور شناسایی دقیق گونه، روی محیط‌های کشت PDA، CLA و SNA کشت داده شدند. جهت بررسی خصوصیات میکروسکوپی از جمله شکل، اندازه و تعداد بندهای عرضی میکروکنیدی و ماکروکنیدی، طول فیالید و شکل و محل قرار گرفتن کلامیدوسپورها از محیط‌کشت‌های CLA و SNA استفاده شد. کشت‌های قارچ به مدت ۲ هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با ۱۲ ساعت نور معمولی و ۱۲ ساعت نور Near-UV در هر روز نگهداری شدند و سپس از نظر خصوصیات ذکر شده در بالا مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور بررسی خصوصیات ماکروسکوپی از جمله رنگ پرگنه، سرعت رشد و وجود رنگیزه، از محیط کشت PDA استفاده شد.

مطالعات مولکولی برای تعیین نژادهای فیزیولوژیک در

گونه *F. oxysporum f.sp. lycopersici*

استخراج DNA ژنومی از میسلیم

جدایه‌های قارچی جهت استخراج DNA در محیط مایع PDB کشت داده شدند. DNA ژنومی به روش CTAB (Ausubel et al., 1994) استخراج شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) برای شناسایی

F. oxysporum f.sp. lycopersici و نژادهای آن

از آغازگرهایی (جدول ۱) استفاده شد که توسط هیرانو و آریه (Hirano and Arie, 2006) طراحی و ارایه شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Master Cycler) انجام شد. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (جدول ۲) شامل برنامه حرارتی واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس و به دنبال آن

موفقیت‌آمیزی در آزمایشگاه بدون نیاز به تکنولوژی بالا انجام گیرد. علاوه بر این توسعه سریع روش‌های مولکولی جدید همراه با افزایش دانش نسبت به ساختار و عملکرد ژن‌های مقاومت، توانسته‌اند نقش مهمی در دست‌یابی به نشانگرهای جدید مولکولی ایفا کنند (Hulbert et al., 2001). از مزایای این نوع نشانگرها می‌توان به کاهش یا حذف نیاز به کاشت طولانی مدت و مراحل دشوار شناسایی مورفولوژیک اشاره نمود (Hamelin et al., 1993; Zhang et al., 1999). سودمندی این روش‌ها زمانی آشکارتر می‌شود که زمان، دقت و صحت در مراحل شناسایی از صفات کلیدی هستند. علاوه بر این، از آنجایی که در این روش‌ها هیچ ژن خارجی به گیاه وارد نمی‌شود، انتقال صفات مطلوب بین جمعیت‌های آمیزشی تسهیل شده است (Goodwin and Annis, 1991; Smith et al., 1996). انتخاب بر مبنای نشانگر، یک انتخاب غیر مستقیم است که با استفاده از روش‌های تعیین ژنوتیپ مولکولی، ردیابی آل‌های مطلوب و هاپلوئید و در نتیجه توسعه لاین‌های اصلاحی را سرعت می‌بخشد و باعث می‌شود ارزیابی فنوتیپی چرخه‌های زندگی گیاهان کاهش و حتی حذف شود. انتخاب بر مبنای نشانگر زمانی ارزشمندتر می‌شود که صفت از نظر وراثتی نهفته و چندژنی هستند و یا قابلیت توارث کمی نشان می‌دهند، چون در این موارد انتخاب بر مبنای فنوتیپ ناواضح و یا غیر ممکن است. استفاده از نشانگرهای هم بارز نیاز به آزمون‌های بررسی نتایج برای تشخیص ژنوتیپ‌های مطلوب حامل آل‌های نهفته را حذف می‌کند (Yeam et al., 2005).

در این تحقیق ارقام تجاری مختلف گوجه‌فرنگی موجود در ایران با استفاده از نشانگر CAPS از نظر داشتن ژن مقاومت I-2 مورد ارزیابی قرار گرفتند و ارقام وهیبریدهای دارای ژن مقاومت شناسایی شدند.

مواد و روش‌ها

جداسازی و نگهداری جدایه‌ها

نمونه‌برداری از گلخانه‌های گوجه‌فرنگی در سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۹۰ صورت گرفت. برای جمع‌آوری نمونه، گلخانه‌های گوجه‌فرنگی در قسمت‌های مختلف استان سیستان و بلوچستان، فارس، اصفهان و کرمان مورد بازدید قرار گرفتند. به این منظور از بوته‌های گوجه‌فرنگی در مراحل مختلف گیاهیچه و گیاه کامل که دارای علائم پژمردگی و زردی یک طرفه بودند، نمونه‌برداری شد. نمونه‌برداری عمدتاً از منطقه

مرید و حاج منصور. ردیابی ژن‌های مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی در ارقام...

urbana II که نسبت به این قارچ حساس است انتخاب شد و آزمون بیماری‌زایی به‌روش (Staniaszek *et al.*, 2007) انجام شد.

بوت‌ها چهار هفته نگهداری شدند و ضمن بازدیدهای مکرر، علایم بررسی و شاخص بیماری‌زایی^۱ بر اساس رتبه‌بندی (Validov *et al.*, 2007) محاسبه و ثبت شد.

رتبه‌بندی علایم بیماری به شرح زیر انجام شد:

گیاهان سالم: ۰، گیاهان با لکه‌های برگ‌ریز کمتر از ۲ میلی‌متر: ۱، گیاهان با لکه‌های برگ‌ریز توسعه یافته: ۲، گیاهان با لکه‌های بزرگ و پژمردگی زیاد: ۳، گیاهان مرده و خشکیده: ۴

میزان بیماری‌زایی با محاسبه Disease Index (DI) مشخص و بررسی شد.

$$DI = (n_0 \times 0 + n_1 \times 1 + n_2 \times 2 + n_3 \times 3 + n_4 \times 4) / (n_1 + n_2 + n_3 + n_4 + n_0)$$

n_1, n_2, n_3, n_4, n_0 : تعداد گیاهانی می‌باشد که با درجات

مختلف علایم بیماری را نشان دادند (Validov *et al.*, 2007).

مرحله دوم این آزمون به منظور تایید نتایج به دست آمده از نشانگر TAO1 انجام شد. روش انجام آزمون به شرح مرحله اول بود، با این تفاوت که آزمون بیماری‌زایی برای تمام ۲۷ رقم انجام شد و بعد از گذشت سه هفته، گیاهان از خاک خارج شده و قسمت پایین ساقه و انتهای ریشه به منظور مشاهده بافت داخلی به صورت طولی و عرضی برش داده شد و گیاهان به دو گروه مقاوم (بدون علایم بیماری) و حساس (با علایم بیماری) طبقه بندی شدند.

نتایج

شناسایی گونه *F. oxysporum. f. sp. lycopersici* و

نژادهای آن

با استفاده از مشخصات مورفولوژیکی و کلید شناسایی گریلاخ و نیرنبرگ (Gerlach & Nirenberg, 1982) تعداد ۴۴ جدایه از ۵۰ جدایه جمع آوری شده قارچ *Fusarium oxysporum* شناسایی شدند. با استفاده از آغازگر Uni، شناسایی دو فرم ویژه *F. oxysporum f. sp. lycopersici* و سایر *F. oxysporum f. sp. radialis-lycopersici* از سایر

۴۰ چرخه با واسرشت در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای متناسب با آغازگر به مدت ۱ دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه با یک بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و به مدت ۷ دقیقه بود. قطعات تکثیر شده روی ژل آگاروز ۱/۲٪ الکتروفورز شدند. ژل‌ها با رنگ اتیدیوم بروماید به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و سپس تحت نور UV مشاهده شده و از آن‌ها عکس تهیه شد.

استخراج DNA ژنومی کل از بافت گیاه

برای استخراج از روش CTAB با اندکی تغییرات استفاده شد (Ausubel *et al.*, 1994). DNA کل از ۲۰۰ میلی‌گرم بافت تازه برگ گیاهان گوجه‌فرنگی استخراج شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) برای تکثیر ژن I-2

به این منظور از آغازگرهای CAPS با نام‌های TAO1F و TAO1r (Staniaszek *et al.*, 2007) استفاده شد که توالی این آغازگرها در جدول ۱ نشان داده شده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Master Cycler) انجام شد. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در جدول ۲ نشان داده شده است. برنامه حرارتی شامل واسرشت اولیه در ۹۴ درجه سلسیوس و به دنبال آن ۴۰ چرخه با واسرشت در دمای ۹۳ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه، اتصال در دمای ۶۳ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ ثانیه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه با یک بسط انتهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و به مدت ۵ دقیقه بود. قطعات تکثیر شده روی ژل آگاروز ۱/۲٪ الکتروفورز شدند. ژل‌ها با رنگ اتیدیوم بروماید به مدت ۳۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند و سپس تحت نور UV مشاهده شده و از آن‌ها عکس تهیه شد.

هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده با آغازگرهای TAO1

محصول PCR با آنزیم‌های برشی *RsaI* و *FokI* (Fermentas, Germany) مورد هضم آنزیمی قرار گرفت (Staniaszek *et al.*, 2007).

آزمون بیماری‌زایی

این آزمون در دو مرحله اجرا شد. مرحله اول به منظور انتخاب جدایه‌هایی از نژاد ۲ با بالاترین میزان بیماری‌زایی انجام گرفت. برای انجام این آزمون ابتدا بذر گوجه‌فرنگی رقم Early

¹ Disease Index (DI)

نتایج آزمون بیماری‌زایی

ارقام گوجه‌فرنگی که در پاسخ به پرایمرهای CAPS، قطعات مرتبط با ژن مقاومت *I-2* را تولید کردند، هیچ نوع از علائم بیماری را روی گیاهان گوجه‌فرنگی تولید نکردند، در حالی که گیاهانی که قطعات مرتبط با ژن مقاومت *I-2* را تولید نکردند علائم بیماری را با شدت‌های مختلف نشان دادند.

نشانگرهای CAPS که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند، توانستند ارقام و هیبریدهای مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی را با دقت بالا و صرفه‌جویی در وقت و هزینه شناسایی کنند. تعدادی از نشانگرهای مبتنی بر DNA از جمله AFLP، RFLP، RAPD و SCAR برای انتخاب بر مبنای نشانگر معرفی شده‌اند. در این میان استفاده از نشانگرهای CAPS به دلیل این‌که هم بارز هستند و به آسانی با الکتروفورز روی ژل آگارز قابل تشخیص هستند، بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. این نشانگر قادر است چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی (SNPs) را که باعث تغییر در فنوتیپ می‌شوند به خوبی شناسایی کند و به همین دلیل نشانگر کامل گفته می‌شود. از نشانگر CAPS در کارهای اصلاحی زیاد استفاده می‌شود، زیرا ساده، سریع و ارزان است و فقط نیازمند یک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، هضم آنزیمی و الکتروفورز روی ژل آگارز است (Sedlacek et al., 2010). نشانگرهای CAPS ردیابی چندشکلی‌های تک‌نوکلئوتیدی را با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و هضم آنزیمی امکان پذیر می‌کنند. زمانی که اطلاعات در رابطه با SNP در دسترس است، روش CAPS یک روش نشانگری ارجح برای انتخاب بر مبنای نشانگر است. به طور کلی توسعه نشانگرهای CAPS زمانی امکان پذیر است که موتاسیون رخ داده یا یک جایگاه تشخیصی آنزیم برشی به‌وجود آمده باشد (Yeam et al., 2005). تعدادی از نشانگرهای مبتنی بر DNA از جمله AFLP، RFLP، RAPD و SCAR، CAPS و SNP شناسایی شده و در انتخاب ارقام مقاوم در گوجه‌فرنگی استفاده شده‌اند که اغلب آن‌ها به ژن‌های مقاوم به بیماری متصل می‌شوند (Shi et al., 2011).

از نشانگرهای CAPS برای شناسایی ارقام حامل ژن مقاومت *Sw-5* نسبت به ویروس *Tomato Spotted Wilt Virus* (Garland et al., 2005)، شناسایی آلل‌های مقاوم نسبت به پوتی ویروس‌های فلفل (Yeam et al., 2005)، شناسایی ارقام مقاوم گوجه‌فرنگی نسبت به پژمردگی فوزاریومی

فرم‌های ویژه *F. oxysporum* انجام شد. با این آغازگر قطعه‌ای از DNA به وزن ۶۷۲-۶۷۰ جفت باز تکثیر شد. ۴۴ جدایه‌ای که با مشخصات مورفولوژیکی گونه *F. oxysporum* شناسایی شده بودند، با آغازگر Uni باند ایجاد کردند. آغازگر Sp23 برای تمایز و شناسایی نژادهای ۲ و ۳ از نژاد ۱ استفاده شد. این آغازگر در نژادهای ۲ و ۳ قطعه‌ای به وزن ۵۱۸ جفت باز تکثیر کرد، در حالی که برای نژاد ۱ هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد. آغازگر Sp13 در نژادهای ۱ و ۳، قطعه‌ای به وزن ۴۴۵ جفت باز تکثیر کرد، اما هیچ قطعه‌ای در نژاد ۲ تکثیر نکرد. نتایج نشان داد که از ۴۴ جدایه‌ای که با آغازگر Uni باند تولید کرده بودند، ۹ جدایه نژاد ۱، ۱۵ جدایه نژاد ۲، ۶ جدایه نژاد ۳ و ۱۴ جدایه فرم ویژه *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* بودند (جدول ۳).

تکثیر با آغازگرهای CAPS و هضم آنزیمی

تکثیر با آغازگرهای TAO1، یک قطعه به وزن ۹۰۲ جفت باز تولید کرد (شکل ۱). اندازه این قطعه ۹۰۲ جفت بازی در ارقام مقاوم و حساس گوجه‌فرنگی متفاوت بود که این تفاوت بعد از هضم قطعات با آنزیم‌های برشی *FokI* و *RsaI* مشاهده می‌شود (Staniasek et al., 2007). بعد از هضم آنزیمی با *FokI*، ارقام مقاوم قطعاتی به وزن‌های ۳۹۰ و ۴۰۰ جفت باز تولید کردند که این قطعات نشان دهنده حضور هر دو آلل وابسته به ژن *I-2* از والدین در رقم مورد نظر بودند. بنابراین این ارقام به عنوان گیاهان مقاوم هتروزیگوت در نظر گرفته شدند. چهارده رقم از ارقام مورد بررسی این قطعات را تولید کردند (جدول ۴). قطعه‌ای به وزن ۸۰۰ جفت باز در هر دو ارقام حساس و مقاوم تشکیل شد که ارتباطی با مقاومت نداشت. الگوی الکتروفورز حاصل از هضم آنزیمی در نه رقم و هیبرید گوجه‌فرنگی با استفاده از آنزیم *FokI* در شکل ۲ نشان داده شده است. هضم با آنزیم *RsaI* در ارقام مقاوم قطعه‌ای به وزن ۵۰۰ جفت باز تولید کرد. قطعه‌ای به وزن ۲۲۰ جفت باز در تمام نمونه‌ها تکثیر شد که ارتباطی با مقاومت نداشت. نتایج حاصل از هر دو آنزیم مشابه بود. الگوی الکتروفورز حاصل از هضم آنزیمی در نه رقم و هیبرید گوجه‌فرنگی با استفاده از آنزیم *RsaI* در شکل ۳ نشان داده شده است.

مرید و حاج منصور. ردیابی ژن‌های مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی در ارقام...

رقم و هفت هیبرید نسبت به قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* مقاومت نشان دادند که برای کشت در مناطقی هستند که نژاد ۲ در آن‌ها غالب است، قابل توصیه می‌باشند.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تاکستان انجام شده است.

(Staniaszek *et al.*, 2007)، و شناسایی ارقام مقاوم گوجه فرنگی نسبت به پژمردگی ورتیسلیومی (Yu Kuklev *et al.*, 2009)، شناسایی آل‌های مقاوم به ویروس موزاییک جو (Sedlacek *et al.*, 2010) و شناسایی ارقام حامل ژن مقاومت *Sr2* نسبت به بیماری زنگ سیاه در گندم (Mago *et al.*, 2010)، استفاده شده است.

در این مطالعه ۲۷ رقم و هیبرید گوجه‌فرنگی از نظر دارا بودن آل مقاوم *I-2* مورد بررسی قرار گرفتند و بر این اساس هفت

جدول ۱- توالی، وزن قطعه تولید شده و نقطه ذوب آغازگرهای مورد استفاده

Table 1. Sequences, melting point and Ampelicone size of primers used in this study

Primers	Melting Point (°C)	Sequence	Ampelicons size (bp)
Uni f	55.9	5'-ATCATCTTGTGCCAACTTCAG-3'	670-672
Uni r	56.5	5'-GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA-3'	
SP 13f	59.4	5'-GTCAGTCCATTGGCTCTCTC-3'	445
SP 13r	57.3	5'-TCCTTGACACCATCACAGAG-3'	
SP 23 f	57.9	5'-CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA-3'	518
SP 23 r	59.4	5'-GCAACAGGTCGTGGGGAAAA-3'	
TAO1 f	61.8	5'-GGGCTCCTAATCCGTGCTTCA-3'	902
TAO1 r	62.1	5'-GGTGGAGGATCGGGTTTGTTC-3'	

جدول ۲- اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

Table 2. Concentration of reagents used in PCR reaction.

Content	Final concentration of reagent in 25µl of PCR reaction for Uni, Sp13 and Sp23(µl)	Final concentration of reagent in 25µl of PCR reaction for TAO ₉₀₂
PCR buffer (10X)	2.5	2.5
MgCl ₂ (50 mm)	0.85	1
dNTP (10 mm)	0.5	0.5
Primer (each) (10 pmol/ml)	1	0.8
<i>Taq</i> DNA polymerase (5 unit/ml)	0.2	0.2
DNA (40ng)	2	2

جدول ۳- شناسایی فرم‌های تخصص یافته و نژادهای *Fusarium oxysporum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و تعیین شدت بیماری‌زایی آن‌ها

Table 3. Identification of formae specialis and races using specific primers and determination of disease index (DI) in *Fusarium oxysporum* isolates.

Isolate	Uni	Sp13	Sp23		DI	Isolate	Uni	Sp13	Sp23		DI
F1	+	-	+	Race2	3.6	F23	+	-	+	Race2	4
F2	+	-	-	<i>Forl</i>	3	F24	+	+	-	Race1	3.3
F3	+	-	-	<i>Forl</i>	2.6	F25	+	-	+	Race2	2
F4	+	-	+	Race2	3	F26	+	-	-	<i>Forl</i>	3.3
F5	+	-	+	Race2	3.3	F27	+	+	-	Race1	4
F6	+	+	+	Race3	4	F28	+	+	+	Race3	2.6
F7	+	+	-	Race1	2.6	F29	+	-	-	<i>Forl</i>	2
F8	+	-	-	<i>Forl</i>	1.3	F30	+	+	+	Race3	3.6
F9	+	-	-	<i>Forl</i>	2.6	F31	+	-	-	<i>Forl</i>	3
F10	+	-	+	Race2	3	F32	+	-	-	<i>Forl</i>	3
F11	+	-	-	<i>Forl</i>	2	F33	+	-	+	Race2	3.3
F12	+	+	-	Race1	2.6	F34	+	-	+	Race2	4
F13	+	+	+	Race3	2	F35	+	-	+	Race2	1
F14	+	-	+	Race2	1.3	F36	+	-	+	Race2	3
F15	+	+	-	Race1	3	F37	+	-	-	<i>Forl</i>	2.6
F16	+	+	+	Race3	2.6	F38	+	-	-	<i>Forl</i>	3.3
F17	+	-	-	<i>Forl</i>	3.3	F39	+	-	-	<i>Forl</i>	3
F18	+	-	+	Race2	4	F40	+	-	+	Race2	4
F19	+	+	-	Race1	3	F41	+	-	+	Race2	3.6
F20	+	+	-	Race1	2	F42	+	+	-	Race1	4
F21	+	+	+	Race3	1	F43	+	+	-	Race1	1.3
F22	+	-	-	<i>Forl</i>	2.6	F44	+	-	+	Race2	3

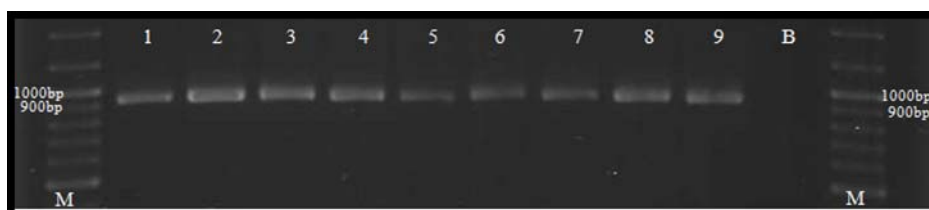
مرید و حاج منصور. ردیابی ژنهای مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی در ارقام...

جدول ۴- توزیع قطعات حاصل از هضم آنزیمی قطعه تکثیر شده با آغازگرهای TAO1 در ارقام و هیبریدهای گوجه‌فرنگی

Table 4. Distribution of the restriction fragments of the CAPS marker TAO1₉₀₂ primer in tomato cultivars and F1 hybrids

Cultivars or F1 hybrids	Response to <i>FOL</i>	TAO1 restriction fragments			
		<i>Rsa</i> I		<i>Fok</i> I	
		A	B	C	D
Peto Rock	R	+	+	+	+
Sunseed	R	+	+	+	+
Cal JN	R	+	+	+	+
Cal JN 3	R	+	+	+	+
Caligen	R	+	+	+	+
Hyb. Petopride 5	R	+	+	+	+
Hyb. Queenty	R	+	+	+	+
Hyb. Comodoro	R	+	+	+	+
Matin	R	+	+	+	+
Hyb. Petopride II	R	+	+	+	+
Hyb. Speedy	R	+	+	+	+
Navid-3(N.3)	R	+	+	+	+
Hyb. Fani	R	+	+	+	+
Hyb. Firenze (PS8094)	R	+	+	+	+
Chef	S	-	+	-	+
Falat Y	S	-	+	-	+
Peto Early 84	S	-	+	-	+
CH-Falat	S	-	+	-	+
Super Queen	S	-	+	-	+
Hyb. PS 6515	S	-	+	-	+
Karoon	S	-	+	-	+
Hyb. Eden F1	S	-	+	-	+
Hyb. Pulad	S	-	+	-	+
Hyb. Petopride 6	S	-	+	-	+
Early Urbana 111	S	-	+	-	+
King Stone	S	-	+	-	+
Super 2270	S	-	+	-	+

FOL, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; A, *Rsa* I-restriction fragment of 500 bp; B, *Rsa* I-restriction fragment of 220 bp; C, *Fok* I restriction fragments of 390 and 410 bp; D, *Fok* I-restriction fragment of 800 bp; (+) presence of marker; (-) absence of marker; R, resistant; S, susceptible



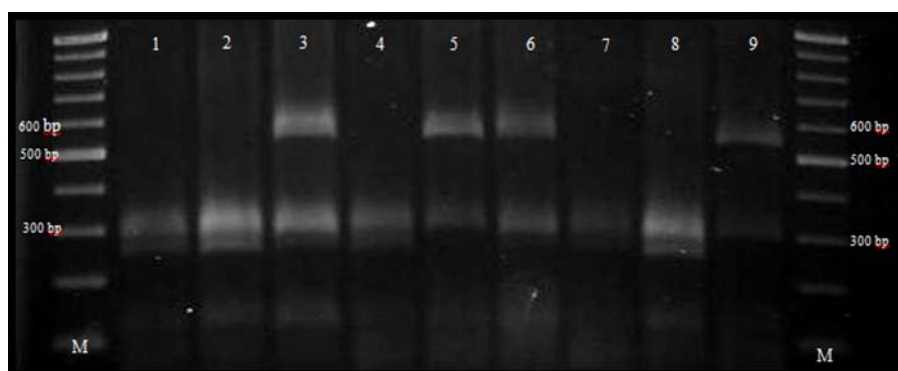
شکل ۱- محصول واکنش زنجیره ای پلیمرز با استفاده از آغازگر TAO1 (قطعه تکثیر شده ۹۰۲ جفت باز). ۱: رقم کالی زن، ۲: هیبرید کوینتی، ۳: رقم متین، ۴: هیبرید فانی، ۵: رقم سی اچ - فلات، ۶: هیبرید ادن، ۷: هیبرید پولاد، ۸: رقم ارلی اوربانا ۱۱۱، ۹: رقم سوپر ۲۲۷۰، M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

Figure 1. PCR products amplified with TAO1 primer. 1: Caligen, 2: Queenty, 3: Matin, 4: Fani, 5: CH-Falat, 6: Eden, 7: Pulad, 8: Early Urbana 111, 9: Super 2270, M: Marker



شکل ۲- الگوی حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *FokI* وجود نوارهای ۳۹۰ و ۴۰۰ جفت بازی نشان دهنده حضور ژن مقاومت است. ۱-۵ ارقام مقاوم و ۶-۱۰ ارقام حساس هستند. ۱: رقم سان سید، ۲: رقم متین، ۳: هیبرید فانی، ۴: رقم کالی ژن، ۵: هیبرید پتوپراید II، ۶: رقم کارون، ۷: رقم شف، ۸: هیبرید پولاد، ۹: هیبرید ادن، ۱۰: رقم کینگ استون، M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

Figure 2. PCR products digested with *FokI* restriction endonuclease of samples. Two restriction fragments of 390 and 410 bp revealed resistant genotypes. 1-5 are resistance varieties and 6-10 are susceptible varieties. 1: Sunseed, 2: Matin, 3: Fani, 4: Caligen, 5: Petopride II, 6: Karoon, 7: Chef, 8: pulad, 9: Eden, 10: King stone, M: Marker



شکل ۳- الگوی حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *RsaI* وجود باند ۵۰۰ جفت بازی نشان دهنده حضور ژن مقاومت است. ارقام ۳، ۵، ۶ و ۹ مقاوم و ارقام ۱، ۲، ۴، ۷، ۸ و حساس هستند. ۱: رقم شف، ۲: رقم کارون، ۳: رقم سان سید، ۴: هیبرید پولاد، ۵: هیبرید کوینتی، ۶: رقم کالی ژن، ۷: هیبرید ادن، ۸: رقم فلات، ۹: رقم متین، M: مارکر ۱۰۰ جفت بازی

Figure 3. PCR products digested with *RsaI* restriction endonuclease of samples. An *RsaI*-digested fragment of 500 bp digestion of TAO1 revealed resistant. 3, 5, 6 and 9 are resistance varieties and 1, 2, 4, 7 and 8 are susceptible varieties. 1: Chef, 2: Karoon, 3: Sunseed, 4: Pulad, 5: Quenty, 6: Caligen, 7: Eden, 8: Falat, 9: Matin, M: Marker

References

- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1994). Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons Inc: New York.
- Barone A (2003) Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. International Workshop of Molecular Biology 2003, October 17-18, Villa Guliano, Torino, Italy, 29-34.
- Booth C (1971) The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England.
- Hamelin R, Ouellette GB, Bernier L (1993) Identification of *Gremmenie laabietina* races with random amplified polymorphic DNA markers. Applied and Environmental Microbiology 59: 1752-1755.
- Hirano Y, Arie T (2006) PCR-based differentiation of *Fusarium* f. sp. *lycopersici* and *radicis lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Japanese Journal of General Plant Pathology 72: 273-283.
- Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q (2001) Resistance gene complexes: evolution and utilization. Annual Review of Phytopathology 39: 285-312.

مرید و حاج منصور. ردیابی ژنهای مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی در ارقام...

- Garland S, Sharman M, Persley AD, Mc Grath D (2005) The development of an improved PCR-based marker system for *Sw-5*, an important TSWV resistance gene of tomato. *Australian Journal of Agricultural Research* 56: 285-289.
- Gerlach W, Nirenberg H (1982) The genus *Fusarium*: A pictorial atlas. *Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land- und Forstwirtschaft (Berlin-Dahlem)* 209: 1-405.
- Goodwin PH, Annis SL (1991) Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2482-2486.
- Grattidge R, O'Brien RG (1982) The occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomato in Queensland. *Plant Disease* 66: 165-166.
- Kim JT, Park H, Hahm Y, Hun Yu S (2001) Crown and root rot of greenhouse tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Korea. *Plant Pathology Journal* 17(5): 290-294.
- Mago R, Brown-Guedira G, Dreisigacker S, Breen J, Jin Y, Singh R, Appels R, Lagudah ES, Ellis J, Spielmeier W (2010) An accurate DNA marker assay for stem rust resistance gene *Sr2* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 122(4): 735-744.
- Malhotra SK, Vashistha RN (1993) Genetics of resistance to *Fusarium* wilt race 1 in current tomato (*Lycopersicon pimpinellifolium*). *Indian Journal of Agricultural Science* 63: 246-347.
- Mc Grath DJ, Gillespie G, Vawdrey L (1987) Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* races 2 and 3 in *Lycopersicon pennellii*. *Australian Journal of Agricultural Research* 38: 729-733.
- Stall RE, Walter JM (1965) Selection and inheritance of resistance in tomato to isolates of races 1 and 2 of the *Fusarium* wilt organism. *Phytopathology* 55: 1213-1215.
- Sedlacek T, Marik P, Chrpova J (2010) Development of CAPS marker for identification of *rym4* and *rym5* alleles conferring resistance to the Barley Yellow Mosaic Virus complex in barley. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 46(4): 159-163.
- Shi A, Vierling R, Grazzini R, Chen P, Caton H, Panthee D (2011) Identification of molecular markers for *Sw-5* gene of tomato spotted wilt virus resistance. *American Journal of Biotechnology and Molecular Science* 1(1): 8-16.
- Smith OP, Peterson GL, Beck RJ, Schaad NW, Bonde MR (1996) Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of Karnal bunt of wheat. *Phytopathology* 86: 115-122.
- Staniasek M, Kozik EU, Marczewski W (2007). A CAPS marker TAO1₉₀₂ diagnostic for the *I-2* gene conferring resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 in tomato. *Plant Breeding* 126(3): 331-333.
- Stevens MA, Rick CM (1986) Genetics and breeding. In: Atherton JG and Rudich J (Eds), *The Tomato Crop*. Chapman & Hall, London. pp. 35-109.
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Martin S, Messeguer GB, Miller RJC, Paterson AH, Pineda O, Ro MS, Wing RA, Wu W, Young ND (1992) High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132: 1141-1160.
- Tanyolac B, Akkale C (2010) Screening of resistance genes to fusarium root rot and fusarium wilt diseases in F3 family lines of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using RAPD and CAPs markers. *African Journal of Biotechnology* 9(19): 2727-2730
- Validov SZ (2007) Biocontrol of tomato foot and root rot in stonewool by *Pseudomonas putida* strain PCL1760 in a certified greenhouse under industrial conditions. Thesis Validov. تکمیل از اینترنت
- Yeam I, Cheorl Kang B, Lindeman W, Frantz J, Faber N, Jahn M (2005) Allele-specific CAPS markers based on point mutations in resistance alleles at the *pvr1* locus encoding eIF4E in Capsicum. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 178-186.
- Yu Kuklev M, Fesenko IA, Karlov GI (2009) Development of a CAPS marker for the *Verticillium* wilt resistance in tomatoes. *Russian Journal of Genetics* 45(5): 575-579.
- Zhang AW, Hartman GL, Curio-penny B, Pedersen WL, Becker KB (1999) Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. *Phytopathology* 89: 796-804.