مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره چهارم (پیاپی ۳۷) زمستان ۱۳۹۷
صفحات ۴۰۳-۳۹۲

Original Article

شناسایی ارقام مقاوم بادنجان نسبت به بیماری پژمردگی فوزاریومی با عامل *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *ملونجینی* با استفاده از نشانگرهای مولکولی در ایران

نگین صفی خانی*[۱]، بهار مرید[۲]، حمیدرضا زمانی زاده[۳]، شهاب حاج منصور[۱]

[۱] کارشناس ارشد، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران،
[۲] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تاکستان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی، تاکستان،
[۳] استاد، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: بیماری پژمردگی فوزاریومی بادنجان از عوامل مهم کاهش این محصول در سراسر دنیا می باشد. توانایی بقاء این بیمارگر به مدت چند سال متوالی در درون خاک، حتی در شرایط نبودن میزبان، کنترل این بیمارگر را با مشکل مواجه کرده است. مؤثرترین و سازگارترین روش برای کنترل این بیماری، تولید و استفاده از ارقام مقاوم می باشد. این مطالعه به منظور شناسایی ارقام مقاوم بادنجان نسبت به بیماری پژمردگی فوزاریومی انجام شد.

مواد و روش ها: ابتدا نمونه های برگی ارقام بومی و هیبرید منتخب بادمجان از ۲۸ استان کشور جمع آوری شد. استخراج DNA با استفاده از روش CTAB از برگ‌های جوان این ارقام انجام گردید. از چهار نشانگر CAPS، RAPD، SRAP و SCAR به منظور تعیین ارقام مقاوم استفاده شد. سپس به منظور تایید نتایج، مقاومت و حساسیت این ژنوتیپ ها در شرایط گلخانه ای نیز بررسی شد.

یافته ها: در این مطالعه از ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی در ۱۳ مورد نشانگرهای مولکولی CAPS ، RAPD و SRAP باندهای شاخص مقاومت را تولید کردند. اما نشانگر SCAR قادر به تفکیک ارقام مقاوم از حساس نبود. نتایج ارزیابی فنوتیپی مقاومت ارقام بومی و هیبریدهای بادنجان در گلخانه نیز تایید کننده نتایج حاصل از بررسی مولکولی بود.

نتیجه گیری: در مجموع استفاده از ارقام مقاوم به دست آمده در این مطالعه با استفاده از نشانگرهای مولکولی، برای کاشت در مناطق دارای بیماری پژمردگی فوزاریومی توصیه می گردد.

واژگان کلیدی: پژمردگی فوزاریومی، بادنجان، نشانگرهای مولکولی، ژن مقاومت.

دریافت مقاله: اردیبهشت ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: خرداد ماه ۹۷

مقدمه

قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *ملونجینی* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*) به عنوان عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی اولین بار در سال ۱۹۵۸ از گیاه بادنجان (*Solanum melongena*) گزارش گردید (۱). در ایران نیز این بیماری برای اولین بار توسط صفی خانی (Safikhani) و همکاران گزارش شده است (۲).

بیش از ۸۵ درصد از محصول بادنجان در ۵ کشور دنیا تولید می شود که بر اساس گزارش های منتشرشده از FAO در سال ۲۰۱۱، کشور چین در مقام اول و کشورهای هند، عراق، ژاپن و ایتالیا در مقام های بعدی قرار دارند (۳). در ایران نیز در اکثر استان های کشور کشت بادنجان صورت می گیرد. به طوری که استان هرمزگان (شهرستان بندرعباس، میناب و ...) بیشترین درصد را به خود اختصاص داده اند (٤).

با توجه به بیشترین سطح زیر کشت بادنجان (۹۵۰۰ هکتار) در

* آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه بیماری شناسی گیاهی.
تلفن: ۰۹۱۲۵۸۳۲۱۷۰ پست الکترونیک: negin_safikhani@yahoo.com

استان هرمزگان، شهرستان بندرعباس و بادنجان کاری در سایر استان های ایران و با توجه به اینکه عامل بیماری هم از گلخانه ها و هم از مزارع کشت بادنجان گزارش شده است. همچنین با توجه به این که بیماری در شرایط مساعد محیطی می تواند خسارت قابل توجهی را وارد کند، لزوم شناخت عامل بیماری و نحوه کنترل آن آشکارتر می گردد.

فوزاریوم اکسیسپوروم یکی از بیمارگرهای پرگون خوار است. دامنه میزبانی وسیع، قدرت بیماریزایی زیاد در شرایط مساعد و پایداری بسیار زیاد آن در برابر شرایط نامساعد محیطی موجب گردیده که این بیمارگر در بسیاری از محصولات کشاورزی ایجاد بیماری نماید. این قارچ یک پاتوژن خاکزی مهم در بادنجان است که از راه ریشه های جوان به گیاه نفوذ می کند و در بافت‌های آوندی گیاه منتشر می‌شود و سالانه خسارات فراوانی را به مزارع و گلخانه‌های کشت بادمجان وارد می‌کند.

به دلیل نبود سموم شیمیایی مناسب و خطرات زیست محیطی ناشی از مصرف سموم، بهترین راه برای کنترل این بیماری تولید و استفاده از ارقام مقاوم است (۵).

از آنجایی که انتخاب فنوتیپی ارقام مقاوم عملی پیچیده و بسیار زمان بر است، استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA در برنامه های اصلاح گیاهان تجاری، می تواند کمک بزرگی به انتقال سریع و کارآمد صفات مهم کشاورزی به ارقام و هیبریدهای مورد نظر می باشد (٦).

در دسترس بودن نشانگرهای مبتنی بر PCR برای بسیاری از ژن های مقاومت اجازه می دهد تا انتخاب بر مبنای نشانگر برای مقاومت در بادنجان به صورت موفقیت آمیزی در آزمایشگاه بدون نیاز به تکنولوژی بالا انجام گیرد. علاوه بر این توسعه سریع روش های مولکولی جدید همراه با افزایش دانش نسبت به ساختار و عملکرد ژن های مقاومت، توانسته اند نقش مهمی در دست یابی به نشانگرهای جدید مولکولی داشته باشند (۷).

از مزایای این نوع نشانگرها می توان به کاهش یا حذف نیاز به کاشت طولانی مدت و مراحل دشوار شناسایی مورفولوژیک اشاره نمود (۸ و ۹). امروزه از مارکرهای RAPD و ISSR به عنوان ابزار مفیدی در انتخاب مقاومت فوزاریوم در بادنجان یاد شده است (۱۰). همچنین آغازگرهای SCAR، RAPD، SRAP– RGA و SRAP برای شناسایی ژن مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی بادنجان معرفی شده است (۱۱). دو رقم از بادنجان به نام های *Solanum aethiopicum* gr. Gilo و *Solanum aethiopicum* gr. Aculeatum شناسایی شده است که حامل ژن مقاومت به بیماری قارچی پژمردگی ناشی از *فوزاریوم اکسیسپوروم فرم اختصاصی ملونجنا* هستند (۱۲).

تا کنون در ایران رقم مقاومی از بادنجان نسبت به بیماری پژمردگی فوزاریومی معرفی نشده است.

هدف از این مطالعه شناسایی ژنوتیپ های مقاوم بادنجان *فوزاریوم اکسیسپوروم فرم اختصاصی ملونجینی* با استفاده از نشانگرهای مولکولی و تائید نتایج ارزیابی فنوتیپی مقاومت ارقام و هیبریدهای بادنجان در گلخانه در ایران بود.

مواد و روش ها

الف) جمع آوری نمونه ها و جداسازی قارچ: نمونه برداری از گلخانه ها و مزارع بادنجان شهرهای مختلف ایران که دارای علایم بیماری پژمردگی فوزاریومی بودند انجام شد (جدول ۱). ۲۸ رقم بادنجان نیز از سراسر ایران جمع آوری گردید. برای جمع آوری نمونه گلخانه های کاشت بادمجان مورد بازدید قرار گرفتند و از بوته های بادنجان در مراحل مختلف گیاهچه و گیاه کامل که دارای علائم پژمردگی و زردی یکطرفه بودند نمونه برداری شد. نمونه برداری عمدتاً از منطقه طوقه و ریشه و ساقه های اولیه گیاه انجام شد. نمونه های آلوده به آزمایشگاه زکریای رازی واقع در دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران منتقل شدند. به منظور جداسازی قارچ، ابتدا اندام‌های گیاهی آلوده به مدت یک ساعت در زیر جریان آب روان قرار داده شدند تا حد امکان قسمت‌های سطحی بافت‌های گیاهی عاری از آلودگی شوند. نمونه‌ها بسته به نوع بافت با هیپوکلریت سدیم ۵-۱٪ به مدت ۵-۱ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و برخی دیگر بدون ضدعفونی سطحی مورد استفاده قرار گرفتند. سپس از حد فاصل بافت سالم و آلوده قطعاتی به ابعاد

جدول ۱: استان ها و شهرستان های مورد بررسی.

شماره	نام استانها	نام شهرستان
۱	استان هرمزگان	بندرعباس–میناب
۲	استان خراسان	نیشابور
۳	استان سیستان و بلوچستان	زابل
۴	استان سمنان	سمنان
۵	استان کرمان	جیرفت
۶	استان یزد	یزد
۷	استان اصفهان	اصفهان
۸	استان مازندران	مازندران
۹	استان آذربایجان شرقی	تبریز
۱۰	استان مرکزی	اراک
۱۱	استان لرستان	لرستان
۱۲	استان خوزستان	دزفول
۱۳	استان تهران	ورامین
۱۴	استان فارس	جهرم

۱×۱ میلی متر به کمک تیغ جراحی استریل جداسازی شد و به محیط کشت آب–آگار منتقل گردید. نمونه ها در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس نگهداری شدند و روزانه از نظر رشد قارچ مورد بررسی قرار گرفتند.

قارچ‌های رشد کرده در شرایط استریل به محیط‌های کشت Potato Dextrose Agar (PDA)، Carnation Leaf Agar (CLA) و Synthetischer Nahrstroffarmer Agar (SNA) (مرک، آلمان) منتقل شدند. در نهایت پرگنه‌های دارای شباهت به گونه *فوزاریوم اکسیسپوروم*، به منظور خالص‌سازی تک اسپور شدند (۱۳).

ب) شناسایی مورفولوژیکی گونه فوزاریوم اکسیسپوروم: به منظور بررسی خصوصیات میکروسکوپی قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* از جمله شکل، اندازه و تعداد بندهای عرضی میکروکنیدی و ماکروکنیدی، طول فیالید و شکل و محل قرار گرفتن کلامیدوسپورها از محیط کشت‌های CLA و SNA استفاده گردید. کشت‌های قارچ به مدت ۲ هفته در دمای ۲۵ درجه سلیسیوس با ۱۲ ساعت نور معمولی و ۱۲ ساعت نور نزدیک به ماوراء بنفش (Near–UV) در هر روز نگهداری شدند. سپس از نظر خصوصیات مورفولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند (۱٤). به منظور بررسی خصوصیات ماکروسکوپی مانند رنگ پرگنه، سرعت رشد و وجود رنگیزه از محیط کشت PDA استفاده شد.

ج) استخراج DNA از بافت گیاهی: استخراج DNA ژنومی به روش CTAB از ۳–۲ عدد برگ تازه بادنجان انجام شد (۱۵). لوله های حاوی DNA استخراج شده تا زمان استفاده مجدد در دمای ۲۰– درجه سلیسیوس نگهداری شدند. تعیین درجه خلوص و غلظت DNA نیز با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ (Nano Drop) صورت گرفت. همچنین به منظور بررسی کیفی DNA استخراج شده، نمونه ها بر روی ژل آگاروز ۱/٤٪ الکتروفورز شدند (۱٦).

د) ارزیابی مولکولی:

۱– تعیین ارقام مقاوم با استفاده از نشانگرهای RAPD: به این منظور از آغازگرهای OPA08، OPAE10 و H12 استفاده شد. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در جدول ۲ و توالی پرایمرها در جدول ۳ آورده شده است. برنامه حرارتی شامل واسرشت شدن اولیه در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳٦ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال در دمای ۵۰ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۲۰ و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ٦ دقیقه انجام شد. قطعات تکثیر شده در هر واکنش بر روی ژل آگاروز ۱/۲٪ الکتروفورز و در زیر نور UV مشاهده شدند (۱۱ و ۱۲).

۲– تعیین ارقام مقاوم با استفاده از نشانگر CAPS: واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از آغازگر E13 f-r-1 انجام شد (جدول ۳). اجزای واکنش زنجیره‌ای پلی مراز در جدول ۲ نشان داده شده است. برنامه حرارتی شامل واسرشت شدن اولیه در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۲ دقیقه و به دنبال آن ۳۰ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس

جدول ۲: اجزای واکنش زنجیره ای پلیمراز برای استفاده از نشانگرها.

واکنش گر ها	نشانگر RAPD	نشانگر CAPS	نشانگر SRAP
PCR buffer (10X)	۲/۵ µl	۲/۵ µl	۲/۵ µl
MgCl2 (50 mm)	۰/۸ µl	۲ µl	۰/۷۵ µl
dNTP (10 mm)	۰/۵۵ µl	۰/۲ µl	۰/۵ µl
Primer (each) (10 pmol/ml)	۱/۲ µl	۲/۵ µl	۱ µl
***Taq* DNA polymerase (5 unit/ml)**	۲/۵ µl	۰/٤ µl	۰/۳۵ µl
DNA (40ng)	۲ µl	۲ µl	۲ µl
ddH_2O	۱۷/۷	۱۷/٦۵ µl	۱٦/۹ µl

جدول ۳: توالی پرایمرهای مورد استفاده در روش های RAPD، SRAP و SCAR.

نام آغازگر	توالی آغازگر	اندازه قطعه تولید شده (bp)	منبع
OPA08	5′ GTGACGTAGG 3′	۲۳۶۰	۱۲
OPAE10	5′ CTGAAGCGCA 3′	۱۶۲۹	۱۲
H12	5′ ACGCGCATGT 3′	۳۲۰	۱۱
E13 f-r-1	5′ CCCGATTCGGCCAACTTCACTAT 5′ GGGGGTTTATGTTGGGCGTTGTAATG	۲۵۰	۱۲
SRAP	5′TGAGTCCAAACCGGACT 5′GACTGCGTACGAATTAAC	٤۲٦	۱۱
SCAR 426	5′TGAGTCCAAACCGGACTACAAG 5′GACTGCGTACGAATTAACTCTACG	٤۲٦	۱۱
SCAR 347	5′TGAGTCCAAACCGGACTACAAG 5′AGTTGAAAGGAAAGTAGGTG	۳٤۷	۱۱

به مدت ٤۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۸۰ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس و به مدت ۷ دقیقه انجام شد. قطعات تکثیر شده در هر واکنش بر روی ژل آگاروز ۱/۲٪ الکتروفورز و در زیر نور UV مشاهده شد (۱۲). هضم آنزیمی محصول CAPS با استفاده از آنزیم *Pst*I انجام شد. به این منظور مقدار ۲۰ میکرولیتر از محصول PCR با ۱ میکرولیتر بافر آنزیم، ۵ میکرولیتر از آنزیم *Pst*I و ۲۸ میکرولیتر آب مقطر ترکیب گردید.

۳- تعیین ارقام مقاوم با استفاده از نشانگر SRAP: اجزای واکنش در جدول ۲ و توالی آغازگرها در جدول ۳ آورده شده است. برنامه حرارتی شامل واسرشت شدن اولیه در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، اتصال در دمای ۳۸ درجه سلیسیوس به مدت ٦۰ ثانیه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۷۵ ثانیه و گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت. قطعات تکثیر شده در هر واکنش بر روی ژل آگاروز ۱/۲٪ الکتروفورز و در زیر نور UV مشاهده شد (۱۱).

٤- تعیین ارقام مقاوم با استفاده از نشانگر SCAR: واکنش زنجیره ای پلی مراز با غلظت های مختلف مواد و دماهای اتصال مختلفی انجام شد. اما هیچ تکثیری مشاهده نگردید. توالی آغازگرها در جدول ۳ آورده شده است.

ه) آزمون بیماریزایی در گلخانه بر روی گیاه بادنجان به منظور تعیین فرم ویژه قارچ:

۱- کاشت گیاهچه های بادنجان، فلفل و گوجه فرنگی به منظور مایه زنی: برای انجام این آزمون ابتدا بذر ارقام حساس بادنجان (بندر عباس و سمنان) گوجه فرنگی (ارلی اوربانا ۱۱۱) و فلفل (دلمه ای رنگی) تهیه گردید. بذرها به مدت ۲ دقیقه در هیپوکلریت سدیم قرار گرفتند. سپس ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند و به مدت ۲٤ ساعت در دمای اتاق درون آب قرار گرفتند. در ادامه بذرها درون یک تشتک قرار داده شدند و کاغذ مرطوبی بر روی سطح آن ها قرار داده شد تا جوانه بزنند. برای تهیه بستر مناسب، خاک سبکی به نسبت ۱:۱:۱ (شن، خاک رس، گیاه خاک) آماده شد. خاک گلدان ها قبل از کاشت اتوکلاو شدند و یک هفته پس از اتوکلاو بذر جوانه زده بادمجان، گوجه فرنگی و فلفل درون گلدان ها کاشته شد. گلدان ها درون گلخانه با رطوبت ۷۰٪ و دمای ۲۰ درجه سلیسیوس قرار گرفتند. ۱۰ روز پس از سبز شدن برگ ها از محلول مغذی اوگلند برای تغذیه گلدان ها استفاده شد. آبیاری گلدان ها ۲ بار در هفته انجام شد. برای مایه زنی از گیاهانی استفاده شد که به مرحله ٦ برگی رسیده بودند (۱۷).

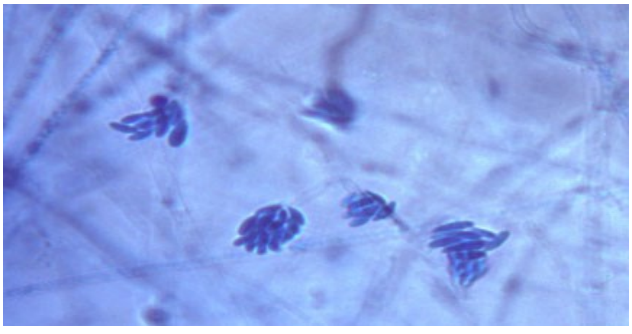
۲- اثبات بیماری با روش مایه زنی (Inoculation): برای این منظور از نشاءهای دو برگی بادنجان که برگ سوم آنها در حال رویش بود استفاده شد. برای تلقیح خاک گلدان‌های حاوی نشاءهای بادنجان از ۳ دیسک PDA قارچی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر که ۷ روز از تاریخ کشت آنها می‌گذشت استفاده شد. گلدان شاهد فقط با ۳ دیسک محیط کشت PDA تلقیح شدند. برای هرجدایه ۵ تکرار در نظرگرفته شد. بوته‌ها ٤ هفته نگهداری شدند (۱۷).

۳- آزمون بیماری زایی درگلخانه روی گیاه بادنجان به منظورشناسایی ارقام مقاوم: برای تلقیح گیاه بادنجان ۳ دیسک قارچ ۷ روزه کشت داده شده روی محیط کشت PDA به قطر ۰/۵ سانتی متر تهیه و در خاک مرطوب گلدان ها قرار گرفت. سپس گلدان ها آبیاری شدند (۱۷).

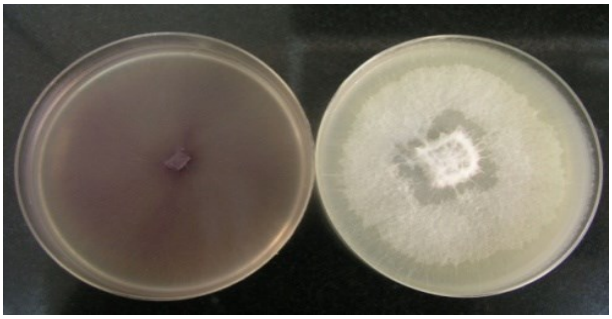
یافته ها

الف) شناسایی گونه: تشخیص گونه *فوزاریوم اکسیسپوروم* با استفاده از کلید گرلاخ و نیرنبرگ (۱۸) و نلسون (۱۳) در شرایط نگهداری استاندارد روی محیط کشت های SNA، Wa و PDA، انجام گرفت. نمونه هایی که آلودگی بیشتری به همراه داشتند در محیط کشت اختصاصی Nash & Snyder نیز کشت داده شد و گونه های فوزاریوم رشد کرده در این محیط به محیط های SNA و PDA منتقل و شناسایی شدند (۱۳). در این مطالعه میکروکنیدی ها به صورت False-head بر روی فیالیدهای کوتاه تولید شدند. تولید کلامیدوسپور، عدم وجود زنجیره، وجود ماکروکنیدی های فراوان، سیلندری شکل و کمی خمیده و اغلب ۴-۳ بندی از دیگر خصوصیات کلیدی مشاهده شده در جدایه ها بود. میکروکنیدی ها یک تا دوسلولی، تخم مرغی و یا بیضوی شکل به فراوانی در سرهای دروغین تشکیل شدند. کلامیدوسپورهای ریسه و کنیدیومی به فراوانی تشکیل شدند و به صورت میانی و انتهایی دیده شدند (شکل ۱).

همچنین رنگ پرگنه ها از سفید تا بنفش و ارغوانی متغییر بود.



شکل ۱: ویژگی میکروسکوپی قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم فرم اختصاصی ملونجینی* (بزرگنمایی ۴۰).



شکل ۲: ویژگی ماکروسکوپی قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم فرم اختصاصی ملونجینی*

پرگنه قارچ دارای میسلیوم هوایی معمولاً فراوان و پنبه ای بود (شکل ۲). در برخی از جدایه ها میسلیوم هوایی کمتر تشکیل شده بود. رنگ میسلیوم های هوایی از سفید تا بنفش تیره متغیر بود. اسپورودوکیا در برخی جدایه ها تقریباً کروی بودند. از مناطقی که نمونه برداری انجام شد در مجموع ۲۶ جدایه متعلق به جنس *فوزاریوم* جمع آوری شدند که پس از شناسایی ۱۲ جدایه به عنوان گونه *فوزاریوم اکسیسپوروم* شناسایی شدند (جدول ٤).

ب) تعیین فرم اختصاصی: به این منظور علاوه بر بادنجان از دو گیاه گوجه فرنگی و فلفل که از خانواده بادنجان هستند استفاده شد. جدایه های *فوزاریوم اکسیسپوروم* بر روی گیاه بادمجان علایم بیماری را ایجاد کردند. اما بر روی دو گیاه فلفل و گوجه فرنگی هیچ نوع علایمی ایجاد نکردند (شکل ۳). جدایه ها به عنوان فرم تخصص یافته *فوزاریوم اکسیسپوروم فرم اختصاصی ملونجینی* شناسایی شدند (جدول ۵).

ج) شناسایی مولکولی ارقام مقاوم نشانگر RAPD: ارقام مقاوم با استفاده از آغازگر OPA08 تولید باندی به وزن ۲۳٦۰ جفت باز می کنند. ۱۳ ژنوتیپ از ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی تولید باند

جدول ٤: کد و محل جمع آوری جدایه های آلوده به قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم فرم اختصاصی*

کد جدایه	محل جمع آوری	کد جدایه	محل جمع آوری
FOM7	بندرعباس	FOM1	بندرعباس
FOM8	سمنان	FOM2	بندرعباس
FOM9	سمنان	FOM3	بندرعباس
FOM10	سمنان	FOM4	بندرعباس
FOM11	سمنان	FOM5	بندرعباس
FOM12	سمنان	FOM6	بندرعباس

گوجه فرنگی رقم *Early urbana* 111 فلفل دلمه ای رنگی بادنجان رقم قصری

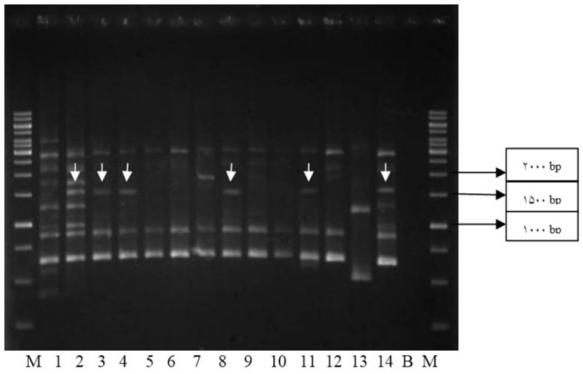
شکل ۳: آزمون بیماریزایی به منظور شناسایی فرم اختصاصی

جدول ۵: آزمون بیماریزایی به منظور شناسایی فرم اختصاص.

میزبان	شاهد	تیمار
بادنجان رقم بندرعباس	سالم	بیمار
بادنجان رقم سمنان	سالم	بیمار
گوجه فرنگی رقم Early urbana 111	سالم	سالم
فلفل دلمه ای رنگی	سالم	سالم

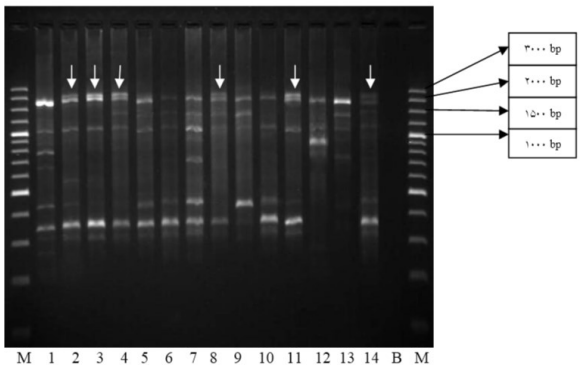
شاخص مقاومت کردند (شکل ٤، جدول ٦). با استفاده از آغازگر OPAE10، از ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی ۱۳ مورد باند شاخص مقاومت ۱٦۲۹ جفت بازی را ایجاد کردند (شکل ۵، جدول ٦). با استفاده از آغازگر H12 ، از ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی ۱۳ مورد باند شاخص مقاومت ۳۲۰ جفت بازی را ایجاد نمودند (شکل ٦، جدول ٦).

همچنین با استفاده از آغازگر CAPS، ۱۳ ژنوتیپ از ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی تولید باند شاخص مقاومت به وزن ۳۰۰ جفت باز کردند (شکل ۷، جدول ٦).

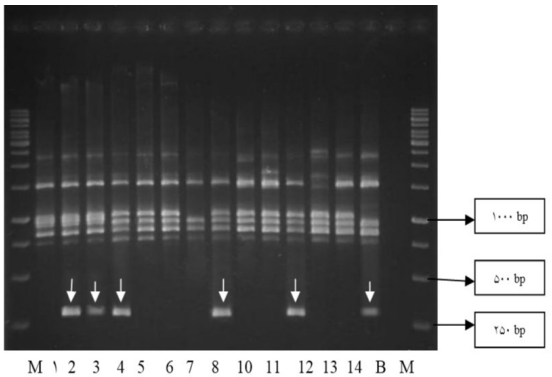


شکل ۵: محصولات واکنش PCR با استفاده از آغازگر RAPD OPAE10 (قطعه تکثیر شده ۱٦۲۹ جفت باز) عبارتند از ۲: شانتال، ۳: هادریان، ٤:

پس از برش آنزیمی با استفاده از آنزیم برشی *PstI*، ارقام مقاوم قطعه ای به وزن تقریبی ۲۵۰ جفت باز تولید کردند (شکل ۸، جدول ٦). با استفاده از آغازگر SRAP تعداد ۱۳ ژنوتیپ از ۲۰



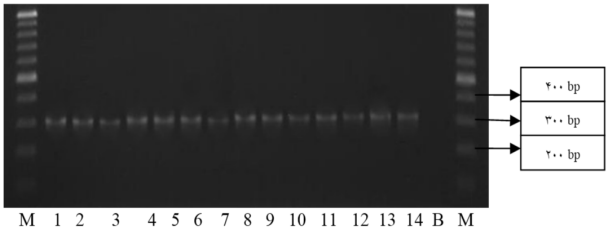
شکل ٤: محصولات واکنش PCR با استفاده از آغازگر RAPD OPA08 (قطعه تکثیر شده ۲۳٦۰ جفت باز) عبارتند از ۲: شانتال، ۳: هادریان، ٤: China Round، ۸: اصفهان، ۱۱: آرو، ۱٤: فاسلیس.



شکل ٦: محصولات واکنش PCR با استفاده از آغازگر RAPD H12 (قطعه تکثیر شده ۳۲۰ جفت باز) عبارتند از ۲: شانتال، ۳: هادریان، ٤: China Round، ۸: اصفهان، ۱۱: آرو، ۱٤: فاسلیس.

جدول ٦: تعیین مقاومت/حساسیت ارقام بادنجان با استفاده از نشانگرهای مولکولی.

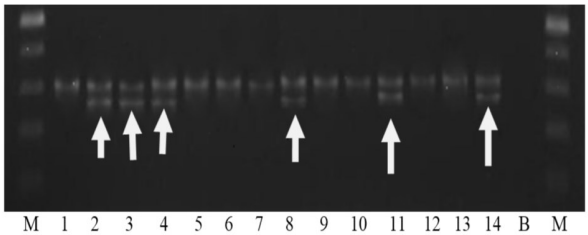
رقم بادنجان	RAPD OPA08	RAPD OPAE10	RAPD H12	CAPS	SRAP	آزمون بیماری زایی	حساس/مقاوم
بندرعباس	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
جهرم	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
یزد	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
اصفهان	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
لرستان	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
تبریز	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
مازندران	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
ورامین	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
دزفول	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
جیرفت	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
نیشابور	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
اراک	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
سمنان	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
زابل	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
قصری	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
دلمه	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
والنتینا	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
هادریان	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
میرابل	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
آرو	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
فاسلیس	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
شانتال	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
Italia 5B0010	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
Black Beauty	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
Long Purple	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
China long	-	-	-	-	-	بیمار	حساس
China Round	+	+	+	+	+	سالم	مقاوم
Blacky	-	-	-	-	-	بیمار	حساس



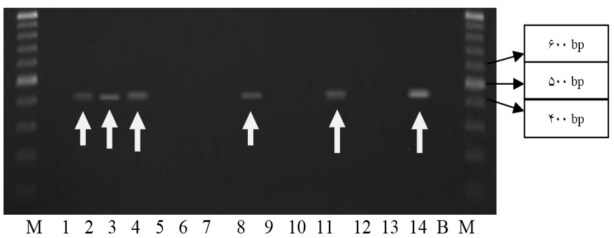
شکل ۷: محصول واکنش زنجیره ای پلیمراز با استفاده از آغازگر E13 f-r-1 (قطعه تکثیر شده ۳۰۰ جفت باز).

ژنوتیپ مورد بررسی تولید باند شاخص مقاومت به وزن ٤٢٦ جفت باز کردند (شکل ۹، جدول ٦).

پس از شناسایی ارقام مقاوم با استفاده از نشانگرهای مولکولی، به منظور تایید نتایج، آزمون بیماری‌زایی بر روی تمامی ژنوتیپ‌های بادنجان انجام شد. نتایج نشان دادند ارقامی از بادنجان که با استفاده از نشانگرهای مولکولی مقاوم به بیماری پژمردگی فوزاریومی شناسایی شده بودند، در آزمون بیماری‌زایی هیچ نوع علایمی ایجاد نکردند. ارقامی که با استفاده از نشانگرهای مولکولی حساس شناسایی شده بودند علایم بیماری پژمردگی فوزاریومی را با شدت‌های مختلف نشان دادند (شکل ۱۰ و ۱۱).



شکل ۸: الگوی حاصل از هضم آنزیمی با آنزیم برشی *PstI* ارقام مقاوم و ایجاد باندی به وزن تقریبی ۳۲۰ جفت عبارتند از ۲: شانتال، ۳: هادریان، ٤: China Round، ۸: اصفهان، ۱۱: آرو، ١٤: فاسلیس.



شکل ۹: محصول واکنش PCR با استفاده از آغازگر SRAP، (قطعه تکثیر شده ٤٢٦ جفت باز) عبارتند از ۲: شانتال، ۳: هادریان، ٤: China Round، ۸: اصفهان، ۱۱: آرو، ١٤: فاسلیس.

شکل ۱۰: نتایج آزمون ارقام حساس.

شکل ۱۱: نتایج آزمون ارقام مقاوم.

بحث

پژمردگی فوزاریومی بادنجان یک بیماری خاکزاد مهم است که تولید بادنجان را محدود می کند (۱۹). با توجه به اینکه مقاومت در برابر بیماری‌های گیاهی برای تولید قابل اطمینان مواد غذایی بسیار مهم است، برای کنترل این بیماری استفاده از ارقام مقاوم توصیه شده است.

به منظور شناسایی ارقام مقاوم می‌توان از نشانگرهایی استفاده کرد که به جایگاه‌های ژنی مقاومت به بیماری متصل می‌شوند. بنابراین می‌توان از آنها برای برنامه‌های اصلاحی انتخاب بر مبنای نشانگرها استفاده کرد. از مزایای این نوع انتخاب کاهش یا حذف نیاز به کاشت طولانی مدت و مراحل دشوار شناسایی مورفولوژیک است (۱۷).

تعدادی از نشانگرهای مبتنی بر DNA از جمله RFLP، AFLP، RAPD و SCAR برای انتخاب بر مبنای نشانگر معرفی شده‌اند. در این میان استفاده از نشانگرهای RAPD به دلیل کاربرد ساده و سریع و نیز نیازنداشتن به اطلاع از توالی ژنومی، نسبت به دیگر روش‌ها بیشتر مورد توجه می‌باشد (۲۰).

در سال های اخیر تحقیقات مختلفی بر روی قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *ملونجینی* انجام گرفته است. در سال ۲۰۱۷ مطالعه ای با هدف شناسایی ژنوتیپ های مقاوم به پژمردگی ورتیسیلیومی با استفاده از نشانگرهای اختصاصی آلل و شناسایی ژنوتیپ های مقاوم به پژمردگی فوزاریومی به وسیله نشانگر CAPS انجام شد. که با کاشت ژنوتیپ های مقاوم یافت شده در این تحقیق در مناطق آلوده می توان این دو بیماری را بدون استفاده از قارچکش ها کنترل نمود (۵).

در سال ۲۰۱۶ نقشه نواحی مقاومت در برابر پژمردگی فوزاریومی با عامل *فوزاریوم اکسیسپوروم* فرم اختصاصی *ملونجینیدر* گیاهان بادنجان کاشته شده مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاکی از مقاومت بسیار بالای ۳ بادنجان LS1934, LS174 و LS2436 در برابر پاتوژن ها بود (۱۹).

در سال ۲۰۱۶ نیز ۳ گونه مختلف بادنجان در مرحله گیاهچه برای بررسی مقاومت به ۲ جدایه مورد ارزیابی قرار

گرفتند. نتایج نشان داد که تلقیح MM 1131 و N 19 نسبت به *فوزاریوم اکواستی* (*Fusarium equiseti*) حساس می باشند. تلقیح N19 نسبت به *فوزاریوم سولانی* (*Fusarium solani*) حساس است. در حالی که N19 و MM 1131 نسبت به *فوزاریوم اکسیسپوروم فرم اختصاصی ملونجینی* حساس هستند (۲۱). در سال ۲۰۱٤ تنوع ژنتیکی ۷۰ جدایه قارچ عامل پژمردگی آوندی بادنجان برای واکنش با رده های مختلف و ارقام متفاوت و شناسایی نژادهای اختصاصی بررسی شدند. همچنین ۳۱ رقم نیز در شرایط گلخانه برای ارزیابی مقاومت نسبت به پژمردگی آوندی بررسی شدند. نتایج نشان داد که رده های مقاومت LS1131 و LS2436 علایم بیماری را نشان ندادند. اما ارقام حساس محلی (Hadrian و Kemer) علایم شدید و بیماری را نشان دادند. رقم های بادنجان Anatolia، Angela، Brigitte، Corsica، Hawk، Amadeo، Koksal، Nouma، Sharapova و Yula درجات مختلف حساسیت به ۳ جدایه Fomg را نشان دادند. اما شدت بیماریزایی برای AGR-703 به صورت چشمگیری متفاوت بود (۲۲).

در مطالعه حاضر نیز ارقام مقاوم شناسایی شده عبارت بودند از: شانتال، هادریان، اصفهان، آرو، فاسلیس، جهرم، تبریز، میرابل، ورامین، قصری، China Round، Black beauty، Purple و ارقام حساس مربوط به بندرعباس، یزد، لرستان، مازندران، دزفول، جیرفت، نیشابور، اراک، سمنان، زابل، دلمه، والنتینا، Italia 5B0010، China Long، Blacky بودند.

در سال ۲۰۱۳ بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های *فوزاریوم اکسیسپوروم فرم اختصاصی ملونجینی* از نواحی مختلف جغرافیایی با روش های بیماریزایی و VCG انجام گرفت. تعداد ۳۷٤ جدایه در ٤ گروه به شدت بیماری زا، بیماری زای متوسط و بسیار کم بیماری زا تقسیم بندی شدند. هیچ ارتباطی بین نواحی جدایه ها و شدت بیماریزایی آنها مشاهده نشد (۲۳).

در سال ۲۰۱۰، ۷٤ جدایه از قارچ *فوزاریوم اکسیسپوروم* به دست آمده از بادنجان های بیمارگر برای انجام آزمون بیماریزایی در گونه بسیار حساس Pala استفاده شد. تمامی جدایه های تست شده عامل بیماریزایی بادنجان بودند و به عنوان *فوزاریوم اکسیسپوروم فرم اختصاصی ملونجینی* شناسایی شدند (۲٤).

نتایج به دست آمده مطابق با نتایج سایر محققین می باشد که از نشانگرهای ISSR و RAPD برای شناسایی ارقام مقاوم بادمجان استفاده کردند (۱۰). برخی از محققین از آغازگرهای SRAP، SRAP–RGA، RAPD و SCAR برای شناسایی ژن مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی بادمجان استفاده نمودند (۱۱).

اما برخی دیگر از نشانگرهای مولکولی CAPS و RAPD به منظور شناسایی ارقام مقاوم بادنجان استفاده کردند (۲۵).

از میان نشانگرهای مورد بررسی در این تحقیق، نشانگرهای CAPS و SRAP از کارایی بالاتری برخوردار بودند. نشانگر CAPS، در کارهای اصلاحی زیاد استفاده می‌شود. زیرا این روش ساده، سریع و ارزان است و تنها نیازمند یک واکنش زنجیره‌ای پلی مراز، هضم آنزیمی و الکتروفورز روی ژل آگارز است. نشانگر SRAP نیز یک نشانگرمولکولی جدید است که چهارچوب های قرائت باز را تکثیر می کند. همچنین نشانگر SRAP در مقایسه با دیگر نشانگرها دارای قابلیت پایداری و تکثیر بیشتر و پیچیدگی کمتر می باشد (۲٦).

نتیجه گیری

در این مطالعه از ۲۰ ژنوتیپ مورد بررسی در ۱۳ مورد نشانگرهای مولکولی CAPS ، RAPD و SRAP باند شاخص مقاومت را تولید کردند. اما نشانگر SCAR قابلیت تفکیک ارقام مقاوم از حساس را نداشت. ارزیابی مقاومت این ژنوتیپ ها در شرایط گلخانه ای نیز تایید کننده روش مولکولی بود. به طوری که ۱۳ رقم مقاوم و ۱۵ رقم حساس به بیمارگر قارچی بودند. بنابراین این ارقام برای کاشت در مناطقی که بیماری پژمردگی فوزاریومی وجود دارد توصیه می‌شوند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از آزمایشگاه بیماری شناسی زکریای رازی واحد علوم و تحقیقات تهران به دلیل حمایت های اجرایی کمال امتنان را دارند.

References

1. Matuo T, Ishigami K. On the wilt of *Solanum melongena* L. and its causal fungus *Fusarium oxysporum* f. sp *melongenae*. Ann Phytopathol Soc Japan. 1958; 23: 189-192.

2. Safikhani N, Morid B, Zamanizadeh HR. First report of Fusarium wilt of eggplant caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* in Iran. New Dis Rep. 2013; 28: 16.

3. Anonymous. FAOSTAT. Preliminary 2009, Production data. Statistical data. Available at: http://www.faostat.fao.org (verified December 25, 2011).

4. Anonymous. 2013. Statistical annual report of Iranian agricultural crops.

5. Morid B, Hajmansoor S. Assessment of tomato genotypes resistance to *Verticillium* and *Fusarium* wilt diseases using molecular makers. J Microb World. 2017; 10: 81-93. [In Persian]

6. Tanksley SD, Ganal 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. High density molecular Linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics. 1992; 132: 1141-1160.

7. Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q. Resistance gene complexes: evolution and utilization. Ann Rev Phytopathol. 2001; 39: 285-312.

8. Hamelin R, Ouellette GB, Bernier L. Identification of *Gremmeniel abietina* races with random amplified polymorphic DNA markers Appl. Environ Microbiol. 1993; 59(6): 1752-1755.

9. Zhang AW, Hartman GL, Curio Penny B, Pedersen WL, Becker KB. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. Phytopathol. 1999; 89 (9): 796-804.

10. Toppino L, Vale G, Alberti P, Mennella G, Acciarri N, Rotino GL. Introgression of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* into cultivated eggplant and characterization of linked molecular markers for development of a markers assisted selection system. Proceedings of the XIIIth EUCARPIA Meeting, Warsaw, Poland. 2007; 157-166.

11. Mutlu N, Boyac FH, Gocmen M, Abak K. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD, and SCAR markerslinked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant. Theor Appl Genet. 2008; 117(8): 1303-1312.

12. Toppino L, Giampiero V, Rotino GL. Inheritance of *Fusarium* wilt resistance introgressed from *Solanum aethiopicum* Gilo and *Aculeatum* groups into cultivated eggplant (S. melongena) and development of associated PCR-based markers Mol Breed. 2008; 22(2): 237-250.

13. Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO. Fusarium Species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania, USA: Penn State University Press. 1983.

14. Abdullaheva K, Shifman IA. Resistance of eggplant to *fusarium* wilt. Selektsiya i Semenovodstvo. 1988; 1: 29-31.

15. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons Inc., New York, USA. 1994.

16. Davis L, Kuehle M, Battey J. Basic methods in molecular biology. 2nd ed. 1994; pp. 777.

17. Morid B, Hajmansoor S. Screening of resistance genes to Fusarium Crown rot disease in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars using RAPD markers. J Microb World. 2011; 3 (4): 251-259. [In Persian]

18. Gerlach W, Nirenberg H. The genus *Fusarium*-A pictorial atlas. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt Für Land-und Forstwirtschaft (Berlin-Dahlem). 1982; 209: 1-405.

19. Koji M, Takeo S, Satomi N, Hirotaka Y, Tsukasa N, Akio O, Hiroyuki F. Detailed mapping of a resistance locus against *Fusarium* wilt in cultivated eggplant (*Solanum melongena*). Theor Appl Genet. 2016; 129: 357-367.

20. Zhang HY, Liu X, He Z. Random amplified DNA polymorphism of *Nicotiana tabacum* L. cultivars. Biol Plant, 2005; 49: 605-607.

21. Phoebe KM, Abang MM, Isabel NW, Schroers HJ. Response of African eggplants to *Fusarium* spp. and identification of sources of resistance. Afr J Biotechnol. 2016; 15(11): 392-400.

22. Altinok HH. Can C, Boyaci HF, Topcu V. Genetic variability among breeding lines and cultivars of eggplant against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* from Turkey. Phytoparasitica. 2014; 42: 75-84.

23. Altinok HH, Can C, Colak H. Pathogenicity and Virulence Diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* Recovered from Eggplant. J Phytopathol. 2013; 161: 651-660.

24. Altinok HH, Can C. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* isolates from eggplant in Turkey by pathogenicity, VCG and RAPD analysis. Phytoparasitica. 2010; 38: 149-157.

25. Baysal Ö, Siragusa M, Gumrukcu E, Zengin S, Carimi F, Sajeva M, Silva JA. Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* by ISSR and RAPD markers on eggplant. Biochem Genet. 2010; 48: 524-537.

26. Maheswaran M. Molecular markers: History, features and applications. Adv Biotechnol. 2004; 1: 17-24.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 4, January 2019

Original Article

Identification of resistant eggplant cultivars to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*, the causal agent of fusarium wilt using molecular markers in Iran

Negin Safikhani[1], Bahar Morid[2], Hamid Reza Zamanizadeh[3], Shahab Hajmansoor[1]

[1]M.Sc., Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran. [2]Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Takestan Branch, Islamic Azad University, Takestan, Iran. [3]Professor, Department of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad university, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Eggplant fusarium wiltis an important factor of yield reduction throughout the world. The ability of this pathogen to survive for several consecutive years within the soil, even in the absence of the host, has made it difficult to control. Producing and using the resistant cultivar is the most effective and suitable method to control this disease. This study was aimed to identify fusarium wilt resistant eggplant cultivars.

Materials & Methods: First, leaf samples of domestic and hybrid eggplant cultivars were gathered from 28 provinces in Iran and then DNA extraction from young leaves of the cultivars was carried out using CTAB method. Four markers including CAPS, RAPD, SRAP, and SCAR were used to determine the resistant cultivars. In order to confirm the results, resistance and sensitivity of the genotypes were assessed in greenhouse conditions, as well.

Results: Out of 20 genotypes of this study, 13 showed index resistance band using CAPS, RAPD, and SRAP of molecular markers. On the other hand, the SCAR marker could not separate the resistant cultivars from the sensitive ones. Phenotype assessment of native and hybrids resistant cultivars in greenhouse condition confirmed the results of the molecular analysis.

Conclusion: In general, the use of resistant cultivars obtained in this study using molecular markers is recommended for planting in areas with fusarium wilt disease.

Keywords: *Fusarium* wilt, Eggplant, Molecular markers, Resistance gene.

Correspondence to: Negin Safikhani

Tel: +98 9125832170

E-mail: negin_safikhani@yahoo.com

Journal of Microbial World 2018, 11(4): 392-403.