



## ردیابی ژن های مقاومت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه در

### ارقام گوجه فرنگی با استفاده از نشانگر RAPD

بهار مرید<sup>۱\*</sup>، شهاب حاج منصور<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup>استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تاکستان، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی،

<sup>۲</sup>مریی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، گروه بیماری شناسی گیاهی

#### چکیده

سابقه و هدف: یکی از بهترین راه های کنترل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گوجه فرنگی ناشی از *F. oxysporum f.sp. radicle-lycopersici* استفاده از ارقام مقاوم می باشد. نشانگرهای مولکولی دارای همبستگی با ژن مقاومت، می توانند در برنامه های اصلاحی گوجه فرنگی مورد استفاده قرار گیرند. هدف از این پژوهش، شناسایی ارقام مقاوم (دارا بودن ژن *Frl*) و حساس ۲۷ رقم گیاه گوجه فرنگی با استفاده از نشانگر RAPD بود. مواد و روش ها: در ابتدا DNA مربوط به ۲۷ رقم گیاه گوجه فرنگی با استفاده از روش CTAB استخراج شد. از تکنیک PCR برای شناسایی *F. oxysporum f.sp. radicle-lycopersici* استفاده شد. سپس برای تکثیر ژن مقاومت *Frl* از نشانگر (UBC 194) RAPD استفاده گردید. نتایج به کمک آزمون بیماری زایی تأیید شدند.

یافته ها: در این مطالعه با استفاده از نشانگر UBC 194 مشخص گردید که از ۲۷ رقم و هیبرید مورد مطالعه، باند شاخص ۵۹۰ جفت بازی (وجود ژن مقاومت *Frl*) در ۲۰ رقم و هیبرید تشکیل شده بود. ارزیابی آزمون بیماری زایی نشان داد ارقامی از گیاه گوجه فرنگی که قطعه مربوط به ژن مقاومت *Frl* را تکثیر کرده بودند، فاقد هر نوع علائم بیماری بودند. اما گیاهانی که این قطعه ژنی را نداشتند، علائم بیماری را با شدت های مختلف نشان می دادند.

نتیجه گیری: با کاشت ارقام مقاوم یافت شده در این پژوهش در مناطق آلوده، می توان بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه را بدون استفاده از سموم شیمیایی کنترل نمود.

واژگان کلیدی: پوسیدگی فوزاریومی طوقه، RAPD، ژن *Frl*

دریافت مقاله: آبان ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: آذر ۱۳۸۹

#### مقدمه

عامل اصلی بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه در گیاه گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.) محسوب می شود (۱).

این بیماری اولین بار در سال ۱۹۶۹ از کشور ژاپن و پس از آن در سال ۱۹۷۱ از کالیفرنیا آمریکا گزارش شد (۲). اما امروزه به طور چشمگیری در تمام کشورهای جهان توسعه یافته است (۳ و ۴). در ابتدا این قارچ به عنوان نژاد

قارچ خاکزی *Fusarium oxysporum f.sp. radicle-lycopersici* (Forl)

(\* آدرس برای مکاتبه: تاکستان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تاکستان، دانشکده کشاورزی

تلفن: ۰۹۱۲۳۵۰۴۹۰۸

پست الکترونیک: b.morid@tiau.ac.ir

نشانگرهای CAPS و RAPD ژن‌های مقاومت به پوسیدگی فوزاریومی ریشه و پژمردگی فوزاریومی را در نسل  $F_3$  گوجه فرنگی بررسی و لاین‌های حساس و مقاوم را شناسایی نمودند (۱۴). هدف از انجام این پژوهش ارزیابی مقاومت (دارا بودن ژن *Frl*) و حساسیت ۲۷ رقم و هیبرید گیاه گوجه فرنگی با استفاده از نشانگر RAPD می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

الف) جمع‌آوری جدایه‌ها: نمونه‌های مورد بررسی در این مطالعه از گلخانه‌های گوجه فرنگی در مناطق مختلف استان‌های سیستان و بلوچستان، فارس، اصفهان و کرمان جمع‌آوری شدند. از بوته‌های گوجه فرنگی دارای علائم پژمردگی و پوسیدگی طوقه در مراحل گیاهچه‌ای و گیاه کامل نمونه‌برداری شد. به منظور جداسازی قارچ از نمونه‌ها، پس از شستشو از حد فاصل بافت سالم و آلوده قطعاتی به ابعاد  $1 \times 1$  میلی‌متر جدا شد و به ظروف پتری حاوی محیط کشت آب-آگار منتقل شدند. ظروف پتری به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد منتقل و روزانه برای ارزیابی رشد قارچ مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور شناسایی قارچ‌های رشد کرده از محیط‌های کشت Potato Dextrose Agar (PDA)، Carnation Leaf Agar (CLA) و Synthetischer Nahrstoffarmer Agar (SNA) استفاده گردید. در نهایت پرگنه‌هایی که به گونه *F. oxysporum* شباهت داشتند به منظور خالص‌سازی تک اسپور شدند.

ب) شناسایی جدایه‌ها: کشت‌های قارچ به مدت ۲ هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و روزانه ۱۲ ساعت نور معمولی و ۱۲ ساعت در نور ماورای بنفش نزدیک (Near-UV) نگهداری شدند. به منظور بررسی خصوصیات مرفولوژیک و میکروسکوپی گونه *F. oxysporum* از جمله شکل، اندازه، تعداد بندهای عرضی میکروکنیدی و ماکروکنیدی، طول فیالید، شکل و محل قرار گرفتن کلامیدوسپورها از محیط کشت‌های CLA و SNA استفاده شد (۱۵). همچنین برای ارزیابی خصوصیات ماکروسکوپی از جمله رنگ پرگنه، سرعت رشد و وجود رنگدانه، محیط کشت PDA به کار رفت.

جدیدی (J3) از *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) عامل پژمردگی آوندی در گیاه گوجه فرنگی معرفی گردید (۵ و ۶). مطالعات بعدی این یافته را رد کرد و پاتوژن را فرم تخصص یافته جدیدی از *Fusarium oxysporum* معرفی نمود. به همین دلیل این پاتوژن به عنوان *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* نام گذاری شد (۷). این تغییر به دلیل ویژگی‌های زیر انجام شد:

۱- علائم ایجاد شده توسط *Fol* و *Forl* با یکدیگر متفاوت است. به طوری که علائم بیماری ناشی از *Forl* در گیاهان بالغ بیشتر شامل پوسیدگی طوقه و ریشه می‌باشد اما در *Fol* علائم بیشتر به صورت پژمردگی آوندی است.

۲- *Forl* در دماهای خنک ( $18^{\circ}\text{C}$ ) شایع‌تر است (۵، ۶، ۸ و ۹). اما *Fol* در خاک‌هایی با دمای حدود  $27^{\circ}\text{C}$  شدیدتر می‌باشد. ۳- دامنه میزبانی *Forl* وسیع‌تر از *Fol* است (۱۰ و ۱۱). به طوری که *Forl* گونه‌های مختلفی از خانواده *Leguminosae* را نیز آلوده می‌کند، اما *Fol* به طور اختصاصی تنها گونه‌های جنس *Lycopersicon* را آلوده می‌نماید.

پوسیدگی طوقه در آب و هوای خنک در مزرعه‌ها و گلخانه‌های گوجه فرنگی توسعه یافته و به دلیل کاهش قابل ملاحظه محصول گوجه فرنگی، در تمام دنیا مورد توجه قرار گرفته است. در حال حاضر هیچ گونه سم تدخینی مؤثری برای کنترل پوسیدگی طوقه و اسپورهای هوازاد *Forl* که می‌توانند خاک تدخین شده را آلوده کنند وجود ندارد (۱). علاوه بر این امروزه سعی بر این است که استفاده از سموم شیمیایی به دلیل آلودگی‌های زیست محیطی و خطرات جدی برای مصرف کنندگان محدود گردد. بنابراین مقاومت ژنتیکی و استفاده از ارقام مقاوم، محتمل‌ترین روش کنترل این بیماری در گیاه گوجه فرنگی می‌باشد. با توجه به اینکه انتخاب فنوتیپی ارقام مقاوم گوجه فرنگی کاری پیچیده و زمان بر می‌باشد (۱۲)، استفاده از نشانگرهای مبتنی بر DNA در برنامه‌های اصلاح گیاهان تجاری کمک بزرگی به شناسایی ارقام مقاوم نموده است (۱۲ و ۱۳). فازبو (Fazio) و همکارانش نشانگرهای RAPD را در رابطه با ردیابی ژن مقاومت (*Frl*) به پوسیدگی ریشه و طوقه در گوجه فرنگی شناسایی کردند (۱). تانیولاک (Tanyolac) و آکال (Akkale) با استفاده از

جدول ۱: توالی و اندازه قطعه تولید شده توسط آغازگرهای مورد استفاده.

آغازگر	توالی	اندازه (bp)
Uni f	5'-ATCATCTTGTGCCAACTTCAG-3'	۶۷۰-۶۷۲
Uni r	5'-GTTTGTGATCTTTGAGTTGCCA-3'	
Sprl f	5'-GATGGTGGAAACGGTATGACC-3	۹۴۷
Sprl r	5'-CCATCACACAAGAACACAGGA-3'	
UBC 194	5'-AGGACGTGCC-3'	۵۹۰

مدت ۱ دقیقه (برای آغازگر Uni دمای اتصال ۵۱ درجه سانتی گراد و برای آغازگر Sprl دمای اتصال ۶۰ درجه سانتی گراد)، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۲ دقیقه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR به ژل آگاروز ۱/۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله نور UV مشاهده و عکس برداری گردید.

ه) استخراج کل DNA ژنومی بافت گیاه: برای استخراج DNA ژنومی از روش CTAB با اندکی تغییرات استفاده شد (۱۶). DNA کل از ۲۰۰ میلی گرم بافت تازه برگ گیاهان گوجه فرنگی استخراج گردید.

و) واکنش PCR برای تکثیر ژن *Frl*: برای تکثیر ژن *Frl* از نشانگر UBC 194 استفاده گردید (جدول ۱). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Master cycler) انجام شد. اجزای مورد استفاده در واکنش PCR در جدول ۲ خلاصه شده است. برنامه حرارتی با شرایط دمایی ۴۵ ثانیه واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد و به دنبال آن ۳۶ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال در دمای ۳۱ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه انجام گرفت. محصول PCR به ژل آگاروز ۱/۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید منتقل و پس از الکتروفورز به وسیله نور UV مشاهده و عکس برداری شد.

ز) آزمون بیماریزایی: این آزمون در دو مرحله اجرا شد. در

ج) استخراج DNA: جدایه های قارچی در ارلن حاوی محیط مایع PDB کشت داده شدند. ارلن ها درون شیکر انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت یک هفته نگهداری گردیدند. سپس توده میسلیمی به کمک پمپ خلاء و قیف بوختر روی کاغذ واتمن جمع آوری و با آب مقطر استریل شستشو شد. میسلیم به دست آمده از هر جدایه درون هاون استریل ریخته و با استفاده از ات مایع سائیده شدند. پودر به دست آمده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. به منظور استخراج DNA ژنومی از روش CTAB استفاده شد (۱۶).

د) تعیین هویت *F. oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*:

برای این منظور از آغازگرهای طراحی شده توسط هیرانو (Hirano) و آریه (Arie) (۱۷) استفاده شد. پس از استخراج DNA، واکنش PCR برای تمامی جدایه ها با استفاده از آغازگر Uni انجام گرفت (جدول ۱). این آغازگر دو فرم *F. oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* و *F. oxysporum f. sp. lycopersici* را از سایر فرم های تخصص یافته *F. oxysporum* متمایز می کند. به منظور تفکیک این دو فرم تخصص یافته از یکدیگر نیز از آغازگر Sprl استفاده شد (جدول ۱). واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf, Master cycler) انجام شد. اجزای مورد استفاده در واکنش PCR در جدول ۲ نشان داده شده است. برنامه حرارتی با شرایط ۹۴ درجه سانتی گراد برای واسرشت اولیه و به دنبال آن ۴۰ چرخه شامل واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دمای متناسب با آغازگر به

جدول ۲: اجزای واکنش PCR.

واکنش PCR با نشانگر	واکنش PCR با آغازگرهای	
	Sprl و Uni	UBC194
PCR buffer (10X)	۲/۵	۲/۵
MgCl <sub>2</sub> (50 mm)	۰/۸۵	۱
dNTP (10 mm)	۰/۵	۰/۵
Primer (10pmol/ml)	۱	۰/۸
Taq DNA polymerase (5unit/ml)	۰/۲	۰/۲
DNA (40ng)	۲	۲
Total	۲۵	۲۵

مرحله اول به منظور انتخاب جدایه هایی از نژاد ۲ با بالاترین میزان بیماریزایی از بذر گوجه فرنگی حساس (رقم 111 Early urbana) به این قارچ استفاده شد. بذرها پس از شستشو درون ظرف پتری قرار گرفته و به منظور جوانه زنی با کاغذی مرطوب پوشانده شدند. برای تهیه بستر مناسب، از خاک سبک به نسبت ۱:۱:۱ (شن، خاک رس، خاک برگ) استفاده گردید. بذرهای جوانه زده گوجه فرنگی درون گلدان ها کاشته شدند و در شرایط رطوبت نسبی ۷۰٪ و دمای ۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. برای مایه زنی از نشاهای دو برگی که برگ سوم آن ها در حال رویش بود استفاده شد. برای تلقیح خاک گلدان های حاوی نشاهای گوجه فرنگی، ۳ پلاگ PDA قارچی به قطر ۰/۵ سانتی متر که ۷ روز از تاریخ کشت آنها می گذشت به کار رفت. گلدان شاهد با ۳ پلاگ از محیط کشت PDA تلقیح و برای هر جدایه ۵ تکرار در نظر گرفته شد. بوته ها به مدت ۴ هفته نگهداری شدند و روزانه علائم و شاخص بیماری (Disease Index) بر اساس رتبه بندی ولیدف (Validov) و همکاران (۱۸) محاسبه و ثبت شد. رتبه بندی علائم بیماری به صورت زیر انجام گرفت: گیاهان سالم: عدد صفر، گیاهان با لکه های برگ ریز کمتر از ۲ میلی متر: عدد ۱، گیاهان با لکه های برگ توسعه یافته: عدد ۲، گیاهان با لکه های بزرگ و پژمردگی زیاد: عدد ۳، گیاهان



شکل ۱: باندهای تکثیر شده حاصل از واکنش PCR با آغازگر Uni.

مرده و خشکیه: عدد ۴.

میزان بیماریزایی با محاسبه Disease Index (DI) مشخص

و بررسی شد:

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

$n_0, n_1, n_2, n_3, n_4$ : تعداد گیاهانی می باشد که با درجات

مختلف علائم بیماری را نشان دادند (۱۸).

مرحله دوم این آزمون به منظور تایید نتایج به دست آمده از نشانگر UBC 194T، انجام گردید. روش انجام این آزمون مانند مرحله اول بود با این تفاوت که آزمون بیماریزایی برای تمام ۲۷ رقم انجام شد. پس از گذشت ۳ 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 شدند. سپس گیاهان به دو گروه مقاوم (بدون علائم بیماری) و حساس (با علائم بیماری) طبقه بندی گردیدند.

## نتایج

الف) شناسایی گونه: با استفاده از مشخصات مرفولوژیک و کلید شناسایی گراچ (Gerlach) و نیرنبرگ (Nirenberg) (۱۵) در مجموع از ۵۰ جدایه جمع آوری شده در ۴۴ مورد گونه *Fusarium oxysporum* شناسایی گردید. با استفاده از آغازگر Uni، تمامی ۴۴ جدایه، قطعه ای از DNA به طول ۶۷۲ جفت باز را تکثیر کردند (شکل ۱). نتایج نشان داد که از این تعداد، ۱۴ جدایه فرم تخصص یافته *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* و ۳۰ جدایه فرم تخصص یافته *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* بودند. از طرفی با استفاده از آغازگر Sprl، از ۴۴ جدایه، تنها ۱۴ جدایه قطعه ای به طول ۹۴۷ جفت باز را تکثیر نمودند (شکل ۲). ب) شناسایی ژن *Frl*: با استفاده از نشانگر UBC 194 از ۲۷ رقم و هیبرید مورد مطالعه، باند شاخص ۵۹۰ جفت بازی در ۲۰ رقم و هیبرید تشکیل و به عنوان ارقام مقاوم مشخص شدند (شکل ۳ و جدول ۳).

ج) نتایج آزمون بیماریزایی: روی ارقامی از گوجه فرنگی که با استفاده از نشانگر UBC 194 قطعه مربوط به ژن مقاومت *Frl* را تکثیر نمودند، هیچ نوع علائم بیماری مشاهده نگردید. اما گیاهانی که فاقد این قطعه ژنی بودند علائم بیماری را با شدت های مختلف نشان دادند.

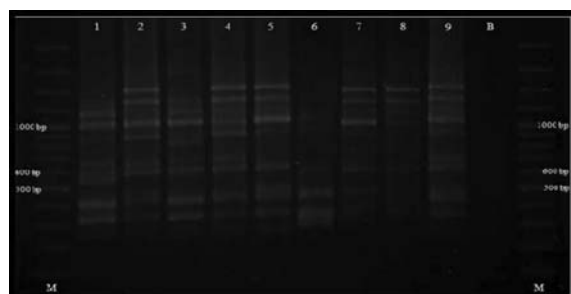
جدول ۳: تعیین مقاومت و حساسیت بر اساس قطعات تکثیر شده با نشانگر UBC 194 در ارقام و هیبریدهای گوجه فرنگی.

ارقام و هیبریدهای گوجه فرنگی	به <i>Forl</i> حساسیت یا مقاومت	ارقام و هیبریدهای گوجه فرنگی	حساسیت یا مقاومت به <i>Forl</i>
Peto Rock	مقاوم	Chef	مقاوم
Sunseed	مقاوم	Falat Y	مقاوم
Cal JN	مقاوم	Peto Early 84	مقاوم
Cal JN 3	مقاوم	CH-Falat	مقاوم
Caligen	مقاوم	Super Queen	حساس
Hyb. Petopride 5	حساس	Hyb. PS 6515	مقاوم
Hyb. Queenty	مقاوم	Karoon	مقاوم
Hyb. Comodoro	حساس	Hyb. Eden F1	مقاوم
Matin	حساس	Hyb. Pulad	مقاوم
Hyb. Petopride II	مقاوم	Hyb. Petopride 6	مقاوم
Hyb. Speedy	حساس	Early Urbana 111	حساس
Navid-3(N.3)	مقاوم	King Stone	مقاوم
Hyb. Fani	مقاوم	Super 2270	حساس
Hyb. Firenze	مقاوم		

## بحث

جایگاه های ژنی مقاومت به بیماری متصل می شوند. بنابراین می توان از آنها برای برنامه های اصلاحی انتخاب بر مبنای نشانگرها استفاده نمود. در دسترس بودن نشانگرهای مبتنی بر PCR برای بسیاری از ژن های مقاومت اجازه می دهد تا انتخاب بر مبنای نشانگر برای مقاومت در گوجه فرنگی 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 ایفا کنند (۲۰).

گوجه فرنگی یکی از مهم ترین محصولات کشاورزی است که به طور وسیعی در تمام دنیا کشت می شود (۱۹). پوسیدگی طوقه و ریشه یکی از مهم ترین بیماری های این گیاه بوده که توسط گونه *F. oxysporum f.sp. radicle-lycopersici* ایجاد می شود (۱). از آنجایی که مقاومت در برابر بیماری های گیاهی برای تولید قابل اطمینان مواد غذایی بسیار مهم می باشد، بنابراین به منظور کنترل این بیماری استفاده از ارقام مقاوم توصیه شده است. برای شناسایی ارقام مقاوم می توان از نشانگرهایی استفاده کرد که به



شکل ۳: باندهای تکثیر شده حاصل از واکنش PCR با نشانگر UBC 194. M: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، B: شاهد. ارقام ۵-۱ و ۹ مقاوم و ارقام ۸-۶ حساس هستند. ۱: پتوراک، ۲: کوینتی، ۳: ادن، ۴: کالی ژن، ۵: فیرنزه، ۶: اسپیدی، ۷: سوپر ۲۲۷۰، ۸: سوپر کویین و ۹: فانی.



شکل ۴: باندهای تکثیر شده حاصل از واکنش PCR با آغازگر Sprl. M: نشانگر ۱۰۰ جفت بازی، B: شاهد. جدایه های F2، F8، F26، F32، F37، F39 دارای باند تقریبی ۹۴۷ جفت بازی بوده و *Forl* شناسایی شدند. جدایه های F3، F7 و F37 فاقد باند بودند و به عنوان *Fol* شناسایی شدند.

گوجه فرنگی (۳۲) و شناسایی ارقام مقاوم برنج نسبت به بیماری بلاست (۳۳) استفاده شده است.

### نتیجه گیری

در مطالعه حاضر ۲۷ رقم و هیبرید گوجه فرنگی از نظر وجود ژن مقاومت *Fr1* به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گوجه فرنگی با استفاده از نشانگر RAPD مورد ارزیابی قرار گرفتند. ۲۰ رقم و هیبرید در واکنش به این نشانگر تولید باند ۵۹۰ جفت بازی کردند و به عنوان ارقام مقاوم شناسایی شدند. بنابراین این ارقام برای کاشت در مناطقی که بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه وجود دارد توصیه می شوند. این یافته با نتایج به دست آمده در مطالعه فازیو (Fazio) و همکارانش در سال ۱۹۹۹ هم خوانی دارد (۱). از طرفی در پژوهش جاری ارقام متین، سوپر کوپین، ارلی اوربانا ۱۱۱ و سوپر ۲۲۷۰ و هیبریدهای پتوپراید ۵، کومودورو و اسپیدی حساس شناخته شدند. بنابراین در مناطقی که بیماری پوسیدگی طوقه وجود دارد باید از کشت ارقام ذکر شده خودداری نمود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تاکستان به دلیل حمایت های مالی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

از مزایای این نوع نشانگرها می توان به کاهش یا حذف نیاز به کاشت طولانی مدت و مراحل دشوار شناسایی مرفولوژیک اشاره نمود (۲۱ و ۲۲). سودمندی این روش ها زمانی آشکارتر می شود که زمان، دقت و صحت در مراحل شناسایی از صفات کلیدی هستند. علاوه بر این، از آن جایی که در این روش ها هیچ ژن خارجی به گیاه وارد نمی شود انتقال صفات مطلوب بین جمعیت های آمیزشی تسهیل شده است (۲۳ و ۲۴).

تعدادی از نشانگرهای مبتنی بر DNA از جمله RFLP، AFLP، RAPD و SCAR برای انتخاب بر مبنای نشانگر معرفی شده اند. از این میان استفاده از نشانگرهای RAPD به دلیل شناسایی ساده و سریع و نیز عدم نیاز به آگاهی از توالی ژنومی نسبت به سایر روش ها بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. علاوه بر این در روش مذکور DNA به آسانی تکثیر شده و نیازی به استفاده از ایزوتوپ ها ندارد (۲۵). از این روش به طور موفقیت آمیزی برای ایجاد نشانگرها در ارگانسیم های مختلف و همچنین ساخت نقشه های ژنتیکی استفاده شده است. نشانگر RAPD تعداد زیادی از نشانگرهای چند جایگاهی را فراهم می کند که می توانند نمونه ها را با وضوح بالا از یکدیگر متمایز کنند (۲۶). نشانگرهای RAPD زمانی برای انتخاب بر مبنای نشانگر مفید می باشند که به طور قوی به ژنی مقاوم نسبت به یک بیماری یا صفات دیگر مرتبط بوده و از یک لاین منفرد غالب به تعداد زیادی جمعیت های مختلف منتقل شوند (۲۷). در سال های اخیر از نشانگر RAPD برای شناسایی ژن های مقاومت نسبت به بیماری های سفیدک پودری در سویا (۲۶)، پژمردگی فوزاریومی، آنتراکنوز زنگ در لوبیا (۲۸، ۲۹ و ۲۹)، آلترا ناریا در هیبریدهای ماندربین (۳۰)، پژمردگی فوزاریومی در بادمجان (۳۱) و شناسایی ژن مقاومت نسبت به قارچ *Cladosporium flavum* در

### References

1. Fazio G, Stevens MR, Scott JW. Identification of RAPD markers linked to fusarium crown and root rot resistance (*Fr1*) in tomato. *Euphytica*. 1999; 105(3): 205-210.
2. Benhamou N, Charest PM, Jarvis WR. Biology and host parasite relation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Tjamos EC, Beckman CH (Eds), *Vascular Wild Diseases of Plants: Basic Studies and Control*, Berlin, Springer-Verlag. 1989: 95-105.
3. Menzies JG, Jarvis WR. The infestation of tomato seed by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Plant Pathol*. 1994; 43(2): 378-386.
4. Brayford D. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, IMI descriptions of fungi and bacteria no. 1270. *Mycopathologia*. 1996; 133: 61-63.

5. Yamamoto I, Konada H, Kuniyasu K, Saito M, Ezuka A. A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* inducing root rot of tomato. Proceedings of the Kansai Plant Protection Society. 1974; 16: 17-29.
6. Sato R, Araki T. On the tomato root-rot disease occurring under vinyl-house conditions in southern Hokkaido. Ann Rep Soc Plant Prot, North Jpn. 1974; 25: 5-13.
7. Harvis WR, Shoemaker RA. Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root rot of tomato. Phytopathology. 1978; 68: 1679-1680.
8. Sonoda RM. The occurrence of *Fusarium* root rot of tomatoes in Florida. Plant Dis Rep. 1976; 60: 271-274.
9. Jarvis WR, Thorpe HJ. Susceptibility of *Lycopersicon* species and hybrids to the foot and root rot pathogen *Fusarium oxysporum*. Plant Dis Rep. 1976; 60(12): 1027-1031.
10. Rowe RC. Comparative pathogenicity and host ranges of *Fusarium oxysporum* isolates causing crown and root rot of greenhouse and field-grown tomatoes in North America and Japan. Phytopathology. 1980; 70(12): 1143-1148.
11. Menzies JG, Koch C, Seywerd F. Additions to the host range of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Plant Dis. 1990; 74(8): 569-572.
12. Lindhout P. The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. Euphytica. 2002; 124(2): 217-226.
13. 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. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics. 1992; 132(4): 1141-1160.
14. Tanyolac B, Akkale C. 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. Afr J Biotechnol. 2010; 9(19): 2727-2730.
15. 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.
16. 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. 1994; 426.
17. Hirano Y, Arie T. PCR-based differentiation of *Fusarium* f. sp. *lycopersici* and *radicis lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. J Gen Plant Pathol. 2006; 72(5): 273-283.
18. Validov SZ, Kamilova F, Lugtenberg BJJ. *Pseudomonas putida* strain PCL1760 controls tomato foot and root rot in stonewool under industrial conditions in a certified greenhouse. Biol Control. 2009; 48(1): 6-11.
19. Barone A, Frusciante L. Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. In: Guimaraes E, Ruane J, Scherf BD, Sonnino A, Dargie JD (eds) Marker-assisted selection: current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish /. FAO, Rome (Italy). Agriculture and Consumer Protection Dept., 978-92-5-105717-9, A1120. 2007; 153-164.
20. Hulbert SH, Webb CA, Smith SM, Sun Q. Resistance gene complexes: evolution and utilization. Annu Rev Phytopathol. 2001; 39: 285-312.
21. Zhang AW, Hartman GL, Curio-penny B, Pedersen WL, Becker KB. Molecular detection of *Diaporthe phaseolorum* and *Phomopsis longicolla* from soybean seeds. Phytopathology. 1999; 89(9): 796-804.
22. Hamelin R, Ouellette GB, Bernier L. Identification of *Gremmeniel aabietina* races with random amplified polymorphic DNA markers. Appl Environ Microbiol. 1993; 59(6): 1752-1755.
23. Goodwin PH, Annis SL. Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. Appl Environ Microbiol. 1991; 57(9): 2482-2486.
24. Smith OP, Peterson GL, Beck RJ, Schaad NW, Bonde MR. Development of a PCR-based method for identification of *Tilletia indica*, causal agent of Karnal bunt of wheat. Phytopathology. 1996; 86(1): 115-122.
25. Zhang HY, Liu XZ, He CS, Zheng CM. Random amplified DNA polymorphism of *Nicotiana tabacum* L. cultivars. Biol Plant. 2005; 49(4): 605-607.
26. Singh M, Chaudhuri I, Mandal SK, Chaudhuri RK. Development of RAPD Markers linked to *Fusarium* Wilt Resistance Gene in Castor Bean (*Ricinus communis* L). Genet Engin Biotech J. 2011; 28: 1-9.
27. Brown RN, Myers JR. RAPD Markers Linked to Morphological and Disease Resistance Traits in Squash. Cucurbit Genet Coop Rep. 2001; 24: 91-93.
28. Young RA, Kelly JD. RAPD Markers Flanking the Are Gene for Anthracnose Resistance in Common Bean.

- J Amer Soc Hort Sci. 1996; 121(1): 37-41.
29. Faleiro FG, Vinhadelli WS, Ragagnin VA, Correa RX, Moreira MA, Barros EG. RAPD markers linked to a block of genes conferring rust resistance to the common bean. *Genet Mol Biol.* 2000; 23(2): 399-402.
  30. Dalkilic Z, Timmer LW, Gmitter FG. Linkage of an *Alternaria* Disease Resistance Gene in Mandarin Hybrids with RAPD Fragments. *J Amer Soc Hort Sci.* 2005; 130(2): 191-195.
  31. Mutlu N, Boyac FH, Gocmen M, Abak K. Development of SRAP, SRAP-RGA, RAPD, and SCAR marker-linked with a *Fusarium* wilt resistance gene in eggplant. *Theor Appl Genet.* 2008; 117(8): 1303-1312.
  32. Wang A, Meng F, Xu X, Wang Y, Li J. Development of Molecular Markers Linked to *Cladosporium fulvum* Resistant Gene Cf-6 in Tomato by RAPD and SSR Methods. *Hort Sci.* 2007; 42(1): 11-15.
  33. Araujo LG, Prabhu AS, Pereira PA, Silva GB. Marker-assisted selection for the rice blast resistance gene *Pi-ar* in a backcross population. *Crop Breed Appl Biotechnol.* 2010; 10(1): 23-31.





## Screening of resistance genes to *Fusarium* Crown rot disease in Tomato (*Lycopersicon esculentum*) cultivars using RAPD markers

Bahar Morid<sup>1</sup>, Shahab Hajmansoor<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Plant Protection, School of Agriculture, Takestan Branch, Islamic Azad University, Takestan, Iran.

<sup>2</sup>Department of Plant Pathology, School of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

---

### Abstract

**Background and Objectives:** *Fusarium* crown rot caused by *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* is one of reasons of decrease in tomato yield worldwide.. Cultivation of resistant tomato cultivars is the best way to control this disease. Molecular markers linked to resistance genes would be useful for improving tomato breeding programs. This study was conducted to identify resistant (existence *Frl* gene) and sensitive varieties of tomatoes using RAPD marker.

**Material and Methods:** DNA was extracted using CTAB method from 27 tomato varieties. PCR technique was used to identify *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*. Then RAPD marker UBC 194 was used to amplify resistance gene *Frl*. Results were confirmed by pathogenicity test.

**Results:** In this study, based on UBC 194 marker it was found that 20 out of 27 tomato varieties and hybrids contained a 590 bp index band (existence of resistance gene *Frl*). Pathogenicity test showed that the tomato varieties that the resistance gene *Frl* was found in them had no symptoms while the varieties that did not contain the gene showed disease symptoms with different disease index.

**Conclusion:** Plantation of resistant varieties in the infected areas can control this disease without using fungicides.

**Keywords:** *Fusarium* crown rot, RAPD, *Frl* gene