شناسایی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته به ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون با استفاده از روش تجزیه تفرق توده‌ای

Identification of microsatellite markers linked to *Potato virus Y* (PVY) resistance genes in tobacco using Bulk Segregated Analysis (BSA) method

مرضیه شازده‌احمدی[۱*] و محمدرضا صلواتی میبدی[۲]

دریافت: ۱۳۹۳/۷/۱۰ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۱/۲۰

چکیده

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های ویروسی خسارت‌زای توتون در ایران و برخی از نقاط جهان ویروس Y سیب‌زمینی (PVY) است که نقش مهمی در کاهش کمیت و کیفیت محصول توتون دارد. موثرترین و بهترین روش برای کاهش خسارت این ویروس، اصلاح ارقام مقاوم نسبت به این بیماری است. از نشانگرهای مولکولی برای نشان‌دار کردن ژن‌های مقاومت در برنامه‌های به‌نژادی استفاده می‌شود. به منظور شناسایی نشانگرهای مولکولی پیوسته با ژن‌های مقاومت به PVY در توتون، ابتدا در سال اول، تلاقی اولیه بین دو والد VAM (مقاوم) و K326 (حساس) انجام شد، سپس بذرهای F1 به دست آمده کشت شده و بذر F2 به دست آمد. بذرهای F2 حاصل در سال دوم، در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش کاشته شدند. گیاهان F2 با جدایه خالص‌سازی شده سویه O ویروس PVY مایه‌زنی شدند و سپس مورد ارزیابی‌های فنوتیپی قرار گرفتند. توسعه بیماری PVY با محاسبه سطح زیر منحنی پیشرفت آلودگی تعیین شد. در ادامه کار از ده بوته مقاوم و ده بوته حساس به PVY، بر اساس علایم مزرعه ای نمونه برگ تهیه گردید. روی این نمونه‌ها برای تایید مقاومت و حساسیت به PVY آزمون الایزا انجام شد و بر اساس نتایج الایزا، بوته‌های حساس و مقاوم شناسایی شدند. در این تحقیق با استفاده از ۱۰۰ جفت آغازگر SSR انتخابی و همچنین به کارگیری روش تجزیه تفرق توده‌ای اقدام به شناسایی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با ژن مقاومت به PVY در دو توده مقاوم و حساس به این بیماری و همچنین بوته‌های جمعیت F2 گردید. سه ترکیب جفت آغازگر به نام‌های PT30002، PT20165 و PT20357 در DNA دو توده مقاوم و حساس تولید چندشکلی نمودند. این جفت آغازگرها بعد از آزمون روی تک بوته‌های دو توده، روی تک بوته‌های جمعیت F2 مورد آزمون و تجزیه قرار گرفتند. در نهایت، فاصله نشانگرها از ژن مقاومت با استفاده از نرم افزار Mapmaker Ver.3.0 تعیین گردید. نشانگر PT3 با فاصله ۱۷/۵ سانتی مورگان در موقعیت ناجفت و دو نشانگر PT1 و PT2 به ترتیب با فاصله ۱۸/۱ و ۳۷/۴سانتی مورگان از ژن مقاومت قرار داشتند.

واژگان کلیدی: PVY، ریزماهواره، جفت آغازگر، توتون، چندشکلی

۱- محقق، گروه بیوتکنولوژی، مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر

۲- معاون پژوهشی، مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش، بهشهر

* **نویسنده مسئول مکاتبات:** noshinshazdeahmadi@yahoo.com

مقدمه

توتون، یکی از گیاهان مهم صنعتی است که در اقتصاد و درآمد کشورهای تولید کننده نقش بسیار مهمی دارد. علی رغم استفاده از روش‌های به‌زراعی، کشت این محصول در کشور با محدودیت‌هایی از جمله بیماری‌های گیاهی مواجه است (Khajehpoor, 2005). یکی از ویروس‌های مهم بیمارگر در توتون که رشد و کیفیت این گیاه را با مشکل مواجه کرده و سبب کاهش کمیت و عملکرد نهایی آن می‌شود، ویروس Y سیب زمینی (PVY) می‌باشد. ویروس PVY متعلق به جنس *Potyvirus* است که گیاهان خانواده سولاناسه مانند سیب‌زمینی، توتون، گوجه‌فرنگی و فلفل را آلوده می‌کند. ویروس PVY به صورت ناپایا به وسیله شته سبز هلو (*Myzus persicae*) و از راه مکانیکی منتقل می‌شود. ویروس PVY باعث ایجاد علایم روشنی یا زردی رگبرگ‌ها، لکه‌های نکروتیک یا (قهوه‌ای شدن رگبرگ‌ها)، رگبرگ نواری، علائم موزاییکی، نکروز رگبرگ‌های اصلی و فرعی و گاهی نکروز ساقه می‌شود. میزان خسارت بسته به عوامل مختلف از جمله ژنوتیپ توتون و زمان وقوع آلودگی متفاوت است. میزان خسارت این بیماری در توتون زیاد بوده و بین ۴۰ تا۱۰۰ درصد گزارش شده است (Lewis, 2007).

بهترین و موثرترین روش کنترل این بیماری، ایجاد و استفاده از ارقام مقاوم می‌باشد (Reynolds, 2011). از آن‌جا که ایجاد مقاومت بهPVYدر توتون با استفاده از روش‌های متداول و کلاسیک اصلاح نباتات مشکل و وقت‌گیر می‌باشد، نشانگرهای مولکولی می‌توانند در جهت تکمیل روش‌های به‌نژادی مفید باشند. می‌توان به جای استفاده از انتخاب فنوتیپی در روش‌های معمول به‌نژادی، گیاهان مورد نظر را توسط نشانگرهای مولکولی در سطح ژنوتیپی تفکیک نمود. استفاده از نشانگرهای مولکولی روشی سریع‌تر و مطمئن‌تر است از این رو، نشانگرهای مولکولی می‌توانند به عنوان ابزار موثری در انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم به PVY مورد استفاده قرار گیرند. نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA ابزار ارزشمندی برای به‌نژادی گیاهان و به ویژه شناسایی ژرم پلاسم در بانک ژن، ارزیابی روابط خویشاوندی و انتخاب به کمک نشانگر (Marker assisted selection, MAS) برای مقاومت به آفات، بیماری‌ها و برخی صفات مطلوب هستند (Rodol and Xiong, 2008). استفاده از این نشانگرها امکان انتخاب گیاهان مطلوب را درون جمعیت در حال تفرق مستقیما و بر اساس ژنوتیپ به جای فنوتیپ فراهم می‌کند.

نشانگرهای مولکولی پیوسته به ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها در گیاهان، بازده اصلاح این گیاهان را به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش داده است. یک نشانگر مولکولی برای یک ژن خاص، قسمتی از DNA است که کاملا به یک ژن پیوسته باشد. بنابراین هر گیاه که حاوی یک نشانگر خاص باشد، حاوی ژن پیوسته به آن نیز خواهد بود. چنانچه صفات تک ژنی مانند مقاومت به برخی از بیماری‌ها را بتوان به وسیله پیوستگی با نشانگرهای مولکولی نشانمند نمود، زمان و هزینه لازم برای انتقال این ژن‌ها از یک زمینه ژنتیکی به دیگری به شدت کاهش خواهد یافت و در بهبود تولید ارقام مقاوم به شدت موثر خواهد بود (Moon *et al*., 2008). ریزماهواره‌ها یا ردیف‌های تکراری ساده (SSR) تکرارهای پشت سر هم کوچکی از DNA هستند که معمولا دو تا پنج جفت باز طول داشته و در ژنوم اغلب یوکاریوت‌ها یافت می‌شوند. نشانگرهای SSR(Simple Sequence Repeat) یکی از مهم‌ترین نشانگرهای مولکولی می‌باشند که به دلیل فراوانی و سطوح چند شکلی بالا، پراکندگی یکنواخت در طول ژنوم، نحوه توارث هم بارز و کم هزینه بودن، درجه بالایی از تنوع آللی را نشان می‌دهند و بنابراین یک نشانگر مولکولی بسیار مناسب برای مکان یابی ژنتیکی، مطالعه جمعیت و شناسایی ژن‌های مقاومت در گیاهان می‌باشند (Naghavi *et al*., 2005).

گزارش‌های تحقیقاتی متعددی درمورد ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون منتشر شده است و نیز در تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی، نشانگر ریزماهواره (SSR) به طور چشم‌گیری برای نشان دادن پیوستگی با ژن مقاومت، در حال گسترش است. با پیوند نشانگرها به مکان ژنی مربوط به مقاومت به PVY در توتون، می‌توان از نشانگرها در برنامه‌های به نژادی و مدیریت بیماری‌های ویروسی توتون به ویژه بیماری PVY جهت انتخاب و ردیابی ژنوتیپ‌های دارای مکان ژنی

مقـاومت استفـاده کـرد. به علاوه با پیـوند نشانگرها، امکان تکثیر توالـی ژن‌ها نیـز وجـود دارد. سـرناک و همکاران (Cernak *et al*., 2008) بیان کردند که ارزیابی مورفولوژیکی مقاومت به PVY، مشکل، پرهزینه و مستلزم صرف زمان زیادی است.به همین دلیل شناسایی ژن‌های مقاومت به PVY در توتون با استفاده از نشانگرهای ریزماهواره، روشی سریع و راحت بوده و کمک زیادی به تولید ارقام مقاوم می‌کند (Dinant *et al*., 1993). محل ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون توسط گوپتن و بورک (Gupton and Burk, 1973) بررسی شده است. نتایج تحقیق آن‌ها نشان داد که احتمالا مقاومت به بیماری PVY در توتون، به یک ژن روی کروموزوم E مربوط می‌شود.رودال و ژانگ (Rodol and Xiong,2008) با بررسی عملکردهای تکمیلی دو ژن مغلوب تعیین کننده دوام مقاومت به PVY در توتون ویرجینیا A موتانت دریافتند که توتون رقم VAM و رقم NC 745 حامل ژن *Va* هستند که این ژن باعث ایجاد مقاومت به بیماری PVY می‌شود. نتایج آن‌ها نشان داد که مقاومت توتون رقم VAM نسبت به بیماری PVY به وسیله دو ژن مغلوب به نام ژن *Va* و *Va2* تعیین می‌شود. لویس (Lewis, 2007) ژنوتیپ‌های *Nicotiana tabacum* و *Nicotiana africana* که دارای مقاومت ژنتیکی نسبت به بیماری PVY هستند را بررسی و مشخص کرد که در گونه *N. africana* یک ناحیه ژنومی به نـام (Nafr) وجـود دارد که این ناحیـه دچار انتقـال مواد ژنتیکی شده و دارای یک ژن مغلوب مقاومت به PVY به نام ژن Va می‌باشـد. کـزوباکا و دوروسـزوکا (Czubacka and Doroszewska, 2009) در نتیجـه تحقیقـات خـود، توتون دابل هاپلـوییـدی را ایجـاد کـردند که دارای منـابع مختـلف مقـاومت به بیمـاری PVY بود.که ایچـی و همکاران (Keiichi *et al*., 2004) یک نژاد جدید از ویروس Y سیب‌زمینی را در توتون بارلی در ژاپن کشف کردند. مشخص شد که روی برگ‌های توتون بارلی، دو جدایه A-1 و A-2 ایجاد لکه‌های زرد و نقاط حلقوی نکروزه قهوه‌ای و علائم سیستمیک می‌کنند. جدایه A-1 به گروهی از نژادهای نکروتیک PVY تعلق دارد. مکان‌یابی مولکولی ژن مقاومت به بیماری PVY (ژن *Rysto*) در سیب‌زمینی توسط بریگنتی و همکاران (Brigenti *et al*., 1998) بررسی شد.

روش تجزیه تفرق توده‌ای (BSA) توسط چندین محقق برای شناسایی نشانگرهای پیوسته به ژن‌های مقاومت به بیماری‌ها مطالعه و بررسی شده است. با استفاده از روش BSA، نشانگرهای مولکولی RAPD پیوسته به ژن مقاومت به بیماری رایزومانیا در چغندرقند بررسی شده است (Pelsy and Merdinoglu, 1996). در کنار این روش، روش انتخاب به کمک نشانگر (MAS) نیز برای شناسایی ژن مقاومت کاربردهای زیادی دارد، بارون (Barone, 2004) نشانگرهای پیوسته به مکان‌های ژنی مقاومت به بیماری در برنامه انتخاب به کمک نشانگر (MAS)در گوجه فرنگی را مورد مطالعه و بررسی قـرار داد. نتـایج تحقیـق وی مشخـص کـرد که مقـاومت به بیمـاری PVY در گوجه فرنگی توسط یک ژن غالب به نام *Pot-1* کنترل می‌شود که این ژن روی کروموزوم شماره ۳ از ژنوم گوجه فرنگی قرار دارد.

از آن‌جایی که تاکنون هیچ گونه بررسی و تحقیقی در مورد شناسایی نشانگر SSR پیوسته به ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون در داخل و خارج از کشور صورت نگرفته است، لذا این پژوهش به منظور شناسایی تعدادی از نشانگرهای ریزماهواره پیوسته با ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون در جمعیت در حال تفرق حاصل از تلاقی والد مقاوم VAM با والد حساس K326 انجام شد. نشانگـرهای ریزماهـواره پیوستـه با مقاومت به PVY شناسـایی شده در این پژوهش می‌توانند در برنامه‌های به‌نژادی به منظور افزایش مقاومت به این بیماری در توتون مورد استفاده قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

مواد گیاهی مورد مطالعه در این تحقیق، جمعیت در حال تفرق F2 حاصل از تلاقی ارقام VAM × K326 بود. یک درصد بذر F2 حاصل از این تلاقی در مزرعه تحقیقاتی مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش شهرستان بهشهر با مختصات جغرافیایی N 36º 43.19, E 53º 43. 38 کاشته و در مرحله سه برگی با ویروس PVY مایه‌زنی شدند. با انجام

آزمون الایزا، تعداد ده بوته کاملا مقاوم و ده بوته کاملا حساس به PVY انتخاب شده و از هر کدام از آن‌ها به طور جداگانه نمونه برگ تهیه شد. نمونه‌ها پس از انجماد در نیتروژن مایع، به دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند و تا زمان استخراج DNA در این دما نگهداری شدند.

ارزیابی مزرعه‌ای و تست الایزا

گیاهان جمعیت در حال تفرق (F2) مورد ارزیابی‌های مزرعه‌ای قرار گرفتند. بذرهای F2 به‌دست آمده، در سال دوم این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار در مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش کشت شده و مورد بررسی قرار گرفتند. هر کرت شامل دو خط یک متری با ۱۷ سانتی‌متر فاصله و تراکم کاشت ۶ گرم بذر در مترمربع بود. مراقبت‌های معمول زراعی در طی فصل کشت انجام شد. برای آلودگی مصنوعی، بعد از انتقال نشاهای گیاهان به زمین اصلی و رسیدن به مرحله ۶-۴ برگی، مایه‌زنی مکانیکی با عصاره ویروس Y سیب‌زمینی صورت گرفت. واکنش نسبت به ویروس ژنوتیپ‌های توتون بررسی گردید. جهت تایید آلودگی یا عدم آلودگی بوته‌ها به PVY بوته‌ها با آزمون دوطرفه الایزا (DAS-ELISA) با استفاده از آنتی‌بادی پلی‌کلونال ویروس Y سیب‌زمینی مورد آزمایش قرار گرفتند. عصاره نمونه‌ها به داخل چاهک‌هایی که قبلاً با پادتن چند همسانه‌ای پوشش یافته بودند ریخته شد. پلت‌ها پس از یک شب نگهداری در یخچال شسته شدند. در مراحل بعدی، به ترتیب از پادتن مخلوط شده (Conjugate) شده با آنزیم آلکالین فسفاتاز و سوبسترای آنزیم (پارا نیترو فنیل فسفات) استفاده شد. یک ساعت پس از ریختن سوبسترا و ظهور رنگ در چاهک‌ها نتایج آن به صورت چشمی خوانده شد.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA، برگ‌های جوان و سالم والدین و نیز از هر یک از ده بوته مقاوم و ده بوته حساس به PVY به طور جداگانه به میزان ۳-۲ گرم جمع‌آوری و DNA ژنومی استخراج گردید. بدین منظور برگ‌ها پس از پودر شدن با نیتروژن مایع و افزودن بافر استخراج مورد تیمار با آنزیم RNase قرار گرفتند. سپس DNA توسط کلروفرم- ایزوآمیل الکل جدا و در ۵۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شده و توسط ایزوپروپانول سرد رسوب نمود. رسوب‌های DNA پس از شستشو با الکل ۷۰٪ در ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شده و به مدت یک شب در یخچال معمولی در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از دو روش طیف‌سنجی نوری با طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر والکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد ارزیابی و تصویر ژل توسط دستگاه ژل داک عکس‌برداری و مشاهده گردید.

آغازگرهای ریزماهواره (SSR)

یک صد جفت آغازگر SSR (ریزماهواره) مورد استفاده در این تحقیق از شرکت سیناژن خریداری شدند. این ۱۰۰ جفت آغازگر با استفاده از نقشه SSR توتون طوری انتخاب شدند که اولا توزیع یکنواختی روی ۲۴ کروموزوم توتون داشته باشند و ثانیا فاصله بین هر دو نشانگر مجاور بیش از ۲۰ سانتی مورگان نباشد.

آزمون آغازگرهای SSR توتون

برای ایجاد بهترین شرایط PCR (Polymerase Chain Reaction) ابتدا غلظت‌های مناسب $Mgcl_2$ (نمک منیزیم)، آغازگر و DNA توسط آزمون گرادیان غلظت تعیین گردید. واکنش PCR در تیوب‌های حاوی ۲۵ میکرولیتر حجم کلی محلول واکنش شامل یک میکرولیتر DNA ژنومی(50 ng/µl)، دو میکرولیتر $Mgcl_2$ (۵/. مولار)، ۵/. میکرولیتر مخلوط

dNTP، ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase، ۲/۵ میکرولیتر از بافر PCR (10X) ، ۱۵/۷ میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۱/۵ میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای SSR توتون (رفت F و برگشت R) تهیه شد. این مواد به طور جداگانه به هر یک از میکروتیوب‌های کوچک ml ۲/. منتقل شده و در داخل دستگاه ترموسایکلر (شرکت Bio-Rad) قرار داده شدند. چرخه‌های حرارتی شامل یک چرخه واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه، به دنبال آن ۳۵ چرخه با واسرشته‌سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، اتصال آغازگر در دماهای ۵۰ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و توسعه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و نهایتا یک چرخه توسعه نهایی برای تکمیل طول قطعات تکثیر شده به مدت هشت دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بود.

الکتروفورز عمودی و رنگ آمیزی ژل

جداسازی محصولات تکثیری با استفاده از الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید واسرشته‌ساز شش درصد در دستگاه الکتروفورز عمودی (شرکت Bio-Rad) انجام شد. زمان الکتروفورز بسته به طول محصولات تکثیر از ۳۰ تا ۶۰ دقیقه متغیر بود و از توان ۸۵ وات استفاده گردید. رنگ‌آمیزی ژل با روش نیترات نقره انجام شد. بعد از خشک کردن شیشه با استفاده از اسکنر، تصویر ژل اسکن گردید. الگوهای نواربندی نمونه‌های حاصل طبق روش لندر و همکاران (Lander *et al*., 1987) به صورت وجود یا عدم وجود نوار امتیازدهی شدند. ژنوتیپ‌های دارای یک نوار (یک آلل) هموزیگوت و ژنوتیپ‌های دارای دو نوار (دو آلل) هتروزیگوت در نظر گرفته شدند. همچنین برای هر نشانگر آلل‌ها در ژنوتیپ‌های مورد مطالعه به صورت ۱، ۲ ، ۳ و ... نام‌گذاری شده و برای برآورد فراوانی آللی هر جایگاه ریزماهواره استفاده شدند.

تجزیه تفرق توده‌ای (Bulk Segregant Analysis, BSA)

برای شناسایی نشانگرهایی که همراه با ژن مقاومت به بیماری PVY در توتون تفکیک می‌شوند، از آزمون تجزیه تفرق توده‌ای که توسط میچل مور و همکاران (Michelmore *et al*., 1991) توضیح داده شد، با کمی تغییرات استفاده گردید. برای شناسایی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته به ژن مقاومت به PVY، ابتدا چندشکلی والدین با استفاده از ۱۰۰ نشانگر ریزماهواره مورد بررسی قرار گرفت. سپس، نمونه‌های DNA استخراج شده از ده عدد از مقاوم‌ترین و ده عدد از حساس‌ترین گیاهان جمعیت F2 حاصل از تفرق والد مقاوم VAM با حساس K326 تهیه گردید و بدین طریق توده مقاوم و حساس تشکیل شد. دو توده از مقاوم‌ترین و حساس‌ترین گیاهان نسل F2 به طور جداگانه توسط ۲۸ آغازگر SSR چندشکل انتخابی از مرحله اول، تست و غربال شدند تا نشانگرهای نهایی پیوسته به PVY در توتون شناسایی گردند. اطلاعات به دست آمده برای هر جفت آغازگر با توجه به وجود و عدم وجود هر باند امتیاز داده شد. والدی که دارای یک باند (یک آلل) در هر چاهک بود به عنوان هموزیگوت و والدی که دارای دو باند (دو آلل) در هر چاهک بود به عنوان هتروزیگوت در نظر گرفته شد. پس از تایید ایجاد چندشکلی آغازگرهای انتخابی روی دو مخلوط DNA، این ترکیب روی تک بوته‌های تشکیل‌دهنده آن‌ها آزمایش شد تا فاصله نشانگر از ژن مقاومت مشخص شود. در آخر، آن دسته از ترکیبات آغازگرها که فاصله‌ای کم‌تر از ۵۰ سانتی مورگان از ژن مقاومت نشان دادند، روی تک بوته‌های جمعیت مورد آزمایش قرار گرفتند.

محاسبات آماری

نشانگرهای ریزماهواره توسط تجزیه خانواده‌های تفرق یافته با استفاده از نرم افزار Mapmaker Ver 3.0 تعیین نقشه پیوستگی گردیدند. نقشه‌های پیوستگی با استفاده از این نرم افزار و فاصله کم‌تر از ۵۰ سانتی مورگان و LOD≥3 حاصل

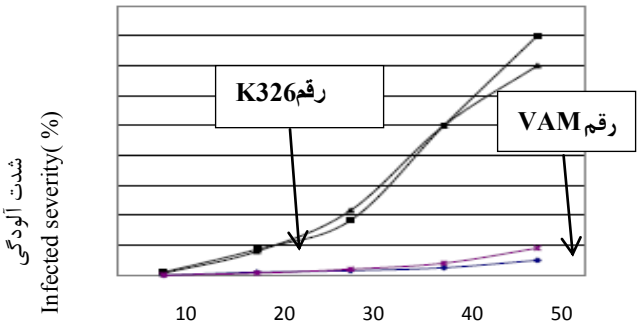
گردیدند. داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار آماری SAS V.9.2. مورد آنالیز و تجزیه واریانس قرار گرفته و مقایسه میانگین صفات در دو رقم مقاوم و حساس از طریق آزمون t (t-Test) انجام شد.

نتایج

تجزیه فنوتیپی

ارزیابی مورفولوژیکی بیماری PVY در والدین حساس و مقاوم

ارزیابی مورفولوژیکی بیماری PVY روی ارقام مقاوم و حساس هر ده روز یک بار انجام گرفت. والدین از نظر شدت بیماری تفاوت معنی‌دار نشان دادند، به طوری که والد مقاوم (رقم VAM) دارای کم‌ترین میزان شدت بیماری بوده و والد حساس (رقم K326)دارای بیش‌ترین میزان شدت بیماری PVY بود. در شکل ۱ پیشرفت آلودگی لاین‌های والدینی در ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ روز پس از آلودگی اولیه نشان داده شده است. پیشرفت سریع بیماری PVY در لاین حساس (K326) از روز ۲۰ به بعد آغاز شد. لاین مقاوم دارای سرعت رشد بسیار کم و تقریبا خطی تا پایان دوره ارزیابی بیماری بودند. سه عامل محیطی افزایش دما، رطوبت و نور، عوامل موثر و مهم در شروع و گسترش بیماری PVY در توتون هستند (Reynolds, 2011). توسعه بیماری PVY به وسیله سطح زیر منحنی پیشرفت آلودگی اندازه‌گیری شد. نتایج تجزیه واریانس ومقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که تفاوت ژنوتیپ‌های مقاوم و حساس برای صفت درصد بوته‌های آلوده به PVY در سطح احتمال ۱٪ معنی‌دار بود (جدول‌های ۱ و ۲).



شکل ۱- منحنی پیشرفت آلودگی PVY در ارقام والدینی
Fig. 1. Disease Progress curve of PVY in parental cultivars

جدول ۱- تجزیه واریانس درصد بوته‌های آلوده به بیماری PVY در دو رقم حساس و مقاوم توتون
Table 1. Analysis of variance for percentage of infected plants to PVY in susceptible and resistant cultivars of tobacco.

S.O.V	منابع تغییرات	df. درجه آزادی	MS میانگین مربعات
Genotype	ژنوتیپ	1	2.251**
Error	خطا	2	0.124
Total	کل	3	-

** : معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪

** : Significant at 1% level of probability.

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد بوته‌های آلوده و حضور ژن مقاومت در دو رقم حساس و مقاوم توتون

Table 2. Mean comparison of percentage of infected plants to PVY and presence of resistance gene in susceptible and resistant cultivars of tobacco

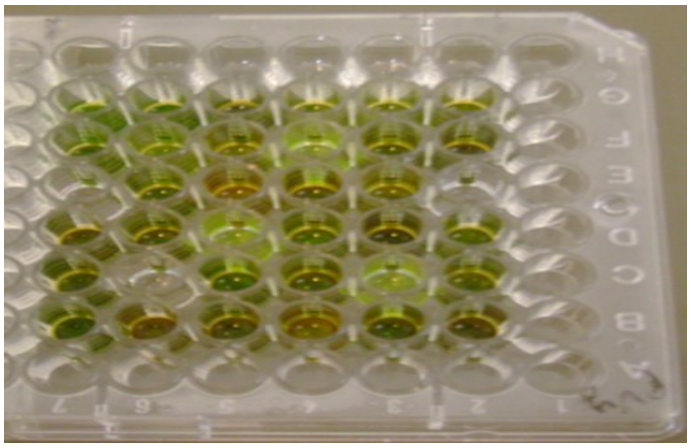
Cultivar	رقم	درصد بوته‌های آلوده Percentage of infected plants	درصد حضور ژن مقاومت Percentage of presence of resistance gene
VAM (Resistant)	VAM (مقاوم)	9.1 b	79.8 a
K326 (Susceptible)	K326 (حساس)	80.2 a	3.1 b

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Means with similar letters in each column are not significantly different at 1% level of probability.

ارزیابی بیماری PVY با آزمون الایزا

نتایج آزمون الایزا بر اساس تغییر رنگ چاهک‌ها (از بی‌رنگ تا زرد رنگ) پس از ۳۰ الی ۱۲۰ دقیقه بعد از افزودن محلول سوبسترا بررسی گردید و به صورت چشمی خوانده شد، به طوری‌که چاهک‌های بدون رنگ، نشان‌دهنده پاسخ منفی واکنش نسبت به PVY بود و چاهک‌های زرد رنگ، نشان دهنده پاسخ مثبت واکنش نسبت به PVY بود (شکل ۲). میانگین الایزای بوته‌های مقاوم و حساس به ترتیب ۰/۱۳۲ و ۱/۳۶۰ بود.

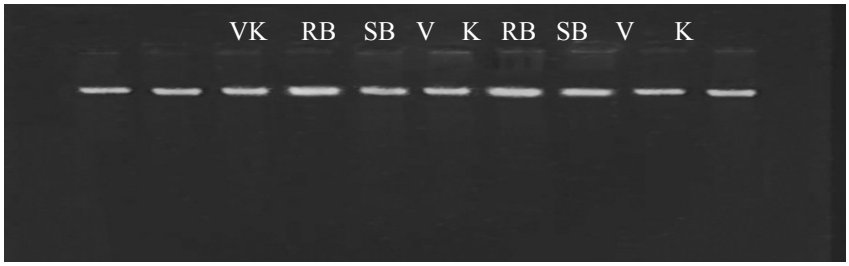


شکل ۲- نتایج ارزیابی بیماری PVY با تست الایزا در نتاج F2

Fig. 2. The results of PVY infection with ELISA test in F2 progenies.

استخراج DNA ژنومی از تک بوته‌ها و نیز توده‌های مقاوم و حساس به PVY

DNA ژنومی استخراج شده در ژل آگارز ۰/۸ درصد با ولتاژ ۶۰ ولت اسمیر (Smear) کمی داشت، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که روش استفاده شده برای استخراج DNA از بافت برگی روشی سریع و مناسب بوده و DNA استخراج شده از کیفیت مطلوبی برخوردار بود. کمیت DNA نیـز با استفـاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد که پس از تایید بهینه بودن شرایط استخراج به دلیل تعداد زیاد نمونه‌ها بسته به حجم رسوب DNA رقیق‌سازی در بافر TE به میزان ۱۵۰-۱۰۰ میکرولیتر انجام شد. تصویر ژل توسط دستگاه ژل داک عکس‌برداری شده و مشاهده گردید. حضور تک باند شفاف نشان دهنده DNA سالم و با کیفیت مناسب تلقی گردید (شکل ۳).



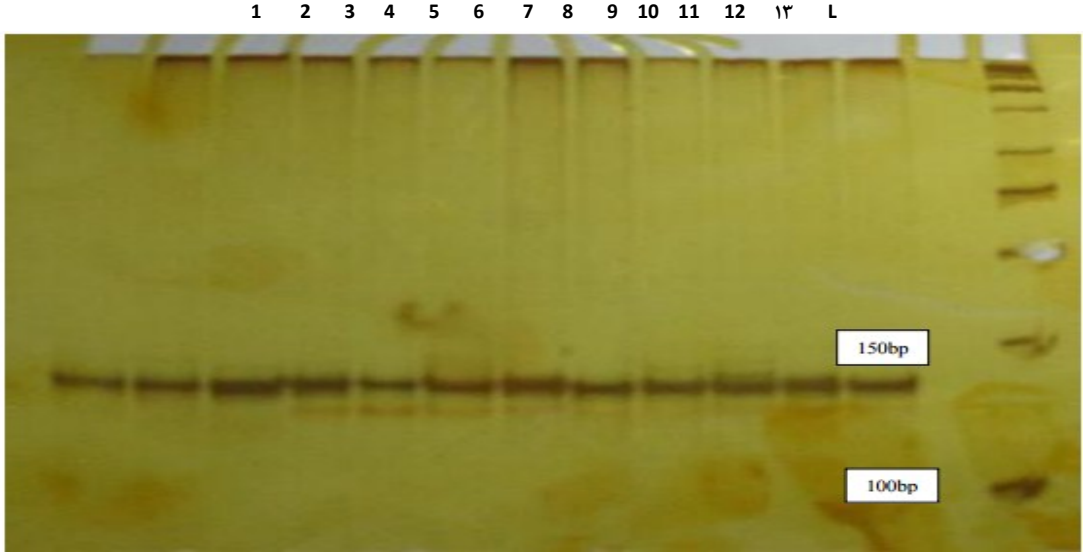
شکل ۳- نمایی از DNA استخراج شده، V: رقم VAM (مقاوم)،K: رقم K326 (حساس)،RB : توده مقاوم و SB: توده حساس

Fig. 3. View of extracted DNA, V: VAM cultivar, K: K326 cultivar, RB: Resistant bulk and SB: Sensitive bulk.

تجزیه مولکولی

شناسایی نشانگرهای ریزماهواره پیوسته به ژن مقاومت به PVY در توتون

حدود ۵ درصد ترکیبات جفت آغازگر، مخلوط توده‌های دو DNA را تکثیر نکردند. بعضی از ترکیبات آغازگرها حـداقل یک نوار در توده مقـاوم یا حساس تکثیر کردند که در دیگری وجود نداشت، فقط سه ترکیب جفت آغازگر به نام‌های PT30002، PT20165 و PT20357 ایجاد یک نوار چندشکل نمودند که تکرار پذیر و مرتبط با مقاومت بودند. این نشانگرهای انتخاب شده می‌توانند جهت گزینش به کمک نشانگر (MAS) برای مقاومت توتون نسبت به بیماری PVY مفید باشند (شکل ۴).



شکل ۴- نتایج الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آکریل آمید ۶ درصد با رنگ‌آمیزی نیترات نقره، ستون ۱: توده مقاوم (RB)، ستون‌های ۲ تا ۱۲:تک بوته‌های مقاوم، ستون ۱۳:توده‌های حساس (SB) می‌باشد. ستـونL: نشانگر وزنی مورد استفاده برای تعیین اندازه باندهای PCR

Fig. 4. The results of gel electrophoresis of PCR products on acrylamide 6% with silver nitrate staining, Column 1: Resistant bulk (RB), Column 2 to 12: resistant plants, Column 3: Susceptible bulk (SB). Column L: Weight indicator used to determine the size of the bands.

آغازگرهای نهایی انتخاب شده عبارت بودند از PT30002، PT20165 و PT20357 که نشانگرهای آن‌ها به ترتیب PT1، PT2 وPT3 نام‌گذاری شدند (جدول ۳). این نشانگرها یک نوار در موقعیت جفت نشان دادند. همان‌طور که در شکل ۴ نشان داده شده است، نشانگر PT1 نواری با اندازه حدود ۱۵۰ جفت باز در توده مقاوم و گیاهان تشکیل دهنده این توده ایجاد نمود. هیچ محصولی در ستون نمونه شماره ۱۳ (توده حساس) مشاهده نشد. فواصل ژنتیکی و ترتیب نشانگرهای PT1 و PT2 توسط نرم افزار Mapmaker Version 3.0 محاسبه شد (جدول ۴).

جدول ۳- مشخصات ۲۸ آغازگر انتخابی SSR دارای بیش‌ترین چندشکلی روی DNA والدین (نشانگرهای دارای * به عنوان برتر نهایی در این مطالعه انتخاب شدند).

Table 3. Detail data of 28 selective SSR markers with highest polymorphism on DNA of parent cultivars (markerswith * were selected as the best marker in this study).

آغازگر	توالی برگشت	توالی رفت	اندازه آلل	تعداد آلل‌ها	دمای اتصال(°C)
Primer	Reverse sequence.	Forward sequence.	Allele size(bp)	Allele N0	Tm
PT 1193	5'-CCTGTAACATCTGAGTGCC-3'	5'-CCATAAGTCCAACAACATGC-3'	100	1	56
PT 30170	5'-TTTAAGCTCATTGAGCCG-3'	5'-TTTAAGCTCATTGAGCCG-3'	130	1	64
PT20165*	5'-GGAATGGAGGATCTTCGT-3'	5'-TGTCTCGTGAAGCATGAA-3'	120-125	2	52
PT20172	5'-CCAAATGGTTCACTGGA-3'	5'-ACACCTCCTTCTTTGC-3'	200	1	52
PT20275	5'-GTTCTATTGATCGCCAT-3'	5'-AACAGCACCCAGCATT-3'	180-185	2	52
PT30067	5'-ATTCGCACCACTTAATCC-3'	5'-AAGCCTGGTCAGTTATCCA-3'	110	1	56
PT30338	5'-TCCATTGCAGACATAATCC-3'	5'-CCTTATTACCTCAGATACAA-3'	200	1	60
PT20445	5'-CAAGACATGTGTCAACTGAA-3'	5'-ATGGCAAATGTTGCATCTC-3'	140-150	2	60
PT30005	5'-CCCTGAGACTCAGATTC-3'	5'-TTTCACAGGCTTAAG-3'	220	1	52
PT30002*	5'-TGCGATGAATATCGAGGTGA-3'	5'-CCATTCTCCACAAGTCAA-3'	250	1	56
PT30028	5'-GCACATGCGATCTTGATT-3'	5'-AAACTTGAAGCAGAGACGG-3'	120-130	2	60
PT20357*	5'-CCGAGCAAGCTATTTGAAT-3'	5'-GGGTTGTAATGGTGCTGGA-3'	125	1	59
PT30087	5'-CTTCTAAGCCGAGGT-3'	5'-TTGATGATAGACGAAG-3'	230-240	2	60
PT30144	5'-TTGTTAGTTACCCTATTGACTT-3'	5'-TGATTGTATTGACAGCGTAC-3'	300	1	63
PT30156	5'-GGATGAACAGACAGGGACA-3'	5'-GGCAACTTCTTCTTGGCA-3'	250	1	60
PT30388	5'-TCCATTGCAGACATAATCC-3'	5'-CCTTATTACCTCAGATACAA-3'	320	1	60
PT30215	5'-TGGTCAGAGTTGTTCCTGC-3'	5'-GCAGACTGGTAGATCGCAC-3'	105-115	2	60
PT30355	5'-TCCGGATCATACATTGTTGG-3'	5'-AAGCAGAGCATTAGATGGA-3'	135	1	60
PT30184	5'-CCCATTCCTTGTTCTA-3'	5'-TTTCCTCATGCATACCAAT-3'	145	1	60
PT30378	5'-TGCAATGGCTACACAAGAAG-3'	5'-TCAATGAGGGTTGTAGCCA-3'	120-140	2	58
PT30391	5'-TCCGGTCGTGAAATCTGT-3'	5'-TGTTAAGGTATCATGTCGAT-3'	180	1	63
PT30468	5'-GGCTTAAGCACAAGCAGA-3'	5'-AATATTGTGCTTGTGTAGGT-3'	200	1	61
PT30480	5'-TAGGCGAGATTGTGAATC-3'	5'-AAAGGAACATGGACATTG-3'	120-140	2	56
PT40009	5'-CCCAAATTATCACGCAAC-3'	5'-GGTCACCTGCTCTCGAG-3'	150	1	60
PT30259	5'-GATTACCTTCAATGCCGA-3'	5'-CAGCCAAGAGAACCTTCAG-3'	180-190	2	60
PT1194	5'-GAGTCCAATGACGAACG-3'	5'-CTAATCACATGGACGAC-3'	220	1	52
PT1085	5'-TGGCAACACCTCAGGCTA-3'	5'-AGCATGTTTGTCCGGTGCT-3'	150	1	59
PT30314	5'-GCAGACCCAGGATGTGTA-3'	5'-TTGAGACATACAAGCGCA-3'	125-130	2	60

جدول ۴- ترتیب و فاصله نشانگرها از یکدیگر و از ژن مقاومت با استفاده از نرم افزار Mapmaker Version 3.0

Table 4. Arrangement and distance of markers from each other and from resistance gene using Mapmaker Ver. 3.0 software.

Markers نشانگر	Distance فاصله
PT1(PT30002)	18.1
PT2(PT 20357)	37.4
PT3(PT20165)	17.5
73 cM-3 Markers	

بحث

در این پژوهش، تعداد زیادی از آلل‌ها برای هر یک از نشانگرهای ریزماهواره مورد مطالعه روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۶ درصد مشاهده گردید که این امر ضرورت استفاده از این ژل را برای جداسازی و تشخیص آلل‌های مختلف اثبات می‌کند. یک صد جفت آغازگر مورد بررسی تکثیر شده در این تحقیق، در مجموع ۱۳۵ آلل با میانگین یک آلل به ازای هر جایگاه ریزماهواره تولید کردند. به طور کلی، اندازه قطعات تکثیر یافته با این آغازگرها در حد ۵ تا۵۰ جفت باز تفاوت داشتند. دلیل تفاوت در اندازه قطعات تکثیر یافته می‌تواند در اثر اختلاف تعداد تکرارهای توالی‌های موجود در آلل‌های مختلف جایگاه اتصال هر آغازگر باشد. چنین تفاوتی در اندازه قطعات تکثیر یافته نیز پیش تر در رابطه با توالی‌های تکراری ساده‌ای که در تحقیق بابیکر و همکاران (Babiker *et al*., 2009) با استفاده از نشانگرهای SSR روی ارقام گندم برای شناسایی ژن مقاومت به بیماری زنگ زرد گندم (ژن *Sr35*) انجام شده بود، دیده شد که در آن تحقیق، اندازه قطعات تکثیر شده با آغازگرهای SSR در حد ۱۰ تا ۳۰ جفت باز بود، در حالی که در تحقیقی که جینگویان و همکاران (Jingyuan *et al*., 2009) با استفاده از آغازگرهای SSR برای شناسایی ژن مقاومت به بیماری CMV در خیار انجام دادند، اندازه قطعات تکثیر شده توسط آغازگرهای SSR به هم نزدیک تر بوده و در حد ۱۰ تا ۲۰ جفت باز تفاوت داشتند. در پژوهش کنونی، تعداد آلل‌های شناسایی شده در هر مکان ژنی بین ۱ تا ۲ آلل بود و اکثر مکان‌های ژنی SSR به طور میانگین دارای یک آلل در هر مکان ژنی بودند. بررسی نتایج حاصل از پژوهش‌های محققین دیگر در مورد تعداد آلل‌های موثر در جایگاه نشانگرهای ریزماهواره در گیاهان دیگر بسیار متفاوت با نتایج به دست آمده در این تحقیق بود. در یک تحقیق روی ارقام توتون با استفاده از آغازگرهای SSR، میانگین تعداد آلل در هر مکان ژنی ریزماهواره بین ۲ تا ۳ آلل بود (Bindler*et al*., 2007) و نیز در تحقیقی که سلبی توپراک و همکاران (Celebi Toprak *et al*., 2009) برای شناسایی گوجه‌فرنگی‌های مقاوم به نژاد PVYo با استفاده از مارکرهای ریزماهواره (SSR) انجام داده بودند، میانگین تعداد آلل در هر مکان ژنی بین ۲ تا ۴ آلل بود. تفاوت در تعداد آلل شناسایی شده در مطالعات مختلف می‌تواند به دلیل منشا و خصوصیات متفاوت ژنوتیپ‌های مورد مطالعه و نیز ماهیت نشانگرهای ریزماهواره از نظر تعداد نوکلئوتید واحدهای تکراری باشد.

در تحقیق حاضر، برای ایجاد بالک (توده) های مقاوم، از برگ‌های ده بوته F2 مقاوم به PVY استفاده شد و همین کار با استفاده از برگ‌های ده بوته F2 حساس به PVY برای تشکیل بالک (توده) حساس انجام گرفت. مخلوط کردن تعداد زیادی از افراد نسل‌های در حال تفرق برای ساخت توده (BULK)، باعث کاهش احتمال مشاهده تفاوت بین دو توده برای نواحی غیر از نواحی مجاور ژن هدف می‌گردد (Zhu and Zhang, 2006).

در پژوهش حاضر، عده ای از نشانگرها باندهای بسیار کمرنگ و نامناسب تکثیر کردند که دلیل آن می‌تواند به علت نداشتن محل اتصال مناسب برای این آغازگرها، داشتن فقط یک محل اتصال یا زیاد بودن فاصله محل‌های اتصال متوالی بر روی ژنوم گیاه توتون باشد. همچنین بهتر بودن کیفیت تکثیر و ایجاد باندهای واضح‌تر توسط بعضی از آغازگرها ممکن است ناشی از بیش‌تر بودن شباهت توالی این آغازگرها با ژنوم گیاه توتون باشد (Davalieva *et al*., 2010). در تحقیقی که رودالو زیونگ (Rodal and Xiong, 2008) انجام دادند، بیان کردند که توتون رقم VAM و رقم NC745 حامل ژن *Va* هستند که این ژن باعث ایجاد مقاومت توتون VAM نسبت به بیماری PVY می‌شود، ولی در تحقیق کنونی، مشخص شد که فقط توتون رقم VAM دارای مقاومت کامل به بیماری PVY بوده و این مقاومت توسط دو ژن به نام‌های *Va* و *Va2* کنترل می‌شود. از آن‌جایی که هنوز تاکنون شناسایی نشانگرهای پیوسته به ژن مقاومت به بیماریPVY در توتون توسط نشانگرهای ریزماهواره (SSR) انجام نشده بود، در پژوهش حاضر این کار انجام شد و از روش تجزیه تفرق توده‌ای (BSA) برای شناسایی نشانگرهای پیوسته به ژن مقاومت به بیماریPVY در توتون استفاده شد. این روش در کنار ارزیابی چند شکلی والدین و همچنین ارزیابی چند شکلی توده‌های مقاوم و حساس به PVY، یک راهبرد کارا برای

تسهیل ژن‌های مقاومت به شمار می‌رود، زیرا در مقایسه با تعیین ژنوتیپ جمعیت با تعداد زیادی از نشانگرها، موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه می‌شود. ژو و ژانگ (Zhu and Zhang, 2006) اظهار داشتند که با استفاده از نشانگرهای هم بارز همانند نشانگرهای SSR، گزینش به کمک نشانگر در نسل F2 برای مقاومت به بیماری PVY در توتون می‌تواند تاثیری مشابه با این عمل در نسل‌های پیشرفته‌تر داشته باشد. بنابراین از طریق گزینش به کمک نشانگرهای پیوسته با ژن‌های مقاومت در نسل‌های اولیه و گزینش افراد هموزیگوت دارای آلل نشانگر والد مقاوم و از همه مهم‌تر روش تجزیه تفرق توده‌ای (BSA) می‌توان عملیات اصلاحی را تسریع کرده و کارایی گزینش را افزایش داد. در تجزیه و تحلیل نهایی این تحقیق مشخص گردید که از ۱۰۰ جفت آغازگر SSR توتون مورد استفاده، در نهایت ۳ نشانگر SSR به نام‌های PT30002، PT20165، PT20357 شناسایی شدند که روی بالک‌های مقاوم و حساس توتون به بیماریPVY هم دارای بیش‌ترین پلی مورفیسم بودند. با توجه به این‌که بهترین روش برای مبارزه و کنترل بیماری PVY در توتون، تولید ارقام مقاوم می‌باشد در این راستا، تجمع ژن‌های مقاوم از منابع مختلف مقاومت اهمیت زیادی دارد. بنابراین ۳ نشانگر SSR شناسایی شده در این پژوهش، پس از تایید توسط سایر محققین قابلیت استفاده در انتخاب تسهیل شده به وسیله نشانگرها را دارا بوده و می‌توانند در نهایت برای تولید ارقام اصلاحی توتون مقاوم به بیماری PVY به کار گرفته شوند.

سپاسگزاری

از مدیریت و همکاران مرکز تحقیقات و آموزش توتون تیرتاش به خاطر همکاری در انجام آزمایش و فراهم آوردن امکانات اجرای این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

References

Babiker, E., Yen, Y. and Stein, J. 2009. Identification of a microsatellite marker associated with stem rust resistance gene *Sr35* in wheat. Australian Journal of Crop science 34: 183-87.

Barone, A. G. 2004. Molecular markers-assisted selection for resistance to pathogens tomato. Theoretical and Applied Genetics 10: 110-118.

Bindler, G., Gunduz, I., Plieske, J., Ganal, M., Rossi, L., Gadani, F. and Donini, P. 2007. A Microsatellite marker based linkage map of tobacco. Theoretical and Applied Genetics 114: 341-349.

Brigenti, G., Garcia, J. and Baulcombe, D. C. 1998. Molecular mapping of the *Potato Virus Y* resistance gene (*Ry sto*)in potato.Theoretical and Applied Genetics 94(2): 198-203.

Celebi Toprak, F., Barutcu, E., Frary, A. and Doganlar, S. 2009. Identification of *Potato Virus YO*(PVY°) resistance in wild and cultivated tomatoes. Turkish Journal of Agriculture 33: 11-17.

Cernak, I., Taller, J., Wolf, I., Feher, E. and Polgar, Z. 2008. Analysis of the applicability of molecular markers linked to the PVY extreme resistance gene *Ry sto* and the identification of new markers.Virology 59(3):195-203.

Czubacka, A. and Doroszewska, T. 2009. Obtaining tobacco double haploids containing different sources of resistance to PVY. Plant Breeding 121: 120-147.

Davalieva, K., Maleva, I., Filiposki, K., Spiroski, O. and Efremov, G.2010. Genetic variability of Macedonian Tobacco varieties determined by microsatellite marker analysis. Diversity Journa l2: 439-449.

Dinant, S. and Vegetale, F. 1993. Heterologous resistance to *Potato virus Y* in transgenic tobacco plants expressing the coat protein gene of lettuce Mosaic potyvirus. Phytopathology 10: 800-810.

Fuentes, J. L., Correa-Victoria, F., Prado, F., Aricapa, G. and Duque, G. 2000. Simple Sequance Repeat (SSR) markers Linked to the blast resistance gene (pi-1)in rice for Marker-assisted Selection (MAS). diversity Journal 13: 130-138.

Gupton, C.L. and Burk, L. G. 1973. Location of the factor for resistance to *Potato Virus Y* in tobacco. The Journal of Heredity 64: 289-293.

Jingyuan, F., Yuanying, W., Caihong, J. and Wansheng, C. H. 2009. Identification and SSR marking of resistance gene of *Cucumber Mosaic Virus.*(CMV). Molecular Plant Breeding 7(2): 355-359.

Keiichi, T. and Akira, U. 2004. A new strain of *Potato virus Y* isolated from burly tobacco in Japan. Diversity Journal 21: 110-118.

Khajehpoor, M. R. 2005. Industrial Plants. Jihad-e- Daneshgahi of Isfahan University publications' Isfahan' Iran(2): 500-507 (in Persian).

Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daley, M. J., Lincoln, S. E. and Newburg, L. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package of constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. Genomics 1: 174-181.

Lewis, R. S. 2007. Evaluation of *Nicotiana tabaccum* genotypes possessing *Nicotiana africana*-derived genetic tolerance to *Potato Virus Y*. Crop Science 47: 1975-1984.

Michelmore, R. W., Paran, I. and Kesseli, R. V. 1991. Identification of markers linkedto disease-resistance genes by Bulked Segregate Analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using a segregating population. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9828–9832.

Moon, H. S., Nicholson, J. S. and Lewis, R. S. 2008. Use of transferable *Nicotiana tabaccum* L.' microsatellite markers for investigating genetic diversity in the genus Nicotiana. Genome 51: 547-559.

Naghavi, M., Ghareyazi, B. and Hosseini Salekdeh, Gh. 2005. Molecular Markers. University of Tehran Press' Tehran' Iran. 334 pp (in Persian).

Pelsy, F. and Merdinoglu, D. 1996. Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA markers linked to a rhizomania resistance gene in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by bulked segregant analysis. Plant Breeding 115: 371-377.

Reynolds, R. J. 2011. *Potato Virus Y* (PVY) in Burly tobacco. Phytopathology 103:81-84.

Rodol, A. and Xiong, Zh. 2008. Complementary functions of two R-genes determine resistance durability of tobacco Virgin A mutant (VAM) to *Potato Virus Y*.Virology 379: 275-290.

Zhu, H. SH. and Zhang, ZH. 2006. Inheritance analysis and identification ofSSR markers linked to Late blight resistant gene in tomato. Crop Science 43: 107-113.