

مقاومت برخی رقم‌های گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) به نماتد ریشه‌گرهی
(*Meloidogyne javanica*) با استفاده از نشانگر ریزماهواره (SSR)

Resistance of some Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Cultivars to Root
Knot Nematode (*Meloidogyne javanica*) Based on Microsatellite Marker

کیومرث میره کی^۱، محمد عبدالهی^۲ و مسعود دهداری^۳

۱، ۲ و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشیار و استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۹/۷

چکیده

میره کی، ک، عبدالهی، م. و دهداری، م. ۱۳۹۳. مقاومت برخی رقم‌های گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) به نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne javanica*) با استفاده از نشانگر ریزماهواره (SSR). مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۳۰: ۳۶۷-۳۸۲.

در این آزمایش مقاومت نسبی هشت رقم گوجه‌فرنگی شامل جی‌اچ ۱ (GH1)، جی‌اچ ۱۲ (GH12)، آجیت (Ajeet)، کارینا (Karina)، کلاستر ۵ (Cluster 5)، مانیشا (Manisha)، تولستوی (Tolstoi) و یک رقم بومی (درتوم) در برابر *Meloidogyne javanica* عامل بیماری ریشه‌گرهی، در شرایط گلخانه‌ای و نیز با استفاده از نشانگر ریزماهواره در سال ۱۳۸۹ در دانشگاه یاسوج مورد ارزیابی قرار گرفت. در ارزیابی گلخانه‌ای، گیاهچه‌ها با دو لارو سن دوم نماتد به ازای هر گرم خاک، مایه‌زنی شدند. هشت هفته پس از مایه‌زنی، مقاومت رقم‌ها بر اساس شاخص‌های تولیدمثلی نماتد مورد ارزیابی قرار گرفت. رقم‌های جی‌اچ ۱۲ و آجیت به عنوان نیمه‌مقاوم، رقم‌های جی‌اچ ۱ و مانیشا به عنوان متحمل و سایر رقم‌ها به عنوان حساس تشخیص داده شدند. در ارزیابی مولکولی، ارتباط هشت جفت آغازگر مولکولی ریزماهواره (SSR) با مقاومت رقم‌های ذکر شده در برابر نماتد ریشه‌گرهی گوجه‌فرنگی بررسی شد. در میان آغازگرها، آلل دوم Tom 55-56 تنها آللی بود که فقط در رقم‌های نیمه‌مقاوم و آلل دوم آغازگر Tom 47-48 تنها در رقم‌های حساس وجود داشت. در ارقام متحمل، هر دو آلل آغازگر Tom 47-48 مشاهده شد. سایر آلل‌های مربوط به سایر آغازگرها مرتبط با حساسیت و یا مقاومت نبودند. آلل دوم آغازگر Tom 47-48 و آلل دوم آغازگر Tom 55-56 همبستگی معنی‌داری با میزان تولید گال توسط نماتد نشان دادند. آلل دوم آغازگر Tom 47-48 مرتبط با حساسیت با میزان همبستگی ۰/۷۳۲ و آلل دوم آغازگر Tom 55-56 مرتبط با مقاومت با همبستگی ۰/۷۳۲- تشخیص داده شدند.

واژه‌های کلیدی: گوجه‌فرنگی، ارقام، آغازگر Tom 47-48، آغازگر Tom 55-56، مقاومت.

مقدمه

در ارزیابی مقاومت بین ژنوتیپ‌ها در یک گونه خاص، قبل از شناسایی و معرفی روش‌های نوین استفاده از نشانگرهای مولکولی، صفات ظاهری نقش عمده را ایفا می‌کرد. اخیراً علم بیوتکنولوژی کمک شایانی به تشخیص روابط ژنتیکی مقاومت و تبارشناسی آن‌ها در میان ژنوتیپ‌های مختلف کرده است. نشانگرهای مولکولی و صفات ظاهری به تنهایی نمی‌توانند ابزار مفید و سودمندی در روش‌های آماری باشند ولی هر دو می‌توانند تکمیل کننده یک دیگر باشند (Martinez et al., 2003).

در حال حاضر، گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*) به عنوان یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی از نظر سطح زیر کشت و اهمیت اقتصادی در کشور مطرح است. وجود عواملی مانند بازار وسیع مصرف داخلی و امکان صادرات به کشورهای همسایه، از عوامل مهم و اساسی در توجه بیشتر به این محصول به عنوان یک محصول استراتژیک و افزایش سطح زیر کشت آن در مناطق مختلف کشور است. علی‌رغم استفاده از روش‌های به‌زراعی و استفاده بهینه از نهاده‌های مدیریتی کشاورزی، کشت این محصول در کشور با محدودیت‌هایی از جمله نماتدهای انگل گیاهی، مواجه است. یکی از نماتدهای مهم که رشد این گیاه را با مشکل مواجه کرده است و سبب کاهش میزان عملکرد نهایی آن می‌شود، نماتدهای ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.)

است. این گروه از نماتدها با پراکنش جهانی، دارای دامنه میزبانی بیش از ۲۰۰۰ گونه گیاهی است و تاکنون بیش از ۹۰ گونه از آن در قسمت‌های مختلف جهان شناسایی و گزارش شده‌اند (Karssen and Moens, 2006). این نماتد در ایران تقریباً در همه جای کشور به وفور وجود دارد (Nasr Esfahani, 2009). امروزه تولید رقم‌های مقاوم و شناسایی ژن‌های دخیل در مقاومت و مکانسیم‌های آن توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Bakker et al., 2006). مقاومت به نماتد ریشه‌گرهی ابتدا توسط بیلی (Bailey, 1941) در گونه وحشی *L. peruvianum* مشاهده و اسمیت (Smith, 1994) موفق به انتقال این مقاومت به گونه زراعی *L. esculentum* شد. انتخاب ژنوتیپ‌ها به وسیله نشانگرهای مولکولی، یکی از روش‌های ارزیابی مقاومت در میزبان‌های نماتدهای ریشه‌گرهی است که دارای پتانسیل بالایی برای شناسایی مقاومت به نماتد در برنامه‌های به‌نژادی و مدیریتی بیماری‌های گیاهی است. در گوجه‌فرنگی، ژن *Mi* در رابطه با مقاومت به نماتدهای *M. arenaria* و *M. javanica* و *M. incognita* شناسایی شده است که دارای پیوستگی بالایی با مکان کروموزومی اسید فسفاتاز-۱ در ارتباط با مقاومت ژنوتیپ‌ها است. برخی آزمایش‌ها برای شناسایی آلل‌های اسید فسفاتاز-۱ انجام شده است که منتهی به شناسایی این ژن و پیوستگی آن با اسید فسفاتاز-۱ شده است. در تعداد

جایگزین روش‌های قدیمی گلخانه‌ای یا مزرعه‌ای می‌توانند گیاهان در بردارنده ژن مقاومت را در سطح ژنوتیپی شناسایی کنند (Sharma *et al.*, 2004). تزورتزاکاکیس و همکاران (Tzortzakakis *et al.*, 2006) آزمایش‌هایی را در برخی شرایط کنترل شده برای شناسایی مقاومت رقم‌هایی از گوجه‌فرنگی نسبت به *Meloidogyne spp.* و همچنین نقش ژن مقاومت در برابر این نماتد و تاثیر درجه حرارت در بیان ژن *Mi*، انجام دادند.

بیزترای و همکاران (Bisztray *et al.*, 1997) با استفاده از گوجه‌فرنگی‌های اصلاح شده، سیستم PAGE را برای تفکیک پروتئین تولید شده توسط اسید فسفاتاز-1 ژن *Mi*، در رابطه با مقاومت به نماتد ریشه‌گرهی *M. incognita* به کار برد. گانگولی و همکاران (Ganguly *et al.*, 1998) صفات اسید فسفاتاز در میزبان‌های مایه‌زنی شده و میزبان‌هایی مایه‌زنی نشده را بررسی کردند. در این آزمایش رقم Pusa Ruby حساس شناسایی شد و رقم Pusa Nemamukt در برابر *M. incognita* از خود مقاومت نشان داد. راجپوت و همکاران (Rajput *et al.*, 2006) ارتباط ده جفت آغازگر مولکولی SSR و پنج جفت آغازگر مولکولی RAPD با مقاومت رقم‌های مختلف گوجه‌فرنگی به نماتد ریشه‌گرهی را مورد ارزیابی قرار دادند. در این پژوهش قابلیت بالای نشانگر SSR در مقایسه با نشانگر RAPD تایید شد.

زیادی از گونه‌های گیاهی، نشانگر ریزوماهواره (SSR) به‌طور چشم‌گیری برای نشان دادن پیوستگی با ژن مقاومت، در حال گسترش است. با پیوند نشانگرها به مکان ژنی مربوط به مقاومت به نماتد، می‌توان از نشانگرها در برنامه‌های به‌نژادی و مدیریت نماتدهای انگل گیاهی جهت انتخاب و ردیابی ژنوتیپ‌های دارای مکان ژنی مقاومت استفاده کرد. به علاوه با پیوند نشانگرها، امکان تکثیر توالی ژن‌ها نیز وجود دارد (Williamson and Kumar, 2006).

تکثیر ژن‌های عامل مقاومت با نشانگرها، ابزاری جدید در برنامه‌های به‌نژادی به شمار می‌رود (Williamson, 1999). ارزیابی مقاومت فیزیولوژیکی گوجه‌فرنگی در برابر نماتدهای ریشه‌گرهی، یکی از اهداف مدیریتی در برنامه‌های باغبانی به شمار می‌رود (Cousins and Walker, 2001). هر چند روش‌های گلخانه‌ای (فیزیولوژیکی) جهت آزمایش‌های مقاومت در برابر نماتد ریشه‌گرهی نیاز به صرف زمان و فضا و مساحت زیادی دارد، با این وجود اکثر آزمایش‌های انجام شده روی گوجه‌فرنگی و روش‌های سنجش عوامل فیزیولوژیکی مبتنی بر این روش بوده است. در این روش، بعضی از شاخص‌های لازم به‌طور مستقیم قابل سنجیدن نیست، بلکه عموماً ارزیابی میزبان بر اساس کاهش تکثیر نماتد در گیاهان میزبان است. روش‌های انتخاب به کمک نشانگر مولکولی به عنوان روش تکمیلی و یا

نسبت‌های مساوی)، انتقال داده شدند. سه روز پس از انتقال گیاهچه‌ها به گلدان‌ها، با ایجاد سه سوراخ در اطراف طوقه، هر بوته با تعداد دو لارو سن دوم نماتد ریشه‌گرهی به ازای هر گرم خاک، که گونه آن بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی و نشانگر مولکولی PCR-SCAR، *M. javanica*، تشخیص داده شده بود (توسط نگارندگان)، مایه‌زنی شد و تیمارهای شاهد فقط با آب مایه زنی شدند. گلدان‌ها در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد، با آبیاری ۴۸ ساعته در محیط گلخانه نگهداری شدند. در طول دوره نگهداری هیچ گونه کود شیمیایی و عناصر غذایی مصرف نشد. هشت هفته پس از مایه‌زنی، با اندازه‌گیری صفات رویشی گیاه از قبیل طول ریشه، طول شاخساره و وزن تر و خشک شاخساره و ریشه تمامی تیمارها، سطح مقاومت رقم‌ها با استفاده از روش حسینی‌نژاد و واجدخان (Hosseininejad and Vajedkhan, 2000) مورد ارزیابی قرار گرفت. به این منظور، وزن تر اندام‌های هوایی و ریشه با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ گرم و طول آن‌ها با خط کش فلزی اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری وزن خشک، اندام‌های هوایی به مدت ۴۸ ساعت و ریشه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. صفات مرتبط با نماتد شامل تعداد گره و کیسه تخم در هر گرم از ریشه با استفاده از شاخص تیلور و ساسر (Taylor and Sasser, 1978) و تعداد لارو سن

تاکنون در ایران تحقیق منتشر شده‌ای در رابطه با ارتباط نشانگر مولکولی SSR با مقاومت به نماتدهای ریشه‌گرهی انجام نشده است. لذا هدف اصلی از انجام این پژوهش، ارزیابی ارتباط هشت جفت آغازگر مولکولی ریزماهواره و ارزیابی گلخانه‌ای مقاومت نسبی تعداد هشت رقم گوجه‌فرنگی در برابر نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* بود.

مواد و روش‌ها

در ارزیابی گلخانه‌ای، آزمایشی در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۱۶ ترکیب تیماری (دو سطح نماتد شامل بدون مایه‌زنی و مایه‌زنی با دو تخم و لارو به ازای هر گرم خاک، هشت رقم گوجه‌فرنگی) در پنج تکرار در تابستان ۱۳۸۹ در گلخانه گروه گیاهپزشکی دانشگاه یاسوج انجام شد. در این بررسی هفت رقم اصلاح شده گوجه‌فرنگی شامل جی‌اچ ۱ (GH1) و جی‌اچ ۱۲ (GH12) از انگلستان؛ آجیت (Ajeet) و کارینا (Karina) از تایلند؛ کلاستر ۵ (Cluster 5)، مانیشا (Manisha) و تولستوی (Tolstoi) از هندوستان و یک رقم بومی (درتوم) که از موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر تهیه شدند، مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تهیه نشاء بذرها در لیوان‌های با قطر ۹ سانتی‌متر در خاک کاشته شدند. پس از رشد کافی نشاء، گیاهچه‌ها در مرحله چهارالی شش برگی به گلدان‌های یک کیلویی حاوی خاک ترکیبی شن، رس و خاک برگ استریل (با

۹۵ میکرولیتر آب مخلوط شد و به مدت چند ثانیه در دستگاه قرار گرفت. در انتها غلظت DNA قرائت شد و برای PCR-SSR غلظت DNA در تمام نمونه‌ها با استفاده از آب دوبار تقطیر یکسان تنظیم شد. برای بررسی تنوع ژنتیکی در رقم‌های مورد بررسی در این آزمایش، از پکیج‌های ژنتیکی منتشر شده آغازگرهای ریزماهواره در گوجه‌فرنگی، استفاده شد (Rajput *et al.*, 2006). این آغازگرها در شرکت تکاپوزیست ایران سنتز شدند. آغازگرهای سنتز شده پودری شکل بودند که طبق دستورالعمل شرکت سازنده با آب مقطر استریل رقیق و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراس با استفاده از دستگاه ترموسایکلر و روش Touchdown انجام شد. در این بررسی از میکروتیوب‌های ۰/۲ میلی‌لیتری استفاده و حجم نهایی هر واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. مارکر مورد استفاده در محدوده ۳۰۰-۱۰۰ جفت باز بود. برنامه زمانی مورد استفاده ترموسایکلر جهت تکثیر قطعه مورد نظر شامل مرحله‌های زیر بود: مرحله واسرشتگی اولیه به مدت ۵ دقیقه با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه شامل سه مرحله: ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت واسرشت سازی ثانویه، ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای اتصال آغازگر و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه جهت گسترش آغازگر و در پایان نیز یک چرخه

دوم در هر گرم از خاک با استفاده از روش بارکر (Barker, 1985) بررسی شد. گروه‌بندی رقم‌ها بر اساس فاکتور تولیدمثل نماتد که به عنوان عاملی جهت تعیین میزان مقاومت محسوب می‌شود، به وسیله نرم‌افزار SPSS 20 به روش جاکارد انجام شد. در گروه‌بندی، رقم‌های با فاکتور تولیدمثل کوچک تر یا برابر یک و شاخص گال کوچک تر یا مساوی ۲ به عنوان مقاوم، فاکتور تولیدمثل کمتر یا برابر یک و شاخص گال بیشتر از ۲ به عنوان نیمه مقاوم، فاکتور تولیدمثل بیشتر از یک و شاخص گال کوچکتر یا مساوی ۲ به عنوان متحمل و فاکتور تولیدمثل بیشتر از یک و شاخص گال بیشتر از ۲ به عنوان حساس در نظر گرفته شدند (Canto-saenz, 1983).

در ارزیابی مولکولی، استخراج DNA از برگ گیاهچه‌های شش برگی گوجه‌فرنگی، با استفاده از کیت استخراج از اندام گیاهی انجام شد. برای ارزیابی کمی و کیفی DNA، پس از استخراج، DNA حاصل در ژل آگارز یک درصد در بافر TBE X1 الکتروفورز شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با اتیدیوم بروماید ($0.5 \mu\text{gml}^{-1}$) رنگ آمیزی شد. پس از شستشوی ژل با آب مقطر، عکس‌برداری در دستگاه Transiluminator UV در زیر نور ماوراء بنفش انجام شد. برای تعیین غلظت DNA بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر، از دستگاه اسپکتوفتومتری با طول موج ۲۸۰ نانومتر استفاده شد. بدین صورت که ۵ میکرولیتر از DNA با

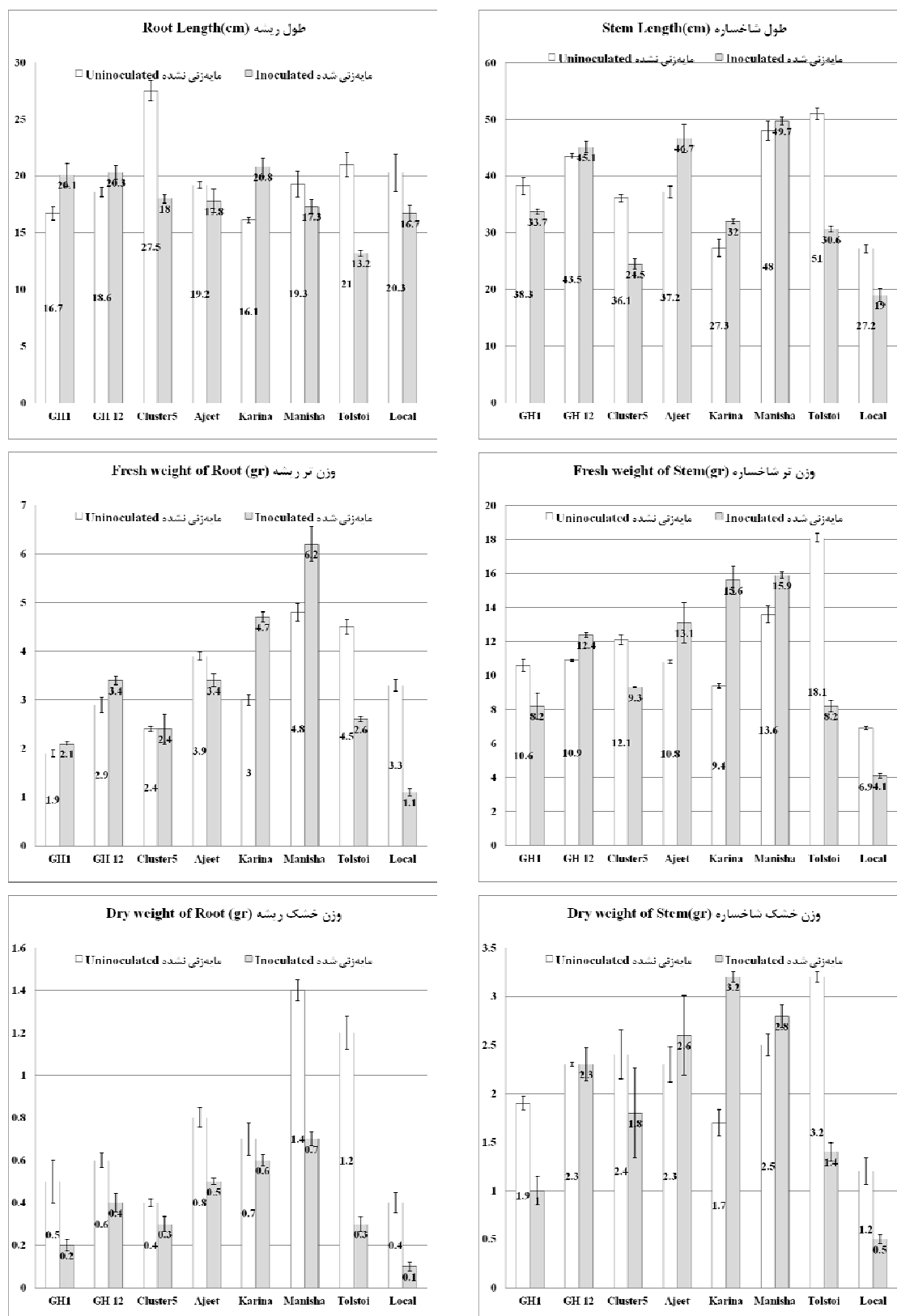
گسترش نهایی با دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۷ دقیقه در نظر گرفته شد.

برای الکتروفورز نمونه‌ها و رنگ آمیزی، با توجه به اندازه قطعه مورد نظر در این تحقیق و از آن جا که حساسیت ژل پلی اکریل آمید ۳۰۰-۲۰۰ برابر ژل آگارز است، از سیستم الکتروفورز عمودی و ژل پلی اکریل آمید ۶٪ برای جداسازی آلل‌های ریزماهواره استفاده شد. قطر ژل مورد استفاده ۰/۲ میلی متر و ابعاد ژل ۲۰×۲۰ سانتی متر در نظر گرفته شد. مقدار ۳ میکرولیتر بافر بارگذاری حاوی فرم آلدئید، به ۵ میکرولیتر محصول PCR واسرشته اضافه و در داخل چاهک‌ها بارگذاری شد. نمونه‌ها در ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد در تانک ژل حاوی بافر TBE 1x به مدت ۱۸۰ دقیقه الکتروفورز شدند. برای رنگ آمیزی ژل، صفحه حاوی ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول ثابت کننده (اسید استیک) بر روی شیکر قرار داده شد. پس از آن ژل، سه دفعه به مدت ۲ دقیقه با آب مقطر شستشو داده شد و در مرحله بعدی صفحه حاوی ژل به مدت ۳۰ دقیقه در محلول نیترات نقره قرار گرفت. شستشو در آب سرد به مدت ۱۰-۵ ثانیه انجام و سپس در محلول ظاهر کننده (کربنات سدیم ۳۰ درصد) قرار داده شد. برای جلوگیری از تیره گی و ناخوانا شدن باندها، پس از ظهور باندها ژل دوباره به محلول تثبیت کننده منتقل و به مدت ۵ دقیقه روی شیکر تکان داده شد تا بیش از حد رنگ نگیرد. پس از رنگ آمیزی، بهترین ژل به

دست آمده برای هر آغازگر انتخاب شد. به منظور تبدیل داده‌های کیفی به داده‌های کمی، به وجود باند عدد یک و عدم وجود باند عدد صفر اختصاص داده شد و سپس با استفاده از نرم افزار 2.2 NTSYS، روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد، دندروگرام آن رسم شد. برای بررسی رابطه بین نشانگر ریزماهواره و ویژگی‌های مهم مرتبط با حساسیت یا مقاومت به نماتد با توجه به غیر پارامتریک بودن مشاهدات از ضریب همبستگی اسپیرمن استفاده شد.

نتایج و بحث

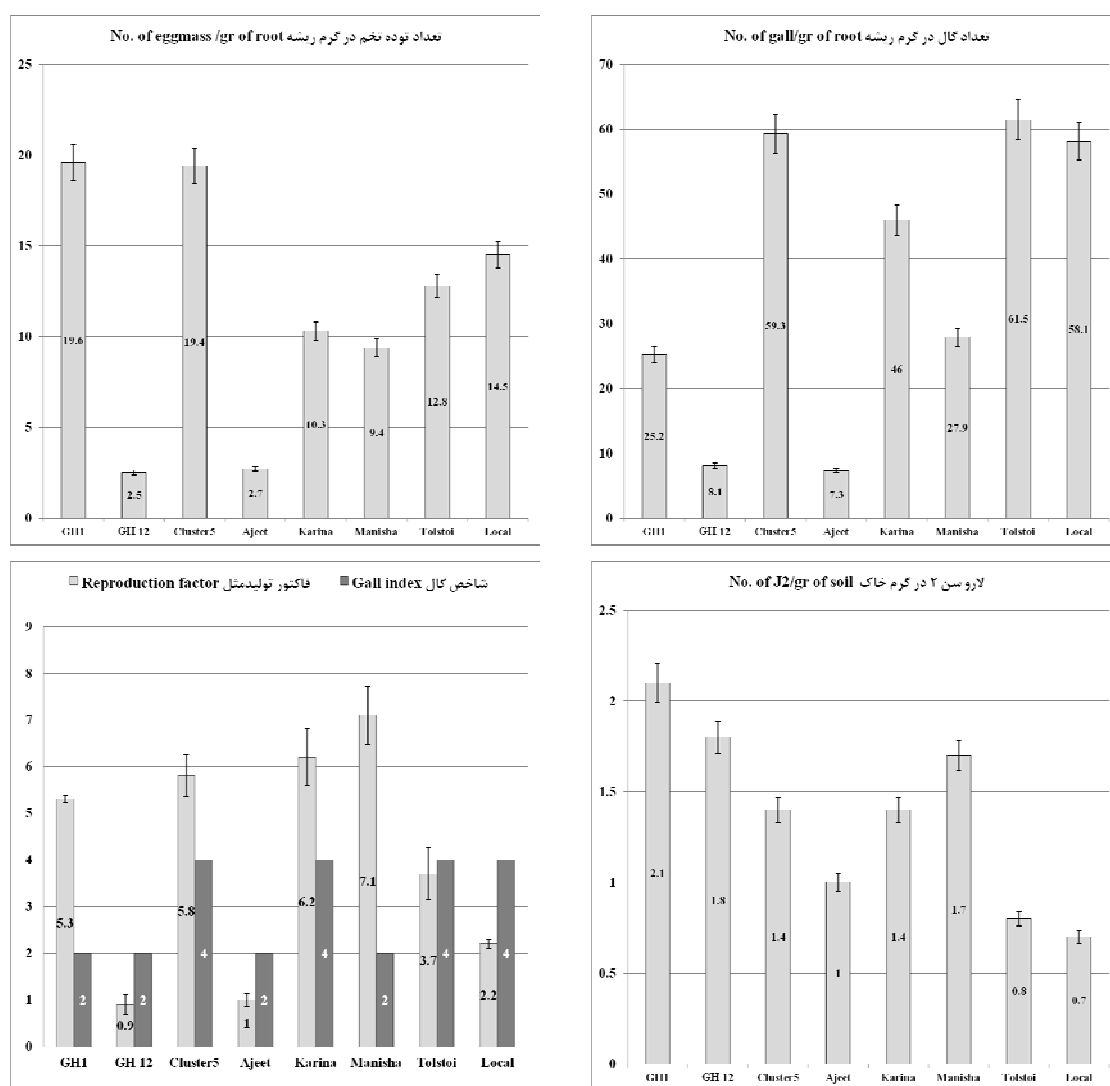
در ارزیابی گلخانه‌ای، نتایج حاصل از آلودگی رقم‌های مورد بررسی با نماتد *M. javanica*، نشان داد که هیچ کدام از رقم‌ها نتوانستند در برابر آلودگی به نماتد ریشه گرهی مقاومت کامل نشان دهند. با مقایسه صفات رشدی رقم‌های گوجه فرنگی (شکل ۱) مشاهده شد که از نظر صفات رویشی، رقم‌های جی اچ ۱۲، آجیت، مانیشا و کارینا نسبت به بقیه رقم‌ها دارای تفاوت معنی داری بوده و کمترین تاثیرپذیری را از آلودگی به نماتد از خود نشان دادند. از طرف دیگر، ارقام کلاستر ۵، بومی و تولستوی از نظر صفات رویشی در مقایسه با تیمار مایه زنی نشده همین رقم‌ها بیشترین افت را در صفات رویشی اندازه گیری شده داشتند. در برخی صفات رویشی مثل وزن تر و خشک ساقه، رقم جی اچ ۱ نیز در اثر مایه زنی به نماتد



شکل ۱- مقایسه میانگین شاخص‌های رشدی رقم‌های گوجه‌فرنگی آلوده شده به نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica*
 Fig. 1. Comparison of means of growth parameters of tomato cultivars inoculated with *Meloidogyne javanica*

رقم‌های جی‌اچ ۱۲ و آجیت با فاکتور تولیدمثلی کمتر از یک و شاخص گره ۲، رقم‌های نیمه مقاوم؛ رقم‌های جی‌اچ ۱ و مانیشا با فاکتور تولیدمثلی بیشتر از یک و شاخص گره ۲، رقم‌های متحمل و سایر رقم‌های مورد بررسی با فاکتور تولیدمثلی بیشتر از یک و شاخص گره ۴ حساس تلقی ارزیابی شدند.

افت این صفات را به وضوح از خود بروز دادند. از نظر ویژگی‌های مرتبط با تکثیر نماتد (شکل ۲) نیز رقم کلاستر ۵ با حمایت از تولیدمثل نماتد، در زمره رقم‌های نامناسب قرار گرفت. بالا بودن شاخص گال و فاکتور تولیدمثل در این رقم حکایت از حساسیت آن به نماتد مورد آزمایش دارد. در این بررسی



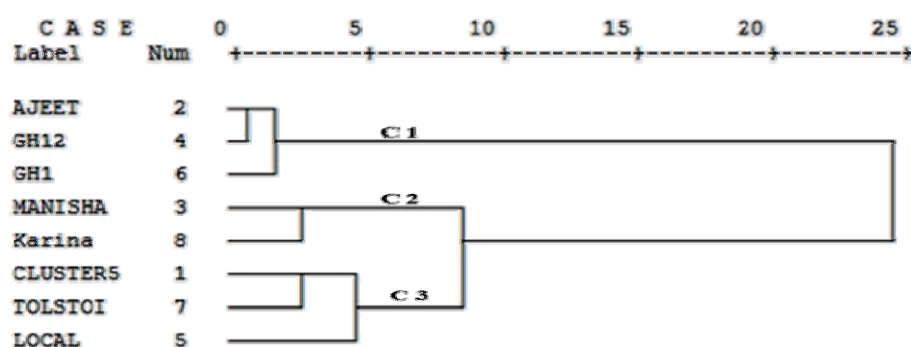
شکل ۲- مقایسه میانگین شاخص‌های مرتبط با نماتد در خاک/ ریشه رقم‌های گوجه‌فرنگی آلوده شده به نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica*

Fig. 2. Comparison of means of nematode related parameters in soil/ root of tomato cultivars inoculated with *Meloidogyne javanica*

گوجه‌فرنگی به نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* بررسی شد. بر اساس این مطالعات، رقم‌های Formula، Mirsini و Rally به عنوان نیمه‌مقاوم شناخته شدند.

بر اساس گروه‌بندی رقم‌ها برحسب شاخص‌های تکثیری نماتد، شامل تعداد لارو سن ۲ در خاک و تعداد گال، توده تخم و تخم در ریشه، همان‌گونه که در نمودار درختی (شکل ۳) ملاحظه می‌شود، رقم‌ها در سه خوشه از یک دیگر تفکیک شدند. بر این مبنا، رقم‌های نیمه‌مقاوم آجیت و جی‌اچ ۱۲ و رقم متحمل جی‌اچ ۱ به واسطه داشتن کم‌ترین میزان گره، کیسه تخم و فاکتور تولید مثل نماتد، در خوشه اول قرار گرفته و از سایر رقم‌ها جدا شدند. خوشه دوم نیز رقم متحمل مانیشا و رقم حساس کارینا را از خوشه سوم که شامل رقم‌های حساس کلاستر ۵، تولستوی و بومی بودند، مجزا کرد.

در گوجه‌فرنگی، مقاومت به نماتدهای ریشه‌گرهی بر اساس عدم توانایی نماتد در ایجاد سایت تغذیه‌ای در میزبان آلوده و همچنین بلوغ و تولیدمثل موفق آن، سنجیده می‌شود (Williamson and Kumar, 2006). در یک ارزیابی گلخانه‌ای مقاومت ۹۰ رقم گوجه‌فرنگی به نماتد *M. incognita* توسط بایی و همکاران (Bai et al., 2010) تعیین شد. در این مطالعه مشخص شد که رقم‌های Fentailang No.1، HortPioneer، Fentailang No.2، 0745، Baili No.2 و Jinguan No.1 بسیار مقاوم بوده و رقم‌های Xianke No.1، Jiahong No.6، Jiayuandafen، 06Chunzhan No.7 و Jinguan No.2 نسبتاً مقاوم و رقم‌های Jinguan No.5، 06Qiu 88، 06Chunzhan No.8 و Jinguan No.7 مقاوم بودند. در تحقیق رومبوس و همکاران (Rumbos et al., 2011) مقاومت ۵۲ رقم محلی یونانی و ۱۰ رقم تجاری



شکل ۳- تجزیه خوشه‌ای شاخص‌های مرتبط با نماتد در خاک / ریشه رقم‌های گوجه‌فرنگی آلوده شده به نماتد ریشه‌گرهی به روش جا‌کارد

Fig. 3. Cluster analysis of nematode related parameters in soil/root of tomato cultivars inoculated with *Meloidogyne javanica*

استفاده قادر به تکثیر در چرخه PCR و ایجاد چندشکلی در ژل پلی‌آکریل آمید هستند.

تجزیه نوارهای به دست آمده از آغازگرهای ریزماهواره مورد استفاده در این آزمایش (جدول ۱) مشخص کرد که آغازگرهای مورد

جدول ۱- توالی آغازگرهای ریزماهواره مرتبط با مقاومت به نماتد *Meloidogyne javanica* مورد استفاده در این آزمایش

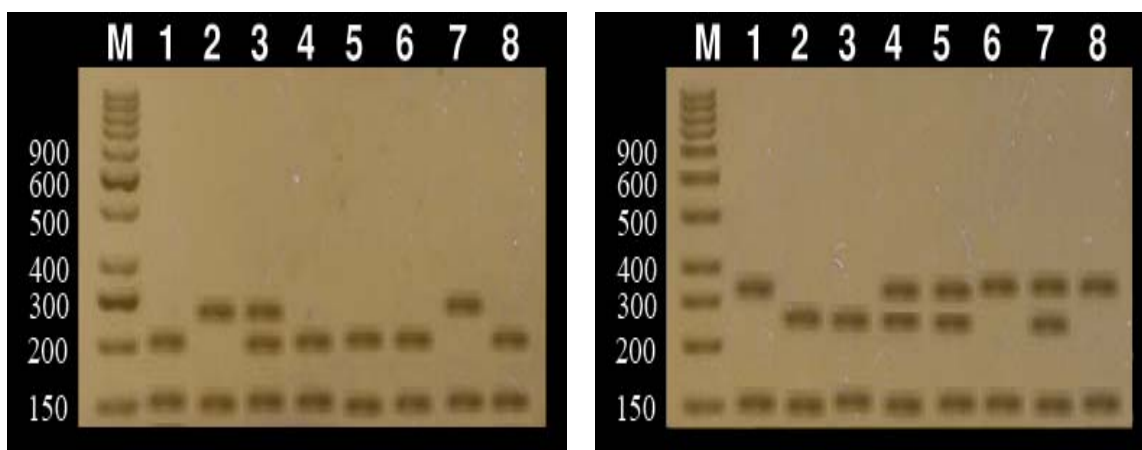
Table 1. Sequences of microsatellite primers linked to resistance to *Meloidogyne javanica*

آغازگر	توالی آغازگر پیشرو	توالی آغازگر معکوس	دمای اتصال آغازگر
Primer	Forward primer	Reverse primer	Annealing temp.
Tom 8-9 ATT7	GCA TTG ATT GAA CTT CAT TCT CGT CC	ATT TTT GTC CAC CAA CTA ACC G	55
Tom 11-28 CTT5/CT5	ATT GTA ATG GTG ATG CTC TTC C	CGA TTA CTA CCA AAA ATA GTC AAA CAC	55
Tom 31A-32A TA11	AAT GTC CTT CGT ATC CTT TCG T	CTA GGT TTT AAT TTT TGT GTC T	55
Tom 39A-40A AATT4	TAA CAC ATT CAT CAA AGT ACC	TTG CGT GTA GAT AAT CCA GTA AT	55
Tom 47-48 AT10	CAA GTT GAT TGC ATT ACC TAT TG	TAC AAC AAC ATT TCT TCC TT	55
Tom 49-50 AT10	AAG AAA CTT TTT GAA TGT TGC	ATT ACA ATT TAG AGA GTC AAG G	55
Tom 55-56 ATTT5	ATT TCT GTA ACT CCT TGT TTC	TGA CTT CAA CCC GAC CCC TCT T	55
Tom 57-58 CT8	TCT AAG TGG ATG ACC ATT AT	GCA GTG ATA GCT AAT GAA AAC	55

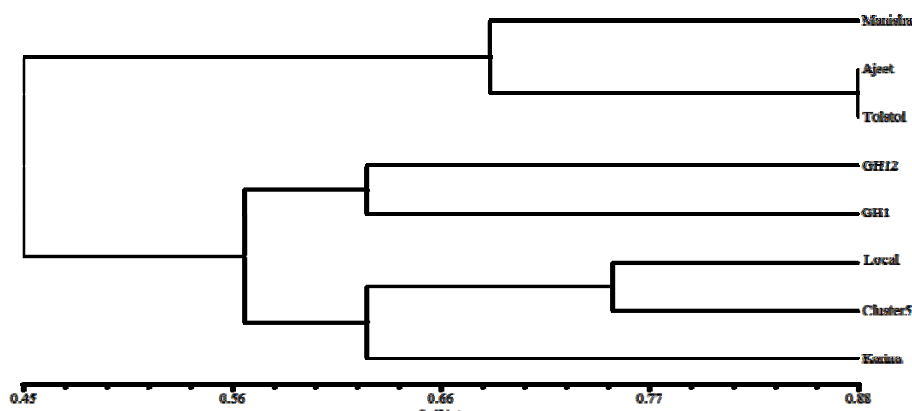
دیگر رقم‌های بومی و کلاستر ۵ که در این گروه‌بندی در یک خوشه قرار گرفتند، در بررسی شاخص‌های تکثیری نماتد نیز در شاخه مشترکی جای داشتند. از آغازگرهای مورد استفاده، در رقم‌های نیمه مقاوم آلل دوم Tom 55-56، در رقم‌های حساس آلل دوم آغازگر Tom 47-48 و در ارقام متحمل هر دو آلل آغازگر اخیر مشاهده شد (شکل ۴). سایر آلل‌های مربوط به سایر آغازگرها مرتبط با حساسیت و یا مقاومت نبودند، هر چند آغازگری چون Tom 39A-40AAATT4 چند شکلی بالایی را در نمونه‌های مورد بررسی نشان داد.

علت تفکیک این رقم‌ها از هم دیگر را می‌توان ناشی از فشار انتخاب روی ژن‌های

مطالعه نمودار درختی تشابه رسم شده بر اساس ضریب تشابه جاکارد (شکل ۵) نشان داد که رقم‌ها از نظر توالی آغازگرهای خنثی از یک دیگر تفکیک شده‌اند. در خوشه‌بندی انجام شده بر اساس نواربندی حاصل از نشانگرهای مولکولی، رقم‌ها به سه گروه اصلی تفکیک شدند. در گروه اول رقم‌های مانیشا و آجیت (رقم‌های متحمل و نیمه مقاوم) و تولستوی (رقم حساس) قرار گرفتند. در گروه دوم رقم‌های جی‌اچ ۱۲، جی‌اچ ۱ (رقم‌های نیمه مقاوم و متحمل) و در گروه سوم رقم‌های بومی، کلاستر ۵ و کارینا (رقم‌های حساس) جای گرفتند. بنابر این، جدا شدن رقم‌های جی‌اچ ۱۲، جی‌اچ ۱ در این گروه‌بندی با گروه‌بندی بر مبنای شاخص‌های تکثیری نماتد منطبق بود و از طرف



شکل ۴- آلل‌های ریزماهوره رقم‌های گوجه‌فرنگی روی ژل پلی‌آکریل آمید. سمت راست: آغازگر Tom 55-56 ATTT5، سمت چپ: آغازگر Tom 47-48 AT10. به ترتیب: M (سایز مارکر)، ۱ (کارینا)، ۲ (آجیت)، ۳ (جی اچ ۱۲)، ۴ (جی اچ ۱)، ۵ (کلاستر ۵)، ۶ (بومی)، ۷ (مانیشا)، ۸ (تولستوی)
 Fig. 4. Polymorphism revealed by SSR marker in tomato cultivars. Different alleles amplified by primers ATTT5 Tom 55-56 (left) and Tom 47-48 AT10 (right): M (Size marker), 1 (Karina), 2 (Ajeet), 3 (GH12), 4 (GH1), 5 (Cluster5), 6 (Local), 7 (Manisha), 8 (Tolstoi)



شکل ۵- تجزیه خوشه‌ای مقاومت ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی با استفاده از نشانگر ریزماهوره، به روش جاکارد

Fig. 5. Cluster analysis of the resistance of tomato cultivars to *Meloidogyne javanica*, using microsatellite marker (Jaccard's method)

تقویت شده‌اند، که علیه نژادهای مختلف فیزیولوژیک نماتد ریشه‌گرهی موثر بوده‌اند. لذا قرار گرفتن رقم‌ها در خوشه‌های جداگانه

مقاومت در اجداد هر کدام از رقم‌های اصلاح شده دانست. بدین ترتیب در طی برنامه‌های به‌نژادی هر رقم، ژن‌های مقاومت انتخاب و

می‌تواند به دلیل قرابت ژنتیکی آن‌ها باشد. بنابراین نشانگر ریزماهواره می‌تواند بیانگر میزان تشابه و تنوع ژن عامل مقاومت رقم‌ها در برابر نماتد ریشه‌گرهی باشد. با توجه به گروه‌بندی مبتنی بر آزمایش‌های گلخانه‌ای، رقم‌های آجیت، جی‌اچ ۱۲ و جی ۱ در گروه مجزایی از مانیشا که آن هم متحمل است، قرار گرفتند. مانیشا با کارینا که حساس است، در یک گروه قرار گرفت که البته در آزمایش‌های مولکولی نیز تولستوی که حساس به نماتد ریشه‌گرهی بود، در شاخه آجیت (نیمه مقاوم) و مانیشا (متحمل) جای گرفت.

با توجه به این که ارزیابی‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای تحت تاثیر شرایط محیطی است، مشکلات زیادی در راه شناخت دقیق مقاومت وجود دارد. در رابطه با بررسی مقاومت گیاهان به نماتدها، از جمله نماتدهای ریشه‌گرهی، همواره سعی بر این بوده است که یک نشانگر مولکولی اختصاصی مرتبط با ویژگی‌های فنوتیپی، به خصوص ویژگی‌هایی که مشاهده آن‌ها مشکل است، تهیه شود. در تحقیقات آرنز و همکاران (Arens et al., 2010) برخی آغازگرها برای ردیابی ژن‌های مقاومت گوجه‌فرنگی به برخی عوامل بیماری‌زا شامل ژن مقاومت به ورتیسلیوم (*Ve1* و *Ve2*)، ژن مقاومت به ویروس موزائیک گوجه‌فرنگی (*Tm1*، *Tm2* و *Tm22*)، ژن مقاومت به فوزاریوم (*I2*) و ژن مقاومت به نماتد ریشه‌گرهی *M. incognita* (*Mil-2*) توسعه داده

شدند. بر اساس این تحقیق، مشخص شد که نشانگرهای مولکولی ابزار بسیار مفیدی برای ارزیابی مقاومت گوجه‌فرنگی به این نماتد است. از بین آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق، *PMiF3-R3* که پیش‌تر نیز توسط المراج و همکاران (El Mehrach et al., 2005) برای مکان‌یابی ژن *Mi-1* و تفکیک مقاومت از حساسیت معرفی شده بود، به عنوان بهترین آغازگر ارزیابی شد. از مزایای دیگر این آغازگر این است که نوارهای اختصاصی ایجاد نمی‌کند. برای مکان‌یابی ژن *Mil-2* نیز آغازگرهای اختصاصی طراحی شده‌اند که قادر به تفکیک رقم‌های حساس و مقاوم از یک دیگر هستند (Goggin et al., 2004؛ Bendezu, 2004؛ Devran and Elekçioğlu, 2004؛ El Mehrach et al., 2005). این آغازگرها یک قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی را در ناحیه 3'-UTR در خارج از توالی کُد کننده *Mil-2* تقویت می‌کنند. ناحیه *Mi* (یک مگا باز) از *Solanum peruvianum* منشا گرفته در روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره شش قرار دارد و مشتمل بر سه قالب باز خواندن (ORF) است که دو قالب ژن‌های *Mil-1* و *Mil-2* و یک قالب دیگر یک ژن کاذب را کُد می‌کنند. از دو ژن مذکور، تنها وجود *Mil-2* برای ایجاد مقاومت به *M. javanica*، *Meloidogyne incognita* و *M. arenaria* کافی است (Milligan et al., 1998).

دارای همبستگی بالا و معنی‌داری با میزان تولید گال توسط نماتد ریشه‌گرهی هستند. با توجه به ضرایب همبستگی و مقایسه آن با ارتباط آلل‌ها با میزان مقاومت و حساسیت، آلل دوم آغازگر Tom 47-48 با میزان همبستگی مثبت ۰/۷۳۲ با صفت میزان گره‌ریشه مرتبط با حساسیت و همچنین آلل دوم آغازگر Tom 55-56 در ارتباط با مقاومت به این نماتد با همبستگی منفی ۰/۷۳۲- بودند.

با استفاده از شاخص Nie، با محاسبه فاصله ژنتیکی بین رقم‌های گوجه‌فرنگی، بر اساس نشانگر ریزماهوره، مشخص شد که بیشترین فاصله (۰/۸۷۵) بین رقم‌های آجیت و تولستوی و کمترین فاصله (۰/۱۲۵) بین رقم‌های آجیت و جی‌اچ‌۱ وجود داشت. این فاصله احتمالاً به دلیل وجود آلل‌های مرتبط با حساسیت و مقاومت با نماتد است. با توجه به نتایج همبستگی اسپیرمن (جدول ۲) مشخص شد که آلل دوم آغازگر Tom 47-48 و آلل دوم آغازگر Tom 55-56

جدول ۲- ضرایب همبستگی اسپیرمن بین گال ریشه و نوارهای حاصل از آغازگرهای مرتبط با مقاومت به نماتد *Meloidogyne javanica*

Table 4. Spearman rank correlation coefficients between root gall and the number of bands detected in Microsatellite primers linked to resistance to *Meloidogyne javanica*

	Primer							
	Tom 8-9	Tom 8-9	Tom 43-44	Tom 43-44	Tom 47-48	Tom 47-48	Tom 11-28	Tom 11-28
Root gall	0.80	0.24	-0.50	0.25	0.21	0.73	0.32	0.62
Sig.	0.16	0.55	0.82	0.54	0.60	0.30	0.42	0.92
	Primer							
	Tom 55-56	Tom 55-56	Tom 39-40	Tom 39-40	Tom 57-58	Tom 57-58	Tom 41-42	Tom 41-42
Root gall	-0.21	-0.73	-0.32	-0.60	0.50	-0.25	-0.85	-0.125
Sig.	0.60	-0.30	0.42	0.90	0.89	0.54	0.80	0.70

همکاری‌های خانم مهندس حاجی‌زاده،
کارشناس آزمایشگاه مرکزی دانشکده
کشاورزی نیز سپاسگزاری می‌شود.

سپاسگزاری
از پشتیبانی‌های مسئولین دانشگاه یاسوج
برای اجرای این تحقیق قدردانی می‌شود. از

References

Arens, P., Mansilla, C., Deinum, D., Cavellini, L., Moretti, A., Rolland, S., van der Schoot, H. Calvache, D., Ponz, F., Collonnier, C., Mathis, R., Smilde, D., Caranta, C., and Vosman, B. 2010. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing. Theoretical and Applied Genetics 120: 655-664.

- Bai, C.M., Duan, Y.X., Chen, L.J., Liu, Y.F., and Zhu, X.F. 2010.** Evaluation of tomato resistance to *Meloidogyne incognita*. *China Vegetables* 6: 33-37.
- Bailey, D.M. 1941.** The seedling method for root-knot nematode resistance. *Proceedings of American Society of Horticultural Science* 38:573-575.
- Bakker, E., Dees, R., Bakker, J., and Govers, A. 2006.** Mechanisms involved in plant resistance to nematodes. pp. 314–334. In: Tuzun, S., and Bent, E. (eds.) *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants*. Springer Science +Business Media Inc., Germany.
- Barker, K.R., 1985.** Nematode Extraction and Bioassays. pp. 19–35. In: Barker, K.R., Carter, C.C., and Sasser, J.N. (eds.) *Advanced Treatise on Meloidogyne: 2. Methodology*. North Carolina State University Graphics, Raleigh, NC, USA.
- Bendezu, I.F. 2004.** Detection of the *Mil 2* tomato gene by PCR using non-organic DNA purification. *Nematropica* 34: 23–30.
- Bisztray, G.D., Siraly, I., Major, A., Barsony, C., and Farkas, J.P.Y. 1997.** Testing nematode resistance in tomato. II. Large scale survey for nematode resistance by PAGE. *Horticultural Science* 29: 58-60.
- Canto-saenz, M. 1983.** The nature of resistance to *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. pp. 160-165. In: Carter, C.C. (ed.). *Proceedings, of the Third Research & Planning Conference on Root-Knot Nematodes, Meloidogyne spp.* International Meloidogyne Project. Lima, Peru.
- Cousins, P.M., and Walker, M.A. 2001.** A technique for screening grape germplasm for resistance to *Meloidogyne incognita*. *Plant Disease* 85: 1052-1053.
- Devran, Z., and Elekçioğlu, I.H. 2004.** The screening of F2 plants for the Root-knot nematode resistance gene, *Mi* by PCR in tomato. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 28: 253–257.
- El Mehrach, K., Mejía, L., Gharsallah-Couchane, S., Salus, M.S., Martin, C.T., Hatimi, A., Vidavski, F., Williamson, V., and Maxwell, D.P. 2005.** PCR-based methods for tagging the *Mi-1* locus for resistance to root-knot nematode in begomovirus-resistant tomato germplasm. *Acta Horticulturae* 695: 263–270.
- Ganguly, A.K., Sreedhar, M., Swain, S.C., and Sreedhar, M. 1998.** Characterization of partially purified acid phosphatase from susceptible and resistant cultivars of tomato against root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Annals of Plant*

- Protection Science 8: 47-52.
- Goggin, F.L., Shah, G., Williamson, V.M., and Ullman, D.E. 2004.** Instability of Mi-mediated nematode resistance in transgenic tomato plants. *Molecular Breeding* 13: 391–394.
- Hosseininejad, E., and Vajedkhan, M. 2000.** Interactions of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* (Race1) and Verticellium wilt fungi *Fusarium oxysporium* f.sp. *ciceri* on pea varieties. *Applied Entomology and Phytopathology* 68: 1-12 (in Persian).
- Karssen, G., and Moens, M. 2006.** Root-knot nematodes. pp. 59-90. In: Perry, R.N., and Moens, M. (eds.) *Plant Nematology*. CAB International Publishing, Wallingford, UK.
- Martinez, L., Caragnaro, P., Masuekki, R., and Rodriguez, J. 2003.** Evaluation of diversity among Argentine grapevine (*Vitis vinifera* L.) varieties using morphological data and AFLP markers. *Journal of Biotechnology* 6: 241-250.
- Milligan, S.B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P., and Williamson, V.M. 1998.** The root-knot nematode resistance gene *Mi* from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10: 1307–1320.
- Nasr Esfahani, M. 2009.** Distribution and identification of root-knot nematode species in tomato fields. *Mycopathology* 7: 45-49.
- Rajput, S.G., Wable, K.J., Sharma, K.M., Kubde, P.D., and Mulay, S.A. 2006.** Reproducibility testing of RAPD and SSR markers in tomato. *African Journal of Biotechnology* 5: 108-112.
- Rumbos, C.I., Khah, E.M., and Sabir, N. 2011.** Response of local and commercial tomato cultivars and rootstocks to *Meloidogyne javanica* infestation. *Australian Journal of Crop Science* 5: 1388-1395.
- Sharma, H.K., Siyanand, P., Pachauri, D.C., and Singh, G. 2004.** Reaction of tomato (*Lycopersicon esculentum*) varieties/lines to *Meloidogyne incognita* race-1. *Indian Journal of Nematology* 34: 93.
- Smith, A.F. 1994.** *The Tomato in America: Early History, Culture, and Cookery*. University of South Carolina Press, Columbia, S.C, USA. 210 pp.
- Taylor, A.L., and Sasser, J.N. 1978.** *Biology, Identification and control of root knot*

nematodes (*Meloidogyne* spp.). A Cooperative Publication of the Department of Plant Pathology, North Carolina State University and The United States Agency for International Development. North Carolina State Graphics, Raleigh, N. C, USA. 111 pp.

Tzortzakakis, E.A., Bletsos, F.A., and Avgelis, A.D. 2006. Evaluation of *Solanum* rootstock accessions for control of root-knot nematodes and tobamo viruses. *Journal of Plant Diseases and Protection* 113: 188-189.

Williamson, V.M. 1999. Plant nematode resistance genes. *Current Opinions in Plant Biology* 2: 327-331.

Williamson, V.M., and Kumar, A. 2006. Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends in Genetics* 22: 396-403.

