DOI: 10.22034/IJPP.2024.2021797.451

بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۹ / شماره ۲/ سال ۱۴۰۲: ۱۳۲-۱۱۶

CC BY

مقاله پژوهشی

ارزیابی مقاومت ارقام مختلف گوجه‌فرنگی نسبت به *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* و شناسایی مولکولی ارقام مقاوم بر اساس نشانگر $SCAR_{Frl}$ در جنوب استان کرمان و استان هرمزگان

آسیه بهاری‌میمندی[1*]، امیررضا امیرمیجانی[1**] و آزاده گودرزی[2**]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۰۱ ، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۳/۲۹)

چکیده

تحقیق حاضر با هدف ارزیابی مقاومت ۱۴ رقم گوجه‌فرنگی رایج در جنوب استان کرمان و استان هرمزگان شامل افرا، الیسا، باسیمو، بدرو، برنتا، بریویو، سانسید ۶۱۸۹، کارون، کانیون، کومودورو، گلسار، متین، ۴۱۲۹ و ۸۳۲۰ در مرحله چهار برگ حقیقی در مقابل *Fusarium oxysporum* f. sp. *116adices-lycopersici* (FORL) در شرایط گلخانه و بررسی وجود یا عدم وجود ژن مقاومت *frl* در ارقام گوجه‌فرنگی بر اساس نشانگر $SCAR_{Frl}$ انجام شد. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه شاخص بیماری، ویژگی‌های ریخت‌شناسی شامل طول ریشه، ارتفاع شاخساره، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر شاخساره و وزن تر کل و تکثیر ژن *frl* با استفاده از آغازگرهای $SCAR_{Frl}$-F/$SCAR_{Frl}$-R، ارقام کارون، کانیون، کومودورو و ۴۱۲۹ به عنوان مقاوم‌ترین و ارقام الیسا، برنتا، گلسار و متین به عنوان حساس‌ترین رقم‌ها نسبت به جدایه FORL UJFCC1919 شناخته شدند. سایر ارقام شامل افرا، باسیمو، بدرو، بریویو، سانسید ۶۱۸۹ و ۸۳۲۰ درجات مختلفی از حساسیت را نسبت به این بیمارگر نشان دادند. با استفاده از آغازگرهای $SCAR_{Frl}$-F/$SCAR_{Frl}$-R، در هر یک از ارقام کارون، کانیون، کومودورو و ۴۱۲۹ یک قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی تکثیر شد که نشان‌دهنده وجود ژن *frl* با آلل‌های هموزیگوس غالب (RR) است. با استفاده از این آغازگر، در ارقام الیسا، برنتا، گلسار، متین و ۸۳۲۰ یک قطعه ۹۵۰ جفت بازی تکثیر شد که بیانگر عدم وجود ژن مقاومت *frl* و وجود آلل‌های هموزیگوس مغلوب (rr) است. به علاوه، در ارقام افرا، باسیمو، بدرو، بریویو و سانسید ۶۱۸۹ دو قطعه در محدوده ۹۰۰-۱۰۰۰ جفت بازی تکثیر شدند که نشان‌دهنده وجود آلل‌های هتروزیگوس (Rr) در این ارقام است.

واژگان کلیدی: ارزیابی مقاومت، پوسیدگی ریشه و طوقه، مقاومت به بیماری، نشانگر پیوسته به ژن

---

* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشگاه جیرفت

**مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ar.amirmijani@ujiroft.ac.ir و a.goudarzi6061@gmail.com

۱- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران

۲- استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی هرمزگان، سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی، بندرعباس، ایران

Iran. J. Plant Path., Vol. 59, No .2, 2023: 116-132

DOI: 10.22034/IJPP.2024.2021797.451

Research Article
Evaluation of resistance of different tomato cultivars against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and molecular identification of resistant cultivars based on $SCAR_{Frl}$ marker in the south of Kerman Province and Hormozgan Province

Asiyeh Bahari-Meymandi[1*], Amirreza Amirmijani[1] and Azadeh Goudarzi[2**]**

(Received: 21.05.2024; Accepted: 18.06.2024)

Abstract
The present study aimed to evaluate the resistance of 14 common tomato cultivars in the south of Kerman province and Hormozgan province, including Afra, Badro, Basimo, Bernetta, Brivio, Canyon, Comodoro, Elisa, Golsar, Karun, Matin, Sunseed 6189, 4129 and 8320 at the stage of four true-leaves against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, under greenhouse conditions and to study the presence or absence of *frl* resistance gene in the tomato cultivars based on the $SCAR_{Frl}$ marker. Based on the results of comparison of the disease index, morphological characteristics including root length, shoot height, root fresh and dry weight, shoot fresh weight and total fresh weight as well as *frl* gene amplification using $SCAR_{Frl}$-F/$SCAR_{Frl}$-R primers, Canyon, Comodoro, Karun and 4129 were recognized as the most resistant and Bernetta, Elisa, Golsar and Matin were recognized as the most sensitive cultivars to FORL UJFCC1919. Other cultivars including Afra, Badro, Basimo, Brivio, Sunseed 6189 and 8320 showed different degrees of sensitivity to this pathogen. Using $SCAR_{Frl}$-F/$SCAR_{Frl}$-R primers, a 1000 bp fragment was amplified in the cultivars Canyon, Comodoro, Karun and 4129 which indicates the presence of *frl* gene with dominant homozygous (RR) alleles. Using this primer, a 950 bp fragment was amplified in Bernetta, Elisa, Golsar, Matin and 8320 cultivars, which indicates the absence of the *frl* gene and the presence of homozygous recessive (rr) alleles. In addition, in Afra, Badro, Basimo, Brivio and Sunseed 6189 cultivars, two 900-1000 bp fragments were amplified, which indicates the existence of heterozygous (Rr) alleles in these cultivars.

Keywords: disease resistance, gene-linked marker, resistance evaluation, root and crown rot

[*] A part of MSc. thesis of the first author, submitted to university of Jiroft, Jiroft, Iran

[**]Corresponding author's E-mail address: ar.amirmijani@ujiroft.ac.ir and a.goudarzi6061@gmail.com
[1] MSc. ex-student of Plant Pathology and Assistant prof. of Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran
[2] Assistant prof. of Plant Protection Research Department, Hormozgan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, BandarAbbas, Iran

مقدمه

گوجه‌فرنگی یکی از محصولات کشاورزی بسیار مهم در ایران به شمار می‌رود. این محصول از نظر سطح زیر کشت در کشور، ارزش اقتصادی و میزان تولید و مصرف، پس از سیب‌زمینی به عنوان مهم‌ترین محصول از گروه سبزی‌ها در نظر گرفته می‌شود. ایران در بین کشورهای تولیدکننده گوجه‌فرنگی در دنیا جایگاه ششم را به خود اختصاص داده است. در سال ۱۴۰۱، سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی در ایران حدود ۱۰۳ هزار هکتار و میزان تولید سالیانه آن بیش از پنج میلیون تن برآورد شده است (Ashraf-Jahani 2023). پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی ناشی از *Fusarium oxysporum* Schltdl. f. sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker (FORL) یکی از بیماری‌های خسارت‌زا و مهم گوجه‌فرنگی در دنیا و ایران به شمار می‌رود. در ابتدا این بیماری در سال‌های ۱۹۶۹ و ۱۹۷۱ میلادی از ژاپن و کالیفرنیا گزارش شد و در حال حاضر دارای پراکنش جهانی است (Mutlu *et al.* 2015). گوجه‌فرنگی از مرحله گیاهچه تا بلوغ به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه مبتلا می‌شود. عامل بیماری به صورت ساپروفیت و از طریق تشکیل کلامیدوسپور به مدت طولانی در بقایای گیاهی و خاک زنده می‌ماند و قادر است گیاهان حساس را از طریق زخم‌ها و منافذ طبیعی آلوده نماید. علائم بیماری در اندام‌های هوایی شامل زرد و بافت‌مرده شدن برگ‌های پایینی، از بین رفتن بافت ریشه و طوقه، تغییر رنگ سیستم آوندی طوقه و قاعده ساقه، پژمردگی، کاهش تعداد و اندازه میوه‌ها و کاهش رشد و مرگ گیاهان آلوده است (Yezli *et al.* 2019). زیان اقتصادی ناشی از بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در گلخانه‌ها، مزارع و سیستم‌های کشت بدون خاک، در صورت عدم اجرای راه‌کارهای مناسب برای مدیریت بیماری، بسیار قابل‌توجه است (Davis & Paulus 2014, Edel-Hermann *et al.* 2011). مهم‌ترین راه‌کارهای مدیریت بیماری شامل استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی (Zhao *et al.* 2016)، کاربرد عوامل کنترل زیستی نظیر گونه‌های *Bacillus* (Baysal *et al.* 2013)، آفتاب‌دهی خاک (Saremi *et al.* 2008) و استفاده از ارقام مقاوم است (Fazio *et al.* 1999). کاشت ارقام مقاوم در مقایسه با سایر راه‌کارهای مدیریت بیماری، از نظر اقتصادی مقرون به صرفه و از نظر زیست محیطی، یک راه‌کار ایمن محسوب می‌شود. از این‌رو، شناسایی منابع مقاومت ژنتیکی نسبت به بیماری در دستیابی به ارقام مقاوم و ایجاد مقاومت پایدار یک امر ضروری است (Fazio *et al.* 1999).

در دهه‌های گذشته، آزمون‌های مایه‌زنی مصنوعی به عنوان تنها روش انتخاب ارقام مقاوم به FORL در برنامه‌های اصلاح نژاد در نظر گرفته می‌شدند. نتایج این آزمون‌ها در تشخیص حساسیت یا مقاومت ارقام گیاهی نسبت به بیمارگرها بسیار تعیین‌کننده است. با این حال، انجام آزمون‌های بیماری‌زایی نسبتاً پرهزینه و وقت‌گیر است و نتایج آنها ممکن است به دلیل تفاوت در میزان بیماری‌زایی جدایه‌های بیمارگر تا حدودی غیر قابل اعتماد باشد. استفاده از نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن‌های مقاومت، یک روش غیر مستقیم برای انتخاب منابع مقاومت ژنتیکی است و برنامه‌های اصلاح نژاد گیاهان را اثربخش‌تر می‌سازد (Mutlu *et al.* 2015). اجرای برنامه‌های اصلاح نژاد مستلزم غربالگری تعداد فراوانی از لاین‌ها و ارقام گیاهی است. غربالگری به کمک نشانگرهای مولکولی در مقایسه با غربالگری مبتنی بر علائم بیماری از مزایای فراوانی از جمله صرفه‌جویی در زمان و منابع و امکان انتخاب لاین‌ها و ارقام در مرحله گیاهچه یا نهال برخوردار است (Collard & Mackill 2008). مقاومت به بیمارگر قارچی FORL به وسیله ژن منفرد غالب *frl* کنترل می‌شود که در بازوی بلند کروموزوم ۹ نزدیک به سانترومر قرار دارد و بین این ژن و ژن Tm-2 پیوستگی کاملی گزارش شده

است (Vakalounakis *et al*. 1997). تا کنون، غربالگری لاین‌ها و ارقام گوجه‌فرنگی به منظور شناسایی ارقام مقاوم به FORL با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلفی از جمله SCAR (Sequence Characterized Amplified Region)، RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)، CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) و RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) انجام شده است (Devran *et al*. 2018, Fazio *et al*. 1999, Mutlu *et al*. 2015, Staniaszek *et al*. 2014). مقاومت به FORL به طور مستقل از سه منبع مختلف شامل *Solanum peruvianum* PI126944 در ژاپن، *S. peruvianum* PI126926 در فرانسه و *S. peruvianum* PI128650 در اوهایو به گوجه‌فرنگی لاین IRB#301 (*S. lycopersicum*) معرفی شد. با استفاده از لاین IRB#301، گوجه‌فرنگی لاین Ohio 89-1 مقاوم به ویروس Tm-2 و قارچ FORL و پس از آن، لاین Fla. 7781 مقاوم به FORL بدون مقاومت به Tm-2 تولید شد (Scott & Jones 2000). آزمون آللی با استفاده از سه منبع مقاومت *S. peruvianum* نشان داد که هر سه لاین دارای یک آلل *frl* هستند. با استفاده از ترکیبی از لاین‌های مقاوم و لاین‌های تقریباً ایزوژنیک (NILs: Near isogenic lines) مشخص شد که سه نشانگر RAPD (شامل UBC#116، UBC#194 و UBC#655) در ارتباط نزدیک با ژن *frl* هستند (Fazio *et al*. 1999). در سال ۲۰۱۴، نشانگر CAPS از توالی C2_At2g38025 در مجموعه ارتولوگ حفاظت شده II (COSII) با فاصله کمتری از ژن *frl* در جمعیت F2 توسعه داده شد (Staniaszek *et al*. 2014). در سال ۲۰۱۵ در ترکیه، نشانگرهای SCAR هم‌بارز مرتبط با ژن *frl* ایجاد شدند و استفاده از آنها در انتخاب لاین‌های گوجه‌فرنگی مقاوم به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه نتایج موفقیت‌آمیزی را به دنبال داشت (Mutlu *et al*. 2015). در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۸ در ترکیه، از تکنولوژی توالی‌یابی نسل جدید (NGS: Next-Generation Ssequencing) و روش تجزیه و تحلیل تفکیک انبوه(Bulk segregant analysis) به منظور توسعه نشانگرهای مولکولی مرتبط با ژن *frl* استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که این نشانگرها به منظور انتخاب ارقام تجاری و مقاوم گوجه‌فرنگی نسبت به بیمارگر FORL در برنامه‌های اصلاح نژاد در مقیاس وسیع قابل اطمینان هستند (Devran *et al*. 2018). در حال حاضر، مکان ژنی *frl* در برنامه‌های اصلاح نژاد گوجه‌فرنگی به منظور توسعه ارقام مقاوم به FORL به صورت تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرد (Devran *et al*. 2018).

در ایران، مقاومت ارقام مختلف گوجه‌فرنگی نسبت به بیمارگرهای مختلف از طریق انجام آزمون‌های بیماری‌زایی و یا با استفاده از نشانگرهای مولکولی مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. در استان آذربایجان شرقی، مقاومت سه رقم گوجه‌فرنگی شامل ارگون، دانفیلد و کلوز در مقابل جدایه C142 از قارچ FORL در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت و رقم دانفیلد به عنوان حساس‌ترین رقم نسبت به این بیمارگر معرفی شد (Manafi *et al*. 2012). در مطالعه دیگری در استان آذربایجان شرقی، مقاومت ارقام رایج گوجه‌فرنگی گلخانه‌ای شامل سه رقم ارگون، دانفیلد و کلوز در مقابل دو جدایه مرجع *F. oxysporum* Schltdl. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder & H.N. Hansen (FOL) و FORL و یک جدایه محلی *F. oxysporum* مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس مقایسه درصد شاخص بیماری، وزن تر و خشک اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه و ارتفاع شاخساره، رقم دانفیلد به عنوان حساس‌ترین رقم و جدایه FORL به عنوان بیماری‌زاترین جدایه انتخاب شد (Manafi *et al*. 2012). در تحقیق دیگری، حضور یا عدم حضور ژن‌های مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی در ۲۷ رقم و هیبرید گوجه‌فرنگی با استفاده از نشانگر CAPS مورد بررسی قرار گرفت و ۱۴ رقم

به عنوان ارقام مقاوم به نژاد ۲ FOL معرفی شدند (Morid & Haj Mansour 2012). در بررسی دیگری در استان آذربایجان شرقی، مقاومت نه رقم گوجه‌فرنگی رایج در کشور نسبت به FOL مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس مقایسه درصد شاخص بیماری و سطح زیر منحنی پیشرفت بیماری، ارقام والتر و پریمو ارلی به ترتیب به عنوان ارقام مصون و بسیار حساس و سایر ارقام شامل فلات، کینگ استار، مونالیزا، پتوپراید ۵، سوپرچف، سوپر استون و سوپر استرین b به عنوان ارقام حساس یا نیمه حساس معرفی شدند (Parsa *et al*. 2018). به منظور شناسایی ژنوتیپ‌های گوجه‌فرنگی دارای آلل مقاومت به بیماری ویروسی پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (TSWV)، ۶۴ ژنوتیپ از جمله ۲۸ رقم تجاری هیبرید با استفاده از نشانگر مولکولی هم‌بارز NCSW-003 که از نوع نشانگرهای SCAR (پیوسته به ژن مقاومت *Sw-5b*) است، از نظر مقاومت به ویروس عامل بیماری مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده، چهار رقم هیبرید سرین، بریویو، جم و زمان حامل آلل مقاومت بودند (Nasirinia *et al*. 2021).

جنوب استان کرمان و استان هرمزگان، سهم قابل‌توجهی در تأمین محصول گوجه‌فرنگی در کشور به خود اختصاص داده‌اند و کشت گوجه‌فرنگی در این استان‌ها، در اقتصاد و معیشت کشاورزان این مناطق نقش قابل‌توجهی ایفاء می‌کند. در بین استان‌های تولیدکننده گوجه‌فرنگی، رتبه نخست تولید این محصول در نیمه دوم سال به استان هرمزگان اختصاص دارد. در این استان، حدود ۱۵ هزار هکتار از زمین‌های کشاورزی زیر کشت گوجه‌فرنگی قرار دارد و سالانه بیش از ۶۷۸ هزار تن محصول از این استان برداشت می‌شود. به علاوه، جنوب استان کرمان با سطح زیر کشت گوجه‌فرنگی حدود پنج هزار هکتار و تولید سالانه محصول بیش از ۱۶۸ هزار تن، رتبه هفتم را در کشور به خود اختصاص داده است (Ashraf-Jahani 2023). بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه مهم‌ترین بیماری خاکزاد گوجه‌فرنگی و یکی از عوامل محدودکننده کشت این محصول در جنوب استان کرمان و استان هرمزگان به شمار می‌رود. در سال ۱۴۰۲، تحقیقی با هدف جداسازی، شناسایی و تعیین فراوانی عوامل قارچی مرتبط با پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی در استان هرمزگان انجام شد. بر اساس نتایج به دست آمده، بیشترین فراوانی (۷۳ درصد) به جدایه‌های FORL تعلق داشت و گونه‌های *Rhizoctonia solani* و *F. acutatum* به ترتیب با فراوانی هشت و یک درصد جداسازی شدند. نتایج بیماری‌زایی گونه‌های قارچی روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی هیبرید سانسید ۶۱۸۹ در مرحله چهار برگ حقیقی نشان داد که هر سه گونه روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی بیماری‌زا هستند و سبب ایجاد پوسیدگی ریشه و طوقه و زردی و بافت‌مردگی اندام‌های هوایی می‌شوند (Rahimipour *et al*. 2024). تا کنون، در زمینه ارزیابی مقاومت ارقام مختلف گوجه‌فرنگی رایج در جنوب کشور نسبت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه و شناسایی مولکولی ارقام مقاوم به این بیماری مطالعه‌ای انجام نشده است. از این‌رو، تحقیق حاضر با هدف ارزیابی مقاومت ۱۴ رقم گوجه‌فرنگی رایج در جنوب استان کرمان و استان هرمزگان نسبت به قارچ FORL در شرایط گلخانه انجام شد. به علاوه، وجود یا عدم وجود ژن مقاومت *frl* بر اساس نشانگر $SCAR_{Frl}$ در ارقام گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های *Fusarium oxysporum*

جدایه‌های *F. oxysporum* (شامل UJFCC1532، UJFCC1846، UJFCC1654، UJFCC1919 و UJFCC1918) مورد استفاده در این تحقیق از مجموعه کشت‌های زنده آزمایشگاه قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه جیرفت (UJFCC) تهیه شدند (جدول ۱). این

جدایه‌ها بر اساس نتایج آزمون‌های بیماری‌زایی مقدماتی روی ارقام گوجه‌فرنگی بیماری‌زا بودند (Rahimipour *et al*. 2024).

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های *Fusarium oxysporum* مورد استفاده در این تحقیق.

Table 1. Characteristics of *Fusarium oxysporum* isolates used in this research.

No.	Species name	Host	Isolate code	Region name
1	*F. oxysporum*	Tomato	UJFCC 1532	Bagher Abad (the south of Kerman Province)
2	*F. oxysporum*	Tomato	UJFCC1846	Anbar Abad (the south of Kerman Province)
3	*F. oxysporum*	Tomato	UJFCC1654	Bagher Abad (the south of Kerman Province)
4	*F. oxysporum*	Tomato	UJFCC1919	Eisin (Hormozgan Province)
5	*F. oxysporum*	Tomato	UJFCC1918	Eisin (Hormozgan Province)

شناسایی فرم مخصوص جدایه‌های *F. oxysporum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

استخراج DNA ژنومی از هر یک از جدایه‌های *F. oxysporum* به روش ژانگ و استفنسن (Zhong & Steffenson 2001) انجام شد. به منظور شناسایی فرم مخصوص جدایه‌ها، از سه جفت آغازگر اختصاصی sp13F/sp13R (اختصاصی نژاد ۱ و ۳ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*)، sp23F/sp23R (اختصاصی نژاد ۲ و ۳ *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*) و sprlF/spr1R (اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*) استفاده شد (Hirano & Arie 2006). اطلاعات مربوط به آغازگرهای مورد استفاده در جدول ۲ نشان داده شده است. مخلوطی حاوی ۵۰ نانوگرم از DNA قالب، یک میکرومول از هر یک از آغازگرهای پیشرو و معکوس و ۱۳ میکرولیتر PCR Master Mix (شرکت Ampliqon) برای واکنش‌های ۲۵ میکرولیتری تهیه شد. برنامه حرارتی مورد استفاده برای انجام واکنش‌ها با توجه به نوع آغازگر تعیین شد.

جدول ۲. آغازگرهای مورد استفاده برای شناسایی فرم مخصوص جدایه‌های *Fusarium oxysporum*.

Table 2. Primers used to identify the formae specialis of *Fusarium oxysporum* isolates.

Primers	Target gene	Sequence (5′→3′)	Formae specialis	Reference
sp13-F sp13-R	*pgx4* (445bp)	GTCAGTCCATTGGCTCTCTC TCCTTGACACCATCACAGAG	*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 1 and 3	Hirano & Arie 2006
sp23-F sp23-R	*pg1* (518bp)	CCTCTTGTCTTTGTCTCACGA GCAACAGGTCGTGGGGAAAA	*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 2 and 3	Hirano & Arie 2006
sprl-F sprl-R	*pgx4* (947bp)	GATGGTGGAACGGTATGACC CCATCACACAAGAACACAGGA	*F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*	Hirano & Arie 2006

تعیین بیماری‌زاترین جدایه FORL

بیماری‌زایی پنج جدایه FORL روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم سوپرچف در شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. بذور گوجه‌فرنگی پس از ضد عفونی با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت پنج دقیقه و سه مرتبه شستشو با آب مقطر سترون، به مدت هفت روز در کاغذ صافی مرطوب سترون قرار داده شدند. بذور جوانه‌زده در گلدان‌های پلاستیکی سیاه‌رنگ به قطر هشت سانتی‌متر حاوی بستر پرلیت و کوکوپیت به نسبت ۳:۱ کشت شدند. به منظور تهیه زادمایه قارچی، پرگنه‌های هفت روزه جدایه‌های FORL با آب مقطر سترون شستشو

داده شد و به منظور حذف ریسه‌ها، سوسپانسیون‌های کنیدیوم از چهار لایه گاز سترون عبور داده شدند. غلظت هر سوسپانسیون با استفاده از لام هماسیتومتر به ۲×۱۰^{۶} کنیدیوم بر میلی‌لیتر آب مقطر سترون رسانده شد. گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی با چهار برگ حقیقی از خاک خارج شدند و ریشه گیاهچه‌ها به مدت پنج ساعت در سوسپانسیون کنیدیوم هر یک از جدایه‌ها قرار داده شدند. پس از این مدت، گیاهچه‌های مایه‌زنی شده به گلدان‌های پلاستیکی سیاه‌رنگ به قطر ۱۵ سانتی‌متر حاوی پرلیت سترون در یک‌سوم تحتانی و بستر خاک آماده کشت سترون شامل ترکیبی از پرلیت، کوکوپیت، ورمی کمپوست، خاک برگ، پیت ماس، خاک رس و ماسه (شرکت گیلدا) انتقال یافتند. برای هر جدایه سه گلدان (هر گلدان حاوی یک گیاهچه)، در نظر گرفته شد. مایه‌زنی گیاهچه‌های شاهد با آب مقطر سترون انجام شد. تمام گلدان‌ها به گلخانه با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با رطوبت نسبی ۶۰ درصد و دمای ۲۲–۱۸ درجه سلسیوس منتقل شدند. آزمون‌های بیماری‌زایی در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شدند. پانزده روز پس از مایه‌زنی، با خارج کردن همه گیاهچه‌ها از خاک، شدت بیماری بر اساس مقیاس نمره‌دهی ترتیبی ذکر شده در جدول ۳ ارزیابی شد (Ye *et al*. 2020).

جدول ۳. مقیاس نمره‌دهی علائم بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Ye *et al*. 2020).

Table 3. Scoring scale of root and crown rot disease symptoms in tomato seedlings inoculated with isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Ye *et al*. 2020).

Score	Symptoms
0	No disease symptoms
1	Light or moderate brown lesions on taproots and lateral roots, without rot
2	Light or moderate rot of taproot, no disease symptoms on the leaves
3	Light or moderate wilting of leaves, stunting, severe rot on taproot and lateral roots, crown rot, and vascular discoloration in the stem
4	Stem bases constricted into lines, dead or almost dead plantlets

همچنین، شاخص بیماری (DI) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه شد (Sharma *et al*. 2018).

$$DSI(\%) = \frac{\sum(Classfrequency \times scoreofratingclass)}{(totalnumberofobservations) \times (maximaldiseaseindex)} \times 100$$ رابطهٔ ۱)

پس از محاسبه DI، گروه‌بندی جدایه‌های مورد بررسی از نظر میزان بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی طبق جدول ۴ انجام شد (Ye *et al*. 2020).

جدول ۴. گروه‌بندی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* از نظر بیماری‌زایی روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم سوپرچف.

Table 4. Grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* isolates in terms of virulence on the seedlings of tomato Superchef cultivar.

Virulence	Disease index (%)
Non-pathogenic	0-10
Low pathogenicity	11-30
Moderate pathogenicity	31-60
High pathogenicity	61-100

ارزیابی واکنش ارقام مختلف گوجه‌فرنگی نسبت به جدایه‌های FORL

گیاهچه‌های ۱۴ رقم گوجه‌فرنگی رایج در جنوب استان کرمان و استان هرمزگان شامل افرا، الیسا، باسیمو، بدرو، برنتا، بریویو، سانسید ۶۱۸۹، کارون، کانیون، کومودورو، گلسار، متین، ۴۱۲۹ و ۸۳۲۰ که در سینی‌های کشت حاوی بستر پرلیت و کوکوپیت رشد یافته بودند، از مرکز تولید بذر و نشاء صوفی بوشهر تهیه شدند. مایه‌زنی گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگ حقیقی با سوسپانسیون کنیدیوم جدایه UJFCC1919 با غلظت نهایی ۲×۱۰^{۶} کنیدیوم بر میلی‌لیتر آب مقطر سترون مطابق با روش ذکر شده در بالا انجام شد و گیاهچه‌های مایه‌زنی شده به گلدان‌های پلاستیکی سیاه‌رنگ به قطر ۱۵ سانتی‌متر حاوی پرلیت سترون در یک‌سوم تحتانی و بستر آماده کشت سترون شامل ترکیبی از پرلیت، کوکوپیت، ورمی کمپوست، خاک برگ، پیت ماس، خاک رس و ماسه (شرکت گیلدا) انتقال یافتند. مایه‌زنی گیاهچه‌های شاهد با آب مقطر سترون انجام شد. مانند آزمایش قبل، گلدان‌های حاوی گیاهچه به گلخانه با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی با رطوبت نسبی ۶۰ درصد و دمای ۲۲-۱۸ درجه سلسیوس منتقل و به صورت روزانه ظهور علائم بیماری در آنها مورد بررسی قرار گرفت. برای پوشش گلخانه از توری سبز با تراکم ۸۰ درصد استفاده شد. پانزده روز پس از مایه‌زنی، شدت بیماری بر اساس مقیاس نمره‌دهی ترتیبی ذکر شده در جدول ۳ ارزیابی شد (Ye *et al.* 2020). آزمون‌های بیماری‌زایی به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی با ۱۴ تیمار (ارقام گوجه‌فرنگی) و سه تکرار انجام شدند. تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

در پایان آزمایش، همه گیاهچه‌های مایه‌زنی شده و شاهد از خاک خارج شدند و ویژگی‌های ریخت‌شناسی آنها شامل طول ریشه، ارتفاع شاخساره، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر شاخساره و وزن تر کل تعیین گردید. به منظور تکمیل اصول بیماری‌زایی و جداسازی قارچ‌ها، ریشه‌ها زیر جریان آب شستشو داده شدند و از فاصله بین بافت‌های سالم و آلوده ریشه و طوقه، قطعاتی به ابعاد تقریبی ۵ × ۵ میلی‌متر برش داده شد. ضد عفونی بافت‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت پنج دقیقه انجام شد و قطعات ریشه و طوقه سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شده و روی حوله کاغذی سترون خشک شدند. قطعات ضد عفونی شده به محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) منتقل شدند و به مدت ۱۰ روز در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. جدایه‌های رشد یافته اطراف قطعات ریشه و طوقه به روش نوک ریسه خالص‌سازی شدند. شناسایی جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی انجام شد.

بررسی وجود یا عدم وجود ژن مقاومت *frl* در ارقام گوجه‌فرنگی بر اساس نشانگر $SCAR_{Frl}$

وجود یا عدم وجود ژن مقاومت *frl* نسبت به قارچ FORL بر اساس نشانگر $SCAR_{Frl}$ پیوسته به ژن *frl* در ۱۴ رقم مختلف گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، DNA ژنومی از بافت برگ گیاهچه‌ها در مرحله چهار برگ حقیقی به روش ژانگ و استفنسن (Zhong & Steffenson 2001) استخراج شد و آزمون PCR با استفاده از جفت آغازگر $SCAR_{Frl}$-F/$SCAR_{Frl}$-R انجام گردید (جدول ۵) (Mutlu *et al.* 2015). اجزای واکنش PCR برای حجم ۱۵ میکرولیتر شامل ۵۰ نانوگرم از DNA قالب، یک میکرومول از هر یک از آغازگرهای پیشرو و معکوس و ۷/۵ میکرولیتر PCR Master Mix (شرکت Ampliqon) بودند. برنامه حرارتی PCR برای نشانگر $SCAR_{Frl}$ شامل یک چرخه واسرشتی اولیه به مدت ۳ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه

واسرشتی در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۳ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، بسط آغازگر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ ثانیه بود. تکثیر قطعات ۱۰۰۰ و ۹۵۰ جفت بازی به ترتیب به عنوان وجود و عدم وجود ژن مقاومت *frl* نسبت به FORL در ارقام گوجه‌فرنگی در نظر گرفته شد (Mutlu *et al*. 2015).

جدول ۵. توالی و اندازه قطعات تکثیر شده با جفت آغازگر $SCAR_{Frl}$-F/$SCAR_{Frl}$-R.

Table 5. Sequence and size of the fragments amplified using $SCAR_{Frl}$-F/$SCAR_{Frl}$-R primer pair.

Primers	Target gene	Sequence (5′→3′)	Resistance/susceptibility alleles	Reference
$SCAR_{FRL}$-F	*frl*	CACATTCATCATCTGTTTTTAGTCTATTC	1000 R/950 S	Mutlu *et al*., 2015
$SCAR_{FRL}$-R		CACAATCGTTGGCCATTGAATGAAGAAC		

نتایج

شناسایی فرم مخصوص جدایه‌های *F. oxysporum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

پنج جدایه *F. oxysporum* به دست آمده از مزارع گوجه‌فرنگی در جنوب استان کرمان و استان هرمزگان که بر اساس نتایج آزمون‌های بیماری‌زایی روی ارقام گوجه‌فرنگی بیماری‌زا بودند، با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی sprlF/spr1R به عنوان *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* تشخیص داده شدند. با استفاده از این آغازگر، قطعه‌ای به طول ۹۵۰ جفت باز تکثیر شد. به علاوه، با استفاده از جفت آغازگرهای sp13F/sp13R و sp23F/sp23R هیچ قطعه‌ای تکثیر نشد.

تعیین بیماری‌زاترین جدایه FORL

نتایج حاصل از تجزیه واریانس درصد شاخص بیماری ناشی از جدایه‌های مختلف FORL در گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم سوپرچف نشان داد که بین جدایه‌های مورد بررسی در سطح احتمال یک درصد اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد (جدول ۶). بیشترین شاخص بیماری (۲۵ درصد) به جدایه UJFCC1846 مربوط بود و این جدایه به همراه UJFCC1919 (با شاخص بیماری ۲۲/۲۲ درصد) در یک گروه آماری قرار گرفت. شاخص بیماری مربوط به جدایه‌های UJFCC1532، UJFCC1918 و UJFCC1654 یکسان بود و ۱۶/۶۶ درصد برآورد شد (جدول ۷). بر این اساس، از گروه جدایه‌های پرآزار، جدایه UJFCC1919 برای انجام آزمون‌های بیماری‌زایی و ارزیابی واکنش ارقام مختلف گوجه‌فرنگی نسبت به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه انتخاب شد.

جدول ۶. تجزیه واریانس شاخص بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم سوپرچف.

Table 6. Analysis of variance of root and crown rot disease index caused by the isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on the seedlings of tomato Superchef cultivar.

Source of variations (S.V.)	D.F.	Mean squares (M.S.)
Treatments	5	226.053**
Error	12	4.21
Coefficient of variation (C.V.%)	12.69	

** Significant at $P \leq 0.01$

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

جدول ۷. مقایسه میانگین شاخص بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم سوپرچف ۱۵ روز پس از مایه‌زنی.

Table 7. Mean comparison of root and crown rot disease index caused by the isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* on the seedlings of tomato Superchef cutivar 15 days after inoculation.

Pathogen	Isolate code	Mean of disease index (%)
F. o. f. sp. *radicis-lycopersici*	UJFCC1846	25[a]
F. o. f. sp. *radicis-lycopersici*	UJFCC1919	22.22[a]
F. o. f. sp. *radicis-lycopersici*	UJFCC1654	16.66[b]
F. o. f. sp. *radicis-lycopersici*	UJFCC1918	16.66[b]
F. o. f. sp. *radicis-lycopersici*	UJFCC1532	16.66[b]

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح احتمال یک درصد آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Means followed by the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$ according to Duncan Test.

ارزیابی واکنش ارقام مختلف گوجه‌فرنگی نسبت به جدایه‌های FORL

هفت روز پس از مایه‌زنی، علائم بیماری در گیاهچه‌های شاهد به صورت زرد شدن برگ‌های پایینی مشاهده شد و زردی به تدریج به برگ‌های بالایی توسعه یافت. پانزده روز پس از مایه‌زنی، زخم‌هایی به رنگ قهوه‌ای روی ریشه‌ها ایجاد شد و تغییر رنگ آوندهای ناحیه طوقه و قاعده ساقه مشاهده گردید (شکل ۱). نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به شاخص بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه، طول ریشه، ارتفاع شاخساره، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر شاخساره و وزن تر کل نشان داد که بین ارقام مورد نظر در سطح احتمال یک درصد اختلاف آماری معنی‌دار وجود دارد (جدول ۸).

بر اساس مقایسه درصد شاخص بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از جدایه UJFCC1919 در ۱۴ رقم مختلف گوجه‌فرنگی، ارقام افرا و ۴۱۲۹ با کمترین درصد شاخص بیماری (۲۵/۰۰ درصد)، بیشترین مقاومت را در مقایسه با سایر ارقام نسبت به جدایه مورد نظر نشان دادند و به طور مشترک در یک گروه آماری قرار گرفتند. درصد شاخص بیماری در ارقام بدرو و بریویو ۲۹/۱۶ درصد، در ارقام ۸۳۲۰ و باسیمو ۳۳/۳۳ درصد، در ارقام برنتا، کارون، کانیون، گلسار و متین ۳۷/۵۰ درصد و در رقم کومودورو ۴۱/۶۶ درصد برآورد شد. این ارقام درجات مختلفی از حساسیت/مقاومت را نسبت به بیماری نشان دادند و در گروه ارقام نیمه حساس/نیمه مقاوم دسته‌بندی شدند. به علاوه، ارقام الیسا و سانسید ۶۱۸۹ با بالاترین درصد شاخص بیماری (۴۵/۸۳ درصد) از بیشترین حساسیت نسبت به جدایه UJFCC1919 برخوردار بودند و به طور مشترک در یک گروه آماری قرار گرفتند (جدول ۹).

در پایان آزمایش، ویژگی‌های ریخت‌شناسی گیاهچه‌های ارقام مختلف گوجه‌فرنگی شامل طول ریشه، ارتفاع شاخساره، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر شاخساره و وزن تر کل مورد سنجش قرار گرفت (جدول ۹). بیشترین میانگین طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه و وزن تر کل به رقم ۴۱۲۹ مربوط بود و رقم برنتا از کمترین میانگین طول ریشه، ارتفاع شاخساره، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر شاخساره و وزن تر کل برخوردار بود (جدول ۹).

شکل ۱. علائم زردی، پژمردگی، کاهش حجم ریشه و پوسیدگی و زخم روی ریشه و طوقه ارقام حساس A) برنتـا، B) سانسـید ۶۱۸۹، و کاهش رشد و حجم ریشه و پوسیدگی ریشه و طوقه در ارقام مقاوم C) ۴۱۲۹ و D) افرا تلقیح شده با *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* UJFCC1919

Figure 1. Yellowing, wilting, stunting, and root and crown rot of susceptible cultivars, A: Bernetta, B: Sunseed 6189, and stunting and root and crown rot of resistant cultivars, C: 4129 and D: Afra inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* UJFCC1919.

جدول ۸. تجزیه واریانس شاخص بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه، طول ریشه، ارتفاع شاخساره، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر شاخساره و وزن تر کل در ارقام گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با جدایه UJFCC1919.

Table 8. Analysis of variance of root and crown rot disease index, root length, shoot height, root fresh and dry weight, shoot fresh weight and total fresh weight in the tomato cultivars inoculated with UJFCC1919 isolate.

		Mean squares (M.S.)						
Source of variations (S.V.)	**D.F.**	**Disease index**	**Root length**	**Shoot height**	**Root fresh weight**	**Root Dry weight**	**Shoot fresh weight**	**Total fresh weight**
Cultivar	13	268.4295**	2.9450**	6. 505**	0.0013**	0.000029**	0.1072**	0.0997**
Inoculation	1	105364.583**	30.964**	34.714**	0.0038**	0.00026**	0.720**	0.6921**
C × I	13	268.4295**	0.6567**	3.598**	0.00012**	0.000012**	0.078**	0.077**
Error	56	96.7262	0.9370	2.062	0.00008	0.000009	0.02787	0.0281
Coefficient of variation (C.V.%)		27.769	22.22	13.58	29.45	28.97	22.39	21.42

** Significant at $P \leq 0.01$

**معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد

جدول ۹. مقایسه میانگین شاخص بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه، طول ریشه، ارتفاع شاخساره، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر شاخساره و وزن تر کل در ارقام گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده با جدایه UJFCC1919.

Table 9. Mean comparison of root and crown rot disease index, root length, shoot height, root fresh and dry weight, shoot fresh weight and total fresh weight in the tomato cultivars inoculated with UJFCC1919 isolate.

No.	Cultivar	Disease index (%)	Root length (cm)	Shoot height (cm)	Root fresh weight (gr)	Root dry weight (gr)	Shoot fresh weight (gr)	Total fresh weight (gr)
1	4129	25.00^{c}	5.58^{a}	11.66^{ab}	0.063^{a}	0.013^{a}	0.940^{a}	1.004^{a}
2	Afra	25.00^{c}	3.58^{de}	10.50^{b-d}	0.037^{bc}	0.010^{ab}	0.744^{a-c}	0.845^{a-d}
3	Brivio	29.16^{bc}	4.91^{a-c}	11.16^{ab}	0.043^{bc}	0.010^{ab}	0.808^{a-c}	0.782^{a-e}
4	Badro	29.16^{bc}	3.66^{c-e}	11.33^{ab}	0.057^{a}	0.011^{ab}	0.870^{ab}	0.927^{ab}
5	8320	33.33^{a-c}	4.50^{a-d}	10.58^{b-d}	0.034^{cd}	0.010^{ab}	0.766^{a-c}	0.800^{a-e}
6	Basimo	33.33^{a-c}	5.25^{ab}	9.00^{cd}	0.030^{c-f}	0.010^{ab}	0.669^{b-d}	0.700^{c-e}
7	Karun	37.50^{a-c}	4.91^{a-c}	12.83^{a}	0.037^{bc}	0.013^{a}	0.944^{a}	0.955^{ab}
8	Canyon	37.50 $^{a-c}$	4.25^{b-e}	10.83^{bc}	0.051^{b}	0.010^{ab}	0.817^{a-c}	0.861^{a-c}
9	Matin	37.50 $^{a-c}$	4.41^{a-e}	10.16^{b-d}	0.014^{d-f}	0.009^{b}	0.637^{cd}	0.651^{c-e}
10	Golsar	37.50 $^{a-c}$	3.50^{de}	10.08^{b-d}	0.019^{d-f}	0.012^{ab}	0.641^{cd}	0.657^{c-e}
11	Bernetta	37.50 $^{a-c}$	3.16^{e}	8.66^{d}	0.013^{f}	0.004^{c}	0.463^{d}	0.582^{e}
12	Comodoro	41.66^{ab}	4.16^{b-e}	10.08^{b-d}	0.025^{c-f}	0.009^{b}	0.733^{a-c}	0.759^{b-e}
13	Sunseed 6189	45.83^{a}	4.75^{a-d}	10.41^{b-d}	0.020^{d-f}	0.010^{ab}	0.605^{cd}	0.625^{de}
14	Elisa	45.83^{a}	4.33^{a-e}	10.66^{bc}	0.021^{d-f}	0.011^{ab}	0.793^{a-c}	0.815^{a-d}

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند، در سطح احتمال یک درصد آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند.

Means followed by the same letters are not significantly different at $P \leq 0.01$ according to Duncan Test.

بررسی وجود یا عدم وجود ژن مقاومت *frl* در ارقام گوجه‌فرنگی بر اساس نشانگر $SCAR_{Frl}$

با استفاده از جفت آغازگر $SCAR_{Frl}$-F/$SCAR_{Frl}$-R، در هر یک از ارقام کارون، کانیون، کومودورو و ۴۱۲۹ یک قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی تکثیر شد که نشان‌دهنده وجود ژن مقاومت با آلل‌های هموزیگوس غالب (RR) است. بر اساس نتایج آزمون بیماری‌زایی و سنجش ویژگی‌های ریخت‌شناسی گیاهچه‌ها نیز این ارقام به عنوان ارقام مقاوم به جدایه UJFCC1919 دسته‌بندی شدند. در ارقام الیسا، برنتا، گلسار، متین و ۸۳۲۰ با استفاده از جفت آغازگر $SCAR_{Frl}$-F/$SCAR_{Frl}$-R یک قطعه ۹۵۰ جفت بازی تکثیر شد که نشان‌دهنده عدم وجود ژن مقاومت و آلل‌های هموزیگوس مغلوب (rr) است. این ارقام از نظر شاخص بیماری و ویژگی‌های ریخت‌شناسی بررسی شده به عنوان ارقام حساس به جدایه UJFCC1919 گروه‌بندی شدند. در سایر ارقام مورد بررسی شامل افرا، باسیمو، بدرو، بریویو و سانسید ۶۱۸۹ با استفاده از آغازگر $SCAR_{Frl}$ دو قطعه ۱۰۰۰-۹۰۰ جفت بازی تکثیر شد. تکثیر این قطعات نشان‌دهنده وجود آلل‌های هتروزیگوس (Rr) در این ارقام است. این ارقام درجات متفاوتی از مقاومت یا حساسیت را نسبت به جدایه UJFCC1919 نشان دادند و در گروه ارقام نیمه حساس تا نیمه مقاوم دسته‌بندی شدند (جدول ۱۰).

جدول ۱۰. گروه‌بندی ۱۴ رقم گوجه‌فرنگی از نظر حساسیت/مقاومت به جدایه UJFCC1919 بر اساس نشانگر $SCAR_{FRL}$

Table 10. Grouping of 14 tomato cultivars in terms of susceptibility/resistance to UJFCC1919 isolate based on $SCAR_{FRL}$ marker

No.	Cultivar	Alleles	Susceptibility/Resistance	No.	Cultivar	Alleles	Susceptibility/Resistance
1	Karun	RR	Resistant	8	Afra	Rr	Semi-susceptible/ semi-resistant
2	Canyon	RR	Resistant	9	Basimo	Rr	Semi-susceptible/ semi-resistant
3	Comodoro	RR	Resistant	10	Sunseed 6189	Rr	Semi-susceptible/ semi-resistant
4	4129	RR	Resistant	11	Matin	rr	Susceptible
5	8320	Rr	Semi-susceptible/ semi-resistant	12	Golsar	rr	Susceptible
6	Brivio	Rr	Semi-susceptible/ semi-resistant	13	Elisa	rr	Susceptible
7	Badro	Rr	Semi-susceptible/ semi-resistant	14	Bernetta	rr	Susceptible

بحث

پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از FORL یکی از مهم‌ترین و خسارت‌زاترین بیماری‌های گوجه‌فرنگی به شمار می‌رود. عامل بیماری به سرعت در خاک‌های سترون استقرار می‌یابد و به مدت طولانی به صورت کلامیدوسپور زیست‌پذیری خود را حفظ می‌کند (Davis & Paulus 2014, Sasaki *et al.* 2022). اگرچه برخی راه‌کارهای مدیریت بیماری از جمله کنترل شیمیایی و آفتاب‌دهی خاک، سطوحی از حفاظت را برای گیاه در مقابل عامل بیماری فراهم می‌نمایند، اما استفاده از ارقام مقاوم، مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین راه‌کار مدیریت این بیماری محسوب می‌گردد. به‌کارگیری مقاومت ژنتیکی گیاهان نسبت به عوامل بیمارگر به عنوان یک راه‌کار مؤثر، قابل‌قبول و ایمن از نظر زیست محیطی برای مدیریت

بیماری‌های گیاهی شناخته شده است (Devran *et al.* 2018, Mutlu *et al.* 2015, Staniaszek *et al.* 2014). اجرای برنامه‌های نوین اصلاح نژاد گیاهان به میزان قابل‌توجهی به استفاده از نشانگرهای مولکولی متکی است و غربالگری با استفاده از این نشانگرها در شناسایی ژنوتیپ‌های گیاهی مقاوم به عوامل بیماری‌زا بسیار سودمند است (Devran *et al.* 2018). استفاده از نشانگرهای پیوسته به ژن‌های مقاومت، امکان تکثیر ژن هدف و تعیین حساسیت یا مقاومت ژنوتیپ‌های گیاهی نسبت به عوامل بیماری‌زا را فراهم می‌سازد. در اغلب برنامه‌های اصلاح نژاد گیاهان، نشانگرهای SCAR در انتخاب لاین‌ها و ارقام مقاوم از کارایی بسیار مناسبی برخوردار هستند (Mutlu *et al.* 2015). به دلیل اختصاصی بودن نشانگرهای SCAR، با استفاده از آنها یک قطعه فوق‌العاده تکرارپذیر تکثیر می‌شود. از مزیت‌های دیگر نشانگرهای SCAR این است که تنها یک جایگاه ژنی به وسیله این نشانگرها شناسایی می‌گردد. از سوی دیگر، به دلیل طویل‌تر بودن نشانگرهای SCAR، نتایج استفاده از آنها در مقایسه با نشانگرهای RAPD تکرارپذیری بیشتری دارد (Kumar & Gupta 2008). از سال ۲۰۱۵، نشانگر $SCAR_{Frl}$ پیوسته به ژن مقاومت *frl* دربرنامه‌های تولید گوجه‌فرنگی در ترکیه مورد استفاده قرار گرفته و به عنوان یک نشانگر مولکولی بسیار قابل اطمینان در شناسایی ارقام مقاوم به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه معرفی شده است (Mutlu *et al.* 2015). با استفاده از این نشانگر، ژن *frl* با دقت بسیار بالایی در هیبریدها و ارقام مختلف گوجه‌فرنگی قابل ردیابی است. به علاوه، بین این نشانگر و ژن *frl*، پیوستگی محکم‌تری در مقایسه با نشانگرهای RAPD گزارش شده است (Fazio *et al.* 1999). استفاده از نشانگر $SCAR_{Frl}$، امکان انتخاب سریع و دقیق ژنوتیپ‌های گیاهی مقاوم، بدون نیاز به انجام آزمون‌های بیماری‌زایی را فراهم می‌کند. علاوه بر این، هم‌بارز بودن این نشانگر، تشخیص ژنوتیپ‌های مقاوم هموزیگوت را در مقابل ژنوتیپ‌های هتروزیگوت امکان‌پذیر می‌سازد (Mutlu *et al.* 2015).

در این تحقیق، علاوه بر انجام آزمون‌های بیماری‌زایی به منظور ارزیابی مقاومت ۱۴ رقم مختلف گوجه‌فرنگی نسبت به FORL، شناسایی مولکولی این ارقام بر اساس نشانگر $SCAR_{Frl}$ نیز به منظور تایید حساسیت یا مقاومت ارقام انجام گردید. نتایج تجزیه واریانس داده‌های مربوط به شاخص بیماری، طول ریشه، ارتفاع شاخساره، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر شاخساره و وزن تر کل نشان داد که ارقام گوجه‌فرنگی مورد بررسی، با یکدیگر دارای اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد هستند. بر اساس مقایسه درصد شاخص بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه ناشی از جدایه UJFCC1919 در ۱۴ رقم مختلف گوجه‌فرنگی، ارقام افرا و ۴۱۲۹ با کمترین درصد شاخص بیماری (۲۵/۰۰ درصد)، بیشترین مقاومت را در مقایسه با سایر ارقام نسبت به جدایه مورد نظر نشان دادند. به علاوه، ارقام الیسا و سانسید ۶۱۸۹ با بیشترین درصد شاخص بیماری (۴۵/۸۳ درصد) از بیشترین حساسیت نسبت به جدایه UJFCC1919 برخوردار بودند. همچنین بیشترین میانگین طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه و وزن تر کل به رقم ۴۱۲۹ مربوط بود. در آزمون‌های بیماری‌زایی نیز این رقم مقاومت بیشتری نسبت به سایر ارقام نشان داد. به علاوه، رقم برنتا از کمترین میانگین طول ریشه، ارتفاع شاخساره، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر شاخساره و وزن تر کل برخوردار بود و در آزمون‌های بیماری‌زایی نیز به عنوان رقم حساس به بیماری شناسایی شد.

با استفاده از نشانگر $SCAR_{Frl}$، یک قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی برای آلل‌های مقاوم و یک قطعه ۹۵۰ جفت بازی برای آلل‌های حساس تکثیر می‌شود (Mutlu *et al.* 2015). در مطالعه حاضر، استفاده از نشانگر $SCAR_{Frl}$ برای شناسایی ارقام گوجه‌فرنگی مقاوم به FORL نتایج موفقیت‌آمیزی را در شناسایی ارقام مقاوم گوجه‌فرنگی به

دنبال داشت. با استفاده از جفت آغازگر $SCAR_{Frl}$-F/$SCAR_{Frl}$-R، در هر یک از ارقام کارون، کانیون، کومودورو و ۴۱۲۹ یک قطعه ۱۰۰۰ جفت بازی تکثیر شد که نشان‌دهنده وجود ژن مقاومت *frl* با آلل‌های هموزیگوس غالب (RR) است. در ارقام الیسا، برنتا، گلسار، متین و ۸۳۲۰ با استفاده از جفت آغازگر $SCAR_{Frl}$-F/$SCAR_{Frl}$-R یک قطعه ۹۵۰ جفت بازی تکثیر شد که بیانگر عدم وجود ژن *frl* و آلل‌های هموزیگوس مغلوب (rr) است. در سایر ارقام مورد بررسی شامل افرا، باسیمو، بدرو، بریویو و سانسید ۶۱۸۹ با استفاده از این آغازگر، دو قطعه در محدوده ۹۰۰-۱۰۰۰ جفت بازی تکثیر شدند. تکثیر این قطعات نشان‌دهنده وجود آلل‌های هتروزیگوس (Rr) در این ارقام است. در مجموع بر اساس نتایج حاصل از مقایسه درصد شاخص بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه، سنجش ویژگی‌های ریخت‌شناسی شامل طول ریشه، ارتفاع شاخساره، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر شاخساره و وزن تر کل و ردیابی ژن مقاومت *frl*، ارقام کارون، کانیون، کومودورو و ۴۱۲۹ مقاوم‌ترین و ارقام الیسا، برنتا، گلسار و متین حساس‌ترین رقم‌ها نسبت به جدایه UJFCC1919 تشخیص داده شدند. سایر ارقام مورد بررسی شامل افرا، باسیمو، بدرو، بریویو، سانسید ۶۱۸۹ و ۸۳۲۰ درجات مختلفی از حساسیت/مقاومت را نسبت به این جدایه نشان دادند. بر این اساس، از ۱۴ رقم گوجه-فرنگی مورد بررسی، ۲۸ درصد نسبت به جدایه UJFCC1919 مقاوم (چهار رقم)، ۲۸ درصد حساس (چهار رقم) و ۴۳ درصد نیمه حساس تا نیمه مقاوم (شش رقم) تشخیص داده شدند.

در ایران، نشانگرهای SCAR تا کنون به منظور ردیابی ژن‌های مقاومت نسبت به بیماری ویروسی پژمردگی لکه‌ای گوجه‌فرنگی (TSWV) و بیماری آنتراکنوز گوجه‌فرنگی با عامل *C. lindemuthianum* مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Nasirinia *et al*. 2021, Hosseini *et al*. 2021). بر اساس اطلاعات موجود، این تحقیق نخستین گزارش از ارزیابی ارقام مختلف گوجه‌فرنگی نسبت به قارچ FORL در استان‌های کرمان و هرمزگان است. به علاوه، مطالعه حاضر نخستین گزارش از ردیابی ژن مقاومت *frl* در گوجه‌فرنگی بر اساس نشانگر $SCAR_{Frl}$ در ایران محسوب می‌شود. نتایج این تحقیق می‌تواند در سطح منطقه‌ای و در راستای مدیریت بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی، اطلاعات مفیدی را در ارتباط با انتخاب و کشت ارقام گوجه‌فرنگی در اختیار کشاورزان جنوب کشور قرار دهد. آگاه‌سازی کشاورزان از ارقام گوجه‌فرنگی مقاوم یا نیمه مقاوم نسبت به FORL در جنوب کشور و توصیه به استفاده از این ارقام به ویژه در مناطقی که بیماری پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه شایع است، در مدیریت بیماری و کاهش زیان اقتصادی ناشی از آن مؤثر خواهد بود. به علاوه، نشانگر $SCAR_{Frl}$ می‌تواند در توسعه لاین‌های گوجه‌فرنگی مقاوم به FORL سهم قابل‌توجهی را به خود اختصاص دهد.

منابع

References

Ashraf-Jahani M. 2023. Agricultural statistics 2021-2022. Tehran: Information and Communication Technology Center of the Ministry of Agricultural Jihad.

Baysal O., Lai D., Xu H.H., Siragusa M., Caliskan M., Carimi F., Teixeira da Silva J.A. and Tor M. 2013. A proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* species. PLoS ONE 8(1): e53182.

Collard B.C.Y. and Mackill D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological

Science 363: 557-572.

Davis R.M .and Paulus A.O. 2014. *Fusarium* crown and root rot, pp. 25-27. In: J.B. Jones, T.A. Zitter, T.M. Momol and S.A. Miller (Eds). Compendium of tomato diseases and pests. 2nd ed. APS Press, St. Paul, MN, USA.

Devran Z., Kahveci E., Hong Y., Studholme D.J. and Tor M. 2018. Identifying molecular markers suitable for *Frl* selection in tomato breeding. Theoretical and Applied Genetics 131: 2099-2105.

Edel-Hermann V., Gautheron N. and Steinberg C. 2011. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* and related species pathogenic on tomato in Algeria and other Mediterranean countries. Plant Pathology 61: 787-800.

Fazio G., Stevens M.R. and Scott J.W. 1999. Identification of RAPD markers linked to *Fusarium* crown and root rot resistance (*Frl*) in tomato. Euphytica 105: 205-210.

Hirano Y. and Arie T. 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of General Plant Pathology 72: 273-283.

Hosseini F., Mirlohi A. and Sharifnabi B. 2021. Molecular identification of bean cultivars for partial resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* based on SCAR markers. Iranian Journal of Plant Pathology 57(3): 189-201.

Kumar J. and Gupta P.K. 2008. Molecular approaches for improvement of medicinal and aromatic plants. Plant Biotechnology Reports 2: 93.

Manafi R., Babai Ahari A., Arzanlou M. and Valizadeh M. 2012. Evaluation of the resistance of common cultivars of greenhouse tomato in East Azarbaijan province to *Fusarium* wilt disease and investigation of the possibility of biological control of this disease. Journal of Agricultural Science and Sustainable Production 22(1): 145-158.

Morid B. and Haj Mansour Sh. 2012. Detection of resistant genes against *Fusarium* wilt disease in tomato cultivars using CAPS marker. Agroecology Journal 8(2): 65-74.

Mutlu N., Demirelli A., Ilbi H. and Ikten C. 2015. Development of co-dominant SCAR markers linked to resistant gene against the *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Theoretical and Applied Genetics 128(9): 1791-1798.

Nasirinia G., Nasrolahnejad S., Ahmadvand R. and Koolivand D. 2021. Molecular screening of some commercial tomato cultivars and their F6 generation for resistance against Tomato spotted wilt virus (TSWV). Agricultural Biotechnology 12(2): 43-52.

Parsa N., Viani A. and Arzanloo, A. 2018. Evaluation of different tomato varieties cultivated in East-Azerbayjan province for resistance to the race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of Applied Research in Plant Protection 7(3): 77-89.

Rahimipour P., Amirmijani A.R. and Goudarzi A. 2024. Identification of fungal agents causing tomato root and crown rot in Hormozgan province. Iranian Journal of Plant Protection Science 54(2): 207-224.

Saremi H., Saremi H. and Okhovvat S.M. 2008. Major *Fusarium* diseases on crops and their control management with soil solarisation in northwest Iran. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 73: 189-199.

Sasaki K., Ito y., Hamada Y., Dowaki A., Jogaiah S. and Ito S.I. 2022. FoMC69 gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* is essential for pathogenicity by involving normal function of chlamydospores. Pathogens 11: 1433.

Scott J.W. and Jones J.P. 2000. Fla. 7775 and Fla. 7781: tomato breeding lines resistant to *Fusarium* crown and root rot. HortScience 35(6): 1183-1184.

Sharma A., Sharma N.K., Srivastava A., Kataria A., Dubey S., Sharma S. and Kundu B. 2018. Clove and lemongrass oil based non-ionic nanoemulsion for suppressing the growth of plant pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Industrial Crops and Products 123: 353-362.

Staniaszek M., Szczechura W. and Marczewski W. 2014. Identification of a new molecular marker C2-25 linked to the *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* resistance *frl* gene in tomato. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding 50(4): 285-287.

Vakalounakis D.J., Laterrot H., Moretti A., Ligoxigakis E.K. and Smardas K. 1997. Linkage between *Frl* (*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* resistance) and Tm-2 (*tobacco mosaic virus* resistance-2) loci in tomato (*Lycopersicon esculentum*). Annals of Applied Biology 130: 319-323.

Ye Q., Wang R., Ruan M., Yao Z., Cheng Y., Wan H., Li Z., Yang Y.and Zhou G. 2020. Genetic diversity and identification of wilt and root rot pathogens of tomato in China. Plant Disease 104(6): 1715-1724.

Yezli W., Hamini-Kadar N., Zebboudj N., Blondin L., Tharreau D. and Kihal M. 2019. First report of crown and root rot of tomato caused by *Fusarium equiseti* in Algeria. Journal of Plant Pathology 101: 1249.

Zhao S., Chen X., Deng S., Dong X., Song A., Yao J., Fang W. and Chen F. 2016. The effects of fungicide, soil fumigant, bio-organic fertilizer and their combined application on chrysanthemum *Fusarium* wilt controlling, soil enzyme activities and microbial properties. Molecules 21: 526.

Zhong S. and Steffenson B.J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. Phytopathology 91(5): 469-476.