مجله به‌نژادی نهال و بذر
جلد ۱-۲۵، شماره ۴، سال ۱۳۸۸

مکان یابی QTL مقاومت به سفیدک پودری(*Oidium neolycopersici* L. Kiss) درگوجه فرنگی

QTL Mapping of Tomato Powdery Mildew (*Oidium neolycopersici* L. Kiss) Resistance

شیوا عزیزی‌نیا[۱]، حسن زینالی[۲]، عباسعلی زالی[۳] و سیروس عبدمیشانی[۳]

۱- دانشجوی سابق دکتری اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج
۲و ۳- به ترتیب دانشیار و استاد، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج

تاریخ دریافت: ۱۳۸۸/۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۸/۷/۲

چکیده

عزیزی‌نیا، ش.، زینالی، ح.، زالی، ع.، و عبدمیشانی، س. ۱۳۸۸. مکان یابی QTL مقاومت به سفیدک پودری (*Oidium neolycopersici* L. Kiss) درگوجه فرنگی. **مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۵:** ۶۴۹-۶۳۵.

این بررسی با هدف تعیین دقیق محل *Ol-qtl1*، مقاومت به سفیدک پودری در نمونهٔ *L. parviflorum* G1.1601 و با استفاده از جمعیت حاصل از تلاقی بین گونه وحشی مقاوم و والد تجاری حساس *L. esculentum* رقم Money Maker (MM) اجرا شد. از جمعیت در حال تفرق F_2 برای تهیه نقشه پیوستگی نشانگرهای جدید و از جمعیت های BC_2 و BC_2S_1 برای مکان یابی دقیق استفاده شد. نشانگرهای احاطه کنندهٔ (Flanking markers) این QTL برای غربال جمعیت ها و شناسایی نوترکیب ها مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور پوشاندن ناحیه هدف، ۵۴ آغازگر جدید طراحی و در نهایت تعداد ۲۴ نشانگر اختصاصی جدید SCAR و CAPS معرفی شدند. نتایج ارزیابی بیماری در جمعیت های BC_2 و BC_2S_1، وجود ناحیه موثر در کنترل مقاومت را بین دو نشانگر ct21 و ct184 تایید کرد. افراد حامل آلل هموزیگوت از والد مقاوم، مقاوم به بیماری بودند و میانگین شاخص بیماری در آن ها ۰/۵ محاسبه شد، گیاهان هتروزیگوت واکنش بینابینی داشتند و گیاهان حامل آلل های هموزیگوت از والد حساس، اکثراً حساس بودند. نتایج کاربرد نشانگرهای جدید در بالادست (Upstream) و پایین دست (Downstream) نشانگر tg25، نشان داد ناحیه کنترل کننده مقاومت در بالادست این نشانگر قرار دارد. بر اساس نتایج این مطالعه، فاصله تقریبی اولیهٔ تعیین شده برای این QTL از ۳۰ سانتی مورگان به حدود ۱۵سانتی مورگان محدود شد. با توجه به پیوستگی نشانگرهای جدید معرفی شده با ناحیه کنترل مقاومت، این نشانگرها می توانند برای انتخاب گیاهان مقاوم در برنامه های اصلاحی گزینش بر مبنای نشانگر (Marker Assisted Selection) مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: گوجه فرنگی، سفیدک پودری، تجزیه QTL، نقشه پیوستگی، نشانگر SCAR، نشانگر CAPS.

نویسنده مسئول: s_azizniya@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum*, syn. *Solanum lycopersicum*) تنها گونه اهلی شده از جنس Lycopersicon است. این گیاه میزبان بیش از ۲۰۰ نوع بیمارگر مختلف است که به طرق مختلف به آن خسارت وارد می‌کنند. با وجود این که کاربرد آفت‌کش‌ها در بیشتر موارد از خسارت این بیمارگرها جلوگیری می‌کنند اما با توجه به خطرات زیست محیطی، عدم تاثیر قطعی روی برخی از بیمارگرها و همچنین هزینه بالای مبارزه شیمیایی، استفاده دائم از آفت‌کش‌ها مقرون به صرفه نیست (Bia and Lindhout, 2007؛ Van der Beek *et al.*, 1994).

سفیدک پودری گوجه‌فرنگی (*Oidium (neo) lycopersici*) در سال‌های اخیر از گلخانه‌های گوجه‌فرنگی در کشورهای اروپای غربی گزارش شده و آسیب زیادی به محصول گوجه‌فرنگی اروپا وارد کرده است و در حال گسترش در گلخانه‌ها و مزارع تولید گوجه‌فرنگی در سراسر دنیا است (Jones *et al.*, 2001؛ Huang *et al.*, 1998؛ Li *et al.*, 2006). به طور طبیعی این گونه روی گوجه‌فرنگی بیماریزا است و روی گونه‌های گیاهی دیگر بندرت دیده شده است (Jankovics *et al.*, 2008).

مطالعات نشان داده است که *O. (neo)lycopersici* یک قارچ بیوتروف است. علایم این بیماری به صورت جوش‌های گرد سفید رنگی هستند که ابتدا روی برگ‌ها ظاهر می‌شوند و می‌توانند ساقه‌ها و کاسبرگ‌ها را نیز آلوده کنند اما روی میوه‌ها دیده نمی‌شوند (Mieslerova *et al.*, 2004). منشاء *O. (neo) lycopersici* هنوز نامشخص است (Jones *et al.*,2001) و تشخیص دقیق بیمارگر به دلیل عدم وجود مرحله جنسی و متفاوت بودن گزارش‌ها در مورد نحوهٔ کنیدی‌زایی مشکل است. بررسی دقیق نمونه‌های هرباریومی، دو گونه سفیدک پودری متمایز در استرالیا (*O. lycopersici*) (Nooedeloos and Loerakker, 1989) و خارج از استرالیا (*O. neolycopersici*) شناسایی کرده است (Oichi *et al.*, 2006؛ Kiss *et al.*, 2001).

بیشتر ارقام زراعی گوجه‌فرنگی به این قارچ حساس هستند اما مقاومت در بیشتر گونه‌های وحشی جنس Lycopersicon وجود دارد (Mieslerova *et al.*, 2000). در میان خویشاوندان وحشی، گونه‌های *L. esculentum*، *L. hirsutum*، *L. cheesmanii*، *L. pimpinellifolium*، *L. parviflorum* و *L. pennelli* به دلیل داشتن منابع مقاومت به بیماری و قابلیت تلاقی راحت‌تر با ارقام زراعی اهمیت بیشتری دارند (Huang *et al.*, 1998؛ Lindhut *et al.*, 1994؛ Pavan *et al.*, 2007). تاکنون شش ژن مقاومت با نام‌های *Ol*-1 تا *Ol*-6 و سه مکان ژنی

www.SID.ir

کنترل‌کننده صفت کمی(QTL) برای مقاومت به *O. neolycopersici* در گونه‌های وحشی شناسایی شده‌اند. ژن نیمه غالب *Ol-1* مقاومت به *O. lycopersici* را در نمونه *L. hirsutum* G1.1560 کنترل می‌کند (Huang *et al*., 2000). این ژن روی بازوی بلند کروموزوم ۶ پیوسته با جایگاه نشانگری *Aps*-1 و در کنار ژن‌های *Mi* (مقاومت به *Meloidogyne* spp.) و *Cf-2/Cf-5* (مقاومت به *Cladosporium fulvum*) قرار گرفته است (Vad der Beek *et al*., 1994). ژن مغلوب *Ol-2* که مقاومت به *L. esculentum* var. *cerasiforme* را کنترل می‌کند روی کروموزوم ۴ در نزدیکی سانترومر مکان‌یابی شده است (Ciccarese *et al*., 1998). در گونه مقاوم *L. hirsutum* G1. 1290 تک ژن غالب *Ol-3* که روی بازوی بلند کروموزم ۶ قرار گرفته است مقاومت را القاء می‌کند (Li *et al*., 2006؛ De Giovanni *et al*., 2004). همچنین سطح بالایی از مقاومت در *L. hirsutum* PI247087 وجود دارد که با ژن *Ol-5* واقع بر بازوی بلند کروموزوم ۶ کنترل می‌شود. به احتمال زیاد *Ol-1*، *Ol-5* و *Ol-3* به یک کلاستر ژنی بزرگ تعلق دارند (Bai *et al*., 2005). ژن غالب *Ol-4* روی بازوی کوتاه کروموزم ۶ قرار داشته و مقاومت را در نمونه *L. peruvianum* LA2172 کنترل می کند (Bai *et al*, 2004). اگر چه تاکنون چند رقم مقاوم به سفیدک پودری به صورت تجاری تولید شده است اما پیوستگی این ژن‌ها با آلل‌های نامطلوب استفاده گسترده از آن‌ها در ایجاد ارقام مقاوم گوجه فرنگی را محدود کرده است (Jankovics *et al*., 2008).

در ارزیابی جمعیت‌های حاصل از نمونه مقاوم *L. parviflorum* G1.1601 توارث کمی مقاومت به *O. neolycopersici* مشاهده و مدل چند ژنی برای این مقاومت پیشنهاد شد (Lindhout *et al*., 1994 ؛ Huang *et al*., 2000). بر اساس تحقیقات بای و همکاران (Bai *et al*., 2003) سه مکان ژنی کنترل‌کننده مقاومت کمی (QTL) در این نمونه تعیین شد. این سه QTL اثر افزایشی نشان داده و در مجموع ۶۸ درصد از تنوع فنوتیپی را تبیین می‌کردند. *Ol-qtl1*، روی کروموزوم ۶ در فاصله بین نشانگرهای ct21 و ct184، با بیشترین مقدار LOD بر روی نشانگر tg25 قرار داشت. دو QTL دیگر (*Ol-qtl2* و *Ol-qtl3*) با هم پیوسته بوده و روی کروموزوم ۱۲، در فاصله ۲۵ سانتی مورگانی از هم و در کنار تک ژن غالب *Lv* که مقاومت به *L. taurica* را کنترل می‌کند قرار دارند و با نشانگرهای CAPS ct99 و ct129 احاطه می‌شوند (Bai *et al*., 2005).

بر اساس اطلاعات نقشه ژنتیکی گوجه‌فرنگی (Tanksley *et al*., 1992)، *Ol-qtl1* فاصله‌ای در حدود ۳۰ سانتی مورگان را در برمی‌گیرد. از نظر ژنتیکی چنین فاصله‌ای می‌تواند حاوی تعداد

www.SID.ir

زیادی ژن فعال باشد که لازم است ژن یا ژن‌های موثر در کنترل صفت مورد مطالعه با مکان‌یابی دقیق از طریق طراحی نشانگرهای جدید شناسایی شوند. از طرف دیگر این مکان ژنی با ژن‌های مقاومت *Ol*-1 و *Ol*-3 و نیز با *Ol*-5 همپوشانی دارد. جهت تعیین دقیق ژن یا ژن‌های کنترل‌کننده مقاومت و نیز بررسی آلل بودن *Ol-qtl1* و تک ژن‌های *Ol*-3 و *Ol*-1 نیاز به بررسی‌های بیشتر و تکمیلی جهت مکان‌یابی دقیق این QTLها احساس می‌شود (Bai *et al.*, 2003).

تحقیق حاضر با هدف مکان‌یابی دقیق‌تر *Ol-qtl1* واقع در کروموزوم ۶ و کاهش فاصله بین نشانگرهای احاطه‌کنندهٔ این ناحیه و محدود کردن ناحیه کنترل‌کننده مقاومت به سفیدک پودری طراحی و اجرا شد. هدف از این تحقیق افزایش تعداد نشانگرهای هم بارز و قابل تکرار در منطقه هدف جهت همسانه‌سازی این QTL در مطالعات آتی و نیز استفاده از نشانگرهای پیوسته جدید در برنامه‌های به‌نژادی بر مبنای نشانگر MAS بود.

مواد و روش‌ها

جمعیت اولیه مورد استفاده در این تحقیق توسط بای و همکاران (Bai *et al.*, 2003) از تلاقی بین نمونه وحشی *L. parviflorum* G1.1601 با مقاومت بالا و والد تجاری حساس *L. esculentum* cv. Money Maker (MM) در گلخانه تحقیقاتی دانشگاه واگنینگن هلند به دست آمده بود. برای تایید مجدد محل QTL مورد بررسی و تهیه نقشه پیوستگی نشانگرهای جدید از جمعیت F_2 و BC_2 حاصل از تلاقی برگشتی گیاهان انتخابی F_1 با والد حساس استفاده شد. برای مکان یابی دقیق (Fine mapping)، از جمعیت BC_2S_1 استفاده شد. ارزیابی بیماری جمعیت‌ها درگلخانه انجام شد و با استفاده از نشانگرهای احاطه کننده نوترکیب های جدید شناسایی شدند.

کل DNA ژنومی از برگ‌های جوان گیاهچه ها قبل از آلوده سازی و با استفاده از روش سریع ارائه شده توسط Steward and Via (1993) استخراج شد و DNA هر کدام از نوترکیب ها در مرحله دوم جهت دست یابی به DNA با کیفیت بهتر با استفاده از کیت Mini-preps ارائه شده توسط شرکت Key-gene مجدداً استخراج شد.

قارچ عامل بیماری

در این مطالعه از جدایه هلندی قارچ *O. neolycopersici* استفاده شد (Lindhout *et al.*, 1994) که کنیدی‌های آن روی گیاهان حساس رقم Money Maker گوجه فرنگی در یک محفظه رشدی (Growth Chamber) با دمای ۲۵±۲ °C، رطوبت نسبی ۷۰ درصد و ۱۶ ساعت روشنایی تکثیر و نگهداری می شدند. مایه قارچی برای آلوده سازی با شستن برگ‌های آلوده گیاهان حساس گوجه فرنگی تهیه شد. زادمایه

Archive of SID

www.SID.ir

(Inoculum) با غلظت ۲×۱۰^{۴} کنیدی در هر میلی لیتر محلول تهیه و سوسپانسیون حاصل برای آلوده کردن مصنوعی روی گیاهان یک ماهه گوجه فرنگی اسپور پاشی شد.

ارزیابی بیماری

کاشت و ارزیابی گیاهان در گلخانه‌های گروه علوم گیاهی دانشگاه واگنینگن هلند و در سال ۱۳۸۷ انجام شد. ده روز بعد از کاشت، گیاهچه‌ها به گلدان‌های بزرگ‌تر انتقال یافتند. گیاهان یک ماهۀ گوجه‌فرنگی (در مرحله رشدی دو یا سه برگ واقعی) با پاشیدن زادمایه قارچ عامل بیماری آلوده شده و در گلخانه با دمای $۲۰\pm۳^{\circ}C$ و رطوبت نسبی ۷۰ درصد نگهداری شدند. ارزیابی بیماری در روزهای ۱۱، ۱۴ و ۱۹ بعد از آلوده‌سازی انجام شد. گیاهان آلوده شده بر اساس روش ارائه شده توسط Bai *et al.* (2003) درجه‌بندی شدند. چهار درجه یا تیپ آلودگی استفاده شد:

مقاوم: بدون علایم مشخص بیماری و اسپورزایی، یا اسپورزایی خیلی کم که لکه‌ها به شدت نکروز شده‌اند؛ نیمه مقاوم: اسپورزایی ملایم، کمتر از ۱۰درصد سطح برگ آلوده شده و نکروز در اطراف لکه‌ها دیده می‌شود؛ نیمه حساس: اسپورزایی متوسط، ۱۰ تا ۳۰درصد سطح برگ پوشیده شده و نکروز مشاهده نمی‌شود؛ حساس: اسپورزایی شدید، بیش از ۳۰ درصد سطح برگی پوشیده شده و علایم نکروز وجود ندارد. برای کمی کردن این رتبه‌ها از درجه‌های ۰ تا ۳ به ترتیب: ۰= گیاهان مقاوم، ۱= گیاهان نیمه مقاوم، ۲ = گیاهان نیمه حساس و ۳ = گیاهان حساس استفاده شد. در محاسبات آماری میانگین رتبه‌های سه تاریخ ارزیابی برای هر گیاه محاسبه و به عنوان شاخص بیماری گیاه به کار برده شد.

طراحی آغازگرهای SCAR و CAPS

نشانگرهای CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) و SCAR Sequence Characterized Amplfied Region) مبتنی بر PCR، براساس اطلاعات توالی کلون های مصنوعی باکتریایی (Bacterial Artificial Clones) و نشانگرهای RFLP طراحی شدند. برای این کار از اطلاعات به دست آمده از پروژه بین‌المللی توالی‌یابی گوجه‌فرنگی و نقشه ژنتیکی ارایه شده توسط تنکسلی و همکاران (Tanksley *et al.*, 1992) استفاده شد. آغازگرهای ۲۲-۲۰ الیگونوکلئوتیدی اختصاصی با استفاده از نرم‌افزار Primer 3 طراحی شد و برای یافتن چند شکلی بین والدین (رقم Money Maker و نمونه G1.1601) مورد استفاده قرار گرفتند. محصول تکثیر شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد تفکیک شد و با استفاده از UV مور بررسی قرار گرفت. در صورت مشاهده تفاوت بین باندهای تکثیر شده در والدین، این آغازگر به عنوان نشانگر SCAR در نظر گرفته شدند. در صورت ایجاد نوارهای تک

Archive of SID

www.SID.ir

شکل، محصول تکثیری توسط آنزیم‌های برشی تیمار شده و سپس روی ژل آگارز ۱/۵ درصد از هم تفکیک شدند و در صورت مشاهده چند شکلی بین والدین، به عنوان نشانگرهای CAPS در نظر گرفته شدند. نوارهایی که بعد از برش، چند شکلی نشان ندادند بعد از خالص‌سازی از روی ژل، برای شناسایی چندشکلی‌های تک نوکلئوتید (Single Nucleotide Polymorphism) توالی یابی شدند.

تهیه نقشه پیوستگی و مکان یابی QTL

از ۲۰۲ فرد جمعیت F_2 برای تعیین محل ژنتیکی نشانگرهای جدید استفاده شد. برای تهیه نقشه پیوستگی نشانگرهای جدید و اطمینان از قرار گرفتن نشانگرها بر روی گروه پیوستگی مورد مطالعه، از داده‌های نشانگرهای AFLP موجود در مطالعه Bai *et al.*(2003)، به عنوان نشانگر کمکی استفاده شد. نرم‌افزار Joinmap 3.0 (Stam, 1993) با استفاده از تابع کوزامبی برای تهیه نقشه ژنتیکی در این جمعیت به کار برده شد. مکان‌یابی QTL با استفاده از MapQTL 4.0 (Van Ooijen and Maliepaard, 1999) انجام شد و آستانه معنی‌دار ۳ برای تشخیص و شناسایی QTLهای معنی‌دار در نظر گرفته شد. به منظور به دست آوردن اطلاعات دقیق‌تر در مورد مکان QTL و تعیین دقیق محل نشانگرها با استفاده از بررسی نوترکیب‌ها، تعداد ۱۱۲ فرد BC_2 در گلخانه کاشته شده و توسط نشانگرهای احاطه‌کننده *Ol-qtl1*، ct21 و ct184 غربال شدند. بر اساس نتایج ارزیابی بیماری و کاربرد نشانگرهای جدید روی این افراد د و فرد ($BC_2$64-15 و $BC_2$14-10) که از نظر جایگاه مورد نظر در وضعیت هتروزیگوت بوده و در آزمون بیماری وضعیت نیمه مقاوم و مقاوم نشان دادند انتخاب و برای تشکیل جمعیت BC_2S_1 خودگشن شدند. برای دست‌یابی به محل دقیق ناحیه کنترل‌کننده مقاومت به بیماری تعداد ۱۱۰۰ فرد از افراد جمعیت BC_2S_1 مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

ایجاد نشانگر های جدید

با هدف پوشاندن ناحیه وجود *Ol-qtl1*، در این تحقیق ۴۷ آغازگر با استفاده از اطلاعات توالی‌های همسانه‌های باکتریایی و هفت آغازگر دیگر بر اساس توالی نشانگرهای RFLP (در مجموع ۵۴ آغازگر) طراحی شد. اطلاعات مربوط به BAC ها از طریق پروژه بین‌المللی توالی‌یابی ژنوم گوجه‌فرنگی به طور مستمر در اختیار محققین قرار می‌گیرد (Arie *et al.*, 2007) و اطلاعات مربوط به نشانگرهای RFLP نیز از مطالعات تنکسلی و همکاران (Tanksley *et al.*, 1992) به دست آمد. تعداد پنج آغازگر در مرحله اول چند شکلی نشان دادند و به عنوان نشانگر SCAR معرفی شدند و ۱۹ عدد بعد از برش آنزیمی چند

Archive of SID

www.SID.ir

شکل بودند و به عنوان نشانگر CAPS شناسایی شدند (جدول ۱). در حالی که ۲۱ عدد از این آغازگرها باندهای تک شکل ایجاد کردند که مرحله توالی‌یابی برای یافتن تفاوت‌های تک نوکلئوتیدی به دلیل تشابهات زیاد توالی‌های والدین موفقیت‌آمیز نبود و تفاوتی بین توالی‌های نوکلئوتیدی محصولات تکثیر شده از دو والد حاصل نشد. تعدادی از نشانگرهای شناسایی شده در جمعیت‌های مورد بررسی نیز تکثیر نشده یا چند شکلی نشان ندادند. به این ترتیب ۲۴ نشانگر جدید در ناحیه بین نشانگرهای ct21 و ct184 ایجاد شدند.

تهیه نقشه پیوستگی و مکان یابی دقیق *Ol-qtl1*

نقشه پیوستگی نشانگرهای جدید در جمعیت F_2 و با استفاده از اطلاعات مربوط به نشانگرهای جدید و نشانگرهای AFLP حاصل از مطالعه بای و همکاران (Bai *et al.*, 2003) تهیه شد. در این بخش دو نشانگر 17O21-1 و 17O21-2 در گروه پیوستگی مستقلی قرار گرفته و با هیچ کدام از نشانگرهای مربوط به ناحیه هدف پیوستگی نشان ندادند. دیگر نشانگرها به همراه نشانگرهای AFLP در یک گروه پیوستگی قرار گرفتند. در نقشه پیوستگی به دست آمده اغلب نشانگرهای جدید در پایین دست نشانگر tg25 تمرکز داشتند. از طرف دیگر به دلیل عدم وجود تعداد مناسبی از افراد نوترکیب در این جمعیت در رابطه با نشانگرهای به کار رفته نقشه مناسبی با استفاده از کلیه نشانگرها حاصل نشد بنابراین تعداد محدودی از آن ها در تهیه نقشه پیوستگی استفاده شدند. نتایج مکان‌یابی QTL نشان‌دهنده وجود پیک در فاصله بین نشانگرهای احاطه‌کننده ct21 و ct184 بود.

به دلیل قابل اطمینان نبودن نقشه پیوستگی تهیه شده و تراکم پایین نشانگرهای به کار رفته در تهیه این نقشه برای ادامه مطالعه از جمعیت‌های BC_2 و BC_2S_1 و بررسی وضعیت نوترکیب‌ها در رابطه با نشانگرهای جدید و نیز تعیین محل احتمالی QTL کنترل‌کننده صفت استفاده شد. برای اجتناب از حذف یا از دست دادن بخش موثر در کنترل مقاومت به بیماری از نشانگر ct136 در فاصله ۷ سانتی مورگانی از نشانگر پایین دست ct184 جهت غربال افراد نوترکیب در این جمعیت‌ها استفاده شد. بر این اساس ۸ فرد نوترکیب BC_2 و ۳۵ فرد نوترکیب BC_2S_1 به دست آمد. با ارزیابی نتایج کاربرد نشانگرهای جدید در این افراد و بررسی وضعیت آللی افراد نوترکیب، همچنین با در نظر گرفتن محل BACهای مورد استفاده برای طراحی آغازگرها و مقایسه نقشه ژنتیکی کروموزوم ۶ ترتیب پیوستگی نشانگرهای جدید به صورت ارائه شده در شکل ۱ پیشنهاد شد.

بر اساس این نتایج برخی از نشانگرهای جدید در پایین دست نشانگر ct184 و دیگر نشانگرها در فاصله بین دو نشانگر غربال کننده قرار گرفتند. نتایج ارزیابی بیماری در جمعیت BC_2 نشان داد افرادی که از نظر تمام نشانگرهای استفاده شده وضعیت آللی

www.SID.ir

جدول ۱- نشانگرهای جدید SCAR و CAPS ایجاد شده

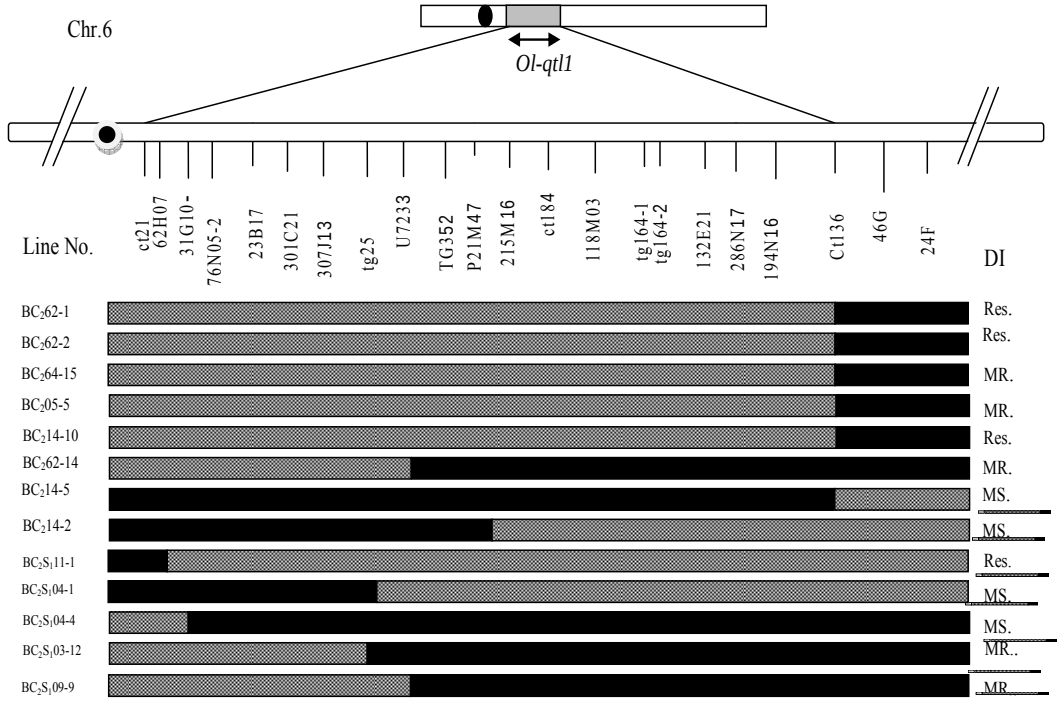
Table 1. New developed sequence characterized amplified region (SCAR) and cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) markers

Name	PCR product size	Original marker type	Restriction enzymes detecting polymorphism	Marker type
17O21-1	900	BAC	-	Dominant SCAR
P307J13-1	1000	BAC	-	Dominant SCAR
123G17	926	BAC	-	Dominant SCAR
17O21-2	850+600	BAC	-	Dominant SCAR
76N05-2	1000	BAC	-	Dominant SCAR
023B17-1	1100	BAC	Hinl II	Dominant CAPS
23B17-2	900	BAC	Dde I	Dominant CAPS
307J13-2	500+800	BAC	Dde I	Dominant CAPS
62H07	853	BAC	DdeI, Alu I	CAPS
286N17	861	BAC	ApoI	CAPS
132E21	850	BAC	HindIII, Dde I	CAPS
46G	900	BAC	AluI	CAPS
118M03	904	BAC	MboI	CAPS
194N16	887	BAC	Alu I, Apo I	CAPS
tg164-1	400	RFLP	Hinf I	CAPS
tg164-2	300	RFLP	Hinf I, Apo I, Hind III	CAPS
24F-2	1400	BAC	Hind II	CAPS
215M16-2	1000	BAC	Alu I	CAPS
tg352-F	350	RFLP	Tsa I	CAPS
TG352	450	RFLP	Tsa I	CAPS
U7233	400	CAPS	HpyCH4IV, Hind II,Dde I,Hinc II	CAPS
301C21-2	1000	BAC	Apo I, Alu I, Dde I	CAPS
57J04-1	1000	BAC	Mn1 I,Rsa I	CAPS
31G10-1	450	BAC	HpyCH IV	CAPS
71M13	600	BAC	Mae I	CAPS
177K	600	BAC	-	SCAR
125P	550	BAC	-	SCAR
116O16-1	1000	BAC	Apo I	CAPS
M047K24-1	1300	BAC	Taa I, Sdu I	CAPS
M47K24-2	1000	BAC	Alu I,Dde I, Apo I, Hinf I	CAPS
72B02	1000	BAC	Mae I	CAPS
302A23-2	1000	BAC	Apo I, Tsa I	CAPS

Archive of SID

هتروزیگوت داشتند پاسخ مقاوم یا نیمه مقاوم به بیماری داشتند (افراد $BC_2$62-1 ، $BC_2$62-2، $BC_2$64-15، $BC_2$05-5 و $BC_2$14-10) در حالی که فرد $BC_2$14-5 که از نظر تمام جایگاه‌های نشانگری هموزیگوت و حاوی آلل‌های والد حساس بود واکنش به بیماری نیمه حساسیت نشان می‌داد. در جمعیت BC_2S_1 نیز فردی که از نظر کلیه نشانگرها وضعیت هتروزیگوت داشت (فرد $BC_2S_1$11-1) واکنش به بیماری مقاومت بروز داد. بنابراین نتایج بررسی این دو جمعیت و تطابق نتایج ارزیابی ژنوتیپی و فنوتیپی وجود بخش کنترل‌کننده مقاومت به بیماری در ناحیه بین دو نشانگر ct21 و ct184 بر اساس یافته های بای و همکاران (Bai *et al.*, 2003) را

www.SID.ir



شکل ۱- شکل گرافیکی ژنوتیپ نوترکیب‌های انتخابی جمعیت‌های BC_2 و BC_2S_1 و شاخص بیماری آن‌ها

Fig. 1. Graphical genotype of the selected recombinants and their disease index (ID) in the BC_2 and BC_2S_1 population

نام نشانگرها در بالای شکل نشان داده شده است. آلل‌های هتروزیگوت به شکل نقطه‌دار و هموزیگوت حساس به رنگ سیاه نشان داده شده‌اند. موقعیت *Ol-qtl1* با فلش نشان داده شده است.

Marker names are indicated at the top of the column. homozygotes of the susceptible allele and heterozygotes, are represented by filled and dotted boxes respectively.The putative location of the *Ol-qtl1* is indicated with arrows

تایید کرد و نشان داد این بخش از کروموزم ناحیه موثر در کنترل کمی مقاومت به بیماری سفیدک پودری است.

از طرف دیگر افرادی که از نظر نشانگرهای بالادست U7233 هتروزیگوت بوده و نشانگرهای پایین آن هموزیگوت حساس بودند (BC_262-14، $BC_2S_1$03-12 و $BC_2S_1$09-9)، واکنش به بیماری نیمه مقاوم داشتند. در حالی که افرادی که در رابطه با نشانگرهای موجود در پایین دست U7233 هتروزیگوت و در بالادست آن هموزیگوت حساس بودند، پاسخ به بیماری نیمه حساسیت نشان دادند (افراد $BC_2$14-2، $BC_2S_1$04-1 و $BC_2S_1$03-4). به این ترتیب و بر اساس یافته‌های حاصل از بررسی دو جمعیت BC_2 و BC_2S_1 نشانگرهای ct21 و U7233 به عنوان نشانگرهای جدید در دو طرف *Ol-qtl1* معرفی می‌شوند. با توجه به موقعیت نشانگر جدید U7233 در فاصله ۳۰ سانتی مورگانی نقشه ژنتیکی کروموزوم ۶ ناحیه هدف برای بررسی‌های بعدی از ۳۰ سانتی مورگان به حدود ۱۵ سانتی مورگان (فاصله بین دو نشانگر جدید) کاهش یافت (شکل ۱). همچنین نشانگرهای

www.SID.ir

جدید معرفی شده در بالادست نشانگر U7233 می‌توانند در بررسی‌های آینده و در برنامه‌های به‌نژادی در رابطه با این سفیدک پودری مورد استفاده قرار گیرند.

نتایج ارزیابی بیماری در افراد نوترکیب جمعیت BC_2 و BC_2S_1 که فاقد QTL های دو و سه، دیگر QTLهای اعطا کننده مقاومت بودند وجود ناحیه موثر در کنترل کمی مقاومت به سفیدک پودری را روی کروموزوم ۶ تایید کرد و به طور واضح نشان داده شد که افراد دارای آلل‌های هموزیگوت والد مقاوم (گیاهان b)، مقاوم بوده و میانگین شاخص بیماری ۰/۵ برای آن‌ها محاسبه شد، گیاهان هتروزیگوت پاسخ بینابینی نشان دادند و گیاهان با آلل‌های هموزیگوت والد حساس، اکثراً حساس بودند (جدول ۲). البته استثنائاتی در این زمینه درگیاهان حاوی ژنوم والد حساس دیده شد. بر اساس نتایج مشاهده شده در بین افراد هموزیگوت حساس (گیاهان a) که فاقد ناحیه QTL مقاومت بودند افرادی با درجات مختلف مقاومت و نیمه مقاومت نیز مشاهده شد. بر اساس این نتایج به نظر می‌رسد علاوه بر QTLهای مورد مطالعه بر روی کروموزوم ۱۲ و ۶، عوامل و ژن‌های کوچک اثر دیگری این بیماری را تحت تاثیر قرار می‌دهند که در حضور QTLهای اصلی اثر آن‌ها قابل مشاهده نیست به طوری که با حذف اثر این نواحی QTL با استفاده از گزینش نشانگری، اثر دیگر فاکتورهای دخیل در بروز و تظاهر مقاومت آشکار می‌شود. به این ترتیب در مطالعات آتی لازم است لاین‌های نزدیک به ایزوژنیک (NILs) برای بررسی دقیق‌تر ناحیه مقاومت و محدود کردن این ناحیه در حد فاکتورهای مندلی ایجاد شده و مورد بررسی تکمیلی قرار گیرند (Brouwer and Clair, 2004).

در تحقیقات مکان‌یابی دقیق با هدف محدود کردن منطقه کنترل‌کننده صفت کمی در حد چند ژن جهت حصول نتایج قابل اطمینان به تعداد مناسبی از افراد نوترکیب نیاز است. در تحقیق حاضر روی جمعیت‌های مختلف F_2، BC_2 و BC_2S_1 بر اساس غربال نشانگری، تعداد محدودی افراد نوترکیب به دست آمد که با توجه به فاصله حدود ۳۵-۳۰ سانتی مورگانی منطقه مورد بررسی، انتظار وقوع تعداد بیشتری نوترکیبی وجود داشت. تعداد کم افراد نوترکیب در این جمعیت‌ها مانع از تهیه نقشه ژنتیکی با استفاده از نرم‌افزارهای مربوطه شد.

عدم وجود تعداد کافی وقایع نوترکیبی در جمعیت‌های اصلاحی گوجه‌فرنگی که از تلاقی بین خویشاوندان وحشی و زراعی به دست آمده‌اند در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (Eshed *et al.*,1997). دلایل مختلفی برای عدم وقوع نوترکیبی کافی می‌تواند پیشنهاد شود. نزدیک بودن منطقه مورد بررسی به سانترومر یکی از این دلایل است. سانترومر در فاصله ۹-۸ سانتی مورگانی نقشه ژنتیکی کروموزوم ۶ قرار دارد و ناحیه مورد مطالعه در این تحقیق فاصلهٔ بین نشانگرهای ct21 در ۱۰ و

www.SID.ir

جدول ۲- وضعیت شاخص بیماری در گیاهان BC_2S_1 حاوی آلل مقاومت (b)، آلل حساسیت (a) و گیاهان هتروزیگوت (h)

Table 2. Disease index in BC_2S_1 individuals of b (resistant), a (susceptible) and h (heterozygote) plants

Disease index	Number of plants		
	b plants	a plants	h plants
R	18	4	8
MR	5	3	9
MS	2	13	4
S	-	24	1

گیاهان b : افراد هموزیگوت حاوی آلل‌های والد مقاوم گیاهان a : افراد هموزیگوت حاوی آلل‌های والد حساس گیاهان h : گیاهان هتروزیگوت ؛ شاخص بیماری : R : گیاه مقاوم؛ MR : گیاه نیمه مقاوم؛ MS : گیاه نیمه حساس؛ S : گیاه حساس.

b plants: Homozygout resistant plants; a plants: Homozygout susceptible plants; h: Heterozygote plants; Disease index: R: Resistant plant; MR: Moderately resistant plant; MS.: Moderately susceptible plant; S: Susceptible plant

ct184 در ۳۸ سانتی مورگانی نقشه ژنتیکی این کروموزوم را در برمی‌گیرد که نزدیکی منطقه مورد بررسی به سانترومر می‌تواند از دلایل عدم تشکیل مقدار کافی افراد نوترکیب باشد. دلیل دوم انتقال ژنتیکی از گونه‌های وحشی به گونه‌های اهلی و عدم وجود هملوژی کافی است (Fulton,*et al.*, 1997). وجود مقدار زیادی فاصله (GAP) در ناحیه هدف و عدم وجود تعداد کافی نشانگر قابل اطمینان و اختصاصی در این بخش از کروموزوم ۶، مطالعه این بخش را با مشکل مواجه کرده است و با وجود مطالعات گسترده توالی یابی بخش بزرگی از کروموزوم ۶ درناحیه زیر سانترومر تعیین توالی نشده است.

بررسی دقیق‌تر نقشه ژنتیکی و فیزیکی کروموزوم ۶ گوجه‌فرنگی نشان داد در ناحیه پایین دست سانترومر نواحی هتروکروماتین و یوکروماتین به صورت متناوب در کنار هم قرار گرفته‌اند. وجود این نواحی به دلیل عدم وجود اطلاعات توالی ژنوم در نواحی یوکروماتین نیز یکی دیگر از موانع ایجاد نشانگرهای جدید و درنتیجه مطالعه در این بخش از ژنوم گوجه‌فرنگی است(Asamizu, 2007). بر اساس نتایج ارزیابی ژنوتیپی افراد نوترکیب، فاصله‌ای در فاصله بین نشانگرهای CAPS 62H07 و 23B17 در نقشه دیده می‌شود که طبق نقشه ژنتیکی فاصله‌ای برابر با ۱۰ سانتی مورگان را در برمی‌گیرد. در این ناحیه به دلیل عدم وجود اطلاعات کافی نشانگری و قرار گرفتن در نزدیکی سانترومر اطلاعات کافی برای نتیجه‌گیری دقیق وجود ندارد.

با توجه به این که محل پیشنهاد شده برای

www.SID.ir

برخی نشانگرها در نقشه ژنتیکی تنکسلی و همکاران (Tanksley *et al.*, 1992) به دلیل استفاده از تعداد محدود فرد در تهیه نقشه ژنتیکی قابل اطمینان نبوده و ممکن است نشانگر ارائه شده مربوط به بخش متفاوتی از ژنوم این گیاه باشد امروزه در جهت کاهش خطاهای حاصل از کاربرد این نشانگرها و اطمینان از تکثیر ناحیه مورد نظر توسط آغازگرهای طراحی شده در برنامه‌های توالی‌یابی ژنومی از مطالعات FISH برای تعیین دقیق محل BAC ها و نشانگرهای مرتبط استفاده می‌شود (Szinay *et al.*, 2008). در مطالعه حاضر نیز برای اطمینان بیشتر از انتخاب نشانگرهای جدید در بازوی بلند کروموزوم ۶ در زیر سانترومر، از ترکیب اطلاعات این دو مطالعه در جهت هر چه دقیق‌تر بودن محل نشانگرهای به دست آمده استفاده شد.

References

Arie, T., Takahashi, H., Kodama, M., and Teraoka, T. 2007. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. Plant Biotechnology 24: 135-147.

Asamizu, E. 2007. Tomato genome sequencing: Deciphering the euchromatin region of the chromosome 8. Plant Biotechnology 24: 5-9.

Bai ,Y., Huang, C. C., Van der Hulst, R., Dekens, F. M., Bonnema, G., and Lindhout, P. 2003. QTLs for tomato powdery mildew resistance (*Oidium lycopersici*) in *Lycopersicon parviflorum* G1.1601 co-localize with two qualitative powdery mildew resistance genes. Molecular Plant-Microbe Interactions 16: 169–176.

Bai,Y., and Lindhout, P. 2007. Domestication and breeding of tomatoes: What have we gained and what can we gain in the future? Annals of Botany 100: 1085-1094.

Bai, Y., Van der Hulst, R., Bonnema, G., Marcel, T.C., Dekens, F.M., Niks, R.E., and Lindhout, P. 2005. Tomato defense to *Oidium neolycopersici*: dominant *Ol* genes confer isolate-dependent resistance via a different mechanism than recessive *ol*-2. Molecular Plant-Microbe Interactions 18: 354–362.

Bai, Y., Van der Hulst, R., Huang, C. C., Wei, L., Stam, P., and Lindhout, P. 2004. Mapping *Ol*-4, a gene conferring resistance to *Oidium neolycopersici* and originating from *Lycopersicon peruvianum* LA2172, requires multi-allelic, single-locus markers. Theoretical and Applied Genetics 109: 1215–1223.

www.SID.ir

Brouwer ,D. J., and Clair, D. A. S. 2004. Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. Theoretical and Applied Genetics 108: 628–638.

Ciccarese, F., Amenduni, M., Schiavone, D., and Cirulli, M. 1998. Occurrence and inheritance of resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersici*) in Lycopersicon species. Plant Pathology 4: 417-419.

DeGiovanni, C., Dell'Orco, P., Bruno, A., Ciccarese, F., Lotti, C., and Ricciardi, L. 2004. Identification of PCR-based markers (RAPD, AFLP) linked to a novel powdery mildew resistance gene (*ol*-2) in tomato. Plant Science 166: 41–48.

Eshed ,Y., Lopez, J., Petiard, V., Uhlig, J., Zamir, D., and Tanksley, S. D. 1997. QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. Theoretical and Applied Genetics 95: 881-894.

Fulton, T. M., Beck-Bunn, T., Emmatty, D., Eshed, Y., Lopez, J., Petiard, V., Uhlig, J., Zamir , D., and Tanksley, S. D. 1997. QTL analysis of an advanced backcross of *Lycopersicon peruvianum* to the cultivated tomato and comparisons with QTLs found in other wild species. Theoretical and Applied Genetics 95: 881-894.

Huang ,C. C., Groot, T., Dekens, F. M., Niks, R. E., and Lindhout, P. 1998. The resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersici*) in Lycopersicon species is mainly associated with hypersensitive response. European Journal of Plant Pathology 104: 399-407.

Huang, C. C., Van de Putte, P. M. H., van der Meer, J. G., Dekens, F. M. and Lindhout, P. 2000. Characterization and mapping of resistance to *Oidium lycopersicum* in two *Lycopersicon hirsutum* accessions: evidence for close linkage of two *Ol*-genes on chromosome 6 of tomato. Heredity 85: 511-520.

Jankovics, T., Bai, Y., Kovács, G. M., Bardin, M., Nicot, P. C., Toyoda, H., Matsuda, Y., Niks, R. E., and Kiss, L. 2008. *Oidium neolycopersici*: intraspecific variability inferred from amplified fragment length polymorphism analysis and relationship with closely related powdery mildew fungi infecting various plant species. Phytopathology 98: 529-540.

Archive of SID

www.SID.ir

Jones ,H., Whipps, J. M., and Gurr, S. J. 2001. The tomato powdery mildew fungus *Oidium neolycopersici*. Molecular Plant Pathology 6: 303–309.

Kiss ,L., Cook, R. T. A., Saenz, G. S., Cunnington, J. H., Takamatsu, S., Pascoe, I., Bardin, M., Nicot, P. C., Sato, Y., and Rossman, A. Y. 2001. Identification of two powdery mildew fungi, *Oidium neolycopersici* sp. and *O. lycopersici*, infecting tomato in different parts of the world. Mycological Research 105: 684-697.

Li, C., Bai, Y., Jacobsen, E., Visser, R., Lindhout, P., and Bonnema, G. 2006. Tomato defense to the powdery mildew fungus: differences in expression of genes in susceptible, monogenic and polygenic resistance responses are mainly in timing. Plant Molecular Biology 62: 127–140.

Lindhout ,P., Pet, G., and van der Beek, H. 1994. Screening wild Lycopersicon species for resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersici*). Euphytica 72: 43-49.

Mieslerova, B., Lebeda, A., and Chetelat, R. T. 2000. Variation in response of wild *Lycopersicon* and *Solanum* spp. against tomato powdery mildew (*Oidium lycopersici*).Journal of Phytopathology 148: 303-311.

Mieslerova, B., Lebeda, A., and Kennedy, R. 2004. Variation in *Oidium neolycopersici* development on host and non-host plant species and their tissue defence responses. Annuals of Applied Biology 144: 237-248.

Nooedeloos, M. E., and Loerakker, W. M. 1989. Studies in plant pathogenic fungi.II.on some powdery mildews (Erysiphales) recently recorded from the Netherlands. Persoonia 14: 51-60.

Oichi, W., Matsuda, Y., Nonomura, T., and Toyoda, H., 2006. Formation of conidial pseudochains by tomato powdery mildew *Oidium neolycopersici*. Plant Disease 90: 915-919.

Pavan, S., Zheng, Z., Borisova, M., Van den Berg, P., De Giovanni, C., Lindhout, P., De Jong, H., Ricciardi, L., Visser. R. G. F., and Bai., Y. 2007. Map- vs. homology-based cloning for the recessive gene *Ol*-2 conferring resistance to tomato powdery mildew. Euphytica 162: 91 - 98.

Stam, P. 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. The Plant Journal 3: 739–744.

Archive of SID

www.SID.ir

Steward, C. N., and Via, L. E. 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. Biotechniques 14: 748-750.

Szinay, D., Chang, S. B., Khrustaleva, L., Peters, S., Schijlen, E., Bai, Y., Stiekema, W. J., van Ham, R. C. H., De Jong, H., and Lankhorst, R. M. K. 2008. High-resolution chromosome mapping of BACs FISH as a backbone for sequencing tomato chromosome 6. The Plant Journal 56: 627-637.

Tanksley, S. D., Ganal, M. W., Prince, J. P., de Vicente, M. C., Bonierbale, M. W., Broun, P., Fulton, T. M., Giovannoni, J. J., Grandillo, S., Martin, G. B., Messeguer, R., Miller, J. C., Miller, L., Paterson, A. H., Pineda, O., Roder, S., Wing, R. A., Wu, W., and Young, N. D. 1992. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. Genetics 132: 1141–1160.

Van der Beek, J., Pet, G. G., and Lindhout, P. 1994. Resistance to powdery mildew *(Oidium lycopersici)* in *Lycopersicon hirsutum* is controlled by an incompletely-dominant gene *0l*-1 on chromosome 6.Theoretical and Applied Genetics 89: 467-473.

Van Ooijen, J., Boer, M. P., Jansen, R. C., and Maliepaard, C. 1999. MapQTL version 4.0: Software for the calculation of QTL positions on genetic maps. CPRO-DLO, Wageningen, The Netherlands.

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir