ژنتیک نوین
دوره دوازدهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۶
صفحه ۳۵۶ - ۳۴۷

گزینش به کمک نشانگر SCAR برای تولید ارقام مقاوم به فوزاریوم (*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*) در طالبی

Marker assisted selection using SCAR to develop Fusarium (*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*) resistant melon

شیما تقی‌خانی[۱]، حسین رامشینی*[۱]، سیداحمد سادات‌نوری[۱]، محمود لطفی[۲]، علی ایزدی‌دربندی[۱]، محمدرضا نقدی[۲]

۱- به‌ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار، استاد، دانشیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

۲- به‌ترتیب دانشیار، دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران

Taghikhani Sh[1], Ramshini H[*1], Sadat Noori SA[1], Lotfi M[2], Izadi Darbandi A[1], Naghdi MR[2]

1- Graduate MSc Student, Associate Professor, Professor, Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, Agricultural College of Aburaihan, University of Tehran

2- Associate Professor, Graduate MSc Student , Department of Horticulture, Agricultural College of Aburaihan, University of Tehran, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: ramshini_h@ut.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۹۶/۲/۵ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۵/۱۷)

چکیده

طالبی محصول مهمی است که به‌صورت گسترده در کشورهای مناطق معتدله رشد می‌کند. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه پژمردگی آوندی ناشی از *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) است. این قارچ سبب ضرر و زیان‌های مهم عملکردی و کاهش کیفیت میوه در طالبی در سراسر جهان می‌شود. اصلاح ژنتیکی گیاه مؤثرترین راه برای کنترل این بیماری است. تاکنون برای این قارچ چهار نژاد صفر، ۱، ۲ و ۱/۲ گزارش شده‌است که نژاد ۱ از نظر اقتصادی ضررهای زیادی در کشور به‌ویژه در نیمه شمالی وارد می‌کند. ارقام محلی مهم از جمله ساوه، ریش بابا و تیل طرق به‌نژاد ۱ حساس هستند. در این مطالعه ژن مقاومت از یک رقم خارجی به‌نام ایزابل به ارقام حساس یاده شده با کمک گزینش به کمک نشانگر انتقال داده شد. غربال گیاهان در نسل اول و دوم تلاقی برگشتی با روش مایه زنی گیاه‌چه‌ها انجام گرفت. تک ژن غالب *Fom-2* باعث ایجاد مقاومت در برابر نژاد صفر و ۱ می‌شود. این ژن توالی‌یابی شده و تفاوت‌های موجود در توالی آل‌های مقاوم و حساس شناسایی شده‌است. به‌منظور تایید گیاهان مقاوم در نسل دوم تلاقی برگشتی پس از غربال با روش مایه زنی، از نشانگر SCAR مبتنی بر تفاوت توالی استفاده شد. مقاومت بیش‌تر گیاهان حاصل از غربال با روش مایه‌زنی با روش مولکولی نیز تایید شد اگر چه تعدادی گیاه حساس شناسایی شدند که بیانگر نقص در روش مایه‌زنی و اعتبار بیش‌تر روش مولکولی در تعیین ژنوتیپ گیاهان بود. گیاهان تایید شده برای تولید نسل BC_3F_1 با سه والد تکراری تلاقی برگشتی داده شدند. با توجه به عملکرد و کیفیت والد بخشنده و نتایج ارزیابی نسل BC_2F_1 به‌نظر می‌رسد با خودگشنی گیاهان BC_3F_1 بتوان ارقام خالص مقاوم را معرفی کرد.

واژه‌های کلیدی

پژمردگی آوندی
تلاقی برگشتی
رقم ایزابل
ژن مقاومت *Fom-2*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.3.7]

مقدمه

طالبی (*Cucumis melo* L.) به خانواده کدوئیان تعلق دارد. این خانواده شامل گیاهان مهم دیگری مانند خیار، هندوانه و کدو است. این گونه دارای انواع مختلفی است که طالبی متعلق به گروه Cantalupensis است (Prohens and Nuez 2007). این گیاه یک محصول مهم باغبانی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است، اما به‌صورت گسترده در کشورهای مناطق معتدله نیز رشد می‌کند (Oumouloud et al. 2013). به گزارش فائو ایران با تولید حدود یک و نیم میلیون تن در سال ۲۰۱۳ پس از چین و ترکیه سومین تولیدکننده انواع طالبی و خربزه در جهان بوده است (FAO 2013).

یکی از جدی‌ترین و مهم‌ترین بیماری‌هایی که باعث بروز خسارت در این محصول می‌شود، پژمردگی آوندی است. عامل این بیماری یک قارچ خاک‌زی به‌نام *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) است (Oumouloud et al. 2012). بر اساس بیماری‌زایی روی ارقام افتراقی طالبی، این قارچ به چهار نژاد صفر، ۱، ۲ و ۱/۲ طبقه‌بندی شده‌است (Tezuka et al. 2011) که نژاد ۱ از نظر اقتصادی ضررهای زیادی در کشور ایران وارد می‌کند (Madadkhah et al. 2012). عامل این بیماری روی بقایای محصولات غیرمیزبان و ریشه گیاهانی که در تناوب قرار می‌گیرند زنده می‌ماند و یا به‌صورت کلامیدوسپور برای چند دهه دوام می‌آورد (Tezuka et al. 2011). برای کنترل این بیماری می‌توان از روش‌های گوناگونی مانند از بین بردن بقایای گیاهی حامل قارچ، تناوب با گیاهان غیرمیزبان مانند گندم و جو، ضدعفونی کردن بذر و بستر آن، به کارگیری ترکیبات بیولوژیک داخل خاک علیه این قارچ و روش‌های طبیعی مانند آفتاب‌دهی خاک‌ها در تابستان استفاده کرد. هم‌چنین تقویت گیاه با استفاده از کودهای مناسب، مراقبت‌های زراعی و آبیاری به موقع می‌تواند تا حدی موثر باشد. کاربرد سموم شیمیایی نیز در کنترل این بیماری مؤثر است، اما به‌علت سرطان‌زایی، ممنوع شده‌اند. بنابراین در حال حاضر کارآمدترین و مؤثرترین روش ایجاد مقاومت در برابر پژمردگی آوندی، استفاده از ژن‌های مقاومت می‌باشد (Tezuka et al. 2009). تک ژن‌های غالب *Fom-1* و *Fom-2* به‌ترتیب باعث ایجاد مقاومت در برابر نژادهای صفر و ۲ و نژادهای صفر و ۱ می‌شوند (Yi-HongWang et al. 2000). از بین دو نژاد ۱ و ۲، نژاد ۱ گسترش بیش‌تری در ایران به‌ویژه در استان‌های نیمه شمالی کشور دارند و خسارت این نژاد به محصول نیز بیشتر از نژاد ۲ است (Banihashemi 2010). تک ژن غالب *Fom-2* باعث ایجاد مقاومت در برابر نژاد صفر و ۱ می‌شود که با وجود نشانگر مولکولی مرتبط با این ژن می‌توان در برنامه اصلاحی "تلاقی برگشتی به کمک نشانگر" برای اصلاح ارقام به‌منظور مقاومت به این نژاد استفاده کرد. ژن *Fom-2* پس از نقشه‌یابی در سال ۲۰۰٤ توالی‌یابی شد که با شماره دسترسی DQ287965 در پایگاه اطلاعاتی داده‌های زیست‌فناوری (NCBI) توالی آن را می‌توان مشاهده کرد (Joobeur et al. 2004). از آن پس بر اساس توالی این ژن نشانگرهای مبتنی بر توالی[1] طراحی و استفاده شده‌اند که می‌توان از آن‌ها در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد (Oumouloud et al. 2012). در این روش برای شناسایی گیاهان مقاوم و حساس استفاده از عامل بیماری‌زا برای غربال گیاهان ضرورتی ندارد و با توجه به ژنوتیپ نشانگری می‌توان ژنوتیپ گیاه برای مکان ژنی مقاومت را تعیین کرد.

تاکنون از روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگر برای اصلاح بسیاری از گیاهان برای مقاومت به تنش‌های زیستی استفاده شده است. بیماری کوتولگی زرد جو توسط ویروس BYDV ایجاد می‌شود. ژن مقاومت به این بیماری از واریته Franklin به واریته Sloop توسط روش اصلاحی تلاقی برگشتی به کمک نشانگر طی دو نسل تلاقی برگشتی و یک نسل خودگشنی انتقال داده شد (Jefferies et al. 2003). کپک سیاه حاصل از قارچ *Alternaria alternate*، یک بیماری عمده گوجه‌های رسیده در حال فرآوری است. پنج QTL با استفاده از گزینش به کمک نشانگر از *Alternaria alternata* به گوجه‌فرنگی زراعی منتقل شدند. RFLP و نشانگرهای مبتنی بر PCR پیرامون و درون نواحی کروموزومی حاوی QTLها، برای گزینش به کمک نشانگر در طی نسل‌های تلاقی برگشتی و خودگشنی استفاده شدند (Foolad et al. 2012). روش اصلاحی تلاقی برگشتی به کمک نشانگر برای بهبود مقاومت لاین HN189 به پژمردگی باکتریایی در برنج موفق

[1] Sequence characterized amplified region

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.3.7]

گزارش شده‌است. دو لاین بهبودیافته HB145 (با یک نسل تلاقی برگشتی) و HB146 (با دو نسل تلاقی برگشتی) به‌دست آمد که مقاومت به پژمردگی باکتریایی پیدا کردند (Zhijuan et al. 2014). پژمردگی ورتیسیلیومی در بادمجان (*Solanum melongena*) توسط *Verticillium dahlia* که یک قارچ خاکزی است ایجاد می‌شود. نمونه جمع‌آوری شده P1388846 از گونه‌های وحشی *S.linnaenum* به این قارچ مقاومت نشان داده است. ورود ژن مقاومت به بادمجان توسط روش اصلاحی تلاقی برگشتی به کمک نشانگر انجام شد. نتایج نشان داد که انتقال ژن مقاومت به ورتیسیلیوم به بادمجان موفقیت‌آمیز بوده است. علاوه بر این یک نشانگر مخصوص که با ژن مقاومت موجود در P1388846 پیوسته بود برای ردیابی این ژن در جمعیت‌های تلاقی برگشتی مورد استفاده قرار گرفت (Liu et al. 2014).

اگر چه بیماری فوزاریوم در ایران در مناطق کشت این گیاه خسارت زیادی به بار می‌آورد ولی متاسفانه با وجود حساس بودن بسیاری از ارقام مهم، هیچ اقدامی در خصوص اصلاح ژنتیکی آن‌ها انجام نشده است. ارقام ساوه، ریش بابا و تیل طرق سه رقم مهم طالبی در ایران هستند. رقم ساوه در زمین‌های واقع در اطراف شهر ساوه در استان مرکزی کشت می‌شود. از طرفی رقم ریش بابا یک رقم معروف طالبی در شهر کاشان است و رقم تیل طرق نیز در خراسان کشت می‌شود. این سه رقم به نژاد یک این بیماری حساس هستند (Madadkhah et al. 2012). هدف از این تحقیق انتقال مقاومت از رقم مقاوم فرانسوی به‌نام ایزابل (به‌عنوان والد بخشنده) به ارقام حساس داخلی ساوه، ریش بابا و تیل طرق (به عنوان ارقام تکراری) با روش تلاقی برگشتی بود. در این تحقیق علاوه بر به‌کارگیری روش تلاقی برگشتی کلاسیک، از گزینش به کمک نشانگر نیز برای تایید گیاهان مقاوم و اثبات کارآمدی نشانگر در شناسایی گیاهان مقاوم و حساس استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از چهار رقم طالبی استفاده شد. رقم ایزابل یک رقم فرانسوی و مقاوم به نژاد یک بیماری فوزاریوم *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) است و ارقام ایرانی ساوه، ریش بابا و تیل طرق که هر سه به این نژاد حساس هستند. اگر چه در منابع گوناگون مقاومت و حساسیت این ارقام بررسی شده بود (Wang et al. 2000; Madadkhah et al. 2012)، در این تحقیق برای اطمینان از وضعیت آن‌ها آزمون آلوده‌سازی انجام گرفت و مقاومت و حساسیت آن‌ها تایید شد.

برای آلوده سازی ارقام مذکور با اسپور قارچ از روش فرو بردن ریشه در سوسپانسیون کنیدیوم به‌میزان 10^6 اسپور در میلی‌لیتر استفاده شد (Banihashemi 2010). به‌طورخلاصه مایه قارچ در محیط PDA (Potato Dexteose Agar) آماده‌سازی شد. سپس سوسپانسیون کنیدیوم‌ها تهیه شده و تعداد کنیدیوم در میلی‌لیتر تنظیم شد. بذرها پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت چهار دقیقه در سه مرحله با آب‌مقطر سترون شستشو و سپس در مخلوط کوکوپیت و پرلیت اتوکلاو شده (۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت ۱۵ دقیقه در دو روز متوالی) به نسبت ۱:۱ کاشته و پس از هفت روز گیاهچه‌ها از بستر مورد نظر بیرون آورده و ریشه‌ها با آب‌مقطر سترون به‌طور کامل شسته شدند. ریشه‌ها به مدت یک دقیقه در سوسپانسیون اسپور قرار گرفتند. ریشه‌های گیاهچه‌های شاهد نیز در آب‌مقطر سترون قرار گرفتند. سپس گیاهچه‌ها در گلدان‌هایی به قطر ۱۳ سانتی‌متر حاوی پیت ماس و ماسه بادی اتوکلاو شده (با نسبت ۲:۱) کشت شدند. گلدان‌ها در دمای ۲۰–۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس گیاهان هر روزه بررسی شده و گیاهانی که در مدت ۷–۵ روز نخست به علت شوک نشا از بین رفتند حذف شدند. از روز هفتم علائم ایجاد شده روی گیاهچه‌ها شامل زردی و پژمردگی ساقه یادداشت شد. یک هفته پس از آلوده‌سازی آثار بیماری در گیاهان حساس کم کم آشکار شد. دو هفته پس از آلودگی گیاهان حساس کاملا زرد شدند. پس از سه هفته گیاهان حساس کاملا از بین رفتند. به این ترتیب گیاهان حساس و مقاوم شناسایی شدند. تعدادی از گیاهچه‌های دارای علایم برای بررسی علت ظهور این علایم، انتخاب و در محیط PDA کشت شدند و به این ترتیب عامل بیماری دوباره از این گیاهان جداسازی شد.

در این آزمایش نخست تلاقی بین رقم مقاوم (ایزابل با ژنوتیپ *Fom-2/Fom-2*) با ارقام حساس (ساوه، ریش بابا و تیل طرق با ژنوتیپ *fom-2/fom-2*) انجام شد. از آنجاکه ارقام ایرانی ساوه،

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.3.7]

ریش بابا و تیل طرق ارقام ناهمگن هستند و با وجود یکنواختی بالا در رسیدگی و شکل میوه، از نظر ژنتیکی به‌طور کامل خالص نیستند از هر رقم ۱۵ گیاه برای تلاقی با والد بخشنده انتخاب شد. سپس گیاهان F_1 (با ژنوتیپ *Fom-2/fom-2*) با والدین حساس (ارقام تکراری) تلاقی برگشتی داده شدند تا نسل BC_1F_1 تولید شود. به این ترتیب برای هر والد تکراری تعداد ۱۵ خانواده تلاقی برگشتی تولید شد. با توجه به تک ژن بودن مقاومت و بر اساس توارث مندلی انتظار این است که در هر خانواده نیمی از گیاهان مقاوم و نیمی حساس باشند. این نسل با روش آلوده‌سازی غربال شد. به این ترتیب که نخست با روش آلوده‌سازی گیاهان مقاوم هتروزیگوت (*Fom-2/fom-2*) از گیاهان حساس (*fom-2/fom-2*) جدا شدند. در این مرحله برای هر خانواده از ۱۲ گیاه استفاده شد. به طوری‌که ۲ گیاه به‌عنوان شاهد آلوده‌سازی نشدند و ۱۰ گیاه بعدی آلوده‌سازی شدند. در هر گلدان چهار گیاه کشت شد. گیاهان مقاوم تایید شده به مزرعه منتقل شده و در فصل گلدهی برای تولید نسل BC_2F_1 با والدین تکراری تلاقی برگشتی داده شدند. در نسل BC_2F_1 نیز به همین ترتیب عمل شد و گیاهان مقاوم با روش آلوده‌سازی مصنوعی شناسایی شدند. سپس برای تایید گیاهان مقاوم با روش مولکولی، از گیاهان مقاوم DNA استخراج شده و ژنوتیپ این گیاهان با نشانگر SCAR تعیین شد. گیاهان مقاوم برای تولید نسل BC_3F_1 (تلاقی برگشتی سوم) دوباره کشت شدند.

به‌منظور تعیین ژنوتیپ گیاهان با نشانگر SCAR، از تمام گیاهان والدی و نسل BC_2F_1 در مرحله ۳-۲ برگی نمونه‌برداری انجام شد. استخراج DNA از تمام نمونه‌ها با استفاده از روش CTAB[1] صورت گرفت (Murray and Thompson 1980). به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از دستگاه اسپکتروفوتومتری استفاده شد. با توجه به توالی آلل مقاوم و حساس ژن *Fom-2* (Joobeur et al. 2004; Oumouloud et al. 2012) و با کمک نرم‌افزار Primer3 دو جفت آغازگر طراحی شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با دو جفت آغازگر به‌صورت چندگانه[2] انجام شد. با آغازگرهای $Fom2\text{-}R_{409}$ تکثیر آلل غالب با طول ۴۰۹ جفت‌باز و با جفت آغازگر $Fom2\text{-}S_{253}$ آلل حساس با طول ۲۵۳ جفت‌باز تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسیکلر (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Applied biosystems) انجام شد. هر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر از PCR Mastermix با غلظت ۱/۵ میلی‌مولار $MgCl_2$، ۰/۶ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ میکرومولار، یک میکرولیتر از DNA ژنومی (با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر) و ۹/۱ میکرولیتر آب‌مقطر بود. هم‌چنین برنامه انجام مراحل PCR به این ترتیب انجام شد: مرحله اول در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (واسرشت سازی اولیه) انجام شد. مرحله دوم شامل دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه به تعداد ۳۵ چرخه تکرار شد. به‌منظور تکثیر تکمیلی قطعات ناقص، مرحله پایانی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت.

[1] Cetyltrimethyl Ammonium Bromide
[2] Multiplex PCR

جدول ۱- توالی آغازگرهای به کار گرفته شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز چندگانه به‌همراه دمای اتصال. آغازگرهای به کار گرفته شده عبارت بودند از $Fom2\text{-}R_{409}$ و $Fom2\text{-}S_{253}$ که به‌ترتیب آلل مقاوم (با طول ۴۰۹ جفت‌باز) و آلل حساس (با طول ۲۵۳ جفت‌باز) را تکثیر می‌کنند.

نام آغازگر	توالی (۳′ → ۵′)	دمای اتصال (T_m) به درجه سانتی‌گراد
$Fom2\text{-}R_{409}$	GAGAAATTTGCAATGGGTGG TTACACTATTATTGCTCAACTTAC	۶۱
$Fom2\text{-}S_{253}$	GACTTTACAGAAAGGCGTTTA ATTGCTCTAAGTTGATCATATTCTG	۶۰

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.3.7]



شکل ۱- تصویر گیاه مقاوم در سمت راست (ایزابل) و حساس در سمت چپ (ریش بابا) پس از سه هفته آلوده‌سازی با نژاد یک عامل بیماری‌زای فوزاریوم (*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*).



شکل ۲- نتیجه غربال گیاهان نسل BC_1F_1 برای خانواده شماره ۱۰ از رقم ریش بابا. گیاهان موجود دراین دو گلدان آلوده شده‌اند. ولی به دلیل اینکه در خانواده BC_1F_1 دو گروه گیاه مقاوم و حساس (به‌ترتیب *Fom-2/fom-2* و *fom-2/fom-2*) وجود دارد برخی گیاهان مقاوم بوده و سالم هستند در حالی که برخی گیاهان حساس بوده و دو هفته پس از آلوده‌سازی کاملا از بین رفته‌اند.

در پایان از هر محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۵ میکرولیتر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد آماده‌سازی شده در بافر TAE یک درصد الکتروفورز شده، سپس با اتیدیوم بروماید ۰/۵ µg/ml به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد و در نهایت طبق تصاویر گرفته شده زیر نور UV، آنالیز نشانگری برای تعیین مقاوم یا حساس بودن ژنوتیپ موردنظر طبق باند حاصل از PCR انجام شد.

از آنجاکه هدف از تلاقی برگشتی اصلاح والد تکراری است بنابراین گیاهانی باید در نسل‌های تلاقی برگشتی گزینش شوند که بیش‌ترین شباهت را به والد تکراری داشته باشند. برای این منظور صفات مرتبط با میوه از جمله طول و عرض میوه و ضخامت گوشت در گیاهان نسل BC_2F_1 و گیاهان والدی اندازه‌گیری شد. هم‌چنین میزان مواد جامد محلول با دستگاه رفرکتومتر اندازه گیری شد.

نتایج

شکل ۱ گیاهان مقاوم و حساس را سه هفته پس از آلوده‌سازی نشان می‌دهد. این شکل تصویر دو رقم ایزابل و ریش بابا را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشخص است رقم ایزابل با وجود آلوده سازی کاملا سالم است در حالی‌که گیاهان رقم ریش بابا کاملا از بین رفته‌اند.

شکل ۲ واکنش گیاهان BC_1F_1 را به عامل بیماری‌زا نشان می‌دهد. با توجه به اینکه در هر گلدان تعداد چهار نشا کشت شده بود طبق وراثت مندلی این احتمال وجود دارد که در یک گلدان

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.3.7]

گیاهان حساس و مقاوم وجود داشته باشند. در واقع در شکل ۲ این نکته به‌صورت آشکار مشخص شده‌است. در این تصویر در یک گلدان یک گیاه سالم باقی مانده در حالی که بقیه گیاهان از بین رفته‌اند. بنابراین گیاه سالم دارای ژنوتیپ *Fom-2/fom-2* و گیاهان حساس از بین رفته دارای ژنوتیپ *fom-2/fom-2* هستند. آزمون مربع کای برای نسبت گیاهان مقاوم و حساس برای هر دو رقم در نسل BC_1F_1 و BC_2F_1 انجام گرفت. در هر دو نسل نسبت گیاهان مقاوم و حساس (*Fom-2/fom-2* و *fom-2/fom-2*) در هر سه رقم انحراف معنی‌داری با نسبت مندلی ۱:۱ نشان نداد (جدول ۲).

برای شناسایی گیاهان مقاوم و حساس در نسل BC_2F_1 نیز همانند نسل اول تلاقی برگشتی آزمایش آلوده‌سازی انجام شد. در این نسل نیز نسبت ۱:۱ به دست آمد. گیاهان مقاوم به دست آمده از این مرحله با روش مولکولی نیز غربال شدند. گیاهان مقاوم تایید شده به مزرعه منتقل شده و هنگام رسیدگی صفات گوناگون اندازه‌گیری شد. در این نسل مقایسه بین خانواده‌های BC_2F_1 با گیاهان والدی (والد تکراری) انجام گرفت. نتایج نشان داد برای بیشتر صفات تفاوت معنی‌داری بین خانواده‌های BC_2F_1 و والد تکراری وجود نداشت. تنها در دو مورد تفاوت معنی‌دار دیده شد (جدول ۳)

باتوجه به توالی کامل ژن *Fom-2* و تفاوت‌های موجود بین آلل مقاوم و حساس آغازگرهایی که بتوانند به‌صورت ویژه آلل مقاوم و حساس را تکثیر کنند طراحی شد. انتظار این بود که آغازگر $Fom2\text{-}R_{409}$ و $Fom2\text{-}S_{253}$ قطعاتی با طول ۴۰۹ و ۲۵۳ جفت بازی را تکثیر کنند. طول قطعات تکثیر شده طبق همین پیش‌بینی به‌دست آمد. تصویر الکتروفورز محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در شکل ۳ نمایش داده شده‌است. در گیاه مقاوم ایزابل قطعه‌ای با طول ۴۰۹ جفت‌بازی تکثیر شده‌است. با توجه به اینکه در هر واکنش PCR هر دو جفت آغازگر حضور داشته‌اند بنابراین ژنوتیپ رقم ایزابل به‌صورت *Fom-2/Fom-2* بوده است. به همین ترتیب در رقم حساس ریش بابا یک قطعه با طول ۲۵۳ جفت‌باز تکثیر شده‌است. بنابراین ژنوتیپ این گیاه به‌صورت *fom-2/fom-2* است. بقیه چاهک‌های ژل نمایش داده شده در شکل ۳ مربوط به گیاهان خانواده BC_2F_1 است. از آنجاکه نخست با کمک آلوده سازی مصنوعی گیاهان حساس حذف شده بودند و تنها از گیاهان مقاوم برای تعیین ژنوتیپ، DNA استخراج شده بود انتظار این بود که گیاهان باقی مانده که مقاوم بودند طبق توارث مندلی به‌صورت *Fom-2/fom-2* باشند. طبق همین پیش‌بینی بسیاری از گیاهان غربال شده نسل BC_2F_1 دارای دو باند تکثیر شده بودند (۴۰۹ و ۲۵۳ جفت‌باز). بنابراین ژنوتیپ این گیاهان به‌صورت *Fom-2/fom-2* تایید شد. البته طبق محاسبه انجام شده از تعداد ۱۳۰ گیاه غربال شده در نسل BC_2F_1 تعداد ۱۲ گیاه دارای ژنوتیپ حساس بودند. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای این ۱۲ گیاه دوباره تکرار شد که همان نتیجه به‌دست آمد. بنابراین گیاهان حساسی که به‌دلیل خطا در آلوده‌سازی مصنوعی حساسیت خود را نشان نداده بودند در این مرحله شناسایی و از ادامه برنامه اصلاحی حذف شدند.

بحث

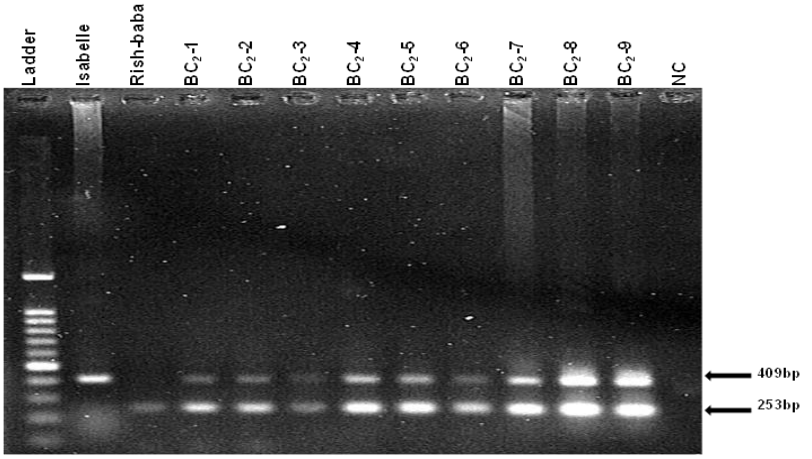
یکی از عوامل بیماری‌زای خطرناک در خربزه و طالبی قارچ خاکزی *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) است که باعث ایجاد بیماری پژمردگی آوندی می‌شود (Oumouloud et al. 2012). عامل این بیماری در خاک باقی مانده و تولید کلامیدیوسپور با دوام و پایدار می‌کند (Tezuka et al. 2011). یکی از روش‌های مناسب کنترل این عامل بیماری زا، استفاده از ارقام مقاوم و به طور کلی استفاده از ژرم‌پلاسم مقاومت می‌باشد. در این آزمایش درمرحله غربال گیاهان نسل BC_1F_1 و BC_2F_1 برای مقاومت به بیماری گیاهانی که آلوده‌سازی شدند یا به‌طور کامل مقاوم بودند و یا پس از سه هفته کاملا از بین رفتند. در این مدت گیاهانی که مقاومت کمی از خود نشان دهند دیده نشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد ژن‌های کوچک اثر یا تغییر دهنده نقش چندانی در کم یا زیاد کردن مقاومت به بیماری ندارند و مقاومت به‌طور کامل عمودی بوده و توسط یک ژن کنترل می‌شود. مشاهده نسبت ۱:۱ در نسل‌های یاد شده از نظر گیاهان مقاوم و حساس نیز تک ژن بودن این صفت را تایید می‌کند (جدول ۲).

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.3.7]

جدول ۲- تعداد خانواده‌ها و گیاهان غربال شده در نسل BC_1F_1 با روش مایه‌زنی. نسبت ۱:۱ برای گیاهان مقاوم و حساس در هر رقم به‌دست آمد.

ژنوتیپ	تعداد خانواده غربال BC_1F_1 شده	تعداد کل گیاهان ارزیابی شده	تعداد مقاوم	تعداد حساس	برای انحراف از نسبت ۱:۱ X^2 آماره
تیل طرق	۱۳	۱۳۰	۵۲	٦٤	$۱/۲^{ns}$
ریش بابا	۱۵	۱۵۰	٦٥	۷۳	$۰/۵^{ns}$
ساوه	۱۵	۱۵۰	۷۳	٦٦	$۰/۳۵^{ns}$



شکل ۳- غربال گیاهان نسل BC_2F_1 که با روش مایه‌زنی مقاوم تشخیص داده شده بودند با نشانگر SCAR. قطعه تکثیر شده با طول ٤۰۹ جفت‌بازی مربوط به آلل مقاوم و قطعه تکثیر شده با طول ۲۵۳ جفت‌بازی مربوط به آلل حساس است. از نمونه‌های DNA ایزابل و ریش بابا به‌عنوان شاهد مقاوم و حساس برای PCR استفاده شد. در این شکل تعداد ۹ گیاه نسل BC_2F_1 نمایش داده شده که همگی هتروزیگوت مقاوم هستند. NC: شاهد منفی است که در آن DNA در واکنش PCR وجود ندارد.

در مورد مقاومت‌های تک ژنی همواره این نگرانی وجود دارد که ممکن است به‌دلیل آشکار شدن نژادهای جدید، مقاومت به این بیماری شکسته شود. با این وجود اگر چه از این ژن سال‌ها برای اصلاح این گیاه برای مقاومت به فوزاریوم استفاده شده‌است، تاکنون گزارشی از شکسته شدن مقاومت دیده نشده است و تعداد نژادهای این بیمای هم‌چنان عبارتند از نژادهای صفر، ۱، ۲ و ۱/۲ (Zheng et al. 1999; Oumouloud et al. 2008; Wang et al. 2011; lvarez 2012; Oumouloud et al. 2013).

توالی DNA رمزگردان ژن *Fom-2* طولی برابر ۳۳۰۷ جفت‌باز دارد که پروتینی با طول ۱۰۷۳ جفت‌باز را رمز می‌کند. این ژن پروتئین R از نوع NBS-LRR رارمز می کند (Joobeur et al. 2004). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که تفاوت توالی بین آلل مقاوم و حساس بسیار زیاد است به طوری‌که بین نوکلوتید ۱۵۷۷ تا ۳۲۲۱ در انتهای ′۳ این ژن بیش از ۲۸ تفاوت نوکلوتیدی بین آلل مقاوم و حساس گزارش شده‌است (Oumouloud et al. 2012).

در PCR چند گانه نزدیک بودن دمای اتصال آغازگرها و عدم تشکیل جفتی‌های آغازگر[1] از اهمیت بالایی برخوردار است. بهینه‌سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در این آزمایش با صرف وقت زیاد و تغییر دادن دما و مقدار DNA به‌دست آمد. در حین آزمایش مشاهده شد با کم کردن دمای اتصال به میزان دو درجه، یک باند غیر اختصاصی با طول حدود ۵۱۰ جفت‌باز تکثیر می‌شد. برای اینکه مشخص شود این باند توسط کدام جفت آغازگر تکثیر می‌شود PCRهای جداگانه با هر کدام از جفت آغازگرها در دمای پایین‌تر (۵۹ درجه سانتی‌گراد) انجام گرفت. در واکنشی که $Fom2\text{-}S_{253}$ قرار داشت قطعه ۵۱۰ جفت‌بازی تکثیر نشد ولی زمانی که از آغازگرهای $Fom2\text{-}R_{409}$ استفاده شد این قطعه تکثیر شد. بنابراین این نتیجه نشان داد که این قطعه توسط آغازگرهای $Fom2\text{-}R_{409}$ تولید شده‌است. همچنین در صورتی‌که تیوب‌های آماده برای انجام واکنش PCR برای مدتی روی یخ (دمای ٤

[1] Primer dimer

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.3.7]

درجه) نباشند به‌دلیل اتصال غیر اختصاصی گاهی این قطعه تولید می‌شد، هر چند تولید این قطعه تغییری در نتیجه‌گیری نهایی برای تعیین مقاومت یا حساسیت نمی‌کرد. زیرا با وجود قطعه ٤٠٩ جفت‌بازی گیاه مورد نظر مقاومت به بیماری را دارا بود.

یکی از ایرادهای روش گزینش به کمک نشانگر این است که ممکن است در حین میوز، پیوستگی بین ژن و نشانگر به‌دلیل وقوع کراسینگ اور بشکند و گیاهان حساس به جای مقاوم گزینش شوند. در مورد تحقیق حاضر این مشکل وجود ندارد زیرا نشانگر به‌کار گرفته شده یک نشانگر کارکردی است، به این معنی که از توالی خود ژن مقاومت به‌دست آمده است. این نشانگرها در به‌نژادی گیاهی و جانوری کاربرد زیادی دارند. کارآمدی این نشانگرها در تحقیقات گوناگون اثبات شده‌است (Hayashi et al. 2006; Li et al. 2009; Whitaker et al. 2010). اگر چه آلوده سازی مصنوعی با دقت بالا انجام گرفت اما غربال گیاهان مقاوم با نشانگر SCAR وجود تعدادی گیاه حساس را در بین گیاهان گزینش شده آشکار کرد. این نتیجه نشان می‌دهد کارآیی نشانگرهای مولکولی برای شناسایی گیاهان مقاوم بهتر از روش آلوده سازی مصنوعی است. به این مزیت می‌توان این نکته را نیز افزود که با به‌کارگیری نشانگرهای مولکولی در وقت و هزینه صرفه جویی قابل توجهی می‌شود.

اگرچه برای بازیابی ژنوم والد تکراری به حدود ٥ تا ٦ تلاقی برگشتی نیاز است اما در نسل تولید شده در تحقیق حاضر یعنی BC_3F_1 به‌طور متوسط ٩٣/٧٥ درصد از ژنوم مربوط به والد تکراری هستند. با توجه به اینکه رقم ایزابل خود یک لینه اصلاح شده‌است و از نظر بسیاری از صفات از مطلوبیت بالایی برخودار است به‌نظر می‌رسد انجام تلاقی برگشتی چهارم نیاز نیست. بنابراین با غربال گیاهان در این نسل و شناسایی گیاهان *Fom-2/fom-2* و سپس خودگشنی این گیاهان می‌توان فرزندان *Fom-2/Fom-2* را شناسایی کرده و سه رقم جدید ریش بابا، ساوه و تیل طرق که مقاوم به این نژاد هستند را معرفی کرد. نتیجه به‌دست آمده از ارزیابی صفات میوه در نسل BC_2F_1 نیز نشان داد گیاهان این نسل از نظر صفات مهم خیلی به نسل والدین نزدیک شده اند و تنها یک نسل دیگر تلاقی برگشتی کافی به نظر می‌رسد. در تحقیقاتی که در مورد دیگر گیاهان انجام شده‌است تعداد تلاقی برگشتی کمتر از ٤ نسل بوده است. به طوری‌که به‌منظور اصلاح برنج برای مقاومت به بلایت باکتریایی از سه نسل تلاقی برگشتی استفاده کردند (Win et al. 2013). در تحقیق دیگری با سه تلاقی برگشتی و سپس خودگشنی گیاهان سورگوم، مقاومت به علف هرز استریگا[1] را به این گیاه منتقل کردند (Yohannes et al. 2015).

[1] Striga

جدول ٣- مقایسه میانگین صفات برای نسل والدی و BC_2F_1 در سه رقم طالبی مورد استفاده در این آزمایش. مقایسه میانگین با آزمون t انجام شده‌است. تنها دو مورد معنی‌دار به‌دست آمد که نشان دهنده نزدیک شدن ریخته ارثی گیاهان نسل BC_2F_1 به گیاهان والدی است.

نام رقم	نسل	مواد جامد محلول	ضخامت گوشت	عرض میوه	طول میوه
ریش بابا	والدی	٧/٥	٣/٦	١٣/٨	١٣
	BC_2F_1	٨/١	٣/٥	١٤	١٣/٦
ساوه	والدی	٧	٢/٧	١١/١	١٢
	BC_2F_1	٨/٤*	٣/٥	١٣/٥	١٤/٥*
تیل طرق	والدی	٧	٢/٧	١٠	٩/٨
	BC_2F_1	٨/١	٢/١	١١/٧	١٣

* معنی‌دار در سطح ٠/٠٥

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.3.7]

هم‌چنین برای اصلاح برنج به بیماری بلاست از دو تلاقی برگشتی و سپس خودگشنی استفاده کرده و در نهایت لینه‌هایی تولید شد که سهم ژنوم والد تکراری در آن‌ها کمتر از ۹۰ درصد بود. در این تحقیق گزینش ژنوم والد تکراری با نشانگرهای مولکولی انجام شد (Singh et al. 2012). هم‌چنین با توجه به اینکه هدف از تلاقی برگشتی اصلاح یک صفت در رقم تکراری است اگر گیاهان در هر نسلی از تلاقی برگشتی به اندازه کافی شبیه والد تکراری باشند می‌توان تلاقی برگشتی را متوقف کرد. نتیجه مقایسه گیاهان نسل BC_2F_1 نشان می‌دهد که میوه از نظر بسیاری از ویژگی‌ها شبیه والد تکراری بوده و به‌نظر می‌رسد رقم بخشنده ایزابل صفات نامطلوب نداشته است (جدول ۳).

در این تحقیق گزینش ژنوم والد تکراری با نشانگرهای مولکولی انجام شد (Singh et al. 2012). هم‌چنین با توجه به اینکه هدف از تلاقی برگشتی اصلاح یک صفت در رقم تکراری است اگر گیاهان در هر نسلی از تلاقی برگشتی به اندازه کافی شبیه والد تکراری باشند می‌توان تلاقی برگشتی را متوقف کرد. نتیجه مقایسه گیاهان نسل BC_2F_1 نشان می‌دهد که میوه از نظر بسیاری از ویژگی‌ها شبیه والد تکراری بوده و به‌نظر می‌رسد رقم بخشنده ایزابل صفات نامطلوب نداشته است (جدول ۳).

هر چند تحقیقات زیادی در زمینه تخمین تنوع ژنتیکی، ارزیابی مقاومت به بیماری و برآورد اجزا واریانس ژنتیکی در این گیاه انجام شده‌است (Feyzian et al. 2009; Madadkhah et al. 2012; Raghami et al. 2014) اما تحقیق حاضر اولین مطالعه در مورد اصلاح این گیاه با روش تلفیقی کلاسیک و مولکولی است. رتبه بندی ایران به‌عنوان سومین تولیدکننده این محصول در جهان نشان دهنده توانایی بالای کشور در تولید این محصول است اما متاسفانه ارقام کشت شده در کشور هنوز ارقام بومی هستند که عملکرد و کیفیت بالایی ندارد. بنابراین به کارگیری روش‌های اصلاحی کلاسیک و مولکولی برای اصلاح این گیاه ضروری به نظر می‌رسد. تحقیق حاضر نشان داد این روش‌ها برای اصلاح این گیاه امکان‌پذیر است.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله نگارندگان از صندوق حمایت از پژوهشگران و فن‌آوران کشور که با تامین اعتبار پژوهشی (شماره گرنت ۳۶۹۹۸/ص/۹۳) انجام این تحقیق را ممکن ساخت تشکر می‌کنند. هم‌چنین گروه محترم گیاهپزشکی پردیس ابوریحان اسپور قارچ عامل بیماری‌زا را در اختیار گروه تحقیقاتی این طرح گذاشت که به این ترتیب از این همکاری صمیمانه قدردانی می‌کنیم.

منابع

Banihashemi Z (2010) Reaction of *Cucumis melo* cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* the cause of melon vascular wilt. Iranian Journal of Plant Pathology 46: 11-22. (In Farsi).

FAO (2013) FAOSTAT. Food and Agricultural Organization of the United Nations. Available at http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. FAO. Rome, Italy.

Feyzian E, Dehghani H, Rezai AM, Javaran MJ (2009) Diallel cross analysis for maturity and yield-related traits in melon (Cucumis melo L.). Euphytica 168:215-223

Foolad MR, Panthee DR (2012) Marker-assisted selection in tomato breeding (Review). Critical Reviews in plant sciences 31: 93-123.

Jefferies S P, King B J, Barr A R, Warner P, Logue S J and Langridge P (2003) Marker-assisted backcross introgression of the Yd2 gene conferring resistance to barley yellow dwarf virus in barley. Plant Breeding 122: 52-56.

Joobeur T, King JJ, Nolin SJ, et al (2004) The fusarium wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. Plant Journal 39:283-297

Hayashi K, Yoshida H, Ashikawa I (2006) Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. Theoretical and Applied Genetics 113:251-260.

HongWang Y, Claude Thomas E, Ralph Dean A (2000) Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene (*Fom-2*) in melon (*Cucumis melo* L.). Molecular Breeding 6: 379-389.

Li Y-H, Zhang C, Gao Z-S, et al (2009) Development of SNP markers and haplotype analysis of the candidate gene for rhg1, which confers resistance to soybean cyst nematode in soybean. Molecular Breeding 24:63-76.

Liu J, Zheng Z, Zhou X, Feng C, Zhuang Y (2014) Improving the resistance of eggplant (*Solanum*

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]
[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.3.7]

melongena) to Verticillium wilt using wild species Solanum linnaeanum. Euphytica 201: 463-469

Madadkhah E, Lotfi M, Nabipour A, Rahmanpour S, Banihashemi Z, Shoorooei M (2012) Enzymatic activities in roots of melon genotypes infected with *Fusarium oxysporum* F.sp. melonis race 1. Scientia Horticulturae 135: 171-176.

Murray HG, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Research 8:4321-4325

Oumouloud A, Arnedo-Andres MS, Gonzalez-Torres R, Alvarez JM (2008) Development of molecular markers linked to the Fom-1 locus for resistance to Fusarium race 2 in melon. Euphytica 164:347-356.

Oumouloud A, Mokhtari M, Chikh-Rouhou H, et al (2012) Characterization of the Fusarium wilt resistance Fom-2 gene in melon. Molecular Breeding 30:325-334.

Oumouloud A, El-Otmani M, Chikh-Rouhou H, et al (2013) Breeding melon for resistance to Fusarium wilt: recent developments. Euphytica 192:155-169.

Prohens J, Nuez F (2007) Vegetables I: Asteraceae, Brassicaceae, Chenopodicaceae, and Cucurbitaceae. Springer Science and Business Media.

Raghami M, López-Sesé AI, Hasandokht MR, et al (2014) Genetic diversity among melon accessions from Iran and their relationships with melon germplasm of diverse origins using microsatellite markers. Plant Systematics and Evolution 300:139-151.

Singh VK, Singh A, Singh SP, et al (2012) Incorporation of blast resistance into "PRR78", an elite Basmati rice restorer line, through marker assisted backcross breeding. Filed Crops Research 128:8-16.

Tezuka T, Waki K, Yashiro K, Kuzuya M, Ishikawa T, Takatsu Y, Miyagi M (2009) Construction of a linkage map and identification of DNA markers linked to *Fom-1*, a gene conferring resistance to *Fusarium oxysporum* F.sp. melonis race 2 in melon. Euphytica 168:177-188.

Tezuka T, Waki K, Kuzuka M, Ishikawa T, Takatsu Y, Miyagi M (2011) Development of new DNA markers linked to the Fusarium wilt resistance locus Fom-1 in melon. Plant Breeding 130: 261-267.

Wang S, Yang J, Zhang M (2011) Developments of functional markers for Fom-2-mediated fusarium wilt resistance based on single nucleotide polymorphism in melon (*Cucumis melo* L.). Molecular Breeding 27:385-393.

Wang Y-H, Thomas CE, Dean RA (2000) Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene (*Fom-2*) in melon (*Cucumis melo* L.). Molecular Breeding 6:379-389.

Whitaker VM, Bradeen JM, Debener T, et al (2010) *Rdr3*, a novel locus conferring black spot disease resistance in tetraploid rose: genetic analysis, LRR profiling, and SCAR marker development. Theoretical and Applied Genetics 120:573-585.

Win KM, Korinsak S, Sirithunya P, et al (2013) Marker assisted introgression of multiple genes for bacterial blight resistance into aromatic Myanmar rice MK-75. Field Crops Research 154:164-171.

Yohannes T, Tesfamichael A, Kiambi D, et al (2015) Marker-assisted introgression improves Striga resistance in an Eritrean Farmer-Preferred Sorghum Variety. Field Crops Research 173:22-29.

Zheng XY, Wolff DW, Baudracco-Arnas S, Pitrat M (1999) Development and utility of cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) and restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) linked to the *Fom-2* fusarium wilt resistance gene in melon (*Cucumis melo* L.). Theoretical and Applied Genetics 99:453-463

Zhijuan Ji1, Jianyao Shi, Yuxiang Zeng1, Qian Qian1, Changdeng Yang1. (2014) Application of a simplified marker-assisted backcross technique for hybrid breeding in rice. Biologia 69: 463-468.

[Downloaded from mail.mg.genetics.ir on 2026-11-19]

[DOR: 20.1001.1.20084439.1396.12.3.3.7]