گزینش به کمک نشانگر SNP به منظور شناسایی گیاهان طالبی مقاوم به فوزاریوم

شیما تقی خانی[۱]، حسین رامشینی[۲،*]، سید احمد سادات نوری[۳]، محمود لطفی[٤]، علی ایزدی دربندی[۲]، نعیمه سوسرایی[۵] و عبداله وروانی فراهانی[۵]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران
۲- دانشیار، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران
۳- استاد، گروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران
٤- دانشیار، گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران
۵- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، پاکدشت، تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۰۳/۲۸ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹٦/۱۲/۱۹)

چکیده

طالبی محصول مهمی است که به صورت گسترده در مناطق معتدله کشت می‌شود. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های این گیاه پژمردگی آوندی ناشی از *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) است. این قارچ هر ساله زیان قابل توجهی به تولیدکنندگان این محصول در سراسر جهان وارد می‌کند. تولید ارقام مقاوم موثرترین راه برای کنترل این بیماری است. تا کنون برای این قارچ چهار نژاد ۰، ۱، ۲ و ۱,۲ گزارش شده است که نژاد ۱ مهم‌ترین نژاد در نیمه شمالی کشور است. رقم محلی گرمک که به طور عمده در استان اصفهان کشت می‌شود به نژاد ۱ حساس است. تک ژن غالب *Fom-2* باعث ایجاد مقاومت در برابر نژاد ۰ و ۱ می‌شود. در این تحقیق ژن مقاومت از یک رقم خارجی به نام ایزابل به رقم حساس یاده شده با روش تلاقی برگشتی به کمک نشانگر SNP انتقال داده شد. غربال گیاهان در نسل اول، دوم و سوم تلاقی برگشتی با روش مایه زنی گیاهچه‌ها انجام گرفت. بخشی از این ژن در والدین توالی‌یابی شد و تفاوت‌های موجود در توالی آلل‌های مقاوم و حساس شناسایی شد. به منظور تایید گیاهان مقاوم در نسل سوم تلاقی برگشتی پس از غربال با روش مایه‌زنی، از نشانگر SNP و روش شناسایی HRM استفاده شد. این روش به طور کامل سه ژنوتیپ مقاوم خالص، مقاوم ناخالص و حساس را از یکدیگر تفکیک کرد. مقاومت بسیاری از گیاهان حاصل از غربال با روش مایه‌زنی، با روش مولکولی نیز تایید شد؛ اگر چه تعداد از گیاهان مقاوم در روش مایه‌زنی، در روش مولکولی به عنوان حساس شناسایی شدند که بیانگر اعتبار بیشتر روش مولکولی در تعیین ژنوتیپ گیاهان است. با خودگشنی و خالص‌سازی گیاهان مقاوم نسل BC_3 می‌توان رقم مقاوم گرمک را معرفی کرد.

واژگان کلیدی: پژمردگی آوندی، تلاقی برگشتی به کمک نشانگر، *Fom-2*

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

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]

مقدمه

طالبی (*Cucumis melo* L.) یکی از گیاهان مهم خانواده کدوئیان 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 نیمه‌گرمسیری است، اما به صورت گسترده در کشورهای مناطق معتدله نیز رشد می‌کند (Oumouloud *et al*., 2013). میزان تولید انواع خربزه و طالبی در ایران در سال ۲۰۱۳ حدود یک و نیم میلیون تن بوده است. به این ترتیب ایران پس از چین و ترکیه سومین تولید کننده بزرگ انواع طالبی و خربزه در جهان بوده است (FAO, 2013). این گیاه دگرگشن است و گرده افشانی آن با حشرات انجام می‌شود.

پژمردگی آوندی یکی از جدی‌ترین و مهم‌ترین بیماری-هایی است که باعث بروز خسارت در این محصول می-شود. عامل این بیماری یک قارچ خاک‌زی به نام *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) است (Oumouloud *et al*., 2012). بر اساس بیماری‌زایی روی ارقام افتراقی طالبی، این قارچ به چهار نژاد ۰، ۱، ۲ و ۱,۲ طبقه‌بندی شده است (Tezuka *et al*., 2009) 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 به صورت کلامیدوسپور برای چند دهه دوام می‌آورد (Tezuka *et al*., 2011). در حال حاضر کارآمدترین و موثرترین روش ایجاد مقاومت در برابر پژمردگی آوندی، استفاده از ژن-های مقاومت می‌باشد (Tezuka *et al*., 2009). تک ژن-های غالب *Fom-1* و *Fom-2* به ترتیب باعث ایجاد مقاومت در برابر نژادهای ۰ و ۲ و نژادهای۰ و ۱ می‌شوند (Wang *et al*., 2000). از بین دو نژاد ۱ و ۲، نژاد ۱ گسترش بیشتری در ایران به ویژه در نیمه شمالی کشور دارد 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 ۰ و ۱ می‌شود که با وجود نشانگر مولکولی مرتبط با این ژن می‌توان در برنامه‌های اصلاحی گوناگون ژن مقاومت را به ارقام حساس منتقل کرد.

امروزه نشانگرهای مولکولی به عنوان ابزاری کارآمد نقش مهمی در روند اصلاح نباتات داشته و در ارزیابی تنوع ژنتیکی، شناسایی نواحی ژنومی کنترل کننده صفات کمی (QTL) و گزینش به کمک نشانگر کاربرد زیادی دارند (Mir Drikvand, 2016; Kaviani Charati *et al*., 2016). ژن *Fom-2* پس از نقشه‌یابی، در سال ۲۰۰٤ توالی‌یابی شد که با شماره دسترسیDQ287965 در پایگاه اطلاعاتی داده‌های زیست فناوری (NCBI) می‌توان توالی آن را مشاهده کرد (Joobeur *et al*., 2004). از آن پس بر اساس توالی این ژن نشانگرهای مبتنی بر توالی (Sequence characterized amplified region, SCAR) طراحی و استفاده شده‌اند که می‌توان از آنها در برنامه‌های اصلاحی استفاده کرد (Oumouloud *et al*., 2012). در این روش که گزینش به کمک نشانگر (Marker assisted selection, MAS) نامیده می‌شود 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. نشانگرهای به کار رفته برای اصلاح این صفت در روش گزینش به کمک نشانگر ویژه آلل بوده و یا نشانگرهای مبتنی بر توالی هستند. بهینه‌سازی واکنش PCR برای این‌گونه نشانگرها جهت دستیابی به نتایج مطمئن و تکرارپذیر نیاز به صرف وقت زیادی دارد (Wang *et al*., 2011). علاوه بر این برای تعیین ژنوتیپ افراد، محصول PCR باید الکتروفورز شود. در بین نشانگرهای دیگری که می‌توان برای این منظور استفاده کرد نشانگر SNP (Single nucleotide polymorphism) از جذابیت‌های زیادی برخوردار است. این نشانگر فراوانی بالایی در سطح ژنوم داشته و روش‌های زیادی برای شناسایی آن وجود دارد (Mammadov *et al*., 2012). تجزیه منحنی

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]

ذوب با دقت بالا (High resolution melting curve, HRM) یک روش مبتنی بر PCR است که می‌تواند تفاوت‌های موجود در توالی DNA را شناسایی کند. در این روش تفاوت در تغییرات فلئورسنس در نیم‌رخ ذوب قطعه تکثیر شده در واکنش PCR اندازه‌گیری می‌شود. طول قطعه، میزان GC و نوع توالی همگی بر منحنی ذوب تاثیر گذاشته و بنابراین می‌توان از آن برای شناسایی تفاوت‌های نوکلئوتیدی استفاده کرد (Taylor, 2009). از این فن‌آوری تاکنون برای تعیین ژنوتیپ SNP در تعدادی از گیاهان استفاده شده است (Hwang *et al*., 2011; Khu and Monteros, 2012; Wu *et al*., 2010). با توجه به اینکه این تجزیه را پس از PCR و بدون خارج کردن تیوب‌ها از دستگاه می‌توان انجام داد، بنابراین خیلی سریع‌تر از روش نشانگرهای SCAR بوده و نیاز به الکتروفورز ندارد.

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*، 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 گزارش شده است. دو لاین بهبود یافته HB145 (با یک نسل تلاقی برگشتی) و HB146 (با دو نسل تلاقی برگشتی) به دست 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 جمع آوری شده P1388846 از گونه‌های وحشی *S.linnaenum* به این قارچ مقاومت نشان داده است. انتقال 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 جمعیت-های تلاقی برگشتی مورد استفاده قرار گرفت (Liu *et al*., 2014). Oumouloud و همکاران (Oumouloud *et al*., 2013) بیماری پژمردگی فوزاریومی را مخرب‌ترین بیماری برای طالبی معرفی نمودند و بهترین روش کنترل آن را توسعه و استفاده از ارقام مقاوم معرفی کردند.

رقم گرمک یک رقم مهم طالبی در ایران است که طبق تحقیقات گذشته مشخص شد به نژاد ۱ بیماری *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) حساس است (Madadkhah *et al*., 2012). با وجود نشانگرهای مولکولی مناسب و با توجه به اینکه ژن *Fom-2* توالی‌یابی شده است، می‌توان با تلاقی برگشتی به کمک نشانگر ژن مقاومت را به این رقم منتقل کرد.

اگر چه این بیماری در ایران در مناطق کشت طالبی خسارت زیادی به بار می‌آورد، ولی متاسفانه با وجود حساس بودن بسیاری از ارقام مهم از جمله رقم گرمک، هیچ اقدامی در خصوص اصلاح ژنتیکی آنها انجام نشده است. رقم گرمک به طور عمده در اصفهان کشت می‌شود اگرچه در مناطق دیگر ایران نیز کشت این رقم انجام می‌شود. هدف از این تحقیق انتقال مقاومت از رقم مقاوم فرانسوی با نام ایزابل (به عنوان والد بخشنده) به رقم حساس داخلی با نام گرمک با روش تلاقی برگشتی بود. در این روش از دو روش مایه‌زنی و روش نشانگری

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]

تعیین ژنوتیپ SNP برای شناسایی گیاهان مقاوم و حساس در هر نسل تلاقی برگشتی استفاده شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از دو رقم طالبی استفاده شد. رقم ایزابل که یک رقم فرانسوی بوده و مقاوم به نژاد ۱ بیماری فوزاریوم *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) است و رقم گرمک که به این نژاد حساس هستند. اگرچه در منابع گوناگون مقاومت و حساسیت این ارقام بررسی شده بود (Madadkhah *et al*., 2012; Wang *et al*., 2000)، با این وجود در این تحقیق برای اطمینان از وضعیت آنها آزمون آلوده‌سازی انجام گرفت و مقاومت و حساسیت آنها تایید شد.

ارزیابی گیاهان برای مقاومت به بیماری: برای آلوده‌سازی ارقام مذکور با اسپور قارچ از روش فروبردن ریشه در سوسپانسیون کنیدیوم به میزان 10^6 اسپور در میلی‌لیتر استفاده شد (Banihashemi, 2010). گیاهچه‌های آلوده شده در گلدان‌هایی به قطر ۱۳ سانتی‌متر حاوی پیت‌ماس 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 شدند 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. 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.

تلاقی گیاهان و تولید نسل‌های تلاقی برگشتی: در این آزمایش نخست تلاقی بین رقم مقاوم (ایزابل با ژنوتیپ RR) با رقم حساس (گرمک با ژنوتیپ rr) انجام شد. سپس گیاهان F_1 (با ژنوتیپ Rr) با گرمک (رقم تکراری) تلاقی برگشتی داده شدند تا نسل BC_1 تولید گردد. برای شناسایی گیاهان مقاوم و حساس از روش آلوده سازی استفاده شد و به این ترتیب گیاهان مقاوم هتروزیگوت (Rr) از گیاهان حساس (rr) جدا شدند. برای هر خانواده چهار گلدان در نظر گرفته شد و در هر گلدان چهار گیاه کشت شد. یکی از گلدان‌ها به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و آلوده‌سازی نشا در آنها انجام نگرفت. در حالی که در سه گلدان دیگر تعداد ۱۲ نشا قرار گرفتند که ریشه آنها با اسپور قارچ آلوده شده بود. به این ترتیب در مجموع برای هر خانواده تعداد ۱۲ گیاه غربال شد. گیاهان مقاوم تایید شده به مزرعه منتقل شده و در فصل گلدهی برای تولید نسل BC_2 با والد تکراری تلاقی برگشتی داده شدند. در نسل BC_2 نیز به همین ترتیب عمل شد و گیاهان مقاوم با روش آلوده‌سازی مصنوعی شناسایی شدند. سپس نسل BC_3 تولید شد. گیاهان حاصل در این نسل نخست با روش مایه‌زنی غربال شدند. برای تایید مولکولی گیاهان مقاوم به دست آمده از این مرحله از نشانگر SNP و تکنیک HRM استفاده شد.

تعیین ژنوتیپ گیاهان با نشانگر SNP: برای این منظور نخست ژن *Fom-2* در گیاهان نسل والدی تعیین توالی شد. برای این منظور DNA از برگ گیاهان با روش CTAB استخراج شد (Murray and Thompson, 1980). یک جفت آغازگر به نام Fom2-1274 بر اساس اطلاعات موجود در مرکز ملی اطلاعات زیست فناوری (NCBI) طراحی شد (جدول ۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر در دستگاه ترموسیکلر (SimpliAmp™ Thermal Cycler, Applied biosystems) انجام شد. هر واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) دارای ۱۲/۵ میکرولیتر از PCR Mastermix با غلظت ۱/۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۰/۶ میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ میکرومولار، یک میکرولیتر از DNA ژنومی (با غلظت ۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) و ۱۰/۳ میکرولیتر آب مقطر بود. همچنین برنامه انجام مراحل PCR به این ترتیب انجام شد:

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]

جدول ۱- توالی آغازگرهای مورد استفاده در این آزمایش به منظور جداسازی بخشی از ژن *Fom-2* از رقم ایزابل و گرمک و آغازگرهای به کار رفته برای آزمایش تعیین ژنوتیپ SNP به کمک روش HRM

Table 1. Sequences of primers used for amplification of a part of *Fom-2* gene in 'Isabelle' and 'Garmak', and also the sequences of primers used for SNP genotyping using HRM method

نام آغازگر Primer name	توالی(′3-′5) Sequence (′3-′5)	دمای اتصال (°C) Annealing temperature (°C)
Fom2-1274	ATCGGGTTTGAAGAAG GTTGTAA AAGTGGGGTTGGAGC ATA	55
Fom2-HRM	AACTTGAGATTTGCAGCT TCG ATTTCTCAAGCTTTGGG AAGAAC	61

مرحله اول در دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (واسرشت سازی اولیه) انجام شد. مرحله دوم شامل دمای ۹٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤۵ ثانیه، دمای ٦۱ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه به تعداد ۳۵ چرخه تکرار شد. به منظور تکثیر تکمیلی قطعات ناقص، مرحله پایانی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در پایان از هر محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۵ میکرولیتر روی ژل آگارز ۱/۲٪ آماده‌سازی شده در بافر ۱TAE درصد الکتروفورز شده، سپس با اتیدیوم بروماید ۰/۵ µg/ml به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. قطعه تکثیر شده از ژل جداسازی شده و با کیت خالص‌سازی ژل (Bioneer Corporation, Korea) ذرات ژل حذف گردید. سپس قطعه به دست آمده در ناقل pGEM-T Easy Vector Systems ساخت شرکت پرومگا (Promega Corporation, Madison, WI, USA) قرار گرفت. از باکتری‌های مستعد *E.coli* سویه DH5α استفاده شد و پلاسمید به درون باکتری مورد نظر منتقل گردید. سپس باکتری‌های تراریخت در محیط LB/Amp/X-Gal قرار گرفته و کلنی‌های سفید انتخاب شدند. استخراج پلاسمید از کلنی‌های سفید انجام شد و با برش آنزیمی با *Eco*RI درج قطعه مورد نظر در پلاسمید تایید شد. برای هر ژنوتیپ سه کلنی مثبت انتخاب شد و پلاسمید استخراج شده برای توالی‌یابی به کار گرفته شد. توالی‌یابی توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام گرفت. توالی-های به دست آمده توسط نرم افزار BioEdit بررسی شده و SNPهای موجود بین توالی گیاه مقاوم (ایزابل) و حساس (گرمک) شناسایی شد. ناحیه‌ای از توالی به طول ۹۹ جفت باز که در آن تفاوت بین ژنوتیپ مقاوم و حساس یک نوکلئوتید بود انتخاب شد. آغازگرهای جدید برای آزمایش HRM طراحی شدند. برای انجام آزمایش HRM از دستگاه ریل تایم پی سی آر LightCycler® 96 System (Roche, Germany) استفاده شد. برای این منظور، واکنش PCR در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. هر واکنش دارای ٤ میکرولیتر از مستر میکس HiFi HRM (شرکت فارابین)، ۰/۵ میکرولیتر از هر کدام از آغازگرها، ۱۳ میکرولیترآب مقطر و ۲ میکرلیتر DNA الگو (با غلظت ۳۰ نانوگرم در میکرولیتر) بود. چرخه دمایی به صورت ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه جهت فعال سازی آنزیم بود. سپس ٤۰ بار چرخه زیر تکرار شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، ٦۱ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ ثانیه. محصولات PCR بدون خارج سازی از دستگاه با استفاده از مقایسه منحنی‌های متفاوت ذوب هر نمونه بررسی شدند. منحنی به دست آمده سپس برای تعیین ژنوتیپ‌ها بررسی شد. در واقع دو آلل مقاوم و حساس تنها در یک نوکلئوتید تفاوت داشتند (شکل ۳). در آلل مقاوم در این نقطه جفت باز GC و در آلل حساس در این نقطه جفت باز AT وجود دارد. بنابراین در رقم حساس که به صورت rr است همه قطعات تکثیر شده در PCR دارای جفت باز AT در این نقطه هستند که منحنی ذوب مخصوص به خود را خواهند داشت. از طرفی در گیاه مقاوم خالص که به صورت RR است همه قطعات تکثیر شده در این نقطه GC خواهند داشت که منحنی ذوب آنها با منحنی ذوب گیاه حساس

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]

متفاوت خواهد بود. در گیاه هتروزیگوت یا هیبرید که هر دو آلل GC و AT وجود دارد به دلیل تشکیل هترودوبلکس‌ها و همودوبلکس‌ها در فرآیند ذوب، منحنی منحصر به فردی به دست می‌آید که از دو منحنی قبلی کاملا قابل تمایز است. به این ترتیب هر کدام از سه ژنوتیپ را می‌توان با دقت بالا تعیین کرد.

نتایج و بحث

آلوده سازی گیاهان والدی برای تایید مقاومت و حساسیت: پس از آلوده‌سازی ریشه گیاهان با اسپور قارچ و طی پنج روز نخست، گیاهانی که به خاطر شوک جابه‌جایی نشا از بین رفته بودند از گلدان‌ها به آرامی حذف شدند. یک هفته پس از آلوده سازی آثار بیماری در گیاهان حساس کم‌کم آشکار شد. دو هفته پس از آلودگی گیاهان حساس کاملا زرد شدند. پس از سه هفته گیاهان حساس کاملا از بین رفتند. شکل ۱ گیاهان مقاوم و حساس را سه هفته پس از آلوده سازی نشان می‌دهد. این شکل تصویر دو رقم ایزابل و گرمک را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشخص است رقم ایزابل با وجود آلوده سازی کاملا سالم است در حالی که گیاهان رقم گرمک کاملا از بین رفته‌اند.

غربال گیاهان در نسل BC_1، BC_2 و BC_3: برای شناسایی گیاهان مقاوم هتروزیگوت در نسل BC_1، BC_2 و BC_3 گیاهان با عامل بیماری‌زا غربال شدند. به طوری که تعداد ۱۲ گیاه از هر خانواده آلوده سازی شد. شکل ۲ واکنش گیاهان را 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 گیاهان حساس و مقاوم وجود داشته باشند. در واقع در شکل ۲ این نکته به صورت آشکار مشخص شده است. در این تصویر در یک گلدان یک گیاه سالم باقی ماند در حالی که بقیه گیاهان از بین رفته‌اند. بنابراین گیاه سالم دارای ژنوتیپ Rr و گیاهان حساس از بین رفته دارای ژنوتیپ rr هستند.

تعیین ژنوتیپ گیاهان نسل BC_3 با روش HRM: پس از تکثیر بخشی از ژن *Fom-2* در این دو رقم، توالی یابی این قطعه انجام شد. طول قطعه توالی یابی شده ۱۲۷٤ جفت باز بود. بین دو توالی تفاوت‌های زیادی وجود داشت. ولی از آنجا که برای آزمایش HRM توصیه می‌شود و تفاوت توالی در یک نوکلئوتید باشد، بنابراین بخشی از این توالی که در آن تفاوت بین رقم مقاوم و حساس یک نوکلئوتید باشد انتخاب شد. این بخش در شکل ۳ نشان داده شده است. پس از تکثیر این بخش در دستگاه Real time PCR و به دست آوردن منحنی ذوب، تفاوت بین ژنوتیپ‌های مقاوم خالص و ناخالص و حساس کاملا مشخص بود. بنابراین از این روش برای تایید گیاهان مقاوم به دست آمده از مرحله آزمون آلوده‌سازی استفاده شد. نتایج نشان داد که بسیاری از گیاهان در آزمون آلوده‌سازی به درستی تعیین ژنوتیپ شده بودند. به طوری که نزدیک به ۹۰ درصد گیاهان دارای الگوی هتروزیگوت بودند. به عبارتی حدود ۱۰ درصد گیاهان در مرحله غربال با روش آلوده‌سازی مصنوعی به اشتباه به عنوان مقاوم گروه‌بندی شده بودند. شکل ٤ و ٥ الگوی‌های گوناگون منحنی ذوب را برای ۹ گیاه مقاوم نسل BC_3 که از آزمون آلوده سازی به دست آمده بودند، نشان می‌دهد. در شکل ٤ و ٥ سه ژنوتیپ ایزابل، گرمک و F_1 آنها به عنوان گیاهان شاهد به کار گرفته شدند. از بین ۹ گیاه تنها یک گیاه الگوی حساس را نشان داد که ممکن است به خاطر اشتباه در آزمون آلوده سازی به عنوان گیاه مقاوم طبقه‌بندی شده باشد.

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 بیماری‌زا، استفاده از ارقام مقاوم و به طور کلی استفاده از ژرم‌پلاسم مقاومت می‌باشد. در این

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]

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

Figure 1. 'Garmak' as the susceptible genotype (right) and 'Isabelle' as the resistant genotype (left) after three weeks of inoculation with race 1 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*

شکل ۲- نتیجه غربال گیاهان نسل BC_2 رقم گرمک به عنوان والد گیرنده. گیاهان موجود در این گلدان آلوده شده‌اند ولی به دلیل اینکه در این خانواده دو گروه گیاه مقاوم و حساس (به ترتیب Rr و rr) وجود دارد، برخی گیاهان مقاوم بوده و سالم هستند در حالی که برخی گیاهان حساس بوده و دو هفته پس از آلوده سازی کاملا از بین رفته‌اند. در این گلدان ٤ گیاه از خانواده یاد شده کشت شده بود

Figure 2. The result of screening of plants in BC_2 generation for 'Garmak' as the recurrent parent. The plants were inoculated with the pathogen but, as there were two groups of resistant and susceptible plants (Rr and rr, respectively), some plants were unaffected while others were died after two weeks. In this pot 4 plants were transplanted for screening

.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]

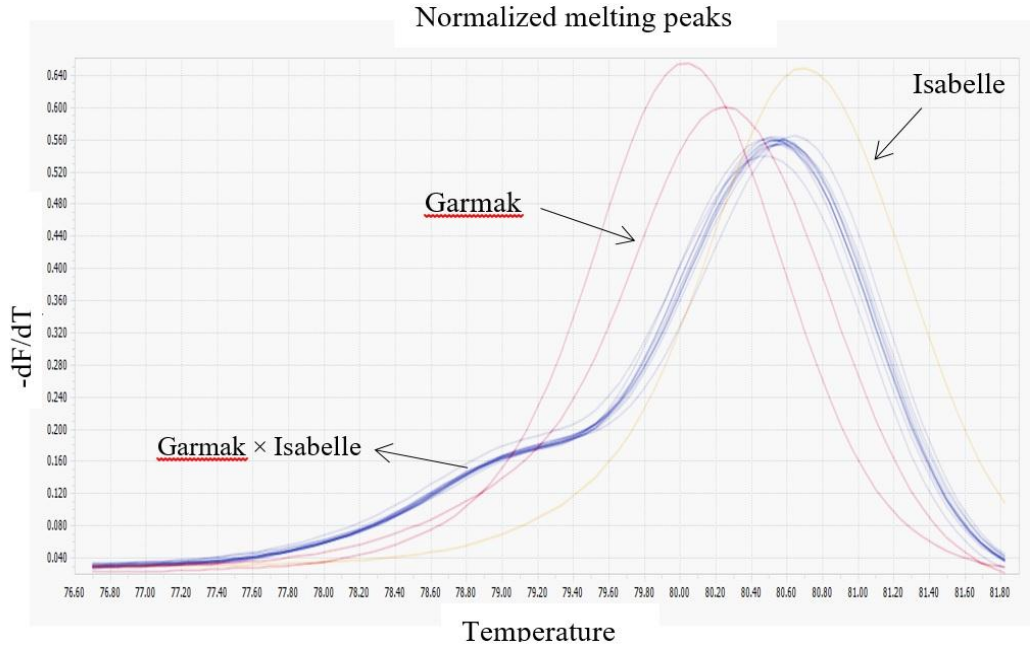
[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]

```
                                10         20         30         40         50
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....|
Isabelle (Resistant)            AACTTGAGATTTGCAGCTTCGATGGCGTTCAAATTATAGACAACGAGTTC
Garmak (Susceptible)            .........................................A.....

                                60         70         80         90
                                ....|....|....|....|....|....|....|....|....|....
Isabelle (Resistant)            TATGGTAATGATCCAAACCAAAGAAGGTTCTTCCCAAAGCTTGAGAAAT
Garmak (Susceptible)            ................................................
```

شکل ۳- توالی بخشی از ژن *Fom-2* در دو رقم ایزابل و گرمک. در این محدوده یک SNP وجود دارد. این محدوده توسط آغازگرهای Fom2-HRM تکثیر شد که طولی برابر ۹۹ جفت باز دارد. به دلیل وجود SNP الگوی منحنی ذوب در افراد مقاوم هموزیگوت، مقاوم هتروزیگوت و حساس (هموزیگوت) متفاوت خواهد بود که از این روش می‌توان به ژنوتیپ فرد پی برد

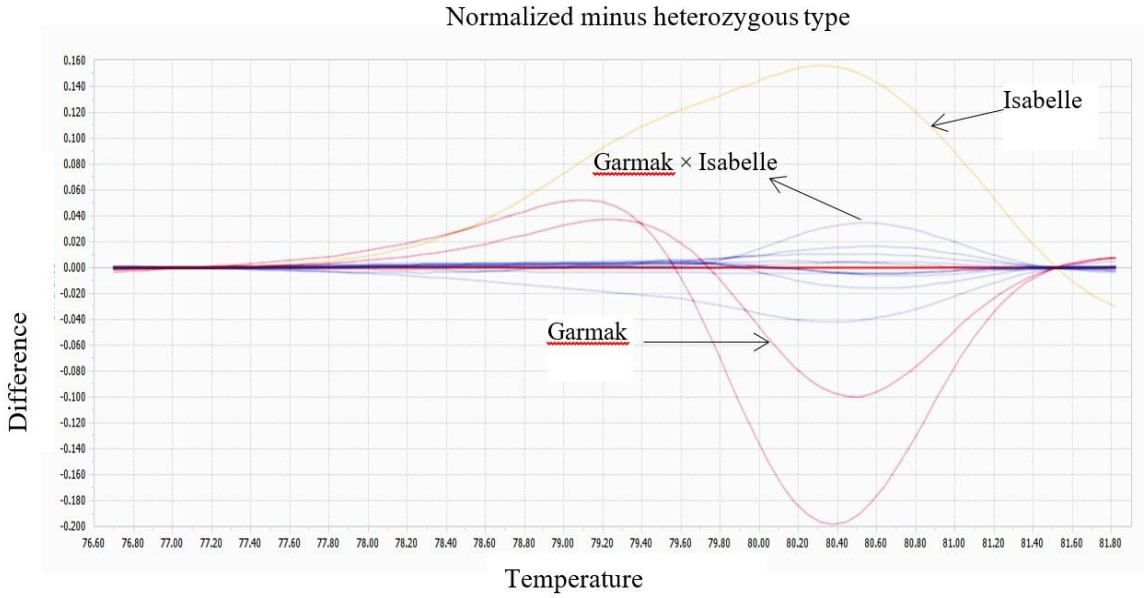
Figure 3. The selected part of *Fom-2* sequence in two varieties of 'Isabelle' and 'Garmak'. In this part of the gene, there is one SNP. This fragment with the length of 99 bp was amplified by Fom2-HRM primers. Due to existence of SNP, the pattern of melting curve among resistant homozygote, resistant heterozygote and susceptible (homozygote) would be different. This feature was used for genotyping of different genotypes.



شکل ٤- منحنی تغییرات در فلئورسنس به ازای تغییر در دما در ژنوتیپ‌های مختلف. سه ژنوتیپ گرمک، ایزابل و F_1 آنها به عنوان ژنوتیپ‌های شاهد در این آزمایش به کار گرفته شدند. تفاوت الگوی منحنی در سه ژنوتیپ شاهد کاملا آشکار است. به این ترتیب ژنوتیپ‌های ناشناخته نسل BC_3 به راحتی تعیین ژنوتیپ شدند

Figure 4. The curve of fluorescence intensity change vs. temperature change in different genotypes. 'Garmak', 'Isabelle' and their hybrid tested as the control genotypes in this analysis. The patterns of control genotypes are distinctly different. According to these patterns, the BC_3 plants were genotyped easily

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]



شکل ۵- منحنی تفاوت در تغییرات فلئورسنس نسبت به ژنوتیپ ٦ که هتروزیگوت بود. در این شکل نیز الگوی منحنی برای سه ژنوتیپ مقاوم، حساس و F_1 کاملا متفاوت است و تعیین ژنوتیپ افراد به راحتی انجام شد

Figure 5. The curve of difference in fluorescence change relative to genotype number 6 which was heterozygote. In this figure, the pattern of curve is clearly different in resistant, susceptible and hybrid genotypes and plants were genotyped clearly

آزمایش غربال گیاهان نسل BC_1، BC_2 و BC_3 برای مقاومت به بیماری به روش آلوده سازی انجام شد. گیاهان در این مرحله یا به طور کامل مقاوم بودند و یا پس از سه هفته کاملاً از بین رفتند. در این مدت گیاهانی که مقاومت کمی از خود نشان دهند دیده نشد. بنابراین به نظر می‌رسد ژن‌های کوچک اثر نقش چندانی در کم یا زیاد کردن مقاومت به بیماری ندارند و مقاومت به طور کامل عمودی بوده و توسط یک ژن کنترل می‌شود. در مورد مقاومت-های تک ژنی همواره این نگرانی وجود دارد که ممکن است به دلیل 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 شده است، تاکنون گزارشی از شکسته شدن مقاومت دیده نشده است و تعداد نژادهای این قارچ همچنان عبارت از نژادهای ۰، ۱، ۲ و ۱,۲ می‌باشد (Oumouloud *et al*., 2013, 2008; Wang *et al*., 2011; Zheng *et al*., 1999).

توالی DNA رمزگردان ژن *Fom-2* طولی برابر ۳۳۰۷ جفت باز دارد که پروتئینی با طول ۱۰۷۳ اسیدآمینه را رمز می‌کند. این ژن پروتئین R نوع NBS-LRR را رمز می‌کند (Joobeur *et al*., 2004). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که تفاوت توالی بین آلل مقاوم و حساس بسیار زیاد است به طوری که بین نوکلئوتید ۱۵۷۷ تا ۳۲۲۱ در انتهای ۳' این ژن بیش از ۲۸ تفاوت نوکلوتیدی بین آلل مقاوم و حساس گزارش شده است (Oumouloud *et al*., 2012). برای اینکه الگوی منحنی ذوب ساده باشد و بتواند به راحتی سه ژنوتیپ مقاوم خالص، مقاوم ناخالص و حساس را از یکدیگر تفکیک کند، بخشی از توالی که دارای یک SNP بین رقم مقاوم و حساس باشد، انتخاب شد. ژنوتیپ SNP در رقم مقاوم ایزابل به صورت G/C و در گرمک به صورت A/T بود. تعیین ژنوتیپ به روش HRM هزینه کمتری نسبت به روش‌های دیگر دارد. در مقایسه با روش‌هایی که در آن برای شناسایی SNP پس از PCR از آنزیم‌های برشی استفاده می‌کنند یا از کاوشگر برای شناسایی آن کمک می‌گیرند، روش HRM سریع‌تر و

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]

راحت‌تر است. ضمن اینکه نیاز به الکتروفورز ندارد (Hwang *et al*., 2011).

یکی از ایرادهای روش گزینش به کمک نشانگر این است که ممکن است در حین میوز، پیوستگی بین ژن و نشانگر به دلیل وقوع کراسینگ‌اور شکسته شود و گیاهان حساس به جای مقاوم گزینش شوند. در مورد تحقیق حاضر این مشکل وجود ندارد زیرا نشانگر به کار گرفته شده یک نشانگر کارکردی است، به این معنی که از توالی خود ژن مقاومت به دست آمده است. این نشانگرها در به نژادی گیاهی و جانوری کاربرد زیادی دارند. کارآمدی این نشانگرها در تحقیقات گوناگون اثبات شده است (Hayashi *et al*., 2006; Li *et al*., 2009; Whitaker *et al*., 2010). غربال ژن‌های مقاومت به *Fusarium oxysporum* در چغندر قند با روش HRM (Lucchi *et al*, 2017) و همچنین گزینش به کمک نشانگر برای ژن-های مقاومت به بلاست در برنج با کمک روش HRM (Luo *et al*., 2017) از مثال‌هایی هستند که می‌توان در این زمینه به آنها اشاره نمود. تعیین ژنوتیپ SNP در یونجه با روش HRM و ترسیم نقشه ژنتیکی از دیگر پژوهش‌های انجام شده در این زمینه است (Han *et al*., 2012). Wang و همکاران (Wang *et al*., 2011) بر اساس SNP موجود در ناحیه LRR ژن *Fom-2*، در گیاهان جمعیت F_2 که از تلاقی دو گیاه حساس و مقاوم طالبی بدست آمده بودند، تعدادی نشانگر CAPS پیوسته با این ژن و همچنین تعدادی نشانگر AS-PCR طراحی کردند. آنها این نشانگرها را بر روی ۳٤ ژنوتیپ دیگر از طالبی به‌کار بردند و حساس و مقاوم بودن آنها به نژاد یک فوزاریوم را اثبات کردند. Oumouloud و همکاران (Oumoulou *et al*., 2012) در پژوهشی به منظور پیشبرد راحت‌تر برنامه اصلاحی برای شناسایی گیاهان مقاوم از حساس نشانگر مولکولی SCAR بر اساس نقاط SNP موجود در ناحیه LRR طراحی و برای شناسایی ۲۷ ژنوتیپ طالبی استفاده کردند.

اگر چه آلوده سازی مصنوعی با دقت بالا انجام گرفت اما غربال گیاهان مقاوم با نشانگر SNP و روش HRM 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 آلوده‌سازی مصنوعی است. به این مزیت می‌توان این نکته را نیز افزود که با به کارگیری نشانگرهای مولکولی در وقت و هزینه صرفه جویی قابل توجهی می‌شود.

برای بازیابی ژنوم والد تکراری به حدود ۵ تا ٦ تلاقی برگشتی نیاز است. در نسل تولید شده در تحقیق حاضر یعنی BC_3 به طور متوسط ۹۳/۷۵ درصد از ژنوم مربوط به والد تکراری هستند. با توجه به اینکه رقم ایزابل خود یک لینه اصلاح شده است و از نظر بسیاری از صفات از مطلوبیت بالایی برخودار است، به نظر می‌رسد انجام تلاقی برگشتی چهارم نیاز نباشد. بنابراین با خودگشنی گیاهان مقاوم در نسل BC_3، می‌توان فرزندان RR را شناسایی کرده و رقم جدید گرمک که مقاوم به این نژاد است را معرفی کرد. در تحقیقاتی که در مورد دیگر گیاهان انجام شده است تعداد تلاقی برگشتی کمتر از ۵ نسل بوده است. به عنوان نمونه در برنج از ۳ نسل تلاقی برگشتی برای انتقال مقاومت به بلایت باکتریایی از رقم حساس به رقم مقاوم استفاده شده است (Win *et al*., 2013). همچنین برای انتقال ۵ QTL عامل مقاومت به علف هرز استریگا (*Striga hermonthica*) از رقم مقاوم به رقم حساس در سورگوم، استفاده از سه نسل تلاقی برگشتی و یک نسل خودگشنی موفقیت‌آمیز گزارش شده است (Yohannes *et al*., 2015). بیماری کوتولگی زرد جو توسط ویروس BYDV ایجاد می‌شود. در پژوهشی، ژن مقاومت به این بیماری (*Yd2*) با کمک نشانگر هم بارز پیوسته، توسط دو نسل تلاقی برگشتی و یک نسل خودگشنی انتقال داده شد (Jefferies *et al*., 2003).

تحقیق حاضر اولین مطالعه در مورد اصلاح این گیاه با روش تلفیقی کلاسیک و مولکولی است. رتبه بندی ایران به عنوان سومین تولید کننده این محصول در جهان نشان

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]

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 امکان پذیر است.

سپاسگزاری

نگارندگان از صندوق حمایت از پژوهشگران و فن آوران 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.

References

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**: 5-7 (In Persian).

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.

Foolad, M.R. and Panthee, D.R. (2012). Marker-Assisted selection in tomato breeding (Review). *Critical Reviews in Plant Sciences*, **31**: 93-123.

Hayashi, K., Yoshida, H. and 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.

Han, Y., Khu, D.M. and Monteros, M. (2012). High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Molecular Breeding*, **29**: 489-501.

Hwang, J.H., Ahn, S.G., Oh, J.Y., Choi, Y.W., Kang, J.S. and Park, Y.H. (2011). Functional characterization of watermelon (*Citrullus lanatus* L.) EST-SSR by gel electrophoresis and high resolution melting analysis. *Scientia Horticulturea*., **130**: 715-724.

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, J.J., Nolin, S.J., Thomas, C.E. and **Dean, R.A.** (2004). The fusarium wilt resistance locus *Fom-2* of melon contains a single resistance gene with complex features. *Plant Journal*, **39**: 283-297.

Kaviani Charati, A., Sabouri, H., Fallahi, H.A. and Jorjani, E. (2016) QTL Mapping of Spike Characteristics in Barley using F3 and F4 Families Derived from Badia × Komino Cross. *Journal of Plant Genetic Research*, **3(1)**: 13-28 (In Persian).

Khu, Y.H.D. and Monteros, M.J. (2012). High-resolution melting analysis for SNP genotyping and mapping in tetraploid alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Molecular Breeding*, **29**: 489–501.

Li, Y.H., Zhang, C., Gao, Z.S., Smulders, M.J.M., Ma, Z., Liu, Z.X., Nan, H.Y., Chang, R.Z. and Qiu, L.J. (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. and Zhuang, Y. (2014) Improving the resistance of eggplant (*Solanum melongena*) to Verticillium wilt using wild species *Solanum innaeanum*. *Euphytica*, **201**: 463-469.

Lucchi, C.D., Stevanato, P., Hanson, L. and McGrath, M. (2017). Molecular markers for improving control of soil-borne pathogen Fusarium oxysporum in sugar beet. *Euphytica* , **213(71)**: 1-14.

Luo, W., Huang, M., Guo, T., Xiao, W., Wang, J., Yang, G., Liu, Y., Wang, H., Chen, Z. and

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]

Zhuang, C. (2017). Marker- assisted selection for rice blast resistance genes Pi2 and Pi9 through high- resolution melting of a gene- targeted amplicon. *Plant Breeding*, **136**: 67-73.

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

Mammadov, J., Chen, W. and Mingus, J. (2012). Development of versatile gene-based SNP assays in maize (*Zea mays* L.). *Molecular Breeding*, **29**:779-790.

Mir Drikvand, R. (2016) Investigation of Heritability of Morphological Traits and Genetic Diversity among Rainfed Barley Genotypes Using Molecular and Morphological Markers. *Journal of Plant Genetic Researches*, **3(2)**: 69-82 (In Persian).

Murray, H.G. and Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research*, **8**: 4321-4325.

Oumouloud, A., Arnedo-Andres, M.S., Gonzalez-Torres, R. and Alvarez, J.M. (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., El-Otmani, M., Chikh-Rouhou, H., Claver, A.G., Torres, R.G., Perl-Treves, R. and lvarez, J.M. (2013). Breeding melon for resistance to Fusarium wilt: recent developments. *Euphytica*, **192**:155-169.

Oumouloud, A., Mokhtari, M., Chikh-Rouhou, H., Arnedo-Andres, M.S., Gonzalez-Torres, R. and Alvarez, J.M. (2012). Characterization of the Fusarium wilt resistance *Fom-2* gene in melon. *Molecular Breeding*, **30**: 325-334.

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

Taylor, C.F. (2009). Mutation scanning using high-resolution melting. *Biochemical Society Transactions*, **37**: 433-437.

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

Tezuka, T., Waki, K., Yashiro, K., Kuzuya, M., Ishikawa, T., Takatsu, Y. and 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.

Wang, S., Yang, J. and 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, C.E. and Dean, R.A. (2000). Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene (*Fom-2*) in melon (*Cucumis melo* L.). *Molecular Breeding*, **6**: 379-389.

Whitaker, V.M., Bradeen, J.M., Debener, T., Biber, A. and Hokanson, S.C. (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, K.M., Korinsak, S., Sirithunya, P., Lanceras-Siangliw, J., Jamboonsri, W., Da, T., Patarapuwadol, S. and Toojinda, T. (2013). Marker assisted introgression of multiple genes for bacterial blight resistance into aromatic Myanmar rice MK-75. *Field Crops Research*, **154**, 164-171.

Wu, S.B., Franks, T.K., Hunt, P., Wirthensohn, M.G., Gibson, J.P. and Sedgley, M. (2010). Discrimination of SNP genotypes associated with complex haplotypes by high resolution melting analysis in almond: Implications for improved marker efficiencies. *Molecular. Breeding*, **25**: 351-357.

Yohannes, T., Tesfamichael, A., Kiambi, D., Folkertsma, R., Tom Hash, C., Ngugi, K., Mutitu, E., Abraha, N., Weldetsion, M., Mugoya, C., Masiga, C.W. and De Villiers, S. (2015). Marker-

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]
[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]

assisted introgression improves Striga resistance in an eritrean farmer-preferred sorghum variety. *Field Crops Research*, **173**: 22-29.

Zheng, X.Y., Wolff, D.W., Baudracco-Arnas, S. and 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, J., Jianyao, S., Yuxiang, Z., Qian, Q. and Changdeng, Y. (2014) Application of a simplified marker-assisted backcross technique for hybrid breeding in rice. *Biologia* **69(4)**: 463-468.

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]

[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]

SNP Marker Assisted Selection for Identification of Fusarium Resistant Melon Plants

Shima Taghikhani[1], Hossein Ramshini[2,*], Seyed Ahmad Sadat-Noori[3], Mahmoud Lotfi[4], Ali Izadi Darbakdi[2], Naeimeh Sousaraei[5] and Abdollah Varvani Farahani[5]

1- M.Sc. Student, Department of Agromony and Plant Breeding Sciences, Aburaihan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran
2- Associate Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, Aburaihan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran
3- Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding Sciences, Aburaihan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran
4- Associate Professor, Department of Horticulture, Aburaihan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran
5- Former M.Sc. Student, Department of Horticulture, Aburaihan Campus, University of Tehran, Pakdasht, Tehran, Iran

(Received: June 18, 2017 – Accepted: March 10, 2018)

Abstract

Melon is an important crop cultivated in moderate climate regions of the world. One of the most important diseases of this plant is vascular wilt caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom). Infection of farm by this pathogen can result in huge damage around the world. Development of resistant varieties is the most effective method for disease control. Four races of 0, 1, 2 and 1,2 have been reported for this pathogen and 1 is more versatile and dangerous races especially in the north half of Iran. Garmak, as an important variety in Isfahan province, is susceptible to race 1. Single dominant gene of *Fom-2* induces resistance against race 0 and 1. In this research, the resistance gene was transferred from Isabelle into Garmak using SNP marker assisted back-crossing. The screening of plants in BC_1, BC_2, and BC_3 generations was carried out using artificial inoculation. This gene was sequenced partially in parental genotypes and resistant and susceptible alleles were discriminated. In order to verify the resistant plants survived after artificial inoculation in BC_3, plants were genotyped using the SNP marker and HRM method. This method distinctly separated three genotypes (RR, Rr and rr) from each other. The resistance of most plants was verified by molecular method. However, among resistant genotypes identified by artificial inoculation method, there were some susceptible plants identified by molecular method, indicating the more confidence of molecular method in genotyping of plants. With selfing of BC_3 resistant plants and selection of homozygote resistant plants, it is possible to develop resistant Garmak variety.

Keywords: Vascular Wilt, Marker Assisted Back-Crossing, *Fom-2*

* **Corresponding Author, E-mail: ramshini_h@ut.ac.ir**

[Downloaded from pgr.lu.ac.ir on 2025-05-10]

[DOR: 20.1001.1.23831367.1397.5.1.5.8]
[DOI: 10.29252/pgr.5.1.63]