ارزیابی مقاومت ارقام مرکبات نسبت به قارچ *Alternaria alternata* با استفاده از RAPD - PCR

سیده نیکو کاکوان (۱)، حمید رضا زمانی زاده (۱)، حسین طاهری (۲)، شهاب حاج منصور (۱) و بهار مرید (۱)
۱- دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ۲- موسسه تحقیقات مرکبات کشور، رامسر

چکیده

بیمارگر ***Alternaria alternata*** در مرکبات پاتوتیپ های مختلفی دارد که باعث بیماری لکه قهوه‌ای در نارنگی‌ها، لکه برگی در راف لمون و پوسیدگی سیاه روی میوه های پس از برداشت می‌شود. بیماری لکه قهوه‌ای آلترناریایی مرکبات یکی از مهمترین بیماری‌های مرکبات در سراسر جهان و ایران می‌باشد و خسارت اقتصادی بالایی به این محصول وارد می‌کند. تاکنون تلاشهای زیادی برای پیدا کردن ارقام مقاوم و همچنین ژنهای مقاومت نسبت به این بیماری ها روی مرکبات انجام شده است. در این پژوهش ۱۳ گونه و رقم مرکبات به نام‌های اورلاندو تانجلو، مینیولا تانجلو، نارنگی‌های کلمانتین، محلی، یونسی، فورچون، کینو، پیج، پرتقال تامسون، پرتقال محلی، لیمو شیرین، لیمو ترش و نارنج با استفاده از تکنیک RAPD-PCR مورد بررسی قرار گرفتند. استخراج دی ان آ ی کل از برگهای مرکبات با استفاده از روش دالکیلیک و همکاران(۲۰۰۵) انجام شد و از دوآغازگر الیگونوکلئوتیدی P12 و AL13 برای تکثیر قطعات دی ان آ استفاده شد. این دو آغازگر توسط داکیلیک و همکاران (۲۰۰۵) از میان ٤۹۲ آغازگر انتخاب شدند که توانستند ژن مربوط به مقاومت به این بیماری را در ارقام مرکبات تکثیر کنند. قطعات تکثیر شده در این آزمایش دارای اندازه های ۱۲۵ جفت باز تا ۳۲۰۰ جفت باز بودند. در نارنج یک باند ۸۵۰ جفت باز توسط آغازگر P12 و یک باند ۱۲۵۰ جفت باز توسط آغازگر AL13 تکثیر شد که همان ژن مقاومت می باشد، ولی در دیگر ارقام هیچگونه باندی در این نواحی دیده نشد. در آزمون بیماریزایی تمام ارقام به جز نارنج، نسبت به بیماری حساس و درجات مختلفی از علایم بیماری را از خود نشان دادند. با توجه به نتایج مارکر مولکولی و آزمون بیماری‌زایی نارنج نسبت به بیماری ناشی از قارچ ***Alternaria alternata*** مقاوم و دارای ژن مقاومت (تکثیر شده توسط آغازگرها) می‌باشد و دیگر ارقام مرکبات مورد بررسی، نسبت به این بیماری حساس یا نیمه حساس می‌باشند. این اولین گزارش از وجود ژن‌های مقاومت به ***Alternaria alternata*** در مرکبات در ایران می‌باشد.

مقدمه

ایران با تولید سالانه بیش از ٤ میلیون تن انواع مرکبات، هشتمین تولید کننده مرکبات در جهان می باشد.(وزارت جهاد کشاورزی ۱۳۸۵).بیمارگر ***Alternaria alternata*** در مرکبات پاتوتیپ های مختلفی دارد که باعث بیماری لکه قهوه ای در نارنگی ها، لکه برگی در راف لمون و پوسیدگی سیاه روی میوه های بعد از برداشت می شود(Timmer *et al*., 2003).

تا کنون تلاشهای زیادی برای پیدا کردن ارقام مقاوم و همچنین ژنهای مقاومت نسبت به این بیماری انجام شده است دالکیلیک و همکاران در سال ۲۰۰۵ با استفاده از روش RAPD-PCR تنوع ژنتیکی چندین رقم مرکبات را با استفاده از ٤۹۲ آغازگر تصادفی مورد بررسی قرار دادند. آنها با مقایسه این تنوع ژنتیکی با میزان مقاومت و حساسیت ارقام در گلخانه بیان کردند که دورگی از کلمانتین دارای ژن مقاومت به این بیماری می باشد و این ژن توسط پرایمرهای P12 و AL13 قابل تکثیر می باشد (Dalkilic *et al* ،2005). هدف از انجام این پژوهش بررسی تنوع ژنتیکی ارقام مختلف مرکبات کشور با روش RAPD-PCR و بررسی رابطه حساسیت و مقاومت این ارقام نسبت به قارچ ***Alternaria alternata*** می باشد.

مواد و روش ها

در این پژوهش از ۱۳ رقم مرکبات شامل ۸ رقم نارنگی (مینیولا تانجلو، اورلاندو تانجلو، پیج،کینو، کلمانتین، فورچون، یونسی و محلی)، ۲ رقم پرتقال(تامسون و محلی) لیموشیرین، لیمو ترش و نارنج استفاده شد. همه این ارقام از مرکز تحقیقات مرکبات در شمال و جنوب کشور تهیه شد. در آزمون بیماریزایی وبررسی حساسیت ارقام در گلخانه از روش اسپری کردن سوسپانسیون اسپور روی برگهای تازه مرکبات استفاده شد. برای انجام RAPD-PCR ابتدااز برگهای تازه ارقام مورد استفاده با روش دالکیلیک و همکاران، DNA کل استخراج شد و برای تکثیر قطعات دی ان آ و بررسی تنوع آنها از دو آغازگر P12 و AL13 در واکنش زنجیره ای پلیمرازی استفاده شد (Dalkilik *et al.,* 2005).

نتایج و بحث

در آزمون بیماریزایی تمام ارقام مورد استفاده به جزء نارنج نسبت به بیماری حساس و درجات مختلفی از علائم بیماری را نشان دادند. در روش مولکولی قطعات دی ان آ با اندازه های متفاوت بین ۱۲۵ تا ۳۲۰۰ جفت باز در تمام ارقام توسط دو آغازگر مورد استفاده تکثیر شدند. اما در رقم نارنج با هریک از آغازگرهای فوق، یک باند اضافی تشکیل شد که در دیگر ارقام وجود نداشت. در آغازگر P12 یک قطعه با اندازه ۸۵۰ جفت باز و با آغازگر AL13 یک قطعه با اندازه ۱۲۵۰وجود داشت. بر اساس کارهای دالکیلیک و همکاران (۲۰۰۵) این دو آغازگر می توانند ژن مقاومت به بیماریهای آلترناریایی را در ارقام مقاوم و دارای این ژن تکثیر کنند. اندازه قطعات ذکر شده توسط این محققین مشابه و برابر قطعات تکثیر شده در این پژوهش می باشد. بنابراین نتایج حاصل از آزمون بیماری زایی با نتایج روش مولکولی مطابقت کامل داشت و رقم نارنج که در روش گلخانه با هیچ کدام از جدایه های قارچ عامل بیماری بیمار نشده بود در روش مولکولی با هریک از آغازگرهای مورد استفاده دارای یک باند اضافی نسبت به سایر ارقام بود که همان ژن مقاومت نسبت به بیماری می باشد. ژن مقاومت به بیماری های آلترناریایی مرکبات توسط یک آلل مغلوب به ارث برده می شود و در میان گیاهان میزبان این بیماری به ندرت این ژن دیده می شود (Ling *et al.*, 2000). این ژن تاکنون درهیبریدی از نارنگی رقم کلمانتین نسبت به ***Alternaria alternata*** و در ارقام مقاوم سیب و گلابی نسبت به دیگر گونه های آلترناریا دیده شده است . در این پژوهش وجود این ژن در میان ارقام نارنج برای اولین بار در ایران و جهان به اثبات رسید. با توجه به اینکه نارنج به عنوان پایه برای اکثر مرکبات استفاده می شود، از این گیاه می توان به عنوان منبع مقاومت به این بیماری در کارهای اصلاح نباتات و تهیه ارقام مقاوم استفاده کرد.

منابع

وزارت جهاد کشاورزی،۱۳۸۵.آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۸۶-۱۳۸۵،اداره کل آمار و اطلاعات معاونت طرح و برنامه ریزی و پشتیبانی وزارت جهاد کشاورزی،تهران.

- Dalkilic, Z., Timmer, L.W., and Gmitter, F.G. 2005. Linkage of an Alternaria Disease Resistance Gene in Mandarin Hybrids with RAPD Fragments. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130: 191-195.
- Ling, P., Duncan, L.W., Deng, Z., Dunn, D., Hu, Z., Huang, S., and Gmitter, F.G. 2000. Inheritance of citrus nematode resistance and ints linkage with molecular markers. Theor. Appl. Genet. 100: 1010-1017.
- Timmer, L.W., Peever, T.L., Solel, Z. and Akimitsu, K. 2003. Alternaria disease of citrus- Novel pathosystems. Phytopathol. Mediterr.: 42, 3-16.

Evaluation of citrus cultivars resistance to *Alternaria alternata*, by RAPD-PCR

Abstract

Alternaria alternata cause 3 distinct diseases of citrus , namely, Alternaria brown spot of tangerines and their hybrids,Alternaria leaf spot of rough lemon,Alternaria black rot of fruit.

Alternaria Brown spot diseases is one of the most important diseases of citrus in the world and also in Iran and causes serious economical losses in citrus industry. Resistance of citrus cultivars to the Alternaria diseases varies genetically. Investigating of genetic diversity with molecular markers can be useful for evaluation of resistance to Alternaria disease in citrus cultivars. In this study, 13 citrus species and cultivars including "Orlando tangelo, Minneola tangelo, Clementine mandarin, Fortune, Page mandarin, Unesi, Kino, Local tangerine, Thamson navel orange, Local orange, Sweet lemon, Key Lime and Sour orange were analyzed based on RAPD- PCR. Total DNA was extracted from leaves by Dalkilik *et al.* method and DNA fragments were amplified by RAPD-PCR using two single, 10mer oligonucleotide primers; AL13 and P12. These primers were selected by Dalkilic *et al*., (2005) from 492 primers that could amplify resistant gene in citrus cultivars. In this research, the sizes of amplified DNA differed from 125bp to 3200bp. In sour orange an 850bp fragment by P12 and a 1250bp fragment by AL13 primer were amplified and there wasn't any band in these regions in other cultivars. In pathogenicity test, with the exception of sour orange, all citrus cultivars showed different rang of disease symptoms. Based on the result of molecular marker and pathogenicity test, sour orange is resistant to *Alternaria alternata* and has resistant gene (amplified by P12 and AL13 primers) but other citrus cultivars are susceptible to this disease. This is the first report of resistant gene in citrus cultivars to *Alternaria alternata* from in iran.

Key words: *Alternaria alternata*, resistance, citrus cultivars, RAPD-PCR