

# ردیابی مولکولی ژن مقاومت ژنتیکی گوجه فرنگی نسبت به بیماری شانکر ساقه ناشی از قارچ *Alternaria alternata*

خدیجه پیری فرد<sup>۱</sup>، محمد علی ابراهیمی<sup>۱\*</sup> و سعیده پیرایش<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> تهران، دانشگاه پیام نور، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی

<sup>۲</sup> تهران، وزارت جهاد کشاورزی، معاونت زراعت

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲۸

## چکیده

با گسترش فعالیت قارچهای بیمارگر در گیاهان زراعی، انجام مطالعات دقیق را در بحث کترل آفات و بیماریهای گیاهی، مهم و ضروری به نظر می‌رسد. شانکر ساقه گوجه فرنگی که در اثر فعالیت قارچ *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* ایجاد می‌شود، از مهم‌ترین بیماریهای گوجه فرنگی در ایران است. این قارچ فیتوکسینی بنام AAL-toxins تولید می‌کند که بازدارنده بیوپستر اسفنگولیپید در گیاه میزان بوده و باعث شانکر ساقه می‌شود. مقاومت در برابر پاتوژن و عدم حساسیت به توکسین، توسط جایگاه ژنی ASC1 در گیاه میزان کترول می‌شود. پروتئین حاصل از بیان این ژن، قادر به سم زدایی AAL-Toxin است. این تحقیق با هدف ردیابی این ژن در ۳۴ ژنوتیپ مهم مورد استفاده در ایران انجام شد. پس از ساخت آغازگر مناسب برای ردیابی ژن دخیل در مقاومت گوجه فرنگی به بیماری شانکر ساقه و این ژن طی واکنش PCR در ارقام مورد آزمایش ردیابی گردید. سپس محصول PCR توالی‌بایی شده و نتیجه سکوئنس نشان داد که باند ایجاد شده مربوط به ژن مورد نظر می‌باشد که از بین ژنوتیپهای مورد آزمایش ارقام کال جی N3، اکسیر فلات VF، اوان، هیبرید ps515 CH فلات، متین، هیبرید ایون، دارای ژن ASC1-1 بودند و برای اولین بار در ایران با روش‌های مولکولی به عنوان ژنوتیپهای دارای ژن مقاوم به شانکر ساقه برای مطالعات بعدی معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: ارقام مقاوم، *Alternaria alternata*، شانکر ساقه، گوجه فرنگی

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۲۲۴۴۰۴۱، پست الکترونیکی: ma\_ebrahimi@pnu.ac.ir

## مقدمه

می‌شود. بررسی (۱۲) جدایه‌های مختلف قارچ به وضوح نشان داد که *A. alternata* پاتوژن اولیه می‌باشد و در این قارچ سمعی به نام AAL-toxins تولید می‌شود که باز دارنده بیوپستر اسفنگولیپید در گیاه میزان بوده و باعث شانکر ساقه و از بین رفتار گونه‌های حساس گوجه فرنگی می‌شود. فیتوکسین AAL-toxins اولین بار توسط بوتینی و همکاران در سال ۱۹۸۱ از قارچ *Alternaria lycopersici* و همکاران در سال ۱۹۸۱ از قارچ *Alternaria f. sp. TB* است که بخش سمی TA و TB آن به عنوان دو استر از

با توجه به افزایش میزان کاشت گوجه فرنگی در کشور، انجام مطالعات دقیق در بحث کترول آفات و بیماریهای گیاهی مهم و ضروری است، از بیماریهای مهم گوجه فرنگی بیماری شانکر ساقه گوجه فرنگی که اولین بار در کالیفرنیا آمریکای جنوبی گزارش شده است. عامل بیماری قارچ *Alternaria alternata* f. Sp. *lycopersici* می‌باشد که علائم آن به صورت زخم‌های روی ساقه و لکه‌های بیضوی مایل به سیاه در طوفق، ساقه و شاخه‌های گیاه در برگها و میوه‌ها به صورت لکه‌های نکروز دیده

شده اخیر روی عامل این بیماری نشان داد حضور DNA آلتارناریا و شناسایی آن بر اساس منطقه ITS با حضور مایکروتکسین قارچ در مواد مختلف ارتباط مستقیم دارد (۱۳). گونه‌های مختلف آلتارناریا با تکنیک‌های مولکولی و مورفولوژیکی متفاوت به راحتی در حد گونه و زیرگونه قابل تفکیک هستند (۷). لذا شناسایی پاتوژن و تفکیک آن در شرایط مناسب با دقت بالا امکان‌پذیر است. اما در ادامه این مطالعات تعیین دامنه میزبانی و شناسایی ارقام مقاوم، نیازمند مطالعات تکمیلی و جدید است (۱۱). بررسی رابطه فیلوزنیکی عامل بیماری نیز با روش‌های مبتنی بر PCR نیز با RAPD (۱۱ و ۱۳) نشان داد که شناسایی ارقام مقاوم با روش‌های جدید مولکولی اغلب دارای دقت بالاتر و نیازمند زمان کمتری است، در این تحقیق تلاش می‌شود شناسایی ارقام مقاوم در سطح ۳۴ رقم مهم گوجه فرنگی در ایران و به روش مولکولی انجام پذیرد. شناسایی توالی ژن دخیل در مقاومت گوجه فرنگی به بیماری شانکر ساقه اخیراً انجام شده است و برای اولین بار در این تحقیق از نگاه کاربردی از نتایج حاصل از پژوهش فوق در راستای شناسایی ارقام مقاوم در ایران استفاده شد. ژن ASC1 میزان مقاومت و حساسیت گیاه را نسبت توکسین تعیین می‌کند. بیان ژن ASC1 باعث تولید پروتئین ASC-1P شده که با آنزیم سرآمید سنتاز در مسیر اسفنگولپید بوده که با حضور ASC1 پروتئین باعث مقاومت گیاه می‌شود. بررسی نتایج حاصل از تکثیر نشان داد که این پرایمر قدرت تمایز میان ارقام هموزیگوس غالب (Asc/Asc) و ارقام هتروزیگوس (Asc/asc) با ارقام هموزیگوس مغلوب (asc/asc) را دارد. توالی مربوط به ژن ASC1 در بانک ژن ثبت شده است با توجه به یافته‌های محققان و اینکه روش‌های معمول برای شناسایی و کنترل بیماری زمان بر و هزینه بر است و بسته به نوع آب و هوا شرایط کشت و پرورش متفاوت بوده و احتمال مقاومت به قارچ کشها وجود دارد، مطمئن‌ترین و موثرترین روش کنترل، شناسایی ارقام مقاوم و کاشت آنها است (۹ و ۱۷) که برای اولین بار در این تحقیق در ایران

یک آمینوفنیل ۱۹ کربن و تریو کربوکسیلات شناخته شده و بخش TB شبیه به بخش سمی TA بوده و در یک گروه کربوکسیل روی آمینوفنیل متفاوت می‌باشد. در واقع این توکسین جزء توکسینهای میزبان اختصاصی می‌باشد (۸). مطالعات انجام شده بر روی جمعیت‌های در حال تفرق برای ردیابی ژنهای مقاومت به این بیماری نشان داده که بیماری شانکر ساقه گوجه فرنگی در نسلهای در حال تفرق انجام شده است همچنین نشان داده که یک ژن غالب کنترل کننده این بیماری بوده که توسط دانشمندی به نام بارون با کمک مارکر MAS بنام ASC1 شناسایی و توالی‌بایی شد به طوری که این ژن بر روی بازوی بلند کروموزوم ۳ قرار دارد. مقاومت در برابر پاتوژن و عدم حساسیت به توکسین توسط جایگاه ژنی ASC1 کنترل می‌شود (۳ و ۹). در سایر مطالعات انجام شده وراثت پذیری مقاومت به عامل بیماریزای A. alternata مورد بررسی قرار گرفته و مشخص شده که این بیماری روی ارقام خاصی از گوجه فرنگی خسارت‌زا است و ژنتیک‌های مختلف دارای طیف وسیعی از واکنش نسبت به این بیماری می‌باشد (۱). تا آنجا در تحقیق مشابهی، وجود اختلاف معنی‌دار بین ژنتیک‌های گوجه فرنگی نسبت به بیماری شانکر ساقه گوجه فرنگی مشخص شد که از نظر صفات بیماری برخی ژنتیک‌ها کاملاً مقاوم و برخی ژنتیک‌ها حساس، تعدادی از ژنتیک‌ها مقاومت نسبی به بیماری دارند (۱۶). همچنین درجه پاسخ متفاوت به A. alternata با هجدۀ رقم گوجه فرنگی، برای ارزیابی احتمال دخالت فعالیت پروتاز و پراکسیداز از نتایج قابل ملاحظه‌ای (۶) و نیز بررسی واکنش مقاومت و یا حساسیت شش رقم گوجه فرنگی A. alternata f. sp. (۸) مورد بررسی قرار گرفت. حال با توجه به اینکه این بررسیها عمدهاً با روش‌های تست بیماریزایی انجام شده است (۵ و ۱۴) بررسی تنوع ژنتیکی عامل بیماری با استفاده از تکنیک‌های مولکولی و مارکرهای مبتنی بر PCR از جمله RAPD (۱۵) مطالعات مولکولی و بیوشیمیایی انجام

سپس DNAهای تمیز و با غلظت مناسب برای PCR از همه ارقام انتخاب شد.

جدول ۱- ارقام مورد استفاده در این تحقیق و کد مربوطه

ارقام گوجه فرنگی	کد	ارقام گوجه فرنگی	کد
هیبرید پی اس	L۲۰	Walter	L۱
سوپر ۲۲۷۰	L۲۱	Early ur bana	L۲
منین	L۲۲	Mana pd	L۳
هیبرید فیزنه	L۲۳	Pate early ch	L۴
هیبرید کومودورو	L۲۴	Bonny Best	L۵
پریمو فلاٹ	L۲۵	شف فلاٹ	L۶
هیبرید پتوپراید	L۲۶	پتو ۸۶	L۷
سی اچ فلاٹ	L۲۷	اکسیر فلاٹ	L۸
روژن	L۲۸	کینگ استون	L۹
کال جی ان ۳	L۲۹	کینگ استار	L۱۰
هرمز	L۳۰	ارلی اوربانا وی اف	L۱۱
هنگام	L۳۱	کیمیا فلاٹ	L۱۲
راها	L۳۲	وای فلاٹ	L۱۳
زیومرد	L۳۳	هیبرید ابیون	L۱۴
کیان	L۳۴	اوان	L۱۵
		کارون فلاٹ	L۱۶
		هیبرید سوپرست	L۱۷
		فلاٹ ۱۱۱	L۱۸
		سوپر شف	L۱۹

انجام فرآیند واکنش زنجیره‌ای پلیمراز: برای تهیه ۲۵ میکرولیتر مخلوط اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز به ترتیب از ۲/۵ میکرولیتر PCR buffer، ۰/۷۵ میکرولیتر کلرید میزیم، ۰/۷ میکرولیتر dNTP، ۱/۲ میکرولیتر آغازگر رفت و برگشت، ۰/۳ میکرولیتر Taq DNA polymerase، ۲ میکرولیتر DNA استفاده شد. جهت انجام این واکنش آغازگر اختصاصی ASC1 ساخت شرکت متایبون آلمان مورد استفاده قرار گرفت. توالی آغازگر مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای Ascl1f عبارت است از: ATCACATCGCTGCTCGGGTTG.

عبارت است از :

در ارقام مهم گوجه فرنگی از روشهای مولکولی به این منظور بهره گرفته شده است.

## مواد و روشهای

کاشت ارقام گوجه فرنگی ۵ رقم بذر اصلاح شده L۱ تا L۵ در جدول ۴ از مؤسسه تحقیقاتی و اصلاح نهال و بذر کرج، ۲۱ رقم بذر از L۶ تا L۲۷ از شرکت فلاٹ و ماباقی بذرها و L۲۲ از شرکت گل سم که از ارقام گوجه فرنگی رایج در کشور تهیه شد. کاشت رقم ۳۴ رقم مختلف گوجه فرنگی در فضای آزاد با خاک peat moss در گلستان و ماه اردیبهشت در دمای بین ۱۹ تا ۲۹ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. ارقام مورد آزمایش، در شرایط مناسب کاشته شده و طبق(شکل ۱) و (جدول ۱) کدگذاری گردید.



شکل ۱- کاشت ارقام گوجه فرنگی

**استخراج DNA:** پس از آماده سازی نمونه‌ها، استخراج DNA به روش CTAB انجام گرفت (۱۰) به منظور انجام فرآیند استخراج DNA بافت برگ گیاهچه‌ها را با ازت مایع خرد نموده و سپس کد گذاری کرده و برای نگهداری به دمای -۲۰ تا -۸۰ منتقل گردید. بافر CTAB تهیه و pH= 8 تنظیم شد. نمونه‌های DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۰/۸ درصد بارگذاری گردید و بعد از انجام الکتروفورز و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید اندازه باند هر DNA خام استخراج شده با مقایسه غلظت مشخصی از نشانگر وزن مولکولی (Gen Ruler DNA Ladder Mix 10kb Fermentas) شرکت تخمین زده شد. استخراج DNA برای هر رقم در ۴ تکرار انجام گرفت و

Bonny, urbana، اوان، هیبرید ps515 CH فلات، متین، Bost، هیبرید ایون دارای قطعه ژن ASC1 بودند که AAL-Toxin پروتئین حاصل از بیان آن، قادر به سم زدایی بوده و بررسیها نشان داده است که وجود این ژن در گیاه میزان مانع بروز علائم بیماری شانکر ساقه می‌شود. تک باند دیده شده در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، همراه با پرایمر مربوطه برای توالی‌بایی به شرکت پیشگام ارسال شد. نتیجه سکوئنس نشان داد که باند ایجاد شده همان ژن مورد نظر می‌باشد. که نتیجه این توالی در پیوست نمایه شده است. این نتایج با مطالعات برخی از محققین همسو بود. کمترین میزان شاخص بیماری به رقمهای Early VF و هیبرید ps515 urbana مقاومت ASC1 را در این ارقام تأیید کرد. نتایج نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار بین ژنتیپها از نظر صفات بیماری (۱۶) که این امر در نتایج این تحقیق تأیید شد.

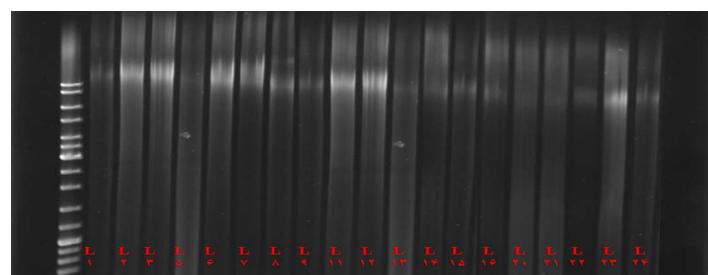
با توجه به تحقیقات براندواج (۲۰۰۲) که بر اساس آن مقاومت به وسیله ژن غالب ASC-1 در برابر قارچ *Alternaria alternata* f.sp. *lycopersici* ایجاد می‌شود. می‌توان مقاومت ارقام ذکر شده دارای این ژن را تأیید کرد. از آنجا که توالی این ژن به تازگی در سایتهاز معتبر درج گردیده است این یافته‌ها به صورت کاربردی برای اولین بار در ایران گزارش می‌گردد. فیتوتوکسین ALL toxin، که عامل اصلی ایجاد علائم است در تعامل پاتوژن میزان تولید می‌شود و صفت مورد بررسی QTL دارای مقاومت عمودی است در سایر ارقام نیز قابل بررسی است.

برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اجرا شده عبارت است از: چرخه نخست، دو دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ چرخه بعدی شامل، ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه، ۵۶ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه و چرخه نهایی ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه در دستگاه ترموسایکلرگرایانت Bio rad Mycycler™ مدل Bio rad انجام گرفت. این واکنش برای هر یک از نمونه‌ها ۵ بار تکرار شد و در این تحقیق برای تعیین وزن باند از DNA Ladder mix 10000 استفاده شده است. برای بررسی تکثیر قطعه ژن مورد نظر، از الکتروفورز محصول PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد با بافر TBE استفاده گردید.

**توالی‌بایی (sequence) :** پس از الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و تکثیر قطعه ژن در برخی ارقام، جهت اطمینان از صحت کار، قطعه تکثیر شده تعیین توالی شد.

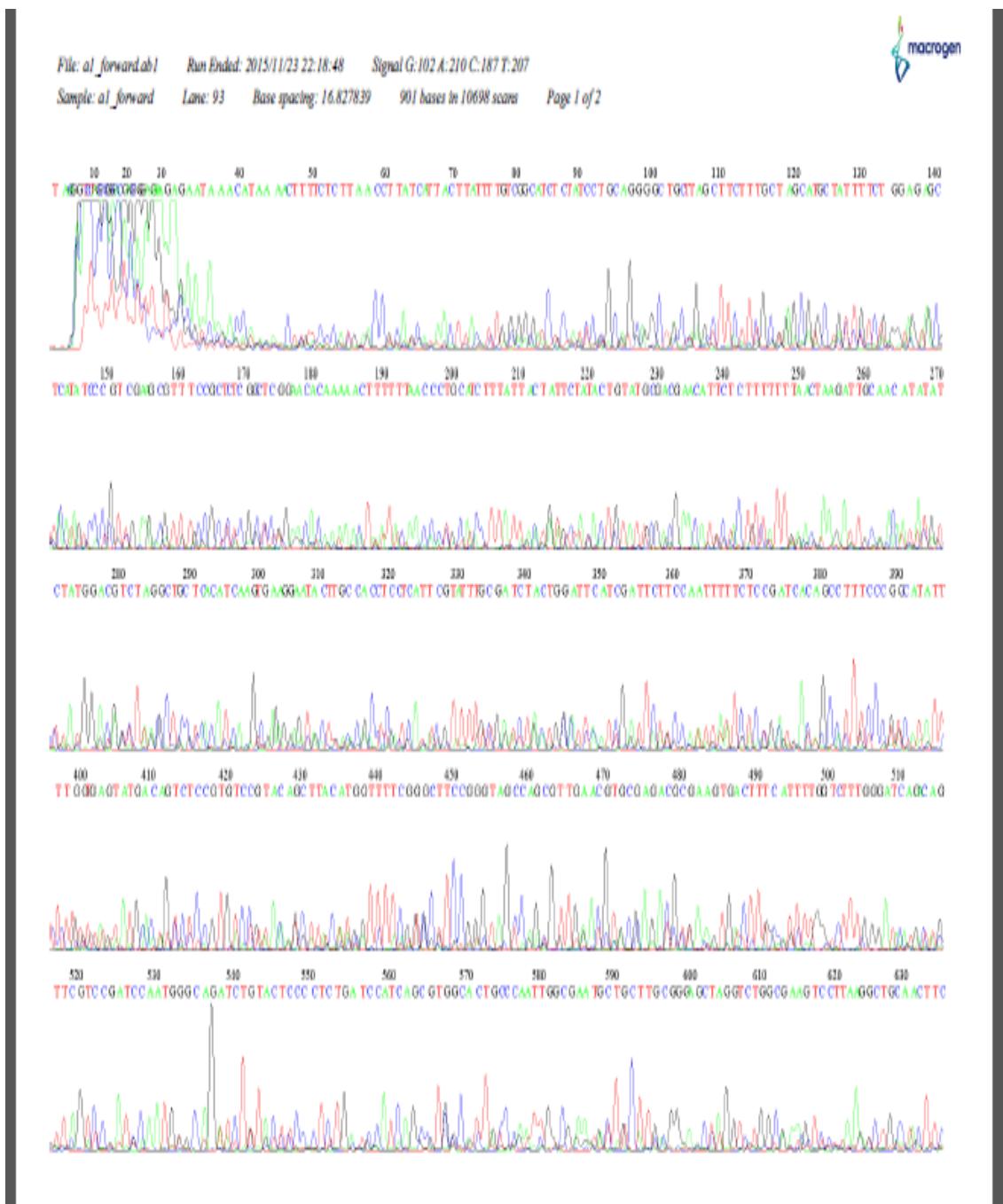
## نتایج و بحث

استخراج DNA به روش CTAB انجام شد. الگوی الکتروفورزی استخراج DNA در ارقام مختلف گوجه فرنگی در ژل آگارز ۱/۸ درصد در شکل ۲ آمده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طبق شرایط ذکر شده انجام و محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در ژل آگارز ۱/۲ درصد با بافر TBE الکتروفورز شد. برخی از ارقام قطعه ژنی به وزن ۱۲۰۰ bp تکثیر کردند. (شکل ۳) از بین ارقام مورد آزمایش، ارقام کال جی N3، VF اکسیر فلات، Early VF



شکل ۲- الگوی الکتروفورزی استخراج DNA در ارقام مختلف گوجه فرنگی در ژل آگارز ۱/۸ درصد

## پیوست یک



است. ارقام مختلفی از این گونه در ایران کشت می‌شود که برخی از آنها به دلیل پرمحصول بودن، زودرس بودن و یا کیفیت میوه بر ارقام دیگر ترجیح دارند همچنین با وجود اینکه اصلاح ژنتیکی بذر گیاهی توانسته است تا حدودی از

در حالی که اصلاح نباتات سنتی یک نقش محوری در توسعه ارقام مقاوم گوجه‌فرنگی را ایفا کرده است. لذا با توجه به اینکه گیاه گوجه‌فرنگی گونه‌ای اقتصادی است و تولید آن به صورت مزرعه‌ای و گلخانه‌ای در کشور مرسوم

محققان مورد بررسی قرار گرفته است تا از تولید گوجه فرنگی در مزرعه با تنشهای مختلف ممانعت شود.

طریق بهبود جوانه زنی در شرایط نامساعد، عملکرد را تحت تأثیر قرار دهد با این حال ویژگیهای دیگر این ارقام از نظر تحمل کمبودهای تغذیه‌ای و یا شرایط تنفسی نیز توسط

L5 L7 L11 L14 L15 L20 L22 L27 L29



1200 bp

شکل ۳- الگوی الکتروفورزی محصول PCR روی ژل آکارز ۱/۲ درصد

دسترسی به این زن و انتقال آن به ارقام حساس می‌توان به ارقام مقاوم با صفات زراعی مناسب دست یافت. آزمونهای بیماریزایی متعددی قابل طرح است که می‌تواند تأییدی بر تحقیقات انجام شده بوده و نتایج حاصل را به فضای گلخانه و مزرعه تعیین دهد. با امید به اینکه این تحقیقات، راه‌گشایی برای مطالعات جدید در شناسایی سریع و تولید ارقام مقاوم نسبت به بیماریهای مختلف باشد.

هدف از این پژوهشها علاوه بر معرفی رقمی با تحمل بیشتر نسبت به کمبودها و تنشهای همچنین افزایش مقاومت آنها در برابر شرایط نامساعد محیطی به شمار می‌رود (۲ و ۴) اما ردیابی مولکولی زن ثابت کرد که این روش می‌تواند یک ابزار بسیار مفید برای شناسایی مقاومت به سایر بیماریها در گوجه‌فرنگی باشد. با توجه به اینکه برخی ارقام با خصوصیات زراعی مناسب، فاقد زن مقاوم هستند، با

## منابع

۳. طاهری، س. (۱۳۹۰)، بررسی تنوع ژنتیکی مقاومت به لکه موچی آلتناریا گوجه فرنگی در کلکسیون بانک ژن گیاهی ملی ایران، پایان نامه ارشد رشته مهندسی بیوتکنولوژی کشاورزی گروه بیوتکنولوژی دانشگاه پیام نور کرج.
۴. نیک‌زاد، خ. و عمادآقایی، ر. (۱۳۹۲). تاثیر پراویمینگ بر جوانه زنی دانه‌های گوجه فرنگی در داماهای زیربهینه. مجله زیست‌شناسی ایران. جلد ۲۶. صفحات ۲۲۳-۲۲۵.
5. Andrew M, Peever T, et al. (2009). An expanded multilocus phylogeny does not resolve morphological species within the small-spored *Alternaria* species complex. *Mycologia*, 101: 95-109.
6. Amjad H , Akhtar K P, Saleem M Y, et al. (2010). Correlative evidence for peroxidase involvement in disease resistance against *Alternaria* leaf blight of tomato. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32: 1171-1176.
7. Aneja J , Agarwal A , & Agnihotri A. (2014). Inter and intra-specific diversity in *Alternaria* species infecting oilseed Brassicas in India. *Journal of Oilseed Brassica*, 5:102-117.
8. Aminian H, Zad J, Sharifi Tehrani A, Okhovat S M, et al.(2004). A study of tomato stem canker in Busher province. *Iranian Journal of Agriculture Sciences* 35: 245-252 (in Persian).

9. Barone, A., & Frusciante, L. (2007). Molecular marker-assisted selection for resistance to pathogens in tomato. Marker-Assisted Selection, Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish, 153-164
10. Guo, L., Hyde, K., & Liew, E. (2000). Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. New phytologist, 147(3), 617-630.
11. Meena P, Rani A, Meena R, Sharma P, Gupta R, et al. (2012). Aggressiveness, diversity and distribution of *Alternaria brassicae* isolates infecting oilseed Brassica in India. African J Microbiol Res, 6:5249-5258..
12. Margaret M T, Shi A, & Kim M. S. (2011). Identification of *Alternaria alternata* as a causal agent for leaf blight in *Syringa* species. The Plant Pathology Journal, 27: 120-127.
13. Miguel P A, Luna A , de la Cruz S , González I , Martín R , et al. (2012). PCR-based assay for the detection of *Alternaria* species and correlation with HPLC determination of altenuene, alternariol and alternariol monomethyl ether production in tomato products. Food Control, 25: 45-52.
14. Naik M K , Chennappa G, Bhat K V, et al. (2014). RESEARCH ARTICLE MOLECULAR AND PATHOGENIC DIVERSITY OF *ALTERNARIA* SP. SOLATED FROM SESAMUM BY SCAR MARKER. International Journal of Current Research Vol. 6, Issue, 09:8335-8350
15. Reni C, Voorrips R E. (2006). Tomato early blight (*Alternaria solani*): the pathogen, genetics, and breeding for resistance. Journal of general plant pathology, 72: 335-347.
16. Shahriari D, Kangarloo S, Lak F, Ghasemi M A, et al. ( 2009).Study on stem canker disease in tomato genotypes. Abstracts of the First National Congress on Tomato Production and Processing Technology. 11-12 February, Iran, Mashhad. page 108 (in Persian).
17. Tiwari S, Kumar S and Gontia I.( 2011). Biotechnological approaches for sesame (*Sesamum indicum* L.) and Niger (*Guizotia abyssinica* L.f. Cass). Asian Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 19:29.

## Molecular detection of tomato Resistance gene to stem canker disease caused by *alternata Alternaria*

**Pirifard Kh.<sup>1</sup>, Ebrahimi M.A.<sup>1</sup> and Pirayesh S.<sup>2</sup>**

**<sup>1</sup> Biotechnology Dept., Payame Noor University, Tehran, I.R. of Iran**

**<sup>2</sup> Ministry of Agriculture Jihad, Agriculture Dep. Tehran, I.R. of Iran**

### Abstract

The spread pathogenic fungi activity in crop plants, detailed studies on the control of pests and plant diseases, is considered essential. Tomato stem canker caused by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici* created the most important diseases of tomato in Iran. This pathogen produces phytotoxin called AAL-toxins that is sphingolipid biosynthesis inhibitor in host plants, causing stem canker. Resistance against pathogens and lack of sensitivity to the toxin, by the gene in the host plant is controlled ASC1. The protein product of this gene, is able to detoxify AAL-Toxin. Therefore, this study aimed to detect canker disease resistance gene in 34 major genotypes used in Iran. PCR products were sequenced the sequencer result showed that the gene is reproduced. That the genotype of the cultivars Cal Jay N3, Elixir plateau, VF Early urbana, Evan, hybrid ps515, CH Plateau, Matin, Bonny Bost, hybrid ion, had ASC1 gene. Resistant genotypes to stem canker were identified by molecular methods for the first time in Iran for further study.

**Key words:** Resistant varieties , *Alternaria alternata* ,Stem canker, Tomato