

رديابي هومولوگ ژن های مقاومت در تعدادي از ارقام خربزه

ناهید عباسپور^{۱*}، فرهاد شکوهی فر^۲

۱: فارغ التحصيل کارشناسي ارشد بيوتكنولوجی از دانشگاه بين المللی امام خميني قزوين: Nahidabaspour81@gmail.com

۲: عضو هيأت علمي دانشگاه فردوسی مشهد: Shokouhifar@um.ac.ir

چکیده:

تنوع بالاي ارقام و توده های محلی خربزه در کشور پشتوانه مناسبی را برای دستیابی به صفات ويژه و استفاده از آن در برنامه های اصلاحی مهیا نموده است. در اختیار بودن اطلاعات ژنومی خربزه در پایگاه های بين المللی بررسی توزیع ژن های مختلف ممکن ساخته است. مطالعه حاضر با هدف شناسائی هومولوگ ژن های مقاومت را در ارقام محلی خربزه انجام شد. توالی این ژن ها بر اساس داده های ژنومی ملون ها از بانک های اطلاعاتی بين المللی بدست آمد و براساس مناطق محافظت شده آن برای هر ژن پرایمرهای اختصاصی طراحی شد. با استفاده از برنامه Touchdown PCR باندهای اختصاصی در اندازه موردنظر تکثیر شد. بر اساس نتایج بدست آمده حضور ژن MRGH12 در تمامی ارقام تایید شد در حالیکه با استفاده از پرایمرهای طراحی شده دو ژن MRGH10 و MRGH11 در هیچ یک از این ارقام مشخص نشد. در مجموع حضور پنج ژن از هفت ژن در ارقام موردنظر تایید شد.

كلمات کلیدی: خربزه ثیان، هومولوگ ژن های مقاومت، الگوی مولکولی ارقام

مقدمه:

خربزه و طالبی (*Cucumis melo*) مهمترین گیاهان خانواده کدویان بشمار می روند که در ایران و بخصوص خراسان سطح زیر کشت قابل توجهی را بخود اختصاص داده اند (<http://www.koaj.ir>). تنوع ارقام و توده های محلی خربزه در کشور بسیار بالا است و می تواند پشتوانه مناسبی را برای دستیابی به صفات ويژه و استفاده از آن در برنامه های اصلاحی مهیا نموده است. با توجه به وجود عوامل بیمارگر متعدد مانند بیماری ضروری است با بررسی تنوع توده های بومی نسبت به شناسائی منابع مقاومت اقدام شود. با توجه به اهمیت ژن های مقاومت و در اختیار بودن اطلاعات زیادی در خصوص ژن های شناسائی شده می توان توزیع آنها را در توده های بومی مورد بررسی قرار داد.

مطالعات انجام شده در خصوص شناسائی و مکانیابی ژن های مقاومت در برابر نژاد های مختلف [۱] قارچ خاکزی (FOM) به شناسائی ناحیه ژنومی در خربزه منتج شده است که تعداد زیادی از ژن های مقاومت در یک گروه لینکازی قرار دارند [۲]. بررسی ها نشان داده است که ژن *Fom1* نیز در این ناحیه قرار گرفته است که عامل مقاومت در مقابل نژاد صفر و ۲ قارچ FOM است [۳-۵]. تا کنون تلاش های متعددی برای شناسائی توالی ژن *Fom1* تا کنون صورت گرفته است و مارکرهای مختلفی در پیوستگی با این ژن شناسائی و معرفی شده است [۳-۵]. با این



حال هنوز توالی ژن Fom-1 شناسائی نشده است. گزارش هایی نیز مبنی بر شناسائی منابع مقاومت جزئی در برابر نژاد ۱.۲ ارائه شده است [۶] ولی تا کنون ژن مسئول آن شناسائی نشده است.

گزارش های موجود حاکی از آن است که تنها نژادهای ۱ و ۱.۲ بطور محدود در مناطقی از ایران شناسائی شده است [۷]. بر این اساس انتظار می رود منابع مقاومت مناسبی در ژنوم توده های بومی خربزه ایران نهفته باشد. انتظار می رود با توجه به تنوع بالای توده های بومی خربزه در ایران با بررسی توزیع همولوگ ژن های مقاومت بتوان منابع مقاومتی مناسبی را جهت مقابله با بیماری های مختلف از جمله بیماری زردی و پژمردگی آوندی خربزه را شناسائی نمود. لذا مطالعه حاضر با هدف ردیابی همولوگ ژن های مقاومت و تعیین توزیع آنها در تعدادی از ارقام خربزه انجام شد.

مواد و روش ها:

نمونه های گیاهی: مواد گیاهی: بذر ارقام خاقانی، خاتونی و درگزی، شهد شیراز، مشهدی به ترتیب با کدهای MSB005، MSB006، MSB014، MSB008، MSB009 و سه رقم خارجی ۱، ۲، ۳ از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد.

استخراج DNA: از هر رقم سه بذر در گلدان های حاوی نسبت های مساوی از پیت:پرلیت:ورمیکولیت کشت شد و تا زمان ظهور برگ های حقیقی در دمای 24 ± 2 ساعت روشنایی نگهداری شد. از هر رقم سه گیاهچه انتخاب شد و از برگ های جوان نمونه گیری و درون ازت مایع فریز شد. بافت برگ درون تیوب های ۱.۵ میلی لیتری و با استفاده از میکروگریندر پودر گردید. استخراج DNA با استفاده از کیت (AccuPrep GMO DNA Extraction, Bioneer Co., South Korea) و بر اساس دستورالعمل ضمیمه آن انجام شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از ژل آگاروز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت.

طراحی آغازگرها و انجام پی سی آر: به منظور طراحی آغازگرها مناسب ابتدا توالی ژن های MRGH بر اساس داده های ژنومی ملون ها از بانک های اطلاعاتی بین المللی استحصال گردید و با استفاده از آنالیز بیوانفورماتیک هفت ژن MRGH انتخاب گردید و با توجه به الگوی حضور توالی های تکراری در دو مین های این ژن ها با استفاده از نرم افزار VectorNTI,11 آغازگرهای اختصاصی برای هر ژن طراحی گردید (جدول ۱).



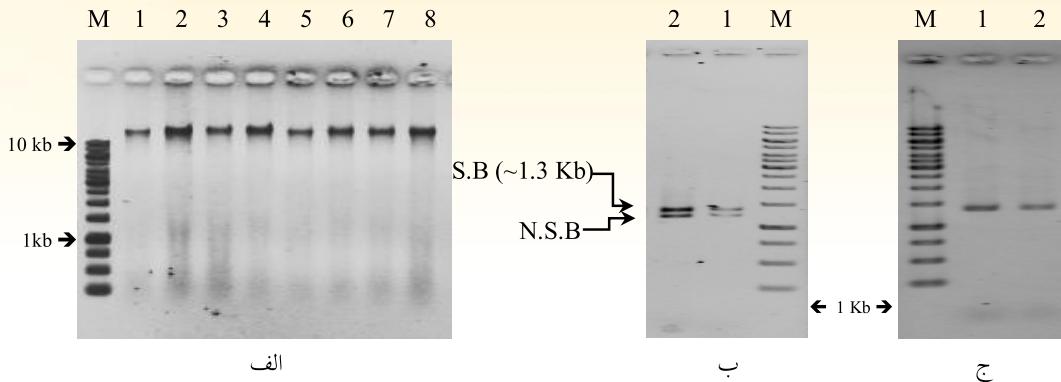
جدول ۱: مشخصات پرایمرهای طراحی شده جهت ردیابی همولوگ ژن های مقاومت در ارقام خربزه

Genes	primers	Sequence (5'- 3')	Ta (°C)
MRGH8	PSh23-F	GGCTGTGGCTTCGTGAGGATGTT	60
	PSh23-R	GGGTAGCCATGCCAACTGAGGAA	
MRGH9	PSh24-F	GGAGGGCTTCACAAAGGTTGGC	60
	PSh24-R	GCTAGCCACCTCAACGCTGCATT	
MRGH10	PSh25-F	CGACGAGCATCATCTCGAAGCCA	60
	PSh25-R	CGGC GGATGGAGAGAGGATTGTT	
MRGH11	PSh26-F	TGATGGTGCAGAACAGAGAGAAGGC	60
	PSh26-R	CGTTGGGGCAAACCTCTCGAA	
MRGH12	PSh27-F	TTCTCCTGCAAGGACACCAAGCC	60
	PSh27-R	GCTCTGAGGCAGACAAGGCATCAT	
MRGH13	PSh21-F	ATGACTCGACTTCCGAACCGAA	63
	PSh21-R	TTGCCATCTCTGGATGGCAT	
MRGH21	PSh22-F	TCCAGGCGATGTGAGGAAGCAA	63
	PSh22-R	TGCTAATGGAAGCCCTCCAGCAT	

واکنش PCR در حجم ۱۰ میکرولیتری و شامل ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی به همراه $MgCl_2$ ۲۵ میلی مolar، dNTPS ۱۰ میلی مolar، یک واحد از آنزیم Taq DNA polymerase, GeNetBio, South Korea) پلیمراز (Prime™ 10x PCR Buffer، پیکومول از جفت آغازگرهای PSH26، PSH25، PSH24، PSH23، PSH22 و PSH27 (سترن شده توسط SBS Genetech) با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf mastercycler gradiant, germany) و با برنامه حرارتی ۴ دقیقه در ۹۳ درجه سانتیگراد و ۳۵ چرخه با (۴۵ ثانیه در ۹۲ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه در دمای اتصال (جدول ۱)، یک دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد) و مرحله تکثیر نهایی با پنج دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد اعمال شد. بمنظور حذف باندهای غیر اختصاصی از برنامه Touchdown PCR استفاده شد.

نتایج

DNA ژنومی استخراج شده از ارقام مورد مطالعه دارای کمیت و کیفیت مطلوب بود (شکل ۱-الف). با توجه به ایجاد باندهای غیر اختصاصی توسط آغازگرهای psh21 و psh22 به منظور بهبود شرایط پی سی آر (شکل ۱-ب) و دستیابی به تک باند اختصاصی اقدام به انجام تاج دان پی سی آر گردید که نتایج حاصله نشان دهنده مطلوب بودن این روش و تاثیر آن در حذف باندهای غیر اختصاصی می باشد (شکل ۱-ج).



شکل (۱) الگوی الکتروفورزی نشان دهنده کیفیت DNA استخراج شده (الف)، محصول PCR (ب) و PCR Touchdown (ج) با استفاده از آغازگر PSh21
الف: ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸ : دو میکرولیتر از DNA استخراج شده به ترتیب مربوط به ارقام MSB005، MSB006، MSB008، MSB009، MSB014، MSB003، MSB012، MSB007، MSB013، MSB015، MSB016، MSB017، MSB018، MSB019، MSB020، MSB021
ب: نتایج PCR به روش معمول نشانده تکثیر دو باند اختصاصی (S.B) و غیر اختصاصی (N.S.B) در ارقام MSB005، MSB006، MSB008، MSB009، MSB014، MSB012، MSB013، MSB015، MSB016، MSB017، MSB018، MSB019، MSB020، MSB021
ج: نشان دهنده ظهور الگوی باند اختصاصی در اندازه ۱.۳ Kb ~ در ارقام با اعمال برنامه Touchdown PCR :M

آغازگرهای طراحی شده توانستند باندهایی را با اندازه مورد انتظار تولید نمایند، البته آغازگرهای PSH25 و PSH26 قادر به ردیابی توالی ژن مورد نظر در هیچ یک از رقمناهای نبودند. الگوی باندی بدست آمده بر اساس هفت جفت آغازگر طراحی شده نشان دهنده وجود تنوع در میان ارقام بررسی شده بود جدول (۲).

جدول ۲: الگوی توزیع همولوگ ژن های مقاومت در ارقام خربزه مورد مطالعه
همولوگ ژن های مقاومت

کد رقم	MRGH21	MRGH13	MRGH12	MRGH11	MRGH10	MRGH09	MRGH08
MSB009	+	+	+	-	-	+	+
MSB014	+	+	+	-	-	-	+
MSB008	+	+	+	-	-	+	+
MSB 1	+	+	+	-	-	+	+
MSB 2	-	-	+	-	-	+	+
MSB 3	-	-	+	-	-	+	-
MSB006	+	+	+	-	-	+	+
MSB005	+	+	+	-	-	+	+



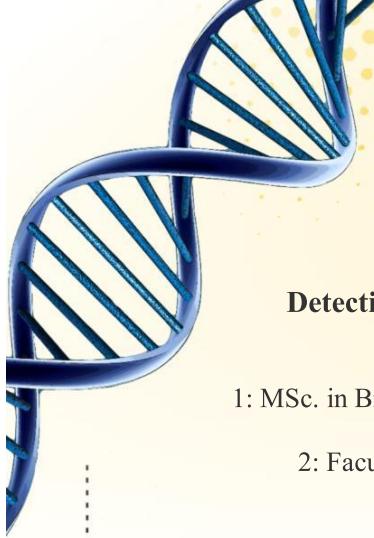
به طوری که آغازگر های PSH24 .PSH23 .PSH22 .PSH21 توانند الگوی باندی متمایز کننده ای را در بین ارقام موردمطالعه ایجاد نمایند. رقم 3 MSB 3، توسط سه آغازگر PSH23 .PSH22 .PSH21 قابل جداسازی از سایر ارقام موردمطالعه بوده و آغازگرها PSH22 .PSH21 نیز قابلیت شناسایی رقم 2 MSB را از سایر ارقام موردمطالعه بررسی دارند. از آغازگر PSH24 نیز می توان به منظور شناسایی رقم 4 MSB014 از سایر ارقام استفاده نمود.

سپاسگزاری:

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی و مدیریت محترم پژوهشکده علوم گیاهی که فضای آزمایشگاهی لازم را جهت اجرای این تحقیق مهیا نمودند صمیمانه تشکر می نمائیم.

برخی از منابع:

1. Risser, G., Z. Banihashemi, and D. Davis., (1976). *A proposed nomenclature of Fusarium oxysporum f. sp. melonis races and resistance genes in Cucumis melo*. Phytopathology,. 66: p. 1105 - 1106.
2. van Leeuwen, H., et al., (2005). *Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes*. Molecular Genetics and Genomics,. 273(3): p. 240-251.
3. Oumouloud, A., Arnedo-Andres., M. S., Gonzalez-Torres, R., Alvarez, J.M., (2008). *Development of molecular markers linked to the Fom-1 locus for resistance to Fusarium race 2 in melon*. Euphytica,. 164(2): p. 347-356.
4. Tezuka, T., et al., (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(2): p. 177-188.
5. Tezuka T., Waki K., Kuzuya 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(2): p. 261-267.
6. Chikh-Rouhou, H., et al., *Inheritance of race 1.2 Fusarium wilt resistance in four melon cultivars*. Euphytica: p. 1-10.
7. Banihashemi, Z., (2010). Z., *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(1): p. 11-22.



Detection of resistance gene homologous in number of melon cultivars

Nahid Abbaspour^{1*}, Farhad Shokouhifar²

1: MSc. in Biotechnology from the International University of Emam Khomeini of Qazvin,

Nahidabaspour81@gmail.com

2: Faculty member of Ferdowsi University of Mashhad, Shokouhifar@um.ac.ir

Abstract:

The high diversity of melon cultivars and accessions provided valuable genetic resources which could support the breeding programs. The public international melon data banks can be used to study distribution of a specific gene. This study aimed to identify homologous of the resistant genes in melon cultivars. Seven MRGH genes were selected and specific primers were designed in conserved domains of the genes. Specific bands in expected size were amplified using touchdown PCR. Based on the results the *MRGH12* gene was detected in all the cultivars while none of the two genes, *MRGH10* and *MRGH11*, was tracked in the cultivars using designed primers. Finally, the presence of five genes from the seven genes was confirmed in the cultivars.

Key words: melon, homologous resistance genes, molecular patterns.