# ردیابی و تکثیر ژن توماتیناز در نژاد ۱ قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*

فاطمه زرندی[*1]، **فرهاد شکوهیفر [2]، بهرام شریف نبی[3]، ضیاء الدین بنی هاشمی[4]، سید بدرالدین ابراهیم طباطبایی[5]**

**۱: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان**fateme.zarandi@yahoo.com

۲: عضو هیئت علمی پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳: عضو هیئت علمی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

٤: عضو هیئت علمی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

۵: عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

**چکیده:**

قارچ ها جهت غلبه بر سیستم دفاعی گیاه از ابزار مختلفی بهره می گیرند. ترکیبات فیتوآنتیسیپین از جمله مواد دفاعی است که در گیاه جهت جلوگیری از حمله پاتوژن ها تولید می شود. آنزیم توماتیناز جهت تجزیه فیتوآنتیسیپین و غلبه بر سیستم دفاعی گیاه توسط طیفی از قارچ ها از جمله تعدادی از فرم های اختصاصی قارچ *Fusarium oxysporum* تولید می شود. با توجه به جایگاه خربزه در کشاورزی استان خراسان و اهمیت بیماری زردی و پژمردگی آوندی خربزه در این مطالعه حضور ژن توماتیناز در جدایه های مربوط به نژاد یک ۱ قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* با هدف تکثیر و کلونینگ توالی ژنومی آن انجام شد. بدین منظور پرایمرهای اختصاصی PSh30-F/R بر اساس توالی ژن توماتیناز در فرم های اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* پس انتخاب مناطق اختصاصی در بالا دست و پائین دست توالی ژن طراحی شد. در الگوی الکتروفورزی محصول PCR جدایه ها تک باند به اندازه حدود ۱.۱ کیلوباز تکثیر شد که با قطعه مورد انتظار انطباق داشت. قطعه مورد نظر جهت مطالعات تکمیلی در وکتور کلونینگ pTG19-T کلون شد و به وسیله تکنیک کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و همچنین پرایمرها یونیورسال M13-F/R تایید شد. کلون های بدست آمده جهت توالی یابی و آنالیز بیشتر در مطالعات تکمیلی مورد استفاده قرار خواهند گرفت.

**کلمات کلیدی:** خربزه – بیماری زردی و پژمردگی آوندی خربزه – ژن توماتیناز – ردیابی ژن

**مقدمه:**

بیماری زردی و پژمردگی آوندی خربزه که در اثر قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (*Fom*) ایجاد می شود، یکی از معضلات اصلی کشت خربزه در استان های خراسان رضوی و شمالی می باشد(۱). در ایران تاکنون نژاد های ۱ از مشهد و گرمسار و نژاد ۱،۲ از استان فارس و اصفهان و اخیرا از کاشان گزارش شده است (۱). توماتین یک آلکالوئید گلیکوزیدی ست که در تعداد زیادی از گونه های گوجه فرنگی و سیب زمینی یافت شده است. این متابولیت ثانویه، با گروه B3 هیدروکسیل استرول های غشایی قارچ ترکیب و باعث تشکیل منفذ و تراوش محتویات سلولی می شود و از این طریق اثر سمی خود را روی قارچ اعمال می کند(5). بعضی از قارچ ها به علت عدم حضور استرول یا میزان کمی از آن در ترکیب غشایی خود به توماتین مقاوم هستند و بعضی از آنها نیز آنزیم های مخصوص سم زدایی توماتین را تولید می کنند . این آنزیم ها Tomatinase نام دارند و متعلق به دسته ای از آنزیم ها به نام ساپونینازها هستند (5). بعد از شناسائی آنزیم توماتیناز ( FoTom1) در قارچ *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (3)

فعالیت آنزیمی و پراکنش ژن *FoTom1* در بین ۳۰ جدایه از ۱۶ فرم اختصاصی مختلف از قارچ *F. oxysporum* مورد بررسی قرار گرفت. هرچند محققان توانستند فعالیت توماتینازی را در ۲۷ جدایه مربوط به ۱۵ فرم اختصاصی مشاهده نمایند، ولی همولوگ ژن *FoTom1* (با شباهت ۹۸ درصد) تنها در شش جدایه متعلق به چهار فرم اختصاصی شناسائی شد(2). در مطالعه دیگری روی فعالیت آنزیم توماتیناز در فرم های مختلف قارچ *F. oxysporum* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد فعالیت آنزیم توماتیناز علاوه بر فرم های اختصاصی *lycopersici* و *radicis-lycopersici* در فرم های غیر بیماریزا روی گیاه گوجه فرنگی مانند *gladioli*، *niveum*،*melonis* و *tuberose* نیز با وزن مولکولی مشابه با FoTom1 قابل مشاهده است (4). با توجه به گزارش فعالیت آنزیم توماتیناز در فرم اختصاصی *melonis* (2,4) و همچنین ردیابی بخشی از توالی کد کننده آن در ژنوم جدایه های مربوط به این فرم اختصاصی با استفاده از تکنیک هیبریداسیون ( 3)، ولی تاکنون توالی کامل این ژن در این فرم اختصاصی گزارش نشده است. لذا مطالعه حاضر با هدف ردیابی و تکثیر توالی کامل ژن توماتیناز در فرم اختصاصی *F. oxysporum* f.sp. *melonis* شد تا در مطالعات تکمیلی نسبت به کلونینگ، بیان و بررسی واکنش آن با ارقام مختلف خربزه اقدام گردد.

**مواد و روش ها:**

جدایه قارچ و باکتری: جدایه مربوط به نژاد یک فرم اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *melonis* شایع در استان خراسان رضوی (اهدایی دکتر ضیاءالدین بنی هاشمی، دانشگاه شیراز) تهیه شد. سویه DH5α از باکتری *E. coli* جهت مراحل کلونینگ مورد استفاده قرار گرفت. وکتور pTG-19-T (Vivantis Co. Malaysia) جهت کلونینگ محصول PCR استفاده شد.

تهیه میسلیوم و استخراج DNA: پلیت های حاوی محیط P.D.A (حاوی ۳۹ گرم Difco Potato Dextrose Agar Cat#213400) جهت کشت قارچ استفاده شد. قارچ ها بر روی محیط P.D.A کشت داده شده و در دمای 25°C نگهداری شدند. بعد از گذشت ده روز، میسلیوم های رشد کرده با استفاده از اضافه کردن آب استریل و 0.05%(v/v) توین 80 به سطح کشت، جمع آوری شدند.میسلیوم های جمع آوری شده، بعد از سانتریفیوژ با دور 8000rpm و مدت زمان 5 دقیقه، در حضور ازت مایع و ماسه استریل توسط گریندر پودر شدند. سپس مقدار 400µl بافر استخراج( SDS 3%, EDTA 0.5 mM PH8.0, Nacl 1mM, Tris-Hcl 0.1mM PH 8.0) به نمونه ها اضافه و در 400µl کلروفرم/فنول حل شده و به مدت 5 دقیقه در دمای 65°C انکوبه شدند. بعد از این که دمای نمونه ها به دمای اتاق رسید با دور 12000rpm و مدت زمان 5 دقیقه سانتریفیوژ انجام شد.بعد از اضافه کردن 300µl از محلول رویی به 300µl ایزوپروپانول سرد، نمونه ها به مدت 20 دقیقه به دمای -20°C انتقال یافتند. بعد از گذشت این زمان نمونه ها با دور 12000rpm و مدت زمان 15 دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت دور ریخته شده و میزان 300µl اتانول 70% سرد به میکروتیوب ها اضافه شد. مجدد با دور 12000rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. در پایان بعد از حذف تانول، پلت به دست آمده در 50µl آب استریل حل شد. کیفیت و کمیت DNA استخراج شده با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد مورد بررسی قرار گرفت.

تکثیر ژن توماتیناز: جهت تکثیر توالی هدف دمای آنلینگ در سه نقطه ۵۴، ۵۵، و ۵۶ درجه و غلظت DNA الگو در دو سطح ۶۰ و ۱۲۰ نانوگرم مورد مقایسه قرار گرفت و بهینه سازی شد. محتویات واکنش تکثیر در حجم ۲۵ میکرولیتری شامل ۶۰ نانوگرم از DNA ژنومی ارقام استخراج شده به واکنش ۱۰ میکرولیتری حاوی ۲.۵ میلی مولار $MgCl_2$، ۲۰۰ میکرومول dNTPs (GeNetBio, south Korea) و یک میکرولیتر بافر PCR 10X (GeNetBio, south Korea)، پنج پیکومول از آغازگرهای

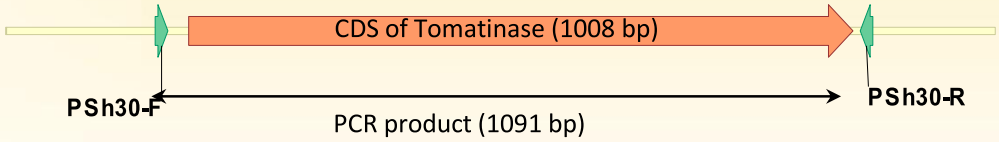
pSH30-F با توالی '5'- AGCCGCATAACAGCA -3' و pSH30-R با توالی '5'- TTGGCAACCTGAACC -3' (سنتز شده توسط SBS Genetech Co., Beijing's, China) ، یک واحد آنزیم تک پلیمراز ( Prime$^{TM}$ Taq DNA polymerase, GeNetBio, south Korea) اضافه شد و با برنامه حرارتی ٤ دقیقه در ٩٣ درجه سانتیگراد و ٣٥ چرخه با (٤٥ ثانیه در ٩٢ درجه سانتیگراد، ٣٠ ثانیه در دمای ٥٦ درجه سانتیگراد، یک دقیقه در ٧٢ درجه سانتیگراد) و مرحله تکثیر نهایی با پنج دقیقه در ٧٢ درجه سانتیگراد با استفاده از دستگاه ترمال سایکلر ( Primus 25 Thermal Cycler, MWG Biotech Inc.) استفاده شد. محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد حاوی ١٠٪ رنگ Green viewer الکتروفورز گردید و تصویر الگوی باندی تکثیر شده از نمونه ها با استفاده از دستگاه ژل داک تهیه شد.

کلونینگ و تایید کلنی های نوترکیب: قطعات تکثیر شده پس از تفکیک و تایید الگوی الکتروفورزی آنها، با استفاده از کیت استخراج از ژل (Gel Purification Kit, Bioneer South Korea) مطابق با دستورالعمل آن خالص سازی شد. کیفیت و کمیت قطعات حاصل با استفاده از الکتورفورز تعیین شد. جهت کلونینگ از کیت pTG19-T (Vivantis, Malaysia) استفاده گردید و روش کار بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. کلنی های نوترکیب با استفاده از روش کلنی PCR مطابق با دستورالعمل های معمول انجام شد [٥]. محتویات واکنش کلنی PCR مطابق با محتویات واکنش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PSh30-F/R و پرایمرهای یونیورسال M13 تهیه شد.

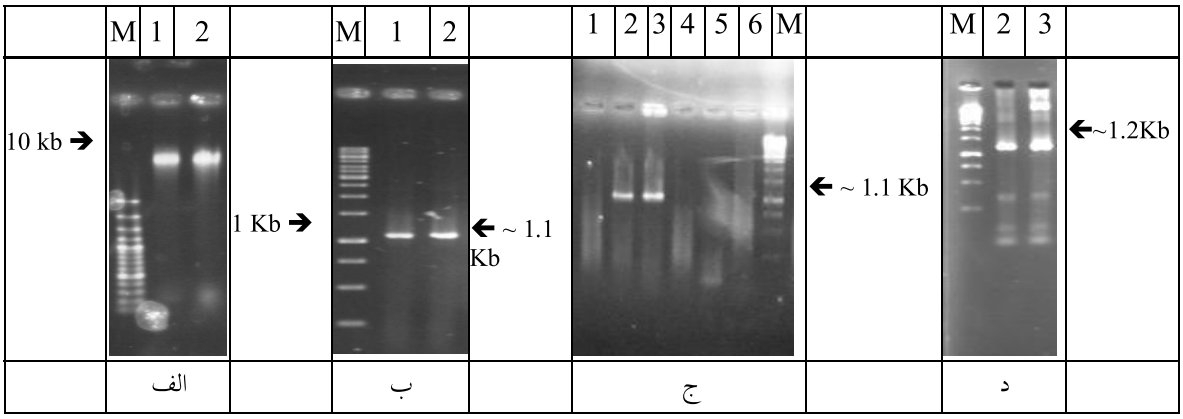
آنالیز داده ها و طراحی آغازگرهای اختصاصی: تاکنون توالی ژن توماتیناز در قارچ *FOM* گزارش نشده است، لذا توالی ژن *FoTom*1 (با شماره دستیابی AJ012668) و پروتئین توماتیناز مربوط به فرم اختصاصی *FOL* از پایگاه داده های زیستی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) بازیابی شد. مناطق بالادستی و پائین دستی توالی کدکننده، از طریق بلاست توالی پروتئین FoTom1 از بانک اطلاعات ژنومی قارچ فوزاریوم ( http://www.broadinstitute.org) بدست آمد . مناطق اختصاصی جهت طراحی پرایمر با استفاده از همردیفی چندگانه توالی های مشابه با استفاده از برنامه MegAline در بسته نرم افزاری DNA star انجام شد. جهت طراحی پرایمرهای اختصاصی از برنامه Primer premier V.5 استفاده شد.

**نتایج و بحث:**

نتایج بازیابی اطلاعات مربوط به ژن *FoTom*1 (کد دستیابی AJ012668) نشان داد این ژن به طول ١٠٠٨ جفت باز فاقد توالی اینترونی است و پروتئینی (کد دستیابی CAA10112.1) به طول ٣٣٥ اسید آمینه را کد می نماید. به منظور طراحی پرایمرهای اختصاصی توالی گسترده تری شامل مناطق بالادستی و پائین دستی توالی کدکننده، از طریق بلاست توالی پروتئین FoTom1 در مقابل بانک اطلاعات ژنومی قارچ فوزاریوم (http://www.broadinstitute.org) بدست آمد. نتایج نشان داد توالی هدف با پنج توالی کدکننده در ژنوم همولوژی نشان داد که تنها یکی از آنها به ژن *FoTom*1 مربوط بود و مابقی به زایلاناز ها تعلق داشت. توالی بالادستی و پائین دستی اختصاصی این ژن جهت طراحی پرایمرهای اختصاصی مناسب بود (شکل١). کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از جدایه های مربوط به قارچ *FOM* مناسب بود (شکل٢–الف). با استفاده از آغازگرهای طراحی شده باندی با وزنی حدود 1.1kb تکثیر شد که نشان دهنده تایید وجود ژن توماتیناز در *FOM* می باشد (شکل٢– ب).




شکل ۱: نمای شماتیک ژن توماتیناز نشان دهنده طول منطقه کدکننده ( CDS)، محل اتصال پرایمرهای اختصاصی طراحی شده ( PSH3-F/R) و طول قطعه قابل تکثیر از DNA ژنومی بر اساس توالی گزارش شده از فرم اختصاصی *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (رسم شده بوسیله نرم افزار Vector NTI V.11).




شکل ۲: الگوی الکتروفورزی (الف) DNA استخراج شده و (ب) محصول PCR حاصل از پرایمرهای اختصاصی PSh30-F/R مربوط به نژاد قارچ *F. oxysporum* f.sp. *melonis* نشان دهنده کیفیت DNA استخراج شده و تکثیر اختصاصی باند مربوط به ژن توماتیناز در اندازه مورد انتظار.
۱ و ۲: جدایه های نژاد ۱ قارچ FOM، M: 1Kb DNA Ladder . نتیجه کلنی PCR (ج) با استفاده از جفت پرایمر (PSh30-F/R) اختصاصی ژن *FoTom*1 و (د) پرایمرهای یونیورسال M13-F/R جهت تایید کلنی های نوترکیب. ج: 3 میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از جفت پرایمر PSh30-F/R نشان دهنده حضور قطعه تکثیر شده از ژن توماتیناز به اندازه تقریبی۱.۱ کیلوجفت باز. د: ۲ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از جفت پرایمرونیورسال M13-F/R نشان دهنده تک باند تکثیر شده با اندازه تقریبی۱.۲ کیلو جفت باز تایید کننده کلنی نوترکیب

قطعه تکثیر شده پس از خالص سازی از روی ژل در وکتور PTG19-T کلون شد. در تعدادی از کلنی های غربال شده روی محیط حاوی آمپیسیلین با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PSh30-F/R باند مورد با اندازه ۱.۱ کیلوباز تکثیر شد (شکل ۲–ج). کلنی های مثبت انتخاب شده با استفاده از پرایمر یونیورسال M13-F/R با تکثیر باند حدود ۱.۲ کیلوبازی تایید شدند (شکل ۲–د). نتایج این مطالعه نشان داد پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی ژن FoTom1 مربوط به فرم اختصاصی FOL توانستند منطقه ای با اندازه مورد انتظار را در ژنوم نژاد ۱ از فرم اختصاصی FOM تکثیر نمایند. مشاهده تک باند در الگوی الکتروفورزی جدایه های مورد مطالعه عملکرد اختصاصی پرایمرها را تایید نمود. حضور ژن توماتیناز در فرم اختصاصی FOM با استفاده از تکنیک هیبریداسیون قبلا گزارش شده بود( 2,4 ) که نتایج مطالعه حاضر نیز این مطلب را تایید می نمایند. قطعه تکثیر شده در مطالعات تکمیلی پس از توالی یابی مورد بررسی بیشتر قرار خواهد گرفت.

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

**منابع:**

1. **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(1): p. 11-22.
2. **Ito, S., Kawaguchi, T. and Nagata, A. 2004**. Distribution of the *FoToml* gene encoding tomatinase in formae speciales of *Fusarium oxysporum* and identification of a novel tomatinase from *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, the causal agent of Fusarium crown and root rot of tomato. J Gen Plant Pathol, 70: 195–201
3. . **Lairini, K., Perez- Espinisa, A., Pineda, M. and Ruiz-rubio, M. 1996**. Purification and Characterization of Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Applied and Environmental Microbiology. 62: 1604–1609.
4. **Lairini, K., Perez-Espinosa, A. and Ruiz-Rubio, M. 1997**. Tomatinase induction in formae speciales of *Fusarium oxysporum* non-pathogenic of tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50: 37-52.
5. **Pareja-Jaime, Y., Roncero, M.I. and Ruiz-Roldán,M.C. 2008**. Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Is required for full virulence on Tomato plants. MPMI 21: 728–736.

## Detection and amplification of *Tomatinase* in race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

Zarandi, F[1] . Shokohifar, F[2]. Sahrifnabi, B[3]. Banihashemi, Z[4]. Tabataei B[3].

1. Master student in Biotechnology, Isfahan University of Technology
2. Plant science research institute, Ferdowsi University o f Mashhad
3. Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology
4. Faculty of Agriculture, Shiraz University

E-mail: fateme.zarandi@yahoo.com

**Abstract:**

Fungi use different tools to overcome plant defense systems. Phytoanticipins are part of defense materials which are produced in plants to prevent invasion of pathogens. Tomatinase is produced and secreted by a range of fungi (including some forma specialis of *Fusarium oxysporum*) to degrade phytoanticipins. In this study due to agricultural importance of Melon in the Khorasan provinces, existence of *Tomatinase* have been investigated in genome of race 1 of *F. oxysporum* f. sp. *melonis* causal agent of Fusarium wilt disease as an economically important disease of melon. For this purpose, specific primers PSh30-F/R based on the *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici Tomatinase* gene were designed after defining the specific sites in up- and down-stream of the gene. Result shows the specific primer pair amplified a single 1.1 kb band of the expected size in the isolates. The segment cloned in pTG19-T vector and transferred to Dh5α. Recombinant colonies confirmed by colony PCR technique using the specific primer pair and M13 universal primers. A confirmed colony selected for sequencing and further analysis in future studies.

Keywords: melon, fusarium wilt disease, Tomatinase, gene detection