کلونینگ توالی کامل ژن *Fom2* از طالبی شهد شیراز

محدثه مقیمی خیرآباد*[۱]، شاهرخ قرنجیک [۲]، فرهاد شکوهی‌فر [۳] و مجتبی ممرآبادی[۳و۴]

۱، دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی شاهرود

۲، استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود

۳، استادیار پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد،

۴، استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

shokouhifar@um.ac.ir

دستیابی به توالی ژن‌های مقاومت در تولید ارقام مقاوم ارزش بالائی دارد. ژن *Fom2* بعنوان عامل مقاومت در مقابل نژاد صفر و یک قارچ *Fusarium oxysporum f. sp. melonis (FOM)* شناخته شده است. نتایج مطالعات قبلی حضور بخشی از توالی این ژن را در ارقام ایرانی خربزه و طالبی نشان داده است. این مطالعه با هدف بررسی توالی کامل این ژن و کلونینگ آن انجام شد. بدین منظور توالی کامل این ژن در بانک اطلاعات NCBI بازیابی شد و با انجام آنالیز های بیوانفورماتیک جفت پرایمر اختصاصی PSh20-2-F/R جهت تکثیر توالی کامل ژن طراحی شد. با توجه به مقاوم گزارش شدن رقم شهد شیراز (MSB006) ژنوم این رقم پس از استخراج بعنوان DNA الگو مورد استفاده قرار گرفت. در الگوی الکتروفورزی محصول PCR تک باندی به اندازه مورد انتظار (حدود ۳.۳ کیلوباز) مشاهده شد. قطعه تکثیر شده جهت توالی یابی در وکتور pTG19 کلون گردید. کلنی های نوترکیب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و یونیورسال M10 تایید شدند و بمنظور تایید نهایی توالی یابی نسبت به توالی یابی دو جهته آن اقدام شد. نتایج توالی یابی حضور ژن *Fom2* را در طالبی شهد شیراز مورد تایید قرار داد. این نتایج اولین گزارش از توالی ژن *Fom2* از ارقام ایرانی بشمار می رود و به شناسائی چندین موتاسیون منتج گردید.

واژگان کلیدی: ژن مقاومت، طالبی، بیماری زردی و پژمردگی آوندی، ژن کلونینگ

مقدمه

خربزه .*Cucumis melo* L از خانواده تیره کدوئیان *Cucurbitaceae* است که شامل طالبی، گرمک و.... می‌گردد (۱). بیماری پژمردگی فوزاریومی *Fusarium oxysporum* یکی از بیمارهای مهم خربزه می‌باشد. این بیماری در خربزه از قارچ *Fusarium oxysporu*m f. Sp. *melonis* (*FOM*) ناشی می‌شود که در مناطق معتدله وسردسیر بسیار شایع است (۱). یک کنترل موثر بر علیه این بیماری ایجاد گیاهان مقاوم به قارچ است. قارچ *Fusarium oxysporu*m f. Sp. *melonis* دارای چهار نژاد فیزیولوژیکی صفر، ۱، ۲ و ۱.۲ می‌باشد (۲). ژن *FOM*1 مقاومت به نژاد ۲ و ۰ و ژن *FOM*2 مقاومت به نژاد ۱ و ۰این بیماری را ایجاد می‌کند (۳). بیماری پژمردگی فوزاریومی به عنوان یکی از بیماری‌های مهم در کشور مطرح است و نبود منابع مقاومت به عنوان یکی از مشکلات برنامه‌های اصلاحی در اکثر گیاهان مطرح بوده و در خصوص این گیاه نیز قابل توجه است. انجام چنینی مطالعه‌ای جهت مهیا نمودن منابع مقاومت ضروری می‌باشد. بیماری پژمردگی فوزاریومی اولین بار در سال۱۹۳۳ از شمال آمریکا گزارش شد و در سال ۱۹۳۸ شناسایی و سال ۱۹۴۰اختصاصی بودن آن در خربزه ثابت شد. در ایران اولین بار در سال۱۳۴۴ عامل بیماری از خربزه‌های حومه مشهد در استان خراسان رضوی جداسازی گردید. در ایران تا کنون نژادهای ۱ از مشهد و گرمسار و نژاد ۱.۲ از استان فارس و اصفهان و اخیرا از کاشان گزارش شده است.

مواد و روش‌ها

بعد از جمع‌آوری بذور طالبی شهد شیراز واستریل آنها را در گلدان‌های دارای نسبت مساوی پیت: پرلیت: ورمی کولیت کشت شدند. گلدان‌ها در نور مصنوعی و در شرایط دمایی ۲۲ درجه سانتیگراد و با فتوپریود ۱۶ ساعت روشنائی و با رطوبت مناسب نگهداری شدند.

حدود یک گرم از برگ‌های جوان و تازه را با استفاده از گریندر در میکروتیوب ۱.۵ میلی‌لیتری در ازت مایع و ماسه استریل به طور کامل پودر گردید. و ۷۰۰µl از بافر استخراج (Nacl 5 M, $NaHso_3$ 38%, CTAB Tris 1 M and EDTA 0.5 M PH 8.0) را به نمونه‌ها اضافه می‌نمائیم و به دنبال آن ۵۰۰ µl کلروفرم:ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) را اضافه و در سانتریفیوژ بادور ۱۳۰۰۰rpm و زمان ۱۵ دقیقه قرارداده سپس ۶۵۰ µl از محلول روئی را برداشته و به ۵۰۰ µl ایزوپروپانل سرد اضافه و در فریزر به مدت ۳۰ دقیقه قرار می‌دهیم و سپس درون سانتریفیوژ با دور ۱۳۰۰۰ rpm و زمان ۱۵ دقیقه و دمای 4^oc گذاشته محلول روئی را خارج و پلیت انتها را در ۳۰ µl آب استریل حل می کنیم. کمیت و کیفیت DNA روی ژل آگارز ۱ درصد و با استفاده از الکتروفورز بررسی شد .

برای انجام واکنش PCR یک میکرولیتر از DNA ژنومی به واکنش ۱۰میکرولیتری حاوی ($Mgcl_2$, Tag, dNTPs, Primer, PCR Buffer) اضافه شد. و در برنامه دمائی ۳ دقیقه در ۹۳ درجه سانتیگراد و ۳۵ چرخه با (۴۵ ثانیه در ۹۲ درجه سانتیگراد، ۴۵ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد) و مرحله نهای ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد در دستگاه گرادیانت قرار داده شد. محصول واکنش در ژل آگارز ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

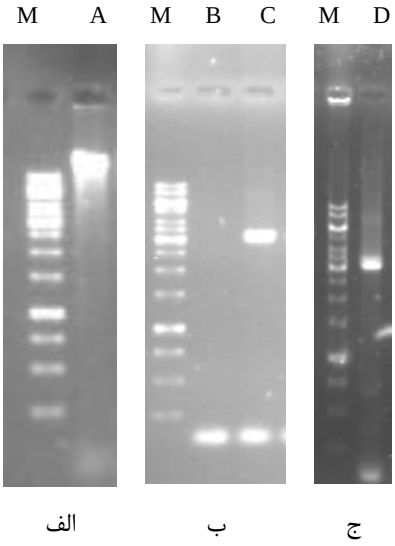
بعد محصولات PCR را با استفاده از کیت (*AccuPrep* Gel Purification Kit, Bioneer) مورد خالص سازی قرار دادیم و قطعه مورد نظر را در وکتور PTG کلون گردید.

نتایج و بحث

توالی کامل ژن *FOM2* از بانک اطلاعات NCBI بازیابی شد، این ژن در منطقه ای بطول ۳۳۰۷ جفت باز در ژنوم خربزه قرار دارد. طول توالی کد کننده آن بطور کلی ۳۲۲۲ باز است و پروتئینی شامل ۱۰۷۴ اسید آمینه را کد می نماید. این ژن به طور کامل اگزون بوده و حاوی مناطق اینترونی نمی‌باشد.

کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از طالبی شهد شیراز با استفاده از روش بکار برده شده مناسب بود و غلظت آن در مقایسه با باند شاهد در مارکر وزنی بکار برده شده در حدود۱۰۰ نانوگرم در میکرولیتر تخمین زده شد (شکل الف). با استفاده از پرایمر Psh20-2 توالی کامل ژن در طالبی شهد شیراز شناسایی و قابل تکثیر می‌باشد (شکل ب). محصولات PCR بعد از خالص سازی در وکتور pTG کلون شد و سپس عمل استخراج پلاسمید را مطابق با کیت (Plasmid DNA *PrimePrep* Isolation Kit, GeNet Bio) انجام داده و و بعد از تایید پلاسمیدهای نوترکیب (شکل ج) نمونه‌ها توالی‌یابی شد و نتایج آنالیز تنوع را ثابت کرد.

با توجه به اهمیت نژاد ۱ در میان نژادهای مختلف قارچ *Fusarium oxysporu*m f. Sp. *melonis* و حساسیت اکثر ارقام به این نژاد، ژن *FOM2* در طالبی شهد شیراز بررسی شد. بر اساس مطالب موجود طالبی شهد شیراز جزء ارقام مقاوم به نژاد ۱است و ژن *FOM2* در این رقم ردیابی و تکثیر شد. انجام چنینی مطالعه-ای جهت مهیا نمودن منابع مقاومت برای سایر ارقام ضروری است.



الف: الکتروفورز DNA استخراج شده: نمونه A ۳ میکرولیتر DNA رقم طالبی شهد شیراز

ب: PCR با پرایمر Psh20-2: نمونه B, C به ترتیب ۳ میکرولیتر از محصول PCR کنترل منفی و رقم طالبی شهد شیراز

ج: PCR با پرایمر Psh10: نمونه D ۵ میکرولیتر از محصول PCR رقم طالبی شهد شیراز

M: مارکر وزنی 1kb

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی و مدیریت محترم پژوهشکده علوم گیاهی که فضای آزمایشگاهی لازم را جهت اجرای این تحقیق محیا نموده‌اند صمیمانه تشکرمی‌نمائیم.

منابع

1- Banihashemi, Z. 2010. Reaction of cucumis melo cultivars to races of *fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* the cause of melon vascular whit. Iranian journal of plant pathology. 46, 11-22.

2- Mas, P. Molot, PM. Risser, G. 1981. Fusarium wilt of muskmelon. In: Nelson, PE. Toussen, TA. Cook, RJ. eds. Fusarium: .Disease, Biology and Taxonomy. University Park, PA, USA: Pennsylvania State University Press, 169–77.

3- Wang, Y. H. Thomas, C. E. Ralph, A. D. 2000. Developments of functional markers for *Fom-2*-mediated fusarium wilt resistance based on single nucleotide polymorphism in melon (*Cucumis melo L.*). Mol Breed 27(3):385-393.