کلونینگ و مقایسه توالی ژن توماتیناز از دو نژاد ۱ و ۱.۲ قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis*

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

1)دانشجوی کارشناسی ارشد گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان 2)عضو هیئت علمی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان 3)عضو هیئت علمی پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد 4)عضو هیئت علمی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز 5)عضو هیئت علمی گروه بیوتکنولوژی دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

shokouhifar@um.ac.ir

توماتیناز یک آنزیم مهم در تجزیه ترکیبات فیتوآلکسینی بشمار می رود. فیتوآلکسین ها بعنوان اولین سد دفاعی گیاه در مقابله با پاتوژن ها بشمار می رود. مطالعات اولیه نویسندگان حضور ژن توماتیناز را در نژاد ۱ قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (FOM) تایید نمود. این مطالعه با هدف مطالعه توالی کامل این ژن و بررسی تنوع آن در نژاد های ۱ و ۱.۲ بعنوان دو نژاد رایج در ایران انجام شد. بدین منظور با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PSh30-F/R توالی کامل ژن توماتیناز از DNA ژنومی دو نژاد مورد مطالعه تکثیر شد. باند های تکثیر شده به اندازه ۱.۱ کیلوباز در وکتور pTG-19 کلون گردید. تکنیک کلنی PCR با پرایمرهای اختصاصی و پرایمرهای یونیورسال M13 به منظور تایید کلونی های نوترکیب بکارگرفته شد و بمنظور تایید نهایی، توالی یابی بصورت دو جهته انجام شد. آنالیز داده های حاصل نشان داد که توالی تکثیر شده در دو نژاد مربوط به ژن توماتیناز است. این توالی ها شباهت بالائی با توالی گزارش شده از ژن توماتیناز مربوط به فرم اختصاصی *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopercisi* نشان داد. این مطالعه به شناسائی چندین موتاسیون در توالی این ژن در نژاد های ۱ و ۱.۲ منتج شد.

واژگان کلیدی: توماتیناز، کلونینگ، تنوع ژنی، قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*

مقدمه

بیماری زردی و پژمردگی آوندی خربزه که در اثر قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (*Fom*) ایجاد می شود، یکی از مهم ترین بیماری های خربزه در استان های خراسان رضوی و شمالی می باشد(1). این قارچ روی طیف وسیعی از گونه های گیاهی بیماریزا است و بر اساس نوع میزبان بصورت فرم های اختصاصی و براساس ارقام افتراقی حامل ژن های مقاومت به نژاد های مختلف تقسیم می شوند. بیشتر از ۱۰۰ فرم اختصاصی و نژاد از *F. oxysporum* شناسایی شده است (2). در ایران تاکنون نژاد های ۱ از مشهد و گرمسار و نژاد ۱،۲ از استان فارس و اصفهان و اخیرا از کاشان برای *F. oxysporum* f.sp. *melonis* گزارش شده است (1). سیستم های دفاعی گیاه در دو نوع از پیش ساخته شده و القائی قابل تفکیک می باشد یکی از متابولیت های ثانویه که قبل از حمله بیمارگر، تولید می شود توماتین است. این ترکیب آلکالوئیدی که در تعداد زیادی از گونه های گوجه فرنگی و سیب زمینی یافت می شود، شامل دو جزء توماتیدین و تتراساکارید بی لیکوتتراوز می باشد. توماتین با استرول های غشایی قارچ ترکیب و باعث تراوش محتویات سلولی و مرگ قارچ می شود. در مقابل بعضی از قارچ ها برای مقابله با این سد دفاعی آنزیم های مخصوص سم زدایی توماتین به نام Tomatinase را تولید می کنند. فعالیت توماتیناز در قارچ هایی که پاتوژن گوجه فرنگی هستند مثل *Alternaria solani*، *Botrytis cinerea*، *Lycopersici* f.sp. *F. oxysporum*، *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici*، *F. solani* و *Septoria lycopersici* و *Verticillium albo-atrum* مشاهده شده است.(3). 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*، *melonis*، *niveum* و *tuberose* نیز مشاهده است (4). با توجه به اینکه تاکنون توالی کامل ژن توماتیناز در فرم اختصاصی *melonis* به طور مستقل بررسی نشده است لذا این مطالعه با هدف کلون توالی کامل این ژن در دو نژاد1 و 1.2 به عنوان نژاد های شایع در ایران و بررسی تنوع آن در مقایسه با توماتیناز گزارش شده از فرم اختصاصی *Lycopersici* (*FoToml*) انجام شد.

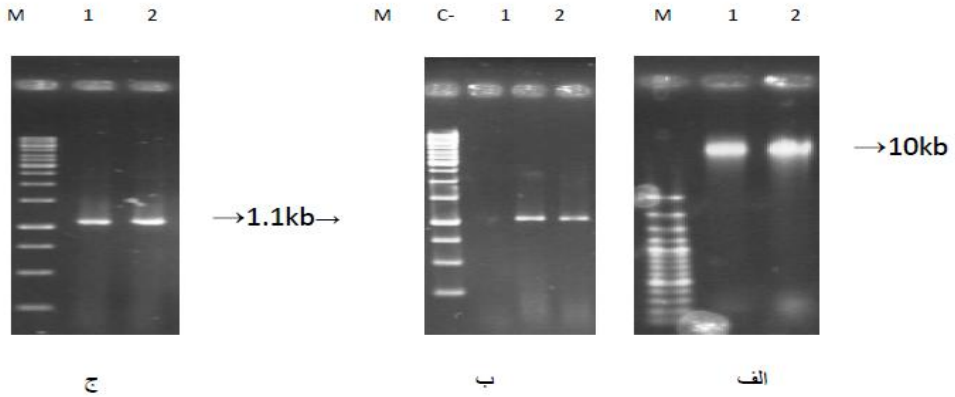
مواد و روش‌ها

جدایه مربوط به نژاد 1 فرم اختصاصی *F. oxysporum* f. sp. *melonis* شایع در استان خراسان رضوی و نژاد 1.2 شایع در استان فارس (اهدایی دکتر ضیاءالدین بنی هاشمی، دانشگاه شیراز) تهیه شد. سویه DH5α از باکتری *E. coli* جهت مراحل کلونینگ و وکتور pTG-19-T (Vivantis Co. Malaysia) جهت کلونینگ محصول PCR استفاده شد. طراحی آغازگرهای اختصاصی نیز براساس اطلاعات گزارش شده از *FoToml* با استفاده از برنامه Primer premier V.5 انجام شد(5). بعد از تهیه میسلیوم و استخراج DNA (۵) با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Psh30-F با توالی 5'-

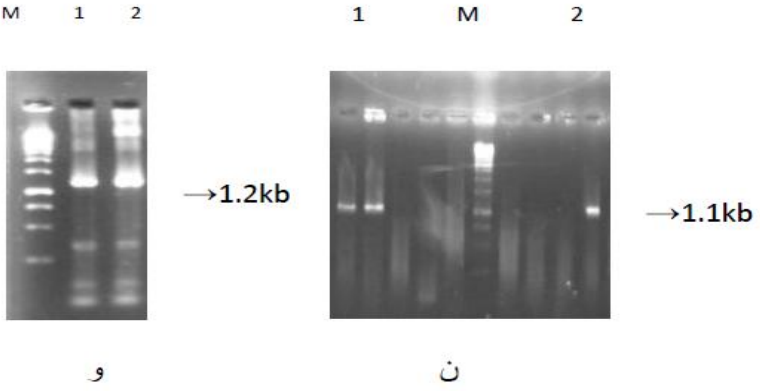
'AGCCGCATAACAGCA -3 و PSH30-R با توالی '5- TTGGCAACCTGAACC -3 (سنتز شده توسط SBS Genetech Co., Beijing's, China) تکثیر ژن توماتیناز صورت گرفت.(5) محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد حاوی۱۰٪ رنگ Green viewer الکتروفورز گردید و تصویر الگوی باندی تکثیر شده از نمونه ها با استفاده از دستگاه ژل داک تهیه شد. قطعات تکثیر شده پس از تفکیک و تایید الگوی الکتروفورزی آنها، با استفاده از دستورالعمل کیت استخراج از ژل (Gel Purification Kit, Bioneer South Korea) خالص سازی شد. کیفیت و کمیت قطعات حاصل با استفاده از الکتروفورز تعیین شد. جهت کلونینگ از کیت pTG19-T (Vivantis, Malaysia) استفاده گردید و روش کار بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. کلنی های حاصله به عنوان کلون های حاوی قطعه مورد نظر انتخاب گردیدند. قطعات کلون شده پس از تایید توسط روش کلنی PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PSh30-F/R و پرایمر یونیورسال M13، جهت تعیین توالی مورد استفاده قرار گرفت. به منظور تعیین توالی دقیق قطعات کلون شده، تعیین توالی در دو جهت با استفاده از آغازگرهای Psh30-F/R انجام گردید. آنالیز نتایج حاصل از توالی یابی با استفاده از برنامه Seqman در بسته نرم افزاری DNA star انجام شد. مقایسه توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه ای ژن *FoToml* توسط نرم افزار Mega5 صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج این مطالعه نشان داد پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی ژن *FoToml* توانستند منطقه ای با اندازه مورد انتظار را در ژنوم نژاد ۱ و 1.2 از فرم اختصاصی FOM تکثیر نمایند. مشاهده تک باند در الگوی الکتروفورزی نژاد های مورد مطالعه عملکرد اختصاصی پرایمرها را تایید نمود. نتایج مطالعه حاضر و تکثیر قطعه ای در اندازه حدود ۱.۱ کیلوباز که با اندازه مورد انتظار از توالی این ژن در FOL انطباق داشت، حضور این ژن را در دو نژاد شایع قارچ FOM قوت بخشید. 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 انتظار با اندازه ۱.۱ کیلوباز تکثیر شد. کلنی های مثبت انتخاب شده با استفاده از پرایمر یونیورسال M13-F/R با تکثیر باند حدود ۱.۲ کیلوبازی تایید شدند.



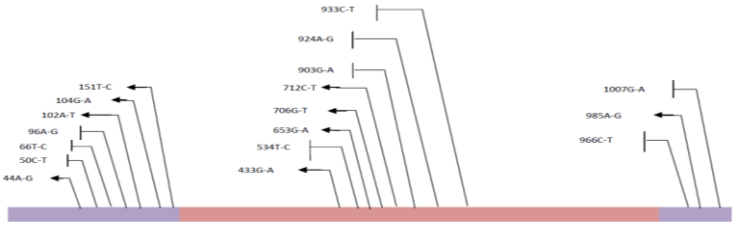
شکل ۱: الگوی الکتروفورزی (الف) DNA استخراج شده (ب) محصول PCR حاصل از پرایمرهای اختصاصی PSh30-F/R مربوط به نژاد 1.2 قارچ FOM(ج) محصول PCR حاصل از پرایمرهای اختصاصی PSh30-F/R مربوط به نژاد 1 قارچ FOM .۱ و ۲: جدایه های قارچ M:FOM 1Kb DNA Ladder



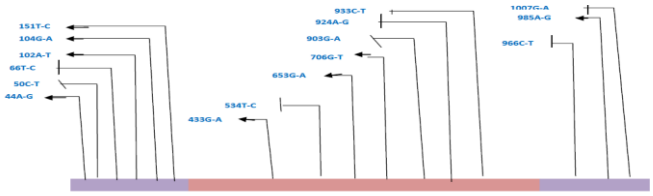
شکل2: نتیجه کلنی PCR (ن) با استفاده از جفت پرایمر (PSh30-F/R) اختصاصی ژن *FoToml* و (و) پرایمرهای یونیورسال M13-F/R جهت تایید کلنی های نوترکیب. 1: جدایه نژاد 1 ، 2: جدایه نژاد 1.2 قارچ FOM

مقایسه و آنالیز توالی توماتیناز در دو نژاد 1 و 1.2 با استفاده از نرم افزارهای Seqman و Mega 5 صورت گرفت . این بررسی ها تغییراتی را در دومین گلیکوزیل هیدرولازی آن نشان داد که بعضی از این تغییرات در سطح اسید آمینه معنی دار بودند. به عنوان مثال در جایگاه 433 توالی نوکلئوتیدی تبدیل باز گوانین به آدنین باعث تغییر اسید آمینه آسپارتیک اسید به آسپاراژین، در جایگاه 653 توالی نوکلئوتیدی ، تغییر باز گوانین به آدنین منجر به تبدیل آرژینین به لیزین، در

جایگاه 706 تغییر باز گوانین به تیمین باعث تبدیل والین به لوسین و تغیر باز سیتوزین به تیمین در جایگاه 712باعث تبدیل پرولین به سرین شد.هم چنین تغییراتی در منطقه خارج از دومین توماتیناز نیز مشاهده شد که تعدادی از آن ها در سطح اسید آمینه معنی دار بودند.



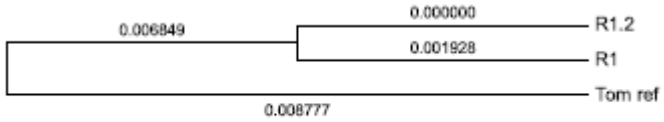
ه



ی

شکل ۳: (ه) نمای شماتیک تنوع توالی در سطح نوکلئوتیدی ژن توماتیناز کلون شده از نژاد یک قارچ و (ی) نژاد 1.2قارچ FOM در مقایسه با ناحیه کد کننده ژن توماتیناز مربوط به FOL .دومین گلیکوزیل هیدرولازی با باکس صورتی رنگ نشان داده شده است. تغییرات DNA که منجر به موتاسیون در پروتئین نشده با علامت T و تغییراتی که باعث تنوع اسید آمینه شده اند با علامت فلش سیاه رنگ مشخص شده است.

ارتباط فیلوژنتیکی بین توماتیناز مربوط به نژاد 1 و 1.2 فرم اختصاصی *Melonis* و توماتیناز مربوط به فرم اختصاصی *Lycopersici* نیز با استفاده از نرم افزار Mega5 رسم شد.



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 مهیا نمودند، صمیمانه تشکر می نماییم.

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)- Cira, L.A., Gonzales, G.A., Torres, J.C., Pelayo, C., Gutie´rrez, M. and Ramı´rez, J. 2008. Heterologous expression of *Fusarium oxysporum* tomatinase in *Saccharomyces cerevisiae* increases its resistance to saponins and improves ethanol production during the fermentation of *Agave tequilana* Weber var. azul and *Agave salmiana* must. Antonie van Leeuwenhoek 93: 259–266.

(3)- 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.

(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) Zarandi, F., Shokohifar, F., Sahrifnabi, B., Banihashemi, Z. And Tabataei, B.2012. Detection and amplification of *Tomatinase* in race 1 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. Iranian Genetics Congress, 12.