ردیابی،تکثیر و توالی یابی بخشی از ژن MRGH21 در رقم خاتونی خربزه

ناهید عباسپور[۱]، فرهاد شکوهی فر[۲]

۱: فارغ التحصیل کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی از دانشگاه بین المللی امام خمینی قزوین،
۲: عضو هیات علمی پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

Shokouhifar@um.ac.ir

ژنوم گیاهان دارای تعداد زیادی از ژن های مقاومت می باشد که در سیستم دفاعی گیاه جهت مقابله با عوامل بیمارگر مشارکت دارند. ژن MRGH21 از جمله همولوگ ژن های مقاومت است که به دلیل حضور دومین های خاص در گروه پروتئین های نوع TIR-NBS-LRR قرار می گیرد. ژن MRGH21 به همراه ژن Fom1 در یک گروه لینکاژی قرار دارند. ژن Fom1 مسئول مقاومت به نژادهای ۰ و ۲ قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis* عامل زردی و پژمردگی آوندی در خربزه می باشد. به منظور ردیابی بخشی از ژن MRGH21 در خربزه ایرانی رقم خاتونی بر اساس توالی کانتیگ BAC31O16 یک جفت آغازگر اختصاصی برای اگزون های اول و دوم این ژن طراحی گردید. قطعه تکثیر شده در وکتور pTG19 کلون گردید و بصورت دو جهته توالی یابی شد. با استفاده از نرم افزار های Seqman و BLAST نتایج مورد آنالیز قرار گرفت. الگوی الکتروفورزی محصول PCR تکثیر تک باند اختصاصی با اندازه مورد انتظار (۱۵۰۰ جفت باز) را نشان داد. آنالیز BLAST انطباق کامل توالی تکثیر شده را با توالی ژن MRGH21 تائید نمود. نتایج این مطالعه حضور ژن MRGH21 را در سطح ژنوم رقم خاتونی تائید شد. انتظار می رود دیگر ژن های این گروه لینکاژی نیز در این رقم قابل ردیابی باشد.

واژگان کلیدی: همولوگ ژن های مقاومت، ژن MRGH21، خربزه، ارقام مقاوم

مقدمه

از جمله مکانیسم هایی که گیاهان برای دفاع در برابر پاتوژن ها به کار می بردند استفاده از ژن های مقاومت می باشد. گروه بزرگی ازهومولوگ ژن های مقاومت پروتئین های درون سلولی را کد می کنند که شامل دومین LRR (leucine -rich repeat) و موتیف NBS (nucleotide binding site) می باشند که انتهای N آنها دارای دومین TIR (Toll/Interleukin-1 receptor) یا دومین CC (coiled- coil) می باشد و به احتمال زیاد در سیتوپلاسم قرار دارند. تا کنون حضور همولوگ ژن های مقاومت در جمعیت ملون ها مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات انجام شده به منظور شناسایی هومولوگ ژن های مقاومت در جمعیت ملون ها منجر به شناسایی ۱۵ هومولوگ ژن NBS-LRR مقاومت شد که بسیاری از ژن های شناسایی شده در مجاورت مکان های ژنی مقاومت به بیماری پژمردگی آوندی Fusarium oxysporum، ویروس حلقه نقطه ای عنبه و آفت Aphis gossypii. قرار داشت. هومولوگ ژن های NBS47-3 و NBS-3 به ترتیب با ژن های Fom1 و Fom2 لینکاژ نشان دادند [۱]. افزایش بیان هومولوگ ژن های MRGH 11، MRGH21 و MRGH63 در گیاهان آلوده به ویروس خشخاشی توتون (Tobacco Rattle Virus) و قارچ Fusarium oxysporum f. sp. melo قابل توجه بود [۲]. آنالیز کتابخانه های کروموزمی مصنوعی 31O16 که دارای یک گروه از هومولوگ ژن های مقاومت می باشد، منجر به شناسایی ۳ مارکر جدید که با Fom1 لینکاژ دارند، شد [3] . هومولوگ ژن MRGH21 در گروه لینکاژی ۷ به همراه Fom1 حضور داشت [۴]. دو ژن Fom 1 و Fom 2 به ترتیب مسئول مقاومت به نژادهای ۰ و ۲ و ۰ و ۱ قارچ خاکزی Fusarium oxysporum f sp melonis عامل بیماری زردی و پژمردگی آوندی در خربزه می باشند [۵].این قارچ از جمله عوامل خسارت زا عمده خربزه به شمار می رود. این مطالعه با هدف ردیابی همولوگ ژن MRGH21 در رقم خاتونی خربزه ایرانی انجام شد تا در صورت حضور این ژن بتوان از آن در سایر برنامه های اصلاحی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

نمونه های گیاهی: بذور رقم خاتونی با کد MSB008 از بانک بذر پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد.

استخراج DNA: پس از کشت بذور رقم خاتونی[۶] 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: به منظور طراحی آغازگرهای مناسب ابتدا توالی ژن MRGH21 بر اساس داده های ژنومی ملون ها از بانک های اطلاعاتی بین المللی استحصال گردید و با توجه به الگوی حضور توالی های تکراری در دومین های این ژن با استفاده از نرم افزار VectorNTI,11 آغازگرهای اختصاصی طراحی گردید.

انجام PCR: واکنش PCR آغازگرهای Psh22-f//r انجام شد [۶]. به منظور حذف باندهای غیر اختصاصی از برنامه Touchdown PCR استفاده شد.

استخراج پلاسمید: استخراج پلاسمید از کلنی های نوترکیب بوسیله کیت (Plasmid exteraction kit, BIONEER, South Korea) و با استفاده از دستورالعمل کیت انجام شد.

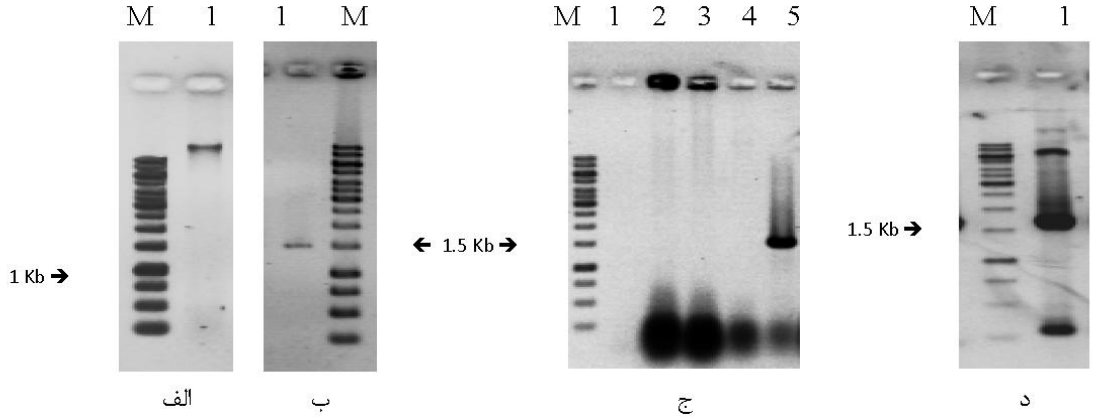
کلونینگ و تایید کلنی های نوترکیب: جهت کلون قطعه تکثیر شده از کیت pTG19-T cloning vector (Vivantis, Malaysia) استفاده گردید و روش کار بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد. جهت تائید کلنی های نوترکیب از روش کلنی PCR مطابق با دستورالعمل های معمول استفاده شد. محتویات واکنش کلنی PCR مطابق با محتویات واکنش PCR و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی PSh22-f/r و پرایمرهای یونیورسال M13 تهیه شد.

توالی یابی و آنالیز نتایج: داده های حاصل از توالی یابی نیز با استفاده از برنامه SegMan در بسته نرم افزاری DNA Star موردآنالیز قرار گرفت و همردیفی توالی ها با استفاده از نرم افزار MEGA5 انجام شد.

نتایج و بحث

ژن MRGH21 در منطقه ای بطول ۴۱۸۵ جفت باز (بدون در نظر گرفتن توالی های تنظیمی و غیر ترجمه شونده بالادست و پائین دست آن) در ژنوم خربزه قرار گرفته است. این ژن دارای چهار توالی اگزونی است که به ترتیب ۵۶۳، ۱۰۸۸، ۲۷۵ و ۱۱۳۳ جفت باز طول دارند. در میان آن سه توالی اینترونی به طول های ۶۷۵، ۱۰۱و ۳۴۹ جفت باز قرار گرفته است. طول توالی کد کننده آن بطور کلی ۳۰۶۰ باز است و پروتئینی (AAU04762.1) شامل از ۱۰۲۰ اسید آمینه را کد می نماید. این پروتئین یک پروتئین مقاومت از نوع TIR-NBS-LRR بشمار می رود. دومین TIR عملکردی مشابه یک گیرنده غشائی را به پروتئین می دهد. این دومین در مسیرهای پیام رسانی و پاسخ های دفاعی نقش ایفا می کند. دومین NB-ARC یک توالی دخیل در پیام رسانی بشمار می رود که در ژن های مقاومت گیاهی مشاهده شده است و در مسیر مرگ سلولی نقش ایفا می کند و قابلیت باند شدن با ATP را دارا است.

جفت آغازگرهای Psh22-r/f به ترتیب در اواخر اگزون ۱ (از باز ۴۰۸تا ۴۲۹) تا اواسط اگزون ۲ (از باز ۱۸۹۱ تا ۱۹۱۳) قرار داشته و ناحیه ای به طول۱۵۰۶ جفت باز را تکثیر می نمایند . DNA استخراج شده از رقم خاتونی دارای کیفیت مطلوب بود (شکل۱-الف). الکتروفورز PCR انجام شده توسط جفت آغازگر طراحی شده نشان دهنده تکثیر یک قطعه با وزن مولکولی حدود۱۵۰۰جفت باز بود (شکل ۱- ب). قطعه تکثیر شده در وکتور PTG19 کلون شد. بررسی کلونی های بدست آمده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PSh22-r/f و نیز آغازگرهای عمومی M13 کلون قطعه تکثیر شده را تائید نمود. (شکل ۲-ج و د).



شکل۱: الف: الکتروفورز DNA استخراج شده از رقم خاتونی، ب: محصول PCR در رقم خاتونی، ج: نتیجه کلنی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی PSH22 f/r جهت غربال کلنی های نوترکیب د: نتیجه PCR با استفاده از آغازگرهای M13

الف: ۱: ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده از رقم خاتونی. ب: ۲ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از آغازگرهای PSH22 f/r در رقم خاتونی. ج: ۱، ۲، ۳ ؛ ۴ و ۵: ۵ میکرولیتر از کلنی PCR انجام شده با استفاده از پرایمر های اختصاصی PSH22 f/r جهت تائید کلنی های نوترکیب، چاهک شماره ۵ نشان دهنده کلنی نوترکیب می باشد . M: نشانگر مولکولی 1kb. ج: ۵ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از آغازگرهای M13

پلاسمید های نوترکیب به صورت دو جهته مورد توالی یابی قرار گرفت. آنالیز توالی یابی انجام شده نشان داد که قطعه تکثیر شده از ژن MRGH21 در رقم خاتونی با توالی این ژن که در بانک های اطلاعاتی موجود می باشد، انطباق کامل داشته و حضور این ژن را در رقم خاتونی تائید کرد (شکل ۲). نتایج گزارش شده از دیگر ژن های مقاومت نیز تایید کننده محافظت شده بودن این توالی ها است. در این خصوص نتایج مطالعه صورت گرفته در سال ۲۰۰۸ روی توالی ژن Fom2 نشان داده است که بخشی از دومین LRR این ژن در هشت رقم از از یازده رقم ملون بررسی شده حفاظت شده بوده است و هیچگونه تنوعی در آن مشاهده نگردیده است. این مطالعه تنها توانسته است در رقم Cum-355 آلل متفاوتی از ژن مقاومت Fom2 را گزارش نماید[۷].با توجه به اینکه ژن MRGH21 در گروه لینکاژی Fom1 قرار دارد و اکثر ارقام خربزه ایرانی به نژاد ۲ قارچ Fusarium oxysporum f. sp. melo مقاوم می باشند حضور این ژن در رقم خاتونی قابل قبول می باشد.

```
MRGH21_ref      tat ggg agt tgg gtt tgc atg aag gaa ata agg aag att aga atg tgt cag aag tca agg gat caa ttg gtg ctt cca     390
Khatooni-CV     --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---     390

MRGH21_ref      ata ttt tac aaa gta gat cca ggc gat gtg agg aag caa gag ggg gag agc ctt gtg aag ttc ttt aat gaa cat gaa     468
Khatooni        --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --g gag agc ctt gtg aag ttc ttt aat gaa cat gaa     468

MRGH21_ref      gcc aat cct aat att agt att gaa gaa gtt aaa aaa tgg aga aaa tct atg aac aaa gtt ggc aat ctc tct gga tgg     546
Khatooni        gcc aat cct aat att agt att gaa gaa gtt aaa aaa tgg aga aaa tct atg aac aaa gtt ggc aat ctc tct gga tgg     546

MRGH21_ref      cat ctc caa gat tcc cag tta agt aat tat ttt cac tct cca cat ttt tct ttt aat ttt tct gtg gtg tga act tgt     624
Khatooni        cat ctc caa gat tcc cag tta agt aat tat ttt cac tct cca cat ttt tct ttt aat ttt tct gtg gtg tga act tgt     624

MRGH21_ref      tat tca tag cgt tag acg agt tgt ttt gtt aga ttc cta agc tct aga aaa tga tga aga taa aat att tct aga aaa     702
Khatooni        tat tca tag cgt tag acg agt tgt ttt gtt aga ttc cta agc tct aga aaa tga tga aga taa aat att tct aga aaa     702

MRGH21_ref      aat aaa caa gtt tag caa gat caa aaa gat tag ata aaa gaa agt ttt att tct ctt aat ttt tat ttt ttt aag cca     780
Khatooni        aat aaa caa gtt tag caa gat caa aaa gat tag ata aaa gaa agt ttt att tct ctt aat ttt tat ttt ttt aag cca     780

MRGH21_ref      agg gag aaa aaa ata gat tga aaa aaa gtt aga gag atg ttt tag aga gag aag cta aaa atg gag caa ata aag aga     858
Khatooni        agg gag aaa aaa ata gat tga aaa aaa gtt aga gag atg ttt tag aga gag aag cta aaa atg gag caa ata aag aga     858

MRGH21_ref      tca act tgt gat att ata agt tag aga aag aag aat agt aaa tta gag aaa ggg aaa ggg aag gtt gat tag aga gag     936
Khatooni        tca act tgt gat att ata agt tag aga aag aag aat agt aaa tta gag aaa ggg aaa ggg aag gtt gat tag aga gag     936

MRGH21_ref      acc ata aga gga atc taa tcc aaa tag aaa tca att aaa aaa aaa aaa aag aga aag caa aat tat aat gat ttt ctg     1014
Khatooni        acc ata aga gga atc taa tcc aaa tag aaa tca att aaa aaa aaa aaa aag aga aag caa aat tat aat gat ttt ctg     1014

MRGH21_ref      ttt cca atc att ttt tta tta ctt ata aga tgt gaa atc aat att tat agc aaa ata tta gtg tct ata gag atg cta     1092
Khatooni        ttt cca atc att ttt tta tta ctt ata aga tgt gaa atc aat att tat agc aaa ata tta gtg tct ata gag atg cta     1092

MRGH21_ref      ttg atg tct atc aac aaa tgt ttc tat ctt tcc tag cta aac att taa ttc att agc caa att tta aaa aca ata cca     1170
Khatooni        ttg atg tct atc aac aaa tgt ttc tat ctt tcc tag cta aac att taa ttc att agc caa att tta aaa aca ata cca     1170

MRGH21_ref      acg tta ttt tca aaa ttt ccg ttc gaa tga tca tga aaa cat aac tat gaa tga aat tta tat gta ggt ttg aag aag     1248
Khatooni        acg tta ttt tca aaa ttt ccg ttc gaa tga tca tga aaa cat aac tat gaa tga aat tta tat gta ggt ttg aag aag     1248

MRGH21_ref      gaa tca tta agg aag ttg tgg atc ata ttt tca aca aat tac gtc ctg att tat ttc gtt atg atg ata aat tag ttg     1326
Khatooni        gaa tca tta agg aag ttg tgg atc ata ttt tca aca aat tac gtc ctg att tat ttc gtt atg atg ata aat tag ttg     1326

MRGH21_ref      gaa tta gcc gaa gat tac atg aaa taa ata agc tta tgg gaa tag gtt tag atg acg tac ggt tca ttg gaa tat ggg     1404
Khatooni        gaa tta gcc gaa gat tac atg aaa taa ata agc tta tgg gaa tag gtt tag atg acg tac ggt tca ttg gaa tat ggg     1404

MRGH21_ref      gaa tga gtg gaa ttg gca aaa caa cca tcg cta gaa tca ttt aca aaa gtg ttt ctc att tgt ttg atg gat gtt att     1482
Khatooni        gaa tga gtg gaa ttg gca aaa caa cca tcg cta gaa tca ttt aca aaa gtg ttt ctc att tgt ttg atg gat gtt att     1482

MRGH21_ref      ttc tgg aca atg tca aag aag ctt taa aga aag aag gga tag ctt cat tac aac aaa agc ttc taa cag gag ctt taa     1560
Khatooni        ttc tgg aca atg tca aag aag ctt taa aga aag aag gga tag ctt cat tac aac aaa agc ttc taa cag gag ctt taa     1560

MRGH21_ref      tga aaa gaa aca ttg aca tcc cta atg ctg atg gag cta cat taa tca aga gaa gaa taa gta aca tta aag ctc tta     1638
Khatooni        tga aaa gaa aca ttg aca tcc cta atg ctg atg gag cta cat taa tca aga gaa gaa taa gta aca tta aag ctc tta     1638

MRGH21_ref      taa ttc tcg atg atg tcg ata atg tta gcc aac ttc ggc agt tag ctg gca gtt tgg att ggt tcg gtt cag gaa gtc     1716
Khatooni        taa ttc tcg atg atg tcg ata atg tta gcc aac ttc ggc agt tag ctg gca gtt tgg att ggt tcg gtt cag gaa gtc     1716

MRGH21_ref      gag tta tcg tta cga cga aac acg aag aca tcc tag ttt cac atg gaa ttg aaa gac gat aca atg ttg aag tgc tga     1794
Khatooni        gag tta tcg tta cga cga aac acg aag aca tcc tag ttt cac atg gaa ttg aaa gac gat aca atg ttg aag tgc tga     1794

MRGH21_ref      aaa ttg acg aag gta ttc aac ttt ttt cac aaa agg cat ttg gag agg act atc caa agg aag ggt act ttg atc tct     1872
Khatooni        aaa ttg acg aag gta ttc aac ttt ttt cac aaa agg cat ttg gag agg act atc caa agg aag ggt act ttg atc tct     1872

MRGH21_ref      gta gcc aag ttg tag att atg ctg gag ggc ttc cat tag caa ttg agg ttc ttg gat ctt ctt tac gta ata aac caa     1950
Khatooni        gta gcc aag --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---     1950

MRGH21_ref      tgg agg att gga tag atg cag tga aaa agt tgt ggg aag ttc gtg ata agg aaa tta atg aaa agt tga aaa tta gtt     2028
Khatooni        --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---     2028
```

شکل ۲: نتیجه همردیفی توالی MRGH21 موجود در بانک های اطلاعاتی و قطعه توالی یابی شده از رقم خاتونی.

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. بودجه این تحقیق از محل طرح شماره ۱۸۹۴۸ مصوب معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد تامین شده است.

منابع

1. Brotman, Y., et al., *Resistance gene homologues in melon are linked to genetic loci conferring disease and pest resistance.* TAG Theoretical and Applied Genetics, 2002. **104**(6): 1055-1063.
2. Van Leeuwen, H., et al., *Analysis of the melon genome in regions encompassing TIR-NBS-LRR resistance genes.* Molecular genetics and genomics, 2005. **273**(3): 240-251.
3. Tezuka, T., et al., *Development of new DNA markers linked to the Fusarium wilt resistance locus Fom‐1 in melon.* Plant Breeding, 2011. **130**(2): 267-261.
4. Garcia-Mas, J., et al., *Cloning and mapping of resistance gene homologues in melon.* Plant Science, 2001. **161**(1): 165-172.
5. Risser, G., Z. Banihashemi, and D. Davis, *A proposed nomenclature of Fusarium oxysporum f. sp. melonis races and resistance genes in Cucumis melo [Muskmelon, fungal diseases]*. Phytopathology, 1976. **66**.
6. Abaspour N.and F. Shokouhifar. 2012. *Detection of resistance gene homologous in number of melon cultivars.* 12th Iranian Genetics Congress, 2012 (In Farsi)
7. Oumouloud, A., et al., *Development of molecular markers linked to the Fom-1 locus for resistance to Fusarium race 2 in melon.* Euphytica, 2008. **164**(2): 347-356.