جداسازی و همسانه سازی ژن Fom-2 در گیاه طالبی

نعیمه سوسرایی[۱]، محمود لطفی[۲*]، حسینعلی رامشینی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد اصلاح گیاهان باغبانی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران. ۲- دانشیار گروه باغبانی، ، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران. ۳- استادیارگروه علوم زراعی و اصلاح نباتات، ، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران.

*نویسنده مسئول: Nsousareai@ut.ac.ir

چکیده

یکی از مهمترین مشکلات تولید طالبی در ایران، بیماری پژمردگی آوندی است که عامل آن قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race 1 می‌باشد. تک ژن غالب Fom-2 باعث ایجاد مقاومت در برابر نژاد صفر و یک می‌شود. در این پژوهش DNA ژنومی ژنوتیپ ایزابل که مقاوم به این بیماری می‌باشد استخراج شد. به منظور انجام واکنش زنجیره ای پلیمراز، یک جفت آغازگر بر اساس توالی ژن Fom-2 بازیابی شده از بانک اطلاعات NCBI و با استفاده از نرم افزار Primer-3 طراحی گردید. در الگوی الکتروفورز محصول PCR تک باندی به اندازه مورد انتظار (۱۳۰۰ جفت باز) مشاهده شد. قطعه تکثیرشده در ناقل pGEM-T Easy همسانه سازی شد و به باکتری E-Coli سویه DH5α منتقل گردید. کلونی های نوترکیب پس از رشد در محیط کشت انتخابی LB/AMP/X-Gal، گزینش شدند و در محیط کشت LB مایع تکثیر یافتند. بمنظور تأیید نهایی کلونینگ، از تعدادی از کلونی های نوترکیب، استخراج پلاسمید و برش با آنزیم برشی EcoR صورت گرفت و با مشاهده الگوی باندی، حضور ژن در ناقل، مورد تأیید قرار گرفت. باکتری های دارای ناقل نوترکیب که درون محیط کشت LB مایع تکثیر یافته بودند، جهت انجام مطالعات بعدی از قبیل توالی یابی ژن و طراحی نشانگر برای شناسایی گیاهان حساس و مقاوم ذخیره گردیدند.

کلمات کلیدی: کلیدی: طالبی، پژمردگی آوندی، ژن مقاومت، همسانه سازی

مقدمه

طالبی *(Cucumis melo L.)* گیاهی متعلق به خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) و گروه Cantalupensis است. طبق آمار FAO در سال ۲۰۱۲، سطح زیر کشت خربزه و طالبی در ایران حدود ۸۲ هزار هکتار بوده است. یکی از جدی ترین مشکلات در تولید طالبی پژمردگی آوندی است که عامل ایجاد کننده آن قارچ خاکزی *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (*Fom*) می‌باشد (Oumouloud et al., 2013). این بیماری باعث زردی، کوتولگی، پژمردگی و در نهایت مرگ گیاه می‌شود (Madadkhah et al., 2012). بر اساس بیماریزایی روی سه رقم افتراقی این قارچ به چهار نژاد ۰، ۱، ۲ و ۱/۲ طبقه بندی شده است (Oumouloud et al., 2013). نژاد ۱ از نظر اقتصادی ضررهای زیادی در کشور ایران وارد می‌کند (Madadkhah et al., 2012). استفاده از ژن‌های مقاومت در طالبی مؤثرترین روش ایجاد مقاومت در برابر پژمردگی آوندی می‌باشد. تک ژن غالب Fom-2 باعث ایجاد مقاومت در برابر نژاد ۰ و ۱ می‌شود (Oumouloud et al., 2013). ژنوتیپ ایزابل به علت دارا بودن این ژن بصورت غالب، توان مقابله با بیماری قارچی فواریوم را دارد و مقاوم به این بیماری می‌باشد (Herman and Perl-Treves, 2007). دستیابی به توالی ژن‌های مقاومت در تولید ارقام مقاوم اهمیت بسیار زیادی دارد. در این تحقیق از ژنوتیپ ایزابل DNA استخراج شد و به عنوان الگو در تکثیر PCR مورد استفاده قرار گرفت. ژن Fom-2 در ناقل pGEM-T Easy کلون شد و به باکتری E-Coli سویه DH5α منتقل گردید. هدف از این پژوهش

جداسازی ژن Fom-2 از ژنوتیپ ایزابل و همسانه سازی آن در باکتری E-Coli، جهت انجام مطالعات بعدی از قبیل توالی یابی ژن و طراحی نشانگر برای شناسایی گیاهان حساس و مقاوم بود.

مواد و روش‌ها

بذور ژنوتیپ ایزابل که از مرکز تحقیقات ورامین تهیه شده بود در گلخانه پردیس ابوریحان در نور مصنوعی، شرایط دمایی ۲۲ درجه سانتیگراد، فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و با رطوبت مناسب کشت شدند. از برگ‌های تازه رشد یافته همه گیاهان نمونه برداری صورت گرفت و این نمونه ها برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفتند. استخراج DNA به روش CTAB انجام شد وکمیت و کیفیت آن با اسپکتوفتومتر طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱٪ ارزیابی و تأیید گردید. برای واکنش تکثیر ژن Fom-2، یک جفت آغازگر بر اساس توالی ژن Fom-2 بازیابی شده از بانک اطلاعات NCBI و با استفاده از نرم افزار Primer-3 طراحی گردید (جدول ۱). هر واکنش زنجیره ای پلیمراز(PCR) حاوی ۲۳ میکرولیتر از Taq DNA Polymerase Mix Red با غلظت ۱/۵ میکرومولارMgcl2 ، یک میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ میکرومولار و یک میکرولیتر از DNA ژنومی بود. واکنش PCR مطابق جدول ۲ و با ۳۵ چرخه انجام گرفت. پنج میکرولیتر از محصول روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید. باند موردنظر از روی ژل برش داده شد و به کمک کیت AccuPrep (Bioneer) تخلیص ژن از باند صورت گرفت. قطعه ژن خالص شده ی موردنظر درون ناقل pGEM-T Easy (Promega Corporation, Madison, WI, USA) همسانه سازی شد. طبق پروتکل شرکت سازنده، پلاسمیدها به باکتری E-Coli (سویه DH5α) انتقال داده شدند. برای تشخیص باکتری های نوترکیب از غیرنوترکیب از محیط کشت LB/AMP/X-Gal استفاده شد. کلونی های سفید انتخاب و برای رشد و تکثیر در محیط کشت LB مایع مایه زنی شد. فالکون‌های حاوی محیط کشت LB مایع و باکتری، درون انکوباتور (دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و دور rpm ۱۸۰۰) بصورت کشت شبانه قرار داده شدند. روز بعد باکتری ها جهت نگهداری و ذخیره با نسبت ۱:۱ با گلیسرول مخلوط شده و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد قرار گرفتند.

جدول ۱- توالی و دمای اتصال دو جفت آغازگر برای تکثیر نواحی حفاظت شده ژن Fom-2

آغازگر	توالی (´۳-´۵)	دمای اتصال (درجه سانتیگراد)
Mel F	ATCGGGTTTGAAGAAGGTTGTAA	۵۵
Mel R	AAGTGGGGTTGGAGCATA	۵۵

جدول ۲- برنامه واکنش PCR

مراحل	زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتیگراد)
واسرشت اولیه	۵	۹۴
واسرشت	۱	۹۴
اتصال آغازگر	۱	۵۵
بسط آغازگر	۱	۷۲
بسط نهایی	۵	۷۲

نتایج و بحث

بعد از کشت بذور ژنوتیپ ایزابل و نمونه برداری از برگ‌ها، استخراج DNA ژنومی انجام شد. کیفیت DNA استخراج شده با استفاده از روش به کار برده شده مناسب بود (شکل ۱- الف). Oumouloud و همکاران (۲۰۱۳) ژن Fom-2 را مورد بررسی و توالی-یابی قرار دادند. طبق مطالعات و بررسی‌های آن‌ها ژن Fom-2 حدود ۳ کیلوباز طول دارد و ۱۰۷۳ اسیدآمینه را کد می‌کند که شامل دو ناحیه پروتئینی Nucleotid binding site (NBS) و Leucine-rich repeats domain (LRR) می‌باشد. این ژن به طور کامل اگزون بوده و فاقد نواحی اینترونی می‌باشد. بر این اساس، یک جفت آغازگر از نواحی حفاظت شده این ژن طراحی و واکنش زنجیره ای پلیمراز انجام شد. با توجه به محل اتصال آغازگرها انتظار بر این بود که نواری در محل ۱۳۰۰ جفت باز مشاهده شود که بعد از PCR مشاهده گردید نواری در این اندازه وجود دارد (شکل ۱- ب).

شکل ۱- الف: الکتروفورزیز DNA استخراج شده. ب: الکتروفورزیز محصولات PCR برای ژن FOM-2 از ژنوتیپ ایزابل (M: نشانگر DNA ۳۰۰۰ جفت بازی، ستون ۱ تا ۴: ژن FOM-2 ۱۳۰۰ جفت بازی، ستون ۵: کنترل منفی شامل واکنش PCR بدون الگو)

قطعه ژن مورد نظر بعد از خالص سازی درون ناقل pGEM-T Easy کلون شد. ناقل pGEM-T Easy یک مبدأ همانندسازی (ori)، یک جایگاه برای وارد شدن ژن موردنظر و یک جایگاه ژن انتخابی (مقاومت به انتی بیوتیک آمپی سیلین یا Amp) دارد.اندازه این ناقل ۳۰۱۵ bp می‌باشد، که با وارد شدن قطعه ژنی به طول ۱۳۰۰ bp درون آن، طولی حدود ۴۳۰۰ bp پیدا می‌کند. محل ورود قطعه ژن به درون ناقل وسط جایگاهی بنام lacZ می‌باشد که قبل از ورود ژن، این جایگاه تولید β- گالاکتوزیداز[1] و در نتیجه تولید رنگ آبی در محیط کشت انتخابی X-Gal می‌کند. اما با ورود ژن به درون ناقل، این جایگاه شکسته شده و β- گالاکتوزیداز تولید نمی‌شود و در محیط کشت X-Gal شاهد کلونی‌های سفید خواهیم بود (Brown, 2010).کلونی های سفید روی محیط کشت LB/AMP/X-Gal انتخاب شدند (شکل ۲- الف). تعدادی از آنها ذخیره و تعدادی دیگر برای استخراج پلاسمید مورد استفاده قرار گرفتند. پس از استخراج پلاسمید با استفاده از آنزیم برشی EcoR حضور ژن موردنظر درون پلاسمید تأیید گردید(شکل ۲- ب).

[1] β-galactosidase

ب الف

شکل ۳- الف: تکنیک سفید- آبی جهت شناسایی باکتری های نوترکیب. ب: الکتروفورزیز پلاسمید در معرض آنزیم برشی

منابع

1. Brown. T.A. 2010. Gene cloning and DNA analysis: an introduction. John Wiley & Sons. P: 33-155
2. Oumouloud. A., El-Otmani, M. Chikh-Rouhou, H. Garce´s Claver, C. Gonza´lez Torres, R. Perl-Treves, R. and Ivarez, J. 2013 Breeding melon for resistance to Fusarium wilt: recent developments (REVIEW). Euphytica. 192:155–169.
3. Madadkhah. E., Lotfi, M. Nabipour, A. Rahmanpour, S. Banihashemi, Z. and Shoorooei, M. 2012. Enzymatic activities in roots of melon genotypes infected with Fusarium oxysporum f. sp. melonis race 1. Scientia Horticulturae. 135, 171–176.
4. Herman, R. and Perl-Treves. R. 2007. Characterization and Inheritance of a New Source of Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* Race 1.2 in *Cucumis mel*. Plant Disease. Vol. 91 No. 9.

Isolation and cloning of Fom-2 from melon

N.Sousaraei[1*], M.Lotfi[2], H.Ramshini[3]

1- M. Sc of Horticultural Plant Breeding, College of Abouraihan, University of Tehran. 2- Associate Professor, Dep. Horticultural Science, College of Abouraihan, University of Tehran. 3- Assistant Professor, Dep. Agronomy and Plant Breeding, College of Abouraihan, University of Tehran.
*Corresponding author: Nsousaraei@ut.ac.ir

Abstract

One of the main problems of melon productions in Iran is wilt disease caused by fungus *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* race 1. Single dominant gene Fom-2 induces resistance toward race 0 and 1. In this study, the genomic DNA was extracted from Isabel which is a resistant cutivar to the disease. In order to perform polymerase chain reaction primers based on the sequence of Fom-2 retrieved from the NCBI database using the software Primer-3 were designed. The single-band of PCR products of the expected size (1300 bp) was observed via electrophoresis. Amplified DNA was ligated in pGEM-T Easy vector and cloned in E-coli strain DH5α. Recombinant colonies after growth in selective culture medium of LB / AMP / X-Gal, were selected and were grown in liquid LB medium . To verify the cloning, recombinant plasmid of some colonies was extracted and cut with restriction enzyme of EcoR the observed band pattern was correct considering the size of amplified DNA and the presence of the gene in the vector was confirmed. Bacteria carrying the recombinant plasmid were amplified in liquid LB medium and conserved for further studies such as gene sequencing and designing molecular marker for identifying resistant and sensitive genotypes.

Key words: Melon, wilt disease, resistance gene, cloning.