بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی
گروه بیوتکنولوژی

ردیابی، تکثیر و کلونینگ ژن *FOM2* و بررسی تنوع آن در توده‌های محلی بومی خربزه ایران

دانشجو: محدثه مقیمی خیرآباد

اساتید راهنما
دکتر شاهرخ قرنجیک
دکتر فرهاد شکوهی‌فر

استاد مشاور
دکتر مجتبی ممرآبادی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد
بهمن ماه ۱۳۹۱

شماره:
تاریخ:
ویرایش:

بسمه تعالی

مدیریت تحصیلات تکمیلی
فرم شماره (۶)

فرم صورتجلسه دفاع از پایان نامه تحصیلی دوره کارشناسی ارشد

با تأییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی عصر (عج) ارزیابی جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد **خانم محدثه مقیمی خیرآباد** رشته **کشاورزی** گرایش **بیوتکنولوژی** تحت عنوان: "**ردیابی، تکثیر وکلونینگ ژن *FOM2* و بررسی تنوع آن در توده‌های بومی خربزه ایران**" که در تاریخ ۱۳۹۱/۱۱/۳۰ با حضور هیأت محترم داوران در دانشگاه صنعتی شاهرود برگزار گردید به شرح ذیل اعلام می گردد:

قبول (با مرجه: عالی) ☑ دفاع مجدد ☐ مردود ☐

۱- عالی (۲۰ - ۱۹)
۲- بسیار خوب (۱۸/۹۹ - ۱۸)
۳- خوب (۱۸/۹۹ - ۱۷)
۴- قابل قبول (۱۵/۹۹ - ۱۴)
۵- نمره کمتر از ۱۴ غیر قابل قبول

عضو هیأت داوران	نام ونام خانوادگی	مرتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	شاهرخ فرنیک فرهاد شکوهی فر	استادیار استادیار	
۲- استاد مشاور	محسنی سرآبادی	استادیار	
۳- نماینده ذوی تحصیلات تکمیلی	محمدرضا عامریان	استادیار	
۴- استاد ممتحن	ناصر فرخی	استادیار	
۵- استاد ممتحن	حمیدرضا صدقوقی	استادیار	

رئیس دانشکده:

تقدیم به تلاش‌های بی‌دریغ پدرم،
به آرزوهای مادرم
و به همسرم
او که احساسش، اندیشه‌اش و حمایتش پشتوانه من بود
و به خواهران و برادر عزیزم
که تجلیگاه آرزوهایم آینده روشن آن‌هاست

خداوند متعال را شاکرم که به من توفیق کسب علم و دانش در جوار بنده برگزیده‌اش را عنایت فرمود، گذشته از الطاف خداوندی و عنایات ویژه حضرت علی بن موسی الرضا و حضرت صاحب الزمان پیشرفت علمی را مدیون بزرگواران زیادی هستم که در راس آن‌ها معلمان دوران زندگی و تحصیلم قرار دارند. در این راستا برخود فرض می‌دانم که همیشه قدردان زحمات تک‌تک این عزیزان باشم. لذا از اولین و مهربان‌ترین معلمان زندگیم پدر و مادر فداکارم که حمایت‌های بی‌دریغ و دعای خیرشان، همیشه شامل حالم بوده، تشکر می‌کنم. از همراه همیشگی زندگیم، همسرم امید عسگریان به خاطر قصور فراوانی که در طی دوران تحصیل داشتم و به دلیل تمام صبوری‌هایش بی‌نهایت سپاسگزارم. از خواهران و برادر عزیزم که حضور گرم و صمیمی آن‌ها در کنارم یکی از مهمترین انگیزه‌های من در ادامه‌ی این راه دشوار بود، ممنونم.

از جناب آقای دکتر فرهاد شکوهی‌فر که در تمام مراحل انجام پایان‌نامه با دلسوزی و مهربانی فراوان راهنمایی این پایان‌نامه را بر عهده داشتند و به خاطر تمامی محبت‌ها و کمک‌های ارزشمندشان از صمیم قلب تشکر و قدردانی می‌نمایم. از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک و همچنین از استاد مشاور جناب آقای دکتر مجتبی ممرآبادی به خاطر راهنمایی‌هایشان سپاسگزارم. از پدر و مادر همسرم که همواره مشوق و پشتیبان من و همسرم بوده‌اند و در طول انجام مراحل پایان نامه از هیچ‌گونه کمکی دریغ نکرده‌اند، تشکر می‌نمایم. از کلیه پرسنل پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد خصوصاً مسئول آزمایشگاه کشت بافت سرکار خانم میرشاهی و خانم ضرغامی کمال تشکر را دارم. از دوستان بزرگوارم در پژوهشکده علوم گیاهی که از حمایت‌ها و تشویق‌هایشان در تمامی مراحل انجام کار بهره‌مند بوده‌ام، سپاسگزارم.

تعهد نامه

اینجانب **محدثه مقیمی خیرآباد** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته **بیوتکنولوژی گیاهی** دانشکده **کشاورزی** دانشگاه صنعتی شاهرود نویسنده پایان نامه **ردیابی، تکثیر و کلونینگ ژن *Fom2* و بررسی تنوع آن در توده‌های بومی خربزه ایران** تحت راهنمائی **دکتر شاهرخ قرنجیک و دکتر فرهاد شکوهی‌فر** متعهد می‌شوم.

- تحقیقات در این پایان نامه توسط اینجانب انجام شده است و از صحت و اصالت برخوردار است .
- در استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است .
- مطالب مندرج در پایان نامه تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی در هیچ جا ارائه نشده است .
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد و مقالات مستخرج با نام « دانشگاه صنعتی شاهرود » و یا « Shahrood University of Technology » به چاپ خواهد رسید .
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تأثیرگذار بوده اند در مقالات مستخرج از پایان نامه رعایت می گردد.
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه ، در مواردی که از موجود زنده (یا بافتهای آنها) استفاده شده است ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است .
- در کلیه مراحل انجام این پایان نامه، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده است اصل رازداری ، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است .

تاریخ

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- **کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج ، کتاب ، برنامه های رایانه ای ، نرم افزار ها و تجهیزات ساخته شده است) متعلق به دانشگاه صنعتی شاهرود می باشد . این مطلب باید به نحو مقتضی در تولیدات علمی مربوطه ذکر شود .**
- **استفاده از اطلاعات و نتایج موجود در پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نمی باشد.**

*** متن این صفحه نیز باید در ابتدای نسخه های تکثیر شده پایان نامه وجود داشته باشد .**

چکیده

بیماری زردی و پژمردگی آوندی یکی از بیمارهای مهم خربزه می‌باشد که قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. m*elonis* (FOM) عامل این بیماری است و از نظر بیماریزائی در چهار نژاد صفر، ۱، ۲و ۱.۲ گروه‌بندی می‌شود. ژن *Fom2* به عنوان عامل مقاومت در مقابل نژاد صفر و ۱ قارچ FOM شناخته شده است. در این مطالعه با توجه به حساسیت اکوتیپ‌های خربزه ایرانی در مقابل نژاد ۱، حضور ژن *Fom2* به عنوان عامل مقاومت در برابر این نژاد در سطح ژنوم اکوتیپ‌های مثل: طالبی شهد شیراز، خربزه مشهدی، خربزه خاتونی، خربزه خاقانی، Charentais Fom1 و Charentais Fom2 مورد بررسی قرار گرفت. توالی گزارش شده ژن *Fom2* از بانک ژن بازیابی شد و با انجام آنالیزهای بیوانفورماتیک مناطق حفاظت شده آن تعیین و جهت طراحی پرایمر داخلی (PSh20-F/R) به کار گرفته شد. نتایج PCR با استفاده از این پرایمر حضور ژن *Fom2* را در اکوتیپ‌های مورد مطالعه تایید نمود و به تکثیر تک باند در اندازه مورد انتظار منتج شد. قطعه داخلی ژن *Fom2* جهت توالی‌یابی در ناقل pTG19 کلون شد و به وسیله تکنیک کلنی PCR با استفاده از پرایمر داخلی ژن *Fom2* و پرایمر یونیورسال Psh10.2-F/R تایید گردید. آنالیز نتایج توالی‌یابی نشان داد که اکوتیپ‌های حساس همانند خربزه مشهدی، خربزه خاقانی، Charentais Fom1 تنوع نوکلئوتیدی و پروتئینی متفاوتی را نسبت به اکوتیپ‌های مقاوم نشان می‌دهند، که همین تنوع نوکلئوتیدی، ساختار پروتئینی اکوتیپ‌های حساس را تغییر و آن‌ها را نسبت به نژاد صفر و ۱ عامل بیماری حساس می‌نماید. شناسایی تفاوت سطح مقاومت در اکوتیپ‌ها به دلیل وجود تنوع در توالی ژن و در سطح بیان پروتئینی ژن *Fom2* می‌باشد. سپس به منظور بررسی توالی کامل ژن *Fom2* و همسانه‌سازی آن، یک جفت پرایمر اختصاصی (PSh20.2-F/R) بر اساس ابتدا و انتهای ژن، جهت تکثیر توالی کامل ژن طراحی گردید. با توجه به مقاوم بودن اکوتیپ طالبی شهد شیراز (M6) ژنوم این اکوتیپ 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. بعد از کلون کردن قطعه مورد نظر در ناقل pTG19 و توالی‌یابی، آنالیز

نتایج وجود موتاسیون را در اکوتیپ مقاوم طالبی شهد شیراز مشخص نمود که این موتاسیون‌ها بر عملکرد ژن *Fom2* تاثیر نداشته است. به طور کلی هدف از کلون قطعه کامل در این تحقیق انتقال ژن *Fom2* به ناقل بیانی و بعد از آن انتقال ژن به گیاه می‌باشد، که در مطالعات تکمیلی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

واژگان کلیدی: خربزه، بیماری زردی و پژمردگی آوندی، *Fusarium oxysporum* f.sp. m*elonis*، ژن *Fom2*

مقالات مستخرج از پایان نامه:

۱- محدثه مقیمی خیرآباد، شاهرخ قرنجیک، فرهاد شکوهی‌فر و مجتبی ممرآبادی (۱۳۹۱). " همسانه‌سازی توالی کامل ژن *Fom2* از طالبی شهد شیراز." **سومین همایش ملی بیوتکنولوژی کشاورزی ایران**. دانشگاه فردوسی مشهد.

۲- محدثه مقیمی خیرآباد، شاهرخ قرنجیک، فرهاد شکوهی‌فر و مجتبی ممرآبادی (۱۳۹۱). "ردیابی توالی ژن *Fom2* در اکوتیپ های حساس و مقاوم به نژاد 1 قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp *Melonis* ." **دوازدهمین کنگره ژنتیک**. دانشگاه شهید بهشتی.

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول: مقدمه	
۱-۱- مقدمه	۲
۱-۲- همسانه‌سازی ژن‌ها	۴
۱-۳- تنوع ژنتیکی و اهمیت بررسی آن	۵
۱-۴- نام‌گذاری عمومی	۶
۱-۵- گیاه‌شناسی و طبقه‌بندی خربزه	۷
۱-۶- خاستگاه و مراکز تنوع خربزه	۸
۱-۷- ویژگی‌های زراعی خربزه	۹
۱-۸- اصلاح خربزه	۱۰
۱-۹- بیماری پژمردگی فوزاریومی	۱۱
۱-۱۰- بیماری پژمردگی فوزاریومی	۱۱
۱-۱۱- علائم بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه	۱۳
فصل دوم: مرور منابع	
۲-۱- فرضیه ژن برای ژن فلور	۱۶
۲-۲- مکانیسم‌های مقاومت گیاهی	۱۷
۲-۳- کنترل شیمیایی	۱۸
۲-۴- انجام عمل پیوند	۱۹
۲-۵- کنترل زراعی	۱۹
۲-۶- کنترل بیولوژیکی	۲۰
۲-۷- استفاده از اکوتیپ های مقاوم	۲۱
۲-۶-اثر متقابل نژادهای پاتوژن با ژن‌های مقاومت	۲۲
۲-۷- مروری بر مطالعات انجام شده	۲۳
فصل سوم: مواد و روش‌ها	
۳-۱- موادگیاهی	۳۸
۳-۲- مشخصات اکوتیپ‌ها از لحاظ مقاومت و یا حساسیت آن‌ها در برابر نژادهای مختلف *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*	۳۸
۳-۳- کاشت نمونه‌های بذری	۳۹
۳-۴- محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز جهت استخراج DNA	۳۹
۳-۵- استخراج DNA از بافت گیاهی	۴۰
۳-۶- بررسی کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده	۴۱

۳-۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *Fom2* ۴۱
۳-۸- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۴۳
۳-۹- تهیه محیط کشت LB مایع و LB جامد ۴۳
۳-۱۰- همسانه‌سازی ژن *Fom2* ۴۴
۳-۱۱- ناقل pTG19 ۴۴
۳-۱۲- تهیه سلول مستعد از باکتری ۴۵
۳-۱۳- ترانسفورماسیون باکتریایی ۴۶
۳-۱۴- واکنش کلنی PCR جهت شناسایی باکتری‌های حاوی قطعه مورد نظر ۴۷
۳-۱۵- توالی‌یابی ۴۷
۳-۱۶- نرم‌افزارهای مورد استفاده جهت آنالیز نمونه‌ها ۴۷

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- بازیابی و آنالیز توالی ژن *Fom2* از پایگاه داده‌های زیستی و محل پرایمرهای عمومی جهت ردیابی ژن *Fom2* ۵۰
۴-۲- استخراج DNA و بررسی کمیت و کیفیت آن ۵۱
۴-۳- بهینه‌سازی شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه داخلی ژن *Fom2* ۵۲
۴-۴- همسانه‌سازی قطعه داخلی ژن *Fom2* در ناقل pTG19 ۵۳
۴-۵- تایید کلنی‌های نوترکیب با تکنیک کلنی PCR و با استفاده از پرایمر Psh20-F/R ۵۴
۴-۶- استخراج پلاسمید نوترکیب از باکتری *E.cloi* ۵۵
۴-۷- تایید پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Psh10.2-F/R ۵۶
۴-۸- تعیین توالی دو جهته قطعه کلون شده از ژن *Fom2* در و کتور pTG19 ۵۶
۴-۹- آنالیز توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی بدست آمده از اکوتیپ‌های مختلف ۵۷
۴-۹-۱- تعیین تنوع در اکوتیپ طالبی شهد شیراز مربوط به سازه pTGM6 ۵۸
۴-۹-۲- تعیین تنوع در اکوتیپ خربزه مشهدی مربوط به سازه pTGM5 ۵۹
۴-۹-۳- تعیین تنوع در اکوتیپ خربزه خاتونی مربوط به سازه pTGM8 ۶۰
۴-۹-۴- تعیین تنوع در اکوتیپ خربزه خاقانی مربوط به سازه pTGM9 ۶۱
۴-۹-۵- تعیین تنوع در اکوتیپ Charentais Fom1مربوط به سازه pTGM15 ۶۱
۴-۹-۶- تعیین تنوع در اکوتیپ Charentais Fom2مربوط به سازه pTGM16 ۶۲
۴-۱۰- همردیفی چندتایی ژن *Fom2* رفرنس با توالی نوکلئوتیدی اکوتیپ های مورد مطالعه و جهت شناسایی جهش‌ها ۶۳
۴-۱۱- رسم درخت ژنی و بررسی قرابت نمونه‌های توالی‌یابی شده ۶۴
۴-۱۲- تکثیر توالی کامل ژن *Fom2* از اکوتیپ استاندارد M6 ۶۵
۴-۱۳- بهینه‌سازی شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تکثیر قطعه کامل ژن *Fom2* ۶۵

۴-۱۴- همسانه‌سازی توالی تکثیر شده با پرایمر PSh20.2 در وکتور pTG19 ۶۶
۴-۱۵- تایید کلنی‌های نوترکیب با استفاده از تکنیک کلنی PCR و پرایمر PSh20.2-F/R ۶۶
۴-۱۶- استخراج پلاسمید نوترکیب از باکتری *E.cloi* ۶۷
۴-۱۷- تایید پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Psh10.2-F/R ۶۸
۴-۱۸- تعیین موتاسیون نمونه pTGM6 حاصل از پرایمر Psh20.2-F/R ۶۹
۴-۱۹- بررسی تنوع توالی ژن *Fom2* تکثیر شده از اکوتیپ طالبی شهد شیراز و مقایسه آن با توالی‌های گزارش شده در بانک های اطلاعاتی ۷۲
۴-۲۰- رسم درخت ژنی و بررسی قرابت نمونه‌های توالی‌یابی شده و اکوتیپ‌های ثبت شده در NCBI ۷۲
۴-۲۱- بحث ۷۳
۴-۲۲- پیشنهادات ۷۶
پیوست‌ها ۷۷
منابع ۸۴

فهرست جداول

جدول ۲-۱- اکوتیپ‌های افتراقی و واکنش هر یک در مقابل نژادهای مختلف قارچ پژمردگی فوزاریومی خربزه ۲۳
جدول ۲-۲- اندازه طول قطعات با آنزیم‌های مختلف برای سایت‌های SNP ۳۴
جدول ۳-۱- نام مواد و کد مربوط به همراه شرکت سازنده ۳۷
جدول ۳-۲- مشخصات ژنوتیپ‌های مورد بررسی ۳۸
جدول ۳-۳- حساسیت و مقاومت اکوتیپ های در برابر نژادهای مختلف ۳۹
جدول ۳-۴- بافر استخراج CTAB ۴۰
جدول ۳-۵- مشخصات پرایمرها ۴۱
جدول ۳-۶- غلظت مواد استفاده شده در واکنش PCR ۴۲
جدول ۴-۱- مشخصات اکوتیپ‌ها پس از اتصال به ناقل ۵۴
جدول ۴-۲- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM6 ۵۸
جدول ۴-۳- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM5 ۵۹
جدول ۴-۴- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM8 ۶۰
جدول ۴-۵- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM9 ۶۱
جدول ۴-۶- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM15 ۶۱
جدول ۴-۷- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM16 ۶۳
جدول ۴-۸- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازهF pTGM6 حاوی ژن *Fom2* همسانه شده از طالبی شهد شیراز ۶۹

جدول ۴-۹- بازیابی توالی ژن‌های *Fom2* گزارش شده ۷۲

فهرست اشکال

شکل ۱-۱- علائم ظاهری پژمردگی فوزاریومی در گیاه خربزه و طالبی ۱۴
شکل ۲-۱- نقشه ژنتیکی *Fom2* ۲۹
شکل ۲-۲- نقشه ژنتیکی *Fom2* ۳۰
شکل ۳-۱- شکل کلی ناقل pTG19 ۴۵
شکل ۴-۱- نمای شماتیک ژن *Fom2* در سطح نوکلئوتیدی ۵۱
شکل ۴-۲- الگوی الکتروفورزی DNA استخراج شده ازاکوتیپ‌های خربزه ۵۱
شکل ۴-۳- الگوی الکتروفورزی محصول PCR حاصل از پرایمر عمومی Psh20 ۵۳
شکل ۴-۴- الگوی الکتروفورزی محصول کلنی PCR حاصل از پرایمر PSh20 ۵۴
شکل ۴-۵- الگوی الکتروفورزی استخراج پلاسمید حاصل از پرایمر PSh20 ۵۵
شکل ۴-۶- الگوی الکتروفورزی محصول PCR حاصل از پرایمر PSh10.2 ۵۶
شکل ۴-۷- ارتباط فیلوژنتیکی نمونه‌های توالی‌یابی شده بر اساس درصد شباهت ۶۴
شکل ۴-۸- ناحیه اتصال پرایمر PSh20.2-F/R به ژن *Fom2* ۶۵
شکل ۴-۹- الگوی الکتروفورزی محصول PCR حاصل از پرایمر PSh20.2-F/R ۶۶
شکل ۴-۱۰- الگوی الکتروفورزی محصول کلنی PCR حاصل از پرایمر PSh20.2-F/R ۶۷
شکل ۴-۱۱- الگوی الکتروفورزی استخراج پلاسمید حاصل از پرایمر PSh20.2-F/R ۶۸
شکل ۴-۱۲- الگوی الکتروفورزی محصول کلنی PCR حاصل از پرایمر PSh20.2-F/R ۶۹
شکل ۴-۱۳- ارتباط فیلوژنتیکی نمونه pTGM6 توالی‌یابی شده با نمونه‌های گزارش شده اومولود بر اساس درصد شباهت ۷۳

فصل اول

مقدمه

۱-۱- مقدمه

خربزه (*Cucumis melo* L.) گیاهی از خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) است. خربزه بومی آفریقا بوده و از آنجا به آسیا و سایر کشورها گسترش یافته است (بنی‌هاشمی، ۲۰۰۹). طبق آمار FAO میزان تولید کل این محصول در سال ۲۰۱۰ میلادی، معادل ۸۵,۹۹۵,۲۷۱ تن می‌باشد،که بالاترین تولید متعلق به کشور چین با ۶۶,۲۲۵,۹۲۵ تن است. ایران با تولید ۳,۴۶۶,۸۸۰ تن حدود ۴٪ از تولید کل جهان را در اختیار دارد.

یکی از بیماری‌های مهم خربزه، پژمردگی فوزاریومی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* است که در نقاط معتدله و سردسیر شایع می‌باشد (بهداد، ۱۳۷۵). این بیماری در غالب کشورها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و عاملی محدود کننده برای تولید خربزه در سطح وسیع می‌باشد (مارتین و گوردون، ۱۹۹۶). عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی در تمامی مراحل رشد حتی قبل از جوانه‌زدن و خصوصاً در مرحله‌ای که میوه‌ها در حال رسیدن می‌باشند، گیاه را مورد حمله قرار می‌دهد. پژمردگی تدریجی اندام‌های هوایی و زرد شدن آن‌ها از علایم بارز این بیماری است. ابتدا قسمتی از برگ‌های آلوده به زرد کم‌رنگ مشاهده شد، سپس زردی برگ‌ها گسترده‌تر و کم‌کم پژمرده می‌شوند (صارمی، ۱۳۷۹). جنس فوزاریوم جزء قارچ‌های خاکزی است که گونه‌هایی از آن اهمیت اقتصادی ویژه دارند (نلسون و همکاران، ۱۹۸۱). قارچ *Fusarium oxysporum* یکی از گونه‌های مهم تغییر پذیر با نژادهای فیزیولوژیکی متنوع در بین گونه‌های فوزاریوم می‌باشد که دارای فرم‌های اختصاصی و جمعیت‌های مختلفی می‌باشد و در گیاهان متعدد ایجاد بیماری می‌کند (سرامی، ۱۹۹۸). تا کنون از فرم تخصص یافته‌ی قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی خربزه چهار نژاد فیزیولوژیکی صفر، ۱، ۲ و ۱.۲ شناسایی و از نواحی مختلف گزارش شده‌اند (مس و همکاران، ۱۹۸۱). روش مهم کنترل ژنتیکی این بیماری استفاده از اکوتیپ‌های مقاوم به این قارچ می‌باشد، البته اکوتیپی که مقاوم به همه نژادها باشد، موجود نیست و تنها استراتژی اساسی برای مقابله با این بیماری انتقال تمام ژن‌های

مقاومت داخل یک اکوتیپ می‌باشد (ریسر، ۱۹۸۷). ژن *Fom1* مقاومت بر علیه نژادهای صفر و ۲ و ژن *Fom2* مقاومت بر علیه نژادهای صفر و ۱ پاتوژن را ایجاد کردند. ژن‌های *Fom1* و *Fom2* بر نژاد ۱.۲ موثر نبوده، بطوریکه نسبت به نژاد ۱.۲ در خربزه مقاومت جزئی وجود دارد (بنی‌هاشمی، ۲۰۰۹). در ایران تاکنون نژاد ۱ این قارچ از مشهد و گرمسار (بنی‌هاشمی، ۱۹۸۹، ۱۹۶۹) و نژاد ۱.۲ از استان-های فارس و اصفهان و اخیراً نیز از کاشان گزارش شده است (بنی‌هاشمی، ۱۹۸۲).

با توجه به این که مهم‌ترین روش مدیریت با بیماری استفاده از اکوتیپ‌های مقاوم به بیماری است (زینک، ۱۹۸۳؛ زونیکا و همکاران، ۱۹۷۷)، منبع مقاومت در توده‌های بومی و خارجی خربزه به نژاد صفر، ۱ و ۲ حاصل شده است (بنی‌هاشمی و دزیو، ۱۹۷۵). غالب اکوتیپ‌های محلی خربزه ایرانی به نژاد صفر مقاوم هستند و تعداد اندکی مقاومت به نژاد ۱ را از خود نشان می‌دهند. مقاومت به نژاد ۱.۲ تاکنون در توده‌های محلی ایران مشاهده نشده است و تمام اکوتیپ‌ها به آن حساس می‌باشند (بنی-هاشمی، الف۱۹۶۸).

در خصوص ضرورت انجام این مطالعه شایان ذکر است که بیماری پژمردگی فوزاریومی به عنوان یکی از بیماری‌های مهم خربزه در کشور مطرح است. از طرفی نبود منابع مقاومت به عنوان یکی از مشکلات برنامه‌های اصلاحی در اکثر گیاهان مطرح می‌باشد و در خصوص این گیاه نیز قابل توجه است. از سوی دیگر از آن‌جا که بیشتر مطالعات علمی بین‌المللی صورت گرفته برای ایجاد مقاومت به این بیماری روی گیاه طالبی می‌باشد و اکوتیپ‌های محلی خربزه ایران خاص کشور ما است انجام چنین مطالعه‌ای جهت فراهم نمودن منابع مقاومت به قارچ عامل این بیماری ضروری به نظر می‌رسد.

با توجه به جایگاه تولید و کشت انواع خربزه در دنیا و نیز تولید آن در نقاط مختلف ایران، کشور ما از نظر تولید در دنیا صاحب مقام و موقعیت ممتازی می‌باشد. خربزه‌های ایرانی هم به خاطر شیرینی و هم به لحاظ لطافت بافت میوه دارای کیفیت خوبی می‌باشند ولی در مقابل، نسبت به بسیاری از بیماری‌ها به ویژه پژمردگی فوزاریومی حساس هستند. هر چند در ایران آمار معتبری از سوی نهادهای

متولی کشاورزی از میزان خسارت پژمردگی فوزاریومی در مزارع خربزه منتشر نشده است، ولی طبق گزارش‌ها و بررسی‌های غیررسمی این بیماری سالانه خسارت جبران ناپذیر و فراوانی به مزارع خربزه کشور وارد می‌نماید. این امر، عدم اقبال کشاورزان نسبت به استفاده از اکوتیپ‌های بومی و تمایل کشاورزان به کاشت اکوتیپ‌ها مقاوم وارداتی را به دنبال داشته است. تداوم این روند و عدم کشت اکوتیپ‌های بومی، ذخایر ارزشمند ژنتیکی کشور را به نابودی و فرسایش ژنتیکی سوق داده است. از این رو لازم است قبل از وقوع کامل این رویداد، تدابیر اساسی در جهت حفظ و مقابله با این مشکل اندیشیده شود. در این باره می‌توان با بهره‌گیری از روش‌های گوناگون از قبیل شناسایی و انتقال ژن-های مقاومت به اکوتیپ‌های بومی گونه‌های مقاوم به این بیماری را ایجاد کرد.

مراحل انجام این پژوهش شامل آماده‌سازی و کشت اکوتیپ‌های مقاوم استاندارد داخلی، بین‌المللی و اکوتیپ‌های بومی حامل ژن *Fom2*، استحصال توالی‌های مربوط به ژن‌های مقاومت در برابر بیماری پژمردگی فوزاریومی، طراحی پرایمر و بهینه‌سازی شرایط تکثیر ژن *Fom2* در توده‌های خربزه، توالی-یابی و آنالیز نتایج و بررسی تنوع احتمالی در توالی‌های شناسائی شده می‌باشد.

اهداف تحقیق:

۱- ردیابی و تکثیر توالی ژن *Fom2*

۲- همسانه‌سازی توالی کامل ژن *Fom2*

۳- بررسی تنوع احتمالی در توالی این ژن در نمونه‌های تکثیر شده در سطح نوکلئوتیدی

۴- بررسی تنوع احتمالی در توالی این ژن در نمونه‌های تکثیر شده در سطح پروتئین

۱-۲- همسانه‌سازی ژن‌ها

سال‌های ۱۹۷۱ تا ۱۹۷۳ را به عنوان یک دگرگونی در بیولوژی مدرن نام می‌برند. در این سال‌ها یک روش کاملاً جدید توسعه یافت و امکان داد تا آزمایش‌هایی که قبلاً عملی نبودند، با موفقیت طرح‌ریزی

و انجام شوند. این روش‌ها تحت عنوان تکنولوژی نوترکیبی DNA[1] یا مهندسی ژنتیک[2] نامیده شده‌اند که فرآیند همسانه‌سازی ژن‌ها را در بر می‌گیرند. هدف از همسانه‌سازی ژن فراهم کردن نسخه‌های متعدد از ژنی منفرد است. که ژن تکثیر یافته در حوزه‌های مختلف تحقیقاتی مورد استفاده است. مراحل اصلی در همسانه‌سازی ژن عبارتند از: تولید یا جداسازی قطعه‌ای از DNA، حاوی ژنی که باید همسانه شود. این قطعه را وارد یک ملکول حلقوی DNA که ناقل نامیده می‌شود، می‌کنند. ورود قطعه مورد نظر به داخل پلاسمید تولید یک مولکول نوترکیب DNA می‌کند.

ناقل، ژن را به سلول میزبان که معمولاً یک باکتری است حمل می‌کند. باکتری‌هایی که ناقل را دریافت می‌کنند توانایی رشد در محیط‌های کشت انتخابی را پیدا می‌کنند و شروع به تکثیر می-نمایند. در درون باکتری، ناقل نیز تکثیر می‌یابد و در واقع از ژنی که حمل می‌کند نسخه‌های مشابه و متعددی تولید می‌نماید. این ناقلین در هنگام تقسیم میزبان به نتاج منتقل شده و همانندسازی ناقل تا رسیدن باکتری به فاز مرگ ادامه پیدا می‌کند (براون، ۲۰۱۰).

۱-۳- تنوع ژنتیکی و اهمیت بررسی آن

بررسی تنوع ژنتیکی گیاهان از جنبه‌های مختلفی حائز اهمیت است. پیش شرط استفاده از ذخایر توارثی شناسایی و مطالعه تنوع ژنتیکی صفات مختلف درآن‌هاست. به علاوه مطالعه تنوع ژنتیکی در زمینه اداره مجموعه‌های گیاهی به ما کمک می‌کند. در کل توده‌های بومی اولیه منابع بسیار با ارزشی از تنوع ژنتیکی برای اصلاح یک گونه‌ی گیاهی می‌باشند و اغلب قادر به استقامت در شرایطی هستند که واریته‌های مدرن در آن شرایط به شدت آسیب می‌بینند، و ثبات عملکرد بهتری از خود نشان می-دهند. با جایگزین کردن و به دنبال آن از بین رفتن واریته‌های اولیه، تنوع ژنتیکی موجود در آن‌ها نیز از بین می‌رود. برای جلوگیری از چنین زیان‌هایی ذخیره واریته‌های اولیه مهم می‌باشد. یکی از پیامدهای اجتناب‌ناپذیر کشاورزی نوین که مبتنی بر استفاده از اکوتیپ‌های اصلاح شده با افزایش

1. Recombinant DNA technology
2. Genetic engineering

عملکرد و کیفیت قابل قبول است کاهش تنوع ذخایر ژنتیکی می‌باشد (عبدمیشانی و شاه‌نجات بوشهری،۱۳۷۷).

۱-۴- نام‌گذاری عمومی

انواع مختلف (*Cucumis melo* L.) سابقاً به نام‌های متعددی شامل کانتالوپ[1]، وینترملون[2]، اسنپ-ملون[3] و غیره نامیده می‌شدند. از این‌رو، به منظور به کارگیری واژه‌ای جامع مانگر[4] و رابینسون[5] ملون[6] را در انگلیسی برای کلیه انواع یا اکوتیپ‌های گونه *C. melo* پیشنهاد نمودند. ملون شامل خربزه var (*C. melo inodorus*)، طالبی (*C. melo* var *cantalupenses*)، گرمک (*C. melo* var *reticulatus*)، خیار چنبر (*C. melo* var *flexusus*) و دستنبو (*C. melo* var *dudaim*s) است. خربزه گیاه جالیزی مهمی است که با داشتن اکوتیپ‌های متنوع، کشت و پرورش آن در کشور ما از گذشته‌های دور تاکنون معمول بوده است. در سال‌های اخیر سطح زیر کشت اکوتیپ‌های اصلاح شده غیر بومی خربزه در حال گسترش می‌باشد و به همین دلیل فرسایش ژنتیکی اکوتیپ‌های بومی زیاد شده است که این خطر می‌تواند میراث چندین هزار ساله را در مدت کوتاهی نابود کند. آندرس در خصوص اهمیت ذخایر بومی اظهار داشته است که اگرچه مواد غیر بومی پایه ژنتیکی دارند ولی اهمیت مواد بومی بیشتر است زیرا سازگاری بیشتری دارند و از اکوتیپ‌های بومی بهتر می‌توان در فرآیندهای اصلاحی استفاده نمود. به طور کلی گیاهان جالیزی مخصوصا طالبی و خربزه نقش مهمی در زراعت صیفی کشور و درآمد ملی دارند (بنی‌هاشمی، ۲۰۰۹). و تنوع در اکوتیپ های خربزه شاید بیشتر از سایر کدوئیان در ایران باشد (بی‌نام، ۲۰۰۶).

1. Cantaloupe
2. Vynter melon
3. Snap melon
4. Munge
5 .Robinson
6. Melon

با توجه به اهمیت اقتصادی زیاد خربزه در ایران و جهان باید توان کنترل انواع آفات مختلف این گیاه و بیماری‌های مهم در رابطه با محصول خربزه مثل سوختگی سیاه خربزه (*Altenaria cucumerina*)، سوکوسپورای خربزه (*Cercopora melonis*)، سفیدک سطحی (*Erysiphe cichoracearum)* و سفیدک داخلی (*Pseudoperonospora cubensis*) را داشته باشیم (ارشاد، ۱۳۵۶). اما آنچه به میزان چشمگیری باعث کاهش کمیت و کیفیت محصول در ایران می‌گردد بیماری پژمردگی فوزاریومی ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* می‌باشد.

۱-۵- گیاه‌شناسی و طبقه بندی خربزه

خربزه با نام علمی *Cucumis melo* L. از خانواده کدوئیان Cucurbitaceae زیر خانواده Cucurbitoideae و جنس *Cucumis* می‌باشد (مک‌کریگت و همکاران، ۱۹۹۳). چهار محصول اصلی کدوییان شامل هندوانه، خیار، کدو و خربزه به زیر خانواده Cucurbitoideae تعلق دارند (رابینسون و والترز، ۱۹۹۹).

جنس *Cucumis* به دو زیر جنس *Cucumis* که گونه‌های *C. sativus* و *C. hystrix* در آن قرار می-گیرند و زیر جنس *Melo* که بقیه‌ی گونه‌ها در آن جای می‌گیرند، تقسیم می شوند (رابینسون و والترز، ۱۹۹۹).

زیر جنس *Melo* به چهار گروه تقسیم می‌گردند (مک‌کریگت و همکاران، ۱۹۹۳) که عبارتند از:

۱- گروه Metuliferus شامل گونه‌ی *C. metuliferus*

۲- گروه Anguria شامل گونه‌ی *C. anguria*

۳- گروه Melo شامل گونه‌ی *C. melo*

۴- گروه Hirsutus شامل گونه‌ی *C. hirsutus*

خربزه (2n=24) جزء محصولات باغبانی دگرگشن و با اهمیت اقتصادی بالا می‌باشد. گل‌های آن نر، ماده و یا کامل می‌باشند. ساقه‌ها ممکن است نرم، کرک‌دار یا بی کرک خطدار یا گوشه‌دار باشند. برگ‌ها دایره‌ای، تخم مرغی یا قلوه‌ای است، سطح برگ ممکن است دارای کرک نرم یا زبر باشد و پهنای آن از ۷ تا ۱۳ سانتی متر تغییر می‌کند. میوه خربزه از نظر گیاه‌شناسی سته است (جهانبخش، ۱۳۷۶).

۱-۶- خاستگاه و مراکز تنوع خربزه

شواهد تاریخی و باستان شناسی نشان می‌دهد که از هزاران سال پیش میوه تیره کدوئیان مورد استفاده بشر قرار گرفته است. تاریخ اقوام مختلف نشان دهنده آن است که در مرحله‌ای از تحولات کشاورزی، گونه‌های اهلی این تیره وارد غذای مردم آن قوم گشته است. با پیشرفت و توسعه سریع دانش بر استفاده‌های گوناگون از آن‌ها افزوده شده است (تاپلی و همکاران، ۱۹۳۷). خاستگاه و منشاء خربزه به خوبی روشن نیست و در این مورد هنوز ابهام وجود دارد. خربزه و طالبی بومی آفریقا بوده که سپس به آسیا و سایر کشورها گسترش یافته است. برخی هند را به دلیل رویش انواع وحشی و غیر خوراکی این گیاه، محل اهلی شدن خربزه می‌دانند و عده‌ای دیگر از مولفین معتقدند که اهلی شدن این گیاه از ایران آغاز گردیده است. در این میان برخی منابع از ایران به عنوان مرکز ثانویه‌ی پیدایش نیز نام برده‌اند (رادیچ، ۱۹۸۵). اکوتیپ‌های *C.melo* از دنیای قدیم به اروپا و آمریکا انتقال یافته است (دانشور، ۲۰۰۰).

گزارش‌های تاریخی و آثار باستانی از وجود خربزه در دو و سه هزار سال قبل از میلاد به ترتیب در مصر و ایران خبر داده‌اند (رابرت زکی و یاماگوچی، ۱۹۹۷). با توجه به اهمیت این محصول در نواحی هند، مصر، ایران و چین بتدریج این گیاه در سراسر خاورمیانه وآسیا نیز گسترش یافت. نظر هوکر[1] این است که گونه و اکوتیپ‌های اهلی خربزه و طالبی از یک اکوتیپ وحشی به نام *C. trigonus* که در

1. Hooker

ایران نیز موجود است، بوجود آمده است. این گونه در ایران و هندوستان و هیمالیا تا نواحی شمالی استرالیا می‌روید. در قرن پانزدهم طالبی و خربزه از نواحی ترکیه به منطقه‌ای به نام کانتالوپ[1] واقع در نزدیک شهر تاریخی روم برده شد و از آنجا به غرب اروپا گسترش یافت. واژه‌ی کانتالوپ یکی از نام-های خربزه می‌باشد که از این ناحیه برگرفته شده است (فورد و تیلور، ۲۰۰۳).

در قرن هفدهم میلادی اکوتیپ‌های خربزه در گلخانه‌های انگلستان کشت می‌شده است. در سال۱۶۸۳خربزه و طالبی توسط کریستوف کلمب به دنیای جدید و از آنجا توسط اسپانیایی‌ها به ایالت کالیفرنیا منتقل شد. در حال حاضر اکوتیپ‌های طالبی و خربزه در نواحی معتدل و گرمسیر سراسر دنیا پرورش داده می‌شوند (رابینسون و والترز، ۱۹۹۹).

۱-۷- ویژگی‌های زراعی خربزه

زمان کاشت خربزه در اکثر مناطق ایران و از جمله استان‌های خراسان شمالی و رضوی معمولا از ۱۵ فروردین تا اوایل اردیبهشت است و با توجه به شرایط آب و هوایی در اسفند ماه نیز به شکل زیر پلاستیکی کشت می‌گردد. در کل ۶-۲ هفته بعد از آخرین یخبندان بذرها قابل کشت یا نشاء می-باشند (حقی‌زاده، ۱۳۷۹). خاک مناسب برای این محصول باید حاصلخیز و تازه و زمین آفتابگیر باشد. خربزه در خاک‌هایی با بافت شنی یا رسی بهتر رشد می‌کند. اگر هدف برداشت زودتر محصول باشد خاک ماسه‌ای یا ماسه‌ای- لومی مناسب است ولی برای رسیدن به میزان بالاتر محصول خاک لومی، سیلتی- لومی و یا لومی- رسی ترجیح داده می‌شود (تامپسون و هومر،۱۹۵۷). زهکشی خاک نقش مهمی را در رشد بوته ایفا می‌کند. pH مناسب برای این محصول ۶/۵-۶ است و تنظیم آن در جذب عناصری چون کلسیم و منیزیم بسیار مهم می‌باشد. روش‌های عمده آبیاری شامل بارانی، جوی پشته، قطره‌ای و نشتی است و کاربرد هر کدام بستگی به شرایط منطقه و میزان آب در دسترس دارد (شول و کوپر، ۱۹۷۳).

1. Cantaluppe

استفاده از عناصر غذایی در میزان تولید محصول بسیار مهم هستند و در این زمینه کاربرد ریز مغذی-ها به صورت محلول‌پاشی در بخش‌های هوایی توصیه می‌شود. برداشت اکثرا به شکل سنتی است زیرا پیچک‌ها در این امر مشکل ایجاد می‌کنند. حدود ۶۸ روز بعد از نشاءکاری برداشت محصول شروع می‌شود که تقریبا مقارن با ۵۵-۳۵ روز بعد از گلدهی است و بستگی به شرایط آب و هوایی دارد. دوره برداشت ۲۷ روز تا یک ماه است و معمولاً هفته‌ای ۳ بار چیدن انجام می‌گیرد، و مقدار تولید به طور متوسط ۲۰-۱۲ تن درهکتار می‌باشد (تامپسون، و هومر ۱۹۵۷).

۱-۸- اصلاح خربزه

نگاهی به تولید ارقام مختلف خربزه و طالبی در کشور نشان می‌دهد که اساسی‌ترین مشکلی که در حال حاضر تولیدکنندگان با آن روبرو هستند، از دست رفتن یا کاهش عملکرد کمی و کیفی محصول خربزه تحت تنش‌های زیستی و غیرزیستی است. اثر تنش‌های زیستی ناشی از انواع بیماری‌ها و افات بسیار مشهود است به طوری که بیماری‌های ویروسی، قارچی و آفات در برخی مناطق تا ۹۰ درصد محصول را از بین می‌برند، به همین جهت اصلاح خربزه در مبارزه با آفاتی نظیر مگس خربزه و مگس جالیز و بیماری‌های همانند سفیدک سطحی و پژمردگی فوزاریومی خربزه صورت گرفته است. بهبود خربزه و تولید ارقام مقاوم به وسیله‌ی روش‌های سنتی آهسته و وقت‌گیر است و نیازمند منبع ژنتیکی قوی می‌باشد ولی متاسفانه منابع ژنتیکی خربزه محدود است و در حال حاضر برای اکثر این عوامل بیماری‌زا منابع مناسبی یافت نشده است. از طرفی موانع و معضلات زیادی در تثبیت و تولید لاین‌های مقاوم و تلاقی بین‌گونه‌ای به روش‌های کلاسیک وجو دارد. به نظر می‌رسد استفاده از روش‌های دست-ورزی ژنتیکی راه حل سریعتری و مناسب‌تری برای اهداف بلند مدت اصلاحی ارقام مقاوم خربزه می-باشد (نداف، ۱۳۸۹).

۱-۹- بیماری پژمردگی فوزاریومی[1]

قارچ *Fusarium oxysporum*، قارچ بیمارزای خاکزی است که در روی ۸۰ گونه‌ی گیاهی بیماری ایجاد می‌نماید (گوردون و مارتین، ۱۹۹۷). در گونه‌ی *Oxysporum* سطح بالایی از تخصص میزبانی وجود دارد، یعنی عامل بیماری گوجه‌فرنگی فقط گوجه را آلوده کرده و بر روی محصولات دیگر ایجاد بیماری نمی‌کند. بر همین اساس بیش از ۱۲۰ فرم تخصص یافته[2] و نژاد[3] در این گونه گزارش شده‌اند که قادر به ایجاد پژمردگی آوندی در بسیاری از محصولات کشاورزی می‌باشند (کورل، ۱۹۹۱). در نامگذاری فرم‌های تخصص یافته از نام لاتین میزبان اختصاصی استفاده می‌شود، به عنوان مثال در گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum*)، فرم تخصص یافته‌ی مهاجم *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersicon*، در نخود (*Pisum sativum*)، فرم تخصص یافته‌ی مهاجم به نام *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi* می‌باشد.

در اکوتیپ‌های مختلف خربزه نیز یکی از بیماری‌های مهم زردی و پژمردگی آوندی ناشی از *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* Snyder & Hansen می‌باشد که در نقاط معتدله و سردسیر شایع است. این فرم خاص از فوزاریوم فقط خربزه را آلوده، که در ادامه به معرفی آن می‌پردازیم. (بنی-هاشمی، ب۱۹۶۸).

۱-۱۰- بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه[4]

بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه یکی از بیماری‌های شایع و مهم با گستردگی وسیع در اغلب کشورهای واقع در آمریکا، اروپا و آسیا می‌باشد (فیکادنتی و همکاران، ۲۰۰۲). عامل بیماری اولین بار در سال ۱۹۳۳در شمال آمریکا و از ایالت‌های نیویورک و مینوسوتا گزارش شد و در سال ۱۹۳۸

1. Fusarium wilt
2. Formae speciales
3. Race
4. Melon Fusarium wilt

توصیف و سال ۱۹۴۰ اختصاصی بودن آن به گونه *C. melo* اثبات شد (بنی‌هاشمی، الف۱۹۶۸). در ایران اولین بار در سال ۱۳۴۴ عامل بیماری از خربزه‌های حومه مشهد در استان خراسان رضوی جداسازی گردید (بنی‌هاشمی، الف۱۹۶۸) و روی اکوتیپ‌های *C. melo* اثبات بیماری‌زایی شد. این بیماری موجب خسارت شدید به مزارع خربزه شده و کاهش محصول از ۵۰ تا ۱۰۰ درصد را در پی داشته است. خطر ابتلا به این بیماری در کلیه‌ی مراحل زندگی گیاه خربزه، از مراحل اولیه‌ی رشد تا هنگام برداشت محصول وجود دارد. اسپورهای این قارچ پس از استقرار در مزرعه برای سال‌ها حتی اگر چندین سال گیاه میزبان کشت نشده باشد، قادر است بر روی بقایای به جا مانده از کشت گیاهان قبلی، و نیز ریشه‌ی برخی از گیاهان غیر میزبان به صورت کلامیدوسپور[1] در خاک باقی بماند (بنی-هاشمی و دزیو، ۱۹۷۵). کلامیدوسپور نوعی اسپور غیر جنسی است که دیواره‌ای ضخیم و محکم آن به شکل گرد می‌باشد و آنرا در شرایط سخت محیطی محافظت می‌نماید. قطعات گیاهان آلوده، ماشین‌ها و ادوات کشاورزی و آب‌ها از عمده عوامل انتشار و انتقال عامل بیماریزا به سایر نقاط محسوب می‌شوند (شرف و ماکانب، ۱۹۸۶).

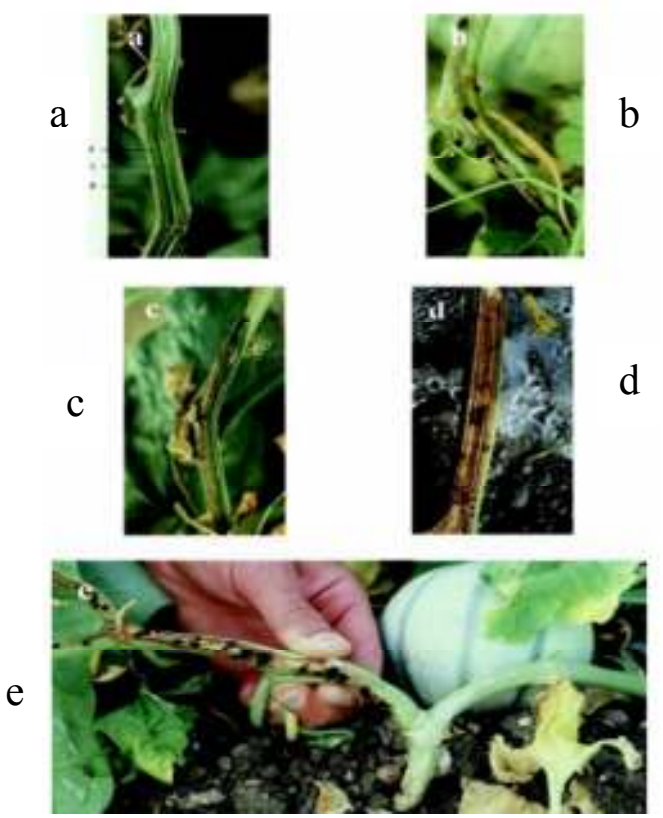
این بیماری در طالبی و خربزه به وسیله‌ی قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* ایجاد می‌شود و منحصرا متعلق به گونه‌ی *C. melo* است و محصولاتی نظیر انواع طالبی، خربزه، گرمک و خیارچنبر را مورد حمله قرار می‌دهند (جهانبخش، ۱۳۷۶). این قارچ در سایر جنس‌ها و گونه‌های کدوئیان بیماری‌زا نیست. این قارچ از طریق ریشه‌های جانبی و شکاف‌های کورتکس وارد گیاه می‌شود. دمای مناسب برای رشد قارچ ۲۶ درجه سانتیگراد می‌باشد ولی دمای ۲۲-۱۸ درجه سانتیگراد موجب تشدید علایم بیماری می‌شود و در دماهای بالاتر، حدود ۳۰ درجه سانتیگراد علایم بیماری ظاهر نمی‌شود. این بیماری در خاک‌های خنک و در اوایل فصل رشد شیوع می‌یابد. رطوبت نسبی بالا (۹۰-۸۰٪) موجب کاهش وقوع آلودگی می‌گردد و در شرایط رطوبت نسبی (۶۰-۵۰٪) شدت بیماری افزایش می‌یابد. افزودن نیتروژن به خاک منجر به افزایش شدت بیماریزایی می‌شود و از طرف دیگر

1. Chlamydospore

اضافه کردن پتاسیم و کلسیم شدت بیماری را کاهش می‌دهد (بلن‌کارد و همکاران، ۱۹۹۴ ؛ لن‌گاسکو و همکاران، ۲۰۰۰).

۱-۱۱- علائم بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه

اگرچه ممکن است که گیاهان در تمامی مراحل رشد تحت تاثیر این قارچ قرار گیرند ولی بیشتر وقوع بیماری در گیاهان بالغ دیده می‌شود (سوآرز و همکاران، ۲۰۰۴). در اثر این بیماری بذور ممکن است قبل از جوانه زدن و سبز شدن از خاک از بین بروند، نشاءها ممکن است قبل و یا بعد از جوانه زنی پژمرده شده و بمیرند (اعتباریان، ۱۳۷۶). در گیاهان مسن‌تر لبه برگ‌ها زرد می‌شود و این زردی به شکل پیش‌رونده کل برگ را در بر می‌گیرد. پژمردگی می‌تواند در هر مرحله‌ای از رشد گیاهان حساس اتفاق بیافتد و در یک یا تعداد بیشتری از ساقه‌های رونده دیده می‌شود. پژمردگی اغلب به کندی پیشرفت می‌کند و در ابتدا فقط در وسط روز که هوا گرم‌تر است قابل مشاهده است، چنین گیاهانی در شب بهبود پیدا می‌کنند ولی بعد از چند روز به طور دائمی پژمرده شده و می‌میرند. ترشحات صمغی قرمز یا نارنجی رنگ که از این زخم‌ها خارج می‌شود در معرض هوا به رنگ قهوه‌ای تیره در می‌آیند در برش عرضی ساقه‌ها مخصوصا در قسمت طوقه گیاه تغییر رنگ آوندی ملاحظه می‌شود که نشانگر رشد و نفوذ قارچ در سیستم آوندهای چوبی است (سوآرز و همکاران، ۲۰۰۴). ریشه‌ها در ابتدا عادی به نظر می‌رسند اما بعدا قهوه‌ای مایل به قرمز شده و در نهایت می‌میرند و میوه‌ها اگر تشکیل شوند کوچک مانده و بازار پسندی خوبی را ندارد (مارتین و آمادور، ۱۹۸۷ ؛ لیچ، ۱۹۳۸). شکل ۱-۱ علائم بیماری را در طالبی و خربزه نشان می‌دهد.



شکل ۱-۱- علایم ظاهری پژمردگی فوزاریومی در گیاه خربزه و طالبی. a) گیاه سالم b-e) گیاه آلوده (شجاعیان، ۱۳۸۳)

پنج فنوتیپ در رابطه با عکس العمل به نژادهای بیماری‌زا معرفی می‌گردند که شامل گیاهان بدون علائم، گیاهان دارای علائم زردی و پژمردگی در کوتیلودون و برگ اولیه، گیاهان دارای زردی و پژمردگی در ۲ برگ اولیه، گیاهان دارای زردی و پژمردگی در ۳ یا تعداد بیشتری از برگ‌ها و نیز مرگ گیاهچه می‌باشند (پرچپید و همکاران، ۲۰۰۵). مقاومت به قارچ عامل این بیماری به طور واضح در مرحله‌ی گیاهچه‌ای مشاهده می‌گردد.

فصل دوم

مرور منابع

۲-۱- فرضیه ژن برای ژن فلور

فرضیه ژن برای ژن اولین بار توسط فلور در سال ۱۹۵۶ و بر اساس مطالعات وی روی اثر متقابل میزبان و پاتوژن روی گیاه کتان برای بیماری زنگ حاصل از *Malampsora lini* ارائه گردید. این فرضیه بیان می‌دارد که هر ژن کنترل کننده مقاومت در میزبان یک ژن متناظر کنترل کننده بیماری-زایی در پاتوژن دارد. مقاومت میزبان از طریق ژن‌های غالب و بیماری‌زایی توسط ژن‌های مغلوب حاصل می‌شود. ژنوتیپ میزبان و پاتوژن تعیین کننده نوع واکنش بیماری می‌باشد. زمانی که ژن‌های میزبان و پاتوژن در تمام مکان‌های ژنی با یکدیگر جفت شوند میزبان واکنش حساسیت نشان خواهد داد. اگر برخی ژن‌ها در مکان‌های ژنی به صورت جفت نشده باقی بمانند میزبان واکنش مقاومت را نشان خواهد داد. در سطح ملکولی فرضیه بر این است که مقاومت ژن برای ژن در اغلب موارد شامل تولید سم یا پروتئین‌های آنتی بیوتیکی توسط یک ژن مقاوم است، تولید سم با میزان فعالیت ژن در ارتباط می‌باشد. مقاومت حاصل از ژن غالب پایدارترین مقاومت می‌باشد.

زمانی که دو پروتئین به یکدیگر متصل شوند تعامل پروتئین–پروتئین رخ می‌دهد، که غالباً عملکردهای بیولوژیکی را انجام می‌دهند. بسیاری از فرایندهای مولکولی مهم در سلول مانند تکثیر DNA توسط کمپلکس‌های بزرگ مولکولی انجام می‌شوند که این کمپلکس‌ها از تعداد زیادی پروتئین‌های سازماندهی شده به وسیله تعامل بین پروتئین‌ها ساخته شده‌اند. تعاملات بین پروتئین‌ها برای اکثر عملکردهای زیست شناختی مهم هستند. به عنوان مثال، سیگنال‌های سطح خارجی یک سلول توسط تعامل پروتئینی بین مولکول‌های سیگنالی به داخل سلول هدایت می‌شوند. این فرایند را انتقال سیگنال می‌نامند که نقش اساسی در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی و در مبارزه با بسیاری از بیمارها بازی می‌کند. تعامل پروتئین-پروتئین برای هر فرآیندی در سلول زنده از اهمیت مهمی برخوردار هستند. اطلاعات در مورد این تعاملات درک ما را از بیماری‌ها بهبود می‌بخشند و و می‌توانند پایه و اساس روش‌های جدید مبارزه با بیماری‌ها را فراهم کنند.

۲-۲- مکانیسم‌های مقاومت گیاهی

اثرات مضر و نامطلوب بر رشد گیاه و عملکرد تنش نامیده می‌شود که می‌تواند حاصل عوامل محیطی یا بیولوژیکی باشد. تنش‌ها به دو گروه زنده و غیر زنده تقسیم‌بندی می‌شوند. تنشی که توسط عوامل بیولوژیکی مثل بیماری‌ها، آفات و علف هرز ایجاد شود را تنش زنده می‌گویند. زمانی که تنش توسط عوامل محیطی ایجاد شود تنش غیر زنده نامیده می‌شود. تمامی گیاهان هر دو گروه تنش را با درجات مختلف تحمل یا مقاومت می‌کنند که در این قسمت از انواع مقاومت گیاهان در برابر تنش‌ها به خصوص بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه صحبت می‌کنیم.

مقاومت عمودی یا اختصاصی: مقاومت اختصاصی میزبان به نژاد خاصی از پاتوژن را مقاومت عمودی می‌نامند. توارث این نوع مقاومت ساده می‌باشد به همین لحاظ به آن مقاومت کیفی هم گفته می‌شود. جزء مقاومت‌های بزرگ ژن می‌باشد یعنی ژن‌های کنترل کننده این نوع مقاومت اثر متمایز و مشخصی دارا می‌باشد. این نوع مقاومت توارث‌پذیری بالای دارد و می‌توان در برنامه‌های اصلاحی از آن استفاده نمود، با ایجاد نژادهای جدید پاتوژن مقاومت عمودی شکسته می‌شود.

مقاومت افقی یا عمومی: مقاومت میزبان به تمام نژادهای یک پاتوژن را گویند. این نوع از مقاومت دارای ژن‌های کنترل کننده زیادی می‌باشد که اثر هر ژن برای ایجاد مقاومت کم می‌باشد (ژن کوچک اثر). مقاومت عمودی در رابط ژن برای ژن کاربردی ندارد، توارث‌پذیری کمی دارد و به همین دلیل شناسایی تیپ‌های مقاوم مشکل می‌باشد. تنوع پیوسته‌ای را مقاومت عمودی در بین ژنوتیپ‌ها نشان می‌دهد و ایجاد نژادهای جدید پاتوژن بر روی مقاومت تاثیری نمی‌گذارد.

مقاومت تک ژنی یا الیگوژنی: اگر مقاومت حاصل یک ژن باشد به آن مقاومت الیگوژنی گویند. در این مورد هر ژن اثری بزرگ و قابل تشخیص بر مقاومت دارا می‌باشد. مقاومت ممکن است توسط ژن-های غالب یا مغلوب حاصل شود. در این نوع از مقاومت تفاوت بین گیاهان مقاوم و حساس کاملاً

مشخص است. انتقال این نوع مقاومت از گیاهی به گیاه دیگر ساده می‌باشد مثل مقاومت به پژمردگی فوزاریومی پنبه و ورتیسیلومی پنبه.

مقاومت چند ژنی یا پلی‌ژنی: گاهی اوقات مقاومت به بیماری‌ها توسط چندین ژن حاصل می‌شود که هر ژن دارای اثری کوچک بر روی مقاومت می‌باشد به طوری‌که اثر هر ژن قابل تشخیص نمی‌باشد. این نوع از مقاومت در برابر تمامی نژادهای پاتوژن ایجاد می‌شود. مقاومت چند ژنی دارای تنوع پیوسته در صفت مقاومت می‌باشد. انتقال این نوع از مقاومت سخت می‌باشد مثل مقاومت به پژمردگی فوزاریومی گوجه (سینگ، ۲۰۱۱).

قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* به شکل کلامیدوسپور در خاک و بقایای آلوده گیاهی زمستان‌گذرانی می‌کند. بعضی از علف‌های هرز نیز ناقلان بدون علائم این بیمارگر محسوب می‌گردند. نحوه زندگی و تغییر جمعیت فرم اختصاصی خربزه در محصولات زراعی چون خربزه، طالبی، چغندر، یونجه، گندم، گوجه‌فرنگی و پنبه بررسی شد، و مشخص گردید فرم اختصاصی عامل پژمردگی خربزه می‌تواند در بقایایی گیاهی همه گیاهان ذکر شده رشد و نمو کند (شفق، ۱۳۸۴). روش مهم کنترل این بیماری استفاده از اکوتیپ‌های مقاوم می‌باشد، البته اکوتیپی که مقاوم به همه نژادها باشد موجود نیست و تنها استراتژی اساسی برای مقابله با این بیماری انتقال تمام ژن‌های مقاومت داخل یک اکوتیپ می‌باشد (ریسر، ۱۹۸۷). بر اثر این بیماری حدود ۹۰٪ خسارت به مزارع جالیزکاری وارد می-گردد (مارتین و آمادور،۱۹۸۷). برای کنترل این بیماری اقدامات متعددی مانند کنترل شیمیایی، بیولوژیکی و ...توصیه شده است.

۲ -۳- کنترل شیمیایی

استفاده از سموم ضدعفونی کننده خاک می‌تواند کنترل اولیه خوبی برای قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* باشد (صارمی، ۱۳۷۷). زیتر (۱۹۹۹) گزارش کرده که حضور مجدد قارچ در خاک خیلی سریع اتفاق می‌افتد. در بررسی جدیدی که توسط هانگ و دامس (۲۰۰۳) در دانشگاه

کورنل انجام گرفته است، مشخص شده که غلظت‌های مختلفی از بیکربنات سدیم و پتاسیم روی رشد میسیلوم قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *mlonis* تاثیر می‌گذارد. در کنترل بیماری از ترکیبات شیمیایی ضدعفونی کننده که عموما به صورت گاز هستند، استفاده می‌شود. ولی معمولاً مشکلات تکنیکی در به کارگیری این ترکیبات، بهره‌برداری آن‌ها را محدود ساخته است. علاوه بر این پس از تدخین خاک و بسترهای کشت، خطر تشکیل مجدد کلونی‌های قارچ در خاک همچنان به قوت خود باقی خواهد ماند. به هر حال توصیه می‌شود که استفاده از مخلوط کلروپیکرین به میزان ۵ گرم در یک متر مربع خاک به همراه متیل بروماید به مقدار ۷۵ گرم در یک مترمربع خاک تا حدودی بر کاهش بیماری تاثیر می‌گذارد (شجاعیان، ۱۳۸۳).

۲-۴- انجام عمل پیوند

در این روش گیاهچه‌ها بر روی پایه‌های مقاوم پیوند زده می‌شوند. برای این‌کار گیاهچه‌ها قبل از انتقال به محل اصلی و در مرحله‌ی یک یا دو برگ حقیقی پیوند می‌شوند و پس از طی یک دوره مراقبت ۱۰-۷ روزه و اطمینان از گرفتن پیوند به محل اصلی انتقال می‌یابند. نتایج حاصل از مطالعات نشان داد که پایه واکنش پیوندک را به لحاظ بروز مقاومت به علاوه کیفیت میوه و میزان محصول تحت تاثیر قرار می دهد (لی، ۱۹۹۴ ؛ نیسین و همکاران، ۲۰۰۲).. انواع کدو مانند *Benincase cerifera* و پایه‌های مقاوم طالبی- خربزه، از جمله پایه‌هایی هستند که برای این منظور مورد استفاده قرار می‌گیرند. این روش کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه عملی می‌باشد ولی هزینه زیاد آن مانع انجام کار است.

۲-۵- کنترل زراعی

به دلیل فراوانی قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* در منطقه ریزوسفر گیاهان حساس در خاک تاثیر تناوب محصول در کنترل بیماری بسیار مورد توجه می‌باشد. بنی‌هاشمی و دزیو (۱۹۷۵)

گزارش کرده‌اند که این قارچ را می‌توان از ریشه ذرت و سویا که در تناوب با خربزه بوده‌اند جدا نمود ولی با این حال تناوب زراعی طولانی با غیر کدوئیان باعث کاهش تدریجی جمعیت قارچ در خاک می‌شود. همچنین سوآرز و همکاران (۲۰۰۴) دریافتند که با عملیات زراعی همانند شخم زمین پروپاگول قارچ اگر برای مدت طولانی در معرض هوا قرار گیرد، گرچه باعث حذف کامل *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* نمی‌گردد ولی به طور چشمگیری باعث کاهش پروپاگول قارچ می‌شود. تقویت گیاهان سالم با استفاده از برنامه حاصلخیزی متناسب با نوع خاک و ممانعت از پراکندگی خاک آلوده توسط ماشین‌آلات کشاورزی، حیوانات و آب‌های زهکشی که خربزه‌های آلوده عبور نموده‌اند از سایر اقدامات به زراعی و بهداشتی در رابط با کاهش بیماری است (حقی‌زاده، ۱۳۷۹).

۲-۶- کنترل بیولوژیکی

روابط متقابل بین نژادهای بیماری‌زا و غیربیماری‌زا درکنترل بیماری موثر است. نژادهای غیربیماری-زای *Fusarium oxysporum* به عنوان عامل کنترل بیولوژیکی شناخته شده‌اند. این نژادها دارای نحوه عمل متفاوتی در ارتباط با کنترل بیولوژیک می‌باشند. یکی از آن‌ها رقابت بر سر موادغذایی موجود در خاک است که بر میزان جوانه‌زنی کلامیدوسپورهای بیمارگر تاثیر می‌گذارند و تراکم اینوکلوم‌های نژاد غیر بیماری‌زا در سطح ریشه افزایش پیدا می‌کند. مقاومت سیستمیک القائی که منجر به تحریک مکانیزم دفاعی گیاهان می‌شود از مکانیسم‌های مهم در این زمینه است (بلن‌کارد و همکاران، ۱۹۹۴). فراول و همکاران (۲۰۰۳) نژادی از *Fusarium oxysporum* را که تحت نام FO-47 است و سبب تحریک مقاومت به پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی می‌شود، را گزارش کردند. از سایر موارد کنترل بیولوژیک که در رابطه با بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه مورد بررسی قرار گرفته است می‌توان به دو سویه باکتری *Pseudomonas putida* اشاره نمود (بورا و همکاران، ۲۰۰۴). تحت شرایط طبیعی آزمایشی که در مزرعه خربزه در طی سال‌های ۲۰۰۱ و ۲۰۰۲ انجام گرفت خربزه‌های دارای تیمار

بذور سویه ۳۰ *Pseudomonas putida* و سویه ۱۸۰ *Pseudomonas putida* به ترتیب ۶۳٪ و ۴۶٪ کاهش آلودگی را نشان دادند (بورا و همکاران، ۲۰۰۴).

اشرفی‌زاده و اعتباریان (۱۳۸۱) در ارزیابی جدایه‌های *Trichoderma*، *Streptomyces* برای کنترل بیولوژیکی پژمردگی فوزاریومی خربزه دریافتند که میزان رشد میسیلومی بیمارگر در مقابل جدایه‌های مختلف دو آنتاگونیست فوق به‌طور معنی‌داری کاهش داشته است. درصد کاهش رشد در مورد جدایه-های *Streptomyces* بین ۱/۴ تا ۹۹/۷ و در مورد جدایه‌های *Trichoderma* بین صفر تا ۱۰ درصد متغیر بوده است.

۲-۷- استفاده از اکوتیپ‌های مقاوم

فرآیند تولید پایه‌های مقاوم با شناسایی ژن‌های مقاومت و جداسازی آن‌ها و انتقال این ژن‌ها همراه می‌باشد. روشی موثر برای شناسایی اکوتیپ‌های مقاوم، تلقیح عامل بیماری‌زا و تخمین پاسخ گیاه به عامل بیماری است (بورگر و همکاران، ۲۰۰۳). در برنامه‌های اصلاحی برای ارزیابی مقاومت به پژمردگی فوزاریومی از روش تلقیح مصنوعی استفاده می‌گردد. با استفاده از تکنیک تلقیح گیاهان حساس دارای علائمی همچون زردی، پژمردگی و مرگ گیاه می‌شوند، ممکن است گیاهان حساس علائم را به صورت ظاهری نشان ندهند زیرا علائم بیماری در داخل سیستم آوندی گیاه حساس و دور از چشم ما می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهند که ژن‌های هسته‌ای پس از انتقال به سیتوپلاسم و بیان پروتئینی می‌توانند نقش مهمی در کنترل مقاومت خربزه به *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* داشته باشند (ریوروس و همکاران، ۲۰۰۱).

با توجه به این‌که دو ژن غالب مقاومت *Fom1* و *Fom2* به ترتیب مقاومت به نژاد صفر، ۲ و صفر، ۱ را باعث می‌شوند (ریسر و مس، ۱۹۶۵ ؛ ریسر و همکاران، ۱۹۷۶ ؛ رابینسون و همکاران، ۱۹۷۶)، تا کنون اکوتیپ‌های متعددی نظیر طالبی شهد شیراز، Charentais Fom2، Cum-334، Cum-241،

PI-161375، PI-124111، گلدن گوفر[1] و دلس[2] به عنوان اکوتیپ‌های مقاوم نسبت به نژادهای صفر و ۱ معرفی شده‌اند (اومولود و همکاران، ۲۰۱۱).

۲-۸- اثر متقابل نژادهای پاتوژن با ژن‌های مقاومت

چهار نژاد *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* بر اساس ظرفیت بیماری‌زایی‌شان در مجموعه‌ای از رقم‌های خربزه مثل Charentais T, Doublon, CM17187 شناسایی شدند و واکنش مقاومت در مقابل بیماری ناشی از این قارچ به حضور ژن‌های *Fom1*، *Fom2* در گیاهان مقاوم نسبت داده شد (ریسر و همکاران، ۱۹۷۶). هر دو ژن مقاومت به صورت مستقل و غالب به توارث می‌رسند. هر اکوتیپ خربزه بسته به ژن‌های مقاومتی که در آن حضور دارد ممکن است به یک نژاد و یا چند نژاد *melonis* *Fusarium oxysporum* f.sp. مقاوم باشد.

برای مثال اکوتیپ Doublon که حاوی تک ژن غالب *Fom1* می‌باشد نسبت به نژادهای صفر و ۲ این قارچ مقاوم است (ریسر و رود، ۱۹۷۳). در حالی‌که اکوتیپ CM 17-187 حاوی ژن غالب *Fom2*، در مقابل نژادهای صفر و ۱ قارچ پژمردگی فوزاریومی خربزه مقاوم است (ریسر و همکاران، ۱۹۷۶). لاین اصلاحی *MR-1* که دارای هر دو ژن *Fom1, Fom2* است نسبت به نژادهای صفر و ۱ ، صفر و ۲ قارچ مقاومت وسیعی را نشان می‌دهند (زینک و توماس، ۱۹۸۸).

نژاد ۱.۲ به دو پاتوتیپ[3] ۱.۲ W (عامل ایجاد پژمردگی) و ۱.۲Y (عامل ایجاد زردی) تفکیک می‌شود (هرمن و تروس، ۲۰۰۷). نژاد صفر قارچ بیماری را فقط بر روی ژنوتیپ‌هایی از خربزه و طالبی می‌توان مشاهده کرد که هیچ یک از ژن‌های مقاومت به پژمردگی فوزاریومی را نداشته باشند. تا به امروز هیچ ژنی برای مقاومت به تمامی نژادهای *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* شناسایی نشده است. فرآیندهای اصلاحی نظیر انتقال ژن‌های مقاومت سبب تولید اکوتیپ‌های نسبتاً مقاوم به نژاد ۱.۲در

1. Golden gopher
2. Dulce
3. Pathotype

نمونه‌های Ogon9 و Piboule (ریسر و رود، ۱۹۷۳)، لاین‌های اصلاحی Isabelle (ریسر و رود، ۱۹۷۳)، دو لاین دابل هاپلوئید Nad1 و Nad2 (فیکادنتی و همکاران، ۲۰۰۲) و لاین اصلاحی BIZ (هرمن و تروس، ۲۰۰۷) شده است. ناکازومی و همکاران (۲۰۰۲) دو کالتیوار جدید خربزه مقاوم به نژاد Y ۱.۲ را معرفی کرده‌اند، این‌کار در انیستیتو بین‌المللی علوم چای و سبزیجات ژاپن و روی اکوتیپ‌های *Cucumis melon* var *conoman* و Podai NO.1 انجام شده است و مشخص شده که این اکوتیپ‌ها دارای مقاومت کمی به نژاد ۱.۲ هستند. امروزه تعداد زیادی منبع مقاومت به نژاد صفر،۱ و ۲ قارچ عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی در خربزه شناخته شده است.

جدول ۲-۱- اکوتیپ‌های افتراقی و واکنش هر یک در مقابل نژادهای مختلف قارچ

	سویه‌ها			
ژن‌های مقاومت	۰	۱	۲	۱.۲
شاهد حساس	حساس	حساس	حساس	حساس
Fom1	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس
Fom2	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
مقاومت چند ژنی *Fom1*, *Fom2*	مقاوم	مقاوم	مقاوم	حساس

۲-۹- مروری بر مطالعات انجام شده

رشد و پراکنش گیاهان در طبیعت تحت تاثیر عوامل تنش‌زای محیطی می‌باشد، فرآیند تکامل در گیاهان برای مقابله با این تنش‌ها سبب ایجاد مکانیزم‌های مقاومت و تحمل در گیاه می‌شود که این عوامل بر روی DNA و عملکرد آن تاثیر می‌گذارد. اساس وراثت صفات در گیاهان به انتقال پایدار توالی DNA ارتباط دارد، توالی DNA بر روی خواص و رفتار بیولوژیکی یک گونه گیاهی موثر است، که این حالت بایستی نسبتاً ثابت بماند اگرچه نوترکیبی‌های ژنتیکی و موتاسیون می‌تواند ترکیبات

جدیدی را ایجاد نماید تا تحمل گیاهان را به انواع بیماری‌ها و تنش‌های محیطی افزایش دهند. تغییرات ژنتیکی که به وسیله موتاسیون‌ها تحریک می‌شود همیشه سبب ایجاد مقاومت نمی‌گردد ممکن است این تغییرات سبب حساسیت اکوتیپ‌های و خسارت جبران‌ناپذیر به محصولات کشاورزی شود (وایسی و همکاران، ۲۰۰۸).

عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* می‌باشد. در گوجه ژن‌های *I* و *I-2* به عنوان منابع مقاومت در برابر بیماری پژمردگی فوزاریومی شناخته شدند. ژن‌های مقاومت در برابر بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه توسط پریت چارد به اکوتیپ‌هایی مثل Marglobe و Rutgers انتقال داده شدتا اینکه موفق به تولید اکوتیپ‌های مقاوم در برابر بیماری شدند (پریت‌چارد، ۱۹۷۲).

بیماری پژمردگی فوزاریومی کاهو که ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lactucum* است یکی از بیماری‌های مهم در منطقه ورامین، کرج و شهر ری می‌باشد. این بیماری اولین بار توسط هوبارد و گریگ از ناحیه فرسنو کالیفرنیا گزارش شد و در ایران در سال ۱۳۷۲ در شهر ری مشاهده شد. در تحقیقی ۱۵اکوتیپ کاهو را نسبت به حساسیت و مقاومت به قارچ فوزاریوم بررسی کردند و متوجه شدند که گونه‌های مقاوم وزن خشک ریشه، وزن خشک و تازه اندام‌های هوائی و درصد بوته-های سالم بیش‌تری را داشتند. در این آزمایش به این نتیجه رسیدند که وزن خشک ریشه دقیق‌ترین شاخص در ارزشیابی مقاومت در برابر بیماری پژمردگی می‌باشد (دهقانی و همکاران، ۲۰۰۱).

تعیین میزان تنوع ژنتیکی در مواد گیاهی گام اولیه برای شناسایی، حفظ و نگهداری ذخایر توارثی و نیز پایه اساسی و اولیه برای تحقیقات ژنتیکی و برنامه‌های اصلاحی می‌باشد. استفاده از نشانگرهای ملکولی ابزاری مهم در این زمینه است که در ارزیابی روابط خویشاوندی ژنتیکی، انتخاب گیاهان برتر و بررسی شباهت یا تفاوت بین نمونه‌های مختلف کاربرد دارند. هم چنین استفاده از این نشانگرها برای افزایش کارایی اصلاح گیاهان مفید می‌باشد (لاوی و همکاران، ۱۹۹۴). تاکنون به منظور ارزیابی

تنوع ژنتیکی در بین گروه‌های خربزه و نیز به منظور ایجاد نقشه‌های لینکاژی از نشانگرهای ژنتیکی مختلفی استفاده شده‌است. در این میان استفاده از نشانگرهای DNA در بررسی‌های مربوط به تنوع ژنتیکی به شدت مورد توجه قرارگرفته است. استفاده از نشانگرهای DNA در ارزیابی‌های مربوط به تنوع ژنتیکی خربزه از دهه ۱۹۹۰ آغاز شد. استاپ و همکاران (۲۰۰۰) با استفاده از مارکرهای RAPD تنوع ژنتیکی خربزه‌های کشت شده در اروپا و آمریکای شمالی را مورد مطالعه قرار دادند، و ملیکی و همکاران (۲۰۰۱) در یک کلکسیون بزرگ از ژرم‌پلاسم‌های خربزه در آفریقا تنوع ژنتیکی را مطالعه کردند.

رستگار و لادن مقدم (۱۳۸۲) به منظور کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه و طالبی، نمونه برداری را از مزارع آلوده که شامل خربزه ایوانکی،خربزه سبز، خربزه مشهدی و طالبی آناناسی بود، را انجام دادند. سپس ضدعفونی طوقه و ریشه گیاه آلوده انجام و قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis* از بافت‌های آلوده جداسازی و اثبات بیماریزایی شد. کنترل بیماری با دو ماده بیولوژیک Trichodermin B و Subtilin به همراه تقویت گیاه با کودهای آهن، روی، مس، پتاسیم، کلسیم ومنگنز انجام و نتایج حاکی از آن بود که استفاده از عناصر مغذی مذکور و تیمار بذور با مواد بیولوژیک سبب رشد بهتر و سریع تر بوته‌ها گردید و تا حد زیادی از بروز بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه جلوگیری نمود.

تا سال ۱۹۶۵ اطلاعات چندانی در خصوص وجود نژادهای فیزیولوژیکی *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (FOM) در دسترس نبود. ریسر و مس (۱۹۶۵)، با استفاده از اکوتیپ‌های افتراقی[1] *Cucumis melo* نژاد ۱، ۲، ۳ و ۴ این قارچ را از فرانسه گزارش کردند. تا کنون بر اساس ژن-های مقاومت شناخته شده در *C. melo* نژادهای دیگری از عامل بیماری گزارش نشده است. بنی-هاشمی و دزیو (۱۹۷۵) ضمن مقایسه جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* از استان

1. Differential cultivars

خراسان رضوی، شمال آمریکا و جنوب کانادا، جدایه‌های استان خراسان را متعلق به نژاد ۲ و جدایه-های آمریکای شمالی را جزء نژاد ۴ معرفی نمودند. ریسر و همکاران (۱۹۷۶) بر اساس ژن‌های شناخته شده مقاومت در اکوتیپ‌های، نژادهای *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* را به صورت نژادهای صفر، ۱، ۲، ۱.۲ گزارش نمودند. بر این اساس نژادهای قبلی ۱، ۲، ۳ و ۴ به ترتیب به نژادهای صفر، ۱، ۲، ۱.۲ تغییر یافت. نژاد ۲ در آمریکا بسیار مخرب و تا سال ۱۹۸۵ تنها نژاد شناخته شده ولی اکنون تمام نژادهای *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* در آمریکا (مارتین و گوردون، ۱۹۹۶) و فرانسه (ریسر و ماس، ۱۹۶۵) گزارش شده‌اند. در ایران تا کنون نژاد ۱ این قارچ از مشهد و گرمسار (بنی‌هاشمی، ۱۹۶۹) و نژاد ۱.۲ را از فارس و اصفهان و اخیرا نیز از کاشان گزارش کرده‌اند (ذاکری و بنی‌هاشمی، ۱۹۹۶) ولی نژادهای صفر و دو تا کنون در ایران شناسایی نشده‌اند، و جداسازی سایر نژادهای قارچ عامل بیماری در ایران احتیاج به پژوهش‌های بیشتری دارد.

علاوه بر تنوع در نژادهای قارچ، گروه‌های سازگاری رویشی[1] (VCG) نیز در *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* مورد مطالعه قرار گرفته است. گروه‌های سازگاری رویشی و نژادهای *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* با هم همخوانی نداشتند و نژادها ممکن است در یک گروه سازگاری رویشی یا گروه‌های سازگاری رویشی دیگر وجود داشته باشند (جاکوبسن و گوردون، ۱۹۹۰).

به منظور انتقال ژن و تولید پایه‌های مقاوم از طریق بیوتکنولوژی از روش‌های کشت بافت در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شده‌است، برای این منظور بر روی میوه خربزه بیش از ۱۰۰ گزارش باززایی توصیف شده‌است. باززایی گیاه خربزه در کشت بافت به دو روش عمده اندام‌زایی و جنین‌زایی سوماتیکی انجام شده‌است. بیشتر گزارشات از باززایی ارقام خربزه مربوط به اندام‌زایی مستقیم می-باشد. باززایی مستقیم نسبتاً راحت‌تر بوده و مشکلاتی مثل طول دوره کشت که در اندام‌زایی غیرمستقیم و جنین‌زاتیی سوماتیکی با آن روبه‌رو هستیم را ندارد. و بر خلاف اندام‌زایی غیرمستقیم با

1. Vegetative compatibility groups

تنوع سوماکلونال و ناهنجاری‌های کمتری مواجه است. شاید عیب اصلی این روش تولید کم پایه‌های مقاوم و حساسیت و سرسختی بیشتر در فرآیندهای انتقال ژن می‌باشد (نداف، ۱۳۸۹). برن‌کارد و همکاران (۱۹۹۱) اکسپلنت‌های کوتیلدونی خانواده *Cucumis melo* L. را که در آن‌ها نمونه‌های مقاوم و حساس به *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* موجود بود، را در معرض نژادهای مختلف عامل بیماری مورد باززایی قرار دادند. درصد رشد و مرگ و میر نمونه‌های آلوده پس از یک ماه تعیین گردید. ژنوتیپ‌های مورد کشت عکس‌العمل متفاوتی را در برابر نژادها از خود نشان دادند، که این رفتار به حضور ژن‌های مقاومت در ژنوتیپ‌ها بستگی داشت. و از گیاهان مقاوم به عنوان پایه‌های مقاوم در برابر نژادهای مختلف پژمردگی فوزاریومی خربزه استفاده نمودند.

گیاهان مورد حمله پاتوژن‌های مثل ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ، نماتد و حشرات قرار می‌گیرند. و آن‌ها مکانیزم‌های فیزیکی و شیمیایی مختلفی را در برابر پاتوژن‌ها از خود نشان می‌دهند. یکی از راه‌های مقاومت ژن‌های R می‌باشد که این ژن‌ها با کد کردن پروتئین‌های R سدهای دفاعی را در برابر پاتوژن‌ها ایجاد می‌نمایند. ژن‌های R از لحاظ توالی، تنوع نوکلئوتیدی در گیاهان مختلف نشان می-دهند. در *L. perenne* در هر ۱۰ نوکلئوتید از توالی ژن‌های R یک موتاسیون در ناحیه LRR مشاهده می‌شود (ژینگ و همکاران، ۲۰۰۷). مکانیزم‌های ژنتیکی مثل جهش نقطه‌ای، نوترکیبی، کراسینگ‌آور نابرابر به عنوان عوامل موثر در تنوع توالی ژن‌های R می‌باشند.

پروتئین‌های R بر اساس ساختار قرار گیری دومین‌ها به خانواده‌های TIR-NBS-LRR و non-TIR-NBS-LRR تقسیم‌بندی می‌شوند. خانواده TIR-NBS-LRR شامل دومین TIR در انتهای آمینی می‌باشد که به سه زیر خانواده TIR-NBS-LRR، TIR-NBS-LRR-WRKY و $NBS_{(TIR)}$-LRR تقسیم‌بندی می‌شوند. این خانواده از پروتئین‌های مقاومت در تک لپه‌ای‌ها شناسایی نشده‌اند.

خانواده non-TIR-NBS-LRR شامل دومین‌های مثل coiled coil و BED می‌باشد که به سه زیر خانواده CC-NBS-LRR، BED-NBS-LRR و $NBS_{(CC)}$-LRR تقسیم‌بندی می‌شوند (میرس و

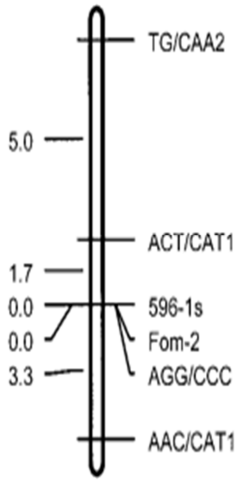
همکاران،۱۹۹۹). این خانواده از پروتئین‌های مقاومت در دو و تک لپه‌ای‌ها شناسایی شده‌است و پروتئین *Fom2* متعلق به خانواده non-TIR-NBS-LRR و زیر خانواده CC-NBS-LRR می‌باشد (گلوواکی و همکاران، ۲۰۱۰). خانواده TIR را می‌توان در ژن‌های مقاومت *N* تنباکو و *RPP5* آرابیدوبسیس دید. پروتئین‌های مقاومت مربوط به کلاس non-TIR دارای ساختار coiled-coil در انتهای آمینی هستند. گروه non-TIR را می‌توان در پروتئین‌های *RPS2* و *RPM1* اآرابیدوبسیس و *Prf* گوجه فرنگی یافت (ژوبیور و همکاران، ۲۰۰۴).

ژن *Fom2* که عامل مقاومت به نژاد صفر و ۱ قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* می‌باشد، از خانواده‌ی ژن‌های مقاومت R (Resistant) است، که این ژن‌ها پروتئین‌های مقاومت را کد می‌کنند. شناسایی ژن‌های avr پاتوژن توسط پروتئین‌های تولید شده ژن‌های R میزبان صورت می‌گیرد که این تشخیص سبب ایجاد پاسخ دفاعی در میزبان می‌شود (مارتین و همکاران، ۲۰۰۳). اخیراً تعدادی از ژن‌های مقاومت که سبب ایجاد واکنش به پاتوژن‌های مختلف می‌شود کلون و ساختارشان در دامنه گسترده‌ای از گونه‌های گیاهی تعیین شده‌است (اینگوارنس و همکاران، ۲۰۰۸)، برای تعیین ساختار ژن‌های مقاومت از ابزارهای ملکولی، نقشه‌های ژنتیکی، ترانسپوزان‌ها و Map-based cloning استفاده کردند (دونگ و همکاران، ۲۰۰۱ ؛ مارتین و همکاران، ۲۰۰۳). ژن مقاومت *Fom2* یک ژن اصلی و منفرد است و متعلق به تیپ NBS-LRR از پروتئین‌های مقاومت می‌باشد، این ژن پروتئین‌هایی را با دومین‌های NBS و LRR کد می‌کند و مربوط به کلاس non-TIR است (ونگ و همکاران،۲۰۱۱).

مدل‌های مختلفی جهت تشخیص پاتوژن‌ها توسط گیاهان معرفی شده است مدل ژن برای ژن که می-گوید هر ژن کنترل کننده مقاومت R در میزبان یک ژن متناظر کنترل کننده بیماری‌زایی در پاتوژن دارد. ژنوتیپ میزبان و پاتوژن تعیین کننده نوع واکنش بیماری می‌باشد. زمانی که ژن‌های میزبان و پاتوژن در تمام مکان‌های ژنی با یکدیگر جفت شوندذ میزبان واکنش حساسیت نشان خواهد داد، که در این حالت میزبان حساس و پاتوژن بیماری‌زا (Virulence) می‌باشد. عکس این حالت سبب شده که

میزبان مقاوم و پاتوژن (avirulence) باشد. مدل‌های ملکولی دیگر با نام‌های Guard و Decoy شناخته شده هستند.

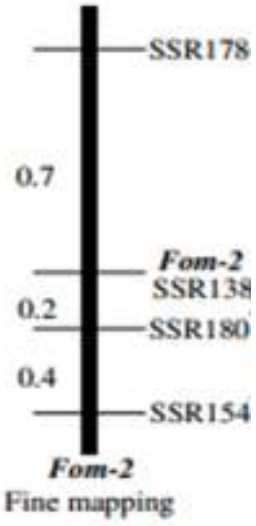
ونگ و همکاران (۲۰۰۰) از دو مارکر مبتنی بر PCR و هم‌بارز برای تهیه نقشه ژنتیکی *Fom2* استفاده کردند. دوتا از مارکرهای AFLP به نام‌های ACT/CAT1 و AAC/CAT1 در فاصله ۱/۷ و ۳/۳ سانتی مورگان از ژن *Fom2* قرار دارند. شکل ۲-۱ نقشه ژنتیکی *Fom2* را بر روی کروموزوم شماره یازده خربزه نشان می‌دهد.



شکل ۲-۱- نقشه ژنتیکی *Fom2*

ژوبیور و همکاران (۲۰۰۴) از مارکرهای AFLP و SSR154 و STS178 در جمعیتی موسوم به Vad375 مشتق از اکوتیپ‌های حساس Vedrantais و اکوتیپ مقاوم PI 161375 برای تهیه نقشه ژنتیکی *Fom2* استفاده کردند. قطعات حاصله از مارکر AFLP کلون و توالی‌یابی شدند که از نتایج آن کتابخانه *Hind*III BAC را تهیه کردند. دو مارکر SSR180 و SSR138 به ژن *Fom2* متصل بودند و این نتایج نشان داد که ژن *Fom2* بین SSR180 و SSR178 قرار گرفته است. در بین تمامی کلون-های BAC دو کلون D09 و ACT11 ژن مقاومت *Fom2* را احاطه کرده بودند. با بررسی این دو کلون BAC ۱۰ ژن مناسب در این ناحیه شناسایی شدند که سه ژن ۷، ۸، ۹ ژن *Fom2* را در بر می‌گرفت

که در محدوده مارکرهای STS411 و STS296 بودند. که بعد از بررسی‌ها ژن ۸ به عنوان یک ژن کاذب شناخته شد زیرا در محدوده این ژن، ۷ کدون پایان قرار داشت که آن را بی اثر می‌کرد. و ژن ۷ تنها توالی در دو کلون ACT11, D09 بود که تشابه معنی‌داری به ژن مقاومت *Fom2* داشت. شکل ۲-۲ نقشه ژنتیکی *Fom2* را بر روی کروموزوم شماره یازده خربزه نشان می‌دهد.



شکل ۲-۲- نقشه ژنتیکی *Fom2*

ریسر (۱۹۸۷) وجود دو ژن غالب اختصاصی *Fom1* و *Fom2* را جهت مقاومت گزارش کرد. نژاد ۱.۲ که شامل دو پاتوتیپ زردی ۱.۲Yو پژمردگی ۱.۲W است، بر دو ژن *Fom1, Fom2* غلبه پیدا می‌کند. علاوه بر دو ژن *Fom1, Fom2* ژن *Fom3* در اکوتیپ Perlita-FR شناسایی شده که سبب ایجاد مقاومت به نژاد ۰ و ۲ پاتوژن می‌گردد (ریسر، ۱۹۸۷). همچنین اخیراً اومولود و همکاران (۲۰۱۱) ژن *Fom4* را در اکوتیپ خربزه Tortuga که سبب ایجاد مقاومت به نژاد صفر و ۲ پاتوژن می‌گردد را هم شناسایی کردند.

غالب اکوتیپ‌های محلی خربزه و طالبی ایرانی به نژادهای صفر مقاوم هستند و تعداد اندکی از اکوتیپ های به نژاد ۱ مقاوم می‌باشند. مقاومت به نژاد ۱.۲ تا کنون در توده‌های محلی ایران مشاهده نشده

است و تمام اکوتیپ‌های شدیدا به آن حساس می‌باشتد به جزء برخی از اکوتیپ‌های چینی مانند Ogon no 9 و ژاپنی مانند Golden Crispy بقیه تحمل به نژاد ۱.۲ ندارند (بنی‌هاشمی، ۲۰۰۹).

باتوجه به این که مهم‌ترین روش مدیریت بیماری استفاده از اکوتیپ‌های متحمل یا مقاوم به بیماری است، تلاش‌های زیادی در سال‌های گذشته توسط دکتر بنی‌هاشمی صورت گرفته، تا منبع مقاومت در توده‌های بومی و خارجی *C. melo* به نژاد صفر، ۱ و ۲ حاصل شود، این در حالی است که مقاومت کامل به نژاد ۱.۲ به دست نیامده‌است. دکتر بنی هاشمی در چند سال گذشته در مورد عکس العمل اکوتیپ‌های مختلف *C. melo* با نژادهای *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* به جمع‌بندی نتایجی رسیده است. بعد از این‌که وی بذور خربزه، خیار، طالبی،گرمک، خیار چنبر و دستنبو را از مناطق مختلف ایران و جهان جمع‌آوری کرد، از بوته‌های با علائم پژمردگی و زردی نمونه‌برداری نمود و بعد از ضدعفونی و رشد قارچ بر روی محیط PDA به شناسایی تمامی نژادهای آلوده کننده پرداخت. آلوده‌سازی اکوتیپ‌های به قارچ عامل بیماری به دو روش غوطه‌ور کردن ریشه‌ها در سوسپانسیون کنیدیوم‌ها و روش کشت مستقیم صورت گرفت، تا عملکرد خانواده *C. melo* را نسبت به نژادهای مختلف *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* مورد بررسی قراردهد. در آلوده‌سازی به روش غوطه‌ور کردن ریشه‌ها در سوسپانسیون کنیدیوم‌ها بسیاری از اکوتیپ‌های ایرانی مثل خربزه ابراهیم‌خانی و مشهدی به نژاد صفر و ۲ کاملا مقاوم بودند و تعداد کمی از اکوتیپ‌های مثل طالبی شهدشیراز و طالبی سی‌سی به نژاد ۱ از خود مقاومت نشان دادند، و هیچ کدام از اکوتیپ‌های مورد مطالعه در این روش آلوده‌سازی نسبت به نژاد ۱.۲ مقاومت بالایی را از خود نشان نداند. در آلوده سازی به روش کشت مستقیم، اکوتیپ‌هایی مثل خربزه عباس شوری و شهد شیراز، سمسوری مهارلو، خربزه آتش آستارا، Ogon no9، Charentais Fom2، Crispy Golden، Gold & Silver مقاومت بالایی را در برابر نژاد ۱ از خود نشان دادند، و هیچ‌کدام از اکوتیپ‌ها نسبت به نژاد ۱.۲ در این روش آلوده‌سازی مقاوم نبودند.

زینگ و توماس (۱۹۹۰) دریافتند که لاین اصلاحی به نام MR-1 که از اکوتیپ C-mPI124111 مشتق شده، نسب به نژادهای صفر، ۱ و ۲ پژمردگی فوزاریومی خربزه مقاوم است و همچنین این اکوتیپ دارای سطحی وسیع از مقاومت‌های غیر اختصاصی به سفیدک پودری (*Pseudoperonospora cubensis*) و سفیدک سطحی (*Sphaerotheca fuliginea*) می‌باشد، لاین MR-1 جزء اکوتیپ‌های یک پایه و منبعی با ارزش از مقاومت به بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه است که در برنامه‌های اصلاحی به طور گسترده استفاده می‌شود. برای بررسی مقاومت این لاین اصلاحی نسبت به نژادهای *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* جوانه‌های آن را به تمامی نژادها آلوده ساختند و نتیجه به دست آمده نشان داد که در مقدار زیادی از غلظت مایه قارچ این لاین نسبت به نژادهای صفر، ۱و ۲ مقاوم و در نسبت‌های پائین قارچ به نژاد ۱.۲ عامل بیماری حساس می‌باشد. از تلاقی بین لاین اصلاحی MR-1 با TM[1] که اکوتیپی حساس بود، تمامی نسل F_1 مقاوم به نژاد ۱ و ۲ و نسل F_2 آن‌ها دارای تفرق ۳:۱ (R:S) می‌باشند که نشان دهنده انتقال عوامل مقاومت همانند ژن-های *Fom1* و *Fom2* از لاین اصلاحی MR-1 به نسل‌های بعد از خودش می‌باشد . زینک و توماس (۱۹۹۰) دریافتند که مقاومت به نژاد ا و ۲ *Fusarium oxysporum* f.sp *melonis* هر کدام توسط یک ژن و مقاومت به نژاد صفر نیز توسط یک ژن دیگر تامین می‌شود. بررسی لینکاژی نشان داد که ژن‌های مقاومت *Fom1* و *Fom2* به طور مستقل و جداگانه بیان می‌شوند.

اومولود و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعات خود توالی LRR از ژن *Fom2* را در اکوتیپ‌های حساس Durango, Vedrantais, Ananas Yokneum با هم مقایسه کردند و مشاهده نمودند که توالی این ناحیه از ژن در اکوتیپ‌های حساس مشابه همدیگر می‌باشد که با توالی اکوتیپ‌های مقاوم متفاوت است. اومولود در ادامه کار تحقیقاتی خود قسمتی از ناحیه LRR از ژن *Fom2* را در ۱۱ نمونه از خربزه‌های مقاوم به نژاد ۱ توالی‌یابی کرد. در این بررسی سه آلل تازه‌ای که سبب ایجاد مقاومت به نژاد ۱ می‌شود، در ژن مقاومت *Fom2* شناسایی شد. با استفاده از پرایمرهای که بر اساس ناحیه

1. Topmark

LRR به نام Fom2-LRR1639 طراحی شده بود، مشخص شد که ناحیه LRR در هشت نمونه خربزه مقاوم به نژاد ۱مثل C-40, C-41, C-87, Cum-241, Cum-334, Cum-190, Charentais- Fom2, Kirkagac مشابه و همانند توالی اکوتیپ مقاوم PI-161375 بوده‌است. اکوتیپ مقاوم PI-124111 از لحاظ توالی همانند اکوتیپ اصلاحی MR-1 بود. اکوتیپ Cum-355 پروتئین متفاوتی را نسبت به اکوتیپ‌های مقاوم MR-1 و PI-161375 تولید می‌نماید، که این موضوع نشان دهنده وجود یک آلل مقاومت تازه در ناحیه LRR از ژن *Fom2* این اکوتیپ می باشد. بعد از توالی‌یابی ناحیه LRR نمونه Cum-355 مشخص شد که در جایگاه نوکلئوتیدی ۷۸۶ از ناحیه LRR ژن *Fom2* نوکلئوتید G (گوانین) جایگزین نوکلئوتید A (آدنین) شده است، که به همین ترتیب در موقعیت اسیدآمینه ۲۶۲ از توالی پروتئینی مورد نظر، اسیدآمینه گلوتامیک اسید به جای لیزین جایگزین شده است. در نمونه مقاوم MR-1 نوکلئوتیدهای A ,G تازه در موقعیت‌های مختلف از توالی مورد نظر وجود داشته که در بقیه لاین‌های مقاوم به این صورت نیست، که به همین ترتیب سبب ایجاد تغییر در توالی پروتئینی ژن مورد نظر می‌شود.

این نتایج نشان می‌دهد که ژن *Fom2* ممکن است متعلق به گروه‌ی از ژن‌های R با سطح پلی مورفیسم کم باشند یعنی در بین اکوتیپ‌های مقاوم و حساس تنوع نوکلئوتیدی زیادی وجود ندارد، نتایج مشابهی برای ژن‌های R دیگر مثل *Pi-d2* (چن و همکاران، ۲۰۰۶) ، *Cm-Eif4e* (نیتو و همکاران، ۲۰۰۶) و *RB* (سونگ و همکاران، ۲۰۰۳) پیشنهاد شده که سطح پلی مورفیسم کمی دارند، برای این نمونه‌ها دو آلل تنها متمایز کننده اکوتیپ مقاوم و حساس از یکدیگر می‌باشد .

ونگ و همکاران (۲۰۱۱) از مارکرهای مبتنی بر PCR مثل AS-PCR[1] وCAPS[2] نیز برای نقشه‌یابی ژنتیکی SNPها موجود در ناحیه LRR از ژن *Fom2* استفاده کردند. در این تحقیق فرضیه این بود که ژنوتیپ‌های مختلف خربزه آلل‌های متفاوتی را برای مقاومت به نژادهای مختلف پژمردگی

1. Chain reactio allele-specific polymerase
2. Cleaved amplified polymorphic sequences

فوزاریومی دارند (زینک و گوبلر، ۱۹۸۵). در این مطالعه از اکوتیپ طالبی از آمریکا و مقاوم به پژمردگی فوزاریومی و اکوتیپ خربزه Hami از چین و حساس استفاده کردند. طراحی پرایمر براساس ناحیه LRR از ژن *Fom2* صورت گرفت. بعد از انجام PCR سه SNP در ناحیه LRR ژن *Fom2* از مقایسه توالی نوکلئوتیدی اکوتیپ مقاوم آمریکایی و اکوتیپ حساس چینی به دست آمد که در جدول ۲-۲ مشاهده شود. در این تحقیق برای مارکر CAPS سه پرایمر طراحی شد تا توالی‌های دارای SNP مشخص شوند. محصولات PCR با آنزیم‌های مختلف برای سایت‌های SNP مختلف مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند، با استفاده از این کار قطعاتی با طول‌های مختلف به دست آمد (جدول ۲-۲).

جدول ۲-۲- اندازه طول قطعات با آنزیم‌های مختلف برای سایت‌های SNP

	آنزیم	نوکلئوتید و طول قطعه (جفت باز) در اکوتیپ حساس	نوکلئوتید و طول قطعه (جفت باز) در اکوتیپ مقاوم
SNP1	*ACC*I	۲۸۱ - A	۳۰۰ - G
SNP2	*Eco*RI	۱۹۱ - A و ۱۵	۲۰۶ - G
SNP3	*Xba*I	۲۳۵ - T و ۱۸	۲۵۳ - C

به طور کلی مارکر AS-PCR می‌تواند اکوتیپ‌های حساس و مقاوم را شناسایی کند ولی ژنوتیپ‌های هموزیگوت را از هتروزیگوت نمی‌تواند تشخیص دهد، که جزء عیوب این مارکر در تحقیق بود. این در حالی است که مارکر CAPS توان تشخیص ژنوتیپ‌های هموزیگوت و هتروزیگوت را از همدیگر دارد. و می‌توان گفت این مارکرها جزء مارکرهای غالب و به عنوان مارکرهای FM[1] تعریف می‌شود (اندرسن و همکاران، ۲۰۰۳).

مس و همکاران (۲۰۰۱) هومولوگ ژن‌های مقاومت خربزه را کلون و توالی‌یابی کردند. در این بررسی از DNAهای یکسان بعد از PCR قطعاتی با طول باندهای ۵۰۰، ۷۰۰ و ۹۰۰ نوکلئوتید حاصل شد.

1. Functional marker

طول باند ۵۰۰bp با طول باند ناحیه NBS از ژن‌های مقاومت مشابه بود. بدین منظور باند bp ۵۰۰ کلون شد و ۶۴ کلونی مربوط آن توالی‌یابی شدند. سپس ۶۴ کلونی بین چهار خانواده به نام‌های MRGH4, MRGH18,MRGH21,MRGH63 تقسیم شدند. هر خانواده شباهت ۹۷ تا ۹۹٪را در سطح پروتئین و DNA به هم نشان دادند.

فصل سوم

مواد و روش‌ها

جدول ۳-۱- نام مواد و کد مربوطه به همراه شرکت سازنده

ماده	نام شرکت	کشور سازنده
Broth LB	Merck	آلمان
Agar LB	Merck	آلمان
T_4 DNA ligase	GeNet Bio	کره جنوبی
ناقل pTG19	Vivantis	مالزی
MOPs	SIGMA	آمریکا
CsCl	SIGMA	آمریکا
$CaCl_2$	SIGMA	آمریکا
$MnCl_2$	Merck	آلمان
Glyserol	Merck	آلمان
بافر PCR	GeNet Bio	کره جنوبی
دزوکسی نوکلئوتید	GeNet Bio	کره جنوبی
کلرید منیزیم	GeNet Bio	کره جنوبی
Taq پلیمراز	GeNet Bio	کره جنوبی
پرایمر	BioNEER	کره‌جنوبی
EDTA	Merck	آلمان
NaCl	SIGMA	آمریکا
Tris	Merck	آلمان
CTAB	Merck	آلمان

نمونه‌های زیر خطدار: نیاز به اتوکلاو دارند شرایط اتوکلاو: دما ۱۲۱ $^{\circ}C$، فشار ۱.۲ اتمسفر، زمان ۲۰ دقیقه

۳-۱- مواد گیاهی

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی ژن *Fom2* و همسانه‌سازی آن، تعداد ۶ ژنوتیپ از بذور انواع مختلف خربزه جمع‌آوری گردید. بذور مورد بررسی از توده‌های بومی، استاندارد داخلی و استاندارد بین‌المللی *Cucumis melo* L. بود و دلیل انتخاب این گروه اهمیت آن در ایران و جهان و نیز حساس و مقاوم بودن اکوتیپ‌های مورد مطالعه به نژادهای مختلف قارچ عامل پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌باشد. جدول ۳-۲ مشخصات ژنوتیپ‌های مورد استفاده را نشان می‌دهد.

جدول ۳-۲- مشخصات ژنوتیپ‌های مورد بررسی

نام	محل جمع‌آوری	شماره نمونه
خربزه خاتونی	خراسان رضوی	MMSC0008 (M8)
خربزه خاقانی	خراسان رضوی	MMSC0009 (M9)
خربزه مشهدی	فارس	MMSC0005 (M5)
طالبی شهد شیراز	فارس	MMSC0006(M6)
Charentais Fom1	اهدائی از دانشگاه دیویس آمریکا	MMSC00015 (M15)
Charentais Fom2	اهدائی از دانشگاه دیویس آمریکا	MMSC00016 (M16)

۳-۲- مشخصات اکوتیپ‌ها از لحاظ مقاومت و یا حساسیت آن‌ها در برابر نژادهای مختلف ***Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis***

حساسیت و مقاومت اکوتیپ‌ها در برابر نژادهای مختلف پژمردگی فوزاریومی خربزه متفاوت می‌باشد که این حالات بستگی به حضور ژن‌های *Fom1* و *Fom2* در اکوتیپ‌هادارد. همان‌طور که قبلاً گفته شد ژن *Fom1* به نژاد صفر و ۲ و ژن *Fom2* به نژاد صفر و ۱ عامل بیماری ایجاد مقاومت می‌نماید، که در جدول ۳-۳ نشان داده شده‌است.

جدول ۳-۳- حساسیت و مقاومت اکوتیپ‌ها در برابر نژادهای مختلف

	نژاد صفر	نژاد ۱	نژاد ۲	نژاد ۱.۲
خربزه خاتونی	نامشخص	نامشخص	نامشخص	نامشخص
خربزه خاقانی	حساس	حساس	مقاوم	حساس
خربزه مشهدی	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس
طالبی شهد شیراز	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس
Charentais Fom1	مقاوم	حساس	مقاوم	حساس
Charentais Fom2	مقاوم	مقاوم	حساس	حساس

۳-۳- کاشت نمونه‌های بذری

بذور در دستمالی مرطوب و در شرایط اتاق رشد تحت نور فلورسانس و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا جوانه زدند. در هر کدام از گلدان‌های پلاستیکی ۳ بذر جوانه زده کشت شدند و در گلخانه تحت شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد با ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار داده شدند. بعد از رشد نمونه‌ها در مرحله چهار برگی، برگ‌های کوچکی که تازه در آمده را جدا کرده درون کاغذ آلومینیوم گذاشته و داخل ازت مایع ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و سپس جهت استخراج DNA به آزمایشگاه منتقل گردیدند.

۴-۳- محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز جهت استخراج DNA

جدول ۳-۴- بافر استخراج CTAB

مواد	مولاریته	مقدار مورد نیاز
NaCl	۵ مولار	۱۰۰ میکرولیتر
$Na_2O_5S_2$	۳۸ درصد	۷ میکرولیتر
CTAB	۱۰ درصد	۷۰ میکرولیتر
Tris	۱ مولار	۷ میکرولیتر
EDTA	۱ مولار	۷۰ میکرولیتر
H_2O		۴۴۶ میکرولیتر

۳-۵- استخراج DNA از بافت گیاهی

برای استخراج DNA از روش CTAB با کمی تغییرات استفاده شد که شامل مراحل زیر می‌باشد: ابتدا ۰/۲ گرم بافت برگی داخل میکروتیوب ۱/۵ میکرولیتری به کمک خوردکن پلاستیکی[1] و با استفاده از ازت مایع پودر گردید. سپس به ازاء هر نمونه ۷۰۰ میکرولیتر بافر استخراج CTAB (جدول ۳-۳) اضافه شد. محتویات همه تیوب‌ها کاملاً با هم مخلوط شدند تا محلول یکنواختی حاصل شود. تیوب‌ها به مدت ۳۰ دقیقه داخل حمام آب گرم در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و هر چند دقیقه یک‌بار تیوب‌ها به آرامی سر و ته شدند تا سوسپانسیون کاملا یکنواختی بدست آید. به ازاء هر نمونه، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از مخلوط کلروفرم- ایزوآمیل الکل (۲۴:۱) اضافه شد و بعد از آن تیوب‌ها چند مرتبه به آرامی سروته شدند. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در rcf ۱۳۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند، پس از سانتریفیوژ ۶۰۰ میکرولیتر از مایع رویی را برداشته و به تیوب ۱/۵ میکرولیتری دیگری منتقل کرده و هم حجم آن ایزوپروپانل سرد اضافه گردید و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. نمونه‌ها در سانتریفیوژ یخچال‌دار با زمان ۱۵ دقیقه و rcf

1. Grinder

۱۳۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس مایع رویی حذف و بر روی رسوب انتهایی ۵۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ سرد اضافه گردید. پس از تخلیه اتانول و خشک شدن کامل، رسوب DNA حاصل در ۴۰ میکرولیتر TE حاوی آنزیم RNAase حل گردید.

۳-۶- بررسی کمیت و کیفیت DNA ژنومی استخراج شده

به منظور بررسی کیفیت و کیفیت DNA ژنومی مقدار ۳ میکرولیتر از DNA استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شد. پس از الکتروفورز در ولتاژ ۸۵ ولت، به مدت ۴۵ دقیقه کیفیت DNA به کمک اشعه UV بررسی و عکس‌برداری شد. تخمین کمیت غلظت باندهای DNA براساس غلظت باند مارکر بر روی ژل آگارز ۱ درصد تعیین گردید.

۳-۷- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای ژن *Fom2*

طول توالی ژن *Fom2* مورد نظر در این تحقیق دارای ۳۳۰۷ جفت باز می‌باشد. به کمک نرم افزار Primer Permier Var.5 ساخت شرکت Premierbiosoft (آمریکا)و همچنین اطلاعات موجود در پایگاه NCBI در مورد توالی ژن *Fom2* پرایمرهای Psh20-F/R, Psh20.2-F/R طراحی گردید. پرایمر Psh20-F/R قطعه‌ای به طول ۹۳۱ جفت باز و پرایمر Psh20.2-F/R قطعه‌ای به طول ۳۲۲۲ جفت باز را تکثیر می‌نماید. مشخصات آغازگرها در جدول ۳-۵ آمده ا

جدول ۳-۵- مشخصات پرایمرها

نوع آغازگر	توالی آغازگر	تعداد نوکلئوتید	Tm (^{0}C)
Psh20-F	5/-GGATGTGGGTGGATGATCTTCGG-3/	۲۳	۶۷/۱
Psh20-R	5/-CGTGCAACCAATGGTACACCACC-3/	۲۳	۶۶/۸
Psh20.2-F	5/- TCAAAAAAACCTACAACTCTCGAACG-3/	۲۶	۶۳/۶
Psh20.2-R	5/-ATGGGTGATTTCCTATGGACTTTTG-3/	۲۵	۵۸/۶

PCR در حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتری با اجزاء واکنش به شرح جدول ۳-۶ انجام پذیرفت:

جدول ۳-۶- غلظت مواد استفاده شده در واکنش PCR

واکنش دهنده‌ها	مقدار مصرفی در یک واکنش(میکرولیتر)	غلظت مورد نیاز در یک واکنش
بافر PCR (10X) (جدول ۳-۱)	۲	1X
دزوکسی نوکلئوتیده (جدول ۳-۱)	۰/۶	۱۶۰ میکرومولار
کلرید منیزیم (25 mM) (جدول ۳-۱)	۲	۱۲۵۰ میکرومولار
آغازگر رفت (جدول ۳-۱)	۰/۵	۰/۰۰۵ میکرومولار
آغازگر برگشت (جدول ۳-۱)	۰/۵	۰/۰۰۵ میکرومولار
Taqپلیمراز (جدول ۳-۱)	۰/۳	یک واحد در میکرولیتر
آب دوبار تقطیر	۱۳/۳	
DNA	۱	۳۰ نانوگرم
کل	۲۰	

10X: غلظت استوک اصلی که ۱۰ برابر غلیظ می‌باشد. 1X: غلظت استوک مورد استفاده که رقیق شده است.

X: برابر

با توجه به ایجاد باندهای غیر اختصاصی توسط پرایمر Psh20.2-F-R به منظور بهبود شرایط PCR و دستیابی به تک باند اختصاصی اقدام به انجام تاچ‌دان پی‌سی‌آر گردید، که نتایج حاصله نشان دهنده مطلوب بودن این روش و تاثیر آن در حذف باندهای غیر اختصاصی می‌باشد. برای انجام واکنش از دستگاه ترموسایکلر ساخت شرکت اپندروف آلمان استفاده شد.

برنامه PCR مربوط به پرایمر Psh20-F/R به این صورت می‌باشد که ابتدا واسرشت‌سازی اولیه در زمان ۳ دقیقه و دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. سپس در ۳۵ سیکل واسرشت‌سازی اولیه در زمان ۴۵ ثانیه و دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد، واکنش اتصال در زمان ۴۵ ثانیه و دمای ۵۸ درجه

سانتی‌گراد و بسط در زمان ۲ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. مرحله آخر در زمان ۵ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

برنامه PCR مربوط به پرایمر Psh20.2-F/R به این صورت می‌باشد که ابتدا واسرشت‌سازی اولیه در زمان ۳ دقیقه و دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. سپس در ۳ سیکل واسرشت‌سازی اولیه در زمان ۴۵ ثانیه و دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد، واکنش اتصال در زمان ۴۵ ثانیه و دماهای ۶۶، ۶۵، ۶۴، ۶۳ درجه سانتی‌گراد و بسط در زمان ۲ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت و همچنین در ۲۵ سیکل واسرشت‌سازی اولیه در زمان ۴۵ ثانیه و دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد، واکنش اتصال در زمان ۴۵ ثانیه و دمای ۶۲ درجه سانتی‌گراد و بسط در زمان ۲ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. مرحله آخر هم در زمان ۵ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

برنامه PCR مربوط به پرایمر Psh10.2-F/R به این صورت می‌باشد که ابتدا واسرشت‌سازی اولیه در زمان ۳ دقیقه و دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. سپس در ۳۵ سیکل واسرشت‌سازی اولیه در زمان ۴۵ ثانیه و دمای ۹۲ درجه سانتی‌گراد، واکنش اتصال در زمان ۴۵ ثانیه و دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد و بسط در زمان ۲ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. مرحله آخر در زمان ۵ دقیقه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

۳-۸- الکتروفورز محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد در بافر TAE در زمان ۴۵ دقیقه و ولتاژ ۹۰ انجام شد و سپس عکس ژل پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با استفاده از اشعه UV مشاهده گردید.

۳-۹- تهیه محیط کشت LB مایع و LB جامد

برای تهیه LB مایع (جدول ۳-۱)، ۲۵ گرم از LB Broth را وزن کرده یک لیتر آب مقطر به آن افزودیم و جهت استریل کردن آن از اتوکلاو استفاده گردید. LB را در دمای $4\ ^{\circ}C$ نگهداری گردید.

برای تهیه LB جامد (جدول ۳-۱)، ۳۷ گرم از LB Agar را وزن کرده یک لیتر آب مقطر به آن افزودیم و جهت استریل کردن آن از اتوکلاو استفاده گردید. پس از اتوکلاو وقتی دمای محلول به حدود ۴۵°C رسید در زیر هود به درون پلیت‌ها ریخته شد و پس از خنک شدن در یخچال نگهداری گردید.

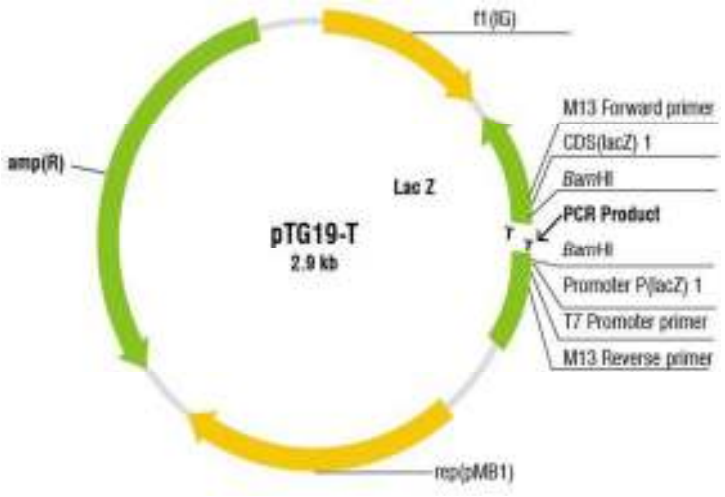
۳-۱۰- همسانه‌سازی ژن *Fom2*

مراحل همسانه‌سازی ژن *Fom2* شامل خالص‌سازی محصولات تکثیر یافته با PCR، اتصال قطعه ژن خالص شده به TA وکتور، وارد کردن DNA نوترکیب حاصل به درون باکتری میزبان و شناسایی باکتری‌های حاوی قطعه مورد نظر می‌باشد. که این مراحل به صورت جداگانه در زیر شرح داده شده-است. خالص سازی محصول PCR با استفاده از PCR Purification Kit ساخت شرکت BioNEER (کره جنوبی) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

در مرحله بعد از همسانه‌سازی، ژن *Fom2* به وکتور pTG19 وارد شد. این واکنش در مجاورت ۱ میکرولیتر آنزیم T_4 DNA Ligase و ۲ میکرولیتر ناقل pTG19 (جدول ۳-۱) و بافر T_4 با مقدار متفاوتی از محصول خالص شده PCR انجام گردید. پس از اضافه کردن تمام مواد نمونه تهیه شده به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگه‌داری گردید.

۳-۱۱- ناقل pTG19

عامل مهمی که باعث کاهش بازده کلون کردن محصول PCR می‌باشد فعالیت آنزیم Taq پلیمراز می-باشد که منجر به اضافه شدن یک آدنین در انتهای $3'$ رشته DNA تازه ساخته شده می‌گردد. بدین منظور برای افزایش کارایی کلون کردن محصولات PCR ناقلی طراحی شده است که حاوی یک باز اضافی در انتهای $3'$ می‌باشد، که اصطلاحاً ناقل pTG19 نامیده می‌شود (شکل ۳-۱). اندازه این ناقل حدود ۲/۹ kb است و دارای رپلیکون pMB1 می‌باشد.



شکل ۳-۱- شکل کلی ناقل pTG19 (شرکت Vivantis)

۳-۱۲- تهیه سلول مستعد[1]

در ابتدا بافر TFB1 را با استفاده از مواد شیمیایی $CaCl, Kac, CsCl, MnCl_2$ با غلظت ۱ مولار و گلیسرول ۶۰ درصد و آب دیونیزه تهیه گردید و سپس با اضافه کردن استیک اسید، pH بافر تهیه شده به ۵/۸ رسید. سپس با استفاده از فیلتراسیون، استریل شده و به دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شد (جدول ۳-۱).

سپس بافر TFB2 را با استفاده از مواد شیمیایی $MOPs, CsCl, CaCl_2$ با غلظت ۱ مولار و گلیسرول ۶۰ درصد و آب دیونیزه تهیه گردید. pH بافر تهیه شده توسط KoH به ۶/۵ رسیده و بعد از فیلتراسیون به دمای چهار درجه سانتی‌گراد انتقال یافت (جدول ۳-۱). بعد از آماده‌سازی و استریلیزاسیون تمام وسایل مورد استفاده، به روش زیر سلول مستعد تهیه گردید:

تک کلنی از باکتری *E. coli* سویه DH5α در سه میلی‌لیتر LB مایع فاقد آنتی بیوتیک، به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با سرعت ۱۲۵ دور در دقیقه کشت داده شد. مقدار یک میلی‌لیتر از باکتری رشد یافته به اضافه یک میلی‌لیتر از $MgCl_2$ یک مولار به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط

1. Competent cell

کشت LB مایع اضافه گردید، سپس ارلن به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در ۱۲۵ دور در دقیقه نگهداری شد تا به OD =۰ /۳۵ رسید. محتویات ارلن به فالکون ۵۰ میلی‌لیتری انتقال داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار گرفت، سپس به مدت ۱۰ دقیقه در۲۵۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ انجام گرفت، مایع رویی تخلیه شد، و فالکون به مدت ۱ دقیقه بر روی دستمال کاغذی قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول TFB1 به رسوب باکتری اضافه شد تا رسوب باکتری درآن حل شود. فالکون به مدت ۱۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد وبه مدت ۱۰دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام گردید، مایع رویی حذف و ۵۰۰ میکرولیتر محلول TFB2به آن افزوده تا رسوب باکتری در آن حل گردد، محلول حاصل در تیوب‌های ۱/۵ میکرولیتری به میزان ۱۰۰میکرولیتر تقسیم شد و برای استفاده‌های بعدی در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

۳-۱۳- ترانسفورماسیون[1] باکتریایی

بیشتر گونه‌های باکتری‌ها قادر به برداشت DNA از محیطی که در آن رشد می‌کنند هستند. اغلب ملکول‌های DNA که به این طریق برداشت شده‌اند، تجزیه می‌شوند، اما در مواردی قادر به باقی ماندن و همانندسازی در سلول باکتری هستند که ترانسفورماسیون گفته می‌شود. به خصوص اگر ملکول DNA یک پلاسمید با مبدا همانندسازی قابل شناسایی توسط سلول میزبان باشد.

برای انجام ترانسفورماسیون، تیوب حاوی سلول‌های مستعد جهت ذوب روی یخ قرار گرفت و همزمان ۱۰ میکرولیتر از واکنش اتصال به آن افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی یخ قرار داده شد. تیوب واکنش به مدت ۴۵ ثانیه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد شوک حرارتی و سپس ۴۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB مایع به مخلوط واکنش اضافه شد و به مدت ۴۵ دقیقه در دستگاه شیکر انکوباتور با ۱۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. بعد ۱۰۰ میکرولیتر از سلول های رشد کرده بر روی پلیت LB جامد

1. Transformation

حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین پخش گردید و به مدت یک شب در انکوباتور به صورت وارونه قرار داده شد.

۳-۱۴- واکنش Colony PCR جهت شناسایی باکترهای حاوی قطعه مورد نظر و استخراج پلاسمید

در کنار شعله با استفاده از نوک سمپلر کلنی‌ها به صورت تصادفی انتخاب گردید و به آرامی درون واکنش PCR تهیه شده مطابق جدول ۳-۴ منتقل شد. به منظور حفظ تک کلنی با همان نوک سمپلر بر روی محیط کشت LB جامد که حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین از کلنی یک کشت مجدد تهیه گردید و پتری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آماده شدن نمونه‌ها، میکروتیوب‌ها را به دستگاه ترموسایکلر مطابق برنامه جدول ۳-۷ منتقل گردید.

استخراج پلاسمید با استفاده از Plasmid DNA Isolation Kit ساخت شرکت GeNet Bio (کره جنوبی) و مطابق دستورالعمل مربوطه انجام گردید.

۳- ۱۵- توالی‌یابی[1]:

جهت اطمینان نهایی از انتقال ژن *Fom2* در ناقل pTG19، سازه‌های ژنی مربوط به ناحیه داخلی ژن *Fom2* به همراه پرایمرهای PSh20-F و PSh20-R (جدول ۳-۵) و سازه مربوط به قطعه کامل ژن *Fom2* به همراه پرایمر PSh20.2-F و PSh20.2-R (جدول ۳-۵) جهت توالی‌یابی ارسال گردید.

۳-۱۶- نرم‌افزارهای مورد استفاده جهت آنالیز نمونه‌ها

بررسی کیفیت نتایج توالی‌یابی با استفاده از نرم افزار Chromas صورت گرفت.

پس از توالی‌یابی اکوتیپ‌ها و مقایسه خوانش‌های فوروارد و ریورس حاصل از توالی‌یابی برای هر اکوتیپ و توالی رفرنس ژن موجود در NCBI در نرم‌افزار Seqman موفق به شناسایی تنوع در نقاط

1. Sequencing

مختلف از ژن *Fom2* شناسایی گردید و حاصل خوانش فوروارد و ریورس توالی‌یابی شده و ژن رفرنس یک توالی به نام Consensuse است که در مراحل بعد از این استفاده می‌کنیم.

توالی Consensuse حاصل از نرم‌افزار Seqman و مقایسه آن با توالی ثبت شـده در NCBI در سـطح ژنومیک و پروتئینی به کمک نرم افزار Mega5 مورد بررسی قرار گرفت و مکان‌های جهـش یافتـه در سطح نوکلئوتیدی و پروتئینی و منطقه دومین مورد بررسی قرار گرفت.

فصل چهارم

نتایج و بحث

در این بخش می‌خواهیم نتایجی از بررسی تنوع در سطح پروتئینی و نوکلئوتیدی ارائه دهیم، هدف از این کار شناسایی موتاسیون‌ها و تاثیر آن بر عملکرد ژن *Fom2* می‌باشد. ابتدا برای بررسی تنوع اکوتیپ‌های مانند خربزه مشهدی، طالبی شهد شیراز، خربزه خاتونی، خربزه خاقانی، Charentais Fom1 و Charentais Fom2 از مناطق مختلف جمع‌آوری گردید. این اکوتیپ‌ها حساسیت و مقاومت متفاوتی را به بیماری پژمردگی فوزاریومی از خود نشان می‌دادند (جدول ۳-۲). سپس جهت بررسی تنوع همسانه‌سازی در دو قسمت صورت پذیرفت:

همسانه‌سازی قطعه داخلی ژن *Fom2* در شش اکوتیپ جمع‌آوری شده و مقایسه تنوع نوکلئوتیدی و پروتئینی که مشاهده می‌شود و بررسی عملکرد متفاوت اکوتیپ‌ها از لحاظ مقاومت و حساسیت در برابر قارچ *Fusarium oxysporium* f.sp. *melonis* می‌باشد.

همسانه‌سازی قطعه کامل ژن *Fom2* در مورد نمونه مقاوم طالبی شهد شیراز و بررسی تنوع موجود در این نمونه و آماده‌سازی جهت کارهای بعدی همانند همسانه‌سازی در ناقل بیانی و انتقال این ژن مقاومت به گیاه می‌باشد.

۴-۱- بازیابی و آنالیز توالی ژن *Fom2* از پایگاه داده‌های زیستی و محل پرایمرهای عمومی جهت ردیابی ژن *Fom2*

بازیابی توالی ژن *Fom2* با شماره دستیابی DQ287965 نشان داد که این ژن دارای منطقه کد کننده با طول ۳۲۲۲ جفت باز[1] و فاقد توالی اینترونی است. این ژن، پروتئینی (ABB91438) به طول۱۰۷۳اسیدآمینه را کد می‌نماید. ژن *Fom2* دارای دو دومین[2] به نام‌های NB-ARC و $AAAATP_{ase}$ می‌باشد. شکل ۴-۱ نمای شماتیک ژن *Fom2* در سطح نوکلئوتیدی و محل اتصال پرایمر Psh20-F/R را نشان می‌دهد.

1. Base Pair (bp)
2. Domain

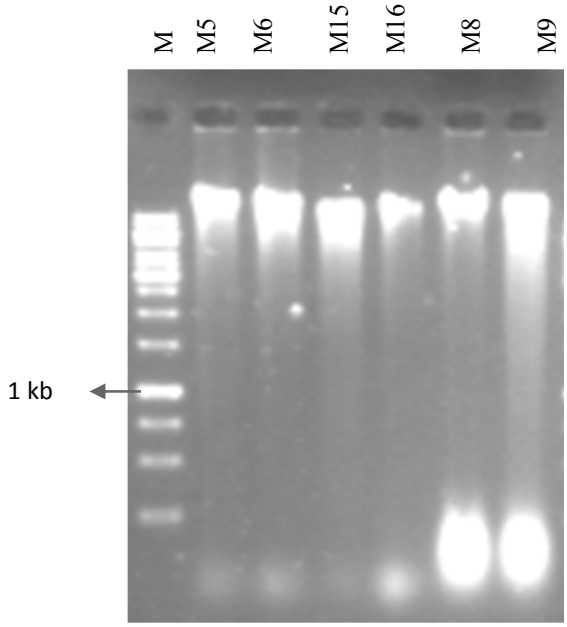
الف

ب

شکل ۴-۱- الف: نمای شماتیک ژن *Fom2* در سطح نوکلئوتیدی ب: ناحیه اتصال پرایمر Psh20-F/R به ژن *Fom2*

۴-۲- استخراج DNA و بررسی کمیت و کیفیت آن

دسترسی به DNA با کیفیت و کمیت مناسب پیش نیاز اولیه بررسی‌های ژنتیک ملکولی می‌باشد. غلظت و کیفیت پائین DNA اعتبار داده‌های حاصله را تحت تاثیر قرار داده و تکرار پذیری آن را کاهش می‌دهد.



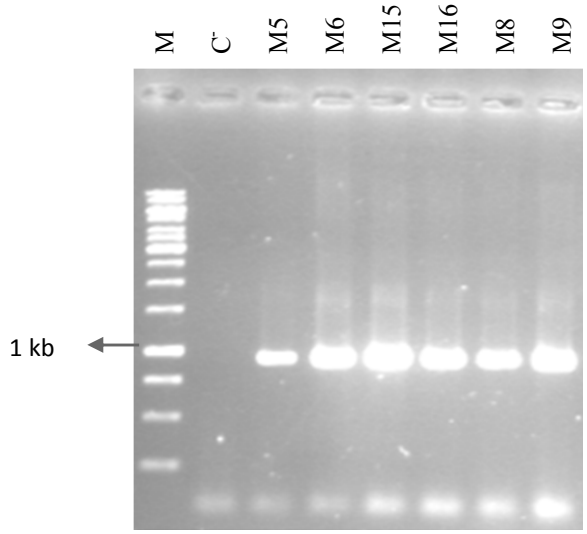
شکل ۴-۲- الگوی الکتروفورزی DNA استخراج شده از اکوتیپ‌های خربزه، در چاهک‌های مربوط به نمونه‌های M5, M6, M15, M16 آلودگی RNA مشاهده نمی‌شود اما در چاهک‌های M8, M9 آلودگی RNA وجود دارد M: نشانگر ملکولی 1kb ladder

همچنین شکستگی DNA نیز می‌تواند مانع تکثیر برخی از قطعه‌های بزرگ شود، به خصوص در مورد توالی کامل ژن *Fom2* که حدود ۳/۳ kb طول دارد، لذا لازم بود تا عمل استخراج DNA با دقت بیشتری انجام گیرد. همان‌طور که گفته شد در این تحقیق استخراج DNA با روشCTAB انجام شد، که DNA با غلظت بیشتر را به دست آوردیم ولی در آن شکستگی DNA قابل رویت می‌باشد. در چاهک‌های مربوط به M5, M6, M15, M16 آلودگی RNA مشاهده نمی‌شود.

۴-۳- بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR برای تکثیر قطعه داخلی ژن *Fom2*

فاکتورهای که در بهینه‌سازی واکنش PCR نقش دارند دمای اتصال، مقدار و غلظت DNA، مقدار آنزیم Taq و $Mgcl_2$ و دستگاه مورد استفاده می‌باشد که در در این مطالعه ما دمای اتصال آغازگر[1] به DNA الگو و غلظت DNA را بهینه نمودیم. بورنت و همکاران (۲۰۰۱) بیان داشتند که اصلاح دمای اتصال آغازگر به الگو تاثیر زیادی بر روی وضوح باندها دارد. بعد از آزمایشات فراوان از برنامه تاچ‌دان پی‌سی‌آر[2] در دمای ۶۲-۶۶ درجه سانتی‌گراد بهترین نتیجه حاصل گردید. بررسی غلظت‌های مختلف DNA نشان دهنده این بود که غلظت ۳۰ نانوگرم بر میکرولیتر بهترین وضوح باندی را ایجاد کرد، که نتیجه حاصل از بهینه شدن دما و غلظت DNA در شکل ۴-۳ نشان داده شده است. نتایج این قسمت در هر چاهک نشان داد پرایمرهای طراحی شده بر اساس توالی ژن *Fom2* توانسته‌اند منطقه‌ای با اندازه مورد انتظار در ژنوم شش اکوتیپ مورد مطالعه تکثیر نمایند. مشاهده تک باند ۹۳۱ جفت بازی در الگوی الکتروفورزی اکوتیپ‌های مورد مطالعه اختصاصی بودن پرایمرها را نشان می‌دهد.

1. Anealing temperature
2. Touch down PCR



شکل ۴-۳- الگوی الکتروفورزی PCR بخشی از توالی ژن *Fom2* حاصل از پرایمر عمومی Psh20، همان‌طور که مشاهده می‌شود چاهک دو C^- می‌باشد که نشان دهنده صحت انجام واکنش PCR است در چاهک‌های بعدی تمامی اکوتیپ‌ها باند ۹۳۱ جفت بازی که مربوط به قطعه داخلی ژن است را تولید کردند، که نشان دهنده حضور ژن *Fom2* در اکوتیپ‌های مورد مطالعه ما می‌باشد. M : نشانگر ملکولی 1kb ladder

۴-۴- همسانه‌سازی قطعه داخلی ژن *Fom2* در ناقل pTG19

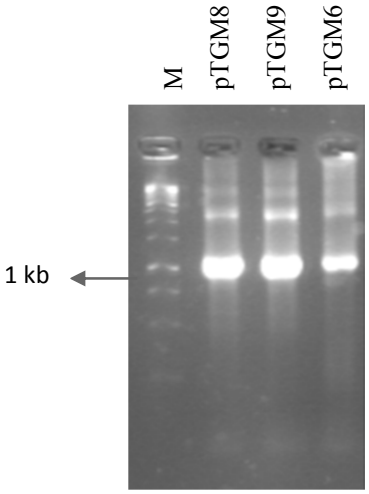
به منظور کلونینگ قطعه داخلی ژن *Fom2* از محصول PCR خالص شده، در واکنش اتصال استفاده گردید. قطعه داخلی ژن *Fom2* پس از ورود به ناقل pTG19 تولید سازه‌های ژنی با مشخصات جدول ۴-۱ را نمود. پس از انجام ترانسفورماسیون باکتریایی و کشت باکتری‌های ترانسفورم شده به روی محیط کشت LB جامد و ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کلونی‌ها بر روی محیط LB رشد کردند که ممکن است حاوی قطعه ژنی مورد نظر نباشند که برای این‌کار غربالگری صورت گرفت.

جدول ۴-۱- مشخصات اکوتیپ های پس از اتصال به ناقل

قبل از اتصال قطعه داخلی ژن *Fom2* به ناقل pTG19	بعد از اتصال قطعه داخلی ژن *Fom2* به ناقل pTG19
خربزه مشهدی (M5)	pTGM5
طالبی شهد شیراز (M6)	pTGM6
خربزه خاتونی (M8)	pTGM8
خربزه خاقانی (M9)	pTGM9
Charentais Fom1 (M15)	pTGM15
Charentais Fom2 (M16)	pTGM16

۴-۵- تایید کلنی‌های نوترکیب با تکنیک کلنی PCR و با استفاده از پرایمر Psh20-F/R

برای اثبات صحت انجام ترانسفورماسیون و ورود قطعه مورد نظر در ناقل pTG19 از تکنیک PCR Colony استفاده شد. در این روش جهت تشخیص کلنی‌های مثبت تایید حضور سازه موردنظر در میزبان باکتریی از پرایمرهای داخلی ژن *Fom2* استفاده شد، و از لاشه تخریب شده میزبان باکتریایی به عنوان جز DNA در یک واکنش PCR استفاده گردید.

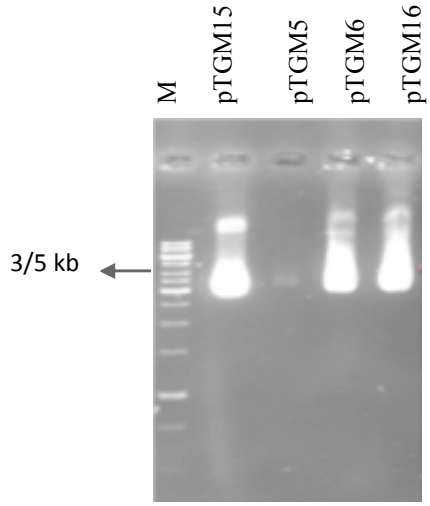


شکل ۴-۴- الگوی الکتروفورزی محصول کلنی PCR حاصل از پرایمر Psh20-F/R، در این شکل مشخص می‌شود که تمامی اکوتیپ‌ها در چاهک‌های ۲ تا ۴ به داخل ناقل منتقل شده‌اند که نشان دهنده کلنی‌های نوترکیب می‌باشد.
M: نشانگر ملکولی 1kb ladder

در نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمر Psh20-F/R باکتری که حاوی قطعه داخلی ژن *Fom2* می-باشد باند ۹۳۱ جفت بازی را مثل نمونه‌های pTGM8، pTGM9 و pTGM6 نشان می‌دهد (شکل ۴-۴).

۴-۶- استخراج پلاسمید نوترکیب از باکتری *E. cloi*

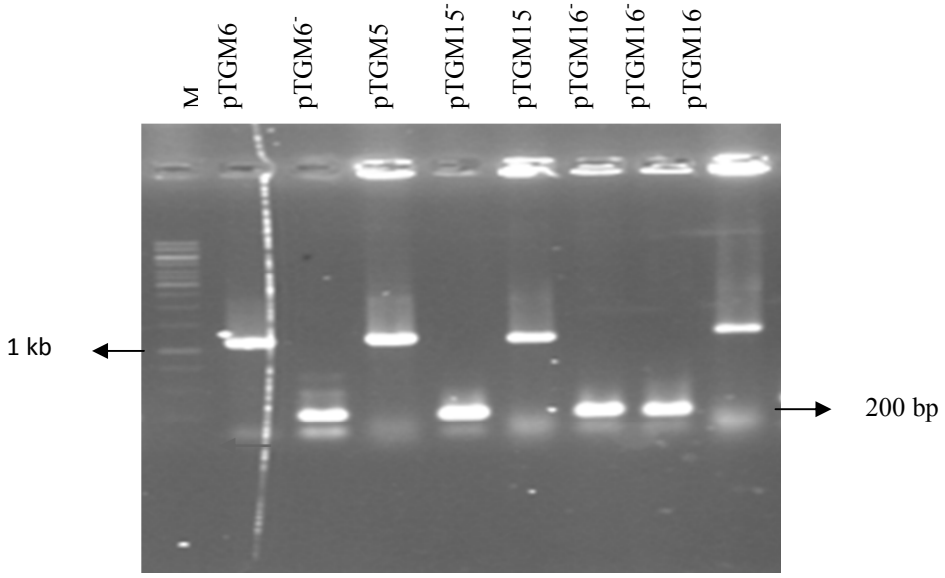
از این روش برای تمایز بین باکتری‌ها که ناقل خالی را کسب کرده‌اند و باکتری‌هایی که با دریافت ناقل نوترکیب تغییر شکل داده استفاده گردید. برای این منظور از کشت شبانه تعدادی از کلونی‌ها در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین که بعد از ۱۶ ساعت انکوبه رشد مطلوب داشته‌اند برای استخراج پلاسمید استفاده کردند. باکتری‌های که ناقل حاوی قطعه داخلی ژن *Fom2* را دریافت نموده‌اند پس از استخراج پلاسمید باندی حدود ۳.۸ kb را مثل نمونه‌های pTGM5, pTGM15, pTGM6 pTGM16 تولید کردند (شکل ۴-۵). باید توجه داشت چون پلاسمید عموماً به صورت سوپر کویل است و شکل فضایی آن متفاوت با حالت خطی است، در نتیجه در الکتروفورز مطابق با اندازه واقعی خود حرکت نمی‌کند.



شکل ۴-۵- الگوی الکتروفورزی استخراج پلاسمید حاصل از پرایمر Psh20، در تمامی سازه‌های مربوط به چاهک‌های ۲ تا ۵ باند ۳/۸ kb پس از استخراج پلاسمید مشاهده می‌گردد که نشان دهنده حضور قطعه داخلی ژن *Fom2* در ناقل مورد نظر می‌باشد. M: نشانگر ملکولی 1kb ladder

۴-۷- تایید پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Psh10.2-F/R

برای اثبات صحت انجام ترانسفورماسیون و ورود قطعه مورد نظر در ناقل pTG19 از پلاسمیدهای استخراج شده و پرایمرهای اختصاصی وکتور pTG19 (Psh10.2-F/R) در واکنش PCR استفاده گردید. در نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمر Psh10.2-F/R باکتری که حاوی قطعه داخلی ژن *Fom2* می‌باشد باند ۱۲۰۰ جفت بازی را نشان می‌دهد مثل نمونه‌های pTGM6، pTGM5، pTGM15 و pTGM16 ، و در صورت ترانسفورم نشدن باکتری باند ۲۰۰ جفت بازی تولید، که همانند چاهک‌های ۳، ۵، ۷ و ۸ می‌باشد (شکل ۴-۶).



شکل ۴-۶- الگوی الکتروفورزی محصول PCR حاصل از پرایمر Psh10.2, کلنی‌های نوترکیب باند حدود ۱۰۰۰ بازی را نشان می‌دهند که در چاهک‌های ۲، ۴، ۶، ۹ مشاهده می‌گردد و کلنی‌های که قطعه مورد نظر را دریافت نکرده‌اند باند ۲۰۰ جفت بازی را نشان می‌دهند. M: نشانگر ملکولی 1kb ladder

۴-۸- تعیین توالی دو جهته قطعه کلون شده از ژن *Fom2* در وکتور pTG19

جهت اطمینان نهایی از انتقال ژن *Fom2* در ناقل pTG19، پلاسمیدهای نوترکیب سازه‌های pTGM5, pTGM6, pTGM8, pTGM9, pTGM15, pTGM16 (جدول ۴-۱) به صورت دو جهته

توسط پرایمرهای Psh20-F/R توالی‌یابی شدند. بررسی پیک‌های مربوط به هر باز نشان داد که خوانش پرایمرهای رفت و برگشت در تمامی سازه‌ها مشابه است.

۴-۹-آنالیز توالی نوکلئوتیدی و پروتئینی بدست آمده از اکوتیپ‌های مختلف

در این مطالعه حضور ژن *Fom2* بهعنوان عامل مقاومت در برابر نژاد ۱ در سطح ژنوم اکوتیپ‌های استاندارد داخلی، اکوتیپ‌های استاندارد خارجی، اکوتیپ‌های بومی خربزه مورد بررسی قرار گرفت. سپس قطعه داخلی ژن *Fom2* در کلیه نمونه‌های بالا توسط پرایمر Psh20-F/R تکثیر شد و همان-طور که از قبل بیان شد پس از خالص‌سازی داخل وکتور pTG19 کلون گردید. کلنی‌های نوترکیب با استفاده از روش‌های مختلف مورد تایید قرار گرفتند، به منظور تایید نهایی توالی‌یابی دو جهته توسط پرایمر Psh20-F/R صورت گرفت، که نتایج توالی‌یابی حضور ژن *Fom2* را در کلیه نمونه‌های بالا مورد تایید قرار داد. هدف مهم بعدی بررسی موتاسیون‌های موجود در این نمونه‌ها در سطح پروتئینی و نوکلئوتیدی می‌باشد. که در جدوال زیر به صورت مجزا مشخص می‌باشد.

۴-۹-۱- تعیین تنوع در اکوتیپ طالبی شهد شیراز مربوط به سازه pTGM6

جدول ۴-۲- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM6

شماره جهش درسطح نوکلئوتید	نوع باز در **pTGM6**	نوع باز در ***Fom2***	اسید آمینه در Fom2	اسیدآمینه در pTGM6	خاصیت شیمیایی اسیدآمینه در pTGM6 /Fom2
۷۲	C	G	لیزین	آسپاراژین	قطبی/قطبی
۲۴۸	C	T	متیونین	ترئونین	غیرقطبی/قطبی
۲۵۴	A	T	والین	آسپارتات	غیرقطبی/قطبی
۳۱۸	G	T	فنیل آلانین	لوسین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۴۵۲	C	A	آسپاراژین	ترئونین	قطبی/ قطبی
۴۵۵	T	C	ترنوئین	متیونین	قطبی/ غیرقطبی
۴۹۷	C	T	والین	آلانین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۶۱۱	G	A	لیزین	آرژنین	قطبی/ قطبی
۶۱۴	G	A	لیزین	آرژنین	قطبی/ قطبی
۷۵۹	G	A			
۷۸۲	C	T	لوسین	پرولین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۸۷۸	A	G	گلایسین	گلوتامات	غیرقطبی/ قطبی

شماره خطدار جهش معنی‌دار : تغییر در پروتئین شماره بدون خط جهش غیر معنی‌دار: عدم تغییر در پروتئین

اکوتیپ طالبی شهد شیراز جزء اکوتیپ‌های مقاوم به نژاد ۱ پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌باشد، تنوع نوکلئوتیدی مشاهده شده بر عملکرد ژن *Fom2* در این اکوتیپ تاثیر گذار نمی‌باشد به همین منظور سایر اکوتیپ‌های مورد مطالعه با این اکوتیپ مقاوم از لحاظ تنوع نوکلئوتیدی مقایسه می‌گردد.

۴-۹-۲-تعیین تنوع در اکوتیپ خربزه مشهدی مربوط به سازه pTGM5

جدول ۴-۳- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM5

شماره جهش درسطح نوکلئوتید	نوع باز در **pTGM5**	نوع باز در ***Fom2***	اسید آمینه در Fom2	اسیدآمینه در pTGM5	خاصیت شیمیایی اسیدآمینه در pTGM5 /Fom2
۷۲	C	G	لیزین	آسپاراژین	قطبی/قطبی
۲۴۸	C	T	متیونین	ترئونین	غیرقطبی/قطبی
۲۵۴	A	T	والین	آسپارتات	غیرقطبی/قطبی
۳۱۸	G	T	فنیل آلانین	لوسین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۴۵۲	C	A	آسپاراژین	ترئونین	قطبی/ قطبی
۴۵۵	T	C	ترنوئین	متیونین	قطبی/ غیرقطبی
۴۹۳	C	T	تیروزین	هیستیدین	غیرقطبی/ قطبی
۴۹۷	C	T	والین	آلانین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۶۱۱	G	A	لیزین	آرژنین	قطبی/ قطبی
۶۱۴	G	A	لیزین	آرژنین	قطبی/ قطبی
۷۵۹	G	A			
۷۸۲	C	T	لوسین	پرولین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۸۷۸	A	G	گلایسین	گلوتامات	غیرقطبی/ قطبی

شماره خط‌دار جهش معنی‌دار : تغییر در پروتئین شماره بدون خط جهش غیر معنی‌دار: عدم تغییر در پروتئین

خربزه مشهدی جزء اکوتیپ‌های حساس به نژاد ۱ پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌باشد، تنوع نوکلئوتیدی موجود در این اکوتیپ بر عملکرد ژن *Fom2* تاثیر گذار می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در جایگاه ۴۹۳ از توالی این اکوتیپ نسبت به اکوتیپ مقاوم طالبی شهد شیراز باز تیمین به باز سیتوزین تبدیل گشته، که تغییر در ناحیه مذکور سبب جایگزینی اسیدآمینه هیستیدین به جای تیروزین شده است. این جایگرینی در ساختار اسید آمینه‌ای سبب تغییر در ساختار پروتئین گشته

چون یک اسیدآمینه قطبی تبدیل به اسیدآمینه غیر قطبی شده که پروتئین را از لحاظ ساختار تبدیل به حالت آبدوست کرده که این حالت بر بیان و عملکرد پروتئین تاثیر گذاشته و این اکوتیپ را نسبت به نژاد ۱بیماری پژمردگی فوزاریومی حساس می‌نماید.

۴-۹-۳- تعیین تنوع در اکوتیپ خربزه خاتونی مربوط به سازه pTGM8

جدول ۴-۴- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM8

شماره جهش درسطح نوکلئوتید	نوع باز در **pTGM6**	نوع باز در ***Fom2***	اسید آمینه در Fom2	اسیدآمینه در pTGM6	خاصیت شیمیایی اسیدآمینه در pTGM6 /Fom2
۷۲	C	G	لیزین	آسپاراژین	قطبی/قطبی
۲۴۸	C	T	متیونین	ترئونین	غیرقطبی/قطبی
۲۵۴	A	T	والین	آسپارتات	غیرقطبی/قطبی
۳۱۸	G	T	فنیل آلانین	لوسین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۴۵۲	C	A	آسپاراژین	ترئونین	قطبی/ قطبی
۴۵۵	T	C	ترنوئین	متیونین	قطبی/ غیرقطبی
۴۹۷	C	T	والین	آلانین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۶۱۱	G	A	لیزین	آرژنین	قطبی/ قطبی
۶۱۴	G	A	لیزین	آرژنین	قطبی/ قطبی
۷۵۹	G	A			
۷۸۲	C	T	لوسین	پرولین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۸۷۸	A	G	گلایسین	گلوتامات	غیرقطبی/ قطبی

شماره خطدار جهش معنی‌دار : تغییر در پروتئین شماره بدون خط جهش غیر معنی‌دار: عدم تغییر در پروتئین

۴-۹-۴- تعیین تنوع در اکوتیپ خربزه خاقانی مربوط به سازه pTGM9

جدول ۴-۵- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM9

شماره جهش درسطح نوکلئوتید	نوع باز در **pTGM6**	نوع باز در ***Fom2***	اسید آمینه در Fom2	اسیدآمینه در pTGM6	خاصیت شیمیایی اسیدآمینه در pTGM6 /Fom2
۹۶	G	A			
۳۸۷	C	T			
۴۳۳	C	T	تریپتوفان	آرژنین	غیرقطبی/قطبی
۴۵۵	T	C	ترنوئین	متیونین	قطبی/ غیرقطبی
۷۲۹	G	A			
۷۵۹	G	A			

شماره خط‌دار جهش معنی‌دار : تغییر در پروتئین شماره بدون خط جهش غیر معنی‌دار: عدم تغییر در پروتئین

خربزه خاقانی جزء اکوتیپ‌های حساس به نژاد ۱ پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌باشد، تنوع نوکلئوتیدی موجود در این اکوتیپ بر عملکرد ژن *Fom2* تاثیر گذار می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود این اکوتیپ نسبت به طالبی شهد شیراز تنوع نوکلئوتیدی متفاوت‌تری را نشان می‌دهد.

۴-۹-۵- تعیین تنوع در اکوتیپ خربزه Charentais Fom1 مربوط به سازه pTGM15

جدول ۴-۶- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM15

شماره جهش درسطح نوکلئوتید	نوع باز در pTGM6	نوع باز در *Fom2*	اسید آمینه در *Fom2*	اسیدآمینه در pTGM6	خاصیت شیمیایی اسیدآمینه در pTGM6 /Fom2
۳۸	G	A	لیزین	آرژنین	قطبی/قطبی
۴۵۵	T	C	ترنوئین	متیونین	قطبی/غیرقطبی
۷۵۹	G	A			

خربزه Charentais Fom1 جزء اکوتیپ‌های حساس به نژاد ۱ پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌باشد، تنوع نوکلئوتیدی موجود در این اکوتیپ بر عملکرد ژن *Fom2* تاثیر گذار می‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود این اکوتیپ همانند اکوتیپ خاقانی نسبت به طالبی شهد شیراز تنوع نوکلئوتیدی متفاوت‌تری را نشان می‌دهد. همین تنوع نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای بر ساختار پروتئین و بیان ژن *Fom2* تاثیر گذاشته است و این اکوتیپ را جزء اکوتیپ‌های حساس کرده‌است.

۴-۹-۶- تعیین تنوع در اکوتیپ خربزه Charentais Fom2 مربوط به سازه pTGM16

اکوتیپ Charentais Fom2 جزء اکوتیپ‌های مقاوم به نژاد ۱ پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌باشد، تنوع نوکلئوتیدی موجود در این اکوتیپ بر عملکرد ژن *Fom2* تاثیر گذار نمی‌باشد. همان‌طور که مشاهده می‌شود این اکوتیپ نسبت به طالبی شهد شیراز تنوع نوکلئوتیدی بیشتری را در جایگاه‌های ۱۰۲، ۲۲۴، ۶۴۰ و ۸۲۵ نشان می‌دهد. که این تنوع نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای بر ساختار پروتئین *Fom2* تاثیر نگذاشته است یعنی تمامی اسیدهای آمینه جدید (قطبی) به حالت اسیدآمینه اول (قطبی) جایگزین شده‌اند پس تغییری در ساختار ژن *Fom2* ایجاد نشده و این اکوتیپ همچنان به عنوان اکوتیپ مقاوم شناخته می‌شود.

جدول ۴-۷- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM16

شماره جهش درسطح نوکلئوتید	نوع باز در pTGM16	نوع باز در *Fom2*	اسید آمینه در *Fom2*	اسیدآمینه در pTGM16	خاصیت شیمیایی اسیدآمینه در pTGM16 /Fom2
۷۲	C	G	لیزین	آسپاراژین	قطبی/قطبی
۱۰۲	C	A	لیزین	آسپاراژین	قطبی/قطبی
۲۲۴	C	T	لوسین	آسپاراژین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۲۴۸	C	T	متیونین	ترئونین	غیرقطبی/قطبی
۲۵۴	A	T	والین	آسپارتات	غیرقطبی/قطبی
۳۱۸	G	T	فنیل آلانین	لوسین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۴۵۲	C	A	آسپاراژین	ترئونین	قطبی/ قطبی
۴۵۵	T	C	ترنوئین	متیونین	قطبی/ غیرقطبی
۴۹۷	C	T	والین	آلانین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۶۱۱	G	A	لیزین	آرژنین	قطبی/ قطبی
۶۱۴	G	A	لیزین	آرژنین	قطبی/ قطبی
۶۴۰	C	T	سیستئین	آرژنین	قطبی/ قطبی
۷۵۹	G	A			
۷۸۲	C	T	لوسین	پرولین	غیرقطبی/ غیرقطبی
۸۲۵	C	T			
۸۷۸	A	G	گلایسین	گلوتامات	غیرقطبی/ قطبی

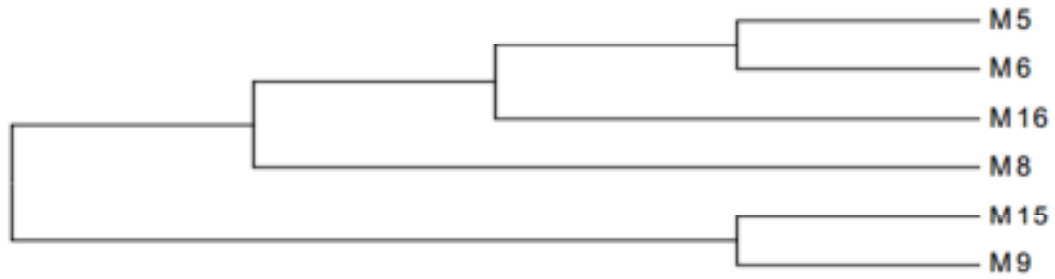
شماره خط‌دار جهش معنی‌دار : تغییر در پروتئین شماره بدون خط جهش غیر معنی‌دار: عدم تغییر در پروتئین

۴-۱۰- همردیفی چندگانه ژن *Fom2* رفرنس با توالی نوکلئوتیدی اکوتیپ‌های مورد مطالعه جهت شناسایی جهش‌ها

بررسی تنوع نوکلئوتیدی در سطح ژنوم ۶ نمونه کلون شده در وکتور pTG19 با ناحیه داخلی ژن *Fom2* گزارش شده در NCBI به کمک نرم‌افزار MEGA5 انجام گردید که نتیجه در شکل پیوست ۱ نشان داده شده است.

۴-۱۱- رسم درخت ژنی و بررسی قرابت نمونه‌های توالی‌یابی شده

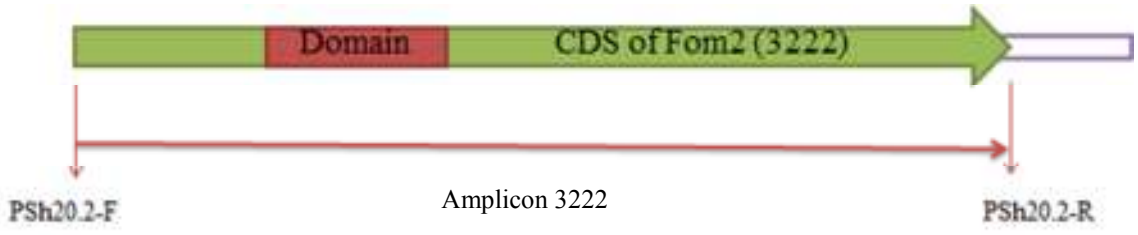
رسم درختچه فیلوژنتیکی نشان دهنده میزان شباهت و تفاوت در بین اکوتیپ‌های از لحاظ نوکلئوتیدی و پروتئینی می‌باشد. تمامی اکوتیپ‌هایی که در زیر گروه‌های مشابه قرار گرفته‌اند از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار نبوده‌اند. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود قرابت فامیلی در بین نمونه-های مقاوم به نژاد ۱ عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه مثل M6, M16, M8 زیاد بوده و همین‌طور در بین اکوتیپ‌های حساس به نژاد ۱ مثل M15, M9 نیز قرابت بیشتری وجود دارد. نمونه M5 که قبلاً به عنوان اکوتیپ حساس معرفی شده بود، از لحاظ تنوع نوکلئوتیدی در شاخه M6 که اکوتیپ مقاوم می‌باشد قرار گرفته ولی این اکوتیپ در یک تک نوکلئوتید با M6 متفاوت است که همین موتاسیون سبب تغییر در ساختار ژن *Fom2* و عملکرد پروتئینی مربوط به این ژن می‌شود.



شکل ۴-۷- ارتباط فیلوژنتیکی نمونه‌های توالی‌یابی شده بر اساس درصد شباهت (رسم شده با نرم‌افزار Clone Manager)

۴-۱۲- تکثیر توالی کامل ژن *Fom2* از اکوتیپ استاندارد M6

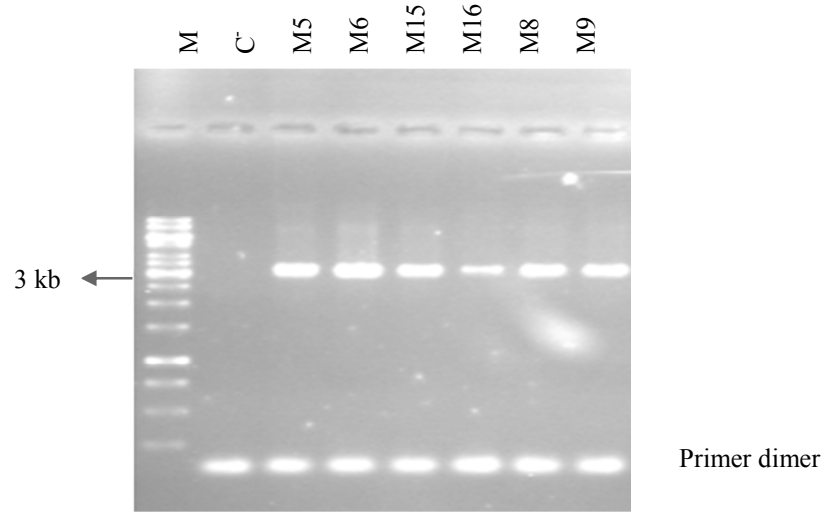
نتایج حاصل از بخش اول این تحقیق حضور بخشی از توالی این ژن را در اکوتیپ‌های خربزه نشان داد. این بخش از مطالعه با هدف بررسی توالی کامل این ژن و کلونینگ آن انجام شد. بدین منظور توالی کامل این ژن در بانک اطلاعات NCBI بازیابی شد و با انجام آنالیز های بیوانفورماتیک جفت پرایمر اختصاصی Psh20.2-F/R بر اساس ابتدا و انتهای ژن جهت تکثیر توالی کامل ژن توسط نرم‌افزار Primer Permier Var.5 طراحی شد. شکل ۴-۸ ناحیه اتصال پرایمر Psh20.2-F/R را به توالی ژن نشان می‌دهد.



شکل ۴-۸- ناحیه اتصال پرایمر Psh20.2-F/R به ژن *Fom2*

۴-۱۳- بهینه‌سازی شرایط واکنش PCR برای تکثیر قطعه کامل ژن *Fom2*

در این تحقیق به منظور بهینه‌سازی واکنش PCR چندین دمای اتصال آغازگر به DNA الگو مورد بررسی قرار گرفت. همان‌طور که گفته شد اصلاح این دما تاثیر زیادی بر روی وضوح باندها دارد. بعد از آزمایشات فراوان دمای مناسب ۵۸ درجه سانتی‌گراد با زمان ۴۵ ثانیه انتخاب گردید. بررسی غلظت-های مختلف DNA نیز نشان داد که غلظت ۳۰ نانو گرم بر میکرولیتر بهترین وضوح باندی را تولید می‌کند. نتیجه حاصل از بهینه شدن دما و غلظت DNA در شکل ۴-۹ قابل رویت می‌باشد.



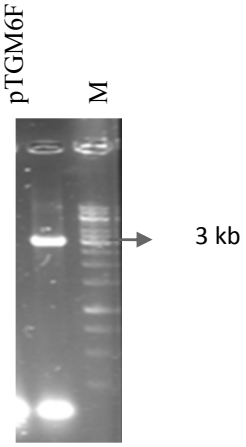
شکل ۴-۹- الگوی الکتروفورزی PCR قطعه کامل ژن *Fom2* حاصل از پرایمر اختصاصی Psh20.2، همان‌طور که مشاهده می‌شود چاهک دو C^- می‌باشد که نشان دهنده صحت انجام واکنش PCR است در چاهک‌های بعدی تمامی اکوتیپ‌ها باند ۳۲۲۲ جفت بازی که مربوط به قطعه کامل ژن است، را تولید کردند که نشان دهنده حضور ژن *Fom2* در اکوتیپ‌های مورد مطالعه ما می‌باشد. M: نشانگر ملکولی 1kb ladder

۴-۱۴- همسانه‌سازی توالی تکثیر شده با پرایمر PSh20.2 در وکتور pTG19

به منظور کلونینگ قطعه داخلی ژن *Fom2* از محصول PCR خالص شده در مرحله قبل، در واکنش اتصال با pTG19 استفاده گردید. پس از انجام ترانسفورماسیون باکتریایی و کشت باکتری‌های E.coli ترانسفورم شده به روی محیط کشت LB جامد حاوی ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و ۱۶ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کلونی‌ها بر روی محیط LB رشد کردند که ممکن است حاوی قطعه ژنی مورد نظر نباشند که برای این‌کار غربالگری صورت گرفت. طالبی شهد شیراز (M6) پس از اتصال به ناقل pTG19 تولید سازه‌ای با نام pTGM6F را می‌نماید.

۴-۱۵-تایید کلنی‌های نوترکیب با استفاده از تکنیک کلنی PCR و پرایمر PSh20.2-F/R

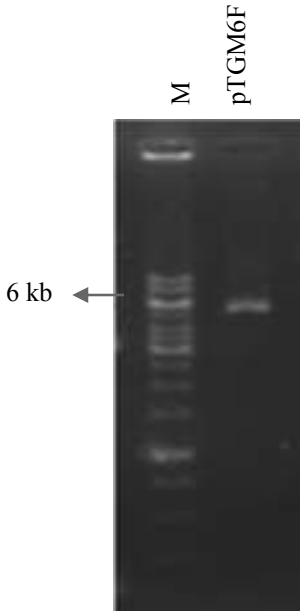
برای اثبات صحت انجام ترانسفورماسیون و ورود قطعه مورد نظر در ناقل pTG19 از تکنیک PCR Colony استفاده شد. در این روش جهت تشخیص کلنی‌های مثبت تایید حضور سازه موردنظر در میزبان باکتریی از پرایمرهای اختصاصی ژن *Fom2* استفاده شد، و از لاشه تخریب شده میزبان باکتریایی به عنوان جز DNA در یک واکنش PCR استفاده گردید. در نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمر Psh20-F/R باکتری که حاوی قطعه کامل ژن *Fom2* می‌باشد باند ۳۲۲۲ جفت بازی را مثل نمونه‌های pTGM6F نشان می‌دهد (شکل ۴-۱۰).



شکل ۴-۱۰- الگوی الکتروفورزی محصول کلنی PCR حاصل از پرایمر Psh20.2-F/R، در این شکل مشخص می‌شود که قطعه کامل ژن *Fom2* در طالبی شهد شیراز به ناقل منتقل شده‌اند که نشان دهنده کلنی نوترکیب می‌باشد. M: نشانگر ملکولی 1kb ladder

۴-۱۶- استخراج پلاسمید نوترکیب از باکتری *E. cloi*

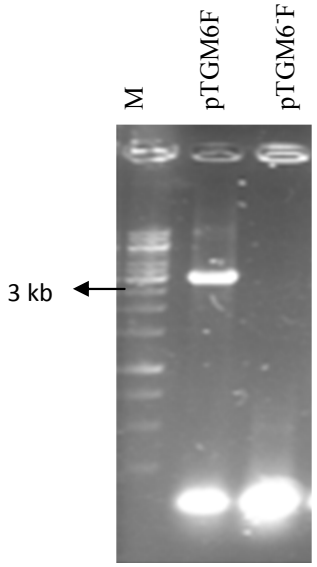
از این روش برای تمایز بین باکتری‌ها که ناقل خالی را کسب کرده‌اند و باکتری‌هایی که با دریافت ناقل نوترکیب تغییر شکل داده استفاده گردید. کشت شبانه از تعدادی از کلونی‌ها در محیط کشت LB حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین که بعد از ۱۶ ساعت انکوبه رشد مطلوب داشته برای استخراج پلاسمید استفاده شدند. باکتری‌های که ناقل حاوی قطعه کامل ژن *Fom2* را دریافت نموده‌اند پس از استخراج پلاسمید باندی حدود kb ۶/۱ را مثل نمونه pTGM6 تولید کردند (شکل۴-۱۱).



شکل ۴-۱۱- الگوی الکتروفورزی استخراج پلاسمید حاصل از پرایمر Psh20.2، سازه مربوط به چاهک ۲ باند ۶ kb را پس از استخراج پلاسمید نشان می‌دهد که نشان دهنده حضور قطعه کامل ژن *Fom2* در ناقل مورد نظر می‌باشد. M: نشانگر ملکولی 1kb ladder

۴-۱۷- تایید پلاسمیدهای نوترکیب استخراج شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Psh10.2-F/R

برای اثبات صحت انجام ترانسفورماسیون و ورود قطعه مورد نظر در ناقل pTG19 از پلاسمیدهای استخراج شده و پرایمرهای اختصاصی وکتور pTG19 (Psh10.2-F/R) در واکنش PCR استفاده گردید. در نتایج حاصل از PCR با استفاده از پرایمر Psh10.2-F/R باکتری که حاوی قطعه کامل ژن *Fom2* می-باشد باند ۳۳۰۰ جفت بازی را مثل سازه pTGM6 نشان می‌دهد و در صورت ترانسفورم نشدن باکتری باندی مثل سازه pTGM6-F تولید نمی‌شود (شکل ۴-۱۲).



شکل ۴-۱۲- الگوی الکتروفورزی محصول کلنی PCR حاصل از پرایمر Psh20.2, کلنی نوترکیب باند حدود ۳۰۰۰ بازی را نشان می‌دهند که در چاهک ۲ مشاهده می‌گردد. و نمونه چاهک ۳ فاقد قطعه کامل ژن می‌باشد. M: نشانگر ملکولی 1kb ladder

۴-۱۸- تعیین موتاسیون نمونه pTGM6 حاصل از پرایمر Psh20.2-F/R

در قسمت زیر بررسی موتاسیون طالبی شهد شیراز در سطح پروتئینی و نوکلئوتیدی در جدول مشخص شده‌است.

جدول ۴-۸- تنوع در سطح نوکلئوتیدی سازه pTGM6 F حاوی ژن *Fom2* همسانه شده از طالبی شهد شیراز

شماره جهش درسطح نوکلئوتید	نوع باز در pTGM6F	نوع باز در *Fom2*	اسید آمینه در *Fom2*	اسیدآمینه در pTGM6	خاصیت شیمیایی اسیدآمینه در pTGM6 **F**/*Fom2*
۱۶۹	C	T			
۲۰۴	C	T			
۲۵۹	C	G	آسپارتات	هیستیدین	قطبی/ قطبی
۴۴۶	G	A	گلوتامات	گلایسین	قطبی/ غیرقطبی
۶۴۲	T	C			
۶۴۶	C	T			
۶۵۴	G	A			

۷۹۸	G	A			
۸۰۱	G	A			
۹۴۶	G	A	ترئونین	آلانین	قطبی/ غیرقطبی
۹۶۹	C	T			
۱۰۶۵	A	G			
۱۱۰۱	C	T			
۱۱۱۸	A	G	آرژنین	گلوتامین	قطبی/ قطبی
۱۱۷۳	G	A			
۱۲۲۶	A	T			
۱۲۲۷	T	A	ایزولوسین	آسپاراژین	غیرقطبی/قطبی
۱۲۴۱	G	T	والین	گلایسین	غیرقطبی/غیرقطبی
۱۸۷۶	C	A	ترئونین	پرولین	قطبی/ غیرقطبی
۱۸۹۶	C	A			
۱۹۶۰	G	C	آرژنین	گلایسین	قطبی/ غیرقطبی
۲۰۰۰	T	C	ترئونین	ایزولوسین	قطبی/ غیرقطبی
۲۰۰۷	C	T			
۲۰۳۱	T	C			
۲۰۴۷	C	T	سیستئین	آرژنین	قطبی/ قطبی
۲۰۸۷	A	G	گلایسین	آسپارتات	غیرقطبی/قطبی
۲۰۹۳	T	C	سرین	لوسین	قطبی/ غیرقطبی
۲۲۱۴	T	C			
۲۲۱۶	G	A	آسپاراژین	سرین	قطبی/ قطبی
۲۳۰۴	G	A			
۲۳۴۳	T	C			
۲۳۴۶	A	G			

۲۳۸۸	G	A			
۲۳۸۹	C	T			
۲۴۴۹	G	A	لیزین	گلوتامات	قطبی/ قطبی
۲۵۰۷	C	T	والین	آلانین	غیرقطبی/غیرقطبی
۲۵۱۲	G	C			
۲۵۱۳	G	A			
۲۵۱۴	T	G	گلوتامین	گلایسین	قطبی/ غیرقطبی
۲۵۱۵	G	A			
۲۵۱۶	G	A	آسپاراژین	گلایسین	قطبی/ غیرقطبی
۲۵۲۳	G	C	ایزولوسین	متیونین	غیرقطبی/غیرقطبی
۲۵۹۴	G	A	لیزین	آرژنین	قطبی/ قطبی
۲۶۱۰	G	T	سرین	آرژنین	قطبی/ قطبی
۲۶۴۳	A	G			
۲۶۴۹	C	A	گلوتامین	هیستیدین	قطبی/ قطبی
۲۶۷۰	A	T			
۲۶۸۳	A	C	گلوتامین	لیزین	قطبی/ قطبی
۲۶۹۸	A	G	گلایسین	سرین	غیرقطبی/قطبی
۲۷۲۰	T	C	پرولین	لوسین	غیرقطبی/غیرقطبی
۲۷۵۳	A	G	گلایسین	آسپارتات	غیرقطبی/قطبی
۲۸۸۲	G	A	آسپارتات	گلایسین	قطبی/ غیرقطبی
۲۸۸۴	A	G	گلوتامات	لیزین	قطبی/ قطبی
۲۹۰۶	A	C	ترئونین	لیزین	قطبی/ قطبی

بعد از کلون کردن قطعه مورد نظر در ناقل pTG19 و توالی‌یابی، آنالیز نتایج وجود موتاسیون را در اکوتیپ مقاوم طالبی شهد شیراز مشخص نمود که این موتاسیون‌ها بر عملکرد ژن *Fom2* تاثیر نداشته و ساختار این ژن را تغییر نمی‌دهد.

۴-۱۹- بررسی تنوع توالی ژن *Fom2* تکثیر شده از اکوتیپ طالبی شهد شیراز و مقایسه آن با توالی‌های گزارش شده در بانک های اطلاعاتی

ابتدا برای اینکه توالی نوکلئوتیدی ژن *Fom2* را با کلیه اکوتیپ‌های ثبت شده در پایگاه اطلاعات (NCBI) مقایسه کنیم، توالی نوکلئوتیدی این ژن را BLAST کردیم. توالی‌های ژن *Fom2* که از اکوتیپ‌های مختلف خربزه با شماره‌های دستیابی متفاوت ثبت شده بود، شناسایی گردید که در جدول ۴- ۹ تمامی نمونه‌ها را مشاهده می‌کنید.

جدول ۴-۹- بازیابی توالی ژن‌های *Fom2* گزارش شده

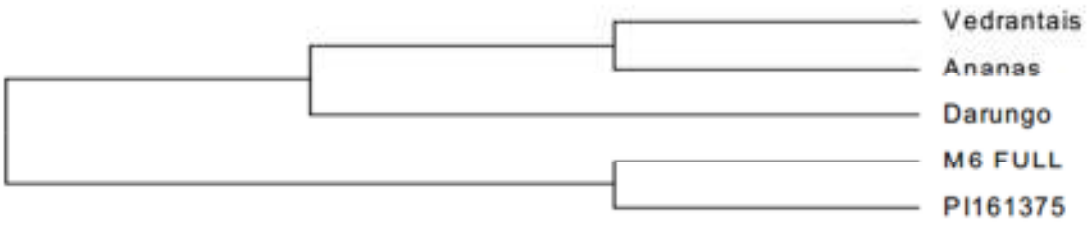
نام ژن	شماره دستیابی	Description
Fom2	DQ287956	Cucumis melo R-FOM2 gene
Fom2	AY619646	Cucumis melo cultivar Durango Fom2 protein (Fom2) gene
Fom2	AY619647	Cucumis melo cultivar Vedrantais Fom2 protein (Fom2) gene
Fom2	AY619648	Cucumis melo cultivar Ananas Yokneum Fom2 protein (Fom2) gene
Fom2	AY619649	Cucumis melo cultivar PI161375 Fom2 protein (Fom2) gene

که همردیفی چندتایی ژن‌های *Fom2* گزارش شده در NCBI با توالی اکوتیپ طالبی شهد شیراز در شکل پیوست ۲ نشان داده شده است.

۴-۲۰- رسم درخت ژنی و بررسی قرابت نمونه‌های توالی‌یابی شده و اکوتیپ‌های ثبت شده در NCBI

همان‌طور که مشاهده شد نمونه M6 که اکوتیپ مقاوم به نژاد ۱ پژمردگی فوزاریومی خربزه است با اکوتیپ PI-161375 در یک شاخه قرار دارند که نشان دهنده توالی یکسان نوکلئوتیدی این دو نمونه

و مقاومت آن‌ها به پژمردگی فوزاریومی می‌باشد. و نمونه‌های حساس توالی یکسان را نشان می‌دهد.



شکل ۴-۱۳- درختچه فیلوژنتیکی نمونه pTGM6 توالی‌یابی شده با نمونه‌های گزارش شده در بانک‌های اطلاعاتی بر اساس درصد شباهت (رسم شده با نرم‌افزار Clone Manager)

۴-۲۱- بحث

ایران یکی از رویشگاه‌های طبیعی خربزه بوده واصلاح این گیاه با توجه به نوع مصرف و کاربرد آن دارای اهمیت می‌باشد. یکی از عوامل خسارت‌زا به خربزه بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌باشد، که عامل این بیماری هم بذرزاد و هم خاکزاد بوده و قادر است که در غیاب میزبان چندین سال در خاک زنده بماند. ضدعفونی مداوم بذور در کنترل آلودگی به بیماری در اکوتیپ های نسبتاً مقاوم مفید خواهد بود، اما معمولاً این روش برای تمام کشاورزان قابل اجرا نیست. در نتیجه تنها راه اقتصادی و آرمانی استفاده از اکوتیپ های مقاوم است (بنی‌هاشمی، ۲۰۰۹).

مطالعه تنوع ژنتیکی موجود بین اکوتیپ های مختلف خربزه با منشا جغرافیایی متفاوت اولین گام در راه اصلاح این گیاه برای مقاومت به پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌باشد. روش‌های سنتی تعیین تنوع زمان، انرژی، امکانات و هزینه‌های زیادی را صرف می‌کند و به تغییر شرایط محیطی هم حساس است در نتیجه استفاده از روش‌های ملکولی و کلون نمونه‌ها در ناقل‌های عمومی و بیانی و سپس توالی‌یابی آن‌ها در شناسایی تنوع به ما کمک بیشتری می‌کند.

دستیابی به توالی ژن‌های مقاومت در تولید اکوتیپ های مقاوم ارزش بالائی دارد. ژن *Fom2* به عنوان عامل مقاومت در مقابل نژاد صفر و ۱ قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* شناخته شده است. نتایج PCR با پرایمر PSh20-F/R حضور ژن *Fom2* را در ۶ اکوتیپ مورد مطالعه نشان داد. با

توجه به این نتایج الگوی الکتروفورزی محصول PCR با پرایمر PSh20 در بین اکوتیپ های مقاوم و حساس یکسان بود. این در صورتی می‌باشد، که اومولود و همکاران (۲۰۱۱) ناحیه LRR ژن *Fom2* را در اکوتیپ های حساس Durango, Vedrantais, Ananas Yokneum با هم مقایسه کردند و نتایج نشان داد که این ناحیه از ژن *Fom2* از لحاظ توالی نوکلئوتیدی در اکوتیپ های حساس مشابه یکدیگر می‌باشد و این در حالی است که با توالی اکوتیپ های مقاوم متفاوت می‌باشد.

با توجه به تفاوت نوکلئوتیدی در توالی ژن *Fom2* در بین اکوتیپ های مقاوم وحساس و وجود پلی مورفیسم اومولود از مارکرهای SCAR[1] برای وجه تمایز آلل‌ها بین۲۷ ژنوتیپ از اکوتیپ های مقاوم و حساس استفاده کرد. در طی PCR با پرایمر مورد نظر در بین گونه‌های حساس و مقاوم آن‌ها موفق به ردیابی ژن *Fom2* شدند و اندازه تک باندها در اکوتیپ های مقاوم ۴۰۸ bp و در اکوتیپ های حساس ۳۴۲ bp می‌باشد و این نشان دهنده الگوی باندی متفاوت در بین اکوتیپ های حساس و مقاوم بوده است. که این مطالب با نتایج ما مغایرت دارد می‌توان نتیجه گرفت که توالی ژن *Fom2* در اکوتیپ های حساس ایرانی موجود می‌باشد، لذا عکس العمل متفاوت اکوتیپ های در برابر بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌تواند نتیجه در تنوع نوکلئوتیدی و بیان ژن *Fom2* باشد.

می‌توان نتیجه حاصله را چنین بیان داشت، خربزه مشهدی که حساس به نژاد ۱ بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌باشد تنها در یک تک نوکلئوتید در طول توالی‌اش با اکوتیپ مقاوم طالبی شهد شیراز متفاوت است که این موتاسیون سبب تغییر در ساختار پروتئینی ژن *Fom2* شد که همین تغییر بر عملکرد و بیان ژن *Fom2* در خربزه مشهدی تاثیر و آن را جزء اکوتیپ های حساس به نژاد ۱ بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌نماید. خربزه خاقانی، Charentais Fom1 تنوع نوکلئوتیدی متفاوتری را نسبت به طالبی شهد شیراز نشان می‌دهد. این تنوع در ناحیه دومین NB-ARC سبب شده موتاسیون‌های ایجاد شده حالت غالب را داشته باشد و پروتئین ما را از لحاظ عملکردی تغییر

1. Sequence characterized amplified region

دهند. اکوتیپ Charentais Fom2 نسبت به طالبی شهد شیراز تنوع نوکلئوتیدی بیشتری را نشان می‌دهد. که این تنوع نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای بر ساختار پروتئین *Fom2* تاثیر نگذاشته است. یعنی موتاسیون‌های خاموشی ایجاد شد که بر عملکرد ژن *Fom2* تاثیر ندارد.

باتوجه به نتایج بدست آمده می‌توان بیان کرد که اختلافات موجود در بین اکوتیپ های از لحاظ مقاومت و حساسیت به پژمردگی فوزاریومی در زمان رشد خربزه، اساس ژنتیکی دارد. با توجه به اینکه توالی ژن *Fom2* در ژنوم همه اکوتیپ های فوق قابل شناسایی و تکثیر بود، ولی بر خلاف انتظار به دلیل حساسیت اکوتیپ خاقانی، خربزه مشهدی و Charentais Fom1 ژن *Fom2* در این اکوتیپ های ردیابی شد. بر اساس این نتایج اکوتیپ های حساس نیز واجد این ژن بوده و انتظار می‌رود نسبت به نژاد ۱ مقاوم باشد، در صورتی که مشخص است تفاوت در سطح مقاومت اکوتیپ های به دلیل وجود تنوع در توالی نوکلئوتیدی و یا در سطح بیان پروتئین‌ها و عوامل محیطی می‌باشد که با نتایج ونگ و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد.

در این تحقیق علاوه بر پرایمرهای داخلی PSh20-F/R جفت پرایمر اختصاصی PSh20.2-F/R جهت تکثیر توالی کامل ژن طراحی شد. با استفاده از آغازگر PSh20.2-F/R که بر اساس ابتدا و انتهای ژن طراحی شد. با توجه به مقاوم گزارش شدن اکوتیپ طالبی شهد شیراز (M6) ژنوم این اکوتیپ 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. بعد از کلون کردن قطعه مورد نظر در ناقل pTG19 و توالی‌یابی، آنالیز نتایج وجود موتاسیون را در اکوتیپ مقاوم طالبی شهد شیراز مشخص نمود که این موتاسیون‌ها بر عملکرد ژن *Fom2* تاثیر نداشته است. به طور کلی هدف از کلون قطعه کامل در این تحقیق انتقال ژن *Fom2* به ناقل بیانی و بعد از آن انتقال ژن به گیاه می‌باشد، که در مطالعات تکمیلی مورد بررسی قرار خواهد گرفت.

نمونه‌های توالی‌یابی شده با اکوتیپ های مطالعات اومولود و همکاران، (۲۰۱۱) و ونگ و همکاران (۲۰۱۱) مقایسه شدند که نتایج مشخص کرد الگوی نوکلئوتیدی جهش‌ها در سطح پروتئینی و نوکلئوتیدی تا حدودی مشابه یکدیگر می‌باشد این درحالی است که تنوع ژنتیکی بین اکوتیپ های خربزه مورد مطالعه ما و محققان دیگر محدود و نزدیک به یکدیگر می‌باشد. و تنوع محدود بر این نکته دلالت دارد که به احتمال زیاد ژنوتیپ‌ها دارای منشا یکسان می‌باشند.

۴-۲۲- پیشنهادات

در جهت تکمیل و بهبود نتایج حاصل از این تحقیق، پیشنهادات ذیل قابل ارائه هستند تا بتوان به کمک آن‌ها، این پژوهش را به نتیجه نهایی خود که همانا تولید اکوتیپ مقاوم به نژاد ۱ قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp .*melonis* عامل بیماری پژمردگی خربزه است، نائل گردیم:

۱- بررسی تنوع ژنتیکی اکوتیپ هایی که در گذشته در منطقه خراسان کشت می‌شده و مقایسه-ی آن با تنوع ژنتیکی اکوتیپ های مطالعه شده در این تحقیق.

۲- با توجه به نتایج اولیه‌ی که در این پروژه به دست آمد به نظر می‌رسد بررسی تنوع ژن *Fom2* بر روی تعداد نمونه‌های بیشتر و دیگر جمعیت‌های استان‌های خراسان و همچنین توده‌های بومی کل کشور اطلاعات بیشتری راجع به تعداد دقیق گونه‌های موجود و روابط خویشاوندی آن‌ها به دست می‌دهد.

۳- با توجه به اینکه ژن کلون شده در این تحقیق در حال حاضر در داخل یک وکتور ساب کلونینگ قرار دارد بایستی به منظور آماده‌سازی برای انتقال به گیاه در مرحله بعد به یک وکتور بیان یوکاریوتی مناسب همسانه‌سازی شود.

۴- بررسی تنوع ژن *Fom2* در سطح بیان از طریق آنالیز RNA و ساخت CDNA

پیوست‌ها

شکل پیوست ۱- همردیفی چندگانه ژن *Fom2* رفرنس با توالی نوکلئوتیدی اکوتیپ‌های مورد مطالعه جهت شناسایی جهش‌ها

مقایسه تنوع نوکلئوتیدی در بین ۶ اکوتیپ M5 (خربزه مشهدی)، M6 (طالبی شهد شیراز)، M8 (خربزه خاتونی)، M9 (خربزه خاقانی)، M15 (Charentais Fom1) و M16 (Charentais Fom2) در شکل زیر مشخص می‌باشد. این تنوع در بین نمونه‌های M5, M16, M6, M8 تا حدود زیادی مشترک می‌باشد، نمونه M5 در نوکلئوتید ۴۹۳ با M6 متفاوت می‌باشد و نمونه M16 در نوکلئوتید ۸۲۵، ۶۴۰، ۴۹۳ با M6 متفاوت است. نمونه M15 و M9 تنوع بسیار متفاوتری نسبت M6 نشان می‌دهد.

```
FOM2 GGA TGT GGG TGG ATG ATC TTC GGC ATC TTG TTT ATC AAG CCG ATG ATC
M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 TAT TAG ACG AAA TTG TTT ATG AAG ATC TTC GAC AAA AGG TCC AAA CAA
M5   ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 GAA AAA TGA AGA AGG TGT GTG ATT TTT TTT CTC CTT CTA CCA ATG TTT
M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ..C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 TGA TCT TTC GTC TTA ACA TGG CAA AAA AAA TGA TGA CTC TTA TAG CAT
M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

#FOM2 TGT TAG AAA AGC ATT ACC TTG AGG CTG CTC CTT TAG GAC TTG TGG GGA
#M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
#M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
#M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
#M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
#M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
#M16  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .C. ... ... ... ...

FOM2 ATG AAA ATG TAA GTC CAG AGA TCG ATG TTA TTA GTC AAT ATC GAG AGA
M5   ... ... .C. ... .A. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... .C. ... .A. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... .C. ... .A. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
```

```
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... .C. ... .A. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 CAA TTT CAG AAC TCG AAG ATC ATA AGA TTT TGG GGA GGG ATG TTG AAG
M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 TTG AAA GTA TAG TGA AAC AAG TGA TTG ATG CTA GCA ATA ATC AAC TTA
M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 CAT CTA TCC TAC CCA TTG TTG GTA TGG GTG GAT TAG GAA AAA CAA CTT
M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ..C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 TGG CAA AGT TAG TTT TCA AAC ACG AGT TGG TTA GAC AAC ATT TTG ATA
M5   ... ... ... ... ... ... .C. .T. ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... .C. .T. ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... .C. .T. ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   C.. ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... ... .C. .T. ... ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 AAA CTG TAT GGG TAT GTG TCT CTG AAC CAT TTA TTG TCA ACA AGA TTT
M5   ... ... ... ... C.. .C. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 TGT TAG ATA TTT TAC AAA ATC TAA AAG GTG GCA TTT CTA ATG GAG GGG
M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 ATA GTA AGG AGG TTT TAC TTC GTG AAC TCC AAA AAG AAA TGC TTG GGC
M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. .G. ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. .G. ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. .G. ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. .G. ... ... ...

FOM2 AAA CAT ATT TTC TTG TGC TTG ACG ATG TTT GGA ACG AAA ATT CTT TTC
M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
```

```
FOM2 TAT GGG GTG AGT TGA AAT ATT GTT TGC TCA AGA TCA CTG GAA ACT CTA
M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 AAA ATA GTA TTG TTG TGA CTA CAA GGA GTG CTG AAG TTA CAA AAA TCA
M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ...
M9   ... ... ..G ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ...
M16  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..G ... ... ...

FOM2 TGG GAA CAT GTC CTG GTC ATC TTT TAA GTA AAT TAT CTG ATG ATC ATT
M5   ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... .C. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 GTT GGT CCT TGT TTA AAG AAA GTG CAA ATG TAT ATG GAC TAT CAA TGA
M5   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ..C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 CTT CAA ACT TGG GGA TTA TTC AAA AAG AGT TGG TCA AAA AAA TTG GTG
M5   ... ... ... ... .A. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6   ... ... ... ... .A. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M8   ... ... ... ... .A. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M9   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M15  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M16  ... ... ... ... .A. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

FOM2 GTG TAC CAT TGG TTG CAC G
M5   ... ... ... ... ... ... .
M6   ... ... ... ... ... ... .
M8   ... ... ... ... ... ... .
M9   ... ... ... ... ... ... .
M15  ... ... ... ... ... ... .
M16  ... ... ... ... ... ... .
```

شکل پیوست ۲- بررسی تنوع توالی ژن *Fom2* تکثیر شده از اکوتیپ طالبی شهد شیراز و مقایسه آن با توالی‌های گزارش شده در بانک های اطلاعاتی:

همان‌طور که مشاهده شد نمونه M6 که اکوتیپ مقاوم به نژاد ۱ پژمردگی فوزاریومی خربزه است با اکوتیپ PI-161375 تنوع نوکلئوتیدی مشابه‌ای را مشخص می‌کنند. که این تنوع مشابه نشان دهنده توالی یکسان نوکلئوتیدی این دو نمونه و مقاومت آن‌ها به پژمردگی فوزاریومی می‌باشد.

```
M6 FULL    ATT AAA AAT GTT GCA TGC AAG CTA CGC ACG ATT GAT TTT ATT CAA AAG
Darungo    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .A. ... ...

M6 FULL    ATT CCT CAC AAT ATA GGT CAA CTG ACA TTC TTT GAT GTG AAG ATA AGA
Darungo    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... .T. ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    AAT TTT GTT TGT TTG CGT ATT TTA AAG ATA TCG AAG ATG TCT AGT GAG
Darungo    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ..C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ..C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ..C ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    AAG TTA CCG AAG TCA ATA GAT CAA TTG AAA CAC TTG AGA TAT CTA GAA
Darungo    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ..T ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    ATT GCA AGT TAT TCA ACG AGA TTA AAA TTT CCA GAG TCT ATT GTT TCG.
Darungo    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    CTT CAT AAT TTG CAA CCA TTA AAG TTC CTA TAC TCC TTT GTT GAA GAA
Darungo    ... ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ..A ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ..A ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ..A ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ..A ... ... ... ...

M6 FULL    TTT CCA ATG AAC TTT TCA AAT TTG GTA AAT TTA AGG CAC TTG AAA TTA
Darungo    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    TGG GGA AAT GTT GAC CAA ACG CCT CCA CAT TTA AGT CAA TTG ATT CAA
Darungo    ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .C. ...
Vedrantais ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .C. ...
Ananas     ... C.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .C. ...
PI161375   ... ... ... ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ... ... .C. ...

M6 FULL    CTC CAA ACA TTG TCT CAT TTT GTA ATT GGG TTT GAA GAA GGT CGT AAG
Darungo    ..T ... ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... T.. ...
Vedrantais ..T ... ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... T.. ...
Ananas     ..T ... ... ... ... ... ... ... ... ..C ... ... ... ... T.. ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    ATT ATT GAA TTG GGA CCA TTG AAA AAC TTG CAA GAT AGT TTG AAT CTT
Darungo    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... .G. ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    TTG TGT TTG GAG AAA GTT GAA AGT AAA GAG GAA GCC AAA GGA GCA AAC
Darungo    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
```

```
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    TTG GCA GAA AAG GAG AAT TTA AAA GAG CTA AAC TTA AGT TGG TCC ATG
Darungo    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    AAA AGA AAA GAT AAC GAT AGT TAC AAT GAT TTG GAA GTG TTG GAA GGA
Darungo    ... ... ... ... ... ..C .A. ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... ..C .A. ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... ..C .A. ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    CTT CAA CCA AAC CAA AAT CTC CAA ATA TTA AGA ATC CAC GAC TTT ACA
Darungo    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    GAA AGG CGT TTG CCT AAC AAG ATT TTT GTT GAG AAT TTA ATA GAG ATA
Darungo    ... ... ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    GGT TTA TAT GGT TGT GAT AAT TGT GAA AAG CTT CCA ATG CTT GGA CAG
Darungo    ... ..G ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..A
Vedrantais ... ..G ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..A
Ananas     ... ..G ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ..A
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    CTA AAC AAC TTA AAG AAA CTT GAG ATT TGC AGC TTC GAT GGC GTT CAA
Darungo    T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     T.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    ATT ATA GAC AAC GAG TTC TAT GGT AAT GAT CCA AAC CAA AGA AGG TTC
Darungo    ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... A.. ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    TTC CCA AAG CTT GAG AAA TTT GCA ATG GGT GGT ATG ATG AAC TTA GAG
Darungo    ... ... ... ... ... ... ... .T. ... CAG AA. ... ..C ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... ... ... .T. ... CAG AA. ... ..C ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... ... ... .T. ... CAG AA. ... ..C ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    CAA TGG GAA GAG GTA ATG ACA AAT GAT GCA TCA TCA AAT GTT ACA ATT
Darungo    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    TTT CCC AAT CTT AGA AGC TTG GAG ATA AGG GGA TGT CCC AAA TTA ACA
Darungo    ... ... ... ... .A. ... ... ... ... ... ..T ... ... ... ... ... ...
Vedrantais ... ... ... ... .A. ... ... ... ... ... ..T ... ... ... ... ... ...
Ananas     ... ... ... ... .A. ... ... ... ... ... ..T ... ... ... ... ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL    AAA ATT CCA AAC GGA TTA CAC TTT TGT AGT TCC ATT CGA CGA GTG AAA
Darungo    ... ... ... ... ..G ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ..T ... ...
Vedrantais ... ... ... ... ..G ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ..T ... ...
Ananas     ... ... ... ... ..G ... ..A ... ... ... ... ... ... ... ..T ... ...
PI161375   ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
```

```
M6 FULL     ATA TAC AAA TGT TCA AAT TTG AGC ATA AAT ATG AGA AAT AAG CTG GAA
Darungo     ... ... C.. ... ... ... ... G.. ... ... ... ... ... ... .C. ...
Vedrantais  ... ... C.. ... ... ... ... G.. ... ... ... ... ... ... .C. ...
Ananas      ... ... C.. ... ... ... ... G.. ... ... ... ... ... ... .C. ...
PI161375    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL     TTA TGG TAT TTA CAC ATT GGT CCG TTA GAC AAG CTA CCA GAA GAT TTA
Darungo     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas      ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
M6 FULL     TGT CAT CTC ATG AAT TTG GGG GTA ATG ACA ATT GTT GGA AAT ATA CAG
Darungo     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas      ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL     AAT TAT GAT TTT GGC ATC CTT CAG CAC CTT CCT TCC CTT AAA AAA ATT
Darungo     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas      ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL     ACT TTA GTC GAG GGT AAG TTG AGC AAT AAT AGT GTA AAA CAA ATT CCT
Darungo     ... ... ... ... .A. G.. ... ... ... ... ... ... .C. ... ... ...
Vedrantais  ... ... ... ... .A. G.. ... ... ... ... ... ... .C. ... ... ...
Ananas      ... ... ... ... .A. G.. ... ... ... ... ... ... .C. ... ... ...
PI161375    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL     CAA CAA CTT CAA CAC CTC ACT TCC TTG GAA TTT CTG TCA ATT GAA AAT
Darungo     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas      ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL     TTT GGA GGC ATC GAA GCT TTG CCA GAA TGG CTA GGA AAC TTG GTA TGT
Darungo     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas      ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL     TTG CAA ACA CTC TGT TTT CTT TGT TGC AGA AAT TTG AAA AAA CTA CCT
Darungo     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas      ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL     TCT ACA GAA GCA ATG CTA CGT CTC ACT AAA TTA AAT AAA TTG TAT GCT
Darungo     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas      ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL     TGC GAA TGT CCA ATG CTA CTA CTC GAA GAA GGT GAC CCA GAG CGA GCA
Darungo     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas      ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...

M6 FULL     AAA CTT TCC CAC TTT CCA AAC GTG TTG GCT CAC CGC AAC ACG TTC GAG
Darungo     ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Vedrantais  ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
Ananas      ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
PI161375    ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...
```

منابع

ارشاد، ج. (۱۳۵۶). "قارچ‌های ایران." سازمان تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی، موسسه بررسی آفات و بیماری‌های گیاهی.۲۷۷ صفحه.

اشرفی‌زاده، آ.، اعتباریان، ح. ر. و زمانی‌زاده، ح. ر. (۱۳۸۱). "ارزیابی جدایه‌های Streptomyces و Trichoderma برای کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه و طالبی."**پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران**. کرمانشاه.

اعتباریان، ح. (۱۳۷۶). "بیماری‌های سبزی و صیفی و روش‌های مبارزه با آن‌ها." چاپ اول. **انتشارات دانشگاه تهران.** ۵۴۴ صفحه.

بهداد، ۱. (۱۳۷۵). "دائره‌المعارف گیاهپزشکی ایران، آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز."**نشر یادبوداصفهان.** ۳۲۰۰ صفحه.

براون، ت. آ.(۲۰۱۰). "کلون‌سازی ژن‌ها و آنالیز DNA." ویرایش ششم. **انتشارات خانه زیست شناسی.** ۴۳۹ صفحه.

بنی‌هاشمی، ض. (۲۰۰۹). "واکنش اکوتیپ های*Cucumis melo* به نژادهای *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* عامل پژمردگی فوزاریومی."**نشریه بیماری‌های گیاهی**. جلد ۴۶، شماره ۱، ص ۱۱-۲۲.

جهانبخش، و. (۱۳۷۶). "بررسی پوسیدگی طوقه و ریشه خربزه در استان خراسان." پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد. ۱۲۰ صفحه.

حقی‌زاده، ح. (۱۳۷۹). "پرورش سبزی در باغ و خانه."**انتشارات پرتو دانش تهران.** ۲۲۴ صفحه.

دهقانی، ع. اعتباریان، ح. ر. علیزاده، ع. (۲۰۰۱). "بررسی مقاومت ارقام مختلف کاهو نسبت به بیماری پژمردگی فوزاریومی". **مجله علوم کشاورزی ایران.** جلد ۳۳، شماره ۲، ص ۳۵۷-۳۵۱.

رستگار، ژ. و لادن مقدم، ع. (۱۳۸۲). "شناسایی عامل بیماری کمر سفید خربزه و بررسی امکان مبارزه بیولوژیک با آن در دشت گرمسار." اعضای هیئت علمی دانشگاه آزاد واحد گرمسار. ۵ صفحه.

سینگ، ف. ۲۰۱۱. ." اصلاح نباتات پیشرفته." **انتشارات دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.** ۲۱۸ صفحه.

شجاعیان، ع. (۱۳۸۳). "تعیین نشانگر دی‌ان‌ای پیوسته به ژن مقاومت به پژمردگی فوزاریومی خربزه به منظور استفاده در انتخاب به کمک نشانگر." پایان‌نامه دکتری. دانشکده کشاورزی تربیت مدرس. ۱۴۰ صفحه.

صارمی، ح. (۱۳۷۹). "بیماریهای گیاهی ناشی از گونه های فوزاریوم."**انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.** ۱۶۰ صفحه.

صارمی، ح. (۱۳۷۷). "اکولوژی و تاکسونومی گونه‌های فوزاریوم."**انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد.** ۱۳۱ صفحه.

عبدمیشانی، س. و شاه‌نجات بوشهری، ع. ۱۳۷۷. "اصلاح نباتات تکمیلی (بیوتکنولوژی گیاهی)." جلد دوم، **انتشارات دانشگاه تهران.** ۳۵۲ صفحه.

نداف خیرآبادی، م. لطفی، م. توحیدفر، م. و نادری، د. ۱۳۸۹. "تراریختی خربزه *Cucumis melo* L. به منظور افزایش مقاومت به بیماری‌های قارچی." پایان نامه کارشناسی ارشد در رشته باغبانی، دانشگاه تهران پردیس ابوریحان.

Andersen, J. R. and Lubberstedt, T. (2003)**.**"Functional markers in plants."**Trends Plant Science.**(8):554–560.

Anonymous. (2006). "Statistics for crop year 2004-2005." Department of statistical information technology, **Ministry of Jahad Aagriculture, Tehran, Iran.**

Banihashemi, Z. (1968a). "The biology and ecology of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in soil and the root zone of host and non-host plants." PhD. Thesis, Michigan State University 114pp.

Banihashemi, Z. (1968b). "The existence of Fusarium wilt of melon in Iran." Proc. First. Nat. **Congress, Plant Medicine.** 47-48.

Banihashemi, Z. (1969)**.** "Cucurbit wilt and root rot diseases in Iran." Proc. 2nd Plant Med. **Congress, Shiraz, Iran.**97-98.

Banihashemi, Z. (1982). "A new physiologic race of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in Irana." **Iranian Journal Plant Pathology.** (18):1-6.

Banihashemi, Z. (1989). "The existence of race 1 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *Melonis* on long melon in Garmsar and its virulence to different cultivars of *Cucumis melo*." Proc. 9th. Plant Protection. **Congress, Mashhad, Iran.** 88(Abst.).

Banihashemi, Z. and Dezeeuw, J. D. (1975). "A new physiological race (Race 4) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis.*"**Iranian Journal of Agricultural.** (3): 41-47.

Blancard, D., Lecoq, H. and Pitrat, M. (1994). "A colour atlas of cucurbit diseasesobservation, identification and control ." **Manson Publishing. London.**

Bora, T., Ozaktan, H., Gore, E. and Aslan, E. (2004). **"**Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* by wettable powder formulations of the two strains of *pseudomonasputida*." **Phytopathology.**(152):471-476.

Burger, Y., Katzir, N., Tzuri, G., Portnoy, V., Saar, U., Shriber, S., Perl-Treves, N. and Cohen, R. (2003). "Variation in the response of melon genotypes to *Fusariumoxysporum* f.sp. *melonis* race 1 determined by inoculation tests and molecular markers." **Plant Pathology.** (52):204–211.

Chen, X., Shang, J., Chen, D., Lei, C., Zou, Y., Zhai, W., Liu, G., Xu, J., Ling, Z., Cao, G., Ma, B., Wang, Y., Zhao, X., Li, S. and Zhu, L. (2006). "A B-lectin receptor kinase gene conferring rice blast resistance." **Plant Journal.** (46):794–804.

Correll, J. C. (1991). "The relationship between formae speciales, races, and vegetative compatibility groups in *Fusariumoxysporum*."**Phytopathology.** (81): 1061-1064.

Daneshvar, M. H. (2000). "Vegetable growing (Principles and Applied)." **Shahid chamran university**. 461 p.

Dong, J. X., Dong, H.T. and Li, D. B. (2001). "Recent advances in plant disease resistance genes." **Acta Phytopathol Sinica.** (31):1–9.

Ficcadenti, N., Setele, S., Annibali, S. and Campanelli, G. (2002). "Resistance to *Fusariumoxysporum* f.sp. *melonis* race 1,2 in muskmelon lines." **Plant Disease. (**86): 897-900.

Ford, R. R. and Taylor, P. W. J. (2003). "Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lensculinaris* ssp. *Culinaris*)."**Theoretical and Applied Genetics.** (107): 910-916.

Garcia-Mas, J., van Leeuwen, H., Monfort, A., de Vicente, M.C., Puigdomènech, P. and Arús, P. (2001). "Cloning and mapping of resistance gene homologues in melon." **Plant Science**. (161): 165–172.

Glowacki, S. Macioszek, V. and Kononowics, A. (2010) "R protein as fundamentals of plant innate immunity."**Molecular Breed.** (16): 1-24.

Gordon, T. R. and Martyn, R. D. (1997)."The evolutionary biology of *Fusariumoxysporum*."**Annual Review Phyopathology.** (35): 111-128.

Hang, Y. D. and Woodams, E. E. (2003). "Control of *Fusarium oxysporum* by baking soda. labensmittle- wiss enschftund." **Technologye.** (36): 803-805.

Herman, R. and Perl-Treves, R. (2007). **"**Characterization and inheritance of a new source of resistance to *Fusariumoxysporum* f.sp. *melonis* race 1,2 in *Cucumismelo*." **Plant Disease.** 91(9):1180-1186.

Ingvardsen, C. R., Schejbel, B. and Lubberstedt, T. (2008). "Functional markers in resistance breeding."**Progress Botany.** (69):62–87.

Jacobson, D. J. and Gordon, T. R. (1990). "Further investigation of vegetative compatibility with in *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*." **Canadian Journal of Botany. (**68): 1245-1248.

Joobeur, T., King, J. J., Nolin, S., J. Thomas, C. E. and Dean, R. A. (2004).
"The Fusarium wilt resistance locus *Fom-2* of melon contains a single resistance gene with complex features." **Plant Journal.** 39(3):283–297.

Kohpayegani, j. A. (2004). "Study of diversity of some Iranian Melons and effects of seed production on genetic ersion." Ph.D. thesis, Tehran University, Iran.
Languasco, L., Giosue, S., Rossi, V. and Gualazzi, M. (2000). "Influence of soil and cultural variables on Fusarium wilt of melon." **EPPO Bulletin.**(30): 185-190.

Lavi, U., Cregan, P., Schaap, T. and Hillel, J. (1994). "Application of DNA markers for identification and breeding of perennial fruit crops."**Plant Breeding.** (12): 195-226.

Leach, JGCT. (1938). "Fusarium wilt of muskmelons in Minnesota". **Minnesota Agriculture Express Station Technology Bull.** 129:32.

Lee, J. M. (1994).**"**Cultivation of grafted vegetables I. Current status, grafting methods, and benefits."**Horticulture Science.** (29): 235-239.

Martyn, R. L. and Amador, J. (1987). "Fusarium wilt (*F.oxysporum* f.sp. *melonis* race 0) of muskmelon in Texas." **Plant Disease.** (70):233-236.

Martin, G.B., Bogdanove, A. J. and Sessa, G. (2003)**.** "Understanding the functions of plant disease resistance proteins." Annu. **Review Plant Biology.** (54): 23–61.

Mas, P., Molot, P. M. and 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.

Meyers, B.C., Dickerman, A.W., Michelmore, R.W., Sivaramakrish-nan, S., Sobral, B.W. and Young, N.D. (1999). "Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily." **Plant Journal.** (20):317-332.

McCreight, J. D., Nerson, H. and Grumet, R. (1993)**.** "*Melon, Cucumismelo* L. In: Genetic Improvement of Vegetabl e Crops, (eds.) G. Kalloo and B.O. Bergh.". **Pregamon Press, Great Britainian.** PP 267-294.

Mliki, A., Staub, J. E., Zhangyong, S. and Ghorbel, A. (2001). "Geneic diversity in melon (*Cucumis melo* L.) :an evaluation of African germplasm Genet." **Resources Crop Evolution.** (48): 587-597.

Nakazumi, H., Yagi, R. and Nakano, M. (2002).**"**Fusarium wilt (RACE 1.2Y)resistant melon rootstock cultivars DoDAI No.1 and DoDAI No.2."**Acta Horticulture (ISHS).** (588):155-160.

Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Cook, R. J. (1981)**.** "Fusarium : Disease, Biology and Taxonomy." **The Pennsylvania State University Press**. Press Park and London.

Nieto, C., Morales, M., Orjeda, G., Clepet, C., Monfort, A., Sturbois, B., Puigdomenech, P., Pitrat, M., Caboche, M., Dogimont, C., Garcia-Mas, J., Aranda, M. A. and Bendahmane, A. (2006). "An *eIF4E* allele confers resistance to an uncapped and nonpolydenylated RNA virus in melon." **Plant Journal. (**48):452–462.

Nisini, P.T., Colla, G., Granati, E., Temperini, O., Crino, P. and Saccardo, F. (2002)**.** "Rootstock resistance to fusarium wilt and effect on fruit yield and quality of two muskmelon cultivars."**Scientia Horticulture.** (93): 281-28.

Oumouloud, A., Arnedo-Andres, M. S., Gonza´lez-Torres, R. and Alvarez, J. M. (2009)."Morphological and molecular char-acterization of melon accessions resistant to Fusarium wilts." **Euphytica.** (169):69–79.

Oumouloud, A., Mokhtari, M., Chikh-Rouhou, H., Arnedo-Andres, M. S., Gonzalez-Torres, R. and Alvarez, J. M. (2011). "Characterization of the Fusarium wilt resistance *Fom-2* gene in melon." **Molecular Breed.**

Perchepied, L., Dogimont, C. and Pitrat, M. (2005). "Strain-specific and recessive QTLs involved in the control of partial to resistance *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* race 1.2 in a recombinant inbred line population of melon." **Theoretical and Applied Genetics.** (111): 65-74.

Poostchi, I. (1972)."Cucurbit and Cucurbit Cultivation". **Franklin Publication.** 330 p. (In Farsi).

Robinson, R. W. and Decker-Walters, D. S. (1999). "Cucurbits." **CBA International.**

Robinson, R. W., Munger, H. M., Whitaker, T. W. and Bohn, G. W. (1976). "Genes of Cucurbitaceae."**Horticulture Science**. (11):554–568.

Rubatzky, V. E. and Yamaguchi, M. (1997). "World vegetable: principles, productionm and nutritive values." 2nd ed. Chapman & Hall , **New York, USA.**

Rudich, J. (1985). "*Cucumismelo*. In: CRC Handbook of Flowering Vol.II, A.H. Halevy (ed.). **Florida, USA.**

Risser, G. and Mas, P. (1965). "Putting obviousness of several races of *Fusariumoxysporum* f.sp. *melonis*." **Annual Amelior Plant.** (15):405-408.

Risser, G. and Rode, J. C. (1973). "Breeding for resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* In: Risser G (ed) Eucarpia: La selection du melon." INRA, Montfavet-Avignon, **France**, pp 37–39.

Risser, G., Banihashemi, Z. and Davis, D. W. (1976). "Proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* races and resistance genes in *Cucumismelo*." **Phytopatology.** (66):1105-1106.

Risser, G. (1987). "Controversy on resistance to Fusarium wilt in Perlita (*Cucumismelo* L.)." **Cucurbit Genetic Croop Representative.** (10):60-63.

Riveros, F. B., Munoz, G., Gonzalez, L., Rojas, P. L., Alvarez, A. M. and Hinrichsen, R. P. (2001). "Comparision between DNA and morphological analysis for identification of fusarium species isolated from muskmelon (*Cucumismelo* L.)." **Agriculture**. **Tecnica.** (61):281-293.

Sarami, H. (1998). "Ecology and taxonomy of Fusarium species." **Jihad-e-Daneshgahi of Mashhad University, Mashhad, Iran.** 132 pp. (in Farsi).

Sinqh, N. P., Bhardwaj, A. K. and Kumar, Aandsingh, K. M. (2004). "Modern technology on vegetable production." **International Book Distribating CO.INDIA.**

Song, J., Bradeen, J. M., Naess, S. K., Raasch, J. A., Wielgus, S. M., Haberlach, G. T., Liu, J., Kuang, H., Austin-Phillips, S., Buell, C. R., Helgeson, J. P. and Jiang, J. (2003)."GeneRBcloned from *Solanumbulbocastanum* confers broad spectrum resis-tance to potato late blight." **Proceedings National Academic Science USA.** (100):9128-9133.

Staub, J. E., Danin-Poleg, Y., Fazio, G., Horejsi, T., Reis, N., Katzir, N. (2000)."Comparative analysis of cultivated melon groups (*Cucumismelo* L.) using random amplified polymorphic DNA and simple sequence repeat markers." **Euphytica.** (115): 225-241.

Suarez-Estrella, F., Vargas-Garcia, M. C., Loprez, M. J. and Moreno, J. (2004). "Survival of *Fusariumoxysporum* f.sp. *melonis* on plant waste." **Crop protection.** (23): 127-133.

Thompson, C. and Homer. (1957**).** "Vegeteble crops. McGraw. " **Hill Book Company New York. Toronto. London.**

Trionfetti Nisini, P., Colla, G., Granati, E., Temperini, D., Crino P. and Saocardo F. (2002). "Rootstock resistance to Fusarium wilt and effect on fruit yield and quality two muskmelon cultivars."**Scientia Horticulturae.** (93):281-288.

Wang, Y. H., Thomas, C. E. and Ralph, A. D. (2000). "Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene (*Fom-2*) in melon (*Cucumis melo* L.)". **Molecular Breed.**(6): 379–389.

Wang, S., Yang, J. and Zhang, M. (2011). "Developments of functional markers for *Fom-2*-mediated fusarium wilt resistance based on single nucleotide polymorphism in melon. (*Cucumismelo* L.)."**Molecular Breed.** 27(3):385–393.

Xing, Y., Andreasen, B. S., Frei, U. and Lubberstedt, T. (2007). "Development of ryegrass allele-specific markers (GRASP) for rust resistance in *Loliumperenne*. In: Perugia, D. Rosselini D. (eds) Proceedings of the 26th EUCARPIA fodder crops and amenity grasses section and 16th*Medicago* spp group joint meeting." Universita degliStudi di Perugia/Facolta diAgraria, Perugia, PP 373–377.

Zakeri, A. and Banihashemi, Z. (1996). "The role of weeds in cultivated and virgin on activity and perpetuation of *Fusariumoxysporum* f.sp.*melonis* in Fars province." **Iran Journal Plant Pathology.** (32): 28-24. (In Farsi With English Summary).

Zink, F. W. (1983). "Reaction of muskmelon germ plarm to inoculation with *Fusarium oxysporum* B.Y. Mar race 2". **Plant Disease.** (67): 1251-1255.

Zink, F. W. and Gubler, W. D. (1985). "Inheritance of resistance in muskmelon to fusarium-wilt."**Journal American Society Horticulture Science.**(110):600-604.

Zink, F.W. and Thomas, C.E. (1988). "Resistance to fusarium wilt in muskmelon breeding line MR-1". (Abstr.) **Phytopatology.** 78:630.

Zink, F.W. and Thomas, C.E. (1990). "Genetics of resistance in muskmelon to *Fusariumoxysporum* f.sp.*melonis* race 0, 1, and 2 in muskmelon line MR-I." **Phytopathology.** (80): 1230–1232.

Zitter, T. A. (1999). "Fusarium wilt of melon a worldwide problem in temprate and tropical regions". **Acta Horticulture.** (492): 157-162.

Zoniga, T. L., Zitter, T. A., Gardon, T. R., Shroeder, D. T. and Okamoto, D. (1977). "Characterization of pathogenic race of *Fusarium oxysporum* f.sp.*melonis* causing Fusarium wilt of melon in New York." **Plant Disease.** (81): 592-5.

Abstract

Yellowing disease and vascular wilt are one of the most important disease of melon that *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* fungu is the cause of the disease and in term of pathogenesis is classified in four strainzer 0,1, 2 and 1.2. Gene *Fom2* as a resistance agent is known against zero and 1 strain of *Fom* fungus. In this study, due to the sensitivity of iranian melon cultivars against 1 strain, the presence of *Fom2* gene as a resistance agent in genomic level were studied in cultivars such as Shiraz Shahd cantaloupe, Mashhadi melon, Khatun melon, Khaghani melon, Charentais Fom1 and Charentais Fom2. *Fom2* gene sequence was retrieved from Gene Bank. And by doing bioinformatics analyzes determined the protected areas and were used for design of general primer (PSh20-F/R). The results of PCR with using primers (PSh20-F/R) confirmed the presence of *Fom2* gene in studied cultivars and caused single band proliferation in expected size. Internal fragment of *Fom2* gene was cloned for sequencing in pTG19 vector and by PCR colony technique with using internal primers of *Fom2* gene and universal primers of PSh10.2-F/R was confirmed. Sequencing analysis revealed that susceptible varieties such as Mashhadi melon, Khaghani melon, Charentais Fom1 showed different nucleotide and protein diversity compared to resistant varieties that this diversity changed the protein structure of susceptible varieties and make them sensitive against zero and 1 strain. Identify different levels of resistance in cultivars is due to variation in gene sequence and protein expression levels of *Fom2* gene.Then for complete sequence analysis of the gene *Fom2* and the cloning specific primer pair (PSh20.2-F / R) was designed based on the beginning and end of the gene. According to the resistance reported of Shiraz Shahd cantaloupe (M6), genome of this cultivar after DNA extraction was used as template. In electrophoretic pattern of the PCR product observed a single bandin size 3.3kb. After the fragment was cloned into the vector pTG19 and sequencing analysis the results showed the mutation in Shiraz Shahd cantaloupe cultivarhas no effect on function of *Fom2* gene. In general the aim of cloned the fully complete fragmentin this study was *Fom2* gene transfer into expression vector and after that transfer gene in to plant which in complementary studies will bestudied.

key words: Melon, *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*, Gene *Fom2*, Fusarium wilt

Shahrood University of Technology

Agriculture Faculty

Detection, amplification and cloning of *FOM2* and it's diversity in Iranian accessions of melon (*Cucumis melo* L.)

Mohadeseh Moghimi Khirabad

Supervisors:

Dr. Sh. Gharanjik

Dr. F. Shokouhifar

Advisor:

Dr. M. Mamarabadi

February 2013