

آنالیز کارکرد ژن *Fol-SIX1* در ارقام مقاوم و حساس *Cucumis melo*صهبا طوسی^۱، فرهاد شکوهی فر^{۲*}، سعید ملک‌زاده شفارودی^۳ و عبدالرضا باقری^۴

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی کشاورزی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲. استادیار پژوهشکده علوم گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳. استادیار گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهان زراعی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۴. استاد گروه بیوتکنولوژی و به‌نژادی گیاهان زراعی دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۶/۱۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۲)

Functional Analysis of *Fol-SIX1* in Resistant and Susceptible *Cucumis melo*S. TOOSI¹, F. SHOKOUHIFAR^{2*}, S. MALEKZADEH SHAFARUDI³ AND A. BAGHERI⁴

1. M.Sc. student, Department of Biotechnology and Plant Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2. Assistant Professor, Research Center for Plant Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3. Assistant Professor, Department of Plant Biotechnology and Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, 4. Professor, Department of Plant Biotechnology and Breeding, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

(Received: Dec. 5, 2014 - Accepted: Nov. 23, 2014)

Abstract

Melon Vascular wilt caused by a soil-borne pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (*Fom*) is a distractive disease. The use of resistant cultivars is an effective way for controlling this fungus. Clear view about the interaction between virulence and resistant genes could provide applicable knowledge to design breeding programs. Fungus effector genes play a critical role during the plant-pathogen interactions. Exploring for the homologous of effector genes in different formae speciales started since some effector genes have been reported from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*). Recently, using bioinformatics assisted approach a homologous *Fol-SIX1* effector gene has been reported from *Fom*. Here we performed a functional analysis study to reveal interactions between *Fol-SIX1* and the melon differential varieties harboring defined R genes. Coding sequence of *Fol-SIX1* from the pT51 construct was subcloned in the pCambia3301 binary vector in three steps and confirmed by colony PCR and digestion analysis. The accuracy of the expression construct, pCaS1 was evaluated by bidirectional sequencing using the PSh4-F2 and PSh51-R primers. Agroinjection-mediated transient expression approach was used to express *Fol-SIX1* in leaves of the melon varieties. Functional analysis of *Fol-SIX1* was performed by agroinjection of LBA4404 carrying pCaS1 into the leaves of melon lines. the leaves of Ch-T and Ch-Fom2 varieties developed a green dried symptom in response to transiently expressed *Fol-SIX1* at 24 hours post injection (hpi), while Ch-Fom1 and BG lines did not responsive to the infection until 48 hpi.

Keywords: Agroinjection, Effector gene, *Fol-SIX1*, Transient expression.

چکیده

ژن‌های اثرگذار (effector genes) نقش کلیدی را در برهم‌کنش میان بیمارگر و گیاه ایفا می‌کنند. جستجوی همولوگ ژن‌های اثرگذار از زمان گزارش تعدادی از این ژن‌های در فرم اختصاصی *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*) آغاز شده است. اخیراً، با بهره‌گیری از روش‌های مبتنی بر بیوانفورماتیک همولوگ ژن اثرگذار *Fol-SIX1* از فرم اختصاصی *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* (*Fom*) گزارش شده است. در این مطالعه آنالیز عملکرد ژن *Fol-SIX1* با هدف بررسی برهم‌کنش این ژن با ارقام افتراقی ملون حامل ژن‌های مقاومت، انجام شد. توالی کدکننده ژن *Fol-SIX1* از سازه pT51 طی سه مرحله در وکتور جفتی pCambia3301 همسانه‌سازی شد و با استفاده از روش‌های کلنی PCR و هضم آنزیمی تایید گردید. صحت توالی سازه بیانی pCaS1 با توالی‌یابی دوجته بوسیله آغازگرهای PSh4-F2 و PSh51-R مورد بررسی قرار گرفت. روش بیان موقت مبتنی بر تزریق آگروباکتریوم برای بیان ژن *Fol-SIX1* در برگ ارقام ملون استفاده شد. آنالیز کارکرد ژن *Fol-SIX1* با تزریق سویه LBA4404 حامل سازه بیانی pCaS1 در برگ ارقام ملون انجام شد. برگ ارقام Ch-T (Ch-T) و Ch-Fom2 (Ch-Fom2) پس گذشت ۲۴ ساعت در ناحیه تزریق علائم سبزخشکی ناشی از مرگ سلولی در پاسخ به بیان موقت ژن *Fol-SIX1* بروز یافت در حالیکه در ارقام Ch-Fom1 (Ch-Fom1) و BG5384 (BG) و Fom1 تا ۴۸ ساعت پس از تزریق نیز پاسخی بروز نیافت.

واژه‌های کلیدی: تزریق آگروباکتریوم، ژن‌های اثرگذار، ژن *Fol-SIX1* بیان موقت.

مقدمه

گیاه خربزه (*Cucumis melo*) متعلق به خانواده کدویان (*Cucurbitaceae*) یکی از گیاهان جالیزی مهم و اقتصادی بشمار می‌رود که در اکثر نقاط دنیا مورد توجه است. بیماری زردی و پژمردگی آوندی که توسط قارچ خاکزی *Fusarium oxysporum* f. *sp. melonis* (Fom) یکی از بیمارگرهای مهم خربزه و طالبی است (Banihashemi, 2010). تولید ارقام مقاوم خربزه بعنوان یک راه کار اقتصادی برای مقابله با این بیمارگر توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلفی در دنیا مورد توجه بوده است (Oumouloud et al., 2013) و چندین نمونه مقاوم در میان توده‌های بومی گزارش شده است (Zink and Gubler, 1985; Zink and Thomas, 1990; Wang et al., 2000; Joobeur et al., 2004; Kang et al., 2010; Oumouloud et al., 2010a; Liu et al., 2011). برای تولید ارقام مقاوم در اختیار بودن اطلاعات کامل از مکانیسم بیماری‌زایی و نحوه برهم‌کنش پاتوژن با گیاه امری ضروری است (Oumouloud et al., 2013).

بر اساس مطالعه برهم‌کنش بیمارگرها و گیاهان، مدل‌های مختلفی برای تفسیر روند تکاملی برهم‌کنش گیاه و عوامل بیماری‌زا ارائه شده است که کامل‌ترین آن مدل زیگزاگ (Jones and Dangl, 2006) است. در این مدل ژن‌های اثرگذار (Janeway and Medzhitov, 2002) نقش مهمی در القاء مقاومت و یا مهار آن در گیاه به عهده دارند. گیاهان می‌توانند با شناسایی این ژن‌ها سیستم دفاعی خود را فعال نمایند که در این حالت پروتئین اثرگذار به‌عنوان یک عامل غیر بیماری‌زا^۱ (Avr) عمل می‌نماید. بیمارگر می‌تواند در طی روند تکامل در این پروتئین اثرگذار تغییر ایجاد نماید و مجدد سیستم

دفاعی گیاه را مهار نماید و سبب بروز یک نژاد جدید در جمعیت بیمارگر شود (Jones and Dangl, 2006). بر اساس این مدل شناسایی ژن‌های اثرگذار و تعیین کارکرد آنها می‌تواند در طراحی برنامه‌های اصلاحی جهت تولید ارقام مقاوم مورد استفاده قرار گیرد (Vleeshouwers and Oliver, 2014).

مطالعات انجام شده در خصوص فرم اختصاصی *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) سبب شده است تا بر اساس الگوی برهم‌کنش جدایه‌های قارچ با ارقام مقاوم ملون چهار نژاد فیزیولوژیک از قارچ به نام‌های نژادهای صفر، یک، ۲ و ۱،۲ شناسایی شود (Risser et al., 1976). هم‌چنین ژن‌های مقاومتی در برابر این نژادها شناسایی شده است. ژن *Fom1* در برابر نژادهای صفر و ۲ و ژن *Fom2* در برابر نژادهای صفر و یک قارچ موجب مقاومت می‌شود. با این حال اطلاعات کاملی در خصوص برهم‌کنش مولکولی قارچ *Fom* و گیاه خربزه و نحوه برهم‌کنش ژن‌های اثرگذار تا کنون گزارش نشده است لذا استفاده از اطلاعات موجود در الگوهای برهم‌کنشی مشابه می‌تواند به عنوان الگو مورد استفاده قرار گیرد.

برهم‌کنش میان قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Fol) و گیاه گوجه فرنگی بعنوان یک مدل برای بیمارگرهای خاکزی بخوبی مورد مطالعه قرار گرفته است (Rep et al., 2004; Van Der Does et al., 2008; Houterman et al., 2009). تا کنون ژن‌های غیربیماری‌زا *Avr1*، *Avr2* و *Avr3* در نژادهای قارچ *Fol* شناسایی شده است که به ترتیب همان ژن‌های اثرگذار *SIX3*، *SIX4* و *SIX1* می‌باشند (Rep et al., 2004). مطالعات با استفاده از روش بیان موقت مبتنی بر تزریق اگروباکتریوم نشان داده است، ژن اثرگذار *SIX4* توسط ژن مقاومت *I* و *I1* (Houterman et al., 2008)، *SIX3* توسط ژن مقاومتی *I-2* (Houterman et al., 2009) و *SIX1* توسط ژن

1. Effector genes
2. Avirulence factor

شده از آزمایشگاه بیوتکنولوژی پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد جهت مراحل کلونینگ استفاده شد. جدایه FB27 مربوط به قارچ *F. Oxysporum* f. sp. *lycopersici* (اهدایی دکتر ضیاءالدین بنی هاشمی از دانشگاه شیراز) است.

ساخت سازه بیانی

بمنظور ساخت سازه بیان کننده ژن *Fol-SIX1* از سازه pTS1 (Toosi et al., 2014a) حامل ژن استفاده شد. شبیه‌سازی مراحل ساخت سازه بیانی با استفاده از نرم افزار Vector NTi, V11 انجام شد. در مرحله اول کل سازه pTS1 بعنوان سازه دهنده و وکتور pCAMBIA3301 به عنوان گیرنده با استفاده از روش همسانه‌سازی ترکیبی به شرح ذیل به یکدیگر الحاق شدند. در این روش هر دو وکتور با استفاده از یک واکنش هضم آنزیمی ترکیبی بوسیله آنزیم *NcoI* به مدت نیم ساعت برش داده شدند تا با هضم ناقص وکتور ها، امکان وجود قطعات هضم شده متنوع فراهم گردد. با اعمال تیمار حرارتی در ۶۰ درجه سانتی‌گراد آنزیم برشی غیر فعال شد و ۱۰ میکرولیتر از مخلوط حاصل جهت تهیه واکنش اتصال و انتقال به سلول های مستعد *Dh5α*، مطابق با دستورالعمل‌های معمول (Sambrook and Russell, 2001) مورد استفاده قرار گرفت.

کلنی‌های نو ترکیب دریافت کننده سازه حامل قطعات صحیح در مرحله اول با محیط LB (۱۰ گرم بر لیتر Bacto-tryptone، ۵ گرم بر لیتر Bacto-yeast extract، ۱۰ گرم بر لیتر NaCl و ۱۵ گرم بر لیتر آگار) حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمپی‌سیلین و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین غربال‌گری شدند. در مرحله دوم کلنی‌های حامل جهت صحیح ژن *SIX1* با روش کلنی PCR تایید شدند. مخلوط واکنش کلنی PCR در حجم ۱۰ میکرولیتری حاوی ۲ میلی مولار $MgCl_2$ ، ۴۰۰ میکرومولار dNTPs (GeNetBio, korea) و یک میکرولیتر بافر 10X PCR، پنج پیکومول از آغازگرهای PSh51-R2 با

مقاومتی *I-3* (Rep et al., 2004) شناسائی می‌شود. در این میان ژن اثرگذار *SIX1* جهت بروز بیماری ضروری است (Rep, 2005). لذا شناسائی کارکرد این ژن در برهم‌کنش در دیگر فرم‌های اختصاصی می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد.

هرچند در گزارش‌های اولیه عقیده بر این بود که ژن *SIX1* تنها در جدایه‌های فرم اختصاصی *Fol* حضور دارد (Van Der Does et al., 2008)، اما در سال ۲۰۱۲ این ژن از جدایه Fo5176، آلوده کننده گیاه آرابیدوسیس نیز گزارش شد (Thatcher et al., 2012). همچنین در آنالیز داده‌های ژنومی مربوط به فرم اختصاصی *Fom* حضور همولوگ ژن *SIX1* مورد تایید قرار گرفته است (Shokouhifar and Rabiei-Motlagh, 2014). بر این اساس انتظار می‌رود این ژن در برهم‌کنش قارچ *Fol* و ملون نقش داشته باشد. در مطالعه حاضر ژن *Fol-SIX1* با هدف پیش‌بینی کارکرد ژن *Fom-SIX1* در برهم‌کنش فرم اختصاصی *Fom* با استفاده از روش بیان موقت مبتنی بر تزریق آگروباکتریوم در برگ ارقام مقاوم و حساس ملون مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این مطالعه طی سال‌های ۱۳۹۱ و ۱۳۹۲ در آزمایشگاه بیوتکنولوژی و مهندسی ژنتیک پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد انجام شد. بذور گیاه توتون رقم *Nicotiana benthamiana* از بانک بذور پژوهشکده علوم گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد و ارقام ملون (Ch-T) Charentais T، (Ch-Fom1) Charentais Fom1، (Ch-Fom2) Fom2 و (BG) BG5384 (اهدائی دکتر J.M. Alvarez از مرکز CITA در اسپانیا) تهیه شد. بیان موقت مبتنی بر تزریق آگروباکتریوم با استفاده از سویه LBA4404 انجام شد. سویه *DH5α* از باکتری *E. coli* و ناقل pCAMBIA3301 (CAMBIA، استرالیا) تهیه

مقاومتی جهت تایید با روش کلنی PCR مطابق با روش ذکر شده در بالا مورد بررسی قرار گرفتند. الگوی هضمی کلنی‌های تایید شده با آنزیم NcoI مورد بررسی قرار گرفت. همچنین تایید نهایی سازه پلاسمید کلنی‌های انتخاب شده با استفاده از آغازگرهای PSh51-R2 و PSh4F.2 بصورت دو جهته توالی‌یابی شدند. نتایج توالی‌یابی با استفاده از برنامه chromas مورد بررسی قرار گرفت. همچنین صحت توالی کلون‌شده با هم‌ردیفی آن با توالی شبیه‌سازی شده با استفاده از برنامه Vector NTi V11 مورد بررسی قرار گرفت. سازه ساخته شده به نام pCaS1 نام‌گذاری شد.

آنالیز بیان موقت مبتنی بر تزریق آگروباکتریوم
ضد عفونی بذور بر اساس روش Chenarani *et al.* (۲۰۱۲) انجام شد. بر این اساس ابتدا پوست بذور حذف شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم یک درصد ضد عفونی شدند. آبکشی بذرها سه بار جمعاً به مدت ۱۵ دقیقه با آب مقطر استریل و تحت شرایط استریل در زیر هود لامینار فلو انجام شد. سپس بذور استریل در زیر هود داخل پتری‌دیش دارای کاغذ صافی مرطوب استریل قرار داده شد و به مدت سه روز در دمای اتاق نگهداری شدند. بذور جوانه‌دار شده به درون گلدان حاوی کود ورمی‌کمپوست و مخلوط ورمی‌کولیت، پیت‌ماس و کوکوپیت انتقال یافت. گلدان‌ها در شرایط دمایی 22 ± 2 درجه و فتوپریود ۱۶ ساعت روشنایی و رطوبت حدود ۶۰ درصد در اتاقک رشد نگهداری شدند.

تهیه سلول‌های مستعد و تراریختی سویه LBA4404 با روش انجماد آبی انجام شد (Hofgen and Willmitzer, 1988). کلنی‌های انتخاب شده با استفاده از تکنیک کلنی PCR (Sambrook and Russell, 2001) و با استفاده از آغازگرهای PSh51-R2 و PSh4F.2 تایید شدند. آماده‌سازی سلول‌های آگروباکتریوم جهت تزریق با

توالی 5'-GCT CAC GCT TTC TAA GGT TGA CA-3' و PSh4F.2 با توالی 5'-CAC CAT GTT GGC AAG CTG CTC TA-3' (Shokouhifar *et al.*, 2013)، یک واحد آنزیم تک پلیمرز (GeNetBio, korea) تهیه شد و برنامه حرارتی پس از بهینه‌کردن به صورت ۵ دقیقه در ۹۳ درجه و ۳۵ چرخه با (۴۵ ثانیه در ۹۲ درجه، ۴۰ ثانیه در ۵۸ درجه و یک دقیقه در ۷۲ درجه) و مرحله تکثیر نهایی با ۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دستگاه ترموسایکلر گرادینت (Eppendorf, Co. Germany) انجام گردید. محصول واکنش در ژل آگارز یک درصد حاوی ۱۰٪ رنگ Green viewer (GeNetBio, korea) الکتروفورز گردید و از الگوی باندهای حاصل با استفاده از دستگاه ژل‌داک تصویربرداری شد. سازه ساخته شده به نام pCaTS1 نام‌گذاری شد و استخراج پلاسمید از کشت شبانه کلنی‌های صحیح در محیط LB مایع حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر آمپی‌سیلین و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین، با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (GeNetBio, korea) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

حذف قطعه مربوط به توالی پایه وکتور pTS1 که حامل ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است با انجام هضم آنزیمی جزئی سازه pCaTS1 با استفاده از NcoI به مدت نیم‌ساعت مطابق با دستورالعمل معمول (Sambrook and Russell, 2001) انجام شد. محصول واکنش پس از غیرفعال‌سازی آنزیم جهت واکنش خوداتصال مورد استفاده قرار گرفت. جهت انتخاب کلنی‌های نوترکیب، سلول‌های ترانسفورم‌شده روی محیط LB حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین پخش شدند. جهت اطمینان از حذف قطعه پایه مربوط به وکتور pTS1 کلنی‌های غربال شده به ترتیب روی نقاط متناظر از محیط‌های مجزا حاوی آمپی‌سیلین و کانامایسین کشت شدند. کلنی‌های به ترتیب دارای الگوی حساس و مقاوم

نتایج

ساخت و تایید سازه pCaS1

شبیه‌سازی مراحل همسانه‌سازی سازه pCaS1 با استفاده از نرم افزار Vector NTi نشان داد. اندازه این سازه حدود ۱۲ کیلو باز خواهد بود. از طریق موقعیت‌یابی محل اتصال آغازگرهای PSh4F2/51-R2 روی سازه، اندازه باند قابل تکثیر حدود ۱۳۵۰ جفت باز محاسبه شد (شکل ۱-الف). در ساختار T-DNA محل همسانه‌سازی ژن *SIX1* در پائین دست پروموتور CaMV35 و در بالادست ژن گزارشگر GUS اینترون‌دار نشان داده شده است (شکل ۱-ب). با قرار گرفتن هر دو ژن در یک مجموعه بیانی امکان تایید بیان ژن *SIX1* با سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز مهیا شد (شکل ۱-ب). همچنین با استفاده از ژن گزارشگر GUS واجد اینترون انتظار می‌رود، تنها در صورت انتقال T-DNA به درون سلول‌های گیاهی و بیان یوکاریوتی ژن GUS، فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز قابل سنجش باشد.

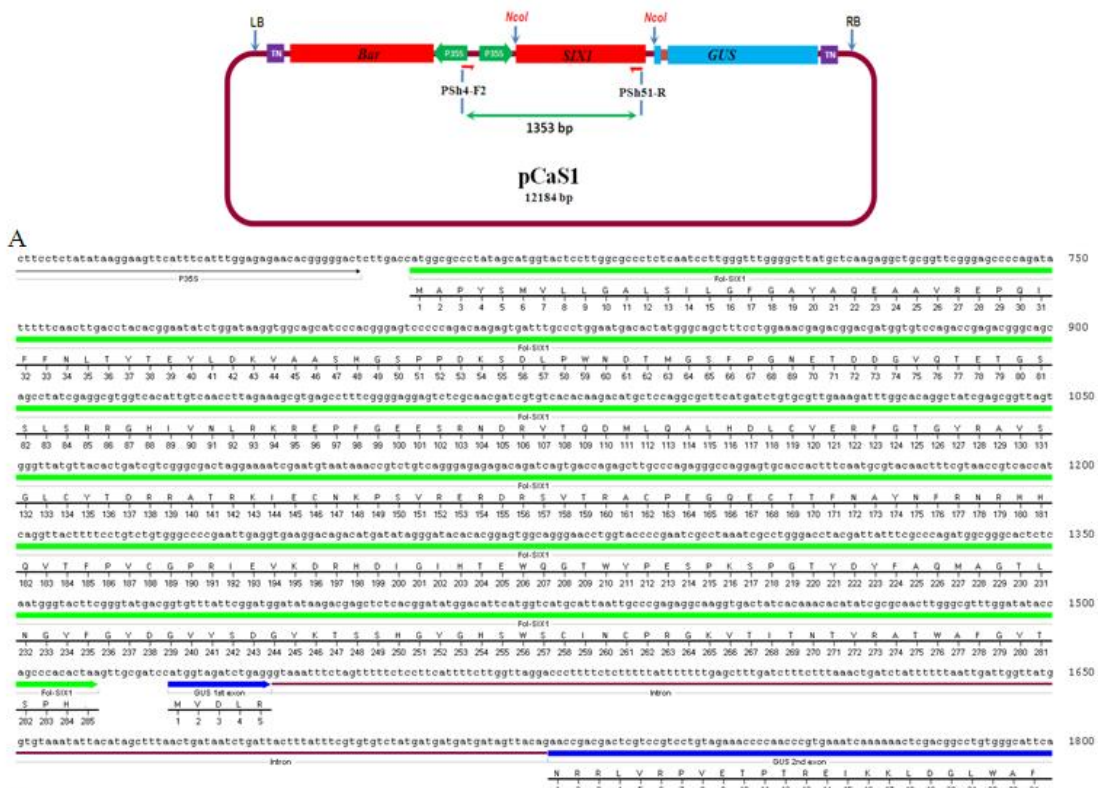
براساس پیش‌بینی قطعات مورد انتظار در طرح شبیه‌سازی شده pCaS1 صحت سازه با استفاده از تکنیک کلنی PCR و هضم آنزیمی تایید شد. الگوی الکتروفورزی نتایج کلنی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی در کلنی‌های ۵، ۶ و ۱۰ به تکثیر باندی در محدوده پائین‌تر از باند ۱/۵ جفت باز مربوط به نشانگر وزنی منتج شد (شکل ۲-الف). قطعه تکثیر شده با اندازه پیش‌بینی شده (۱۳۵۳ جفت باز) انطباق داشت (شکل ۱-الف).

صحت کلنی‌های انتخاب شده با استفاده از الگوی هضم آنزیمی پلاسمید آنها بوسیله آنزیم برشی *NcoI* مورد بررسی قرار گرفت. براساس طرح شماتیک (شکل ۱-الف) دو جایگاه آنزیم *NcoI* در وکتور pCaS1 وجود دارد که در نتیجه برش دو قطعه به اندازه‌های ۹۰۰ و ۱۱۲۸۴ جفت باز مورد انتظار است. در نتایج هضم آنزیمی دو قطعه در محدوده بالاتر از ۱ و ۱۱ کیلو باز مشاهده شد که با الگوی مورد انتظار انطباق داشت.

روش Yang و همکاران (۲۰۰۰) با تغییراتی انجام شد. در این روش کلنی‌های تایید شده در محیط LB مایع حاوی ۳۰ میلی‌گرم در لیتر ریفامپسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر کانامایسین کشت داده شد و در انکوباتور شیکردار با شرایط ۱۵۰ دور و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت نگهداری شدند. سلول‌های باکتری با سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند و پس از حذف محیط کشت، در محیط لقا (شامل بافر فسفات ۲ میلی‌مولار و MES ۲۰ میلی‌مولار به همراه یک گرم بر لیتر NH_4Cl ، ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۱۵ میلی‌گرم بر لیتر KCl ، ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر CaCl_2 ، ۲٫۵ میلی‌گرم بر لیتر $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، یک درصد گلوکز و ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر کانامایسین با اسیدیته ۵٫۵) به مدت یک شب و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تیمار شدند. سلول‌ها با ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در ۲۵۰۰ دور در دقیقه رسوب داده شدند و سپس در محلول تزریق شامل ۱۰ میلی‌مولار MgSO_4 و ۱۰ میلی‌مولار MES با اسیدیته ۵٫۵ تا حصول $\text{OD}_{600} = 0.6$ رقیق شدند. حدود ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری درون فضای میان سلولی برگ‌های سالم و متصل به گیاه با استفاده از سرنگ پلاستیکی یک میلی‌لیتری تزریق شد. گیاهچه‌ها بعد از تزریق با پوشش پلاستیکی پوشانده شدند و در دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در هر رقم سویه حامل سازه pCaS1 به همراه سویه فاقد این سازه به عنوان کنترل در سه تکرار گیاه و سه تکرار برگ تزریق شدند و واکنش گیاه در فواصل زمانی صفر تا ۷۲ ساعت پس از تزریق تصویربرداری شد.

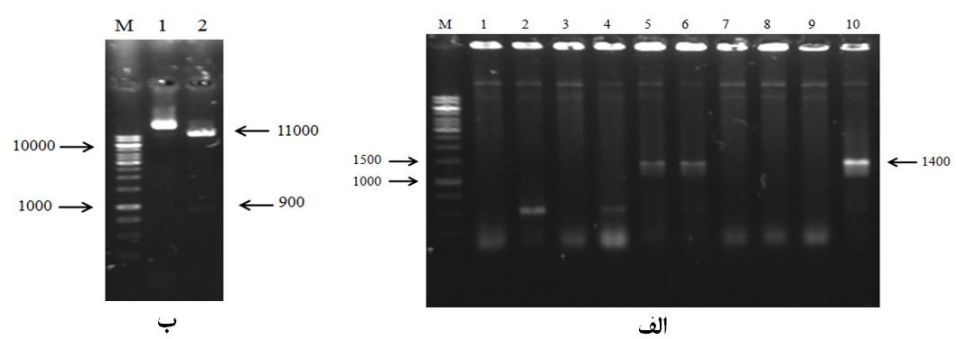
سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکرونیداز

ارزیابی بیان ژن GUS قرار گرفته در پائین دست ژن *SIX1* با هدف اطمینان از انجام بیان موقت در بافت برگ نمونه‌های ۲۴ ساعت پس از تزریق با روش Bahrabadi و همکاران (۲۰۱۴) انجام شد.



B

شکل ۱- نمای شماتیک سازه pCaS1 (A) و توالی منطقه در برگیرنده توالی ژن *SIX1* در اتصال با ژن گزارشگر (B) (الف) موقعیت پرایمرها و آنزیم برشی *NcoI* مورد استفاده در کلنی PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی (ب) توالی ژن *SIX1* در پائین دست پروموتور CaMV35S و در بالادست توالی ژن *GUS* اینتروندار
 LB: left border, TN: CaMV 35S poly A, *Bar*: the herbicide-resistance gene as plant selection gene, P35S: CaMV 35S promoter, *SIX1*: *Fol-SIX1* coding sequence, *GUS*: β-glucuronidase gene containing an intron as reporter gene, Int: intron, RB: right border, PSh4-F2 and PSh51-R forward and reverse primers.



شکل ۲- تایید سازه pCaS1 با روش های کلنی PCR و هضم آنزیمی
 (الف) نتایج کلنی PCR با استفاده از آغازگرهای PSh4F.2/51-R2 (۱: کنترل منفی؛ ۲، ۳، ۴، ۷، ۸ و ۹ کلنی های نوترکیب فاقد باند منطبق با جهت سنس؛ ۵، ۶ و ۱۰ کلنی نوترکیب نشان‌دهنده باند مورد انتظار، M: نشانگر وزن مولکولی 1Kb)
 (ب) تایید سازه pCaS1 با روش هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم *NcoI* (۱: پلاسمید استخراج شده از کلنی نوترکیب و ۲ نتیجه هضم آنزیمی کلنی شماره ۱۰، M: نشانگر وزن مولکولی 1Kb)

داشت. برهمکنش ژن *Fol-SIX1* با یک رقم حساس Ch-T (Ch-T) و سه رقم مقاوم شامل Charentais Fom1 (Ch-Fom1)، Charentais Fom2 (Ch-Fom2) و BG5384 (BG) مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به حضور ژن‌های مقاومتی مختلف در این ارقام مقاوم، دفاعی گیاه پاسخ‌های دفاعی متفاوتی در واکنش به بیان این ژن مورد انتظار است.

آنالیز عملکرد ژن *SIX1* روی رقم حساس Charentais T (Ch-T)

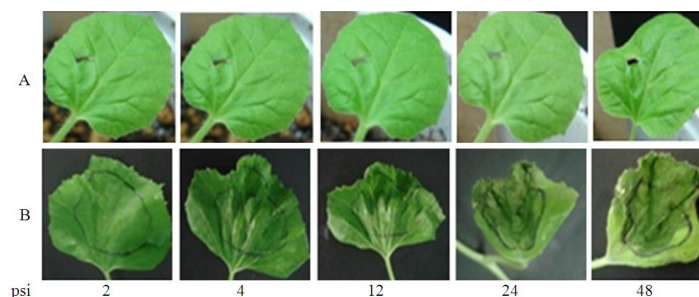
نتایج تزریق سوسپانسیون سویه LBA4404 فاقد سازه pCaS1 نشان داد برگ رقم Ch-T تا ۴۸ ساعت پس از تزریق سویه LBA4404 هیچ‌گونه علامتی بروز نمی‌دهد (شکل ۳-الف). عدم حساسیت رقم Ch-T به تزریق سویه LBA4404 نشان می‌دهد برهم‌کنش میان رقم و سویه سازگار است. این سازگاری در مطالعات گذشته نیز مشاهده شده بود (Toosi *et al.*, 2014b).

برگ‌های رقم Ch-T تزریق شده با سویه LBA4404 اگروباکتریوم حامل سازه pCaS1 علائمی به‌صورت سبز خشک بروز دادند (شکل ۳). علائم چروکیدگی از زمان ۲ ساعت پس از تزریق نمایان شد. روند بروز پاسخ از ۲۴ ساعت به‌صورت خشکیدگی در محل تزریق شدت یافت (شکل ۳).

صحت سازه pCaS1 با انجام توالی‌یابی به‌وسیله آغازگر PSh51-R2 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد منطقه در برگیرنده جایگاه‌های همسانه‌سازی با کیفیت مناسبی توالی‌یابی شده است. منطقه توالی‌یابی شده در حدود ۹۵۰ جفت دارای کیفیت توالی مناسبی بود. نتیجه هم‌ردیفی توالی با توالی شبیه‌سازی شده مربوط به سازه pCaS1 نشان داد منطقه کدکننده توالی (کدون آغاز) کاملاً با توالی رفرنس انطباق دارد. همچنین بررسی چهارچوب خواندنی توالی کدکننده ژن *SIX1* با استفاده از نرم‌افزار Vector NTi صحت مرحله کلونینگ را تایید نمود (شکل ۱-ب). توالی کامل سازه pCaS1 در پایگاه بانک ژن با شماره رس شمار KP836314 ثبت شد.

تراریختی سلول‌های اگروباکتریوم و آزمون بیان موقت

نتایج آزمون کلنی PCR انتقال سازه pCaS1 را به سویه LBA4404 اگروباکتریوم جهت استفاده در روش بیان موقت مبتنی بر تزریق تایید نمود. در کلنی‌های صحیح با توجه به جایگاه اتصال آغازگرهای PSh4F2/51-R2 روی سازه pCaS1 (شکل ۱-الف)، تکثیر قطعه‌ای به اندازه ۱۳۵۳ جفت باز مورد انتظار بود. نتایج کلنی PCR نشان داد در کلنی‌های صحیح بانندی در اندازه حدود ۱۴۰۰ جفت باز تکثیر شده است که با اندازه مورد انتظار انطباق



شکل ۳- نتیجه برهمکنش *Fol-SIX1* با رقم Ch-T ملون

A: برگ تلقیح شده با سویه LBA4404 فاقد سازه pCaS1. B: برگ رقم Ch-T ملون تلقیح شده با سویه LBA4404 حامل سازه pCaS1. psi: ساعت پس از تزریق

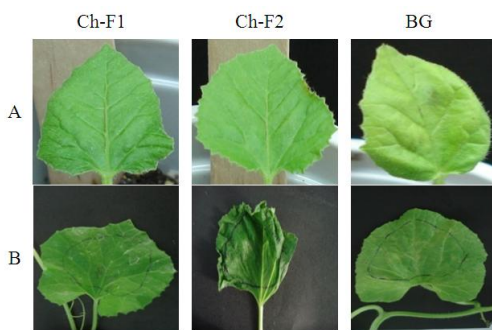
آنالیز عملکرد ژن SIX1 روی ارقام مقاوم

در آزمایشات تکمیلی با هدف بررسی برهم‌کنش ژن SIX1 با ژن‌های *Fom1* و *Fom2*، سویه حامل سازه pCaS1 به برگ ارقام مقاوم شامل Charentais، Charentais Fom1 (Ch-Fom1) و Fom2 (Ch-Fom2) و BG5384 (BG) تزریق شد. با توجه به نتایج آزمایش اول، زمان مناسب جهت بررسی پاسخ گیاه، ۲۴ ساعت پس از تزریق در نظر گرفته شد. همچنین به منظور اطمینان از عدم تاثیر سویه در بروز مرگ سلولی، سوسپانسیون سویه LBA4404 فاقد سازه pCaS1 نیز به برگ ارقام مقاوم نیز تزریق شد. نتایج نشان داد پس از گذشت ۲۴ ساعت هیچ‌یک از ارقام نسبت به تزریق سویه LBA4404 پاسخ دفاعی قابل مشاهده‌ای بروز ندادند (شکل ۴- B). این نتایج در مطالعات قبلی توسط Toosi و همکاران (۲۰۱۴ b) گزارش شده بود که در آزمایش حاضر نیز مورد تایید قرار گرفت.

در نمونه‌های تزریق شده با سویه حامل سازه pCaS1 واکنش ارقام متفاوت بود (شکل ۴- B). در ارقام Ch-Fom1 و BG علائمی مشاهده نشد. در حالی که در رقم Ch-Fom2 علائم سبز خشکی ۲۴ ساعت پس از تزریق قابل مشاهده بود (شکل ۴- B). در خصوص ژن‌های اثرگذار جداسازی شده از فرم اختصاصی *Fol* نتایج تایید کننده کارکرد آنها بعنوان ژن‌های فعال کننده سیستم دفاعی بوده است. در مطالعه‌ای نشان داده شده است که بیان ژن *SIX1* در رقم گوجه فرنگی حامل ژن *I3* سبب فعال شدن سیستم دفاعی می‌شود و بر این اساس *Avr3* نامیده شده است (Rep et al., 2004). در مطالعات مشابه با تزریق سویه حامل ژن اثرگذار *Fol-SIX3* و بیان موقت آن در برگ گوجه فرنگی حامل ژن مقاومت *I2* نقش غیربیماری‌زایی این ژن نیز اثبات شده است (Houterman et al., 2009). با روش مشابهی نشان داده شده است که ژن اثرگذار *SIX4* با حضور ژن مقاومت *I* و یا *I1* سبب فعال شدن سیستم

دفاعی و بروز پاسخ فوق حساسیت می‌شود (Houterman et al., 2008). با توجه به این گزارش‌ها می‌توان بر اساس نتایج بدست آمده ژن *SIX1* را بعنوان ژن غیر بیماری‌زایی *Avr-F2* در نظر گرفت. هرچند حضور ژن‌های *Fom1* و *Fom2* در رقم BG و عدم بروز مرکز سلولی در این رقم این نتیجه‌گیری را کمی پیچیده می‌نماید. عدم پاسخ ارقام Ch-Fom1 و BG اطمینان از بیان ژن *SIX1* را در محل تزریق با ابهام روبرو می‌ساخت به همین دلیل بیان ژن *GUS* در این نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

به این منظور دیسک‌های برگ‌های این ارقام ۴۸ ساعت پس از تزریق جهت سنجش فعالیت آنزیم بتاگلوکونیداز مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد ژن *GUS* واجد اینترون که در یک واحد بیانی در پائین دست ژن *SIX1* قرار دارد قادر به بیان و تولید آنزیم بوده است (شکل ۵).



شکل ۴- مقایسه سه رقم استاندارد ملون در پاسخ به بیان ژن

SIX1 در زمان ۲۴ ساعت پس از تزریق

A: نمونه تزریق شده با سویه LBA4404 حامل سازه pCaS1، B: نمونه کنترل بدون تزریق، Ch-F1، Ch-F2 و BG به ترتیب ارقام مقاوم استاندارد ملون شامل Charentais Fom1، Charentais Fom2 و BG5384.

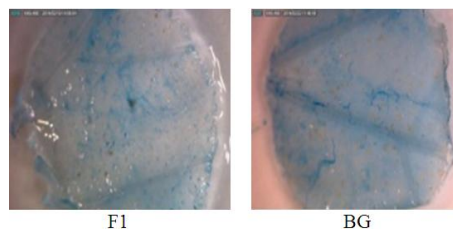
به منظور آنالیز ژن افکتوری *Fol-SIX1* در ارقام استاندارد ملون، از روش بیان موقت مبتنی بر اگروباکتريوم استفاده شد. توالی ژن *Fol-SIX1* از وکتور pTS1 در پائین دست پروموتور CaMV35S

مشابه، تزریق شد تا عدم پاسخ گیاه به سویه اگروباکتریوم تایید شود.

بروز مرگ سلولی می‌تواند در نتیجه مقاومت و یا حساسیت باشد. در صورتی که با بروز مقاومت همراه باشد به آن پاسخ فوق حساسیت گفته می‌شود (Rep, 2005). رقم Ch-T یک رقم حساس به تمام نژادهای قارچ *Fom* است (Risser et al., 1976)، لذا بر این اساس شاید بتوان مرگ سلولی بروز یافته را ناشی از حساسیت رقم به بیان ژن *SIX1* دانست. با این حال مطالعه مراحل توسعه قارچ *Fom* روی یک رقم حساس (Zvirin et al., 2010) نشان داده است که میسلیوم قارچ می‌تواند طی ۱۱ روز از سطح ریشه‌های موئین در گیاه وارد شده و بخوبی در سیستم آوند چوب به سمت بخش هوایی گیاه توسعه یابد. مطالعه الگوی بیان ژن *SIX1* در هنگام توسعه قارچ *Fol* در گیاه گوجه فرنگی نیز نشان داده است که بیان ژن *SIX1* از زمان نفوذ در اپیدرم ریشه القاء می‌شود (Van Der Does et al., 2008). مقایسه این نتایج این نتیجه گیری را محتمل می‌سازد که پاسخ رقم Ch-T به بیان ژن *Fol-SIX1* از نوع حساسیت بوده است.

هرچند با توجه به گزارش حضور ژن *SIX1* در توالی ژنوم نژاد یک مربوط قارچ *Fom* (Shokouhifar and Rabiei-Motlagh, 2014) انتظار می‌رفت رقم Ch-T قادر به شناسایی ژن *SIX1* نباشد، ولی برخلاف این نتایج این آزمایش نشان داد بیان موقت ژن *SIX1* قادر است مرگ سلولی را در رقم Ch-T فعال نماید. توالی ژن *SIX1* مورد استفاده در مطالعه حاضر مربوط به نژاد یک قارچ *Fol* می‌باشد. لذا این احتمال وجود دارد که وجود جهش‌های متعدد میان توالی *SIX1* در فرم‌های اختصاصی *Fol* و *Fom* (Shokouhifar and Rabiei-Motlagh, 2014) عامل این تناقض باشد. اخیراً مطالعات انجام شده در خصوص ردیابی همولوگ ژن *SIX1* در قارچ *Fom* وجود این

در وکتور جفتی pCAMBIA3301 کلون گردید و سازه جدید با روش‌های کلنی PCR، هضم آنزیمی و توالی یابی تایید شد. مطالعات قبلی نشان داده است سویه LBA4404 از نظر سازگاری جهت آزمون بیان موقت در ارقام ملون قابل استفاده است (Toosi et al., 2014b). بر این اساس ناقل جفتی بیان‌کننده ژن *SIX1* به نام pCaS1 ساخته شد و به سویه LBA4404 منتقل گردید. آنالیز عملکرد ژن *SIX1* با تزریق سلول‌های اگروباکتریوم حامل سازه بیانی pCaS1 در برگ چهار رقم ملون مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۵- سنجش هستوشیمیائی فعالیت آنزیم بتاگلوکرونییداز در نمونه‌های تزریق شده با سویه LBA4401 حامل سازه pCaS1 حدود ۲۴ ساعت پس از تزریق، F1: رقم حامل ژن مقاومت *Fom1*، BG: رقم حامل ژن‌های مقاومت *Fom1* و *Fom2*

آنالیز عملکرد ژن *SIX1* ابتدا روی رقم Ch-T مورد بررسی قرار گرفت. رقم Ch-T به‌عنوان یک رقم حساس در آزمون‌های بیماری‌زایی قارچ *Fom* مطرح است (Risser et al., 1976). این آزمایش با هدف بررسی روند پاسخ گیاهی که فاقد ژن‌های مقاومت *Fom* است به ژن *Fol-SIX1* انجام شد، تا مدت زمان لازم برای بروز پاسخ توسط گیاه مشخص شود. ژن *SIX1* در برگ‌های رقم Ch-T با استفاده از تزریق سوسپانسیون سلولی سویه LBA4404 حامل سازه pCaS1 بیان شد و اثر آن در زمان‌های ۲ تا ۴۸ ساعت پس از تزریق مشاهده شد. همچنین سوسپانسیون سویه LBA4404 اگروباکتریوم که فاقد سازه pCaS1 بود به‌عنوان کنترل در برگ‌های

چشم‌ها را که در سطح پروتئین نیز بروز می‌یابد، اثبات کرده است. میزان اثرگذاری چشم‌ها در پروتئین‌های افکتوری در نژادهای مختلف *Fol* به اثبات رسیده است (Houterman *et al.*, 2009) و به عنوان یک استراتژی تکاملی جهت فائق آمدن و مخفی شدن در مقابل سیستم دفاعی گیاه در قارچ‌ها به کار گرفته می‌شود (Stergiopoulos *et al.*).

(2007).

براساس الگوی برهم‌کنش قارچ *Fom* و ارقام مقاوم ارائه شده توسط Risser و همکارانش در سال ۱۹۷۶، می‌توان حضور ژن‌های *Avr* را مطابق با الگوی برهم‌کنش ارائه شده در فرم اختصاصی *Fol* و گیاه گوجه‌فرنگی (Rep *et al.*, 2004) به صورت جدول ذیل استنتاج نمود (جدول ۱).

جدول ۱- الگوی برهم‌کنش نژادهای *Fom* و ارقام مقاوم ملون

<i>FOM</i> Races/ <i>Avr</i> gene	Melon verities/R gene			
	Ch-T/-	Ch-F1/ Fom2	Ch-F2/ Fom1	BG/ Fom1 & Fom2
0	<i>Avr</i> F1 & <i>Avr</i> F2	C	InC	InC
1	<i>Avr</i> F2	C	InC	C
2	<i>Avr</i> F1	C	C	InC
1.2	-	C	C	C
Fol-SIX1		InC	C	InC

C: برهم‌کنش سازگار (مقاومت)، InC: برهم‌کنش ناسازگار (حساسیت)

معادل *Avr-F1* در نظر گرفته شود، ولی با توجه به تاثیر آن در بروز پاسخ در رقم *Ch-T* که فاقد این ژن است، نمی‌توان این نتیجه را تایید نمود. همچنین عدم بروز پاسخ در رقم *BG* که حامل هر دو ژن *Fom1* و *Fom2* است (Chikh-Rouhou *et al.*, 2011) نیز نشان می‌دهد که *SIX1* بر اساس الگوی مورد انتظار نمی‌تواند *Avr* متناظر هیچ کدام از این دو ژن باشد.

بر اساس نتایج بدست آمده از این مطالعه مشخص شد که الگوی پاسخ به ژن *SIX1* در ارقام ملون با الگوی تفکیک نژادی *Fom* انطباق ندارد. در صورت وجود انطباق انتظار می‌رفت رقم *BG* نیز که حامل هر دو ژن *Fom1* و *Fom2* است، بتواند پاسخ دفاعی را فعال نماید که در نتایج بدست آمده اینگونه نبود و به نظر می‌رسد ژن‌های مقاومت دیگری در الگوی پاسخ‌دهی قابل پیش‌بینی است که براساس نتایج این مطالعه در ارقام *Ch-T* و *Ch-* *Fom2* حضور داشته باشد. در نتیجه می‌توان الگوی حضور ژن مقاومتی متناظر برای *SIX1* را در ارقام

عملکرد ژن *Fol-SIX1* در ارقام ملون تا حدی براساس الگوی پاسخ ارقام گوجه‌فرنگی به *SIX1* قابل پیش‌بینی است. در برهم‌کنش گوجه‌فرنگی و قارچ *Fol*، حضور ژن *SIX1* تنها توسط ژن *I-3* قابل تشخیص است (Rep *et al.*, 2004). بر این اساس در رقم *Ch-Fom1* تنها در صورتی پاسخ دفاعی فعال می‌شود که این رقم مشابه رقم دارای ژن *I-3* در گوجه‌فرنگی عمل نماید. درحالی‌که نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که *SIX1* نمی‌تواند *Avr* متناظر ژن مقاومت *Fom1* باشد.

رقم *Ch-Fom2* به عنوان یک رقم مقاوم حامل ژن مقاومت *Fom1* بوده و به نژادهای صفر و یک قارچ *Fom* مقاوم است. در حالی‌که در برابر نژادهای 2 و 1.2 حساسیت نشان می‌دهد (Risser *et al.*, 1976). انتظار می‌رود نژاد صفر و یک به دلیل داشتن ژن‌های *Avr*، توسط گیاهی دارای ژن مقاومتی *Fom1* قابل تشخیص باشد. بروز پاسخ فوق‌حساسیت در برگ رقم *Ch-Fom2* (حامل ژن مقاومت *Fom1*) نشان داد، ژن *SIX1* می‌تواند

شناسایی شده در فرم‌های اختصاصی قارچ *Fusarium oxysporum* می‌توانند برای مطالعه مکانیسم برهم‌کنش در فرم‌های اختصاصی مختلف مورد مطالعه قرار گیرند و ژن *SIX1* از فرم اختصاصی *Fol*، قادر است سیستم دفاعی ارقام مقاوم در ملون را فعال کند. مطالعه حاضر نشان داد ژن *Fol-SIX1* می‌تواند سبب بروز مرگ سلولی در ارقام *Ch-T* و *Ch-Fom2* شود و برای نشان دادن برهم‌کنش این ژن اثرگذار با ژن‌های مقاومت نیاز است تا در مطالعات تکمیلی ژن‌های مقاومت نیز با استفاده از روش بیان موقت جدانشده و برهم‌کنش آنها در گیاهان مدل مورد ارزیابی قرار گیرند.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه فردوسی به جهت تامین منابع مالی و مدیریت محترم پژوهشکده علوم گیاهی که فضای آزمایشگاهی لازم جهت اجرای این تحقیق را مهیا نمودند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Bahrabadi M, Shokouhifar F, Ebrahimi Ma (2014) Functional Analysis of SP-DD Synthetic Promoter Using Agroinjection Method in Tobacco Plant. *Crop Biotech.* 6: 11-20.
- Banihashemi Z (2010) Reaction of Cucumis melo Cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis the cause of melon vascular wilt. *Iranian Journal of Plant Pathology* 46: 11-22.
- Chenarani Z, Shokouhifar F, Mamarabadi M, Farrokhi N (2012) Study the effects of explant and medium types in direct regeneration induction in melon (*Cucumis melo* L., cv. Khatooni). 12th Iranian Genetics Congress, Tehran.
- Chikh-Rouhou H, González-Torres R, Oumouloud A, Alvarez Jm (2011) Inheritance of race 1.2 *Fusarium* wilt resistance in four melon cultivars. *Euphytica* 182: 177-186.
- Hofgen R, Willmitzer L (1988) Storage of competent cells for agrobacterium transformation. *Nucleic Acids Research.* 16: 9877-9877.
- Houterman Pm, Cornelissen Bj, Rep M (2008) Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector. *PLoS Pathogens* 4: e1000061.
- Houterman Pm, Ma L, Van Ooijen G, De Vroomen Mj, Cornelissen Bj, Takken Fl, Rep M (2009) The effector protein *Avr2* of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly. *The Plant Journal* 58: 970-978.
- Janeway Ca, Medzhitov R (2002) Innate immune recognition. *Annual review of*

مورد مطالعه به صورت جدول ذیل پیشنهاد نمود (جدول ۲). در مطالعه حاضر این ژن فرضی *RSI* نام‌گذاری شد.

جدول ۲- الگوی حضور ژن‌های مقاومتی متناظر برای ژن *SIX1* براساس پاسخ گیاه به بیان ژن *SIX1*

نام ارقام	ژن مقاومت	پاسخ گیاه
CH-T	RS1	HR
C-F1	-	nR
C-F2	RS1	HR
BG	-	nR

CH-T, C-F1, C-F2 و BG ارقام استاندارد ملون، HR پاسخ فوق حساسیت و nR عدم ایجاد پاسخ

حضور ژن‌های مقاومت جدید به نام‌های *Fom3* و *Fom4* در ارقام ملون در مطالعات دیگری نیز گزارش شده است (Zink and Gubler, 1985; Oumouloud *et al.*, 2010b) که قادرند در برابر نژادهای صفر و ۲ قارچ *Fom* مقاومت نشان دهند. ولی تاکنون *Avr* متناظر این ژن‌ها شناسایی نشده است.

نتایج این مطالعه نشان داد، ژن‌های اثرگذار

- immunology 20: 197-216.
- Jones Jdg, Dangl JI (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Joobeur T, King Jj, Nolin Sj, Thomas Ce, Dean Ra (2004) The fusarium wilt resistance locus Fom-2 of melon contains a single resistance gene with complex features. *The Plant Journal*. 39: 283-297.
- Kang F, Wang X-L, Li G (2010) Identification on Pathogen of Wilt Disease and Root Rot of Melon in Xinjiang. *Xinjiang Agricultural Sciences* 6: 021.
- Liu P-Y, Bie Z-L, Peng B, Gu Q-S (2011) Seedling Stage Test of Melon Resistance to Fusarium Wilt. *China Cucurbits and Vegetables* 2: 007.
- Oumouloud A, Andres Msa, Torres Rg, Alvarez J (2010a) Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis races 0 and 2 in melon accession Tortuga. *Euphytica* 176: 183-189.
- Oumouloud A, Arnedo-Andrés M, González-Torres R, Álvarez J (2010b) Inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis races 0 and 2 in melon accession Tortuga. *Euphytica* 176: 183-189.
- Oumouloud A, El-Otmani M, Chikh-Rouhou H, Claver Ag, Torres Rg, Perl-Treves R, Alvarez Jm (2013) Breeding melon for resistance to Fusarium wilt: recent developments. *Euphytica* 192: 155-169.
- Rep M (2005) Small proteins of plant-pathogenic fungi secreted during host colonization. *FEMS microbiology letters* 253: 19-27.
- Rep M, Van Der Does Hc, Meijer M, Van Wijk R, Houterman Pm, Dekker Hl, De Koster Cg, Cornelissen Bjc (2004) A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato. *Molecular Microbiology* 53: 1373-1383.
- Risser G, Banihashemi Z, Davis D (1976) A proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races and resistance genes in Cucumis melo. *Phytopathology* 66: 1105 - 1106.
- Sambrook J, Russell D (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. . CSHL press.
- Shokouhifar F, Abbaspour N, Toosi S, Ghafariania N (2013) Construction of the pCaBGi vector to analysis regulatory elements in plants. *Iranian Journal of Plant Biotechnology* Submitted: (In Farsi).
- Shokouhifar F, Rabiei-Motlagh E (2014) Identification of the *Fol-SIX1* gene homolog in the genome of *Fusarium oxysporium* f. sp. *melonis*. *Modern genetics journal* submitted (in Farsi).
- Stergiopoulos I, De Kock Mj, Lindhout P, De Wit Pj (2007) Allelic variation in the effector genes of the tomato pathogen *Cladosporium fulvum* reveals different modes of adaptive evolution. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20: 1271-1283.
- Thatcher Lf, Gardiner Dm, Kazan K, Manners Jm (2012) A highly conserved effector in *Fusarium oxysporum* is required for full virulence on Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25: 180-190.
- Toosi S, Malekzadeh Shafaroudi S, Shokouhifar F, Bagheri A (2014a) Isolation and amplification of *Fol-SIX1* to construct expression vector pCaS1. 1st international & 13th Iranian Genetics Congress. Tehran.
- Toosi S, Shokouhifar F, Malekzadeh Shafaroudi S, Bagheri A (2014b) Optimization of the Agrobacterium mediated transient gene expression in melon leaves. 1st international & 13th Iranian Genetics Congress. Tehran.
- Van Der Does Hc, Duyvesteijn Rge, Goltstein Pm, Van Schie Ccn, Manders Emm, Cornelissen Bjc, Rep M (2008) Expression of effector gene

- SIX1 of *Fusarium oxysporum* requires living plant cells. *Fungal Genetics and Biology* 45: 1257-1264.
- Vleeshouwers Vg, Oliver Rp (2014) Effectors as Tools in Disease Resistance Breeding Against Biotrophic, Hemibiotrophic, and Necrotrophic Plant Pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27: 196-206.
- Wang Y-H, Thomas Ce, Dean Ra (2000) Genetic mapping of a fusarium wilt resistance gene (Fom-2) in melon (*Cucumis melo* L.). *Molecular Breeding* 6: 379-389.
- Zink F, Gubler W (1985) Inheritance of resistance in muskmelon to fusarium wilt. *Journal of the American Society for Horticultural Science*.
- Zink F, Thomas C (1990) Genetics of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. melonis races 0, 1, and 2 in muskmelon line MR-1. *Phytopathology* 80: 1230-1232.
- Zvirin T, Herman R, Brotman Y, Denisov Y, Belausov E, Freeman S, Perl-Treves R (2010) Differential colonization and defence responses of resistant and susceptible melon lines infected by *Fusarium oxysporum* race 1-2. *Plant Pathology* 59: 576-585.