جداسازی ، همسانه‌سازی، توالی یابی و بررسی بیوانفوماتیکی آنالوگ ژن مقاومت به ویروس موزاییک گوجه فرنگی در دو رقم طالبی بومی ایران

فاطمه قرائی[۱و۲] و مریم غایب زمهریر[۱*]

[۱] ایران، تهران، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، بخش تحقیقات بیماریهای گیاهی

[۲] ایران، تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی ومنابع طبیعی، گروه باغبانی

تاریخ دریافت: ۹۵/۵/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۱۳

چکیده

جنس *Cucurbita* از خانواده کدوئیان (Cucurbitacea) می‌باشد. این گیاهان، مورد حمله طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرند. در حال حاضر تدبیر کارآمد برای کنترل بسیاری از بیماریهای کدوئیان، استفاده از گیاهان مقاوم می‌باشد. در این مطالعه، قلمرو NBS کد شونده با ژنهای مقاومت در ارقام طالبی بومی ایران بررسی شد. به این منظور بذور ارقام مختلف طالبی ایرانی تهیه و در گلخانه کشت داده شدند. استخراج DNA به روش CTAB از برگ ارقام مختلف انجام شد. آغازگرهای دجنره از نواحی حفاظت شده ژنهای آنالوگ مقاومت طراحی شدند و تکثیر این ژنها از روی DNA به روش PCR انجام شد. نتایج این بررسی منجر به جداسازی یک ژن آنالوگ مقاومت به ویروس موزاییک گوجه فرنگی (ToMV) از طالبی رقم TN-92-99 و TN-92-80 شد که در پلاسمید pGEM-T همسانه سازی و توالی یابی شد. آنالیز بلاست نشان داد که توالی NBS در طالبی ایرانی ۹۹-۹۲ درصد با ژن مقاومت به ویروس موزاییک گوجه فرنگی در سایر کدوئیان شباهت دارد. ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از آنالوگهای جداسازی شده از طالبی و هندوانه موجود در بانک ژن NCBI دو گروه اصلی و هفت زیر گروه را ایجاد کرد. بررسی ساختار دوم پروتئین آنالوگ ژن مقاومت به ToMV با استفاده از نرم افزار PSIpred نشان داد که این پروتئین فقط از مارپیچ α تشکیل شده است. ترشح این پروتئین در رقم طالبی TN-92-99 در غشاء پلاسمایی است و ترشح خارج سلولی آن ناچیز است. این اولین مطالعه در رابطه باکلون، بیان و تعیین فعالیت آنزیمی ژن مقاومت به ویروس موزاییک گوجه فرنگی در طالبی بومی ایران است. تظاهر این ژن می‌تواند نقش مهمی در مقاومت به بیماریهای ویروسی از جمله بیماری موزاییک گوجه فرنگی در کدوئیان داشته باشد که از آن در برنامه های اصلاحی می توان استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: همسانه‌سازی، طالبی، مقاومت، ویروس موزاییک گوجه فرنگی، PCR

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۳۷۰۸۱۲۸ ، پست الکترونیکی: zamharir2005@yahoo.com

مقدمه

طالبی با نام علمی *Cucumis melo* var *reticulatus* گیاهی علفی از تیره کدوئیان می‌باشد .عقیده بر این است که طالبی از هندوستان منشأ گرفته است (۱)، اما برخی منشأ آن را ایران و هند می دانند (۱۴).

طالبی دارای واریته های زیادی است که از نظر شکل و طعم متفاوتند و شامل *C. m.* var. *reticulatus* و *C. m.* var. *indorus* و *C. m.* var. *dudaim* می‌باشند (۱۴). کدوئیان از جمله طالبی مانند سایر گیاهان مورد حمله آفات و بیماریهای مختلفی قرار می‌گیرند (۱۰).

در حال حاضر تدبیر کارآمد برای مدیریت بیماریهای مختلف گیاهان از جمله کدوئیان استفاده از ارقام مقاوم است (۸). در مورد بعضی بیماریها مانند بیماریهای

فایتوپلاسمایی یافتن مقاومتهای طبیعی نادر است و بیشتر تمرکز بر استفاده از روشهای زیست فن‌آوری برای تولید گیاهان مقاوم می‌باشد (۱۱ و ۱۲). توده‌های بومی گونه‌های کدوئیان و خویشاوندان وحشی آنها غنی‌ترین ذخایر ژنتیکی در خصوص تحمل یا مقاومت به تنشهای زیستی هستند. مهندسی ژنتیک در دهه های اخیر، راهکارهای جدیدی برای معرفی مقاومت به بیمارگرها در گیاهان مختلف فراهم کرده است. گیاهان سازوکارهای مختلفی را برای دفاع در مقابل بیمارگرها به کار می‌برند. این سازوکارها با ژنهای مقاومت گیاه (R gene) فعال می‌شوند (۸).

با توجه به نقش ژنهای مقاومت بر علیه عوامل بیماریزای گیاهی و اهمیت هرم‌بندی ژنهای مقاومت در تولید ارقام مقاوم، محققان روشهایی جهت شناسایی و نشانمندکردن ژنهای مقاومت ابداع کرده اند. با استفاده از موتیفهای حفاظت شده ژنهای مقاومت، یک راهکار مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پایمراز (PCR) جهت جداسازی ژنهای مقاومت جدید و ایجاد نشانگرهای شدیداً پیوسته با ژنهای مقاومت در گونه‌های مختلف گیاهان زراعی به کار برده شده است (۳و ۶). PCR با استفاده از آغازگرهای الیگونوکلئوتیدی دجنره در جداسازی توالیهای حفاظت شده بسیار حساس بوده و از این رو در جداسازی ژنهای مقاومت کارآیی بالایی دارد. اگر ساختارهای حفاظت شده در بین تعداد زیادی از ژنهای مقاومت مشترک باشند، امکان زیادی برای جداسازی ژنهای مقاومت جدید مبتنی بر همولوژی توالی وجود دارد (۴).

از آنجایی که اطلاعات کمی درمورد ژنهای مقاومت و آنالوگهای آنها و همچنین ساختار و عملکرد آنها در ارقام طالبی بومی ایران وجود دارد، هدف این تحقیق جداسازی و تعیین ویژگیهای توالی آنالوگ ژن مقاومت به بیماری در طالبی، ترسیم ساختارهای پروتئینی، پیش‌بینی عملکرد و بررسیهای فیلوژنتیکی با سایر ژنهای این خانواده با استفاده از ابزار های بیوانفورماتیکی بود.

مواد و روشها

تهیه بذور و کشت ارقام طالبی بومی و استخراج DNA: بذور ارقام بومی طالبی در ایران شامل TN-92-99، TN-92-80، TN-92-107، TN-92-120 و TN-92-115 از بانک ژن (موسسهٔ تحقیقات اصلاح نهال و بذر، کرج) تهیه و در گلخانه موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور کشت شدند. به منظور کشت بذور، گلدانها کاملاً شسته و با خاک استریل پر شدند و ۷–۵ بذر در هر گلدان قرار داده شد و سطح بذور با خاک نرم پوشانده شد. گلدانها در دمای ۲۵–۱۸ درجه قرار داده شدند. یک‌ماه بعد از کشت، DNA از برگ گیاهان طالبی به روش CTAB با اندکی تغییر (۵) استخراج شد.

گزینش آغازگر و انجام PCR: در این مطالعه از ترکیب آغازگری F1/R1 و F2/R1 که در مطالعات قبلی از روی موتیفهای حفاظت شده ژنهای کد کننده پروتئین NBS–LRR طراحی شده بودند برای واکنش PCR استفاده شد (جدول ۱).

جدول۱– توالی وترکیب آغازگرهای مورد استفاده در مطالعه آنالوگ ژنهای مقاومت در ارقام بومی طالبی ایران

Primer	Conserved motif	Primer sequence	Reference
F1	P-loop	TGSSRGGHWYRGGBAAAACTAC	Zhang *et al*. (2008)
R1	GLPL	HRCWARAGGVARCCCTYBACA	Zhang *et al*. (2008)
F2	P-loop	GGDGTDGGNAARACWAC	Deng *et al*. (2000)

هر واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتری شامل ۲–۱ میکرو لیترDNA، dNTP (۱۰ میلی مولار) با حجم ۱میکرولیتر، آغازگرها (۱۰–۲۰ میلی مولار) با حجم نهایی ۲ میکرولیتر برای هر آغازگر، ۲/۵ میکرولیتر بافر(۱۰X) ،

$MgCl_2$ با حجم نهایی۱ میکرولیتر، آنزیم Taq پلیمراز (1U)۰/۲ میکرولیتر واحد (سیناژن ،ایران) و آب دو بار تقطیر شده استریل صورت گرفت. لوله‌ها در دستگاه PCR قرار داده شده و ۳۵ چرخه دمایی شامل ۱دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد برای واسرشتگی DNA (اولین چرخه ۵ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد)، ۱دقیقه در ۵۵ درجه سانتی گراد برای اتصال آغازگرها،۱/۵ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد برای ساختن DNA انجام گرفت. در آخر به منظور توسعه طول رشته DNA به مدت ۵ دقیقه در ۷۲ درجه باقی ماندند. محصول PCR در آگارز ۱/۲ درصد الکتروفورز شده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید، باندها با اشعه UV مرئی شدند و از آنها عکسبرداری شد.

همسانه سازی در ناقل pGEM-T (Vector): بعد از تکثیر ژن توسط PCR و خالص سازی آن به روش لئونارد (۱۹۹۸) (۹)، عمل اتصال بین ژن و پلاسمید pGEM-T easy vector system I، محصول شرکت پرومگا (آمریکا) صورت گرفت. پلاسمیدpGEM-T شامل راه‌اندازهای T7 و SP6 در طرفین ناحیه برشی (MCS) است و ژن انتخاب‌گر آن برای گزینش *E. coli* ژن مقاومت به آمپی‌سیلین می‌باشد. همچنین کاست ژنی حاوی β-گلوکورونیداز تحت راه اندازهای SP6 وT7 در طرفین سایت برشی اختصاصی (MCS) جهت گزینش به روش کلونی سفید و آبی وجود دارد. پس از الحاق قطعه به پلاسمید و ایجاد پلاسمید نوترکیب، انتقال به وسیله شوک حرارتی به باکتری *E. coli* نژاد Top10 انجام شد. در مرحله بعد باکتریها روی محیط LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، IPTG و X-GAL کشت داده شدند. پس از ۱۶ ساعت تیمار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، تعدادی کلونی سفید به عنوان کلونیهای نوترکیب انتخاب و در نهایت استخراج پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت GF-1 Plasmid DNA Extraction Kit (Vivantis, Malasia) انجام گرفت. کلونیهای نوترکیب با استفاده از تکنیک PCR مورد بررسی قرار گرفتند. پلاسمیدها با دو آغازگر T7 و SP6 توالی‌یابی شدند.

آنالیرهای تعیین توالی و رسم درخت فیلوژنی: با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI و BLAST، توالی نوکلئوتیدی و اسید آمینه‌ای آنالوگهای مختلف مقاومت در ارقام طالبی بومی ایران و چندین گونه دیگر به همراه سایر ویژگیها (ویژگیهای توالیهای مورد بررسی از جمله طول mRNA ، توالی cDNA، تعداد اگزون و اینترون، طول پروتئین و شماره دسترسی توالیها) مورد بررسی قرار گرفتند (۲). همردیفی مقایسه‌ای ژن کلون شده در وکتور pGEM-T با سایر گیاهان موجود در NCBI با استفاده از نرم افزار T-Coffee به روش ClustalW انجام شد (۱۶). بررسی فیلوژنتیکی با استفاده از آنالوگهای مختلف مقاومت در ارقام طالبی بومی ایران و انواع ژنهای *NBS* با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 به روش UPGMA انجام شد (۱۳). به منظور تأیید صحت و اعتبار درختهای حاصل، تست BootStrap با ۱۰۰۰ تکرار صورت گرفت (۷).

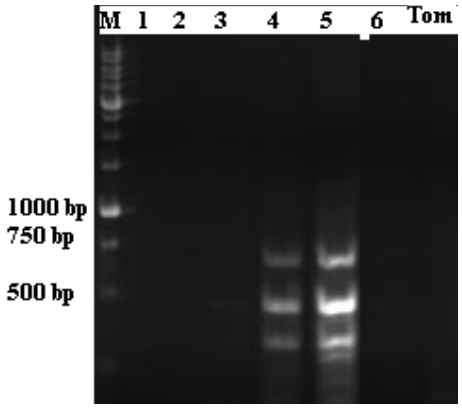
تعیین مشخصات و شناسایی قلمروهای آنالوگهای مختلف مقاومت در ارقام طالبی بومی ایران: توالی پروتئینی با استفاده از پایگاههای اطلاعاتی پروتئینی و UniProtKB تعیین شد. تعیین قسمتهای درون، خارج سلولی و غشایی پروتئین با استفاده از برنامه TMHMM صورت گرفت.

تعیین ساختار و محل عملکرد پروتئین: برای تعیین ساختارهای اول و دوم پروتئین از برنامه‌های Uniprot B، PSIpred و برای تعیین محل عملکرد آن از بانک PSORT PROTEIN استفاده شد.

نتایج

نتایج تکثیر ژنهای آنالوگ مقاومت با استفاده از ترکیبهای آغازگری F1/R1 و F2/R1 نشان داد ترکیب آغازگری F2/R1 قادر به تکثیر آنالوگهای مقاومت به بیماری در ارقام طالبی TN-92-99 و TN-92-80 بومی ایران است (شکل

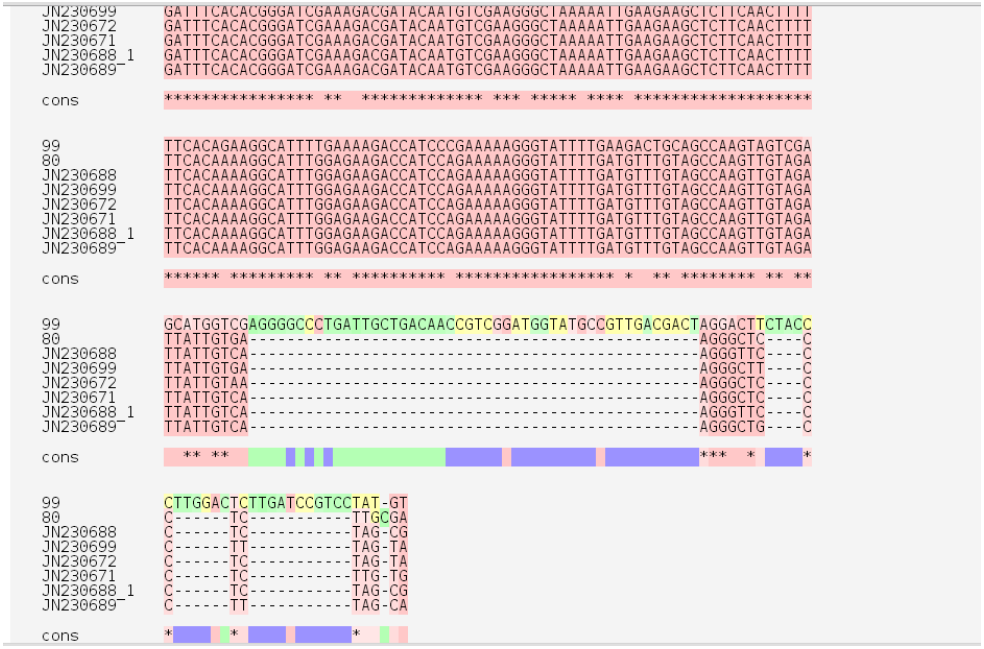
۱) ولی ترکیب آغازگری F1/R1 این قابلیت را ندارد.



شکل ۱- تکثیر آنالوگهای مختلف ژن مقاومت در ارقام طالبی بومی ایران: چاهک ۵-۱ به ترتیب ارقام طالبی TN-92-107، TN-92-120، TN-92-115، TN-92-99 و TN-92-80، چاهک Tom مربوط به گوجه فرنگی به عنوان کنترل منفی و چاهک ۶ واکنش انجام شده با آب است و M نشانگر اندازه‌ای Kb ۱ (فرمتاز).

آنالیز بلاست با استفاده از برنامه NCBI نشان داد که توالی NBS در رقم طالبی TN-92-99 ایرانی ۹۲ درصد با ژن مقاومت به ویروس موزاییک گوجه فرنگی در طالبی و در رقم طالبی TN-92-80 ایرانی ۹۹ درصد شباهت را با ژن مقاومت NBS-LRR به ترتیب در هندوانه دارد. آنالوگهای مقاومت جداسازی شده از سایر ارقام طالبی بومی ایران شباهتی با ژنهای مقاومت ثبت شده در بانک ژن نداشتند. در بعضی از ارقام مانند TN-92-107، TN-92-115 و TN-92-120 با هیچیک از ترکیبهای آغازگری مورد استفاده در این مطالعه، ژنی تکثیر نشد (شکل ۱).

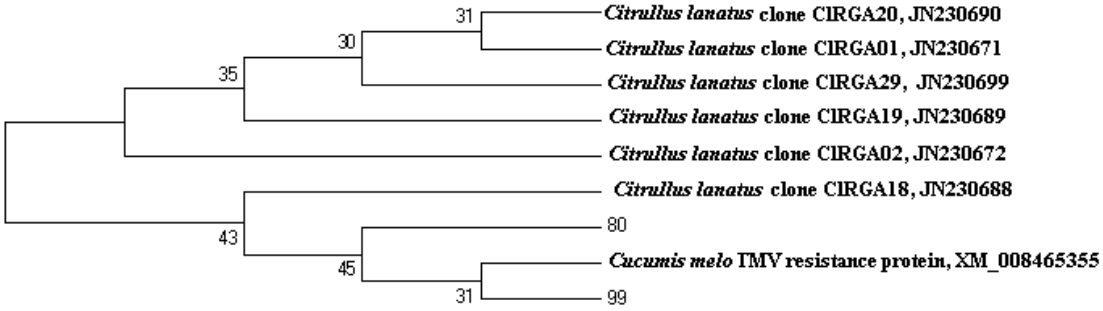
نتایج همردیفی با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI و نرم افزار T-Coffee به روش ClustalW نشان داد که این آنالوگهای مقاومت به بیماری در ارقام طالبی TN-92-99 و TN-92-80 بومی ایران، حفاظت شدگی بالایی به طول حدود ۶۰ جفت باز را در دو رقم نشان می‌دهند (شکل ۲).



شکل۲- همردیفی مقایسه‌ای آنالوگهای مقاومت کلون شده در ناقل pGEM-T با آنالوگهای مشابه در هندوانه و موجود در NCBI (JN238699, JN238688, JN238689, JN238672, JN238671) با استفاده از برنامه T-Coffe.

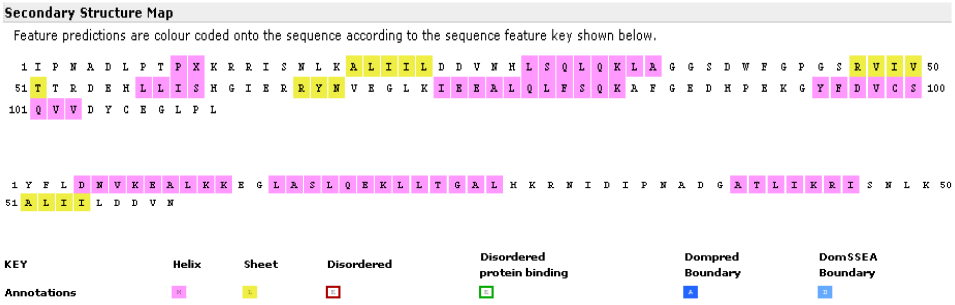
به منظور بررسی روابط تکاملی بین ارقام طالبی بومی ایران از نظر توالی آنالوگهای مقاومت به بیماری، رسم درخت فیلوژنی انجام شد، تا میزان شباهت آنها با سایر توالیهای همساخت در طالبی و هندوانه موجود در پایگاه بررسی

شود. با توجه به اینکه ژنوم جانداران حجم گسترده‌ای از اطلاعات را در خود دارد و بررسی تمام این توالیها بسیار دشوار است، معمولا از توالیهایی استفاده می‌شود که در موجودات همساخت باشند. ترسیم درخت فیلوژنی با استفاده از آنالوگهای جداسازی شده از خربزه و هندوانه موجود در بانک ژن NCBI دو گروه اصلی و هفت زیر گروه را ایجاد کرد (شکل ۳). گروه اول شامل آنالوگهای JN230690, JN230689، JN230699 و JN230671 است و گروه دوم شامل آنالوگهای مقاومت ۸۰ و ۹۹ در ارقام طالبی بومی ایران به همراه XM-008465356 و JN230688 است که بیشترین شباهت این آنالوگها در ارقام طالبی بومی ایران با ژن مذکور مربوط به گیاه خربزه است (XM-008465356). آنالوگهای مقاومت گروه اول به صورت جداگانه از گروه دوم قرار گرفته اند.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی توالی همسانه شده با سایر ژنهای همتای خود در بانک اطلاعاتی NCBI با استفاده از نرم‌افزار MEGA6

بررسی ساختار دوم پروتئین آنالوگ ژن مقاومت همسانه شده ۹۹ و ۸۰ به ترتیب جداسازی شده از ارقام طالبی بومی ایران TN-92-99 و TN-92-80، با استفاده از PSIpred نشان داد که این پروتئین فقط از مارپیچ α تشکیل شده است (شکل ۴). نتایج بیوانفورماتیکی مربوط به هدف‌گیری پروتئین، با استفاده از نرم افزار PSORT PROTEINT، نشان داد که بیشترین میزان ترشح پروتئین درغشاء پلاسمایی بوده است و ترشح خارج سلولی آن ناچیز است.



شکل۴- ساختار دوم پروتئین ژن آنالوگ مقاومت ۸۰ (بالا) و ۹۹ (پایین) جدا شده از ارقام بومی طالبی با استفاده از PSIpred

بحث

ژنهای خانواده NBS-LRR نقش مهمی در پاسخ مقاومت گیاهان به بیمارگرهای مختلف دارند (۱۵). با در نظر گرفتن خسارت بیماریهای غیرقابل کنترل ویروسی و فایتوپلاسمایی در کدوئیان، اهمیت شناسایی و آنالیز ژنهای مقاوم به بیمارگرهای مذکور در کشاورزی حائز اهمیت است. با توجه به این خسارتها در باغبانی، تولید گیاهان تراریخته متحمل از طریق انتقال ژن می‌تواند منجر به افزایش تولیدات، کاهش مصرف سم و رسیدن به کارآیی

مطلوب تولید آن در واحد سطح شود. مطالعاتی که تا کنون روی ژنهای خانواده NBS-LRR ارقام تجاری کدوئیان انجام شده نشان می دهد این ژنها در این خانواده دارای نقاط محاظت شده هستند که بر اساس این توالیها پرایمرهای مختلفی طراحی شده است (۱۵ و ۱۶). در این مطالعه آغازگرهای مختلفی بررسی شد و نتایج آن ما نشان داد که آغازگر F2/R1 در تمامی ارقام طالبی بومی ایران قادر به تکثیر آنالوگ ژنهای مقاومت به بیماریها می باشد.

داده‌های به دست آمده در مطالعه اخیر نشان داد، آنالوگهای مختف مقاومت در ارقام طالبی بومی ایران وجود دارد که تظاهر آنها می‌تواند نقش مهمی در مقاومت به بیماریهای ویروسی از جمله بیماری موزاییک گوجه فرنگی در کدوئیان داشته باشد. زیرا خانواده کدوئیان در مقایسه با سایر گیاهان دارای تعداد کمی ژن مقاومت است (۱۷). به عنوان مثال تعداد ژنهای متعلق به خانواده NBS-LRR در خربزه و هندوانه ۸ عدد است که روی کروموزوم ۹قرار دارند و در خیار ۱۲ عدد است (۱۷). این ژنها برای اولین بار از ارقام ایرانی طالبی TN-92-99 و TN-92-80 از طریق PCR جداسازی و در پلاسمید pGEM کلون شدند.

درخت فیلوژنی براساس توالی آنالوگهای مقاومت ۹۰ و ۸۸ جداسازی شده از ارقام طالبی بومی ایران و آنالوگهای جداسازی شده از طالبی و هندوانه موجود در بانک ژن NCBI به منظور بررسی روابط تکاملی نشان داد که آنالوگهای طالبی ایرانی قرابت زیادی با آنالوگهای XM-008465356 و JN230688 جداسازی شده از هندوانه و خربزه دارند. همچنین آنالوگهای جداسازی شده از خربزه و هندوانه نیز در درخت فیلوژنی در هر دو شاخه اصلی کنار هم قرار گرفته اند که بیانگر شباهت بالای این آنالوگها در سطح مولکولی بین گونه‌های خربزه و هندوانه است که در مطالعات دیگر نیز این نتایج حاصل شده است (۱۶ و ۱۷) و به عبارت دیگر مفهوم ژن آنالوگ مقاومت را بیان می کند و اینکه این ژنها نقش مهمی در مقاومت در گونه های مختلف گیاهی دارد. نکته حائز اهمیت در این درخت وجود آنالوگهای مختلف مقاومت در خربزه و هندوانه با عملکرد یکسان است که نشان می‌دهد این ژن می‌تواند نقش کلیدی در گیاه داشته باشد و همین باعث شده تا به صورت حفاظت شده در گونه‌های خربزه و هندوانه در طول تکامل حفظ شود.

مطالعه ساختار دوم پروتئین نشان داد، پروتئین ۹۹ و ۸۰، به ترتیب جداسازی شده از ارقام طالبی بومی ایران TN-92-99 و TN-92-80، فقط از مارپیچ α تشکیل شده است. پس دارای انعطاف و حلالیت بیشتر است. انعطاف‌پذیری بیشتر باعث پایداری کمتر پروتئین می‌شود، در نتیجه می-توان گفت که این پروتئین دارای پایداری نمی‌باشد. و این مسئله در پروتئینهای مقاومتی که در زمان تنش و واکنش به یک پاتوژن بیان می شوند مشاهده می شود (۱۷).

براساس آنالیزهای مختلف بیوانفورماتیکی آنالوگهای مختلف مقاومت، شباهت زیادی با توالی این ژن ها در سایر کدوئیان ثبت شده در NCBI دارند. از آنجایی که خانواده NBS-LRR ها در مقاومت عمودی نقش دارند، این مطالعه راهی برای تولید گیاهان تراریخته طالبی متحمل به بیماریهای با مدیریت دشوار، نظیر بیماریهای ویروسی و فایتوپلاسمایی کدوئیان از طریق انتقال ژن در آینده است.

منابع

۱- ور ج دبلیو، و. و ج.پ. مک کلوم.۱۳۷۷. مترجم. دکتر مصطفی **مبلی** و دکتر بهمن **پیراسته** . تولید سبزی. چاپ دوم. ۳۰۰۰ جلد. نشر دانشگاه صنعتی اصفهان. ۸۷۷ صفحه.

2- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW and Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215: 403-410.

3- Barker B, Zambryski P, Staskawicz B and Dinish-Kumar SP. 1997. Signaling in plant-microbe interaction. Science, 276:726-733.

4- Deng ZS, Huang P, Ling C, Chen C, Yu CA, Weber GA, Moore FG and Gmitter J. 2000. Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences. Theoretical Appllied Genetics, 101:814–822.

5- Doyle JJ and Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 12:13–15.

6- Faris JD, Li WL, Liu DJ, Chen PD and Gill BS. 1999. Candidate gene analyziz of quantitive disease resistance in wheat. Theoretical Appllied Genetics, 98:219-225.

7- Felsenstein J (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution, 39: 783-791.

8- Lawrence L, Ram C, Ning H, Pamela C and Frederick M. 2000. Isolation and characterization of disease resistance gene homologues from rice cultivar IR64. Gene, 255: 245–255.

9- Leonard JT, Grace MB, Buzard GS, Mullen MJ and Barbagallo CB. 1998. Preparation of PCR products for DNA sequencing. BioTechniques, 24: 314-317.

10- Sikora EJ. 2011. Common diseases of cucurbits. Alabama Cooperative Extension System (Alabama A&M University and Auburn University). 8pp.

11- Singh RJ. 2006. Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Vegetable Crops, Volume 3. CRC Press.

12- Splittstoesser W E. 1990. Vegetable Growing Handbook : Organic and Traditional Methods. Springer London, Limited, 362 pp.

13- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mollecular Biology Evolution, 24: 1596–1599. 10.1093/molbev/msm092.

14- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. 1997. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research, 25:4876–4882.

15- Wan H, Yuan W, Bo K, Shen J, Pang X, Chen J. 2013. Genome-wide analysis of NBS-encoding disease resistance genes in Cucumis sativus and phylogenetic study of NBS-encoding genes in Cucurbitaceae crops. BMC Genomics 14:109

16- Morata J and Puigdomènec P.2017. Variability among Cucurbitaceae species (melon, cucumber and watermelon) in a genomic region containing a cluster of NBS-LRR genes. BMC Genomics 18: 138.

17- Vanlerberghe GC. 2013. Alternative Oxidase: A Mitochondrial Respiratory Pathway to Maintain Metabolic and Signaling Homeostasis during Abiotic and Biotic Stress in Plants. Internatinal Journal of Mollecular Science, 14:6805-6847; doi:10.3390/ijms14046805.

Isolation, cloning, sequencing and bioinformatic study of a resistance gene analouge against tomato mosaic virus in tow native types of cantaloupe to Iran

Gharaei F.[1,2] and Ghayeb Zamharir M.[1]

[1] Dept of Plant Diseases, Iranian Research Institute of Plant protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I.R. of Iran

[2] Horticultural Group, Dept. of Agriculture, Science and research Branch of Islamic Azad University, Tehran, I. R. of Iran.

Abstract

Cucurbita genus belongs to Cucurbitaceae family. These plants are attacked with different pathogenic agents. Currently the effective strategy to control many disease of Cucurbitaceae is the usage of resistant plants. In this study, the NBS domain encoded by resistance genes was studied in Iranian native varieties of cantaloupe. For this purpose, the seeds of Iranian native cantaloupe cultivars were provided and cultivated in greenhouse. DNA was extracted from leaves of different cultivars using CTAB method. Degenerate primers were designed from conserved motives of resistance analogues genes and amplification of these genes was performed using PCR method. The results showed the isolation of an analogous for resistance gene to tomato mosaic virus (ToMV) in cantaloupe cultivars TN-92-99 and TN-92-80 that were cloned in pGEM-T plasmid and then sequenced. Blast analysis indicated that NBS sequence in Irnian cantaloupe share 92% similarity with ToMV resistance gene in watermelon. Phylogenetic tree drawing using resistance gene analogues from cantaloupe and watermelon existing in NCBI gene bank created tow main groups and seven subgroups. Second structure study of protein of ToMV resistance gene analogus using PSIpred software indicated that these proteins only have α helix structure. This protein is secreted in plasma membrane of cantaloupe cultivar TN-92-99 and its extracellular secretion is very little.This is the first study of cloning, expression and identification of enzymatic activity of a resistance gene against ToMV in Iranian native cantaloupe cultivars. Expression of this gene could play important role in resistance against viral diseases including tomato mosaic disease in Cucurbitaceae that could use in breeding programs.

Key words: cantaloupe, resistance, cloning**,** PCR, Tomato musaic virus