

شناسایی آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری (RGAs) در جمعیت F1 در حال تفرق سیب‌زمینی
با استفاده از تکنیک NBS profiling
Identification of resistance gene analogues (RGAs) in F1 mapping population of
potato using NBS profiling technique

سارا درستان^۱، محمد مقدم^۲، سید ابوالقاسم محمدی^۲، سعید اهری‌زاد^۳ و ژاک وسن^۴

چکیده

دژستان، س.، م. مقدم، س. ا. محمدی، س. اهری‌زاد و ژ. وسن. ۱۳۸۹. شناسایی آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت به بیماری (RGAs) در جمعیت F1 در حال تفرق سیب‌زمینی با استفاده از تکنیک NBS profiling. مجله علوم زراعی ایران: ۱۲ (۲) ۱۹۸-۱۸۵.

به منظور شناسایی و جداسازی آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت (RGAs) در سیب‌زمینی، ۴۶ ژنوتیپ از جمعیت F1 در حال تفرق دیپلوئید SH×RH با حداکثر نوترکیبی با استفاده از تکنیک NBS Profiling در آزمایشگاه ژنومیکس دانشگاه واگنینگن هلند مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از پنج آغازگر دژنره طراحی شده براساس موتیف‌های حفاظت‌شده دامنه NBS، در مجموع ۱۸۷ نشانگر چندشکل تولید شد که در ارتباط با نقشه AFLP جمعیت متشکل از ۱۰۰۰۰ نشانگر مکان‌یابی شدند. پس از توالی‌یابی تعدادی از نشانگرها و همردیف کردن آنها، ۶۸ نشانگر با ژن‌های مقاومت شناخته‌شده یا پروتئین‌های مقاومت به بیماری گروه TIR-NBS-LRR همولوژی نشان دادند. هفت تا از این RGAها جایگاه ژنی و توالی مشابه با ژن‌های مقاومت شناسایی شده در سیب‌زمینی یا گوجه‌فرنگی داشتند. سی‌وهفت RGA توالی‌یابی شده در نواحی کروموزومی مشابه با ژن‌های مقاومت شناسایی شده با RGAها در گوجه‌فرنگی یا سیب‌زمینی مکان‌یابی شدند بدون اینکه با این ژن‌های مقاومت یا RGAها از نظر توالی دارای همولوژی باشند و بقیه RGAها نیز در جایگاه‌هایی مکان‌یابی شدند که تاکنون در آنها RGA گزارش نشده است. اکثر این RGAها در خوشه‌ها یا زیرخوشه‌های جدید یا موجود در نقشه قرار گرفتند. در بررسی رابطه فیلوژنی، توالی‌های RGA براساس آغازگر دژنره مورد استفاده برای تکثیر تفکیک شدند. نتایج حاصل از این پژوهش می‌تواند در مکان‌یابی ژن‌های مقاومت منفرد و مکان‌های کمی مقاومت به بیماری‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنالوگ‌های جمعیت نقشه‌یابی، ژن‌های مقاومت به بیماری (RGAs)، سیب‌زمینی و NBS Profiling.

تاریخ دریافت: ۸۷/۳/۱۹ تاریخ پذیرش: ۸۸/۷/۱۵

۱- دانشجوی دکتری اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۲- استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز (مکاتبه کننده) (پست الکترونیک: moghaddamv@yahoo.com)

۳- دانشیار دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

۴- محقق مؤسسه بین المللی تحقیقات گیاهی، واگنینگن، هلند

مقدمه

در سال‌های اخیر با راه‌اندازی پروژه‌های ژنومی در گیاهان، استفاده از توالی‌های همولوگ حفاظت‌شده ژن‌های عامل مقاومت یا ژن‌های مقاومت به بیماری به‌عنوان یکی از روش‌های کارآمد تشخیص و شناسایی ژن‌های مقاومت به‌شمار می‌رود. ژن‌های مقاومت به عوامل بیماری‌زای گیاهی شامل باکتری‌ها، ویروس‌ها، قارچ‌ها و نماتدها از گونه‌های مختلف جداسازی شده‌اند. مقایسه توالی اسیدهای آمینه پروتئین‌های حاصل از ژن‌های مقاومت همسانه‌شده در گیاهان مختلف نشان داده است که در آنها تعدادی از موتیف‌های حفاظت‌شده وجود دارد (Baker *et al.*, 1997). بیشتر پروتئین‌های رمز شده توسط ژن‌های مقاومت دارای یک محل اتصال به نوکلئوتید (Nucleotide Binding Site: NBS) هستند که به یک تکرار غنی از لوسین (Leucien-Rich Repeats: LRR) با طول متغیر در انتهای کربوکسیل متصل می‌باشد. این دامنه‌ها در برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین و ترانسسانی پیام‌های مولکولی شرکت می‌کنند (Staskawicz *et al.*, 1995). ژن‌های مقاومت گروه NBS-LRR متداول‌ترین گروه ژن‌های مقاومت هستند (Hulbert *et al.*, 2001). تاکنون، تنها نقش ثابت‌شده برای ژن‌های رمزکننده پروتئین‌های دارای NBS-LRR در گیاهان، مقاومت به بیماری‌ها یا آفات بوده است (Michelmore, 2000). ژن‌های مقاومت گروه NBS-LRR به زیرگروه‌های TIR [Toll/Interleukin-1/Receptor (TIR)] و non-TIR براساس حضور یک دامنه TIR در ناحیه انتهای آمینی تقسیم می‌شوند. این نوع از ژن‌های مقاومت به‌عنوان ژن‌های (TNL) TIR-NBS-LRR طبقه‌بندی می‌شوند. ژن‌های مقاومت non-TIR معمولاً دارای یک دامنه Coiled-Coil (CC) به جای یک دامنه TIR می‌باشند (Pan *et al.*, 2000b). دامنه‌های NBS ژن‌های مقاومت دارای چند مزیت

برای شناسایی توالی‌های همولوگ از طریق موتیف‌های درون ناحیه NBS در گونه‌های جدید هستند. از موتیف‌های حفاظت‌شده یک ناحیه با آرایش غیرقابل تغییر می‌توان برای تعیین روابط فیلوژنی و طبقه‌بندی ژن‌های NBS-LRR استفاده کرد (Meyers *et al.*, 1999; Pan *et al.*, 2000b). وجود موتیف‌های حفاظت‌شده امکان طراحی آغازگرهای دژنره و جداسازی آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت توسط واکنش چرخه پلی‌مراز از ژنوم‌های گیاهی را فراهم کرده است. این رهیافت به صورت موفقیت‌آمیزی برای جداسازی ژن‌های NBS-LRR از چند گونه تک‌په ای و دولپه‌ای مورد استفاده قرار گرفته است (Kanazin *et al.*, 1996; Noir *et al.*, 2001). رهیافت NBS-profiling یکی از روش‌های جدید برای جداسازی قطعات RGA تکثیرشده می‌باشد. این روش در گونه‌های مختلف با اندکی تغییر یا بدون تغییر در آغازگرها و پروتکل قابل کاربرد است (van der Linden *et al.*, 2004).

امروزه مجموعه قابل توجهی از توالی‌های NBS-LRR حفاظت‌شده در گونه‌های مختلف گیاهی در دسترس می‌باشند. بسیاری از این توالی‌ها به‌صورت نواحی کروموزومی حامل ژن‌های مقاومت بزرگ اثر و نیز مکان‌های ژنی کمی مقاومت (Quantitative Resistance Loci: QRL) دخیل در مقاومت به بیماری مکان‌یابی شده‌اند (Kanazin *et al.*, 1996; Carcia-Mas *et al.*, 2001). افزون بر این مشخص شده است که برخی از آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت شناسایی شده به مکان‌های ژنی مقاومت به بیماری‌ها و آفات خاص (Geffroy *et al.*, 2000) و یا QRL ها پیوسته هستند (Chen *et al.*, 1998; Timmerman-Vaughan *et al.*, 2000).

مکان‌یابی ۳۹ ژن مقاومت شناخته‌شده و ۶۵ مکان ژنی کمی مقاومت (QRL) در نقشه پیوستگی سیب‌زمینی

۴۶ ژنوتیپ از جمعیت F1 در حال تفرق SH×RH سیب زمینی حاصل از تلاقی والدین دیپلوئید هتروزیگوت (SH83-92-488(SH) و RH89-039-16(RH) (Roupe van der Voort et al., 1997) حداکثر نوترکیبی با استفاده از نرم افزار MapPop (Vision et al., 1999) انتخاب شدند. والدین جمعیت از بین تلاقی های مختلف انجام شده در دانشگاه واگنینگن کشور هلند براساس حداکثر مقدار نوترکیبی در جمعیت، انتخاب شده بودند. مرستم برگی از گیاهان پنج هفته ای رشد یافته در گلخانه برداشت شدند و DNA ژنومی طبق روش فولتون و همکاران (Fulton et al., 1995) استخراج گردید. برای این جمعیت نقشه ژنتیکی فوق اشباع متشکل از تقریباً ۱۰۰۰۰ نشانگر AFLP موجود است که در آن کروموزوم های سیب زمینی تقریباً به حدود ۹۰۰ جایگاه (Bins) با فاصله ژنتیکی تقریبی ۰/۸ سانتی مورگان تقسیم شدند (Isidore et al., 2003; van Os et al., 2006).

تکنیک NBS Profiling

این تکنیک طبق روش وندر لیندن و همکاران (van der Linden et al., 2004) روی DNA ژنومی انجام گرفت. در این تکنیک علاوه بر استفاده از یک آغازگر دژنره RGA، هم زمان از یک آداپتور متصل به یک جایگاه آنزیم برشی استفاده می شود و چندشکلی در طول قطعات و همچنین چندشکلی درون جایگاه تشخیص آنزیم برشی آشکار می شود. آنزیم های برشی *AluI*، *MseI*، *RsaI*، *HaeIII* و *TaqI* برای تیمار DNA ژنومی به کار برده شدند. آغازگرهای دژنره NBS براساس همردیفی توالی های DNA موتیف های حفاظت شده NBS، طراحی شدند (جدول ۱). فرآورده های تکثیری روی ژل پلی آکرلامید ۶ درصد با استفاده از دستگاه Li-Cor تفکیک گردیدند. نوارهای چندشکل مشاهده شده براساس وجود و عدم وجود نوار در نتاج امتیازدهی گردید. با استفاده از روش مکان یابی حداکثر درست نمایی

ظهور ژن های مقاومت را به صورت خوشه ای نشان می دهد. این جایگاه های متراکم (Hotspots) شامل چندین خانواده ژنی اعطا کننده مقاومت به گروه های مختلف عوامل بیماریزا می باشند. مهمترین خوشه های ژن های مقاومت روی کروموزوم های ۴، ۵، ۹، ۱۱ و ۱۲ سیب زمینی قرار دارند. این خوشه ها احتمالاً از اجداد مشترک از طریق مضاعف شدن ژن (Gene duplication) حاصل شده اند، ولی از نظر ساختاری و عملکردی انشعاب یافته اند. QRL ها برای برخی از بیماری ها مانند بلایت دیررس، پوسیدگی غده و نماتدهای سیستم ریشه روی هر ۱۲ کروموزوم سیب زمینی شناسایی شده اند، اما یک خوشه QRL بزرگ روی کروموزوم ۵ قرار دارد که شامل مکان های ژنی ایجاد کننده مقاومت به ویروس ها، قارچ ها، آمیست ها، باکتری ها و نماتدها می باشد (Simko et al., 2007). برای اطلاعات بیشتر می توان به نقشه عملکردی مقاومت به عوامل بیماریزای سیب زمینی در PoMaMo (Meyer et al., 2005) پایگاه داده <https://gabi.rzpd.de/PoMaMo.html> مراجعه کرد. مکان یابی RGA های کاندیدا، ژن های مقاومت و QRL های سیب زمینی پیوستگی بین آنها را آشکار کرد (Gebhardt and Valkonen, 2001).

هدف این پژوهش، تکثیر و جداسازی آنالوگ های ژن های مقاومت به بیماری در جمعیت در حال تفرق دیپلوئید SH×RH سیب زمینی (*Solanum tuberosum*) با استفاده از تکنیک NBS-profiling، انتساب آنها به نقشه فوق اشباع (Ultra High Density: UHD) سیب زمینی، شناسایی RGA ها در خوشه های ژنی شناخته شده و نیز شناسایی خوشه های ژنی مقاومت جدید احتمالی بود.

مواد و روش ها

آزمایش ها در آزمایشگاه ژنومیکس دانشگاه واگنینگن هلند انجام شد.

مواد گیاهی و استخراج DNA

به منظور مکان یابی گزینشی (Selective mapping)،

(Maximum likelihood mapping) جایگاه هر نشانگر در ارتباط با نقشه UHD موجود تعیین شد (van Os et al., 2006).

جداسازی و تجزیه نوارهای NBS

برای جداسازی نوارهای چندشکل، والدین SH و RH با تمام ترکیب‌های آنزیم/آغازگر (آغازگرها با P^{33} نشانمند شده بودند) مورد استفاده در ژل پلی آکریلامید بارگذاری شدند. نوارهای چندشکل معین از ژل پلی آکریلامید بریده شد و در ۱۰۰ میکرولیتر محلول TE در دمای ۹۷ درجه سانتیگراد برای پنج دقیقه قرار گرفتند. قطعات مجدداً با آغازگر اختصاصی NBS و آغازگر آداپتور تکثیر و فرآورده‌های تکثیری با استفاده از ژل آگارز تفکیک شدند. قطعات به صورت مستقیم با استفاده از آغازگر آداپتور به عنوان آغازگر توالی‌یاب و با کیت BigDye Terminator و دستگاه توالی‌یاب خودکار ABI3700 [Applied Biosystems (USA)] توالی‌یابی شدند. همردیفی توالی‌ها به وسیله مقایسه توالی‌ها با داده‌های اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها با استفاده از برنامه‌های Blastx و tBlastx در بانک اطلاعاتی NCBI انجام شد (Altschul et al., 1997). روابط فیلوژنی بین توالی‌های نوکلئوتیدی RGA های نشانگرهای TIR با استفاده از برنامه MegAlign نرم-افزار DNASTar و روش Neighbor-joining مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

از پنج آغازگر NBS مورد استفاده، سه آغازگر NBS13R، NBS15F و NBS5A بین والدین چندشکلی قابل قبولی نشان دادند. با استفاده از ۱۵ ترکیب آنزیم/آغازگر در کل ۱۸۷ نوار چندشکل تکثیر و امتیازدهی شد (جدول ۱) و به نقشه ژنتیکی UHD منتسب گردید. الگوی نواری افراد جمعیت با استفاده از ترکیب آنزیم *RsaI* و آغازگر NBS13R در ژل Li-Cor در شکل یک نشان داده شده است. میانگین LOD در مکان‌یابی

برابر ۶/۳ بود. از این تعداد نشانگر ۷۷ نشانگر اختصاصی در والد RH، ۷۹ نشانگر اختصاصی در والد SH و ۳۱ نشانگر در هر دو والد مشاهده شدند. برای تعیین ماهیت نشانگرهای تکثیرشده، تعدادی از نشانگرها توالی‌یابی شدند که ۸۵ نشانگر دارای توالی معتبر قابل خواندن بودند و ۶۸ تا از آنها براساس همولوژی با ژن‌های مقاومت شناخته شده یا پروتئین‌های مقاومت به بیماری گروه TIR-NBS-LRR به عنوان RGA شناسایی شدند. از ۶۸ RGA، ۲۹ RGA مختص والد RH، ۳۱ RGA مختص والد SH و هشت RGA در هر دو والد تکثیر شدند (جدول ۲).

جایگاه‌های RH5.1، RH11.2، SH6.1 (فاصله ۳-۱) و SH11.2 در سطح توالی و تقریباً در سطح جایگاه ژنی با RGA های شناسایی شده در سیب‌زمینی توسط لیستر و همکاران (Leister et al., 1996) و جب‌هاردت و والکونن (Gebhardt and Valkonen, 2001) و در گوجه‌فرنگی توسط پن و همکاران (Pan et al., 2000a) همولوژی داشتند. جایگاه‌های RH4.1، RH6.3، RH7.1، RH11.1، SH4.1، SH5.1، SH6.1 (فاصله ۵) و SH11.1 در آن نواحی کروموزومی مکان‌یابی شدند که قبلاً در آنها RGA هایی در گوجه‌فرنگی یا سیب‌زمینی شناسایی شده‌اند ولی این توالی‌ها با این RGA ها دارای همولوژی نبودند (جدول ۲ و شکل ۲).

تجزیه فیلوژنی RGA ها براساس توالی نوکلئوتیدی، آنها را به سه گروه مشخص تفکیک کرد. گروه اول شامل دو زیرگروه بود. زیرگروه اول شامل نشانگرهای NBS15F و NBS5A شامل نشانگرهای NBS13R را در بر گرفت. نشانگرهای NBS5A، NBS13R و NBS15F به ترتیب براساس موتیف‌های حفاظت شده Kin-2a، GLPL site و MHDV دامنه NBS طراحی شده بودند و موتیف‌های مختلف دامنه NBS را تکثیر کردند. در تجزیه فیلوژنی نیز آنها در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. Contig 18 در یک گروه منفرد (گروه سوم) قرار گرفت و شامل

جدول ۱- آغازگرهای اختصاصی NBS، آنزیم‌های برشی، تعداد نوارهای چندشکل، تعداد توالی‌های معتبر و تعداد توالی‌های معتبر که تشابه معنی‌داری با RGA ها یا ژن‌های مقاومت شناخته‌شده داشتند

Table 1. Specific NBS primers, enzymes used for cutting DNA, number of polymorphic bands, number of reliable sequences and number of reliable sequences that exhibited significant similarity with RGAs or known resistance genes

آغازگر Primer	توالی آغازگر Primer sequence	دمای اتصال AT (°C)	آنزیم Enzyme	نوارهای چندشکل Polymorphic bands	توالی‌های معتبر Reliable sequences	≠RGA
NBS13R	AAGAARCATGCDATATCTARAA	55	AluI, MseI, RsaI, HaeIII, TaqI	55	34	26
NBS12R	yTTsArsGCTAAAGGRAGRCC	55	AluI, MseI, RsaI, HaeIII, TaqI	-	-	.*
NBS12F	CTTTAGCbyTsAArkTGtkkGG	55	AluI, MseI, RsaI, HaeIII, TaqI	-	-	-
NBS15F	ATGCATGAyTTrATwvAAGAbA	55	AluI, MseI, RsaI, HaeIII, TaqI	92	33	27
NBS5A	YYTKRTHGTMITKGATGAYGTITGG	55	AluI, MseI, RsaI, HaeIII, TaqI	40	18	15
Total				187	85	68

≠RGA: تعداد توالی‌های معتبر که تشابه معنی‌داری با RGA ها یا ژن‌های مقاومت شناخته‌شده داشتند

≠RGA: Number of reliable sequences that exhibited significant similarity with RGAs or known resistance genes.

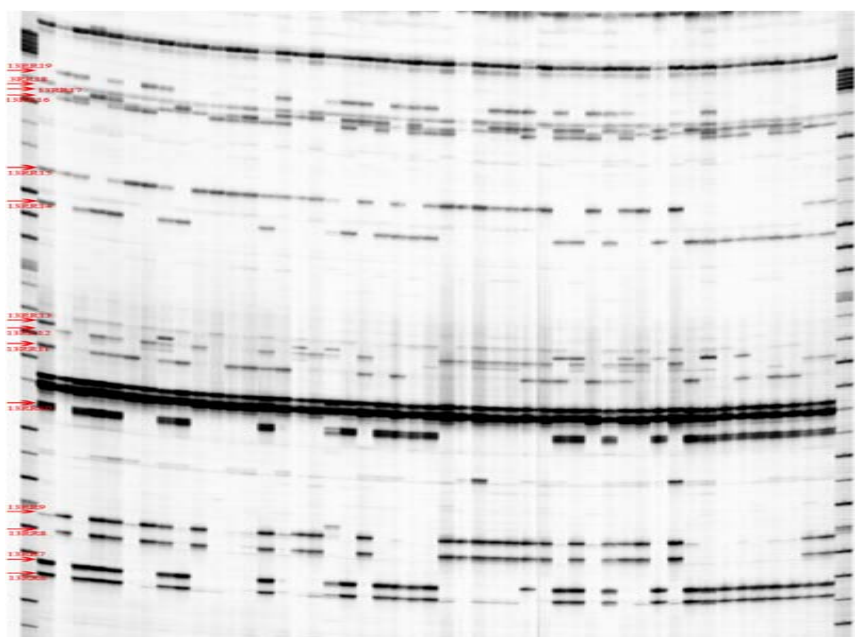
AT: Annealing Temperature.

*: The primers didn't amplify enough polymorphic bands.

G,A,T,C: Guanine, Adenine, Thymine, Cytosine. R: Purine (A or G), Y: Pyrimidine (T or C), W: A or T, S: G or C, M: A or C, K: G or T, H: A or T or C, B: G or C or T, V: G or A or C, D: G or A or T, I: Inosine

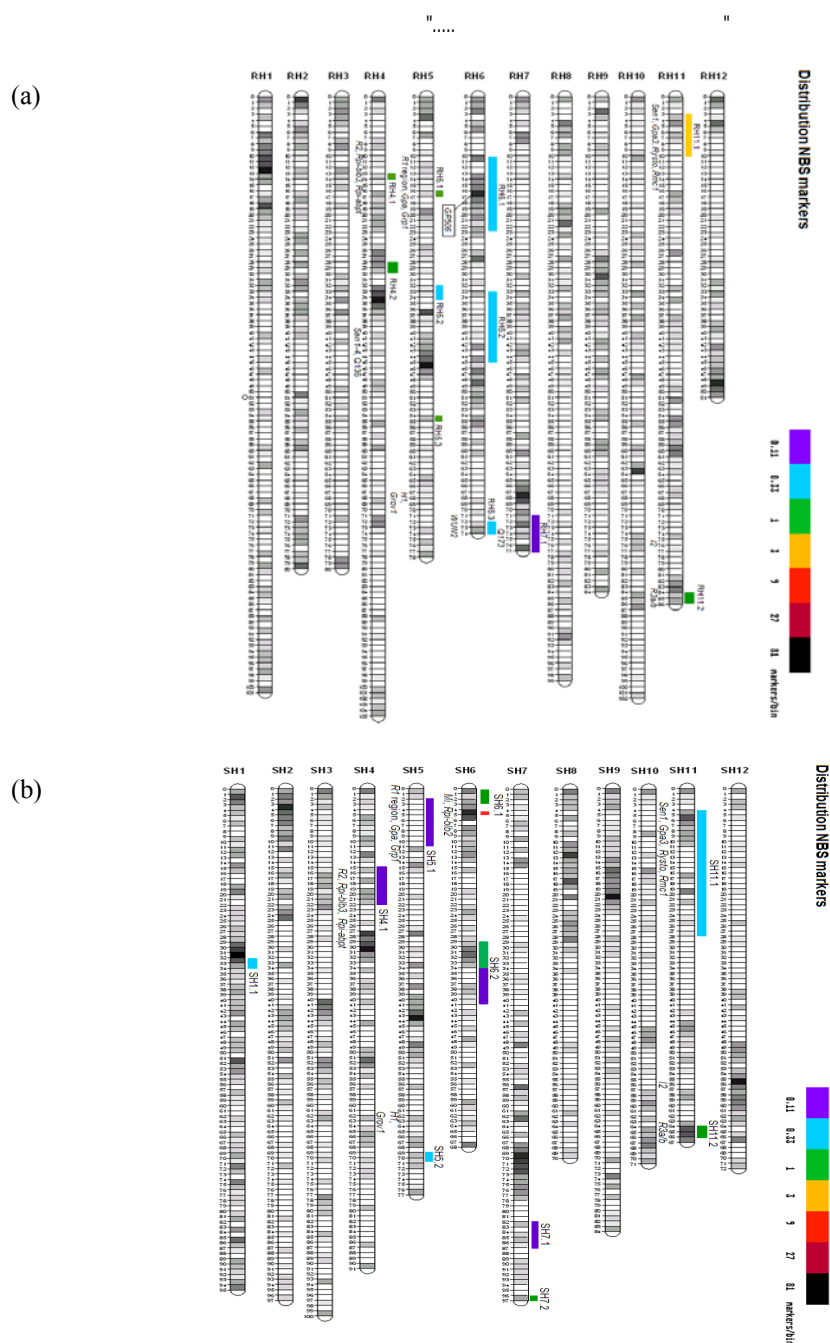
RGA ها را تکثیر می کند. وندر لیندن و همکاران (van der Linden *et al.*, 2004) در سیب زمینی، گوجه فرنگی، جو و کاهو، کالنج و همکاران (Calenge *et al.*, 2005) در سیب و بروگمنز و همکاران (Brugmans *et al.*, 2008) در سیب زمینی گزارش کردند که اکثریت قطعات تکثیر شده بوسیله تکنیک NBS profiling از ژن های مقاومت و RGA ها بدست آمده اند. بروگمنز و همکاران (Brugmans *et al.*, 2008) با استفاده از جمعیت حاضر و براساس آغازگرهای طراحی شده از موتیف های حفاظت شده درون دامنه NBS، ۳۴ RGA را مکان یابی کردند.

نشانگرهای 13RH1 و 13RR14 بود که در جایگاه RH11.1 قرار دارند و با پروتئین gag رتروترانسپوزون (Retrotransposon gag protein) و ژن های مقاومت همولوژی نشان دادند (شکل ۳). احتمال دارد این نشانگرها با رتروترانسپوزون های درج شده در قسمت اینترون ژن های مقاومت مرتبط بوده و یا حاصل تکثیر ژن های مقاومت از بین رفته ای باشند که عملکرد آنها به علت درج رتروترانسپوزونی از بین رفته است. توالی مشابه رتروترانسپوزون در نواحی غیررمز کننده ژن *Xa21* برنج نیز گزارش شده است (Song *et al.*, 1998). تکنیک NBS profiling یکی از روش های جداسازی ژن های مقاومت است که به طور اختصاصی



شکل ۱- الگوی نواری افراد جمعیت با استفاده از ترکیب آنزیم *RsaI* و آغازگر NBS13R در ژل Li-Cor. پیکانها جایگاه های نواری چندشکل را نشان می دهند که در میان ژنوتیپ ها ردیابی شده اند. سه چاهک اول از سمت چپ بترتیب عبارتند از نشانگر وزن مولکولی، والد RH و والد SH و بقیه چاهک ها مربوط به ۴۶ فرد از جمعیت می باشد

Fig. 1. The banding pattern of some individuals of the population using combination of *RsaI* enzyme and NBS13R primer on Li-Cor gel. Arrows indicate the positions of polymorphic bands that were detected among genotypes. Three wells from left side indicate ladder, RH parent and SH parent, respectively and other wells are related to 46 individuals from population



شکل ۲- جایگاه نسبی RGA ها در نقشه فوق اشباع سبب زمینی RH (a) و SH (b). هر کروموزوم شامل جایگاه‌هایی است که تعداد متفاوتی نشانگرهای AFLP در حال تفرق دارد. تعداد نشانگرها در هر جایگاه بوسیله سایه خاکستری (در سایه سفید، صفر و در سایه سیاه بیش از ۵۰۰ نشانگر وجود دارد) نشان داده شده است. خطوط سمت راست هر کروموزوم جایگاه نسبی RGA ها را نشان می‌دهد. جایگاه‌های *Sen1-4*, *R3a/b*, *Rpi-blb2*, *Rpi-blb3*, *Rpi-abpt*, *Gpa6*, *Gpa3*, *Sen1*, *RYsto*, *ST124*, *Rmc1*, *R1*, *R2*, *Grov1* & *H1*, *Gpa1* و *wun2* در سبب زمینی و جایگاه‌های *Mi*, *Q173*، *I2* و *Q136* در گوجه‌فرنگی شناسایی شده و در سمت چپ هر کروموزوم نشان داده شده‌اند.

Fig. 2. The relative positions of RGAs in the UHD map of potato of (a) RH and (b) SH. Each chromosome includes bins that contain different numbers of AFLP markers. The number of markers in each bin is represented by gray shading (white shading is 0 and black shading is more than 500). Bars in the right part show the relative positions of RGAs. The positions of *Sen1-4*, *R3a/b*, *Rpi-blb2*, *Rpi-blb3*, *Rpi-abpt*, *Gpa6*, *Gpa3*, *Sen1*, *RYsto*, *ST124*, *Rmc1*, *R1*, *R2*, *Grov1* & *H1*, *Gpa1* and *wun2* from potato and positions of *Mi*, *Q173*, *Sw5*, *I2* and *Q136* from tomato were identified and indicated in the left part of each chromosome

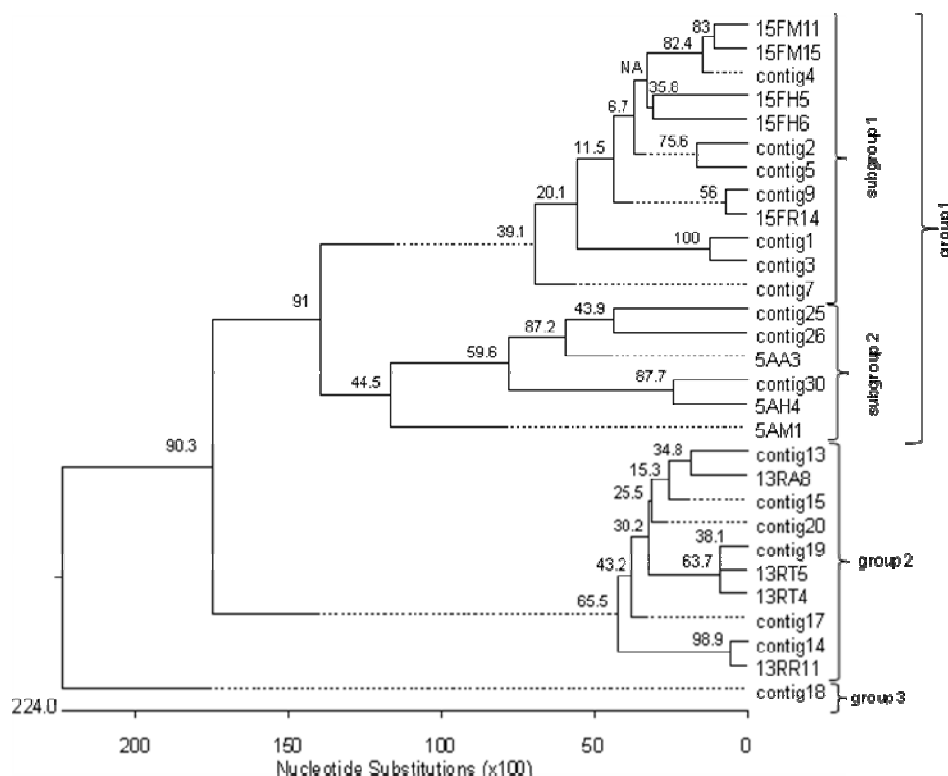
جدول ۲- نوارهای NBS profiling با همولوژی معنی دار با ژنهای مقاومت شناخته شده و RGA ها. نشانگرهای NBS15F، NBS13R و NBS5A به اختصار به صورت 15F، 13R و 5A نشان داده شده اند

Table 2. The NBS profiling bands that had significant homology with known resistance genes and RGAs.

NBS15F, NBS13R and NBS5A markers are shown as 15F, 13R and 5A, respectively

جایگاه Locus	فاصله Bin (Interval)	آغازگر/آنزیم Primer/Enzyme	شماره دسترسی توالی های همولوگ accession number Homologue	E میزان تشابه و ارزش value Score (bits) & E
RH4.1	14	5AH4	gb ABI30281.1 NBS-containing resistance-like protein	34.3 (4.0)
RH4.2	29-30	5AR5, 5AT3	gb AAV31189.2 NB-ARC domain containing protein	67.8 (3e-10)
RH5.1	17	5AT6	gb AAU95627.1 R1	135 (7e-55)
RH5.2	33-34	15FM8	TIR-NBS-LRR type disease resistance proteins	
RH5.3	55	13RA5	TIR-NBS-LRR type disease resistance proteins	
			emb CAA08797.1 NL25	
		13RA3, 15FH12,	gb AAZ95005.1 late blight resistance protein Rpi-blb2	42.4 (1e-06)
		15FT15, 15FH7, 5AH10,	gb AAC32252.1 disease resistance gene homolog Mi-copy2	88.6 (1e-21)
RH6.1	11-23	15FM16	TIR-NBS-LRR type disease resistance proteins	89.4 (1e-21)
RH6.2	34-45	13RT2, 15FT13, 13RR11	TIR-NBS-LRR type disease resistance proteins	
			gb AAG43546.1 AF211528_1 Avr9/Cf-9 rapidly elicited protein4	43.9(0.005)
RH6.3	73-74	15FT18	gb ACE79504.1 NBS-coding resistance gene analog	105 (4e-21)
RH7.1	72-77	5AT7	gb AAF04603.1 AF195939_1 disease resistance protein Gpa2	97.4 (8e-19)
				270 (6e-71)
		13RH1, 13RH2, 13RM4,	gb AAR21295.1 bacterial spot disease resistance protein4	
		15FR15, 15FH5, 15FM11	gb AAW28561.2 TMV resistance protein N	208-264 (1e-52 to 5e-69)
		, 15FR4, 13RT5, 13RT4,	emb CAA08798.1 NL27	150 (8e-47)
		13RA7, 13RR6, 13RR14,	emb CAA08797.1 NL25	137 (3e-31)
RH11.1	4-10	13RR15, 13RT10, 15FA7	TIR-NBS-LRR type disease resistance proteins	
		, 15FH4	gb ABV29168.1 disease resistance protein R3a-like protein	53.5-187 (6e-06 to 4e-46)
			gb AAU90287.1 Putative disease resistance protein I2C-5	53.5-185 (6e-06 to 1e-45)
RH11.2	85-86	5AM2, 5AR8, 5AM1	CC-NBS-LRR type disease resistance proteins	
			dbj BAD12594.1 N protein	
SH1.1	33-34	13RR21	TIR-NBS-LRR type disease resistance proteins	147 (6e-47)
SH4.1	16-22	5AR6	gb AAS9312.1 RPP13-like protein	85.9 (1e-15)
			gb AAR21295.1 bacterial spot disease resistance protein 4	
			gb AAW28561.2 TMV resistance protein N	270 (6e-71)
SH5.1	3-11	13RR19, 13RT8	TIR-NBS-LRR type disease resistance proteins	264 (5e-69)
			gb AAR21295.1 bacterial spot disease resistance protein 4	
			gb AAW28561.2 TMV resistance protein N	270 (6e-71)
SH5.2	70-71	13RA5	TIR-NBS-LRR type disease resistance proteins	264 (5e-69)
			gb AAZ95005.1 late blight resistance protein Rpi-blb2	88.6 (1e-21)
SH6.1	1-3	5AH5, 5AT2	gb AAC32252.1 disease resistance gene homolog Mi-copy2	89.4 (1e-21)
			emb CAA08797.1 NL25	
			gb AAR21295.1 bacterial spot disease resistance protein 4	
		13RA2, 13RM6,	gb AAF21317.1 AF121437_1 disease resistance protein A19	42.4 (1e-06)
		15FM2, 15FT17,	gb AAG43546.1 AF211528_1 Avr9/Cf-9 rapidly elicited	70.1 (7e-11)
		15FT19, 13RR16,	protein4	53.5 (9e-17)
SH6.1	5	15FT18	TIR-NBS-LRR type disease resistance proteins	43.9 (0.005)
			gb ACF22048.1 NBS-coding resistance gene protein	
		15FH9, 13RR12,	gb AAO23076.1 R 1 protein	63.2 (5e-13)
SH6.2	30-41	13RR9, 15FT12,	TIR-NBS-LRR type disease resistance proteins	45.8 (0.001)
		15FH10, 15FR13, 13RT2	gb AAG43546.1 AF211528_1 Avr9/Cf-9 rapidly elicited	
			protein4	71.2 (3e-11)
SH7.1	83-87	15FR14	gb ACE79504.1 NBS-coding resistance gene analog	105 (4e-21)
SH7.2	97	5AT7	emb CAA08798.1 NL27	
			gb AAW28561.2 TMV resistance protein N	150 (8e-47)
		13RT9, 13RA8,	gb AAT37497.1 N-like protein	104-180 (2e-42 to 5e-44)
		15FH6, 15FT7,	gb AAG43546.1 AF211528_1 Avr9/Cf-9 rapidly elicited	102-124 (2e-37 to 9e-21)
		15FT8, 13RA9,	protein4	77(5e-13)
		15FM15, 15FM5,	gb AAR21295.1 bacterial spot disease resistance protein4	
SH11.1	5-28	13RA7, 13RR15,	TIR-NBS-LRR type disease resistance proteins	70.1 (7e-11)
		13RT10, 15FH4	gb ABV29168.1 disease resistance protein R3a-like protein	187 (4e-46)
			gb AAU90287.1 Putative disease resistance protein I2C-5	185 (1e-45)
SH11.2	65-66	5AM4, 5AT1	CC-NBS-LRR type disease resistance proteins	

A: AluI, M: MseI, H: HaeIII, T: TaqI, R: RsaI



شکل ۳- روابط فیلوژنتیک بین توالی‌های نشانگرهای NBS براساس سطح نوکلئوتیدی. Contigها براساس برنامه SeqMan نرم‌افزار DNASTar بدست آمده‌اند. روابط فیلوژنتیک براساس برنامه MegAlign نرم‌افزار DNASTar با استفاده از روش Neighbor-joining بدست آمد و توالی نشانگر 13RA9 بنابر پیشنهاد نرم‌افزار به علت تفاوت بالا با توالی دیگر نشانگرها حذف گردید. درصد دقت در آنالیز Bootstrap برای ۱۰۰۰ چرخه در هر نقطه از خوشه‌بندی نشان داده شده است

Fig. 3. Phylogenetic relationships among sequences of NBS markers at nucleotide level. Contigs derived from SeqMan program of DNASTar software. Phylogenetic relationships derived by MegAlign program of DNASTar software based on Neighbor-joining method and sequence of 13RA9 marker was deleted based on suggestion of software because of high divergence of this marker with another markers. Percent of accuracy in bootstrap analysis for 1000 cycles are indicated at each branch point

به علت مکان‌یابی تعداد زیادی از RGA ها در جایگاه‌های RH11.1 و SH11.1، فاصله متوسط مکان‌یابی برابر با ۱/۷۰ جایگاه بود. هرچند که در برخی از جایگاه‌ها این فاصله به علت عدم وجود داده‌های نشانگری کافی در افراد مورد بررسی بیشتر از ۱/۷۰ جایگاه بدست آمد. لازم به ذکر است که کل افراد جمعیت برای تمام فاصله‌های موردنظر، نو ترکیبی نشان دادند. ولی با توجه به اینکه در پژوهش حاضر فقط بخش کوچکی از جمعیت مورد استفاده قرار گرفت، بنابراین احتمال نو ترکیبی در برخی از فاصله‌ها کمتر شده است. بروگمنز و همکاران (Brugmans *et al.*, 2008) بیان داشتند با افزایش تعداد افراد می‌توان دقت مکان‌یابی را بهبود بخشید. گروب و همکاران (Grube *et al.*, 2000) با مطالعه مقایسه‌ای سازمان ژنومی ژن‌های مقاومت و RGA ها در گوجه‌فرنگی، سب‌زمینی و فلفل گزارش کردند که علیرغم انطباق کم جایگاه ژنومی ژن‌هایی با فنوتیپ مشخص که مقاومت به عوامل بیماری‌زای خویشاوند یا یکسان را ایجاد می‌کنند، مکان‌های ژنی مقاومت به صورت معنی‌داری حفاظت شده‌اند. این موضوع نشان داد که جایگاه‌های کروموزومی خوشه‌های ژن‌های مقاومت به صورت گسترده‌ای در گونه‌زایی حفاظت

بروگمنز و همکاران (Brugmans *et al.*, 2008) بیان داشتند با افزایش تعداد افراد می‌توان دقت مکان‌یابی را بهبود بخشید. گروب و همکاران (Grube *et al.*, 2000) با مطالعه مقایسه‌ای سازمان ژنومی ژن‌های مقاومت و RGA ها در گوجه‌فرنگی، سب‌زمینی و فلفل گزارش کردند که علیرغم انطباق کم جایگاه ژنومی ژن‌هایی با فنوتیپ مشخص که مقاومت به عوامل بیماری‌زای خویشاوند یا یکسان را ایجاد می‌کنند، مکان‌های ژنی مقاومت به صورت معنی‌داری حفاظت شده‌اند. این موضوع نشان داد که جایگاه‌های کروموزومی خوشه‌های ژن‌های مقاومت به صورت گسترده‌ای در گونه‌زایی حفاظت

شده‌اند و ژنومیک مقایسه‌ای می‌تواند ابزاری مناسب برای شناسایی سریع ژن‌هایی باشد که از نظر ساختاری مشابه با ژن‌هایی هستند که تاکنون در جنس‌های خویشاوند مکان‌یابی شده‌اند.

نتایج این پژوهش نشان داد که اگرچه بسیاری از خوشه‌های ژنی مقاومت بین سیب‌زمینی و گوجه‌فرنگی حفاظت شده‌اند، ولی اغلب آنها ممکن است قسمتی از زیرخوشه‌های ناهمگن باشند که شامل بیش از یک خانواده RGA منفرد هستند. پن و همکاران (Pan et al., 2000a) در گوجه‌فرنگی پیوستگی بین ژن‌های مقاومت و توالی‌های دربردارنده NBS از منشاهای مختلف را گزارش کردند. مکان‌یابی این توالی‌ها در گوجه‌فرنگی براساس جمعیت‌های لاین‌های خالص نو ترکیب انجام گرفت که یک دقت نشانگری پایین ایجاد می‌کنند و بنابراین نشانگرها در یک فاصله ژنتیکی بزرگ قرار می‌گیرند. اگرچه دقت ژنتیکی مکان‌یابی این پژوهش در مقایسه با مطالعه پن و همکاران (Pan et al., 2000a) بالاتر بود، اما هنوز برای ترسیم نتایج داده‌های مکان‌یابی Profiling کافی نبوده است.

در آزمایش حاضر، خوشه‌های ژنی با نشانگرهای دارای همولوژی با ژن‌های مقاومت شناخته‌شده و RGA ها در ابتدای کروموزوم ۱۱ در والدین RH و SH با عنوان‌های RH11.1 و SH11.1 مکان‌یابی شدند. ابتدای کروموزوم ۱۱ جایگاه‌ها ژن‌های *Sen1* (ژن مقاومت به *S. endobioticum*)، *Gpa3* (ژن مقاومت به *G. pallid*)، *RYsto* (ژن مقاومت به *Potato Virus Y*) و *Rmc1* (ژن مقاومت به *M. chitwodii*) است (Simko et al., 2007) اما RGA های جایگاه‌های RH11.1 و SH11.1 با این ژن‌ها همولوژی نشان ندادند. جایگاه‌های RH4.1، RH6.1، RH7.1، RH4.1، RH6.1، RH7.1، RH4.1 و SH5.1 به ترتیب با نشانگرهای مرتبط با ژن‌های مقاومت و مکان‌های ژنی مقاومت *R2* و *Rpi-blb3* و *Rpi-abpt*، *GP506*، *WUN2*، *Q173* و *R2* و *Rpi-blb3* و *Rpi-abpt*،

R1 region، *Gpa* و *Grp1* جایگاه یکسان داشتند که دلیل بر وجود خوشه (هایی) از ژن (های) مقاومت در این مکان‌های ژنی می‌باشد. در جایگاه‌های RH6.1، SH6.1 و SH6.2 خوشه یا زیرخوشه‌ای از RGA ها قرار داشتند. جایگاه‌های RH5.1، RH11.2، SH6.1 (فاصله ۳-۱) و SH11.2 از نظر توالی نوکلئوتیدی و نیز از نظر جایگاه کروموزومی به ترتیب با ژن‌های *R1*، *I2GA* و *R3a*، *Rpi-blb2* و *Mi-copy2*، *I2GA* و *R3a* همولوژی داشتند. پژوهش‌های مختلف نشان داده‌اند که توالی‌های NBS-LRR یا آنالوگ‌های ژن‌های مقاومت در دیگر گونه‌های گیاهی نیز در گروه‌های بزرگ سازمان‌دهی شده‌اند. معماری ژنومی توالی‌های RGA و ژن‌های مقاومت حقیقی به‌عنوان یک منبع تنوع توالی‌ها و تکامل آنها مورد توجه قرار گرفته است. بیشتر توالی‌های NBS-LRR براساس پراکنش کروموزومی خود گروه‌بندی شده‌اند. همچنین توالی‌های NBS-LRR در یک کروموزوم خاص با تکرار بیشتری نسبت به دیگر کروموزوم‌ها قرار می‌گیرند (Meyers et al., 2003). در آراییدوپسیس، ۷۳/۲ درصد ژن‌های NBS-LRR (۱۰۹ ژن از میان ۱۴۹ ژن) در ۴۳ گروه توزیع شده‌اند (Richly et al., 2002). در این تحقیق ۳۷ RGA موجود در RH در ۱۱ گروه و ۳۹ RGA موجود در SH در ۱۰ گروه توزیع شدند. گمان می‌رود ساختار فیزیکی این گروه‌ها در ایجاد و حفظ تنوع ژن‌های مقاومت دخالت داشته باشند.

تکنیک NBS profiling با هدف قرار دادن گروه‌ها و زیرگروه‌های ژن‌های مقاومت و خوشه‌های ژنی اختصاصی، شناسایی نشانگرهای کاملاً پیوسته با مکان‌های ژنی مقاومت به بیماری را امکان‌پذیر می‌سازد. از این طریق علاوه بر اعضای جدید خوشه‌های موجود، شناسایی خوشه‌های ژنی مقاومت فرضی جدید نیز ممکن است (van der Linden et al., 2004).

مقاومت واکنش‌ها در انجام این پژوهش
سپاسگزاری می‌نمایند.

سپاسگزاری
نگارندگان این مقاله صمیمانه از همکاری موسسه
تحقیقات بین‌المللی گیاهی و گروه اصلاح نباتات بخش

References

منابع مورد استفاده

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402.
- Baker, B., P. Zambriski, B. Staskawicz and S. P. Dinesh-Kumar. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. *Science* 276: 726-733.
- Brugmans, B., D. Wouters, H. van Os, R. Hutten, G. van der Linden, R. G. F. Visser, H. J. van Eck and E. A. G. van der Vossen. 2008. Genetic mapping and transcription analyses of resistance gene loci in potato using NBS profiling. *Theor. Appl. Genet.* 117: 1379–1388.
- Calenge, F., C. G. van der Linden, E. van de Weg, H. J. Schouten, G. van Arkel, C. Denancé and C. E. Durel. 2005. Resistance gene analogues identified through the NBS profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple. *Theor. Appl. Genet.* 110: 660–668.
- Carcia-Mas, J., H. van Leeuwen, A. Monfort, C. de Vicente, P. Puigdomenech and P. Arus. 2001. Cloning and mapping of resistance gene homologous in melon. *Plant Sci.* 161: 165-172.
- Chen, X. M., R. F. Line and H. Leung. 1998. Genome scanning for resistance-gene analogs in rice, barley, and wheat by high resolution electrophoresis. *Theor. Appl. Genet.* 97: 345–355.
- Fulton, T. M., J. Chunwongse and S. D. Tanksley. 1995. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 13: 207–209.
- Gebhardt, C. and J. P. T. Valkonen. 2001. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 79–102.
- Geffroy, V., M. Seignac, J. C. F. De Oliveira, G. Fouilloux, P. Skroch, P. Thoquet, P. Gepts, T. Langin and M. Dron. 2000. Inheritance of partial resistance against *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phasiolus vulgaris* and co-localization of quantitative trait loci with genes involved in specific resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 287–296.
- Grube, R. C., E. R. Radwanski and M. Jahn. 2000. Comparative genetics of disease resistance within the solanaceae. *Genetics* 155: 873–887.
- Hulbert, S. H., C. A. Webb, S. M. Smith and Q. Sun. 2001. Resistance gene complexes: Evolution and utilization. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39: 285-312.
- Isidore E., H. van Os, S. Andrzejewski, J. Bakker, I. Barrena, G. J. Bryan, J. Buntjer, B. Caromel, H. J. van Eck, B. Ghareeb, W. De Jong, P. van Koert, V. Lefebvre, D. Milbourne, E. Ritter, J. N. A. M.

- Roupe van der Voort, F. Rousselle-Bourgeois, J. van Vliet and R. Waugh. 2003.** Toward a marker-dense meiotic map of the potato genome: Lessons from linkage group I. *Genetics* 165 (4): 2107–2116.
- Kanazin, V., L. F. Marek and R. C. Shoemaker. 1996.** Resistance gene analogs are conserved and clustered in soybean. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 11746-11750.
- Leister, D., A. Ballvora, F. Salamini and C. Gebhardt. 1996.** A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. *Nat. Genet.* 14: 421–429.
- Meyer, S., A. Nagel and C. Gebhardt. 2005.** PoMaMo-a comprehensive database for potato genome data. *Nucleic Acids Res.* 33: D666-D670.
- Meyers, B. C., A. W. Dickerman, R. W. Michelmore, S. Sivaramakrishnan, B. W. Sobral and N. D. Young. 1999.** Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant J.* 20(3): 317-332.
- Meyers, B. C., A. Kozik, A. Griego, H. Kuang and R. W. Michelmore. 2003.** Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 809-834.
- Michelmore, R., 2000.** Genomic approaches to plant disease resistance. *Current Opinion Plant Biol.* 3: 125-131.
- Noir, S., M. C. Combes, F. Anthony and P. Lashermes. 2001.** Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). *Mol. Genet. Genomics* 265: 654-662.
- Pan, Q., Y. Liu, O. Budai-Hadrian, M. Sela, L. Carmal-Goren, D. Zamir and R. Fluhr. 2000a.** Comparative genetics of nucleotide binding site leucine rich repeat resistance gene homologues in the genomes of two dicotyledons: Tomato and *Arabidopsis*. *Genetics* 155: 309– 322.
- Pan, Q., J. Wendel and R. Fluhr. 2000b.** Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. *J. Mol. Evol.* 50: 203-213.
- Richly, E., J. Kurth and D. Leister. 2002.** Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. *Mol. Biol. Evol.* 19: 76-84.
- Roupe van der Voort, J., P. Wolters, R. Folkertsma, R. Hutten, P. van Zandvoort, H. Vinke, K. Kanyuka, A. Bendahmane, E. Jacobsen, R. Janssen and J. Bakker. 1997.** Mapping of the cyst nematode resistance locus Gpa2 in potato using a strategy based on comigrating AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 95: 874–880.
- Simko, I., S. Jansky, S. Stephenson and D. Spooner. 2007.** Genetics of resistance to pests and disease. pp 117-147. In: Vreugdenhil D. *et al.* (Eds). *Potato biology and biotechnology advances and perspectives*. Elsevier Ltd.
- Song, W. Y., L. Y. Pi, T. E. Bureau and P. C. Ronald. 1998.** Identification and characterization of 14 transposon-like elements in the noncoding regions of members of the *Xa21* family of disease resistance genes in rice. *Mol. Gen. Genet.* 258: 449–456.
- Staskawicz, B. J., F. M. Ausubel, B. J. Baker, J. G. Ellis and J. D. G. Jones. 1995.** Molecular genetics of

plant disease resistance. *Science* 268: 661-667.

- Timmerman-Vaughan, G. M., T. J. Frew and N. F. Weeden. 2000.** Characterization and linkage mapping of R-gene analogous DNA sequences in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 241–247.
- van der Linden, G., D. Wouters, V. Mihalka, E. Kochieva, M. Smulders and B. Vosman. 2004.** Efficient targeting of plant disease resistance loci using NBS profiling. *Theor. Appl. Genet.* 109: 384–393.
- van Os, H., S. Andrzejewski, E. Bakker, I. Barrena, G. Bryan, B. Caromal, B. Ghareeb, E. Isidore, W. de Jong, P. van Koert, V. Lefebvre, D. Milbourne, E. Ritter, J. Rouppe van der Voort, F. Rousselle-Bourgeois, J. van Vliet, R. Waugh, J. Visser and H. van Eck. 2006.** Construction of a 10,000-marker ultradense genetic recombination map of potato: Providing a framework for accelerated gene isolation and a genome wide physical map. *Genetics* 173: 1075–1087.
- Vision, T. J., D. G. Brown, D. B. Shmoys, R. T. Durrett and S. D. Tanksley. 1999.** Selective mapping: A strategy for optimizing the construction of high-density linkage maps. *Genetics* 155: 407–420.

Identification of resistance gene analogues (RGAs) in F1 mapping population of potato using NBS profiling technique

Dejestan, S.¹, M. Moghadam², S. A. Mohammadi², S. Aharizad³ and J. Osen⁴

ABSTRACT

Dejestan S., M. Moghadam, S.A., Mohammadi, S., Aharizad and J., Osen. 2010. Identification of resistance gene analogues (RGAs) in F1 mapping population of potato using NBS profiling technique. *Iranian Journal of Crop Sciences*. 12 (2): 185-198 (in Persian).

To identify and isolate resistance gene analogues (RGAs) in potato, 46 genotypes from F1 diploid mapping population of SH × RH with highest recombination were assessed by NBS profiling technique in the genomics laboratory of Wageningen University, The Netherlands. Using five degenerate primers, that were designed based on conserved motifs NBS domain, in total, 187 polymorphic markers were produced and mapped in relation to AFLP map of the population comprising 10,000 markers. Following sequencing and alignment of several markers, 68 of them revealed homology between known resistance genes or TIR-NBS-LRR type disease resistance proteins. Seven of these RGAs showed similar genetic position and sequence with resistance genes identified in potato or tomato. Thirty seven of the sequenced RGAs were mapped in the chromosomal regions similar to resistance genes or RGAs identified in tomato or potato without having sequence homology with these resistance genes or RGAs, and the rest of RGAs were mapped in positions where no RGA was reported, before. The majority of the RGAs were positioned in new or existing clusters or sub-clusters in the map. Phylogenetic analysis revealed the grouping of RGA sequences based on degenerate primers that were used for amplification. The result of this research could be used in mapping of single resistance genes and quantitative resistance loci.

Key Words: NBS profiling, Mapping population, Potato and Resistance Gene Analogues (RGAs).

Received: June, 2008

Accepted: October, 2009

1- Ph.D. Student,, Faculty of Agriculture, Univesity of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Professor, Faculty of Agriculture, Univesity of Tabriz, Tabriz, Iran (Corresponding author)

(Email: moghaddamv@yahoo.com)

3- Professor, Faculty of Agriculture, Univesity of Tabriz, Tabriz, Iran

4- Scientist, International Plant Research Institute, Wageningen, The Netherlands