همسانه‌سازی کارکردی ژنهای مقاومت به بلایت دیررس سیب زمینی در ژنوتیپ محک سولانوم دمیسوم

سیدمحمدمهدی مرتضویان[۱]، عباسعلی زالی[۲]، علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری[۲]، محمدرضا بی‌همتا[۲]، ادوین ون‌در ووسن[۳]، جک ووسن[۳]

چکیده

ارقام محک دمیسوم جهت تعیین نژاد ایزوله‌های پاتوژن اهمیت جهانی دارند. شناسایی آلل‌های جدید مقاوم در برابر ایزوله های پاتوژن جهت ایجاد مقاومت پایدار از موارد مورد تاکید به‌نژادگران گیاهی است. مطالعات اخیر، نشان‌دهنده حضور ژن‌ها یا آلل‌های هومولوگ *R3* و *R2* در ژنوتیپ Ma.R9 سولانوم دمیسوم می‌باشد. با توجه به مقاومت این ژنوتیپ در مطالعات مختلف در برابر ایزوله‌های شایع، شناسایی و همسانه‌سازی ژن‌های مقاوم موجود در آن با روش ژن کاندید مورد مطالعه قرار گرفت. براساس نتایج این آزمایش برای نخستین‌بار وجود ژن *R3a* در این ژنوتیپ به تایید رسید. از سوی دیگر از بین هومولوگ‌های ژن *R2*، هومولوگ فعال این ژن همسانه‌سازی و توالی‌یابی گردید و فعالیت مشابه آن با ژن *R2* با روش اینفیلتراسیون همزمان تایید گردید. لذا برای نخستین بار، گزارش وجود دو ژن با واکنش متفاوت در برابر ایزوله‌های پاتوژن در این ژنوتیپ می‌تواند دلیلی بر پایداری نسبی این ژنوتیپ در برابر ایزوله‌های مختلف مورد مطالعه در کشورها و سال‌های مختلف باشد. همچنین نتایج این آزمایش تاییدی بر کارایی بالای روش افکتورومیکس درجهت شناسایی ژن‌ها و آلل‌های جدید می‌باشد. همخوانی دو ژن *R2* و هومولوگ آن در سطح اسیدآمینه نشان‌دهنده حفظشدگی کامل ناحیه LRR و حذف، اضافه و جانشینی در بین واحدهای ناحیه NBS می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: همسانه‌سازی، هومولوگ های *R2 R3*، Ma.R9، بلایت دیررس، سولانوم دمیسوم.

مقدمه

سیب‌زمینی در چهار قرن گذشته دستخوش تغییرات بیولوژیکی عمده‌ای قرار گرفته بنحویکه باعث شده جایگاه آن بعنوان چهارمین محصول زراعی مهم در دنیا بعد از گندم، ذرت و برنج با تولید جهانی ۳۱۱ میلیون تن در سطح ۱۸/۹ میلیون هکتار قرار گیرد (*http://faostat.fao.org*). مطالعه الگوی فعلی مصرف مواد غذایی کشور، حاکی از درصد بالای تامین انرژی از غلات و کربوهیدرات ها و عدم تنوع کافی محصولات غذایی می‌باشد. لذا در الگوی غذایی مطلوب پیشنهادی موسسه پژوهش های برنامه ریزی و اقتصاد کشاورزی وزرات جهاد کشاورزی برای مصرف گندم، برنج و قند و شکر کاهش نسبی و در مقابل برای انواع سبزی و میوه و حبوبات افزایش درنظر گرفته شده است. در خصوص سیب‌زمینی نیز ضرورت افزایش مصرف و جایگزینی آن با بخشی از مصرف برنج و نان مورد تاکید قرار گرفته است. از آنجا که یکی از پاتوژن‌های مهم سیب‌زمینی در ایران با توانایی بسیاربالا در ایجاد تنوع و تکامل، با توجه به حضور دو فرم جنسی و غیر جنسی آن، بیماری سفیدک دروغی یا بلایت دیررس سیب‌زمینی است و در سال های مختلف بخصوص در استان های شمالی کشور گسترش آن مشاهده شده است لازم است نسبت به شناسایی و معرفی ارقام مقاوم و اصلاح در جهت ایجاد مقاومت پایدار گام نهاد. در این راستا شناسایی آلل‌ها و یا ژن‌های مقاوم جدید با روش های نوین مولکولی و ادغام مجموعه ای از آنها می‌تواند یکی از راههای موثر در مبارزه علیه این بیماری محسوب شود. یکی از روش های ایجاد

۱، ۲ و ۳- به ترتیب، دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی و مهندسی ژنتیک و اعضای هیئت علمی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران و اعضای هیئت علمی مرکز تحقیقات گیاهی هلند، دانشگاه واخنینگن.

مقاومت پایدار استفاده از هرمی کردن ژن‌های فعال یا آلل‌های مختلف بدست آمده از گونه‌های مختلف است. از میان گونه‌های غده‌ای جنس سولانوم، سولانوم دمیسوم[1] کاراترین گونه وحشی مورد استفاده تا امروز جهت ایجاد مقاومت در برابر بلایت دیررس سیب‌زمینی است. این الوهگزاپلوئید می‌تواند بطور مستقیم با گونه‌های زراعی سولانوم توبروسوم تلاقی یابد. لذا تا بحال ۱۱ ژن مقاومت اصلی (ژن R) از این گونه به سیب‌زمینی زراعی انتقال یافته اند (۴، ۱۷). این یازده ژن مقاومت در قرن گذشته شناسایی شده اند که *R1* تا *R11* را تشکیل می‌دهند. هفت ژن از یازده ژن اصلی شناسایی شده تا بحال نقشه یابی و چهار ژن از این یازده ژن در ارقام مختلف بصورت تک ژن‌های مقاومت یا در ترکیب با یکدیگر استفاده شده اند (۹). ارقام محک دمیسوم جهت تعیین نژاد ایزوله های پاتوژن اهمیت جهانی دارند. از سوی دیگر، تشخیص ژن‌های غیربیماریزای پاتوژن، مبتنی بر ژن‌های مقاومت اصلی موجود در این ارقام محک است. لذا تعیین اینکه چند ژن مقاومت در هر رقم محک وجود دارد از اهمیت بسزایی برخوردار است. روش کاوش آللی[2] بعنوان روشی امیدوارکننده باعث تسهیل در شناسایی ژن‌های مقاومت می گردد و تا حدی تکامل ژن‌های مقاومت را نیز روشن می‌نماید (۲۴). اامیست‌ها[3] بر روی بافت‌های گیاهی با تغییر سیستم دفاعی سلول گیاهی و به‌کمک دسته‌ای از پروتئین‌های افکتور تکثیر می‌یابند. این افکتورها بعنوان مولکول‌هایی شناخته می‌شوند که ساختار و فعالیت سلول میزبان را تغییر داده و لذا موجب تسهیل آلودگی (عوامل بیماریزا یا توکسین‌ها) و یا راه‌اندازی پاسخ‌های دفاعی (عوامل غیربیماریزا یا الیسیتورها) می گردند (۲۱). افکتور ژنومیکس یا افکتورومیکس در جداسازی سریع ژن‌های مقاومت از طریق کاوش‌آللی بسیار موثر است. براساس این روش، همولوگ‌های بین گونه‌ای ژن‌های مقاومت بسیار راحت‌تر می‌توانند شناسایی و جداسازی شده و در گروه‌های مختلف قرار گیرند. اعضای یک گروه با طیف مقاومت مشابه ممکن است در گونه‌های مختلفی یافت شوند. این نتایج بخصوص در ایجاد مقاومت پایدار که در آن ژن‌های مقاومت همسانه سازی شده و ترجیحا متعلق به گروههای مختلف جهت ترانسفورماسیون سیسژنیک ارقام سیب‌زمینی استفاده می‌شود می‌تواند بسیار مفید باشد (۹). کلیه ژن‌های همسانه‌سازی شده مقاومت به بلایت دیررس متعلق به دسته NBS-LRR ها هستند (۶). ژن Av*R3a* با ژن *R3a* مقاومت در گونه‌های وحشی دمیسوم مرتبط بوده و مشخص شده این ژن پروتئینی در سیتوپلاسم میزبان ترشح می‌نماید که مرگ سلولی مربوط به *R3a* را به راه می‌اندازد. با استفاده از Av*R3a* بعنوان یک اامیست‌ها مدل، ویسون و همکاران (۲۶) نشان دادند که موتیف RXLR-EER برای جابجایی داخل سلول های میزبان سیب‌زمینی لازم است. تجزیه های محاسباتی نشان می‌دهد که تقریبا ۲۰۰ افکتور RXLR-EER کاندید در ژنوم فیتوفتورا اینفستانس وجود دارد (۱۴). هر دو نوع مقاومت اختصاصی و غیراختصاصی به *P.infestans* در گونه‌های وحشی و زراعی سیب‌زمینی دیده می‌شود (۲۵). از جمله ژن‌های با مقاومت اختصاصی ژن *R1* سولانوم دمیسوم و از جمله تک ژن‌هایی که ایجاد مقاومت عمومی می‌نماید ژن *RB* یا *Rpi-blb1* است که از *S. bublocastanm* بدست آمده است. بس و همکاران (۵) نشان دادند دو آلل Av*R3a* که در غیر بیماریزایی گیاهان حامل ژن *R3a* نقش دارند پروتئین‌هایی ترشح مینمایند که تنها در سه واحد که دوتای آنها در پروتئین کامل می‌باشند اختلاف دارند. ایزوله‌های غیر بیماریزای حامل آلل Av*R3a*، پروتئین AV*R3a*KI را کد می کنند در حالیکه ایزوله‌های بیماریزا تنها آلل بیماریزای av*R3a* کد کننده AV*R3a*EM را دارند. پاسخ فوق حساسیت تنها در برهمکنش بین پروتئین‌های AV*R3a*KI و محصول ژن *R3a* دیده شد. مشخص شده است که ۷۵ اسید امینه ناحیه انتهای کربوکسیل AV*R3a*KI که ناحیه RXLR را نیز شامل می‌شود برای غیربیماریزایی و توقف فعالیت‌ها لازم است در حالیکه ناحیه انتهای امینو در انتقال و هدف‌گیری نقش دارند اما برای فعالیت افکتور لازم نیستند. این محققین همچنین دریافتند که هر دو اسید امینه پلی مورفیک (واحد ۸۰) K و (واحد ۱۰۳) I مربوط به AV*R3a* کامل در فعالیت افکتور نقش دارند. براساس مطالعات شامپورت (۲۰۰۸) بین ژنهای RD11 و Av*R2*، ۲۳ درصد و براساس دامین کارکردی این دو، ۶۳ درصد

1- *Solanum demissum* 2- Allele mining 3- Oomycetes

همولوژی وجود دارد. جهت پی بردن به مکانیزم مقاومت ایجاد شده توسط ژن *RB* در سولانوم بالباکاستانوم[1]، اثر دو ژن *Rar1* و *Sgt1* در مقاومت به LB مورد بررسی قرار گرفت (۳). برخلاف مقاومت ایجاد شده توسط اکثر ژنهای بزرگ اثر، RB پیشرفت بیماری را کند نموده اما مانع ظهور علائم بیماری نمی‌شود. مشخص شده که *Rar1* و *Sgt1* در تنظیم تظاهر ژن *RB* نقش دارند (۱۲). در مطالعات مختلف روی ارقام محک، R9 بعنوان یکی از امیدبخش ترین ارقام دمیسوم مقاوم در برابر ایزوله‌های فایتوفتورا اینفستانس شناسایی شده است. در مطالعه لتینن و همکاران (۱۵) هیچ ایزوله‌ای که بیماریزایی روی R9 نشان دهد مشاهده نشد. این محققین علت این امررا نبود فشار گزینشی عنوان نمودند. براساس مطالعه مرتضویان و همکاران (۲۰۰۸) با استفاده از روش افکتورومیکس، ژنوتیپ محک Ma.R9 حاوی ژن همولوگ *R2* و براساس نظر هوانگ و همکاران (۱۱)، با استفاده از داده های مارکر مولکولی حاوی ژن *R3a* می‌باشد لذا در این پژوهش با استفاده از روش ژن کاندید اقدام به همسانه سازی این ژن‌ها گردید.

مواد و روش‌ها

DNA ژنومی از برگ‌های جوان ژنوتیپ Ma.R9 با روش فولتون و همکاران (۸) استخراج شد. مجموعه توالی‌های همولوگ با *R3a* به طول ۳۸۴۹ جفت باز موجود در بانک‌های اطلاعاتی با استفاده از موتور جستجوی BLAST بدست آمد. جهت تشکیل روابط فیلوژنتیک بین توالی های بدست آمده از برنامه Megalign v.8 استفاده شد. آغازگرهای هرز براساس گروه‌های فیلوژنتیک جهت تکثیر کامل ORF مربوط به خانواده ژنی *R3a* و نیز آغازگرهای مربوط به ژن *R2* طراحی گردید (جدول۱). جهت تکثیر دقیق خانواده های ژنی از آنزیم فیوژن استفاده شد. واکنش پی سی آر به حجم ۲۰ µl شامل ۵۰ pmol آغازگر، ۲۰۰ µmol/l دی ان تی پی، ۰/۰۲ U/µl آنزیم فیوژن پلیمراز و ۵۰ نانوگرم دی ان ای ژنومی و طبق برنامه زیرصورت گرفت. برنامه مورد استفاده جهت تکثیر خانواده های ژنی *R3a* برای گروه های یک، دو و چهار: ۳۰ ثانیه در ۹۸ درجه، ۳۵ سیکل شامل ۱۰ ثانیه در ۹۸ درجه، ۴۵ ثانیه در ۶۵ درجه، ۱۸۰ ثانیه در ۷۲ درجه و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه و برنامه مورد استفاده جهت تکثیر گروه سه : ۳۰ ثانیه در ۹۸ درجه، ۳۵ سیکل شامل ۱۰ ثانیه در ۹۸ درجه، ۴۵ ثانیه در ۶۲ درجه، ۱۸۰ ثانیه در ۷۲ درجه و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه انجام شد. جهت تکثیر ژن های همولوگ *R2* برنامه پی سی آر بصورت: ۳۰ ثانیه در ۹۸ درجه، ۳۵ سیکل شامل ۱۰ ثانیه در ۹۸ درجه، ۱۵۰ ثانیه در ۷۲ درجه و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه صورت پذیرفت.

محصول پی سی آر پس از جداسازی از ژل و خالص‌سازی و یا پس از حذف آغازگرهای جفت شده با استفاده از محلول 30% PEG8000/30mM Mgcl2، در ناقل

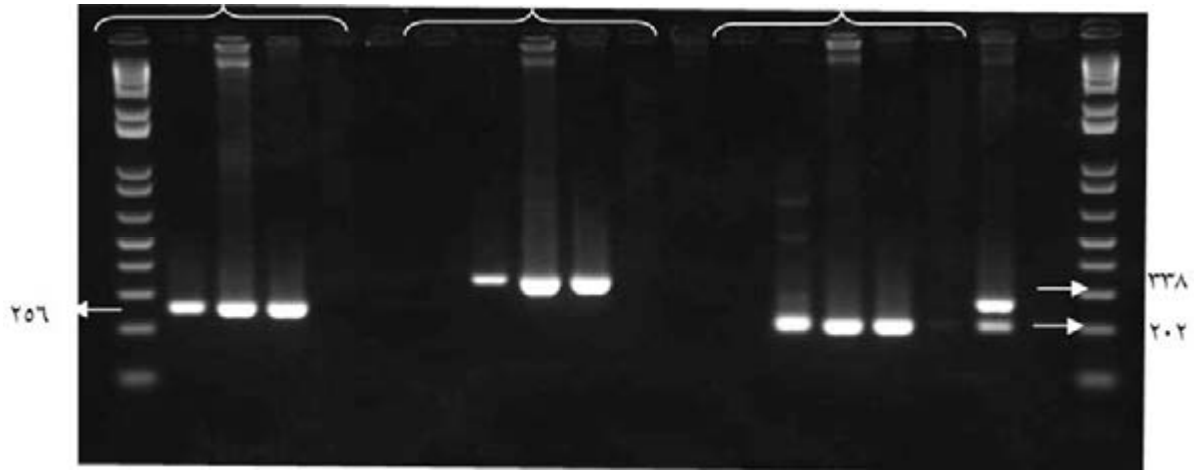
جدول۱: آغازگرهای مورد استفاده جهت همسانه‌سازی ژن‌های همولوگ *R3a* (بازهای با حروف کوچک ناحیه لازم برای واکنش LR، F آغازگر رفت و R آغازگر برگشتی می‌باشد)

Gateway pDON*R221* vector:	Sequence	Length (bp)
R3a-GatBP-F	*GGGGCAACTTTgtacaaaaaagttg*ATGGAGATTGGCTTAGCAGTTGGTG	50
R3a-GatBP-R	*GGGGCAACTTTGTACAACaaagttg*TCACATGCATTCCCTATCGATCTT	49
pENTR D-Topo Vector:	Sequence	Length (bp)
R3a-Clade1-F	caccATGGAGATTGGSTTARCARTTGGTGGTG	32
R3a-Clade1-R	AMAKRYATTYCCHATYGATNWBTATGGTGGRA	32
R3a-Clade2-F	caccATGGAKATTGGCTTWGCWGTTGGTGGKGC	33
R3a-Clade2,3-R	AYWGGDATYYCMHATYRMTAWHTATGGTGGRRAT	34
R3a-Clade3,4-F	ATGGADATTGGCTTAGCAGTTGGTKGT	27
R3a-Clade4-R	TCACAGSYATTYCYCATYGATCTKTATAGTGGAA	34

H=A or C or T ،S=G or C، W= A or T ،Y= T or C ،K= G or T،M= A or C ،R= G or A

1-S. bulbocastanum

پلاسمیدی D-TOPO و pDON*R*221 الحاق شد. پلاسمیدهای نوترکیب داخل سلول‌های باکتریایی مستعد *E.coli* سویه TOP10 تراریخت شد. باکتریهای تراریخت در محیط کشت LB جامد حاوی آنتی‌بیوتیک انتخابی کانامایسین (۵۰ mg/ml) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۸ ساعت مورد کشت قرار گرفتند. همسانه‌های حاوی ژن مورد نظر از طریق کلونی پی سی آر با استفاده از ترکیب آغازگرهای M13F و آغازگر انتخابی داخل ژن شناسایی شدند. DNA پلاسمیدها با استفاده از روش مینی پرپ استخراج شده و مورد توالی‌یابی قرارگرفت. تجزیه توالی، بررسی همخوانی و بررسی روابط فیلوژنی با نرم افزارهای Seqman v.7 ، MEGALIGN v.7 و CLUSTUL-W انجام شد. جهت بررسی تظاهر ژن طی واکنش LR با واسطه آنزیم LR Clonase شرکت اینویتروژن، الحاق آغاز کننده و خاتمه دهنده ژن *Rpi-blb3* در ناقل بیان دوتایی 236pKGW-MGW صورت گرفته و پس از تکثیر در باکتری‌های مستعد ایشریشیا کلی[1] همسانه‌های مورد نظر با روش کلونی پی سی آر، تعیین شدند. همسانه‌های موردنظر پس از هضم با آنزیم برشی و مقایسه با الگوی پیش‌بینی شده توسط نرم افزار ApE شناسایی و پس از استخراج DNA در ناقل اگروباکتریوم سویه COR308 با روش الکتروپوریشن منتقل شدند. اگروباکتریوم‌های تراریخت در محیط کشت LB حاوی تتراسایکلین (۴ µg/ml) و اسپکتینومایسین (۱۰۰ µg/ml) به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت رشد داده شده و همسانه‌های مثبت در گزینش مقدماتی با روش کلونی پی سی آر شناسایی شدند. جهت تایید و نیز بررسی پایداری سازه منتقل شده به ناقل باکتریایی، استخراج پلاسمید و انتقال به ناقل باکتریایی مستعد ایشریشیا کلی DH5Alpha صورت گرفت. بررسی نتایج هضم پنج همسانه تصادفی، پس از استخراج پلاسمید، مورد بررسی قرار گرفت. اگروباکتریوم‌های مورد نظر پس از رسیدن به مرحله رشد لگاریتمی و تعیین OD سوسپانسون سلولی با g ۳۶۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه مورد سانتریفوژ قرار گرفته و رسوب داده شدند. رسوب بدست آمده در محیط کشت MMA حل شده و برای OD 0.2 تنظیم شدند. انتقال اگروباکتریوم‌های حاوی ژن مورد نظر به فضای سلولی *Nicotiana benthamiana* شش هفته‌ای با روش اگروانفیلتراسیون همزمان از طریق سطح پشتی برگ صورت گرفت. چهار گیاه و از هریک سه موقعیت برگی از ناحیه پایین ساقه به سمت بالا، در مجموع دوازده تکرار انجام شد. از ترکیب *R2*/Av*R2* بعنوان کنترل مثبت و نیز نزدیکترین همولوگ‌های ژن مقاومت R2 یعنی RD11، جهت بررسی برهمکنش‌های احتمالی استفاده شد. چهار تا پنج روز پس از اینفیلتراسیون همزمان، نتایج حاصل از برهمکنش براساس ظهور علائم فوق حساسیت و یا عدم



شکل۱: باندهای اختصاصی *R3a*. از چپ به راست: پنج ستون اول حاصل بکارگیری نخستین گروه آغازگرهای اختصاصی (۲۵۶ جفت باز)، پنج ستون دوم حاصل تکثیر توسط دومین گروه آغازگرهای اختصاصی (۳۳۸ جفت باز) و سومین گروه حاصل تکثیر توسط سومین گروه آغازگرهای اختصاصی (۲۰۲ جفت باز) که در هر گروه نخستین ستون مربوط به تکثیر از روی DNA ژنومی، دومین ستون نتیجه تکثیر از روی کلون کاندید، سومین باند حاصل تکثیر از روی کلون حاوی ژن *R3a*، چهارمین و پنجمین ستون متعلق به استفاده از دو کلون دیگر R9 یعنی بترتیب 9D4-6 و 9D4-26 می‌باشد.

جدول ۲: آغازگرهای اختصاصی طراحی شده جهت تایید حضور ژن R3a در Ma.R9

آغازگر	توالی(5'----> 3')	موقعیت(*R3a*)	اندازه باند تولید شده (bp)
***R3a* Specific_F1**	ACCACAGGAAGATGTAATAA	۱۳۷۶ bp	۲۵۶
***R3a* Specific_R1**	CTCAAACTCACCACCATATC	۱۶۳۲ bp	
***R3a* Specific_F2**	CCCTTGGTTATAAACTTTCC	۲۷۰۳ bp	۳۳۸
R3a* Specific_*R2	TTACAGTAGGCAATAGTCAGT	۳۰۴۱ bp	
***R3a* Specific_F3**	AGAGATTGTTGGTGGTGAGA	۳۲۷۳ bp	۲۰۲
R3a* Specific_*R3	TTTGTAGACTTTGAAGCGAA	۳۴۷۵ bp	

ظهور آن ثبت گردید.

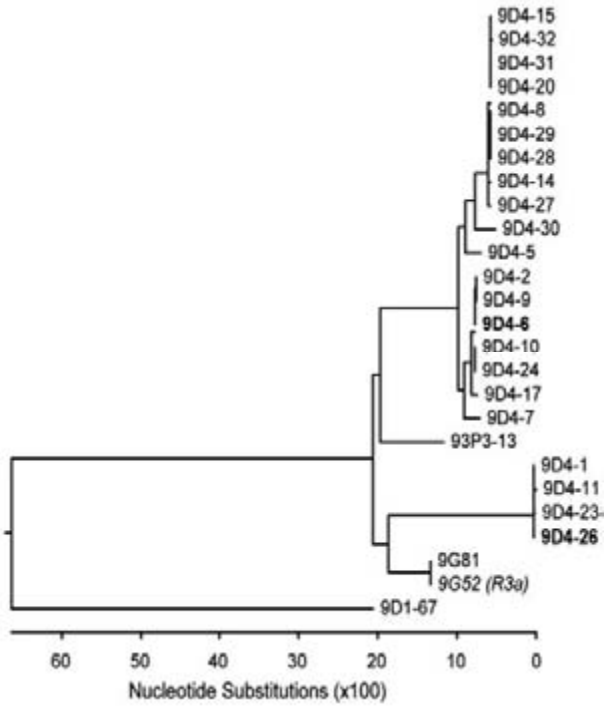
نتایج و بحث

تکثیر خانواده‌های ژنی *R3* و *R2* با استفاده از آنزیم فیوژن صورت گرفت و توالی های تکثیر شده پس از جداسازی از روی ژل وارد ناقل پلاسمیدی D-TOPO گردیدند. براساس نتایج حاصل از توالی‌یابی، همسانه حاوی ژن کامل *R3a* از بین همسانه‌ها شناسایی شد. جهت تایید حضور ژن مذکور در ژنوم Ma. R9 دمیسوم، پس از همخوانی کلیه توالی‌های بدست آمده از بانک‌های اطلاعاتی و همسانه‌های توالی‌یابی شده بدست آمده از این پژوهش، سه جفت آغازگر اختصاصی برمبنای نواحی موجود در ژن *R3a* که در هیچیک از همسانه‌های مذکور دیده نشده بود طراحی و مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۲، شکل ۱). حضور باند اختصاصی *R3a* در همسانه کاندید و ژنوم Ma.R9 و عدم تکثیر باند اختصاصی در سایر همسانه‌ها تایید کننده حضور این ژن است (شکل ۱).

براساس اطلاعات مارکری بدست آمده توسط هوانگ و همکاران (۲۰۰۵) *R9* شکل آللی *R3a* می‌باشد. اما براساس نتایج بدست آمده از این آزمایش برای اولین بار تایید می‌شود که این ژنوتیپ حاوی ژن *R3a* می‌باشد هر چند امکان حضور آلل‌های دیگر مقاومت نیز محتمل است. این ژن از دسته NBS-LRR می‌باشد که فراوان‌ترین دسته ژن‌های مقاومت در اامیست‌ها می‌باشد (۱۳).

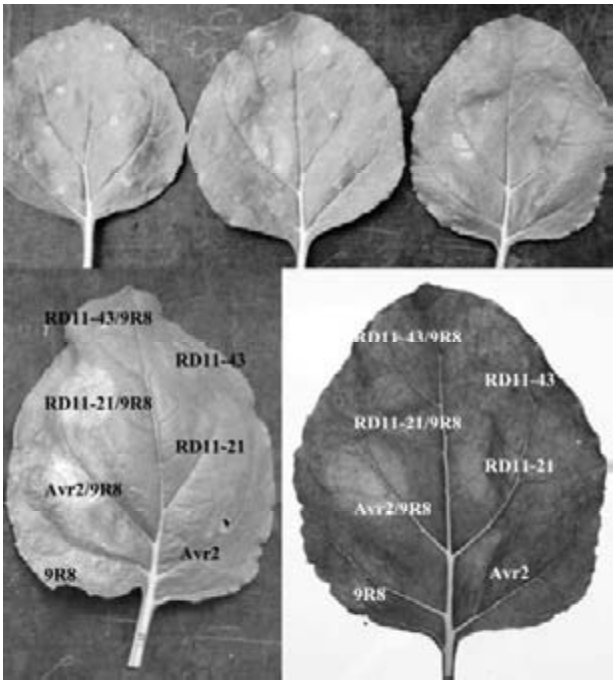
نتایج توالی‌یابی همسانه‌های شبیه *R2* و شبیه *R3a* با استفاده از نرم‌افزار Seqman مورد ارزیابی قرار گرفت. روابط فیلوژنتیک بین همسانه‌های با طول کامل مشابه *R3a* و *R2* با استفاده از نرم افزار Megalign رسم شد. رابطه فیلوژنتیکی بین کلیه توالی‌های شبیه *R3* بدست آمده از Ma.R9 چهار گروه مجزا را نشان می‌دهد (شکل ۲).

بدلیل تغییرات ناشی از حذف، اضافه و جایگزینی هیچیک از همسانه‌های شبیه *R3* با طول کامل بدست نیامد. بعنوان مثال در همسانه‌های 9D4-27 و 9D4-14 جهش نقطه‌ای در نوکلئوتید ۸۷۶ از نوع ترانسورژن بین آدنین و سیتوزین و در همسانه‌های 9D4-8,20,28,29,15 وقوع ترانسورژن در نوکلئوتید ۴۳۹ بین نوکلئوتیدهای سیتوزین و تیمین باعث ایجاد کدون پایان و خاتمه زودرس ژن گردیده است. در مجموع بیشترین تعداد جایگزینی‌ها بین بازهای



شکل ۲: شجره فیلوژنتیکی ۲۶ توالی کلون های R9 . کلون مربوط به ژن‌هایی که بصورت پررنگ نشان داده شده‌اند بهمراه DNA ژنومی، جهت تایید حضور ژن *R3a* در Ma.R9 مورد استفاده قرار گرفتند.

گوانین و آدنین و در سطح اسیدآمینه بین لوسین و سرین قابل مشاهده است. در ذرت و گندم نیز بیشترین میزان جایگزینی‌ها از نوع ترانزیسیون بین بازهای گوانین و آدنین بترتیب به میزان ۴۵ و ۵۵ درصد از چندشکلی تک نوکلئوتیدی[1]ها می‌باشد (۱۰). فراوان‌تر بودن جایگزینی‌های ترانزیسیون بجای ترانسورسیون بین سیتوزین و گوانین می‌تواند بدلیل ساختار شیمیایی دی ان ای باشد (۱۰). اطلاع از ماهیت و فراوانی این تغییرات می‌تواند در شناسایی اینکه اختلافات حقیقی و یا ناشی از خطاهای توالی‌یابی است کمک زیادی نماید. رابطه فیلوژنتیکی و تجزیه توالی همولوگ های ژن *R2* نشان داد که بیشترین میزان جانشینی در سطح نوکلئوتید بین گوانین و آدنین و در سطح اسیدآمینه بین لوسین و ایزولوسین می‌باشد. با توجه به یک قانون کلی، اکثر تغییرات، بخصوص در داخل ژن باید از نوع ترانزیسیون و احتمالا هم معنی[2] باشد به این معنا که تغییر در اسید امینه تفاوتی در عملکرد پروتئین حاصله ایجاد نمی‌نماید (۱۰). با توجه اینکه بیشترین شباهت بین همسانه 9R8 و ژن *R2* بدست آمد، ادامه آزمایش با روش اینفیلتراسیون همزمان صورت گرفت. آرمسترانگ و همکاران (۱) از روش اینفیلتراسیون همزمان جهت تایید فرم غیربیماریزای ژن *Avr3a KI* در توتون استفاده نمودند. مور و همکاران (۲۰۰۵) با استفاده از اینفیلتراسیون همزمان کاتالاز و باکتری، میزان تجمع پراکسید اکسیژن و مرگ سلولی را برآورد نمودند. ولیشوور و همکاران (۲۳) هیچگونه علایم مرگ سلولی پس از اینفیلتراسیون همزمان Rpi-blb1 و IpiO4 در توتون مشاهده نکردند. جهت انجام آزمایش ATTA[3] برگ‌های جوانتر مناسب‌تر از برگ‌های مسن می‌باشند در حالیکه براساس نتایج این آزمایش، برگهای مسن‌تر جهت انجام اینفیلتراسیون همزمان مناسب‌تر بودند. لذا بمنظور اینفیلتراسیون همزمان از برگهای مسن‌تر استفاده گردید. نتایج این آزمایش نیز نشان داد که برگ‌های جوانتر نسبت به برگ‌های مسن‌تر قاعده توتون به بیماری مقاوم‌تر هستند (۲۲،۱۹). ژن *Avr2* موجود در پلاسمید pGR106 (۱۶) در ناقل دوتایی نوترکیب PVX که امکان گسترش در منطقه وسیع‌تری از سطح برگ اما همراه با علائم موزاییک برگی

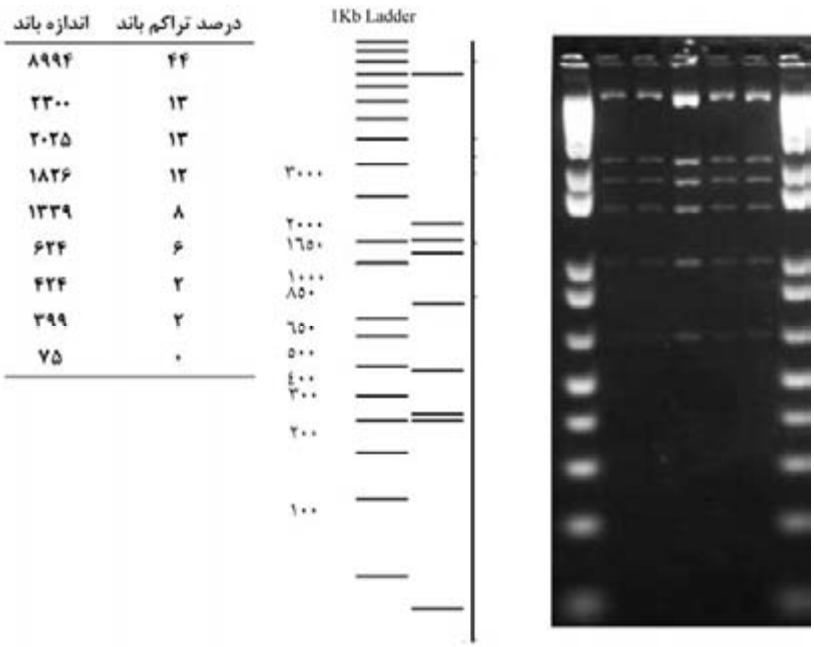


شکل۳: نتایج اینفیلتراسیون همزمان برگهای توتون با ژن همولوگ *R2* و Av*R2* و همولوگ های آن

را فراهم می‌نماید تراریخت و مورد استفاده قرار گرفت. در مواردی بدلیل استفاده از ناقل PVX و میزان تظاهر بالا، علائم نکروزه حول منطقه اینفیلتراسیون بیشتر از معمول مشاهده شد. در مطالعات صورت گرفته توسط سایر محققین که از ویروس بعنوان ناقل استفاده می‌نمایند نیز چنین امری مشاهده شده است (۲،۵). فایور-رامپانت و همکاران (۳) نشان داده‌اند که ناقل دوتایی مبتنی بر PVX، pGR106 در گونه های تتراپلوئید زراعی و دیپلوئید سولانوم و توتون بنتامیانا می‌تواند مورد استفاده قرارگیرد. براساس مطالعات ریتمن (۲۰۰۸) واکنش ایزوله‌ها و رتبه‌دهی جهت ATTA بسته به ژنوتیپ ۳ تا ۱۱ روز پس از آلوده‌سازی می‌تواند صورت گیرد. براساس نتایج اولیه همخوانی همسانه‌های شبیه *R2* و *R3a*، همسانه 9G52 بعنوان همسانه کاندید جهت آزمایش اینفیلتراسیون همزمان و انتقال موقت جهت تظاهر ژن مورد استفاده قرار گرفت (شکل ۳).

جهت تایید ژن و بررسی پایداری سازه در ناقل اگروباکتریوم استخراج پلاسمید، انتقال به ناقل باکتریایی و

1- Single Nucleotide Polymorphism (SNP) 2- synonymous 3- Agrobacterium Transient Transformation Assay



اندازه باند	درصد تراکم باند
۸۹۹۴	۴۴
۲۳۰۰	۱۳
۲۰۲۵	۱۳
۱۸۲۶	۱۲
۱۳۳۹	۸
۶۲۴	۶
۴۲۴	۲
۳۹۹	۲
۷۵	۰

شکل ۴- الگوی برش پنج پلاسمید تصادفی بدست آمده از باکتری DH5α حاوی ژن *9G29* توسط آنزیم *Hind*III و مقایسه الگوی برش یافته با الگوی مورد انتظار توسط نرم افزار ApE. تشابه در الگوی برش بین پلاسمیدها نشان دهنده پایداری سازه منتقل شده و تشابه با الگوی پیش بینی شده نرم‌افزار، تایید کننده حضور ژن مورد نظر است.

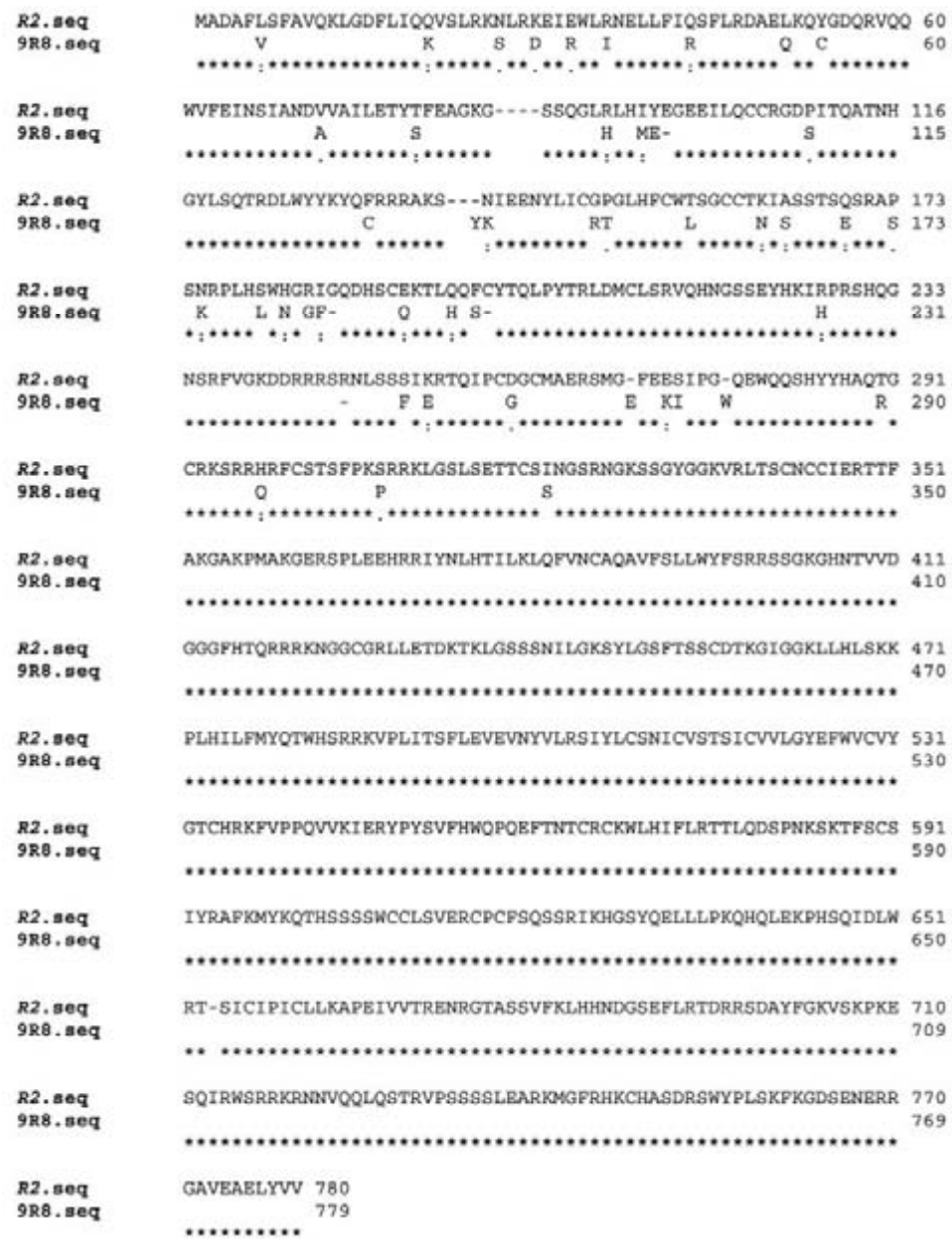
براساس اطلاعات توالی‌یابی، دامین LRR محصول ژن موجود در همسانه 9R8 هیچگونه تغییری نسبت به ژن *R2* نشان نمی دهد در حالیکه دامین NBS دارای تغییرات ژنی و ۴۴ جابجایی اسیدآمینه می‌باشد. محصول ژن *9R8* (*R2-Like*) با وزن مولکولی ۹۷۹۲۱ و طول ۸۴۵ واحد دارای نقطه ایزوالکتریک ۷/۷۴ می‌باشد (شکل ۵، جدول ۳).

جدول۳: خصوصیات ژن 9R8

اسید آمینه (ها)	تعداد	براساس وزن (٪)	براساس فراوانی (٪)
باردار (*R K H Y C D E*)	۲۸۷	۳۹/۱۰	۳۳/۹۶
اسیدی (*D E*)	۱۱۳	۱۴/۱۰	۱۳/۳۷
بازی (*K R*)	۱۱۶	۱۶/۹۰	۱۳/۷۳
قطبی (*N C Q S T Y*)	۲۰۸	۲۳/۵۸	۲۴/۶۲
آبگریز (*A I L F W V*)	۳۱۱	۳۶/۰۴	۳۶/۸۰

هضم DNA پنج همسانه تصادفی صورت گرفت. نتایج یکسان بدست آمده با نتایج قابل انتظار و الگوی برش مشابه نشان دهنده تایید حضور ژن و پایداری سازه موردنظر است (شکل۴). نتایج بدست آمده از اینفیلتراسیون همزمان نشان دهنده فعال بودن این ژن در مقابل ایزوله فعال در برابر ژن *R2* و *R3a* می‌باشد که حاکی از حضور آلل هومولوگ و فعال *R2* و حضور ژن *R3a* می‌باشد.

شناسایی بسیاری از ژنهای مقاومت برای نخستین بار از طریق روش‌های همسانه سازی مکانی صورت گرفته است که مبتنی بر پیوستگی مقاومت گیاه با مارکرهایی است که مکان فیزیکی آن‌ها بر روی ژنوم مشخص است. طی چند سال اخیر پیشرفت‌های عمده‌ای در ژنومیک گیاهی رخ داده که همسانه‌سازی مکانی در برنج و آرابیدوپسیس را بسیار کارآمدتر نموده و نتایج این پژوهش نیز می‌تواند حاکی از کارامد بودن این روش در خانواده سولانوم باشد (۲۰). در نهایت، مطالعات تکمیلی جهت بررسی تظاهر و فعال بودن ژن همسانه‌سازی شده در سطح گیاه و انتقال پایدار به سولانوم پیشنهاد می گردد.



شکل۵: مقایسه ژن R2 و ژن همولوگ آن در Ma.R9 شامل نواحی NBS و LRR با استفاده از نرم‌افـزار ClustalW. علامـت – نشان‌دهنده حذف واحد است. در ناحیه انتهای کربوکسیل، LRR، تغییری مشاهده نمی شود لذا بیشتر تغییرات تکاملی از نـوع جهش های هم معنی بوده که تغییری در نوع برهمکنش با ژن غیربیماریزای Avr2 نشان نمی‌دهد.

"*": حضور اسید آمینه یکسان (Identical residue) ؛ ":": جانشینی حفاظت شده (Conserved substitution)

"." : جانشینی نیمه حفظ شده (Semi-conserved substitution)

منابع

1-Armstrong M.R., S.C.Whisson, L.Pritchard, J.I. Bos, E.Venter, A.O.Avrova, A.P. Rehmany, U. Bohme, K. Brooks, I. Cherevach, N. Hamlin, B. White, A. Fraser, A. Lord, M.A. Quail, C. Churcher, N. Hall, M. Berriman, S. Huang, S. Kamoun, J.L. Beynon, and P.R.J. Birch. 2005. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene AvR3a, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:7766–71

2-Bendahmane A., B.A. Kohm, C. Dedi, D.C. Baulcombe. 1995. The coat protein of potato virus X is a strain-specific elicitor of Rx1-mediated virus resistance in potato. Plant J. 8: 933-941.

3-Bhaskar P.B., J.A. Raasch, L.C. Kramer, P. Neumann, S.M. Wielgus and J. Jiang. 2008. SgtI, but not RarI, is

essential for the RB-mediatedbroad-spectrum resistance to potato late blight. BMC Plant Biol. 8:2-9

4-Black W., C. Mastenbroek, W.R. Millsand, L.C. Paterson. 1953. A proposal for an international nomenclature of races of phytophthora infestans and of genes controlling immunity in Solanum demissum derivatives. Euphytica, 2: 173-178.

5-Bos J.I., T.D. Kanneganti, C. Young, C. Cakir, E. Huitema, J. Win, M.R. Armstrong, P.R.J. Birch, S. Kamoun. 2006. The C-terminal half of Phytophthora infestans RXLR effector AVR3a is sufficient to trigger R3a-mediated hypersensitivity and suppress INF1-induced cell death in Nicotiana benthamiana. Plant J. 48(2):165-76.

6-Bradshaw J.E., G.J. Bryan, A.K. Lees, K. McLean, and R.M. Solomon-Blackburn. 2006. Mapping the R10 and R11 genes for resistance to late blight (Phytophthora infestans) present in the potato (Solanum tuberosum) R-gene differentials of Black. Theor Appl Genet, 112:744-751.

7-Faivre-Rampant O., E.M. Gilroy, K. Hrubikova, I. Hein, S. Millam, G.J. Loake, P. Birch, M. Taylor and C. Lacomme. 2004. Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. Plant Physiol 134:1308–1316

8-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

9-Haverkort A.J., P.M. Boonekamp, R. Hutten, E. Jacobsen, L.A.P. Lotz, G.J.T. Kessel, R.G.F. Visser and E.A.G. Van der Vossen. 2008. Societal costs of late blight in potato and prospects of durable resistance through cisgenic modification, Potato Research 51:47–57

10-Henry R.J. 2008 plant genotyping II, CAB International PP.281

11-Huang S., E.A.G. van der Vossen, H. Kuang, V.G.A.A Vleeshouwers, N. Zhang, T.J.A Borm, H.J.V. Eck, B. Baker, E. Jacobsen and R.G.F. Visser. 2005. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. Plant Journal 42(2):251-61

12-Hubert D.A., P. Tornero, Y. Belkhadir, P. Krishna, A. Takahashi, K. Shirasu and J.L. Dangl. 2003. Cytosolic HSP90 associates with and modulates the Arabidopsis RPM1 disease resistance protein. Embo J. 22: 5679– 5689.

13-Hulbert S.H., C.A. Webb, S.M. Smith, and Q. Sun. 2001. Resistance gene complexes: Evolution and Utilization Annu. Rev. Phytopathol. 2001. 39:285–312

14-Lamour K.H., J. Win and S. Kamoun. 2007. Oomycete genomics: newinsights and future directions. Fems Microbiol. Lett. 274: 1–8.

15-Lehtinen A., A. Hannukkala, B. Andersson, A. Hermansen, V.H. Le, R. Nærstad, M.B. Brurberg, B.J. Nielsen, J.G. Hansen and J. Yuen. 2008. Phenotypic variation in Nordic populations of Phytophthora infestans in 2003 Plant Pathology 57, 227–234

16-Lu R., A.M. Hernandez, J.R. Peart, I. Malcuit and D.C. Baulcombe. 2003. Virus-induced gene silencing in plants. Methods 30: 296–303.

17-Malcolmson J.F. and W. Black. 1966. New R-genes in Solanum demissum Lindl. and their complementary races of Phytophthora infestans (Mont.) de Bary. Euphytica 15, 199–203.

18-Mur L.A.J., P. Kenton and J. Draper. 2005. In Planta measurements of oxidative bursts elicited by avirulent and virulent bacterial pathogens suggests that H2O2 is insufficient to elicit cell death in tobacco. Plant Cell Environ 28:548–561

19-Nelson H.E. 2006. Bioassay to detect small differences in resistance of tomato to late blight according to leaf age, leaf and leaflet position, and plant age. Australasian Plant Pathology 35(3): 297-301.

20- Ronald C.P. 2007. Plant-Pathogen Interactions: Methods and Protocols. Human Press PP.354

21-Torto G.A., S. Li, A. Styer, E. Huitema, A. Testa, N.A.R. Gow, P. Van West and S. Kamoun. 2003. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen Phytophthora. Genome Res. 13, 1675–1685.

22-Visker M.H.P.W., L.C.P. Keizer, D.J. Budding, L.C. Vanloon, L.T. Colon and P.C. Struik. 2003. Leaf position prevails over plant age and leaf age in reflecting resistance to late blight in potato. Phytopathology 93(6): 666-674.

23-Vleeshouwers V.G.A.A., H. Rietman, P. Krenek, N. Champouret, C. Young, S. Oh, M. Wang, K. Bouwmeester, B. Vosman, G.F. Visser, E. Jacobsen, F. Govers, S. Kamoun, E.A.G. Van der Vossen. 2008. Effector Genomics Accelerates Discovery and Functional Profiling of Potato Disease Resistance and Phytophthora Infestans Avirulence Genes PLoS ONE 3(8): e2875.

24-Wang M., S. Allefs, R.G. van den Berg, V.G.A.A. Vleeshouwers, E.A.G. van der Vossen, B. Vosman. 2008. Allele mining in Solanum : conserved homologues of Rpi-blb1 are identified in Solanum stoloniferum Theor Appl Genet 116:933–943

25-Wastie R.L. 1991. Breeding for resistance. In: Phytophthora Infestans: the Cause of Late Blight of Potato, Vol. 7 (Ingram, D.S. and Williams, P.H. (eds)), pp. 193–224. San Diego, CA: Academic Press.

26-Whisson S.C., P.C. Boevink, L. Moleleki, A.O. Avrova, J.G. Morales, E.M. Gilroy, M.R. Armstrong, S. Grouffaud, P. van West, S. Chapman, I. Hein, I.K. Toth, L. Pritchard, P.R.J. Birch. 2007. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. Nature 450, 115-118.

Functional cloning of resistant genes against late blight in *Solanum demissum* genotype

S.M.M. Mortazavian[1], A.A. Zali[1], A.A. Shah-Nejat Bushehri[1], M.R. Bihamta[1], E.A.G. Van der Vossen[2], J. Vossen[2]

Abstract

Demissum differentials are important for pathogen isolates identification. Recent studies show Ma.R9 contains *R2* and *R3* or homologues of the genes. This genotype has a high resistance against different isolates in the world. Candidate gene approach applied to isolate and cloning of these homologues in this genotype. Phylogenetic clades drawn and expression assay was done by coinfiltration in *N. benthamiana*. Result revealed this genotype contain *R3a* and also functional *R2* like gene. Alignment of *R2* gene against *R2*-like in amino acids level showed completely conserved residues in LRR region. Presence of more than one gene could be the reason of resistance against different isolates. These results confirm high efficiency of candidate cloning approach and effector genomics as new approaches.

Keywords: Cloning, *R2- R3-* like, Ma.R9, *Solanum demissum*

1, 2 - Contribution from College of Agriculture, University of Tehran and PRI, Wageningen, The Netherlands.