

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

سیدمحمد مهدی مرتضویان<sup>۱</sup>، عباسعلی زالی<sup>۲</sup>، علی‌اکبر شاه‌نجات بوشهری<sup>۳</sup>، محمدرضا بی‌همتا<sup>۴</sup>، ادوین ون در ووسن<sup>۵</sup>، جک ووسن<sup>۶</sup>

### چکیده

ارقام محک دمیسوم جهت تعیین نژاد ایزوله‌های پاتوزن اهمیت جهانی دارند. شناسایی آل‌های جدید مقاوم در برابر ایزوله‌های پاتوزن جهت ایجاد مقاومت پایدار از موارد مورد تاکید به‌نژادگران گیاهی است. مطالعات اخیر، نشان‌دهنده حضور ژن‌ها یا آل‌های همولوگ  $R3$  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 نخستین بار وجود ژن  $R3a$  در این ژنوتیپ به تایید رسید. از سوی دیگر از بین همولوگ‌های ژن  $R2$ ، همولوگ 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 پاتوزن 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 در جهت شناسایی ژن‌ها و آل‌های جدید می‌باشد. همخوانی دو ژن  $R2$  و همولوگ آن در سطح اسیدآمیننه نشان‌دهنده حفظ‌شدگی کامل ناحیه LRR و حذف، اضافه و جانشینی در بین واحدهای ناحیه NBS می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: همسانه‌سازی، همولوگ‌های  $R2$ ،  $R3$ ، 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 کربوهیدرات‌ها و عدم تنوع کافی محصولات غذایی می‌باشد. لذا در الگوی غذایی مطلوب پیشنهادی موسسه پژوهش‌های برنامه ریزی و اقتصاد کشاورزی و زرات جهاد کشاورزی برای مصرف گندم، برنج و قند و شکر کاهش نسبی و در مقابل برای انواع سبزی و میوه و حبوبات افزایش در نظر 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 پاتوزن‌های مهم سیب‌زمینی در ایران با توانایی بسیار بالا 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 سال‌های مختلف بخصوص در استان‌های 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 آل‌ها و یا ژن‌های مقاوم جدید با روش‌های نوین مولکولی و ادغام مجموعه‌ای از آنها می‌تواند یکی از راه‌های موثر در مبارزه علیه این بیماری محسوب شود. یکی از روش‌های 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.

گروههای مختلف جهت ترانسفورماسیون سیسژنیک ارقام سیب زمینی استفاده می‌شود می‌تواند بسیار مفید باشد (۹). کلیه ژنهای همسانه‌سازی شده مقاومت به بلایت دیررس متعلق به دسته NBS-LRRها هستند (۶). ژن *AvR3a* با ژن *R3a* مقاومت در گونه‌های وحشی دمیوسوم 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 *AvR3a* بعنوان یک امیست‌ها مدل، ویسون و همکاران (۲۶) نشان دادند که موتیف RXLR-EER برای جابجایی داخل سلول‌های میزبان سیب زمینی لازم است. تجزیه‌های محاسباتی نشان می‌دهد که تقریباً ۲۰۰ افکتور RXLR-EER کاندید در ژنوم فیتوفتورا اینفستانس وجود دارد (۱۴). هر دو نوع مقاومت اختصاصی و غیر اختصاصی به *P. infestans* در گونه‌های وحشی و زراعی سیب زمینی دیده می‌شود (۲۵). از جمله ژنهای با مقاومت اختصاصی ژن *RI* سولانوم دمیوسوم و از جمله تک ژنهایی که ایجاد مقاومت عمومی می‌نماید ژن *RB* یا *Rpi-blb1* است که از *S. tuberosum* بدست آمده است. بس و همکاران (۵) نشان دادند دو آلل *AvR3a* که در غیر بیماریزایی گیاهان حامل ژن *R3a* نقش دارند پروتئین‌هایی ترشح مینمایند که تنها در سه واحد که دو تای آنها در پروتئین کامل می‌باشند اختلاف دارند. ایزوله‌های غیر بیماریزای حامل آلل *AvR3a*، پروتئین *AVR3aKI* را کد می‌کنند در حالیکه ایزوله‌های بیماریزای تنها آلل بیماریزای *avR3a* کد کننده *AVR3aEM* را دارند. پاسخ فوق حساسیت تنها در برهمکنش بین پروتئین‌های *AVR3aKI* و محصول ژن *R3a* دیده شد. مشخص شده است که ۷۵ اسید آمینه ناحیه انتهایی کربوکسیل *AVR3aKI* که ناحیه RXLR را نیز شامل می‌شود برای غیر بیماریزایی و توقف فعالیت‌ها لازم است در حالیکه ناحیه انتهایی آمینو در انتقال و هدف‌گیری نقش دارند اما برای فعالیت افکتور لازم نیستند. این محققین همچنین دریافتند که هر دو اسید آمینه پلی مورفیک (واحد ۸۰) K و (واحد ۱۰۳) I مربوط به *AVR3a* کامل در فعالیت افکتور نقش دارند. براساس مطالعات شامپورت (۲۰۰۸) بین ژنهای RD11 و *AvR2*، ۲۳ درصد و براساس دامین کارکردی این دو، ۶۳ درصد

مقاومت پایدار استفاده از هرمی کردن ژنهای فعال یا آلل‌های مختلف بدست آمده از گونه‌های مختلف است. از میان گونه‌های غده‌ای جنس سولانوم، سولانوم دمیوسوم<sup>۱</sup> کاراترین گونه وحشی مورد استفاده تا امروز جهت ایجاد مقاومت در برابر بلایت دیررس سیب زمینی است. این الوهگزپلوئید می‌تواند بطور مستقیم با گونه‌های زراعی سولانوم توبروسوم تلاقی یابد. لذا تا بحال ۱۱ ژن مقاومت اصلی (ژن R) از این گونه به سیب زمینی زراعی انتقال یافته اند (۴، ۱۷). این یازده ژن مقاومت در قرن گذشته شناسایی شده اند که *RI* تا *RI1* 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 دمیوسوم جهت تعیین نژاد ایزوله‌های پاتوژن اهمیت جهانی دارند. از سوی دیگر، تشخیص ژنهای غیر بیماریزای 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<sup>۲</sup> بعنوان روشی امیدوارکننده باعث تسهیل در شناسایی ژن‌های مقاومت می‌گردد و تا حدی تکامل ژن‌های مقاومت را نیز روشن می‌نماید (۲۴). امیست‌ها<sup>۳</sup> بر روی بافت‌های گیاهی با تغییر سیستم دفاعی سلول گیاهی و به کمک 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 بیماریزای یا توکسین‌ها) و یا راه‌اندازی پاسخ‌های دفاعی (عوامل غیر بیماریزای یا الیستورها) می‌گردند (۲۱). افکتور ژنومیکس یا افکتورومیکس در جداسازی سریع ژن‌های مقاومت از طریق کاوش آللی 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 ترجیحاً متعلق به

بدست آمد. جهت تشکیل روابط فیلوژنتیک بین توالی های بدست آمده از برنامه Megalign v.8 استفاده شد. آغازگرهای هرز براساس گروه های فیلوژنتیک جهت تکثیر کامل ORF مربوط به خانواده ژنی *R3a* و نیز آغازگرهای مربوط به ژن *R2* طراحی گردید (جدول ۱). 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 پلیمرز 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، 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 خالص سازی و یا پس از حذف آغازگرهای جفت شده با استفاده از محلول 30% PEG8000/30mM MgCl2 در ناقل

همولوژی وجود دارد. جهت پی بردن به مکانیزم مقاومت ایجاد شده توسط ژن *RB* در سولانوم بالباکاستانوم، 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 نمی شود. 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 دمیسموم مقاوم در برابر ایزوله های فایتوفتورا اینفستانس شناسایی شده است. در مطالعه لنین و همکاران (۱۵) هیچ ایزوله ای که بیماریزایی روی *R9* نشان دهد مشاهده نشد. این محققین علت این امر را نبود فشارگزینی 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* می باشد لذا در این پژوهش با استفاده از روش ژن کاندید اقدام به همسانه سازی این ژن ها گردید.

## مواد و روش ها

DNA ژنومی از برگ های جوان ژنوتیپ *Ma.R9* با روش فولتون و همکاران (۸) استخراج شد. مجموعه توالی های همولوگ با *R3a* به طول ۳۸۴۹ جفت باز موجود در بانک های اطلاعاتی با استفاده از موتور جستجوی BLAST

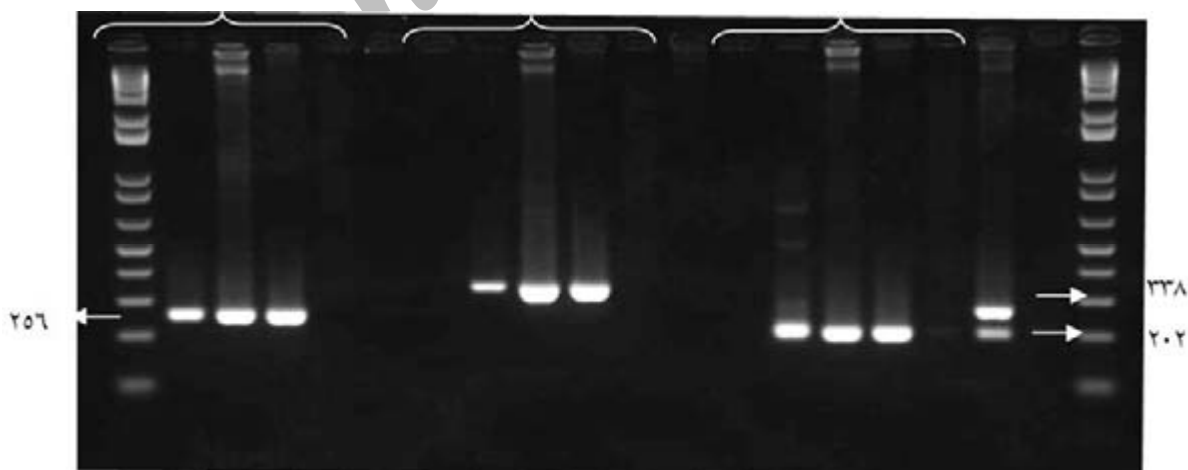
جدول ۱: آغازگرهای مورد استفاده جهت همسانه سازی ژن های همولوگ *R3a* (بازهای با حروف کوچک ناحیه لازم برای واکنش LR، F آغازگر رفت و R آغازگر برگشتی می باشد)

Gateway pDONR221 vector:	Sequence	Length (bp)
<i>R3a-GatBP-F</i>	GGGGCAACTTTgtacaaaaaagttgATGGAGATTGGCTTAGCAGTTGGTG	50
<i>R3a-GatBP-R</i>	GGGGCAACTTTGTACAACaaagttgTCACATGCATTCCCTATCGATCTT	49
pENTR D-Topo Vector:	Sequence	Length (bp)
<i>R3a-Clade1-F</i>	caccATGGAGATTGGSTTARCARTTGGTGGTG	32
<i>R3a-Clade1-R</i>	AMAKRYATTYCCHATYGATNWBATGGTGGRA	32
<i>R3a-Clade2-F</i>	caccATGGAKATTGGCTTWCWGTTGGTGGKGC	33
<i>R3a-Clade2,3-R</i>	AYWGGDATYYCMHATYRMTAWHTATGGTGGRRAT	34
<i>R3a-Clade3,4-F</i>	ATGGADATTGGCTTAGCAGTTGGTKGT	27
<i>R3a-Clade4-R</i>	TCACAGSYATTTCYCATYGATCTKTATAGTGGAA	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

تتراسایکلین (۴ μg/ml) و اسپیکتینومايسين (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 ایشیریشیا کلی DH5Alpha صورت گرفت. بررسی نتایج هضم پنج همسانه تصادفی، پس از استخراج پلاسمید، مورد بررسی قرار گرفت. اگر باکتریوم‌های مورد نظر پس از رسیدن به مرحله رشد لگاریتمی و تعیین OD سوسپانسیون سلولی با ۳۶۰۰ g 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 اگر باکتریوم‌های حاوی ژن مورد نظر به فضای سلولی *Nicotiana benthamiana* شش هفته‌ای با روش اگرواینفیلتراسیون هم‌زمان از طریق سطح پشتی برگ صورت گرفت. چهار گیاه و از هر یک سه موقعیت برگ از ناحیه پایین ساقه به سمت بالا، در مجموع دوازده تکرار انجام شد. از ترکیب *R2/AvR2* 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

پلاسمیدی D-TOPO و pDONR221 الحاق شد. پلاسمیدهای نو ترکیب 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 سانتی‌گراد 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 قرار گرفت. تجزیه توالی، بررسی همخوانی و بررسی روابط فیلوژنی با نرم افزارهای Seqman v.7، MEGALIGN v.7 و CLUSTAL-W انجام شد. جهت بررسی تظاهر ژن طی واکنش LR با واسطه آنزیم LR Clonase شرکت اینویترورژن، الحاق آغازکننده و خاتمه دهنده ژن *Rpi-blb3* در ناقل بیان دوتایی 236pKGW-MGW صورت گرفته و پس از تکثیر در باکتری‌های مستعد ایشیریشیا کلی<sup>۱</sup> همسانه‌های مورد نظر با روش کلونی پی سی آر، تعیین شدند. همسانه‌های مورد نظر 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



**شکل ۱:** 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	CTCAAACCTCACCACCATATC	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	

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

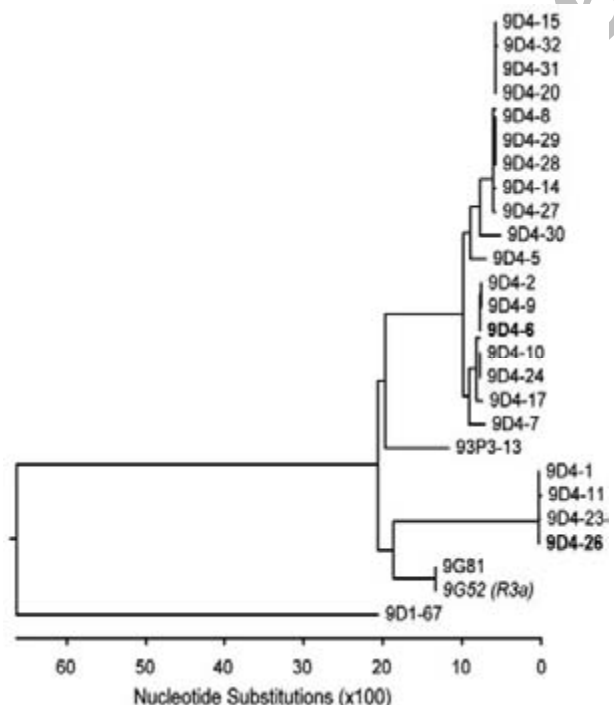
ظهور آن ثبت گردید.

## نتایج و بحث

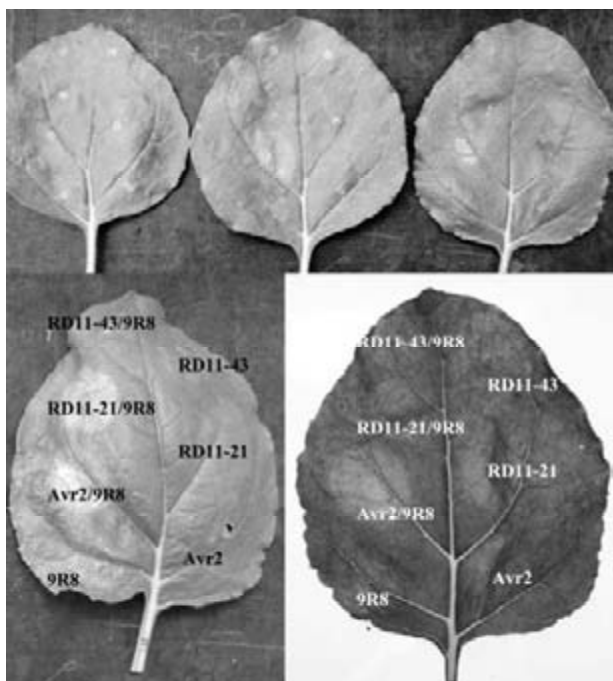
تکثیر خانواده‌های ژنی R3 و R2 با استفاده از آنزیم فیورژن صورت گرفت و توالی‌های تکثیر شده پس از جداسازی از روی ژل وارد ناقل پلاسمیدی D-TOPO گردیدند. براساس نتایج حاصل از توالی‌یابی، همسانه حاوی ژن کامل R3a از بین همسانه‌ها شناسایی شد. جهت تایید حضور ژن مذکور در ژنوم Ma.R9، دمیسوم، پس از همخوانی کلیه توالی‌های بدست آمده از بانک‌های اطلاعاتی و همسانه‌های توالی‌یابی شده بدست آمده از این پژوهش، سه جفت آغازگر اختصاصی بر مبنای 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 امیست‌ها 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 نرم‌افزار Megalign رسم شد. رابطه



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



شکل ۳: نتایج اینفیلتراسیون همزمان برگهای توتون با ژن همولوگ R2 و Avr2 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 (۵، ۲). فایور-رامپانت و همکاران (۳) نشان داده‌اند که ناقل دوتایی مبتنی بر PVX، pGR106، در گونه‌های تتراپلوئید زراعی و دیپلوئید سولانوم و توتون بتامیانا می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. 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).

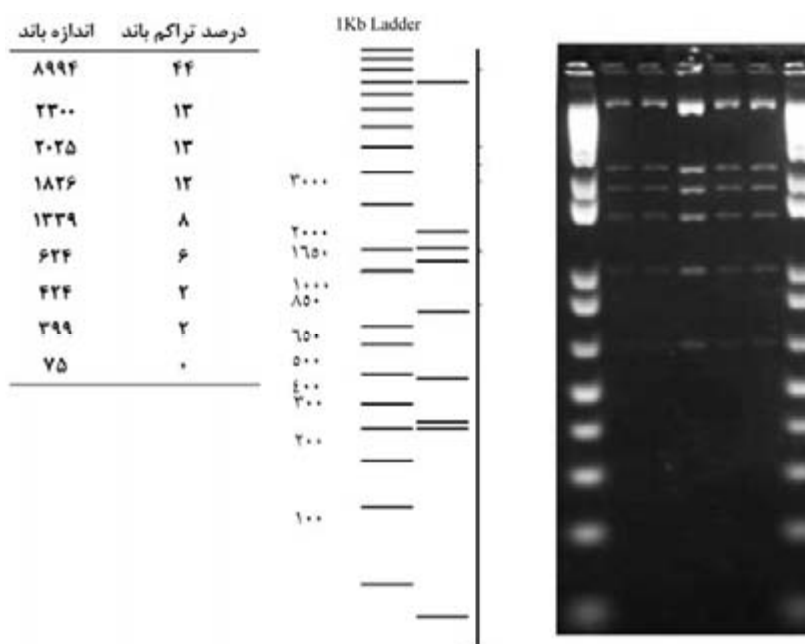
جهت تایید ژن و بررسی پایداری سازه در ناقل آگروباکتیریوم استخراج پلاسمید، انتقال به ناقل باکتریایی و

گوانین و آدنین و در سطح اسید آمینه بین لوسین و سرین قابل مشاهده است. در ذرت و گندم نیز بیشترین میزان جایگزینی‌ها از نوع ترانزسیون بین بازهای گوانین و آدنین بترتیب به میزان ۴۵ و ۵۵ درصد از چندشکلی تک نوکلئوتیدی<sup>۱</sup>ها می‌باشد (۱۰). فراوان تر بودن جایگزینی‌های ترانزسیون 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 اسید آمینه بین لوسین و ایزولوسین می‌باشد. با توجه به یک قانون کلی، اکثر تغییرات، بخصوص در داخل ژن باید از نوع ترانزسیون و احتمالاً هم معنی<sup>۲</sup> باشد به این معنا که تغییر در اسید آمینه 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. و لیشور و همکاران (۲۳) هیچگونه علائم مرگ سلولی پس از اینفیلتراسیون همزمان Rpi-blb1 و IpiO4 در توتون مشاهده نکردند. جهت انجام آزمایش ATTA<sup>۳</sup> 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 (۱۹، ۲۲). ژن *Avr2* موجود در پلاسמיד pGR106 (۱۶) در ناقل دوتایی نو ترکیب PVX که امکان گسترش در منطقه وسیع‌تری از سطح برگ اما همراه با علائم موزاییک برگی

1- Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

2- synonymous

3- Agrobacterium Transient Transformation Assay



شکل ۴- الگوی برش پنج پلاسمید تصادفی بدست آمده از باکتری DH5α حاوی ژن 9G29 توسط آنزیم HindIII 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 نرم افزار، تایید کننده حضور ژن مورد نظر است. براساس اطلاعات توالی یابی، 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 جایجایی اسید آمینه می باشد. محصول ژن 9R8 (R2-Like) با وزن مولکولی ۹۷۹۲۱ و طول ۸۴۵ واحد دارای نقطه ایزوالکتریک ۷/۷۴ می باشد (شکل ۵، جدول ۳).

جدول ۳: خصوصیات ژن 9R8

اسید آمینه (ها)	تعداد	براساس وزن (%)	براساس فراوانی (%)
پاردار (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
آپگریز (A I L F W V)	۳۱۱	۳۶/۰۴	۳۶/۸۰

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 آراییدوپسیس را بسیار کارآمدتر نموده و نتایج این پژوهش نیز می‌تواند حاکی از کارآمد 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 می‌گردد.

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 مورد نظر است (شکل ۴). نتایج بدست آمده از اینفلتراسیون همزمان نشان دهنده فعال بودن این ژن در مقابل ایزوله فعال در برابر ژن R2 و R3a می‌باشد که حاکی از حضور آلل همولوگ و فعال R2 و حضور ژن R3a می‌باشد. شناسایی بسیاری از ژنهای مقاومت برای نخستین بار از طریق روش‌های همسانه‌سازی مکانی صورت گرفته است

R2.seq	MADAFLSFAVQKLGDFLIQQVSLRKNLRKEIEWLRNELLPIQSFLRDAELKQYGDQRVQQ	60
9R8.seq	V K S D R I R Q C	60
R2.seq	WVFEINSIANDVVAILETYTFEAGKG---SSQGLRLHIYEGEEILQCCRGDPITQATNH	116
9R8.seq	A S H ME- S	115
R2.seq	GYLSQTRDLWYKYQFRRAKS---NIEENYLICGPGHLFCWTSGCCTKIASSTSQSRAP	173
9R8.seq	C YK RT L N S E S	173
R2.seq	SNRPLHSWHGRIGQDHSCEKTLQQFCYTLQPYTRLDMCLSRVQHNGSSEYHKIRPRSHQG	233
9R8.seq	K L N GF- Q H S- H	231
R2.seq	NSRFVKGDDRRSRNLSSSIKRTQIPCDGCMABERSMG-FEESI PG-QEWQSHYYHAQTG	291
9R8.seq	- F E G E KI W R	290
R2.seq	CRKSRHRFCSTSFPKSRRKLGSLSETTCSINGSRNGKSSGGYGGKVLRTSCNCCIERITTF	351
9R8.seq	Q P S	350
R2.seq	AKGAKPMAKGRSPLEHRRYINLHTILKLQFVNCAQAVFSLWYFRRSSGKGHNTVVD	411
9R8.seq		410
R2.seq	GGGFHTQRRRKNGGCGRLLLETDKTKLGSSSNILGKSYLGSFTSSCDTKGIGKLLHLHLSKK	471
9R8.seq		470
R2.seq	PLHILFMYQTWHSRRKVP LITSFLEVEVNVLRSIYLCVSTSI CVVLGYEFWVCVY	531
9R8.seq		530
R2.seq	GTCHRKFVPPQVVKIERYPYSVFHWQPOEFTNTCRCKWLHIFLRTTLQDSPNKSKTFSCS	591
9R8.seq		590
R2.seq	IYRAFMYKQTHSSSSWCCLSVERCPCFQSSRIKHGSYQELLLPKQHLEKPHSQIDLW	651
9R8.seq		650
R2.seq	RT-SICIPICLLKAPEIVVTRENRGTASSVFKLHHNDGSEFLRTDRRSDAYFGKVKPKPE	710
9R8.seq		709
R2.seq	SQIRWSRRKRNNVQQLQSTRVPSSSSLEARKMGFRHKCHASDRSWYPLSKFKGDSSENER	770
9R8.seq		769
R2.seq	GAVEAELYVV	780
9R8.seq		779

**شکل ۵:** مقایسه ژن R2 و ژن همولوگ آن در Ma.R9 شامل نواحی NBS و LRR با استفاده از نرم‌افزار ClustalW. علامت - نشان‌دهنده حذف واحد است. در ناحیه انتهای کربوکسیل، LRR، تغییری مشاهده نمی‌شود لذا بیشتر تغییرات تکاملی از نوع جهش‌های 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-mediated broad-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: new insights 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sup>1</sup>, A.A. Zali<sup>1</sup>, A.A. Shah-Nejat Bushehri<sup>1</sup>, M.R. Bihamta<sup>1</sup>,  
E.A.G. Van der Vossen<sup>2</sup>, J. Vossen<sup>2</sup>

### 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*